

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007年度～2008年度  
 課題番号：19790475  
 研究課題名（和文）大腸癌におけるDkk familyのWntシグナル制御機構の解明  
 研究課題名（英文）Dkk family genes regulate Wnt signal pathway  
 in human colorectal cancer  
 研究代表者 山口 達也(YAMAGUCHI TATSUYA)  
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教  
 研究者番号：30397301

## 研究成果の概要：

本研究の目的はDickkopf (Dkk) familyの大腸癌発癌過程における役割を明らかにすることにある。われわれは大腸癌で高発現している遺伝子の1つとして*Dkk4*を見出し、これに着目して研究を開始した。臨床生検検体および培養細胞を用いた検討により、多くの大腸癌において*Dkk4* および*Dkk2* が高発現していると結論づけた。この*Dkk4*の高発現は、大腸癌で認められるWntシグナルの亢進によりもたらされると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：大腸癌、Wnt、Dkk、beta-catenin

## 1. 研究開始当初の背景

我々は大腸癌の発癌メカニズムを明らかにするため、臨床症例の大腸癌部と非癌部の組

織より抽出した mRNA を用い、大腸癌で特異的に高発現する遺伝子として *Dkk(Dickkopf)4* をクローニングした。 *Dkk*

には *Dkk1* から *Dkk4* まで 4 種類のホモログが存在し Wnt シグナル伝達経路に関与していると考えられているが、各々の機能の違いは明確になっていない。われわれは大腸癌で高発現している *Dkk4* に着目して研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は大腸癌における Dkk family の発現パターンを調べることで、ならびに発現制御のメカニズムや Wnt シグナル伝達経路への関与を解析し、大腸癌発癌過程における Dkk family の役割を明らかにすることにある。

## 3. 研究の方法

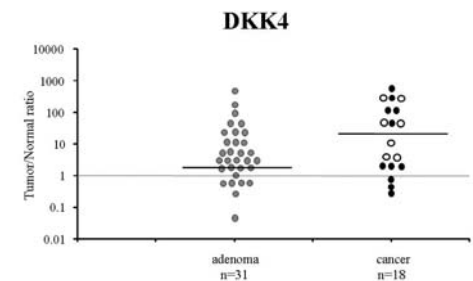
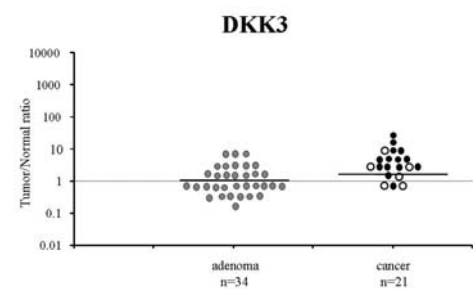
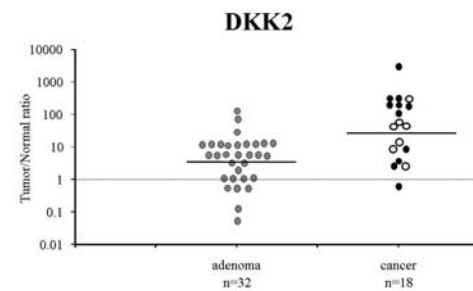
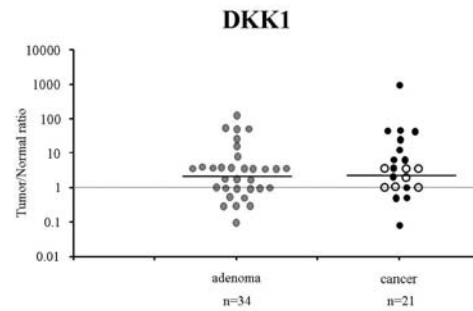
大腸癌 21 症例、腺腫 34 症例、計 55 症例の腫瘍部・非腫瘍部の臨床生検検体を用いて Dkk family の発現パターンを調べた。その結果をもとに臨床検体・培養細胞系で Dkk の発現制御機構のメカニズムおよび機能を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ほとんどの大腸癌で *Dkk4*、*Dkk2* は高発現している。

RT-PCR で mRNA 量を検討したところ、大腸癌では腫瘍正常粘膜比はそれぞれ *Dkk2* median 27.4  $p < 0.01$ 、*Dkk4* median 51.4  $p < 0.01$  と著明な発現増加を認めた。

腺腫でも *Dkk2*、*Dkk4* の増加を認めたが癌よりも著明ではなかった。

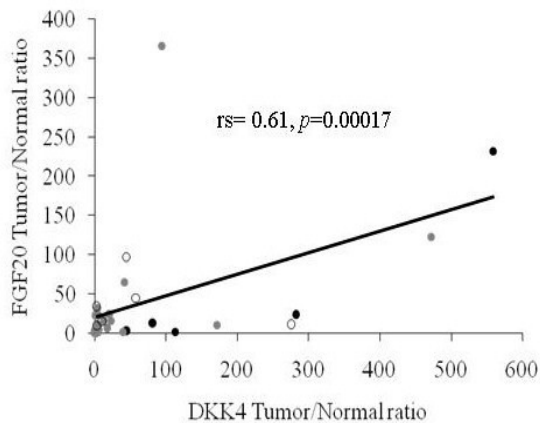


Expression level of each DKK family member in colorectal tumors measured by real-time RT-PCR. ●:

advanced cancer, ○: early cancer, ●: adenoma. Black *horizontal line*: the median in each group of subjects. Black *dashed line*: indicates equal expression of DKK between tumor and normal mucosa. Data were analyzed with the Wilcoxon signed-rank test.

**(2) Dkk4 の発現は  $\beta$ -catenin の標的遺伝子である Fibroblast growth factor -20 (FGF20) の発現レベルと正の相関性があった。**

Wnt シグナルにおいて重要な役割を果たす  $\beta$ -catenin の標的遺伝子 *FGF20* の発現と *Dkk4* との関係により *Dkk4* の発現は Wnt シグナルにより制御されていると考えられた。

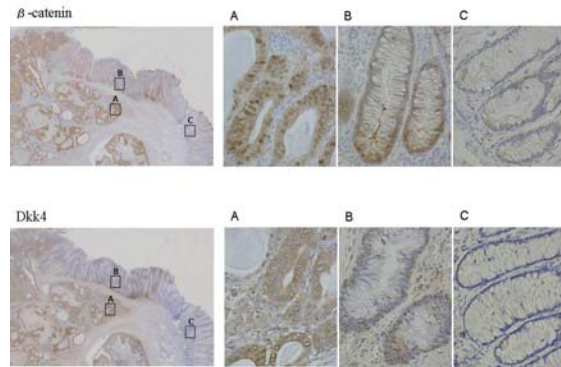


The relationship between expression levels of DKK 4 and FGF20 in colorectal tumors. Data were analyzed for Spearman's correlation coefficient by rank testing ( $r_s$ ).

**(3) Dkk4 の発現は  $\beta$ -catenin の核移行と正の相関性があった。**

臨床検体を用いた検討で *Dkk4* の mRNA、蛋白のどちらも  $\beta$ -catenin の核移行と正の相関性を認めた。また培養細胞を用いて、 $\beta$

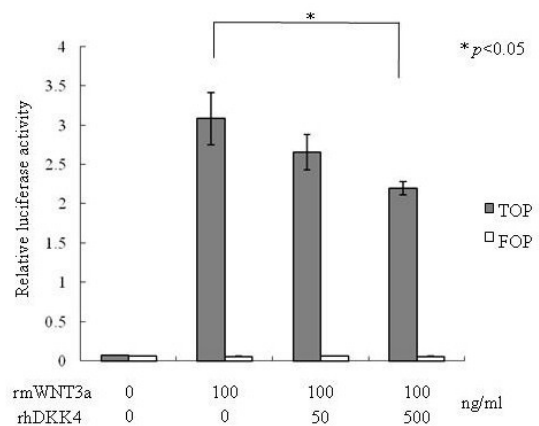
-catenin の活性化により *Dkk4* の発現が増加することを確認した。



Immunohistochemical staining with  $\beta$ -catenin (upper panel) and DKK4 (lower panel) antibody in the specimen which was obtained by endoscopic mucosal resection showing: I, II, whole image; A, invasive cancer with intense staining; B, adenoma with weak staining; C, normal mucosa with almost negative staining. Magnification: A-C  $\times 400$

**(4) Dkk4 は Wnt シグナルを抑制する。**

レポーターアッセイを行い組み替え *Dkk4* 蛋白が Wnt シグナルを抑制することを認めた。



HEK293 cells were cotransfected with canonical (super 8 $\times$  TOP-FLASH, *solid columns*) or mutant (super

8× FOP-FLASH, *open columns*) TCF/LEF luciferase reporters, and pRL-TK. Five hours after transfection, medium was changed and rhDKK1 and -4 was added. rmWnt3a was added 12 h later and luciferase activity was measured 12 h after that. *Bars*, SD.

(1)から(4)の結果より、我々は多くの大腸癌において *Dkk4* および *Dkk2* が高発現していると結論づけた。この *Dkk4* の高発現は、大腸癌で認められる Wnt シグナルの亢進によりもたらされると考えられた。Dkk family の Wnt シグナル伝達での役割を解析し、大腸癌発癌における Dkk family の役割を明らかにすることは大腸癌発生過程の理解とその診断治療法の開発において重要であると考えられる。

#### 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)

Matsui Akira, Yamaguchi Tatsuya, Maekawa Shinya, Miyazaki Chikako, Takano Shinichi, Uetake Tomoyoshi, Inoue Taisuke, Otaka Masahiko, Otsuka Hiroyuki, Sato Tadashi, Yamashita Atsuya, Takahashi, Yuka, Enomoto Nobuyuki  
DICKKOPF-4 and -2 genes are upregulated in human colorectal cancer  
Cancer science (in press) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

#### ①第 94 回日本消化器病学会

松井 啓、山口 達也、前川 信哉ほか  
大腸癌における DKK family の遺伝子発現解析および DKK4 の発現機序の検討  
2008 年 5 月 8 日 福岡

#### ②第 49 回日本消化器病学会大会

松井 啓、山口 達也、前川 信哉ほか  
大腸癌における Dkk family の遺伝子発現解析  
2007 年 10 月 19 日 神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山口 達也 (YAMAGUCHI TATSUYA)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教  
研究者番号 : 30397301

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし