

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11470

研究課題名(和文) 扁平上皮癌特異的癌関連遺伝子DKK3による腫瘍制御

研究課題名(英文) Tumor control targeting specific cancer-associated gene, DKK3 in squamous cell carcinoma

研究代表者

片瀬 直樹 (KATASE, Naoki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：30566071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)におけるDKK3の機能解析を行い、DKK3が腫瘍制御のターゲットになりうるかを検討した。HNSCC由来細胞株でDKK3を過剰発現させた系とDKK3を安定的にノックダウンした系を確立し、その影響を検討したところ、DKK3の過剰発現ではAktのリン酸化上昇を介して細胞の浸潤、遊走、浸潤がいずれも有意に増大した一方、ノックダウンではこれらは全て低下し、Aktのリン酸化も低下した。これらから、DKK3はHNSCC特異的にAktを介して腫瘍細胞の悪性度を規定する因子であることが明らかになり、治療のターゲットとして有望であることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国では年間で約1.8万例のHNSCCが発生するが、その5年生存率は76.2%であり、転移を伴う場合は40%程度にとどまる(国立癌研究センター2014年統計)。HNSCCの治療成績向上のために、腫瘍ごとに存在する特有の遺伝子発現プロファイルと分子基盤の理解に基づく分子標的創薬が求められている。申請者はそのターゲット候補としてDKK3を同定し研究を続けている。本研究ではDKK3の詳細な機能解析を行い、DKK3がHNSCCの治療および創薬のターゲットとなりうることを明らかにした。本研究成果は創薬の実現に向けての基礎データとなり、その意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the function of DKK3 gene in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). We previously reported that DKK3 may exert oncogenic function particularly in HNSCC, while DKK3 has been reported as tumor suppressor gene. We established DKK3 over-expression model by transfection of DKK3 expression plasmid and stable knockdown model by lentivirus-mediated transfer of shRNA for DKK3. Our data have shown that DKK3 over-expression resulted in significantly increased cellular proliferation, migration and invasion with increased phosphorylation of Akt (Ser 473). Correspondingly, DKK3 stable knockdown significantly decreased these, together with decreased phosphorylation of Akt (Ser473). We suggested that activation of Akt by DKK3 may be driven by two independent pathways; by the binding of secreted DKK3 to unknown receptor and by activation of mTOR pathway. These results strongly imply that DKK3 may be the encouraging candidate of targeted therapy of HNSCC.

研究分野：病理学・口腔病理学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 口腔癌 DKK3 遺伝子機能解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) はしばしば制御困難になることが知られており、転移を伴う場合の 5 年生存率は 40-50%とされている。癌は種々の癌関連遺伝子の変異の蓄積によって発生すると考えられているが、HNSCC に特異的な遺伝子変異については不明な点が多い。この背景から、研究代表者は網羅的な LOH 解析から、HNSCC に特異的に関与する遺伝子として DKK3 遺伝子を同定した。DKK3 の属する dickkopf WNT signaling pathway inhibitor ファミリーは分泌型タンパクをコードし、細胞の癌化に重要である oncogenic な Wnt signal を抑制因子として働く。また、DKK3 は REIC (reduced expression in immortalized cells) の別名でも知られ、種々の癌で発現が低下しており、DKK3 発現のない腫瘍細胞に強制発現させると apoptosis を惹起するという理由から、癌抑制遺伝子であると考えられている<sup>[1]</sup>。しかし研究代表者のこれまでの研究では、HNSCC では DKK3 は大多数の症例で発現し、発現群は予後不良であること、さらに HNSCC 細胞で DKK3 をノックダウンすると細胞浸潤・遊走が有意に減少することが明らかとなり<sup>[2,3]</sup>、「HNSCC では DKK3 は癌抑制遺伝子ではなく oncogenic に作用する」との仮説に至った。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では「DKK3 が HNSCC 特異的に oncogenic function を発揮するメカニズムを明らかにすること」および「DKK3 に対する各種の阻害剤が扁平上皮癌治療に使用できる可能性を追究すること」を目的に研究を行った。これらの目的を達成するために、HNSCC 細胞に DKK3 を過剰発現させる系と、DKK3 を安定的にノックダウンした系を構築し、細胞の増殖、浸潤、遊走への影響と、その詳細な機序を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) DKK3 過剰発現系での解析

