

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16331

研究課題名（和文）間葉系幹細胞による癌悪性化に関するシグナルネットワーク機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of signal network mechanism for malignant transformation of cancer by MSC

研究代表者

瀧口 豪介（Takiguchi, Gosuke）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：60647767

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：今回の研究では、CXCL16-CXCR6シグナルが、自律的にMSCにおいても活性化され、CCL5の発現を上昇させることを示した。また、CCL5受容体であるCCR1/CCR3がMKN45細胞表面に発現し、MSC由来CCL5がCCR1/CCR3との結合し、MKN45細胞の移動を促進することを示した。MSCのCXCL16-CXCR6シグナルがCCL5の発現を上昇させ、MKN45細胞でCCL5-CCR1/3シグナルが活性化され、MKN45細胞の移動を促進することを示した。これらの結果はMSC由来ケモカインが、未分化胃癌細胞の進展を制御していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌関連線維芽細胞と癌細胞とのシグナルネットワークに関しては、未だ不明な点で、Wnt5a-Ror2シグナルがMSCsにおいてCXCL16の分泌を高め、胃癌細胞MKN45のCXCR6を刺激することにより、その細胞増殖が促進されることが報告された。本研究は、癌微小環境におけるCAFとがん細胞の相互作用から、がんの増殖、浸潤、転移を細胞間・細胞内のシグナルネットワークの観点から解析する重要な研究です。この制御機構の解明こそが、悪性度の高い未分化胃がんの進展を制御可能なものとする契機となる研究であり、がん制御の布石として大変意義深い研究である。

研究成果の概要（英文）：This study showed that CXCL16-CXCR6 signaling is activated in MSCs autonomously and up-regulates CCL5 expression. We also showed that the CCL5 receptor, CCR1/CCR3, is expressed on the surface of MKN45 cells and that MSC-derived CCL5 binds to CCR1/CCR3 and promotes MKN45 cell migration. MSC CXCL16-CXCR6 signaling up-regulates CCL5 expression and activates CCL5-CCR1/3 signaling in MKN45 cells, promoting MKN45 cell migration. These results suggest that MSC-derived chemokines regulate the progression of undifferentiated gastric cancer cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Wnt5a-Ror2シグナル CXCL16-CXCR6 PI3K-AKT-mTOR 胃癌 線維芽細胞 がん微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌微小環境において、骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSC) が癌の進展に大きく寄与していると考えられている。我々はこれまでの研究でヒト未分化胃癌細胞株 MKN45 とヒト初代培養骨髄由来 MSC を用いた直接・間接共培養系実験により、MSC が Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化により液性因子の分泌を促進し、MKN45 に対し細胞増殖促進作用を有する事を明らかにした。さらに MSC が Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化により CXCL16 の分泌を促進し、分泌された CXCL16 は MKN45 が発現するケモカイン受容体 CXCR6 に結合し、細胞内にシグナルを伝達することで、MKN45 の細胞増殖を促進させることを明らかにした。しかし Wnt5a-Ror2 シグナル、CXCL16-CXCR6 シグナルが他の癌腫でも発現、作用しているか、また *in vivo* においても MSC が MKN45 に対し増殖促進作用を有するかも不明である。

2. 研究の目的

- 1) 癌微小環境において線維芽細胞が Wnt5a-Ror2、CXCL16-CXCR6 シグナル経路を介して胃癌細胞に対し、浸潤や転移を促進する作用を有するかを明らかにする。
- 2) 癌細胞における CXCL16-CXCR6 の下流シグナルとして PI3K-AKT-mTOR シグナルが活性化しているか明らかにする。
- 3) 癌微小環境における骨髄由来間葉系細胞が癌細胞の増殖、浸潤、転移を促し、進展の促進機構が普遍的なものであるか否かを明らかにする。
- 4) Wnt5a-Ror2、CXCL16-CXCR6、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の inhibitor により癌細胞の増殖、浸潤、転移が抑制されるかを検討し、新たな治療ターゲットを確立する。

3. 研究の方法

- ・間葉系幹細胞-胃癌細胞の共培養増殖アッセイ、共培養による浸潤アッセイを行う。
- ・RT-PCR に RNA の同定、Western blot による蛋白アッセイを行う。
- ・ヌードマウスへの胃癌細胞の移植実験を行う。
- ・サイトカイン産生の検証を行う。
- ・胃癌細胞株と、がん関連遺伝子である trefoil factor family (TFF) との関連

4. 研究成果

- ・CXCL16-CXCR6 の下流シグナルとして PI3K-AKT-mTOR シグナルは確認されなかった。
- ・不死化間葉系幹細胞株である UE6E7T-12 細胞と胃癌細胞株 MKN45 細胞を用いた実験により UE6E7T-12 細胞由来の CXCL16 は、MKN45 細胞において STAT3 の活性化を介して Ror1 の発現を誘導することが確認された。
- ・MKN45 細胞において骨髄由来間葉系幹細胞由来の CXCL16 は STAT3 の活性化を介して Ror1 を誘導することで胃癌細胞の増殖、移動を促進することを確認した。また *in vivo* においては、腫瘍形成能を促進することが確認された。
- ・骨髄由来の間葉系幹細胞 MSC の CXCL16-CXCR6 シグナルがサイトカインの一種 CCL5 の発現を増加させ、MKN45 細胞に発現している CCL5 のレセプターである CCR1、CCR3 に結合することで、MKN45 細胞の浸潤能を亢進させる事が確認された。
- ・FF は、3つのペプチドが同定され、いずれも6個のシステイン残基による三つ葉のクロ

ーバー様構造を有する peptide であり、このペプチドは、全消化管に分布しており、粘液産生細胞によって分泌されている。その生理機能は、細胞保護作用と細胞遊走作用が主なものであり、消化管の創傷治癒作用に密接に関連している。さらに最近では、消化管の悪性腫瘍との関連も指摘されるようになった。

中でも TFF1 は、消化管のうち胃において強い発現が見られ、特に粘膜表層細胞で主に産生されている。発現量は少ないが小腸や大腸においても発現が確認されている。UE6E7T-12 との共培養で促進した MKN45 の増殖が TFF1 添加により抑制される傾向にある。

単培養では MKN45 増殖は TFF1 添加により変わらない可能性がある。

以上より、UE6E7T-12 の Wnt5a-Ror2signal が CXCL16-CXCR6 を活性化して MKN45 の増殖を促進するが、TFF1 は UE6E7T-12 の活動を抑制する可能性がある。

UE6E7T-12 の CXCL16 発現は TFF1 添加により抑制される傾向にある。

TFF1 の増殖、進展への影響や signal への影響はまだ不明である。

以上のような結果を報告した。

Okamoto D, Yamauchi N, **Takiguchi G**, Nishita M, Kakeji Y, Minami Y, Kamizaki K.
Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells.
Genes Cells. 2022 Mar 9.

Ikeda T, Nishita M, Hoshi K, Honda T, Kakeji Y, Minami Y.
Mesenchymal stem cell-derived CXCL16 promotes progression of gastric cancer cells by STAT3-mediated expression of Ror1
Cancer Sci. 2020 Feb 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Okamoto Daiki, Yamauchi Natsuko, Takiguchi Gosuke, Nishita Michiru, Kakeji Yoshihiro, Minami Yasuhiro, Kamizaki Koki	4. 巻 Online
2. 論文標題 Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12933	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 -

1. 著者名 AGAWA KYOSUKE, YAMASHITA KIMIHIRO, NAKAGAWA AKIO, YAMADA KOUTA, WATANABE AKIHIRO, MUKOHYAMA JUNKO, SAITO MASAFUMI, FUJITA MITSUGU, TAKIGUCHI GOSUKE, URAKAWA NAOKI, HASEGAWA HIROSHI, KANAJI SHINGO, MATSUDA TAKERU, OSHIKIRI TARO, NAKAMURA TETSU, SUZUKI SATOSHI, KAKEJI YOSHIHIRO	4. 巻 41
2. 論文標題 Simple Cancer Stem Cell Markers Predict Neoadjuvant Chemotherapy Resistance of Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4117 ~ 4126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15214	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0件

〔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
---------	---------