

タイトル DKK4 の Wnt シグナル伝達経路への影響と腎癌におけるその有効性について

The effect of DKK4 in Wnt signaling pathways and role in human renal cancer

所属 氏名 山口大学医学部医学研究科 平田 寛

Yamaguchi University Graduate School of Medicine

派遣期間 2005 年 9 月 1 日～現在

September 1, 2005- current

研究機関 Department of Urology, San Francisco Veterans Affairs Medical Center and University of California at San Francisco, San Francisco, California

研究指導者 Prof. Rajvir Dahiya

Summary

The functional significance of Wnt antagonist DICKKOPF-4 (DKK4) has not been investigated in renal cancer. We initially found that the expression of DKK4 was significantly higher in renal cancer tissues compared to adjacent normal kidney tissues. To assess the function of DKK4, we established stable *DKK4* transfected cells and performed functional analyses including TCF/LEF reporter assay, cell viability, colony formation, apoptosis, cell cycle, invasive capability, wound healing capability and *in vivo* tumor growth. The relative TCF/LEF activity was significantly lower in *DKK4* transfected cells compared to empty vector, and nuclear beta-catenin expression was decreased in *DKK4* transfectants. Also beta-catenin downstream effector proteins, cyclinD1 and c-Myc, showed decreased expression in *DKK4* transfectants. However, higher invasiveness and migration was observed in stably transfected *DKK4* cells. We also found increased growth of *DKK4* transfected tumors in nude mice. Members of the Wnt non-canonical/JNK signaling pathway such as c-Jun expression and phosphorylation, and MMP-2 expression were significantly increased in *DKK4* stable transfectants. This is the first report to show that DKK4 expression is increased in renal cancer tissues and that DKK4 activates the non-canonical JNK signaling pathway while inhibiting the Wnt-canonical pathway.

研究目的

近年の診断技術の改良によって、早期腎細胞癌の発見数も着実に上昇しているが、残念なことに腎細胞癌固有の確実な分子マーカーは発見されていない。診断時に遠隔転移を認める症例も多い。腎細胞癌は他癌腫と性質を異にしており、一般的な化学療法や放射線療法に応答しにくい傾向があり、手術後再発を認めた場合は免疫療法が主な選択肢となってきた。

最近新たな治療方法として、Multi-kinase inhibitor の sorafenib や mTOR inhibitor、そして VEGF neutralizing antibody が認可され使用されつつあるが、日本国内では十分に使用されてはいない。

WNT シグナル経路は癌化シグナルの一つである。標準的な経路では WNT シグナルリガンドは Frizzled ファミリーの細胞表面受容体と LRP5/LRP6 co-receptors に結合し、最終的に β カテニンは転写因子の LEF1/TCF ファミリーと相互作用することによって、核内における下流の特異的な遺伝子発現を促進し癌化に深く関与する。この β カテニンを介した経路を canonical pathway という。Wnt シグナルにはこの他、 β カテニンを介さない経路、すなわち non-canonical pathway が存在し、これは大きく三つの経路から形成される (Wnt/ Ca^{2+} , Wnt/G protein, Wnt/PCP 伝達経路)。主には細胞の極性や細胞浸潤・転移に関与していると考えられている。

Wnt antagonist 遺伝子には、Wif1、sFRP family(sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, sFRP5)、DKK family (DKK1, DKK2, DKK3, DKK4)が含まれる。

我々の研究室ではこれら antagonist の腎癌における役割・意義に関して報告を重ねている。以前の報告例では大腸癌において、他の DKK family と同様に DKK4 も Wnt signal の阻害作用が報告されていたが、最近になって大腸癌の癌組

織において DKK4 の高発現を報告するグループがあらわれた。また我々は最初に DKK4 の発現が腎細胞癌の癌組織において、正常腎組織よりも有意に高いことを確認し、我々は DKK4 がどのように canonical non-canonical 経路に関与するのか、そして DKK4 の腎癌における役割、この二点を明らかにした。

本研究は Wnt antagonist の一つの DKK4 の腎癌における役割意義の解明に新たな知見を与えるものであり、大きな意義をもつと考える。

研究経過

1. DKK4 の腎細胞癌における発現レベル

我々は最初に、real time RT-PCR を用い、30 症例（全例 淡明細胞癌）の腎癌組織と正常腎組織での DKK4 の発現レベルを比較した。それぞれの正常組織の発現レベルを 1 とし、癌部における発現レベルを比較した。30 例中 19 例で、有意に癌部での DKK4 の発現が高かった。

2. TCF/LEF reporter assay

DKK4 が canonical pathway に関与しているか否かを判断するのに、 β カテニン signal のターゲットである TCF/LEF reporter assay を行った。relative TCF/LEF activity は、DKK4 で有意に下がった。また TCF/LEF の下流 effector である cyclinD1 と c-Myc のタンパク質発現レベルも有意に減少した。

