

学位授与番号：甲 951 号

氏 名：三本 麗

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 11 月 13 日

学位論文名：

DYRK2 は Snail の分解を介して乳癌上皮間葉転換を抑制する

主論文名：

DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail.

（DYRK2 は Snail の分解を介して乳癌上皮間葉転換を抑制する）

学位審査委員長：相羽恵介教授

学位審査委員：山田 尚教授、岡本愛光教授

論文要旨

(2部提出)

論文提出者名

三本麗

指導教授名 森川 利昭

主論文題名

DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail

(DYRK2はSnailの分解を介して乳癌上皮間葉転換を制御する)

Cancer letters, published online 08 July 2013

doi:10.1016/j.canlet.2013.06.005

<要旨>

上皮間葉転換は、細胞間接着因子である E-cadherin の発現が失われ、上皮細胞が間葉系細胞様の性質を獲得する現象である。上皮間葉転換を制御する因子として転写因子 Snail が重要といわれている。一方、リン酸化酵素 dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2)はこれまでの研究で乳癌の浸潤に関与する可能性が示唆されてきた。DYRK2 と Snail、そして上皮間葉転換の関連についてはこれまでに報告はなく、本研究を通して検討を行った。In vitroにおいて、乳癌細胞の中で浸潤能が低いとされる MCF-7 と、高いとされる MDA-MB-231 を用いて、DYRK2 の有無による浸潤能と上皮間葉転換における重要な転写因子である Snail、E-cadherin の発現について検討した。In vivo においては、DYRK2 の発現有無により転移能の変化を検討した。更に臨床検体を用いて乳癌における DYRK2 の発現と予後解析を行った。また DYRK2 が Snail のどの部位をリン酸化しているかを抗リン酸化抗体を用いて検討した。結果は、MCF-7 細胞内の DYRK2 の発現を RNA 干渉により抑えると、Snail の分解が止まり細胞内に蓄積し、E-cadherin の発現が抑制され浸潤能が顕著に増加した。一方 MDA-MB-231 においては DYRK2 の過剰発現により浸潤能が低下した。In vitro kinase assay において DYRK2 は Snail の 104 番目のセリンをリン酸化し、リン酸化は Snail のプロテアソームによる分解を促進していることが示唆された。移植実験においては、DYRK2 抑制細胞では骨転移・肺転移が認められた。実際の乳癌組織内においても、DYRK2 が低発現の組織では、遠隔転移再発が有意に多くなることが示された。細胞実験の結果と同様、DYRK2 低発現の乳癌では Snail の発現が上昇していた。これらの結果より、乳癌において DYRK2 は転写因子 Snail をリン酸化し、Snail の発現を介して上皮間葉転換と浸潤・転移を制御することが示された。

論文審査の結果の要旨

三本麗氏提出の学位申請論文は主論文1編、1冊よりなり、主論文題名は「DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail.(DYRK2はSnailの分解を介して乳がん上皮間葉転換を制御する)」と題するもので、インパクトファクター(2012): 4.258の英文誌Cancer Letters誌に発表されたもので、森川利明教授、吉田清嗣教授のご指導によるものです。

次に主論文の要旨と審査内容をご報告致します。

近年癌が転移する仕組みについて「上皮間葉転換」説という仮説が注目されています。正常上皮細胞は、胚発生時にはより移動性のある間葉細胞に転換して胚内の適切な位置へと移動します。上皮間葉転換とは、細胞間接着因子であるE-cadherinの発現が失われ、上皮細胞が間葉系細胞様の性質を獲得する現象であり、もしもこの現象が癌でも起こっていれば、癌細胞が組織から遊離して血流中へ入り、遠隔転移をきたす仕組みを説明できます。この上皮間葉転換を制御する因子として転写因子Snail、Twistなどが現在までに報告されています。一方、乳癌の浸潤については、リン酸化酵素dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2)が関与する可能性が示唆されています。そこで、本研究では乳癌における上皮間葉転換とSnail、DYRK2との関連性を検討しました。使用した細胞株は、乳癌細胞の中でも浸潤能が低いとされるMCF-7と、浸潤能が高いとされるMDA-MB-231であり、この2株を用いて、DYRK2の有無による浸潤能と転写因子であるSnail、そしてE-cadherinの発現について*in vitro*にて検討しました。*In vivo*では、DYRK2の発現有無による転移能の変化を検討、さらに臨床検体を用いて乳癌におけるDYRK2の発現と予後解析を行っています。またDYRK2がSnailのどの部位をリン酸化しているか、抗リン酸化抗体を用いて検討しました。結果は、MCF-7細胞内のDYRK2の発現をRNA干渉により抑えると、Snailの分解が止まり細胞内に蓄積し、E-cadherinの発現が抑制され浸潤能が顕著に増加しました。一方MDA-MB-231においてはDYRK2の過剰発現により浸潤能が低下しました。*In vitro* kinase assayにおいてDYRK2はSnailの104番目のセリンをリン酸化し、リン酸化はSnailのプロテアソームによる分解を促進していることが示唆されました。移植実験では、DYRK2抑制細胞では骨転移・肺転移が認められました。臨床検体を用いた乳癌組織の検討でも、DYRK2が低発現の症例では、遠隔転移再発が有意に多くなることが示されました。*In vitro*の結果と同様、DYRK2低発現の乳癌症例ではSnailの発現が上昇しました。以上の結果より、乳癌においてDYRK2は転写因子Snailをリン酸化し、Snailの発現を介して上皮間葉転換と浸潤・転移を制御する可能性が考えられました。

このような研究成果について平成25年10月9日、山田尚教授、岡本愛光教授、森川利昭教授ご臨席の下、公開論文審査委員会を開催致しました。席上、多くの質問がなされまし

た。

- DYRK2の癌における変異は報告されているか？
- DYRK2をノックダウンした細胞では間葉系の細胞に変化しているのか？
- DYRK2がこのSnailの分解に寄与する割合はどのくらいか？
- DYRK2抑制株ではER、PgR、HER2のステータスはどうなっているのか？
- 転移巣でのDYRK2とSnail/E-cadherinの関係はどうか？
- MCF-7細胞のp53のステータスは？
- Xenograft modelにてDYRK2の発現やSnail/E-cadherinとの相関は検討したか？
- 今回は肺転移・骨転移が認められたとのことだが、DYRK2低発現の乳癌に臓器特異性はあるのか？
- E-cadherinの発現変化だけがこの現象を引き起こしているのか？
- 上皮間葉転換を起こしても、転移巣を作るには足場の形成などほかの要因が重要である。その点については検討したか？
- DYRK2が転移に関与し、転移が生存率に関与するとのことだが、今回の結果では生存期間に有意差はでていない。どのように解釈するか？
- 生存期間に差が見られなかった理由として、転移巣に関連のないすべての死亡をみてしまったからではないか？
- 今後、DYRK2をターゲットにした治療戦略をたてたいとのことだが、具体的には何を予定しているのか？

など多くの質疑・討議がなされ、三本氏からは極めて的確かつ明快な回答がなされました。その後、山田教授、岡本教授と慎重審議の結果、本論文は乳癌においてDYRK2が転写因子Snailをリン酸化し、Snailの発現を介して浸潤・転移を制御する可能性を*in vitro*、*in vivo*臨床成績から示唆した有用な研究であり、今後「上皮間葉転換」説の理解や臨床応用を含めた研究のさらなる発展を期待するものと判断されました。ここに学位申請論文として十分な価値あるものと認めた次第であります。