

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300347

研究課題名(和文)腫瘍悪性化分子機構の解明と癌制圧に向けた診断・治療への展開

研究課題名(英文)Elucidation for molecular mechanisms of neoplastic cell 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) 16,500,000円、(間接経費) 4,950,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制遺伝子p53の細胞死誘導を惹起するDYRK2キナーゼについて、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メカニズムの解明に主眼を置いた。まずDYRK2はG1/S期の遷移を制御することで細胞周期調節に寄与しており、発癌抑制に貢献している可能性が明らかとなった。次にsnailを介して癌細胞の上皮間葉転換や転移を制御していることも判明した。さらにDNA損傷によってDYRK2がp53のSer46をリン酸化しアポトーシスを誘導する分子機構として、アンフィレグリンの発現を見出した。アンフィレグリンはDDX5と結合してmiRNAのプロセッシングを調節し、Bcl-2の発現を抑制していた。

研究成果の概要(英文)：Dysregulation of the G1/S transition in the cell cycle contributes to tumor development. Degradation of c-Jun/c-Myc is a critical process for the G1/S transition. We found DYRK2 functioning as a priming kinase, whose phosphorylation of c-Jun/c-Myc precedes and is required for subsequent GSK3beta phosphorylation. DYRK2 silencing shortened the G1 phase to accelerate cell proliferation due to their escape from ubiquitination-mediated degradation. EMT plays a fundamental role in the early stages of breast cancer invasion. Snail is an important regulator of EMT. We identified that DYRK2 regulates Snail stability. Knockdown of DYRK2 promoted EMT and cancer invasion in vitro and in vivo. p53 phosphorylation at Ser46 exerts apoptotic cell death. We found that amphiregulin (AREG) is identified for a direct target of Ser46 phosphorylation. AREG interacted with DDX5. AREG regulated precursor microRNA processing with DDX5 to reduce the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2.

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：DNA傷害 アポトーシス ユビキチン化 プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、癌による死亡者数は他の死亡原因とは異なり戦後一貫して増加傾向にあり、1981年より死亡原因の第1位となり、現在に至るまでその死亡率は上昇し続けている。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。近い将来、日本人の約半数が癌により死亡するとの予測もある。癌の原因を解明し、診断・治療を開発して癌を制圧することは喫緊の国民的課題である。

研究代表者はこれまでに、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。DNA 損傷によって惹起されるアポトーシスでは、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 Ser46 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 損傷に応答して Ser46 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 Ser46 キナーゼの同定を目指し、世界に先駆けて Ser46 キナーゼとして DYRK2 を同定することに成功した。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。c-Jun/c-Myc の分解抑制による高発現が多く、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。一方、p53 の Ser46 によるリン酸化が、どのようなメカニズムでアポトーシス誘導を惹起しているのか、ほとんど明らかにされていない。このリン酸化によって p53 の転写標的遺伝子の指向がアポトーシス関連分子にスイッチする可

能性が示唆されているが、その標的分子はこれまでほとんど明らかにされていない。そこで我々はマイクロアレイによって Ser46 リン酸化特異的に発現が誘導される分子を探索したところ、その一つとして amphiregulin(AREG)を同定した。さらに、AREG が p53 依存性アポトーシス誘導に重要な働きを担っていることが判明した。そのメカニズムを解明する過程で、AREG が microRNA(miRNA)の成熟機構に関与しているという全く予想外の結果を得た。以上のような p53 を中心とした細胞運命制御機構を解明することにより、発癌や癌の進展といった腫瘍悪性化の詳細な分子メカニズムが明らかになると考えられる。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

本研究は研究代表者らが明らかにした、癌抑制遺伝子 p53 の細胞死誘導を惹起する DYRK2 キナーゼについて、未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、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メカニズムを確立する。さらに我々が見出した p53 による新規 microRNA (miRNA) 制御もふまえて腫瘍悪性化の分子基盤に迫ると共に、癌の診断に有用な新規腫瘍マーカーの探索や癌の治療に繋がる新規標的分子の探索を通じて、癌制圧に向けた臨床応用に展開することを目的とする。具体的な研究項目は次のものである。

- (1) DYRK2 の細胞死誘導機構と細胞周期調節機構の解明
- (2) miRNA の成熟機構とその破綻がもたらす発癌や癌の進展との関連
- (3) これらの分子機構の解明を端緒とした腫瘍悪性化分子基盤の確立
- (4) 発癌や癌の進展に関わる新規腫瘍

マーカーの網羅的探索

(5) 新しい癌治療を目指した新規分子標的の網羅的探索

### 3. 研究の方法

(1) DYRK2 の細胞内局在制御機構の解明

これまでに我々は、DYRK2 の多くは細胞質に局在しており、DNA 傷害などのストレスを受けると核に移行し p53 などをリン酸化することを見出している。その後の解析から、DYRK2 は核に移動するのではなく、ストレス刺激により核内 DYRK2 の恒常的分解が抑制されるといふ知見を得た。しかしこの分解機構の詳細は不明である。そこでこの分解機構が最も可能性のあるポリユビキチン化によるものかどうかについて検証する。また質量分析計を用いた DYRK2 会合分子の網羅的探索を遂行し、ユビキチン化に関与する分子群を単離し、機能解析を行う。

(2) DYRK2 における細胞周期制御の分子機構

これまでの予備的実験から、DYRK2 の細胞周期制御には、基質である c-Jun/c-Myc のプライミングリン酸化が関与している可能性を示唆する結果を得ている。まずこの現象について細胞株で詳細な検証を行う。具体的には、DYRK2 をノックダウンし、これら基質群のリン酸化の変化を細胞周期と共にモニターする。DYRK2 によるプライミングリン酸化が GSK3 のリン酸化を誘導し、基質の分解に影響を及ぼしているかについても調べる。またリコンビナントタンパク質を用いたインビトロにおけるリン酸化能もあわせて確認する。

次に、c-Jun/c-Myc によって転写制御される下流遺伝子の発現をモニターする。具体的には、DYRK2 をノックダウンした後、細胞周期を同調させて G1 期から S 期にかけての細胞周期関連遺伝子群の発現変化を経時的に調べる。さらに細胞周期の変化を細胞内イメージングにより、可視化する。方法としては、FUCCI システムを利用する。

最後に、DYRK2 をノックダウンした腫瘍細胞をヌードマウスに移植し、モック細胞の移植と比較してその腫瘍増殖能や腫瘍転移

能を調べる。

(3) 腫瘍病理検体を用いた DYRK2 の発現解析

腫瘍病理検体をパラフィン包埋ブロックを用いて解析する。特に癌の悪性度や進展度に着目し、DYRK2 の発現レベルとの関連について精査する。さらに、癌のステージを指標とした DYRK2 の発現レベルと c-Jun/c-Myc のプライミングリン酸化との関連についても検証し、DYRK2 が診断や予後予測マーカーとして有用であるかについてその可能性を探る。

(4) 分子標的としての DYRK2

これまでの研究から、DYRK2 の発現低下や機能不全が癌の発生や進展と密接に関わることが示されれば、DYRK2 が分子標的になる可能性がある。そこで、特に DYRK2 の分解亢進による機能不全に着目し、癌で何らかの異常がみられるか調べる。もし癌で分解が亢進している場合、この分解に関わる分子群を同定し、DYRK2 との発現の関連を検証する。また DYRK2 の発現が低下した癌組織では細胞死と細胞周期に異常を来していることが予測され、癌の進展、特に転移能の亢進への関与が考えられることから、細胞やモデル動物を用いて DYRK2 が癌転移に関与しているか検証する。

