

## 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 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790785

研究課題名（和文） 大腸癌患者の血清 Dkk4 測定による Wnt シグナル亢進の評価とその意義

研究課題名（英文） Evaluation of the Wnt signal activity by the serum concentrations of Dkk4 (Dickkopf 4) in patient with colorectal cancer.

## 研究代表者

山口 達也 (YAMAGUCHI TATSUYA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：30397301

## 研究成果の概要（和文）：

我々は、大腸癌で高発現している遺伝子の1つとして Dkk4 を見い出し、これに着目して研究を開始した。今回は、Dkk4 の発現とその臨床的意義を調べるため、外科手術を行った進行大腸癌の臨床検体を用い Dkk4 の mRNA 発現量と術後の再発について検討した。その結果 Dkk4 が高発現している症例は術後の再発率が高い傾向を認めた。Dkk4 は癌の悪性度診断や治療抵抗性を予測するマーカーとしての有用性が期待されており、癌における Dkk 高発現のメカニズムと臨床的意義について更なる検討が必要であると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we focused our research on the role of Dkk4 gene which had been found as one of the genes being highly expressed in colon cancer in our previous study. In order to investigate the clinical significance of Dkk4 expression, we examined the association between the recurrence after surgery for advanced colorectal cancer and DKK4 mRNA expression level in colorectal cancer using clinical samples. Through the analysis, we found that the colorectal cancers with high Dkk4 mRNA expression tended to show higher recurrence rate after surgery.

Since clinical significance of Dkk4 as a biomarker to predict malignant potential and treatment-resistance in colorectal cancer was indicated though the analysis, additional studies including clinical studies as well as basic studies disclosing the molecular mechanism of Dkk4 upregulation in colorectal would further clarify the significance of Dkk4 in colorectal 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：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：大腸癌、Wnt、Dkk、beta-catenin

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌において Wnt シグナルが亢進することは多数の症例で認められ、Wnt シグナル伝達経路の亢進が、発癌において重要であると考えられている。われわれは網羅的遺伝子検索により大腸癌で高発現している遺伝子の1つとして Dkk4 を見出し、これに着目して研究を開始した。臨床生検検体および培養細胞を用いた検討により、多くの大腸癌において Dkk4 が高発現しており、悪性化に伴い発現が増加していた。この Dkk4 の高発現は、大腸癌で認められる Wnt シグナルの亢進によりもたらされると考えられた。

Dkk family は Dkk1 から Dkk4 の4種類の Dkk ホモログが存在する分泌蛋白で、Wnt-Fzd 系の共働受容体 LRP-5/-6 のリガンドとして機能し、発生や発癌に関与する Wnt シグナル伝達を抑制、TCF/LEF1 結合配列を持ち、Wnt シグナルにより発現が誘導されることが解明されてきた。しかし、それ以外の Dkk family の機能は不明な点が多く、その臨床的意義は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は大腸癌における Dkk4 の発現とその臨床的意義を調べることにある。さらに大腸癌の発癌における遺伝子異常や Wnt シグナル伝達異常への関与を調べることでより新たな腫瘍マーカーや予後予測因子の開発、発癌メカニズムの解明に結びつけることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 外科手術を行った進行大腸癌症例につ

いて術前の腫瘍部と正常粘膜からの生検組織を使用し、腫瘍・正常粘膜における Dkk4 の mRNA 発現比を検討した。その中から経過が追跡できた症例の術後再発までの期間を調査した。

(2) 大腸癌における癌遺伝子の変異の全体像を把握するために Ion Ampliseq Cancer Panel を用いた検討を行った。これは 46 の癌関連遺伝子(表 1)を同時にシーケンスし、739 の癌関連変異 (Hot spot) を 1run で検出可能なシステムである。今回は消化器癌の培養細胞株について癌関連変異の頻度を検討した。

ABL1	CSF1R	FGFR3	KDR	NRAS	SMARCB1
AKT1	CTNNB1	FLT3	KIT	PDGFRA	SMO
ALK	EGFR	GNAS	KRAS	PIK3CA	SRC
APC	ERBB2	HNF1A	MET	PTEN	STK11
ATM	ERBB4	HRAS	MLH1	PTPN11	TP53
BRAF	FBXW7	IDH1	MPL	RB1	VHL
CDH1	FGFR1	JAK2	NOTCH1	RET	
CDKN2A	FGFR2	JAK3	NPM1	SMAD4	

表 1 46 の癌関連遺伝子一覧

## 4. 研究成果

(1) 腫瘍・正常粘膜における Dkk4 の mRNA 発現比は、腺腫/正常粘膜比で 2.6 倍 (n=31、 $p<0.05$ )、大腸癌/正常粘膜比で 27.4 倍 (n=18、 $p<0.05$ ) であった。大腸癌のうち進行癌で手術を行った進症例は 11 例であった。Dkk4 の大腸癌/正常粘膜比で 2 倍以上を Dkk4 高発現群 (n=7)、2 倍未満を Dkk4 低発現群 (n=4) とした。手術後の平均観察期間は 24 ヶ月で、再発症例は Dkk4 低発現群には認めず、Dkk4 が高発現している症例は術後の再発率が高い傾向を認めた (図 1)。

