

## 146. 乳癌幹細胞の発生機構の解明

仁平 直江

Key words : 癌幹細胞, 乳癌

東京慈恵会医科大学 生化学講座

### 緒言

癌幹細胞は、1997年に急性骨髄性白血病で発見されて以来、現代の癌研究のホットトピックスとなっている。癌幹細胞は癌細胞と異なり、高い腫瘍形成能を持ち、抗癌剤に対し耐性を示す。このことから、癌幹細胞は従来の癌治療法では排除し難い。癌幹細胞を標的とした治療法を確立する為には、癌幹細胞の性質を分子レベルで理解する必要がある。これまでに私はリン酸化酵素 DYRK2 に注目して、癌細胞における機能解析を進めてきた<sup>1)</sup>。そして、DYRK2 をノックダウンさせた乳癌細胞は著しい腫瘍形成能を持つことを見出した<sup>2)</sup>。更に、乳癌細胞の DYRK2 をノックダウンすると、乳癌幹細胞の割合が増加するという知見を得ている。しかし DYRK2 のノックダウンによって乳癌幹細胞の割合が増加する起因は不明である。そこで、本研究では、DYRK2 の発現が低下した乳癌細胞より乳癌幹細胞が生み出される起因を明らかにする為に、DYRK2 によって制御を受ける遺伝子の網羅的探索を行った。

### 方法

#### 1. フローサイトメトリー

細胞をトリプシン処理によって剥離した後、Sorting buffer (PBS, 1 mM EDTA, 25 mM HEPES, 1% FBS) で懸濁した。細胞は抗 CD24 抗体と抗 CD44 抗体で染色し、Guava (Millipore) で解析を行った。

#### 2. マイクロアレイ解析

細胞を回収した後、1回 PBS で洗い、RNeasy (Qiagen) を用いて細胞から RNA を抽出した。マイクロアレイ解析は Cell inovator 社での受託解析によって行った。

#### 3. ウェスタンブロッティング

細胞は回収後、1回 PBS で洗い、ベレットを等量の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 μg/ml Aprotinin, 1 μg/ml Leupeptin, 10 mM NaF, 1% NP-40, 1 μg/ml Pepstein A) で溶解し、超音波破碎機にかけ、氷上で 30 分間静置した。15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を細胞抽出液とした。この細胞抽出液を SDS-PAGE によって分離し、ニトロセルロース膜へ転写した。ニトロセルロース膜はブロッキング試薬を用いて常温で 1 時間反応させた後、TBS-T で洗浄し、一次抗体で終夜反応させた。一次抗体を除去後、TBS-T で洗浄し、二次抗体で常温 1 時間反応させ、化学発光試薬を用いて可視化した。

#### 4. リアルタイム PCR

細胞を回収した後、1回 PBS で洗い、TRIsure (BIOLINE) を用いて細胞から RNA を抽出した。RNA から cDNA を合成し、PicoReal (Thermo) を用いてリアルタイム PCR 解析を行った。

## 結果

はじめに DYRK2 をノックダウンした細胞で癌幹細胞の割合が増えることを確認するために、乳癌細胞 MCF-7 (pSuper) と DYRK2 ノックダウン細胞 (DYRK2sh5) を CD24 と CD44 抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った (図 1 A)。その結果、上皮性幹細胞のマーカーである CD24(-)/CD44(+) の割合は、DYRK2 を安定的にノックダウンした乳癌細胞 MCF-7 細胞 (DYRK sh5) で上昇した。この結果より、DYRK2 は癌幹細胞の発生を抑制していることが示唆された (図 1 A)。

DYRK2 は p53 や c-Myc などの転写因子の機能・発現制御に関わっていることから、DYRK2 のノックダウンによって様々な遺伝子の発現が変動している可能性が考えられる。そこで、DYRK2 のノックダウンによって発現変動を受ける遺伝子の網羅的探索を行った。マイクロアレイ解析の結果より、DYRK2 のノックダウンによって発現が上昇する遺伝子として KLF4 が同定された。マイクロアレイ解析の結果を確認するために、リアルタイム PCR 解析を行った結果、DYRK2 をノックダウンした MCF-7 細胞では、mRNA の発現量の上昇が認められた (図 1 B)。更に、ウェスタンブロットングによる解析によっても、DYRK2 をノックダウンした細胞で KLF4 のタンパクレベルでの発現量の上昇が認められた (図 1 C)。

