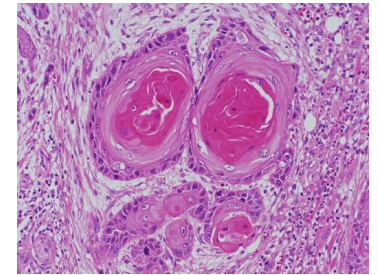
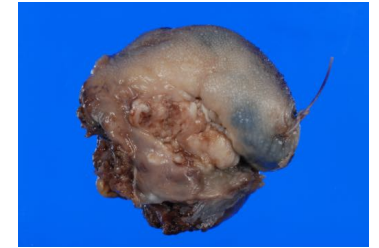


特異的がん関連遺伝子DKK3を 標的とした頭頸部扁平上皮癌制御 ～DKK3の発見から中分子創薬まで～

口腔病理学分野
片瀬 直樹

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)

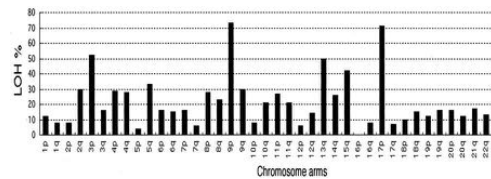
- 頭頸部領域の悪性腫瘍の90%以上を占める
- 年間の罹患数・死亡者は約23,000例・7,800例
- 治療は手術が中心
舌・顎骨・歯が失われることで摂食・嚥下・
発音機能低下と審美障害によるQOL低下が
避けられない
- 5年生存率は40～60%程度
- 背景となるがん関連遺伝子の理解が不十分
TP53, AKT1, APC, CCND1, FGFR3,
NOTCH1, PIK3CA, PTEN の変異など
(Cancer Genome Atlas Network. *Nature*. 2015)



**HNSCCの治療成績向上につながる
特異的がん関連遺伝子の同定と、
これを標的とした低侵襲治療法の
開発が求められている**

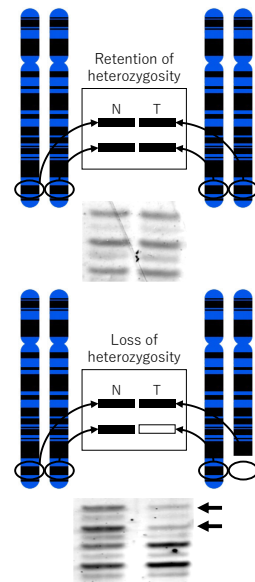
HNSCC特異的がん関連遺伝子の同定：LOH解析

0025-6870/03/0501-0091\$05.00/0
Loss of Heterozygosity
Copyright © 2003 by The United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. Vol. 83, No. 1, p. 99, 2003
**Genome-Wide Analyses on Loss of Heterozygosity in
Head and Neck Squamous Cell Carcinomas**
Levent Bekir Beder, Mehmet Gunduz, Mamoru Ouchida, Kunihiro Fukushima,
Esra Gunduz, Sachio Ito, Akiko Sakai, Noriyuki Nagai, Kazunori Nishizaki, and
Kenji Shimizu

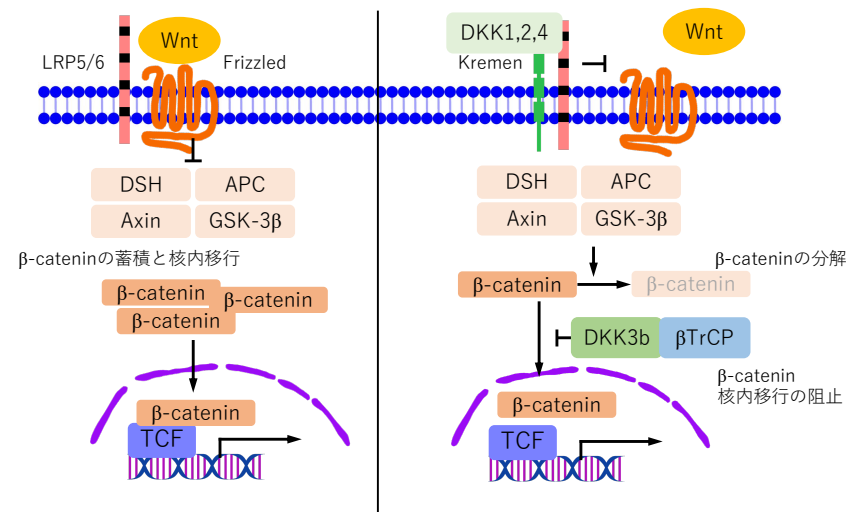


Beder LB and Gunduz M et al. *Lab Invest*. 2003

先行研究でHNSCCにおいて高頻度にLOHが生じて
いる領域を同定。新たながん抑制遺伝子候補として
dickkopf WNT signaling pathway inhibitor family
(DKK family) を見出した。



DKK familyはWnt signalを阻害するがん抑制遺伝子である



Wntは受容体であるFrizzledと
LRP5/6に結合してβ-cateninの
核内移行と転写を促進する

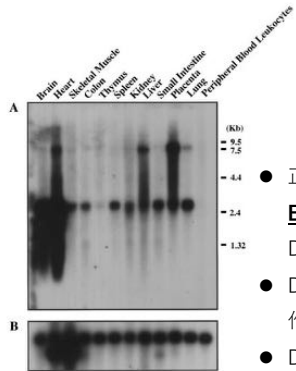
DKK familyのうちDKK1, 2, 4はKremenとLRP5/6に
結合することでWntを競合的に阻害する。DKK3の
細胞内isoformはβ-cateninの核内移行を阻害する

DKK3はREICとしても知られる

Biochemical and Biophysical Research Communications 268, 20–24 (2000)
doi:10.1006/bbrc.1999.2067, available online at <http://www.idealibrary.com> on IDEAL®

A REIC Gene Shows Down-Regulation in Human Immortalized Cells and Human Tumor-Derived Cell Lines

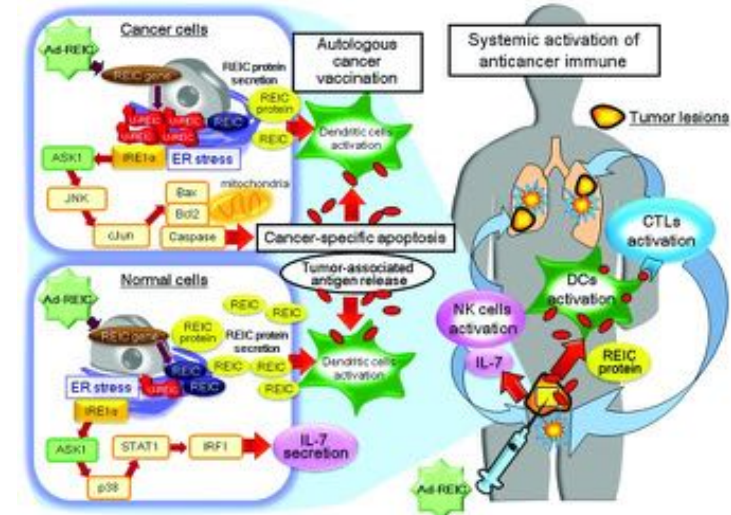
Toshiya Tsuji, Masahiro Miyazaki, Masakiyo Sakaguchi, Yusuke Inoue, and Masayoshi Namba
Department of Cell Biology, Institute of Molecular and Cellular Biology, Okayama University Medical School, Shikata-cho 2-5-1, Okayama 700-8558, Japan



- 正常細胞を不死化させた際に発現が低下する遺伝子 **R**educed **E**xpression in **I**mmortalized **C**ells (REIC)が発見され、これが DKK3と同一であることが報告された。
- DKK3/REIC発現は多くのがん細胞で低下しており、Wnt抑制作用とも併せ、強力な癌抑制遺伝子であるとされる。
- DKK3/REIC過剰発現による腫瘍治療も模索されている。

Tsuji Tet al. Biochem Biophys Res Commun. 2000

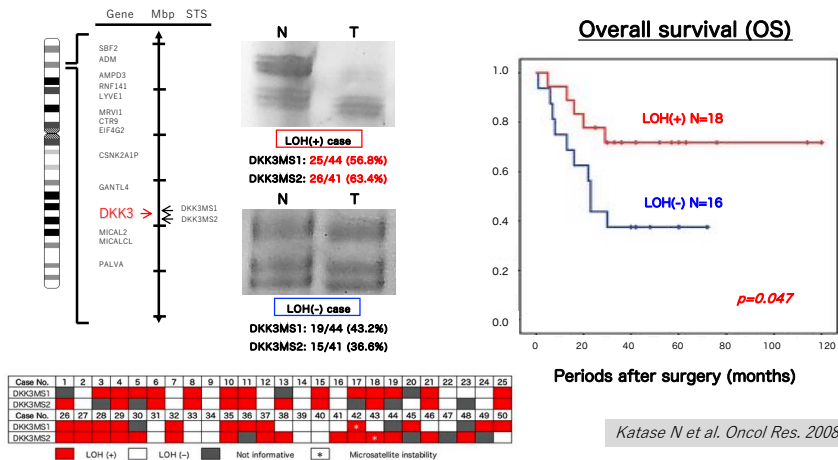
DKK3/REIC遺伝子導入治療の可能性



Ad-REICは腫瘍細胞にapoptosisを起こすほか、Wnt signalの活性化を抑制する

Watanabe M, Nasu Y, Kumon H. *Oncol Lett.* 7(3):595-601, 2014

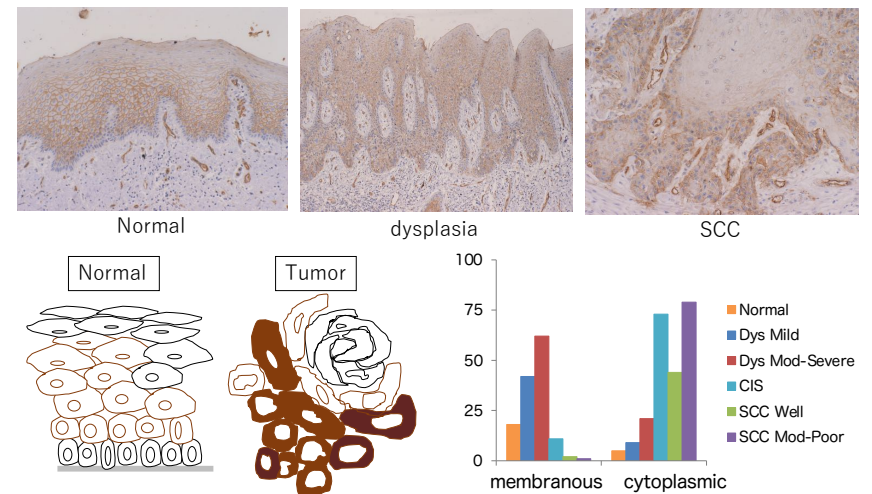
HNSCCにおけるDKK3のLOH解析



HNSCCではDKK3を含む染色体上の領域 (11p15.2) に高頻度にLOHが認められ、がんの発生に重要と考えられた。一方、DKK3 LOH(+)群は予後良好であった。