3. DKK4 機能解析

腎癌における DKK4 の役割を解析するために、DKK4 発現ベクターによる様々な機能解析（colony formation assay、cell viability assay、invasion assay、wound

healing assay、in vivo study、apoptosis assay) を行った。腎細胞癌の cell line は A-498 と Caki-1 を使用した。DKK4 過剰発現ベクター群では、colony 形成能、細胞増殖能は有意に高く、invasion, migration ability も有意に高いことが認められた。In vivo の mouse model でも、腫瘍の増殖は DKK4 の stably transfectants にて高いことが示された。しかしながら、アポトーシスに関しては関与はまったく認められなかった。

4.DKK4 と non-canonical pathway との関連

TTCF/LEF reporter assay と cyclinD1, c-Myc の発現レベルの低下という観点からみて、DKK4 は canonical pathway、つまり beta-catenin dependent pathway を抑制していると考えられたが、逆に DKK4 の機能解析から考えると、DKK4 は腫瘍の増殖促進、つまり癌化を促進していることが観察された。

この相反する機能を証明するのに、我々はまず non-canonical pathway に着目し、その中でも JNK pathway に関係するタンパク質の発現レベルを Western blot にて検証した。JNK の発現は DKK4 にて上昇し、c-Jun およびリン酸化も亢進することが認められた。

考察

本研究において、DKK4 の Wnt signal における役割と、腎癌における関与について多くの知見が得られた。Wnt signal は多くの癌化に関連し、腎細胞癌においても例外ではない。DKK4 は Wnt antagonist に含まれ、他の癌腫においては Wnt シグナルを抑制すると考えられていたが、最近の大腸癌での報告同様、腎細胞癌では発現が正常組織に比べ上昇し、癌化に関与することが推測された。Wnt シグナルは、beta-catenin を介した canonical pathway と beta-catenin を介さない

non-canonical pathway に分類され、我々は最初に DKK4 が canonical pathway にどう関与するのかを確認するため、TCF/LEF reporter assay を行い、DKK4 が canonical signaling pathway を抑制することを発見した。この発見の裏付けのため、TCF/LEF の下流 effector の cyclinD1, および c-Myc のタンパク質発現レベルを Western blot にて検証し、TCF/LEF reporter assay 同様、DKK4 が canonical pathway を抑制していることを発見した。DKK4 は canonical pathway においては癌化を抑制するように作用するが、実際の DKK4 の機能解析においては、非常に興味深いことに、腎癌細胞の浸潤増殖を促進する結果が得られた。

この相反する DKK4 の持つ機能を解析するために、Wnt signaling pathway のもう一つの経路、つまり non canonical pathway に着目した。Non canonical pathway (Wnt/Ca²⁺, Wnt/G protein, Wnt/PCP signaling pathways) にも多くの経路が含まれるが、腎細胞癌においては、ほとんど解明されていない。その中でも、c-Jun-NH2-kinase (JNK) pathway はこの non-canonical pathway に含まれる (Wnt/PCP signaling pathway)、JNK の活性化は、さまざまな細胞ストレスに対するアポトーシスに関連する場合と、細胞増殖 つまりは anti-アポトーシスに関連する相反する二つがあることが分かっている。これまでも文献で、Wnt antagonist の中で、JNK と apoptosis に関連するものとしては、DKK3 が JNK の活性化を介して他の癌腫 (prostate cancer, testicular cancer, breast cancer) の apoptosis を促進に関与する報告例がある。また DKK1 が同様に JNK の活性化を介して、placental choriocarcinoma と mesothelioma の apoptosis を誘導する報告例も見られる。

今回の我々の研究においては、DKK4 は腎細胞癌の apoptosis の誘導には全く関与しなかった。次に JNK 活性化のもう一つの因子、つまり細胞増殖に関しては、non small-cell lung cancer biopsy samples にて癌化の促進に関与することが報

告されている。また breast cancer においても JNK の活性化は apoptosis の促進にはまったく関与しないが、腫瘍の浸潤には大きく関与するという報告がある。そのため、我々は JNK 経路に関係するタンパク質の発現レベルを検証し、JNK、c-Jun、リン酸化 c-Jun の上昇を DKK4 の過剰発現した腎癌細胞で認めた。DKK4 は JNK の活性化を介して細胞増殖・浸潤に関与することが推測された。また、JNK 経路の down stream の一つである MMP-2 のタンパク質発現レベルも、DKK4 の過剰発現細胞にて上昇した。DKK4 は canonical pathway を抑制するが、non-canonical pathway の JNK の活性化を介して腎細胞癌細胞の増殖・浸潤に関与することが認められた。

これらの知見は、手術後再発の早期の腎細胞癌のマーカーとして、今後の新たな診断・治療戦略の一部となり得ることが期待される。