



Role of Wnt5b-Ror1 signaling in the proliferation of pancreatic ductal adenocarcinoma cells

山内, 菜津子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8978号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492487>

※ 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

Role of Wnt5b-Ror1 signaling in the proliferation of pancreatic ductal adenocarcinoma cells

膵癌細胞の増殖におけるWnt5b-Ror1シグナルの役割

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: 南 康博 教授、掛地 吉弘 教授)

山内 菜津子

背景・目的

膵癌（Pancreatic ductal adenocarcinoma; PDAC）は、最も難治性で予後が悪い癌の一つであるが、PDAC の進行を制御する分子メカニズムは十分に解明されていない。PDAC の罹患率数は増加傾向にあることから、PDAC の進行を制御する分子メカニズムを解明することは喫緊の課題である。Ror1 と Ror2 からなる Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor（Ror）ファミリー受容体は、Wnt5a をはじめとする Wnt ファミリーリガンドの受容体として働くことで、細胞の極性、移動、増殖を制御する（Nishita *et al.* Trends Cell Biology. 2010）。我々はこれまでに、Wnt5a-Ror1 シグナルや Wnt5a-Ror2 シグナルが、胃癌、肺腺癌、骨肉腫、頭頸部扁平上皮癌など、さまざまな種類の癌の進行を制御する上で重要な役割を担っていることを明らかにしてきた（Takiguchi *et al.* Cancer Science. 2016）。最近、Ror ファミリー受容体は PDAC の進行にも関与していることが示されたが（Liu *et al.* BMC Cancer. 2021）、その詳細な分子メカニズムについては未解明な点も多い。本研究では、PDAC における Wnt-Ror シグナルの役割について解析した。

結果

まず、Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) からダウンロードした TCGA データベースを用いて、*Ror1* と *Ror2* の発現レベルが PDAC 患者の予後と関連するか否かを解析した。その結果、*Ror2* は PDAC 患者の予後との相関は認められなかったが、*Ror1* の発現が高いと、PDAC 患者の予後が悪いことが明らかとなった（ $p<0.05$ ）。そこで、本研究では PDAC における *Ror1* の役割を解析することとした。実際に PDAC 患者で *Ror1* が発現しているか解析するために、19 人の PDAC 患者のホルマリン固定パラフィン包埋標本から切片を作製し、抗 *Ror1* 抗体を用いた免疫組織的解析を実施したところ、*Ror1* は PDAC の組織内の管状構造に発現していた。これらの所見は、*Ror1* を介したシグナル伝達が PDAC の進行において重要な役割を担っている可能性を示唆している。

次に、PDAC 細胞株を用いて *Ror1* の機能解析を行った。まず、3 種類の PDAC 細胞株（PANC-1 細胞、AsPC-1 細胞、CFPAC-1 細胞）における *Ror1* の発現量について比較した。その結果、PANC-1 で *Ror1* が高発現していることを見出した。そこで、本研究では PANC-1 細胞を用いて *Ror1* の機能解析を実施することとした。近年、*Ror1* が複数の細胞の増殖促進に寄与していることが報告された。そこで、PANC-1 細胞の増殖抑制に *Ror1* が関与するか否かについて WST-8 アッセイおよび Edu アッセイを用いて解析したところ、*Ror1* の発現抑制によって PANC-1 細胞の増殖が有意に阻害された。また、*Ror1* 阻害剤である Strictinin で PANC-1 細胞を処理したところ、Strictinin の濃度依存的に PANC-1 細胞の増殖が抑制された。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いて *Ror1* 欠失 PANC-1 細胞を樹立し、NOG マウスに皮下移植した。移植から 7 週間後に腫瘍組織を摘出し、腫瘍重量を測定した。その結果、*Ror1* の発現を欠失させることで、腫瘍重量が有意に減少した（ $p<0.05$ ）。以上の解析結果から、*Ror1* は一部の PDAC の増殖を抑制することで、PDAC

の進行に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Ror1 は Wnt5a の受容体として働き、非古典的 Wnt シグナル伝達を活性化することが知られている (Nishita *et al.* Trends Cell Biology. 2010)。Wnt5a と Wnt5b の両方を高発現していることで知られる肺腺癌細胞株 PC-9 細胞とともに、3 種類の PDAC 細胞株 (PANC-1 細胞、AsPC-1 細胞、CFPAC-1 細胞) における *Wnt5a* の発現量を定量的 PCR 法を用いて比較解析したところ、PDAC 細胞株における *Wnt5a* の発現は、PC-9 細胞よりもはるかに低いことが明らかとなった。一方で、PANC-1 細胞では他の PDAC 細胞に比べ、*Wnt5a* に構造が最も近い Wnt リガンドである *Wnt5b* が高発現していた。このため、PANC-1 細胞では Wnt5a ではなく、Wnt5b が Ror1 を介してシグナルを伝達している可能性が考えられた。実際、TCGA の解析から、*Wnt5b* の発現が高いと PDAC 患者の予後が悪いことが明らかになった。そこで、PANC-1 細胞において *Wnt5b* の発現を抑制したところ、*Ror1* 発現抑制時と同様に PANC-1 細胞の増殖が阻害された。さらに、Wnt5b を恒常的に発現する L 細胞 (Wnt5b L 細胞) および、そのコントロール L 細胞の培養上清を濃縮することで、Wnt5b 調整培地 (Wnt5b-conditioned medium ; Wnt5b CM) およびコントロール調整培地 (コントロール-conditioned medium ; コントロール CM) を作製し、これら調整培地を PANC-1 細胞に添加した。その結果、Control を導入した PANC-1 細胞を Wnt5b CM 存在下で 3 日間培養すると、コントロール CM と比較して細胞増殖が促進された。一方、*Ror1* の発現を抑制した PANC-1 細胞を Wnt5b CM またはコントロール CM 存在下で 3 日間培養した場合、細胞増殖に明らかな差は認められなかった。これらの結果から、Wnt5b-Ror1 シグナルが PANC-1 細胞の増殖を促進することが示された。

結論・考察

本研究では、Wnt5b-Ror1 シグナルが PANC-1 細胞の増殖を促進することを見出した。このことから、Wnt5b と Ror1 が、一部の PDAC 患者における治療候補となり得ることを示唆している。Wnt5b-Ror1 シグナルの下流因子は未だほとんど同定されていないため、今後、Wnt5b-Ror1 シグナル伝達が PDAC 細胞の増殖を促進する分子メカニズムを明らかにすることが重要である。

本研究では、PANC-1 細胞における Ror1 と Wnt5b の発現レベルが、他の PDAC 細胞株である AsPC-1 細胞と CFPAC-1 細胞における発現レベルよりも高いことを示した。現在のところ、Ror1 と Wnt5b の発現レベルが 3 つの PDAC 細胞株で異なる理由は不明である。最近、PDAC 細胞では YAP/BRD4 経路によって Ror1 の発現が誘導されることが示された (Yamazaki *et al.* EMBO J. 2023)。一方、他の細胞種では、STAT3、NF- κ B、HIF1 α 、Notch、Nkx2-1 などによっても Ror1 の発現が転写誘導されることが報告されている (Li *et al.* PLoS One. 2010; Yamaguchi *et al.* Cancer Cell. 2012; Kamizaki *et al.* Journal of Biological Chemistry. 2017; Huang *et al.* International Immunopharmacology. 2023; Ishikawa *et al.* Cancer Science. 2023) が、PDAC 細胞における Ror1 の発現制御にこれらの因子が関与するか否か

は未だ不明である。また、Wnt5b の発現を制御する分子メカニズムもまだ解明されていない。PDAC 細胞の一部で Wnt5b と Ror1 の発現が増強されるメカニズムを明らかにするためには、今後さらなる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3405 号	氏 名	山内 菜津子
論 文 題 目 Title of Dissertation	Role of Wnt5b-Ror1 signaling in the proliferation of pancreatic ductal adenocarcinoma cells 膵癌細胞の増殖における Wnt5b-Ror1 シグナルの役割		
審 査 委 員 Examiner	主 査 鈴木 聡 Chief Examiner 副 査 福本 巧 Vice-examiner 副 査 今井 俊夫 Vice-examiner		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

