

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860185

研究課題名(和文)線維化肺における癌転移成立のメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular pathology of frequently-accompanied pulmonary cancer in fibrotic lung

研究代表者

丸山 順一 (Maruyama, Junichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30723639

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)：肺線維症の代表的疾病である特発性間質性肺炎(IPF)には肺癌が高率に併発するが、このメカニズムは未だ完全に理解されていない。申請者はGEOに公開されているIPF肺の遺伝子発現データを再解析することで、癌幹細胞マーカーとして報告されているDCLK1がIPF肺において発現上昇していることを見出した。さらに、DCLK1が細胞のDNA損傷修復機構を抑制すること、DCLK1タンパク質の発現量がマクロファージ様細胞培養上清の処理により増加することを示唆する結果を得た。以上より、IPF肺における肺癌高併発メカニズムの一つとして、「DCLK1の発現上昇による発癌の促進」の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism how idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is often accompanied by lung cancer is not fully understood. To address this question, I re-analyzed the GEO gene expression data obtained from IPF lung samples and identified DCLK1 as an up-regulated gene in the IPF lung. DCLK1 has been reported as a marker gene of cancer stem cells. I revealed that DCLK1 suppresses the activity of DNA repairing system and that DCLK1 protein expression level is up-regulated by the treatment of macrophage-like cell-conditioned medium. Taken together, it is suggested that the up-regulation of DCLK1 protein amount in the lung facilitates tumorigenesis and that this up-regulation can be promoted by the accumulation of macrophage cells in the lung.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺線維症 肺癌 DNA損傷修復

### 1. 研究開始当初の背景

癌転移は癌死亡の主要原因でありその克服は癌治療成績の向上に必須である。一般には、癌転移は癌の進行に伴う癌細胞の悪性化によって起こる病態と理解される。その一方で、癌の比較的初期に癌幹細胞性をもつ細胞が転移臓器に広がり、原発巣に遅れて顕在化している可能性も指摘されている。前者の場合は癌の早期発見・早期切除が転移率を下げると期待されるが、後者の場合は転移する性質を持つ癌においては原発巣を早期発見・早期切除しても転移は避けられないことになり、新しい治療的アプローチが必要となる。

癌転移治療の困難さの一因は、転移巣の癌細胞が原発巣の癌細胞と異なる特性を得て、より悪性度が高く治療抵抗性に变化することにある。このような原発巣と転移巣の間の癌細胞の heterogeneity は、転移成立までの時間に癌細胞内におこるゲノム・エピゲノムの变化と、癌細胞を取り巻く環境が転移巣と原発巣と異なることによると推察される。癌転移が癌の初期に生じる場合には、癌細胞内で自律的に起こる変化よりも、外部環境の変化により癌細胞内に引き起こされる変化の重要度が増す。

2005年にKaplanらは、骨髄由来の血管増殖因子受容体(VEGFR)陽性細胞が癌細胞の転移に先立って肺に出現し、癌転移のニッチを形成するという先駆的発表を行った(Kaplan et al. *Nature* 2005)。ニッチの実体がKaplanらの提唱したVEGFR陽性細胞に限定されるか否か、ニッチ形成が転移に必須の要件であるか否かは議論が分かれているが、癌転移に先立って転移臓器に癌の生着・成育を助ける変化が起こるという考え方は広く受け入れられるようになった。この考え方が正しければ、癌の生着・成育を助ける変化の実体を明らかにすることで、それを標的として癌転移が顕在化する以前に治療的介入を行うことが出来る可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、肺線維症モデルを利用して癌の生着・成育を助ける変化の実体を解明し、癌転移抑制の新しい治療標的を発見することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)プレオマイシン誘導性線維化肺またはコントロール処置肺のBAL洗浄液中に回収されるマクロファージを含む細胞集団を培養し、その培養上清を肺癌由来細胞株の培養液に加え、細胞増殖・癌幹細胞性への影響を評価した。

(2)プレオマイシン誘導性線維化肺またはコントロール処置肺より肺線維芽細胞を単離し、その培養上清を肺癌由来細胞株の培養液に加え、細胞増殖・癌幹細胞性・遊走能・浸潤能に対する影響を評価した。

(3)公共の遺伝子発現情報データベースであ

るGEOに登録されているデータを用いて、特異性間質性肺炎(IPF)患者由来肺サンプルと健常者由来肺サンプル間の遺伝子発現パターンを比較した。

(4)(3)の解析により発現変動していることが分かった遺伝子に対して、癌幹細胞性誘導能・DNA損傷修復機構への影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1)プレオマイシン誘導性線維化肺またはコントロール処置肺のBAL洗浄液中に回収されるマクロファージを含む細胞集団を培養し、その培養上清を肺癌由来細胞株の培養液に加え、細胞増殖・癌幹細胞性への影響を評価した。プレオマイシン誘導性線維化肺由来マクロファージ培養上清添加条件において細胞増殖・癌幹細胞性の亢進が起こることを予想したが、検討を行った項目においてはコントロール処置肺由来マクロファージ培養上清添加条件との間で有意な差は見られなかった。

(2)プレオマイシン誘導性線維化肺またはコントロール処置肺より肺線維芽細胞を単離し、その培養上清を肺癌由来細胞株の培養液に加え、細胞増殖・癌幹細胞性・遊走能・浸潤能に対する影響を評価した。プレオマイシン誘導性線維化肺由来マクロファージ培養上清添加条件において何れかの性質の亢進が起こることを予想したが、何れの項目においてもコントロール処置肺由来マクロファージ培養上清添加条件との間で有意な差は見られなかった。

ここで検討方針を転換し、IPF患者肺において健常肺と比較して発現が変動している遺伝子群を絞り込んで、線維化肺で異常が起きているシグナル経路を見出す方針を試すこととした。

(3)公共の遺伝子発現情報データベースであるGEOに登録されている独立3データセットを用いて、特異性間質性肺炎(IPF)患者由来肺サンプルと健常者由来肺サンプル間の遺伝子発現パターンを比較した。結果、IPF患者由来サンプルにおいて2倍以上発現量が增大している遺伝子として61遺伝子を同定した。同定した61遺伝子の中に、これまでに癌幹細胞マーカーとして報告されていたDCLK1が含まれていた。DCLK1とIPFの関係を解析した例はこれまでに存在しないこと、DCLK1がキナーゼであり解析が比較的容易であると期待されることから、以降の解析はDCLK1に注目して進めた。

(4)DCLK1をヒト乳腺上皮由来細胞株MCF10Aに発現させると、幹細胞性の指標となるMammosphere形成能がMCF10A細胞に付与された。この結果から、DCLK1は単なる癌幹細胞マーカーではなく、癌幹細胞性のドライバー遺伝子である可能性が考えられる。

(5)DCLK1にはキナーゼ活性を有するドメインが含まれているため、DCLK1による癌幹細胞性誘導能にキナーゼ活性が必要であるか

否かを検討した。結果、キナーゼ活性を欠損させた変異体を用いても癌幹細胞性が誘導されたため、DCLK1はそのキナーゼ活性に依存しない様式で癌幹細胞性を誘導していることが示唆された。

(6)発癌には癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異が必要であり、これはDNA損傷修復機構を含むゲノム安定性維持機構の不活性化に因る部分が大きい。そこで、DCLK1の発現が細胞のDNA損傷修復機構に影響を及ぼすか否かを検討した。結果、DCLK1の強制発現は非相同末端結合・相同性組み換えという代表的な二種のDNA修復機構をモニターするレポーター系においていずれの活性も抑制した(図1)。また、DNA損傷依存的なBRCA1・RAD51等DNA修復タンパク質の核内foci形成がDCLK1の強制発現により抑制された。以上の結果より、DCLK1がDNA損傷修復機構を抑制的に制御する可能性が示唆された。

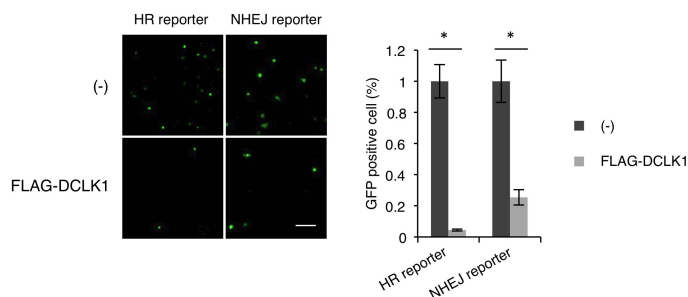


図1. DCLK1はDNA損傷修復機構を抑制する。FLAG-DCLK1の過剰発現により、GFP蛍光で表されるDNA損傷修復応答が抑制された。

(7)マクロファージ様細胞株RAW264.7の培養上清を非小細胞肺癌由来細胞株H1299に処理すると、DCLK1タンパク質の発現量が上昇した(図2)。この時、DCLK1 mRNA量に変化は見られなかったため、この発現量上昇はタンパク質安定化を介していると考えられる。IPF肺にはM2マクロファージが集積していることが知られていることから、本結果は集積したマクロファージから分泌される物質が肺実質細胞におけるDCLK1タンパク質発現量上昇に寄与する可能性を示している。

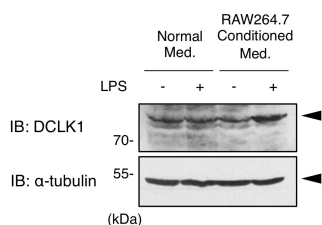


図2. DCLK1はRAW264.7細胞培養上清処置により発現上昇する。H1299細胞内在性DCLK1タンパク質量はLPS活性化RAW264.7細胞の培養上清処置により増加した。

以上の結果をまとめると、線維化肺において肺癌の併発率が高くなる分子機構の一つとして、「マクロファージ分泌物質等により肺実質細胞においてDCLK1タンパク質発現量上昇が起こり、その結果、癌幹細胞性誘導とDNA損傷修復機構抑制が引き起こされる」という機構の存在が示唆された。

## 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7件)

Sarkar A, Iwasa H, Hossain S, Xu X, Sawada T, Shimizu T, Maruyama J, Arimoto-Matsuzaki K, Hata Y. Domain analysis of Ras-association domain family member 6 upon interaction with MDM2. FEBS Lett. 591, 260-272. 2017 doi: 10.1002/1873-3468.12551. 査読有

Nagashima S, Maruyama J, Kawano S, Iwasa H, Nakagawa K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nishina H, Hata Y. Validation of the chemical compound library screening for TAZ inhibitors by use of green fluorescence protein-fused TAZ. Cancer Sci. 107, 791-802. 2016 doi: 10.1111/cas.12936. 査読有

Maruyama J, Kobayashi Y, Umeda T, Vandewalle A, Takeda K, Ichijo H, Naguro I. Osmotic stress induces the phosphorylation of WNK4 Ser575 via the p38MAPK-MK pathway. Sci. Rep. 6, 18710. 2016 doi: 10.1038/srep18710. 査読有

Kodaka M, Yang Z, Nakagawa K, Maruyama J, Xu X, Sarkar A, Ichimura A, Nasu Y, Ozawa T, Iwasa H, Ishigami-Yuasa M, Ito S, Kagechika H, Hata Y. A new cell-based assay to evaluate myogenesis in mouse myoblast C2C12 cells. Exp Cell Res. 336, 171-181. 2015 doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.015. 査読有

Kawano S, Maruyama J, Nagashima S, Inami K, Qiu W, Iwasa H, Nakagawa K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nishina H, Hata Y. A cell-based screening for TAZ activators identifies ethacridine, a widely used antiseptic and abortifacient, as a compound that promotes dephosphorylation of TAZ and inhibits adipogenesis in C3H10T1/2 cells. J. Biochem. 158, 413-423. 2015 doi: 10.1093/jb/mvv051. 査読有

Yang Z, Nakagawa K, Sarkar A, Maruyama J, Iwasa H, Bao Y, Ishigami-Yuasa M, Ito S, Kagechika H, Hata S, Nishina H, Abe S, Kitagawa M, Hata Y. Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. Mol. Cell. Biol. 34, 1607-1621. 2014 doi: 10.1128/MCB.01346-13. 査読有

Iwasa H, Kudo T, Maimaiti S, Ikeda M, Maruyama J, Nakagawa K, Hata Y. The RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis and the cell cycle via MDM2 protein and p53 protein. J. Biol. Chem. 288, 30320-30329. 2013 doi: 10.1074/jbc.M113.507384. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

丸山順一、江欣亮、岩佐宏晃、湯浅 石上磨里、影近弘之、仁科博史、畑裕 新規に同定した YAP1 活性化化合物は多発性骨髄腫において YAP1-p73 経路依存的な細胞死を誘導する 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2016年12月1日 横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

長島俊太、丸山順一、湯浅 石上磨里、影近弘之、仁科博史、畑裕 細胞内局在を指標とする探索系による転写共役因子(TAZ)抑制剤探索の有効性の検証 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2016年12月1日 横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/mbc/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 順一 (Maruyama Junichi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：30723639

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

## (4) 研究協力者

( )