

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16781

研究課題名(和文) 組織幹細胞のがん化におけるがん抑制キナーゼDYRK2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of tumor suppressor kinase DYRK2 in tissue stem cells

研究代表者

吉田 彩舟 (YOSHIDA, SAISHU)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40772744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：組織発生は、様々なシグナル分子の時空間的な制御により進行する。近年の幹細胞生物学の発展に伴い、組織幹細胞は、組織発生だけでなく、発がんにも関与することが明らかになりつつある。本研究では、これまで哺乳類個体レベルでの機能が報告されていないリン酸化酵素の中でも、Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2)に注目し、マウス個体レベルでの機能解析を行った。その結果、リン酸化酵素DYRK2が新規の一次繊毛制御因子であり、Hedgehogシグナルの活性化に必須の分子であることを哺乳類の個体・細胞レベルで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、リン酸化酵素DYRK2が新規の一次繊毛制御因子であり、Hedgehogシグナルの活性化に必須の分子であることを明らかにした。一次繊毛の異常は、内臓逆位や骨格異常、水頭症などの奇形疾患「繊毛病」の原因であることが報告されている。したがって、本研究から得られた知見は、組織発生の制御機序、さらに、それらの異常によって生じる「奇形疾患」や「がん」の病態解明につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Embryogenesis and patterning of cell differentiation are facilitated by spatiotemporal activation of multiple signaling pathways. Recent stem cell technology demonstrates that tissue stem/progenitor cells regulate not only embryogenesis but also tumorigenesis. In this study, we aim to reveal a function for Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) in mouse in vivo. Here, we demonstrate that DYRK2 is a novel regulator of ciliogenesis and is required for embryogenesis via activation of Hh signaling during development.

研究分野：発生生物学、腫瘍生物学

キーワード：DYRK2 組織発生 一次繊毛 Hedgehog リン酸化酵素 発がん 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

組織発生は、未分化な幹細胞が様々なシグナル分子(Hedgehog, FGF, Wnt など)の時空間的な制御を受け進行する。近年の幹細胞生物学の発展に伴い、組織幹細胞は、組織発生だけでなく、発がんにも関与することが明らかになりつつある。具体的には、遺伝子改変マウスを用いた解析により、血液系だけでなく、腸管や胃、脳といった分野で、正常な組織幹細胞からのがん幹細胞化が示されている。したがって、幹細胞の制御分子、ならびに組織幹細胞からのがん化に寄与する因子の解明は、個体発生の理解、さらに、発がん機構の理解に重要である。

我々は、DNA 損傷時にアポトーシスを誘導する p53(Ser46)のリン酸化酵素として Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2)を同定した。これまで、がん細胞株を用いた DYRK2 の機能解析は報告されているが、哺乳類の個体レベルにおける DYRK2 の機能に関する知見は報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、DYRK2 の全身性ならびにコンディショナルノックアウトマウスを作成し、個体レベルでの DYRK2 の機能を解明することを目的とする。特に、組織発生ならびに発がん過程における DYRK2 の役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 全身性 *Dyrk2* 欠損 (*Dyrk2*^{-/-}) マウスの *in vivo* 解析

作出した全身性 *Dyrk2* 欠損マウス個体を用いて、マクロならびに組織化学的に表現系を解析する。

(2) DYRK2 が制御する下流シグナルの解明

Dyrk2 欠損マウスが示す表現系を手掛かりに、DYRK2 が制御する下流シグナルを *in situ* hybridization 法により同定する。また、*Dyrk2* 欠損マウス胚から胎仔線維芽細胞(MEF)を樹立し、細胞レベルでその分子機序を解析する。

(3) *Dyrk2* コンディショナルノックアウト (*Dyrk2*^{flox/flox}) マウスを用いた腸管幹細胞特異的な *Dyrk2* 欠損マウスの解析

腸管幹細胞 (*Lgr5* 発現細胞) 特異的に CreER^{T2} を発現する *Lgr5*-CreER^{T2}-IRES-EGFP マウスと *Dyrk2*^{flox/flox} マウスを交配し、*Lgr5*-CreER^{T2}-IRES-EGFP;*Dyrk2*^{flox/flox} マウスを作成する。本マウスは、タモキシフェンを投与することで、腸管幹細胞特異的に *Dyrk2* を欠損させることが可能である。タモキシフェン投与後の個体をマクロならびミクロ(免疫組織化学)解析し、発がんの有無を解析する。