膵癌は、最も難治性で予後が悪い癌の一つである。膵癌の進展にはいくつかの分子が関連していることが知られているが、PDACの進行の根底にある分子メカニズムは十分に解明されていない。我々はこれまでに、Wnt-Ror シグナル伝達が、胃癌、肺腺癌、頭頸部扁平上皮癌、骨肉腫など、諸種のがんの進行を制御する上で重要な役割を担っていることが明らかにしてきた。最近、Ror ファミリー受容体が膵癌の進展にも関与していることが示されたが、その詳細な分子メカニズムについては未解明な点が多い。そこで、本研究では膵癌における Wnt-Ror シグナルの役割について解析を行なった。

まず、TCGA データベースを用いて、Ror1 と Ror2 の発現レベルと膵癌患者の予後との関連を調べたところ、Ror1 の高発現は膵癌患者の予後不良と関連していたが、Ror2 の発現レベルとの関連は認められなかった。そこで膵癌における Ror1 の役割に注目し、免疫組織化学的解析により、19 人の膵癌患者由来の癌部を含むホルマリン固定パラフィン包埋標本切片を用いて抗 Ror1 抗体による免疫染色を行なったところ、Ror1 は膵癌組織内の管状構造に高発現しており、Ror1 を介するシグナル伝達が膵癌の進展に関与する可能性が示唆された。

次に、膵癌細胞株 PANC-1、AsPC-1、CFPAC-1 における Ror1 の発現解析を行なったところ、PANC-1 細胞が最も Ror1 を高発現しており、以降の解析では主に PANC-1 細胞を用いた。PANC-1 細胞の増殖や細胞周期進展における Ror1 の機能を解析するため、*Ror1* ノックダウンによる Ror1 の発現抑制を行い、WST-8 アッセイ、EdU アッセイによる解析を行ったところ、PANC-1 細胞の増殖及び細胞周期進展が有意に阻害された。また、Ror1 特異的阻害剤である Strictinin で処理したところ、Strictinin の濃度依存的に PANC-1 細胞の増殖が阻害された。次に、CRISPR-Cas9 システムを用いて *Ror1* 遺伝子ノックアウト PANC-1 細胞を樹立し、NOG マウスに皮下移植し、移植から 7 週間後に腫瘍組織を摘出し、腫瘍重量を測定したところ、PANC-1 細胞における *Ror1* 遺伝子ノックアウトにより、腫瘍重量が親細胞に比べて有意に減少することが見出された。これらの *in vitro*、*in vivo* の解析から、Ror1 は PANC-1 の増殖・進展に重要な役割を担うことが示唆された。

Ror1 は Wnt5a の受容体として働き、非古典的 Wnt シグナル伝達経路を活性化することが知られている。PANC-1 細胞において Wnt5a の発現は殆ど検出されないが、Wnt5a の近縁分子である Wnt5b の発現は、他の細胞株に比べて有意に高いことが判明した。実際、TCGA 解析からも、*Wnt5b* の高発現が膵癌の予後不良と関連していることが見出された。そこで、PANC-1 細胞において Wnt5b の発現をノックダウンにより抑制したところ、Ror1 の場合と同様、PANC-1 細胞の増殖が有意に阻害された。このことから、PANC-1 細胞では Wnt5b と Ror1 によるシグナル伝達が細胞増殖を促進することが示唆される。そこで、Ror1 の発現を抑制した PANC-1 細胞に、濃縮 Wnt5b 含有培地 (Wnt5b-conditioned medium; CM) または Wnt5b 不(低)含培地 (対照 CM) を用いて培養したところ、対照 PANC-1 細胞 (siControl を導入) を Wnt5b CM で 3 日間培養すると、コントロール CM と比較して細胞増殖が有意に促進された。一方、*Ror1* ノックダウン PANC-1 細胞を Wnt5b CM またはコントロール CM で 3 日間培養した際には、細胞増殖に明らかな差は見られなかった。以上の結果から、Wnt5b-Ror1 シグナルが PANC-1 細胞の増殖を促進することが示唆される。

本研究は、膵癌患者における Ror1 の発現解析及び Ror1 を高発現する膵癌細胞 PANC-1 を用いて Wnt5b-Ror1 シグナルの機能解析を行ったものであるが、従来殆ど行われなかった膵癌の進展と Ror1 の高発現との関連や PANC-1 細胞に高発現する Wnt5b、Ror1 による自律的 Wnt5b-Ror1 シグナルの活性化がこの膵癌細胞の増殖を促進することなどの重要な知見を得たものとして 価値ある集積であると認める。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。