

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16720

研究課題名(和文) 胃癌の腫瘍間質を介した抗癌剤抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) To identify molecular mechanism of anticancer drug resistance through tumor stroma of gastric cancer

研究代表者

内原 智幸 (Uchihara, Tomoyuki)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：60835172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblast: CAFs)が分泌する液性因子が抗がん剤感受性を制御することが示唆されてきたが、詳細な分子機構は明らかではなかった。本研究では、CAFが分泌する細胞外小胞(Extracellular vesicles: EVs)によって引き起こされる胃癌の抗がん剤抵抗性獲得メカニズムを明らかにした。さらにEVsの質量分析の結果、抗がん剤抵抗性を促進するCAF-EVs中のAnnexinA6を同定しその機能を解明した。今後、胃癌においてAnnexinA6やCAFをターゲットにした新たな創薬開発に向けた研究の展開が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行した胃癌においては抗がん剤などの様々な薬剤が用いられているが、十分な病状の改善は得られていない。がん細胞周囲のがん微小環境の構成細胞の一つである、がん関連線維芽細胞(CAFs)は様々な因子を分泌することでがんの悪性を強めることが知られている。

胃癌に対して抗がん剤治療が効きにくくなる「治療抵抗性」に関わる因子として、CAFが分泌する細胞外小胞(EVs)中のAnnexinA6(アネキシンA6)が胃癌細胞に取り込まれることで、抗がん剤の効果が低下することが分かった。AnnexinA6やCAFをターゲットにした新たな創薬開発の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Some secreted factors from cancer associated fibroblasts (CAFs) enhance drug resistance, however the molecular mechanism is unclear. In the current study, we revealed the mechanism of drug resistance caused by extracellular vesicles (EVs) from CAFs. Moreover, mass spectrometry of GC-EVs and CAF-EVs showed the importance of AnnexinA6 in CAF-EVs which promoted drug resistance of gastric cancer. These findings demonstrate that drug resistance is conferred by annexin A6 in CAF-EVs and provide a potential avenue for overcoming GC drug resistance in conventional chemotherapeutics.

研究分野：腫瘍生物学、消化器外科学

キーワード：腫瘍微小環境 胃癌 CAFs 細胞外小胞 抗ガン剤抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞をとりまく腫瘍微小環境において線維芽細胞は、がん細胞やその他の免疫細胞等により活性化され、がん関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAFs) として様々な液性因子を分泌し腫瘍進展に関与することが知られている。一方、胃がんはスクリーニングおよび治療法の進歩に伴い予後改善が認められるようになったが、進行胃がん患者に対しては転移・再発のため依然として満足できる遠隔成績は得られていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は未だ胃がんにおける機能の全貌が明らかになっていない腫瘍間質 (ストローマ)由来因子のよって引き起こされる抗がん剤治療抵抗性メカニズムを解明することである。

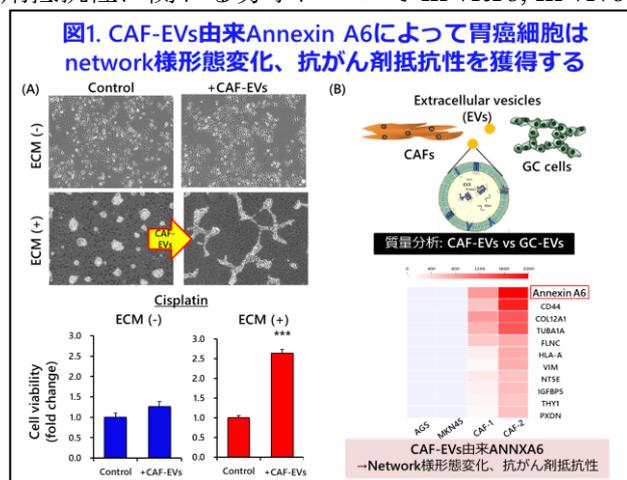
## 3. 研究の方法

胃がん切除検体を用いて、CAF マーカーである  $\alpha$ SMA の免疫染色・定量化を行い、予後との関連性を評価する。CAF の conditioned medium (CM) および CAF-CM から抽出した細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs) を用いて培養した胃がん細胞の遺伝子発現変化、抗がん剤感受性について検討する。さらに胃がん由来 EVs、CAF 由来 EVs を用いた質量分析を行う。抗がん剤抵抗性に関与する分子について *in vitro*, *in vivo* で機能解析を行う。

