

## 学位論文抄録

**Thrombospondin-1 overexpression stimulates loss of Smad4 and accelerates malignant behavior via TGF- $\beta$  signal activation in pancreatic ductal adenocarcinoma**  
(Thrombospondin-1 の過剰発現は膵癌における Smad4 発現低下を促進し TGF- $\beta$  活性化を介して悪性度を進展させる)

松村 和季

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:** Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is characterized by abundant stroma and cancer-associated fibroblasts (CAFs) provide a favorable tumor microenvironment. Smad4 is known as tumor suppressor in several types of cancers including PDAC, and loss of Smad4 triggers accelerated cell invasiveness and metastatic potential. The thrombospondin-1 (TSP-1) can act as a major activator of latent transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) *in vivo*. However, the roles of TSP-1 and the mediator of Smad4 loss and TGF- $\beta$  signal activation during PDAC progression have not yet been addressed. The aim is to elucidate the biological role of TSP-1 in PDAC progression.

**Methods and Results:** High substrate stiffness stimulated TSP-1 expression in CAFs, and *TSP-1* knockdown inhibited cell proliferation with suppressed profibrogenic and activated stroma-related gene expressions in CAFs. Paracrine TSP-1 treatment for PDAC cells promoted cell proliferation and epithelial mesenchymal transition (EMT) with activated TGF- $\beta$  signals such as phosphorylated Akt and Smad2/3 expressions. Surprisingly, knockdown of *DPC4* (Smad4 gene) induced TSP-1 overexpression with TGF- $\beta$  signal activation in PDAC cells. Interestingly, TSP-1 overexpression also induced downregulation of Smad4 expression and enhanced cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. Treatment with LSKL peptide, which antagonizes TSP-1-mediated latent TGF- $\beta$  activation, attenuated cell proliferation, migration and chemoresistance with enhanced apoptosis in PDAC cells.

**Conclusions:** TSP-1 derived from CAFs stimulates loss of Smad4 expression in cancer cells and accelerates malignant behavior by TGF- $\beta$  signal activation in PDAC. TSP-1 could be a novel therapeutic target, not only for CAFs in stiff stroma, but also for cancer cells in the PDAC microenvironment.

## 学位論文抄録

### 【目的】

癌の促進・抑制には癌細胞自身に加え、周囲の微小環境が重要な役割を果たしている。膵癌は予後不良な固形癌として知られ、細胞外マトリックスから構成される豊富な間質が特徴である。腫瘍間質は様々な細胞（線維芽細胞や炎症細胞）やコラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスにより構成されるが、腫瘍間質形成においては Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) の重要性が報告されている。今回、我々は matricellular protein である Thrombospondin-1 (TSP-1) に着目した。TSP-1 はトロンビン刺激による血小板の活性化を介して、 $\alpha$  顆粒から分泌される血小板 TSP-1 として最初に同定されたが、細胞間接着および創傷治癒や TGF- $\beta$  活性化機構、血管新生抑制など多彩な機能を持つタンパク質として注目されている。最近では癌の進展への関わりも報告されている。本研究では、豊富な腫瘍間質を特徴とする膵癌における膵癌微小環境における細胞外マトリックス TSP-1 の機能を明らかにし、TSP-1 の発現が膵癌進展に与える影響を検討する。

### 【方法】

#### (1) 臨床検体を用いた研究

膵癌切除標本を用いて免疫組織学的染色を行い、TSP-1 発現の局在および強度を評価し、TSP-1 の発現が膵癌患者の予後へ与える影響を評価した。

#### (2) In vitro

(A) 組織の硬さが変化することで、CAFs の TSP-1 発現に与える影響を評価した。

(B) 膵癌細胞株における TSP-1 の発現を評価し、TSP-1 発現変化ならびに recombinant TSP-1 投与による増殖能、浸潤能の影響や Smad signal や EMT マーカーを評価した。

(C) 膵癌細胞株における TSP-1 と Smad4 の発現に関する相互関係について評価した。

(D) TSP-1 による TGF $\beta$  活性化阻害ペプチド (LSKL ペプチド) を用いて増殖能や浸潤能の評価と化学療法と併用することによる効果を評価した。

#### (3) In vivo

TSP-1 過剰発現株をマウスに移植し、腫瘍の増大や浸潤能を評価した。

### 【結果】

組織の剛性が高いと CAFs の TSP-1 発現が促進された。TSP-1 抑制では CAFs の細胞増殖を抑制し、線維形成性が抑制された。膵癌細胞株の TSP-1 刺激は、リン酸化 Akt や Smad2/3 発現が活性化され、TGF- $\beta$  シグナルによる細胞増殖と EMT を促進した。また、Smad4 の抑制では膵癌細胞株で TGF- $\beta$  シグナル活性化を伴う TSP-1 過剰発現を誘発した。TSP-1 の過剰発現は Smad4 発現抑制も誘発し、in vitro および in vivo での細胞増殖を促進した。LSKL ペプチドによる処理は、膵癌細胞株のアポトーシスの増強を伴う細胞増殖、遊走および化学療法抵抗性を弱めた。

### 【結論】

CAFs 由来の TSP-1 は、膵癌細胞株における Smad4 発現低下を促進し、膵癌細胞株における TGF- $\beta$  シグナル活性化によって悪性度を進展させた。TSP-1 は硬い間質の CAFs だけでなく、膵癌微小環境の癌細胞に対しても、新しい治療標的になる可能性がある。