The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	CKAP4 is a potential exosomal biomarker and therapeutic target for lung cancer
Author(s)	名越, 章裕
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92062
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　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	名越　章裕
論文題名 Title	CKAP4 is a potential exosomal biomarker and therapeutic target for lung cancer （CKAP4は肺がんのバイオマーカーおよび治療ターゲットとなる）

論文内容の要旨(Abstract of Thesis)

〔目　的(Purpose)〕

小胞体の構造維持に関与するII型膜タンパク質のcytoskeleton-associated protein 4（CKAP4）は、膵がんや肺がん等の種々のがんの細胞膜にも発現している。これまで、膵がんにおいて、CKAP4がWnt/β-cateninシグナルの抑制因子である分泌タンパク質Dickkopf1（DKK1）の受容体として機能し、phosphatidylinositol 3-kinase/AKT経路の活性化を介して腫瘍細胞の増殖を促進する（DKK1-CKAP4シグナル）ことが判明している。さらに、CKAP4がDKK1と結合した後、細胞外分泌小胞エクソソームへ分泌されること，膵がん患者において健常人と比較して血清CKAP4濃度が高値であること、また抗CKAP4モノクローナル抗体が膵がん細胞株に対して腫瘍増殖抑制効果を示すことなども明らかになっている。一方で、肺がんに関して同様の検討を行った報告はない。本研究では、肺がんにおけるDKK1-CKAP4シグナルの意義および診断と治療のための標的となり得るかを検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

①　ヒト肺がん細胞株におけるエクソソーム中へのCKAP4分泌メカニズムの解明

ヒト肺がん細胞のうちDKK1を発現し、かつ細胞膜上にCKAP4を発現している細胞株A549を用いて実験を行った。A549細胞においてDKK1ならびにエクソソーム分泌に関与するタンパク質であるClathrin, Rabs（低分子量Gタンパク質），VPSs（液胞タンパク質ソーティング関連タンパク質）等をsiRNAでノックダウンすると、エクソソーム中のCKAP4分泌が減少した。以上の結果から、細胞膜上のCKAP4はDKK1と結合した後にエクソソームとともに細胞外に分泌されると考えられた。

②　非小細胞肺がん患者におけるCKAP4の診断マーカーとしての有用性の検討

大阪大学医学部附属病院にて手術を行った92例の肺がん患者、および年齢・性別をマッチさせた健常者の血清CKAP4濃度をサンドイッチELISA法で測定した。肺がん患者の血清CKAP4陽性例（>0.1 ng/mL）は18例（19.6%）であり、健常人の6例（6.5%）よりも有意に多かった（P<0.01）。続いて、抗CKAP4抗体を用いた肺がん組織免疫染色を行い、血清CKAP4値と免疫染色の相関を調べた。組織免疫染色において>5% areaを染色陽性と判定すると、血清CKAP4陽性率は染色陽性群にて17/70例(24.3%)，染色陰性群において1/22例(4.5%)であり、染色陽性群にて有意に陽性率が高かった(P<0.01)。肺がん患者8例において、術前術後血清のCKAP4濃度を測定すると、全例で術後血清CKAP4の低下が見られた。以上の結果から、CKAP4陽性肺がんにおいてCKAP4は、血清中に分泌されバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

③　抗CKAP4抗体の肺がん治療分子標的薬としての可能性の検討

DKK1を発現しているが細胞膜上にCKAP4を発現していない肺がん細胞株のH292細胞に対し、細胞膜上を含めて異所性にCKAP4を過剰発現させたH292/CKAP4細胞株を作成した。野生株と比較したH292/CKAP4細胞株のAKT活性化をウエスタンブロット法で、細胞増殖能および抗CKAP4抗体への感受性を細胞増殖アッセイ，sphere形成アッセイ，BALB/cマウスを用いたxenograftモデルで調べた。H292/CKAP4細胞では、野生株に比し活性型AKTが増加し、腫瘍増殖能が亢進した。H292/CKAP4細胞に抗CKAP4抗体を作用させたところ、活性型AKTの抑制，sphere形成能の阻害，マウスxenograftモデルでの腫瘍増殖抑制作用が認められた。続いて、EGFR変異を持つヒト肺がん細胞のうちDKK1を発現し、かつ細胞膜上にCKAP4を発現している細胞株HCC4006に対して、抗CKAP4抗体およびEGFRチロシンキナーゼ阻害薬osimertinibを用いて、同様の検討を行った。HCC4006細胞を抗CKAP4抗体で処理すると、AKT活性が阻害され、その作用はosimertinibとの併用で増強された。マウスxenograftモデルでは、osimertinibならびに抗CKAP4抗体は単剤投与で同程度の腫瘍増殖抑制作用が認められ、両薬剤を併用した群では相加的に腫瘍増殖が抑制された。

〔総　括(Conclusion)〕

肺がん細胞において、CKAP4はDKK1と結合した後にエクソソームとして細胞外に分泌されることが示唆された。血清CKAP4値を測定することで、腫瘍組織のCKAP4発現を予測し、抗CKAP4抗体を用いた治療の対象となる肺がん患者群を推定できると考えられた。以上、本研究により、CKAP4は肺がん治療の標的分子となり得るとともに、抗CKAP4抗体使用のためのコンパニオン診断に利用できる可能性があることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　名越　章裕

		（職）	氏　名	
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	新谷　康	新谷 康
	副　査	大阪大学教授	猪原　秀典	猪原 秀典
	副　査	大阪大学教授	江口　英利	江口 英利

論文審査の結果の要旨

本論文は、小胞体の構造維持に関与するII型膜タンパク質であるcytoskeleton-associated protein 4（CKAP4）が、非小細胞肺癌の診断・治療においてどのような役割を示すかを検討した研究である。本研究では、癌細胞膜上のCKAP4がエクソソームに分泌されることに着目し、肺癌患者の血清CKAP4濃度の測定を行い、CKAP4が肺癌の診断マーカーとなり得ることを明らかにした。さらに、特異的な抗CKAP4マウスモノクローナル抗体が単剤で肺癌細胞の増殖を抑制すること、上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬との併用でEGFR変異を持つ肺腺癌細胞の増殖を相加的に抑制することを示し、CKAP4を標的とした新たな肺癌治療につながる可能性が示唆された。以上より、本研究の成果は学位の授与に値すると考えられる。