

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17746

研究課題名（和文）CKAP4 Sandwich-ELISAを用いた新規肺癌血清マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of a novel lung cancer biomarker using CKAP4 Sandwich-ELISA

研究代表者

名越 章裕（Nagoya, Akihiro）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90860297

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗CKAP4抗体を用いたサンドイッチELISA法で、肺癌患者および年齢性別をマッチさせた健常人それぞれ92名の血清CKAP4濃度を測定したところ、肺癌患者（19.6%）においては健常人（6.5%）と比して、有意に血清CKAP4陽性（ > 0.1 ng/mL）率が高いことが分かった。また、抗CKAP4抗体はヒト肺癌細胞株の増殖抑制作用を示した。その作用は、EGFR 変異を持つヒト肺がん細胞に対しては、既存のEGFR阻害薬（Osimertinib）と併用することで増強されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌患者では健常人に比べて有意に血清CKAP4濃度が高いことから、血清CKAP4濃度をサンドイッチELISA法で測定することで、肺癌診断が可能となる可能性が示唆された。同時に抗CKAP4は単剤および既存の抗癌剤との併用で、ヒト肺癌細胞の増殖を抑制した。以上の結果から、肺癌においてはCKAP4が新規診断マーカーと共に治療標的分子となり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Serum CKAP4 levels were measured in 92 lung cancer patients and the same number of age- and sex-matched healthy controls by sandwich ELISA using anti-CKAP4 antibody. The finding was that the serum CKAP4 positivity (> 0.1 ng/mL) was significantly higher in lung cancer patients (19.6%) than in healthy controls (6.5%). In addition, anti-CKAP4 antibody inhibited the growth of human lung cancer cell lines by inhibiting the phosphorylation of AKT both in vitro and in vivo. These effects were enhanced against human lung cancer cells with EGFR mutations when combined with an existing EGFR inhibitor (osimertinib).

研究分野：肺がん

キーワード：CKAP4 exosomes lung cancer biomarker

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は日本人の死因において 1960 年代以降増加を続け、現在 2 人に 1 人が罹患し、3 人に 1 人が癌によって死亡する状態となっている。肺癌は全癌種のうち死亡者数第 1 位であり、肺癌に対する治療成績の向上は喫緊の課題となっている。癌において、治療成績向上には早期診断・早期治療が重要となる。しかし、現在の肺癌確定診断は、まずレントゲンや CT などといった画像検査から肺癌を疑い、気管支鏡などを用いた生検により組織を得て、それを染色後に顕微鏡で観察するという過程を経てなされることが一般的である。これらは専門的かつ高度な技術を要するため、診断までに多くの時間と費用を必要とし、早期診断が困難である現状では、発見から治療までの間に癌が進行してしまうこともしばしば見られる。一方、腫瘍マーカーは腫瘍細胞が産出する特殊な物質のことであり、この測定結果は腫瘍の存在診断・進行度の推定・治療経過の評価などに用いられている。採血にて容易に測定しうる指標であるが、癌種毎に用いられるマーカーやその検査特性は異なってくる。肺癌においては CEA・CYFRA などといったマーカーが臨床利用されているが、感度・特異度ともに不十分であり、診療の補助程度にしか用いられていない。つまり、現状では肺癌に対する迅速かつ簡便な診断方法は確立されていない。

CKAP4 (cytoskeleton-associated protein 4) は、もともと小胞体の構造維持に関与することが知られていた型膜タンパク質である。申請者が所属する大阪大学呼吸器外科学教室は、大阪大学分子病態生化学教室との共同研究により、細胞膜に局在する CKAP4 が膀胱癌・肺癌において分泌タンパク質 DKK1 (Dickkopf1) の受容体として機能し、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸キナーゼ (PI3K) と AKT を活性化することにより、癌細胞の増殖を促進することを明らかにした (Kimura, H. et al. J Clin. Inv. 2016)。さらに、この CKAP4 は膀胱癌細胞において、細胞膜からエンドソーム内に取り込まれ、エクソソームとして細胞外に分泌されることを明らかにし、エピトープの異なる 2 種類の特異的抗 CKAP4 抗体 (捕捉抗体: 3F11-2B10, 検出抗体: 1G4-4A9) を用いた Sandwich-ELISA により、膀胱癌症例において切除不能症例では、血清 CKAP4 の値が高値であることを示した (Kimura, H. et al. Clin. Cancer Res. 2019)。また、同抗体を用いた免疫染色を行うと、免疫染色陽性症例では有意に血清 CKAP4 の値が高値であった。

