

181. 膵臓癌における DYRK2 の癌抑制機構解明および治療法開発

春木 孝一郎

東京慈恵会医科大学 医学部 外科学講座

Key words : 膵臓癌, DYRK2, p53, 遺伝子治療

緒言

膵臓癌は最も予後不良な消化器がんの1つであり、多くの非切除例に対し抗癌化学療法などの非根治的な治療が施されているが、その予後は極めて悪く1年生存率は約15%にとどまる。そのため現行に加え新たな治療が期待されている。

近年、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターは、臨床面での安全性を保ちつつ抗癌剤耐性のある多くの腺癌への高い導入効率を持つことから、革新的癌治療薬として大きな期待が寄せられており、臨床開発が世界的に進められている。本研究においてターゲットにした DYRK2 (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2) は、DNA 損傷に反応して p53 のセリン 46 をリン酸化しアポトーシスを誘導する機能的なキナーゼであると報告されている [1]。また、DYRK2 が細胞周期制御に必須である癌遺伝子 c-Myc と c-Jun のプライミングリン酸化を担い、c-Myc と c-Jun の分解を促すとの報告 [2] や、膀胱癌患者 [3]・乳癌患者 [4] において癌組織の DYRK2 発現が予後と相関するとの報告があり、癌における DYRK2 の働きが注目されている。

本研究では、DYRK2 を膵臓癌細胞に遺伝子導入することによる抗腫瘍効果を検討しアデノウイルスベクターを用いた新規治療法の開発を目指し、膵臓癌細胞株において DYRK2 強制発現群で細胞増殖抑制効果を認め、その細胞増殖抑制効果はキナーゼ活性存在下に認めることが示唆されたので報告する。

方法

1. プラスミドベクターを用いた DYRK2 強制発現による抗腫瘍効果の検討

PANC-1 (ヒト膵癌細胞) において Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いてプラスミドベクター pcDNA3 (Invitrogen) で DYRK2 を強制発現させ、ベクター投与から 48 時間後にウェスタンブロッティング法によりコントロールと比較した DYRK2 タンパクの増加を評価した。また DYRK2 を強制発現させた際の抗腫瘍効果を MTT 法で検討した。

2. アデノウイルスベクターを用いた DYRK2 強制発現による抗腫瘍効果の検討

アデノウイルスベクターによる DYRK2 発現に Cre/loxP 発現制御システムを用いた (図 1)。Cre/loxP 発現制御システムは東京大学医科学研究所の斎藤博士らのグループにより開発されたものである。Cre/loxP 発現制御システムでは、標的ウイルスのプロモーターと目的遺伝子の間に、poly A が存在するスタッファー領域が挿入されており、そのウイルス単体の感染では目的遺伝子は発現しないものの、スタッファー領域の両端に loxP 配列が存在するために Cre リコンビナーゼ組換えアデノウイルスを共感染させると、スタッファー配列が切り出されてプロモーターから目的遺伝子の転写が開始される。

DYRK2 cDNA をコスミドに挿入し、COS-TPC 法 (Takara Bio, Shiga, Japan) によってアデノウイルスベクター pAxEFLNL-gPv4icit2 に導入した。ウイルス titer は 293 細胞内で決定され、MOI (multiplicity of infection) として表現した。

MIAPaCa-2 (ヒト膵癌細胞) において pAxEFLNL-gPv4icit2 を 100 MOI、Cre 発現組換えアデノウイルスベクターを 10 MOI 投与し、投与 96 時間後の細胞増殖抑制効果を評価した。未治療 (NT) 群、キナーゼ活性の無い変異型 DYRK2

発現アデノウィルスベクター投与 (DYRK2-KR) 群をコントロールとして使用し NT 群の細胞数を 100%とした。

3. 各治療群における細胞増殖抑制効果を評価するために、Celltiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社、WI、米国) を用い、プロトコールに従い測定を行った。

4. 統計学的解析は Student's t-test および反復測定分散分析により行った。p 値 < 0.05 以下を有意な差とした。

結 果

1. プラスミドベクターによる DYRK2 強制発現の抗腫瘍効果

DYRK2 強制発現群では、コントロール群と比較してウェスタンブロットティング法により DYRK2 発現量の増加を認めた。また MTT 法にて DYRK2 強制発現群ではコントロール群と比較して経時的に有意な細胞増殖抑制効果 (p 値 = 0.008) を認めた (図 2)。

2. アデノウィルスベクターによる DYRK2 強制発現の抗腫瘍効果

投与後 96 時間で、DYRK2 強制発現 (DYRK2) 群 (cell viability : 82%) において、NT 群、DYRK2-KR 群 (cell viability : 91%) と比較して有意に細胞増殖抑制効果 (それぞれ p 値 = 0.014、0.008) を認めた (図 3)

