

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19932

研究課題名(和文) 膵癌術後再発予防のための新規治療の開発 癌幹細胞マーカーDclk1に注目して

研究課題名(英文) Development new therapy for resected pancreatic cancer focused on Dclk1

研究代表者

竹本 圭宏 (TAKEMOTO, Yoshihiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50622213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は予後不良な疾患であり、予後改善のために新規治療法の開発が急務である。本研究では、膵癌におけるDclk1に注目し、Dclk1をターゲットとした膵癌術後における新規治療法の開発を進める。

Dclk1阻害薬であるLRRK2-IN-1(LRRK)によって、p-Chk1の発現がLRRKによって有意に減少した。GEMとLRRKの併用はGEM単剤に比べて有意に細胞生存率を減少させた。当科で手術を行った膵癌症例でのDclk1の発現を免疫染色で評価した。OSではDclk1高値群で有意に予後不良だった。膵癌においてDclk1はMAPキナーゼ経路を介した増殖に関与し、予後不良因子となり得ると思われた。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that doublecortin-like kinase 1 (Dclk1) positively regulates tumor growth, invasion, metastasis, and anti-apoptosis in pancreatic cancer cells. Therefore, Dclk1 is a potential therapeutic target for pancreatic cancer. Consistent with this finding, the GEM-induced p-Chk1 expression was significantly decreased by treatment with LRRK. Combined treatment with GEM and LRRK significantly reduced cell survival compared to individual treatment with GEM. These results indicate that Dclk1 inhibition in combination with GEM treatment offers a novel approach to treat pancreatic cancer cells. To investigate the expression of Dclk1 in resected specimens of pancreatic cancer and its prognostic significance. Patients in the high Dclk1 group exhibited significantly shorter survival times than those in the low Dclk1 group ($P < 0.05$). Dclk1 may be a marker for poor prognosis in patients with resected pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Dclk1 Chk1 膵癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌は予後不良な疾患であり、根治が可能な唯一の手段は外科手術だが、術後に再発する症例も多く、予後改善のために新規治療法の開発が急務である。また治療が困難な原因として、化学療法や放射線治療に抵抗性を有する癌幹細胞の存在が挙げられており、膵癌に限らず癌幹細胞に対する治療が研究されている。

Dclk1 は大腸癌において癌幹細胞マーカーとして同定され (Nakanishi Y, et al. Nat Genet 2013)、小腸や大腸において Dclk1 陽性細胞は長期生存し、炎症により増殖が促されることが明らかになった (Westphalen CB, Takemoto Y, et al. J Clin Invest 2014)。膵癌においても様々な報告がなされており、膵癌前駆病変として知られる膵上皮内腫瘍病変 (pancreatic intraepithelial neoplasia, 以下 PanIN) において高発現し、同時に幹細胞能を有していることが明らかになった (Bailey, et al. Gastroenterology 2014)。しかし、浸潤性膵癌において、Dclk1 陽性細胞が癌幹細胞か否かは結論が出ていない。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌における Dclk1 に注目し、Dclk1 が膵癌細胞を増殖させる機序の解明および Dclk1 をターゲットとした膵癌術後における新規治療法の開発を進める。Dclk1 は膵癌において癌幹細胞マーカーである可能性が示唆され、外科手術後の Dclk1 陽性膵癌細胞の増殖や幹細胞能に関する報告はこれまでになされておらず、本研究によって膵癌における Dclk1 の役割が明らかになれば、術後再発の予防および予後の改善につながると考えられる。

3. 研究の方法

(1)膵癌の癌幹細胞の特徴の一つとして、化学療法に対して抵抗性を有することが知られている。膵癌に対する化学療法では gemcitabine (GEM) がしばしば用いられる。核酸アナログ製剤である GEM により細胞周期は S 期で停止し、checkpoint kinase 1 (Chk1) のリン酸化が引き起こされる。ヒト膵癌細胞株である MiaPaca2 と PANC-1 を培養し、siRNA や Dclk1 のキナーゼ阻害薬である LRRK2-IN-1 (LRRK) を用いて、膵癌細胞における Chk1 のリン酸化、DNA 損傷、アポトーシス、細胞生存に対する GEM、LRRK 単剤、GEM と LRRK の併用による効果を比較・検討し、GEM と LRRK の併用の有用性を検証した。

(2)Dclk1 によってリン酸化される基質候補蛋白質を同定するため、Dclk1 を LRRK によって阻害した膵癌細胞株 MiaPaca2 を用いた癌

関連リン酸化蛋白質マイクロアレイ解析を行う。その結果を参考にし、当科の膵癌手術標本に免疫染色を行い、組織学的に Dclk1 および Dclk1 に影響を受ける因子の発現を評価し、Dclk1 高発現症例と予後の評価を行う。

