

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15059

研究課題名(和文) 特発性肺線維症への肺がん併発現象におけるDCLK1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of DCLK1 in pulmonary cancer associated with IPF

研究代表者

丸山 順一 (MARUYAMA, Junichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30723639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症(IPF)には肺癌が高率に併発することが知られているが、この分子機構は未だ完全に理解されていない。本研究において研究代表者は、公共データ再解析により癌幹細胞マーカーとして知られているDCLK1がIPF肺において発現上昇していることを見出した。また、肺腺癌由来細胞株H1299におけるDCLK1発現はLPSで活性化させたマクロファージ様細胞株の培養上清処置により誘導された。さらに、この発現誘導はRelA発現抑制では阻害されない一方でRelB発現抑制により阻害されることを見出した。この結果は、DCLK1発現がalternative NF- $\kappa$ B経路を介して誘導されることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、IPF肺においては浸潤するマクロファージなどの炎症性細胞から分泌されるサイトカインにより、肺胞上皮細胞においてalternative NF- $\kappa$ B経路が活性化され、その結果癌幹細胞性が確立して発癌に至るというモデルを支持する。このモデルが正しければ、alternative NF- $\kappa$ B経路を阻害すればIPFに併発する肺癌発癌を予防できる可能性が期待される。本研究はIPF肺を対象とした。しかし、肺以外の臓器でも慢性的な炎症に伴い、alternative NF- $\kappa$ B経路の活性化とそれに伴うDCLK1発現誘導がなされ、発癌に繋がっている可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is frequently associated with lung cancer. However, the molecular mechanism underlying this association remains unclear. We analyzed the gene expression profiles of IPF lungs using public datasets and extracted 94 genes that were upregulated in all of them. Among these, we identified DCLK1, a well-known cancer stem cell-marker. In this study, we confirmed that DCLK1 expression was enhanced in human IPF lungs and in lungs of mice with bleomycin-induced fibrosis. We also found that the human lung cancer H1299 cells expressed DCLK1 when exposed to the conditioned medium derived from the LPS-stimulated macrophage-like RAW264.7 cells. We also revealed that IL-17 and LTA induced DCLK1 expression in human lung cancer H1299 cells. Moreover, RelB silencing, but not RelA silencing, blocked the induction of DCLK1 expression by conditioned medium. Hence, the inhibition of alternative NF- $\kappa$ B signaling may be useful to prevent cancer development in IPF lungs.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：特発性肺線維症 DCLK1 NF- $\kappa$ B

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症を発生母地として癌が発生することは経験的に知られているが、その詳細な分子機構は不明な点が多い。研究代表者は特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis; IPF) に肺癌が高率に併発する現象に注目し、IPF を足掛かりとして慢性炎症と発癌を繋ぐ分子機構の解析に取り組んだ。遺伝子発現情報データベース Gene Expression Omnibus (GEO) より健常肺と IPF 肺間で遺伝子発現パターンを比較したデータを集めて再解析することで、IPF 肺において 2 倍以上に発現上昇している 94 遺伝子を絞り込んだ。その遺伝子集団の大部分は細胞外マトリックスやサイトカインであったが、細胞接着分子・転写因子・細胞骨格制御因子・代謝酵素等も含まれていた。その中で、発癌に直結する可能性のある遺伝子として癌幹細胞マーカー遺伝子 Doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) が注目された。近年 DCLK1 は肺癌において、その発現量が悪性と相関すること、肺癌細胞の増殖浸潤能や癌幹細胞性に関与することが報告されている。研究代表者は DCLK1 を安定的に過剰発現させたヒト乳腺上皮由来細胞株 MCF10A を用いた遺伝子発現プロファイル解析より、DCLK1 の過剰発現が相同組換え修復 (HR) や非相同末端結合 (NHEJ) といった DNA 修復機構を抑制することを示唆する結果を得た。さらに、DCLK1 発現量は活性化マクロファージ培養上清の処置により増加することも見出した。以上の結果は、DCLK1 発現量は IPF 肺という慢性炎症環境下において亢進し、DNA 修復機構を抑制することで発癌に寄与する可能性を示唆していると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、DCLK1 依存的 DNA 修復抑制機構と IPF 肺における DCLK1 発現上昇機構の解明を通して DCLK1 の慢性炎症下における発癌への寄与を検証し、DCLK1 シグナルの制御による慢性炎症依存的発癌の予防方法開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) HR や NHEJ を制御する細胞内シグナルに対する DCLK1 過剰発現の影響を、ヒト肺腺癌由来細胞株 H1299、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116、ヒト胎児由来線維芽細胞 HEK293FT を用いて、細胞染色・イムノプロット・共免疫沈降等の *in vitro* 実験系により検討した。

