

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18124

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析に基づいた、DKK2を標的とした胆管癌治療の有効性の検討

研究課題名(英文) DKK2 targeting therapy for cholangiocarcinoma found by exhausted gene analysis.

研究代表者

中川 茂樹 (NAKAGAWA, Shigeki)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：10594872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌は手術による根治切除が唯一の根治的な治療であるが、根治切除後の予後も非常に厳しい状況にあり、新しい癌標的治療の開発が不可欠である。今回我々は、胆管癌組織の遺伝子発現データを用いて胆管癌における治療標的の検索を行った。DKK2 (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2) が予後及び根治切除術後の再発率共に強く関連する事が明らかとなった。胆管癌においてDKK2はWNTシグナルを不活性化させる遺伝子であり、癌細胞より分泌されたDKK2がCD8陽性T細胞を不活性化する事で癌の免疫寛容獲得に貢献し、癌の増殖に関わっている事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、抗がん剤の選択肢の少ない胆管癌において治療の標的となる遺伝子、DKK2を発見した。更にその遺伝子の、胆管癌における働きを明らかにしたところ、免疫細胞のWNTシグナルという細胞増殖シグナルを抑えて腫瘍免疫を抑制することで、癌細胞を活性化している事が明らかとなった。今後研究を重ね、抗がん剤として実用化される事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Surgery is the only treatment for the cure of cholangiocarcinoma, but the prognosis after surgery is still poor. We search the new therapeutic target from the exhaustive analysis of cholangiocarcinoma gene expression database. We found the DDK2 was strongly associated with poor prognosis of cholangiocarcinoma patients and clarify the mechanism how DKK2 works in cholangiocarcinoma. DDK2 inactivate the CD8 positive T cells by blocking the WNT signal, and help the cancer cells gain the immune tolerance.

研究分野：消化器外科、肝胆膵外科、胆道癌、バイオインフォマティクス

キーワード：胆管癌 DKK2 細胞周期 抗癌剤 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は根治切除後も高率に再発を来す予後不良な疾患であるが、現在の所再発予防に有効な術後補助化学療法は存在しない。また、切除不能症例に対する有効な全身化学療法はゲムシタピン + シスプラチンが中心であるが、奏効率は思わしくなく、その生命予後は極めて不良であり、術前・術後の補助化学療法を含めた化学療法として有用な薬剤が待ち望まれている。更に近年胆管癌を含め種々の癌腫における網羅的な遺伝子解析の進歩により、gene signature を用いた癌のサブクラス分類や予後予測・薬剤の効果予測が報告されつつある。

2. 研究の目的

網羅的な遺伝子発現データを用いた治療ターゲットの検索

今回我々は、胆管癌における分子標的治療の治療標的を検索する為に TCGA (The Cancer Genome Atlas) の遺伝子発現データを用いて網羅的な解析を行った。胆管癌の予後及び再発と強く相関する遺伝子を検索したところ、DKK2(dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2) が予後及び根治切除術後の再発率共に強く相関する事が明らかとなった。

癌における DKK2 の作用

DKK2 は WNT シグナルを不活化させる遺伝子として知られているが、近年では癌細胞より分泌された DKK2 が CD8 陽性 T 細胞を不活性化する事で癌の免疫寛容獲得に貢献し、癌の増殖に関わるという報告がなされている (Nature Med. 2018)。同研究では、DKK2 を阻害すると、CD8T 細胞及びナチュラルキラー細胞が活性化されて腫瘍の進行が妨げられ PD-1/PD-L1 阻害の影響が更に強くなることを示している。

本研究の目的

本研究においては、胆管癌における DKK2 と予後との関係を明らかにし、その腫瘍伸展に関わる作用機序を明らかにする。DKK2 自体を治療標的とした抗腫瘍効果に加えて、近年注目を集めている PD-1/PD-L1 阻害剤との併用における DKK2 阻害の効果を実証することを目的とする。

以下に述べるその治療標的の検索方法やヒト検体を用いた DKK2 阻害剤の効果検証の方法等は網羅的、かつ非侵襲的にヒト検体における効果を検証する事が可能であり、極めて新規性・有効性が高いものと考えられる。

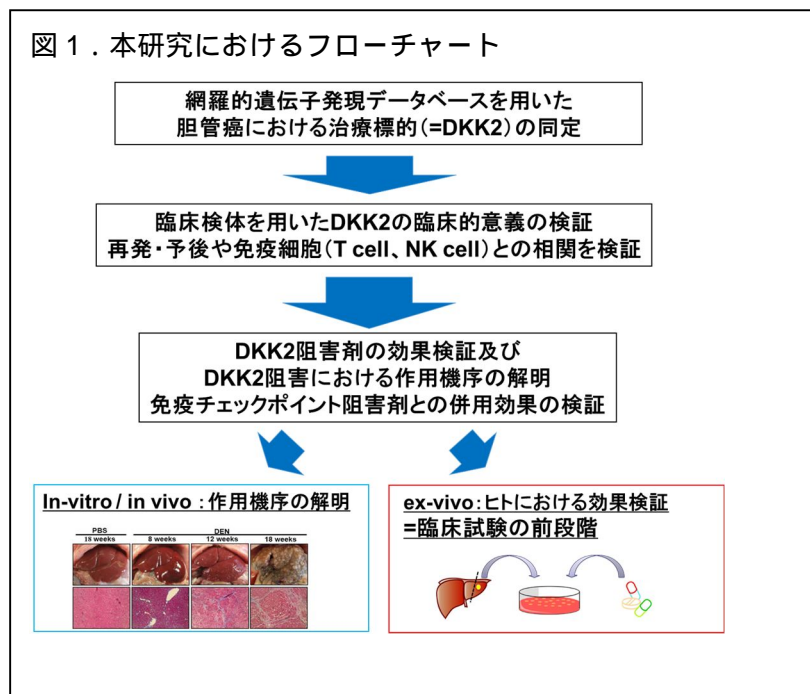
3. 研究の方法

本研究においては、以下の ~ の段階に分け、その有用性を検証しながら次のステップへと進めて行く予定である。図 1 に研究遂行のフローチャートを示す。

網羅的な遺伝子発現データを用いた治療標的としての DKK2 の同定と in silico における機能解析

胆管癌における薬物治療標的として有用な遺伝子を検索するため、TCGA から胆管癌症例の癌部のマイクロアレイデータベースを用いて検討を行った。TCGA の胆管癌症例約 50 例において、cox 比例ハザードモデルにより再発に対するハザード比が 3.0 よりも大きい遺伝子を選び、この内ハザード比が最も高い(HR: 3.48)DKK2 を選択し、治療標的としての有用性を検討する事とした。同 TCGA のデータベース及び、当科にて利用可能である複数のマイクロアレイデータベースのコホートを用いて、DKK2 を相関の高い pathway や、免疫細胞の相関を in silico において解析する。

図 1. 本研究におけるフローチャート



ヒト検体における DKK2 発現と再発・予後及び臨床病理学的因子との相関の検討
 当科保有の臨床検体及びデータベースを用いて、臨床検体における DKK2 の機能的な発現意義及び、予後予測因子としての有用性を明らかにする。熊本大学医学部、消化器外科にて 2000 年～2014 年に肝外・肝内胆管癌に対して根治切除を施行された約 300 症例を用いて、定量 PCR 及び免疫染色にて RNA レベル、蛋白レベルの DKK2 発現を確認する。生命予後や再発等との相関関係を明らかにすると共に、CD8 陽性リンパ球や PD-1 発現との相関を検討する。

胆管癌細胞株を用いた DKK2 の機能解析及び DKK2 阻害剤の効果検証
 胆管癌細胞株を用いた *in vitro/in vivo* の実験によって、DKK2 の癌細胞における働きを明らかにする。当科にて保有している 8 種類の胆管癌細胞株に対して、DKK2 発現プラスミドベクターを導入し DKK2 強制発現を、DKK2 を標的とした siRNA を用いて発現抑制を行った細胞株を作成し、機能解析を行う。MTT assay にて増殖能、FACS を用いて細胞周期及びアポトーシス、invasion assay にて浸潤能、scratch assay にて遊走能に与える影響を明らかにする。更に、癌細胞より分泌された DKK2 の働きを検証する為に癌細胞と免疫細胞の共培養を行い DKK2 がリンパ球に対して与える影響を明らかにする。

ヒト癌細胞組織のスライスを用いた *ex vivo* 培養系を用いて、腫瘍微小環境を含んだ状態での DKK2 阻害剤のヒト検体における効果の検証
 手術による切除後すぐの胆管癌組織を、厚さ 300 μ m にスライスし、細胞培養用メディウムを用いて培養を行う。この組織に対して DKK2 阻害剤を投与し、MTS アッセイにてその *viability* を評価する。また、カルチャー後の蛋白、mRNA を回収してその蛋白、遺伝子発現の変化を評価する。このような *ex vivo* の実験系を用いてヒト胆管癌組織に対する薬剤の効果の評価することで、胆管癌組織中の免疫細胞をはじめとする間質細胞や微小血管などの腫瘍微小環境を残しつつ、薬剤感受性の評価を行う事が可能である。DKK2 阻害剤単独及び PD-1 阻害剤との併用を行い 48 時間培養した後、細胞の *Viability*、リンパ球マーカーを測定し、効果を検証する。

本研究により、胆管癌における薬物治療において DKK2 を標的とした分子標的治療薬の有用性及びその作用機序が明らかになる事が期待される。

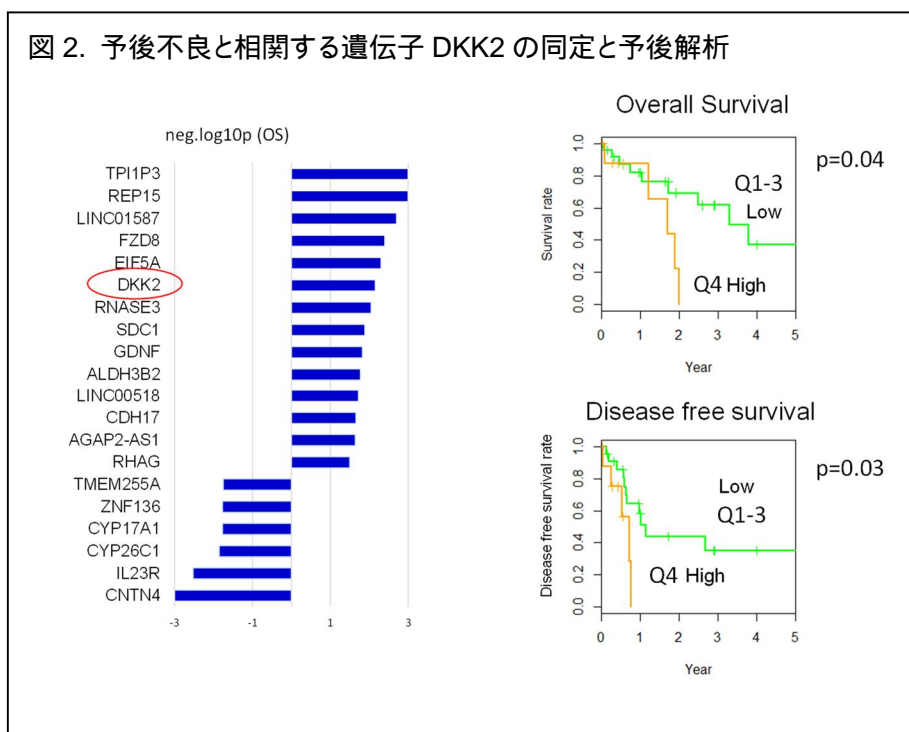
4. 研究成果

網羅的な遺伝子発現データを用いた治療標的としての DKK2 の同定と *in silico* における機能解析

胆管癌における薬物治療標的として有用な遺伝子を検索するため、TCGA から胆管癌症例の癌部のマイクロアレイデータベースを用いて検討を行った。TCGA の胆管癌症例約 50 例において、cox 比例ハザードモデルにより再発に対するハザード比が 3.0 よりも大きい遺伝子を選び、この内ハザード比が最も高い(HR: 3.48)DKK2 を選択し、治療標的としての有用性を検討する事とした(図 2)。

ヒト検体における DKK2 発現と再発・予後及び臨床病理学的因子との相関の検討

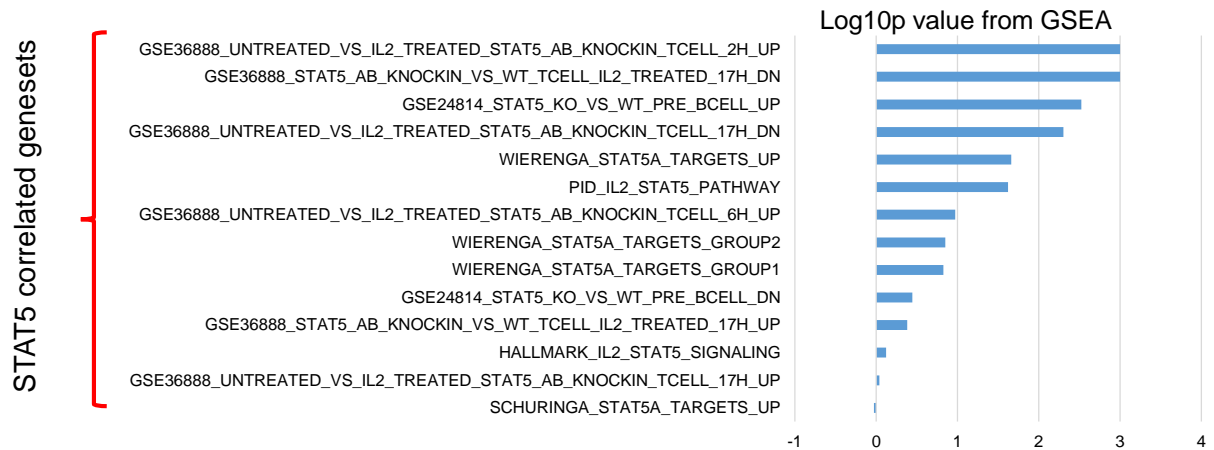
TCGA コホートを用いて生存解析を行った所、DKK2 高値の症例では優位に再発率、生存率共に不良であった(図 2)。



in silico functional analysis を用いた DKK2 の機能解析及び DKK2 阻害剤の効果検証
 同 TCGA のデータベース及び、当科にて利用可能である複数のマイクロアレイデータベースのコ
 ホートを用いて、DKK2 を相関の高い pathway や、免疫細胞の相関を in silico において解析した
 所、WNT シグナルの下流である、STAT5 と関連する gene set がエンリッチメントされている事
 が明らかとなった (図 3)。

図 3. 胆管癌における DKK2 の機能解析

In silico functional analysis



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakao Yosuke, Nakagawa Shigeki, Yamashita Yo-ichi, Umezaki Naoki, Okamoto Yuya, Ogata Yoko, Yasuda-Yoshihara Noriko, Itoyama Rumi, Yusa Toshihiko, Yamashita Kohei, Miyata Tatsunori, Okabe Hirohisa, Hayashi Hiromitsu, Imai Katsunori, Baba Hideo	4. 巻 -
2. 論文標題 High ARHGEF2 (GEF-H1) Expression is Associated with Poor Prognosis Via Cell Cycle Regulation in Patients with Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09383-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Shigeki, Yamashita Yo-ichi, Umezaki Naoki, Yamao Takano, Kaida Takayoshi, Hiyoshi Yukiharu, Mima Kosuke, Okabe Hirohisa, Hayashi Hiromitsu, Imai Katsunori, Chikamoto Akira, Baba Hideo	4. 巻 169
2. 論文標題 Four gene intrahepatic metastasis-risk signature predicts hepatocellular carcinoma malignant potential and early recurrence from intrahepatic metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 903 ~ 910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2020.09.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------