

ヒト扁平上皮癌細胞における 繊維芽細胞増殖因子レセプター FGFR3c の 誘導発現とシグナル伝達

大 西 力
上 野 信 洋
金 井 陸 行
寺 田 基 剛
清 水 昭 男
瀬 尾 美 鈴

(平成17年3月11日提出)
(平成17年12月14日修正)

目 次

1. 概要
 2. 序論
 3. 略語表
 4. 結果
 - 4.1 ヒト皮膚由来扁平上皮癌細胞 DJM1 の FGFR3 発現.
 - 4.2 Ponasterone A による濃度依存的な FGFR3c 発現の誘導.
 - 4.3 FGFR3c の FGF2 刺激による足場依存的な細胞増殖.
 - 4.4 FGFR3c の FGF2 刺激による足場非依存的な細胞増殖.
 - 4.5 FGF 刺激による細胞内タンパク質のチロシンリン酸化.
 - 4.6 FGF による FRS2-MAPK 経路の活性化.
 - 4.7 FGF シグナル伝達における PLC- γ 経路の関与.
 5. 考察
- 参考文献

1. 概 要

繊維芽細胞増殖因子 (FGF) は細胞増殖, 分化, 遊走, 血管新生など様々な細胞応答を引き起こす能力があり, 標的細胞の FGF に対する感受性は FGF 受容体 (FGFR) の発現に依存している. FGF

の働きはその4つの受容体を介して行なわれ、受容体の細胞内ドメインにあるチロシンキナーゼを活性化することにより、細胞内に様々なシグナルを伝達する。その結果、多様な細胞応答を引き起こす。

FGFR3の活性化型点変異は膀胱癌、子宮癌、胃癌、大腸癌、扁平上皮癌などで発見されており、多発性骨髄腫では10~20%の患者においてIgG重鎖との転座によるFGFR3の過剰発現が癌化の原因に寄与することが報告されている。また前立腺癌や膵臓癌でFGFRの発現が見られ、癌の悪性化に寄与していることを示唆する報告もある。しかし、上皮癌におけるFGFR3による癌の悪性化や形質転換のメカニズムはまだ明らかになっていない。そこで私達は上皮癌細胞におけるFGFR3の役割とシグナル伝達を調べることにした。

本研究ではヒトの食道癌におけるFGFR3cの役割を調べるために、エクダイソン誘導発現ベクターシステムを用いてヒト皮膚由来扁平上皮癌細胞株であるDJM1に、FGFR3cの発現を誘導し、その足場依存的な細胞増殖と足場非依存的増殖に及ぼす影響を調べた。FGFR3cタンパク質の発現はPonasterone A濃度依存的な方法で誘導発現した。その結果、Ponasterone A処理によってFGFR3cを誘導発現させたクローンにおける足場依存的細胞増殖および足場非依存的増殖は、FGF2により著しく促進された。これらの結果から、FGFR3cの上皮癌における発現は癌の悪性化過程に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次にFGFR3cによる癌悪性化のメカニズムを調べるために、FGF1とFGF2刺激による細胞内シグナル伝達分子の活性化を調べた。

FGFR3cを発現誘導したDJM1細胞をFGF1またはFGF2刺激した後、全細胞内タンパク質のチロシンリン酸化を調べたが、ほとんど違いは認められなかった。しかし、FGF1はRas-MAPK経路を活性化したが、FGF2は活性化しなかった。FGF1はFRS2, MAPK, Elk-1のリン酸化とc-Fosの発現上昇を誘導したが、FGF2は誘導しなかった。以上の結果から、FGF2の癌悪性化シグナルはRas-MAPK経路を介さないことが分かった。

FGF2は浸潤性のヒト食道扁平上皮癌において高発現しており、ヒト膵臓癌患者においてはFGF2を発現していると予後が悪いことが報告されている。本研究の結果とあわせて考えると、ヒト上皮癌細胞におけるFGFR3cの異所性発現とFGF2の発現は、FGF2の血管新生能力やFGFR3c発現によるFGF2オートクライン、パラクラインによる癌細胞の増殖促進など、癌にとって生存有利な環境を形成し、癌悪性化において重要な役割を果たしているかもしれない。

これらをまとめると、FGFR3cの発現とFGF2によるシグナル伝達は、食道癌組織における癌悪性化を促進している可能性が示唆された。面白いことに、FGFR3c発現におけるFGF2シグナルが、癌化シグナルに主要な役割を果たしているRas/MAPK経路とは異なるシグナル経路を通じて悪性化シグナルを伝えていることを示唆するものとなった。

2. 序 論

繊維芽細胞増殖因子 (FGF) は動物細胞の増殖, 分化, 生存, 血管新生, 創傷治癒, 腫瘍形成, 初期胚の中胚葉からの器官・組織形成などを制御する上で重要な役割を果たしている. FGF は23種類から成るファミリーを形成しており, FGFR は4種類の遺伝子が同定され, FGF ファミリーと同様に遺伝子ファミリーを形成している [1, 2]. FGF の働きはその4つの受容体 (FGFR) を介して行なわれ, 受容体の細胞内ドメインにあるチロシンキナーゼが活性化することにより, 細胞内に様々なシグナルを伝達する. FGFR 遺伝子の活性化型点変異や転座などの原因により FGF-FGFR システムに異常が生じると, 人間や動物は組織形成や正常な成長が出来ず, 過剰な FGF シグナルは細胞の癌化を引き起こす.

FGFR は細胞膜を一回貫通するレセプター型チロシンキナーゼであり, その構造はリガンドと結合する細胞外領域 (ECD), 膜貫通領域 (TM), および細胞内に情報を伝達する細胞内領域から構成されている. 細胞外領域には3つの免疫グロブリン領域 (IgI, II, III) とアシッドボックスを持っており, 疎水性アミノ酸からなる膜貫通領域をはさんで, 細胞内領域には細胞内タンパク質のチロシン残基をリン酸化するチロシンキナーゼを有している.

細胞の増殖や分化誘導には FGF シグナルが重要な役割を果たしているが, FGF シグナルは細胞表面の FGFR に FGF が結合することから始まる. リガンドである FGF が FGFR に結合すると FGFR の立体構造変化が変化する事で細胞膜上での FGFR の二量体化が誘導され, チロシンキナーゼが活性化されると考えられている. 活性化されたチロシンキナーゼがまずお互いの特定の位置にあるチロシン残基をリン酸化する (自己リン酸化). 引き続き活性化チロシンキナーゼはそのチロシンリン酸化部位を認識してリクルートされる細胞内のドッキングタンパク質をチロシンリン酸化し, MAPK 経路などの様々なシグナル伝達経路を活性化する [3].

FGFR が活性化すると細胞膜直下に結合したドッキングタンパク質 FRS2 のチロシン残基をリン酸化し, チロシンリン酸化された FRS2 は, さらに下流にシグナルを伝達する Grb2 や Sos, Shp2, PKC γ , PI3-K, Src, Crk などのタンパク質と結合する [4]. このように, 細胞や細胞の状態が変わることによって FRS2 に結合するタンパク質の構成が異なる複合体を形成し, FGFR が多様な細胞応答を引き起こすと考えられている [5].

4種類の FGFR はどのようにして, 23種類の FGF に対応しているのだろうか. FGFR のリガンド (FGF) 特異性は, FGFR の細胞外領域の構造によって決定される. FGFR は IgIII 後半部分のエクソンの選択的スプライシング (Alternative splicing) により複数のアイソフォームが生じる [6]. 上皮系では主に IIIb タイプ, 間葉系では IIIc タイプが発現することが知られており [7-9], IgIIIb, IgIIIc の違いにより異なる FGF 感受性を示す [10-12]. FGFR1 における FGFR1b と FGFR1c は, どちらも FGF1 に高親和性であるのに対し, FGF2 では FGFR1c の方が50倍も親和性が高いことが

知られている [13]. ヒトの膜貫通型 FGFR3 でも, FGFR1 と同様に FGFR3b, FGFR3c と呼ばれるアイソフォームが存在する.

FGFR3 遺伝子の活性化型点変異は膀胱癌, 子宮癌, 胃癌, 大腸癌, 扁平上皮癌などで発見されており [14-17], 多発性骨髄腫では10~20%の患者において IgG 重鎖との転座による FGFR3 の発現が癌化の原因に寄与することが報告されている [18]. また前立腺癌や膵臓癌で FGFR1 の発現が見られ, 癌の悪性化に寄与していることを示唆する報告もある [19,20].

当研究室のこれまでの研究によって, ヒトの食道癌患者の癌部位およびその周辺正常部位における FGFR3 の RNA レベルでの発現を調べたところ, FGFR3b は癌および正常部位ともに発現している事が示された. それに対し FGFR3c については正常部位ではあまり発現が確認出来なかったが, 癌部位に高頻度で発現していることが示された [21]. この結果は, 食道癌において FGFR3c が癌の悪性化に寄与しているであろうことを示唆するものとなった.

本研究ではヒトの食道癌における FGFR3c 発現の役割を調べるために, ヒト皮膚由来扁平上皮癌由来の細胞株である DJM1 を用いた. DJM1 細胞は FGFR3c を発現していない細胞のため, その異所性発現の役割を解析し易い利点がある. さらに FGFR3c の遺伝子導入には, エクダイソン誘導発現ベクターシステムを用いた. このシステムでは, 昆虫ホルモンであるエクダイソンの類似体である Ponasterone A を細胞培養上清に添加することによって, FGFR3c の発現が誘導されるため, 非添加時の FGFR3c が発現しない状態と発現した状態での癌の性質をより厳密に比較できると考えた. その結果, Ponasterone A 処理によって FGFR3c を誘導発現させたクローンは, FGF2 刺激により細胞増殖とソフトアガー中の足場非依存的増殖が著しく促進された.

さらに FGFR3c の発現によって, FGF1 と FGF2 刺激による細胞内シグナル伝達に違いが生じていないか検討した.

その結果, FGF1 および FGF2 刺激による全細胞内タンパク質のチロシンリン酸化は, ほとんど違いが認められなかった. しかし, FGF1 は主要な癌化および増殖シグナル伝達経路である Ras-MAPK 経路を活性化したが, FGF2 は活性化しなかった. FGF1 は FRS2, MAPK, Elk-1 のリン酸化と c-Fos の発現上昇を誘導したが, FGF2 は誘導しなかった. これは, DJM1 細胞では FGF2 の癌悪性化シグナルは Ras-MAPK 経路を介さないことを示している.

FGF2 は浸潤性のヒト食道扁平上皮癌において高発現しており [22], ヒト膵臓癌患者においては FGF2 を発現していると予後が悪いことが報告されている [23]. 本研究の結果とあわせて考えると, ヒト上皮癌細胞における FGFR3c の異所性発現と FGF2 の発現は, FGF2 の血管新生能力や FGFR3c 発現による FGF2 オートクライン, パラクラインによる癌細胞の増殖など, 癌にとって生存有利な環境を形成し, 癌悪性化において重要な役割を果たしているかもしれない.

これらをまとめると, FGFR3c の発現と FGF2 によるシグナル伝達は, 食道癌組織における癌の悪性化を促進している可能性が示唆された. 面白いことに, FGFR3c 発現における FGF2 のシグナルが, 癌化に主要な役割を果たす古典的 Ras/MAPK 経路以外のシグナル経路を通じて悪性化シグナ

ルを伝えていることを示唆するものとなった。

3. 略語表

BSA: bovine serum albumin
cDNA: complementary DNA
DEPC: diethyl pyrocarbonate
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid salt dihydrate
FBS: fetal bovine serum
FGF: fibroblast growth factor
FGFR: fibroblast growth factor receptor
FRS2: FGFR substrate 2
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
Na₃VO₄: sodium orthovanadate
PCR: polymerase chain reaction
PBS: phosphate buffered saline
PLC- γ : phospholipase C- γ
PVDF: polyvinylidene fluoride
RT: reverse transcription
SD: standard deviation
SDS: sodium dodecyl sulfate
STAT: Signal transducer and activator of transcription
TBS: Tris buffered saline
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

4. 結果

4.1 ヒト皮膚由来扁平上皮癌細胞 DJM1 の FGFR3 発現

ヒトの膜貫通型 FGFR3 は、細胞外領域にある IgIII の C-末端側のエクソンの選択的スプライシングにより FGFR3b, FGFR3c と呼ばれるアイソフォームが生じ、その結果リガンドである FGF に対する感受性が変化する [10-12]。通常、正常な上皮系細胞では主に IIIb タイプ、間葉系細胞では IIIc タイプが発現することが知られている [7-9] (図 1A)。

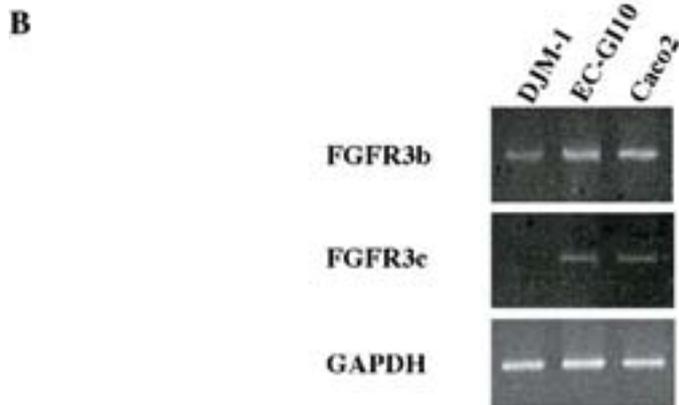
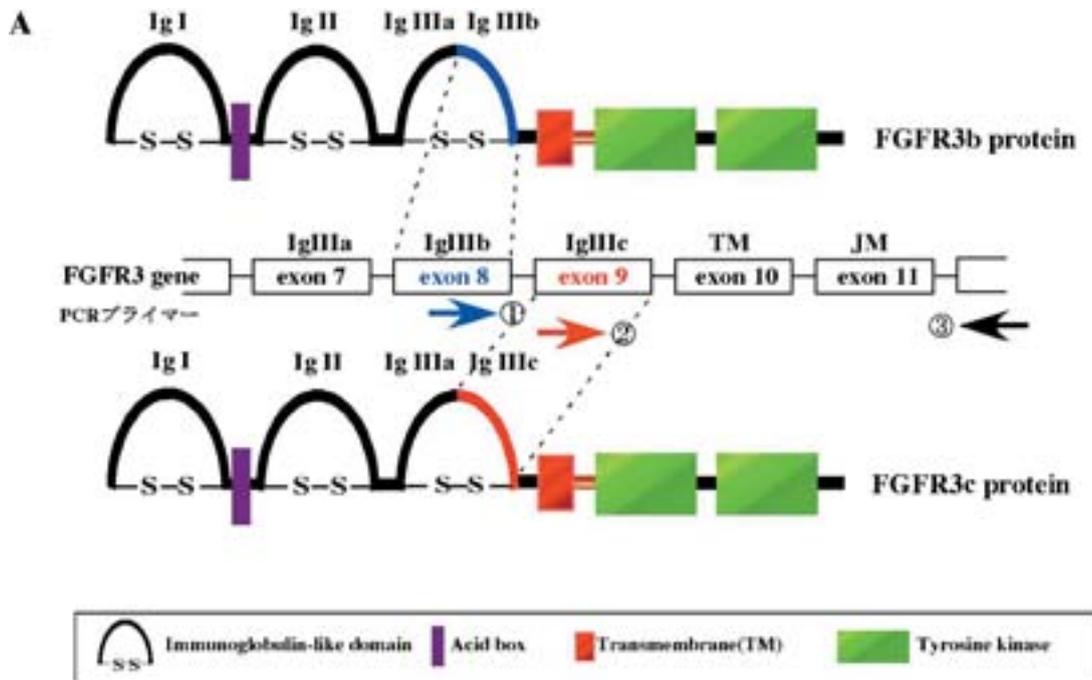


図1 ヒト上皮癌細胞株における FGFR3b と FGFR3c の発現

A. FGFR3b と FGFR3c の模式図

これらのアイソフォームは膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼであり、選択的スプライシングにより IgIIIb ドメインを持つ FGFR3b と IgIIIc ドメインを持つ FGFR3c が存在している。IIIb アイソフォームは主に上皮細胞に、IIIc アイソフォームは主に間葉系細胞に発現している。IgIIIb, IgIIIc の違いにより異なる FGF 感受性を示す。

B. ヒト上皮癌細胞株における FGFR3c の遺伝子発現

皮膚由来扁平上皮癌細胞 DJM-1, 食道由来扁平上皮癌細胞 EC-GI10, 結腸癌細胞 Caco2 細胞から RNA を抽出した後、RT-PCR で各々の細胞における FGFR3b (①と③のプライマー) と FGFR3c (②と③のプライマー) の発現を比較した。GAPDH (ハウスキーピング遺伝子)。

当研究室の以前の研究によって、ヒトの食道癌患者の癌部位およびその周辺正常部位における FGFR3 の RNA レベルでの発現を調べたところ、FGFR3b は癌および正常部位ともに発現している事が示された [21]. それに対し FGFR3c については正常部位ではあまり発現が確認出来なかったが、癌部位に高頻度で発現していることが示された。

FGFR3 の活性化型点変異は膀胱癌、子宮癌、胃癌、大腸癌、扁平上皮癌などで発見されており [14-17], 多発性骨髄腫では10~20%の患者において IgG 重鎖との転座による FGFR3 の発現が癌化の原因に寄与することが報告されている [18]. また前立腺癌や膵臓癌で FGFR の発現が見られ、癌の悪性化に寄与していることを示唆する報告もある [19,20]. しかし、上皮癌における FGFR3 による癌の悪性化や形質転換のメカニズムはまだ明らかになっていない. そこで我々は上皮癌細胞における FGFR3 の役割とシグナル伝達を調べることにした. まず、ヒト上皮癌細胞株を用い、FGFR3 の発現を RT-PCR によって解析した. ヒト食道由来扁平上皮癌細胞 EC-GI-10, ヒト結腸由来癌細胞 Caco2 では FGFR3b, FGFR3c ともに発現していることが確認できた. しかし、ヒト皮膚由来扁平上皮癌細胞 DJM1 では FGFR3b のみ発現しており、FGFR3c の発現は見られなかった (図 1B).

4.2 Ponasterone A による濃度依存的な FGFR3c 発現の誘導

ヒトの上皮癌における FGFR3c 発現の役割を調べるために、エクダイソン誘導発現ベクターシステムを用いて、DJM1 細胞に FGFR3c の発現を誘導した. 4.1 で述べたように DJM1 細胞は FGFR3c を発現していない上皮癌細胞のため、FGFR3c 発現の役割を解析し易い利点がある. Ponasterone A (Pona) という昆虫ホルモン (エクダイソン) 類似体のレセプターであるエクダイソンレセプター (VgEcR) とレチノイド X レセプター (RXR) を発現するベクター pVgRXR と FGFR3c cDNA を挿入したベクター pIND-FGFR3c を同時に導入し、その細胞の培養液に Ponasterone A を添加することで FGFR3c が転写される (図 2).

pIND-FGFR3c と pVgRXR をリポフェクション法により、DJM1 細胞にトランスフェクトした. 安定発現クローン細胞は 200 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin と 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 で選択した. これらの細胞に図に示した濃度の Ponasterone A を添加し、30時間培養することによって FGFR3c を発現させ、ウエスタンブロットによりスクリーニングしたところ、Ponasterone A 濃度依存的に FGFR3c を発現する安定発現クローン細胞 (DJM1-IIIc) を樹立することが出来た (図 3A). このクローンを用いて 5 μM Ponasterone A 添加後の FGFR3c 発現レベルを 1~48時間で確認したところ、24時間で発現レベルは最大であり、48時間では FGFR3c の発現が減少していた (図 3B).

4.3 FGFR3c の FGF2 刺激による足場依存的な細胞増殖

FGFR3c 発現が癌細胞の悪性化に関係あるかどうか調べるため、最初に FGFR3c 発現と細胞増殖の関係を調べた. DJM1-IIIc 細胞を 1% BSA-DMEM 中に懸濁し、24穴プレートに 1.0×10^4 細胞 / 500 μl / ウェルずつ播種した. 翌日に、FGFR3c の発現を誘導するために Ponasterone A, 5 μM を

Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System

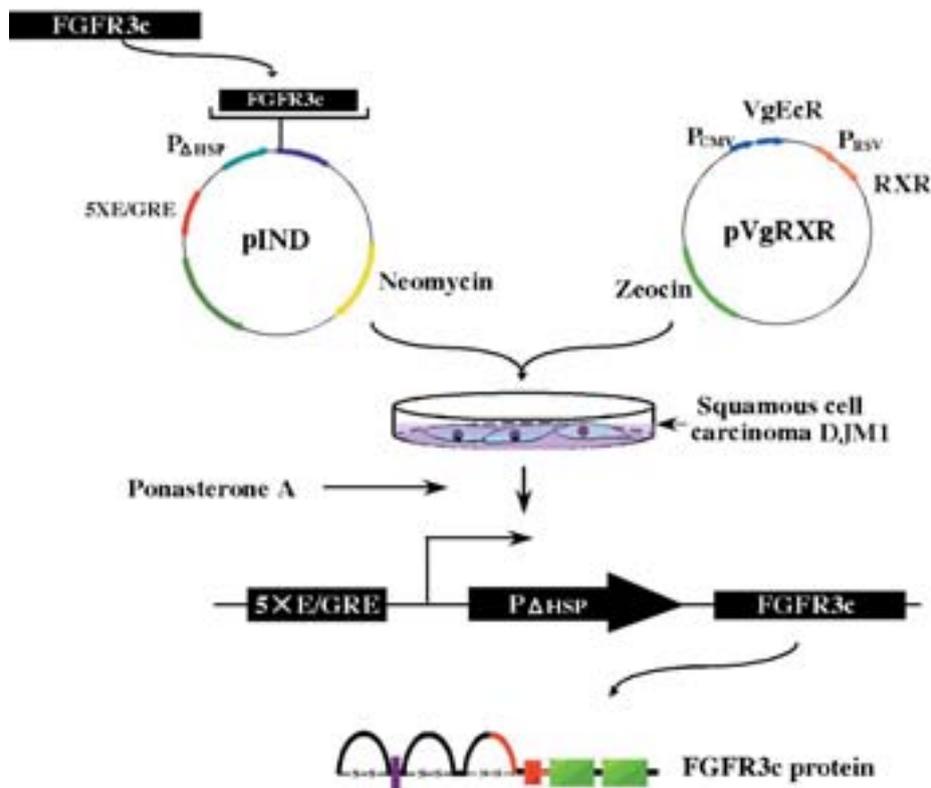


図2 Ecdysone 誘導システムの概要図

FGFR3c 遺伝子を挿入したベクター (pIND-FGFR3c) と Ponasterone A レセプター (RXR) を発現するベクター (pVgRXR) を同時に DJM1 細胞に導入し、その細胞培養液に Ponasterone A という昆虫ホルモン (エクダイソン) 類似体を添加することで、リガンドが結合したエクダイソンレセプター (VgEcR) とレチノイド X レセプター (RXR) のヘテロダイマーが modified ecdysone response element (5XE/GRE) に結合し、プロモーター (P Δ HSP) からの転写を活性化させ、FGFR3c タンパク質の合成が誘導される。

添加して24時間培養後、FGF1 もしくは FGF2 (10 ng/ml) をそれぞれ添加し、FGF 添加後7日目の細胞数をコールターカウンターで測定した。

Pona 添加 (+) もしくは非添加 (-) の細胞における FGF 非刺激時の細胞数をコントロールとし、100%の増殖率とした。FGF1 もしくは FGF2 刺激によってどれだけ増殖したかを%で表した (図4)。Pona+ および Pona- の細胞を FGF1 で刺激すると細胞増殖は促進されたが、それぞれ 153 ± 10 (mean \pm S. D.) %, $156 \pm 21\%$ と FGFR3c 発現による差は見られなかった。一方、FGF2 刺激では Pona- では $175 \pm 7\%$ であったが、Pona+ では $269 \pm 10\%$ ($P < 0.001$) と非常に高い増殖率を示した。

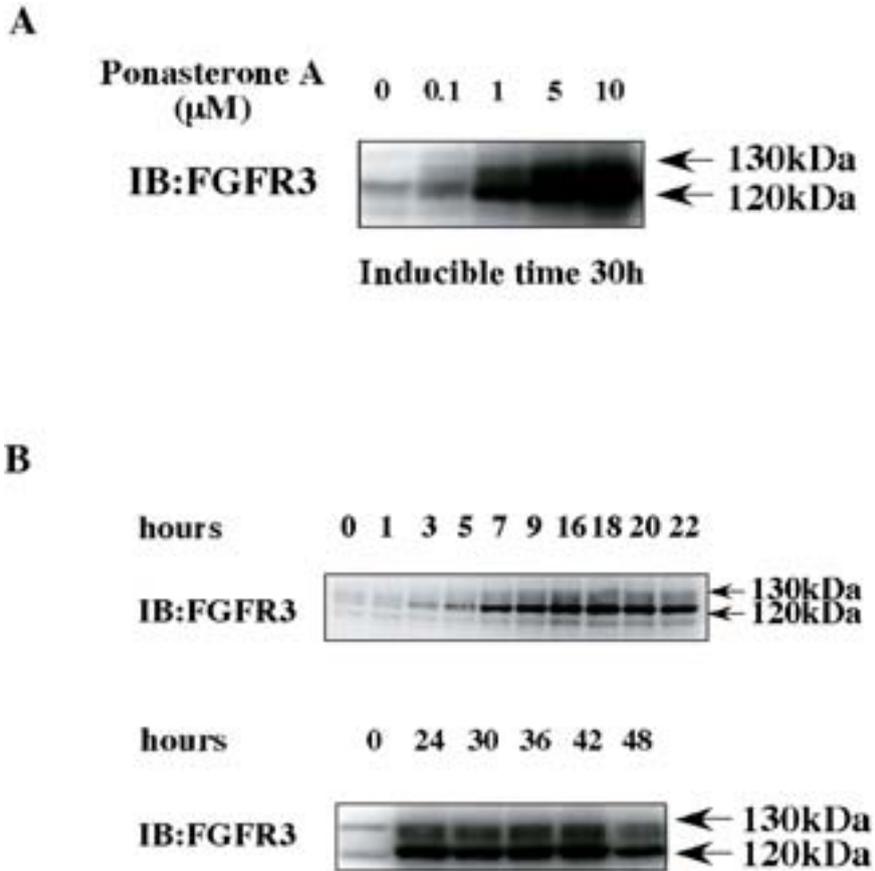


図3 Ecdysone-inducible system を用いた DJM1 細胞の FGFR3c 安定発現株の樹立

- A. Ponasterone A 濃度依存的な FGFR3c タンパク質の誘導発現. DJM1-IIIc 細胞に $0.1 \mu\text{M}$ Ponasterone A を添加, または非添加 (0) で, 30時間培養することによって FGFR3c の発現を誘導し, ウエスタンブロットにより検出したところ, Ponasterone A の濃度依存的に FGFR3c を発現した. 130 kDa と 120 kDa のバンドが FGFR3c である.
- B. Ponasterone A 処理による FGFR3c タンパク質の誘導発現タイムコース. $5 \mu\text{M}$ Ponasterone A 添加後の FGFR3c 発現レベルをそれぞれ図に示した時間で確認したところ, 24時間で発現レベルは最大であり, 48時間では FGFR3c の発現が減少し始めていた.

これらの結果から, DJM1-IIIc 細胞では FGFR3c 発現が誘導されると, FGF1 刺激による細胞増殖の促進効果にはほとんど差が認められないが, FGF2 刺激による細胞増殖が大きく促進されることがわかった. FGF1 による効果は, 後で述べるように DJM1 細胞が持つ内在性の FGFR2 および FGFR3 を介するものと考えられた.

4.4 FGFR3c の FGF2 刺激による足場非依存的な細胞増殖

図4に示したように, FGFR3c を発現している DJM1-IIIc 細胞は FGF2 刺激によって足場依存的細胞増殖を亢進することがわかった. しかし, 生体内における癌の悪性度は, 足場依存的な細胞増殖

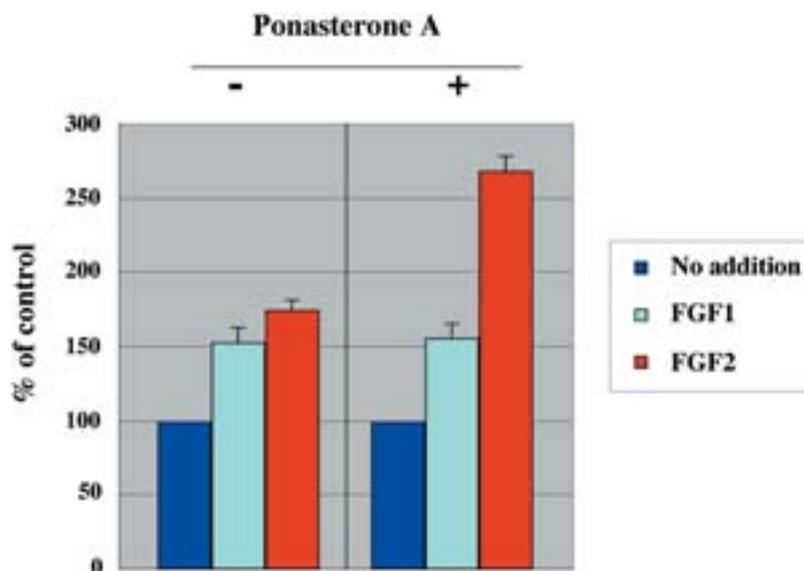


図4 FGFR3cのFGF2刺激による足場依存的な細胞増殖

DJM1-IIIc細胞を1% BSA-DMEMに懸濁し、24穴組織培養皿に 1.0×10^4 細胞/500 μ l/ウェルずつ播き、翌日に5 μ M Ponasterone Aを添加(+)または非添加(-)した。24時間培養後、FGF1もしくはFGF2(10 ng/ml)を添加し、7日目の細胞数をコールターカウンターで測定した。3ウェルの値を平均し、平均値 \pm 標準偏差(mean \pm S. D.)として示した。

よりも足場非依存的な細胞増殖と深く関連していると考えられている。そこでFGFR3cは足場非依存的な環境においてもFGF2によってコロニー形成を促進するかどうかを調べるために、ソフトアガー中におけるコロニーフォーメーションアッセイを行った。

ソフトアガー中に播かれたDJM1-IIIc細胞を25日間培養し、コロニーの形成を測定した。Ponasterone A非添加(Pona-)もしくは添加(Pona+)培養下の細胞におけるFGF非刺激時のコロニー数をコントロールとし、100%のコロニー形成率とした。FGF1もしくはFGF2刺激によってどれだけコロニーを形成したかを%で表した(図5A)。FGF1刺激した場合はPona-で 90 ± 19 (mean \pm S. D.)%, Pona+で 123 ± 21 %とFGF非刺激とあまり差が見られなかった。一方、FGF2刺激ではPona-では 91 ± 16 %であったが、Pona+では 276 ± 37 % ($P < 0.01$)のコロニー形成率を示した(図5A)。さらに位相差顕微鏡を用いた観察では、Pona+培養系でFGF2刺激されたコロニーは、他のすべてのものに比べて明らかに巨大化していた(図5B)。

これらの結果から、FGFR3cはFGF2刺激されたときに、DJM1-IIIc細胞の癌の悪性度を促進することが示された。

4.5 FGF刺激による細胞内タンパク質のチロシンリン酸化

FGFR3cを発現したDJM1-IIIc細胞における、FGF2刺激による癌の悪性化メカニズムを明らかにするために、無血清培地で16時間、細胞を血清飢餓状態にした後、FGF1またはFGF2刺激による

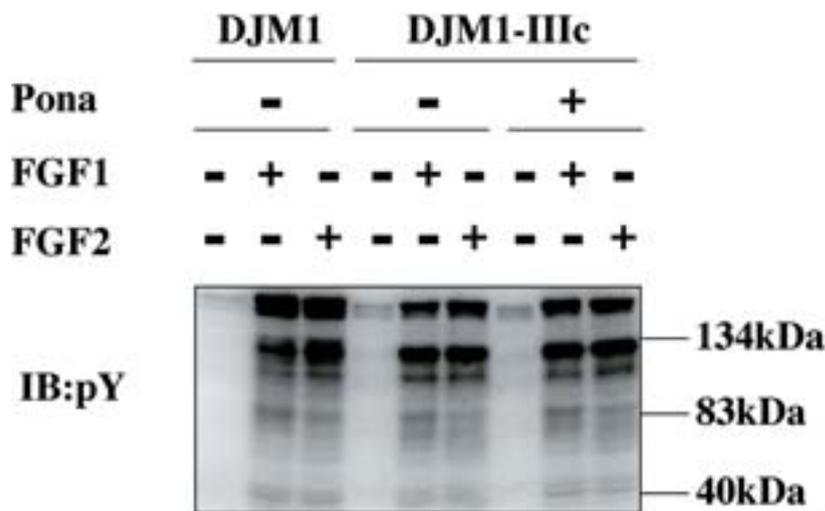


図6 FGF 刺激による細胞内タンパク質のチロシンリン酸化

100 mm 組織培養皿に DJM1 細胞は 7×10^5 個/10 ml 10% FBS-DMEM, DJM1-IIIc 細胞は 1.0×10^6 個/10 ml で播種し, 37°C , 5% CO_2 の条件下で 3 日間培養した. 1% BSA-DMEM 2 ml で 2 回洗浄し, 5 ml の 1% BSA-DMEM に置換した後, $5 \mu\text{M}$ Ponasterone A を (Pona+) または非添加 (Pona-) し, 16 時間培養することによって FGFR3c の発現を誘導した. FGF1 と FGF2 (10 ng/ml) で 30 分間刺激した後, 細胞を Lysis バッファ $50 \mu\text{l}$ (1% Nonidet P-40, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) で溶解した. $60 \mu\text{g}$ の細胞溶解液を 7.5% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE でタンパク質を分離し, 抗リン酸化チロシン抗体 (4G10 と p-Tyr-100) でウエスタンブロットにより検出した.

細胞内シグナル伝達を調べた. その結果, 図 6 に示すように FGFR3c を発現した DJM1-IIIc 細胞 (Pona+) における, FGF1 および FGF2 刺激による全細胞内タンパク質のチロシンリン酸化にほとんど違いはなかった. しかし, 80kDa や 40kDa のバンドは FGF1 刺激でやや強く検出されていた. FGF 刺激しないときは, チロシンリン酸化はほとんど起こっていなかった. また親株である DJM1 細胞と, DJM1-IIIc 細胞 (Pona+ および-) における, FGF1 および FGF2 刺激時の細胞内チロシンリン酸化にほとんど違いはなかった (図 6).

4.6 FGF による FRS2-MAPK 経路の活性化

FGF 刺激による FGFR の活性化は様々な細胞内シグナル伝達分子群を活性化するが, なかでも MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 経路は FGF シグナルにおいて非常に重要な働きをしていると考えられている [24, 25]. MAPK は外界からの様々な刺激に反応して活性化されるプロテインキナーゼであり, 細胞外からのシグナルを核に伝達し, 遺伝子発現を調節することで, 細胞増殖, 分化, アポトーシスなどの細胞応答を制御することが知られている.

そこで, FGF 刺激による FRS2-MAPK 経路の活性化を詳しく調べるために, FGFR3 と FGFR2 のチロシンリン酸化を解析した. DJM1 細胞, DJM1-IIIc 細胞は内在性の FGFR3b を発現しているため, 抗 FGFR3 抗体によって細胞溶解液を免疫沈降した後, 同じ抗体で検出すると 130 kDa と 120

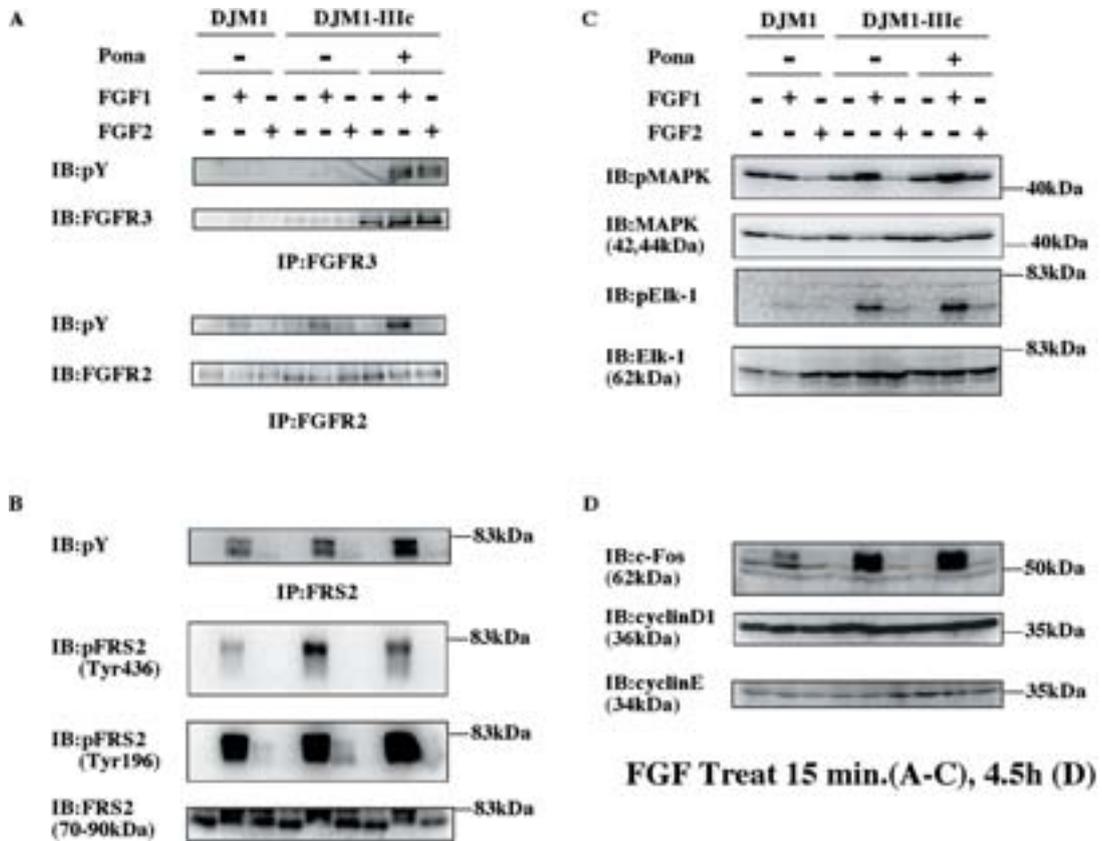


図7 FGFによるRas-MAPK経路の活性化

100 mm 組織培養皿に DJM1 細胞は 7×10^5 個/10 ml 10% FBS-DMEM, DJM1-IIIc 細胞は 1.0×10^6 個/10 ml で播種し, 37°C , 5% CO_2 の条件下で 3 日間培養した. 1% BSA-DMEM 2 ml で 2 回洗浄し, 5 ml の 1% BSA-DMEM に置換した後, $5 \mu\text{M}$ Ponasterone A を添加 (Pona+) または非添加 (Pona-) し, 16 時間培養することによって FGFR3c の発現を誘導した. FGF 刺激 (A-C; 15 min. D; 4.5 h.), タンパク質を回収した後, DC プロテインアッセイでタンパク質濃度を定量し, SDS-PAGE, ウェスタンブロットティングによって特定のタンパク質を検出した. A. FGF で 15 分間刺激した後, 細胞溶解液を調製し, 抗 FGFR3 抗体および抗 FGFR2 抗体によって免疫沈降反応 (IP) を行った. 4G10 と p-Tyr-100 抗体を用い, それぞれのチロシンリン酸化を解析した (IB: pY). B. FGF で 15 分間刺激した後, 細胞溶解液を調製し, 記載された抗体を用いて FRS2 のチロシンリン酸化 (IB: pY, pFRS2Tyr436, pFRS2Tyr196) を検出した. C. FGF で 15 分間刺激したタンパク溶解液を調製し, 記載された抗体を用いて MAPK や Elk-1 のチロシンリン酸化を解析した. D. FGF で 4.5 時間刺激した後, 細胞溶解液を調製し, 記載された抗体を用いて c-Fos, cyclin D1, cyclin E のタンパク質発現を解析した.

kDa のバンドが Pona-培養系でも検出された. しかし, DJM1-IIIc 細胞では Pona+ で, FGFR3c の発現が誘導され 130 kDa と 120 kDa のバンドが濃くなっていた (図 7A, IB: FGFR3). 次に, FGF 刺激による FGFR3 のチロシンリン酸化を調べた. DJM1 細胞と DJM1-IIIc 細胞 (Pona-) でも FGF1 刺激によって, FGFR3b のチロシンリン酸化が弱く認められた (図 7A, IP: FGFR3, IB: pY). しかし, FGF2 刺激によっては, FGFR3b のチロシンリン酸化は認められなかった. Ponasterone A によって FGFR3c タンパク質を発現させた DJM1-IIIc 細胞 (Pona+) においては, FGF1 および

FGF2 刺激による FGFR3c のチロシンリン酸化が見られた。

DJM1 細胞と DJM1-IIIc 細胞は内在性の FGFR2b (120 kDa) も発現している (図 7A, IB: FGFR2)。FGF1 は FGFR2b のチロシンリン酸化を引き起こしたが、FGF2 ではされなかった (図 7A, IP: FGFR2, IB: FGFR2)。

次に FGFR のドッキングタンパク質である FRS2 のリン酸化を検討した。FRS2 にはチロシンやスレオニンがリン酸化される部位があり、特に Tyr196 のリン酸化は Grb2 と、Tyr436 のリン酸化は Shp2 との結合に関与し [5]、MAPK の長時間活性化に重要な役割を果たしている [26]。そこで、細胞溶解液を抗 FRS2 抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロットで FGF 刺激による FRS2 のチロシンリン酸化を抗チロシンリン酸抗体 (IB: pY)、またチロシンリン酸化部位特異的抗体 (IB: pFRS2 tyr436, tyr196) を用いて確かめた。しかし、FGFR3c タンパク質を発現させた DJM1-IIIc 細胞 (Pona+) において、FGF1 刺激では FRS2 のチロシンリン酸化を引き起こすが、FGF2 では引き起こさないことが分かった (図 7B)。また DJM1 細胞と DJM1-IIIc 細胞 (Pona+および-) を、FGF1 または FGF2 で刺激しても同様だった (図 7B)。

FGF 刺激によりチロシンリン酸化された FRS2 は Grb2 や Shp2 を介して Sos を活性化し、その結果 Ras/Raf/MAPK カスケードを活性化する。活性化された MAPK は、細胞質から核内に移行し Elk-1 をはじめとする様々な転写因子のリン酸化を介して遺伝子発現を誘導する [25]。そこで、MAPK の活性化 (リン酸化) と Elk-1 のリン酸化を調べたところ、FGF1 は一貫して MAPK 経路を活性化し (図 7C, IB: pMAPK)、Elk-1 のリン酸化を引き起こすが、FGF2 ではしないことが分かった (図 7C, IB: pELk-1)。これらの結果は、DJM1 細胞では FGF1 刺激によって内在性の FGFR2b または FGFR3b の活性化が起こり、FRS2 のチロシンリン酸化、さらにその下流である MAPK 経路が活性化されることを説明できる。しかし、FGF2 は、FGFR3c が発現している、していないに関わらず、FRS2 のリン酸化を誘導することが出来ず、従って MAPK の活性化も誘導しなかった。

さらに、転写因子である c-Fos の発現が FGF 刺激によって誘導されるか調べた。c-fos は FGF シグナルでわずか数分以内に転写が一過性に活性化される前初期遺伝子群 (immediate early genes) の一つであり、Jun や Fos タンパク質は G₀ 期の細胞が増殖因子の刺激により G₁ 期そして S 期へと移行する際に誘導され、細胞複製の開始に関わっていることが知られている [27]。FGF1 は全ての細胞において c-Fos の発現を誘導するが、FGF2 はしないことが分かった (図 7D)。

cyclin D1 と cyclin E はサイクリン依存性プロテインキナーゼの活性化因子として G₁ チェックポイントで重要な働きをしており、これらのタンパク質が発現されると増殖において正の調節をすることが知られている [28, 29]。さらに、cyclin D1 は癌細胞において過剰発現している場合が多いことも報告されている [30-32]。DJM1 細胞では、FGF 刺激の有無に関わらずその発現が誘導されていることを検出した。従って、cyclin D1 と cyclin E は DJM1 細胞において、恒常的に発現が誘導されていることが分かった (図 7D)。

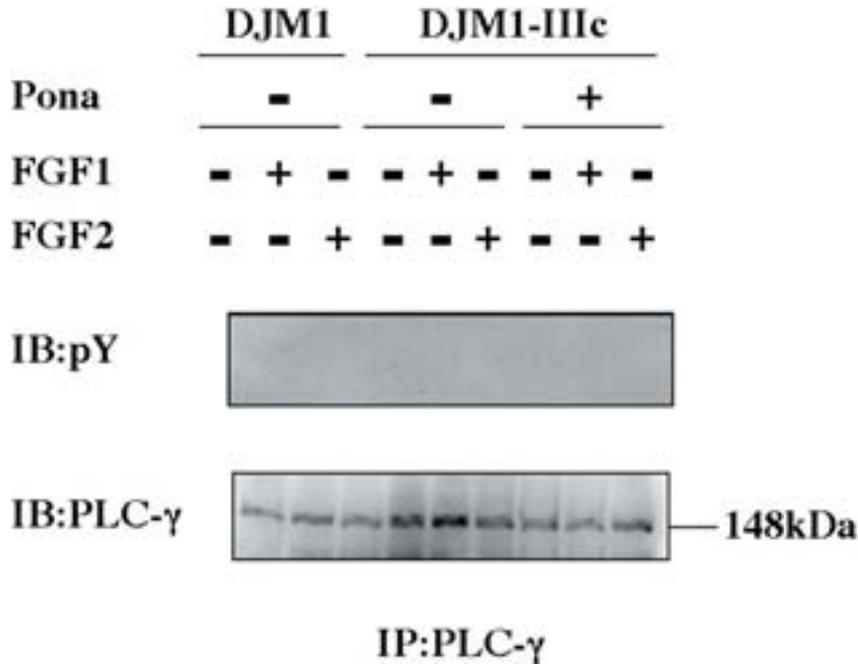


図8 FGF シグナル伝達における PLC-γ 経路の関与

100 mm 組織培養皿に DJM1 細胞は 7×10^5 個/10 ml 10% FBS-DMEM, DJM1-IIIc 細胞は 1.0×10^6 個/10 ml で播種し, 37°C, 5% CO₂ の条件下で 3 日間培養した. 1% BSA-DMEM 2 ml で 2 回洗浄し, 5 ml の 1% BSA-DMEM に置換した後, 5 μM Ponasterone A を添加 (Pona+) または非添加 (Pona-) し, 16 時間培養することによって FGFR3c の発現を誘導した. 15 分間 FGF 刺激した後, タンパク質を回収し, DC プロテインアッセイでタンパク質濃度を定量した. 抗 PLC-γ 抗体によって免疫沈降反応 (IP) を行った. SDS-PAGE, ウェスタンブロットティングによって 4G10 と p-Tyr-100 抗体を用い, PLC-γ のチロシンリン酸化 (IB: pY) を解析した.

4.7 FGF シグナル伝達における PLC-γ 経路の関与

FGFR1 は, レセプターの 766 番目のチロシンリン酸化がホスホリパーゼ C-γ (PLC-γ) を活性化し, 癌の悪性化に寄与していることが報告されている [33]. そこで, FGFR3c でも同様なことが起きているか調べた. しかし, FGF1 および FGF2 刺激は, FGFR3c タンパク質を発現させた DJM1-IIIc 細胞 (Pona+) において PLC-γ のリン酸化を誘導しなかった. また DJM1 細胞, DJM1-IIIc 細胞 (Pona-) における, FGF1 および FGF2 刺激によってもリン酸化は誘導されなかった (図 8). 以上の結果から FGFR3c を介するシグナル伝達経路は, PLC-γ を介していないことが分かった.

5. 考 察

当研究室のこれまでの研究によって, ヒトの食道癌患者の癌部位およびその周辺正常部位における FGFR3 の RNA レベルでの発現を調べたところ, FGFR3b は癌および正常部位ともに発現している

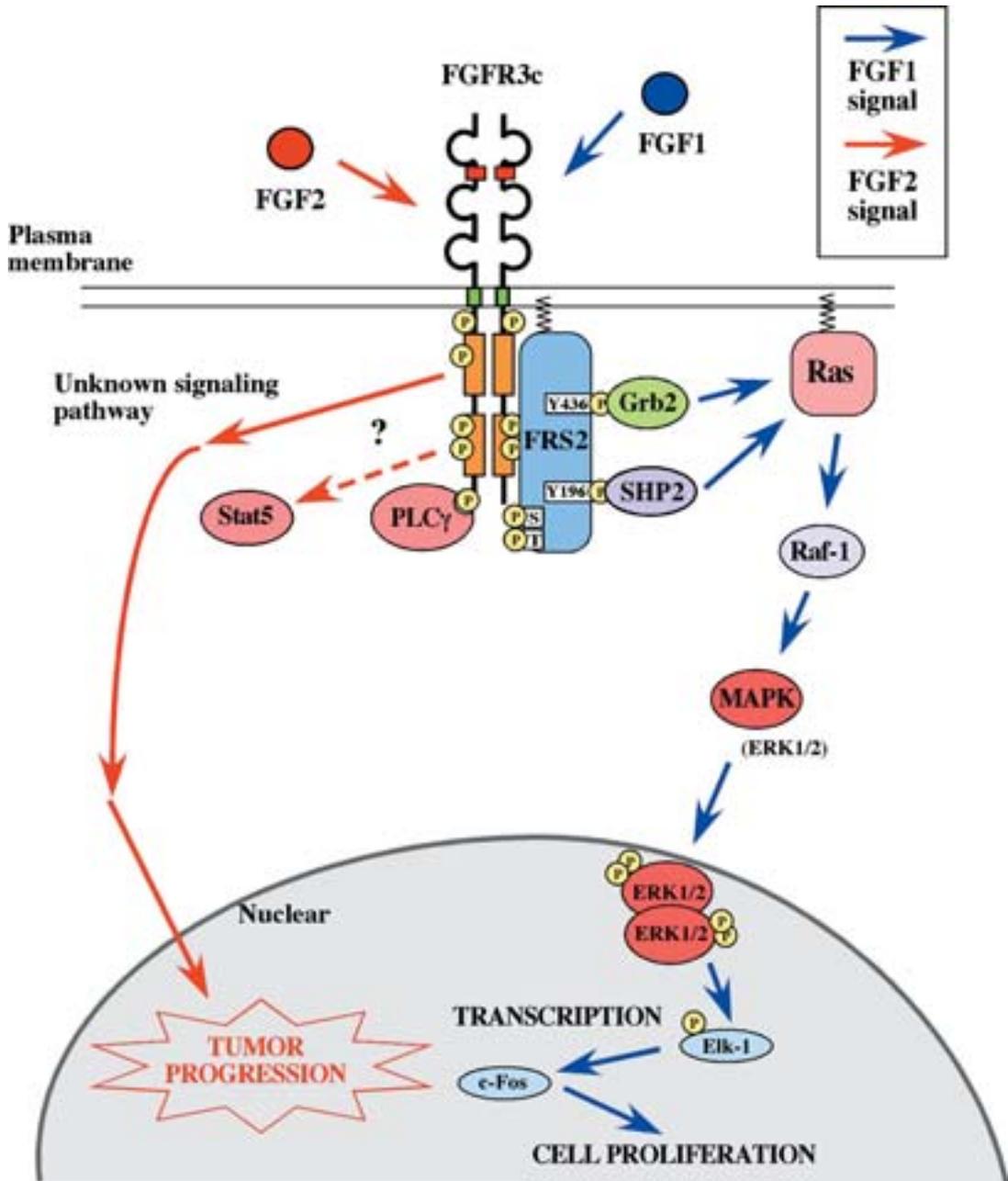


図9 FGFR3c 活性化による未知のシグナル経路を介した癌の悪性化

FGF1 は FGFR2b や FGFR3b を活性化し、FRS2 のリン酸化を促進する。リン酸化 FRS2 を足場として Grb2 や Shp2 などの細胞内シグナル伝達分子がリクルートされ、Ras, Raf, MAPK が次々と活性化されて、核内の Elk-1 やその他の転写因子をリン酸化する。その結果、c-Fos やその他のタンパク質が合成され、細胞増殖を促進する。ところが、FGFR3c を発現した DJM1-IIIc 細胞では、FGF2 刺激によって FGFR3c のチロシンリン酸化は起こったが、FRS2 のリン酸化や MAPK の活性化は誘導されなかった。FGF2/FGFR3c は今までに知られていないシグナル伝達経路を介して細胞増殖・癌の悪性化を促進すると考えられる。

事が示された。それに対し FGFR3c については正常部位ではあまり発現が確認出来なかったが、癌部位に高頻度で発現していることが示された [21]。この結果は、食道癌において FGFR3c が癌の悪性化に寄与していることを示唆するものとなった。上皮細胞が癌化し、悪性化する過程で間葉系細胞の性質を発現するようになることが知られている（上皮-間葉遷移）。FGFR mRNA のスプライシングは組織特異的に起こり、通常正常な上皮細胞では、IIIb エクソンが選択され、その結果 FGFR3b が発現する [8]。また、正常な間葉系細胞では IIIc エクソンが選択され、FGFR3c が発現している [9]。しかし、佐藤らの研究によって、食道癌においても、間葉系細胞の持つ遺伝子発現が起こり、通常は発現していない FGFR3c が発現するようになったことが示された。

本研究において FGFR3c の発現がヒトの上皮癌の発癌過程また癌悪性化に果たす役割を調べるために、ヒト皮膚由来扁平上皮癌である DJM1 細胞を用いた。DJM1 細胞は FGFR3c を発現していない細胞のため、その発現の役割を解析し易い利点がある。エクダイソン誘導発現ベクターシステムを用いて DJM1 細胞に FGFR3c を遺伝子導入し、FGFR3c タンパク質の発現を Ponasterone A 濃度依存的な方法で誘導発現した。Ponasterone A 濃度依存的に FGFR3c を発現する安定発現クローン細胞を樹立することが出来たので、FGFR3c 発現時の細胞増殖に変化があるか調べた。

FGFR のリガンド特異性の研究により、FGFR の細胞外領域に位置する三番目の Ig ドメイン IgIIIb, IgIIIc の違いにより異なる FGF 感受性を示すことが知られている [10-12]。FGF1 は FGFR3b, FGFR3c とともに親和性を示すが、FGF2 は FGFR3c のみ親和性があることが示されており [10-12]、FGFR3c を発現した DJM1-IIIc 細胞では、FGF2 刺激によって細胞増殖が亢進することが予想された。

足場依存的な細胞増殖では、DJM1-IIIc 細胞を FGF1 刺激することによりその増殖は促進されるものの、FGFR3c 発現誘導による差は見られなかった。一方、FGF2 刺激では、FGFR3c 発現により大きく増殖が促進されることがわかった。これは FGFR3c のリガンド特異性から考えて、予想通りの結果となった (図4)。

次に、ソフトアガー中の足場非依存的細胞増殖においても FGFR3c を発現した DJM1-IIIc 細胞は FGF2 刺激によって増殖を亢進するか調べた。通常、細胞が増殖するためには基底膜や隣接した細胞のように足場になるものを必要とし、足場のない状態に細胞をおくと、正常な細胞は増殖できない。しかし癌細胞の場合、足場非依存的に増殖できる能力を獲得するようになる。そこで FGFR3c 発現による足場非依存的な増殖を調べるために、ソフトアガー中でのコロニーフォーメーションアッセイを行った。FGF1 刺激では FGFR3c 発現により僅かにコロニー形成が抑制された。一方、FGF2 刺激では FGFR3c 発現により非常に高いコロニー形成率を示した (図5A)。さらに位相差顕微鏡を用いた観察では、FGFR3c を発現している細胞を FGF2 刺激すると、他のすべての場合に比べて明らかにコロニーのサイズが増大した (図5B)。これらの結果より、DJM1-IIIc 細胞における FGFR3c 発現は、癌の悪性化に寄与していることが示された。

次に、FGFR3c を発現させた DJM1-IIIc 細胞における、増殖促進や癌悪性化の性質を亢進するメ

カニズムを調べるために、FGF1 と FGF2 刺激による細胞内シグナル伝達を調べた。FGF 刺激による FGFR の活性化はその下流の様々なシグナル伝達分子群を活性化するが、なかでも MAPK は FGF シグナルにおいて非常に重要な働きをしていると考えられている。MAPK は外界からの様々な刺激に応答して活性化されるプロテインキナーゼであり、細胞外からのシグナルを核に伝達し、遺伝子発現を調節することで、細胞増殖、分化、アポトーシスなどの細胞応答を制御する [24, 25]。FGF と結合した FGFR は、細胞膜上で二量体化し、自己リン酸化される。チロシンリン酸化された FGFR は活性化され、ドッキングタンパク質である FRS2 をリン酸化し、それに結合した Grb2・Sos 複合体を介して低分子量 G タンパク質 Ras を活性化する [4]。Ras はセリン/トレオニンキナーゼ Raf を活性化し、MAPK カスケードを活性化する。

そこで、FGF 刺激による Ras-MAPK 経路の活性化を詳しく調べるために、まず FGFR3 と FGFR2 のチロシンリン酸化を検討した。Ponasterone A によって FGFR3c タンパク質を発現させた DJM1-IIIc 細胞において、FGF1 および FGF2 による FGFR3c のチロシンリン酸化が見られた。DJM1-IIIc 細胞は上皮細胞由来の癌細胞であるため内在性の FGFR2b と FGFR3b を発現している。FGF1 は FGFR2b と FGFR3b のチロシンリン酸化を引き起こしたが、FGF2 では FGFR3c を発現した時のみ、チロシンリン酸化を引き起こした (図 7A)。この結果は、BaF3 細胞を用いて Chellaiah と Ornitz らが以前報告したように、FGFR2b と FGFR3b は FGF1 によって強く活性化されるが、FGFR3c は FGF2 により強く活性化されるという結果と一致した [10-12]。

次に、FGFR のドッキングタンパク質である FRS2 のリン酸化を検討した。FRS2 にはチロシンやスレオニンがリン酸化される部位があり、特に Tyr196 のリン酸化はアダプタータンパク質である Grb2 と、Tyr436 のリン酸化はチロシンホスファターゼでもありアダプタータンパク質である Shp2 との結合に関与することが知られている [5]。これらのタンパク質が、チロシンリン酸化された FRS2 に結合することにより、Sos を活性化し、さらに下流のシグナル伝達経路 Ras/Raf/MAPK カスケードを活性化する。FGFR3c タンパク質を発現させた DJM1-IIIc 細胞において、FGF1 刺激では FRS2 のチロシンリン酸化を引き起こすが、FGF2 では FRS2 のチロシンリン酸化は認められなかった (図 7B)。さらに、FGF1 は DJM1 細胞と DJM1-IIIc 細胞 (Pona+および-) で MAPK 経路を活性化し、下流の転写因子である Elk-1 のリン酸化を引き起こしたが、FGF2 では MAPK 経路を活性化せず、したがって Elk-1 のリン酸化も認められなかった。以上の結果から、FGF1 によってチロシンリン酸化され活性化される FGFR2b または FGFR3b は細胞内の FRS2 をチロシンリン酸化して下流の MAPK カスケードを活性化することが出来るが、FGF2 によっては、FGFR2b と FGFR3b は活性化されないことが示された。一方、Ponasterone A によって誘導された FGFR3c は、FGF1 および FGF2 のどちらでも活性化されていたが、FGF2 によって FGFR3c のみが活性化された場合は、FRS2 のチロシンリン酸化を誘導せず、したがって MAPK の活性化も誘導することは出来なかった。さらにこのことは、活性化された FGFR3c は FGFR2b とのヘテロ二量体を形成することは出来ないことを示唆している。

細胞外からの増殖シグナルを伝える Ras や Raf は癌遺伝子であり、これらの活性型変異は細胞のがん化過程または悪性化過程において重要な役割を果たしている [34, 35]. ヒトの自然発症がんには約20%の高率で *ras* の点突然変異が発見される. Ras や Raf が活性化されると、その下流である MAPK 経路が活性化され、細胞の増殖スイッチを ON にするために必要な転写因子を直接リン酸化し、遺伝子発現を調節する [36]. しかし、本研究によって FGF1 は Ras/Raf/MAPK を活性化するが、FGF2 はこの経路を活性化せずに、DJM1 細胞の足場依存的増殖と足場非依存的増殖を強く促進することが示された.

c-Fos は FGF シグナルでわずか数分以内に転写が一過性に活性化される前初期遺伝子群 (immediate early genes) の一つであり、Jun や Fos タンパク質は G_0 期の細胞が増殖因子の刺激により G_1 期そして S 期へと移行する際に誘導され、細胞複製の開始に関わっている [27]. しかし、FGF1 は転写因子である *c-Fos* の発現を誘導するが、FGF2 は誘導しないことが分かった (図 7D). したがって、FGF2 による DJM1 細胞の増殖促進には Fos タンパク質は関わっていないと考えられた.

FGFR シグナルの阻害は cyclin D のダウンレギュレーションを通じて乳癌細胞の増殖を阻害することが報告されている [30]. cyclin D1 と cyclin E は G_1 チェックポイントで重要な働きをしており、そのタンパク質が発現されると増殖において正の調節をすることが知られている [28, 29]. しかし、DJM1 細胞では FGF 刺激の有無に関わらず恒常的に cyclin D1 と cyclin E の発現が誘導されていることが分かった (図 7D). cyclin D1 と cyclin E の恒常的発現は、多くの癌で見られており、細胞周期を制御する機構に何らかの欠損が生じたためであると考えられている [31, 32].

マウス前立腺において、癌化すると正常な前立腺上皮細胞で発現している FGFR2b の発現が低下し、そのかわり FGFR1c の発現が上昇することが報告されている [19]. FGFR2b は前立腺上皮細胞の増殖を抑制し分化を促進するが、その発現停止は増殖抑制を解除すると考えられる. さらに癌化すると発現する FGFR1c は増殖シグナルを伝達し、細胞増殖を促進させる. FGFR1c の Tyr766 がリン酸化することにより、PLC- γ がリクルートされ、その下流シグナルが癌の悪性化に関わっているのではないかと推測されている [23]. PLC- γ には 2 つの SH2 ドメインが存在し、受容体型チロシンキナーゼの自己リン酸化部位やドッキングタンパク質のチロシンリン酸化部位にリクルートされることでリン脂質の豊富な細胞膜近傍で機能し、下流のホスファチジルイノシトール応答経路と PKC を活性化する. 本研究においても FGFR3c 発現によって、PLC- γ を介したシグナル経路が活性化されているのではないかと予想し、PLC- γ のリン酸化を検出した (図 8). しかし FGFR3c タンパク質を発現させた DJM1-IIIc 細胞において、FGF1 および FGF2 刺激は PLC- γ のリン酸化を誘導しなかった. DJM1 細胞において、FGF1 および FGF2 刺激ともに PLC- γ を介したシグナル経路は活性化されることが分かった.

これらをまとめると、FGFR3c タンパク質を発現させた DJM1-IIIc 細胞は、FGF2 刺激によって Ras-MAPK 経路を活性化せず、足場依存的な細胞増殖および足場非依存的増殖を促進していることがわかった. 図 6 に示したように、FGF1 または FGF2 刺激による全細胞内タンパク質のチロシンリ

ン酸化には、ほとんど違いは認められなかった。では、FGF2はFGFR3cの活性化を介してRas-MAPK経路以外のどのシグナル伝達経路を活性化しているのであろうか。

間葉系の細胞（繊維芽細胞）を用いて、様々な活性化型点変異体FGFR3のがん化能やSTAT活性化、PI3K活性化に関与するFGFR3のチロシン残基の同定が試みられた[37]。この細胞では、STAT5を介したシグナル経路を通じて癌化シグナルを伝えていることが示唆されている[38,39]。また新規のFGFR1(FGFR-1L)がヒト胎盤から見つかり、FGF2刺激によってFGFR1ではFRS2をリン酸化するが、FGFR-1LではFRS2をリン酸化しないことが示され、Ras-MAPK経路以外の増殖促進経路の存在が示唆された[40]。この結果は、本研究においてFGF1はFRS2をリン酸化したが、FGF2はリン酸化しないという結果と同じことが言えそうである。

上皮癌におけるFGF1とFGF2シグナルは癌の成長や運動性(転移)に関わっている[41]。また、FGF2は浸潤性のヒト食道扁平上皮癌において高発現しており[22]、ヒト膵臓癌患者においてはFGF2を発現していると予後が悪いことが知られている[23]。本研究の結果とあわせて考えると、ヒト上皮癌細胞におけるFGFR3cの異所性発現とFGF2の発現は、FGF2の血管新生能力やFGFR3c発現によるFGF2オートクライン、パラクラインによる癌細胞の増殖など、癌にとって生存有利な環境を形成し、癌悪性化において重要な役割を果たしているかもしれない。さらにこれらの発見は、FGFR3cとFGF2が今まで知られていないシグナル経路を通じて悪性化シグナルを伝えていることを示唆している。今まで報告されてきたFGFR3による細胞がん化シグナルの研究は、白血病細胞や繊維芽細胞におけるものであり、上皮癌細胞における報告は本研究が初めてである。肺癌では3割が上皮癌由来であり、子宮癌の組織型においては、扁平上皮癌の割合が8割以上である。これらのことから、本研究は上皮癌におけるシグナル伝達研究に貴重な知見を提供していると考えられる。現在、FGF2により活性化されるFGFR3cを介したシグナル伝達カスケードの解明へ向けた研究を行っている。

参 考 文 献

- [1] Johnson, D. E., and Williams, L. T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60, 1-41.
- [2] Powers, C. J., McLeskey, S. W., and Wellstein, A. (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 7, 165-197.
- [3] Kanai, M., Goke, M., Tsunekawa, S., and Podolsky, D. K. (1997) Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 272, 6621-6628.
- [4] Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89, 693-702.
- [5] Lax, I., Wong, A., Lamothe, B., Lee, A., Frost, A., Hawes, J., and Schlessinger, J. (2002) The docking

- protein FRS2alpha controls a MAP kinase-mediated negative feedback mechanism for signaling by FGF receptors. *Mol. Cell* 10, 709-719.
- [6] Johnson, D. E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., and Williams, L. T. (1991) The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4627-4634.
- [7] Orr-Urtreger, A., Bedford, M. T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Givol, D., and Lonai, P. (1993) Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev. Biol.* 158, 475-486.
- [8] Murgue, B., Tsunekawa, S., Rosenberg, I., deBeaumont, M., and Podolsky, D. K. (1994) Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3 IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res.* 54, 5206-5211.
- [9] Wuechner, C., Nordqvist, A. C., Winterpacht, A., Zabel, B., and Schalling, M. (1996) Developmental expression of splicing variants of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) in mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 1185-1188.
- [10] Ornitz, D. M., and Leder, P. (1992) Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J. Biol. Chem.* 267, 16305-16311.
- [11] Chellaiah, A. T., McEwen, D. G., Werner, S., Xu, J., and Ornitz, D. M. (1994) Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J. Biol. Chem.* 269, 11620-11627.
- [12] Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M. (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* 271, 15292-15297.
- [13] Werner, S., Duan, D. S., de Vries, C., Peters, K. G., Johnson, D. E., and Williams, L. T. (1992) Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol. Cell. Biol.* 12, 82-88.
- [14] Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J. P., and Radvanyi, F. (1999) Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat. Genet.* 23, 18-20.
- [15] Jang, J. H., Shin, K. H., and Park, J. G. (2001) Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res.* 61, 3541-3543.
- [16] Shotelersuk, V., Ittiwut, C., Shotelersuk, K., Triratanachat, S., Poovorawan, Y., and Mutirangura, A. (2001) Fibroblast growth factor receptor 3 S249C mutation in virus associated squamous cell carcinomas. *Oncol. Rep.* 8, 1301-1304.
- [17] Rieger-Christ, K. M., Mourtzinis, A., Lee, P. J., Zagha, R. M., Cain, J., Silverman, M., Libertino, J. A., and Summerhayes, I. C. (2003) Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. *Cancer* 98, 737-744.
- [18] Richelda, R., Ronchetti, D., Baldini, L., Cro, L., Viggiano, L., Marzella, R., Rocchi, M., Otsuki, T., Lombardi, L., Maiolo, A. T., and Neri, A. (1997) A novel chromosomal translocation t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood* 90, 4062-4070.
- [19] Feng, S., Wang, F., Matsubara, A., Kan, M., and McKeehan, W. L. (1997) Fibroblast growth factor re-

- ceptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 57, 5369-5378.
- [20] Kornmann, M., Ishiwata, T., Matsuda, K., Lopez, M. E., Fukahi, K., Asano, G., Beger, H. G., and Korc, M. (2002) IIIc isoform of fibroblast growth factor receptor 1 is overexpressed in human pancreatic cancer and enhances tumorigenicity of hamster ductal cells. *Gastroenterology* 123, 301-313.
- [21] 佐藤信洋 (2003) 消化器系癌における FGFR3 アイソフォームの発現と可溶性 FGF レセプターの構造解析 京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻修士論文.
- [22] Kitadai, Y., Onogawa, S., Kuwai, T., Matsumura, S., Hamada, H., Ito, M., Tanaka, S., Yoshihara, M., and Chayama, K. (2004) Angiogenic switch occurs during the precancerous stage of human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 11, 315-319.
- [23] Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M., Beger, H. G., Uchida, E., Onda, M., Kobrin, M. S., and Korc, M. (1993) Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res.* 53, 5289-5296.
- [24] Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., and Yancopoulos, G. D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.
- [25] Davis, R. J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 14553-14556.
- [26] Shimizu, A. (2002) Studies on Two Alternatively Spliced Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Isoforms 京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻博士論文.
- [27] Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S. (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64, 281-302.
- [28] Sherr, C. J. (1993) Mammalian G1 Cyclins. *Cell* 18, 1059-1065.
- [29] Sherr, C. J. (1995) D-type cyclins. *Trends Biol. Sci.* 20, 187-190.
- [30] Koziczak, M., Holbro, T., and Hynes, N. E. (2004) Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. *Oncogene* 23, 3501-3508.
- [31] Porter, P. L., Malone, K. E., Heagerty, P. J., Alexander, G. M., Gatti, L. A., Firpo, E. J., Daling, J. R., and Roberts, J. M. (1997) Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat. Med.* 3, 222-225.
- [32] Peters, G. (1994) The D-type cyclins and their role in tumorigenesis. *J. Cell. Sci. Suppl.* 18, 89-96.
- [33] Wang, F., McKeenan, K., Yu, C., and McKeenan, W. L. (2002) Fibroblast growth factor receptor 1 phosphotyrosine 766: molecular target for prevention of progression of prostate tumors to malignancy. *Cancer Res.* 62, 1898-1903.
- [34] McCormick, F. (1989) ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* 56, 5-8.
- [35] Fujioka, H., Kaibuchi, K., Kishi, K., Yamamoto, T., Kawamura, M., Sakoda, T., Mizuno, T., and Takai, Y. (1992) Transforming and c-fos promoter/enhancer-stimulating activities of a stimulatory GDP/GTP exchange protein for small GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 926-930.
- [36] Rapp, U. R. (1991) Role of Raf-1 serine/threonine protein kinase in growth factor signal transduction. *Oncogene* 6, 495-500.

- [37] Hart, K. C., Robertson, S. C., and Donoghue, D. J. (2001) Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Mol Biol Cell* 12, 931-942.
- [38] Kong, M., Wang, C. S., and Donoghue, D. J. (2002) Interaction of fibroblast growth factor receptor 3 and the adapter protein SH2-B. A role in STAT5 activation. *J. Biol. Chem.* 277, 15962-15970.
- [39] Meyer, A. N., Gastwirt, R. F., Schlaepfer, D. D., and Donoghue, D. J. (2004) The cytoplasmic tyrosine kinase Pyk2 as a novel effector of fibroblast growth factor receptor 3 activation. *J. Biol. Chem.* 279, 28450-28457.
- [40] Lopez, M. E., and Korc, M. (2000) A novel type I fibroblast growth factor receptor activates mitogenic signaling in the absence of detectable tyrosine phosphorylation of FRS2. *J. Biol. Chem.* 275, 15933-15939.
- [41] Billottet, C., Elkhatib, N., Thiery, J. P., and Jouanneau, J. (2004) Targets of fibroblast growth factor 1 (FGF-1) and FGF-2 signaling involved in the invasive and tumorigenic behavior of carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 4725-4734.

Fibroblast Growth Factor Receptor 3 induces Tumor Growth Through MAPK (ERK)-independent Signal Transduction Pathways in Skin Epithelial Cancer Cells.

Chikara ONISHI¹, Nobuhiro UENO², Michiyuki KANAI³, Motoki TERADA⁴, Akio SHIMIZU⁵, Misuzu SEO¹ (¹ Department of Biotechnology, Kyoto Sangyou University, Kamigamo-Motoyama, Kita-ku, kyoto 603-8555, Japan, ² AnGes MG, Inc., Saito-asagi 7-7-15, Ibaraki, Osaka 567-0085 Japan, ³ Department of Surgery, Kitano Medical Research Inst and Hospital, 2-4-20 Oogimachi, Kita-ku, Osaka, 530-0025, Japan, ⁴ Department of Biological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyoto, University, kyoto 606-8501, Japan, ⁵ Vascular Biology Program, Children's Hospital Boston and Harvard Medical School, 1 Blackfan cricle, Boston, MA02115, U. S. A.)

SUMMARY

The overexpression of FGFR3 induces cellular transformation. The expression of FGFR3c, which is one of alternatively spliced isoforms of FGFR3, is increased in human epithelial cancers. However, the underlying mechanism of the tumor progression by FGFR3c signaling in epithelial cancer has been poorly understood. In this study, we investigated the role and signal transduction of FGFR3c in epithelial cancer cells. We show that the ecdysone-inducible expression of FGFR3c in human squamous cell carcinoma cells greatly enhanced anchorage-dependent and -independent growth in response to FGF2. These results suggest that the misexpression of FGFR3c has the potential to enhance a malignant progression in epithelial cancers by FGF2 in an autocrine or paracrine manner.

Next, we analyzed the relationship between malignant characteristics, activation of cell signaling pathways, and the overexpression of FGFR3c using an ecdysone-inducible system. In FGFR3c-expressing DJM1 cells, FGF1 activates mitogenic signaling in the presence of Ras-MAPK pathway, whereas FGF2 activates in the absence of a detectable Ras-MAPK pathway. FGF1 enhanced phosphorylation of FRS2, MAPK (ERK1/2) and Elk-1 and increased the transcription factor c-Fos protein, whereas FGF2 did not. These findings indicate that FGF2 stimulated FGFR3c and is capable of malignant signaling, which does not converge with classical FRS2-Ras / MAPK signaling. The signaling pathway of the enhanced responsiveness to FGF2 in DJM1-IIIc cells expressing FGFR3c is unknown at this time, but it does not appear to be mediated by the MAPK (ERK1/2). These findings provide an insight into the mechanism by which FGFR3 contributes to tumor progression of epithelial cancer and a basis for the development of cancer therapies.