(2) DCLK1 過剰発現による肺癌形成への影響を検討するために、DCLK1 発現を 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) 投与依存的に誘導できるトランスジェニックマウスの作製を行った。

(3) ヒト IPF 患者由来肺組織サンプル、マウスプレオマイシン肺線維症モデル由来肺組織サンプルを用いて、実際に線維化肺において DCLK1 発現が亢進しているか否かを免疫組織染色・イムノプロット・qRT-PCR により検討した。

(4) マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 に Lipopolysaccharide (LPS) を処置して活性化させ、活性化マクロファージ培養上清を調製した。調製した培養上清を H1299 細胞に処置して DCLK1 発現誘導の可否を検討した。同時に、DCLK1 発現誘導に関与する細胞外物質の絞り込みや細胞内シグナル伝達経路の絞り込みを行った。

### 4. 研究成果

(1) まず、本研究開始前に得ていた「DCLK1 の過剰発現は MCF10A 細胞において sphere formation 形成能を付与し染色体異数化を誘導する」結果に関して、論文発表を行った (Lu *et al.* (2018) *Biochem. Biophys. Rep.* **16**:130-7. )

(2) DCLK1 の過剰発現による肺癌形成への影響を検討するために、4-OHT 投与により 3xFLAG-DCLK1-ires-Venus カセットが発現するトランスジェニックマウスの作製を行った。結果、そのようなマウスを 1 ライン得ることに成功し、4-OHT 腹腔内投与により肺において 3xFLAG-DCLK1 発現が誘導されること、単離培養した肺線維芽細胞への 4-OHT 処置により同様の発現誘導がなされることを確認した。このマウスを用いた実際の検討は、後述するプロジェクト上の問題点の判明により留め置いている。

(3) DCLK1 による DNA 損傷修復抑制の分子機構に関して、HR を制御するシグナル伝達経路のコンポーネントである RNF8・RNF168・RAP80 等と DCLK1 の相互作用可否を検討した。結果、これらの中で RNF168 が最も強く DCLK1 と相互作用した。また、DCLK1 は Histone1.2 (H1.2) とも相互作用した。RNF168 は DNA 損傷応答時に H1.2 と相互作用することが報告されているため (Thorslund *et al.* (2015) *Nature* **527**:389-93. ) この結果は DCLK1 が RNF168 と H1.2 の相互作用に介入することで HR を抑制する可能性を示唆している。

(4) 項目(3)の解析を進めている途中で、上記の項目(1)の論文で用いた DCLK1 コンストラクトの C 末端側にフレームシフト変異が見つかり、C 末端 33 アミノ酸が欠損して artificial 配列 10 アミノ酸に置換されていることが判明した。そこで、DCLK1 トランスジェニックマウスを作製する際に合成した正しい配列の DCLK1 を用いて再度当該論文データの妥当性を調査していたところ、当時当該論文において用いていた MCF10A-DCLK1 安定発現株が、レンチウイルスベクター作製に用いた HEK293FT 細胞の混入によりほぼ完全に HEK293FT 細胞に置き換わっていたことが判明した。改めて行った検討実験においては、当時用いた安定発現株では当該論文の実験結果が再現される一方で、正しい配列の DCLK1 を用いて新たに作製した MCF10A-DCLK1 安定発現株では実験結果の再現は出来なかった。以上の状況を受けて、項目(1)の論文では DCLK1 の機能を正しく評価出来ていなかったと判断し、当該論文を撤回するとともに、DCLK1 による DNA 損傷修復抑制の分子機構を解析する研究方針を一度止めることとした。

