

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16330

研究課題名（和文）難治性がんにおけるDKK1の遺伝子発現制御機構とがん微小環境制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of regulatory mechanisms of DKK1 gene expression and its role in the cancer microenvironment in refractory cancers

研究代表者

佐田 遼太（Sada, Ryota）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60869783

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）：我々は種々のがんにおいてDKK1-CKAP4シグナルによる細胞増殖機構を明らかにしてきた。本研究で、私共は膵がん由来細胞株S2-CP8細胞においてDKK1下流で発現制御される遺伝子を網羅的に解析し転写因子FOXM1を見出した。FOXM1自身はDKK1を発現促進するポジティブフィードバック機構を介して、膵がんおよび食道扁平上皮がんの細胞増殖を促進する分子機構を報告し、膵がん・食道扁平上皮がんにおいてDKK1とFOXM1の共発現が独立した予後不良因子であること、DKK1-CKAP4 FOXM1シグナルが治療ターゲットとなり得る事を見出し、成果を論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の私共の研究成果の学術的意義は、難治性がんにおけるWntシグナルと独立したDKK1過剰発現の分子機構を明らかにしたことである。

また私共が開発した抗CKAP4抗体が、DKK1-CKAP4-FOXM1シグナルを阻害することで、in vivoにおける腫瘍増殖抑制を示すことを明らかにした。難治性がんの分子病態の理解と、将来の新規治療戦略の開発につながる事が期待される点で、今回の私共の研究成果の社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We have previously elucidated the mechanism of cell proliferation mediated by DKK1-CKAP4 signaling in various cancers. In this study, we comprehensively analyzed the genes expressed downstream of DKK1-CKAP4 signaling in pancreatic cancer cell line S2-CP8 and focused to the transcription factor FOXM1, which promotes DKK1 expression in a positive feedback mechanism to enhance tumor cell growth of pancreatic and esophageal squamous cell carcinoma cells. We elucidated that co-expression of DKK1 and FOXM1 is an independent poor prognostic factor in pancreatic cancer and esophageal squamous cell carcinoma, and that DKK1-CKAP4 FOXM1 signaling is a potential therapeutic target. We have published our findings in a paper.

研究分野：molecular biology

キーワード：DKK1 CKAP4 FOXM1 膵がん 肝がん 肺がん

1. 研究開始当初の背景

私共は分泌蛋白質 Dickkopf1 (DKK1)の DKK1 の新規細胞膜受容体として Cytoskeleton-Associated protein 4 (CKAP4)を同定し、種々のがんにおいて DKK1-CKAP4 シグナルが細胞増殖を促進することを明らかにした。一方、がんにおいて DKK1 が過剰発現するメカニズムについては十分な解析が進んでいない。また DKK1-CKAP4 シグナル活性化が AKT のリン酸化を促進することは明らかとなっていたが、同シグナル下流でどのような遺伝子発現が制御されるかについても明らかとなっていなかった。DKK1-CKAP4 シグナルは膵がん・肺がん・食道がんといった複数のがんにおいてその活性化が予後不良因子であることが報告されており、これらのがんにおける DKK1-CKAP4 シグナルの活性化制御機構を明らかにすることは、がんの病態理解と新規治療法の開発に必要である。また近年、がんにおいて DKK1 が腫瘍局所の炎症・免疫応答制御に関与していることが報告されているが、その分子機構は臓器ごとに多彩であり、十分な解析が行われていない。

2. 研究の目的

本申請研究課題では、膵がん・食道がんにおける DKK1 の発現制御メカニズム及び DKK1-CKAP4 シグナル下流での遺伝子発現制御を明らかにすることを目的とする。また新規に作製した DKK1 高発現がんモデルを用いて、DKK1-CKAP4 シグナルによるがん細胞増殖能および腫瘍微小環境制御における同シグナル軸の機能について解析を進めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト難治性がんにおける DKK1 の過剰発現のメカニズム解析

DKK1 および細胞膜 CKAP4 を高発現し、DKK1-CKAP4 シグナルが活性化しているヒト膵がん由来細胞株 S2-CP8 において内在性 DKK1 をノックアウトした細胞を作製し、DKK1 依存性に発現が変動する遺伝子を RNA シーケンスで解析することで、DKK1-CKAP4 シグナル下流で発現制御される遺伝子の網羅的探索を行い、細胞周期制御転写因子 FOXM1 に着目した。複数のヒト膵がんおよび食道がん由来細胞株を用いて、DKK1 および細胞膜 CKAP4 の発現と、FOXM1 発現の関連を、DKK および CKAP4 のノックダウンおよびレスキュー実験を用いてウェスタンブロットおよび定量 PCR で解析した。DKK1-CKAP4 シグナル下流で AKT が活性化することが知られており、DKK1-CKAP4 シグナル下流での FOXM1 発現制御メカニズムを、AKT 阻害剤を用いた実験で解析した。これらの解析を進める中で、FOXM1 の発現が低下すると DKK1 自体の発現も低下することが明らかとなり、転写因子 FOXM1 が DKK1 の発現を制御している可能性を考察し、ヒト膵がんおよび食道がん由来細胞株において FOXM1 をノックダウンして DKK1 の発現変動をウェスタンブロットおよび定量 PCR で解析した。またクロマチン免疫沈降およびレポーターアッセイの手法を用いて、転写因子 FOXM1 による DKK1 の発現制御機構を解析した。さらに、私達が本研究で同定した DKK1 遺伝子プロモーター領域の FOXM1 結合領域を、Crispr-Cas9 システムを用いてヒト膵がん由来細胞株 S2-CP8 のゲノム上から DKK1 遺伝子座上流の FOXM1 結合領域を欠損させた細胞株 (S2-CP8/FOXM1 binding site deletion (FOXM1 BS)) を作製し、DKK1 遺伝子発現および細胞増殖能の変化をウェスタンブロット、定量 PCR、および細胞増殖アッセイで解析した。

ヒト膵がんおよび食道がんの臨床症例において DKK1 と FOXM1 の発現に相関があるかどうかを、手術標本を用いた免疫染色で解析した。大阪大学医学部付属病院にて外科切除された膵がん 38 例および食道扁平上皮がん 82 例の組織切片に対して DKK1 および FOXM1 の免疫組織化学染色を行い、両タンパクの発現相関を解析した。上記症例の臨床データを用いて DKK1 および FOXM1 を共発現する症例の予後を解析した。

(2) DKK1 高発現難治性がんモデルマウスを用いた腫瘍微小環境制御における DKK1 の機能解析

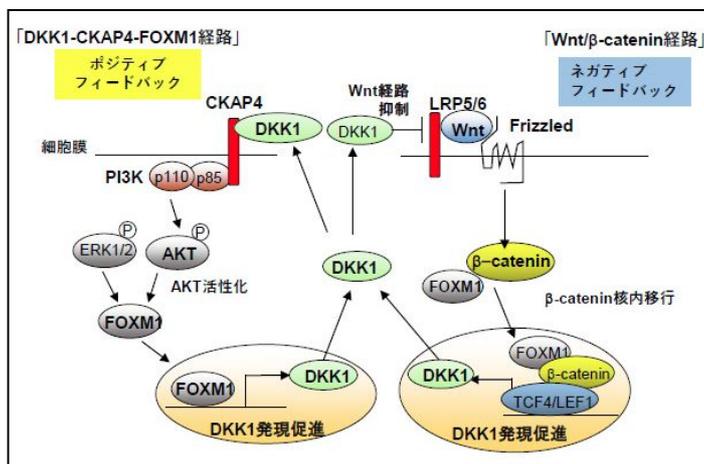
DKK1 の腫瘍微小環境制御における役割を解析するため、正常免疫マウス C57BL/6 マウスに対して hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法を用いて N90 -catenin+c-MET に DKK1 を共発現させる肝がんモデルマウスを作製し、DKK1 発現の有無による腫瘍形成および腫瘍への免疫細胞浸潤を、摘出した肝臓の組織切片を用いた免疫組織化学染色で解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト難治性がんにおける DKK1 の過剰発現のメカニズム解析

ヒト膵がん由来細胞株 S2-CP8 において内在性 DKK1 をノックアウトした細胞を作製し、DKK1-CKAP4 シグナル下流で発現制御される遺伝子を RNA シーケンスで網羅的探索することで、転写因子 FOXM1 を見出した。実際に複数のヒト膵がんおよび食道がん由来細胞株において、DKK1 および細胞膜 CKAP4 高発現細胞株が FOXM1 を高発現しており、これらの細胞において DKK1 あるいは CKAP4 をノックダウンすることで、AKT 抑制を介して FOXM1 の発現が低下することを明らかにした。これらの解析を進める中で、FOXM1 の発現が低下すると DKK1 自体の発現も低下することが明らかとなり、ヒト膵がんおよび食道がん由来細胞株において FOXM1 をノックダウンすると DKK1 の発現が低下し、一方で内在性 FOXM1 および DKK1 の発現が低い膵がん由来細胞株 Capan-1 に

FOXM1 を過剰発現させることで DKK1 の発現が亢進することを明らかにした。DKK1 遺伝子上流の FOXM1 のコンセンサス配列に対してクロマチン免疫沈降法を行い、実際に FOXM1 が DKK1 遺伝子上流に結合することを確認した。Crispr-Cas9 システムを用いてヒト膵がん由来細胞株 S2-CP8 のゲノム上から DKK1 遺伝子座上流の FOXM1 結合領域を欠損させた細胞株を作製したところ、同細胞では DKK1 の発現が低下し、AKT 活性化および *in vitro* での細胞増殖活性、ゼノグラフトモデルにおける皮下腫瘍形成能の低下を認めた。以上の結果から、ヒト膵がんおよび食道がんにおいて DKK1-CKAP4 シグナルと FOXM1 が相互に発現を促進するポジティブフィードバック機構を介して細胞増殖能を活性化する分子機構が明らかとなった。続いて私共は、実際にヒト膵がんおよび食道がんの臨床症例において DKK1 と FOXM1 の発現に相関があるかどうかを、手術標本を用いた免疫染色で解析した。大阪大学医学部付属病院にて外科切除された膵がん 38 例および食道扁平上皮がん 82 例の組織切片に対して DKK1 および FOXM1 の免疫組織化学染色を行ったところ、膵がんにおいて 27/38 例 (71.1%)、食道扁平上皮がんにおいて 40/82 例 (48.8%) で腫瘍組織特異的に DKK1 と FOXM1 が共に発現しており、両者の共発現には統計的に有意な相関を認めた。上記症例の臨床データを用いて DKK1 と FOXM1 を共に発現する症例の予後を解析したところ、食道扁平上皮がんにおいて DKK1 と FOXM1 をともに発現した症例ではそれ以外の症例と比較して有意に全生存率および無再発生存率が不良であり、同様に膵がんにおいても DKK1 と FOXM1 をともに発現した症例ではそれ以外の症例と比較して予後が不良である傾向を認めた他、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースの膵がん 174 例のデータを利用した予後解析においても、DKK1 および FOXM1 の mRNA レベルでの発現量が共に高い症例では、それ以外の症例と比較して有意に全生存率が不良であった。以上の結果から、ヒト膵がんおよび食道扁平上皮がんにおいて DKK1-CKAP4 シグナル下流において AKT の活性化を介して転写因子 FOXM1 が発現し、また FOXM1 が逆に DKK1 のエンハンサー領域に結合して発現を促進するポジティブフィードバック機構を介して腫瘍の増殖が促進し臨床的予後不良と関わるということが明らかとなり、研究成果を論文報告した。



