

消化器系がんが発現する線維芽細胞増殖因子 受容体 3IIIc のがん悪性化メカニズムの解析と 個別化医療への応用

瀬 尾 美 鈴****
 福 光 一 生*
 上 田 修 吾**
 上 野 信 洋***

要 旨

食道がん患者臨床検体の免疫組織染色により、線維芽細胞増殖因子受容体 3 の選択的スプライシングアイソフォーム (FGFR3IIIc) の発現が食道がん組織において上昇することを明らかにした。FGFR3IIIc のがん部位における発現比 (がん部位 / 正常粘膜部位) と各患者の臨床情報を比較したところ、発現比の高いがん患者ほど、全生存期間が短くなることを見出した。大腸がん細胞 Caco2 を用いて、FGFR3IIIc の発現を siRNA でノックダウンすると細胞増殖能と浸潤能が阻害され、レンチウイルスにより発現を回復すると増殖能と浸潤能が上昇した。さらに、FGFR3IIIc の発現をノックダウンするとフルオロウラシルに対する抗がん剤の IC50 値が低くなり 27.7 μ M となったが、FGFR3IIIc を再び発現させると IC50 値が 1000 μ M 以上になった。FGFR3IIIc の発現をノックダウンすると下流シグナル伝達経路の Akt, MAPK, PLC γ の活性化を阻害し、FGFR3IIIc の発現を回復すると、これらのタンパク質が再び活性化したことから、増殖能、浸潤能、抗がん剤耐性の獲得に FGFR3IIIc の下流シグナル伝達経路が関わっていることが示唆された。次に、消化器系がんの患者検体から得られたがん組織を用いてオルガノイド培養系を確立し、FGFR3IIIc が消化器系がん患者の治療予測マーカーとなりうるか、治療の分子標的として有用であるかを検討し、FGFR3IIIc シグナル制御による個別化医療への応用を目指す。

キーワード：線維芽細胞増殖因子受容体 3IIIc, 食道がん, 大腸がん, 抗がん剤耐性, 患者由来がんオルガノイド

* 京都産業大学大学院, 生命科学研究科

** 公益財団法人田附興風会医学研究所 北野病院

*** 京都産業大学生命科学部

1. はじめに

線維芽細胞増殖因子受容体 3 (FGFR3) は細胞膜を一回膜貫通するチロシンキナーゼ型受容体で、細胞外領域の免疫グロブリン領域で種々の FGF 分子 (22 種類存在する) と結合し二量体を形成する。その結果、チロシンキナーゼが活性化し、相互にチロシンリン酸化すると、様々な細胞内のシグナル伝達タンパク質がチロシンリン酸化部位にリクルートされ、細胞増殖、生存、遊走、浸潤などの応答を引き起こす。FGFR3 の遺伝子には細胞外領域をコードするエキソン IIIb と IIIc が存在し、発現する細胞によって特異的な選択的スプライシングが起こる (1, 2)。このうち FGFR3IIIc は間質細胞に発現するアイソフォームで、正常上皮では FGFR3IIIb が発現する。FGFR3IIIc は IIIb と比べて、FGF2 など炎症やがん部位でレベルが上昇する FGF と結合することができる (図 1)。

我々は、食道がん患者の検体を用いた解析から、正常な消化器系上皮細胞には FGFR3IIIb が発現しているが、正常上皮細胞ががん化することで間葉系細胞の性質を獲得し (上皮間葉転換: EMT), FGFR3IIIc の発現が上昇することを示した (3)。進行消化器系がんは、手術や抗がん剤化学療法を

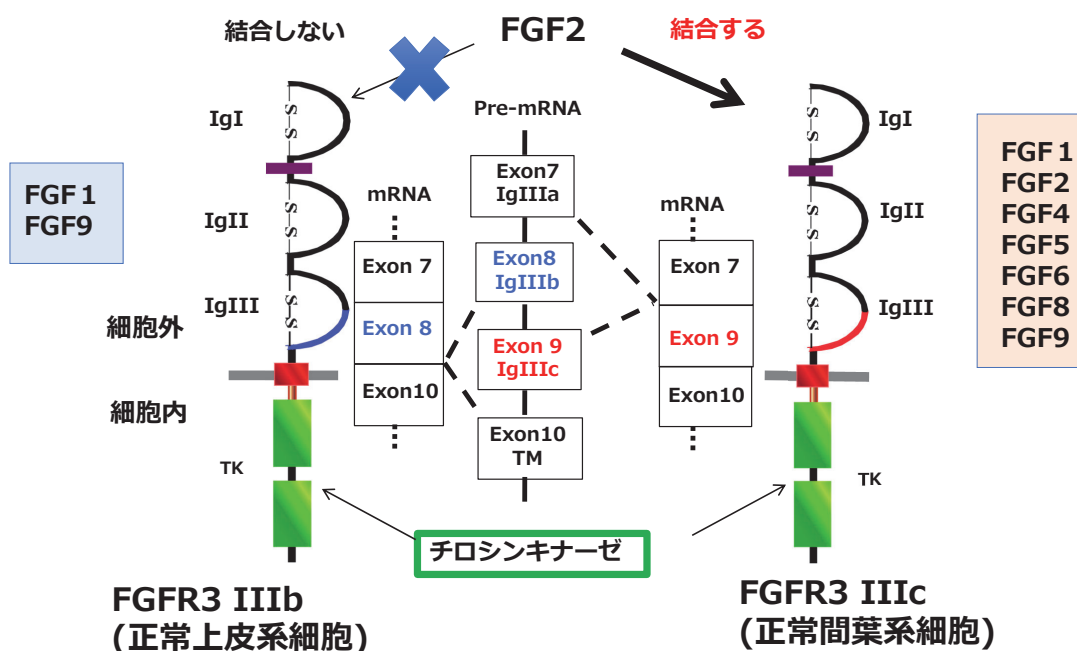


図 1 線維芽細胞増殖因子受容体 3 (FGFR3) のアイソフォームと選択的スプライシング

FGFR3 には、膜貫通型または可溶型の複数のアイソフォームが選択的スプライシングにより生じる。膜貫通型の主なアイソフォームは図に示すように、細胞外領域の 3 番目の免疫グロブリン様ドメイン IgIII の後半部分をコードするエキソンが 2 種類あり (Exon8 と Exon9), どちらかを選択するかにより, IIIb 型または IIIc 型となる。それぞれ, リガンドである FGF への結合選択性が異なり, IIIb 型は正常上皮系細胞に発現し, FGF1, FGF9 と結合するが, IIIc 型は正常間葉系細胞に発現し, 図に示すように多くの FGF と結合することができる。中でも, FGF2 は腫瘍組織中で発現が上昇していると報告されており, IIIc は FGF2 に反応することができる。