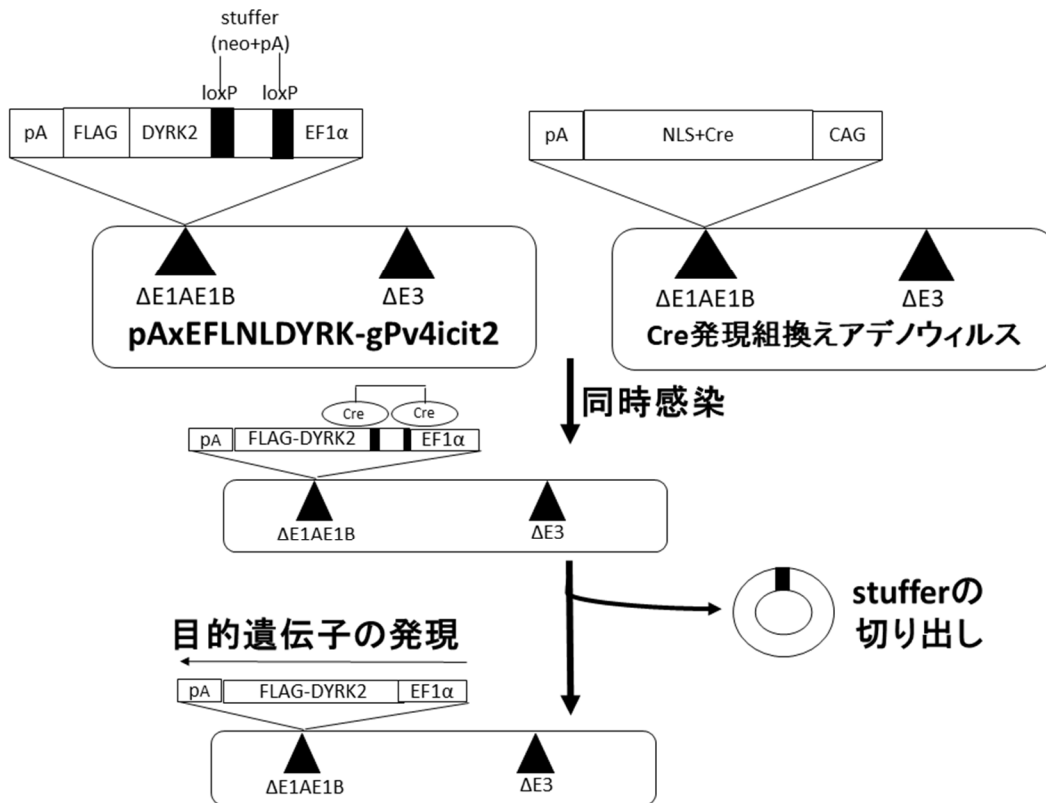


図 1. アデノウィルスベクター作製

pAxEFLNLDYRK-gPv4icit2 のプロモーター-EF1α と目的遺伝子 FLAG-DYRK2 の間には、poly A が存在するスタッフ領域が挿入されており、ウィルス単体の感染では目的遺伝子は発現しないものの、スタッフ領域の両端に loxP 配列が存在するため Cre リコンビナーゼ組換えアデノウィルスを共感染させると、スタッフ領域が切り出されてプロモーターから目的遺伝子の転写が開始される。

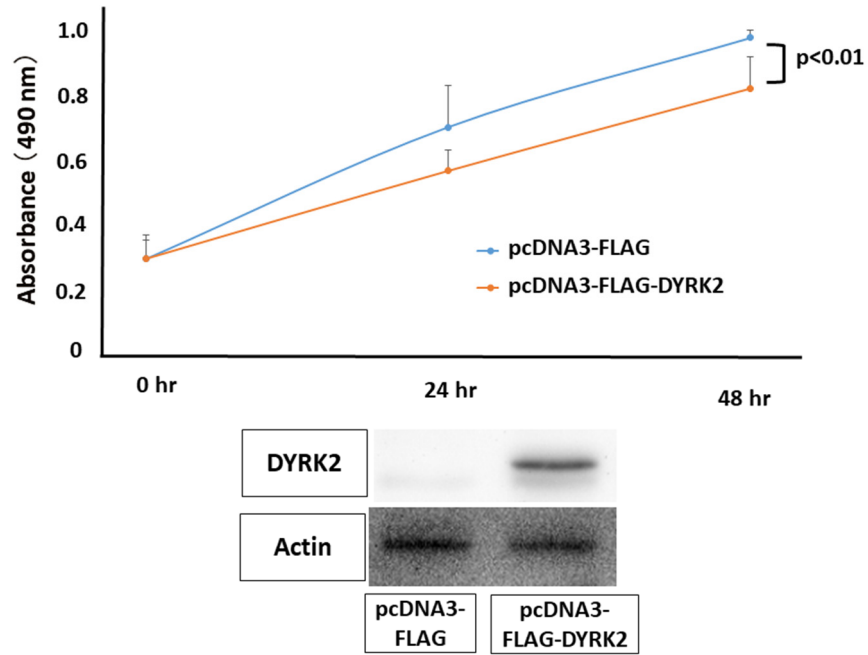


図2. プラスミドベクターによる DYRK2 強制発現の抗腫瘍効果

DDYRK2 強制発現群では、コントロール群と比較してウェスタンブロッティング法により DYRK2 発現量の増加を認めた。また MTT 法にて DYRK2 強制発現群ではコントロール群と比較して経時的に有意な細胞増殖抑制効果 (p 値 = 0.008) を認めた。

