

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08429

研究課題名(和文) 肝臓におけるがん幹細胞制御機構の解明と遺伝子治療開発

研究課題名(英文) Gene therapy development in liver cancer

研究代表者

及川 恒一(Oikawa, Tsunekazu)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20514491

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)：我々は世界に先駆けてp53依存的細胞死誘導キナーゼDYRK2を同定し、癌の増殖、転移・浸潤に関与することを明らかにしてきた。そこで肝臓におけるDYRK2の役割について解析を行った。ヒト肝臓組織癌部では非癌部に比べDYRK2の発現が低下しており、発現低下例では予後不良であること、肝臓細胞株でDYRK2強制発現及びノックダウン機能解析からDYRK2が腫瘍細胞増殖抑制やapoptosisを誘導すること、肝臓細胞株を免疫不全マウスに移植しadenovirus遺伝子導入によるDYRK2強制発現を行うことで増殖抑制とアポトーシスを誘導を介した腫瘍縮小効果を持ち、将来的な新規治療となりうる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓は全世界で第2位の死亡数をほこり、日本では男性は5位、女性は7位である。日本における肝臓の10年生存率は17.6%と膵臓に次ぐワースト第2位で予後不良である。肝臓の根治的治療としては切除が主体で、早期にはラジオ波焼灼療法、肝動脈塞栓療法、肝移植等が有効であるが、脈管浸潤や遠隔転移を有する症例の多くは予後不良であるため、より早期の診断法の確立と新規治療法が切望されている。本研究における我々の研究成果は学術誌(Yokoyama-Mashima S et al, Cancer Lett, 2019)に採択され、肝臓における将来的な新規治療となりうる可能性を示しており有益な発見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Liver cancers, including hepatocellular carcinoma (HCC) are among the most common cancers worldwide and are associated with a poor prognosis. The only curative treatments for HCC are surgical resection for early-stage. However, most patients are diagnosed at advanced-stages. For the treatment of unresectable HCC, transcatheter arterial chemoembolization and systemic chemotherapy, but the effects are limited. Therefore, the identification of novel molecules that can become targets for future therapies is urgently needed.

We have reported that dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2 (DYRK2) functions as a tumor suppressor by regulating cell survival, differentiation, proliferation and apoptosis. We found that HCC patients with low levels of DYRK2 had a significantly worse overall survival than those with high levels. Overexpression of DYRK2 inhibited cell proliferation and induced apoptosis. The forced expression of DYRK2 may become a potential target for gene therapy of HCC.

研究分野：Gastroenterology

キーワード：肝臓 がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

原発性肝癌の根治的治療としては外科的切除が主体であり、早期にはラジオ波焼灼療法、経皮的エタノール注入療法、肝動脈塞栓療法、肝移植等がときに有効である。しかしながら、脈管侵襲や遠隔転移を呈する症例の多くは予後不良であるため、より早期の診断法の確立と新規治療法が切望されている。近年、切除不能肝細胞癌に対して腫瘍細胞増殖と血管新生を阻害するソラフェニブやレンバチニブ等の分子標的薬が開発され、臨床で使用されているが、それらの効果は非常に限定的であり、新規治療標的分子の同定による新たな新規治療法の開発が急務であると考えられていた。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでに世界に先駆けて p53 依存的細胞死誘導キナーゼとして DYRK2 を同定し、乳癌、卵巣癌、大腸癌等においてリン酸化酵素である DYRK2 発現低下が細胞周期の主要転写因子 c-Jun や c-Myc の蓄積を引き起こし細胞増殖が亢進すること、リプログラミング転写因子 KLF4 発現を誘導し癌幹細胞特性と化学療法抵抗性の獲得をもたらすこと、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) の主要転写因子 Snail 発現亢進による EMT を誘導することで癌の増殖、転移・浸潤に関与することを明らかにしてきた (Taira et al. *J Clin Invest*, 2012/ Mimoto et al. *Cancer Lett*, 2013 / Ito et al. *Cancer Sci*, 2017/ Mimoto et al. *Oncogene*, 2017)。

しかしながら、これまでに肝癌における DYRK2 の役割についての詳細は不明であった。そこで、肝癌においてリン酸化酵素である DYRK2 制御機構を解明することにより、肝癌に対する新規治療法開発応用を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト肝癌細胞株において、DYRK2 遺伝子の強制発現 (gain of function) または small hairpin RNA (shRNA) を利用した knockdown および CRISPR/Cas9 システムを用いた knockout (loss of function)を行い、*in vitro* 培養系と *in vivo* xenograft 担癌マウスにおける腫瘍形成を評価することで肝癌細胞における DYRK2 の機能解析を行った。さらに症例的な治療応用を見据えてマウス肝癌誘導モデルを用いた dyrk2 遺伝子導入実験を行った。

具体的には、

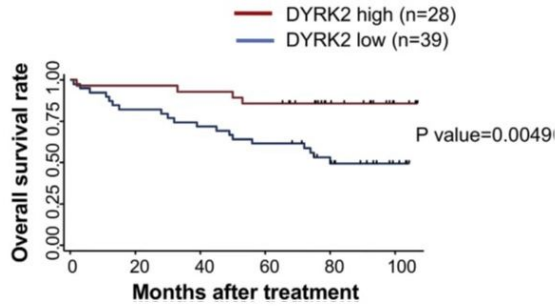
1. ヒト肝癌組織を用いて癌部と非癌部の DYRK2 発現を免疫染色で比較し、その予後について解析した。
2. *in vitro* 培養系でのヒト肝癌細胞株における細胞増殖やアポトーシスへ与える影響を解析した。
3. *in vitro* 培養系において、ヒト肝癌細胞株における細胞増殖、アポトーシスに関連する細胞周期関連およびアポトーシス関連遺伝子の発現をウェスタンブロットや免疫組織染色で解析した。
4. また、ヒト肝癌細胞株の DYRK2 遺伝子を knockdown した stable line を作成し、免疫不全マウスの皮下に移植した腫瘍細胞を IVIS イメージング装置を用いて、*in vivo* における生体内動態を解析した。
5. 担癌免疫不全マウスに DYRK2 強制発現 (adenovirus による遺伝子導入) を行い、*in vivo* での抗腫瘍効果を解析した。
6. さらに、マウス肝癌誘導モデルを用いて dyrk2 強制発現を行うことで将来的な遺伝子治療候補となりうるかを解析した。

## 4. 研究成果

我々は、

ヒト肝癌組織の免疫染色において癌部では非癌部と比べ DYRK2 の発現が著しく低下していること、DYRK2 低発現肝癌患者の予後は DYRK2 高発現患者と比較し不良であること

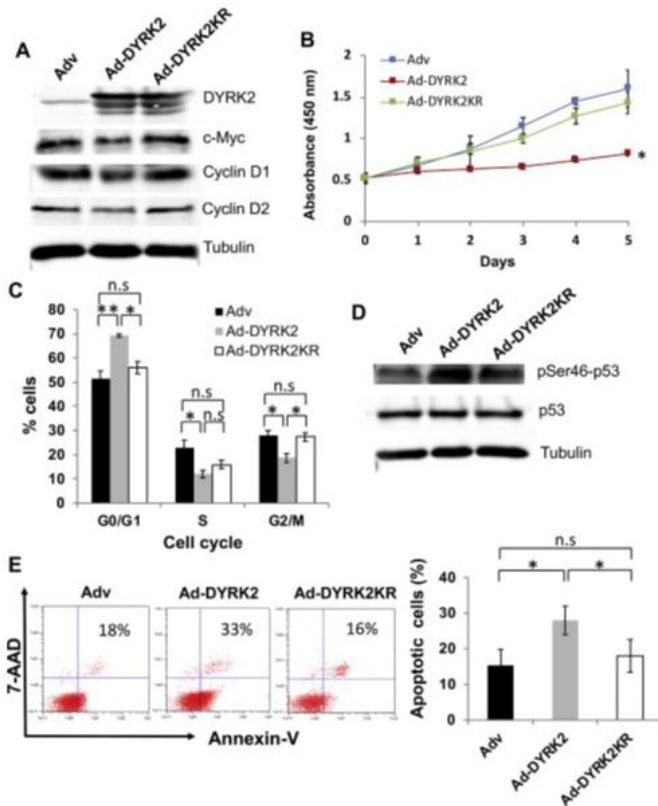
( 図 1 )



Yokoyama-Mashima et al. *Cancer Lett* 451; 2019, 100-109

図 1. 肝癌における DYRK2 発現と予後の関係

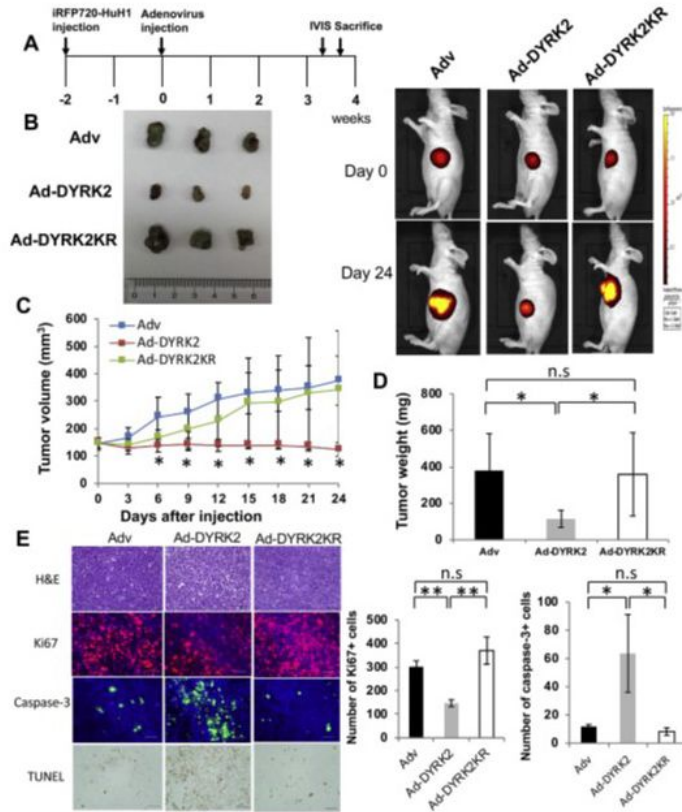
ヒト肝癌細胞株では正常肝細胞より DYRK2 が低発現であり、その強制発現及び knockdown を行った機能解析の結果から DYRK2 が細胞周期関連遺伝子である cyclin D1, cyclin D2 を介して腫瘍細胞の増殖を抑制すること一方で DYRK2 は肝癌細胞においれ apoptosis を誘導すること ( 図 2 )



Yokoyama-Mashima et al. *Cancer Lett* 451; 2019, 100-109

図 2. 肝癌細胞株での DYRK2 強制発現による細胞増殖やアポトーシスに与える影響

ヒト肝癌細胞株を免疫不全マウスの皮下に移植した xenograft 担癌マウスにおいて、DYRK2 強制発現 ( adenovirus による遺伝子導入 ) が、 *in vitro* のみならず *in vivo* でも腫瘍細胞の増殖抑制と apoptosis 誘導を介した腫瘍縮小効果を持つこと ( 図 3 )



Yokoyama-Mashima et al. *Cancer Lett.* 451; 2019, 100-109

図 3. xenograft 担癌マウスにおける DYRK2 強制発現 (adenovirus による遺伝子導入) による抗腫瘍効果

マウス肝癌誘導モデルにおいて dyrk2 強制発現は腫瘍造成を抑制すること、腫瘍発症・進展に関連する遺伝子を microarray を用いて網羅的に解析を行い、dyrk2 が制御する興味深い複数の遺伝子が存在すること

を見出した。今後さらなる dyrk2 の腫瘍形成、進展にかかわる制御メカニズムについて解析していく予定である。

これらの結果は、学術誌 (Yokoyama-Mashima S et al, *Cancer Lett.* 451:2019. 100-109) に掲載され、肝癌における将来的な新規治療応用につながる可能性を示唆すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada K, Oikawa T, Kizawa R, Motohashi S, Yoshida S, Kumamoto T, Saeki C, Nakagawa C, Shimoyama Y, Aoki K, Tachibana T, Saruta M, Ono M, Yoshida K.	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 2021年
3. 雑誌名 Cancer Res.	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. Epub 2020 Dec 14.	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 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 Lett.	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. Epub 2019 Mar 6.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山志保
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

〔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  (Yoshida Kiyotsugu)  (70345312)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授    (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
---------	---------