

聖一, 井田博幸. 急性腹症が疑われた基礎疾患のない
上腸間膜動脈症候群の1例. 日小児救急医学会誌
2020; 19(1): 82-5.

生 化 学 講 座

講座担当教授: 吉田 清嗣 分子腫瘍学

教育・研究概要

I. 乳癌幹細胞株 iCSCL10A における新規骨転移抑制因子の同定

乳癌の罹患率は年々増加の一途を辿っている。早期に発見し治療を行えば死亡率は低いが、遠隔転移を伴うステージIVでは、急激にその割合が増加することから、転移を防ぐことが、重要な課題である。乳がん骨転移に対する治療法は、これまで抗がん剤治療、分子標的治療、ホルモン療法が行われてきたが、効果的な治療法がなく画期的な治療法の開発が急務となっている。

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、骨転移巣から iCSCL-10A 細胞を単離し、網羅的遺伝子発現解析により移入前後での遺伝子発現変化を調べた。その結果、骨転移巣から単離した iCSCL-10A 細胞において、carbonic anhydrase 13 (CA13) の顕著な発現減少が認められた。そこで、CA13 を iCSCL-10A 細胞に過剰発現し、移動・浸潤能、転移能について検討した。その結果、CA13 過剰発現 iCSCL-10A 細胞は、コントロールに比して、移動・浸潤能、骨転移能の有意な減少が認められた。さらに、CA13 低発現乳癌患者では、予後不良となることから、CA13 が新規予後予測因子となりうる可能性が示唆された。本研究から、CA13 が新たな乳癌骨転移抑制因子となる可能性が示唆された。

II. DYRK2 欠損マウスは先天性奇形症候群の疾患モデルとなる

我々は、これまでリン酸化酵素 DYRK2 の機能同

定を行ってきた。これまでの解析から、乳がん細胞において DYRK2 発現低下は、細胞周期進行、発癌の亢進、浸潤・転移の促進などを認めた。また、これまでの報告から、DYRK2 発現低下は、大腸がん、肝がん、リンパ腫、膀胱がん、卵巣漿液性腺がんなど多数のがんで患者の予後不良と相関していることが見出されている。以上のことから、DYRK2 は、これまで多くのがんの進展・転移を抑制することが明らかとなっており、新たな治療ターゲットとしての可能性が期待される分子である。しかしながら、マウス個体レベルにおける知見については全く不明である。そこで、DYRK2 のマウス個体レベルでの機能を明らかにするため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて DYRK2 欠損マウスの作製を試みた。得られた F0 世代マウスの DYRK2 遺伝子配列を調べたところ、片側アレルでのみ欠失変異を起こし、フレームシフトによりナンセンス変異を起こしているヘテロ欠損マウスを得た。このマウス同士を交配し、DYRK2 欠損マウスの作出を行ったところ、成体の DYRK2 欠損マウスは得られなかった。そこで、DYRK2 欠損マウスの胎生期の解析を行ったところ、胎生 18.5 日目までメンデルの法則に従い生存していたが、肺低形成による呼吸不全を引き起こし、出生直後致死となることがわかった。また、DYRK2 欠損胎児は、骨低形成、腸管低形成、鎖肛、気管食道狭窄、腎低形成、四肢奇形が認められ、これら表現型の異常は、先天性奇形である VATER 症候群 (V=椎体異常, A=肛門奇形, TE=気管食道瘻, R=橈骨奇形及び腎奇形という 5 徴候の頭文字の組み合わせで命名) の症状と類似することがわかった。

また、DYRK2 欠損胎児を用いた網羅的遺伝子発現解析から、VATER 症候群において変異が見いだされている *Foxf1* 遺伝子の発現減少が認められた。さらに、DYRK2 欠損肺において、*Foxf1* の濃度勾配が消失しており、それによって気管と肺胞の形成異常を呈することが明らかとなった。以上のことから、DYRK2 はマウスの生存に必須であり、DYRK2 欠損マウスが、VATER 症候群の病態を解明する有用なモデルとなる可能性が示唆された。

Ⅲ. 組織発生における DYRK2 の機能解析

本研究は、我々が、DNA 損傷時にアポトーシスを誘導する p53 の Ser46 リン酸化酵素として同定した Dual specific tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) に関し、さらなる機能解析を目的としている。具体的には、DYRK2 の、1. 組織発生における機能、2. 組織・がん幹細胞にお

ける機能、ならびに、3. 大腸がんにおける DYRK2 の腫瘍抑制効果の解析、の 3 点に関して検証した。

1. 組織発生における機能解析

正常な組織発生は、シグナリングの時空間的発現パターンにより決定付けられる。これらシグナリングは、構成分子の遺伝子発現だけでなく、リン酸化を始めとする翻訳後修飾により厳密に制御されている。しかしながら、組織発生における DYRK2 の機能は、これまでに報告されていない。そこで、本研究では、*Dyrk2* 欠損マウスの表現系解析を中心に解析を行った。*Dyrk2* 欠損マウス個体ならび *Dyrk2* 欠損細胞 (マウス胎仔線維芽細胞 MEF) を用いた解析から、DYRK2 により制御される候補シグナルを同定した。現在、同定したシグナリングにおける DYRK2 の分子機序の解明を進めている。

2. 組織・がん幹細胞における DYRK2 の機能解析

発がん過程には、組織幹細胞が cancer-initiating cells に性質転換する例が報告されている。DYRK2 の局在解析から、DYRK2 が複数の組織幹細胞で発現している可能性を見出した。そこで、cancer-initiating cells における DYRK2 の機能解析を行うために、*Lgr5* 発現細胞で特異的に *Dyrk2* を欠損するマウス (*Dyrk2*^{lox}; *Lgr5*-CreERT2-IRES-EGFP マウス) を作出した。現在、本マウスの解析を進めている。

3. 大腸がんにおける DYRK2 の腫瘍抑制効果の解析

これまでに、我々は、大腸がんにおいて *Dyrk2* のノックダウンを行うことで、増殖性が亢進することを *in vitro* で報告している。そこで、DYRK2 の過剰発現が腫瘍溶解に寄与するかを検討している。大腸がん細胞株の Xenograft モデルを作製し、アデノウイルスを用いた DYRK2 過剰発現の効果を、増殖抑制ならびにアポトーシス誘導という観点から解析中である。

Ⅳ. 型破り分泌の機能解析

タンパク質が細胞外に分泌されるためにはリン脂質二重層からなる内膜を通過する必要がある。一般的に細胞外に分泌されるタンパク質は、合成時に持つ分泌シグナルに依存して内膜を通過し分泌される。しかし細胞外液中には分泌シグナルを持たないタンパク質も存在し、近年、様々なタンパク質が型破り分泌されることが報告されはじめています。特に免疫系の研究では、型破り分泌が炎症応答機構の一つとして示されている。一方で型破り分泌とがん細胞との直接的な関係を示す報告は現在までに皆無である。

これまでにわれわれは、型破り分泌が生きた肝がん細胞で観測されることを見出し、その機能解析を先駆的に進めてきた (Yamada K, et al. Sci Rep 2016)。このうち肝がんの診断や治療に活用できる候補として PKC δ の同定に成功した。実際に細胞株を用いた解析から、PKC δ の細胞外分泌が肝がんでは特異的に高検出されることを見出した。ヒト血清を用いた解析では、血中 PKC δ が現在臨床検査で使われている腫瘍マーカー (AFP や PIVKA-II) より慢性肝炎・肝硬変と肝がんを鑑別する診断精度が高く優れていることが判明した。また機能解析の成果、細胞外の PKC δ がヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合して、肝がんの細胞増殖能を亢進させる作用を持つことを突き止めた。細胞外の PKC δ を標的とする抗体の作出にも成功し、抗腫瘍効果が確認できたため、現在抗体医薬品シーズとして実用化研究を進めている。これらの成果を総括すると、PKC δ の型破り分泌は肝がんにて特化しており、増殖機構にも直接寄与することから、PKC δ の型破り分泌が肝腫瘍形成を規定する病態機構を担っているのではないかと考えられる。今後その機序を問う。

V. CRISPR/Cas9 法を用いた特定遺伝子の発現抑制

遺伝子サイレンシングは特定の遺伝子の機能を明らかにする上で有用な手法である。従来から行われている RNA 干渉を利用した方法は、1. 完全な発現抑制が出来ない、2. 多くの場合で発現の回復が観察される、などの点で実験系としては不十分である。近年、ゲノム編集法を用いて特定の遺伝子の発現を抑制できることが示され、各方面で用いられるようになってきている。そこで、我々もゲノム編集法の一つである CRISPR/Cas9 法を用いて、がん細胞株における特定遺伝子の破壊を試みた。CRISPR/Cas9 法による遺伝子破壊には複数の方法があるが、我々はレンチウイルスベクター系とプラスミド系を用いて、それぞれにおける遺伝子破壊の効率を見積もった。まず、lentiCRISPR v2 プラスミドをパッケージベクターと共に 293T 細胞へ導入し、レンチウイルスベクターの粒子を得た。この粒子を多重感染率が 1 になるように様々ながん細胞株に感染させ、ピューロマイシン耐性の細胞をクローン化した。それらのクローンを解析したところ、多くのクローンではゲノム編集が生じておらず、遺伝子を破壊することができなかった。一方、lentiCRISPR v2 プラスミドをリポフェクション法で細胞に導入し、強くピューロマイシン選択を行ったところ、生存し

た細胞の大部分でゲノム編集が生じていた。これらのゲノム編集効率の差は、細胞内で発現する Cas9 タンパク質量の違いで生じていると考えられる。

「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。2019 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、DYRK2 欠損マウスの胎生期の解析を様々な角度から検証し、いくつかの病態との類似性を見出している。得られた結果は原著論文として発表する準備を進めている。

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) [Nomoto H](#), [Maehashi H](#), [Nakamura M](#), [Masaki T](#), [Mezaki Y](#), [Park J](#), [Aizawa M](#), [Ohkawa K](#), [Yoshida K](#), [Matsuura T](#). Bio-artificial bone formation model with a radial-flow bioreactor for implant therapy -comparison between two cell culture carriers: porous hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate beads. *Hum Cell* 2019; 32(1) : 1-11.
- 2) [Yokoyama-Mashima S](#), [Yogosawa S](#), [Kanegae Y](#), [Hirooka S](#), [Yoshida S](#), [Horiuchi T](#), [Ohashi T](#), [Yanaga K](#), [Saruta M](#), [Oikawa T](#), [Yoshida K](#). Forced expression of DYRK2 exerts anti-tumor effects via apoptotic induction in liver cancer. *Cancer Lett* 2019; 451: 100-9.
- 3) [Mimoto R](#), [Yogosawa S](#), [Saijo H](#), [Fushimi A](#), [Nogi H](#), [Asakura T](#), [Yoshida K](#), [Takeyama H](#). Clinical implications of drug-screening assay for recurrent metastatic hormone receptor-positive, human epidermal receptor 2-negative breast cancer using conditionally reprogrammed cells. *Sci Rep* 2019; 9(1) : 13405.
- 4) [Kanno N](#), [Fujiwara K](#), [Yoshida S](#), [Kato T](#), [Kato Y](#).

Dynamic changes in the localization of neuronatin-positive cells during neurogenesis in the embryonic rat brain. *Cell Tissue Organs* 2019; 207(3-4) : 127-37.

- 5) Hayashi M, Madokoro H, Yamada K, Morimoto C, Sakamoto M, Yanagawa H, Yamada T. Novel antibody-drug conjugate with anti-CD26 humanized monoclonal antibody and Transcription Factor IIIH (TFIIH) inhibitor, triptolide, inhibits tumor growth via impairing mRNA Synthesis. *Cancers (Basel)* 2019; 11(8) : 1138.

II. 総 説

- 1) Yamada K, Yoshida K. Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2019; 1866 : 839-48.
- 2) Yoshida S, Yoshida K. Multiple functions of DYRK2 in cancer and tissue development. *FEBS Lett* 2019; 593(21) : 2953-65.

III. 学会発表

- 1) 與五沢里美, 吉田清嗣. DYRK2 欠損マウスは肺低形成により呼吸不全となり, 出生直後致死となる. 平成 30 年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会, 大津, 2019 年 1 月.
- 2) 隈本智卓, 山田幸司, 青木勝彦, 吉田清嗣, 矢永勝彦. (ポスター) DYRK2 のメチル化を標的とした大腸癌治療の可能性. 第 74 回日本消化器外科学会総会. 東京, 7 月.
- 3) 横山志保, 與五沢里美, 吉田彩舟, 吉田清嗣. (ポスター) 肝がんにおける DYRK2 の強制発現はアポトーシスの誘導を介して抗腫瘍効果を発揮する. 第 78 回日本癌学会学術総会. 京都, 9 月.
- 4) 横山志保, 與五沢里美, 鐘ヶ江裕美, 吉田彩舟, 及川恒一, 猿田雅之, 吉田清嗣. (ポスター) 肝臓癌における DYRK2 の強制発現はアポトーシスを介して抗腫瘍効果を発揮する. 第 136 回成医会総会. 東京, 10 月.
- 5) 本橋沙耶, 山田幸司, 及川恒一, 木澤隆介, 吉田彩舟, 多胡直子, 隈本智卓, 下山雄也, 尾野雅哉, 吉田清嗣. (ポスター) 細胞内キナーゼの新しい分泌システムの発見と肝がん診断・治療への実用化研究. 第 136 回成医会総会. 東京, 10 月.
- 6) 吉田彩舟, 加藤たか子, 加藤幸雄, 下垂体前葉から単離した組織幹細胞の分化能解析. 第 44 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. さいたま, 11 月.
- 7) Imawari Y, Mimoto R, Yamaguchi N, Takeyama H, Yoshida K. DYRK2 contributes to the tumor cell proliferation and invasion through KLF4 in breast can-

cer cells. 11th AACR-JCA (American Association for Cancer Research - Japanese Cancer Association) Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine. Maui, 2019 Feb.

- 8) Kumamoto T, Yamada K, Yoshida S, Aoki K, Yanaga K, Yoshida K. DNA methylation of DYRK2 promoter regulates proliferation of human colorectal cancer. ACS Clinical Congress 2019 (105th American College of Surgeons Annual Clinical Congress). San Francisco, Oct.
- 9) Imawari Y, Mimoto R, Yamaguchi N, Kamio M, Nogi H, Uchida K, Yakeyama H, Yoshida K. (Poster) Downregulation of DYRK2 contributes to tumor cell proliferation by enhancing CDK14 expression in breast cancer. 42nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS). San Antonio, Dec.
- 10) Mimoto R, Yogosawa S, Saijo H, Fushimi A, Nogi H, Asakura T, Yoshida K, Yakeyama H. (Poster) Conditional reprogrammed cells enable us to examine the drug resistance for recurrent metastatic hormone receptor-positive, human epidermal receptor 2-negative breast cancer. 42nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS). San Antonio, Dec.