



Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis

Takiguchi, Gosuke

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6691号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006691>

※ 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

Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis

間葉系幹細胞における Wnt5a-Ror2 シグナルは、
CXCL16-CXCR6 シグナル経路の活性化を介して胃癌細胞の増殖を促進する

瀧口 豪介, 西田 満, 栗田 佳奈, 掛地 吉弘, 南 康博

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

瀧 口 豪 介

受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は、Wnt5a 受容体として β カテニン非依存的 Wnt シグナル経路を活性化するが、近年、様々な癌細胞において Wnt5a と Ror2 の両方またはそれらの一方が過剰発現していることが明らかにされている。それらの過剰発現は、Src ファミリーチロシンキナーゼや JNKなどを介した Wnt5a-Ror2 シグナルの恒常的な活性化を誘導し、その結果、癌浸潤に必須なマトリックスメタロプロテアーゼの発現やそれに伴う浸潤突起の形成をもたらすことも見出されている。一方、癌の進展には癌細胞だけでなく、癌周囲の間質の存在も重要視されている。癌周囲の間質は様々な細胞や成分で構成されているが、その中でも骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSCs) は癌の進展に大きく寄与していると考えられている。MSCs は遺伝子的に不均一な集団であるが、いずれもその細胞表面には CD73、CD90、CD105 を発現し、様々な成長因子やサイトカインを産生・分泌する。また、MSCs は *in vivo* にて癌細胞の増殖を促進させる能力や、自身が癌関連線維芽細胞 (CAFs) を含めた様々な間葉系細胞へと分化する能力をもっている。興味深いことに、MSCs は Ror2 を発現し、その骨芽細胞分化に関与することが知られている。しかし、MSCs において Wnt5a-Ror2 シグナルが、癌の進展に関与しているのかどうかは全く明らかにされていない。本研究では MSCs における Wnt5a-Ror2 シグナルが未分化胃癌細胞の増殖能に与える影響について解析した。

本研究ではルシフェラーゼを恒常的に発現しているヒト未分化胃癌細胞株 MKN45 とヒト初代培養骨髄由来 MSCs を用いた。MKN45 細胞は Wnt5a と Ror2 をほとんど発現していないが、MSCs はこれらを発現していることを確認した。また、MKN45 紡錐のルシフェラーゼ活性はその細胞数と相関することを確認した。

最初に MSCs が MKN45 細胞の増殖に及ぼす影響について調べるために MSCs と MKN45 細胞を同じ well に入れ細胞同士が直接接触する条件で共培養を行った。すると 9 日目の時点で共培養した群では単培養に比べ、細胞増殖が有意に促進していた。次に MSCs の MKN45 細胞に対する細胞増殖促進作用に細胞同士の直接的な接触が必要かどうか調べるために、0.4 μ m の孔を持つフィルターで上下槽が区切られた Transwell を用い間接的共培養を行った。9 日目の時点で直接的共培養と同様に MKN45 細胞の単培養に比べ、MSC との共培養で MKN45 細胞の増殖は促進された。

この MSC の MKN45 細胞に対する増殖促進作用に Wnt5a-Ror2 シグナルが関与しているかどうか調べるために、siRNA により Ror2 または Wnt5a をノックダウンした MSCs を用いて、同様に MKN45 細胞との直接的または間接的共培養を行った。Ror2 および Wnt5a のいずれをノックダウンした条件においても、MKN45 細胞に対する増殖促進作用は抑制され、MSCs のもつ細胞増殖促進作用に Wnt5a-Ror2 シグナルが関与していることが示された。

間接的共培養でも細胞増殖促進作用が認められたことより、細胞増殖促進に何らかの液性因子が関与している可能性が考えられた。そこでその仮説を検証するため、液性因子が含まれている可能性がある MSCs の培養上清を用いて、MKN45 細胞の増殖が促進されるか確認した。6 日間 MSCs を培養した培養上清を回収し、培地に 25% の濃度になるように

加えて MKN45 細胞を培養すると、加えなかった群に比べ細胞増殖が促進された。さらに、その液性因子の分泌に *Wnt5a-Ror2* シグナルが関与しているかを調べるため、*Ror2*をノックダウンした MSCs から回収した培養上清を用いて同様に MKN45 細胞を培養した結果、MKN45 細胞に対する増殖促進作用が有意に抑制された。そこでその液性因子を同定するために、MSCs の培養上清に含まれるケモカインを抗体アレイを用いて網羅的に解析した。その結果、IL-8、CCL2、CXCL12、CXCL16 の発現が *Ror2*のノックダウンにより減弱した。定量的 RT-PCR 法を用いてこれらの因子の発現を解析した結果、*CXCL16*の発現が *Ror2* のノックダウンに伴い有意に減弱することが確認された。さらに、ELISA 法を用いた解析からも、*Ror2*または *Wnt5a* のノックダウンにより MSCs 培養上清中の CXCL16 の濃度が低下することを確認した。よって *Wnt5a-Ror2* シグナルにより MSCs から発現・分泌される CXCL16 が MKN45 細胞に作用し増殖を促進させることが示唆された。

次に CXCL16 が実際に MKN45 細胞に対して増殖促進作用を有するか確認するため、リコンビナントの CXCL16 を培地に加えて細胞増殖に与える影響を確認すると、CXCL16 の添加により細胞増殖の促進が認められた。また siRNA を用いて MSCs の *CXCL16*をノックダウンすることにより、共培養で見られた MKN45 細胞への増殖促進作用が抑制された。さらに CXCL16 に対する中和抗体を培地に加えることで、共培養による細胞増殖促進作用を抑制できることが確認された。

CXCL16 には膜型および分泌型が存在し、膜型の CXCL16 が ADAM ファミリーにより切断されて分泌型となる。分泌された CXCL16 はその受容体である CXCR6 に結合し、細胞増殖を促進すると考えられる。そこで MKN45 細胞における CXCR6 の発現を確認すると、MKN45 細胞は MSCs に比べ CXCR6 が高発現している事が確認された。最後に siRNA を用いて MKN45 細胞の CXCR6 をノックダウンし、MSCs と共培養を行うと、CXCR6 をノックダウンした MKN45 細胞では MSCs による細胞増殖促進作用が抑制された。

以上の実験より、骨髓由来の MSCs は *Wnt5a-Ror2* シグナルにより CXCL16 を発現・分泌し、分泌された CXCL16 は未分化胃癌細胞 MKN45 が発現する CXCR6 に結合し、細胞内にシグナルを伝達することで、細胞増殖を促進させることができた。Wnt5a-Ror2 シグナルがいかにして CXCL16 の発現を制御しているか、CXCL16-CXCR6 シグナルがいかにして MKN45 細胞の増殖を促進させるのか、また、CXCR6 を発現している他の癌腫に対しても MSCs は細胞増殖促進作用を有するかなど、今後さらなる研究が必要である。CXCL16 に対する中和抗体や、MSCs における *Ror2*、*Wnt5a*、*CXCL16*、および MKN45 細胞における CXCR6 のノックダウンはいずれも共培養による MKN45 細胞の増殖の抑制することから、*Wnt5a-Ror2* シグナル、CXCL16-CXCR6 シグナルはともに癌治療のターゲットとなりうることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2593号	氏名	瀧口 豪介
論文題目 Title of Dissertation	<p>Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis</p> <p>間葉系幹細胞における Wnt5a-Ror2 シグナルは、CXCL16-CXCR6 シグナル経路の活性化を介して胃癌細胞の増殖を促進する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 横崎 宏 Chief Examiner</p> <p>副査 具 英成 Vice-examiner</p> <p>副査 真庭 謙昌 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は、Wnt5a 受容体として β カテニン非依存的 Wnt シグナル経路を活性化するが、様々な癌細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルの恒常的な活性化の結果、浸潤に必須なマトリックスメタロプロテアーゼの発現や浸潤突起の形成亢進が見出されている。一方、癌の進展には癌周囲の間質、特に骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSCs) の関与が注目されている。MSCs は不均一な集団であるが、様々な成長因子やサイトカインを分泌する。また、MSCs は *in vivo* にて癌細胞の増殖を促進させる能力や自身が他の様々な間葉系細胞へと分化する能力をもっている。MSCs は Ror2 を発現し、骨芽細胞分化に関与することが知られているが、MSCs における Wnt5a-Ror2 シグナルが、癌の進展に関与しているかどうかは不明である。本研究では MSCs における Wnt5a-Ror2 シグナルが未分化胃癌細胞の増殖に与える影響を解析した。本研究ではルシフェラーゼを恒常的に発現したヒト未分化胃癌細胞株 MKN45 とヒト骨髄由来 MSCs を用いた。MKN45 細胞は Wnt5a と Ror2 をほとんど発現していないが、MSCs はこれらを発現している。得られた研究結果は以下のとくである。

MSCs が MKN45 細胞の増殖に及ぼす影響を検討するため、MSCs と MKN45 が直接接觸する条件で共培養を行ったところ、9 日目の時点で共培養群では単培養群に比べ、細胞増殖が有意に促進していた。次に MSCs と MKN45 を Transwell を用い間接的共培養を行った。9 日目の時点で直接的共培養と同様、MSC との共培養で MKN45 細胞の増殖は促進された。この MSC の MKN45 に対する増殖促進作用における Wnt5a-Ror2 シグナルの関与を検討するため、Ror2 または Wnt5a をノックダウンした MSCs を用いて、前述の MKN45 との直接的または間接的共培養を行った。Ror2、Wnt5a のいずれをノックダウンした場合も MKN45 に対する増殖促進作用は抑制され、MSCs における Wnt5a-Ror2 シグナルが関与していることが示された。

間接的共培養でも細胞増殖促進作用が認められ、細胞増殖促進に液性因子が関与している可能性が考えられた。そこで MSCs の培養上清を用いて、MKN45 の増殖促進を確認したところ、MSCs を 6 日間培養した培養上清により細胞増殖促進が確認された。また、Ror2 をノックダウンした MSCs からの培養上清を用いて MKN45 を培養した結果、MKN45 に対する増殖促進作用が有意に抑制された。次に液性因子の同定のために、MSCs 培養上清に含まれるケモカインを抗体アレイを用いて網羅的に解析したところ、IL-8、CCL2、CXCL12、CXCL16 の発現が Ror2 のノックダウンにより減弱した。定量的 RT-PCR 法による解析の結果、CXCL16 の発現が Ror2 のノックダウンに伴い有意に減弱すること、ELISA 解析から Ror2 または Wnt5a のノックダウンにより CXCL16 の濃度が低下することから、MSCs における Wnt5a-Ror2 シグナルにより発現・分泌される CXCL16 が MKN45 に作用し増殖を促進させることが示唆された。

次に、精製(組換え)CXCL16 を培地に添加し細胞増殖に与える影響を確認したところ、CXCL16 により細胞増殖の促進が認められた。また MSCs における CXCL16 をノックダウンしたところ、共培養で見られた MKN45 細胞への増殖促進作用が抑制され、さらに CXCL16 に対する中和抗体により共培養での細胞増殖促進作用が抑制された。MSCs から分泌された CXCL16 はその受容体である MKN45 上の CXCR6 に結合し、細胞増殖を促進すると考えられる。MKN45 では MSCs に比べ CXCR6 が高発現しているが、MKN45 細胞における CXCR6 のノックダウンにより、MSCs による MKN45 の細胞増殖促進が抑制された。以上より、骨髄由来 MSCs における Wnt5a-Ror2 シグナルにより CXCL16 が発現・分泌され、CXCL16 は未分化胃癌細胞 MKN45 上の CXCR6 に結合し、細胞増殖を促進させると考えられる。また、Wnt5a-Ror2 シグナル、CXC 及び 16-CXCR6 シグナルは癌治療のターゲットとなりうることが示唆された。

本研究は、癌細胞の微小環境に存在する MSCs における Wnt5a-Ror2 シグナルがケモカイン CXCL16 の発現・分泌を介し、その受容体 CXCR6 を発現する胃癌細胞の増殖を促進することを初めて明らかにしたもので、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。