

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22791766  
 研究課題名（和文） 頭頸部扁平上皮癌におけるDKK遺伝子ファミリーの機能解析  
 研究課題名（英文） Functional analyses on DKK gene family in head and neck squamous cell carcinoma  
 研究代表者  
 片瀬 直樹（KATASE NAOKI）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：30566071

### 研究成果の概要（和文）：

本研究では頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）の発生・進展に関わる癌関連遺伝子として同定された DKK3 遺伝子について機能解析を行った。DKK3 は消化管の腺癌等では発現が消失しており癌抑制遺伝子とされているが、HNSCC ではこれとは異なり、組織や細胞株で mRNA、蛋白がともに優勢的に発現していた。さらに、生存分析では DKK3 蛋白発現（-）の患者群は生存期間が長いことが示され、細胞株において DKK3 mRNA 発現を siRNA で抑制すると細胞の浸潤性、遊走性が低下することが示された。以上から、HNSCC では DKK3 が癌抑制遺伝子としてではなく、腫瘍の進展を促進する機能を有する可能性が示唆された。

### 研究成果の概要（英文）：

In this research project, functions of DKK3 gene were investigated in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Although DKK3 is reported to function as tumor suppressor in kinds of tumors, the present researches demonstrated contradict findings. In HNSCC, DKK3 mRNA and protein were dominantly expressed, unlike those in other cancers were attenuated or lost because of promoter methylation. Survival analyses revealed that DKK3 protein(-) patients showed longer survival. Knockdown of DKK3 mRNA by siRNA in HNSCC cell lines resulted in decreased cellular migration and invasion. All the data strongly imply the paradoxical function of DKK3 in HNSCC.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌、DKK3、癌抑制遺伝子、機能解析、siRNA、生存分析

#### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）は世界的にも発生頻度の高い悪性腫瘍である。HNSCCは転移をきたした場合には制御困難となる場合があり、

治療成績の向上と予後予測のために、HNSCCの浸潤や転移を制御する因子についての基礎研究が求められている。

癌は一般的に、癌遺伝子の増幅や癌抑制遺

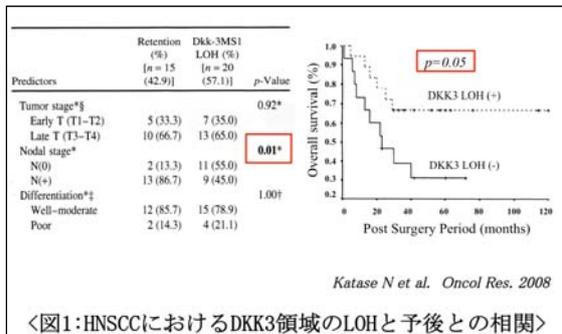
伝子の機能喪失などの癌関連遺伝子に生じた変異や後成的修飾の結果として生じるが、HNSCCの浸潤性や転移能の決定に関わる有力な癌関連遺伝子については不明な点が多い。

申請者は、HNSCCの発生と進展に関わる癌関連遺伝子をgenome wideなヘテロ接合性消失(LOH)解析により検索し、重要な癌関連遺伝子としてDKK遺伝子ファミリー(DKK1-4)を同定した。

DKK遺伝子ファミリーは、消化管の腺癌や前立腺癌等では、細胞の癌化を促進するWntシグナルを抑制する機能をもつことから、癌抑制遺伝子と考えられている。その中でも特にDKK3は、別名をREIC(Reduced Expression In Cancer)といい、多種類の癌で発現低下が認められ、強力な癌抑制因子であるとされる。さらに、近年ではDKK3の癌治療のターゲットとしての可能性が議論されている。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究で、HNSCCではDKK遺伝子ファミリーに非常に高頻度(39-63%)にLOHが生じていることを見出した。LOH解析は対立遺伝子の欠失を検出する手法であり、LOHが高頻度に生じている染色体上の領域には強力な癌抑制遺伝子の存在が示唆されることから、最も高頻度であったDKK3を有力な癌抑制遺伝子候補として、臨床データとの相関を比較した。



〈図1:HNSCCにおけるDKK3領域のLOHと予後との相関〉

しかし、興味深いことにDKK3領域(10p15.2)にLOHを伴う患者群は有意にリンパ節転移が少なく、Overall Survivalが長いという、予想に反する結果が得られた(図1:Katase Net al, Oncol Res. 2008)。

そこで、本研究計画ではHNSCCにおけるDKK3の詳細な機能を検討することを目的とし、(1)腫瘍組織材料でのDKK3蛋白発現の検討、(2)前癌病変を含めた頭頸部扁平上皮の癌化過程におけるDKK3発現の検討、(3)HNSCC由来細胞株を用いたDKK3遺伝子機能解析の3つのテーマについて研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織材料でのDKK3蛋白発現の検討

#### ①材料

岡山大学病院 病理部口腔病理診断部門で取り扱った頭頸部扁平上皮癌症例90例、HNSCC由来細胞株10種を用いた。

#### ②方法

常法に従い連続切片を作成し、DKK3を認識する特異的抗体を用いて免疫組織化学を施し、蛋白発現の有無および局在を検討した。細胞株についてはDKK3蛋白発現の有無をwestern blottingにより検討した。さらに、DKK3蛋白発現の有無と予後との相関を、Kaplan-Meier法による生存解析、多変量解析により検討した。

### (2) 癌化過程DKK3蛋白発現の検討

#### ①材料

岡山大学病院 病理部口腔病理診断部門で取り扱った頭頸部扁平上皮癌、上皮異形成症例、合計65例を用いた。

#### ②方法

常法に従い連続切片を作成し、DKK3の発現と局在を免疫組織化学により検

討した。さらに、DKK3 と Wnt canonical pathway、細胞増殖との関連を検討するため、 $\beta$ -catenin と Ki-67 に対する免疫組織化学も行った。

### (3) 細胞株での DKK3 遺伝子機能解析

#### ①材料

HNSCC 由来細胞株 4 種、陰性対照群として胃腺癌由来細胞株 2 種、大腸腺癌由来細胞株 2 種を用いた。

#### ②方法

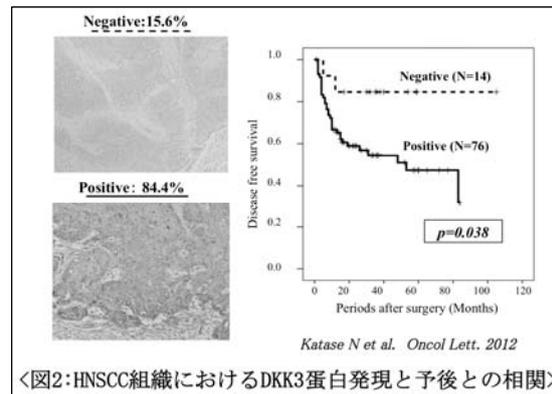
各細胞株を培養して mRNA を回収し、RT-PCR 法により DKK3 mRNA 発現を確認した。次いで、DKK3 発現細胞に対して DKK3 を特異的にノックダウンする siRNA を Lipofectamine™ を用いてトランスフェクションし、細胞の増殖、遊走能、浸潤性に及ぼす影響を、MTT assay、migration assay、matrigel invasion assay によって検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 組織材料での DKK3 蛋白発現の検討

- ① HNSCC 組織・細胞での DKK3 蛋白発現  
DKK3 蛋白は扁平上皮癌症例の 84.4% (76/90 例) で発現が認められた。Western blotting では、全ての細胞で DKK3 蛋白発現が検出された。
- ② HNSCC 組織での DKK3 蛋白発現と予後  
DKK3 蛋白発現群は有意に Disease Free Survival, Metastasis Free Survival が短かった (図 2)。また DKK3 蛋白発現は独立した予後予測因子であった。

以上の結果からは、DKK3 は HNSCC では消化管の腺癌とは異なった発現を示すことが明らかとなった。

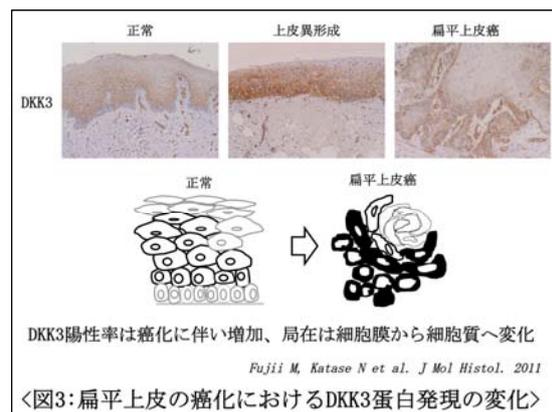


〈図2:HNSCC組織におけるDKK3蛋白発現と予後との相関〉

また、生存分析では DKK3 発現群は予後不良であることが示され、「DKK3 には未知の癌遺伝子的な機能が存在する」との仮説に至った。

### (2) 癌化過程 DKK3 蛋白発現の検討

頭頸部の扁平上皮は、正常から上皮異形成 (軽度/中等度/高度)、上皮内癌を経て浸潤癌へと進展すると考えられている。癌化の各過程における DKK3 発現と局在を検討したところ、DKK3 蛋白発現は上皮異形成、上皮内癌にかけて発現率が上昇し、蛋白の局在も細胞膜から細胞質内へと変化した (図 3)。また、 $\beta$ -catenin の発現と局在も同様であった。



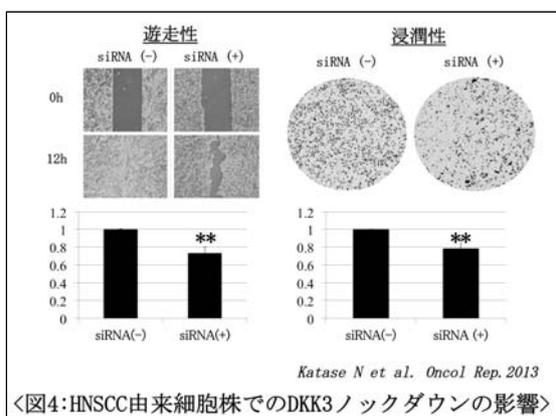
〈図3:扁平上皮の癌化におけるDKK3蛋白発現の変化〉

この結果からは、HNSCC では DKK3 が癌抑制因子としては機能していないこと、HNSCC での DKK3 発現は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに影響しない可能性が示された。

### (3) 細胞株での DKK3 遺伝子機能解析

HNSCC、胃癌、大腸癌等の細胞株を用いて mRNA 発現を定量的に検討した。用いた細胞株のうち、HNSCC 由来細胞株のみに DKK3 発現が認められたが、胃癌や大腸癌の細胞株では発現を認めなかった。

DKK3 高発現を示す細胞株を選別し、siRNA による RNA 干渉で DKK3 発現のノックダウンを行い、細胞増殖や浸潤性の変化を検討した。DKK3 ノックダウンは細胞の増殖能には影響を及ぼさなかったが、検討した 2 種類の細胞株において、細胞遊走能と浸潤能が有意に低下した (図 4)。



この結果は、実験 (1) で得られた仮説を裏付けるデータであり、HNSCC では DKK3 が癌遺伝子的に機能する可能性が強く示唆された。

上記のように、本研究では DKK3 の「これまで報告されてこなかった未知の癌遺伝子的機能」の存在の可能性が示された。

また、本研究結果からは癌抑制遺伝子の機能の多様性、組織特異性の存在をも示唆しており、頭頸部扁平上皮癌研究のみならず癌関連遺伝子の基礎研究としての価値をも有すると考えられる。

#### 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 31 件)

- ① Katase N, Lefeuvre M, Gunduz M 他 (10 人中 1 番目)、Absence of Dickkopf (Dkk)-3 protein expression is correlated with longer disease free survival and lower incidence of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma、*Oncol Lett*、査読有、3 巻 2 号、2012、273-280.
- ② Sathi GSA, Tamamura R, Tsujigiwa H 他 (8 人中 4 番目)、Osteogenic genes related to the canonic WNT pathway are down-regulated in ameloblastoma、*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*、査読有、114 巻 6 号、2012、771-777.
- ③ Buery RR, Siar CH, Katase N 他 (9 人中 3 番目)、NRAS and BRAF mutation frequency in primary oral mucosal melanoma、*Oncol Rep*、査読有、26 巻 4 号、2011、783-787.
- ④ Fujii M, Katase N, Lefeuvre M 他 (8 人中 2 番目)、Dickkopf (Dkk)-3 and  $\beta$ -catenin expressions increased in the transition from normal oral mucosal to oral squamous cell carcinoma、*J Mol Histol*、査読有、42 巻 6 号、2011、499-504.
- ⑤ Inoue M, Roan CH, Abe T 他 (8 人中 6 番目)、Localization and characterization of lymphatic vessels in oral and cervical squamous cell carcinoma、*Exp Ther Med*、査読有、2 巻 5 号、2011、793-797.
- ⑥ Ali MA, Gunduz M, Gunduz E 他 (11 人中 6 番目)、Expression and mutation analysis of Her2 in head and neck squamous cell carcinoma、査読有、28 巻 5 号、2010、495-500.

- ⑦ Katase N, Gunduz M, Beder LB他 (10人中1番目)、Frequent Allelic Loss of Dkk-1 Locus (10q11.2) is Related with Low Distant Metastasis and Better Prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas、Cancer Invest、査読有、28巻1号、2010、103-110.
- ⑧ Borkosky SS, Gunduz M, Beder L他 (11人中7番目)、Allelic loss of the ING gene family loci is a frequent event in ameloblastoma、Oncol Res、査読有、18巻10号、2010、509-518.

[学会発表] (計43件)

- ① 片瀬 直樹 他、siRNAによるDkk-3 遺伝子ノックダウンが口腔扁平上皮癌由来細胞に及ぼす影響、第23回日本臨床口腔病理学会、2012年8月30日、東京
- ② 片瀬 直樹 他、口腔扁平上皮癌由来細胞におけるDkk3 遺伝子の機能解析、第101回日本病理学会総会、2012年4月27日、東京
- ③ 藤井 昌江 他、頭頸部扁平上皮癌におけるDkk-3の免疫組織化学的検討、第32回岡山歯学会、2011年11月23日、岡山
- ④ 片瀬 直樹 他、Dkk-3 protein and mRNA expression in head and neck squamous cell carcinoma and its correlation with the prognosis、第70回癌学総会、2011年10月4日、名古屋
- ⑤ 藤井 昌江 他、頭頸部扁平上皮癌におけるDkk-3発現の検討、第19回硬組織再生生物学会総会、2010年9月4日、岡山
- ⑥ Tsujigiwa H他、Three regions in 1p36 are preferentially deleted in oral squamous cell carcinoma、15th meeting of IAOP、2010年8月18日、Seoul (Korea)
- ⑦ Katase N他、Application of loss of heterozygosity analysis for detection of tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma、15th meeting of IAOP、2010年8月17日、Seoul (Korea)
- ⑧ 片瀬 直樹 他、頭頸部扁平上皮癌におけるDkk遺伝子ファミリーのヘテロ接合性消失 (LOH) 解析、第7回日本病理学会カンファレンス「炎症と免疫、癌」、2010年8月6日、岡山
- ⑨ 片瀬 直樹 他、頭頸部扁平上皮癌におけるDkk-3 蛋白発現解析、第21回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2010年7月31日、大阪
- ⑩ 松田 寛之 他、頭頸部扁平上皮癌におけるDkk 遺伝子ファミリーのヘテロ接合性消失 (LOH) と臨床病理学的特徴の相関、第99回日本病理学会、2010年4月28日、東京
- ⑪ 片瀬 直樹 他、頭頸部扁平上皮癌におけるDkk-3 のヘテロ接合性消失解析と蛋白発現の解析、第99回日本病理学会、2010年4月28日、東京

[図書] (計1件)

- ① Katase N他、NOVA Science Publisher、Oral Cancer: Causes, Diagnosis and Treatment. 2011、169-188.

[その他]

雑誌論文⑤は、カナダの医学情報ウェブサイト「Global Medical Discovery」に“Key Scientific Article”として掲載された。

ホームページ等

<http://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/dickkopf-dkk-3-and-beta-catenin-expressions-increased-in-the-transition-from-normal-oral-mucosal-to-oral-squamous-cell-carcinoma/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片瀬 直樹 (KATASE NAOKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教

研究者番号：30566071