



Title	Activation of the Dickkopf1-CKAP4 pathway is associated with poor prognosis of esophageal cancer and anti-CKAP4 antibody may be a new therapeutic drug
Author(s)	新野, 直樹
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/70657
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 新野 直樹		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	土岐 祐一郎
	副 査 大阪大学教授	野々村 祝夫
	副 査 大阪大学教授	木村 正

論文審査の結果の要旨

食道癌においては、Dickkopf-1 (DKK1) の発現が予後不良因子となることが報告されているが、腫瘍増殖を促進する機序についてはこれまで不明であった。本研究では、食道癌において Cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) が DKK1 の受容体として関係し、抗CKAP4抗体が新たな治療薬となりうるかを評価している。切除検体を用いた免疫組織化学染色では、DKK1、CKAP4 が共陽性の症例では有意に予後不良となり、細胞株を用いた検討では両者が複合体を形成し、AKTリン酸化を介した細胞増殖に寄与することを明らかとした。また、抗CKAP4抗体によりマウス皮下腫瘍形成が抑制されることを明らかとした。

本研究結果により、DKK1、CKAP4 両者を発現する食道扁平上皮癌においては、抗CKAP4抗体が新たな治療薬のひとつとなる可能性が示唆された。

以上より、食道癌における DKK1 の受容体としての CKAP4 に着目した本研究は、がん研究における新たな知見と考えられ、学位に値すると考える。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	新野 直樹
論文題名 Title	Activation of the Dickkopf1-CKAP4 pathway is associated with poor prognosis of esophageal cancer and anti-CKAP4 antibody may be a new therapeutic drug (Dickkopf1-CKAP4経路の活性化は食道癌の予後不良因子となり、抗CKAP4抗体は新たな治療薬となり得る)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
<p>分泌タンパク質Dickkopf1 (DKK1) は、胎生期にβカテニン経路を抑制するという機能から、腫瘍抑制的に働くことが想定されている。しかし、食道扁平上皮癌においては、その発現が予後不良因子となることが報告されており、DKK1が腫瘍増殖を促進する機序については不明であった。我々は、肺癌や肺癌において、DKK1が細胞膜受容体 Cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) と結合し、AKT活性化を介した腫瘍増殖を促進することを明らかにした。一方で、肝内胆管癌や肝細胞癌ではCKAP4発現群が予後良好であるとの報告もあり、DKK1-CKAP4経路による腫瘍悪性化については臓器特異性など不明な点が多いと考えられている。本研究では、食道扁平上皮癌においてCKAP4がDKK1の受容体として腫瘍増殖に関係し、抗CKAP4抗体が新たな治療薬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) 食道扁平上皮癌におけるDKK1、CKAP4発現の臨床的な意義を検討した。119例の切除検体を抗DKK1抗体、抗CKAP4抗体で免疫染色したところ、それぞれ62例 (52.1%)、66例 (55.5%) で腫瘍部特異的に濃染された。両タンパク質の発現と臨床病理学的背景に有意な関連は認めなかったが、両タンパク質が陽性の46例 (38.7%) は、いずれかのみが陽性の36例や共に陰性の37例と比較し、有意に全生存期間の短縮が見られた。一方でいずれかのみが陽性の症例と共に陰性の症例の予後に有意差は認められなかった。多変量解析では、両タンパク質の陽性が年齢やステージと並んで、独立した予後不良因子となった (ハザード比2.463、$p=0.0012$)。</p>	
<p>2) 11種類の食道扁平上皮癌細胞株におけるDKK1と細胞膜上のCKAP4の発現量を測定して、食道癌細胞株を分類した。DKK1高発現、CKAP4細胞膜発現のTE-8では、抗DKK1抗体による免疫沈降にてDKK1とCKAP4が複合体を形成することが確認された。また、DKK1低発現、CKAP4細胞膜発現のTE-14をDKK1で刺激することにより、時間依存的にCKAP4がエンドサイトーシスされた。一方、CKAP4結合領域を欠損したDKK1 (DKK1ΔCRD1) での刺激では、細胞膜上CKAPはエンドサイトーシスされなかった。</p>	
<p>3) DKK1-CKAP4経路が細胞増殖に与える影響と細胞内シグナルについて解析するために、DKK1高発現、CKAP4細胞膜発現のTE-5、TE-8において、DKK1もしくはCKAP4の発現抑制株、ならびにそれぞれの株にDKK1またはCKAP4を発現させた細胞株を樹立した。DKK1もしくはCKAP4の発現抑制により、AKTの活性化と細胞増殖が抑制された。これら表現型は、DKK1またはCKAP4の発現により回復した。しかし、DKK1の発現抑制による表現型は、DKK1ΔCRD1の発現により回復しなかった。また、これらの細胞株をヌードマウスの皮下に注射し、腫瘍形成を比較したところ、<i>in vitro</i>と同様の結果が得られた。一方、DKK1低発現、CKAP4細胞膜発現のTE-14では、CKAP4の発現抑制はAKT活性化や細胞増殖に影響を与えなかった。</p>	
<p>4) 抗CKAP4抗体が食道扁平上皮癌の新たな治療薬と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、<i>in vitro</i>でDKK1とCKAP4の結合阻害活性を有する抗CKAP4ポリクローナル抗体 (抗CKAP4 pAb) を精製した。本抗体の処理により、TE-5、TE-8のAKTの活性化と細胞増殖が抑制された。さらに、TE-8を皮下注射し腫瘍を形成したヌードマウスに対して、本抗体を投与 (250 μg/body、週2回) したところ、コントロールIgG投与群と比較して本抗体投与群で、有意に皮下腫瘍形成が抑制された (腫瘍体積 コントロールIgG群 1337.6 mm³ vs 抗CKAP4 pAb群 608.5 mm³, $p=0.0011$)。しかし、TE-14ではAKTの活性化と細胞増殖に影響を認めなかった。</p>	
〔総 括(Conclusion)〕	
<p>本研究により、DKK1が高発現し、CKAP4が細胞膜に存在する食道扁平上皮癌において、CKAP4がDKK1の受容体として機能し、DKK1がCKAP4に結合することにより、AKTを活性化し、腫瘍増殖を促進することが明らかとなった。また、DKK1とCKAP4の結合阻害能を有する抗CKAP4抗体が、両タンパク質を発現する扁平上皮癌において、新たな治療薬となる可能性が示唆された。</p>	