

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861056

研究課題名(和文) 乳癌におけるリン酸化酵素DYRK2の発現制御機構の解明 治療法開発を目指して

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism by which DYRK2 expression is regulated

## 研究代表者

三本 麗 (Mimoto, Rei)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70710333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は癌細胞におけるリン酸化酵素DYRK2の働きについて研究を進めてきた。DYRK2は乳癌・卵巣癌において発現が減少しており、低発現の癌では抗癌剤耐性を獲得し予後不良である。DYRK2を恒常的に発現抑制細胞株においてmTOR パスウェイが活性化していることが、マイクロアレイを用いた解析により明らかとなった。mTOR阻害剤であるエベロリムスを添加するとDYRK2低発現の乳癌細胞では感受性が増加した。Xenograft modelにおける検討では、抗癌剤よりもエベロリムスでの腫瘍増殖抑制効果が高かった。これらの結果より、DYRK2の発現が低い乳癌ではエベロリムスが特異的に作用した。

研究成果の概要(英文)：Our recent study revealed that DYRK2 has a tumor-suppressive function through c-Myc, c-Jun, and Snail expression and phosphorylation of p53. DYRK2 expression is decreased in advanced breast cancer and serous ovarian cancer. Diminished expression of DYRK2 confers drug-resistance to cytotoxic chemotherapy and poor prognosis in these cancers. However, the therapeutic strategy has not been established for breast cancer patients with low DYRK2 expression. Through microarray analysis, mTORC1 pathway was detected as the activated pathway in DYRK2 depleted cells. mTOR inhibitor, everolimus treatment was associated with a significant inhibition of tumor growth compared to vehicle in vitro and in vivo.

研究分野：腫瘍学

キーワード：乳癌 DYRK2

## 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 2013 年で 14 人に 1 人となり年々増加傾向である。乳癌患者の予後は適切な治療により比較的良好であるが、一方で抗癌剤耐性の症例や、副作用により治療完遂できない症例が数多く存在する。臨床現場においては、既存の広範囲な細胞毒性をもつ抗癌剤とは異なる作用機序を持つ、ターゲットを絞った新たな治療戦略が求められている。本研究ではそのターゲットとして、リン酸化酵素 DYRK2 に注目した。癌抑制遺伝子 p53 によるアポトーシスを誘導するリン酸化酵素として DYRK2 を同定して以来(Taira N et al, Mol. Cell., 2007)、DYRK2 の乳癌組織における減少は、c-Jun・c-Myc の細胞内過剰蓄積による顕著な腫瘍増殖に至り、乳癌浸潤を促す重要な転写因子 Snail の分解にも DYRK2 のリン酸化が必要であることを示してきた。つまり DYRK2 の発現低下を抑え込むことは、乳癌の転移再発を抑制する新たな治療ターゲットとなる可能性がある。しかしながら、DYRK2 自体の発現制御機構、また DYRK2 の発現低下をターゲットとした治療法は未だ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、未だ解明されていない乳癌における DYRK2 の発現制御の実態を明らかにし、DYRK2 の発現低下した乳癌をターゲットとした新たな治療戦略を確立する。

## 3. 研究の方法

**(1) ホルマリン固定検体と凍結検体を用いた、DYRK2 の mRNA 量とタンパク質量の解析**  
同一検体におけるタンパク量と mRNA 量を比較し、この発現制御が実際のヒト乳癌組織内でも作用しているのかを検討する。検体は東京慈恵会医科大学乳腺内分泌外科にて採取、ホルマリン検体と凍結検体が対応するよう同一組織を用いる。ホルマリン検体では、免疫組織学的手法により正常乳管部と浸潤乳管部の DYRK2 のタンパク質量を解析する。同一組織で新鮮凍結切片を作成し、Laser Micro Dissection を用いて間質細胞が混入しないよう、正常乳管部と乳癌部を切り出し、DYRK2 の mRNA 量をリアルタイム PCR にて定量的に解析する。乳癌組織と正常乳管部における DYRK2 のタンパク量と mRNA 量を比較しどちらのレベルで発現制御されているのかを明らかにする。

**(2) DYRK2 の発現量の異なる乳癌細胞株と CytoLine Solution 社の遺伝子カスケード解析サービスを用いた、DYRK2 低発現の細胞内で活性化している因子の探索**

本研究では遺伝子カスケード解析サービス (CytoLine Solution 社) を用い、高・低 DYRK2 の乳癌細胞株を用いて発現アレイにて転写量の変化を測定する。世界最大の転写因子

結合サイト・転写制御データベースを用いて変動した遺伝子の転写結合サイトを探索し、シグナル伝達のカスケードの上流の原因因子を特定するという新たな手法を用いる。

**(3) 同定された上流因子による DYRK2 低発現株の制御の解析**

まず、同定された上流因子が実際に DYRK2 の発現によって活性化レベルが変化するかを *in vitro* の実験にて検討する。キーノード因子の下流のリン酸化・タンパク質発現を検討する。

**(4) 同定されたカスケードを阻害する薬剤の効果の検討**

同定された因子のカスケードを阻害する薬剤を用いて DYRK2 低発現の乳癌への効果を MTS アッセイ、ヌードマウスを用いた異種移植実験にて検討する。臨床検体を用いた DYRK2 の発現と、臨床における奏効率・予後と関連を解析する。

## 4. 研究成果

本研究では、DYRK2 低発現の乳癌に対する特異的な治療としてエベロリムスを同定する事ができた。エベロリムスは現在臨床現場でホルモン受容体陽性乳癌の再発症例に対して使用されている薬剤である。しかしながら、その効果予測因子については明らかになっていない。DYRK2 の発現を転移巣で解析することで、エベロリムスへの感受性を予測できるという結果を得る事が出来た。

**(1) DYRK2 の発現は乳癌内でタンパク質レベルで制御されている**

DYRK2 の mRNA 発現量は、乳癌部と正常乳管部で変化がない一方で、タンパク質発現量は癌部で低下していた。DYRK2 発現低下はタンパク質レベルで制御されていることが示唆された。

**(2) DYRK2 の発現が低下した乳癌細胞内では mTOR パスウェイが活性化している**

乳癌細胞株 MCF-7 細胞において DYRK2 を恒常的にノックダウンした細胞株 (shRNA DYRK2 細胞) を作製した。コントロール細胞 (pSuper 細胞) と shRNA DYRK2 細胞でマイクロアレイを行い、CytoLine Solution 社の遺伝子カスケード解析を用いてキーノード因子といわれる上流因子を 79 個同定した。また、KEGG パスウェイ解析を用いて 5 つの活性化しているパスウェイを同定した。二つの手法で共通していたのが mTOR パスウェイであった。

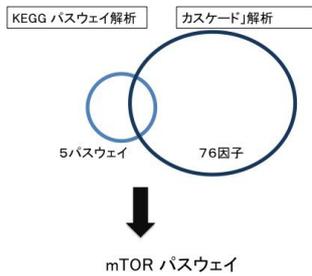


図 1 ) DYRK2 低発現細胞株における活性化パスウェイの同定

**DYRK2 の発現により mTOR パスウェイの活性化が変化する**

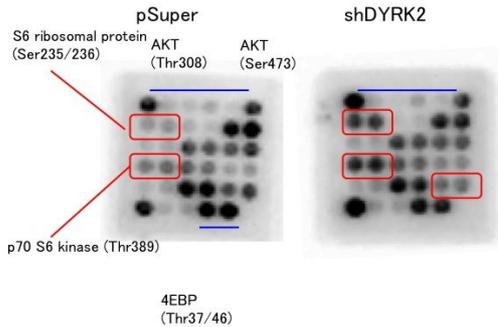


図 2 ) Akt signaling 抗体アレイ

抗体アレイを用いて 2 つの細胞株間で mTOR パスウェイの上流および下流のリン酸化状態を検討すると、下流因子の 4EBP, S6K のリン酸化状態が亢進していた。

**( 3 ) DYRK2 ノックダウン細胞は細胞障害性の抗癌剤よりもエベロリムスでの腫瘍増殖抑制効果が高かった**

mTOR 阻害薬であるエベロリムスを shRNA DYRK2 作用させると細胞障害性の抗癌剤よりもエベロリムスでの腫瘍増殖抑制効果が高かった。ヌードマウスを用いた異種移植実験においても同様の結果が得られた。

実際にエベロリムスを使用した転移性乳癌患者を対象にその奏効率と DYRK2 の発現を比較すると、DYRK2 の低発現の乳癌においてエベロリムスの効果が高いことが示唆された。

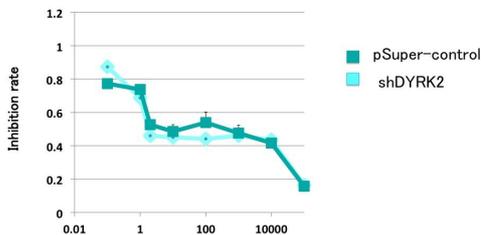


図 3 ) 2 細胞間におけるエベロリムスへの感受性 ( in vitro )

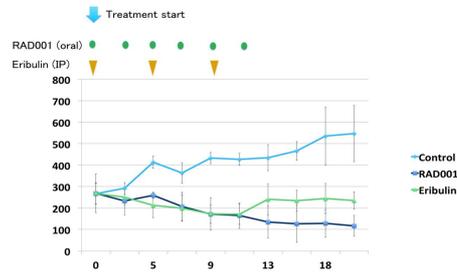


図 4 ) shRNA DYRK 細胞における抗癌剤エリプリンとエベロリムスの効果の比較( in vivo )

DYRK2 の発現	奏効率
低発現	83%
高発現	25%

表 1 ) 乳癌転移巣における DYRK2 の発現とエベロリムスの効果

5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

三本麗, The treatment of RAD001 has a growth inhibition effect to chemotherapy-resistant DYRK2 low expression breast cancer, 第 73 回日本癌学会学術総会, 神奈川

三本麗, 化学療法耐性 DYRK2 低発現乳癌に対するエベロリムスの有効性の検討, 第 23 回日本乳癌学会学術総会、東京

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]  
出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

三本 麗 (MIMOTO, Rei)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70710333