研究には下記のとおりヒト由来 HNSCC、食道扁平上皮癌、胃腺癌、大腸腺癌、膵臓癌、前立腺癌、肺扁平上皮癌および肺腺癌細胞株を使用した。DKK3 の腫瘍細胞株での発現は Western blotting (abcam, EPR15611) および Real time PCR (STEPOne plus, Thermo Fisher Scientific) で検討した。

次いで full length の DKK3 の C 末端側に HA-tag を付加したタンパクを発現するプラスミド (pCS2+/DKK3-HA) を作製し、HNSCC 由来細胞株の HSC-3 (ヒト舌癌由来) に Turbofectin 8.0 (Origene) でトランスフェクションして DKK3 過剰発現系を確立した。トランスフェクションのコントロールには pCS2+/GFP を用いた。発現増加は western blotting と immunofluorescence および Real time PCR で確認した。また、apoptosis assay も行った (APOPercentage™ apoptosis assay)。

DKK3 過剰発現の影響は MTT assay (TACS MTT, TREVIGEN), migration assay (Ibidi, Cell culture insert), invasion assay (InnoCyte™ Cell Invasion Assay) で検討するとともに、ヌードマウス背部皮下に腫瘍細胞を移植し、28 日間腫瘍径の増大を観察した。

DKK3 過剰発現による影響のメカニズムの検討として、Wnt signal のターゲット遺伝子の cyclin D1, c-myc の発現変化を Real time PCR で、TCF activity の変化を Reporter assay で確認するとともに、関連シグナル分子について western blotting を行った。

### (2) DKK3 ノックダウン系での解析

材料としては上記の過剰発現系の結果を踏まえ、ヒト舌癌由来細胞の HSC-3 を用いた。DKK3 の安定的なノックダウンを構築するため、DKK3 に対する shRNA を lentivirus (DKK3 shRNA expressing vector, Origene) を用いて導入した。導入後の細胞は 10 µg/µl puromycin 存在下で培養して DKK3 の発現が消失したクローンを選別した。DKK3 タンパクと mRNA 発現の消失は western blotting と immunofluorescence および Real time PCR で確認した。DKK3 ノックダウンの影響は MTT assay, migration assay, invasion assay で検討するとともに、ヌードマウス背部皮下に腫瘍細胞を移植し、28 日間腫瘍径の増大を観察した。

DKK3 ノックダウンによる影響のメカニズムについては microarray (3D-Gene, 東レ) およびデータベースを利用した pathway 解析で検討し、関連するシグナルについて western blotting で検討した。また、これまでの研究成果の妥当性を評価するため、The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータベースを利用して生存解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) DKK3 過剰発現系の結果

