

研究報告書
2019年度：A課題

2021年4月12日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 熊本大学 国際先端医学研究機構
住 所 熊本県熊本市中央区本荘 2-2-1

研究者氏名 石本 崇胤



(研究課題)

腫瘍間質由来エクソソームによる抗がん剤抵抗性獲得メカニズムの解明

2020年2月29日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

「研究背景と目的」

腫瘍間質は線維芽細胞、免疫細胞、血球系細胞、血管、リンパ管、細胞外マトリックス等から構成されており、腫瘍の進展や浸潤・転移に関わっている。特に、がん細胞やその他の免疫細胞等により活性化された線維芽細胞は **Cancer-associated fibroblasts (CAFs)** として様々な液性因子を分泌しがん進展に関わ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。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。

「研究方法」

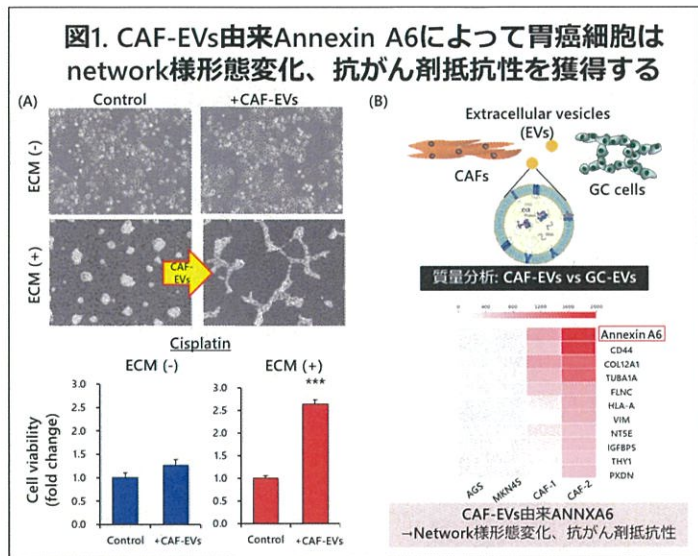
がん切除検体を用いて、CAF マーカーである α SMA の免疫染色・定量化を行い、予後との関連性を評価する。CAF の conditioned medium (CM) および CAF-CM から抽出した細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs) を用いて培養した胃がん細胞の遺伝子発現変化、抗がん剤感受性について検討する。さらに胃がん由来 EVs、CAF 由来 EVs を用いた質量分析を行う。抗がん剤抵抗性に関わる分子について *in vitro*, *in vivo* で機能解析を行う。

「研究結果」

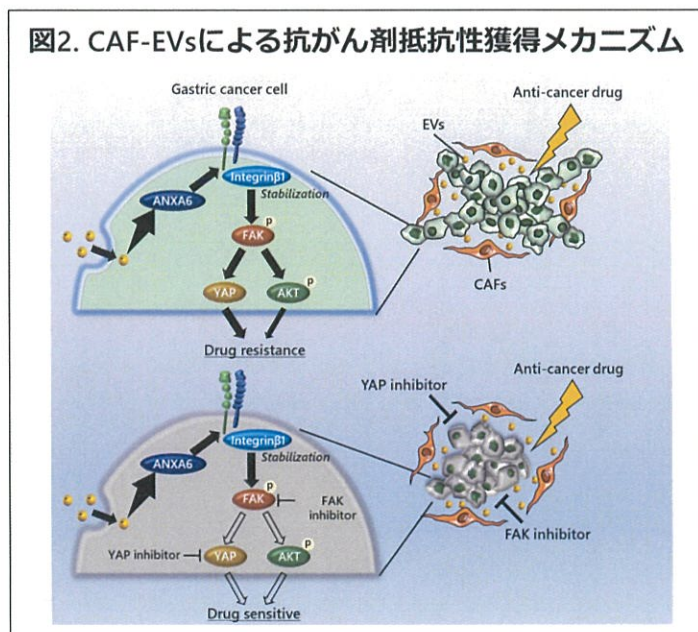
CAFs の主要なマーカーである α SMA の免疫染色・定量化を行い予後との相関を比較したところ、CAFs が多い症例 (CAF-high) では有意に予後不良と相関することが明らかになった。さらに、Stage IV で化学療法を行った症例においても同様に CAFs が多いと有意に予後不良と相関することが分かった。このことから、胃がん来 CAFs には抗がん剤抵抗性獲得等に関わる重要な因子が存在すると考えた。

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 と胃癌細胞由来 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)。胃癌腹膜播種モデルマウスを用いた検証においても胃癌が



CAF-EVs 由来 AnnexinA6 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 は胃癌細胞内に取り込まれた後、胃癌細胞膜上の $\beta 1$ 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、胃癌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癌に対する治療薬となり得ることを示した。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)。



「考察」

本研究結果によって、胃がんの「治療抵抗性」に関わる因子として、CAFs が分泌する細胞外小胞 (EVs) 中の AnnexinA6 が胃がん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。今後、AnnexinA6 タンパク質や EVs を分泌する CAFs をターゲットにした新たな治療法開発の可能性を見出した。

「発表論文」

1. 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***. Extracellular Vesicles from Cancer-Associated Fibroblasts Containing Annexin A6 Induces FAK-YAP Activation by Stabilizing $\beta 1$ Integrin, Enhancing Drug Resistance. *Cancer Res.* 2020 Aug 15;80(16):3222-3235.
2. Bu L, Baba H, Yasuda T, Uchihara T, **Ishimoto T***. Functional diversity of cancer - associated fibroblasts in modulating drug resistance. *Cancer Sci.* 2020 Oct;111(10):3468-3477.

「謝辞」

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました公益財団法人がん研究振興財団に心より感謝申し上げます。