行うも予後不良であるが、その悪性化の原因や転移・再発リスク予測についてはいまだ十分には解明されていない。これまでも、がん細胞由来の各種細胞株を用いて、遺伝子変異や細胞内シグナル伝達を検討することで、腫瘍の増殖や転移能に及ぼす影響を明らかにしようとする研究が行われてきた。しかしながら、一般に、長年培養維持された細胞株は元のがん細胞の性質から変化し、より悪性化している。一方、がん患者に由来する腫瘍オルガノイドは、樹立がん細胞株培養系とは異なり、患者生体内に存在する特徴を示す (4, 5, 6)。腫瘍オルガノイドは、臨床の腫瘍の性質や動態を *in vitro* で再現しうることが明らかにされ、遺伝子的にも採取した時点での患者腫瘍に近いと考えられる。したがって、本研究では、患者由来のオルガノイド培養系を用いて、FGFR3IIIc が消化器系がん患者の予後不良の原因分子であるか、また、分子標的治療の標的として有用であるかを明らかにする。

本研究では、消化器系全般（食道・胃・腸）のがん患者のがん組織からオルガノイド培養系を確立し、FGFR3IIIc の発現を解析し、患者の臨床情報と照らし合わせることで、FGFR3IIIc ががんの悪性化と関連し、生存率の低下に関与しているかを検証し、消化器系がん患者の治療予測マーカーとして有用であるかを検討する。

2. 材料と方法

2.1 患者検体

消化器系がん患者検体の使用（腫瘍組織）については、公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院医の倫理委員会および京都産業大学研究倫理委員会の承認を受けて実施した。なお、患者本人よりインフォームドコンセントを取得した。

2.2 免疫組織染色

食道がん組織の免疫組織染色は、以前報告したように行った (3)。なお、抗体はウサギ抗 FGFR 3IIIc 抗体（ヤマサ醤油株式会社）を使用した。

2.3 細胞培養

Caco2 細胞

10% FBS, 2 mM- グルタミン, 54 U/mL-54 μ g/mL penicillin-streptomycin を含む DMEM (low glucose) を用いた。3-4 日毎に 0.25% トリプシン-EDTA 処理を行い、10 cm dish に、 1.0×10^6 cells/10 mL または、 5.0×10^5 cells/10 mL で播種し、37°C インキュベーターで 5% CO₂ の条件で培養した。

2.4 siRNA とレンチウイルスによる FGFR3IIIc 発現

siRNA transfection

Serum-free DMEM を用いて 0.048 μ M に調製した siControl と siFGFR3 を 550 μ L とり、550 μ L

siLentFect (BioRad, cat.170-3361) に加え、20 分間室温でインキュベートした。その後、Caco2 細胞の培養皿 (5.0×10^5 cells / 4 mL/6 cm dish) に 500 μ L ずつ添加し 24 時間培養した。siRNA はヒト FGFR3 m R N A の 3'-UTR 領域にアニールするようにデザインした。

FGFR3 siRNA : 5'-GAUGCUGUGUAUAUGGUAUTT-3', 5'-AUACCAUAUACACAGCAUCTT-3',
siControl siRNA : 5'-UGGUUUACAUGUCGACUAATT-3', 5'-UUAGUCGACAUGUAAACCATT-3'.

FGFR3IIIc のレンチウイルス作成と過剰発現

PCR によってヒト FGFR3IIIc cDNA を増幅した。増幅した FGFR3IIIc の DNA 断片を pHAGE レンチウイルスバックボーンベクターにクローニングした。このベクターと tat, rev, gag-pol, VSV-G それぞれをコードするヘルパーウイルスプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクトし、レンチウイルスを作成した (3)。

Caco2 細胞を siRNA で処理した後、CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した。 5.0×10^5 cells/6 cm dish の Caco2 細胞の培地を除去し、新しく 4 mL のメディウムを加えた。その後、10 μ g/ml ポリブレン 4 μ L を添加し混和させた。そして、FGFR3IIIc のレンチウイルスを加え、ウイルス専用のインキュベーターで 24 時間培養した。細胞を回収し、細胞増殖アッセイ、浸潤アッセイ、タンパク質解析に用いた。

2.5 細胞増殖アッセイと抗がん剤耐性解析

1 日培養した細胞に 0.25% トリプシン-EDTA 溶液を加え洗浄し、1 mL のトリプシンを加え、5% CO₂ インキュベーターで 3 分間培養し細胞をはがした後、10% DMEM を 4 mL 加え、15 mL チューブに回収し、1000 rpm、5 分遠心した。遠心後の上清をとり、新たにメディウムを 5 mL 加え、血球計算板を用いて、細胞密度をカウントした。それぞれの密度の細胞を 1.5×10^4 cells/100 μ L になるように調製し、96 穴プレートに添加した。5% CO₂ インキュベーターで 4 時間培養した後、5-Fu を 10 μ L ずつ添加し、37°C、5% CO₂ 条件でインキュベートした。

5-FU を添加した細胞の入った 96 穴プレートを 37°C、5% CO₂ インキュベーターで 72 時間培養した後、10 μ L の MTT 溶液 (PBS に MTT を 5 mg/mL) それぞれの well に滴下し、2 時間培養した。上清を除去し、DMSO を 100 μ L ずつ加えた後、iMark マイクロプレートリーダー (Bio Rad) を用い、各 well の吸光度 (OD) を 540 nm の波長で測定した。5-FU を添加していない細胞の OD 値の平均を 100% とし、5-FU 添加時の値をその割合で示した。

2.6 浸潤アッセイ

1 日培養した Caco2 細胞に 0.25% トリプシン-EDTA 溶液を加え洗浄し、1 mL のトリプシンを加え、5% CO₂ インキュベーターで 3 分間保温した。細胞をはがした後、10% FBS-DMEM を 4 mL 加え、15 mL チューブに回収し、10,000 rpm、5 分間遠心した。遠心後の上清を除き、沈殿に新たに 20%