以上の結果より、DKK1-CKAP4 シグナルの亢進した癌患者では腫瘍増殖が促進され、それに伴い血清中にもより多くの CKAP4 がエクソソームとして分泌されることが推測される。しかし、肺癌においては CKAP4 の分泌メカニズムや Sandwich-ELISA を用いた血清 CKAP4 濃度の測定は報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、現行の肺癌診断法を代替しうる簡便な臨床指標を見出すことである。そのために肺癌患者における血清 CKAP4 の臨床的有用性を評価し、その分泌メカニズムを分子細胞学的に明らかにすることを目的とした。

また、抗 CKAP4 は膀胱癌細胞の増殖抑制作用を示すことが分かっている。抗 CKAP4 抗体が肺癌においても腫瘍増殖抑制作用を示し、肺癌において CKAP4 が治療標的分子となり得るかどうかを検討することも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺癌細胞株を用いた基礎研究

肺癌には、A549をはじめ複数種の細胞株が存在し、それぞれで由来する組織型や発現タンパク質とその局在は異なっている。細胞膜上に存在し、DKK シグナルを介した腫瘍増殖に関与する CKAP4 が、どのように細胞外に放出されるかという機序を探索するため、細胞内に DKK1 および CKAP4 を発現しており、かつ細胞膜上に CKAP4 が高発現している A549 細胞を用いる。A549 細胞の培養上清から超遠心法を用いてエクソソームを単離し、CKAP4 がその中に含まれていることを確認する。さらに、DKK や CKAP4 といったタンパク質発現に関与する遺伝子やエクソソーム分泌に関わる Rab27a, VPS35 等の遺伝子をノックダウンし、CKAP4 のエクソソーム分泌に与える影響を評価する。

(2) 抗 CKAP4 抗体による臨床検体を用いた研究

大阪大学呼吸器外科学教室で保有している肺癌手術を行った 92 症例の血清に対し、CKAP4 濃度を測定し、年齢・性別をマッチさせた健常人の血清 CKAP4 値との比較を行う。また、肺癌患者

に関しては、術後の血清も採取し、術前の血清 CKAP4 値を比較することで、根治手術前後の濃度変化を調査する。

同時に抗 CKAP4 抗体を用いた免疫染色を行い、肺癌組織における CKAP4 の発現と血清 CKAP4 の値、さらには病期や胸膜・血管・リンパ管浸潤といった臨床病理学的因子や長期予後との関連を明らかにする。

(3) 抗 CKAP4 抗体の肺癌細胞増殖抑制効果の検討

肺癌細胞において、抗 CKAP4 が AKT のリン酸化を阻害することで癌細胞の増殖を抑制することが分かっている。肺癌においても同様の作用を示すかを、肺癌細胞株を用いたウエスタンブロット法や Sphere アッセイなどの実験を行い、in vitro で調べるとともに、ヒト癌細胞を免疫不全マウスに移植する xenograft モデルを用い、in vivo でも検討する。

また、抗 CKAP4 抗体が腫瘍増殖抑制作用を示すのであれば、その作用が既存の抗癌剤と併用することで増強するのかを検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト肺癌細胞において CKAP4 は DKK1 依存性にエクソソームに分泌される

細胞内に DKK1 を発現し、かつ細胞膜上に CKAP4 を発現しているヒト肺癌細胞株である A549 を用いて実験を行った。

A549 の DKK1 を siRNA 法でノックダウンすると、エクソソーム中に分泌される CKAP4 が減少した(図1)。また、エクソソームマーカータンパク質である Rab27b, VPS26a, VPS35 といったタンパク質をノックダウンすると、同様にエクソソーム中の CKAP4 量が減少した(図2)。以上の結果より、ヒト肺癌細胞において、CKAP4 は DKK1 依存性にエクソソーム中に分泌されるというメカニズムが示唆された。

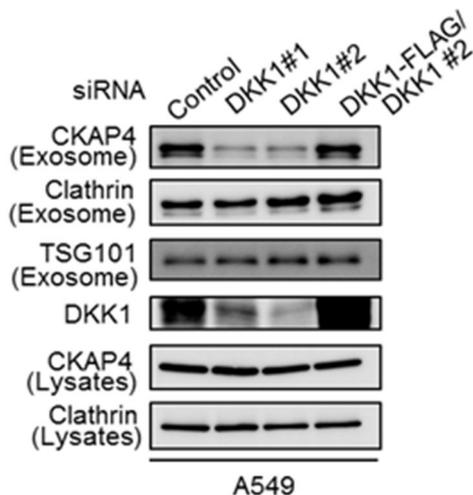


図1 DKK1 ノックダウンによるエクソソーム CKAP4 の変化

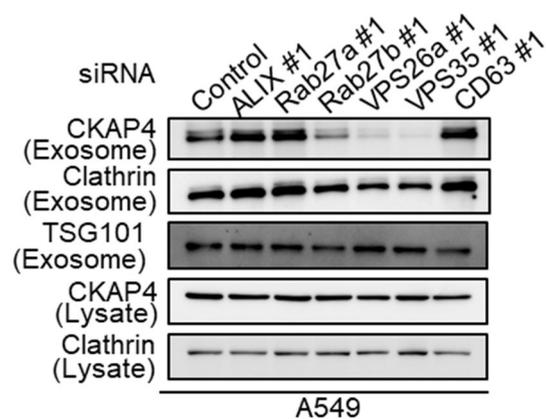


図2 エクソソームマーカータンパク ノックダウンによる CKAP4 の変化

(2) 肺癌患者において肺癌細胞からの分泌により血清 CKAP4 値が上昇する

肺癌患者の手術検体を用いて、抗 DKK1 および抗 CKAP4 抗体で組織免疫染色を行うと、DKK1 では 51/92 例 (55.4%), CKAP4 では 70/92 例 (76.1%) で免疫染色陽性 (>5% area を陽性と判断) であった。免疫染色と長期予後の関係を調べると、DKK1/CKAP4 共陽性の症例では、どちらか一方のみが陽性もしくは共に陰性の症例と比べて有意に relapse-free survival および overall survival が不良であった(図3)。以上の結果より、DKK1-CKAP4 シグナルはヒト肺癌の予後不良因子であることが示唆された。

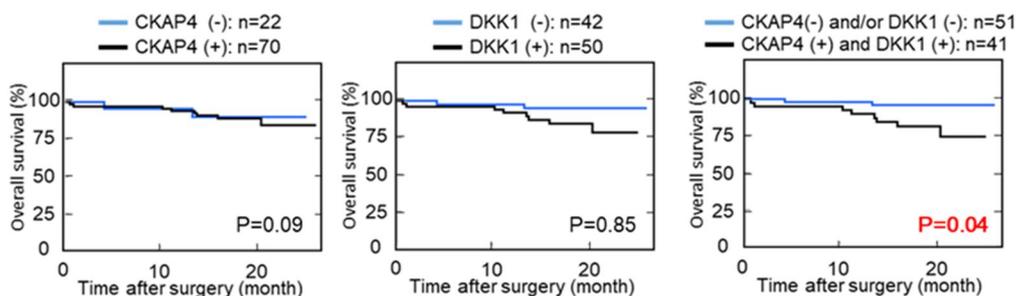


図3 DKK1/CKAP4 組織免疫染色と長期予後の関係

肺癌手術症例と年齢・性別をマッチさせた健常人の血清 CKAP4 濃度を測定したところ、血清 CKAP4 陽性例 (0.1 ng/mL) は肺癌患者で 18/92 例 (19.6%) であり、健常人の 6/92 例 (6.5%) よりも有意に陽性率が高かった ($P < 0.01$) (図 4)。また、血清 CKAP4 陽性率と免疫染色との関係を調べたところ、免疫染色陽性例では染色陰性例に比べて、血清 CKAP4 陽性例が有意に多かった (17/70 例 (24.3%) vs. 1/22 例 (4.5%) , $P < 0.01$)。肺癌患者 8 例において手術後の血清 CKAP4 値を測定したところ、全例で術前より値の低下が見られた。

