

## 学位論文抄録

Extracellular Vesicles from Cancer-Associated Fibroblasts Containing Annexin A6 Induces  
FAK-YAP Activation by Stabilizing  $\beta 1$  Integrin, Enhancing Drug Resistance  
(Cancer associated fibroblasts 由来細胞外小胞中の AnnexinA6 は  $\beta 1$  integrin-FAK-YAP  
シグナルを介した抗がん剤抵抗性を促進する)

内原 智幸

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻消化器外科学

指導教員

馬場 秀夫 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻消化器外科学

## Abstract of the Thesis

**Background and Purpose:** Extracellular vesicles (EVs) from cancer-associated fibroblasts (CAFs) are composed of diverse payloads. Although CAFs impact the aggressive characteristics of gastric cancer (GC) cells, the contribution of CAF-EVs to GC progression has not been elucidated. Here we investigated the molecular mechanism of the changes in GC characteristics induced by CAF-EVs.

**Methods:** We have isolated CAFs from surgically resected GC tissues and collected conditioned medium (CM) of CAFs. GC cell lines cultured in normal medium or CAF-CM were examined the drug sensitivity with extracellular matrix (ECM). We isolated extracellular vesicles (EVs) from CAF-CM by ultracentrifugal separation. We performed mass analysis of CAF-EVs and conducted in vitro/in vivo experiments by using CAF-EVs.

**Results:** CAFs abundance in GC tissues was associated with poor prognosis of GC patients receiving chemotherapy. Moreover, CAF-EVs induced tubular network formation and drug resistance of GC cells in the ECM. Comprehensive proteomic analysis of CAF-EVs identified annexin A6 plays a pivotal role in network formation and drug resistance of GC cells in the ECM via activation of B1 integrin-focal adhesion kinase (FAK)-YAP. A peritoneal metastasis mouse model revealed that CAF-EVs induced drug resistance in peritoneal tumors, and inhibition of FAK or YAP efficiently attenuated GC drug resistance in vitro and in vivo.

**Conclusions:** These findings demonstrate that drug resistance is conferred by annexin A6 in CAF-EVs and provide a potential avenue for overcoming GC drug resistance through the inhibition of FAK-YAP signaling in combination with conventional chemotherapeutics.

## 学位論文抄録

[ 目的 ] 腫瘍間質において癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAFs)が分泌する液性因子ががん細胞の抗がん剤感受性を制御することが示唆されてきたが、その詳細な分子機構は明らかではない。また、CAFs 由来の細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs)はがんの進展に寄与することが報告されている。今回、CAF-EVs によって引き起こされる胃がんの抗がん剤抵抗性獲得メカニズムを明らかにすることを目的とした。

[ 方法 ] 胃がん切除検体を用いて、CAFs 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した。CAFs の conditioned medium (CM)および CAF-CM から抽出した EVs を用いて胃がん細胞を培養した。CAF-CM および CAF-EVs 刺激による胃がん細胞の遺伝子発現変化、抗がん剤感受性について in vitro, in vivo で検討した。さらに胃がん由来 EVs、CAF 由来 EVs を用いた質量分析を行った。

[ 結果 ] がん切除標本において、腫瘍間質に CAFs が多い症例は有意に予後不良であった。In vitro の検討では、細胞外マトリックス存在下において CAF-CM 中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した。次に RNA sequencing による解析の結果、CAF-CM を加えた胃がん細胞では Integrin signal に関わる遺伝子群の発現が有意に亢進していた。さらに、CAF-CM から抽出した EVs を加えた胃がん細胞も同様に network 様の形態変化を起こし、抗がん剤抵抗性を獲得した。EVs の質量分析の結果、CAF-EVs 由来タンパク質のうち、AnnexinA6 が今回の現象に重要であることを同定した。さらに CAF-EVs を介して胃がん細胞に取り込まれた AnnexinA6 は Integrin $\beta$ 1を細胞膜上に安定化させ、細胞外マトリックスとの相互作用を介した FAK-YAP シグナル活性化により抗がん剤への抵抗性を示した。また、腹膜播種モデルマウスを用いた検証において、CAF-EVs が促進する FAK-YAP シグナルが抗がん剤抵抗性獲得に関わり、FAK または YAP の阻害が抗がん剤抵抗性を減弱させることを明らかにした。

[ 考察 ] 今後の研究の進捗によって、胃がんにおいて AnnexinA6 や CAFs をターゲットにした新たな創薬開発が期待される。

[ 結論 ] CAF-EVs 中の AnnexinA6 が、胃がん細胞の Integrin signal を活性化し抗がん剤抵抗性を示すという新しい分子機構を明らかにした。