4. 研究成果

研究

Dclk1 によってリン酸化される基質候補蛋白質を同定するため、Dclk1 を Dclk1 阻害薬である LRRK2-IN-1 (LRRK) によって阻害した膵癌細胞株 MiaPaca2 を用いた癌関連リン酸化蛋白質マイクロアレイ解析を行ったところ、ATR 経路に属するリン酸化 cdc25A およびリン酸化 Chk1 の発現レベルの減少が認められた (図 1)。この結果から、Dclk1 は ATR 経路に関与していることが示唆された。この結果に一致して、GEM 誘導性の p-Chk1 の発現が LRRK によって有意に減少した (図 2)。GEM 単剤では細胞周期が S 期で停止したが、GEM と LRRK の併用では細胞周期は S 期で停止せず進行した (図 3)。加えて、GEM と LRRK の併用は GEM または LRRK 単剤に比べて -H2AX 陽性細胞数を増加させた (図 3)。さらに、LRRK 単剤、GEM と LRRK の併用は GEM 単剤に比べて、caspase-3 の活性化と PARP1 の切断を誘導し、GEM と LRRK の併用は GEM 単剤に比べて有意に細胞生存率を減少させた (図 4)。これらの結果は、Dclk1 阻害と GEM との併用は膵癌細胞の新規治療法となり得ることを示している。

Antibody name	Intensity		Ratio (%) (LRRK/ Control)
	Control (DMSO)	LRRK (50 μM)	
Akt (Phospho-Ser473)	15278.5	500.5	3.28
cdc25A (Phospho-Ser75)	26021.0	1914.0	7.36
STAT1 (Phospho-Ser727)	27948.0	2471.0	8.84
JAK2 (Phospho-Tyr221)	16696.0	1557.0	9.33
FAK (Phospho-Tyr925)	18429.0	3475.0	18.86
c-Jun (Phospho-Ser243)	18280.5	4807.0	26.30
cdc25C (Phospho-Ser216)	19121.5	5211.0	27.25
BAD (Phospho-Ser112)	23047.5	7167.0	31.10
NFκB-p105/p50 (Phospho-Ser893)	12876.5	4189.0	32.53
eEF2K (Phospho-Ser366)	17454.5	5932.0	33.99
JAK2 (Phospho-Tyr1007)	12732.0	5130.0	40.29
CDK2 (Phospho-Thr160)	17259.0	6985.0	40.47
BCL-2 (Phospho-Ser70)	16820.0	6861.0	40.79
Raf1 (Phospho-Ser259)	15261.5	6241.5	40.90
TYK2 (Phospho-Tyr1054)	16798.0	7063.0	42.05
BCL-2 (Phospho-Thr56)	14397.5	6312.5	43.84
c-Jun (Phospho-Thr239)	11045.5	5136.0	46.50
NFκB-p105/p50 (Phospho-Ser907)	23004.5	11145.5	48.45
Chk1 (Phospho-Ser280)	17482.0	8578.5	49.07

図 1 Dclk1 阻害 MiaPaca2 細胞において 50% 以上発現レベルが低下した癌関連リン酸化蛋白質

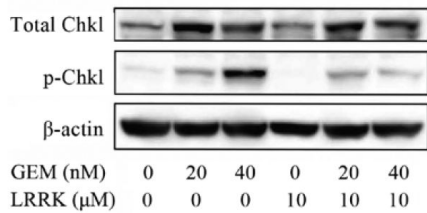


図2 DMSO、GEM単剤、LRRK単剤、GEMとLRRKの併用で48時間処理したMiaPaCa2細胞から作製したcell lysateを用いてウェスタンブロットングを行い、total Chk1、p-Chk1、-actinの発現を検出した。

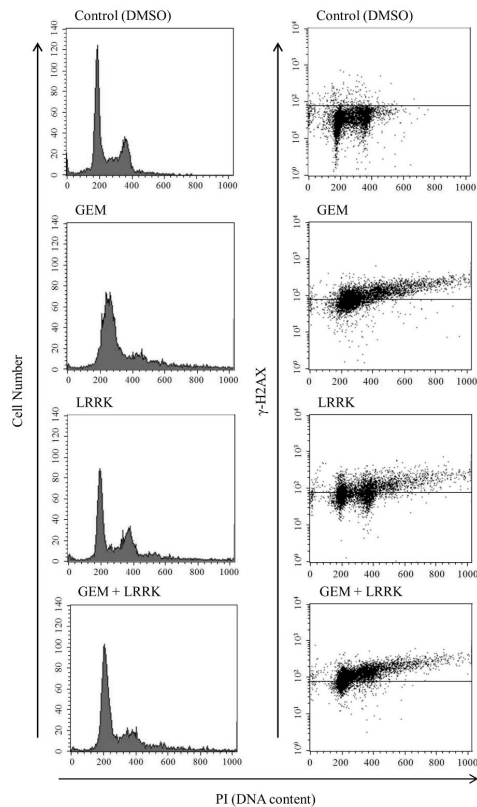


図3 GEM、LRRK単剤、またはGEMとLRRKの併用処理による細胞周期とDNA損傷への影響

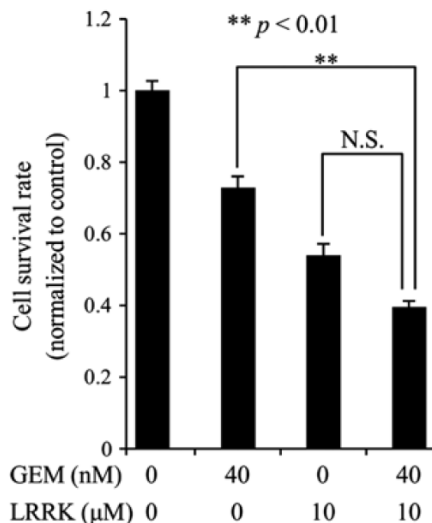


図4 GEM、LRRK単剤、またはGEMとLRRKの併用処理による細胞生存率への影響

研究

研究と同様にDcl1k1によってリン酸化される基質候補蛋白質を同定するため、Dcl1k1をDcl1k1阻害薬であるLRRK2-IN-1(LRRK)によって阻害した膵癌細胞株MiaPaca2を用いた癌関連リン酸化蛋白質マイクロアレイ解析を行ったところ、ATR経路に属するリン酸化cdc25Aおよびリン酸化Chk1の発現レベルの減少が認められ、WBでもDcl1k1抑制に伴い、pMEKの低下を確認した。

2005年4月から2017年12月にかけて当科で手術を行った膵癌症例のサンプルを使用して、Dcl1k1・Ki67・pMEKの発現を免疫染色で評価した。Histscoreを用いて定量化した。Dcl1k1発現の中央値をcut-off値とし、Dcl1k1高値群・Dcl1k1低値群に分けた。PFSは両群間に有意差はなかったが、OSではDcl1k1高値群で有意に予後不良だった(図5)。pMEKおよびKi67の発現もDcl1k1高値群で高値だった。結果をまとめると、膵癌においてDcl1k1はMAPキナーゼ経路を介した増殖に関与し、予後不良因子となる可能性があると思われる。

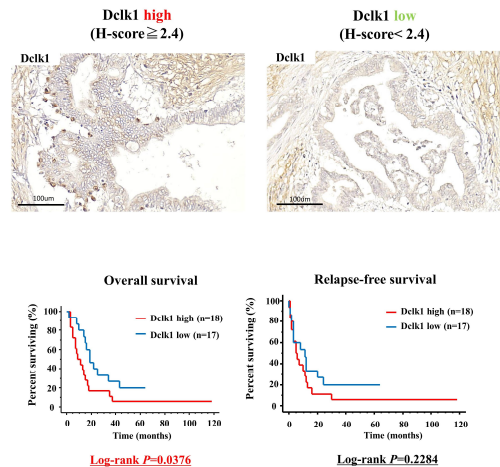


図5 当科手術症例におけるDcl1k1高値群と低値群の予後評価

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1件)

Kawamura D, Takemoto Y, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Shirasawa B, Tanaka T, Kugimiya N, Harada E, Hamano K. Enhancement of cytotoxic effects of gemcitabine by Dcl1k1 inhibition through suppression of Chk1 phosphorylation in human pancreatic cancer cells. Oncol Rep. 2017 Nov;38(5):3238-3244.

DOI : 10.3892/or.2017.5974 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

Takemoto Y, Hironaka Y, Nishimoto A, Suehiro Y, Kugimiya N, Suga A, Harada E, Hamano K.

Dclk1 can be a predictor for poor survival in patients with resected pancreatic cancer.

AACR Annual meeting 2018, Chicago

Kawamura D, Takemoto Y, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Shirasawa B, Tanaka T, Kugimiya N, Harada E, Hamano K.

Synergistic effect of gemcitabine and a Dclk1 inhibitor on pancreatic cancer cell survival.

AACR Annual meeting 2017, Washington DC

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 圭宏 (TAKEMOTO, Yoshihiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 5 0 6 2 2 2 1 3