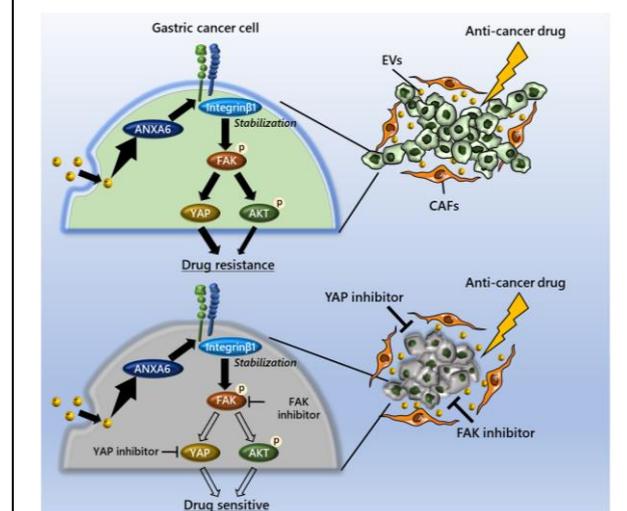
## 4. 研究成果

CAFs の主要なマーカーである  $\alpha$ SMA の免疫染色・定量化を行い予後との相関を比較したところ、CAFs が多い症例 (CAF-high) では有意に予後不良と相関することが明らかになった。さらに、Stage IV で化学療法を行った症例においても同様に CAFs が多いと有意に予後不良と相関することが分かった。このことから、胃がん由来 CAFs には抗がん剤抵抗性獲得等に関与する重要な因子が存在すると考えた。

我々は CAFs が分泌する EVs に注目した。細胞外マトリックスの存在下で CAF-EVs で培養した胃がん細胞は network 様の形態変化を起こし、顕著な抗がん剤抵抗性を獲得することを見出した (図 1A)。また、CAF-EVs と胃がん細胞由来 EVs の質量分析の結果、CAF-EVs において最も特異的に高発現していた Annexin A6 が network 様の形態変化、抗がん剤抵抗性獲得に重要であることを示した (図 1B)。胃がん腹膜播種モデルマウスを用いた検証においても胃がんが CAF-EVs 由来 Annexin A6 によって抗がん剤抵抗性を獲得するということが明らかになった。Annexin A6 は胃がん細胞内に取り込まれた後、胃がん細胞膜上の  $\beta$ 1 integrin を安定化させ、下流の FAK-YAP pathway を活性化させた。さらに FAK 阻害剤・YAP 阻害剤を用いた検証において、これらが有意に Network 様形態変化、抗がん剤抵抗性を抑制することを明らかにした。また、胃がん腹膜播種モデルマウスにおいても、CAF-EVs とともに FAK 阻害剤・YAP 阻害剤を投与した群では有意に腫瘍重量が減少することを明らかにした。つまり、FAK 阻害剤・YAP 阻害剤は CAF-EVs によって抗がん剤抵抗性を獲得した胃がんに対する治療薬となり得ることを示した。



**図2. CAF-EVsによる抗がん剤抵抗性獲得メカニズム**



まとめると、CAF-EVs 由来の Annexin A6 は胃癌細胞に取り込まれ、細胞膜上の  $\beta 1$  integrin を安定化、下流の FAK-YAP pathway を介して抗がん剤抵抗性獲得に関わる。また、FAK 阻害剤・YAP 阻害剤が CAF-EVs によって抗がん剤抵抗性を獲得した胃癌に対する治療薬となり得ることを明らかにした (図 2)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uchihara T, Miyake K, Yonemura A, Komohara Y, Itoyama R, Koiwa M, Yasuda T, Arima K, Harada K, Eto K, Hayashi H, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Yoshida N, Yashiro M, Masuda M, Ajani JA, Tan P, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular Vesicles from Cancer-Associated Fibroblasts Containing Annexin A6 Induces FAK-YAP Activation by Stabilizing $\alpha$ 1 Integrin, Enhancing Drug Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3222 ~ 3235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内原 智幸, 石本 崇胤, 江藤 弘二郎, 長井 洋平, 岩槻 政晃, 岩上 志朗, 馬場 祥史, 吉田 直矢, 馬場 秀夫
2. 発表標題 胃癌Cancer associated fibroblasts由来細胞外小胞中のAnnexin A6 はIntegrin/FAK-YAPシグナルを介した抗がん剤抵抗性を促進する
3. 学会等名 第53回制癌剤適応研究会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Uchihara T, Ishimoto T, Miyake K, Yonemura A, Yasuda T, Itoyama R, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Baba H.
2. 発表標題 Extracellular vesicles from cancer associated fibroblasts induce drug resistance via integrin $\alpha$ 1/FAK signaling in gastric cancer cells.
3. 学会等名 AACR
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内原 智幸、石本 崇胤、馬場 秀夫
2. 発表標題 Cancer associated fibroblasts由来細胞外小胞による胃がん薬剤治療抵抗性メカニズムの解明
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会 研究奨励賞受賞講演
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Uchihara T, Yonemura A, Miyake K, Yasuda T, Akiyama T, Kitamura F, Itoyama R, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Baba H and Ishimoto T
2. 発表標題 To identify the molecular mechanisms of drug resistance induced by gastric cancer associated fibroblast
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内原 智幸、石本 崇胤、江藤 弘二郎、長井 洋平、岩槻 政晃、岩上 志朗、馬場 祥史、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 ストローマ由来細胞外小胞による胃がん治療抵抗性メカニズムの解明
3. 学会等名 第28回癌病態治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内原 智幸、石本 崇胤、米村 敦子、三宅 慧輔、安田 忠仁、伊東山 瑠美、江藤 弘次郎、岩槻 政晃、長井 洋平、岩上 志朗、馬場 祥史、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 胃癌関連線維芽細胞由来エクソソームを介した薬剤抵抗性メカニズムの解明
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------