FBS-DMEM を 5 mL 加えて懸濁し、血球計算板を用いて、細胞数をカウントした。その後、細胞を 1×10^5 cells/100 μ L に調製し、12 μ m 孔の millicell カップ (Millipore) に播種し、600 μ L の 0.1% FBS-DMEM が入った well にカップを移し、37°C, 5% CO₂ インキュベーターで終夜インキュベートした。Millicell カップを取り出し、Diff-Quick 染色キット (Sysmex) を用いて染色し、メンブレンの下側に浸潤した細胞の数を 6 視野 (× 400 倍の倍率) カウントし平均値±標準偏差を示した。

2.7 ウェスタンブロット

Caco2 細胞のタンパク質回収と SDS-PAGE, ウェスタンブロットは、以前報告したように行った (3)。使用した一次抗体と二次抗体は表 1 (A) (B) にまとめた。

2.8 オルガノイド培養法 (CTOS 法)

近藤らの方法 (4) に従って培養した。50 mL チューブに入った大腸がんまたは胃がん検体を、1 × PBS で一回、組織洗浄液 (0.1% BSA, 1% penicillin-streptomycin を添加した EBSS) で二回洗浄した。腫瘍組織を non coating 10 cm 培養皿に移し、1 mm 角に切断した後、50 mL チューブに回収

表 1 ウェスタンブロットに使用した抗体

(A) 一次抗体

標的タンパク質	抗体	メーカー	Cat No.	希釈倍率
FGFR	FGFR3 (c-15) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	sc-123	1/2000
p-FGFR	p-FGF Receptor (Y653/654) Rabbit Ab	CS	3471S	1/2000
MAPK	p44/42 MAPK (Erk 1/2) Rabbit Ab	CS	9102S	1/2000
p-MAPK	phospho- p44/42 MAPK (T202/Y204) Rabbit Ab	CS	9101S	1/2000
AKT	Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb	CS	#4691S	1/2000
p-AKT	p-Akt (S473) (D9E) XP (R) Rabbit mAb	CS	4060S	1/2000
PLC γ	PLC γ Rabbit Ab	CS	#2822S	1/2000
p- PLC γ	p-PLC γ (Y783) Rabbit Ab	CS	2821S	1/2000
β -actin	β -actin (c4) mouse monoclonal IgG	Santa Cruz	sc-47778	1/2000

(B) 二次抗体

標的タンパク質	抗体	メーカー	Cat No.	希釈倍率
Rabbit Ig	HRP-Donkey anti rabbit IgG	Jackson Immuno Res	711-035-52	1/5000
Mouse Ig	HRP-Goat anti mouse IgG	Santa Cruz	sc-2055	1/5000

*CS: Cell Signaling

し、1000 rpm, 5 分間遠心した。組織洗浄液で洗浄と遠心を二回繰り返した後、酵素処理液（liberase DH を添加した DMEM）を 20 mL 加え、滅菌三角フラスコへ移し、37℃ のインキュベーターで、1 時間から 1 時間 30 分間組織のサイズを確認しながら攪拌し組織を分解した。

インキュベート後、組織洗浄液で洗浄し、1000 rpm, 5 分間遠心を 2 回行い細胞を回収した。細胞懸濁液を、500 μ m, 250 μ m の金属フィルター、100 μ m, 40 μ m のセルストレイナーに通した。フィルターに通らなかった細胞塊 CTOS（Cancer tissue-originated spheroid）をそれぞれのフィルターごとに別々の 15 mL チューブに回収し、1000 rpm, 5 分間遠心した。上清を捨て、細胞塊を Stem Pro 増地（25% BSA と Stem Pro® hESC, 10 μ m/mL bFGF, 55 mM メルカプトエタノールを添加した DMEM/F-12 増地）に懸濁した。細胞懸濁液を non coating 24 well plate に 600 μ L ずつ播種し、37℃, 5% CO₂ インキュベーターで培養した。3 日～4 日に一度増地交換を行った。

3. 結果

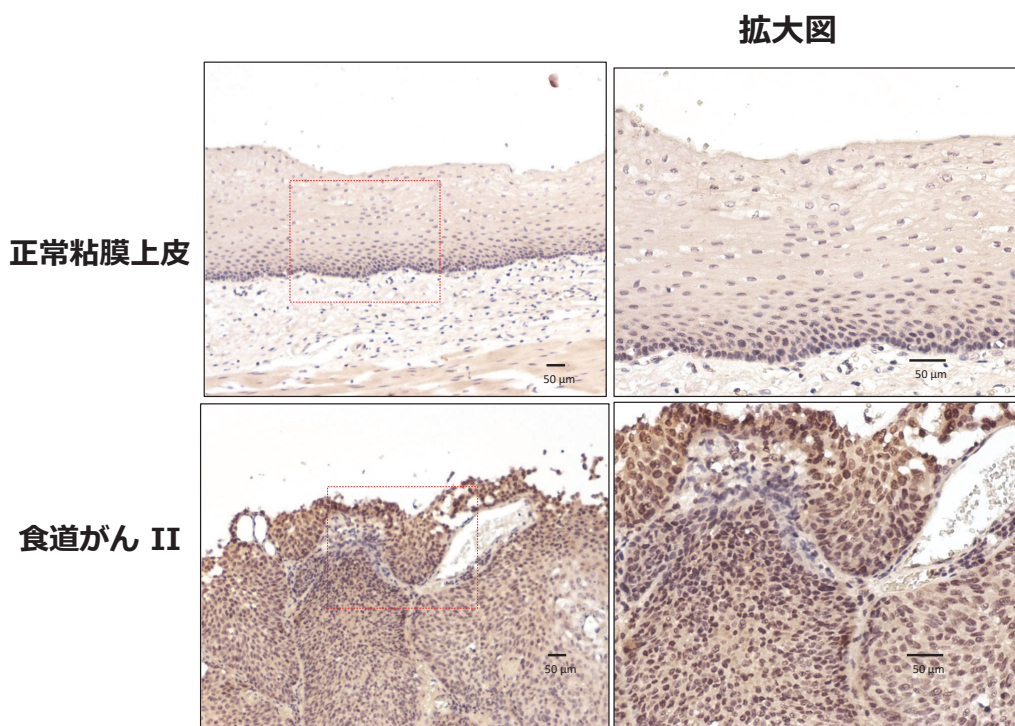


図 2 食道がん部位では、正常粘膜上皮と比較して FGFR3IIIc の発現が上昇していた。

- (A) 食道がん患者（ステージ II）の腫瘍部位の検体の免疫組織学的染色を FGFR3IIIc に特異的なウサギ抗体を用いて行った。上図：同じ患者検体の正常粘膜上皮（扁平上皮）の一部。下図：腫瘍部位。右側の図は左側の図の一部（赤破線で囲んだ領域）を拡大した。腫瘍部位では多くのがん細胞が濃く茶色（FGFR3IIIc 陽性）に染まっている。（スケールバー：50 μ m）

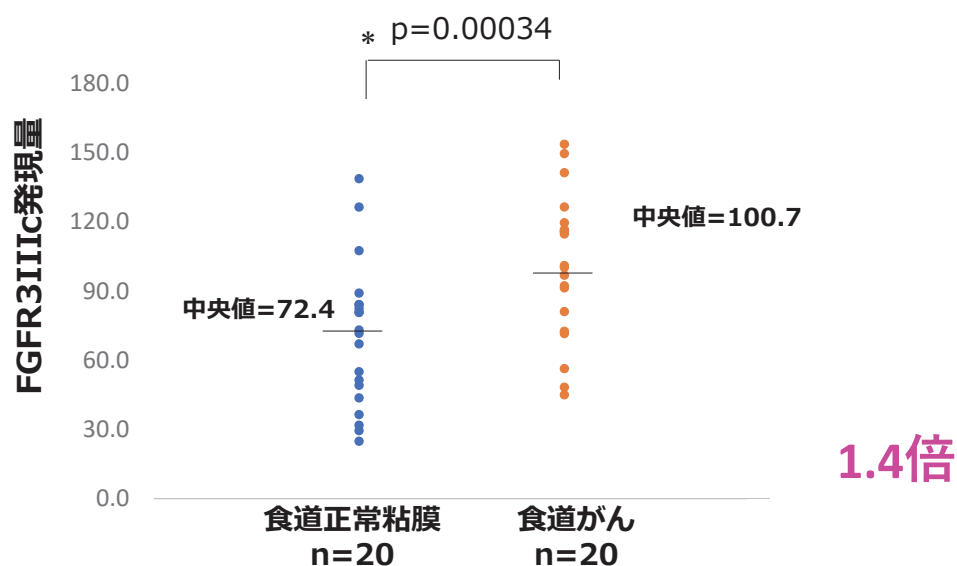
3.1 食道がん部位の FGFR3IIIc 高発現は、食道がん患者の生存期間を短くする

食道がん患者（ステージ II）の食道がん部位と正常粘膜部位の組織切片を、FGFR3IIIc に対する特異的抗体で免疫組織染色した（図 2（A））。破線で囲んだ正常粘膜部位では、基底膜以外の扁平上皮細胞はほとんど染まっていない（上左図）。一方、下の図（左、右）の食道がん部位では、食道がん細胞の間充織組織への浸潤により全体に広がって増殖しほとんどの細胞が茶色く濃く染まっていた。このことは食道がん細胞が、正常食道上皮細胞よりも強く FGFR3IIIc を発現していることを示している。

同様に、異なるステージの食道がん患者検体（20 症例）を用いて、FGFR3IIIc 発現の比較を行なった（図 2（B））。FGFR3IIIc の発現量は、免疫染色図を ImageJ で解析した。食道正常粘膜の発現量の中央値が 72.4 に対して、食道がん部位の中央値は 100.7 で正常粘膜部位の 1.4 倍の発現量であり、有意に高くなっていることがわかった（ $p=0.00034$ ）。

次に、各患者の食道がん部位と正常粘膜部位の FGFR3IIIc 発現比と全生存期間をグラフにして、FGFR3IIIc 発現と予後の関係を解析した（図 3（A））。その結果、食道がん部位と正常粘膜部位における FGFR3IIIc の発現比が高いほど、全生存期間が短くなる負の相関関係が認められた（ $R=-0.436$ ）。

そこで、FGFR3IIIc の発現比の平均値 1.6 よりも高い患者のグループ（H）と低い患者のグループ



ウィルコクソンの符号付き順位検定

図 2 食道がん部位では、正常粘膜上皮と比較して FGFR3IIIc の発現が上昇していた。

(B) 食道がん部位の FGFR3IIIc 発現量は正常粘膜部位と比較して有意に高かった。

20 症例の食道がん患者検体の免疫組織染色により、腫瘍部位と正常粘膜部位の FGFR3IIIc の発現量を ImageJ により数値化して比較した。その結果正常粘膜上皮の FGFR3IIIc 発現量の中央値が 72.4 であり、食道がん部位では 100.7 と 1.4 倍と有意に上昇していた（ $p=0.00034$ ）。

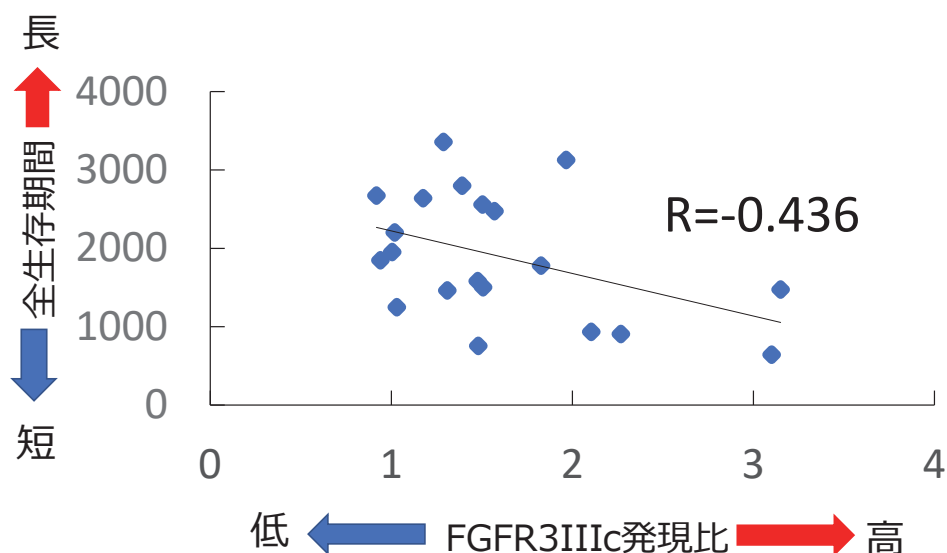


図3 FGFR3IIIcの発現が高いと、食道がん患者の全生存期間が短くなる。

- (A) グラフの縦軸は全生存期間（日数）、横軸は食道がんの腫瘍部位と正常粘膜部位におけるFGFR3IIIcの発現比を示す。発現比が高いほど、全生存期間が短くなる逆相関関係が見られた($R = -0.436$)。

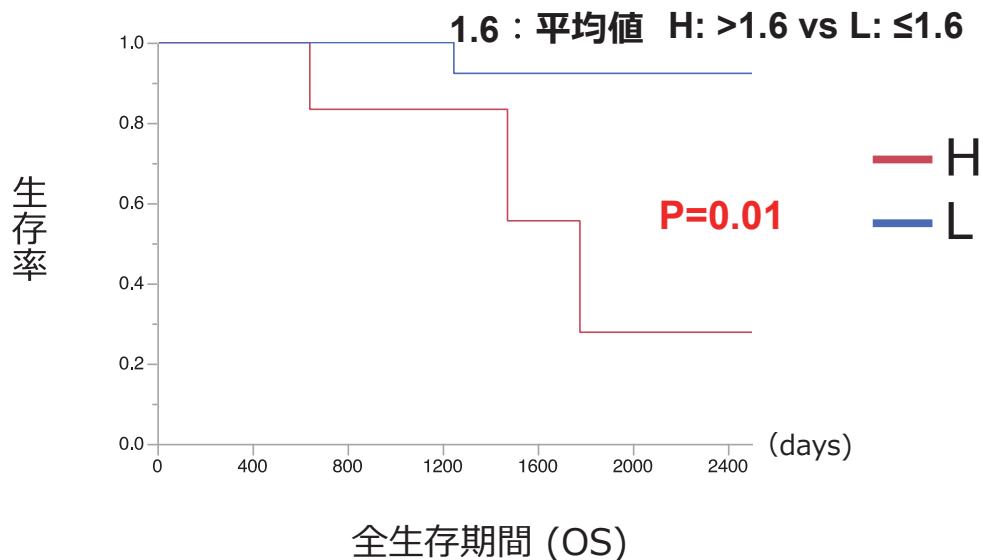


図3 FGFR3IIIcの発現が高いと、食道がん患者の全生存期間が短くなる。

- (B) FGFR3IIIc 発現が高い食道がん患者は発現が低い患者と比べて全生存期間が短くなった。グラフの縦軸は生存率、横軸は全生存期間（日数）を示す。FGFR3IIIcの発現が高い患者（H）の生存率0.5の時、全生存期間は約1700日であったが、FGFR3IIIcの発現が低い患者（L）は同じ時の生存率が0.9以上であった ($p = 0.01$)。

(L) を分けてそれぞれの全生存期間と生存率との関係を調べた (図 3 (B))。その結果, FGFR3IIIc 発現の高い患者のグループの 50% の生存率を示す期間が約 1800 日であり, 低い患者では 2400 日以上と, 有意な差が認められた ($P=0.01$)。これらの結果は, 食道がん部位に FGFR3IIIc が高く発現すると, がんの悪性化が促進することを示している。

3.2 大腸がん細胞の FGFR3IIIc 発現を抑制すると, 増殖能と浸潤能を阻害した

がん細胞の悪性化の指標として増殖能と浸潤能に及ぼす FGFR3IIIc 発現の影響を, 大腸がん細胞 Caco2 を用いて, *in vitro* で解析した (図 4 (A) (B) (C))。Caco2 細胞では内因性の FGFR3IIIc が

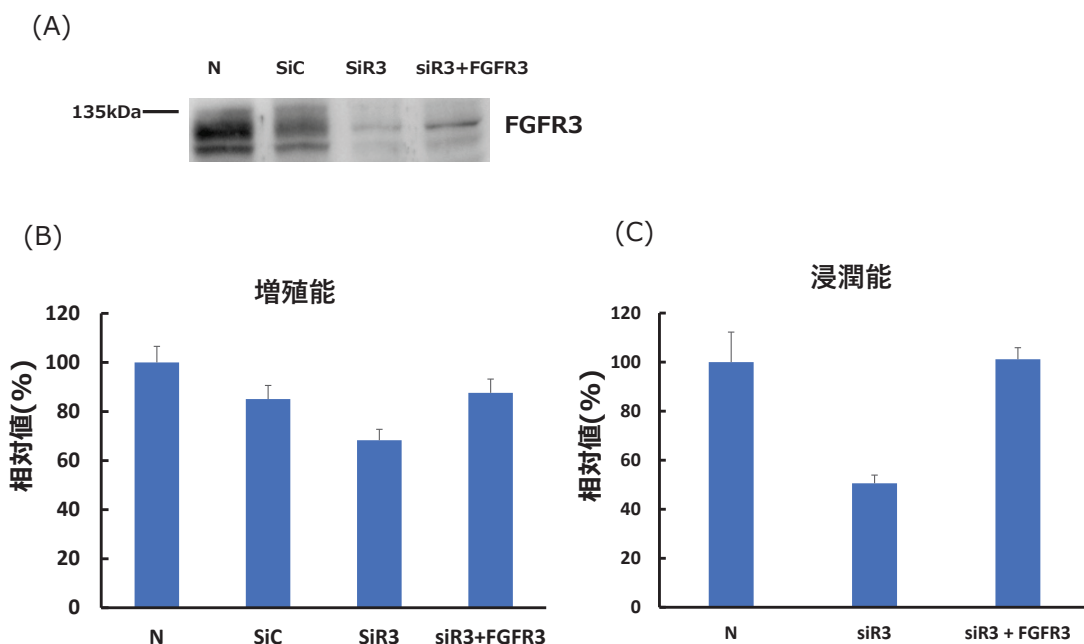


図 4 FGFR3IIIc の発現抑制は, 大腸がん細胞の増殖と浸潤を阻害した。

- (A) Caco2 細胞を siRNA 処理により内在性の FGFR3 の発現をノックダウンした (N:siRNA 無処理, siC:siControl 処理, siR3:siFGFR3 処理)。レンチウイルスにより再び FGFR3IIIc を発現させ (siR3+FGFR3), 細胞溶解液を SDS-PAGE, ウェスタンブロットにより抗 FGFR3 抗体で FGFR3 の発現レベルを検出した。
- (B) 増殖アッセイ. Caco2 細胞を siRNA 処理した翌日レンチウイルスを感染した。24 時間後に, 細胞を回収して 96 well plate に 1.5×10^4 cells/well を播種した。37°C, 5% CO₂ インキュベーターで培養した。3 日後に 5 mg/ml の MTT を 10 μ m 添加し 2 時間培養した。上清を除去し, DMSO を 100 μ l ずつ添加して, ELISA リーダーを用いて 540 nm の吸光度を測定した。N の値を 100% として, 各処理の値 (%) の平均値 \pm 標準偏差を示した。
- (C) 浸潤アッセイ. (B) と同様にして Caco2 細胞を処理したのち, 細胞を 1×10^5 cells/100 μ L に調製し, 12 μ m 孔の millicell カップ (Millipore) に播種した。600 μ L の 0.1% FBS-DMEM が入った well にカップを移し, さらに 1 日培養した。Millicell カップを取り出し, Diff-Quick 染色キット (Sysmex) を用いて染色し, メンブレンの下側に浸潤した細胞の数を 6 視野 ($\times 400$ 倍の倍率) カウントし平均値 \pm 標準偏差を示した。

発現しているが、siRNA を用いて FGFR3 の発現をノックダウンした時、さらに FGFR3 発現をノックダウンした細胞にレンチウイルスを用いて FGFR3IIIc を再び発現させた時の増殖能と浸潤能を比較した。図 4 (A) では、何も処理していない Caco2 細胞 (N), siControl で処理した細胞 (siC), siFGFR3 で処理した細胞 (siR3), siFGFR3 で処理したのち FGFR3IIIc を発現させた細胞 (siR3+FGFR3) の FGFR3 の発現をウェスタンブロットで解析した (図 4 (A))。FGFR3IIIc は糖鎖修飾によって約 110 kDa と 130 kDa の複数のバンドとして検出されるが (N, siC), siR3 によって発現が阻害され、レンチウイルスによって発現が一部回復していることがわかった。次にこれらの細胞を使って、細胞増殖能を比較したところ、siR3 細胞で最も増殖能が低く、レンチウイルスによる FGFR3IIIc の発現回復により、増殖能が上昇することが確かめられた (図 4 (B))。

同様に、これらの細胞を使って、浸潤能を比較したところ、siR3 で強く浸潤能が抑制され、FGFR3IIIc の発現回復により、浸潤能も N と同程度に回復することがわかった (図 4 (C))。これらの結果から、Caco2 細胞における FGFR3IIIc の発現は、細胞増殖能と浸潤能を高め、がんの悪性化を促進することがわかった。

2.3 大腸がん細胞の FGFR3IIIc 発現上昇は抗がん剤耐性を獲得させる

大腸がん細胞で FGFR3IIIc の発現が高まると、抗がん剤に対する耐性が変化するかどうか調べた (図 5)。図 4 と同様にして、Caco2 細胞を siRNA とレンチウイルスで処理したのち、細胞を 96 well plate に播種して、大腸癌の標準治療薬フルオロウラシル (5-FU) で処理し薬剤耐性を比較した。図 5 に示すように、siR3 処理によって 30 μ M の 5-FU で Caco2 細胞の生存率が約 50% 以上低下するのに対して、FGFR3IIIc の発現を回復すると 1000 μ M の 5-FU でも 100% の生存率を維持した。これらの処理による 5-FU に対する IC50 値 (50% 生存率になる時の薬剤濃度) を表 2 にまとめた。その結果、siControl で処理した場合、IC50 は 864 μ M であったが、siR3 処理で 27.7 μ M と 5-FU に対する感受性が約 31 倍に高くなった。一方、FGFR3IIIc の発現を回復すると何も処理していない細胞 (N) と同様に、IC50 値が 1000 μ M 以上となり、強い耐性を示した。以上の結果から、FGFR3IIIc は抗がん剤耐性の獲得にも関わっていることが明らかになった。

2.4 FGFR3IIIc の発現が抑制されることで、Akt, MAPK, PLC γ の活性が低下し、FGFR3IIIc の発現上昇により活性化した。

FGFR3IIIc の発現により、Caco2 細胞の細胞内シグナル伝達経路がどのように変化しているか、ウェスタンブロットにより解析した (図 6)。その結果、FGFR3 の主要な細胞内シグナル伝達の下流分子、Akt, MAPK, PLC γ (10) のリン酸化 (活性化) が siR3 により阻害され、FGFR3IIIc の回復で高まることが示された。

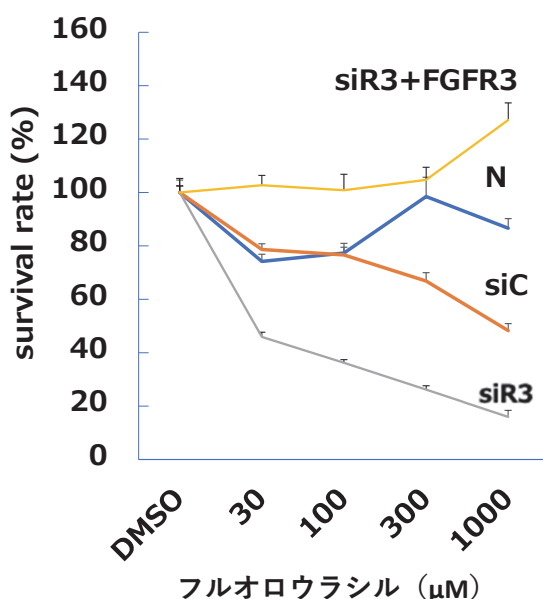


図5 FGFR3IIIc の発現上昇は、大腸がん細胞 Caco2 の抗がん剤耐性を獲得させた。

Caco2 細胞を図 4 (A) に示したように siRNA 処理した翌日、細胞を回収して 96 well plate に 1.5×10^4 cells/well を播種した。4 時間後に、それぞれグラフに示す濃度のフルオロウラシルを添加して 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで培養した。3 日後に 500 μg/ml の MTT を添加し 2 時間培養した。上清を除去し、DMSO を 100 μl ずつ添加して、ELISA リーダーを用いて 540 nm の吸光度を測定した。

表 2 大腸がん細胞の FGFR3IIIc の発現上昇は、抗がん剤耐性を獲得させた。

Caco2 細胞	IC50 値 (μM)
N	>1000
siC	864.1
siR3	27.7
siR3+FGFR3	>1000

図 6 に示した Caco2 細胞のそれぞれの処理によるフルオロウラシルに対する IC50 値をまとめた。FGFR3 の発現をノックダウンすると (siR3 細胞)、フルオロウラシルに対する IC50 値が 27.7 μM と対照の siC 細胞と比べて約 30 分の 1 になった。しかし、siR3 細胞に再び FGFR3IIIc を過剰発現させると、非処理の細胞と同じように IC50 値が 1000 μM に回復したことから、FGFR3IIIc の発現が Caco2 細胞にフルオロウラシルに対する耐性を獲得させることがわかった。

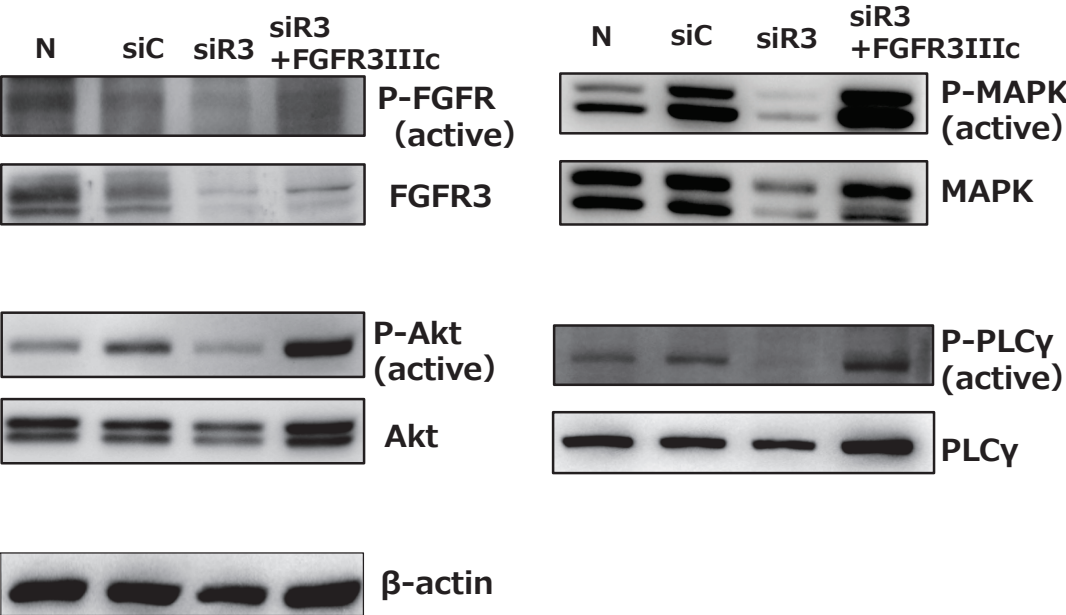


図6 FGFR3IIIc の発現が抑制されることで Akt, MAPK, PLC γ の活性が低下し, FGFR3IIIc の発現上昇により活性化した。

Caco2 細胞の FGFR3IIIc 発現上昇による増殖促進, 浸潤能促進, および抗がん剤耐性獲得に細胞内シグナル伝達経路タンパク質 Akt, MAPK, PLC γ のリン酸化, すなわち活性化が関与している可能性が高い。

表3 オルガノイド培養系作成状況

番号	作成日	検体	がん種	作成結果
1	2020.5.14	gc-01	胃がん	×
2	2020.5.28	cc-02	大腸がん	○
3	2020.6.2	cc-03	大腸がん	×
4	2020.6.18	gc-04	胃がん	×
5	2020.7.2	cc-05	大腸がん	×
6	2020.7.7	cc-06	大腸がん	×
7	2020.7.14	cc-07	大腸がん	○
8	2020.9.2	cc-08	大腸がん	×
9	2020.9.10	cc-09	大腸がん	○
10	2020.10.1	cc-10	大腸がん	○
11	2020.10.15	cc-11	大腸がん	○
12	2020.11.17	gc-12	胃がん	×

13	2020.11.21	cc-13	大腸がん	○
14	2020.12.8	cc-14	大腸がん	○
15	2020.12.17	cc-15	大腸がん	○
16	2021.01.09	cc-16	大腸がん	○
17	2021.01.14	cc-17	大腸がん	○
18	2021.02.02	cc-18	大腸がん	×
19	2021.02.04	cc-19	大腸がん	×
20	2021.02.18	gc-20	胃がん	×
21	2021.03.30	cc-21	大腸がん	○

○：オルガノイド作成に成功

×

2.5 消化管がん患者検体からのオルガノイド作成

現在までに、消化器系がん患者検体（21 症例、大腸がん 17 症例、胃がん 4 症例）を用いて、オルガノイドの作成を検討した（表 3）。一般的により難しいとされる胃がんのオルガノイド作成には成功していないが、大腸がんは、11/17（65%の成功率）でオルガノイド作成に成功した。

4. 考察

我々の大腸がん細胞を用いた今回の研究で、FGFR3IIIc の発現上昇が細胞の増殖と浸潤を促進すること、抗がん剤耐性を獲得させることが明らかになった。大腸がん患者の検体を用いた研究（8）では、病気の進行とともに間葉系タイプ FGFR3IIIc と上皮系タイプ IIIb の mRNA 発現比が亢進することが、また、大腸がんのモデル細胞株を用いた実験でも、FGFR3IIIc の発現抑制によりがん細胞の増殖が抑えられることが報告されている（8）。胃がん細胞の増殖を促進するがん遺伝子産物 HER2 に対する分子標的薬に、トラスツズマブがある。これは、胃がん患者の第一選択薬である。しかしながら、トラスツズマブを投与し続けると、1 年以内にトラスツズマブに対する耐性を獲得する。耐性を獲得した胃がん細胞では FGFR3 とそのリガンドである FGF9 の発現が上昇し、FGFR3 の下流シグナル伝達経路の活性化がトラスツズマブに対する耐性の獲得に関与していることが報告されている（7）。

従って、大腸がん患者また胃がん患者から得られた検体から確立されたオルガノイド培養系を用いて、FGFR3IIIc の発現上昇と抗がん剤耐性の獲得に関連があるかどうかを明らかにし、個別化医療に役立てたい。しかしながら、現在までに大腸がんのオルガノイド培養系は成功したもの、その成功率は 100 % ではない。なぜ、成功しない場合があるのか、その原因を明らかにしたい。現在では、がんの診断技術の向上から、がんのステージが初期である場合は、よりオルガノイド培養系の確立が難しいのかもしれない。また、胃がんでは症例が少ないこともあるが、全く成功していない。

