

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19484

研究課題名(和文) ライブイメージングを基盤とする癌幹細胞の非対称分裂検出とメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation for molecular mechanism of cancer stem cells by the live-imaging technology

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：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、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。そこでDYRK2が上皮間葉転換および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だ。またがん幹細胞の分裂様式を調べるにあたって、その恒常性維持に寄与する分子の同定と機能解析は必須であり、その一つとしてがん遺伝子として知られるリン酸化酵素であり、細胞増殖、生存、アポトーシスを制御することが報告されているPim-1キナーゼを見いだすことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞はがん細胞の中で幹細胞様の性質をもつ細胞集団として知られており、自己複製能、高い治療抵抗性をもつ。これら幹細胞様の性質は、浸潤や転移、再発などの原因となると考えられている。がん幹細胞は腫瘍内に極少数の割合で存在していると考えられているが、がん幹細胞に制御に関わる因子や細胞内シグナル伝達経路については不明な点が多い。本研究からPim-1、DYRK2、CA13などこれまで知られていなかったがん幹細胞制御分子の同定に成功しており、これらの分子をターゲットとした治療法開発の端緒となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that downregulation of DYRK2 promotes cancer stem-like traits in vitro, tumorigenesis in vivo, and the proportion of the cancer stem cell population. KLF4 serves as a key mediator of DYRK2's control over the cancer stem phenotype. Our findings delineate a mechanism of cancer stem cell regulation by the DYRK2-AR-KLF4 axis. Targeting of this pathway may be a promising strategy against cancer stem cells. We also found that silencing of DYRK2 increased CDK14. Reduced DYRK2 expression increases CDK14 expression, which promotes cancer cell proliferation and invasion. CDK14 and DYRK2 expression inversely correlated. We identified androgen receptor (AR) as a DYRK2-dependent transcription factor regulating CDK14. Our findings suggest a mechanism by which a DYRK2-AR-CDK14 interaction regulates cell proliferation and invasion. Targeting of this pathway may be a promising therapeutic strategy for treating cancer.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん幹細胞 細胞分裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、分裂期の染色体制御機構について解析を進めてきた。また一方で癌幹細胞の制御機構について、リン酸化酵素に着目して新たな知見を得ている。これら異なる領域の研究成果を包括的に検証する過程で、癌幹細胞の分裂制御、特に非対称分裂が癌の多様性や可塑性にどのように寄与しているかその制御機構解明を通じて明らかにしたいとの新たな研究の着想に至った。そもそも癌細胞は均一な細胞集団ではなく、未分化な細胞から高度に分化した細胞など、様々な細胞が混在する不均一な集団である。このような癌細胞の不均一性は、既存の抗癌剤や放射線療法によって癌が退縮したにも関わらず再発が起こるなど、癌の難治性の重大な原因となっている。

腫瘍内に存在する癌幹細胞は正常の幹細胞と同じように自己複製能と多分化能を有した細胞群であり、非対称分裂によって様々な性質の癌細胞を供給し、腫瘍の不均一性を生み出している。このことから、癌幹細胞における非対称分裂の制御機構を解明することは、腫瘍不均一性の成り立ちを明らかにすることにつながると期待されている。また癌幹細胞は再発や転移の原因となることから、この分裂様式の理解は病態の理解のみならず、新規治療への応用に繋がる。しかし癌幹細胞における非対称分裂の制御機構については、その制御因子をはじめとして殆ど詳らかになっていないのが現状である。なぜならこの分裂様式を規定するメカニズムは、特に哺乳類細胞においてはこれまで実験的に示すことが困難であり、その多くが不明のままである。

2. 研究の目的

幹細胞は細胞分裂の際に、対称に分裂して2個の幹細胞あるいは分化した細胞を生み出すか、非対称に分裂して幹細胞と分化した細胞を生み出している。幹細胞性が可塑的に遷移する癌幹細胞においては、非対称分裂により様々な性質の癌細胞を生み出すことによって増大していると考えられている。この分裂様式を規定するメカニズムはこれまで実験的に示すことが困難であり、その多くが不明である。そこで本研究では、まず細胞ライブイメージングを利用したヒト癌幹細胞の非対称分裂を検出する系の確立に取り組む。次に非対称分裂を起こした細胞を抽出し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析等による制御因子の網羅的探索を行う。以上の解析から、癌幹細胞の非対称分裂がどのような因子によって制御されているかについて、その制御因子の網羅的探索を通じて明らかし、非対称分裂の分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

研究の方法として、2つのアプローチを計画した。1つ目は、ショウジョウバエの幹細胞で示された新旧のヒストン H3 の取り込み様式が不均等分裂を規定しているという知見を元に、SNAP-tag 技術を用いた *in vitro* イメージング解析により検証する。SNAP-tag 技術により細胞周期のある特定の時限だけを標識して可視化することが可能になった。そこでヒストン H3 に SNAP-tag を融合することで、新旧のヒストン H3 を区別してパルスチェイスできることから、その分配と不均等分裂との関連の有無について調べることを企図した。2つ目は、癌幹細胞ではプロテアソーム活性が低下しており、蛍光蛋白質とプロテアソームによって直接認識される degron モチーフの融合遺伝子をマーカーに用いた癌幹細胞の可視化の報告があることから、蛍光蛋白質と degron モチーフによる同様の実験系を構築し、プロテアソーム活性の違いを指標と

