

ヒト膀胱癌細胞におけるDclk1阻害によるChk1リン酸化の抑制を
介したゲムシタビンの細胞傷害性効果の増強

氏名 河村 大智

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用医工学系専攻 器官制御医科学領域

器官病態外科学(外科学第一)

平成29年12月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	4
4. 方法	4-6
5. 結果	6-14
6. 考察	14-15
7. 結語	15
8. 謝辞	15
9. 参考文献	15-17

1. 要旨

膵癌の治療において、gemcitabine (GEM)はよく用いられるが、その効果は限定的である。そのため、GEM の細胞傷害性効果を増強させる標的分子の同定が必要である。最近の研究により、doublecortin-like kinase 1 (Dclk1)は膵癌細胞において腫瘍増殖、浸潤、転移、そして上皮間葉移行、多分化能、血管新生、抗アポトーシス関連因子を正に制御していることが明らかになった。それゆえ、Dclk1は膵癌に対する治療標的候補分子と考えられているが、Dclk1 のシグナル伝達経路は、その基質蛋白質を含めて明らかになっていない。Dclk1 によってリン酸化される基質候補蛋白質を同定するため、Dclk1 を Dclk1 阻害薬である LRRK2-IN-1(LRRK)によって阻害した膵癌細胞株 MIA Paca2 を用いた癌関連リン酸化蛋白質マイクロアレイ解析を行ったところ、ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR)経路に属するリン酸化 cdc25A およびリン酸化 Chk1 の発現レベルの減少が認められた。この結果から、Dclk1 は ATR 経路に関与していることが示唆された。この結果に一致して、GEM 誘導性の p-Chk1 の発現が LRRK によって有意に減少した。GEM 単剤では細胞周期が S 期で停止したが、GEM と LRRK の併用では細胞周期は S 期で停止せず進行した。加えて、GEM と LRRK の併用は GEM または LRRK 単剤に比べて γ -H2AX 陽性細胞数を増加させた。さらに、LRRK 単剤、GEM と LRRK の併用は GEM 単剤に比べて、caspase-3 の活性化と PARP1 の切断を誘導し、GEM と LRRK の併用は GEM 単剤に比べて有意に細胞生存率を減少させた。これらの結果は、Dclk1 阻害と GEM との併用は膵癌細胞の新規治療法となり得ることを示している。

2. 研究の背景

膵癌は予後不良な癌の1つで、5年生存率は8%である(1)。外科的切除は根治を期待できる治療法であるが、術後補助化学療法に gemcitabine (GEM) がしばしば用いられる(2)。核酸アナログ製剤である GEM により細胞周期は S 期で停止し(3)、checkpoint kinase 1 (Chk1) のリン酸化が引き起こされる (4, 5)。GEM と Chk1 阻害の組み合わせは、S 期での損傷 DNA の修復がなされず、そのまま細胞周期が進行し、M 期において致死的な染色体不安定性を引き起こし細胞死に至ると考えられており、これまでに併用効果が研究されてきた。予想された通り、GEM と Chk1 阻害の併用は GEM 単剤に比べて、コロニー形成を阻害し(4)、細胞死を増加させ(6)、腫瘍増殖を阻害した(7-10)。さらに、第 1 相の臨床試験が開始され、第 2 相での推奨用量が示されている(11-15)。しかしながら、正常細胞に対しても Chk1 阻害薬による影響がみられた(12, 16)ため、正常細胞への副作用がなく GEM の細胞傷害性効果を高め、癌細胞に特異的な標的分子の同定が必要である。Doublecortin-like kinase 1 (Dclk1) は Ca^{2+} /calmodulin 依存性 kinase 様ドメインをエンコードし、微小管重合を制御している(17, 18)。Dclk1 はヒト正常膵に比べて膵癌で高発現し (19)、膵癌細胞における腫瘍増殖、浸潤、転移、多分化能、血管新生を正に制御する(20-22)。キナーゼ阻害剤である XMD8-92 と LRRK2-IN-1 (LRRK) は、Dclk1 を阻害することによって腫瘍増殖を抑制し、上皮間葉移行や多分化能関連遺伝子の発現、c-MYC や KRAS のような癌遺伝子の発現を抑制した(23, 24)。しかしながら、Dclk1 のシグナル伝達経路はその基質蛋白質を含めて明らかとなっていない。

3. 目的

膵癌細胞における Chk1 のリン酸化、DNA 損傷、アポトーシス、細胞生存に対する GEM、LRRK 単剤、GEM と LRRK の併用による効果を比較・検討し、GEM と LRRK の併用の有用性の有無を明らかにすることを研究目的とする。

4. 方法

使用した細胞株と培地 ヒト膵癌細胞株である MIA Paca2 と PANC-1 を理研バイオリソースセンターから購入した。5% CO_2 を含む 37°C の加湿加温器内で培養した。

試薬 LRRK2-IN-1 は Merck Millipore (Darmstadt, Germany) から購入し、dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解した。Gemcitabine は Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan) から購入し、PBS で溶解した。LRRK2-IN-1 と gemcitabine は 4°C で保管した。

siRNAのトランスフェクション siRNAsはGE Dharmacon (Chalfont, UK)から購入した。Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて説明書に従い、On-Target plus Human DCLK1 (9201) siRNA-SMART pool (L-004884-00-0005)またはOn-Target plus Non-targeting Pool (D-001810-10-05) control siRNAをPANC-1細胞にトランスフェクションした。72時間培養し、Dclk1 siRNAまたはNon-target siRNAをトランスフェクションさせたPANC-1細胞を回収した。

Protein microarray Dclk1によってリン酸化される基質蛋白質を同定するため、我々はCancer Signaling Phospho Antibody Array (Full Moon BioSystems Inc., Sunnyvale, CA, USA)を用いてprotein microarrayを行った。このprotein microarrayには癌関連シグナル伝達経路に関わる269個のリン酸化蛋白質に対する抗体がプロットされている。DMSOまたはLRRK2-IN-1で処理したMIA Paca2細胞から採取したcell lysate、non-target siRNAまたはDclk1 siRNAをトランスフェクションしたPANC-1細胞から採取したcell lysateを準備し、protein microarrayと反応させた。反応後のprotein microarrayをGenePix 4000B microarray scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)でスキャンし、シグナルをGenePix Pro7で定量解析した。

ウェスタンブロットティング MIA Paca2細胞はDMSO、GEM (20 or 40 nM)、LRRK (10 μ M) またはGEM (20 or 40 nM)とLRRK (10 μ M)の併用で48時間処理した。PANC-1細胞はNon-target siRNAまたはDclk1 siRNAをトランスフェクションし、72時間培養した。細胞を回収し、RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1X protease inhibitor]で溶解し、30分間氷上で静置した。4°Cで20分間、20000 x gで遠心をかけ、上清をcell lysateとして回収した。蛋白質濃度はBCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で測定した。等量のcell lysate (30 μ g)をsample buffer(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)と混ぜ、20分間室温で反応させた。Polyacrylamide gelであるSuperSep Ace 10%または15% (Wako, Osaka, Japan)を用いたSDS-PAGEによりsample bufferと混合されたcell lysateを分離し、分離された蛋白質をImmobilon-P PVDF transfer membrane (Merck Millipore)に転写した。蛋白質が転写されたメンブレンを5% w/v ウシ血清アルブミンを含んだTBST (Tris-buffered saline containing Tween-20)で室温にて1時間ブロッキングさせた後、1:1000に希釈された目的蛋白質に対する1次抗体で4°Cにて一晩反応させた。Membraneを洗浄後に、1:5000に希釈されたhorseradish peroxidase標識の2次抗体で室温にて45分間反応させた。洗浄後に免疫複合体にAmersham ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA)を反応させ、Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)で検出した。Bandの蛍光強度はImageJ softwareを用いて測定した。本研究で用いた1次抗体は、抗DCAMKL1抗体 (Abgent, San Diego, CA, USA)、抗Chk1抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、抗Phospho-Chk1 (S345)抗体 (Cell Signaling Technology,

Danvers, MA, USA)、抗PARP-1 (F-2)抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗Caspase-3 (31A1067)抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 β -actin抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)である。本研究で用いた2次抗体は、horseradish peroxidase (HRP)で標識された抗マウスおよび抗ウサギポリクローナルヤギ免疫グロブリン(Dako, Glostrup, Denmark)である。

フローサイトメトリー解析 MIA Paca2細胞を6-well plateに 2×10^5 個/2 ml培地の密度で播いた。10% FBS を含んだDMEMで24時間培養した後、細胞周期のG0期に同期させるため、無血清のDMEMに交換した。無血清培地で24時間培養後、10% FBSを含んだDMEMに交換し、細胞をDMSO、GEM (40 nM)、LRRK (10 μ M)、またはGEM (40 nM)とLRRK (10 μ M)の併用で24時間処理した。細胞を回収し、70% ethanolで固定し-20°Cで30分間静置した。その後Cell Staining Buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA)で3回洗浄した。細胞懸濁液をpropidium iodide (PI)/RNase (Immunostep, Salamanca, Spain)およびFITC anti-H2A.X Phospho (Ser139) antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA)で反応させ、BD FACSAria III flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)で解析した。

生細胞アッセイ MIA Paca2細胞を96-wellのプレートに 1×10^4 個/wellの細胞密度で播いた。24時間培養した後、細胞はDMSO、GEM (40 nM)、LRRK (10 μ M)、またはGEM (40 nM)とLRRK (10 μ M)の併用で72時間処理し、Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque)を加えて37°Cで4時間インキュベーションした。450 nmでの吸光度をiMark microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で測定した。

統計解析 統計解析にはJMP Pro 11.2.0 software (SAS Institute Inc.)を使用した。群間の差異はTukey's testで評価した。P-values <0.05を統計学的に有意差ありとした。

5. 結果

Protein microarray 解析による Dcl1 によりリン酸化される基質候補蛋白質の同定

Dcl1 によってリン酸化される蛋白質を同定するため、癌のシグナル伝達経路に重要とされる269 個のリン酸化蛋白質に対する特異的抗体がプロットされた protein microarray に DMSO または LRRK で処理した MIA Paca2 細胞、Non-target または Dcl1 siRNA をトランスフェクションした PANC-1 細胞から作製した cell lysate を反応させた。Table I と II は、Dcl1 阻害膀胱癌細胞において、50%以上発現レベルが低下した癌関連リン酸化蛋白質を示している。P-Chk1 と、その下流にある p-cdc25A の発現レベルは、Dcl1 阻害 PANC-1 細胞および Dcl1 阻害 MIA Paca2 細胞、いずれにおいても低下していた。これらの蛋白質は ATR 経路に属し、細胞周期

チェックポイントを制御している。DMSO または LRRK で処理した MIA Paca2 細胞における、p-cdc25A、p-Chk1 の発現レベルは DMSO 処理に比べ、LRRK 処理により減少していた (Fig. 1A, Table I)。LRRK 処理で DMSO 処理に比べ Dclk1 の発現は減少する傾向がみられた (Fig. 1B)。これらの結果から、Dclk1 は cdc25A と Chk1 のリン酸化を正に制御して、細胞周期チェックポイントの制御に関与していることが示唆される。

**Table I. Dclk1 阻害 MIA Paca2 細胞において 50%以上
発現レベルが低下した癌関連リン酸化蛋白質**

Antibody name	Intensity		Ratio (%) (LRRK/ Control)
	Control (DMSO)	LRRK (50 μ M)	
Akt (Phospho-Ser473)	15278.5	500.5	3.28
cdc25A (Phospho-Ser75)	26021.0	1914.0	7.36
STAT1 (Phospho-Ser727)	27948.0	2471.0	8.84
JAK2 (Phospho-Tyr221)	16696.0	1557.0	9.33
FAK (Phospho-Tyr925)	18429.0	3475.0	18.86
c-Jun (Phospho-Ser243)	18280.5	4807.0	26.30
cdc25C (Phospho-Ser216)	19121.5	5211.0	27.25
BAD (Phospho-Ser112)	23047.5	7167.0	31.10
NF κ B-p105/p50 (Phospho-Ser893)	12876.5	4189.0	32.53
eEF2K (Phospho-Ser366)	17454.5	5932.0	33.99
JAK2 (Phospho-Tyr1007)	12732.0	5130.0	40.29
CDK2 (Phospho-Thr160)	17259.0	6985.0	40.47
BCL-2 (Phospho-Ser70)	16820.0	6861.0	40.79
Raf1 (Phospho-Ser259)	15261.5	6241.5	40.90
TYK2 (Phospho-Tyr1054)	16798.0	7063.0	42.05
BCL-2 (Phospho-Thr56)	14397.5	6312.5	43.84
c-Jun (Phospho-Thr239)	11045.5	5136.0	46.50
NF κ B-p105/p50 (Phospho-Ser907)	23004.5	11145.5	48.45
Chk1 (Phospho-Ser280)	17482.0	8578.5	49.07

**Table II. Dclk1 阻害 PANC-1 細胞において 50%以上
発現レベルが低下した癌関連リン酸化蛋白質**

Antibody name	Intensity		Ratio (%) (si-Dclk1/ Control)
	Control (non-target)	si-Dclk1	
cdc25A (Phospho-Ser75)	14935.2	3961.8	26.53
Fak (Phospho-Tyr397)	13761.0	4523.5	32.87
STAT4 (Phospho-Tyr693)	10683.7	4292.0	40.17
Chk1 (Phospho-Ser317)	19384.0	8719.8	44.98
PTEN (Phospho-Ser380/ Thr382/Thr383)	13016.7	6084.8	46.75
Src (Phospho-Tyr529)	25736.5	12031.7	46.75

si-Dclk1, Dclk1 siRNA.

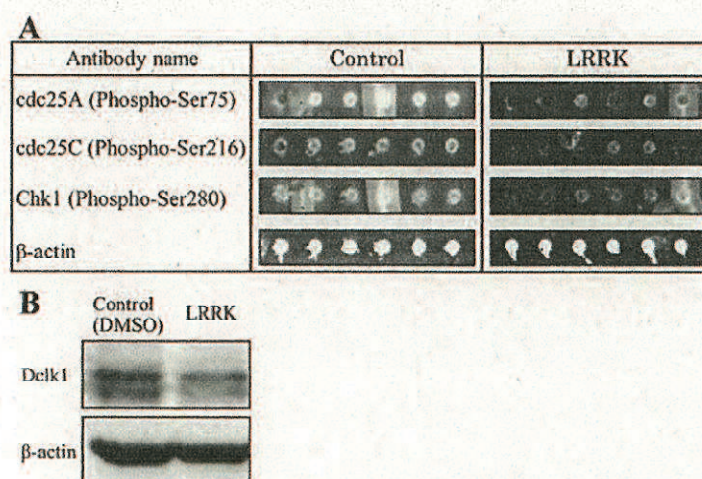


Figure 1. Protein microarray 解析による Dclk1 によりリン酸化される基質候補蛋白質の探索
 (A) DMSOまたはLRRK (40 μM)で72時間処理したMIA Paca2細胞から作製したcell lysateを用いてprotein microarray解析を行った。DMSOまたはLRRKで処理したMIA Paca2細胞における、cdc25A (Phospho-Ser75)、cdc25C (Phospho-Ser216)、Chk1 (Phospho-Ser280)、β-actinのprotein microarray画像を示している。
 (B) Protein microarrayで用いたcell lysateを用いてウェスタンブロットティングを行い、Dclk1とβ-actinの発現を検出した。β-actinはgelの各ウェルにアプライした全蛋白量を評価するのに用いた。

GEMはChk1のリン酸化を誘導し、GEMとLRRKの併用は有意にp-Chk1の発現を抑制した

Chk1のリン酸化に対するGEM、LRRKの単剤またはGEMとLRRKの併用効果を検討するため、MIA Paca2細胞をDMSO、GEM、LRRK、GEMとLRRKの併用で48時間処理し、ウェスタンブロットリングを行った。Dclk1の発現はLRRK処理によって抑制され、GEM処理によって変化しなかった(Fig. 2A and B)。予想通り、MIA Paca2細胞においてGEM処理はChk1のリン酸化を誘導し(Fig. 2C and D)、GEMとLRRKの併用によりp-Chk1の発現が抑制された(Fig. 2C and D)。

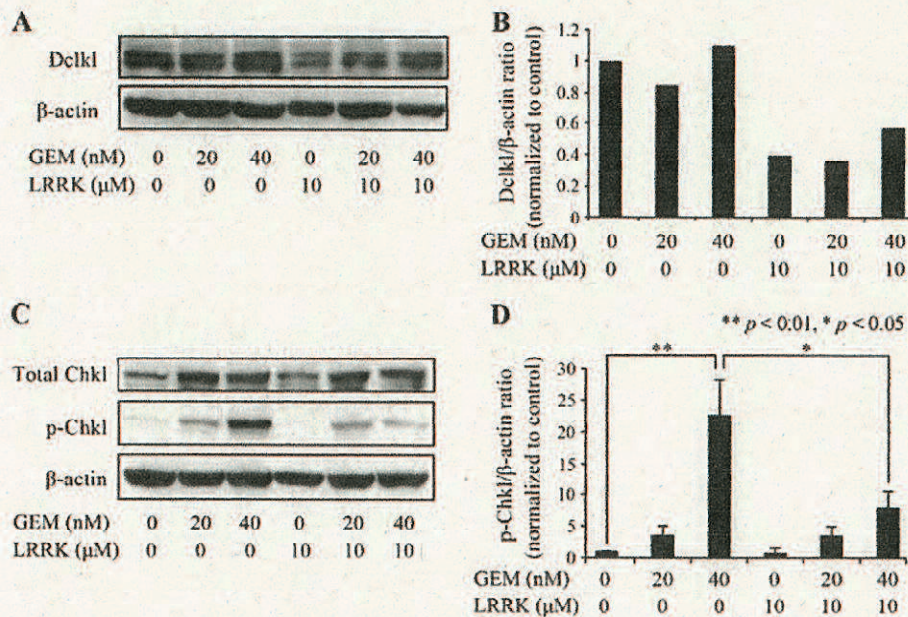


Figure 2. GEM、LRRK単剤、またはGEMとLRRKの併用処理によるp-Chk1の発現への影響

(A) DMSO、GEM単剤(20 nMまたは40 nM)、LRRK単剤(10 μM)、GEM(20 nMまたは40 nM)とLRRK(10 μM)の併用で48時間処理したMIA Paca2細胞から作製したcell lysateを用いてウェスタンブロットリングを行い、Dclk1とβ-actinの発現を検出した。β-actinはgelの各ウェルにアプライした全蛋白量を評価するのに用いた。

(B) ImageJ softwareを用いて検出された目的蛋白質のバンドを定量化した。β-actinに対するDCLK1の発現の比率は、コントロールにおける発現の比率を基準とした。

(C) DMSO、GEM単剤(20 nMまたは40 nM)、LRRK単剤(10 μM)、GEM(20 nMまたは40 nM)とLRRK(10 μM)の併用で48時間処理したMIA Paca2細胞から作製したcell lysateを用いてウェスタンブロットリングを行い、total Chk1、p-Chk1、β-actinの発現を検出した。β-actinはgelの各ウェルにアプライした全蛋白量を評価するのに用いた。

(D) ImageJ softwareを用いて検出された目的蛋白質のバンドを定量化した。β-actinに対するp-Chk1の発現の比率は、コントロールにおける発現の比率を基準とした。グラフのバーは、3回の実験での平均値 ± 標準誤差を表している。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, 有意差あり。

GEMとLRRKの併用処理はそれぞれの単剤処理に比べ、GEM誘導性の細胞周期停止を無効にし、DNA損傷を増加させた

細胞周期の進行とDNA損傷に対するGEM、LRRKの単剤またはGEMとLRRKの併用効果を検討するため、DMSO、GEM、LRRK単剤あるいはGEMとLRRKの併用で処理されたMIA Paca2細胞をPIと γ -H2AX抗体で反応させ、フローサイトメトリー解析を行った。無血清培地で24時間培養すると、ほとんどのMIA Paca2細胞はG0/G1期に留まっていた。過去に報告されているように、GEM単剤で処理するとS期で停止し(3)、コントロールに比べて γ -H2AX陽性細胞数が増加した(Fig. 3 and Table III)。LRRK単剤で処理すると細胞周期は進行し、コントロールに比べて γ -H2AX陽性細胞数が増加した(Fig. 3 and Table III)。重要なことに、GEMとLRRKの併用では、S期で停止せずに細胞周期は進行し、GEMまたはLRRK単剤に比べて、 γ -H2AX陽性細胞数が増加した(Fig. 3 and Table III)。

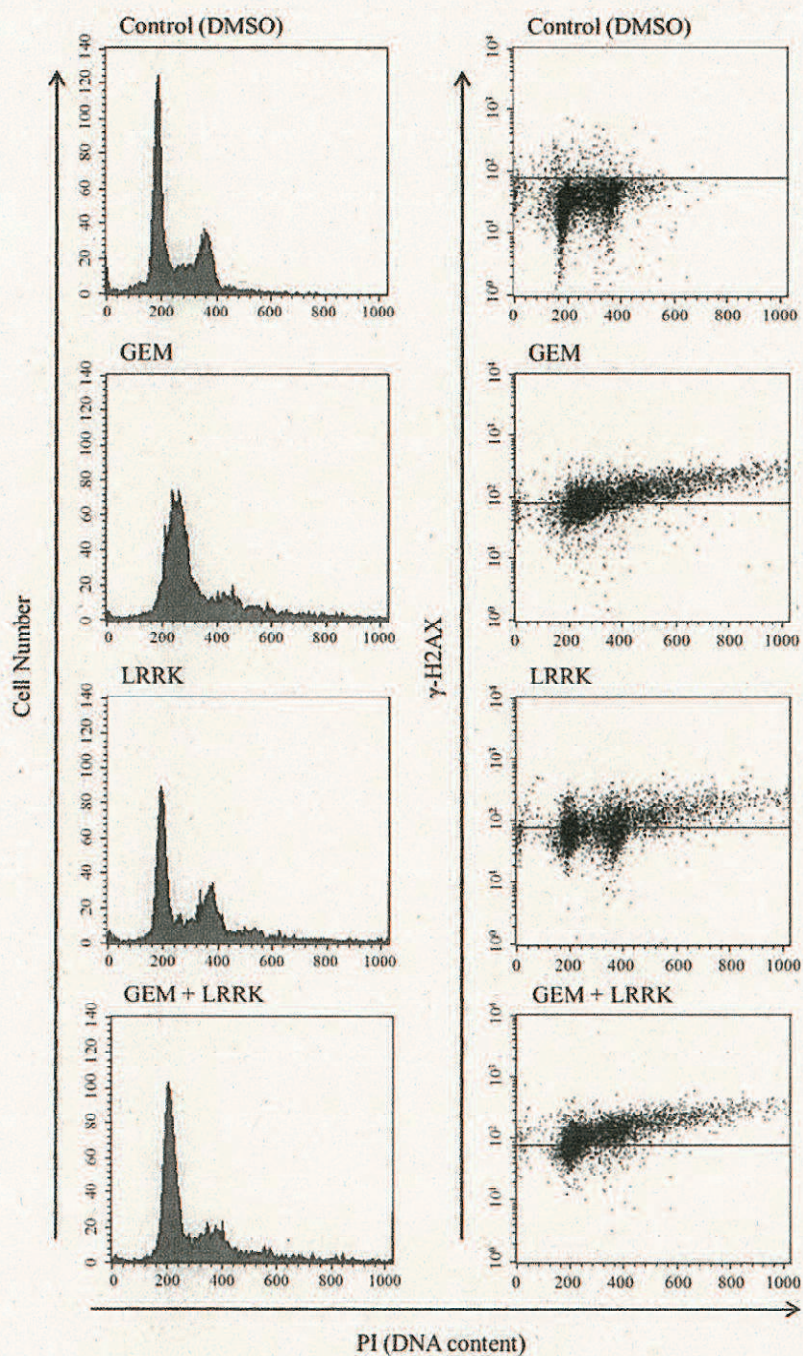


Figure 3. GEM、LRRK単剤、またはGEMとLRRKの併用処理による細胞周期とDNA損傷への影響

24時間無血清培地で培養し、MIA Paca2細胞をDMSO、GEM単剤(40 nM)、LRRK単剤(10 μM)、GEM (40 nM)とLRRK(10 μM)の併用で処理し、フローサイトメリー解析を行った。横軸はPIの蛍光強度を示している。縦軸は細胞数(左側)、γ-H2AX発現レベル(右側)を示している。フローサイトメリー解析での代表的な結果を示している。

Table III. 細胞周期の各期における γ -H2AX陽性細胞数の割合

Treatment	sub-G1	G1	S	G2/M	Total
Control					
γ -H2AX (+)	0.81	1.37	0.98	2.49	5.65
γ -H2AX (-)	4.01	53.81	12.49	24.04	94.35
Total	4.82	55.18	13.47	26.53	100.00
GEM					
γ -H2AX (+)	0.66	11.19	27.37	29.14	68.36
γ -H2AX (-)	1.32	12.00	15.81	2.51	31.64
Total	1.98	23.19	43.18	31.65	100.00
LRRK					
γ -H2AX (+)	0.95	16.42	5.85	29.79	53.01
γ -H2AX (-)	1.65	28.53	4.41	12.40	46.99
Total	2.60	44.95	10.26	42.19	100.00
GEM + LRRK					
γ -H2AX (+)	0.61	38.10	13.35	28.76	80.82
γ -H2AX (-)	0.48	16.02	1.56	1.12	19.18
Total	1.09	54.12	14.91	29.88	100.00

LRRK 単剤および GEM と LRRK の併用は caspase-3 の活性化と PARP1 の切断を引き起こす

アポトーシスにおける GEM、LRRK 単剤または GEM と LRRK の併用効果を検討するため、MIA Paca2 細胞を DMSO、GEM、LRRK 単剤または GEM と LRRK の併用で 48 時間処理し、ウェスタンブロッティングを行った。注目すべきことに、GEM 単剤では caspase-3 の活性化と PARP1 の切断がほとんど引き起こされなかったが、LRRK 単剤や GEM と LRRK の併用では caspase-3 の活性化と PARP1 の切断が引き起こされた (Fig. 4A)。GEM と LRRK の併用は PARP1 の切断を GEM 単剤に比べ有意に増加させた (Fig. 4B)。GEM 単剤は intact PARP1 の発現を増加させ、GEM と LRRK の併用は cleaved caspase-3 を増加させる傾向がみられた。したがって、GEM と LRRK の併用では、cleaved PARP1 の増加が引き起こされたと考えられた。

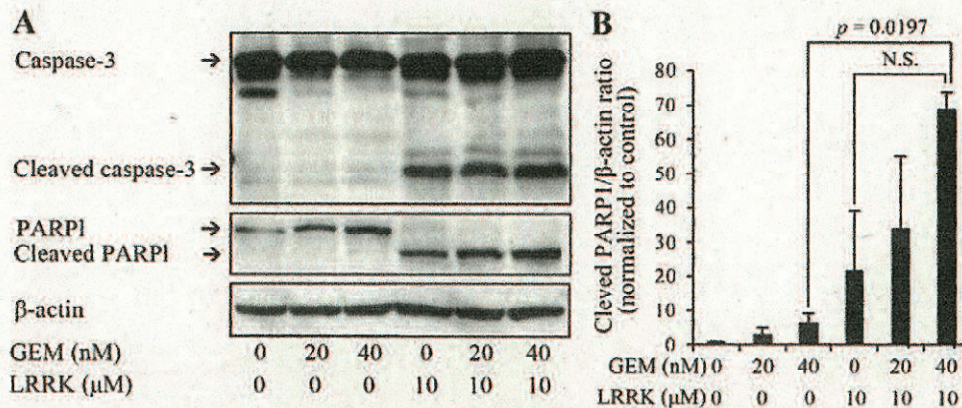


Figure 4. GEMまたはLRRK単剤、またはGEMとLRRKの併用処理によるcaspase-3活性化およびPARP1切断への影響

(A) DMSO、GEM単剤(20 nMまたは40 nM)、LRRK単剤(10 μM)、またはGEM(20 nMまたは40 nM)とLRRK(10 μM)の併用で48時間処理したMIA Paca2細胞から作製したcell lysateを用いてウェスタンブロッティングを行い、caspase-3、切断型caspase-3、PARP1、切断型PARP1、β-actinの発現を検出した。β-actinはgelの各ウェルにアプライした全蛋白量を評価するのに用いた。

(B) ImageJ softwareを用いて検出された目的蛋白質のバンドを定量化した。β-actinに対する切断型PARP1の発現の比率は、コントロールにおける発現の比率を基準とした。グラフのバーは、3回の実験での平均値 ± 標準誤差を表している。

GEM と LRRK の併用は GEM 単独に比べて有意に MIA Paca2 の細胞生存率を低下させた

MIA Paca2の細胞生存に対する、GEM、LRRKの単剤またはGEMとLRRKの併用効果を検討するために、MIA Paca2細胞をDMSO、GEM、LRRK、またはGEMとLRRKの併用で72時間処理し、生細胞アッセイを行った。GEMまたはLRRKの単剤でも細胞生存率はある程度低下した(Fig. 5)。GEMとLRRKの併用はGEM単剤と比べて有意に細胞生存率を低下させ、LRRK単剤と比べて有意差はないものの細胞生存率を低下させる傾向がみられた(Fig. 5)。

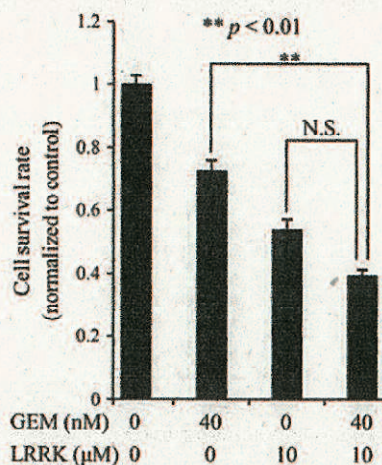


Figure 5. GEM、LRRK単剤、またはGEMとLRRKの併用処理による細胞生存率への影響
 MIA Paca2細胞をDMSO、GEM (40 nM)、LRRK (10 μM)、またはGEM (40 nM)とLRRK (10 μM)の併用で48時間処理し、細胞生存率を評価するため生細胞アッセイを行った。コントロールにおける細胞生存率を基準とした。グラフのバーは、3回の実験での平均値 ± 標準誤差を表している。
 **, $p < 0.01$, 有意差あり; N.S., 有意差なし。

6. 考察

本研究では、癌関連リン酸化蛋白質がプロットされた protein microarray に Dclk1 を阻害させた膵癌細胞から作製した cell lysate を反応させて、Dclk1 によってリン酸化される基質蛋白質の候補を同定した。Dclk1 阻害により、発現レベルが 50% 以下となった蛋白質の中には、p-cdc25A および p-Chk1 が含まれていた。これらの蛋白質は細胞周期チェックポイントを制御している ATR 経路に属している。Chk1 は活性化 ATR によってリン酸化され、p-Chk1 は cdc25A をリン酸化し、細胞周期停止を誘導している。すなわち、p-Chk1 は cdc25A の上流にあり、cdc25A は p-Chk1 の基質蛋白質である。そのため、我々は Dclk1 によってリン酸化される基質蛋白質の候補として Chk1 に着目した。予想通り、GEM によって誘導される p-Chk1 の発現レベルは Dclk1 阻害によって有意に減少した。GEM により S 期で停止した細胞周期は、GEM と LRRK の併用により、S 期で止まることなく進行した。さらに、GEM と LRRK の併用は GEM 単剤に比べて DNA 損傷、アポトーシス、細胞死を増加させた。これらの結果に基づいて、我々は、GEM と LRRK の併用が細胞死を増加させた機序について次のように考察した。それは、Dclk1 の阻害により、GEM によって引き起こされる p-Chk1 の発現は抑制され、その結果、細胞周期チェックポイントが破綻する。そのため、細胞周期は S 期で停止せず、損傷 DNA の修復がなされないまま細胞周期が進行し、致死的染色体不安定性により細胞死に至る、というものである。さらに、O'Connell らは、Dclk1 の short form はヒト大腸癌細胞で発現し、long form

は正常大腸細胞に発現している、と最近報告した(25)。本研究では、MIA Paca2 細胞において Dclk1 の short form が検出された。他のヒト膵癌細胞株や膵癌組織、正常膵において Dclk1 のどちらの form がみられるか、さらなる研究が必要であると考えられる。

7. 結語

GEM と Dclk1 阻害薬である LRRK の併用は、細胞周期チェックポイントを破綻させ、GEM 単剤に比べて有意に細胞生存率を低下させた。GEM と Dclk1 を標的とした治療は、膵癌に対する将来の新規治療法となり得ると考えられる。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学講座(第一外科)、濱野公一教授に深謝申し上げます。また、実験のご指導を頂きました、竹本圭宏先生(山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学講座)、西本新先生(山口大学大学院医学系研究科医学教育学講座)、上野耕司先生(山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学講座)に感謝申し上げます。水上洋一教授(山口大学遺伝子実験施設長)には細胞周期解析についてご指導いただき、感謝申し上げます。また、弘中紫氏には技術的協力をいただき、感謝いたします。

9. 参考文献

1. Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67: 7-30, 2017.
2. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T and Takaori K: Pancreatic cancer. *Lancet* 388: 73-85, 2016.
3. Shi Z, Azuma A, Sampath D, Li YX, Huang P and Plunkett W : S-Phase arrest by nucleoside analogues and abrogation of survival without cell cycle progression by 7-hydroxystaurosporine. *Cancer Res* 61: 1065-1072, 2001.
4. Karnitz LM, Flatten KS, Wagner JM, Loegering D, Hackbarth JS, Arlander SJH, Vroman BT, Thomas MB, Baek YU, Hopkins KM, *et al*: Gemcitabine-induced activation of checkpoint signaling pathways that affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol* 68: 1636-1644, 2005.
5. Morgan MA, Parsels LA, Parsels JD, Mesiwala AK, Maybaum J and Lawrence TS: Role of checkpoint kinase 1 in preventing premature mitosis in response to gemcitabine. *Cancer Res* 65: 6835-6842, 2005.

6. Parsels LA, Morgan MA, Tanska DM, Parsels JD, Palmer BD, Booth RJ, Denny WA, Canman CE, Kraker AJ, Lawrence TS, *et al*: Gemcitabine sensitization by checkpoint kinase 1 inhibition correlates with inhibition of a Rad51 DNA damage response in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 8: 45-54, 2009.
7. Venkatesha VA, Parsels LA, Parsels JD, Zhao L, Zabludoff SD, Simeone DM, Maybaum J, Lawrence TS and Morgan MA: Sensitization of pancreatic cancer stem cells to gemcitabine by Chk1 inhibition. *Neoplasia* 14: 519-525, 2012.
8. Montano R, Thompson R, Chung I, Hou H, Khan N and Eastman A: Sensitization of human cancer cells to gemcitabine by the Chk1 inhibitor MK-8776: Cell cycle perturbation and impact of administration schedule in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 13: 604, 2013.
9. Koh SB, Courtin A, Boyce RJ, Boyle RG, Richards FM and Jodrell DI: CHK1 inhibition synergizes with gemcitabine initially by destabilizing the DNA replication apparatus. *Cancer Res* 75: 3583-3595, 2015.
10. Barnard D, Diaz HB, Burke T, Donoho G, Beckmann R, Jones B, Barda D, King C and Marshall M: LY2603618, a selective CHK1 inhibitor, enhances the anti-tumor effect of gemcitabine in xenograft tumor models. *Invest New Drugs* 34: 49-60, 2016.
11. Seto T, Esaki T, Hirai F, Arita S, Nosaki K, Makiyama A, Kometani T, Fujimoto C, Hamatake M, Takeoka H, *et al*: Phase I, dose-escalation study of AZD7762 alone and in combination with gemcitabine in Japanese patients with advanced solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* 72: 619-627, 2013.
12. Sausville E, Lorusso P, Carducci M, Carter J, Quinn MF, Malburg L, Azad N, Cosgrove D, Knight R, Barker P, *et al*: Phase I dose-escalation study of AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with gemcitabine in US patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 73: 539-549, 2014.
13. Daud AI, Ashworth MT, Strosberg J, Goldman JW, Mendelson D, Springett G, Venook AP, Loechner S, Rosen LS, Shanahan F, *et al*: Phase I dose-escalation trial of checkpoint kinase 1 inhibitor MK-8776 as monotherapy and in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 33: 1060-1066, 2015.
14. Doi T, Yoshino T, Shitara K, Matsubara N, Fuse N, Naito Y, Uenaka K, Nakamura T, Hynes SM and Lin AB: Phase I study of LY2603618, a CHK1 inhibitor, in combination with gemcitabine in Japanese patients with solid tumors. *Anticancer Drugs* 26: 1043-1053, 2015.
15. Calvo E, Braithe F, Von Hoff D, McWilliams R, Becerra C, Galsky MD, Jameson G, Lin J, McKane S, Wickremesinhe ER, *et al*: Phase I study of CHK1 inhibitor LY2603618 in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Oncology* 91: 251-260, 2016.
16. Goto H, Izawa I, Li Ping and Inagaki M: Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is

- checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci* 103: 1195-1200, 2012.
17. Lin PT, Gleeson JG, Corbo JC, Flanagan L and Walsh CA: DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J Neurosci* 20: 9152-9161, 2000.
18. Omori Y, Suzuki M, Ozaki K, Harada Y, Nakamura Y, Takahashi E and Fujiwara T: Expression and chromosomal localization of KIAA0369, a putative kinase structurally related to Doublecortin. *J Hum Genet* 43: 169-177, 1998.
19. Mohammed A, Janakiram NB, Madka V, Brewer M, Ritchie RL, Lightfoot S, Kumar G, Sadeghi M, Patlolla JMR, Yamada HY, *et al*: Targeting pancreatitis blocks tumor-initiating stem cells and pancreatic cancer progression. *Oncotarget* 6: 15524-15539, 2015.
20. Sureban SM, May R, Qu D, Weygant N, Chandrakesan P, Ali N, Lightfoot SA, Pantazis P, Rao CV, Postier RG, *et al*: DCLK1 regulates pluripotency and angiogenic factors via microRNA dependent mechanisms in pancreatic cancer. *PLoS One* 8: e73940, 2013.
21. Sureban SM, May R, Lightfoot SA, Hoskins AB, Lerner M, Brackett DJ, Postier RG, Ramanujam R, Mohammed A, Rao CV, *et al*: DCAMKL-1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cells through a miR-200a-dependent mechanism. *Cancer Res* 71: 2328-2338, 2011.
22. Ito H, Tanaka S, Akiyama Y, Shimada S, Adikrisna R, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, *et al*: Dominant expression of DCLK1 in human pancreatic cancer stem cells accelerates tumor invasion and metastasis. *PLoS One* 11: e0146564, 2016.
23. Sureban SM, May R, Weygant N, Qu D, Chandrakesan P, Bannerman-Menson E, Ali N, Pantazis P, Westphalen CB, Wang TC, *et al*: XMD8-92 inhibits pancreatic tumor xenograft growth via a DCLK1-dependent mechanism. *Cancer Lett* 351: 151-161, 2014.
24. Weygant N, Qu D, Berry WL, May R, Chandrakesan P, Owen DB, Sureban SM, Ali N, Janknecht R and Houchen CW: Small molecule kinase inhibitor LRRK2-IN-1 demonstrates potent activity against colorectal and pancreatic cancer through inhibition of doublecortin-like kinase 1. *Mol Cancer* 13: 103, 2014.
25. O'Connell MR, Sarkar S, Luthra GK, Okugawa Y, Toiyama Y, Gajjar AH, Qiu S, Goel A and Singh P: Epigenetic changes and alternate promoter usage by human colon cancers for expressing DCLK1-isoforms: Clinical implications. *Sci Rep* 5: 14983, 2015.