

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19355

研究課題名(和文) DCLK1は膵神経内分泌腫瘍細胞のstemness形質を制御する

研究課題名(英文) DCLK1 regulates stemness feature in neuroendocrine tumors.

研究代表者

池園 友 (Ikezono, Yu)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10461419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経内分泌腫瘍(NET)の起源や発生、そして浸潤・転移機序については不明な点が多い。我々は、癌幹細胞マーカーDCLK1が膵NET組織に強くびまん性に発現している所見を見出した。ヒト膵NET細胞株においては、DCLK1がFAK-Tyr925残基のリン酸化を促進し、EMT regulatorであるSLUGの発現を上昇させることを初めて示した。DCLK1自体の詳細な機能が不明な中、FAKを介したEMT制御に関わる点を今回明らかにした。“高率に転移する”NETの臨床的特徴や、NETに対する新規治療標的分子をDCLK1-FAK-SLUG軸に沿って考案する上で重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DCLK1 is a marker for intestinal and pancreatic cancer stem cells. This study was conducted to assess DCLK1 expression levels in pancreatic neuroendocrine tumor (PNET) tissues and to explore the roles of this molecule in PNET. Immunohistochemically, all PNET tissues highly and diffusely expressed DCLK1. A DCLK1-overexpressing PNET cell(QGP1-DCLK1) exhibited EMT-related gene signatures, and upregulation of Slug, N-Cadherin, and Vimentin was validated by real-time PCR and immunoblotting. QGP1-DCLK1 cells had increased cell migration and proliferation. The factors involved in the formation of the fast-growing tumors included p-FAK (on Tyr925), p-ERK1/2 and p-AKT. In conclusion, robust and ubiquitous expression of DCLK1 was demonstrated in human PNET tissues and cells. DCLK1 characterized the PNET cell behavior, inducing p-FAK/SLUG-mediated EMT. These findings suggest the possibility of developing novel therapeutic strategies against PNETs by targeting DCLK1.

研究分野：消化器一般

キーワード：DCLK1 NET FAK SLUG EMT

1. 研究開始当初の背景

神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor, NET) とは神経内分泌細胞に由来する腫瘍であり、ペプチドホルモン・アミン産生能を有し、神経内分泌マーカーを発現するものと定義されている。現在では Diffuse Neuroendocrine System; DNES という概念により、NET は全身諸臓器に発生するとされている。従来カルチノイド腫瘍や内分泌腫瘍と呼称されてきたものは、2000 年以降 WHO 分類で NET として統一された。消化器領域における、膵・消化管 NET は 2010 年より新たなガイドラインによる分類がなされている。近年、NET の患者数は、欧米のみならず本邦においても増加傾向にある。さらに膵領域においては、糖尿病治療薬である DPP 阻害薬による発病の可能性も指摘されており (Alexandra et al., Diabetes 2013)、糖尿病患者数の増加に伴う NET 患者数の増加が懸念されている。NET の発生や増殖メカニズムに関しては多くの研究があるが、いまだ不明な点が多く、患者予後を改善するには、NET の悪性ポテンシャルの詳細な解析と、新規標的分子の同定およびその治療への応用が必要である。申請者は最近、消化管 NET において DCLK1 が高発現していることを報告した (Oncol Lett 2014)。DCLK1 は microtubule-associated protein であり、元来、神経系細胞の増殖 (細胞周期) や分化、遊走、アポトーシスを制御する蛋白である (Shu et al., Neuron 2006)。ところが最近、DCLK1 は神経系のみならず、大腸癌・膵癌の癌幹細胞にも発現していることが報告され (Nakanishi et al., Nat Genet 2013; Bailey et al., Gastroenterology 2013)、さらに DCLK1 の knockdown や特異的阻害剤による抗腫瘍効果も報告されるようになり (Nathaniel et al., Mol Cancer 2014)、消化器病学領域においても大変注目される分子の一つとなってきている。免疫組織化学的方法を用いた我々の予備実験では、DCLK1 はヒト膵・消化管 NET 組織において、ほぼ全症例で高発現を認めた。また膵 NET 細胞株 (CM 細胞) においても DCLK1 の強い発現を確認した。さらに、その発現を sh-RNA-レンチウイルス・システムを用いて knockdown し、恒常的に DCLK1 発現を最小化した細胞株の樹立に成功している。興味深いことに、同実験系においては DCLK1 の糖代謝への関与も示唆された。このような我々の予備実験結果および既報の知見より、膵・消化管 NET において高発現している DCLK1 は、何らかの機序で NET 細胞の増殖、低酸素耐性 (spheroid 形成能) あるいは特異な糖代謝や autophagy 調節機構 (Kantara et al., Cancer Res 2014) に関与している可能性が高いと考えられる。したがって、DCLK1 がそのような癌幹細胞の基本的形質の制御に深く関与しているのであれば、その発現ないしキナーゼ機能をプロッ

クすることで強い抗腫瘍効果が期待される。本研究では上記の考えを基盤とし、膵・消化管 NET に対する新規分子標的治療戦略を提案し、早期に実臨床に寄与しうるエビデンスを構築することを目標としたい。

2. 研究の目的

Doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) の機能については未だ不明な点が多いが、腫瘍細胞増殖亢進作用やアポトーシス抵抗性、低酸素耐性への関与が報告されている。本研究の目的は、膵神経内分泌腫瘍における DCLK1 発現の意義とその機能を解明し、分子標的治療への応用を検討することである。そこで、以下の 3 点を中心に検討したい。

ヒト膵神経内分泌腫瘍組織における DCLK1 発現を、免疫組織化学的染色により検討する。

ヒト膵神経内分泌腫瘍細胞株を用いて、DCLK1 の発現およびその新規機能を探索する。

DCLK1 を knockdown あるいは過剰発現させた膵神経内分泌腫瘍細胞株を用いて、xenograft モデルにおいて DCLK1 が腫瘍増殖や周囲組織への浸潤に及ぼす影響を検討する。また、DCLK1 kinase inhibitor を用いて臨床における治療学的アプローチが可能か否かを検討する。

3. 研究の方法

ヒト膵・消化管 NET 組織を用いて、DCLK1 染色をおこなう。腫瘍の病理学的情報と臨床情報 (転移の有無や予後など) を参照し、DCLK1 の予後因子としてのポテンシャルを決定する。

膵 NET 細胞株を用いて、細胞増殖の他、癌幹細胞の stemness を支える特異な糖代謝や低酸素耐性、活性酸素種 (ROS) に対する防御機構などについて、DCLK1 が果たす役割を詳細に検討する。

Xenograft モデルを用いて、DCLK1 knockdown がもたらす抗腫瘍効果や既存の分子標的治療薬 (mTOR 阻害剤) への上乗せ効果を検討する。DCLK1 過剰発現系でも同様の実験をおこなう。

DCLK1 特異的阻害剤 (LRRK2-IN-1 など) を用いて、in vitro、in vivo でその抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

1. ヒト膵 NET 組織を用いた免疫組織化学的染色とその解析

1997 年～2012 年に久留米大学病院にて外科切除された膵神経内分泌腫瘍組織全 15 症例において免疫染色による DCLK1 の発現を検討した全 15 症例の内訳は男性/女性; 8/7 例、平均年齢; 56(17-77) 歳、平均最大腫瘍径; 30.2(12-93)mm、NETG1/G2; 10/5 例、機能性/非機能性; 3/12 例であった。全 15 症例で腫瘍部にびまん性に DCLK1 の発現が確認され、

一般的な神経内分泌マーカー（シナプトフィジン、クロモグラニン A、CD56）よりも陽性率が高い結果であった。染色強度と面積でスコア化し、腫瘍因子（悪性度、腫瘍径、転移の有無など）との関連性を検討したが、その関連性に有意差は認められなかった。DCLK1には大きく2つのアイソフォームを有することが知られているが、今回肝臓原発のNETの凍結標本より蛋白を抽出しWB法にて行った解析では、そのアイソフォームはLong-formであることが分かった。

2. 膵NET株におけるDCLK1発現の決定と、その新規機能の追求

(1), (2) DCLK1を発現している膵神経内分泌腫瘍細胞株CM細胞を用いて、siRNAによりDCLK1ノックダウン細胞を作製した。DCLK1ノックダウン細胞はコントロールと比較し細胞増殖が有意差をもって低下し、Wound-healing assayにおいてその遊走能は有意に低下した。WB法による解析ではDCLK1ノックダウン細胞でSTAT3及びAKTのリン酸化が低下し、PTEN脱リン酸化の上昇が確認された。

(3) 上記結果が得られたがやや変化に乏しいため、DCLK1のより主となる機能は別にあるのではと判断した。次にDCLK1を発現していない膵神経内分泌腫瘍細胞株QGP1細胞にプラスミドベクターを導入し、DCLK1過剰発現細胞株(QGP1-DCLK1)を作製した。コントロールであるQGP1-EVと比較しその細胞形態に著明な変化が認められた。【図1】次にこれらをマイクロアレイ法により網羅的に解析を行ったところ、EMTに関連する幾つかの分子に有意な変化が認められた。【図2】さらに詳細にリアルタイムPCR法、WB法を用いてメッセンジャーRNAレベル、蛋白レベルでの解析を行った。最も変化したものはEMTのregulatorとされるSLUGであった。それに伴い間葉系マーカーであるN-CADHERIN、VIMENTINは上昇し、またAKT、Erk、FAKty925のリン酸化の上昇、CYCLIN D1の上昇も認められた。細胞増殖は有意な差は認めなかったが、Wound-healing assayでは有意にその遊走能は上昇した。

3. Xenograftモデルを用いて、dclk1過剰発現がもたらす効果を解析した。

(1) DCLK1過剰発現細胞株(QGP1-DCLK1)、コントロール細胞株をヌードマウスへ移植し、腫瘍の形成能を比較したところ、QGP1-DCLK1は有意に大きな腫瘍を形成した。【図3】

(2) 腫瘍組織を免疫組織化学染色にて評価を行った。in vitroの結果同様にQGP1-DCLK1の腫瘍組織にはSLUGおよびp-FAKty925の発現が上昇した。また核分裂像では有意にQGP1-DCLK1で増加した。

(3) QGP1細胞は細胞カウントが非常に難しい細胞であり、エベロリムスの上乗せ効果の評価は困難であった。しかしながらスフィア形成を比較したところQGP1-DCLK1で有意に大きなスフェアを形成した。

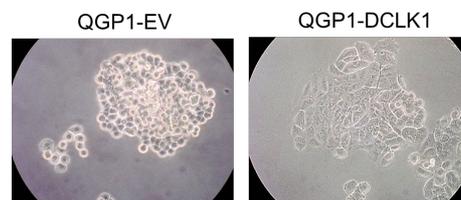
4. DCLK1 特異的阻害剤である小分子化合物LRRK2-IN-1やXMD8-92を用いて、その抗腫瘍効果をinvitroおよびinvivoで検討する。

(1) 膵NET細胞株に上記の阻害剤を投与しinvitroで検討を行った。

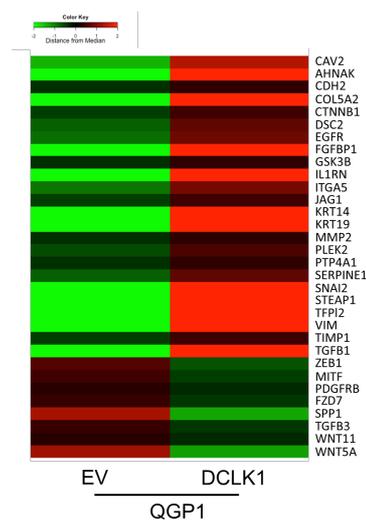
QGP1-DCLK1にLRRK2-IN-1およびXMD8-92を投与したところSLUGおよびp-FAKty925の発現が低下した。またDCLK1を元々発現するCM細胞においても阻害剤の投与にて同様の結果が得られた。更に、FAKとSLUGの関係性を詳細に検討するためにQGP1-DCLK1細胞にsiRNAをもちいてFAKの発現をノックダウンしたところ、SLUGの発現も低下した。つまりFAKはSLUGの上流にある分子であると示唆され、DCLK1はこのFAKty925のリン酸化を促進することで、増殖においてはMAPK pathwayを中心とした分子が関与し、転移・遊走に関してはEMTのregulatorであるSLUGを中心とした分子が関与していると考えられた。

(2) Xenograftモデルを用いて、同阻害剤の抗腫瘍効果を検討する。

Xenograftモデルでの阻害剤の抗腫瘍効果に関しては、十分な検討ができなかったため今回は行わなかった



【図1】



【図2】



【図3】

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ikezono Y, Koga H, Akiba J, Abe M, Yoshida T, Wada F, Nakamura T, Iwamoto H, Masuda A, Sakaue T, Yano H, Tsuruta O, Torimura T
Pancreatic Neuroendocrine Tumors and EMT Behavior Are Driven by the CSC Marker DCLK1, *Mol Cancer Res.* 2017 Jun;15(6):744-752. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0285. Epub 2017 Feb 8.

〔学会発表〕(計 4 件)

池園 友「膵神経内分泌腫瘍における癌幹細胞マーカーDclk1 の機能解析」JDDW 2015.10.9, 品川プリンスホテル, 東京
Ikezono Y 「 The putative cancer stem cell marker DCLK1 is highly expressed in pancreatic neuroendocrine tumors and induces epithelial-mesenchymal transition 」 UEGW 2015.10.26, Barcelona, Spain
Ikezono Y 「DCLK1 promotes tumor growth and invasion through Slug-mediated epithelial-mesenchymal transition in pancreatic neuroendocrine tumors 」 AACR 2016.4.18, New Orleans, Louisiana, USA
池園 友「膵神経内分泌腫瘍において幹細胞マーカーDCLK1 は Tyr925FAK を介し、腫瘍増殖・遊走を促進させる」日本癌学会学術総会2016.10.7, パシフィコ横浜, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

池園 友 (Ikezono Yu)
久留米大学内科学講座消化器内科部門・助教
研究者番号：10461419

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()