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

した非対称分裂の検出を試みた。以上2つの異なるアプローチからそれぞれに非対称分裂細胞を比較・検討することで非対称分裂の制御因子の網羅的探索を行い、分子機構を明らかにすることを計画した。

4. 研究成果

幹細胞性が可塑的に変化するがん幹細胞において、非対称分裂により様々な性質のがん細胞を生み出すことで増大していることから、この分裂様式の理解が本研究の目的であった。しかし計画していた実験が想定よりも遥かに困難であることが判明し、現況での実験精度では証明が不可能であるという結論に達した。そこでがん幹細胞の特性により焦点を当てた研究へと方針を転換した。

(1) Pim-1 によるがん幹細胞の自己複製能制御機構

幹細胞性が可塑的に変化するがん幹細胞において、非対称分裂により様々な性質のがん細胞を生み出すことによって増大していると考えられており、この分裂様式の理解が研究目的である。がん幹細胞はがん細胞の中で幹細胞様の性質をもつ細胞集団として知られており、自己複製能、高い治療抵抗性をもつ。これら幹細胞様の性質は、浸潤や転移、再発などの原因となると考えられている。がん幹細胞は腫瘍内に極少数の割合で存在していると考えられているが、がん幹細胞に制御に関わる因子や細胞内シグナル伝達経路については不明な点が多い。Pim-1 はがん遺伝子と知られるリン酸化酵素であり、様々な基質のリン酸化を介して細胞増殖、生存、アポトーシスを制御することが報告されている。また、Pim-1 の高発現が多くのがん種で報告されているが、がん幹細胞での機能については不明である。本研究では Pim-1 キナーゼのがん幹細胞内での機能に注目し大腸癌細胞株を用いた解析を行った。過去の報告から、*in vitro* における sphere formation assay は自己複製能を有するがん幹細胞を選別する方法であることが明らかとなっていることから、sphere 形成細胞での Pim-1 の機能について解析を行った。その結果、Pim-1 は sphere 細胞で高発現していることを見出した。また、Pim-1 の機能抑制は sphere 形成を抑制した。Pim 阻害剤を用いた解析から、Pim-1 は sphere 細胞において Akt、mTOR の活性を制御することが明らかとなった。これらの結果から、Pim-1 は Akt/mTOR シグナル伝達経路の活性化を介してがん幹細胞の自己複製能の制御に寄与している可能性が示唆された。

(2) DYRK2 による癌幹細胞化と癌転移の *in vivo* イメージング解析

我々が細胞死誘導性リン酸化酵素として同定した DYRK2 は、これまでの内外の研究から癌に抑制的に働くことが、乳癌、卵巣癌、肺癌、膀胱癌、大腸癌などで報告されている。本研究では DYRK2 の癌抑制機構について、その幹細胞性と転移に焦点を当てて調べた。まず、大腸癌の肝転移における DYRK2 の役割について、動物実験モデルで検証した。大腸癌細胞株 HCT-116 に E2-Crimson を導入し、蛍光標識による追跡を可能にした。ヌードマウスの脾臓に癌細胞を注入し経門脈による肝転移を誘導し、転移巣から腫瘍を回収した。E2-Crimson 陽性細胞をセルソーターで分離し DYRK2 の発現を調べたところ、有意にその発現が低下していることを見出した。そこで HCT-116 に DYRK2 を安定的に発現する細胞株を樹立し、マウス肝転移モデルで検証したところ、野生型 DYRK2 を発現した細胞株では有意に転移能が減少したが、リン酸化酵素活性のない DYRK2 発現細胞では、コントロール細胞と同等の転移能を示した。以上の結果から、

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

DYRK2の発現抑制が大腸癌の転移を促進すること、翻ってDYRK2の強制発現によって酵素活性依存的に転移を抑制できることが示唆された。さらに手術検体を用いてDYRK2の発現レベルと予後について検証を行った。DYRK2の発現が高い症例では低い症例に比べて、全生存率、無病生存率それぞれについて有意に高いことが判明した。

(3) 乳癌におけるDYRK2の幹細胞性制御の分子機構

幹細胞性が可塑的に変化するがん幹細胞において、非対称分裂により様々な性質のがん細胞を生み出すことで増大していることから、この分裂様式の理解が本研究の目的であった。しかし計画していた実験が想定よりも遥かに困難であることが判明し、現段階での実験精度では証明が不可能であるという結論に達した。そこでがん幹細胞の特性により焦点を当てた研究へと方針を転換した。端緒として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、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。そこで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だ。DYRK2低発現の乳癌細胞では転写因子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。さらに臨床検体を用いた解析を行った。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。また、DYRK2とKLF4をつなぐ因子として転写因子であるAndrogen Receptorが同定された。今後はこのDYRK2/AR/KLF4を介した乳癌幹細胞制御をターゲットとした治療について検討する予定である。

また乳癌におけるDYRK2の役割について、幹細胞性の制御をふまえた動物実験モデルで検証した。ホルモン受容体陽性乳癌細胞株であるMCF-7において、DYRK2の発現を抑制した細胞株を作成し網羅的発現解析を行って野生株と比較したところ、最も発現が増加した遺伝子としてCDK14を同定した。実際にMCF-7細胞においてDYRK2の発現を抑制するとCDK14の発現が上昇し、増殖能が顕著に増加した。DYRK2とCDK14の発現を抑制すると、*in vitro*、*in vivo*においてDYRK2単独抑制細胞よりも腫瘍増殖や浸潤能が減少した。実際の乳癌組織内においても、DYRK2が低発現の組織ではCDK14の発現は高かった。この分子機構として、DYRK2は転写因子ARを介してKLF4を転写制御することでCDK14の発現を調節して乳癌の幹細胞性を抑制することを見出した。DYRK2低発現細胞ではAR阻害剤であるMDV3100の添加でCDK14の発現が低下した。近年、ARを標的とした乳癌治療が効果的であるとの報告もあり、これまで悪性度が高いとされていたDYRK2低発現乳癌に対して、AR阻害剤が治療標的となる可能性がある。

(4) CA13は新規乳がん骨転移抑制因子である

乳がんの罹患率は年々増加の一途を辿っている。早期に発見し治療を行えば死亡率は低いが、遠隔転移を伴うステージでは、急激にその割合が増加することから、転移を防ぐことが、重要な課題である。乳がん骨転移に対する治療法は、これまで抗がん剤治療、分子標的治療、ホルモン療法が行われてきたが、効果的な治療法がなく画期的な治療法の開発が急務となっている。

我々は、これまで乳がん幹細胞株iCSC-10Aを用いて、乳がんの骨転移機構の解析を行って

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

きた。iCSCL-10A 細胞は、リプログラミング因子 (OCT4、SOX2、Klf4、c-Myc) を乳腺上皮細胞株 MCF-10A に導入することによって樹立された細胞株である。本細胞株は、自己再生能、多分化能、薬剤耐性能、造腫瘍能などのがん幹細胞の性質を保持しているが、その転移能、分子機序については不明であった。そこで、in vivo 蛍光イメージングにより iCSCL-10A 細胞の転移の有無およびその分子機序に関わる新規因子を同定し、乳がんの転移の効果的治療法や診断マーカーの開発を目指した基礎的知見を得ることを目的とし検討を行った。

近赤外蛍光タンパク質 iRFP713 を iCSCL-10A 細胞に安定発現させ、免疫不全マウスに心腔内投与し、in vivo 蛍光イメージングにより転移の有無を調べた。iCSCL-10A 細胞は、移植 4 週間後から高率に骨転移を認めた。次に、iCSCL-10A 細胞の骨転移に関与する遺伝子を探るため、骨転移巣から iCSCL-10A 細胞を単離し、網羅的遺伝子発現解析により移入前後での遺伝子発現変化を調べた。その結果、細胞質型炭酸脱水酵素 (CA) ファミリーの一つである carbonic anhydrase 13 (CA13) の顕著な発現減少が認められた。CA ファミリーは細胞質、膜結合型などに分類され、その機能は局在により異なる。膜結合型 CA は、細胞外 pH 調節を介してがん微小環境を酸性化し、がんの進展・転移促進に働くことが知られている。このことから、細胞質型 CA13 は、細胞内 pH 調節を介して、乳がん細胞の浸潤・転移能を抑制するというモデルの提唱に至っている。そこで、CA13 の乳がん細胞における機能を調べるため、CA13 を過剰発現させた iCSCL-10A 細胞 (CA13 細胞) を作製し、検討したところ、CA13 細胞において浸潤能、骨転移能の有意な減少が認められた。次に、細胞外酸性化により発現誘導され、がんの浸潤・転移を亢進する VEGF-A、破骨細胞の分化、溶骨に関与する M-CSF の発現を調べたところ、CA13 細胞において VEGF-A、M-CSF の発現減少が認められた。さらに、CA13 高発現乳がん患者では、全生存期間、無病生存期間の延長を認めた。以上のことから、CA13 は、細胞内酸性化と VEGF-A、M-CSF の発現減少を介して、乳がん細胞の浸潤能、骨転移能の抑制、溶骨に関与する新規分子であることが明らかとなった。さらに、CA13 は、乳がんの新規診断マーカーとなりうることが示唆され、新たな治療法開発にもつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 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 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 Rei, Yogosawa Satomi, Saijo Hiroki, Fushimi Atsushi, Nogi Hiroko, Asakura Tadashi, Yoshida Kiyotsugu, Takeyama Hiroshi	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 ~ 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 隈本智卓、山田幸司、青木勝彦、吉田清嗣、矢永勝彦
2. 発表標題 DYRK2のメチル化を標的とした大腸癌治療の可能性
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satomi Yogosawa, Jun Nakayama, Mayuko Nishi, Akihide Ryo, Kiyotsugu Yoshida
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

〔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
---------	---------