

生 化 学 講 座

教 授：吉田 清嗣 分子腫瘍学

教育・研究概要

I. 乳癌幹細胞株 iCSCL10A の骨転移機構の解析

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乳癌幹細胞株である。本細胞株は、自己再生能、多分化能、薬剤耐性能、造腫瘍能などの癌幹細胞の性質を保持しているが、その転移能については不明である。

そこで、近赤外蛍光タンパク質 iRFP713 を iCSCL-10A 細胞に安定発現させ、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転移の有無を調べた。その結果、移植 4 週間後から高率に大腿骨・脛骨転移、及び、肝臓、副腎転移を認めた。次に、iCSCL-10A 細胞の骨転移に関与する遺伝子を探索するため、セルソーターを用いて、移植 4 週間後のマウス骨転移巣から iCSCL-10A 細胞を単離し、マイクロアレイ解析により移入前後での遺伝子発現の変化を調べた。その結果、骨転移巣から単離した iCSCL-10A 細胞において、細胞接着、シグナル伝達、代謝などに関係する遺伝子の発現減少が認められた。また、これら遺伝子を過剰発現させた iCSCL-10A 細胞株を作製し解析を行ったところ、移動能・浸潤能の減少が認められた。従って、これら遺伝子は、乳癌の骨転移に対して抑制的に機能する可能性が示唆された。現在、これら過剰発現細胞株の転移能を解析中である。

II. DYRK2 の発現と安定性に関する研究

これまでの我々の研究から、タンパク質キナーゼである DYRK2 はがん抑制的な機能を有していると考えられる。実際に、複数のがん患者検体の免疫染色解析の結果から、がん部において DYRK2 の発現低下が示されている。しかしながら、細胞内での DYRK2 の発現調節機構についてはほとんど明らかになっておらず、どのような刺激にตอบสนองして DYRK2 の発現が変化しているかは不明である。そこで我々はがん細胞株をもちいて、他のがん抑制シグナルが DYRK2 の発現に与える影響を解析した。

Hippo シグナル経路は細胞間の接着を感知することで細胞増殖を抑制し、個体における臓器のサイズを規定する経路として知られている。MST1 はこの

経路の中心的なタンパク質キナーゼであり、がん抑制的な機能を有している。タンパク質間相互作用のデータベースを検索した結果、MST1 と DYRK2 の相互作用が示唆されたため、DYRK2 の機能調節に影響を与える候補分子として研究の対象とした。まず、細胞株を異なる密度で培養し、DYRK2 のタンパク質発現量を解析した。細胞を低密度で培養した場合には DYRK2 の発現は低かったが、細胞を高密度で培養した場合には DYRK2 の発現は高かった。定量 PCR の結果から、低密度培養と比較して高密度培養の方が DYRK2 の mRNA 発現量が約 2 倍であることが示された。細胞が高密度の条件下では Hippo シグナル経路は活性化しており、細胞増殖は抑制される。したがって、Hippo シグナルと DYRK2 が協調してがん抑制的な機能を発揮している可能性が示唆される。今後はこの可能性について詳細に検討していく予定である。

GSK3 β は多くのがん で機能が抑制されており、活性化した GSK3 β はがん細胞の遊走や浸潤を抑制することが知られている。GSK3 β の活性が DYRK2 の発現に与える影響を調べるため、我々は 大腸癌細胞株 (HCT116) を GSK3 β 阻害剤である塩化リチウム (LiCl) で処理し、DYRK2 の発現をイムノブロット法で解析した。その結果、DYRK2 の発現量は 5 時間の LiCl 処理で減少することが明らかになった。同様の結果は肺癌細胞株 (NCI-H460) や網膜上皮不死化細胞 (RPE1) でも確認された。この結果は GSK3 β による DYRK2 のリン酸化が DYRK2 タンパク質の安定性に寄与している可能性を示唆している。これまでに多くのタンパク質キナーゼについて、その機能発現には HSP90 のシャペロン活性を必要とすることが示されている。今回、我々は HSP90 阻害剤であるゲルダナマイシンを短時間 (5 時間) 処理することで DYRK2 のタンパク質量が減少することを見いだした。今後は GSK3 β シグナルによる DYRK2 の安定性や活性の制御の可能性について検討していく予定である。

III. リン酸化酵素の局在解析

細胞内キナーゼは、細胞内情報伝達系を担う分子として知られている。そのうち、本研究室ではいくつかのセリン・スレオニンキナーゼに着目し、これまでにその同定をはじめ、その性状・機能解析に関して世界でも先駆的な成果を挙げてきた。本研究では、こうした細胞内キナーゼとがんとの関連について解析を進めている。

われわれは細胞内キナーゼのうち、新たにキナー

ゼXについて、その細胞内局在解析を行ったところ、キナーゼXが細胞内のみならず細胞外にも局在することを見出した。実験系としては、生化学的手法をはじめ、可視的細胞生物学的、免疫学的手法を用いた。さらに内科学講座との共同研究により、この細胞内キナーゼXが患者血清で高値に検出されることを見出した。また、このキナーゼXが細胞膜糖鎖関連受容体に結合していることも見つけた。よって本研究から、細胞内キナーゼの新しい局在とがんとの関連を明らかにすることができた。今後は、機能解析をはじめ、細胞生物学的側面と病態学・臨床的意義の解明を目指して研究を進めていく予定である。

IV. がん幹細胞における Pim-1 の機能解析

がん幹細胞はがん細胞の中で幹細胞様の性質をもつ細胞集団として知られており、自己複製能、高い治療抵抗性をもつ。これら幹細胞様の性質は、浸潤や転移、再発などの原因となると考えられている。がん幹細胞は腫瘍内に極少数の割合で存在していると考えられているが、がん幹細胞に制御に関わる因子や細胞内シグナル伝達経路については不明な点が多い。Pim-1 はがん遺伝子と知られるリン酸化酵素であり、様々な基質のリン酸化を介して細胞増殖、生存、アポトーシスを制御することが報告されている。また、Pim-1 の高発現が多くのがん種で報告されているが、がん幹細胞での機能については不明である。本研究ではPim-1 キナーゼのがん幹細胞内での機能に注目し大腸癌細胞株を用いた解析を行った。過去の報告から、*in vitro*におけるsphere formation assayは自己複製能を有するがん幹細胞を選別する方法であることが明らかとなっていることから、sphere形成細胞でのPim-1の機能について解析を行った。その結果、Pim-1はsphere細胞で高発現していることを見出した。また、Pim-1の機能抑制はsphere形成を抑制した。Pim阻害剤を用いた解析から、Pim-1はsphere細胞においてAkt, mTORの活性を制御することが明らかとなった。これらの結果から、Pim-1はAkt/mTORシグナル伝達経路の活性化を介してがん幹細胞の自己複製能の制御に寄与している可能性が示唆された。

〔点検・評価〕

1. 研究

発癌機構の解明と癌治療への応用を主たるテーマとして研究活動を展開しており、その成果をコンスタントに発信できるようになってきた。2017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、まず乳癌幹細胞の骨転移について、モデル細胞を用いた解析からその詳細な分子機構の一端を明らかにした。また大腸癌細胞株を用いたがん遺伝子Pim-1キナーゼの解析から、がん幹細胞が集積していると考えられているスフィア形成細胞に高発現していることを見出した。またPim阻害剤を用いた解析から、Pim-1はスフィア形成細胞においてAkt, mTORの活性を制御することが明らかとなった。またリン酸化酵素の局在解析から、細胞外での存在を見出し、病気との関わりを示唆する結果を得た。

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。医学科2年生前期のコース基礎医科学Iのユニット「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の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) Honda M, Yogosawa S, Kamada M, Kamata Y, Kimura T, Koike Y, Harada T, Takahashi H, Egawa S, Yoshida K. A novel near-infrared fluorescent protein, iRFP720, facilitates transcriptional profiling of prostate cancer bone metastasis in mice. *Anticancer Res* 2017; 37(6): 3009-13.
- 2) Ito D, Yogosawa S, Mimoto R, Hirooka S, Horiuchi T, Eto K, Yanaga K, Yoshida K. DYRK2 is a suppressor and potential prognostic marker for liver metastasis of colorectal cancer. *Cancer Sci* 2017; 108(8): 1565-73.
- 3) Kagami Y, Ono M, Yoshida K. Plk1 phosphorylation of CAP-H2 triggers chromosome condensation by condensin II at the early phase of mitosis. *Sci Rep* 2017; 7(1): 5583.

II. 総説

- 1) Aoki K, Yoshida K. 4. Biological consequences of priming phosphorylation in cancer development. In: Prignet C, ed. *Protein Phosphorylation*. London: Intech, 2017. p.73-96.
- 2) 三本 麗, 吉田清嗣. 【乳癌学-最新の診断と治療-】乳癌の分子生物学と発症機序 癌幹細胞の概念. 日臨

2017；75(増刊3 乳癌学)：102-6.

- 3) 山田幸司, 米田悦啓, 岡 正啓. 第4編：検査・診断法 第1章：新規腫瘍マーカーと診断技術 第2節：核輸送因子インポーター $\alpha 1$ の新たな機能. 次世代がん治療：発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス, 診断法まで. 東京：エヌ・ティー・エス, 2017. p.285-94.

III. 学会発表

- 1) 山本武徳, 仁平直江, 奥五沢里美, 青木勝彦, 吉田清嗣. RNF8とDYRK2の相互作用はDNA二本鎖切断部位へのDNA修復因子のリクルートを制御する. 第75回日本癌学会学術総会. 横浜, 9月.
- 2) 木澤隆介, 青木勝彦, 多胡直子, 吉田清嗣. DYRK2の活性制御機構に関する研究. 第134回成医学会総会. 東京, 10月.
- 3) 奥五沢里美, 吉田清嗣. 乳癌幹細胞株の骨転移に関する遺伝子の解析. 平成29年度先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会. 茅野, 9月.

分子生物学講座

教授：松藤 千弥 生化学, 分子生物学
講師：村井 法之 生化学, 分子生物学
講師：小黒 明広 分子生物学

教育・研究概要

I. 教育概要

今年度は以下の講義・演習・実習を担当した。

- ・コース基礎医学Ⅰのユニット「分子から生命へ」講義（アミノ酸代謝, 核酸代謝, 遺伝子発現制御）
- ・コース基礎医学Ⅰのユニット「分子から生命へ」演習（タンパク質の一生, バイオインフォマティクス, バイオハザードとケミカルハザード, 生体分子の探査法）
- ・コース基礎医学Ⅰのユニット「分子から生命へ」実習（食欲・体重調節機構：レプチンとレプチン受容体）
- ・コース外国語Ⅲのユニット「医学英語専門文献抄読Ⅰ」
- ・コース臨床基礎医学のユニット「症候学演習」
- ・コース臨床基礎医学のユニット「感染・免疫テュートリアル」
- ・コース臨床基礎医学のユニット「行動科学」

II. 研究概要

当講座ではアンチザイム（AZ）というポリアミン調節タンパク質の分子機能に焦点を当て、ポリアミン調節系の生物学的意義の解明と医学的応用を目的として研究を推進している。ポリアミンは細胞増殖に必須の生理活性物質であり、個体発生や発がん深く関わっているばかりでなく、最近ではオートファジーを介した長寿（老化抑制）や血管の炎症抑制による動脈硬化予防にも関与していることが報告されている。AZは細胞内のポリアミン濃度が高値となると翻訳フレームシフト機構によって発現誘導され、ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素（ODC）に結合し、その活性を抑制するとともにプロテアソームによる分解を促進する。またAZはポリアミンの細胞内への取り込みも抑制する。このようにAZは細胞内ポリアミンの濃度のフィードバック調節を行っている。また、AZにはその機能を抑制するタンパク質、アンチザイムインヒビター（AZIN）が存在する。本年度は、このポリアミン調節タンパク質アンチザイムの発現機構や