The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Gas6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes migration of Axl-expressing lung cancer cells during chemotherapy
Author(s)	神﨑, 隆
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69265
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）神崎　隆

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	奥村明之進
	副　査	大阪大学教授	野口眞三郎
	副　査	大阪大学教授	猪俣武典

論文審査の結果の要旨

上記学生は、当教室において「化学療法施行中に癌関連線維芽細胞由来のGas6がAxlを発現する肺癌細胞の遊走を促す」に関する研究に従事しました。本研究は、肺癌切除検体より分離し樹立した癌関連間質細胞細胞株と担癌マウスモデルを用いた実験により化学療法中の肺癌腫瘍内の微小環境の変化を検討したものであり、化学療法中に癌関連間質細胞からGas6が分泌され、Axl陽性肺癌細胞の遊走を促すことを示したものです。本研究の成果は肺癌の治療抵抗性の解明を通して肺癌の新規治療開発に貢献することが期待され、肺癌臨床に携わる呼吸器外科の観点から興味深い研究成果であります。また、樹立した癌関連間質細胞細胞株や、本研究により確立したマウスモデルより癌関連間質細胞の分取法は、今後の肺癌に関する研究に応用・発展が期待されます。以上より、学位授与に相当する価値ある研究と考えます。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	神崎　隆
論文題名 Title	Gas6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes migration of Axl-expressing lung cancer cells during chemotherapy （化学療法施行中に癌関連線維芽細胞由来のGas6がAxlを発現する肺癌細胞の遊走を促す）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

癌は癌細胞と癌間質から成り、癌間質は癌関連線維芽細胞(CAF)、炎症細胞、腫瘍血管、細胞外マトリックスにより構成される。抗癌剤を使い続けると癌は薬剤耐性を示し転移能を獲得することが知られており、この現象に癌間質の関与が示唆されている。レセプターチロシンキナーゼAxlは様々な癌腫でその過剰発現と予後不良との関係が報告されている。肺癌において、Axlの恒常的活性化変異は未だ報告がなく、Axlはそのリガンドであるgas6との結合により活性化すると考えられている。その機序として、癌細胞由来のGas6の作用(autocrine)と、間質細胞由来のGas6の作用(paracrine)が挙げられる。近年、急性骨髄性白血病において骨髄間質細胞由来のGas6が白血病細胞の増殖、薬剤耐性に関与するとの報告がなされたが、固形癌における間質細胞由来のGas6の重要性に関しては未だ明らかではない。今回我々は抗癌剤治療時にCAF)由来のGas6が癌細胞のAxlを介して癌の悪性化に関与するメカニズムを明らかにした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

＜方法＞①マウス皮下モデルを用いて抗癌剤(CDDP)非投与時/投与時のCAFのGas6の発現を比較した。② ヒト肺癌手術検体からから採取したCAFを不死化して樹立した細胞株(LCAF^{htert})及びヒト肺癌細胞株H1299を用い、LCAF^{htert}が分泌するGas6のH1299への作用を解析した。③術前化学療法を施行した肺癌切除症例の検体を用いてAxl及びGas6の免疫染色を行い、予後との関係を評価した。

＜結果＞①C57BL6mouseの皮下にマウス肺癌細胞株Lewis lung carcinoma(以下LLC)を移植し、移植後7/9/11日目にCDDPを腹腔内投与すると、CDDP投与群は14日目にcontrol群と比して腫瘍体積が小さかった。癌細胞と宿主由来の細胞を分離する為以下の実験をGFPmouseを用いて行った。LLC移植後14日目に腫瘍を酵素分解してCAF(GFP-CD31-CD45-PDGFR-β+細胞)を分取し、RT-qPCRにてGas6の発現を解析したところ、CDDP投与群のCAFのGas6の遺伝子発現は、非投与群のそれに比して有意に高かった。②肺癌切除検体より、正常肺組織及び肺癌組織をコラゲナーゼで分解しディッシュに付着する細胞を継代純化してnormal lung fibroblast (NF)及びCAFのprimary cultureを行った(n=4)。CAFにhTERTを導入して不死化CAF細胞株を樹立した(LCAF^{hTERT})。我々は実験①の結果及び、化学療法によって腫瘍内の血流が低下するという既報に基づき、腫瘍内の血流低下がGas6の発現制御に関与していると仮定し、腫瘍内の血流低下を模してCAFに血清飢餓ストレスを加えた。Primary culture CAF及びLCAF^{hTERT}を血清飢餓状態で培養すると、Gas6の遺伝子発現の有意な上昇を認めた。通常の培養条件でLCAF^{hTERT}のGas6をsiRNAを用いてノックダウン(KD)すると、増殖の抑制を認めた。H1299はAxlの発現を認めGas6の発現は乏しく、外来性のGas6に反応しAxlのリン酸化を認めた。Migration assayにて、H1299の遊走能はGas6により亢進し、Axl特異的inhibitorにより減弱した。LCAF^{hTERT}の培養上清はH1299の遊走を亢進し、LCAF^{hTERT} のGa6をKDするとその効果は減弱し、Axl特異的inhibitorはその効果を阻害した。③術前化学療法・化学放射線療法を施行後肺切除を行った肺癌69例を対象に、Axl及びGas6の発現を免疫染色にて検討した。Axlは主に癌細胞に発現し、37例で陽性であった。Gas6は癌細胞にも間質にも発現が認められ、stromal Gas6は57例で陽性であった。Axl陽性例は全例stromal Gas6陽性であった。Axl陽性（かつstromal Gas6陽性）群(n=37)は、Axl陰性かつstromal Gas6陰性群(n=12)に比し、有意に5年無再発生存率が不良で(22% vs 51%, p=0.04)、再発形式は遠隔転移が多かった。また、化学療法前後の検体が入手可能であった22例では、14例が化学療法前にAxl陰性であったが、内11例では化学療法後に陽転化していた。

〔総　括(Conclusion)〕肺癌において、抗癌剤治療によりCAFのGas6発現が上昇し、CAF由来のGas6が癌細胞に作用しその遊走を促した。切除検体にてAxl陽性（かつstromal Gas6陽性）群は予後不良であり、化学療法が上記機序により遠隔転移を促進している可能性が示唆された。CAFを標的とした治療開発が今後の課題であると考えられた。