



## Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells

岡本, 大輝

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8391号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477817>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)  
学位論文の内容要旨

Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells

間葉系幹細胞から誘発される自律的および細胞間ケモカインシグナルが未分化胃がん細胞の遊走を調節する

岡本 大輝, 山内 菜津子, 潤口 豪介, 西田 滉  
掛地 吉弘, 南 康博, 紙崎 孝基

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
食道胃腸外科学  
(指導教員: 掛地 吉弘 教授)

Daiki Okamoto  
岡本 大輝

胃がんは世界におけるがん関連死亡の原因として3番目に多く、胃がんの進展調節機構を解明することは重要である。近年、さまざまながん種の進行とがん微小環境の関係について多くの報告があり、がん微小環境は新たな治療標的として注目されている (Hanagan & Weinberg. Cell. 2011)。がん微小環境は、がん細胞だけでなく周囲の間質組織に存在する間葉系幹細胞、がん関連線維芽細胞、腫瘍関連マクロファージなどで構成されており、これら細胞はケモカインを分泌し、がん細胞の増殖・遊走・転移を促進することが報告されている (Reyes *et al.* Front Immunol. 2020)。ケモカインはサイトカインのサブファミリーであり、自己分泌や細胞間シグナルを介してさまざまな細胞応答を誘発し、がんの進行を促進すると言われている (Nagarsheth *et al.* Nat Rev Immunol. 2017)。しかし、胃がん微小環境におけるケモカインシグナルが胃がんの進展を制御する分子機構は未解明な点が多い。

Ror ファミリー受容体に属する Ror2 は分泌性糖タンパク質 Wnt5a の受容体として機能することで非古典的 Wnt 経路を活性化し、細胞の極性、移動、増殖および分化を制御する (Endo *et al.* Int Rev Cell Mol Biol. 2015; Kamizaki *et al.* Dev Dyn. 2021)。Wnt5a と Ror2 は、様々な腫瘍組織に発現し、Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化が腫瘍の進行に寄与することが報告されている (Enomoto *et al.* Oncogene. 2009; Nishita *et al.* Mol Cell Biol. 2010; O' Connell *et al.* Cancer Discov. 2013)。また、肺がんや卵巣がんでは間質組織にも Ror2 が発現しており、Ror2 の発現レベルと予後に関わりがあると報告されている (Huang *et al.* Int Rev Cell Mol Biol. 2015; Henry *et al.* Dev Dyn. 2017)。

我々は、胃がん微小環境の構成細胞の一つである骨髓由来間葉系幹細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルが活性化されることで、ケモカインの一つである CXCL16 の発現が誘導され、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: 以下、MSC) から分泌された CXCL16 が低分化型胃がん細胞株 MKN45 細胞に発現している CXCL16 受容体である CXCR6 に結合し、MKN45 細胞の増殖を促進することを報告した (Takiguchi *et al.* Cancer Science. 2016)。さらに、MKN45 細胞において CXCL16-CXCR6 シグナルが STAT3 の活性化を介して Ror1 の発現を誘導することにより、増殖および移動を促進することを報告した (Ikeda *et al.* Cancer Science. 2020)。これらの結果から、MSC から分泌された CXCL16 によって胃がん細胞における CXCL16-CXCR6 シグナルが活性化し、胃がんの進展が促進されることが示唆された。一方で、MSC から分泌された CXCL16 が MSC 自身の細胞表面に発現している CXCR6 に結合

し、CXCL16-CXCR6 シグナルの細胞自律的な活性化を介して、別のケモカインの発現が誘導されることで前立腺がんや乳がんの進展が促進されるという報告がある (Jung *et al.* Nat Commun. 2013; Chaturvedi *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2014)。そこで、本研究では MSC における細胞自律的なケモカインシグナルの活性化が胃がんの進展を制御する可能性について検討した。

まず、コントロール siRNA あるいは *Ror2* siRNA を導入した初代ヒト骨髓由来間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cell : 以下、hMSC) の馴化培地を回収し、培地中に含まれるサイトカインについてサイトカインアレイを用いて解析した。その結果、*Ror2* の発現抑制によって CXCL16 と CCL5 の発現が抑制されることが明らかとなった。また定量的 RT-PCR 法を用いた解析から、不死化骨髓由来間葉系幹細胞株である UE6E7T-12 細胞でも同様に *Ror2* の発現を抑制すると、CXCL16 および CCL5 の発現が抑制されることを見出した。これらの結果から、MSC において *Ror2* シグナルが CXCL16 と CCL5 の発現を誘導していることが示された。

続いて、UE6E7T-12 細胞において CXCL16 および CCL5 を介したシグナル伝達経路が細胞自律的に活性化している可能性を検討するために、UE6E7T-12 細胞における CXCL16 受容体 (CXCR6) および CCL5 受容体 (CCR1、CCR3、CCR5) の発現についてフローサイトメトリー法を用いた解析を行なった。その結果、CXCR6 の発現は確認されたが、CCL5 受容体の発現は確認されなかつた。このことから、UE6E7T-12 細胞において CXCL16-CXCR6 シグナルが細胞自律的に活性化している可能性が考えられた。また興味深いことに、UE6E7T-12 細胞において siRNA を用いて CXCL16 の発現を抑制すると、CCL5 の発現が抑制されることが示された。これらの結果より、UE6E7T-12 細胞において *Ror2* を介したシグナルが CXCL16 の発現を誘導し、CXCL16-CXCR6 シグナルが MSC において細胞自律的に活性化されることで CCL5 の発現が誘導されることが示された。

CCL5 は、様々ながん種の進展との関与が報告されている (Aldinucci & Colombatti. Mediators Inflamm. 2014)。そこで、UE6E7T-12 細胞由來の CCL5 が MKN45 細胞の増殖能および遊走能の亢進に関与しているか検討した。まず、MKN45 細胞の細胞膜上に CCL5 受容体が発現するか否かについてフローサイトメトリー法を用いた解析を行なったところ、CCR1 および CCR3 が MKN45 細胞で高発現していることを見出した。次に、CCL5 刺激によって MKN45 細胞の増殖能が亢進するか検討するために WST8 アッセイを行なったところ、CCL5 刺激では MKN45 細胞の増殖は亢進しないことが明らかとなっ

た。次に Transwell を用いて CCL5 刺激によって MKN45 細胞の遊走能が亢進するか検討した。その結果、CCL5 刺激により MKN45 細胞の遊走能が亢進することが明らかとなった。さらに、MKN45 細胞において CCR1 および CCR3 をそれぞれ発現抑制すると、CCL5 刺激による MKN45 細胞の遊走能の亢進が抑えられることが見出された。これらのことから、CCL5 は CCR1 および CCR3 を介して MKN45 細胞の遊走能を亢進する可能性が示唆された。

本研究により、がん微小環境を構成する MSC から *Ror2* シグナル依存的に分泌される CXCL16 は、細胞自律的な CXCL16-CXCR6 シグナルの活性化を誘導し CCL5 の発現を誘導することが明らかとなった。さらに MSC から分泌された CCL5 が、MKN45 細胞に発現する CCR1 および CCR3 を介して遊走能を亢進することが明らかになった。しかし、CCL5-CCR1/3 シグナルが MKN45 細胞の遊走能を促進する分子機構や、MKN45 細胞が MSC の増殖や分化、ケモカイン産生能などを制御する可能性については検討できていないため、今後さらなる解析が必要と考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3182 号	氏名	岡本 大輝
論文題目 Title of Dissertation	Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells  間葉系幹細胞から誘発される自律的および細胞間ケモカインシグナルが未分化胃がん細胞の遊走を調節する		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 福本 功 副査 Vice-examiner 横山 徳志 副査 Vice-examiner 田中一也		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】

近年、さまざまがん種の進行とがん微小環境の関係について多くの報告があり、がん微小環境は新たな治療標的として注目されている。がん微小環境は、がん細胞だけでなく周囲の間質組織に存在する間葉系幹細胞、がん関連線維芽細胞、腫瘍関連マクロファージなどで構成されており、これら細胞はケモカインを分泌し、がん細胞の増殖・遊走・転移を促進する。しかし、胃がん微小環境におけるケモカインシグナルが胃がんの進展を制御する分子機構は未解明な点が多い。

Ror ファミリー受容体に属する Ror2 は 分泌性糖タンパク質 Wnt5a の受容体として機能することで、細胞の極性、移動、増殖および分化を制御する。Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化が腫瘍の進行に寄与することが報告されている。また、脳がんや卵巣がんでは Ror2 の発現レベルと予後に関わりがあると報告されている。

