

生 化 学 講 座

教 授：吉田 清嗣 分子腫瘍学，病態医化学

教育・研究概要

I. 乳癌幹細胞株 iCSCL10A の転移機構の解析

がんの浸潤・転移パターンを反映した転移モデルの作製は，病因の解明や治療法開発を目指す上で重要である。私たちは，近赤外蛍光タンパク質 iRFP を用いて乳癌幹細胞の骨転移モデルを作製した。乳癌幹細胞株 iCSCL-10A は，リプログラミング因子 (OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc) を乳腺上皮細胞株 MCF-10A に導入することによって樹立された人工乳癌幹細胞株である。本細胞株は，自己再生能や多分化能などの癌幹細胞の性質を保持し，免疫不全マウスに移植すると高率で腫瘍形成を認めるが，その転移能についてはわかっていない。そこで，生体透過性の高い近赤外蛍光タンパク質 iRFP を iCSCL-10A 細胞に安定発現させ，それを免疫不全マウスに心腔内投与し，in vivo 蛍光イメージングにより経時的に転移の有無を観察した。その結果，親株 MCF-10A 細胞を移植したマウスでは全く転移は認められなかったが，iCSCL-10A 細胞を移植したマウスでは，移植 4 週間後から高率に大腿骨・脛骨転移を認めた。従って，近赤外蛍光タンパク質 iRFP を用いることで，生体にストレスをかけずに経時的にがん転移のイメージングが可能であり，iRFP 標識乳癌幹細胞は高率に骨転移することがわかった。次に，骨転移を認めたマウスの両足から骨髓細胞を採集し，セルソーターを用いて iRFP 陽性細胞の割合を調べたところ，全体の 3～6%であった。この細胞を単離し，マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行い，骨転移に関与する因子を探索中である。

II. DYRK2 ノックアウトマウスの作製

我々は，これまでにリン酸化酵素 DYRK2 が，乳癌細胞において癌抑制遺伝子 p53 や細胞周期の主要転写因子 c-Jun や c-Myc のリン酸化を担う重要な分子であり，その発現低下は造腫瘍能を亢進，上皮間葉転換 (EMT) の亢進，浸潤・転移の促進させることを見出してきている。しかしながら，DYRK2 の in vivo 解析の知見については未解明のままであった。そこで，CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて DYRK2 遺伝子改変マウスの作製を行った。本年は，得られた F0 世代マウスから欠

失パターンの異なるマウス 3 匹を選び，野生型マウスとの交配により 3 種の F1 世代ヘテロ個体を得た。また F0 マウスの脳抽出液を用いて DYRK2 タンパク質の発現量を調べたところ，野生型と比べ F0 マウスでは，DYRK2 発現減少が認められ，DYRK2 遺伝子のゲノム編集を確認できた。現在，F1 ヘテロ個体同士を交配させ，ホモ個体を出し，表現型の異常を経時的に解析中である。

III. DYRK2 低発現の乳癌に対する治療法の探索

これまでに我々は癌細胞におけるリン酸化酵素 DYRK2 の働きについて研究を進めてきた。DYRK2 は乳癌・卵巣癌において発現が減少しており，低発現の癌では抗癌剤耐性を獲得し予後不良である。そのような乳癌に対して特異的に作用する治療法の探索を現在行っている。DYRK2 を恒常的にノックダウンした細胞株において mTOR pathway が活性化していることが，マイクロアレイを用いた解析により明らかとなった。mTOR 阻害剤であるエベロリムスを添加すると DYRK2 低発現の乳癌細胞ではコントロールと比較し感受性が増加した。Xenograft model における検討では，DYRK2 ノックダウン細胞は細胞障害性抗癌剤よりもエベロリムスでの腫瘍増殖抑制効果が高かった。これらの結果より，DYRK2 の発現が低い乳癌ではエベロリムスが特異的に作用することが示唆された。

平成 27 年度は新たに DYRK2 と mTOR の直接的な制御メカニズムについて明らかにした。DYRK2 が mTOR の 631 番目をリン酸化することで引き続いて FBW7 を介したユビキチン・プロテアソーム系による分解が生じた。また，臨床検体を用いた研究では DYRK2 低発現の再発乳癌において，エベロリムスが有意に予後を改善することを示した。

IV. 乳癌幹細胞の発生機構の解明

現在，DYRK2 が上皮間葉転換および乳癌幹細胞の存在に影響を及ぼすという実験結果を元に，DYRK2 による乳癌幹細胞の制御に焦点をあて，癌幹細胞の発生の分子機構の解明に取り組んでいる。DYRK2 低発現の乳癌細胞では転写因子 KLF4 の発現が上昇し CD44^{high}/CD24^{low} で標識される癌幹細胞の割合が増加した。また DYRK2 の発現量に依存してスフェア形成能・ヌードマウスにおける腫瘍形成能がともに変化した。本年度は，新たに臨床検体を用いた解析を行った。DYRK2 低発現の肺転移では顕著に CD44⁺/CD24⁻細胞と ALDH1 陽性細胞が増加しており，乳癌幹細胞の増加が示唆された。また，

DYRK2 と KLF4 をつなぐ因子として転写因子である Androgen Receptor が同定された。今後はこの DYRK2/AR/KLF4 を介した乳癌幹細胞制御をターゲットとした治療について検討していく。

V. がん細胞における TRIP13 の病態生理的意義の解明

新規ながん関連タンパク質である TRIP13 は、ヒトの正常組織では発現が低く（精巣等を除く）、がん細胞で高発現している。これまでに複数のがん細胞株に対して TRIP13 に対する shRNA を安定発現させたところ、がん細胞の増殖抑制と細胞死が誘導されることが明らかになった。この現象が TRIP13 の機能欠損によるものであることを示すため、siRNA を用いて内在性の TRIP13 の発現を抑制した細胞と、そこに外来性の TRIP13 (siRNA 抵抗性) 導入した細胞を比較したところ、TRIP13 の機能を相補することで細胞増殖が回復することが示された。したがって、がん細胞の増殖において TRIP13 は重要な機能を有していることが明らかになった。がん細胞における TRIP13 の機能を解明するために、TRIP13 の発現抑制に対して明確な表現型を示すがん細胞株を検索したところ、乳癌細胞部 MCF7 では siRNA の導入後 10 日ほど培養することで、細胞の増殖停止、細胞の伸展、核の巨大化、多核化などが観察されることが明らかになった。これらの細胞形態の変化は細胞老化と酷似している。実際に siRNA 導入後 10 日の細胞を回収し、ウエスタンブロッティング法を用いてタンパク質の発現を解析したところ、細胞老化マーカーであるがん抑制遺伝子産物 p21 の発現が亢進していた。また、細胞内の低エネルギー状態を感知するキナーゼである AMPK のリン酸化も亢進していた。一方、p53 の安定化やリン酸化の亢進は観察されなかったことから、p21 の発現は AMPK 経路を通して亢進していると考えられるが、今後のさらなる研究が必要である。さらに TRIP13 の遺伝子発現制御に関しても研究を行った。TRIP13 遺伝子のプロモーター領域（開始コドン上流 2720 塩基）をクローニングし、レポーターアッセイを行ったところ、開始コドンから上流 369 塩基で活性が最大となった。この領域に存在する転写因子認識配列を検索したところ、GABPA の結合配列が 2 箇所存在することが示唆された。そこで siRNA を用いて内在性の GABPA をノックダウンし、レポーター活性を解析したところ、確かに TRIP13 のレポーター活性が抑制されたが、同時に内部標準として使用した SV40 やチミジンキナーゼ

プロモーターの活性も抑制されてしまった。タンパク質の解析においても TRIP13 の発現の低下と共に様々な種類のタンパク質の発現が低下しており、GABPA は細胞内の広範囲な遺伝子発現を制御していることが示唆された。TRIP13 遺伝子の発現制御に関しては、今後はエピジェネティックな制御も考慮に入れて研究を進めていく予定である。

VI. Plk1 による分裂期染色体制御機構の解析

癌細胞はゲノム不安定性という特徴をもち、染色体の本数が増加した異数性であることが知られている。分裂期における染色体制御の異常は異数性の原因となり、細胞の癌化とその悪性化を促進すると考えられている。本研究では、癌での発現亢進が報告されている Plk1 というリン酸化酵素に注目した解析を通じて、異数性癌細胞における染色体制御機構を明らかにすることを目的とした。癌細胞株に Plk1 阻害剤を添加する実験を行った結果、Plk1 の活性阻害は分裂期において CAP-H2 蛋白質の発現低下を引き起こすことを見出した。CAP-H2 は condensin II と呼ばれる蛋白質複体のサブユニットの一つであり、分裂期での染色体の凝縮とその構造維持に機能することが知られている。Plk1 による CAP-H2 発現制御について解析を進めた結果、CAP-H2 の発現低下はユビキチンリガーゼである APC/Cdc20 を介した分解によることを明らかにした。また、Plk1 が CAP-H2 を直接リン酸化することを明らかとし、そのリン酸化部位として Ser288 を同定した。更なる機能解析の結果、Plk1 による CAP-H2 のリン酸化は分裂期における CAP-H2 の発現上昇と condensin II の活性化に必要であることを明らかにした。以上の結果から、分裂期において Plk1 は CAP-H2 の発現量と condensin II の機能を制御し、染色体構築に寄与していることが明らかとなった。

「点検・評価」

1. 研究

平成 24 年度より講座担当教授として吉田清嗣が着任し、発癌機構の解明と癌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、ようやくその研究成果を少しずつ発信できるようになってきている。平成 27 年度生化学講座の研究活動において特記すべき事項としては、まず DYRK2 による乳癌幹細胞の制御について、その詳細な分子機構の一端を明らかにした。また DYRK2 は様々な癌において発現が減少しており、低発現の癌では予後不

良であることを明らかにしている。またそのような癌において mTOR pathway の活性化を見出している。癌幹細胞化と合わせて、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。

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到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) Dashzeveg N, Yogosawa S, Yoshida K. Transcriptional induction of protein kinase C delta by p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *Cancer Lett* 2016; 374(1) : 167-74. Epub 2016 Feb 13.

II. 総説

- 1) Dashzeveg N, Yoshida K. Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane. *Cancer Lett* 2015; 367(2) : 108-12.

III. 学会発表

- 1) 奥五沢里美, 伊藤大介, 吉田清嗣. 大腸癌肝転移における DYRK2 の機能解析. 平成 27 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ: 動物モデル研究の新たな可能性-がん研究をこえて-. 大津, 2月.
- 2) Dashzeveg N, Yoshida K. The phosphorylation of p53 at ser46 is essential to induce cell death through palmdelphin in response to DNA damage. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2015. Philadelphia, Aug.
- 3) Shiozaki M, Fujimoto K, Sadaki T, Yoshida K, Utsunomiya K. PKCdelta is a key regulator of palmitate-induced beta cell death. 51st EASD (European Association for the Study of Diabetes) Annual Meeting. Stockholm, Sep.
- 4) Imawari Y, Mimoto RK, Yamaguchi N, Yoshida K. (Poster session C : Stemness and metastasis) DYRK2 contributes to the generation of breast can-

cer stem cells through KLF4. 10th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. Maui, Feb.