



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | DCLK1 integrates induction of TRIB3, EMT, drug resistance and poor prognosis in colorectal cancer                                                     |
| Author(s)    | 牧野, 俊一郎                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 2020, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/76244">https://hdl.handle.net/11094/76244</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------|
| (申請者氏名) 牧野 俊一郎                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |               |
| 論文審査担当者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | (職) | 氏 名           |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 主 査 | 大阪大学教授 土岐 研一郎 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 副 査 | 大阪大学教授 小川 和孝  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 副 査 | 大阪大学教授 奥山 元臣  |
| <p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>Double cortin-like kinase 1 (DCLK1) は腫瘍進展に関わる治療標的分子となる可能性が報告されているものの、転移・浸潤機構に関わるシグナルなどの詳細なメカニズムに関する報告は少ない。本研究では、大腸癌におけるDCLK1発現の意義について検討することを目的とした。</p> <p>DCLK1は、大腸癌が浸潤・転移する過程に重要な役割を果たしていることを細胞実験で示した。DCLK1のサイレンシングを行なった細胞はMesenchymal Epithelial transition (MET) 様変化を認めた。IPA解析で、MET様変化が裏付けられ、Tribbles homolog 3 (TRIB3) との強い相関関係が疑われたため、TRIB3のsiRNAを行なったところ、DCLK1のサイレンシングを行なった細胞と同様に表現型のMET様変化を認めた。</p> <p>また抗癌剤オキサリプラチンとDCLK1阻害剤の併用によって有意に細胞増殖抑制効果が増強し、抗腫瘍効果は相乗効果であった。臨床検体においては、DCLK1高発現は全生存期間の独立予後不良因子であった。</p> <p>DCLK1はTRIB3の誘導を介して、大腸癌におけるEpithelial Mesenchymal transition (EMT)、薬剤耐性、および予後不良に関与し、治療標的となりうる可能性が示唆された本報告は学位に値するものと認める。</p> |     |               |

# 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名<br>Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 牧野 俊一郎                                                                                                                                                    |
| 論文題名<br>Title                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | DCLK1 integrates induction of TRIB3, EMT, drug resistance and poor prognosis in colorectal cancer<br>(DCLK1はTRIB3の誘導を介して、結腸直腸癌におけるEMT、薬剤耐性、および予後不良に関与する。) |
| 論文内容の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                           |
| 〔目 的(Purpose)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                           |
| <p>Double cortin-like kinase 1 (DCLK1) は神経系の分化、遊走や増殖に関わる分子として報告された。近年では、マウスにおける細胞系譜解析の結果から、腸管の癌幹細胞マーカーとして注目されている (Nature Genetics 2013)。その後、肺癌、肝癌などで腫瘍進展に関わる治療標的分子となる可能性が報告されているものの、転移・浸潤機構に関わるシグナルなどの詳細なメカニズムに関する報告は少ない。大腸癌におけるDCLK1発現の意義について検討することを目的とした。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                           |
| 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                           |
| 【対象と方法】                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                           |
| <p>市販の大腸癌細胞株 (SW480, HCT116) を用いて発現解析を行なった。またDCLK1のサイレンシングにはshort hairpin (sh) RNA (MISSION® shRNA, Sigma-Aldrich) を用いた。細胞増殖はCell counting kit-8 (Dojindo) で評価した。細胞浸潤活性をcell invasion assay kit (R &amp; D systems)を用いて評価した。各種細胞をRNA sequencingを用いて網羅的に解析し、IPA解析にて評価した。qRT-PCR, Western blottingでmRNA、タンパク質の発現を確認した。DCLK1の阻害剤(LRRK2 Kinase Inhibition)を使用し、単独での腫瘍抑制と、オキサリプラチンとの併用での大腸癌の増殖抑制効果の影響を検討した。臨床検体における評価は2007年から2013年までの間に当科で切除した連続した200例の切除検体を抗DCLK1抗体 (Abcam) を用いて免疫組織学的染色を行い臨床病理学的因子との相関関係を評価した。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                           |
| 【結果】                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                           |
| <p>特にSW480とHCT116において、DCLK1は高い発現を示した。両細胞株に対してshDCLK1を行うと増殖能・浸潤能・遊走能が抑制された。shDCLK1を行なった細胞はMesenchymal Epithelial transition (MET) 様変化を認めた。IPA解析で、MET様変化が裏付けられ、Tribbles homolog 3 (TRIB3) との強い相関関係が疑われたため、TRIB3のsiRNAを行なったところ、shDCLK1と同様に表現型のMET様変化を認めた。TRIB3のover expressionを行なった細胞はEpithelial Mesenchymal transition (EMT) 様変化を認めることを示した。またshDCLK1を行なった細胞をTRIB3のover expression を行うことで、Mesenchymal Epithelial transition (MET) 様変化がEpithelial Mesenchymal transition (EMT) 様変化に変化することを確認した。</p> <p>DCLK1を阻害することによるオキサリプラチンの増殖抑制効果への影響を調べるために、DCLK1をサイレンシングした大腸癌細胞株のSW480, HCT116にオキサリプラチンを投与することで、オキサリプラチンの腫瘍抵抗性が低下した。またDCLK1の阻害剤(LRRK2 Kinase Inhibition)は用量依存的に増殖を阻害した。2剤併用投与はオキサリプラチン単剤投与群と比較して有意に細胞増殖抑制効果が増強し、2剤併用での抗腫瘍効果は相乗効果であった。</p> <p>臨床検体の予後とDCLK1の発現との相関を確認すると、DCLK1の高発現は低発現のものと比較し、全生存期間、無再発生存期間において予後が不良であった (<math>p &lt; 0.0001</math>)。また単変量解析、多変量解析にて臨床病理学的因子との相関を確認すると、大腸癌臨床サンプルにおけるDCLK1の高発現は、腫瘍深達度・リンパ節転移とともに予後に相関 (<math>p = 0.0249</math>) し、臨床病理学的に悪性度が高いと考えられた。</p> |                                                                                                                                                           |
| 〔総 括(Conclusion)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                           |
| <p>大腸癌において、DCLK1がTRIB3を介して、EMTを制御していることが示唆される。DCLK1は、大腸癌が浸潤・転移する過程に重要な役割を果たしていると考えられる。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                           |