

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03584

研究課題名(和文) 癌幹細胞の可塑性が誘起する腫瘍転移の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of tumor metastasis driven by cancer stem cells

研究代表者

吉田 清嗣 (Yoshida, Kiyotsugu)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70345312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死を誘導するリン酸化酵素DYRK2について、癌幹細胞の発生・維持と分化・誘導を制御するという知見を基盤とした、転移における分子メカニズムの解明に主眼を置いた研究を展開した。大腸癌の肝転移におけるDYRK2の役割について、動物実験モデルで検証した。まず大腸癌細胞株を蛍光標識し、肝転移を追跡できるモデルを構築した。転移した細胞のDYRK2発現を調べたところ、有意にその発現が低下していることを見出した。DYRK2の発現抑制細胞株を作成し、肝転移モデルで検証したところ、有意に転移を促進することを見出した。一方でDYRK2の強制発現によって酵素活性依存的に転移を抑制できることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は高い腫瘍形成能を持ち、転移や再発の原因になると考えられている。一方で多くの抗癌剤に耐性を示すことから、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が切望されている。我々はすでにDYRK2が癌幹細胞の発生・維持制御分子であることを明らかにしており、本研究ではこの知見を腫瘍転移機構に発展させた。研究成果として大腸癌の肝転移モデルマウスを用いてDYRK2を発現させることで、酵素活性依存的に転移を抑制できることを示した。従ってDYRK2が転移抑制分子として臨床応用への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms that allow colorectal cancer cells to form liver metastases are largely unknown. Activation of EMT is the key step for metastasis of cancer cells. We have recently demonstrated in breast cancer and ovarian serous adenocarcinoma that DYRK2 controls EMT. The aim of this study is to clarify whether DYRK2 regulates liver metastases of colorectal cancer. We demonstrated that the ability of cell invasion and migration was abrogated in DYRK2-overexpressing cells. In an in vivo xenograft model, liver metastatic lesions were markedly diminished by an ectopic expression of DYRK2. Furthermore, we found that patients whose liver metastases expressed low DYRK2 levels had significantly worse overall and disease-free survival. Given the findings that DYRK2 regulates cancer cell metastasis, we concluded that the expression status of DYRK2 could be a predictive marker for liver metastases of colorectal cancer.

研究分野：分子腫瘍学

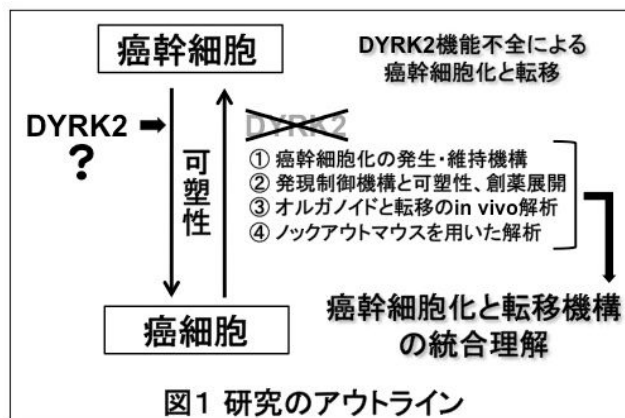
キーワード：癌 幹細胞 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌は本邦における死亡原因の第1位であり、癌の克服は解決すべき最重要課題である。癌が致死性を獲得する最大の要因は転移であり、転移を抑えることは癌を制圧することに繋がる。しかし癌細胞の転移がどのように起こるのか、その本態は未だ十分に解明されているとはいえない。したがって癌転移の分子機構解明は、新しい分子標的治療の開発という観点からも喫緊の課題である。

申請者は癌の診断・治療への応用を視野に入れた研究を推進してきた。具体的には、ゲノムDNAに生じる損傷が癌の原因であることから、DNA損傷における細胞応答、特にアポトーシスと呼ばれる細胞死誘導の分子機構の解明に取り組んできた (Yoshida K, et al. *EMBO J.* 2003; Yoshida K, et al. *Nat. Cell Biol.* 2005; Raina D, et al. *EMBO J.* 2006; Yoshida K, et al. *Mol. Cell. Biol.* 2006; Liu H, et al. *Mol. Cell. Biol.* 2007; Yoshida K. *Trends Mol. Med.* 2008; Kimura J, et al. *Int. J. Cancer* 2011; Suzuki K, et al. *Cancer Sci.* 2012; Taira N, et al. *PNAS.* 2014)。p53を介して細胞死を誘導するリン酸化酵素として同定したDYRK2が、いくつかの癌組織において正常組織と比べて顕著に発現が低下していることを見出した (Taira N, et al. *Moll. Cell* 2007; Taira N, et al. *J. Clin. Invest.* 2012)。さらにDYRK2の発現が低下した乳癌や卵巣癌では、上皮間葉転換が誘導されて転移が亢進することをマウス xenograft 転移実験により明らかにした (Mimoto R, et al. *Cancer Lett.* 2013; Yamaguchi N, et al. *Tumor Biol.* 2015)。そのメカニズムとして、DYRK2の発現低下が幹細胞関連転写因子 KLF4 の制御を介して癌幹細胞化を引き起こしていることを発見した (Mimoto R, et al. *Oncogene* 2017)。これらの知見から、DYRK2の発現が低下した癌組織においては癌幹細胞化が誘導され、DNA損傷によって引き起こされるアポトーシス誘導の回避や過剰な細胞増殖が起きていることが予測され、DYRK2が新規腫瘍マーカーや癌治療の有望な標的分子候補として期待される。



2. 研究の目的

これまでの国内外の研究から癌幹細胞仮説が提唱され、再発・転移や治療抵抗性との関連が示唆されているものの、その詳細は多くが不明である。そこで本研究では、我々が世界に先駆けて見出した「リン酸化酵素 DYRK2 が癌幹細胞の発生や維持を制御している」という知見を端緒に、癌幹細胞の可塑性に着目した癌転移研究を展開する (図1)。

DYRK2による癌幹細胞の発生・維持機構の解明

乳癌細胞において、DYRK2をノックダウンすると表面抗原 CD44^{high}/CD24^{low} で定義付けられている幹細胞の割合が著しく増加するという知見を見出した。この詳細な分子機構を解明し、他の癌種でも同様の表現型が出現するかについて、ゲノム編集による CRISPR/Cas9 を用いた DYRK2 ノックアウト細胞株を樹立し、それぞれの癌種に応じた幹細胞マーカーを指標として検証する。

DYRK2の発現制御メカニズムと癌幹細胞可塑性との関連及び創薬への展開

これまでに様々な癌細胞、癌組織検体における DYRK2 の発現を検証したところ、低分化型で

あつたり悪性度が高い癌ほどその発現が顕著に低下していることを見出しており、癌幹細胞の割合との逆相関が想定される。この発現低下はプロモーター領域のメチル化及びユビキチン化—プロテアソーム分解系による制御であるという知見を得ているが、その詳細な分子機構は不明である。そこでこのメカニズムを解明し、癌幹細胞と非癌幹細胞との遷移が生じる可塑性との関わりを検証する。さらに創薬への応用展開を見据えた、DYRK2 及びそのシグナルカスケード分子群を賦活化する化合物のスクリーニングを行う。

腫瘍オルガノイドを用いた癌幹細胞化と癌転移の in vivo イメージング解析

近年開発された、患者体内の腫瘍と同様の遺伝子発現パターンや組織構造を再現できる腫瘍オルガノイドの培養技術を導入し、ゲノム編集による CRISPR/Cas9 により DYRK2 をノックアウトすることで幹細胞化を誘導し、網羅的発現解析を行う。またマウス遠隔転移モデル実験系を基盤とした生体蛍光イメージング法を駆使して、幹細胞化した腫瘍オルガノイドの転移を追跡し、転移した癌細胞を正確に分離・解析する。このアプローチには安定で明るい蛍光プローブが不可欠であり、これまで使用に耐えうる担体がほぼ皆無であったが、近年の改良型近赤外蛍光タンパク質の開発により実現への可能性が大いに高まったと判断した。本研究の遂行によりその実用性を検証する。

DYRK2 ノックアウトマウスによる癌幹細胞と転移の in vivo 解析

DYRK2 コンディショナルノックアウトマウスを作出し、幹細胞化や発癌との関連を検索する。また発癌誘導剤や自然発症発癌モデルマウスとの交配による発癌と転移誘発を試み、転移組織の解析から in vivo による分子機構解明に繋げ、in vitro あるいはオルガノイド解析で得られた知見と統合することで癌転移の本質に迫る。

3. 研究の方法

「DYRK2 の機能不全により誘導される癌幹細胞化と癌転移に至る分子機構」を解明することが本研究の狙いである。そのために、

- ① DYRK2 ノックアウト細胞を作成し、癌幹細胞化の発生・維持機構を網羅的発現解析によって明らかにする。
- ② DYRK2 の発現制御メカニズムをエピゲノム修飾及び分解機構から解明する。
- ③ 腫瘍オルガノイドを用いて癌幹細胞化を試み、生体蛍光イメージングにより遠隔転移モデルを確立し解析を行う。
- ④ DYRK2 ノックアウトマウスを樹立し幹細胞化と癌転移が誘導されるのか調べ、これまでの in vitro 及び in vivo 実験で得られた知見との統合を図り結論を導く。

4. 研究成果

① DYRK2 による癌幹細胞化と癌転移の in vivo イメージング解析

我々が細胞死誘導性リン酸化酵素として同定した DYRK 2 は、これまでの内外の研究から癌に抑制的に働くことが、乳癌、卵巣癌、肺癌、膀胱癌、大腸癌などで報告されている。本研究では DYRK 2 の癌抑制機構について、その幹細胞性と転移に焦点を当てて調べている。まず、大腸癌の肝転移における DYRK 2 の役割について、動物実験モデルで検証した。大腸癌細胞株 HCT-116 に E2-Crimson を導入し、蛍光標識による追跡を可能にした。ヌードマウスの脾臓に癌細胞を注入し経門脈による肝転移を誘導し、転移巣から腫瘍を回収した。E2-Crimson 陽性細胞をセルソ

ーターで分離し DYRK 2 の発現を調べたところ、有意にその発現が低下していることを見出した。そこで HCT-116 に DYRK 2 を安定的に発現する細胞株を樹立し、マウス肝転移モデルで検証したところ、野生型 DYRK 2 を発現した細胞株では有意に転移能が減少したが、リン酸化酵素活性のない DYRK 2 発現細胞では、コントロール細胞と同等の転移能を示した。以上の結果から、DYRK 2 の発現抑制が大腸癌の転移を促進すること、翻って DYRK 2 の強制発現によって酵素活性依存的に転移を抑制できることが示唆された。さらに手術検体を用いて DYRK 2 の発現レベルと予後について検証を行った。DYRK 2 の発現が高い症例では低い症例に比べて、全生存率、無病生存率それぞれについて有意に高いことが判明した。

② 乳癌における DYRK 2 の幹細胞性制御の分子機構

乳癌における DYRK 2 の役割について、幹細胞性の制御をふまえた動物実験モデルで検証した。ホルモン受容体陽性乳癌細胞株である MCF-7 において、DYRK2 の発現を抑制した細胞株を作成し網羅的発現解析を行って野生株と比較したところ、最も発現が増加した遺伝子として CDK14 を同定した。実際に MCF-7 細胞において DYRK2 の発現を抑制すると CDK14 の発現が上昇し、増殖能が顕著に増加した。DYRK2 と CDK14 の発現を抑制すると、*in vitro*、*in vivo* において DYRK2 単独抑制細胞よりも腫瘍増殖や浸潤能が減少した。実際の乳癌組織内においても、DYRK2 が低発現の組織では CDK14 の発現は高かった。この分子機構として、DYRK2 は転写因子 AR を介して KLF4 を転写制御することで CDK14 の発現を調節して乳癌の幹細胞性を抑制することを見出した。DYRK2 低発現細胞では AR 阻害剤である MDV3100 の添加で CDK14 の発現が低下した。近年、AR を標的とした乳癌治療が効果的であるとの報告もあり、これまで悪性度が高いとされていた DYRK2 低発現乳癌に対して、AR 阻害剤が治療標的となる可能性がある。

③ 肝癌細胞における DYRK 2 の抗腫瘍効果

前項で乳癌における DYRK 2 の役割について、幹細胞性の制御をふまえた動物実験モデルで検証した結果、DYRK2 は乳癌細胞の増殖、進展・転移抑制を担う重要な分子であることが判明した。一方で、他の癌腫では個体レベルでは不明であった。そこで肝癌細胞で検証したところ、DYRK2 を発現低下させると、c-Myc 発現が亢進し、細胞周期進行が認められ、Xenograft モデルにおける肝癌細胞の腫瘍形成能も亢進した。このことから、DYRK2 は、肝癌細胞の増殖、腫瘍形成能の抑制に機能することが示唆された。次に、アデノウイルスベクターを用いて、肝癌細胞に DYRK2 を過剰発現させ、抗腫瘍効果を検討した。その結果、DYRK2 を過剰発現させた肝癌細胞では、細胞増殖、細胞周期の遅延が認められ、p53 リン酸化を介したアポトーシスも亢進した。また、アデノウイルスベクターを用いて DYRK2 を過剰発現させると、Xenograft モデルにおける肝癌細胞の腫瘍形成能を顕著に減少させ、抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。さらに、DYRK2 発現は、肝癌患者の予後不良と逆相関しており、DYRK2 が肝癌の予後予測因子となりうることも明らかとなった。以上のことより、DYRK2 は、今後、肝癌に対する新たな遺伝子治療法開発に向けた有用なターゲットとなりうることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yogosawa Satomi, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 3376 ~ 3382 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13792 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yokoyama-Mashima Shiho, Yogosawa Satomi, Kanegae Yumi, Hirooka Shinichi, Yoshida Saishu, Horiuchi Takashi, Ohashi Toya, Yanaga Katsuhiko, Saruta Masayuki, Oikawa Tsunekazu, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 451 |
| 2. 論文標題 Forced expression of DYRK2 exerts anti-tumor effects via apoptotic induction in liver cancer | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Letters | 6. 最初と最後の頁 100 ~ 109 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.02.046 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamada Kohji, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 1866 |
| 2. 論文標題 Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research | 6. 最初と最後の頁 839 ~ 848 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2019.02.009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ito Daisuke, Yogosawa Satomi, Mimoto Rei, Hirooka Shinichi, Horiuchi Takashi, Eto Ken, Yanaga Katsuhiko, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 Dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2 is a suppressor and potential prognostic marker for liver metastasis of colorectal cancer | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 1565 ~ 1573 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13280 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Honda M, Yogosawa S, Kamada M, Kamata Y, Kimura T, Koike Y, Harada T, Takahashi H, Egawa S, Yoshida K. | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 A Novel Near-infrared Fluorescent Protein, iRFP720, Facilitates Transcriptional Profiling of Prostate Cancer Bone Metastasis in Mice. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Research | 6. 最初と最後の頁 3009-3013 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kagami Yuya, Ono Masaya, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Plk1 phosphorylation of CAP-H2 triggers chromosome condensation by condensin II at the early phase of mitosis | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 5583 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05986-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Okabe Hinako, Aoki Katsuhiko, Yogosawa Satomi, Saito Mitsuru, Marumo Keishi, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Downregulation of CD24 suppresses bone metastasis of lung cancer | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 112 ~ 120 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13435 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Imawari Yoshimi, Mimoto Rei, Hirooka Shinichi, Morikawa Toshiaki, Takeyama Hiroshi, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Downregulation of dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2 promotes tumor cell proliferation and invasion by enhancing cyclin-dependent kinase 14 expression in breast cancer | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 363 ~ 372 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13459 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kumamoto Tomotaka, Yamada Kohji, Yoshida Saishu, Aoki Katsuhiko, Hirooka Shinichi, Eto Ken, Yanaga Katsuhiko, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Impairment of DYRK2 by DNMT1-mediated transcription augments carcinogenesis in human colorectal cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Oncology | 6. 最初と最後の頁 1529-1539 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.5020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yoshida Saishu, Yoshida Kiyotsugu | 4. 巻 593 |
| 2. 論文標題 Multiple functions of DYRK2 in cancer and tissue development | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Letters | 6. 最初と最後の頁 2953 ~ 2965 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13601 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 井廻良美、三本麗、山口乃里子、武山浩、吉田清嗣 |
| 2. 発表標題 乳癌細胞株においてDYRK2はCDK14を介して腫瘍増殖を制御する |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 隈本智卓、山田幸司、青木勝彦、矢永勝彦、吉田清嗣 |
| 2. 発表標題 DYRK2のプロモーター領域のメチル化は人の結腸直腸癌の進行を制御する |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本武徳、仁平直江、與五沢里美、青木勝彦、吉田清嗣 |
| 2. 発表標題 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 |
| 3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 横山志保、與五沢里美、吉田彩舟、吉田清嗣 |
| 2. 発表標題 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 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|