

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08672

研究課題名(和文)糖・脂質代謝制御を介したがんの進展・転移機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of tumor progression by the regulation of glucose and lipid metabolism

研究代表者

與五沢 里美 (Yogosawa, Satomi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60392437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)乳癌細胞を用いてDYRK2と脂質代謝の主要転写因子PPAR γ の発現量について検討した。(2)また、Dyrk2欠損マウスの解析を行った。その結果、トリプルネガティブ乳癌細胞株MDA-MB-468において、DYRK2発現低下により、PPAR γ の発現亢進が認められた。また、Dyrk2欠損マウスは、骨低形成、腸管低形成、鎖肛、気管食道狭窄、肺低形成、腎低形成、四肢奇形など多くの組織形成異常の表現型を示し、出生直後に致死となることがわかった。従って、Dyrk2欠損マウスは、先天性奇形症候群の病態を解明する有用なモデルとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DYRK2は多数の癌において癌抑制因子として機能することがわかっている重要な分子である。しかしながら、DYRK2のマウス個体レベルでの生理的意義は全く不明である。本研究では、Dyrk2欠損マウスを作製し解析を行った。研究成果として、Dyrk2欠損マウスは、上気道を含む呼吸器の形成異常による呼吸不全を引き起こし、出生直後致死となることがわかった。また、Dyrk2欠損マウスは、多くの組織形成異常の表現型を示した。以上のことから、Dyrk2はマウスの生存に必須であり、Dyrk2欠損マウスが先天性奇形症候群の病態を解明する有用なモデルとなる可能性が示唆され、今後更なる研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) exerts anti-tumor effects in various cancer cells. However, physiological function of Dyrk2 in mice largely unknown. In this study, we first present that the expression of PPAR γ , a key regulatory gene of lipid metabolism, was increased in DYRK2-knockdown MDA-MB-468 cells but not MCF7 cells. This finding suggests that DYRK2 may regulate the expression level of PPAR γ in a subtype-dependent manner. We next investigate the phenotypes of Dyrk2-deficient mice. Dyrk2-deficient mice exhibited sudden death soon after birth due to respiratory failure. Furthermore, Dyrk2-deficient mice were found to show developmental abnormalities and congenital malformations of multiple organs. Taken together, we demonstrated that Dyrk2 is essential for embryonic development and provide a basis for improving our understanding of embryonic development and refractory pediatric disease.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌 脂質代謝 リン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

がんの生存、増殖、転移において、がん細胞は低酸素・低栄養状態の微小環境で活発な活動をするため、ダイナミックな代謝リプログラミングを起こし、ATP 産生に加え細胞構造の材料となるタンパク質、脂質、核酸を大量に作り出している。近年、乳がん、大腸がん、卵巣がんなど様々ながん細胞において、脂質代謝の亢進が認められ、化学療法の標的として期待されている。しかしながら、がん細胞やその微小環境における脂質代謝やその制御機構は、未だ不明な点が多く残されている (Natalya et al., Cell Metabolism, 2016)。

近年、乳がん、大腸がん、卵巣がんなど様々ながん細胞において、脂質代謝の亢進が認められ、化学療法の標的として期待されている (Kuemmerle et al., Mol Cancer Ther, 2011, Accioly et al., Can Res, 2008, Nomura et al., Cell, 2010, Rysman et al., Can Res, 2010)。しかしながら、がん細胞やその微小環境における脂質代謝やその制御機構は、未だ不明な点が多く残されている。

我々は、世界に先駆けてリン酸化酵素 DYRK2 の機能同定を行ってきた (Taira et al., Mol Cell, 2007)。これまでの解析から、乳がん細胞において DYRK2 発現低下は、細胞周期の主要転写因子 c-Jun や c-Myc の発現亢進による、細胞周期進行、発癌の亢進 (Taira et al., Mol Cell, 2007)。

上皮間葉転換 (EMT) の主要転写因子 Snail 発現亢進による EMT の亢進、浸潤・転移の促進 (Mimoto et al., Cancer Lett, 2013) リプログラミング転写因子 KLF4 発現亢進による癌幹細胞性、化学療法抵抗性の亢進 (Mimoto et al., Oncogene, 2016) mTOR 発現亢進による薬剤抵抗性の亢進を認めた (Mimoto et al., Cancer Lett, 2017) (図 1)。

また、DYRK2 発現低下は、大腸癌、肝癌、肺癌、膀胱癌、リンパ腫、膀胱癌、卵巣漿液性腺癌など多数の癌で患者の予後不良と関連していることが見出されている。以上のことより、DYRK2 は、がんの進展・転移の抑制を担う重要な分子であることが示唆されるが、マウス個体レベルにおける知見については全く不明である。

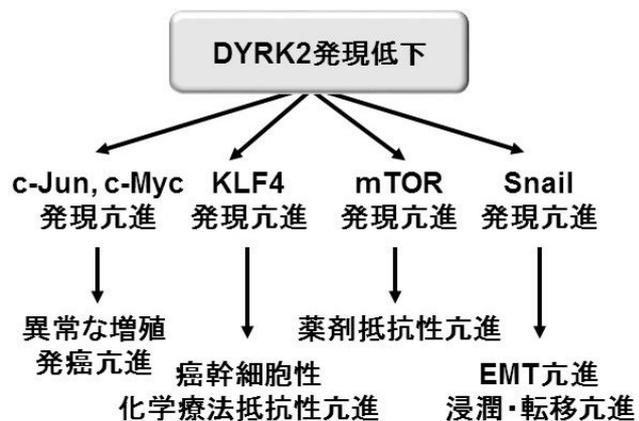


図 1: DYRK2発現低下によるがん進展・転移

そこで、DYRK2 のマウス個体レベルでの生理的意義を明らかにするため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて Dyrk2 欠損マウスを作製した。さらに、Dyrk2 に関与する遺伝子を探索するため、網羅的発現解析を行ったところ、Dyrk2 欠損により、糖・脂質代謝関連遺伝子群の発現が亢進していることを見出した。これらの知見から、Dyrk2 欠損は、糖・脂質代謝を亢進し、がん進展・転移に機能することが予測され、DYRK2 が、癌の進展・転移を抑制する癌抑制因子として働くことが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) や癌細胞を用いて、DYRK2 による糖・脂質代謝抑制機構を明らかにする。DYRK2 のマウス個体レベルでの生理的意義を明らかにするため、Dyrk2 欠損マウスの解析を行う。

3. 研究の方法

DYRK2 による糖・脂質代謝抑制機構

Dyrk2 欠損マウスからマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を単離する。また、乳癌細胞において DYRK2 をノックダウンし、糖・脂質代謝に関連する分子の発現レベルを調べる。

Dyrk2 欠損マウスの解析

Dyrk2 欠損マウスの表現型の異常を経時的に解析する。具体的には、まず、基本パラメーター (体重、外見的異常) に加え、マイクロ CT 撮影、病理診断による形態学的解析などにより表現型の異常を調べる。次に、ホモ個体が胎生致死の場合は、胎生期における発生異常 (死亡時期、骨格・組織の形態形成など) 先天性疾患との関連性を明らかにする。また、ヘテロ・ホモ個体において発癌の有無を調べる。

4. 研究成果

DYRK2 による糖・脂質代謝抑制機構

DYRK2 に関与する遺伝子を探索するため、網羅的発現解析を行ったところ、DYRK2 欠損により、糖・脂質代謝関連遺伝子群の発現が亢進していることを見出した。本研究では、まず、乳癌細胞において DYRK2 をノックダウンし、脂質代謝の主要転写因子 PPAR γ の発現レベルについて調べた。その結果、トリプルネガティブタイプの乳癌細胞株 MDA-MB-468 において、DYRK2 発現低下により、PPAR γ の発現亢進が認められた。また、luminal タイプの MCF7 細胞では、PPAR γ の発現亢進が認められなかった。以上のことから、DYRK2 は乳癌細胞のサブタイプ依存的に PPAR γ 発現量に関与することが示唆された。

Dyrk2 欠損マウスの解析

Dyrk2 のマウス個体レベルでの生理的意義を明らかにするため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて Dyrk2 欠損マウスを作製した。得られた F0 世代マウスの Dyrk2 遺伝子配列を調べたところ、片側アレルでのみ欠失変異を起こし、フレームシフトによりナンセンス変異を起こしているヘテロ欠損マウスを得た。これら 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。このヘテロマウス同士を交配し、Dyrk2 欠損マウスの作出を行ったところ、成体の Dyrk2 欠損マウスは得られなかった。そこで、Dyrk2 欠損マウスの胎生期の解析を行ったところ、Dyrk2 欠損胎仔は、胎生 18.5 日目までメンデルの法則に従い生存していたが、出生直後に致死となることがわかった。

次に、胎生 18.5 日目の Dyrk2 欠損胎仔における組織形成異常の有無を調べた。その結果、Dyrk2 欠損胎仔では、骨低形成、腸管低形成、鎖肛、気管食道狭窄、肺低形成、腎低形成、四肢奇形などが認められ、多くの組織形成異常の表現型を示した。また、網羅的発現解析から、Dyrk2 欠損胎仔において、肺発生関連因子、Foxa2、Notch1、Foxp2、Nkx2.1、腸管発生関連因子、Cdx2、Foxf2、Foxl1、骨格発生関連因子、Hoxd12、Hoxd13、Scx、Brachyury、口蓋裂関連因子、Foxf2 の発現減少が認められ、組織形成の異常が遺伝子発現レベルにおいても明らかとなった。また、

Dyrk2 欠損マウスにおける出生直後致死は、上気道を含む呼吸器の形成異常による呼吸不全が原因であることがわかった。

次に、成体の Dyrk2 ヘテロ欠損マウスの表現型を明らかにするため、60 週齢まで観察し、組織形成異常の有無を調べた。その結果、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、腸管などの主要組織の形態異常は認められなかった。また、主要組織における腫瘍形成の有無を調べたところ、腫瘍形成は認められなかった。

以上のことから、Dyrk2 はマウスの生存に必須であり、Dyrk2 欠損マウスが、先天性奇形症候群の病態を解明する有用なモデルとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ito D, Yogosawa S, Mimoto R, Hirooka S, Horiuchi T, Eto K, Yanaga K, Yoshida K.	4. 巻 108
2. 論文標題 DYRK2 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) 10.21873/anticancer.11655	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 Okabe H, Aoki K, Yogosawa S, Saito M, Marumo K, Yoshida K.	4. 巻 109
2. 論文標題 Downregulation of CD24 suppresses bone metastasis of lung cancer.	5. 発行年 2018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 Yokoyama-Mashima S, Yogosawa S, Kanegae Y, Hirooka S, Yoshida S, Horiuchi T, Ohashi T, Yanaga K, Saruta M, Oikawa T, Yoshida K.	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 Mimoto R, Yogosawa S, Saijo H, Fushimi A, Nogi H, Asakura T, Yoshida K, Takeyama H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinical implications of drug-screening assay for recurrent metastatic hormone receptor-positive, human epidermal receptor 2-negative breast cancer using conditionally reprogrammed cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49775-w	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 Yogosawa Satomi, Nakayama Jun, Nishi Mayuko, Ryo Akihide, Yoshida Kiyotsugu.	4. 巻 27
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 13 suppresses bone metastasis in breast cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Treatment and Research Communications	6. 最初と最後の頁 100332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ctarc.2021.100332	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 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 -

〔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 與五沢里美、吉田清嗣
2. 発表標題 乳癌幹細胞株の骨転移に関する遺伝子の解析
3. 学会等名 平成29年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yogosawa Satomi, Nakayama Jun, Nishi Mayuko, Ryo Akihide, Yoshida Kiyotsugu.
2. 発表標題 Carbonic anhydrase 13 suppresses bone metastasis of breast cancer cells.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 與五沢里美、吉田清嗣
2. 発表標題 DYRK2欠損マウスは先天性奇形症候群の疾患モデルとなる
3. 学会等名 2019年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 與五沢里美、吉田清嗣
2. 発表標題 DYRK2欠損マウスは肺低形成により呼吸不全となり、出生直後致死となる
3. 学会等名 平成30年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
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
研究 分担 者	吉田 清嗣	東京慈恵会医科大学・医学部・教授	
	(Yoshida Kiyotsugu)		
	(70345312)	(32651)	

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