

稲田大), 南沢 享. ニワトリ胚動脈管リモデリングにおける弾性線維断片化・形成不全の確認. 第91回日本生理学会大会. 鹿児島, 3月.

- 15) 南沢 享, 横山詩子 (横浜市立大). 動脈管閉鎖における細胞外基質の重要性. 第91回日本生理学会大会. 鹿児島, 3月.
- 16) 藤井輝之, 新谷正嶺, 塚本精一, 石渡信一 (早稲田大), 福田紀男, 南沢 享. ストレスファイバー様構造を形成したラット幼若心筋細胞のサルコメア動態の解析. 第91回日本生理学会大会. 鹿児島, 3月.
- 17) 草刈洋一郎, 上杉 健, 中井 岳, 志村大輔, 浦島 崇, 栗原 敏, 南沢 享. 肥大大心筋における線維化特異的発現因子の同定. 第91回日本生理学会大会. 鹿児島, 3月.
- 18) 志村大輔, 草刈洋一郎, 合田巨人 (早稲田大), 南沢 享. 乳酸による心房の興奮収縮連関に対する阻害効果. 第91回日本生理学会大会. 鹿児島, 3月.
- 19) 小比類巻生, 大山廣太郎, 広川恵里沙, 下澤東吾, 照井貴子, 南沢 享, 石渡信一, 福田紀男. 高速ライブイメージングを用いたマウス *in vivo* 単一サルコメア計測. 第91回日本生理学会大会. 鹿児島, 3月.
- 20) 赤池 徹, 謝 宜庭¹⁾, 劉 孟佳¹⁾, 大森衣里子, 横田知大¹⁾ (¹⁾早稲田大), 梶村いちげ, 南沢 享. ブラウンノルウェーラット動脈管における弾性線維形成の検討. 第91回日本生理学会大会. 鹿児島, 3月.

生 化 学 講 座

教授: 吉田 清嗣 分子腫瘍学, 病態医化学
准教授: 朝倉 正 がんの生化学, 病態医化学

教育・研究概要

I. p53による細胞死誘導の分子機構

癌抑制遺伝子産物 p53 は転写因子として, DNA 損傷に応答した細胞周期停止・DNA 修復・アポトーシス誘導に関与する遺伝子の発現を誘導する。発現を誘導する遺伝子の選択は p53 の翻訳後修飾によって担われていると考えられている。中でも, セリン 46 (Ser46) のリン酸化がアポトーシス誘導に非常に重要であることは明らかとなっているが, リン酸化された p53 がどのようにアポトーシスを誘導するかは未だ明らかとなっていない。そこで, 我々は Ser46 のリン酸化された p53 によって特異的に発現誘導される遺伝子の網羅的探索を行った。マイクロアレイを用いた解析の結果, 新規 p53 標的遺伝子として AREG (amphiregulin) が同定された。DNA 損傷下における AREG の機能を明らかにするために, AREG と会合する蛋白を質量分析法により解析した結果, 新規 AREG 会合蛋白として RNA ヘリカーゼ DDX5 が同定された。DDX5 は DNA 損傷下における microRNA のプロセシングに関与していることが知られている。そこで, microRNA のプロセシングに注目した解析を進めた結果, AREG は DDX5 と共に, 前駆体 microRNA である pri-miRNA から pre-miRNA へのプロセシングに関わっていることが明らかとなった。

II. DYRK2による Snail/E-cadherin を介した乳癌浸潤転移の制御

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。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。

III. プロテアソーム阻害剤耐性細胞の上皮間葉転換 (EMT) 誘発機構の解明: DUSP6 を介した ERK1/2 シグナル伝達系の関与

新規化学療法剤として用いられるようになったプロテアソーム阻害剤に対して耐性を獲得した細胞を樹立した。子宮内膜がん細胞 Ishikawa を Epoxomicin (EXM) で処理することにより得られた EXM 耐性細胞 Ishikawa/EXM は、E-cadherin 発現消失を伴い EMT を誘発し、E-cadherin 発現調節に関与する転写抑制因子は ZEB1 であることを明らかにしてきた。この発現調節系には dual specificity protein phosphatase 6 (DUSP6) の発現が消失していたのでその関与を検討した。DUSP6 は ERK1/2 を脱リン酸化することが知られているので、ERK1/2 によるシグナル伝達系の関与を調べた。

Ishikawa/EXM で DUSP6 の発現抑制と Fos-related antigen 1 (Fral) の発現亢進が見られた。ERK1/2 によるシグナル伝達系において ERK2 リン酸化 (活性化) は Fral をリン酸化し、その結果 ZEB1/2 を発現誘導することが報告されている。Ishikawa に Fral を強制発現させると ZEB1 に誘発された E-cadherin 発現抑制を引き起こした。さらに、Ishikawa の DUSP6 ノックダウン、あるいは DUSP6 の阻害剤 (E)-2-Benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (BCI) で活性を阻害すると、FRA1 発現亢進と E-cadherin 発現抑制を引き起こした。一方、Ishikawa/EXM への DUSP6 強制発現は FRA1 と ZEB1 の発現抑制に伴って E-cadherin 発現を誘導した。これらのことから、Ishikawa/EXM における DUSP6 の消失は FRA1 発現亢進を介した ZEB1 発現誘導を引き起こし、E-cadherin 発現を消失させたと考えられた。

すでに、ZEB1 発現に miR200 family の関与を明

らかにしているので、今後 Fral による miR200 の発現抑制について検討していく。

IV. 癌細胞膜表面高発現糖タンパク質 CD147 を標的とした高分子ミセルによる化学療法法の検討

高分子ミセルに抗 CD147 抗体 (aCD147ab) を標識し GSH-DXR を内封したミセル製剤は、aCD-147ab の高発現しているヒト類表皮癌細胞 A431 およびヒト子宮癌細胞 Ishikawa に特異的、かつ有効な抗腫瘍効果を示したので、担がんマウスでの *in vivo* 治療効果検討の準備を進めている。

V. ヒト高分化型肝細胞癌株を用いたフィブリノーゲンの産生

世界的に血液製剤の需要が増えているが、主要な供給源を献血に依存している限り、ウイルス感染などのリスクを回避することは困難である。そこで、安全・安定に血液製剤を供給可能な方法を開発することは重要である。我々は、高分化型の肝細胞癌株である FLC-7 と 2 種類の無血清培地 (ASF104N と IS-RPMI) を組み合わせ、フィブリノーゲンを効率的に産生する培養系の開発を試みた。その結果、培養系にラジアルフロー型のバイオリクターを用いた場合では、42 日間の長期培養が可能であり、1 日あたり 109.5 μ g のフィブリノーゲンを産生させることが可能であった。FLC-7 細胞が産生したフィブリノーゲンのサブユニット構成や凝固時間は血液製剤由来のものと同様であるため、我々が開発した培養系はフィブリノーゲンの効率的な生産システムの構築に有用であることが示唆された。

VI. 絶望行動に関与する脱ユビキチン化酵素 USP46 の研究

ユビキチン特異的プロテアーゼ (USP) は脱ユビキチン化酵素であり、特定の標的タンパク質からユビキチンを切り離すことでそのタンパク質の安定性や局在を調節する、ユビキチン-プロテアソーム系の調節因子である。近年、マウスの尾懸垂試験や強制水泳試験によるスクリーニングから、無動行動を起こさない CS マウスが見出された。その行動異常の原因遺伝子を検索するために量的形質遺伝子座解析を行った結果から、*Usp* 遺伝子が同定され、そのエクソンに 3 塩基の欠失が存在することが明らかになっている。この欠失は USP46 タンパク質の 92 番目のリジン残基を欠失させるが、このアミノ酸残基の欠失が USP46 の機能に及ぼす影響は不明である。そこで我々は、既に立体構造が明らかになっている