(5) AREG による miRNA 成熟機構と細胞死誘導機構

我々のこれまでの予備的実験から、p53 のアポトーシス誘導に必須な Ser46 リン酸化に応じて特異的に発現誘導される AREG が、Drosha と呼ばれる RNA プロセシング酵素を介して miRNA の成熟機構に関与しているというデータを得ている。しかしそのメカニズムは全く明らかになっていない。そこで AREG の会合分子を質量分析により探索し、Drosha の機能をどのように制御し miRNA の成熟機構に寄与しているかを解明する。

またこれまでの研究から miRNA の発現異常が発癌あるいは癌の進展に密接な関わりを持つことが多数報告されている。そこで癌臨床検体から AREG と miRNA の発現との関連を調べることで、AREG の発現異常が miRNA の成熟機構を破綻させることで、結

果として発癌や癌の進展に寄与している可能性について解析を行う。

さらに、AREG によって制御されている miRNA を miRNA マイクロアレイにより網羅的に解析し、細胞内での発現変化を確認する。次にこれら miRNA の標的遺伝子を単離するために、同定された miRNA を細胞に導入し、miRNA と結合している RNA-induced silencing complex の主要コンポーネントである Ago タンパク質を免疫沈降し RNA 画分を精製し標的 mRNA の配列を決定する。これにより同定された標的遺伝子が実際に制御を受けているかについて、個々の分子ごとに機能解析を行い、細胞の運命決定にどのように関与しているか検証する。最後にこれまでの研究成果をふまえ、miRNA 制御と腫瘍悪性化について総括する。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) DYRK2 の細胞内局在制御機構の解明

これまでに我々は、DYRK2 の多くは細胞質に局在しており、DNA 傷害などのストレスを受けると核に移行し p53 などをリン酸化することを見出している。その後の解析から、DYRK2 は核に移動するのではなく、ストレス刺激により核内 DYRK2 の恒常的分解が抑制されるという知見を得た。その具体的なメカニズム解明を目的として DYRK2 の機能解析を進めたところ、DYRK2 は ATM によって制御されていることが判明した。具体的には、DNA 損傷に伴って ATM は DYRK2 の Thr33 と Ser369 をリン酸化し、DYRK2 を活性化するだけでなく、DYRK2 の核内での安定化にも寄与していることが明らかになった。さらに DYRK2 は核内にも存在するが、MDM2 によって恒常的にユビキチン化され分解されていること、DNA 損傷後 ATM による Thr33 のリン酸化によって MDM2 が DYRK2 から解離し分解が抑制されることを見いだした。そしてこの制御が DNA 損傷における p53 依存性アポトーシス誘導に本質的なステップであることが示された。以上の結果から、DYRK2 は細胞質だけでなく核にも存在しているが、核内 DYRK2 は MDM2 によって恒常的に分解されており、DNA 損傷によって

ATM によるリン酸化を受け核内で安定化し活性化され、p53 をリン酸化しアポトーシスを誘導するというモデルを提唱した。さらに DYRK2 の分解に関わる新たなユビキチンリガーゼを同定することを目的として、質量分析計を駆使した DYRK2 の会合分子の網羅的探索に着手しているが、今までのところ候補分子は見出せていない。しかし、DYRK2 の新たな機能に関わると考えられるいくつかの会合分子が同定されたため、会合様式を調べながら機能解析を進めている。

##### ( 2 )DYRK2 における細胞周期制御の分子機構

転写因子である c-Jun や c-Myc は細胞周期制御に必須であることが知られている。c-Jun や c-Myc はプライミングリン酸化を受けると、引き続いて GSK3beta によるリン酸化が誘導され、さらにユビキチンリガーゼ FBW7 がリクルートされて c-Jun や c-Myc がユビキチン化されることで、プロテアソームによる分解が誘導される。このリン酸化を起点とした分解は G1 期から S 期への遷移に重要であり、分解異常が発癌や癌の進展と密接に関与していることは報告されていたが、そのプライミングキナーゼははっきりしていなかった。本研究で我々は、DYRK2 と呼ばれるリン酸化酵素が、c-Jun や c-Myc のプライミングリン酸化を担っていることを見出した。興味深いことに、DYRK2 をノックダウンすると c-Jun や c-Myc のプライミングリン酸化が顕著に減弱し、それに伴い c-Jun や c-Myc の分解異常による蓄積が観察され、G1 期の顕著な短縮に伴う細胞増殖が亢進した。さらに DYRK2 を恒常的にノックダウンした乳癌細胞をマウスに移植し造腫瘍効果を調べたところ、コントロール細胞と比較して、明らかな造腫瘍能の増強が観察された。次に、ヒト乳癌組織における DYRK2 の発現を検証したところ、乳管内乳癌と比べて浸潤性乳癌では DYRK2 の顕著な発現低下が認められ、一方で c-Jun や c-Myc は発現上昇しているという逆相関現象が観察された。以上より、DYRK2 は DNA 損傷に応答して細胞死を誘導する一方で、G1/S 期の遷移を制御することで細胞周期調節にも寄与しており、発癌抑制に貢献している可能性が示唆された。

### (3) 上皮間葉転換と転移におけるDYRK2の役割

転写因子 snail は E-cadherin の発現を負に制御しており、snail 自身はリン酸化と引き続く分解によって発現がコントロールされている。我々は DYRK2 が snail をプライミングリン酸化し、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。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 の発現は上皮間葉転換 (EMT) を制御していることから、DYRK2 による 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、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。

### (4) AREG による miRNA 成熟機構と細胞死誘導機構

我々はこれまでに、DNA 損傷によって DYRK2 が p53 の Ser46 をリン酸化しアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた。しかし、p53 がリン酸化を受けた後どのようなメカニズムで細胞死が惹起されるかについては不明であった。その詳細な分子機構を解明するために、Ser46 のリン酸化で誘導される分子を網羅的発現解析によって同定したところ、その一つとしてアンフィレグリン (AREG) と呼ばれるサイトカイン分子を見出した。AREG は Ser46 リン酸化依存的に誘導され、細胞核に蓄積してることが判明した。次に AREG がどのように細胞死誘導に寄与しているかを調べるために、AREG と会合する分子を質量分析計によって探索したところ、DDX5 と呼ばれる分子を同定した。DDX5 は RNA ヘリカーゼの一つであり、Drosha と呼ばれる酵素と協調して miRNA のプロセッシングに参与している。そこに AREG が会合することでプロセッシングが促進されることを見出した。この結果、抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現を抑制する miRNA が活性化することでアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計6件)

Taira N, Yamaguchi T, Kimura J, Lu Z-G, Fukuda S, Higashiyama S, Ono M, Yoshida K. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:717-722 (2014)

DOI: 10.1073/pnas.1313675111

Mimoto R, Taira N, Takahashi H, Yamaguchi T, Okabe M, Uchida K, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 controls epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail. *Cancer Lett.* 339:214-225 (2013)

DOI: 10.1016/j.canlet.2013.06.005

Taira N, Mimoto R, Kurata M, Yamaguchi T, Kitagawa M, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *J. Clin. Invest.* 122:859-872 (2012)

DOI: 10.1172/JCI60818

### 〔学会発表〕(計25件)

吉田清嗣 細胞死誘導と細胞周期制御による発癌抑制の分子機構 第3次対がん10か年総合戦略・文科省がん支援活動 合同公開シンポジウム、東京；1月31日、2012

### 〔図書〕(計2件)

Yoshida K. Functional role for the c-Abl tyrosine kinase signalling in the DNA damage response. In: Kimura S and Shimizu S (eds), *DNA repair: New Research*. Nova Science Publishers, Inc. pp.133-147 (2012)

Yoshida K. Role for PKC $\delta$  on apoptosis in the DNA damage response. In: Clark C. Chen (ed), *Selected Topics in DNA Repair*. InTech. pp.293-304 (2011)

### 〔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