→ DKK3はがん抑制遺伝子か、がんを促進するのか？

HNSCCにおけるDKK3発現解析

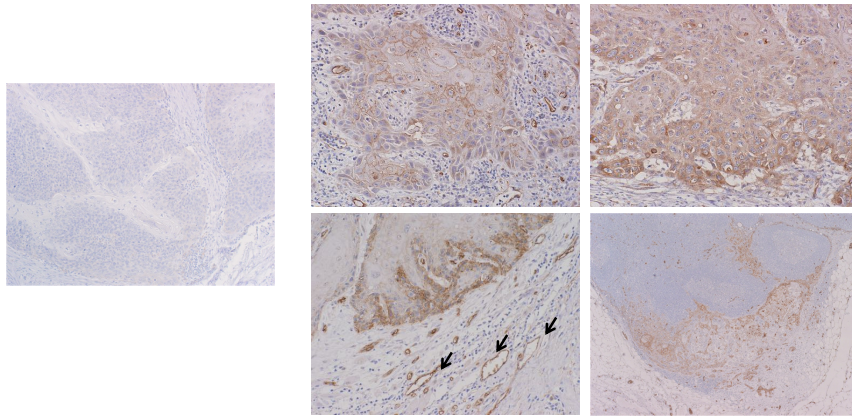


HNSCCの発がん過程でDKK3発現量は増加し、局も細胞膜から細胞質へ変化する。

HNSCCにおけるDKK3発現解析

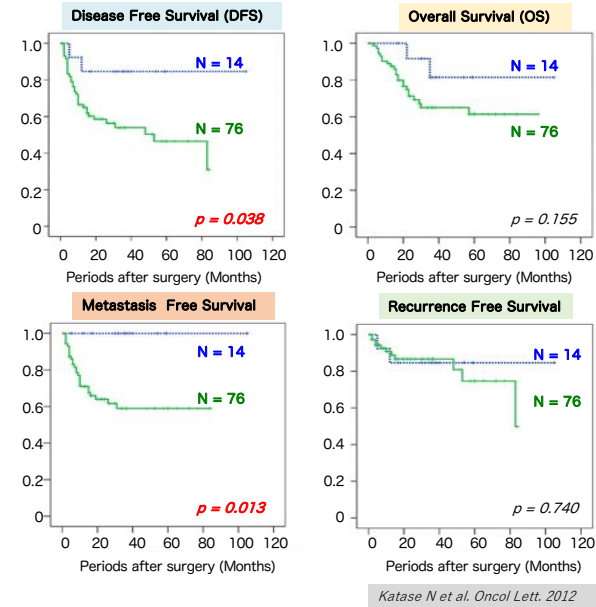
< Negative: 15.6% >

< Positive: 84.4% >



HNSCC 90症例についてDKK3の免疫染色を行った。DKK3発現は大多数の症例で認められた。DKK3は細胞質および腫瘍周囲の血管に陽性を示す。

HNSCCにおけるDKK3発現解析



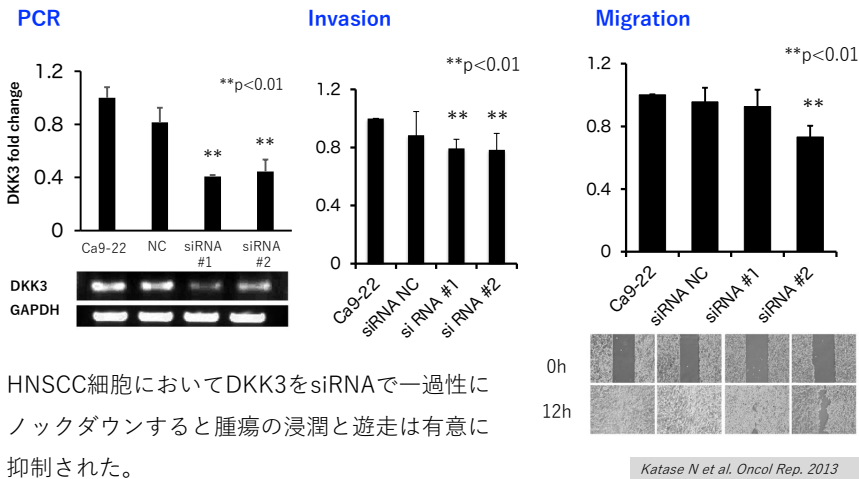
DKK3発現群は有意にDFSが短く、OSも短い傾向が示された。

DKK3陽性群は転移の頻度が高いのに対し、DKK3陰性群は一例も転移を起こさなかった。



DKK3はHNSCCではがん抑制遺伝子ではなくがんの転移を促進する？

HNSCCにおけるDKK3ノックダウンの影響

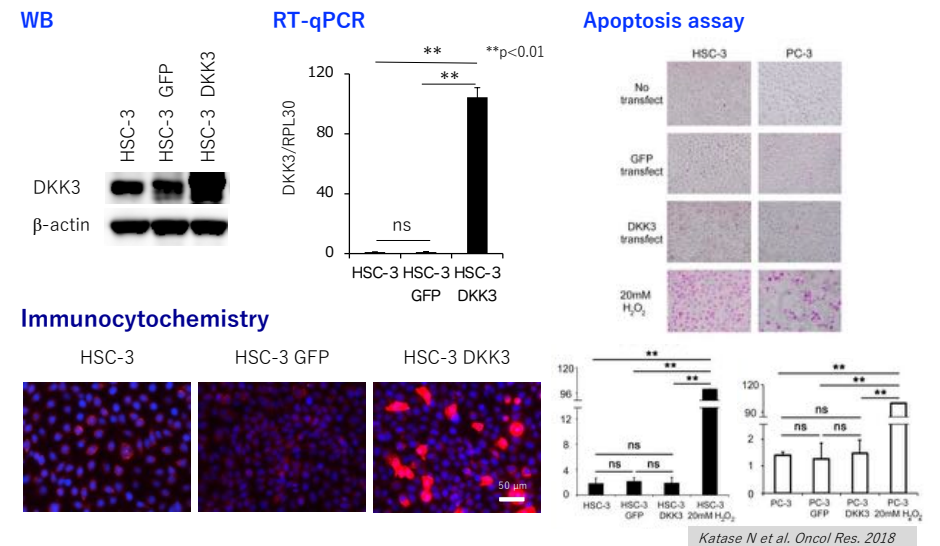


HNSCC細胞においてDKK3をsiRNAで一過性にノックダウンすると腫瘍の浸潤と遊走は有意に抑制された。

Katase N et al. Oncol Rep. 2013

DKK3はHNSCCではがん抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) ではなく Tumor-promoting factorとして機能しているのではないか？