DKK1-CKAP4 シグナル下流において AKT の活性化を介して転写因子 FOXM1 が発現し、また FOXM1 が逆に DKK1 のエンハンサー領域に結合して発現を促進するポジティブフィードバック機構を介して腫瘍の増殖が促進し臨床的予後不良と関わるということが明らかとなり、研究成果を論文報告した。

(2) DKK1 高発現難治性がんモデルマウスを用いた腫瘍微小環境制御における DKK1 の機能解析

正常免疫マウス C57BL/6 マウスに対して hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法を用いて N90 -catenin+c-MET に DKK1 を共発現させる肝がんモデルマウスを作製し、マウス肝臓内に DKK1 を発現する分化型肝がんの多発発がんを確認した。肝臓から摘出した腫瘍から核酸およびタンパクを抽出し、実際に導入した DKK1 が発現することを確認した。更に、担癌マウス血清中に DKK1 が分泌されていることを EISA で確認した。私達は既に、412 例の肝がん症例の臨床サンプルおよび臨床データを用いた研究で、ヒト肝細胞がんにおける DKK1-CKAP4 シグナル活性化が肝がんの増殖を促進することを見出している。しかし、予想に反して、N90 -catenin+c-MET 群と比較して、N90 -catenin+c-MET+DKK1 共発現群では、腫瘍形成促進を認めず、免疫組織化学染色では DKK1 依存性の、腫瘍内免疫細胞浸潤像にも有意な差異が確認できなかった。現在までに、正常免疫マウスを用いた複数のマウスがんモデルにおいて、同様に DKK1 を過剰発現するがんモデルを作製済みであり、DKK1-CKAP4 シグナルによる、腫瘍微小環境での免疫制御メカニズムに関しては引き続き解析を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Sada Ryota, Kimura Hirokazu, Takada Naoki, Harada Akikazu, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Yamamoto Hideki, Kikuchi Akira | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 The Dickkopf1 and FOXM1 positive feedback loop promotes tumor growth in pancreatic and esophageal cancers | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 4486 ~ 4502 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-01860-z | 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 - |
| 1. 著者名 Nagoya Akihiro, Sada Ryota, Kimura Hirokazu, Yamamoto Hideki, Morishita Koichi, Miyoshi Eiji, Morii Eiichi, Shintani Yasushi, Kikuchi Akira | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 CKAP4 is a potential exosomal biomarker and therapeutic target for lung cancer | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 408 ~ 426 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-22-571 | 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 - |
| 1. 著者名 Sada Ryota, Iguchi Kosuke, Matsumoto Shinji, Kimura Hirokazu, Zen Yoh, Akita Masayuki, Gon Hidetoshi, Fukumoto Takumi, Kikuchi Akira | 4. 巻 114 |
| 2. 論文標題 DKK1 CKAP4 signal axis promotes hepatocellular carcinoma aggressiveness | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 2063-2077 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15743 | 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 - |
| 1. 著者名 Kikuchi Akira, Matsumoto Shinji, Sada Ryota | 4. 巻 125 |
| 2. 論文標題 Dickkopf signaling, beyond Wnt-mediated biology | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Seminars in Cell and Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 55 ~ 65 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcd.2021.11.003 | 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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐田遼太、木村公一、高田直季、山本英樹、菊池章 |
| 2. 発表標題 膵がん・食道扁平上皮がんにおけるDKK1とFOXM1のポジティブフィードバック発現制御を介した腫瘍増殖促進メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐田遼太 |
| 2. 発表標題 The Dickkopf1 and FOXM1 positive feedback loop is associated with tumor growth of pancreatic and esophageal cancer |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐田遼太 |
| 2. 発表標題 The Dickkopf1 and FOXM1 positive feedback loop promotes tumor growth and associates with poor prognosis of pancreatic and esophageal cancer |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会総会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|