



WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells

神澤, 真紀

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5874

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005874>

※ 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。



学位論文の内容要旨

WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells

WNT5A はヒト胃癌細胞の上皮・間葉移行、癌幹細胞性獲得において
主要な調節因子である

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
病理診断学
(指導教員：伊藤智雄教授)

神澤 真紀

【背景】がん微小環境は、がん細胞の増殖や浸潤能、腫瘍内部の血管新生促進を通じ、腫瘍促進に働くことが知られる。このがん間質には、細胞外マトリックス、サイトカイン、成長因子等の各種液性因子、線維芽細胞、筋線維芽細胞、血管をはじめとする細胞性因子が含まれるが、その中でも癌関連線維芽細胞（CAF）が腫瘍促進に作用する重要な因子と考えられている。これまでの申請者らのグループは、胃癌細胞株 MKN-7 と骨髓由来 CAF を共培養することで、両者の直接的な接触が WNT5A、TGF- β の発現亢進させる引き金となり、MKN-7 細胞の上皮間葉移行（EMT）や癌幹細胞性再獲得を促進させること示した。WNT5A は WNT ファミリーに含まれ、個体発生や細胞恒常性維持において重要な役割を果たす。ヒト悪性腫瘍での WNT5A の発現亢進が、細胞の浸潤性を高める実験結果も報告させており、胃癌でも WNT5A 発現低下が肝転移巣の形成を抑制することがマウスを用いた実験で示されている。ヒト胃癌組織の約 30% に WNT5A 過剰発現があり、腫瘍径、リンパ節転移の頻度、臨床病理学病期との間に相関関係があることが報告されている。本研究では、胃癌における WNT5A の機能を、EMT や癌幹細胞性再獲得の見地から解明することを試みた。

【方法】ヒト胃癌細胞株 MKN-7、TMK-1、HSC-45、MKN-74、HSC-57 を用いた。そのうち MKN-7 については、WNT5A 遺伝子（pWNT5A）導入実験、shWNT5A を用いた発現抑制実験を行った。RT-PCR や cDNA マイクロアレイ解析による各種遺伝子発現の検討に加え、神戸大学病院において外科的に切除された 42 例の胃癌検体（リンパ節転移あり 21 例・リンパ節転移なし 21 例）についてもホルマリン固定、パラフィン包埋切片より WNT5A 発現を免疫組織化学的に検討した。

【結果】今回用いた 5 種類の胃癌細胞株は mRNA、蛋白質いずれにおいても内因性に WNT5A 発現があることが確認された。MKN-7 細胞に pWNT5A を導入することにより、MKN-7 細胞は形態学的に紡錘形を示す変化が見られたものの、対照群と比べ有意な細胞数の増加は無く、むしろ細胞増殖は抑制されるという結果となった。細胞運動能については、pWNT5A 導入により運動能が亢進する結果が得られた。pWNT5A 導入による形態的変化より MKN-7 細胞に EMT が誘導されているのではないかと予想し、各種 EMT 関連因子の発現変化を検討したところ、EMT 誘導因子 Snail (SNAI1)、間葉系マーカー vimentin (VIM)、癌幹細胞 (CSC) マーカー CD133 の発現が促進されることが示された。上皮系マーカーである E-cadherin (CDH1) の発現抑制は顕著ではなかったものの、EMT 促進や CSC 獲得における WNT5A の役割が示唆された。これらの結果を踏まえ、SCID マウス皮下に pWNT5A を導入した MKN-7 細胞を接種させたところ、対照群と比して pWNT5A 導入 MKN-7 では有意に腫瘍形成が促進され、WNT5A が癌幹細胞性再獲得に作用することを支持する結果となった。反対に、shWNT5A を導入することにより、MKN-7 細胞の内因性 WNT5A 発現を抑制する実験を試みたところ、SNAI1 と CD133 については mRNA、蛋白質レベルにおいて抑制されたことが示された。更に、mRNA レベルでの TGF β RI, MMP2,

MMP9発現低下、CSC マーカー CD44 もまた抑制されることが示され、WNT5A 発現抑制が EMT 抑制、癌幹細胞性低下と関連する可能性も示唆された。この時に MKN-7 細胞での発現遺伝子の変化を cDNA マイクロアレイにて網羅的に解析したところ、WNT5A による細胞シグナル抑制によって、血管新生因子、細胞増殖因子など腫瘍促進因子等の各種シグナルの抑制が確認された。最後に、胃癌組織での WNT5A 発現異常と臨床病理学的因子との関連について検討を行ったところ、WNT5A 高発現は 29 例(66%)で認められた。WNT5A 高発現は、性別、年齢、進度、リンパ節転移とは有意な相関は無かったものの、びまん型 (diffuse-type) 胃癌は腸型 (intestinal-type) 胃癌に比して WNT5A 陽性率が高い傾向が認められた。興味深いことに、intestinal-type 胃癌腫瘍先進部において WNT5A の発現は腫瘍辺縁部に特に強く、胃癌細胞と CAF との接触が WNT5A 発現を亢進させるという以前の研究結果に矛盾しないものであった。

【結語】WNT5A は胃癌細胞において EMT を促進させると同時に、癌幹細胞性再獲得に作用することが明らかとなった。WNT5A は、胃癌のがん微小環境を理解する上でも重要な因子である可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2323号	氏名	神澤 真紀
論文題目 Title of Dissertation	WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells		
	WNT5A はヒト胃癌細胞の上皮・間葉移行、癌幹細胞性獲得において主要な調節因子である		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 副査 Vice-examiner 副査 Vice-examiner	栗 健 林 祥岡 寺島 俊雄	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

癌微小環境は、癌細胞の増殖や浸潤能、腫瘍内部の血管新生促進を通じ、腫瘍促進に働くことが知られている。この癌間質には、細胞外マトリックス、サイトカイン、成長因子等の各種液性因子、線維芽細胞、筋線維芽細胞、血管をはじめとする細胞性因子が含まれるが、その中でも癌関連線維芽細胞（CAF）が腫瘍促進に作用する重要な因子と考えられている。これまで、申請者らのグループは、胃癌細胞株 MKN-7 と骨髓由来 CAF を共培養することで、両者の直接的な接触が WNT5A、TGF-β の発現亢進させる引き金となり、MKN-7 細胞の上皮間葉移行（EMT）や癌幹細胞性再獲得を促進させること示してきた。WNT5A は WNT ファミリーに含まれ、個体発生や細胞恒常性維持において重要な役割を果たしている。ヒト悪性腫瘍での WNT5A の発現亢進が、細胞の浸潤性を高める実験結果も報告されており、胃癌でも WNT5A 発現低下が肝転移巣の形成を抑制することがマウスを用いた実験で示されている。また、ヒト胃癌組織の約 30% に WNT5A 過剰発現があり、腫瘍径、リンパ節転移の頻度、臨床病理学病期との間に相関関係があることが報告されている。本研究では、EMT や癌幹細胞性再獲得の見地から、胃癌における WNT5A の機能を検討した。

ヒト胃癌細胞株 MKN-7 を用い、WNT5A 遺伝子 (pWNT5A) 導入実験、shWNT5A を用いた発現抑制実験を行った。RT-PCR や cDNA マイクロアレイ解析による各種遺伝子発現の検討に加え、神戸大学医学部附属病院において外科的に切除された 42 例の胃癌検体（リンパ節転移あり 21 例・リンパ節転移なし 21 例）についてもホルマリン固定、パラフィン包埋切片より WNT5A 発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、MKN-7 細胞に pWNT5A を導入することにより、MKN-7 細胞は形態学的に紡錘形を示す変化が見られたものの、対照群と比べ有意な細胞数の増加は無く、むしろ細胞増殖は抑制されるという結果となった。細胞運動能については、pWNT5A 導入により運動能が亢進する結果が得られた。pWNT5A 導入による形態的変化より MKN-7 細胞に EMT が誘導されているのではないかと予想し、各種 EMT 関連因子の発現変化を検討したところ、EMT 誘導因子 Snai1 (SNAIL1)、間葉系マーカー vimentin (VIM)、癌幹細胞 (CSC) マーカー CD133 の発現が促進されることが示された。上皮系マーカーである E-cadherin (CDH1) の発現抑制は顕著ではなかったものの、EMT 促進や CSC 獲得における WNT5A の役割が示唆された。これらの結果を踏まえ、SCID マウス皮下に pWNT5A を導入した MKN-7 細胞

を接種させたところ、対照群と比して pWNT5A 導入 MKN-7 では有意に腫瘍形成が促進され、WNT5A が癌幹細胞性再獲得に作用することを支持する結果となった。反対に、shWNT5A を導入することにより、MKN-7 細胞の内在性 WNT5A 発現を抑制する実験を試みたところ、SNAI1 と CD133 については mRNA、蛋白質レベルにおいて抑制されたことが示された。更に、mRNA レベルでの TGF β RI、MMP2、MMP9 発現低下、CSC マーカーCD44 もまた抑制されることが示され、WNT5A 発現抑制が EMT 抑制、癌幹細胞性低下と関連する可能性も示唆された。また、MKN-7 細胞での発現遺伝子の変化を cDNA マイクロアレイにて網羅的に解析したところ、WNT5A による細胞シグナル抑制によって、血管新生因子、細胞増殖因子など腫瘍促進因子等の各種シグナルの抑制が確認された。最後に、胃癌組織での WNT5A 発現異常と臨床病理学的因子との関連について検討を行ったところ、WNT5A 高発現は 29 例 (66%) で認められた。WNT5A 高発現は、性別、年齢、進度、リンパ節転移とは有意な相関は無かったものの、びまん型 (diffuse-type) 胃癌は腸型 (intestinal-type) 胃癌に比して WNT5A 陽性率が高い傾向が認められた。興味深いことに、intestinal-type 胃癌腫瘍先進部において WNT5A の発現は腫瘍辺縁部特に強く、胃癌細胞と CAF との接触が WNT5A 発現を亢進させるという以前の研究結果に矛盾しないものであった。

本研究は、胃癌における WNT5A の機能について、その EMT や癌幹細胞性再獲得について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつた WNT5A が胃癌細胞において EMT を促進させると同時に、癌幹細胞性再獲得に作用することについて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。