DKK3 gain-of-function実験

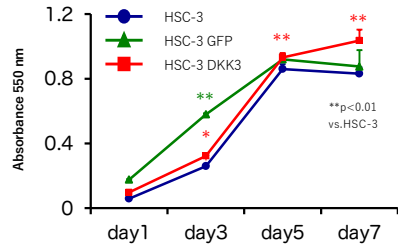


Katase N et al. Oncol Res. 2018

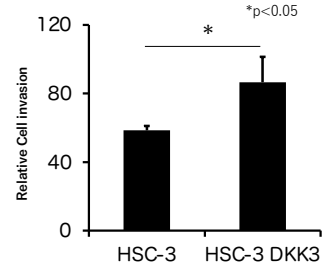
HNSCC細胞でDKK3を過剰発現させてもapoptosisは惹起されない。

DKK3 gain-of-function実験

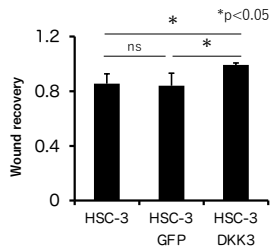
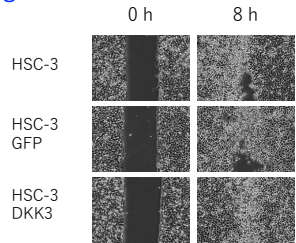
Proliferation



Invasion



Migration

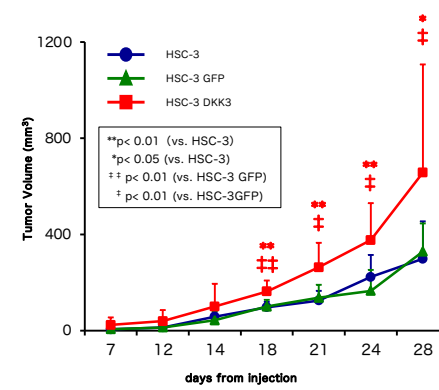


DKK3過剰発現は腫瘍の増殖・浸潤・遊走を有意に増加させた

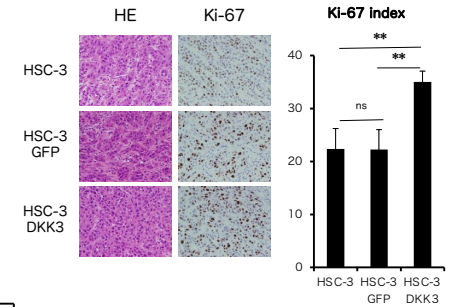
Katase N et al. Oncol Res. 2018

DKK3 gain-of-function実験

In vivo tumor growth



Histological analyses

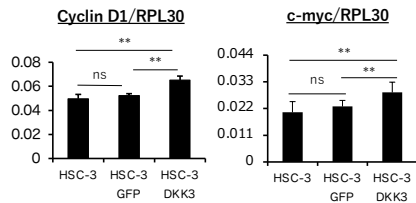


Katase N et al. Oncol Res. 2018

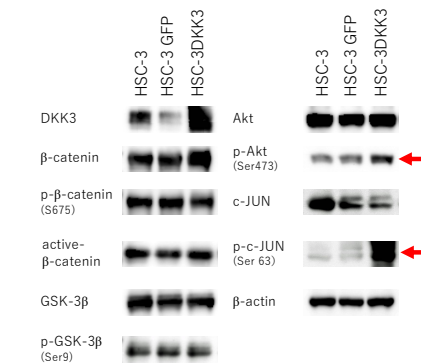
DKK3過剰発現は in vivoでの腫瘍細胞の増大も有意に増加させた。

DKK3 gain-of-function実験

RT-qPCR for Wnt target genes

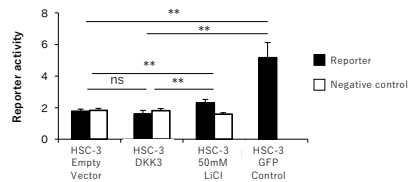


WB for DKK3-related signal



Katase N et al. Oncol Res. 2018

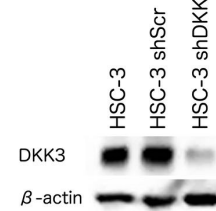
TCF Reporter assay



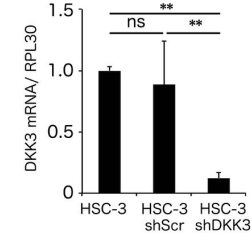
DKK3を過剰発現させるとWnt target遺伝子の発現が増加し、あたかもWnt signalが活性化されているように思われたが、実際にはAktの活性化が重要であることが示された。

DKK3 loss-of-function実験

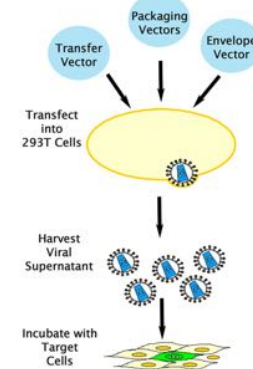
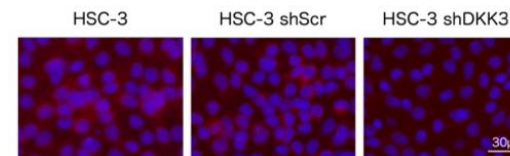
WB



RT-qPCR



Immunocytochemistry

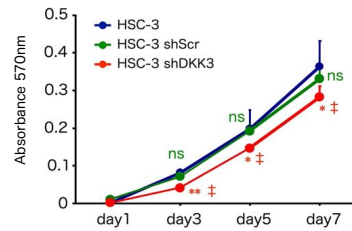


Katase N et al. Int J Oncol. 2019

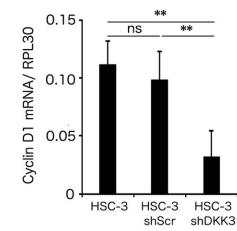
HNSCC細胞でDKK3をshRNAでノックダウンさせる。形態に変化はない。

DKK3 loss-of-function実験

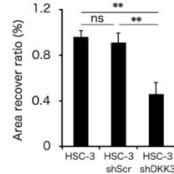
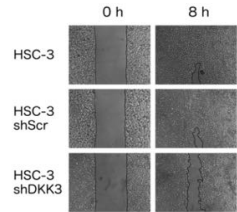
MTT assay



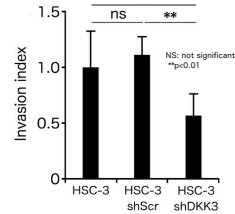
RT-qPCR (Cyclin D1)



