

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26290041

研究課題名(和文) 癌幹細胞の発生・維持機構と腫瘍悪性化の可塑性制御

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of cancer stem cells for neoplastic cellular transformation

## 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) 12,800,000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・維持に寄与す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。まずDYRK2はE-cadherinの発現制御を介して癌細胞の転移を制御していることを見出した。またDYRK2の機能不全により上皮間葉転換が誘導されることや、転写因子KLF4の誘導を介して癌幹細胞性の獲得に繋がることを明らかにした。またDYRK2がmTOR経路への制御にも関わっていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：EMT plays a fundamental role in the early stages of cancer invasion. E-cadherin is an important regulator of EMT. We identified that DYRK2 regulates E-cadherin expression. Knockdown of DYRK2 promoted EMT and cancer invasion in vitro and in vivo. Attenuated expression of DYRK2 promotes cancer stem-like traits in vitro, tumorigenesis in vivo, and cancer stem cell population. We found that KLF4 serves as a key molecule controlling DYRK2-mediated cancer stem cell. Reduced DYRK2 expression leads to an increase of KLF4 expression, which induces cancer stem-like properties. We also found that mTORC1 pathway is activated in DYRK2-depleted cells. The ectopic expression of DYRK2 promoted phosphorylation for the ubiquitination and degradation of mTOR.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌 幹細胞 上皮間葉転換

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では現在およそ2人に1人が癌に罹患し、3人に1人が癌により死亡している。癌の原因を解明し、新しい診断・治療を開発して癌の制圧を目指すことは、喫緊の国民的課題である。

申請者はこれまでに、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主な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。この機構では、癌抑制遺伝子である p53 がその中心的な働きを担っている。p53 は多彩な修飾を受けてその機能を使い分けており、中でもセリン 46 のリン酸化はアポトーシス誘導に必須である。ところが、どのようなリン酸化酵素 (キナーゼ) が DNA 損傷に応答し



図1 DYRK2キナーゼの機能と発癌

てセリン 46 をリン酸化するのか明らかにされていなかった。そこで我々はセリン 46 キナーゼの同定を目指し、世界に先駆けてセリン 46 キナーゼとして DYRK2 を同定することに成功した (図 1)。我々は DYRK2 の機能についてさらに解析を進めたところ、DYRK2 の発現を抑制すると細胞周期において顕著な G1 期の短縮が観察され、結果として細胞増殖能の亢進が見られるという、興味深い知見を得た。その機構として、DYRK2 は c-Jun/c-Myc という転写因子を直接リン酸化し分解を誘導することで、G1 期から S 期へ

の移行を制御していることが判明した (図 1)。c-Jun/c-Myc の分解抑制による高発現が多くの癌細胞において見出されていることから、DYRK2 の機能不全が発癌や癌の進展に関与する可能性が示唆される。さらに我々は DYRK2 の新たな基質として Snail という転写因子を同定した (図 1)。Snail は E-cadherin の発現を負に制御することで上皮間葉転換 (EMT) を誘導する。DYRK2 は Snail をリン酸化し分解を誘導するため、DYRK2 の機能不全は EMT を惹起する。EMT の獲得は癌幹細胞への遷移と密接に関わっている。

またこれまでの我々の研究から、DYRK2 の発現が低下した癌組織においては、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 c-Jun/c-Myc の発現制御異常を伴う過剰な細胞増殖が起きていることが予測され、DYRK2 が新規癌抑制遺伝子である可能性を示唆している。と同時に、DYRK2 が新規腫瘍マーカーや癌治療の標的分子になりうると期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、DNA 傷害に応答して細胞死を誘導するリン酸化酵素として申請者が初めて見出した DYRK2 が、新規癌抑制遺伝子として発癌や癌の進展に寄与する分子機構を明らかにする。その端緒として、これまでに我々は DYRK2 が癌幹細胞の発生や維持に関与しているという知見を得ている。癌幹細胞は転移や再発の原因になることから根治治療の標的であり、どのように幹細胞として発生・維持され、またどのように分化・誘導されるかといったメカニズムの解明を通じて、癌制圧に向けた臨床応用に展開することを目的とする。計画している具体的な研究項目及び内容は次のものである。

(1) DYRK2 による癌細胞の浸潤・転移と

上皮間葉転換機構の解明を通じて、癌幹細胞がどのように発生し維持制御されているかを明らかにする。

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ている。その分子メカニズムの一つとして、ヒストンのメチル化制御に着目している。幹細胞はヒストン H3 のメチル化によって維持されることが知られており、このメチル化を触媒する SMYD3 が DYRK2 によって制御されている可能性を示唆する結果を得ている。そこで本研究では、

( 2 ) DYRK2 が SMYD3 を介したヒストンメチル化調節にどのように関わるかを検証し、癌幹細胞の発生・維持機構を明らかにする。

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、低分化型であっ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、癌幹細胞の割合との逆相関が予想される。この発現低下はプロモーター領域のメチル化とユビキチン化—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、

( 3 ) DYRK2 の発現制御メカニズムを解明し、癌幹細胞発生・維持機構との相関を検証する。

DYRK2 の発現が低下した癌組織においては、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、c-Jun/c-Myc の発現制御異常を伴う過剰な細胞増殖が起き

ていることが予測される。また EMT の獲得により癌の浸潤・転移が誘導され、癌幹細胞への遷移が促進されることなどから、DYRK2 が新規癌抑制遺伝子である可能性を示唆している。そこで in vivo での検証を目的として、新学術領域研究『がん支援』「個体レベルでのがん支援活動」に御協力していただき、DYRK2 ノックアウトマウスを作成中である。本研究では、

( 4 ) DYRK2 ノックアウトマウスを解析し、新規癌抑制遺伝子である可能性を検証する。

以上の結果から DYRK2 が癌幹細胞の発生・維持に寄与する新規癌抑制遺伝子であることが明らかとなれば、腫瘍マーカーや癌治療の標的分子になりうると期待される。そこで、DYRK2 の発現を回復させる低分子化合物のスクリーニングを計画しており、革新的な癌治療開発に繋がることが期待される。また DYRK2 はリン酸化酵素であるため、そのシグナル伝達カスケードを解明することで、新たな標的分子の同定を追求していく。

### 3 . 研究の方法

( 1 ) DYRK2 におけるリン酸化とユビキチン化を介した細胞増殖制御の分子機構

我々は近年、DYRK2 が転写因子 Snail をリン酸化し、引き続く GSK-3 によるリン酸化並びにユビキチン化による分解を通して、その標的分子 E-cadherin の発現を制御していることを見出した。この現象について、まず乳癌細胞に焦点を絞って機能解析を進める。具体的には、Snail のリン酸化状態をモニターし、ユビキチン化や E-cadherin 発現との相関性を検証する。E-cadherin の発現は EMT を制御していることから、DYRK2 による Snail リン酸化を介した E-cadherin 発現制御が EMT にどのように

影響を与えているかについて、乳癌細胞株を用いて *in vitro* による invasion assay や、*in vivo* によるマウス心腔内移植による骨や肺への遠隔転移モデルなどにより明らかにしていく。さらにこの EMT が実際に癌幹細胞様形質の獲得に関与しているかについて、DYRK2 ノックダウンにより EMT をおこした細胞の遺伝子発現プロファイルを解析するとともに、浮遊培養塊形成能実験や xenograft での腫瘍形成能実験により検証する。

#### (2) DYRK2 による遺伝子発現の網羅的探索とシグナリングカスケードの同定

これまでに DYRK2 が転写因子のリン酸化修飾を介していくつかの遺伝子発現制御に関与していることが分かってきた。その全体像を把握し、癌幹細胞の発生・維持機構における役割を明らかにするために、恒常的にノックダウンしている乳癌細胞株と親株の比較により網羅的遺伝子発現プロファイルを調べる。このデータを基に、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検索し、DYRK2 の上流・下流に位置するシグナリングカスケードを特定する。この中で、癌幹細胞の発生・維持に関わると予測されるシグナルを抽出し、そのシグナルを制御するマスター転写因子群を同定する。次に DYRK2 によるマスター転写因子群の制御機構を明らかにする。具体的には、リン酸化による修飾やユビキチン化による分解などに着目し、試験管内実験や癌細胞株によってその機能的制御を確認し、*in vivo* マウス実験などによって実証する。

#### (3) DYRK2 の癌における発現制御機構の解明

我々はこれまでに様々な癌細胞、癌組織検体における DYRK2 の発現を解析してきた。その結果、低分化型であったり悪性度

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、発現量と癌幹細胞の割合とが逆相関するのではないかと予想している。発現低下メカニズムとして プロモーター領域のメチル化と 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

DYRK2 遺伝子のプロモーター配列内のメチル化状態を同定するために、次世代シーケンサーを用いたメチル化 DNA 解析を行う。まず DYRK2 の転写量が低い癌細胞株からゲノム DNA を精製し、バイサルファイトシーケンスを行いメチル化を検出する。次に同定したメチル化配列に対するプライマーを用いてメチル化特異的 PCR により臨床検体におけるメチル化の有無を検討する。

DYRK2 の分解に関与しているユビキチン E3 リガーゼを網羅的に探索する。具体的には、コムギ無細胞蛋白質系による E3 リガーゼタンパク質アレイにより行う。同定された E3 リガーゼの *in vitro* ユビキチン化反応を行い、この E3 リガーゼが細胞内で DYRK2 のユビキチン化に関与しているかを検討することで、生理的な E3 リガーゼであるか否かを検証する。次に臨床検体を用いてリガーゼと DYRK2 との発現の相関を検証する。

#### (4) DYRK2 ノックアウトマウス解析による新規癌抑制遺伝子の検証

新学術領域研究『がん支援』「個体レベルでのがん支援活動」によるご支援により、DYRK2 ノックアウトマウス作製に着手しており、その解析を行う。本研究ではこのノックアウトマウスが癌を発症するか観察し、DYRK2 が新規癌抑制遺伝子であるというこれまでの仮説を検証する。また『がん支援』「個体レベルでのがん支援活

動」病理形態学的研究支援班に、病変の病理組織学的解析を依頼する。DYRK2 ノックアウトが胎生致死となる場合も想定しており、コンディショナルノックアウトの作製には既に着手している。さらに様々な発癌モデルマウスをDYRK2 ノックアウトマウスと掛け合わせ、発症した癌を解析することで腫瘍悪性化や抗癌剤応答性などを調べる。またノックアウトマウス由来線維芽細胞株を樹立し、これまでに得られた知見を基に、DYRK2 の細胞内機能を確証する。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) Snail のプライミングリン酸化状態をモニターし、ユビキチン化や E-cadherin 発現との相関性を検証した。また E-cadherin の発現は EMT を制御していることから、DYRK2 による Snail プライミングリン酸化を端緒とする E-cadherin 発現制御が EMT にどのように影響を与えているかについて、乳癌細胞株を用いて in vitro による invasion assay や、in vivo による xenograft を用いた遠隔転移モデルなどにより明らかにした。また 8 9 症例の乳癌検体を解析し、DYRK2 の発現と遠隔転移再発症例との間に有意な逆相関があることを見出した。以上より、DYRK2 の発現が低下することで Snail の発現が増加し、EMT が誘導されることで乳癌の浸潤・転移が促進されていることが示された。なお、同様の結果が卵巣癌細胞でも得られており、この機構は癌種を超えた普遍的な現象である可能性がある。今後は DYRK2 の発現・機能制御機構を明らかにすることで、新たな治療戦略としての可能性を解明する必要があると考える。

( 2 ) DYRK2 が上皮間葉転換および乳癌幹細胞の存在に影響を及ぼすという実験結果を元に、DYRK2 による乳癌幹細胞の制御に

焦点をあて、癌幹細胞の発生の分子機構の解明に取り組んでいる。DYRK2 低発現の乳癌細胞における遺伝子発現プロファイル解析から、転写因子 KLF4 の発現が上昇し CD44 high/ CD24 low で標識される癌幹細胞の割合が増加することをみいだした。また DYRK2 の発現量に依存してスフェア形成能・ヌードマウスにおける腫瘍形成能がともに変化した。また臨床検体を用いた解析から、DYRK2 低発現の肺転移では顕著に CD44+/CD24-細胞と ALDH1 陽性細胞が増加しており、乳癌幹細胞の増加が示唆された。さらに、DYRK2 と KLF4 をつなぐ因子として転写因子である Androgen Receptor を同定した。

( 3 ) 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。そのような乳癌に対して特異的に作用する治療の探索を行っており、DYRK2 を恒常的にノックダウンした細胞株において mTOR pathway が活性化していることが、網羅的発現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コントロールと比較し感受性が増加した。Xenograft model における検討では、DYRK2 ノックダウン細胞は細胞障害性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することが示唆された。さらに DYRK2 と mTOR の直接的な制御メカニズムについて明らかにした。DYRK2 が mTOR の 6 3 1 番目をリン酸化することで引き続いて FBW7 を介したユビキチン・プロテアソーム系による分解が生じた。また、臨床検体を用いた研究では DYRK2 低発現の再発乳癌において、エベロリムスが有意に予後を改善することを示した。

(4) DYRK2 の発現解析については、プロモーター領域のメチル化とユビキチン化—プロテアソーム分解系による制御の両面から解析を進めており、癌種によって片方だけの制御を受けていたり、両方の制御が見られることが判明しつつある。詳細な分子機構の解明にはさらなる検証が必要である。

(5) CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて DYRK2 遺伝子改変マウスの作製を行った。まず初めに、DYRK2 遺伝子中の標的配列を含むガイド RNA と DNA 切断酵素 Cas9 の合成 RNA を作製し、マウス受精卵に注入した。その後、生存した受精卵のみを仮親マウスへ移植し、13匹の仔マウスを得た。次に得られた F0 世代マウスから欠失パターンの異なるマウス3匹を選び、野生型マウスとの交配により3種の F1 世代ヘテロ個体を得た。また F0 マウスの脳抽出液を用いて DYRK2 タンパク質の発現量を調べたところ、野生型と比べ F0 マウスでは、DYRK2 発現減少が認められ、DYRK2 遺伝子のゲノム編集を確認できた。現在、F1 ヘテロ個体同士を交配させ、ホモ個体を作出し、表現型の異常を経時的に解析中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

Mimoto R, Nihira NT, Hirooka S, Takeyama H, Yoshida K. Diminished DYRK2 sensitizes hormone receptor-positive breast cancer to everolimus by the escape from degrading mTOR. *Cancer Lett.* 384:27-38 (2017) doi: 10.1016/j.canlet.2016.10.015

Mimoto R, Imawari Y, Hirooka S, Takeyama H, Yoshida K. Impairment of DYRK2 augments stem-like traits by promoting KLF4 expression in breast cancer. *Oncogene* 36:1862-1872 (2017) doi: 10.1038/onc.2016.349 1

Yamaguchi N, Mimoto R, Yanaiharu N, Imawari Y, Hirooka S, Okamoto A, Yoshida K. DYRK2 regulates epithelial-mesenchymal-transition and chemosensitivity through Snail degradation in ovarian serous adenocarcinoma. *Tumor Biol.* 36:5913-5923 (2015) doi: 10.1007/s13277-015-3264-y

[学会発表](計20件)

Yoshida K. Tumor suppressive function of DYRK2. DYRK1A, related kinases and human disease. Saint Malo, France 3/30 (2017)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://jikei-biochem.wix.com/yoshidalab>

## 6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし