

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16267

研究課題名（和文）乳癌におけるDYRK2下流遺伝子の探索と腫瘍増殖・浸潤制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of DYRK2 downstream gene in breast cancer to elucidate the mechanisms of tumor growth and invasion

研究代表者

井廻 良美 (Imawari, Yoshimi)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：20649040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：DYRK2はリン酸化酵素であり、DYRK2の発現が低い乳癌では細胞増殖能、浸潤能が高く、悪性度も高くなっている。そこで、本研究ではDYRK2低発現の乳癌で、治療効果の高い薬剤の探索を行った。

DYRK2を恒常的にノックダウンした細胞株においてCDK14の転写が増加していることが、マイクロアレイを用いた解析により明らかとなった。更にレポーターアッセイなどを用いて、ARを転写因子として同定した。AR阻害剤であるMDV3100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。これらの結果より、DYRK2の発現が低い乳癌ではAR阻害剤が特異的に作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、乳癌におけるDYRK2によるCDK14の発現制御機構を解明し、更にDYRK2の発現が低い乳癌に対して、治療効果が期待出来る化合物を同定した。

臨床検体を用いた病理解析も併せて行ったことで、基礎研究での成果を臨床での「DYRK2の発現の低い、すなわち悪性度の高い乳癌に特異的な治療法の確立」へと繋げる架け橋のような知見を見出すことが出来たと考える。

研究成果の概要（英文）：Tumor progression is the main cause of death in patients with breast cancer.

Accumulating evidence suggests that dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2 (DYRK2) functions as a tumor suppressor by regulating cell survival, differentiation, proliferation and apoptosis.

However, little is known about the mechanisms of transcriptional regulation by DYRK2 in cancer progression, particularly with respect to cancer proliferation and invasion.

Here, using a comprehensive expression profiling approach, we show that cyclin-dependent kinase 14 (CDK14) is a target of DYRK2. We further identified androgen receptor (AR) as a candidate of DYRK2-dependent transcription factors regulating CDK14.

Our findings demonstrate that reduced DYRK2 expression in breast cancer promotes tumor cell proliferation and invasion by modulating CDK14 expression via AR, and inhibits the growth by treatment with AR inhibitor, MDV3100.

研究分野：腫瘍学

キーワード：DYRK2 乳癌 腫瘍増殖

1. 研究開始当初の背景

日本における乳癌の罹患率は現在では約 20 人に 1 人となり年々増加傾向を示している。これまで申請者らは、癌細胞内におけるリン酸化酵素、DYRK2 の機能について解析を進めて来た。Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) の発現低下が生じると癌遺伝子 c-Jun・c-Myc の分解機構に異常をきたし、顕著な腫瘍増殖につながるということが報告されており、更に、DYRK2 が上皮間葉転換に関与し、抗癌剤治療耐性に寄与するという報告もある。また、DYRK2 の発現低下が生じると KLF4 を介して幹細胞性が増強されると報告した。そして、乳癌の臨床検体を用いて行った免疫組織染色では、正常乳腺や早期乳癌においては DYRK2 の発現が保たれているのに対し、浸潤癌においては DYRK2 の発現が低下していることが明らかになっている。つまり、DYRK2 の発現が低い乳癌では細胞増殖能が高く、上皮間葉転換が生じており、悪性度が高くなっている。

DYRK2 は c-Myc、c-Jun、Snail、mTOR をリン酸化し、分解することで癌に抑制的に働くことが報告されているが、いずれも翻訳後修飾である。初めて DYRK2 が直接 KLF4 を転写制御することによって幹細胞性を増強することを報告した。しかし、DYRK2 が直接、癌細胞の増殖や浸潤を増強させて癌を進行させる転写制御機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、DYRK2 が直接転写制御する遺伝子を探索し、その発現制御機構を明らかにすることによって、DYRK2 の発現の低い、すなわち悪性度の高い乳癌に特異的な治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) DYRK2 が直接転写制御する遺伝子の探索とその発現制御機構に焦点をあてた解析

