

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：17601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23791552
研究課題名（和文） 膵癌の浸潤・転移に関与する Wnt 関連遺伝子の機能解析
研究課題名（英文） Functional analysis of Wnt-related genes concerning invasion and metastasis of pancreas cancer
研究代表者 高橋 伸育 (TAKAHASHI NOBUYASU) 宮崎大学・医学部・助教 研究者番号：20404436

研究成果の概要（和文）：様々な癌の浸潤・転移に関わるとされる WNT 蛋白を抑制する機能を有する DKK-1 の濃度を測定することで膵癌の早期発見を試みた。膵液中に存在する DKK-1 の濃度と癌の存在には相関関係がみられなかったが、同じく予後不良である胆道癌においては DKK-1 の濃度は有意に上昇しており、早期発見への手がかりになり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：WNT protein have a multiple functions concerning cancer in vasion and metastasis. We investigated DKK-1 protein concentration in the pancreatic juice, which shows inhibitory ability against WNT protein, for an early detection of the pancreas cancer. Although no correlation can be identified between DKK-1 concentration and pancreas cancer, DKK-1 mRNA expression is elevated in the bile duct cancer as well as pancreas cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 消化器外科学

キーワード：Dkk-1 遺伝子、Wnt 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌の死亡数は世界的にみて年に 213000 人に及び、発見が遅れ、浸潤・転移性が強いことから、5 年生存率は約 6% しかない。従って、膵癌の早期発見と浸潤・転移抑制のための新規マーカーや治療標的の同定が急務である。申請者はこれまでの研究において、Wnt 関連遺伝子の一つであり Wnt がその受容体である LRP5/6 と結合するのに競合的に作用する Dickkopf-1 (DKK-1) 遺伝子に注目し、本遺伝子が膵癌で高発現していることを世界

で初めて示した。Wnt の研究は約 20 年前にスタートし、発生、幹細胞の維持、癌との関わり合いといった多彩な機能が報告され、Wnt に関する論文は年々増加の一途をたどっている。Wnt 関連遺伝子は現在までに数種類が同定されており、申請者が報告した DKK-1 研究も 1998 年の発見以来、様々な癌や疾患での機能解析がなされており、世界的に注目を集めている遺伝子である。

## 2. 研究の目的

申請者は摘出膵癌組織および膵癌細胞株に

における DKK-1 の高発現を確認し、short hairpin RNA (shRNA) 発現レトロウイルスベクターを当研究室で樹立した膵癌細胞株 SUIT-2 とその高転移株である S2-CP8 に感染させ、安定的に DKK-1 を抑制する細胞株を樹立した。コントロール株と比較した解析結果では DKK-1 抑制株では遊走、浸潤能とも低下しており、従来の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによる悪性形質の発現抑制とは異なる機能を有していることを明らかにした。この従来の知見と異なる機能に関わる遺伝子を同定し、その機能を具体的に解析するのが本研究の目的であり、結果として膵癌の早期発見につながるマーカーを発見し、機能を明らかにしたいと考えている。

### 3. 研究の方法

目的達成のために以下の方法を考案した。

- (1) DKK 遺伝子抑制による Wnt 関連遺伝子発現の変化
- (2) DKK 遺伝子が関与する従来のシグナル伝達経路とは異なる経路の同定

上記 (1) (2) について、大腸癌などの発癌機構の一つとして考えられる Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルとは異なる新たなシグナル伝達経路を同定できれば膵臓癌の分子標的治療の可能性を開拓できると考えられる。Heiser らは 2008 年の *Gastroenterology* 誌において膵臓癌では  $\beta$ -catenin の蓄積は膵管癌の発生には関与しないとの報告をしており、申請者の DKK-1 抑制は Wnt/ $\beta$ -catenin 経路に影響を与えないという報告と一致していた。そのため、DKK-1 には Wnt シグナルを抑制するという役割の他に、別の経路を介して膵管癌の悪性形質を制御する可能性が考えられる。これに関連する遺伝子を同定し、シグナルをコントロールすることができ

ば予後不良な膵癌の治療に一つの可能性を見いだせるかもしれない。

- (3) Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN; 膵上皮内腫瘍性病変) と DKK ファミリー遺伝子発現との関連性

膵臓癌の前癌病変と考えられる PanIN における DKK 蛋白の発現を、そのステージごとに定性、定量することで、膵臓癌の発生機構への DKK 遺伝子の関与を解析できる。膵臓癌の発生には多種の遺伝子の異常が関わっており、その遺伝子変異の蓄積により PanIN のステージが上がっていき、最終的には癌を発生させることがこれまでの研究で判明している。正常膵管上皮から膵癌に至るまでの過程で DKK-1 の遺伝子変化が関与していることがわかれば、膵臓癌の早期発見につながるかもしれない。当院では年間約 400 例の ERCP と約 100 例の擦過細胞診を行っており、膵液の採取を容易に行える環境にある。膵液中の DKK 遺伝子を測定することができ、臨床診断との関連づけができれば早期発見への手がかりとなる可能性がある。

