

Title	CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and involved in tumor progression
Author(s)	木村, 公一
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59548">https://hdl.handle.net/11094/59548</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨  
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	木村 公一
論文題名 Title	CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and involved in tumor progression (CKAP4はDKK1受容体として腫瘍進行を促進する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>分泌蛋白DKK1は、胎生期にWntシグナル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として知られており、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。近年、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、DKK1がWntシグナルの阻害とは関係なく、独自の機能によりがん細胞の増殖を促進する可能性が示唆されていたが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、DKK1がどのような受容体を介して細胞増殖を促進するのか解明し、がんにおける新規治療標的となりうるかを評価することを目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>1) DKK1低発現株であるイヌ腎尿管上皮細胞株MDCK細胞において、DKK1過剰発現株 (MDCK/DKK1) を樹立した。過剰発現株では細胞増殖が促進していた。さらにDKK1の新規受容体の同定を目的として、細胞膜に存在するDKK1結合タンパク質を網羅的に検索し、DKK1の新規受容体としてCytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) を同定した。</p> <p>2) DKK1およびCKAP4のdeletion mutantを作成し、免疫沈降による結合実験を行った。DKK1のCRD1 (cysteine rich domain) およびCKAP4のLZ (leucine zipper) domainが各々の結合に必須であった。さらに、Recombinant DKK1とGST-ECD-CKAP4 (CKAP4の細胞外ドメイン) を用いてpull downによる結合実験を行ったところ、DKK1はCKAP4に直接結合し、既知の受容体であるLRP6と同程度のKd値を示した。また、MDCK細胞をRecombinant DKK1で刺激することで、DKK1の濃度および時間依存的にCKAP4がエンドサイトーシスされた。</p> <p>3) DKK1-CKAP4シグナルが細胞増殖に与える影響とシグナルの詳細について解析した。MDCK/DKK1は野生株に比べAKTが活性化しており、CKAP4の発現抑制でAKTの活性が抑制され細胞増殖が野生株と同程度にまで抑制された。一方、野生株ではCKAP4の発現抑制はAKTの活性化と細胞増殖に影響しなかった。さらに、CKAP4はDKK1依存性にp85<math>\alpha</math>と結合し、各々の結合にCKAP4のProline-rich regionとp85<math>\alpha</math>のSH3 domainが必要であった。</p> <p>4) ヒトがんにおける発現と予後への影響を外科的切除標本の免疫染色にて解析した。膀胱がん、肺腺がんおよび肺扁平上皮がんにおいて、DKK1とCKAP4は約6~8割の高頻度でがん組織特異的に発現しており、両者が共に発現している症例は有意に予後不良であった。</p> <p>5) がん細胞株におけるDKK1およびCKAP4の細胞増殖へ与える影響について解析した。ヒト膀胱がん細胞株S2-CP8細胞および肺がん細胞株A549細胞においてshRNAによるDKK1およびCKAP4の発現抑制株を樹立した。DKK1およびCKAP4の発現抑制で、AKTの活性化および細胞増殖は抑制された。さらに、ヌードマウスにおける皮下腫瘍形成も抑制された。一方、DKK1低発現株である子宮頸がん細胞株HeLaS3細胞では、CKAP4の発現抑制は細胞増殖に影響を与えなかった。</p> <p>6) CKAP4が分子標的療法の標的になりうるかを検討した。CKAP4の細胞外ドメインを抗原部位としウサギポリクローナル抗CKAP4抗体を精製した。この抗体によりRecombinant DKK1とGST-ECD-CKAP4の結合は阻害された。また、S2-CP8細胞およびA549細胞に抗体を処理することで、AKTの活性化と細胞増殖は抑制された。さらに、ヌードマウスにおける皮下腫瘍形成も抗体の投与で抑制された。一方で、抗CKAP4抗体投与はDKK1低発現株であるHeLaS3細胞のヌードマウスにおける皮下腫瘍形成に対しては影響しなかった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>本研究結果により、①DKK1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AKTの活性化を介してがん細胞の増殖が促進すること、②CKAP4がDKK1とCKAP4の過剰発現するヒトがんにおいて新規の分子標的となることが明らかとなった。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 木村 公一

論文審査担当者	(職) 氏 名
主 査	大阪大学教授 菊池 章
副 査	大阪大学教授 高木 由二
副 査	大阪大学教授 宮崎 純一

## 論文審査の結果の要旨

DKK1は種々のがんで過剰発現しており、がん細胞の増殖を促進する機能があると報告されていたが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、細胞膜に存在するDKK1結合タンパク質を網羅的に解析して、DKK1の新規受容体としてCytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) を同定した。さらに、①DKK1が結合することでCKAP4にPI3Kが結合しAKTの活性化を介して、細胞増殖を促進すること、②DKK1とCKAP4の両者は膵がんおよび肺がんで高頻度に腫瘍部特異的に過剰発現しており、両者の発現している症例は予後が悪いこと、③DKK1もしくはCKAP4の発現抑制および抗CKAP4抗体による機能阻害がDKK1とCKAP4の両者が高発現している膵がんおよび肺がん細胞株のAKTの活性化を抑制し、ヌードマウス皮下での腫瘍形成を抑制することを明らかにした。

以上、DKK1によるがん細胞増殖メカニズムを解析し、抗CKAP4抗体の腫瘍形成阻害効果を示した本研究は、がん研究における新たな知見と考えられ、博士(医学)の学位授与に値すると考えられる。