



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 などを経た 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 細胞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、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、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、骨髄由来の 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明らかとなった。*Wnt5a-Ror2* シグナルがいかんして *CXCL16* の発現を制御しているか、*CXCL16-CXCR6* シグナルがいかんして 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。