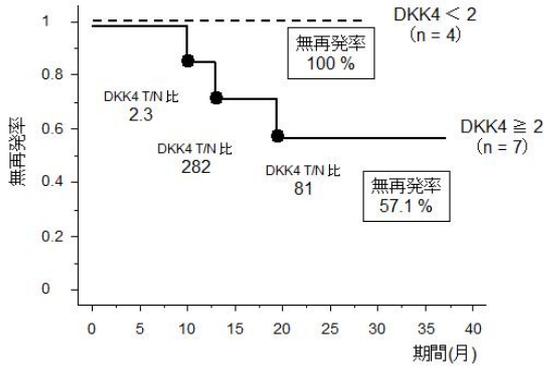


図1 進行大腸癌の術後再発と Dkk4 の発現の関係

(2) 大腸癌、胃癌、肝癌、膵癌の計 23 種の培養細胞株について 46 癌遺伝子、739 癌関連変異の頻度を検討した。多種の細胞株において多様な変異が検出された (図 2) が、今後は同様の検討を大腸癌の臨床検体を対象とし、Laser Microdissection system を用いて癌遺伝子の変異について網羅的解析を行う予定である。

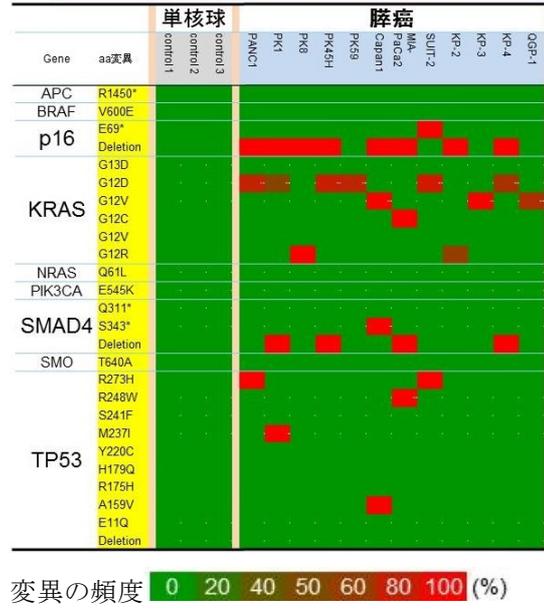


図2 消化器癌細胞株における癌関連変異の頻度

大腸癌では Wnt シグナルの構成分子である APC、 $\beta$  カテニン、Axin の遺伝子に変異が生じ  $\beta$  カテニンが異常に蓄積して Wnt シグナル伝達が亢進する。Dkk4 は Wnt シグナルにより発現誘導され、正常細胞では negative feed back により Wnt シグナルを抑制するが、Wnt シグナルの構成遺伝子に変異がある大腸癌においては negative feed back がからず Dkk4 が過剰に発現するものと考えられた (図 3)。

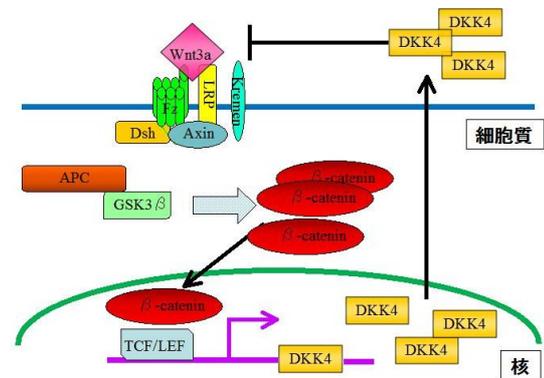
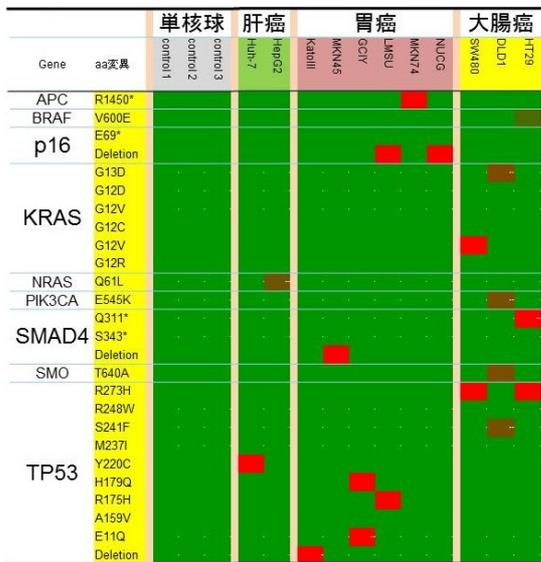


図3 正常細胞における Wnt シグナルと Dkk4 の関係

Wnt シグナルの状態を評価するためにはβ  
カテニンよりシグナル下流の蛋白の状態を  
評価する必要がある。我々が大腸癌で高発現  
する遺伝子として見出した Dkk4 は、Wnt シグ  
ナルにより発現を制御され、分泌蛋白である  
ことより血中濃度の測定が可能である特徴  
を持つ。血液検査で生体中の Wnt シグナル亢  
進を評価できるということは、新たな腫瘍マ  
ーカーや予後予測因子の開発、また発癌のメ  
カニズムの解明に大きなインパクトを与え  
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)

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山口 達也 (YAMAGUCHI TATSUYA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学  
研究員

研究者番号：30397301

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし