

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15064

研究課題名(和文)細胞膜受容体CKAP4のエクソソームへの輸送メカニズムと生理機能の解析

研究課題名(英文)Analysis of translocation mechanism and function of cell membrane receptor CKAP4 to exosome

研究代表者

木村 公一 (KIMURA, HIROKAZU)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：60595370

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、分泌タンパク質DKK1の新規受容体CKAP4のエクソソームへの移行に関与する遺伝子を探索し、ALIX、Rab27a、Rab27b、VPS26a、およびVPS35が重要であることを明らかにした。さらに、膵がん患者血清エクソソーム中CKAP4を測定し、膵がん手術症例のうち免疫染色でCKAP4が陽性の症例の血清CKAP4が、健常人、および免疫染色でCKAP4が陰性の症例に比べて有意に高値になることを明らかにした。以上の結果から、エクソソーム中CKAP4が膵がん症例の中でCKAP4の発現している症例を同定するための新規腫瘍マーカーとなりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性がんである膵がんにおいて新規治療法が求められており、これまでにDKK1-CKAP4シグナルが膵がんの新規治療標的になりうることを明らかにしている。本研究では、CKAP4のエクソソームへの移行メカニズムを明らかにし、血清エクソソーム中CKAP4の測定法を開発した。さらに、血清CKAP4が膵がん症例でCKAP4が発現する症例(DKK1-CKAP4シグナルが活性化する可能性がある症例)を同定するためのコンパニオン診断薬となりうることを明らかにした。

本研究結果は、DKK1-CKAP4シグナルを標的としたがんの新規診断法および治療法の開発につながる可能性があり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文): In this study, the translocation mechanism of CKAP4, a novel receptor of secreted protein DKK1, to exosome was analyzed. Among many genes associated with exosome biosynthesis, it was revealed that ALIX, Rab27a, Rab27b, VPS26a, and VPS35 are involved in translocation of CKAP4 to exosome. Furthermore, CKAP4 in exosome from serum of patients with pancreatic cancer was measured. Serum CKAP4 levels of immunohistochemically CKAP4-positive cases were significantly higher than those of CKAP4-negative cases and healthy control individuals. Expression levels of CKAP4 in exosome were high in preoperative sera, whereas it was greatly reduced in postoperative sera. These results suggest that CKAP4 secreted with exosomes in serum may represent a biomarker for pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍医学

キーワード：CKAP4 DKK1 エクソソーム コンパニオン診断 腫瘍マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Wnt は線虫やショウジョウバエからヒトまで種間を越えて高度に保存された分泌性の糖タンパク質であり、Wnt によって活性化される細胞内シグナル伝達経路には、 β -カテニン経路と β -カテニン非依存性経路が存在する (Kikuchi, A., et al., Trends Cell Biol., 2009)。DKK1 は、胎生期に β -カテニン経路を抑制することにより、形態形成を適正化する重要な細胞増殖制御因子である。DKK1 は Wnt 受容体 LRP6 に結合し、エンドサイトーシスを誘導する結果、細胞表面の LRP6 を減少させ β -カテニン経路を抑制することが示されている (Yamamoto, H., et al., Dev Cell., 2008)。 β -カテニン経路の異常活性化が発がんを促進するために、DKK1 はがん抑制機能を有すると考えられていた。一方、DKK1 が Wnt シグナルとは関係なく、がん細胞の増殖を促進する可能性も示唆されていた (Sato, N., et al., Cancer Res., 2010) が、DKK1 がどのようにして細胞のがん化を促進するのかは不明であった。私共は、DKK1 の新規受容体として Cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) を同定した。CKAP4 は II 型膜タンパク質 (N 端側を細胞質側に向ける細胞膜 1 回貫通タンパク質) であるが、その機能は十分に理解されていなかった。また、CKAP4 ががんと関連することも示されていなかった。私共は、DKK1 は細胞膜上の CKAP4 と結合することにより、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸キナーゼ (PI3K) と AKT を活性化して、がん細胞の増殖を亢進することを明らかにした。また、免疫組織学的検討により、膵がん、肺がん、食道がん症例において DKK1 と CKAP4 は約 4~6 割の頻度でがん組織特異的に発現しており、両タンパク質が発現している症例は、それ以外の症例に比して有意に予後不良であることを明らかにした (図 1)。したがって、DKK1 と CKAP4 の両タンパク質の発現ががん発症と予後に関与する可能性が考えられた。DKK1 と CKAP4 が共に発現している膵がん細胞株 S2-CP8 細胞、肺がん細胞株 A549 細胞、食道がん細胞株 TE-8 細胞に対する DKK1 または CKAP4 の発現抑制により、AKT 活性化および細胞増殖能は抑制され、さらに *in vivo* (ヌードマウス皮下腫瘍形成) の実験系において、これらのがん細胞株の腫瘍形成が抑制された。また、CKAP4 の細胞外領域を抗原として作製した抗 CKAP4 抗体が、DKK1 と CKAP4 の結合阻害を示すとともに、上述の複数のがん細胞株による皮下腫瘍形成を阻害した (図 2)。これらの研究成果は、DKK1 と CKAP4 の両タンパク質が発現したがんにおいて、DKK1 が CKAP4 に結合するとがん細胞の増殖が促進すること、CKAP4 がヒトがんにおいて新規の腫瘍マーカーならびに治療標的となる可能性を示すものである。

エクソソームは 30~150 nm のサイズの細胞から分泌される小胞体で、内部に様々なタンパク質や脂質、RNA が含まれており、別の細胞に運搬されることによって機能的変化や生理的变化を引き起こす。がん細胞特異的なエクソソームの内容物が他臓器に前転移ニッチを形成し (転移先となる標的細胞の質的变化を促す)、がんの転移を促進すること (Peinado, d., et al., Nat Med., 2012) や、がん遺伝子そのものがエクソソームを介して細胞間を移送し、がんの進行を促進すること (Al-Nedawi, K., et al., Nat Cell Biol., 2008) など、がんの進行にエクソソームが関与することが多数報告されている。私共は、エクソソームデータベース (ExoCarta) 検索より CKAP4 がエクソソーム中存在するタンパク質として登録されていることを見出し、がん細胞株において CKAP4 がエクソソーム中に存在する一方で、非腫瘍細胞株では存在しないことを確認した。また、複数のがん細胞株で細胞膜上の CKAP4 とエクソソーム中 CKAP4 の発現に相関があることを明らかにした (図 3)。さらに、細胞膜上の CKAP4 のエクソソームへの移行に、DKK1 依存性及びクラスリン依存性のエンドサイトーシスが重要であることを明らかにした。しかし、CKAP4 のエクソソームへの輸送メカニズム、エクソソーム中 CKAP4 の生理機能は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、(1) CKAP4 のエクソソームへの輸送に重要な遺伝子を明らかにし、(2) エクソソーム中 CKAP4 の生理機能を解明することを目的とした。