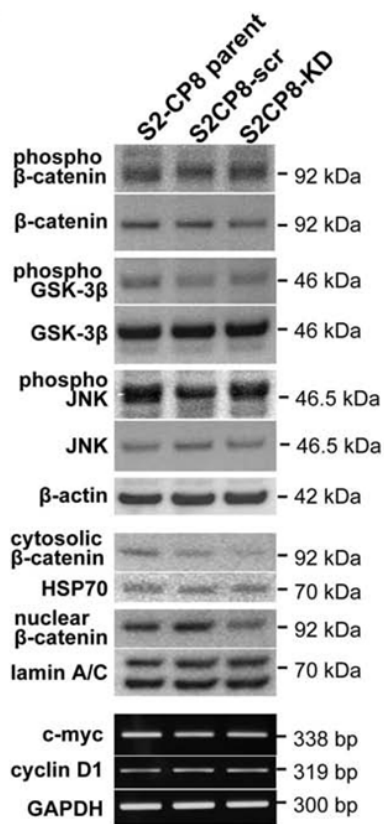
- (4) 発生学的に同じ起源を有する胆道系腫瘍での DKK ファミリー遺伝子及び Wnt 関連遺伝子の発現解析

胆道は膵臓と同様の系統で発生するため、その発癌経路にも関連性を同定できる可能性があり、治療に用いることができればこの難治性腫瘍にもブレイクスルーを起こす可能性があると考えられる。膵臓癌の化学療法の標準的治療は gemcitabine を用いたものが一般的であるが、胆道癌に関しては標準的な化学療法は現在のところない。当科では年間約 30 例の胆道系腫瘍の切除手術があり、こ

これらのサンプルから抽出した RNA を用いて Wnt 関連遺伝子の発現を解析し、臨床事項との関連性が動的できれば治療への足がかりになる可能性がある。

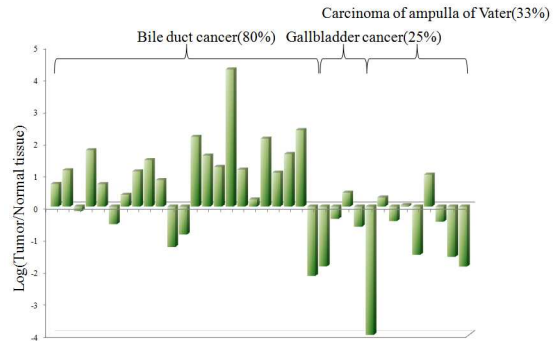
#### 4. 研究成果

Human DKK-1 ELISA Kit を用いて膵液内の DKK-1 と癌の発症との間に関連性がないかを調べたが、有意差が得られず、明らかな相関関係は認められなかった。



また、上図に示したように古典的 Wnt 経路に関係すると報告されているシグナルについて DKK-1 抑制株を用いて Western Blot による蛋白発現を比較したが、DKK-1 抑制によるシグナル変化は認められなかった。

	Tumor tissue and adjacent normal tissue	Serum
Bile duct cancer	23	18
Gallbladder cancer	4	7
Cancer of ampulla of Vater	10	3
Pancreas tumor	36(18)	33
Gastrointestinal stromal tumor	22	0
No malignant tumor		38(20)



次に胆道系の癌と DKK-1 発現との間に関連性がないかを調べるために、上図の通りサンプルを採取し、それぞれについて癌組織と近傍の正常組織の RNA を抽出し、逆転写反応を行って cDNA を作製した。これを用いて Real-Time RT-PCR を行い発現を比較した。胆道系腫瘍のカテゴリーには胆管癌、胆嚢癌、乳頭部癌があり、このうち胆管癌に関してはその 80%が腫瘍組織で有意に発現上昇が認められた。

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0件)

[学会発表] (計2件)

1. Takahashi, N., Aoyama, F., Sawaguchi, A.: Establishment of cell line derived from hepatoid adenocarcinoma of the ampulla of Vater. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. 2012, 8. Kyoto, Japan.

2. 澤口 朗、豊嶋典世、高橋伸育：加圧凍結技法が広げる次世代電顕解析の可能性  
日本顕微鏡学会第68回学術講演会、2012, 5.  
つくば

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 伸育 (TAKAHASHI NOBUYASU)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20404436

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：