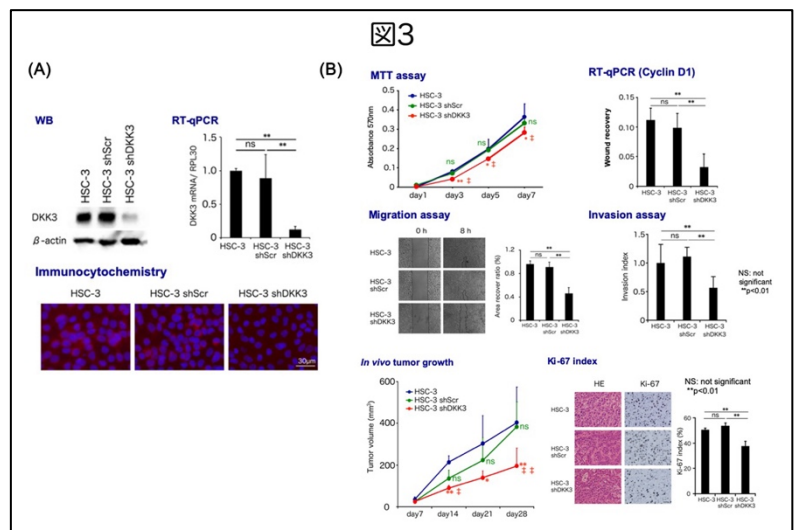
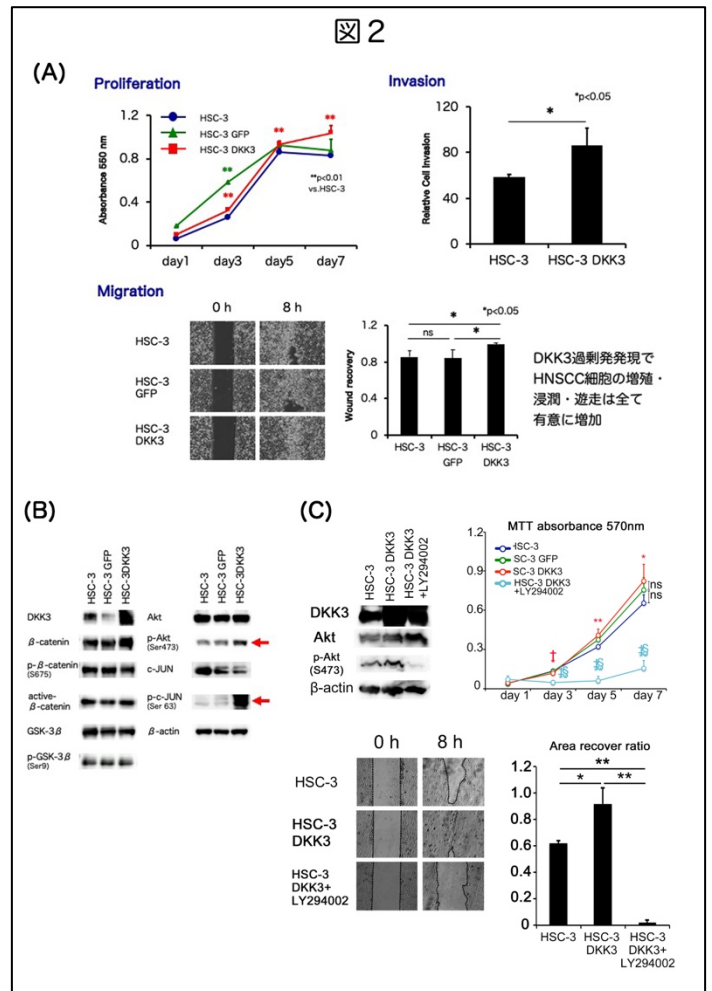
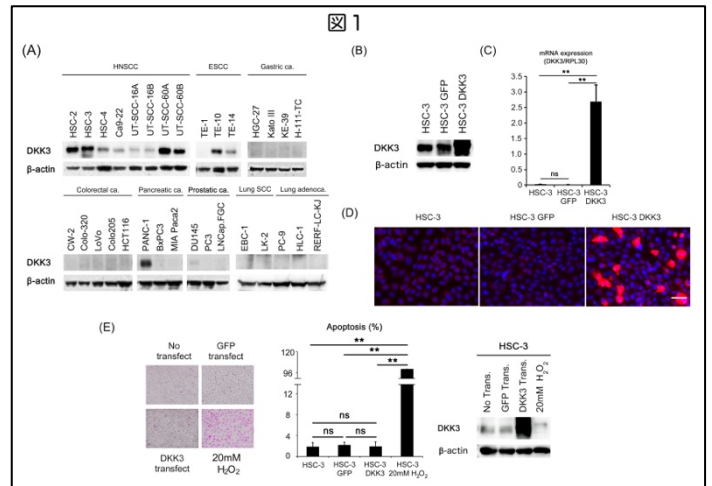
DKK3 発現は消化管腺癌や前立腺癌、肺癌では発現が認められなかったが、HNSCC と食道扁平上皮癌で

は特異的に発現が高いことが示された。ここから DKK3 が扁平上皮癌の発生と進展に関わる可能性が示唆された。pCS2<sup>+</sup>/DKK3-HA のトランスフェクションでは、DKK3 発現はタンパクレベルでも mRNA レベルでも有意に増加した。これまでの報告では DKK3 を adenovirus で腫瘍細胞株に過剰発現させるとアポトーシスを誘発するとされていたが<sup>14)</sup>、本研究では DKK3 の過剰発現によってアポトーシスの誘導は認められなかった (図 1)。これには発現方法と細胞株の相違によるものと考えられた。