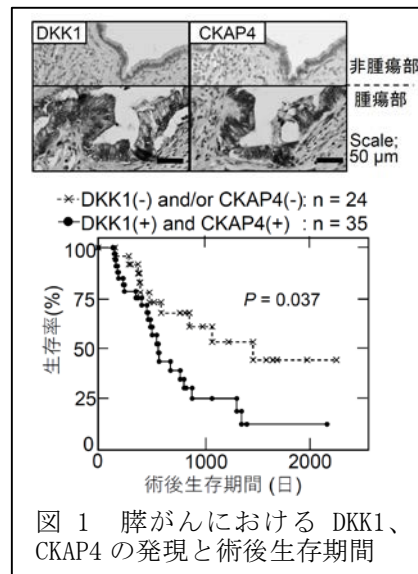


図 1 膵がんにおける DKK1、CKAP4 の発現と術後生存期間

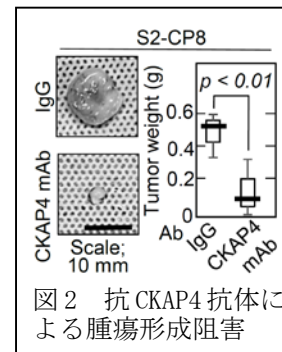


図 2 抗 CKAP4 抗体による腫瘍形成阻害

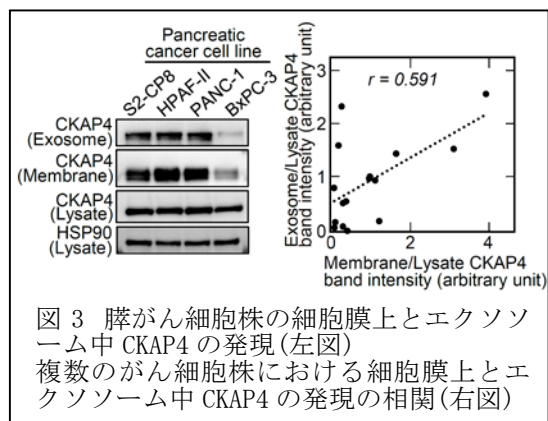


図 3 膵がん細胞株の細胞膜上とエクソソーム中 CKAP4 の発現 (左図) 複数のがん細胞株における細胞膜上とエクソソーム中 CKAP4 の発現の相関 (右図)

3. 研究の方法

(1) CKAP4 のエクソソームへの輸送メカニズムの解析

エクソソームの生合成経路として、A)細胞膜が小胞としてエンドサイトーシスされ、B)その小胞が多胞性エンドソームと融合した後、C)開口放出される経路が知られている。その際に、エクソソームに含まれるタンパク質毎に、エクソソームの輸送や分泌等の生合成に関与する複数の遺伝子が報告されている (Kowal, J., et al., Curr Opin Cell Biol., 2014)。エクソソーム形成や分泌に関与することが知られている 10 種類の遺伝子を、CKAP4 が細胞膜上およびエクソソーム中に高発現する膵がん細胞株 S2-CP8 細胞において、siRNA により発現抑制し、エクソソーム中 CKAP4 の発現量を比較し、有意に発現量が低下する遺伝子を同定する。

(2) エクソソーム中 CKAP4 の生理機能の解析

私共は、S2-CP8 細胞において CKAP4 のノックアウト (KO) 細胞を樹立し、増殖能、遊走能が抑制されることを見出している。この表現型は、DKK1 の受容体としての CKAP4 が消失することでの DKK1-CKAP4 シグナルの不活性化によるものと考えてきた。一方、がん細胞由来のエクソソームが、がん細胞の増殖・転移を誘導することが報告されており、上記の表現型にエクソソーム中の CKAP4 が関与するか否かを検討する。S2-CP8 細胞の CKAP4 過剰発現株 (野生株に比較してエクソソーム中 CKAP4 の発現量が多いことを確認している) と CKAP4 KO 株の培養上清から、エクソソームを精製する (以下、CKAP4 過剰発現エクソソームと CKAP4 非発現エクソソーム)。CKAP4 過剰発現エクソソーム及び CKAP4 非発現エクソソームで CKAP4 KO 株を刺激し、CKAP4 過剰発現エクソソームによる刺激が有意に増殖能、遊走能 (トランスウェルを用いたアッセイ) を亢進するか否かを検討する。

4. 研究成果

本研究期間内で次の成果を得た。

(1) CKAP4 のエクソソームへの輸送メカニズムの解析

エクソソームへの輸送・分泌に関与することが報告されている 10 種類の遺伝子 (ALIX, CD9, CD63, CD81, HGS, TSG101, Rab27a, Rab27b, VPS26a, VPS35) を S2-CP8 細胞で siRNA により発現抑制し、エクソソーム中 CKAP4 の発現量を比較した。ALIX, Rab27a, Rab27b, VPS26a, VPS35 の発現抑制によりエクソソーム中 CKAP4 の発現は有意に低下し、これらの遺伝子が CKAP4 のエクソソームへの輸送に重要であることが明らかになった。(図 4)。

