

## 生 化 学 講 座

講座担当教授：吉田 清嗣 分子腫瘍学

### 教育・研究概要

#### I. DYRK2 過剰発現アデノウイルスベクターを用いた肝癌細胞に対する抗腫瘍効果

我々は、これまでリン酸化酵素 DYRK2 の機能同定を行ってきた。これまでの解析から、乳癌細胞において DYRK2 発現低下は、1) 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、2) 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・転移の促進を認めた。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相関していることが見出されている。従って、DYRK2 は、乳癌細胞の増殖、進展・転移抑制を担う重要な分子であることが示唆されるが、肝癌細胞における知見については未だ不明である。そこで、肝癌細胞において DYRK2 を発現低下させると、c-Myc 発現が亢進し、細胞周期進行が認められ、Xenograft モデルにおける肝癌細胞の腫瘍形成能も亢進した。このことから、DYRK2 は、肝癌細胞の増殖、腫瘍形成能の抑制に機能することが示唆された。次に、アデノウイルスベクターを用いて、肝癌細胞に DYRK2 を過剰発現させ、抗腫瘍効果を検討した。その結果、DYRK2 を過剰発現させた肝癌細胞では、細胞増殖、細胞周期の遅延が認められ、p53 リン酸化を介したアポトーシスも亢進した。また、アデノウイルスベクターを用いて DYRK2 を過剰発現させると、Xenograft モデルにおける肝癌細胞の腫瘍形成能を顕著に減少させ、抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。さらに、DYRK2 発現は、肝癌患者の予後不良と逆相関しており、DYRK2 が肝癌の予後予測因子となりうることも明らかとなった。以上のことより、DYRK2 は、今後、肝癌に対する新たな遺伝子治療開発に向けた有用なターゲットとなり得ることが示された。

#### II. DYRK2 の発現と安定性に関する研究

これまでの我々の研究から、リン酸化酵素である DYRK2 はがん抑制的な機能を有していると考えられる。実際に、免疫染色解析の結果から、複数のがん患者検体のがん部では DYRK2 タンパク質の発現量が低下していた。したがって、DYRK2 の発現を

回復させることができるならば、それはがん治療法の開発に結びつく可能性があるが、細胞内での DYRK2 の発現調節機構についてはほとんど明らかになっていない。

DYRK2 遺伝子のプロモーター領域は GC 含量が高いため、DNA のメチル化による mRNA の発現制御機構の存在が示唆される。その一方で、DYRK2 mRNA 中の開始コドン上流には 300 塩基以上にわたって GC 含量が高い 5' 非翻訳領域が存在し、その内部には uORF が存在している。これらは mRNA の 5' 非翻訳領域を介する翻訳調節機構の存在を示唆するものである。そこで、この 5' 非翻訳領域がルシフェラーゼの発現に及ぼす影響をレポーターアッセイ系を用いて解析した。DYRK2 遺伝子の転写開始点から始まる 5' 非翻訳領域を PCR で増幅し、その配列を SV40 プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子との間に挿入したところ、ルシフェラーゼの活性は 5 分の 1 まで低下した。また、レポーターベクターに挿入した配列から uORF 領域を欠損させたところ、ルシフェラーゼの活性は元の 2 分の 1 まで回復した。以上の結果から、DYRK2 の発現調節機構の一つとして 5' 非翻訳領域を介する翻訳調節が存在する可能性が示唆された。

細胞内での DYRK2 の発現量はタンパク質分解系によっても制御されている。ショウジョウバエの DYRK2 については、そのドメイン構造と細胞内安定性との関連が Kinstrie らによって調べられているが、ヒトの DYRK2 における知見はない。一方、ヒト DYRK2 のキナーゼドメインについては立体構造が解かれており、そのアミノ酸配列は Kinstrie らによる安定性評価に用いられた領域と一致している。そこで、ヒト由来の培養細胞にヒト DYRK2 のキナーゼドメインを強制発現させ、その発現量をイムノブロットングで評価した。その結果、細胞内におけるヒト DYRK2 のキナーゼドメインの発現量は、全長の DYRK2 と比べて、極めて低かった。いくつかの欠失変異体を作成し、それらの発現量を比較したところ、細胞内安定性における N 末端の寄与は大きく、その領域はヒトからゼブラフィッシュまでで保存されていることが明らかになった。尚、キナーゼドメイン以降の C 末端領域は DYRK2 の安定性への寄与は小さかった。

#### III. 組織発生における DYRK2 の機能解析

正常な組織発生は、シグナリングの時空間的発現パターンにより決定付けられる。これらシグナリングは、構成分子の遺伝子発現だけでなく、リン酸化

を始めとする翻訳後修飾により厳密に制御されている。これまでに我々は、DNA 損傷時にアポトーシスを誘導する p53 の Ser46 リン酸化酵素として Dual specific tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) を同定してきた。しかしながら、組織発生における DYRK2 の機能は不明である。そこで、本研究では、組織発生における DYRK2 の機能解明を目的とした。現在までに、解析に必要な免疫組織化学的手法、in situ hybridization 法ならびに in vitro 解析を立ち上げた。今後、これらの手法を用いて、組織発生における DYRK2 の標的シグナルの同定を試みる。

#### IV. リン酸化酵素の局在解析

細胞内キナーゼは、細胞内情報伝達系を担う分子として知られている。そのうち、本研究室ではいくつかのセリン・スレオニンキナーゼに着目し、これまでにその同定をはじめ、その性状・機能解析に関して世界でも先駆的な成果を挙げてきた。本研究では、こうした細胞内キナーゼとがんとの関連について解析を進めている。

我々は細胞内キナーゼのうち、新たにキナーゼ X について、その細胞内局在解析を行ったところ、キナーゼ X が細胞内のみならず細胞外にも局在することを見出した。実験系としては、生化学的手法をはじめ、可視的細胞生物学的、免疫学的手法を用いた。さらに本学内科との共同研究により、この細胞内キナーゼ X が患者血清で高値に検出されることを見出した。また、このキナーゼ X が細胞膜糖鎖関連受容体に結合していることも見つけた。よって本研究から、細胞内キナーゼの新しい局在とがんとの関連を明らかにすることができた。今後は、機能解析をはじめ、細胞生物学的側面と病態学・臨床的意義の解明を目指して研究を進めていく予定である。

#### V. がん幹細胞における Pim-1 の機能解析

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。

#### 「点検・評価」

##### 1. 研究

発癌機構の解明と癌治療への応用を主たるテーマとして研究活動を展開しており、その成果をコンスタントに発信できるようになってきた。2018 年度生化学講座の研究活動において特記すべき事項としては、アデノウイルスベクターを用いて、肝癌細胞に DYRK2 を発現させ、抗腫瘍効果を検討したところ、DYRK2 を過剰発現させた肝癌細胞では、細胞増殖、細胞周期の遅延が認められ、アポトーシスも亢進した。また、アデノウイルスベクターを用いて DYRK2 を過剰発現させると、Xenograft モデルにおける肝癌細胞の腫瘍形成能を顕著に減少させ、抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。この効果は DYRK2 のリン酸化酵素活性依存的に発揮されることから、何らかの基質リン酸化を介した現象であることが推察される。

##### 2. 教育

主に医学科 2 年生、3 年生、及び看護学科 2 年生の教育に携わっている。医学科 2 年生前期のコース基礎医科学 I のユニット「分子から生命へ」では、講義・演習・実習を分子生物学講座と密接に連携しながら担当している。演習や実習では、少人数による「議論を通じて考えて理解する」能動的な学習を促すよう周到な準備のもと実施しており、多大な教員の負担はあるものの、充分それに見合う教育効果が得られていると考えている。

## 研究業績

## I. 原著論文

- 1) Okabe H, Aoki K, Yogosawa S, Saito M, Marumo K, Yoshida K. Downregulation of CD24 suppresses bone metastasis of lung cancer. *Cancer Sci* 2018; 109(1): 112-20.
- 2) Imawari Y, Mimoto R, Hirooka S, Morikawa T, Takeyama H, Yoshida K. Downregulation of DYRK2 promotes tumor cell proliferation and invasion by enhancing CDK14 expression in breast cancer. *Cancer Sci* 2018; 109(2): 363-72.
- 3) Chen M, Cai LY, Yoshida S, Takekoshi S, Kajiwara H, Nishimura N, Wang H, Kato T, Izumi SI, Kato Y. Presence of human herpes virus 1-thymidine kinase in testis of azoospermic infertile herpes-infected patients. *Reprod Toxicol* 2018; 82: 57-62.
- 4) Yoshida S, Fujiwara K, Inoue T, Sasaki E, Kametani Y, Takekoshi S, Inoshita N, Kato T, Kato Y. "Localization of SOX2-positive stem/progenitor cells in the anterior lobe of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) pituitary. *J Reprod Dev* 2018; 64(5): 417-22.

## II. 総説

- 1) Yogosawa S, Yoshida K. Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in the DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Sci* 2018; 109(11): 3376-82.
- 2) 山田幸司, 米田悦啓. 第1章: 細胞はどのようにして生きているか 1.3. 遺伝情報の発現と継承. 坂井建雄(順天堂大), 石崎泰樹(群馬大)編. 人体の細胞生物学: カラー図解. 東京: 日本医事新報社, 2018. p.50-69.
- 3) 山田幸司, 米田悦啓, 岡 正啓. 核輸送因子インポーター $\alpha 1$ の細胞外放出とがん機能. *細胞* 2018; 50(5): 263-6.
- 4) 吉田彩舟. 下垂体の機能維持と幹・前駆細胞. *アグリバイオ* 2018; 2(11): 84-7.
- 5) 吉田彩舟. 下垂体組織幹・前駆細胞の特性とその起源の多様. *細胞* 2018; 50(7): 403-6.

## III. 学会発表

- 1) 本田真理子, 與五沢里美, 鎌田美乃里, 鎌田裕子, 木村高弘, 小池祐介, 原田 徹, 鷹橋浩幸, 穎川 晋, 吉田清嗣. 新規近赤外線蛍光蛋白 iRFP720 は, マウス前立腺癌骨転移モデルを用いた遺伝子発現解析に有用である. 第106回日本泌尿器科学会総会. 京都, 4月.
- 2) 野本秀材, 松浦知和, 前橋はるか, 白井美佐子, 大川 清, 吉田清嗣. ラジアルフロー型バイオリアクター

を用いたバイオ人工骨の開発-マウス MC3T3-E1 細胞とヒト hFOB1.19 細胞を用いて-. 第36回ヒト細胞学会学術集会. 東京, 8月.

- 3) 井廻良美, 三本 麗, 山口乃里子, 武山 浩, 吉田清嗣. 乳癌細胞株においてDYRK2はCDK14を介して腫瘍増殖を制御する. 第77回日本癌学会学術総会. 大阪, 9月.
- 4) 三本 麗, 與五沢里美, 伏見 淳, 野木裕子, 武山浩, 吉田清嗣, 大木隆生. CR細胞を用いたルミナルB乳癌に対する新たな薬剤感受性試験法の確立. 第77回日本癌学会学術総会. 大阪, 9月.
- 5) 隈本智卓, 山田幸司, 青木勝彦, 矢永勝彦, 吉田清嗣. DYRK2のプロモーター領域のメチル化は人の結腸直腸癌の進行を制御する. 第77回日本癌学会学術総会. 大阪, 9月.
- 6) 木澤隆介, 山田幸司, 及川恒一, 隈本智卓, 及川祐希, 多胡直子, 尾野雅哉, 立花利公, 吉田清嗣. 細胞内キナーゼの細胞外分泌はがん細胞増殖を促進する. 第135回成医会総会. 東京, 10月.
- 7) 吉田彩舟, 藤原 研, 西原大翔, 堀口幸太郎, 加藤たか子, 屋代 隆, 加藤幸雄. レチノイン酸シグナルは下垂体特異的転写因子*Prop1*の発現を制御している. 第45回日本神経内分泌学会学術集会. 東京, 10月.
- 8) 吉田彩舟, 藤原 研, 西原大翔, 堀口幸太郎, 加藤たか子, 屋代 隆, 加藤幸雄. 下垂体発生過程における転写因子*Prop1*のレチノイン酸シグナルによる発現制御解析. 第111回日本繁殖生物学会大会. 上田, 8月.
- 9) 吉田彩舟, 藤原 研, 西原大翔, 堀口幸太郎, 加藤たか子, 屋代 隆, 加藤幸雄. 下垂体特異的転写因子*Prop1*の発現はレチノイン酸による制御を受ける. 第33回日本下垂体研究会学術集会. 高知, 8月.

## IV. 著書

- 1) Yoshida K. Chapter3: Tumor suppressive functions of protein kinase C  $\delta$  in the DNA damage response. In: Pierce DJ, ed. Protein Kinase C: Emerging Roles and Therapeutic Potential. New York: Nova Science Publishers, 2018. p.49-64.