細胞への影響に関しては、DKK3 の過剰発現は細胞の増殖性、遊走性、浸潤性の全てが有意に増大した。また、ヌードマウス皮下への移植でも、DKK3 過剰発現細胞はコントロールに比較して有意に腫瘍径が増大し、Ki-67 index も増加していた (図 2)。これらから、DKK3 が HNSCC では oncogenic function を示すという仮説が裏付けられた。メカニズムの検討では、DKK3 過剰発現に伴って Wnt signal のターゲットである cyclin D1, c-myc の発現が有意に上昇しており、DKK3 が Wnt signal を抑制するのではなく、逆に亢進させているのではないかと考えられた。しかし TCF レポーターアッセイの結果では DKK3 による Wnt signal の活性化は否定された。そこで、他のシグナル分子の発現およびリン酸化の状態を western blotting で検討したところ、これらの現象には Akt のリン酸化が関わっている可能性が示唆された (図 2)。確認のため、DKK3 過剰発現細胞に Akt の阻害剤である LY294002 を作用させると、DKK3 による増殖性、遊走性、浸潤性の増加は全て打ち消された (図 2)。結論として、DKK3 は HNSCC 細胞において Akt のリン酸化を介して腫瘍細胞の悪性度を増加させることが明らかになった。本成果は Oncology Research 誌に掲載され、第 31 回歯科基礎医学会学会奨励賞の受賞対象論文となった。

## (2) DKK3 ノックダウン系の結果

DKK3 に対する shRNA の導入によって、DKK3 発現をノックダウンした細胞 (HSC-3 shDKK3) を樹立することができた。DKK3 のノックダウンによる影響では、細胞の増殖性、遊走性、浸潤性の全てが有意に低下した。また、ヌードマウス皮下への移植でも DKK3 ノックダウン細胞はコントロールに比較して有意に腫瘍径が縮小し、Ki-67 index も低下しており、上記の DKK3 過剰発現系と全く逆の関係になっていた (図 3)。本研究を実施中に DKK3 でコードされるタンパクには分泌型と非分泌型の 2 つの isoform が存在することが報告されたため<sup>15)</sup>、メカニズムをより詳細に検討するために microarray 解析と pathway 解析を組み



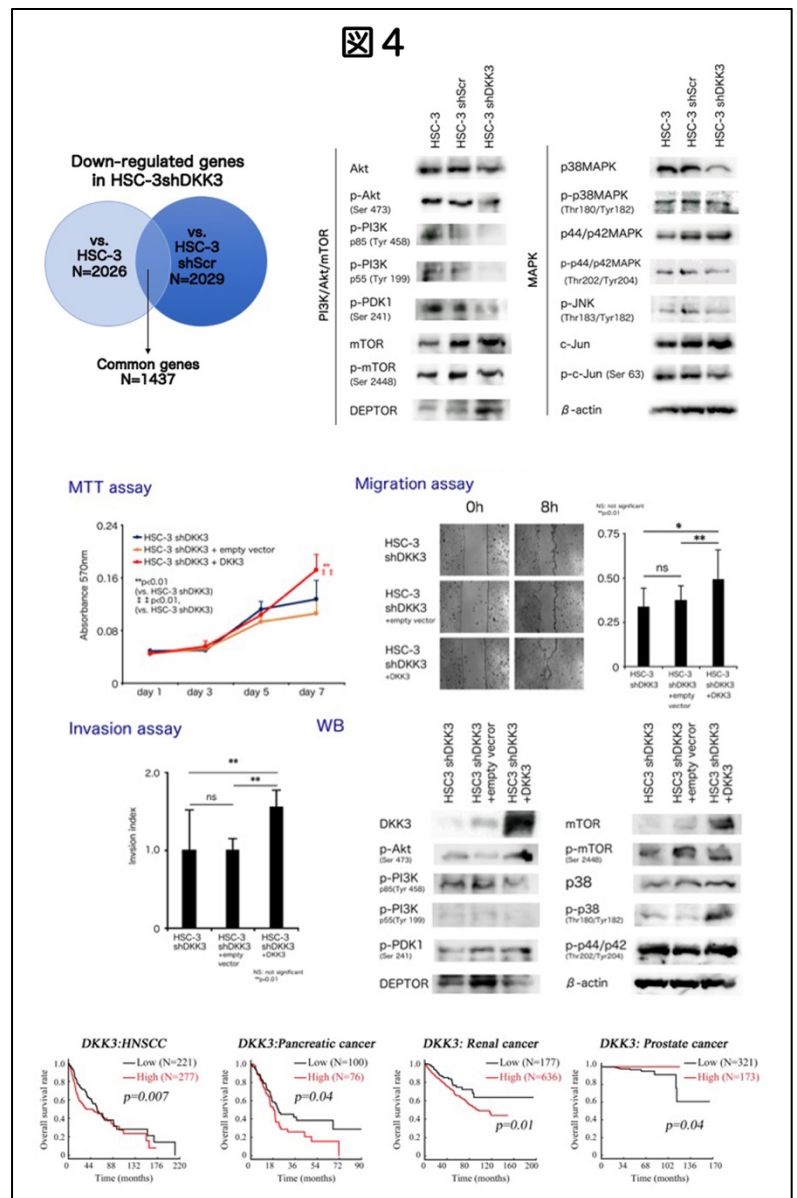
合わせて候補となる経路の絞り込みを行った。その結果、DKK3 のノックダウンでは 1437 種類の遺伝子発現が発現低下しており、PI3K/Akt/mTOR pathway および MAPK pathway の関与が示唆された。Western blotting ではこれに一致して、DKK3 ノックダウン細胞では Akt (Ser 473), PI3K p85 (Tyr 458), PI3K p55 (Tyr 199) および PDK1 (Ser 241) のリン酸化と、p38MAPK の発現が低下していた。ここから、DKK3 でコードされる分泌型タンパクが現時点では未知のレセプターに結合して Akt のリン酸化を亢進させる可能性が示された。また同時に、DKK3 ノックダウン細胞では mTOR (Ser 2448) のリン酸化が低下する一方で、DEPTOR の発現が増加していた。ここからは、DKK3 が細胞内で mTOR complex を抑制する DEPTOR を分解することで mTOR complex を活性化し、Akt のリン酸化に寄与している可能性が示唆された。本結果は DKK3 が HNSCC において Akt のリン酸化を介して悪性度を制御するという前回の結果を強く支持し、そのメカニズムの詳細を明らかにするものであった (図 4)。

確認のため、DKK3 ノックダウン細胞に pCS2<sup>+</sup>/DKK3-HA をトランスフェクションして再度 DKK3 発現を回復させてやると、DKK3 ノックダウンによる増殖性、遊走性、浸潤性の低下は全て解除され、Akt, PI3K, PDK1, mTOR のリン酸化は増加し、DEPTOR 発現は低下した (図 4)。

TCGA のデータベースを用いて生存解析を行ったところ、DKK3 の高発現は HNSCC, pancreatic cancer, Renal cancer で予後不良因子であった。一方で、これまでの報告と一致して、prostatic cancer では DKK3 の低発現が予後不良因子となっていた (図 4)。これらの結果からは、DKK3 が既知の癌抑制遺伝子としての機能以外に、特定の腫瘍では oncogenic function を発揮することが強く示唆された。本研究成果は International Journal of Oncology 誌に掲載された。

## 引用文献

1. Veeck J, Dahl E. Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1825(1):18-28.
2. Katase N, Lefevre M, Gunduz M, Gunduz E, Beder LB, Grenman R, Fujii M, Tamamura R, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. 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*. 2012;3(2):273-280.
3. Katase N, Lefevre M, Tsujigiwa H, Fujii M, Ito S, Tamamura R, Buery RR, Gunduz M, Nagatsuka H. Knockdown of Dkk-3 decreases cancer cell migration and invasion independently of the Wnt pathways in oral squamous cell carcinoma-derived cells. *Oncol Rep*. 2013;29(4):1349-1355.
4. Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kurose K, Ebara S, Miyazaki M, Namba M, Kumon H, Huh NH. Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase. *Cancer Res*. 2005;65(21):9617-22.
5. Leonard JL, Leonard DM, Wolfe SA, Liu J, Rivera J, Yang M, Leonard RT, Johnson JPS, Kumar P, Liebmann KL, Tutto AA, Mou Z, Simin KJ. The Dkk3 gene encodes a vital intracellular regulator of cell proliferation. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181724.



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 1件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Katase N, Nishimatsu S, Yamauchi A, Yamamura M, Fujita S.   | 4. 巻<br>54(3)           |
| 2. 論文標題<br>DKK3 knockdown confers negative effects on malignant potency of head and neck squamous cell carcinoma cells via PI3K/Akt signal and MAPK pathways. | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Int J Oncol.  | 6. 最初と最後の頁<br>1021-1032 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3892/ijo.2018.4667.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Katase N, Nishimatsu S, Yamauchi A, Yamamura M, Terada K, Itadani M, Okada N, Hassan NMM, Nagatsuka H, Ikeda T, Nohno T, Fujita S.                  | 4. 巻<br>26(1)           |
| 2. 論文標題<br>DKK3 overexpression increases malignant property of head and neck squamous cell carcinoma cells.   | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Oncol Res.  | 6. 最初と最後の頁<br>45-58     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3727/096504017X14926874596386.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Yamauchi A, Yamamura M, Katase N, Itadani M, Okada N, Kobiki K, Nakamura M, Yamaguchi Y, Kuribayashi F.   | 4. 巻<br>17(1)           |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of pancreatic cancer cell migration with multiple parameters in vitro by using an optical real-time cell mobility assay device.         | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>BMC Cancer  | 6. 最初と最後の頁<br>234       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s12885-017-3218-4.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Katase N, Nagano K, Fujita S.   | 4. 巻<br>62(1)           |
| 2. 論文標題<br>DKK3 expression and function in head and neck squamous cell carcinoma and other cancers.   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>J Oral Biosci.  | 6. 最初と最後の頁<br>9-15      |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.job.2020.01.008.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>片瀬 直樹, 藤田 修一                             |
| 2. 発表標題<br>頭頸部扁平上皮癌由来細胞でのDKK3 ノックダウンは腫瘍細胞の悪性度を低下させる |
| 3. 学会等名<br>第29回 日本臨床口腔病理学会                          |
| 4. 発表年<br>2018年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>片瀬 直樹, 藤田 修一                             |
| 2. 発表標題<br>頭頸部扁平上皮癌由来細胞でのDKK3 ノックダウンは腫瘍細胞の悪性度を低下させる |
| 3. 学会等名<br>第60回 歯科基礎医学会学術大会                         |
| 4. 発表年<br>2018年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>片瀬 直樹, 西松 伸一郎, 山内 明, 山村 真弘, 藤田 修一, 池田 通 |
| 2. 発表標題<br>口腔癌細胞株でのDKK3遺伝子ノックダウンは細胞の悪性度を低下させる      |
| 3. 学会等名<br>第106回 日本病理学会総会                          |
| 4. 発表年<br>2017年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>片瀬 直樹, 藤田 修一                          |
| 2. 発表標題<br>頭頸部扁平上皮癌細胞におけるDKK3過剰発現は腫瘍細胞の悪性度を増大させる |
| 3. 学会等名<br>第59回 歯科基礎医学会                          |
| 4. 発表年<br>2017年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>片瀬 直樹                              |
| 2. 発表標題<br>頭頸部扁平上皮癌由来細胞におけるDKK3強制発現/ノックダウンの影響 |
| 3. 学会等名<br>第7回 川崎医科大学学術集会                     |
| 4. 発表年<br>2016年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>片瀬 直樹   |
| 2. 発表標題<br>頭頸部扁平上皮癌由来細胞でのDKK3遺伝子強制発現の影響 Effects of DKK3 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma-derived cells. |
| 3. 学会等名<br>第27回 日本臨床口腔病理学会 総会・学術大会   |
| 4. 発表年<br>2016年  |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>片瀬 直樹, 永野 健一, 藤田 修一      |
| 2. 発表標題<br>DKK3は頭頸部扁平上皮癌細胞の悪性を増加させる |
| 3. 学会等名<br>第108回 日本病理学会 総会          |
| 4. 発表年<br>2019年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>片瀬 直樹  |
| 2. 発表標題<br>DKK3 overexpression increases malignant property of head and neck squamous cell carcinoma cells. |
| 3. 学会等名<br>第61回 歯科基礎医学会 学術大会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

## 〔図書〕 計2件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>片瀬 直樹                                      | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>株式会社ニューサイエンス社                              | 5. 総ページ数<br>4   |
| 3. 書名<br>Medical Science Digest Vol 45 No.2 2019年2月号 |                 |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Katase N, Gunduz M, Fujita S          | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>NOVA Science Publishers               | 5. 総ページ数<br>50  |
| 3. 書名<br>Horizons in Cancer Research. Volume 71 |                 |

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

-

## 6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                                | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 西松 伸一郎<br><br>(NISHIMATSU Shin-ichiro)<br><br>(20222185) | 川崎医科大学・医学部・准教授<br><br><br><br>(35303) |    |
| 研究分担者 | 山村 真弘<br><br>(YAMAMURA Masahiro)<br><br>(70299204)       | 川崎医科大学・医学部・講師<br><br><br><br>(35303)  |    |
| 研究分担者 | 山内 明<br><br>(YAMAUCHI Akira)<br><br>(80372431)           | 川崎医科大学・医学部・教授<br><br><br><br>(35303)  |    |