Migration assay



Invasion assay

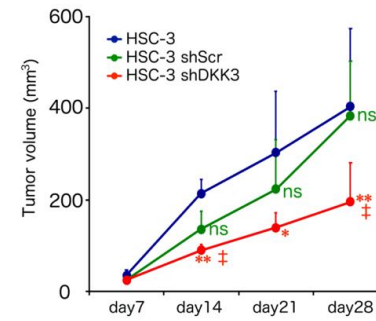


Katase N et al. Int J Oncol. 2019

DKK3のノックダウンは腫瘍の増殖・浸潤・遊走を有意に低下させた。

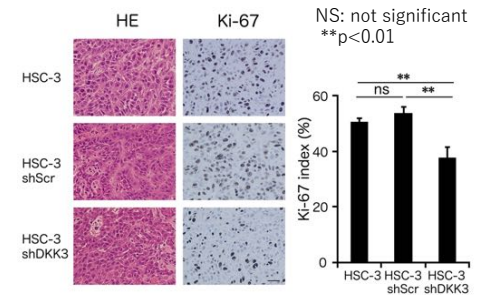
DKK3 loss-of-function実験

In vivo tumor growth



NS: not significant, **p<0.01, *p<0.05 (vs. HSC-3)
‡ ‡ p<0.01, ‡ p<0.05 (vs. HSC-3 shScr)

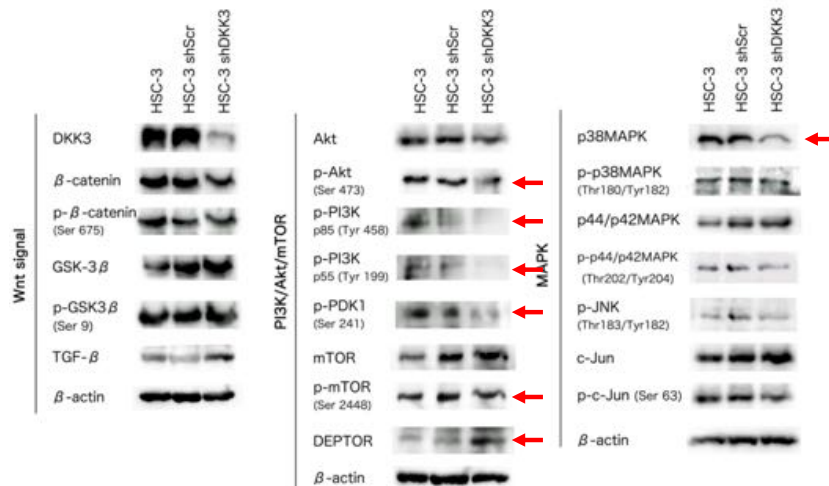
Ki-67 index



Katase N et al. Int J Oncol. 2019

DKK3ノックダウンは in vivoでの腫瘍細胞の増大も有意に低下させた。

DKK3 loss-of-function実験



Katase N et al. Int J Oncol. 2019

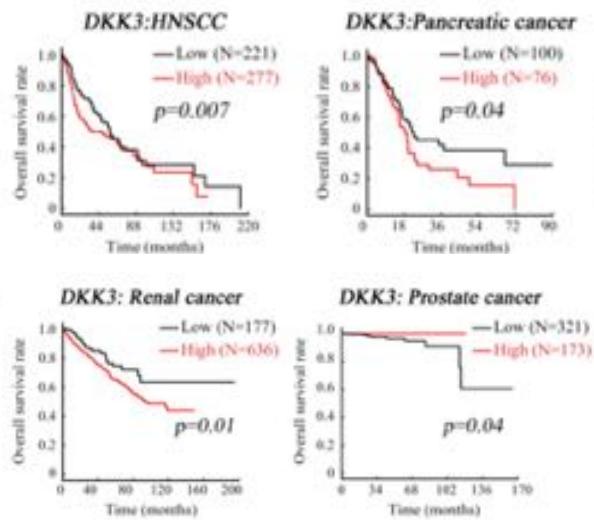
DKK3をノックダウンさせるとAktのリン酸化が低下した。

ここまでのまとめ

- DKK3はREICとしても知られ、Wnt signal抑制作用をもつことと腫瘍で発現が低下していることから、がん抑制遺伝子 (TSG) とされる。
- HNSCCでのLOH解析でもDKK3領域は高頻度にLOHを生じていた。しかしDKK3 LOH(+)群の方が転移が少なく予後良好であった。
- 免疫染色ではDKK3発現は正常扁平上皮では低いが、がん化の過程において発現が増加し、がんでは高発現を示す。またDKK3(+)群は転移が多く予後不良であった。
- HNSCC細胞でDKK3発現を増加させるとAktのリン酸化を介して腫瘍細胞の増殖・浸潤・遊走が全て有意に増大するが、apoptosisは起こさない。逆にDKK3をノックダウンすると、Aktのリン酸化も増殖・浸潤・遊走も全て有意に低下する。

DKK3はHNSCCではTSGではなく tumor-promoting factor であり、Aktを介して腫瘍の悪性度を規定している

DKK3の機能はDKK3非発現腫瘍と発現腫瘍では異なる



Katase N et al. Int J Oncol. 2019

The Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータ解析でも DKK3発現は腫瘍組織型によって異なる。

DKK3非発現腫瘍

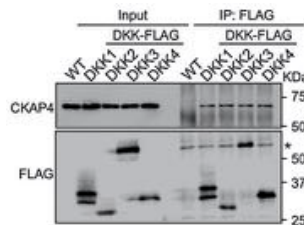
前立腺癌、胃癌、大腸癌などでは発現低下で予後不良

DKK3発現腫瘍

HNSCC、膵臓癌、腎癌などでは発現増加で予後不良

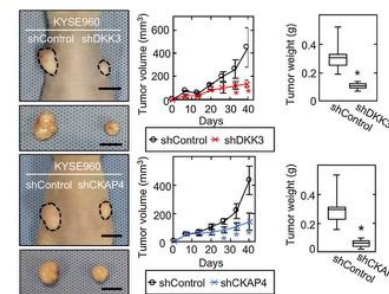
食道癌におけるDKK3発現

CKAP4はDKKファミリーと結合する



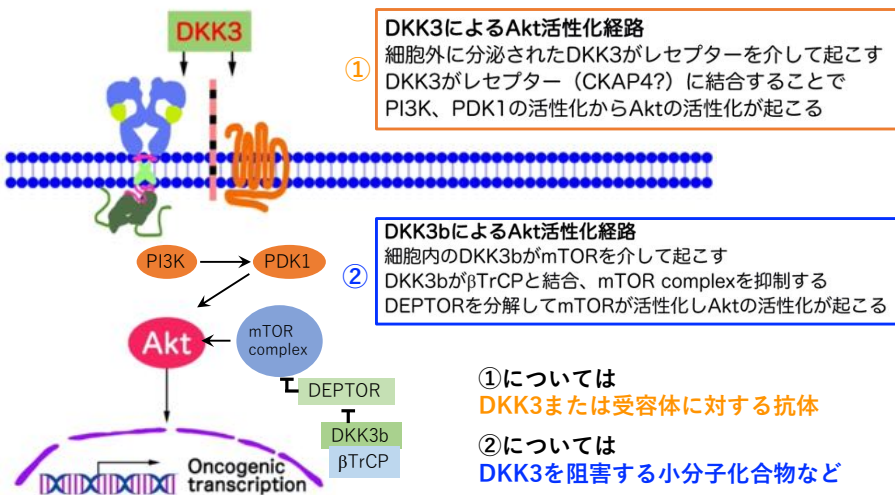
Kajiwara C et al. Cancer Res. 2018

DKK3/CKAP4抗体はESCC細胞の増殖を抑制

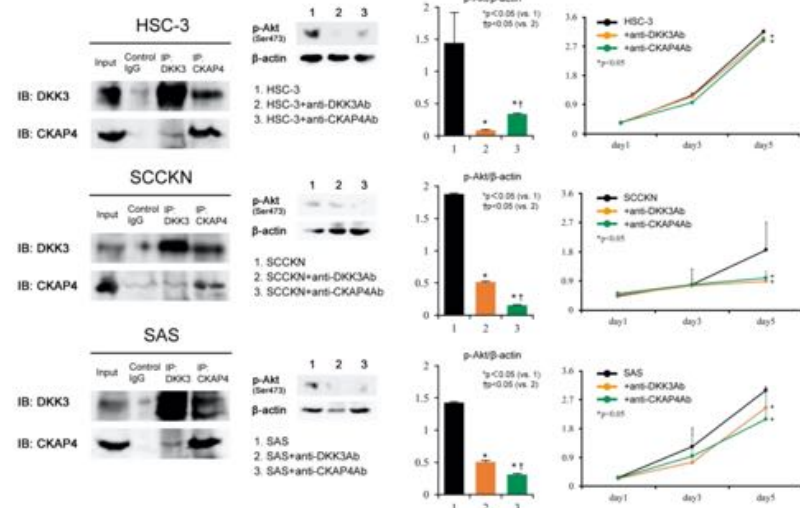


- 分泌型DKK3の受容体は長らく不明であったが、KajiwaraらはCKAP4がDKKファミリーと相互作用することを明らかにした。
- CKAP4は type II 膜貫通型タンパクで小胞体の構造維持に関わるが、細胞膜にも存在し数種のリガンドの受容体となるmulti-functional moleculeである。
- 食道扁平上皮癌ではDKK1/DKK3とCKAP4の共発現はPI3K-AKT経路を活性化して癌細胞の増殖を促進。DKK3/CKAP4に対する抗体は腫瘍抑制に有効である。

DKK3をターゲットとした腫瘍治療は可能か？



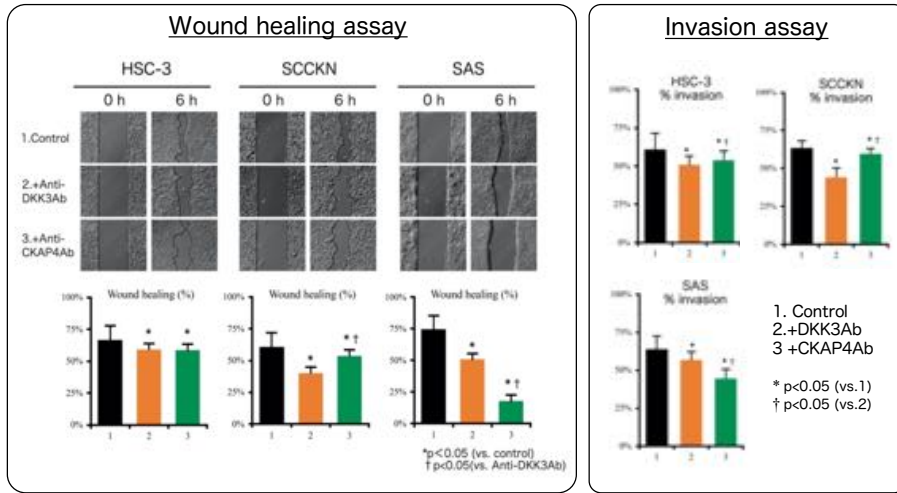
DKK3/CKAP4に対する抗体はHNSCC治療に応用可能か？



Katase N et al. Oral Dis. 2022

免疫沈降でOSCC細胞でもDKK3とCKAP4のタンパク相互作用が確認できた。 DKK3/CKAP4に対する抗体はAktのリン酸化と細胞増殖を有意に低下させた。

DKK3/CKAP4に対する抗体はHNSCC治療に応用可能か？



Katase N et al. Oral Dis. 2022

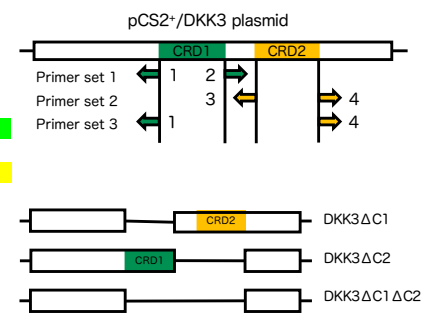
DKK3/CKAP4に対する抗体はいずれの細胞株でも遊走と浸潤を有意に低下させた。

DKK3を阻害するペプチドの開発

DKK3アミノ酸配列

MQRLGATLLC LLLAAAVPTA PAPAPTATSA PVKPGPALSY
 PQEATLNEM FREVVEELMED TQHKLRSAVE EMEAEAAAK
 ASSEVNLANL PPSYHNENTNT DTKVGNNTI H VREIHKITN
 NQTGMVFSE TVITSVGDEE GRRSHECIID EDCGPSMYCQ
 FASFQYTCQP CRGQRMLCTR DSECCGDQLC VWGHCITKMAT
 RGSNGTICDN QRDCQPLGCC AFQRGLLPV CTPLPVEGEL
 CHDPASRLLD LITWELEPDG ALDRCPACAG LLQPHSHSL
 VYVCKPTFVG SRDQGBEILL PREVPDEYEV GSFMEVVRQE
 LEDLERSLITE EMALGEPAAA AAALLGEEI

Signal peptide 21aa
 Cysteine Rich domain1 50aa
 Cysteine Rich domain2 66aa

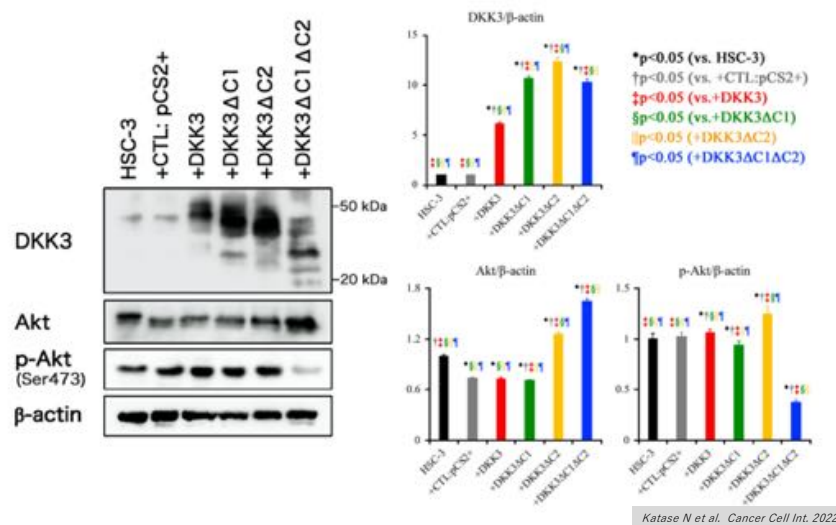


Primer	Sequence
1.DKK3ΔC1-U	5'- CTC GTG GCT CCT TCT GGC TTC TTC GTC -3'
2.DKK3ΔC1-D	5'- AAA ATG GCC ACC AGG GGC AGC AAT GGG -3'
3.DKK3ΔC2-U	5'- GAT GGT CCC ATT GCT GCC CCT GGT GGC C -3'
4.DKK3ΔC2-D	5'- CAG CCC CAC AGC CAC AGC CTG GTG TAT G -3'

DKK3には開始コドン (atg=M)が2箇所あり、Signal peptideを含む分泌型タンパクと、これを含まない非分泌型タンパク (DKK3b) をコードする。DKK3は機能ドメインと考えられる2つのcysteine rich domain (CRD)を有する。

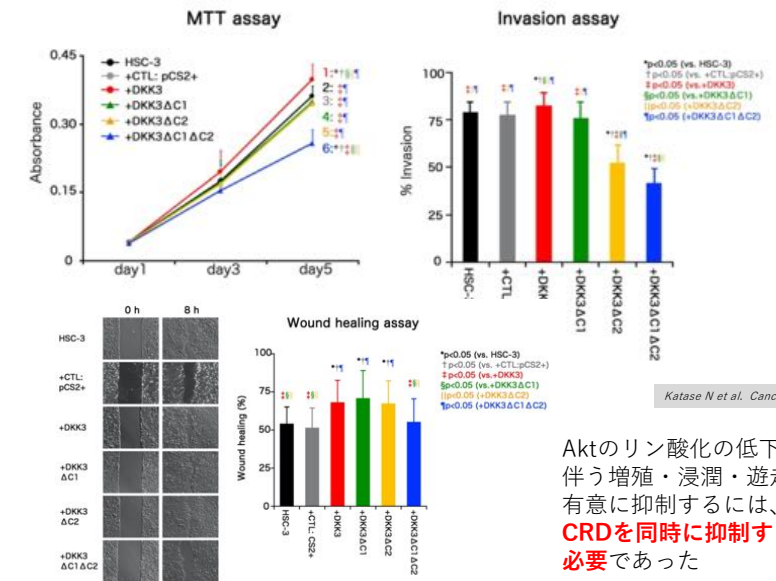
CRDのdeletion mutantを作製して導入し、機能ドメインを同定

DKK3機能ドメインの同定



Aktのリン酸化は +DKK3で増加し、+ΔC1、+ΔC2でも増加が維持されたが、+ΔC1ΔC2では対照群よりも有意に低下した。

DKK3機能ドメインの同定

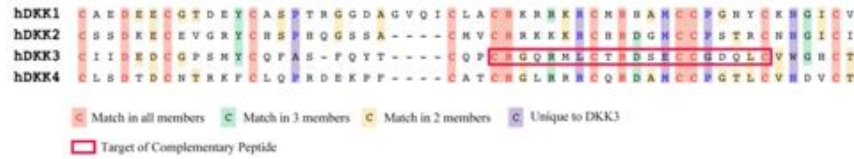


Aktのリン酸化の低下とこれに伴う増殖・浸潤・遊走を全て有意に抑制するには、2つのCRDを同時に抑制することが必要であった

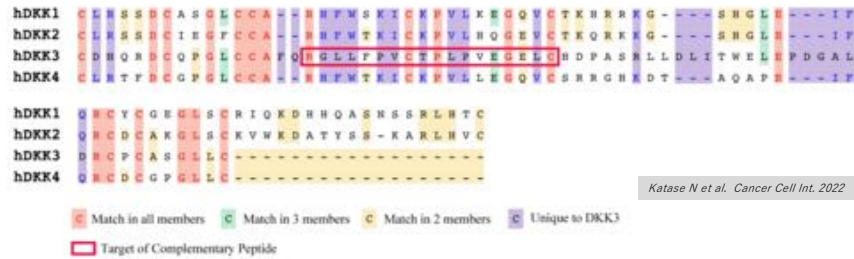
DKK3機能ドメインを阻害するペプチドの合成

DKK3機能ドメインを阻害するペプチドの合成

CRD1: DKK-type Cys-1



CRD2: DKK-type Cys-2



Katase N et al. Cancer Cell Int. 2022

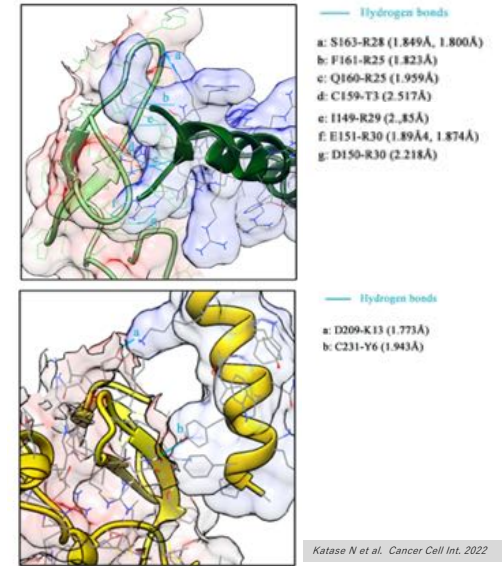
相補性ペプチドは蛋白科学研究所に受託してデザインした。

相補性ペプチドとは？

蛋白質内の特定の配列に特異的に結合してその機能を抑制するペプチド
以下の条件を満たす

1. 標的ペプチドに対して疎水性パターンが逆の値になって相補性になっている
2. 対応する位置のアミノ酸側鎖の容積が対応性でアミノ酸同士のα炭素が5Å以内に接近できる
3. ペプチド骨格のバックボーン並列性が一致している

CRD1、2についてそれぞれ10個の配列を得たが、全て実際に合成して100通りを試すのは現実的ではない。



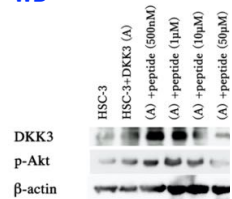
Katase N et al. Cancer Cell Int. 2022

モデリングとドッキングシミュレーションを実施

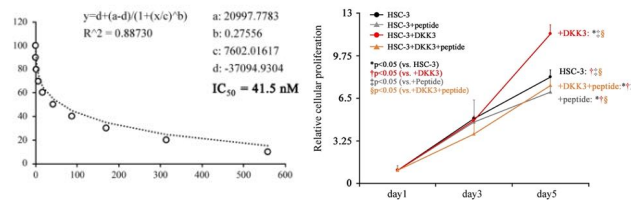
DKK3機能ドメイン阻害ペプチドの効果

DKK3機能ドメイン阻害ペプチドの効果

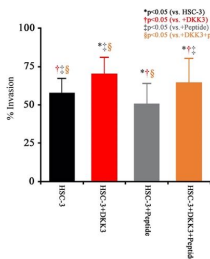
WB



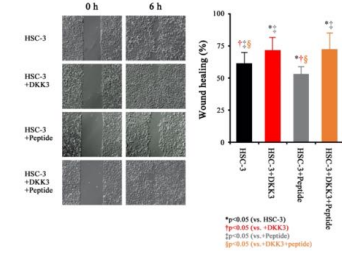
MTT assay



Invasion assay



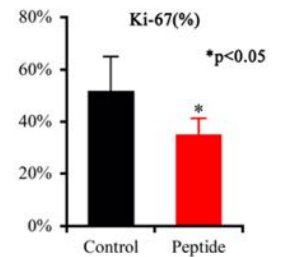
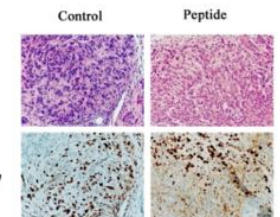
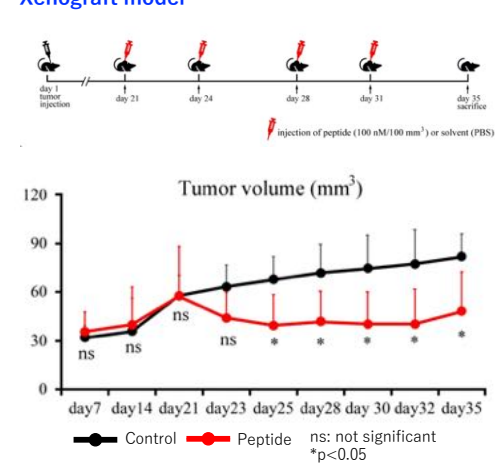
Migration assay



Katase N et al. Cancer Cell Int. 2022

DKK3阻害ペプチドは低用量 (IC₅₀=41.5nM) でAktのリン酸化を抑制でき、100nMで腫瘍の増殖・浸潤・遊走を有意に抑制できた。

Xenograft model



Katase N et al. Cancer Cell Int. 2022

相補性ペプチドを腫瘍細胞100mm³あたり100nMで注入すると腫瘍細胞の増殖が有意に抑制され、Ki-67 indexも有意に低下した。

総 括

- DKK3はWnt signalを抑制することから“がん抑制遺伝子”とされるが、DKK3を発現する腫瘍ではその機能は全く異なり、Aktリン酸化を介して腫瘍細胞の増殖・浸潤・遊走を有意に増大させる。
- DKK3に対する抗体や、機能ドメインであるCRDを阻害するペプチドはDKK3/Akt axisを抑制して抗腫瘍効果を示し得る。
- DKK3阻害ペプチドはHNSCCの新規治療オプションとなることが期待され、食道癌、膵臓癌などの他のDKK3発現を示す難治性がんへの適用も期待される（特許出願済み）。