4. 研究成果

(1) 全身性 *Dyrk2* 欠損マウスの *in vivo* 解析

作出した *Dyrk2* 欠損マウスは、広域な組織形成不全を示し、出生時に致死に至った(図 1A)。特に骨格系の異常が顕著であり、口蓋裂、頭蓋底骨の形成不全や欠損、四肢の短縮や骨化の遅延などが観察された(図 1B-F)。

(2) DYRK2 が制御する下流シグナルの解明

Dyrk2 欠損マウスの表現系を手掛かりに、DYRK2 が制御する下流シグナルを探索した。*Dyrk2* 欠損マウスと類似の骨格形成異常を呈するシグナル異常に Hedgehog シグナルが報告されている。そこで、Hedgehog シグナルの活性指標である転写因子 *Gli1* の発現を *in situ* hybridization で解析した。その結果、*Dyrk2* 欠損個体において、*Gli1* の発現が低下していることが確認された。

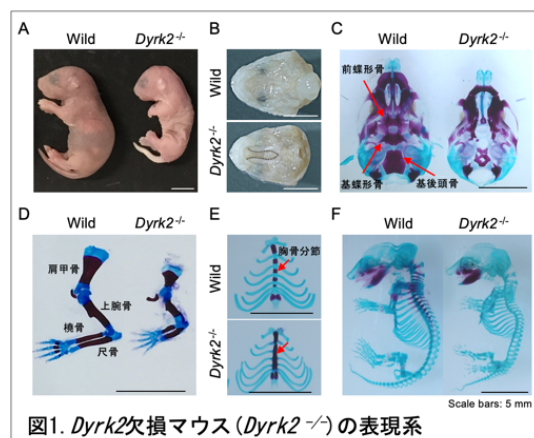


図1. *Dyrk2*欠損マウス (*Dyrk2*^{-/-}) の表現系

この個体レベルで観察された Hedgehog シグナルの低下機序を解析するために、*Dyrk2* 欠損マウス胚から胎仔線維芽細胞 (MEF) を樹立し、Hedgehog リガンドへの応答性を検証した (本研究では、Hedgehog リガンドの代わりに、Smoothened のアゴニストである SAG を使用)。その結果、野生型では SAG に応答し、*Gli1* の発現が上昇する (図 2)。一方で、*Dyrk2* 欠損細胞では、SAG への応答性が消失することが確認された (図 2)。

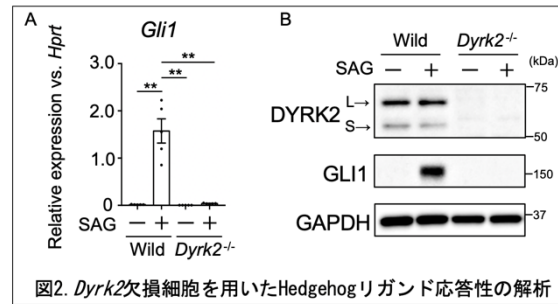


図2. *Dyrk2*欠損細胞を用いたHedgehogリガンド応答性の解析

哺乳類の Hedgehog シグナルは、細胞小器官である一次繊毛に強く依存したシグナル系であることが知られている。そこで、*Dyrk2* 欠損による Hedgehog シグナル活性異常の原因を追求するために、Hedgehog シグナルの反応の場である一次繊毛に注目した。その結果、*Dyrk2* 欠損細胞の一次繊毛は、顕著に長化、さらに先端の膨張や、ねじれなどの形態異常が確認された (図 3)。こうした一次繊毛の異常は、マウス線維芽細胞だけでなく、繊毛研究のモデルであるヒト網膜色素上皮由来 hTERT-RPE1 細胞において *DYRK2* をノックダウンすることでも再現できた。以上の結果から、リン酸化酵素 DYRK2 が新規の一次繊毛制御因子であり、Hedgehog シグナルの活性化に必須の分子であることを哺乳類の個体・細胞レベルで示した。

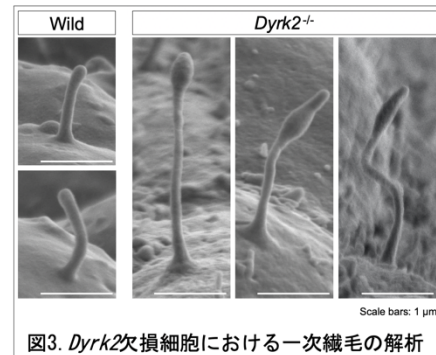


図3. *Dyrk2*欠損細胞における一次繊毛の解析

(3) *Dyrk2* コンディショナルノックアウト (*Dyrk2*^{flox/flox}) マウスを用いた腸管幹細胞特異的な *Dyrk2* 欠損マウスの解析

上記のように、全身性 *Dyrk2* 欠損マウスは出生時致死であり、生後の発がん過程における機能は解析できない。そこで、発がん過程における DYRK2 の機能を解明するために、*Dyrk2*^{flox/flox} マウスを用いた解析を行った。がん幹細胞の起源であることが報告されている腸管幹細胞を標的とし、*Lgr5*-CreER^{T2}-IRES-EGFP;*Dyrk2*^{flox/flox} マウスを作出した。タモキシフェンを投与し、腸管幹細胞特異的な *DYRK2* 欠損マウスを作出した。現在、組織化学的な解析を進めている。

以上の解析から、特に発生過程における DYRK2 の機能を個体レベルで明らかにした。中でも DYRK2 は一次繊毛の形態・機能制御を介し、Hedgehog シグナルを統制する分子であることを見出し、原著論文[Yoshida *et al.*, eLife (2020)]として発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Horiguchi Kotaro, Fujiwara Ken, Takeda Yoshito, Nakakura Takashi, Tsukada Takehiro, Yoshida Saishu, Hasegawa Rumi, Takigami Shu, Ohsako Shunji	4. 巻 in press
2. 論文標題 CD9-positive cells in the intermediate lobe of the pituitary gland are important supplier for prolactin-producing cells in the anterior lobe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-021-03460-5	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 Yamada Kohji, Oikawa Tsunekazu, Kizawa Ryusuke, Motohashi Saya, Yoshida Saishu, Kumamoto Tomotaka, Saeki Chisato, Nakagawa Chika, Shimoyama Yuya, Aoki Katsuhiko, Tachibana Toshiaki, Saruta Masayuki, Ono Masaya, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 81
2. 論文標題 Unconventional Secretion of PKC Exerts Tumorigenic Function via Stimulation of ERK1/2 Signaling in Liver Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 414 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-2009	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 Horiguchi Kotaro, Yoshida Saishu, Tsukada Takehiro, Fujiwara Ken, Nakakura Takashi, Hasegawa Rumi, Takigami Shu, Ohsako Shunji	4. 巻 155
2. 論文標題 Cluster of differentiation (CD) 9-positive mouse pituitary cells are adult stem/progenitor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 391 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01943-0	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 HORIGUCHI Kotaro, YOSHIDA Saishu, TSUKADA Takehiro, NAKAKURA Takashi, FUJIWARA Ken, HASEGAWA Rumi, TAKIGAMI Shu, OHSAKO Shunji	4. 巻 66
2. 論文標題 Expression and functions of cluster of differentiation 9 and 81 in rat mammary epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 515 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-082	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 Yoshida Saishu, Aoki Katsuhiko, Fujiwara Ken, Nakakura Takashi, Kawamura Akira, Yamada Kohji, Ono Masaya, Yogosawa Satomi, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 9
2. 論文標題 The novel ciliogenesis regulator DYRK2 governs Hedgehog signaling during mouse embryogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e57381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.57381	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 Horiguchi Kotaro, Fujiwara Ken, Yoshida Saishu, Tsukada Takehiro, Hasegawa Rumi, Takigami Shu, Ohsako Shunji, Yashiro Takashi, Kato Takako, Kato Yukio	4. 巻 153
2. 論文標題 CX3CL1/CX3CR1-signalling in the CD9/S100 /SOX2-positive adult pituitary stem/progenitor cells modulates differentiation into endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 385 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01862-0	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 MUSHA Shiori, YOSHIDA Saishu, MURAKAMI Syo, KOJIMA Ryotaro, DEAI Masahito, SASO Naoshi, MOGI Chihiro, SATO Koichi, OKAJIMA Fumikazu, TOMURA Hideaki	4. 巻 66
2. 論文標題 Involvement of GPR4 in increased <i>growth hormone</i> and <i>prolactin</i> expressions by extracellular acidification in MtT/S cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 175 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-159	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 MORIYAMA Ryutarō, IWAMOTO Koichi, HAGIWARA Teruki, YOSHIDA Saishu, KATO Takako, KATO Yukio	4. 巻 66
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase activation reduces the transcriptional activity of the murine luteinizing hormone β -subunit gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 97 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-143	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 Horiguchi Kotaro, Yoshida Saishu, Hasegawa Rumi, Takigami Shu, Ohsako Shunji, Kato Takako, Kato Yukio	4. 巻 379
2. 論文標題 Isolation and characterization of cluster of differentiation 9-positive ependymal cells as potential adult neural stem/progenitor cells in the third ventricle of adult rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 497 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-019-03132-5	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 Kanno Naoko, Fujiwara Ken, Yoshida Saishu, Kato Takako, Kato Yukio	4. 巻 207
2. 論文標題 Dynamic Changes in the Localization of Neuronatin-Positive Cells during Neurogenesis in the Embryonic Rat Brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells Tissues Organs	6. 最初と最後の頁 127 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000504359	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 Kanno Naoko, Yoshida Saishu, Kato Takako, Kato Yukio	4. 巻 67
2. 論文標題 Characteristic Localization of Neuronatin in Rat Testis, Hair Follicle, Tongue, and Pancreas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 495 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155419836433	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 -