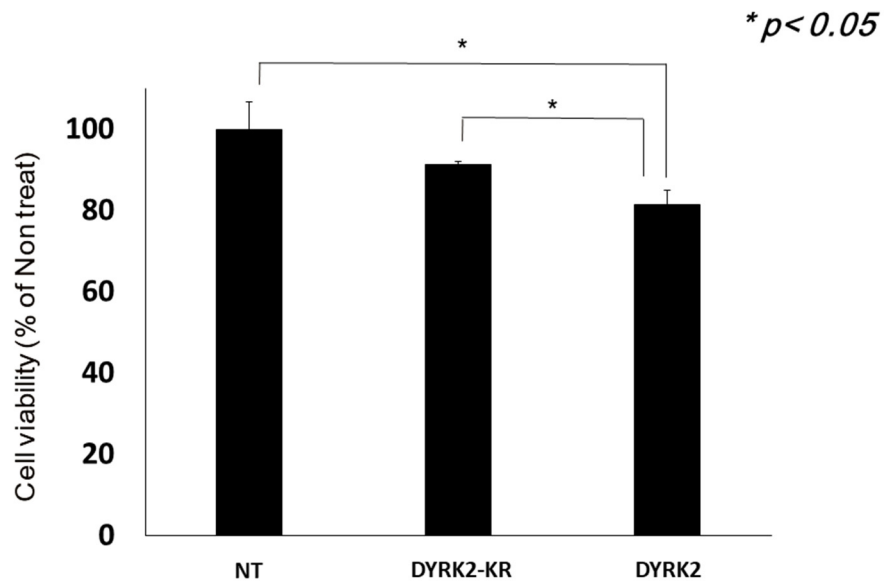


図3. アデノウィルスベクターによる DYRK2 強制発現の抗腫瘍効果

投与後 96 時間で、DYRK2 強制発現 (DYRK2) 群 (cell viability : 82%) において、NT 群、DYRK2-KR 群 (cell viability : 91%) と比較して有意に細胞増殖抑制効果 (それぞれ p 値 = 0.014、0.008) を認めた。

考 察

DYRK2 強制発現アデノウイルスベクターがヒト膀胱癌細胞に対して抗腫瘍効果を持つことが示唆された。DYRK2 は本邦で発見された p53 関連キナーゼであり、DYRK2 をコントロールして機能させることができれば、癌細胞の増殖を効率よく抑制できる可能性があり、DYRK2 をターゲットにした遺伝子治療は世界初の試みとなる。今回用いた腫瘍溶解性アデノウイルスベクターは、臨床面での安全性を保ちつつ抗腫瘍剤耐性のある多くの腺癌への高い導入効率を持つことから、革新的癌治療薬として大きな期待が寄せられており、臨床開発が世界的に進められている。Cre/loxP 発現制御システムを用いたのは、通常 DYRK2 発現組換えアデノウイルスを 293 細胞内で増殖させる際に DYRK2 により 293 細胞が死滅しウイルスベクターの調製が困難であったという経緯がある。DYRK2 の抗腫瘍効果を引き起こす分子機構はまだ不明な点が多く、臨床応用に向けた副作用の点からも、DYRK2 強制発現による細胞周期への影響、各シグナルパスウェイへの影響など分子機構の解明が必要であると考えられた。また *in vivo* での効率的な導入方法の検討、生体への全身性への影響の検討も必要である。今後は、このウイルスベクターを用いて、細胞への導入効率の検討、正常細胞への影響を含めた分子機構の解明、*in vivo* への応用を行い、安全性、有効性を担保した新たな癌治療法の確立を目指したい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学医学部外科学講座の堀内堯先生である。

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* 2007; 25(5): 725-38. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.02.007.
- 2) Taira N, Mimoto R, Kurata M, et al. DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122(3): 859-72. DOI: 10.1172/JCI60818.
- 3) Nomura S, Suzuki Y, Takahashi R, et al. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) as a novel marker in T1 high-grade and T2 bladder cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *BMC urology* 2015; 15: 53. DOI: 10.1186/s12894-015-0040-7.
- 4) Mimoto R, Taira N, Takahashi H, et al. DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail. *Cancer letters* 2013; 339(2): 214-25. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.06.005.