USP21を鋳型として、SWISS-MODELを用いたホモロジーモデリングを行い、USP46の立体構造を予測した。その結果、92番目のリジン残基はUSP46の活性部位とは離れた位置にあり、タンパク質表面のループ構造に存在することが予測された。これは92番目のリジン残基がUSP46の触媒活性に重要であるというよりは、USP46と結合するタンパク質との相互作用に重要である可能性を示唆する。そこでUSP46と結合するタンパク質を検索するため、ヒト神経芽細胞腫細胞株SH-SY5Yを用いてFlag-USP46(野生型および変異型)安定発現株を作製した。Flagに対する免疫沈降を行い、USP46と相互作用しているタンパク質をLC-MS/MS解析で同定したところ、いくつかのタンパク質を同定することが出来た。その中には既にUSP46との相互作用が示唆されているWDR48やDMWDが存在していたが、これらは野生型と変異型(Lys92欠失)の両方に結合することが明らかになった。現在、さらなる解析を進めている。

「点検・評価」

1. 研究

昨年度より講座担当教授として吉田清嗣が着任し、発がん機構の解明とがん治療への応用を主たる研究テーマとする講座へとリニューアルされた。一方これまでに講座で行われてきた研究も引き続き進行しており、新規と既存の研究課題が有機的に連携することで、相乗効果が期待される。特記すべき事項としては、まずDNA損傷において中心的な役割を果たしているがん抑制因子p53がどのように細胞死誘導を制御しているのかについて、その詳細な分子機構の一端を明らかにした。またDNA損傷で活性化されアポトーシスを誘導するDYRK2キナーゼの機能解析から、新たな癌の浸潤・進展機構が解明され、癌治療の標的分子となる可能性を提示することができた。また3次元ラジアルフローバイオリクターを利用したヒトアルブミン・フィブリノーゲンの安全大量産生法の開発をスタートさせ、高産生系の確立が期待されている。また多剤耐性をクリアするための作用機序の検討が重点的に行われ、臨床応用の可能性が充分手応えとして得られた。

2. 教育

主に医学科2年生、3年生、及び看護学科2年生の教育に携わっている。2年生前期の基礎医科学I「分子から生命へ」では、講義・演習・実習を分子生物学講座と密接に連携しながら担当している。演習や実習では、少人数による「議論を通じて考えて

理解する」能動的な学習を促すよう周知な準備のもと実施しており、多大な教員の負担はあるものの、充分それに見合う教育効果が得られていると考えている。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Mimoto R, Taira N, Takahashi H, Yamaguchi T, Okabe M, Uchida K, Miki Y (Tokyo Medical and Dental Univ), Yoshida K. DYRK2 controls epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail. *Cancer Lett* 2013; 339(2) : 214-25.
- 2) Taira N, Yamaguchi T, Kimura J¹⁾, Lu Z-G¹⁾ (¹Tokyo Medical and Dental Univ), Fukuda S²⁾, Higashiyama S²⁾ (²Ehime Univ), Ono M (National Cancer Center Research Institute), Yoshida K. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(2) : 717-22.

III. 学会発表

- 1) 松本倫典, 松浦知和, 前橋はるか, 青木勝彦, 矢永勝彦, 大川 清, 岩本武夫, 吉田清嗣, 高田耕司. ヒト高分化型肝細胞癌株を用いたフィブリノーゲンの効率的産生システム. 第68回日本消化器外科学会総会, 宮崎, 7月.
- 2) 松本倫典, 松浦知和, 前橋はるか, 青木勝彦, 矢永勝彦, 大川 清, 岩本武夫, 吉田清嗣, 高田耕司. ラジアルフロー型バイオリクターを用いたFLC-7細胞培養系でのフィブリノーゲン産生. 第86回日本生化学会大会. 横浜, 9月.
- 3) Dashzeveg N, Taira N, Yoshida K. P53 targets isoform of paralemmin protein in a serine 46 specific manner to promote apoptosis. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月.
- 4) 朝倉 正, 山口乃里子, 青木勝彦, 吉田清嗣. Epoxomicin 耐性細胞はDUSP6/MKP3発現消失に伴いZEB1発現を誘導しE-cadherin発現消失を促す. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月.
- 5) 平 直江, 木村純子, 吉田清嗣. 細胞死及びmicroRNA代謝制御に関わる新規p53関連遺伝子の同定. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月.
- 6) 加賀美裕也, 仁平啓史, 吉田清嗣. Mps1/TKは分裂期染色体凝集を制御する. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月.