マイクロアレイを用いて、DYRK2 によって制御を受ける遺伝子を網羅的に探索する。同定された遺伝子が実際に DYRK2 によって転写制御されているのかを *in vitro* の実験にて検討する。更に、同定された遺伝子が癌細胞の増殖や浸潤を増強させているのかを *in vitro* での MTS アッセイと浸潤アッセイや、マウスを用いた腫瘍形成能判定などの *in vivo* で判定する。

(2) 臨床検体を用いた病理学的解析

東京慈恵会医科大学附属病院で 2001 年～2002 年に手術を受けた乳癌検体 60 例を対象に、免疫組織染色にて DYRK2 と同定された直接転写制御する遺伝子の発現を検討する。

(3) DYRK2 の発現量と抗癌剤治療効果の関連の検討

DYRK2 を発現抑制した乳癌細胞株に各種薬剤を添加し、MTS アッセイを用いて、腫瘍細胞増殖能の変化を測定し、DYRK2 低発現の乳癌に対して治療効果が期待出来る化合物を探索する。

4. 研究成果

本研究では、DYRK2 の発現が低下することで転写因子 AR を介して CDK14 の発現が増加し、乳癌の増殖・浸潤が促進されることが示された。更に、DYRK2 低発現乳癌では AR 阻害剤が特異的に作用することが示唆された。

(1) DYRK2 は CDK14 の発現を制御している

ホルモン受容体陽性乳癌細胞株である MCF-7 細胞において、DYRK2 の発現を恒常的に抑制した細胞株 (shDYRK2) と空ベクターのみを遺伝子導入した細胞株 (pSuper control) を樹立した。MCF-7 細胞において、shRNA で DYRK2 の発現を恒常的に抑制した細胞株と siRNA で一時的に抑制した細胞株を用いて、マイクロアレイ解析で DYRK2 の下流遺伝子を網羅的に探索した。どちらのマイクロアレイ解析においても DYRK2 の発現を抑制すると、1.5 倍以上転写が増加したのは 8 遺伝子。そのうち、DYRK2 の発現を恒常的に抑制した細胞株において最も転写が増加した Cyclin-dependent kinase 14 (CDK14) に注目した。

配列特異的である可能性を除去する為に 2 配列の shRNA と siRNA を用いて実験を行ったが、どちらの配列でも DYRK2 の発現を抑制すると、mRNA、蛋白ともに CDK14 の発現が上昇しており、マイクロアレイ解析の結果と同様であった。

(2) DYRK2 は CDK14 を介して腫瘍細胞の増殖と浸潤を制御する

DYRK2 発現抑制細胞株 (shDYRK2) において、CDK14 を恒常的に抑制した細胞株 (shDYRK2-shCDK14) と空ベクターのみを遺伝子導入した細胞株 (shDYRK2-pSuper control)、空ベクターのみを遺伝子導入した細胞株 (pSuper control) において、更に空ベクターのみを遺伝子導入した細胞株 (pSuper control-pSuper control) を樹立し、MTS assay、colony formation assay、xenograft model を用い、腫瘍増殖能を検討した。DYRK2 / CDK14 発現抑制細胞株 (shDYRK2-shCDK14) では、DYRK2 単独発現抑制細胞株 (shDYRK2-pSuper control) と比

較し、MTS assay、colony formation assay、xenograft model において、腫瘍増殖能が減少していた。

DYRK2 発現抑制細胞株 (shDYRK2) において、siRNA を用いて CDK14 の発現を抑制した細胞株 (shDYRK2-CDK14 siRNA) とコントロールの細胞株 (shDYRK2-Control siRNA)、空ベクターのみを遺伝子導入した細胞株 (pSuper control) において、コントロールを遺伝子導入した細胞株 (pSuper control- Control siRNA) を用いて、浸潤アッセイにて腫瘍浸潤能を検討した。DYRK2 / CDK14 発現抑制細胞株 (shDYRK2-CDK14 siRNA) では、DYRK2 単独発現抑制細胞株 (shDYRK2-Control siRNA) と比較し、浸潤アッセイにて浸潤能が低下した。これらの結果より、DYRK2 の発現低下が CDK14 の発現上昇を介して腫瘍の増殖と浸潤を促進していることが示唆された。

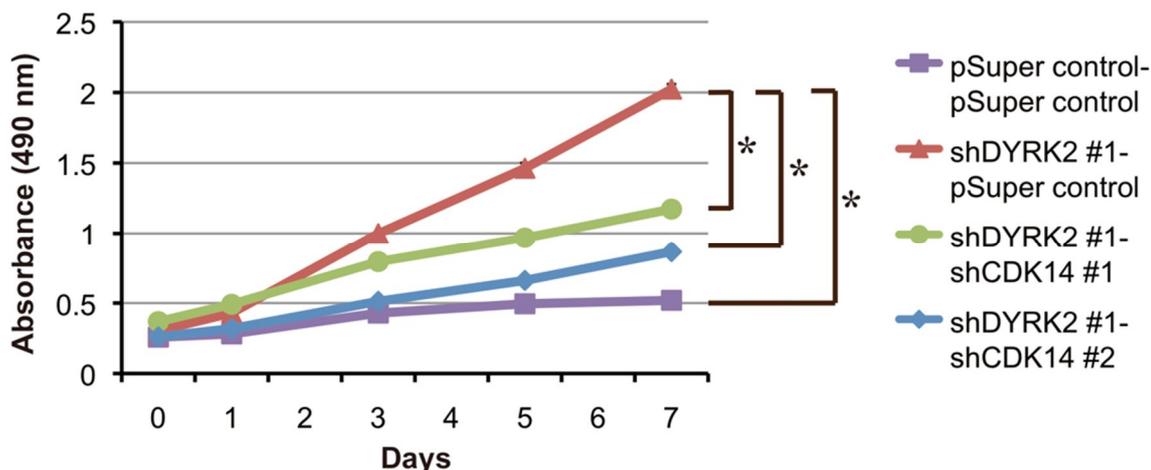


図 1) DYRK2 / CDK14 発現抑制細胞株における MTS assay を用いた腫瘍増殖能の評価

(3) DYRK2 は転写因子 AR を介して CDK14 の発現を制御する

マイクロアレイを用いて、DYRK2 によって制御を受ける遺伝子を網羅的に探索した結果、DYRK2 の発現を抑制すると、CDK14 の転写が増加することが判明している。このことより、CDK14 は直接 DYRK2 に転写制御されていると考えられた。また、我々は DYRK2 の発現低下が転写因子 Androgen receptor (AR) を介して KLF4 を転写制御することによって幹細胞性を増強することを報告している。そこで、DYRK2 と CDK14 の関係を検証する為に、転写因子 AR に注目した。

AR 阻害剤である MDV3100 を pSuper control 細胞と shDYRK2 細胞にそれぞれ添加した。DYRK2 低発現である shDYRK2 細胞では、mRNA、蛋白ともに MDV3100 添加群で CDK14 の発現が低下していた。

shDYRK2 細胞に MDV3100 を添加すると、濃度依存性に CDK14 の発現は低下した。これらの結果より、DYRK2 は転写因子 AR を介して CDK14 の発現を制御していることが示唆された。

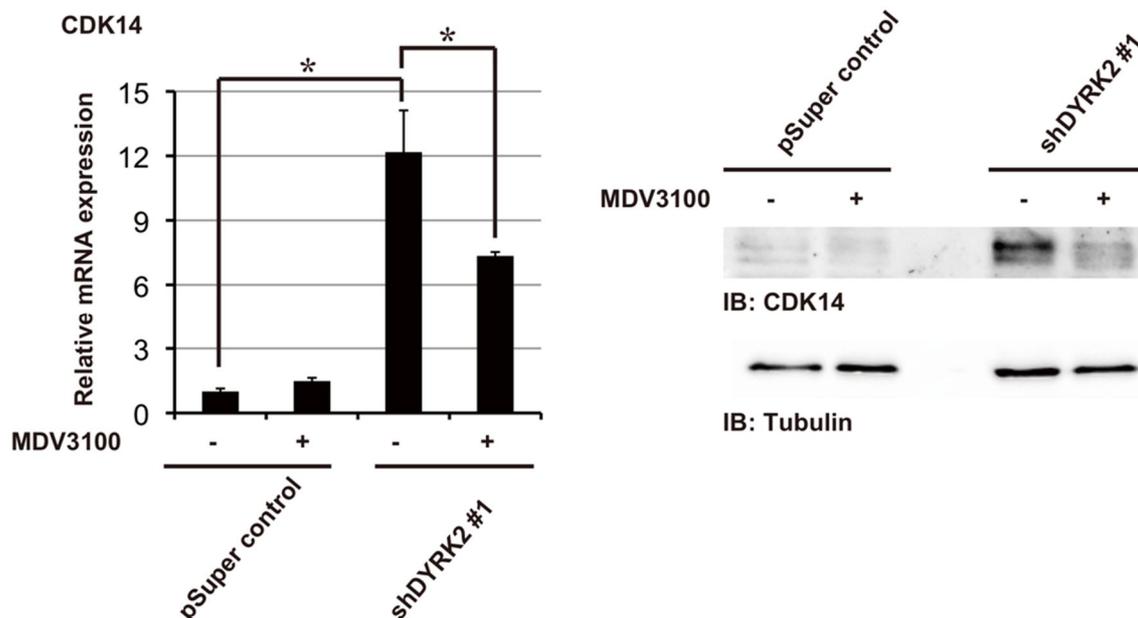


図 2) 2 細胞間における MDV3100 添加での mRNA 量、タンパク量の変化

(4) ヒト乳癌において DYRK2 と CDK14 の発現は逆相関となる

東京慈恵会医科大学附属病院で 2001 年～2002 年に手術を受けた乳癌検体 60 例を対象に、免疫組織染色にて DYRK2 と CDK14 の発現を検討した。乳癌検体の免疫組織染色にて DYRK2 と CDK14 の発現を検討すると、DYRK2 低発現の組織では CDK14 が増加しており、ヒト乳癌組織においても細胞株を用いた実験と同様の相関性が認められた。

これらの結果より、DYRK2 の発現が低下することで転写因子 AR を介して CDK14 の発現が増加し、乳癌の増殖・浸潤が促進されることが示された。

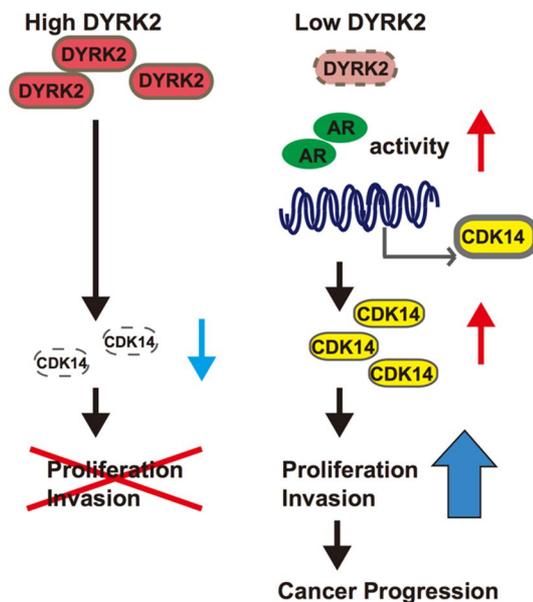


図 3) 乳癌における DYRK2-AR-CDK14 の関係

(5) DYRK2 発現抑制乳癌細胞株では MDV3100 への感受性が高い

ホルモン受容体陽性乳癌細胞株である MCF-7 細胞において、DYRK2 の発現を恒常的に抑制した細胞株 (shDYRK2) では、空ベクターのみを遺伝子導入した細胞株 (pSuper control) と比較し、MTS assay において、MDV3100 がより低濃度で腫瘍増殖能を減少させた。

これらの結果より、DYRK2 低発現乳癌では AR 阻害剤が特異的に作用することが示唆された。

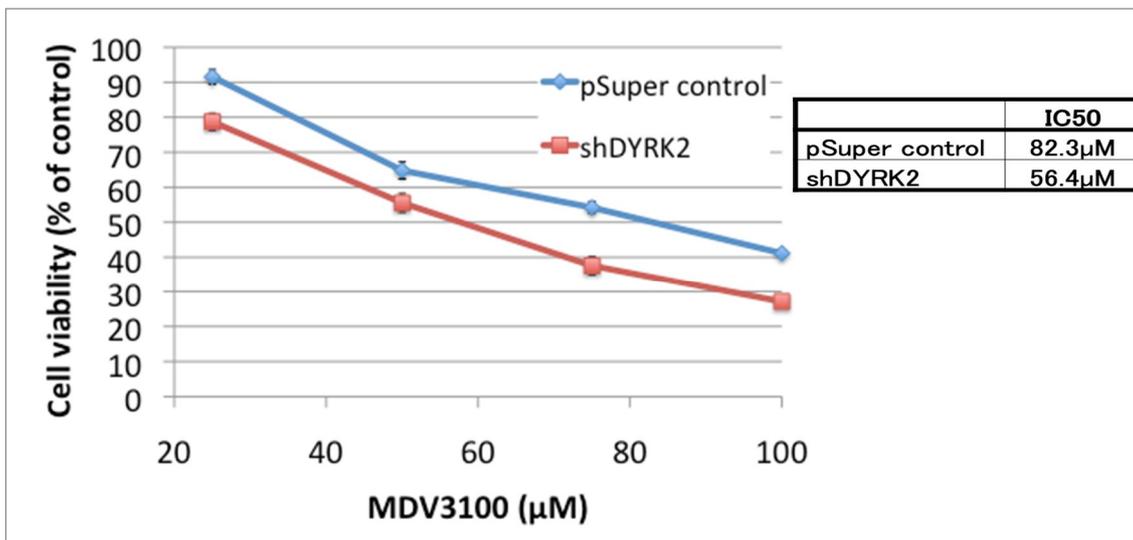


図 4) 2 細胞間における MDV3100 への感受性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakano S, Imawari Y, Mibu A, Kato S, Yamaguchi S, Otsuka M, Sano M.	4. 巻 89
2. 論文標題 Molecular Targeted Therapy for Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor 2-Negative Metastatic Breast Cancer in Clinical Practice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch.	6. 最初と最後の頁 88-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1272/jnms.JNMS.2022_89-203	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 Nakano Satoko, Imawari Yoshimi, Mibu Akemi, Otsuka Masahiko, Oinuma Toshinori	4. 巻 91
2. 論文標題 Differentiating vacuum-assisted breast biopsy from core needle biopsy: Is it necessary?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The British Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1259/bjr.20180250	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9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井廻良美, 三宅亮, 三宅美佐代, 野木裕子
2. 発表標題 同一腫瘍内に乳管癌と小葉癌が混在した乳癌の一症例
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅亮, 井廻良美, 武山浩, 野木裕子
2. 発表標題 腋窩リンパ節腫大を伴った乳腺顆粒細胞腫の 1 例
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井廻良美, 三本麗, 野木裕子, 鳥海弥寿雄, 武山浩
2. 発表標題 MDV3100はホルモン受容体陽性HER2陰性DYRK2低発現乳癌細胞株において有効である
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井廻良美, 中野聡子, 壬生明美, 生沼利倫
2. 発表標題 内分泌療法後に第5次治療でCDK4/6阻害剤を使用し8ヶ月間以上の奏功が得られた転移再発乳癌の1症例
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井廻良美, 中野聡子, 加藤俊介, 山口茂夫, 壬生明美, 生沼利倫
2. 発表標題 無石胆嚢炎を併発した同時両側乳癌、胆嚢転移の1症例
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshimi Imawari, Rei Mimoto, Noriko Yamaguchi, Makiko Kamio, Hiroko Nogi, Ken Uchida, Hiroshi Takeyama, Kiyotsugu Yoshida
2. 発表標題 Downregulation of DYRK2 contributes to tumor cell proliferation by enhancing CDK14 expression in breast cancer
3. 学会等名 the 42nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井廻良美, 三本麗, 風間高志, 野木裕子, 塩谷尚志, 木下智樹, 烏海弥寿雄, 内田賢, 武山浩
2. 発表標題 乳癌においてDYRK2はCDK14を介して腫瘍増殖を制御する
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

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 Yoshimi Imawari, Rei Mimoto, Noriko Yamaguchi, Hiroshi Takeyama, Kiyotsugu Yoshida
2. 発表標題 DYRK2 contributes to the tumor cell proliferation and invasion through CDK14 in breast cancer cells
3. 学会等名 Eleventh AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京慈恵会医科大学 生化学講座 吉田研究室
<http://jikei-biochem.wixsite.com/yoshidalab>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------