1. 著者名 Yoshida S, Yoshida K	4. 巻 bio-protocol.org/prep815
2. 論文標題 Immunohistochemistry protocol for analyzing Hedgehog pathway factors in mouse embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bio-protocol	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) なし	査読の有無 無
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 吉田彩舟	4. 巻 47
2. 論文標題 リン酸化酵素 DYRK2 は一次繊毛を介し組織発生を制御する新規分子である	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 比較内分泌学 (原著論文紹介)	6. 最初と最後の頁 172
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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二
2. 発表標題 マウス下垂体前葉におけるCD9/CD81/SOX2陽性細胞の同定と幹細胞性の解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今泉佑太、吉田彩舟、青木勝彦、鐘ヶ江裕美、吉田清嗣、大木隆生
2. 発表標題 大腸がんに対するアデノウイルスベクターによるDYRK2過剰発現を用いた新規遺伝子治療
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田彩舟
2. 発表標題 一次繊毛を介して組織発生を制御する新規リン酸化酵素DYRK2の解析
3. 学会等名 第11回 ペプチド・ホルモン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawamura A, Yoshida S, Aoki K, Nakakura T, Fujiwara K, Yoshida K
2. 発表標題 DYRK2 regulates mammalian development via the control of ciliogenesis
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口幸太郎、吉田彩舟、中倉 敬、塚田岳大、藤原 研、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二
2. 発表標題 ラット乳腺上皮細胞における膜タンパク質CD9の発現解析
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原研、吉田彩舟、中倉敬、塚田岳大、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代隆、加藤たか子、加藤幸雄
2. 発表標題 ラット下垂体の生後におけるラトケ遺残腔の観察
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術集
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原研、吉田彩舟、中倉敬、塚田岳大、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代隆、加藤たか子、加藤幸雄
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell Layerの観察
3. 学会等名 第125回日本解剖学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田彩舟、加藤たか子、加藤幸雄
2. 発表標題 下垂体前葉から単離した組織幹細胞の分化能解析
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原研、吉田彩舟、中倉敬、塚田岳大、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代隆、加藤たか子、加藤幸雄
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell Layer細胞の解析
3. 学会等名 第46回 日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019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

1. 発表者名 Kumamoto T, Yamada K, Yoshida S, Aoki K, Yanaga K, Yoshida K
2. 発表標題 DNA Methylation of Dual-Specificity Tyrosine-Regulated Kinase 2 (DYRK2) Promoter Regulates Proliferation of Human Colorectal Cancer
3. 学会等名 第105回米国外科学会議 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口幸太郎、吉田彩舟、中倉敬、藤原研、塚田岳大、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代隆、加藤たか子、加藤幸雄
2. 発表標題 マウス下垂体前葉におけるCD9/CD81陽性細胞の観察
3. 学会等名 第34回日本下垂体研究会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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