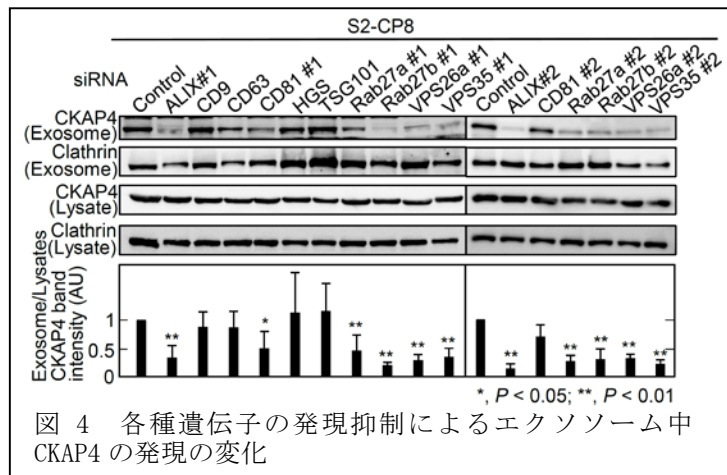


図 4 各種遺伝子の発現抑制によるエクソソーム中 CKAP4 の発現の変化

(2) エクソソーム中 CKAP4 の生理機能の解析

S2-CP8 細胞 CKAP4 KO 株を CKAP4 過剰発現エクソソームと CKAP4 非発現エクソソーム 10µg/ml で刺激し、4 日後の細胞数を比較した。エクソソーム刺激を行っていないコントロール群、CKAP4 過剰発現エクソソームによる刺激を行った群、並びに CKAP4 非発現エクソソームによる刺激を行った群の間に、有意な増殖能の差は認められなかった (図 5)。そのため、S2-CP8 細胞以外の細胞株において解析を行った。各細胞株から分泌されるエクソソーム中に存在する内在性 CKAP4 の影響を除外するため、CKAP4 が低発現である肝がん細胞株 SNU449 細胞、並びにイヌ腎尿管上皮細胞株 MDCK 細胞の CKAP4 KO 株において、CKAP4 過剰発現エクソソーム、CKAP4 非発現エクソソームでの刺激を行ったが、S2-CP8 細胞と同様に増殖能に有意な変化は認められなかった。次に、S2-CP8 細胞 CKAP4 KO 株に対して 10 µg/ml でエクソソーム刺激を行い刺激 3 時間後及び 6 時間後の遊走細胞数を比較した。いずれの条件でもエクソソーム刺激による遊走能の有意な変化は認められなかった (図 6)。SNU449 細胞および MDCK 細胞は遊走能に乏しく、エクソソーム刺激による解析ができなかった。

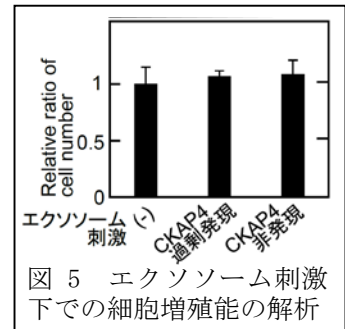


図 5 エクソソーム刺激下での細胞増殖能の解析

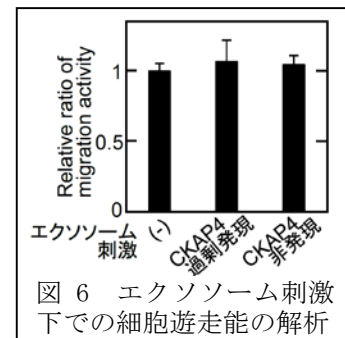


図 6 エクソソーム刺激下での細胞遊走能の解析

以上の結果から、エクソソーム中 CKAP4 の生理機能は明らかにならなかった。そのため、がん細胞株においてエクソソーム中の CKAP4 が高発現するというこれまでに明らかにした知見をふまえて、エクソソーム中 CKAP4 にがんの診断マーカーとしての意義があるか否か

を解析した。

S2-CP8 細胞および、S2-CP8 細胞と同様に二次元培養下で培養上清中のエクソソームに CKAP4 が高発現である膵がん細胞株 HPAF-II 細胞を移植した免疫不全マウスと、細胞を移植していない同じ週齢の免疫不全マウスの血清エクソソーム中の CKAP4 の発現を比較した。両がん細胞株移植マウスの血清エクソソーム中で CKAP4 が高発現していた (図 7)。また、PS Capture Exosome ELISA Kit 及び抗 CKAP4 抗体を用いてマウス血清エクソソーム中の CKAP4 の測定を行い、がん細胞株移植マウスの血清 CKAP4 が細胞を移植していないマウスの血清 CKAP4 より高値となることを明らかにした (図 7)。以上の結果より、移植したがん細胞株由来のエクソソーム中 CKAP4 が、マウス血清中に存在していることが示唆された。

ついで、膵がん手術症例のうち免疫染色で CKAP4 が陽性の症例、免疫染色で CKAP4 が陰性の症例、健常人、がんの既往のない大腸ポリープ症例の血清エクソソーム中の CKAP4 を ELISA にて測定した。免疫染色で CKAP4 が陽性の症例の血清 CKAP4 は、それ以外の症例に比べて有意に高値であった (図 8)。また、膵がん症例で手術適応のある症例と手術適応のない症例の血清 CKAP4 を比較した。手術適応のない症例の血清 CKAP4 が有意に高値であり、病期の進行により血清 CKAP4 がより高値になることが示唆された (図 9)。さらに、膵がん同一症例における術前および術後の血清エクソソーム中 CKAP4 の発現量を 4 症例で比較した。全ての症例において、術前に比べて術後に血清 CKAP4 の発現量は低下していた (図 10)。