胃がん微小環境の構成細胞の一つである骨髓由来間葉系幹細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルが活性化されることで、ケモカインの一つである CXCL16 の発現が誘導され、間葉系幹細胞(MSC)から分泌された CXCL16 が低分化型胃がん細胞株 MKN45 細胞に発現している CXCL16 受容体である CXCR6 に結合し、MKN45 細胞の増殖を促進することが報告されている(Takiguchi et al. Cancer Science. 2016)。さらに、MKN45 細胞において CXCL16-CXCR6 シグナルが STAT3 の活性化を介して Ror1 発現を誘導することにより、増殖および移動を促進することが報告されている(Ikeda et al. Cancer Science. 2020)。これらの結果から、MSC から分泌された CXCL16 によって胃がん細胞における CXCL16-CXCR6 シグナルが活性化し、胃がんの進展が促進されることが示唆された。一方で、MSC における細胞自律的なケモカインシグナルの活性化を介した胃がんの進展については明らかになっておらず、本研究では MSC における細胞自律的なケモカインシグナルが胃がんの進展を制御する可能性について検討した。

【方法・結果】

まず、MSCにおいては、サイトカインアレイを用いた解析で、Ror2 の発現抑制によって CXCL16 と CCL5 の発現が抑制されることが明らかとなった。また定量的 RT-PCR 法を用いた解析でも同様に Ror2 の発現抑制により、CXCL16 と CCL5 の発現が抑制されることが見出された。これらの結果から、MSCにおいて Ror2 シグナルが CXCL16 と CCL5 の発現を誘導していることが示された。

続いて、UE6E7T-12 細胞において CXCL16 と CCL5 を介したシグナル伝達経路が細胞自律的に活性化している可能性を検討し、UE6E7T-12 細胞における CXCL16 受容体(CXCR6)および CCL5 受容体(CCR1, CCR3, CCR5)の発現についてフローサイトメトリー法を用いた解析を行なった。その結果、CXCR6 の発現が確認され、UE6E7T-12 細胞において CXCL16-CXCR6 シグナルが細胞自律的に活性化している可能性が考えられた。また UE6E7T-12 細胞において CXCL16 の発現を抑制すると、CCL5 の発現が抑制されることが示された。これらの結果より、UE6E7T-12 細胞において Ror2 を介したシグナルが CXCL16 の発現を誘導し、CXCL16-CXCR6 シグナルが MSC において細胞自律的に活性化されることで CCL5 の発現が誘導されることが示された。

さらに、UE67T-12 細胞由来の CCL5 が MKN45 細胞の増殖能および遊走能の亢進に関与しているか検討した。また、MKN45 細胞の細胞膜上に CCL5 受容体が発現するか否かについてフロー cytometry 法を用いた解析を行なったところ、CCR1 および CCR3 が MKN45 細胞で高発現していることを見出した。そこで、CCL5 刺激によって MKN45 細胞の増殖能が亢進するか検討したが、CCL5 刺激では MKN45 細胞の増殖は亢進しないことが明らかとなった。次に、CCL5 刺激によって MKN45 細胞の遊走能が亢進するか検討すると、CCL5 刺激により MKN45 細胞の遊走能が亢進することが明らかとなった。さらに、MKN45 細胞において、CCR1 および CCR3 をそれぞれ発現抑制すると、CCL5 刺激による MKN45 細胞の遊走能の亢進が抑えられることが見出された。これらの結果から、CCL5 は CCR1 および CCR3 を介して MKN45 細胞の遊走能を亢進する可能性が示唆された。

#### 【総括】

本研究により、がん微小環境を構成する MSC から Ror2 シグナル依存的に分泌される CXCL16 は、細胞自律的な CXCL16-CXCR6 シグナルの活性化を誘導し CCL5 の発現を誘導することが明らかとなった。さらに MSC から分泌された CCL5 が、MKN45 細胞に発現する CCR1 および CCR3 を介して遊走能を亢進することが明らかになった。以上より、従来ほとんど行われなかつたがん微小環境を構成する MSC の細胞自律的ケモカインシグナルと胃がん進展の関係についての新たな重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。