(5) 研究代表者は項目(4)の状況を受けて、研究期間の後半は DCLK1 の線維化肺における発現誘導機構解析に力点を置くこととした。まず、ヒト IPF 患者の線維化肺において実際に DCLK1 発現が亢進しているか否かを梶村春彦博士(浜松医科大学)との共同研究により検討したところ、免疫組織染色により確かに DCLK1 染色強度が増強している様子が観察された。同様の DCLK1 発現量亢進は、マウスプレオマイシン肺線維症モデルにおける線維化誘導肺においても mRNA レベルで観察された。

(6) 研究代表者は本研究開始前に、LPS で活性化させた RAW264.7 細胞の培養上清を H1299 細胞に処置することで H1299 細胞における DCLK1 発現量が亢進する結果を得ており、引き続きこの現象に関する詳細な検討を行った。まず、活性化 RAW264.7 培養上清を熱やタンパク質分解酵素で処理すると誘導活性が失われたことから、この活性はタンパク質に由来することが示唆された。続いて、サイトカイン IL-17 が DCLK1 の発現を誘導するという報告を受けて(Zhang *et al.* (2018) *Gastroenterology* **155**:210-23.) 検討を行ったところ、IL-17 を実際に H1299 細胞に処置することで DCLK1 発現誘導が観察された。しかしながら、RAW264.7 細胞における IL-17 の発現量は LPS 処置では増加せず、LPS 活性化 RAW264.7 培養上清依存的な DCLK1 発現誘導現象に IL-17 が大きく関与する可能性は低いと考えられた。そこで、GEO を利用して IL-17 以外の候補サイトカインを検索したところ、lymphotoxin- $\beta$  受容体シグナルが DCLK1 発現を制御する可能性が見出された(Lötzer *et al.* (2010) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**:395-402.)。そこで、lymphotoxin- $\beta$  受容体リガンドである LTA を H1299 細胞に処置したところ、確かに DCLK1 発現誘導が観察された。加えて、RAW264.7 細胞における LTA の発現量は LPS 処置により増加した。以上より、LPS 活性化 RAW264.7 培養上清依存的な DCLK1 発現誘導現象には LTA が関与していることが示唆された。

(7) lymphotoxin- $\beta$  受容体下流では主に NF- $\kappa$ B 経路が活性化することから、NF- $\kappa$ B 経路が H1299 細胞における DCLK1 発現誘導に関与する可能性を検討した。まず、canonical NF- $\kappa$ B 経路のコンポーネントである RelA のノックダウンや canonical NF- $\kappa$ B 経路に対する阻害剤処置では LPS 活性化 RAW264.7 培養上清依存的 DCLK1 発現誘導は抑制されなかった。一方で、alternative NF- $\kappa$ B のコンポーネントである RelB のノックダウンにより DCLK1 発現誘導が抑制された。

(8) 以上の結果は、DCLK1 発現が canonical NF- $\kappa$ B 経路ではなく alternative NF- $\kappa$ B 経路を介して誘導されていることを示唆しており、DCLK1 発現誘導分子機構に関する新規知見であると考えられる(図1)。以上の知見を含めた一連の検討結果を論文発表した。(Lu *et al.* (2021) *J. Med. Dent. Sci.* **68**:39-48.)

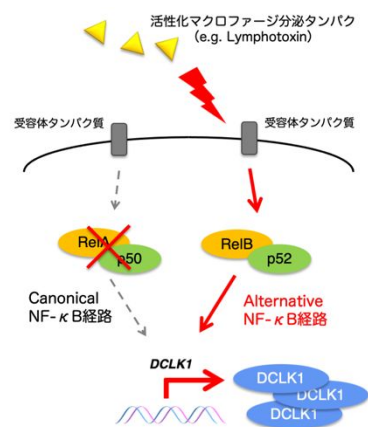


図1 Alternative NF- $\kappa$ B経路を介した DCLK1発現誘導

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuxiong Lu, Junichi Maruyama, Haruhiko Sugimura and Yutaka Hata	4. 巻 68
2. 論文標題 Doublecortin-like kinase 1 expression is induced by alternative NF- B signaling in human lung cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical and Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 39-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11480/jmds.680005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Junichi Maruyama, Haruhiko Sugimura and Yutaka Hata
2. 発表標題 Doublecortin-like kinase 1 compromises DNA repair and induces chromosomal instability.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------