

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06944

研究課題名(和文)CKAP4のエクソソームへの輸送機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文)Analysis of the translocation mechanism of 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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、分泌タンパク質DKK1の新規受容体であるCKAP4のエクソソームへの移行機構を解析した。CKAP4はがん細胞株特異的にエクソソームに発現しており、さらに、がん細胞株において細胞膜上のCKAP4の発現量とエクソソーム中のCKAP4の発現量は比例していた。また、DKK1およびクラスリン依存性のエンドサイトーシスによりエクソソーム中CKAP4の発現量が増加することを明らかにした。以上の結果から、がん細胞の細胞膜上でDKK1の受容体として機能しているCKAP4がエクソソームに移行することが示唆され、エクソソーム中CKAP4が新規腫瘍マーカーになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文): In this study, translocation mechanism of CKAP4, a novel receptor of secreted protein DKK1, to exosome was analyzed. CKAP4 was specifically secreted with exosome from cancer cell lines. In addition, the amounts of CKAP4 on exosome were proportional to those of CKAP4 on the cell surface membrane. The secretion of CKAP4-containing exosome was mediated by DKK1- and Clathrin-dependent endocytosis routes. These results suggest that CKAP4, which functions as a receptor of DKK1 on the cell surface membrane of cancer cells, is translocated to exosome, and CKAP4 in exosome may be a novel tumor marker.

研究分野：腫瘍医学

キーワード：CKAP4 エクソソーム DKK1 クラスリン エンドサイトーシス

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)。 β -カテニン経路では、Wnt が受容体に作用すると細胞質の β -カテニンが安定化する。細胞質内で蓄積した β -カテニンは核内に移行した後、転写因子 Tcf と複合体を形成し、種々の標的遺伝子の発現を促進して、その結果、細胞の増殖や分化を制御する。Dkkopf1 (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 が Wnt 受容体 Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (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)。

Wnt シグナル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。しかし、膵がんや肺がん、胃がん、肝細胞がん、胆管がん、乳がん、頭頸部がんにおいて DKK1 が高発現していることや、抗 DKK1 抗体が肺がん細胞株の増殖を抑制することが報告された (Sato, N., et al., Cancer Res., 2010)。これらの結果は、DKK1 は Wnt シグナルの阻害とは関係なく、がん細胞の増殖を促進する可能性を示唆しているが、DKK1 がどのような受容体と結合し、がんに関連するのかは全く不明であった。この疑問に答えるべく、私共はイヌ腎尿管上皮細胞株 MDCK 細胞において、細胞膜上に存在する DKK1 の新規結合タンパク質として Cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) を同定し、DKK1 が CKAP4 に作用して細胞増殖を促進することを明らかにした。CKAP4 は II 型膜タンパク質 (N 末側を細胞質側に配向する細胞膜 1 回貫通タンパク質) であり、肺胞上皮細胞に発現してサーファクタントプロテインと結合することが報告されていたが、細胞増殖制御、及び発がんとの関連は不明であった。

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 52~79% の頻度で、がん組織に高発現し、しかも両者が同一がん組織内 (連続切片において) で、共発現している症例が存在した (図 1)。

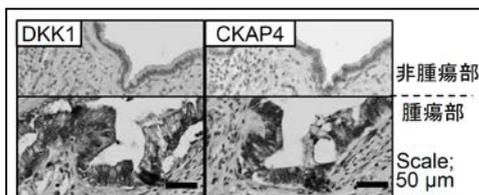


図 1 膵がんにおける DKK1、CKAP4 の染色像

一方、非がん部においては、DKK1 および CKAP4 は免疫組織化学的手法により染色されなかった。さらに、これらのがんの DKK1 と CKAP4 が共に陽性の症例の術後生存期間と術後無再発生存期間は、それ以外の症例に比して有意に短かった (図 2)。

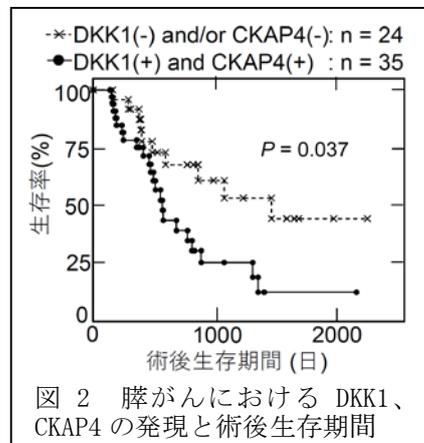


図 2 膵がんにおける DKK1、CKAP4 の発現と術後生存期間

したがって、DKK1 と CKAP4 の共発現が予後不良と相関する可能性が考えられた。

DKK1 と CKAP4 の両タンパク質が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 細胞に対して、DKK1 または CKAP4 の発現抑制を行った。その結果、*in vitro* および *in vivo* の実験系において、これらのがん細胞の増殖能が阻害された。また、CKAP4 の細胞外領域を抗原として作製した抗 CKAP4 ポリクローナル抗体 (CKAP4 pAb) が、DKK1 と CKAP4 の結合阻害を示すとともに、*in vitro* および *in vivo* の実験系において、S2-CP8 細胞、A549 細胞、TE-8 細胞の増殖能を抑制した (図 3)。

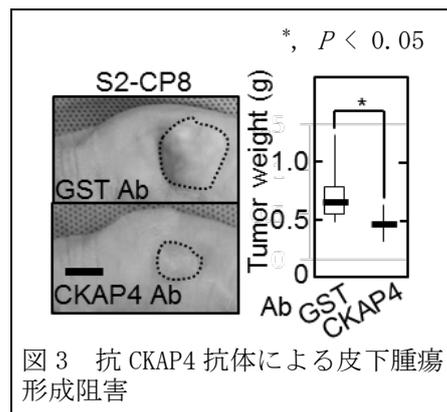


図 3 抗 CKAP4 抗体による皮下腫瘍形成阻害

重要なことは、CKAP4 の発現抑制および CKAP4 pAb は、DKK1 過剰発現細胞の増殖能を有意に抑制したが、DKK1 の発現していない細胞の増殖能には影響しなかったことである。すなわち、CKAP4 は、DKK1 が発現している場合に細胞増殖に対して促進的に作用することが明らかになった。これらの研究成果は、DKK1 と CKAP4 の両者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

のマーカーならびに治療標的となりうる可能性を示すものである。

近年、種々の分子標的治療薬が開発されているが、それらの適応症例を選択するためのマーカー（コンパニオン診断薬）が必須となる。エクソソームは 30~150nm 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。また、がん細胞特異的なエクソソームの内容物が、新規腫瘍マーカーとなる可能性がある。私共は、エクソソームデータベース (ExoCarta) 検索より CKAP4 がエクソソームに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、膀胱がん細胞株および肺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。この結果はがん細胞特異的に CKAP4 がエクソソームに輸送され、細胞外に分泌されることを示唆するものである。CKAP4 がエクソソームに存在するという論文報告はなく、その輸送機構は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、CKAP4 がエクソソームに輸送されるという知見をもとに、エクソソームへの CKAP4 の輸送機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エクソソームは一般的には、ショ糖密度勾配超遠心法で分画したとき、約 1.13~1.19 g/ml の密度に分画される膜小胞体と定義されている。エクソソームの抽出には種々の方法が報告されているが、最も汎用されているのは、細胞培養液、血清、尿などの試料をフィルトレーションし、10 万 x g にて超遠心した沈殿物をエクソソーム分画と定義する方法である。私共は、後者の方法でエクソソーム分画を回収し、ウェスタンブロットにて、がん細胞株でのみエクソソーム中に CKAP4 が発現することを見出している。そこで、ショ糖密度勾配超遠心法で、エクソソームマーカーである CD81、TSG101 と同分画に CKAP4 が検出される事を確認する。

(2) エクソソームの分泌機構として、細胞膜上のタンパク質がエンドサイトーシスされ、多胞性エンドソームにリクルートされた後、開口放出される経路が知られている (図 4)。

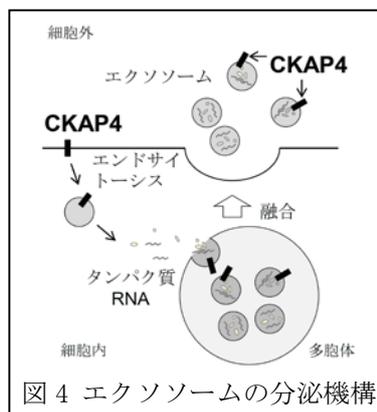


図 4 エクソソームの分泌機構

私共は、細胞膜上の CKAP4 の発現量が細胞株によって異なること、CKAP4 が DKK1 依存性およびクラスリン依存性エンドサイトーシスを受けることを見出している。そこで、以下の点について解析する。

- ① 細胞株ごとに、細胞膜上の CKAP4 の発現量とエクソソーム中の CKAP4 の発現量に相関があるか否かをウェスタンブロットにて band intensity を定量し解析する。
- ② エクソソームへの CKAP4 の輸送に DKK1 およびクラスリン依存性のエンドサイトーシスが関係するか否かを、DKK1 の過剰発現、クラスリンのノックダウンにより解析する。

4. 研究成果

本研究期間内で次の成果を得た。

(1) ショ糖密度勾配超遠心法によるエクソソーム中 CKAP4 の発現確認

培養上清を 10 万 x g にて超遠心して精製したエクソソームをショ糖密度勾配超遠心法により分画すると、CKAP4 はエクソソームマーカーである CD81 および TSG101 と同分画に検出された (図 5)。

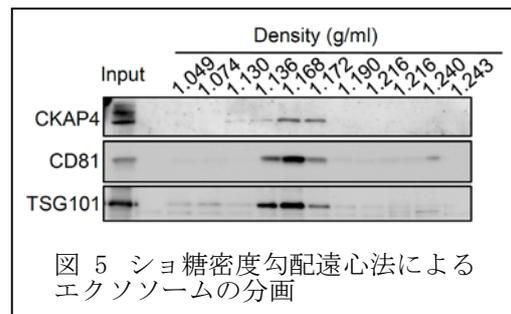


図 5 ショ糖密度勾配超遠心法によるエクソソームの分画

(2) エクソソームへの CKAP4 の輸送機構の解析

① 細胞膜上の CKAP4 の発現量とエクソソーム中の CKAP4 の発現量の相関

10 種類以上の複数のがん細胞株で細胞膜上の CKAP4 とエクソソーム中の CKAP4 の発現量の相関について解析した。細胞膜上の CKAP4 の発現量とエクソソーム中の CKAP4 の発現量に正の相関を認めた (図 6)。

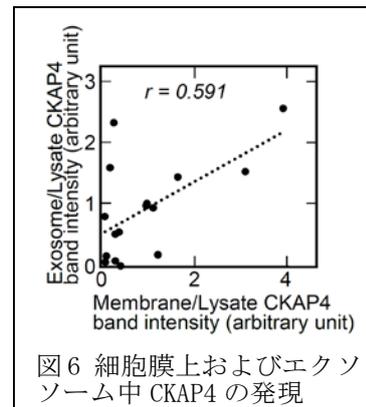


図 6 細胞膜上およびエクソソーム中 CKAP4 の発現

② DKK1 およびクラスリン依存性エンドサイトーシスによるエクソソーム中 CKAP4 の発現増加

DKK1 依存性のエンドサイトーシスの影響を除外するため DKK1 が発現していない MDCK 細胞において、野生株、DKK1 過剰発現株、CKAP4 へ

の結合に必要なドメイン CRD1 を欠損した DKK1 (DKK1 ΔCRD1) 過剰発現株のエクソソーム中の CKAP4 の発現量を比較した。野生株と比較して、DKK1 過剰発現株でエクソソーム中 CKAP4 の発現が増加し、DKK1 ΔCRD1 過剰発現株では増加しなかった。(図 7)。また、DKK1 が発現しているがん細胞株においてクラスリンの発現抑制により、細胞膜上の CKAP4 の発現は増加し、エクソソーム中の CKAP4 の発現は減少した。(図 8)。

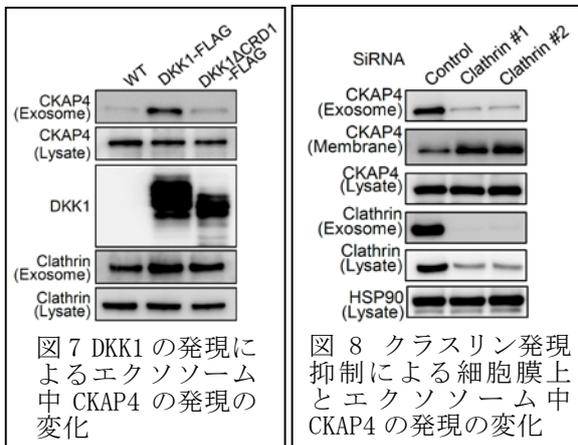


図 7 DKK1 の発現によるエクソソーム中 CKAP4 の発現の変化

図 8 クラスリン発現抑制による細胞膜上とエクソソーム中 CKAP4 の発現の変化

以上の結果より、がん細胞の細胞膜上で DKK1 の受容体として機能する CKAP4 がエクソソームへ輸送されていることが示唆され、エクソソーム中 CKAP4 が新規腫瘍マーカーとなりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Shinno N, Kimura H, Sada R, Takiguchi S, Mori M, Fumoto K, Doki Y, Kikuchi A. Activation of the Dickkopf1-CKAP4 pathway is associated with poor prognosis of esophageal cancer and anti-CKAP4 antibody may be a new therapeutic drug. *Oncogene*. (査読有) 2018 [Epub ahead of print]. doi: 10.1038/s41388-018-0179-2.

2. Kikuchi A, Fumoto K, Kimura H. The Dickkopf1-cytoskeleton-associated protein 4 axis creates a novel signalling pathway and may represent a molecular target for cancer therapy. *Br J Pharmacol*. (査読有) 174(24):4651-65., 2017. doi: 10.1111/bph.13863.

[学会発表] (計 3 件)

1. 木村 公一, 食道扁平上皮癌の新規治療標的である DKK1-CKAP4 シグナル第 76 回癌学会学術総会, 2017/09/29, 横浜.

2. 木村 公一, 膵癌の新規治療標的である Dkk1 新規受容体 CKAP4, 第 48 回日本膵臓学会

大会, 2017/07/14, 京都.

3. 木村 公一, 新規癌治療標的である Dkk1-CKAP4 シグナル, 第 75 回癌学会学術総会, 2016/10/06, 横浜.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

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

6. 研究組織

(1) 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
研究者番号: 60595370

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()