

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861742

研究課題名(和文) DKK-3をターゲットとした頭頸部扁平上皮癌の転移抑制

研究課題名(英文) Metastasis suppression in head and neck squamous cell carcinoma by targeting DKK3 gene.

研究代表者

片瀬 直樹 (Katase, Naoki)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30566071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)で特異的に発現するDKK3遺伝子の機能解析のため、HNSCC由来細胞株でDKK3をtransfectionにより強制発現させる系(DKK3-OE)と、shRNAによって安定的にノックダウンする系(DKK3-KD)を確立し、DKK3-OEについて詳細に検討した。DKK3-OEでは細胞の増殖能、浸潤や遊走が増加し、ヌードマウスへの移植でも腫瘍サイズが増加した。DKK3-OEではWnt signalのターゲット遺伝子発現が増加したが、TCF活性は上昇せず、DKK3はWnt/ $\beta$ -catenin以外の別のシグナルを介して腫瘍の進展を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research project, functional analyses on DKK3 gene were performed in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Although DKK3 is known as tumor suppressor of which expression is reduced in many kinds of malignancies, its expression is specifically high in HNSCC. In the present research, DKK3 overexpression (DKK3-OE) and DKK3 stable knockdown (DKK3-KD) were established, and detailed investigation was done on DKK3-OE model. DKK3-OE resulted in increased cellular proliferation, migration and invasion. Moreover, DKK3-OE cells showed increased tumor volume in nude mice xenograft model. To explain these results, influence of DKK3-OE on Wnt/ $\beta$ -catenin signal was investigated. However, TCF activity that will be increased by Wnt/ $\beta$ -catenin signal was not increased, although Wnt target gene expression was elevated. The results imply that DKK3 may exert oncogenic function via certain signal other than Wnt/ $\beta$ -catenin signal, specifically in HNSCC.

研究分野：口腔病理学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 扁平上皮癌 DKK3 がん抑制遺伝子 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(HNSCC)は世界的にも発生頻度の高い悪性腫瘍である。一般に腫瘍はがん遺伝子、がん抑制遺伝子に生じた異常の蓄積によって生じるが、現在のところ HNSCC に特異的ながん関連遺伝子の異常は同定されていない。

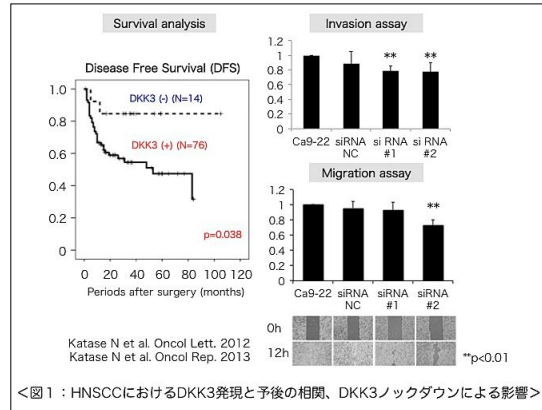
研究代表者は HNSCC の発生と進展に関わるがん関連遺伝子の検索から、dickkopf Wnt signaling inhibitor (DKK) family に着目、特に DKK3 について研究を続けてきた。

がん細胞では種々のシグナルの異常が認められるが、中でも Wnt signal は細胞のがん化に重要な役割を果たすと考えられている。DKK はこの oncogenic Wnt signal を抑制することによってがん抑制遺伝子として機能していると考えられる。実際に消化管の腺癌などでは、DKK family がメチル化によって機能低下し、Wnt / $\beta$ -catenin シグナルの過剰亢進をきたすことが知られている。DKK family は DKK1-4 までのメンバーがあり、DKK1, DKK2 および DKK4 は Wnt アンタゴニストとしての作用を示すが、DKK3 だけはこの機能を有しておらず、その本質的な機能については不明な点が多い。

一方で DKK3 は腫瘍細胞において発現が低下する遺伝子、REIC(reduced expression in immortalized cells)としても知られている。ほとんどの腫瘍細胞では DKK3 発現は低下しており、adenovirus で強制発現させる(Ad-REIC)とアポトーシスを惹起することから、DKK3 は治療のターゲットとなりうるがん抑制遺伝子として注目されている。

しかし、研究代表者のこれまでの研究では、驚くべきことに (1)DKK3 は HNSCC ではほとんどの症例で発現しており DKK3 発現群は予後不良であること、(2) DKK3 発現は前がん病変の段階から増加すること、(3) HNSCC 由来細胞株で DKK3 をノックダウンすると細胞の浸

潤性、遊走性有意に低下することを報告し(図1)、「HNSCC では DKK3 ががん抑制遺伝子ではなくがん遺伝子的に機能する」との仮説に至った。



<図1: HNSCCにおけるDKK3発現と予後の相関、DKK3ノックダウンによる影響>

## 2. 研究の目的

本研究では、DKK3 発現の組織特異性の確認を目的に、種々のがん細胞における DKK3 発現の状態を比較した。また、HNSCC における DKK3 発現の意義および生物学的機能の解明を目指し、HNSCC 由来細胞株で DKK3 遺伝子を過剰発現系とノックダウン系を確立した。

さらに、DKK3 が HNSCC の将来的な分子標的治療のターゲットになりうるかを検討するため、本研究期間では DKK3 過剰発現の影響と、DKK3 を介したシグナルの変化について詳細な検討を加えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種腫瘍細胞での DKK3 遺伝子およびタンパク発現の検討

#### 材料

ヒト腫瘍由来細胞株として HNSCC 由来細胞株 8 種、食道癌由来細胞株 3 種、胃癌由来細胞 4 種、大腸癌由来細胞株 5 種、膵臓癌由来細胞株 3 種、前立腺癌由来細胞株 3 種を用いた。

#### 方法

細胞を培養後、total RNA を抽出、cDNA を合成し、DKK3 発現を Real Time PCR で

検討した。内部コントロールには RPL30 を用いた。また、培養細胞からタンパクを IP buffer にて回収し、常法に従い western blotting (WB) を行って DKK3 タンパク発現を検討した。

## (2) DKK3 強制発現系(DKK3-OE)およびノックダウン系(DKK3-KD)の確立

### 材料

種々の程度に DKK3 を発現する HNSCC 由来細胞株を複数用いた。

### 方法

DKK-OE 系では、DKK3 の全長をクローニングして pCS2<sup>+</sup> vector に組み込んだ発現プラスミドを用いた。また、PCR によって DKK3 に HA-tag を付加した DKK3-HA-Tag 発現プラスミドも作製した。これらのプラスミドを transfection によって発現させた。コントロールとしては GFP transfection を用いた。DKK3-KD 系では、DKK3 に対する short hairpin RNA (shRNA) 配列が組み込まれた vector を 4 種類用い、lentivirus で導入した。コントロールには scramble RNA を導入した細胞を作製した。それぞれの効果は WB、Real time PCR、Immunocytochemistry (ICC)、ELISA で確認した。

## (3) DKK3-OE による HNSCC 由来細胞への影響について

### 材料

本研究期間では DKK3-OE 系について詳細な検討を加えた。材料としては HNSCC 由来細胞株と、同細胞に GFP を発現させた細胞 (GFP)、DKK3 を過剰発現させた細胞 (DKK3-OE) を用いた。

### 方法

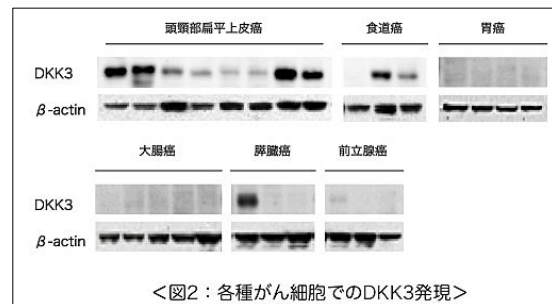
細胞増殖への影響を MTT assay で、浸潤への影響を invasion assay で、遊走への影響

を migration assay で検討した。また、in vivo での影響を観察するため、これらの細胞をヌードマウスの背部皮下に移植して経時的に腫瘍の増大を計測した。シグナルの変化については WB と免疫沈降、Real time PCR、TCF reporter assay など検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 各種腫瘍細胞での DKK3 発現

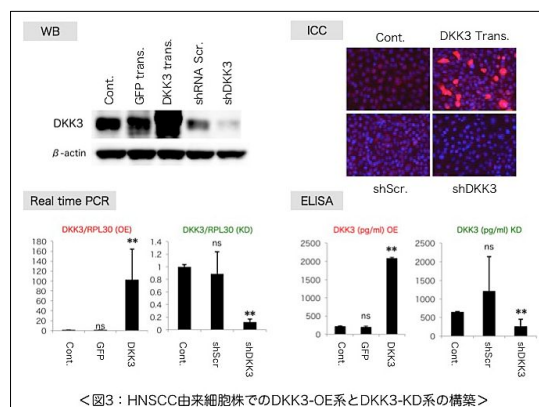
本研究では DKK3 が HNSCC と食道扁平上皮癌で特異的に発現していることを明らかにした (図 2)。また、一部の膵臓癌由来細胞にも発現を認めた。



このことから、DKK3 が扁平上皮癌特異的に発現し、腺癌などとは異なった動態を示す可能性が示唆された。

### (2) DKK3-OE 系と DKK3-KD 系の評価

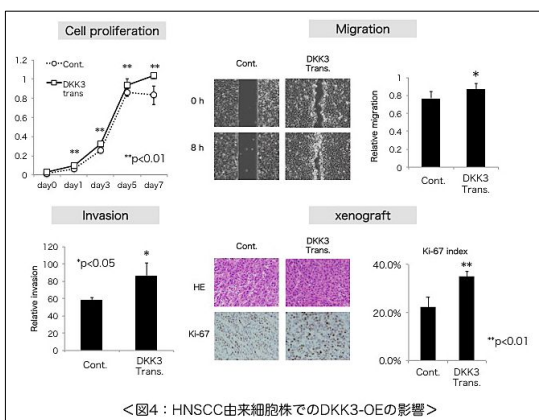
発現プラスミドによる DKK3-OE 系では DKK3 mRNA 発現、タンパク発現および分泌量を全て有意に増加させることができた。Lentivirus による DKK3-KD 系では、DKK3 発現を mRNA レベルでもタンパクレベルでも有意に抑制できた (図 3)。



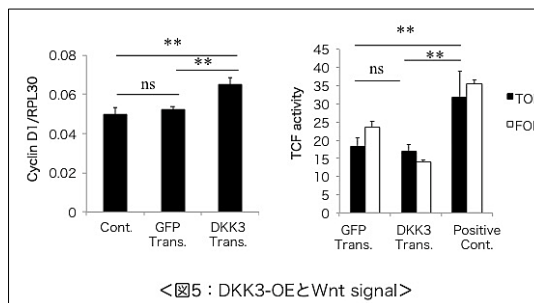
これまでの報告では、DKK3 非発現細胞に adenovirus で DKK3 を発現させると apoptosis を起こすとされているが、DKK3 発現細胞である HNSCC 細胞での DKK3-OE は apoptosis を惹起しなかった。また、HNSCC 細胞への adenovirus での発現も試みたが、感染が起らず系を構築できなかった。

### (3) DKK3-OE による影響

本研究では DKK3-OE 系の解析を優先的に進めた。DKK3-OE 細胞は、コントロールの parental cell や GFP 導入細胞に比較して細胞増殖が有意に高く、浸潤性、遊走性も有意に増加することが示された。ヌードマウスへの移植系では、DKK3-OE 細胞はコントロールと比較して、有意に tumor volume の増大が認められ、組織学的解析では Ki-67 index が有意に高かった (図 4)。



DKK3-OE 系による HNSCC 由来細胞の増殖、浸潤、遊走の増加のメカニズム解明のため、シグナルの変化を検討すると、DKK3-OE 系では cyclin D1 などの Wnt / $\beta$ -catenin/TCF シグナルのターゲット遺伝子の発現が増加していた。しかし、TCF reporter assay などでは TCF activity の増加は認められず、この現象が Wnt canonical signal を介したものである可能性が示された (図 5)。その他の細胞内シグナルのリン酸化の状態を WB で検討したが、有意な変化は認められなかった。



本研究結果からは、DKK3 は口腔、食道の扁平上皮癌に特異的に発現することが示された。また、DKK3-OE によって HNSCC 由来細胞株の悪性度が増加することも示され、HNSCC では、DKK3 は他の臓器のがんとは異なり、がん抑制遺伝子ではなくがんの進展を促進する可能性が強く示唆された。

現在は DKK3 と直接結合するタンパクを免疫沈降とタンパク質量分析で同定し、検討を続けているほか、DKK3-OE で発現変化する遺伝子群を microarray で、シグナルの変化を抗体アレイで検討し、DKK3 を介したシグナルの全体像の解明に取り組んでいる。また、本研究と対になる実験として、DKK3-KD 系の解析を継続しており、in vivo での実験を計画中である。

本研究からは DKK3 が HNSCC のみならず扁平上皮癌の治療のターゲットとなりうる可能性が示されており、がん基礎研究として高い価値を有していると考えられる。

### 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)

[雑誌論文](計 17 件)

Katase N, Terada K, Suzuki T, Nishimatsu S, Nohno T. miR-487b, miR-3963 and miR-6412 delay myogenic differentiation in mouse myoblast-derived C2C12 cells. *BMC Cell Biol.* 査読有, 16(1) 13, 2015. doi:10.1186/s12860-015-0061-9.

Nakano A, Mishima K, Katase N, Ueyama Y.: A Case of Squamous Cell Carcinoma Arising From Branchial Cleft Cyst. *J Oral Maxillofac Surg.* 査読有, 73(4) 781-785, 2015. doi:

10.1016/j.joms.2014.10.036.

Terada K, Misao S, Katase N, Nishimatsu S, Nohno T. Interaction of Wnt signaling with BMP/Smad signaling during the transition from cell proliferation to myogenic differentiation in mouse myoblast-derived cells. *Int J Cell Biol*. **査読有**, 2013: 2013:616294, 2013. doi: 10.1155/2013/616294.

Yamamoto M, Fujita H, Katase N, Inoue K, Nagatsuka H, Utsumi K, Sasaki J, Ohuchi H.: Improvement of the Efficacy of 5-aminolevulinic Acid-mediated Photodynamic Treatment in Human Oral Squamous Cell Carcinoma HSC-4. *Acta Med Okayama*. **査読有**, 67(3) 153-164, 2013.

Katase N, Nohno T. DKK3 (dickkopf 3 homolog (*Xenopus laevis*)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. **査読有**, 17(10) 678-686, 2013. doi: 10.4267/2042/51533. <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/DKK3ID40327ch11p15.html>

Katase N, Lefeuvre 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*. **査読有**, 29(4) 1349-1355, 2013. doi: 10.3892/or.2013.2251.

〔学会発表〕(計 32 件)

片瀬 直樹, 寺田 久美子, 西松 伸一郎, 鈴木 貴弘, 松崎 秀紀, 山村 真弘, 山内 明, 大槻 剛巳, 濃野 勉. 口腔癌由来細胞における DKK3 遺伝子発現の影響. 第 38 回日本分子生物学会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸市 神戸ポートアイランド.

Katase N, Yamamura M, Yamauchi A, Nishimatsu S, Nohno T. Functional analyses of DKK3 in oral squamous cell carcinoma cell lines 口腔癌由来細胞株における DKK3 遺伝子の機能解析. 第 74 回日本癌学会, 2015 年 10 月 10 日, 名古屋市 名古屋国際会議場.

片瀬 直樹. 口腔扁平上皮癌における DKK3 の発現と機能解析.

第 57 回歯科基礎医学会, 2015 年 9 月 12 日, 新潟市 朱鷺メッセ.

片瀬 直樹. Knockdown of Dkk-3 decreases cancer cell migration and invasion independently of the Wnt pathways in oral squamous cell carcinoma-derived cells.

第 26 回 日本臨床口腔病理学会 総会・学術大会, 2015 年 7 月 31 日, 札幌市 北海道大学 学術交流会館.

片瀬 直樹, 西松 伸一郎, 濃野 勉. DKK3 過剰発現が頭頸部扁平上皮癌細胞に及ぼす影響.

第 37 回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 27 日, 横浜市 パシフィコ横浜.

片瀬 直樹. 頭頸部扁平上皮癌細胞における DKK3 強制発現の影響.

第 25 回日本臨床口腔病理学会, 2014 年 8 月 29 日, 新潟市 メディアシップ日報ホール.

藤井 昌江, 片瀬 直樹, 高島 清文, 武部 祐一郎, 于 湫, 河合 穂高, 辻極 秀次, 長塚 仁. Dkk-3 の頭頸部扁平上皮癌における発現の検討.

第 25 回日本臨床口腔病理学会, 2014 年 8 月 28 日, 新潟市 メディアシップ日報ホール.

Katase N, Gunduz M, Tsujigiwa H, Ito S, Fujii M, Nagatsuka H, Sasaki A, Nohno T.: DKK3 expression and its function in head and neck squamous cell carcinoma.

AACR Annual Meeting 2014 San Diego, 2014 年 4 月 6 日, San Diego, USA, San Diego Convention Center.

片瀬 直樹, 濃野 勉. 頭頸部扁平上皮癌における DKK3 の機能について.

第 36 回日本分子生物学会, 2013 年 12 月 4 日, 神戸市 神戸国際会議場.

片瀬 直樹, 濃野 勉. 頭頸部扁平上皮癌における DKK3 発現と機能.

第 86 回日本生化学会, 2013 年 9 月 13 日, 横浜市 パシフィコ横浜.

〔図書〕(計 1 件)

1. Katase N, Nohno T, Gunduz M. Chapter 10-Dkk-3, a mysterious tumor suppressor gene that possesses multiple functions in tumor progression. In. *Tumor Suppressor Genes: Functions, Regulation and*

Health Effects (Gunduz M and Gunduz E Eds.)” NOVA Science Publisher, Hauppauge, New York, USA, p.207-232, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

雑誌論文 は平成 27 年度日本臨床口腔病理学会 奨励賞（実験病理部門）を受賞した。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片瀬 直樹 (KATASE NAOKI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30566071