原因はわからないが、培養方法を変える、特に培養に添加する増殖因子を変える、増やすなどの改良が必要である。

大腸がん細胞を用いた *in vitro* の FGFR3 の下流シグナルの解析より、生存と増殖に関連する Akt, MAPK, PLC γ の活性が siR3 の細胞で低下し、FGFR3IIIc の発現を回復させることで、これらの活性も回復していた。Akt 経路は、タンパク質合成や細胞の増殖、生存を制御する経路であり、Akt が活性化されると様々なメカニズムでアポトーシスが抑制される (10)。例えば、Akt はアポトーシス促進性のタンパク質 BAD や caspase9 をリン酸化してアポトーシス誘導能を阻害し、Akt は転写因子 CREB をリン酸化することにより、アポトーシス抑制タンパク質 BCL-2 の発現を誘導する。MAPK 経路は、細胞の増殖、分化、生存、形質転換などの多くの働きを担う経路であることが知られている。また、2017 年に発表された論文では、大腸がん細胞の標準治療薬として使われているイリノテカンに対する薬剤耐性について調べられており、FGFR3 の発現が増加した細胞では、アポトーシスを促進するタンパクである BCL-XL の発現の低下がみられた (9)。これらのことから、FGFR3 の発現が上昇すると、下流シグナルである Akt, MAPK の活性が上昇し、これらの経路の活性によって、フルオロウラシルに対するアポトーシスを抑制しているのではないかと考えられる。

オルガノイド培養系を用いて① 5-FU やその他の抗がん剤耐性と FGFR3IIIc の発現を解析し、個別化医療に役立つ情報を収集すること、②がん治療につながる化合物を選定することにより、がん患者の治療に活かしたいと考えている。

5. 引用論文

1. Murgue, B., Tsunekawa, S., Rosenberg, I., deBeaumont, M., & Daniel K. Podolsky Identification of a Novel Variant Form of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3 IIIb) in Human Colonic Epithelium. *Cancer Res.* **54**, 5206-5211 (1994)
2. Holzmann, K., Grunt, T., Heinzle, C., Sampl, S., Stainhoff, H., Reichmann, N., Kleiter, M., Hauck, M., & Marian, B. Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor IgIII Loops in Cancer. *J. Nucleic Acids.* **2012**, 950508. (2012)
3. Ueno N., Shimizu A., Kanai M, Iwaya Y, Ueda S, Nakayama J, Seo MK. Enhanced Expression of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 IIIc Promotes Human Esophageal Carcinoma Cell Proliferation. *J. Histochem. Cytochem.* **64** (1), 7-17. (2016)
4. 近藤純平, 井上正宏, CTOS 法を用いたがんオルガノイド培養とパネル作成への応用, (2019) 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド, ed. 佐々木博己, 実験医学別冊, 羊土社
5. Kondo, J., Ekawa, T., Endo, H., Yamazaki, K., Tanaka, N., Kukita, Y., Okuyama, H, et al. High-throughput screening in colorectal cancer tissue-originated spheroids. *Cancer Science.* **110**, 345-355. (2019)
6. Kondo J, Inoue M. Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy. *Cells*, **8**, 470-486 (2019).
7. Piro, G., Carbone, C., Cataldo, I., Di Nicolantonio, F., Giacomuzzi, S., et al., An FGFR3 Autocrine Loop sustains Acquired Resistance to Trastuzumab in Gastric Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* **22**(24):6164-6175. (2016)

8. Sonvilla, G., Allerstorfer, S., Heizle, C., Statner, S., Karner, J., Klimpfinger, M., Wrba, F., Fischer, H., Gauthofer, C., & Spiegl-Kreinecker, S., et al. Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration. *Br. J. Cancer* 102, 1145-1156. (2010)
9. Erdem, Z.N., Schwarz, S., Drev, D., Heinzle, C., Reti, A., Heffeter, P., Hudec, X., Holzmann, K., Grasl-Kraupp, B., Berger, W., Michael Grusch, M., & Marian, B. Irinotecan Upregulates Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Expression in Colorectal Cancer Cells, Which Mitigates Irinotecan-Induced Apoptosis. *Transl. Oncol.* 10 (3), 332-339. (2017)
10. Touat, M., Ileana, E., Postel-Vinay, S., Andre, F., & Soria J-C. Targeting FGFR Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res.*, 21 (12) 2684-2694. (2020)

6. 謝辞

本研究は、京都産業大学科研費申請再挑戦プログラム「消化管癌患者検体オルガノイド培養確立による細胞内シグナル解析と個別化医療の探究」（課題番号 E2004）の研究の一部として実施された。また、研究の一部は、平成 29 年度科学研究費助成事業基盤研究 C「食道がん悪性化における FGFR3IIIc の分子メカニズム解析」（課題番号 17K10611）の支援を受けて実施した。

Analysis of molecular mechanisms by Fibroblast Growth Factor Receptor 3IIIc in malignant progression in digestive cancer cells and application of cancer organoid model for personalized therapy.

Misuzu SEO
Kazuki FUKUMITSU
Shugo UEDA
Nobuhiro UENO

Abstract

The expression of an alternatively spliced isoform of FGFR3, FGFR3IIIc, was analyzed by immunohistochemistry in samples from patients with esophageal carcinoma (EC). We found that the expression of FGFR3IIIc was higher in EC than in non-cancerous mucosa. In this study, clinical significance of the increased expression of FGFR3IIIc in the EC patients was examined. We found that Overall Survival in the EC patients with higher expression levels of FGFR3IIIc was shorter than that in those with lower expression levels of FGFR3IIIc ($P < 0.01$). Further, we examined the effect of FGFR3IIIc expression in cell proliferation, invasion, and drug-resistance, using Caco2 cells as colorectal cancer model. The knockdown of endogenous FGFR3 using siRNA treatment significantly abrogated cell proliferation and invasion and the overexpression of FGFR3IIIc in the cells with enhanced cell proliferation and invasion. In addition, the cells overexpressing FGFR3IIIc acquired the drug-resistance to 5-FU. The cell-survival and proliferation stimulating signaling molecules such as Akt, MAPK, PLC γ were activated by FGFR3IIIc expression in the cells. Thus, our results suggest that targeting FGFR3IIIc can be a promising strategy for EC and colorectal cancer therapy. Patient-derived cancer organoid is an important live material that reflects clinical heterogeneity. We are now preparing patient-derived cancer organoids from digestive cancer patients to evaluate targeting FGFR3IIIc for the therapy.

Keywords : Fibroblast growth factor receptor 3IIIc. Esophageal cancer. Colorectal cancer. Drug-resistance. Patient-derived cancer organoid.