

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09908

研究課題名(和文) DKK3機能ドメイン抑制ペプチドによる頭頸部癌制御

研究課題名(英文) Control of Head and neck cancer by inhibitory peptides for DKK3 functional domain.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに、DKK3タンパクが頭頸部扁平上皮癌の増殖や浸潤を促進することを明らかにしてきた。本研究ではDKK3の機能を阻害するペプチドの開発を行なった。DKK3タンパクの構造解析から、機能の発揮に必要な領域(ドメイン)が2つのcysteine rich domain (CRD)にあることを確認し、CRD内の特定のアミノ酸配列に対する相補性ペプチドを合成した。ペプチドは低用量でAktのリン酸化を抑制し、細胞増殖・遊走・浸潤を有意に抑制することが示された。また、DKK3の受容体として同定されたCKAP4の発現について検討し、DKK3/CKAP4が腫瘍制御の標的となりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果からは、DKK3の機能ドメインが2つのcysteine rich domain(CRD)にあることが明らかになり、さらにCRD内の特定のアミノ酸配列を標的とした相補性ペプチドが実際にDKK3タンパクの機能を阻害でき、既存の抗がん剤よりも低用量で腫瘍の増殖等を抑制できることが示された。この成果はDKK3が頭頸部扁平上皮癌の治療標的となることを示すだけでなく、DKK3タンパクの本質的機能の一端を明らかにした点で学術的意義が大きく、さらに実現可能性の高いペプチドベースの中分子創薬を開拓した点で社会的意義が非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that DKK3 functions as tumor-promoting factor in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) through activation of Akt. To establish a new therapeutic agent targeting DKK3 protein for HNSCC, we developed complementary peptides for the functional domain of DKK3 protein. Firstly, we focused on two cysteine rich domains (CRDs), and showed that both of CRD1 and CRD2 are necessary for exertion of the oncogenic function of DKK3. Secondly, we designed complementary peptides against the certain amino acid sequences within the CRDs. The peptides successfully suppressed Akt activation by DKK3 and consequent cellular proliferation, migration and invasion in HNSCC-derived cells. We also investigated the expression and function of CKAP4, which was newly reported as a receptor for DKK3 in HNSCC. The data showed that DKK3 and CKAP4 expression was associated with poorer prognosis of HNSCC, and antibodies against DKK3 or CKAP4 showed anticancer effects in HNSCC cells.

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

## 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)は頭頸部領域で最も発生頻度が高い悪性腫瘍である。HNSCC の治療は手術が中心となるが、手術によって顎骨や歯、舌が失われることで患者の生命の質 (QOL) が低下することから、低侵襲性治療の開発が求められている。研究代表者は分子標的治療の開発を念頭に、HNSCC 特異的な発現を示し腫瘍の悪性度を規定するがん関連遺伝子の候補として DKK3 遺伝子を同定した。

研究代表者はこれまでの研究で、HNSCC では DKK3 が大部分の症例で陽性であり、陽性性例は有意に無疾患生存率が短く予後不良であること、HNSCC 細胞で DKK3 を過剰発現/ノックダウンすると Akt の活性化状態が変化し細胞の増殖・浸潤・遊走が有意に増加/減少することを明らかにし、DKK3 が HNSCC では癌遺伝子として腫瘍細胞の悪性度を規定することを示してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では DKK3 を標的とした新規 HNSCC 治療法の開発を志向した。DKK3 は分泌型/非分泌型タンパクをコードしており、分泌型は細胞表面の受容体を介して、非分泌型は細胞内のエフェクタータンパクと結合することでそれぞれ独立して Akt を活性化すると考えられることから、DKK3 とエフェクタータンパクの結合を阻害するペプチドを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) DKK3 機能ドメインの同定

DKK3 が Akt をリン酸化させる過程においてはタンパク質相互作用が起こっているが、まずはその相互作用に必須となる機能ドメインを同定した。DKK3 タンパクのアミノ酸配列と各種データベースの情報から機能ドメインの候補として2つの cysteine rich domain (CRD)に着目した。CRD1、CRD2 のいずれか、またはそれらの両方を欠損した deletion mutant タンパクを発現する plasmid を作製し、HNSCC 由来細胞株に導入して Akt のリン酸化、細胞増殖・遊走・浸潤への影響を検討した。

### (2) DKK3 機能ドメインを抑制する相補性ペプチドの作製

(1)の結果を踏まえ、CRD 内の特定の amino acid 配列を標的とした相補性ペプチドをデザインした。amino acid 配列をもとに、DKK3 タンパクと相補性ペプチドのモデルを作成してドッキングシミュレーションを行い、最も結合しやすいと考えられるペプチドを選定した。ついで、実際に合成したペプチドを HNSCC 由来細胞株に作用させ、細胞増殖・遊走・浸潤への影響を検討したほか、ヌードマウス背部皮下に HNSCC 由来細胞を移植し、ペプチドを注入して腫瘍治療が可能かを検討した。

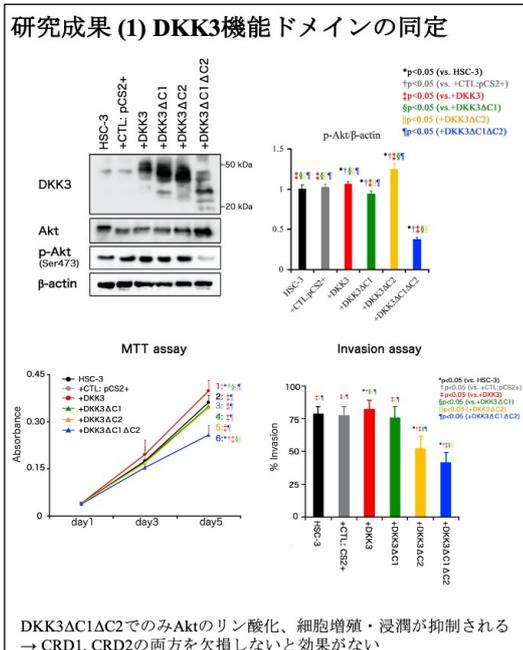
### (3) DKK3 の受容体 CKAP4 の発現と、抗体による治療可能性の検討

研究期間中に、これまで不明であった DKK3 の受容体として CKAP4 が報告されたため、HNSCC 組織における CKAP4 発現とその臨床的意義を検討した。さらに、HNSCC 由来細胞株を用いて、DKK3 または CKAP4 に対する抗体が腫瘍抑制効果を示すかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) DKK3 機能ドメインの同定

DKK3 の2つの CRD のうち、CRD1 を欠損したタンパク、CRD2 を欠損したタンパク、CRD1 と CRD2 の両方を欠損したタンパクを発現する plasmid をそれぞれ DKK3ΔC1、DKK3ΔC2、DKK3ΔC1ΔC2 として作製し、HNSCC 由来細胞の HSC-3 にトランスフェクションした。それぞれの deletion mutant タンパク質の、Akt リン酸化、細胞増殖・遊走・浸潤への影響を評価したところ、CRD1 と CRD2 のいずれか一方の欠損では Akt のリン酸化は保たれ、細胞増殖や遊走、浸潤も抑制されないことが示され、DKK3 による作用を抑制するためには CRD1 と CRD2 の両方を抑制することが必要であることが明らかになった。



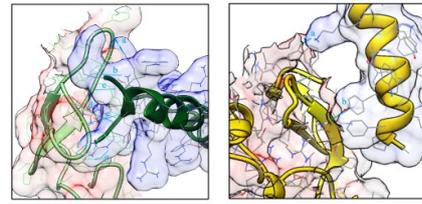
## (2) DKK3 機能ドメインを抑制する相補性ペプチドの作製と評価

DKK3 の CRD1, CRD2 が機能ドメインとして重要であることが示されたことから、これらの領域に対する相補性ペプチドを設計した。DKK ファミリータンパク質 (DKK1, DKK2, DKK3, DKK4) のアミノ酸配列を比較し、DKK3 の CRD に特有のアミノ酸配列を特定し、その配列に対する相補性ペプチドを蛋白科学研究所 (名古屋大学) に受託し、MIMETEC プログラムを用いてそれぞれ 10 種類ずつ設計した。CRD1, CRD2 の両方を抑制するためには、10×10 通りの組み合わせについて検討する必要があるが、現実的には実施が困難であるため、DKK3 のタンパクモデルとペプチドのモデルを作成し、コンピュータ上でタンパク同士の結合をシミュレーション (ドッキングシミュレーション) して最適なペプチドの組み合わせを決定した。CRD1, CRD2 に対するペプチドを混合して作用させると、50nM 程度の低用量で Akt リン酸化の抑制効果が出現した。HNSCC 由来細胞に最終濃度 100nM で反応させると、腫瘍細胞の増殖・遊走・浸潤は全て有意に抑制された。

また、ヌードマウス背部皮下に HNSCC 由来細胞株を移植して腫瘍を形成させ、腫瘍 100mm<sup>3</sup> あたり 100nM となるようにペプチドを腫瘍に直接注入したところ、腫瘍の増大が有意に抑制されることが示された。

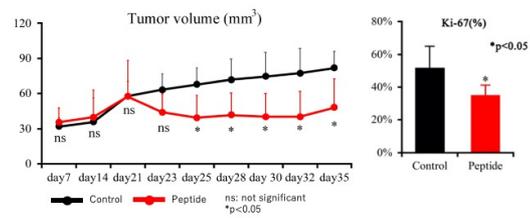
(1), (2) の成果は論文として *Cancer Cell Int* 誌に掲載された。

### 研究成果 (2) DKK3機能ドメインを抑制する相補性ペプチドの作製と評価



Hydrogen bonds  
 a: S163-R28 (1.849Å, 1.800Å)    c: I149-R29 (2.85Å)  
 b: F161-R25 (1.823Å)    e: E151-R30 (1.894Å, 1.874Å)  
 d: C160-R25 (1.999Å)    f: D150-R30 (2.218Å)  
 g: D209-K13 (1.773Å)  
 h: C231-Y6 (1.943Å)

#### Xenograft model



DKK3のCRD1, CRD2内の特異的なアミノ酸配列を特定し、これを標的とする相補性ペプチドを合成、最も結合性の高いものを選別した。ペプチドは腫瘍の増殖・浸潤・遊走と生体内での腫瘍の増大を有意に抑制した。

## (3) HNSCC における DKK3 受容体 CKAP4 の発現とその意義

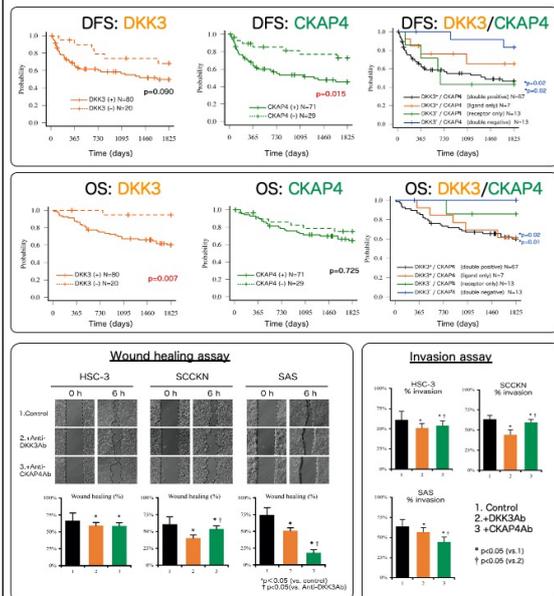
HNSCC と同じく DKK3 を高発現する腫瘍である食道扁平上皮癌において、CKAP4 が DKK3 の受容体として機能することが報告された (Kajiwara C et al, *Cancer Res.* 2018) ことから、HNSCC における DKK3/CKAP4 タンパクの発現と意義を検討した。HNSCC 症例 100 例で DKK3 および CKAP4 に対する免疫組織化学を行いタンパク発現と臨床データ・予後との相関を検討した。また、3 種の HNSCC 由来細胞株に DKK3 または CKAP4 に対する抗体を作用させてその影響を確認した。

結果では HNSCC 症例の 80% が DKK3 陽性、71% が CKAP4 陽性で DKK3 発現群と CKAP4 発現群はともに T-stage, TNM-stage が高かった。DKK3 発現群は無疾患生存率 (DFS) が有意に短く、CKAP4 陽性群は期間生存率 (OS) が有意に短かった。DKK3/CKAP4 double positive 群は DFS, OS ともに有意に短かった。さらに、いずれの細胞株においても DKK3/CKAP4 抗体は細胞の増殖・遊走・浸潤と Akt 活性化を有意に抑制した。

以上から DKK3/CKAP4 は HNSCC の治療標的となることが示された。

本結果は論文として *Oral Dis* 誌に掲載された。

### 研究成果 (3) HNSCCにおけるDKK3受容体CKAP4発現とその意義



HNSCCではDKK3またはCKAP4の発現があると予後不良となることが示された。HNSCC由来細胞にDKK3またはCKAP4に対する抗体を作用させると、細胞増殖・浸潤などは有意に抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katase N, Kudo K, Ogawa K, Sakamoto Y, Nishimatsu SI, Yamauchi A, Fujita S.	4. 巻 29
2. 論文標題 DKK3/CKAP4 axis is associated with advanced stage and poorer prognosis in oral cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Dis.	6. 最初と最後の頁 3193-3204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.14277.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Katase N, Nishimatsu SI, Yamauchi A, Okano S, Fujita S.	4. 巻 22(1)352
2. 論文標題 Establishment of anti-DKK3 peptide for the cancer control in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Cell Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12935-022-02783-9.	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片瀬 直樹, 藤田 修一
2. 発表標題 口腔癌におけるCKAP4発現および機能解析
3. 学会等名 第111回 日本病理学会 総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片瀬 直樹, 藤田 修一
2. 発表標題 DKK3/CKAP4 axisは口腔扁平上皮癌の予後不良因子である
3. 学会等名 第32回日本口腔内科学会 第33回日本臨床口腔病理学会 第35回日本口腔診断学会 合同学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片瀬 直樹, 藤田 修一
2. 発表標題 DKK3機能ドメイン抑制ペプチドによる頭頸部扁平上皮癌制御
3. 学会等名 第38回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片瀬 直樹
2. 発表標題 DKK3機能ドメイン抑制ペプチドによる頭頸部扁平上皮癌制御
3. 学会等名 第41回日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 工藤 広大, 片瀬 直樹, 藤田 修一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるCKAP4発現および機能解析
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会 学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片瀬 直樹, 藤田 修一
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌特異的癌関連遺伝子DKK3の機能ドメイン同定
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会 学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katase N, Nishimatsu S, Yamamura M, Yamauchi A
2. 発表標題 DKK3 regulates malignant property of head and neck squamous cell carcinoma via phosphorylation of Akt.
3. 学会等名 第79回 日本癌学会 学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片瀬 直樹、藤田 修一
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌の悪性度を規定するDKK3遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第65回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 片瀬 直樹, 西松 伸一郎, 山内 明, 岡野 慎士, 藤田 修一	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社ニューサイエンス社	5. 総ページ数 3
3. 書名 Medical Science Digest Vol 49 No.4 2023年4月号	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 (特願2022-004012を基礎とする優先権主張出願)がん治療用医薬組成物およびがん治療薬をスクリーニングする方法	発明者 片瀬直樹	権利者 国立大学法人 長崎大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-133659	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 がん治療用医薬組成物およびがん治療薬をスクリーニングする方法	発明者 片瀬 直樹	権利者 国立大学法人 長崎大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-004012	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖、浸潤を抑制するペプチドを開発  
<https://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/guidance/kouhou/press/file/2022/20221129-2.pdf>  
 医歯薬学総合研究科 口腔病理学分野 片瀬 直樹 助教が大会長賞を受賞  
<https://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/news/news3757.html>

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
研究分担者	藤田 修一  (FUJITA Shuichi)  (00181355)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授   (17301)	
研究分担者	西松 伸一郎  (NISHIMATSU Shin-ichiro)  (20222185)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
研究分担者	山内 明  (YAMAUCHI Akira)  (80372431)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	

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