

腫瘍悪性化の分子機構と癌治療への応用

東京慈恵会医科大学 生化学講座

吉田 清嗣

1、要旨

我々は近年、細胞死誘導に重要な働きを担う酵素として DYRK2 キナーゼを同定することに成功した。本研究において DYRK2 の機能についてさらに詳細な解析を行ったところ、DYRK2 の発現を抑制すると有意な 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、全く予想外の結果を得た。その分子機構として、DYRK2 は c-Jun/c-Myc という転写因子を直接リン酸化することを見出した。さらに DYRK2 は snail という転写因子をリン酸化し E-cadherin の発現を上げることで、上皮間葉転換 (EMT) を抑えており、DYRK2 の発現低下により EMT が促進され浸潤・転移に繋がることが判明した。以上の結果から、DYRK2 による腫瘍悪性化機構の一端が明らかとなり、発癌や癌の進展との関わりが示唆された。

2、はじめに

DNA 損傷によって惹起される細胞死 (アポトーシス) では、がん抑制遺伝子である 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いることが知られており、中でも Ser46 のリン酸化はアポトーシス誘導に必須と考えられている[1,2]。ところが、どのようなリン酸化酵素 (キナーゼ) が DNA 損傷にตอบสนองして Ser46 をリン酸化するのか明らかにされていなかった。これまでの研究から、紫外線による Ser46 のリン酸化は HIPK2 というキナーゼがその中心的な役割を果たしているという報告がなされたが[3,4]、DNA 損傷ではリン酸化できない。また ATM が Ser46 のリン酸化に関わっていることも報告されたが[5]、現在までのところ直接のリン酸化酵素であることは示されていない。そこで我々は、DNA 損傷における機能的かつ生理的な Ser46 キナーゼの同定を目指し、ファージ発現ライブラリーを用いた抗リン酸化抗体によるスクリーニングを行ったところ、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[6]。DYRK2 は ATM 依存的に DNA 損傷によって活性化され、細胞質から核に移行し Ser46 をリン酸化する。また siRNA により DYRK2 の発現を抑えると、Ser46 のリン酸化が完全に阻害され、p53 依存性アポトーシス誘導が有意に抑制された。これら一連の DYRK2 による p53 の Ser46 リン酸化とアポトーシス誘導の発現は、p53 依存性アポトーシス誘導機構の解明に向けた大きな前進であり、がんをはじめとする疾患への治療応用が期待されている[7]。我々は DYRK2 の機能についてさらに詳細に解析を行ったところ、DYRK2 の発現を抑制すると有意な 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、全く予想外の結果を得た。さらに様々な予備実験の結果、DYRK2 は c-Jun/c-Myc という転写因子を直接リン酸化することを見出した。このリン酸化は G1 期から S 期に移行する際に観察されるユビキチン化とそれに続くプロテアソームによる分解に必須であることから、分解を受けずに発現が持続することが、G1 期短縮と増殖亢進に寄与していると考えられる。実際 c-Jun/c-Myc の変異や高発現が多くの乳癌細胞において見

出されていることから、DYRK2 が乳癌発症に関与する可能性が示唆される。そこで本研究では、DYRK2 における細胞周期調節機構を解明し、乳癌発症や乳癌の進展との関わりを明らかにし、治療への応用を模索した。

3、結果と考察

① DYRK2 における細胞周期制御の分子機構

c-Junやc-Myc は細胞周期制御に必須な転写因子である。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FBXW7がリクルートされてc-Junやc-Mycの分解を促すことが知られている。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が報告されている。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[8]。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。

② DYRK2による浸潤・転移の分子機構

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、引き続くGSK3によるリン酸化並びに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[9]。この現象について、特に乳癌細胞に焦点を絞って機能解析を進めた。具体的には、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snailプライミングリン酸化を嚆矢とする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、乳癌細胞株を用いて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。

③ 定量性プロテオミクス解析システムの構築と DYRK2 研究への応用

本研究は、さらに2DICAL法という無標識サンプル間比較解析が可能な定量性プロテオミクス解析システムを構築し、癌臨床検体の網羅的解析を行うことにも挑戦した。この目的達成のため、様々な癌細胞株を用いて、2DICAL法による質量分析測定を行い、併せてその定量比較解析限界を検討した。これらの予備実験をふまえて、適切な条件のもと臨床検体の網羅的発現解析を順次進めていく予定である。加えて我々が焦点を当てて研究を進めているDYRK2やp53などについて、2DICAL法を用いて会合分子の単離やリン酸化部位の同定も試みた。興味深いことに、DYRK2の基質分子候補が多数同定されており、そのいくつかは

ついて現在精力的に機能解析を進めている。いずれにしても、DYRK2 という、これまでどんな働きを担っているのかほとんどわかっていなかったリン酸化酵素が、本研究を通してその機能が徐々にではあるが明らかになりつつあると考えている。また我々は近年、細胞周期に関わる分子が分裂期において特異的にリン酸化修飾されることを見出し、2DICAL 法の解析システムを応用してこのリン酸化部位の同定を試みた。その結果、新たなリン酸化部位を一カ所同定することに成功した。以上より、2DICAL 法はリン酸化修飾の同定にも極めて有効なシステムであることが判明した。今後は、他の翻訳後修飾、例えばアセチル化やユビキチン化などの同定にも応用できるかについても、検討を進めていく予定である。

4、文献

- [1] K. Yoshida, Y. Miki, The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage, *Cancer Sci* 101 (2010) 831-835.
- [2] K. Yoshida, Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage, *Trends Mol Med* 14 (2008) 305-313.
- [3] G. D'Orazi, B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. Saito, M. Gostissa, S. Coen, A. Marchetti, G. Del Sal, G. Piaggio, M. Fanciulli, E. Appella, S. Soddu, Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 11-19.
- [4] T.G. Hofmann, A. Moller, H. Sirma, H. Zentgraf, Y. Taya, W. Droge, H. Will, M.L. Schmitz, Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 1-10.
- [5] S. Saito, A.A. Goodarzi, Y. Higashimoto, Y. Noda, S.P. Lees-Miller, E. Appella, C.W. Anderson, ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12491-12494.
- [6] N. Taira, K. Nihira, T. Yamaguchi, Y. Miki, K. Yoshida, DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage, *Mol. Cell* 25 (2007) 725-738.
- [7] K. Yoshida, Role for DYRK family kinases on regulation of apoptosis, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 1389-1394.
- [8] N. Taira, R. Mimoto, M. Kurata, T. Yamaguchi, M. Kitagawa, Y. Miki, K. Yoshida, DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 859-872.
- [9] R. Mimoto, N. Taira, H. Takahashi, T. Yamaguchi, M. Okabe, K. Uchida, Y. Miki, K. Yoshida, DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail, *Cancer Lett.* 339 (2013) 214-225.