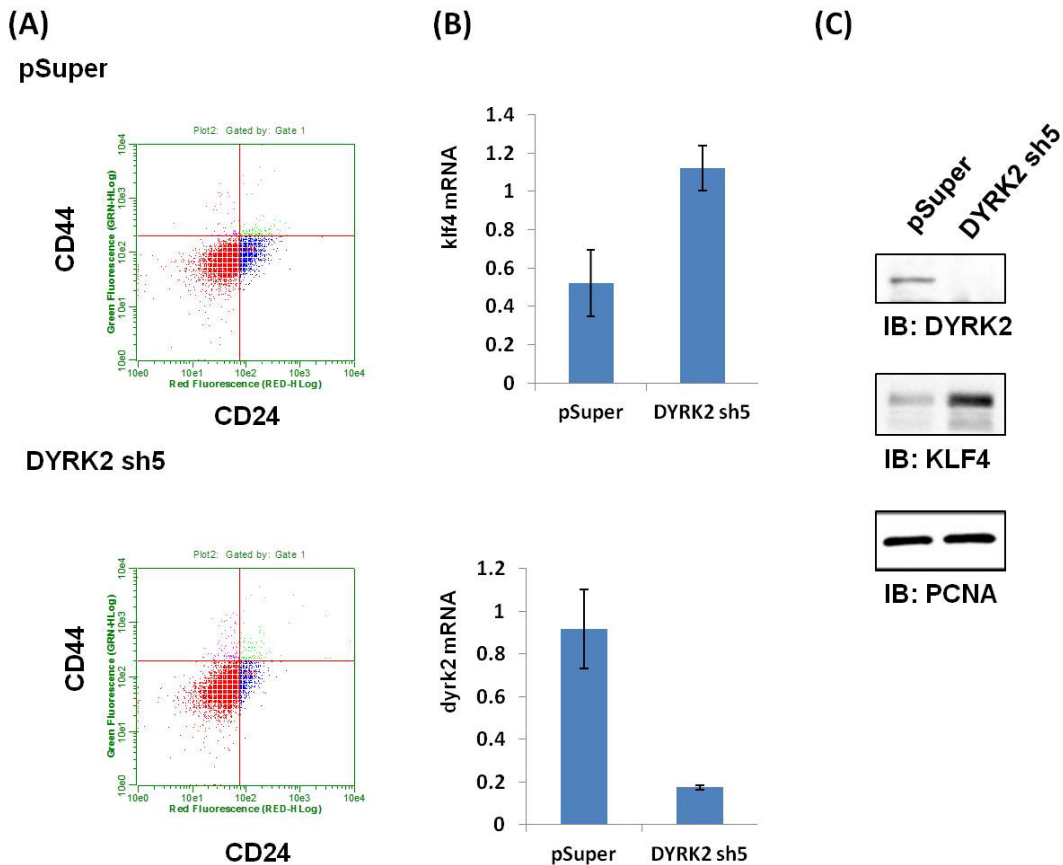


図 1. DYRK2 のノックダウン細胞 (DYRK2 sh5) では *KLF4* 遺伝子の発現が上昇する。

乳癌細胞 MCF-7 (pSuper) と DYRK2 ノックダウン細胞 (DYRK2 sh5) を CD24 と CD44 抗体で染色し、フローサイトメトリー解析 (A)、リアルタイム PCR 解析 (B)、ウェスタンブロットング解析 (C) を行った。

## 考察

従来の癌幹細胞研究では、組織や培養細胞株の中から高い腫瘍形成能を持つ癌幹細胞を単離し、その細胞表面に発現している両面抗原を同定することを目標とした研究が多くなされてきた。しかし、このようなアプローチでは癌幹細胞

の表原型を知ることは可能であるが、癌幹細胞の成り立ちを知ることは難しかった。本研究では、DYRK2によって制御を受ける遺伝子を探索することで、癌幹細胞内の分子制御を明らかにする研究を進めたいと考えた。

本研究により、DYRK2のノックダウン細胞において、幹細胞性の維持に関わる遺伝子であるKLF4の発現が上昇していることが明らかとなった。正常乳腺細胞に、iPS細胞の樹立に必要な山中因子(KLF4・Sox2・OCT4・c-Myc)を導入することで乳癌幹細胞が作製できることが既に報告されている<sup>3)</sup>。このことから、DYRK2ノックダウン細胞で癌幹細胞の割合が増加する起因はKLF4の発現上昇であると考えられる。この仮説を検証するためにも、DYRK2ノックダウン細胞にKLF4を更にノックダウンした細胞を作製し、その細胞が幹細胞性を有しているかどうかを解析する必要があると考えられる。現在のところ、なぜDYRK2のノックダウンによってなぜKLF4の転写が促進されるかは不明である。今後は、KLF4の転写制御についても更に解析を続けるつもりである。

### 共同研究者

本研究の協同研究者は、東京慈恵会医科大学大学生化学講座の吉田清嗣博士、三本 麗博士、井廻良美医師である。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

### 文 献

- 1) Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y. & Yoshida, K. : DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Molecular Cell*, **25** : 725-738, 2007.
- 2) 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.
- 3) Nishi, M., Sakai, Y., Akutsu, H., Nagashima, Y., Quinn, G., Masui, S., Kimura, H., Perrem, K., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S. W. & Ryo, A. : Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*, **33** : 643-652, 2014.