以上の結果より、肺癌患者では肺癌細胞から CKAP4 が血清中に分泌され、その結果、健常人より血清 CKAP4 値が高くなっている可能性が示唆された。

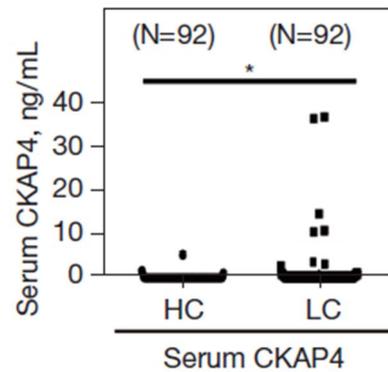


図 4 健常人と肺癌患者における血清 CKAP4 値の比較

(3) 抗 CKAP4 抗体の肺癌細胞増殖抑制効果の検討

EGFR 変異を持つヒト肺癌細胞株のうち、細胞内に DKK1 を発現し、かつ細胞膜上に CKAP4 を発現している HCC4006 細胞を用いて実験を行った。

HCC4006 細胞に対して、抗 CKAP4 抗体を作用させると、AKT のリン酸化が阻害され (図 5)、また Sphere アッセイでは Sphere の形成が阻害された。第 3 世代 EGFR 阻害薬であるオシメルチニブを作用させても同様の結果が得られた。ヌードマウスの皮下に HCC4006 細胞を注入した xenograft モデルで抗 CKAP4 抗体の作用を検討したところ、抗 CKAP4 抗体は単剤で腫瘍増殖抑制作用を示した。抗 CKAP4 抗体とオシメルチニブを併用したところ、更なる腫瘍の縮小が見られ、相加的な腫瘍増殖抑制作用を示した (図 6)。

以上の結果より、抗 CKAP4 抗体は AKT のリン酸化阻害を介して肺癌細胞の増殖を抑制することが示され、CKAP4 が肺癌の治療標的分子となりうることが示唆された。

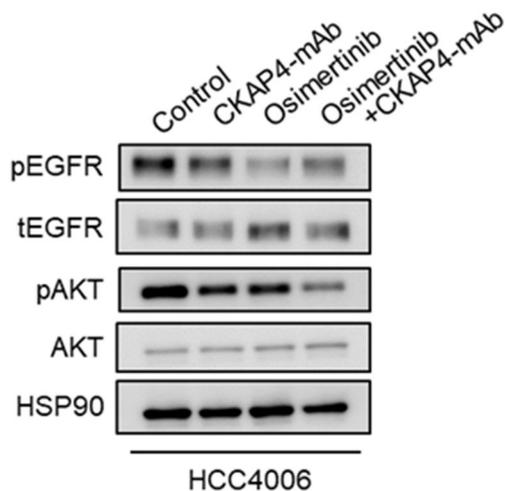


図 5 ウェスタンブロッティング法による抗 CKAP4 抗体とオシメルチニブの AKT リン酸化に対する作用の評価

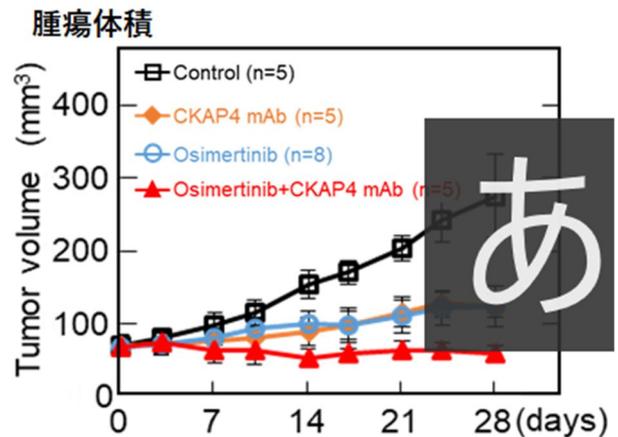


図 6 Xenograft モデルを用いた抗 CKAP4 抗体とオシメルチニブの腫瘍増殖抑制作用の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nagoya Akihiro, Sada Ryota, Kimura Hirokazu, Yamamoto Hideki, Morishita Koichi, Miyoshi Eiji, Morii Eiichi, Shintani Yasushi, Kikuchi Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 CKAP4 is a potential exosomal biomarker and therapeutic target for lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 408 ~ 426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tlcr-22-571	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 名越 章裕、佐田 遼太、木村 公一、山本 英樹、菊池 章
2. 発表標題 肺がんにおけるDKK1-CKAP4シグナルの治療標的としての可能性
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro Nagoya, Ryota Sada, Hirokazu Kimura, Hideki Yamamoto, Yasushi Shintani, Akira Kikuchi
2. 発表標題 DKK1-CKAP4 signaling in lung cancer and the utility of the anti-CKAP4 monoclonal antibody
3. 学会等名 第60回 癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiro Nagoya, Ryota Sada, Hirokazu Kimura, Hideki Yamamoto, Eriko Fukui, Toru Kimura, Takashi Kanou, Naoko Ose, Soichiro Funaki, Yasushi Shintani, Akira Kikuchi
2. 発表標題 The utility of the anti-CKAP4 monoclonal antibody in DKK1-CKAP4 signal-activated lung cancer
3. 学会等名 Asia Conference on Lung Cancer（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------