以上の結果より、血清エクソソーム中 CKAP4 が膵がん症例において、CKAP4 が発現している症例を同定するための新規腫瘍マーカーになりうると考えられた。

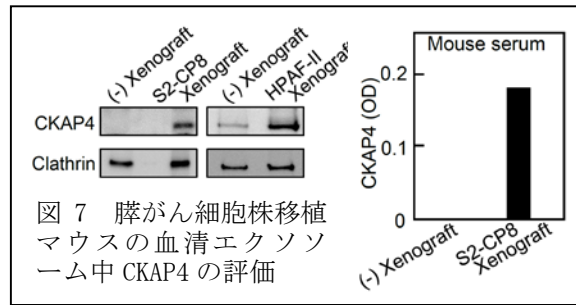


図 7 膵がん細胞株移植マウスの血清エクソソーム中 CKAP4 の評価

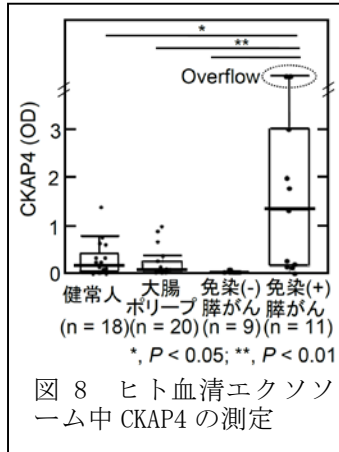


図 8 ヒト血清エクソソーム中 CKAP4 の測定

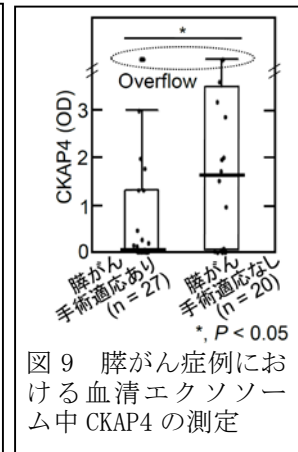


図 9 膵がん症例における血清エクソソーム中 CKAP4 の測定

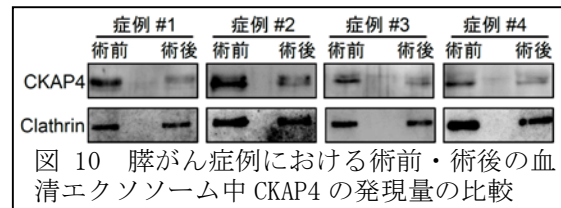


図 10 膵がん症例における術前・術後の血清エクソソーム中 CKAP4 の発現量の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Shinno, N., Kimura, H., Sada, R., Takiguchi, S., Mori, M., Fumoto, K., Doki, Y., Kikuchi, A. | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Activation of the Dickkopf1-CKAP4 pathway is associated with poor prognosis of esophageal cancer and anti-CKAP4 antibody may be a new therapeutic drug. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 3471-3484 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0179-2. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kajiwara, C., Fumoto, K., Kimura, H., Nojima, S., Asano, K., Odagiri, K., Yamasaki, M., Hikita, H., Takehara, T., Doki, Y., Morii, E., Kikuchi, A. | 4. 巻 78 |
| 2. 論文標題 p63-dependent Dickkopf3 expression promotes esophageal cancer cell proliferation via CKAP4. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 6107-6120 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-1749. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kimura, H., Yamamoto, H., Harada, T., Fumoto, K., Osugi, Y., Sada, R., Maehara, N., Hikita, H., Mori, S., Eguchi, H., Ikawa, M., Takehara, T., Kikuchi, A. | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 CKAP4, a DKK1 Receptor, Is a Biomarker in Exosomes Derived from Pancreatic Cancer and a Molecular Target for Therapy. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 1936-1947 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-2124. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sada, R., Kimura, H., Fukata, Y., Fukata, M., Yamamoto, H., Kikuchi, A. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Dynamic palmitoylation controls the microdomain localization of the DKK1 receptors CKAP4 and LRP6. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Science Signaling | 6. 最初と最後の頁 9519 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aat9519. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Harada, T., Matsumoto, S., Hirota, S., Kimura, H., Fujii, S., Kasahara, Y., Gon, H., Yoshida, T., Itoh, T., Haraguchi, N., Mizushima, T., Noda, T., Eguchi, H., Nojima, S., Morii, E., Fukumoto, T., Obika, S., Kikuchi, A. | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Chemically modified antisense oligonucleotide against ARL4C inhibits primary and metastatic liver tumor growth. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics | 6. 最初と最後の頁 602-612 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-18-0824. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 木村公一、菊池章 |
| 2. 発表標題 DKK1の新規受容体であるCKAP 4のエクソソームへの移行機構の解析 |
| 3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐田遼太、木村公一、山本英樹、菊池章 |
| 2. 発表標題 Dynamic palmitoylation regulates membrane microdomain localization and cancer cell proliferative signaling activity of CKAP4. |
| 3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 菊池章、木村公一、麓勝己 |
| 2. 発表標題 The Dickkopf1-CKAP4 pathway, a novel cancer signaling, represents molecular targets for cancer therapy. |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 菊池章、佐田遼太、木村公一、山本英樹 |
| 2. 発表標題 DKK1 signal-dependent cellular functions through two receptors, LRP6 and CKAP4. |
| 3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会・第19回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本 英樹、木村 公一、菊池 章 |
| 2. 発表標題 CKAP4, a DKK1 receptor, is a biomarker in exosomes derived from pancreatic cancer and a molecular target for therapy. |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 原田武志、松本真司、廣田傑、木村公一、藤井慎介、菊池章 |
| 2. 発表標題 肝腫瘍に対するARL4Cを標的としたアンチセンス核酸を用いた新規がん治療法の開発 |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高田 直季、木村 公一、菊池 章 |
| 2. 発表標題 DKK1-CKAP4シグナルと転写因子FOXM1のpositive feedback loop形成機構 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐田 遼太、木村 公一、山本 英樹、菊池 章 |
| 2. 発表標題 DKK1受容体CKAP4のPALMITIN酸化を介したシグナル制御機構 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本英樹、佐田遼太、木村公一、菊池章 |
| 2. 発表標題 Dynamic palmitoylation determines membrane microdomain localization of two DKK1 receptors CKAP4 and LRP6, and regulates DKK1 signaling. |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| ホームページ等 http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/ |
|--|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | | |
| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |