

# 大腸がん患者オルガノイドを用いた FGFR3IIIc シグナルの抑制と抗がん剤耐性の克服

瀬尾美鈴\*,\*\*\*  
 中元 萌\*  
 福光 一生\*  
 奥知慶久\*\*  
 上田修吾\*\*  
 上野信洋\*\*\*

## 要 旨

進行性大腸がんは標準治療薬である抗がん剤に薬剤耐性を獲得していることから、完治が難しい。我々は以前の大腸がん培養細胞を用いた研究から、大腸がんが抗がん剤耐性を獲得する原因の1つとして、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であるFGFR3IIIcの発現が上昇する可能性を提唱した。本研究では、大腸がん患者臨床検体からオルガノイドを作製し、標準治療薬であるフルオロウラシル (5-FU) に対する耐性とFGFR3IIIcの発現との関係を解析した。大腸がんオルガノイドの免疫組織染色によって、上皮系細胞マーカー上皮細胞接着因子 (EpCAM) 陽性、細胞増殖マーカー Ki67, がんマーカーがん胎児性抗原 (CEA) 陽性の細胞にFGFR3IIIcの発現が認められた。オルガノイドから抽出したmRNAを用いてRT-PCRによってFGFR3IIIcともう一つのアイソフォームFGFR3IIIbの発現を解析した。FGFR3IIIbとFGFR3IIIc発現のハウスキーピング遺伝子GAPDHに対する相対値と、それぞれのオルガノイドの5-FUに対する薬剤感受性IC50値との相関性を検証した。その結果、正常上皮に発現するFGFR3IIIbと5-FUに対するIC50値の関係は相関関数-0.481で負の値を示したが、大腸がん細胞に発現するFGFR3IIIcと5-FUに対するIC50値の関係は相関関数0.057で正の値を示した。これらの結果から、FGFR3IIIcの発現上昇と5-FUへの薬剤耐性獲得に関連が見られることが示唆された。

キーワード：線維芽細胞増殖因子受容体3IIIc, 大腸がんオルガノイド, 上皮細胞接着因子 (EpCAM) がん胎児性抗原 (CEA), 抗がん剤耐性, フルオロウラシル, ATP assay

\* 京都産業大学大学院、生命科学研究科、

\*\* 田附興風会北野病院、医学研究所、

\*\*\* 京都産業大学生命科学部

## 1. はじめに

日本において、悪性新生物（がん）は1981年以降、37年連続で日本人の死因の第一位であり、死亡総数の3割を占めている。2021年の部位別死亡率は、男性（全年齢）で肺がんに次いで、大腸がんは第二位、第三位胃がん、女性は、大腸がんが第一位、第二位肺がん、第三位膵臓がんである<sup>1</sup>。このことから、大腸がんの治療の進歩が社会的に強く求められている。大腸がんの治療は、基本的に内視鏡手術および外科手術が行われ、切除不能のがんや進行性大腸がんでは、化学療法や放射線療法による治療を行う<sup>2</sup>。近年は、患者のがんの原因となっている遺伝子（ゲノム）変異や増幅を調べて、その原因となる分子がわかり、それに対する分子標的薬が存在している場合は、その分子標的薬を個々の患者の治療に適用する個別化医療が進められている。2022年度版の大腸癌治療ガイドラインでは、対象となる症例は少ないが、MSI-H大腸癌やBRAF遺伝子異常大腸がんに対して有効な薬剤が承認された<sup>2</sup>。しかしながら、多くの大腸がん症例に対する新たな分子標的薬は未承認であるため、悪性化した大腸がんでは、既存の抗がん剤に対して耐性を獲得している場合が多い。したがって、個々の大腸がん患者の既存の抗がん剤に対する薬剤耐性について有用な分子マーカーの探索と新規分子標的薬の開発が重要となる。

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分子と結合し二量体を形成する。その結果、細胞内領域の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、細胞膜の内側に結合しているRASタンパク質を活性化する<sup>3</sup>。活性化されたRASタンパク質はMAPK経路の最初の酵素であるRAF（BRAF）を活性化することで、MAPK経路が活性化され、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の3番目の免疫グロブリン様ドメインの後半部分IIIbまたはIIIcをコードするエキソンが存在し、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ことで、FGFR3IIIcまたはFGFR3IIIbのどちらか一方が発現する<sup>4,5</sup>。FGFR3IIIcは間質細胞に発現し、FGFR3IIIbは正常上皮細胞に発現する。FGFR3IIIcの方が、FGFR3IIIbと比べて、FGF2やFGF9など炎症やがん部位で発現が上昇するFGFと結合できる。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か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<sup>6</sup>。

大腸がん患者の検体を用いたSonvillaらの研究<sup>7</sup>で、大腸がんの病期（ステージ）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報告された<sup>7</sup>。また、大腸がんのモデル細胞株SW480とHCT116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た<sup>7</sup>。

現在、大腸がん患者に対する化学療法は、フルオロウラシル（5-FU）を用いたFOLFOX治療やFOLFIRI治療などが標準治療として行われているが、転移性大腸がんでは、5-FUに対する耐性を

獲得していることが報告されている<sup>8</sup>。大腸がん細胞株 Caco2 を用いた我々の以前の研究によって、Caco2 細胞に間葉系タイプの FGFR3IIIc を発現させると、5-FU に対する IC50 値が約 30 倍高くなることを示した<sup>9</sup>。本研究では、この違いが、大腸がん患者由来の検体を用いた大腸がんオルガノイドでも得られるかを検証した。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<sup>9, 10, 11</sup>。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。本研究では、がんオルガノイド作製法として Cancer tissue-originated spheroids (CTOS) 法を用いた。この方法は、腫瘍組織からがん細胞のクラスターに分離しても、がん細胞間の細胞-細胞間接触を *in vitro* で維持することができるため、生存率を高く保ってがん幹細胞をスフェロイドとして効率よく回収できることが報告されている<sup>9</sup>。

本研究の目的は、大腸がん患者検体から大腸がんオルガノイドを作製し、FGFR3IIIc の発現が実際に大腸がん患者由来のがんオルガノイドで上昇しているかどうかを解析する。また、FGFR3IIIc の発現が抗がん剤 5-FU に対する耐性獲得と関連しているかを明らかにし、FGFR3 シグナル制御による個別化医療への可能性を追求することである。

## 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。手術説明時に研究内容を説明し、患者本人よりインフォームドコンセントを取得した。手術後の腫瘍組織の一部を京都産業大学に送った。

### 2.2 オルガノイド培養法（CTOS 法）

近藤らの Cancer tissue-originated spheroids (CTOS) 法<sup>9</sup>に従い、以前報告したように行なった<sup>8</sup>。

### 2.3 オルガノイドの免疫蛍光染色

24 well plate で培養したオルガノイドを、15 mL チューブに移し、1000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去し、PBS で懸濁したのちに遠心、PBS の除去を行い、MatriMix (511) (Nippi, 8999001) で懸濁した。オルガノイド懸濁液を Non coating 24 well plate (Iwaki, 1820-024) に 150  $\mu$ L 滴下し、37°C インキュベーターで 30 分以上培養し、ゲル化させた。500  $\mu$ L ずつ Stem Pro 培地を加え、培養した。培養後、O.C.T compound (SAKURA, 4583) 内に MatriMix を包埋した。ステンレス容器に液体窒素を入れ、イソペンタンが入った容器にステンレス容器を入れ、液体窒素の中に O.C.T compound を入れて凍結させた。クライオスタット (Leica 社) を用いて、16~20  $\mu$ m の切片を作製した。スライドガラスに作製した切片をのせ、4% パラホルムアルデヒドで 20 分固定した。

PBS で洗浄後, 0.2% Triton X-100 in Phosphate Buffer Solution (PBS) を加え, 1 時間反応し, 細胞を透過させた。3% Bovine Serum Albumin (BSA) /3% Horse serum を含む 1 × PBST で 1 時間ブロッキングした。3% BSA/3% Horse serum を含む 1 × TBST に一次抗体を加え, 試料に添加後 4°C で 48 時間インキュベートした。1 × PBST で 1 時間の洗浄を 3 回繰り返した後, 3% BSA/3% Horse serum を含む 1 × PBST に二次抗体を加え, 4°C で 48 時間インキュベートした。1 × PBST で 1 時間の洗浄を 3 回繰り返した後, 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, 1:1000) を含む封入剤 (DAKO) を添加し, カバーガラスを被せて封入した。

表 1 免疫組織染色に使用した抗体

## (A) 一次抗体

標的タンパク質	抗体	メーカー	Cat No.	希釈倍率
FGFR3IIIc	Rabbit polyclonal Anti-FGFR3IIIc 抗体	ヤマサ醤油	105	1/50
FGFR3IIIc	Mouse monoclonal Anti-FGFR3IIIc IgG	R&D	MAB7662	1/50
Ki-67 antigen	Mouse Monoclonal Anti-Human Ki-67	Dako	M7240	1/250
EpCAM	Rabbit mA EpCAM (D1B3)	*CS	#2626S	1/200
CEA	Anti-Carcino Embryonic Antigen CEA antibody[EPCEAR7]	Abcam	ab133633	1/250
DAPI	DAPI Nucleic Acid Stain	Invitrogen	D1306	1/1000

\*CS: Cell Signaling

## (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	Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A11008	1/100
Rabbit Ig	Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific	A21203	1/100
Mouse Ig	Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	Abcam	Ab150113	1/100
Mouse Ig	Anti-mouse IgG Alexa Fluor 594	Molecular Probes	A-11005	1/100

## 2.4 オルガノイドを用いた ATP assay

24 well plate に培養したオルガノイドを 15 mL チューブに回収し, 1000 rpm で 5 分遠心し, オルガノイドを集めた。上清を除去し, Tryple Express (Gibco, 12604-021) を 3 mL 加え, 37°C インキュベーターでオルガノイドの形が崩れるまで, 反応させた (2 分ごとにピペティングを行った)。Stem Pro 培地を 6 mL 加え, 1000 rpm で 5 分間遠心した。遠心後, 上清を捨て, 新たに 10 mL の Stem Pro 培地を 6 mL 加え, 1000 rpm, 5 分間遠心した。遠心後, 上清を捨て, 新たに 10 mL の

Stem pro 培地を加え、細胞をカウントした。1 well あたり  $1.0 \times 10^4$  cells になるように調製し、non coating 96 well plate (Iwaki, 1860-096) に播種した。5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37°C 24 時間培養後、5-FU を添加し、さらに 4 日間培養後、ATP assay を行った。データは n=3 で未処理の細胞を生存率 100% とし、相対値で評価を行った。

OptiPlate™-96 (PerkinElmer, 6005290) に培養したオルガノイドを培地ごと移し、working solution (株式会社同仁化学研究所, A550) を 100  $\mu$ L ずつ添加した。遮光し、室温で 2 分間振とうし、10 分間インキュベートした。Varioskan LUX (Thermo Scientific) で発光量を測定し、未処理の細胞の値を生存率 100% とし、相対値で評価を行った。

## 2.5 遺伝子発現解析

### 2.5.1 Total RNA 抽出

オルガノイドを 15 mL チューブに回収し、PBS で洗浄した。PBS を除去し、ISOGEN II を 1 mL 加えてホモジナイザーで細胞を溶解させ、2.0 mL チューブに回収した。0.4 mL の RNase free water を加え、攪拌した後、室温で 15 分静置した。12000 rpm で 15 分遠心した後、上清を 1.5 mL チューブに回収し、回収した量と同量のプロパノールを加えて攪拌後、室温で 10 分静置した。15000 rpm で 10 分遠心し上清を捨て、75% エタノールを 1 mL 加えて洗浄した。8000  $\times$  g で 3 分遠心後、エタノールを捨て 5 分間乾燥させた後、RNase free water を 50  $\mu$ L 加え、RNA を溶解させた。RNA 濃度を Nano drop 2000 (Thermo Scientific) を用いて測定した。

### 2.5.2 逆転写反応による cDNA の合成

RNase free dH<sub>2</sub>O に total RNA を加え、全量を 1  $\mu$ g /10  $\mu$ L とした。10 mM dNTP を 1  $\mu$ L, Random Hexamer, Oligo dT をそれぞれ 0.5  $\mu$ L ずつ加えたチューブに total RNA を 8  $\mu$ L 加え、65°C で 5 分変性させた。10  $\times$  RT buffer を 2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> を 4  $\mu$ L, 0.1 M DTT を 2  $\mu$ L, RNase out を 1  $\mu$ L 加えて混合し、Super Script II (Invitrogen, 11904-018) を 1  $\mu$ L 加え、42°C 2 分, 42°C 60 分, 70°C 15 分で逆転写を行い、4°C で保存した。

### 2.5.3 RT-PCR

cDNA を dH<sub>2</sub>O で段階希釈し、1/10, 1/100, 1/1000, 1/5000 の cDNA 希釈液を作製した。希釈した cDNA 10  $\mu$ L に Gotaq Green Master Mix (Promega) を 12.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ M Forward primer を 1.25  $\mu$ M, 10  $\mu$ M Reverse primer を 1.25  $\mu$ M 加え、C1000 Thermal Cycler (Bio Rad Cat.184-0048) で PCR 反応を行った。95°C, 60°C, 72°C の反応を 34 サイクル行った。その後、2% アガロースゲルを用いて Tris Acetate EDTA buffer (pH8.0) 中で電気泳動を行い、0.5  $\mu$ g/ml Ethidium Bromide 溶液中で DNA を染色し Image J を用いてバンドの濃さを測定し数値化した。

PCR で使用したプライマー

- ・ FGFR3IIIb Forward: 5'-CTGTCGAGCCACCAATTTTCATAGGC-3'
- ・ FGFR3IIIc Forward: 5'-CTTGCACAACGTCACCTTTGAG-3'
- ・ FGFR3 Reverse: 5'-GACAGGTCCTTGTCAGTGGCATC-3'
- ・ GAPDH Forward: 5'-AGTCAGCCGCATCTTCTTTTTCGCGTC-3'
- ・ GAPDH Reverse: 5'-AATCCGTTGACTCCGACCTTACCT-3'

### 3. 結果

#### 3.1 大腸がん患者検体からのオルガノイド作製

以前, 消化器系がん患者検体の 21 症例からオルガノイドの作製を検討したことを報告した (9, 10)。今回, 2021 年 4 月以降から 2022 年 11 月までに得られた大腸がん 19 検体を用いてオルガノイドを作製した (表 2)。オルガノイドが作製できたのは 19 例中 11 例であり, 成功率 58% であった。cc-29 は, オルガノイドを作製することができなかったが, 胃がんが大腸転移した腫瘍組織であった。以前の報告で, 本研究で用いた CTOS 法では, 胃がんを原発巣とする腫瘍からはオルガノイド作製にいまだ成功していない。表 2 には, 検体を取得した大腸がん患者のステージ, 大腸がん部位, 大腸がんドライバー遺伝子 KRAS/BRAF 変異についての検査結果を示した。KRAS/BRAF 変異は 6 例だった。

表 2 大腸がんオルガノイドの作製と 5-FU に対する IC50 値

検体	作製結果	TNM Stage	部位 (右 / 左)	5-FU IC50 (μM)	RAS/BRAF 変異体発現
cc-22	○	IIIb	左 (S 状結腸癌)	245.9	未測定
cc-23	×	IIIb	左 (S 状結腸癌)	-	未測定
cc-24	○	IIIb	右 (上行結腸癌)	-	未測定
cc-25	○	IVa	右 (上行結腸癌)	179.9	KRAS G12D/-
cc-26	×	IIa	左 (S 状結腸癌)	-	未測定
cc-27	×	IIIb	左 (下行結腸癌)	-	未測定
cc-28	○	IVc	左 (S 状結腸癌)		KRAS G12V/-
cc-29	×	—	胃癌の大腸転移	-	
cc-30	×	IIIb	左 (S 状結腸癌)	-	KRAS G12D/-
cc-31	○	IIa	左 (下行結腸癌)	414	未測定
cc-32	×	IIa	右 (上行結腸癌)	-	未測定
cc-33	○	IVa	右 (盲腸癌)	1819.2	KRAS G12V/-
cc-34	×	IIa	左 (S 状結腸癌)	-	未測定

cc-35	○	IVc	右 (盲腸癌)	1741.9	-/BRAF+
cc-36	○	IVb	左 (S 状結腸癌)	267.3	KRAS G12S/-
cc-37	×	IIa	右 (上行結腸癌)	-	未測定
cc-38	○	IIa	左 (RS 直腸癌)	255.5	未測定
cc-39	○	IIIb	左 (RS 直腸癌)	236.8	未測定
cc-40	○	IIIb	左 (S 状結腸癌)	-	未測定

2021.4.8 から 2022.11.08 までに大腸がん患者検体から作製したオルガノイド。

○: オルガノイド作製に成功した。×: オルガノイド作製に失敗した。

TMN Stage: 大腸がんの病期 (ステージ) を示した。IIa: 漿膜下層または腹膜被覆のない結腸あるいは直腸の周囲組織に浸潤する腫瘍。IIIb: リンパ節転移あり。遠隔転移なし。IVa:1 臓器に転移。IVb:2 臓器以上に転移, 腹膜転移。IVc: 虫垂癌, 腹膜転移以外の遠隔転移。IC50 ( $\mu\text{M}$ ): 作製したオルガノイドを用いて, ATP assay により 5-FU に対する IC50 値を求めた。RAS/BRAF:RAS 遺伝子または BRAF 遺伝子の活性型変異があるかを測定した。KRAS G12D, KRAS G12V, KRAS G12 S:KRAS の 12 番目のアミノ酸グリシン (G) がそれぞれアスパラギン酸 (D), バリン (V), セリン (S) に変異している活性型 KRAS。

### 3.2 オルガノイドを用いた 5-FU に対する感受性試験

現在, 大腸がん患者に対する化学療法は, 代謝拮抗剤であるフルオロウラシル (5-FU) を用いた FOLFOX 治療や FOLFIRI 治療などが標準治療として行われているが, 転移性大腸がんでは, すでに 5-FU に対する耐性を獲得していることが報告されている<sup>7</sup>。今回作製したオルガノイド (8 症例) を用いて, 5-FU に対する感受性の違いを ATP assay を用いて評価した (図 1)。その結果から, 生存率 50% を示す 5-FU 濃度を IC50 値として算出した (表 2)。最も IC50 値が低いオルガノイドは cc-25 で  $179.9 \mu\text{M}$  であり, 最も IC50 値が高いオルガノイドは cc33 で,  $1819.2 \mu\text{M}$  であった。大腸がん患者のステージはどちらも IVa で, すでに肝臓や肺など離れた臓器に転移が見られる末期がんであった (表 2)。

### 3.3 オルガノイドで FGFR3IIIc の発現量と 5-FU 耐性は相関する

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を調べるため, 各オルガノイドから total RNA を抽出し cDNA を合成した。その後, FGFR3IIIb と FGFR3IIIc の発現を RT-PCR, アガロースゲル電気泳動で確認 (図 2) し, Image J を用いてバンドの濃さを数値化した。5-FU に対する IC50 値との相関関係を調べるために, 横軸を FGFR3IIIb あるいは FGFR3IIIc の発現量, 縦軸を IC50 値として, グラフ化した。

これらの結果から, FGFR3IIIb は負の相関係数 ( $R=-0.481$ ) を示した (図 3 (A))。一方, FGFR3IIIc は僅かに正の相関係数 ( $R=0.057$ ) を示した (図 3 (B))。この結果から, オルガノイドで FGFR3IIIb の発現量が高いと 5-FU に対する感受性が高くなり, FGFR3IIIc の発現量が高いと, 5-FU に対する耐性が高くなる傾向が見られた。

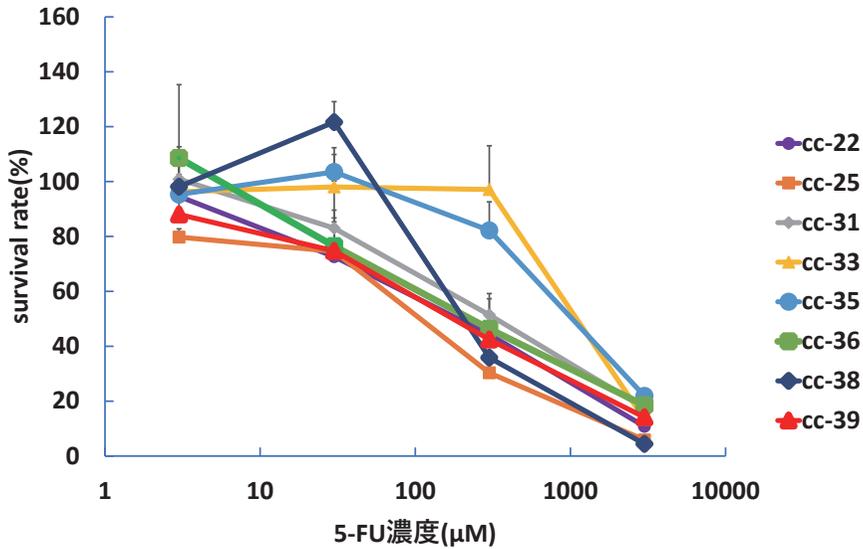


図1 大腸がんオルガノイドを用いた 5-FU 耐性の評価

表2に示した大腸がんオルガノイドを、それぞれ  $1.0 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L の密度で Non-coating 96 well plate (Iwaki, 1860-096) に播種し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37°C 一晚培養した後、5-FU を 0  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 3000  $\mu$ M 添加した。4日間培養し、ATP assay を行った。データは 0  $\mu$ M の平均値を survival rate (生存率) 100% とし、n=3 で評価した。各オルガノイドの生存曲線のグラフから生存率 50% を示す 5-FU の濃度を IC50 値とした (表2)。

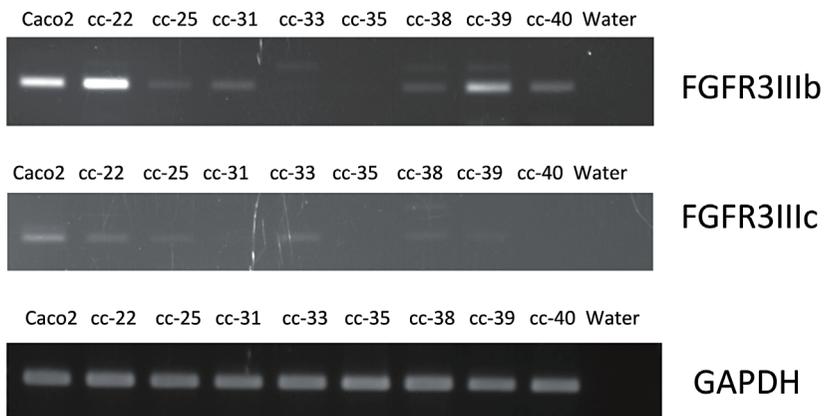


図2 大腸がんオルガノイドの FGFR3IIIb と FGFR3IIIc 発現の解析

大腸がんオルガノイドから RNA を抽出し、逆転写反応を行い cDNA を合成した。その後、FGFR3IIIb と FGFR3IIIc、およびハウスキーピング遺伝子 GAPDH の発現を RT-PCR を行い、DNA をアガロースゲル電気泳動した。Image J を用いてバンドの濃さを数値化し、GAPDH の数値で標準化した。

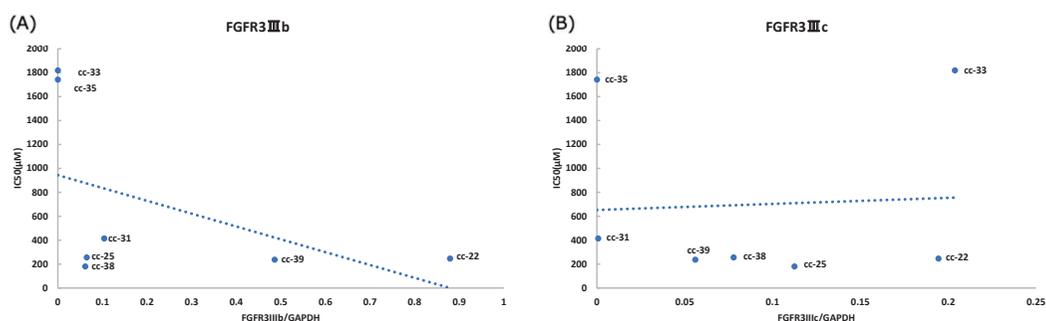


図3 大腸がんオルガノイドで FGFR3IIIc の発現量が高いと、5-FU 耐性を獲得している

#### (A) FGFR3IIIb 発現と 5-FU に対する IC50 値

横軸を FGFR3IIIb の発現量を GAPDH で標準化した値、縦軸を 5-FU に対する IC50 値としてグラフ化した。FGFR3IIIb/GAPDH と IC50 値は負の相関 ( $R=-0.481$ ) がみられた。

#### (B) FGFR3IIIc 発現と 5-FU に対する IC50 値

横軸を FGFR3IIIc の発現量を GAPDH で標準化した値、縦軸を IC50 値としてグラフ化した。FGFR3IIIc/GAPDH と IC50 値は僅かに弱い正の相関 ( $R=0.057$ ) がみられた。

### 3.4 オルガノイドの免疫蛍光染色

作製した大腸がんオルガノイドを MatriMix (511) 内で培養後、Tissue-Tek O.C.T Compound に埋め、16-20 μm の凍結切片を作製し、免疫蛍光染色を行った。FGFR3IIIc 陽性細胞は細胞増殖マーカーである Ki67 の発現が認められたことから (図 4 (A)), FGFR3IIIc を発現している細胞は細胞増殖を亢進していたと考えられる。さらに FGFR3 陽性細胞が大腸がん細胞であることを確認するために上皮系細胞のマーカーである EpCAM 又は大腸がん細胞のマーカーである CEA で染色した。FGFR3 陽性細胞が EpCAM (図 4 (B)) 又は Carcinoembryonic antigen (CEA) (図 4 (C)) で染色された。これらの染色結果から、オルガノイドを構成する細胞において FGFR3IIIc を発現している細胞は大腸がん細胞であることが示された。

## 4. 考察

以前、Sonvill らの大腸がん患者の検体を用いた研究<sup>7</sup>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 FGFR3IIIb 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<sup>7</sup>。本研究では、作製したオルガノイドから RNA を抽出し、RT-PCR により FGFR3IIIc と FGFR3IIIb の発現について解析し、オルガノイドによってそれぞれ FGFR3IIIc と FGFR3IIIb の発現度が異なることを示した (図 2)。興味深いことに、今回作製したオルガノイドから抽出した RNA を用いた解析では、2つのアイソフォームの発現が同時に高くならず、FGFR3IIIb の発現が高いと FGFR3IIIc の発現が低くなるか、また逆に FGFR3IIIb の発現は見られず FGFR3IIIc の発現が検出できる場合があった。このことは、大腸がん細胞の FGFR3 遺伝子発現の制御、特に選択的スプ

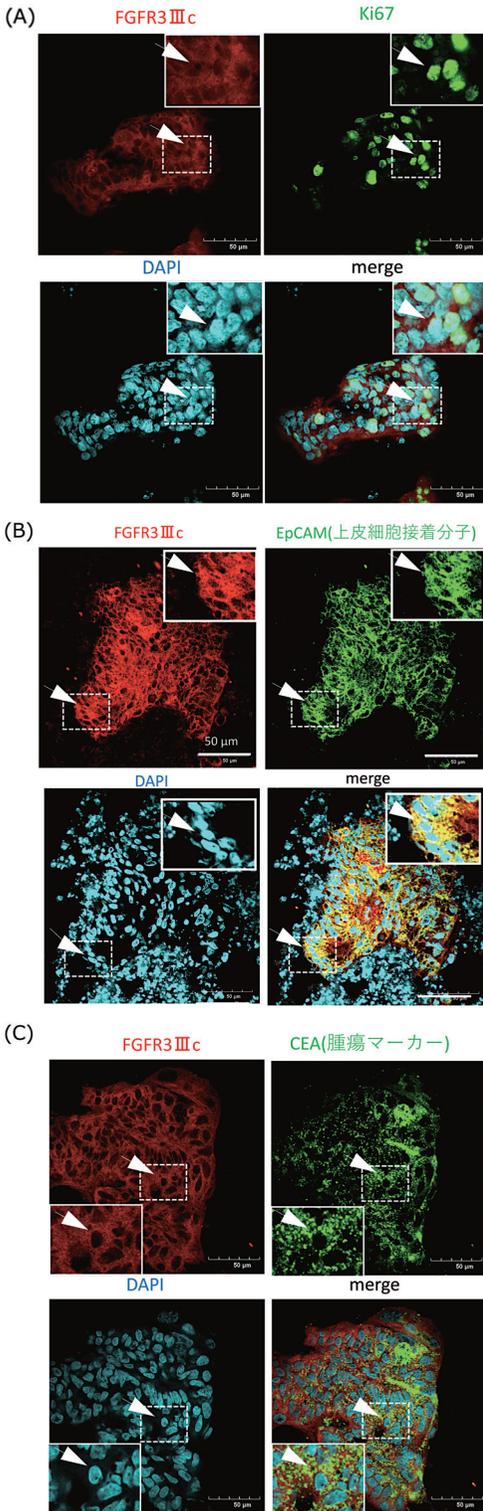


図4 大腸がんオルガノイドの免疫蛍光染色

## (A) FGFR3IIIc と増殖マーカー Ki67 の発現

FGFR3IIIc を発現する細胞は、増殖マーカーである Ki67 を細胞の核に発現している。オルガノイドを MatriMix (511) 内で培養後、Tissue-Tek O.C.T Compound に包埋し、16~20  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製したのち、免疫蛍光染色を行った。一次抗体にそれぞれ、FGFR3IIIc と細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体とを使用した。白い破線で囲んだ領域を拡大した。DNA (核) を DAPI (青) で染色した。核に Ki67 の発現が見られ (白矢印)、その細胞には細胞質に FGFR3IIIc の発現が認められた。Merge では画像を重ね合わせた。これらの結果から、オルガノイドを構成し増殖している細胞で FGFR3IIIc を発現していることを確認した。

## (B) FGFR3IIIc と上皮マーカー EpCAM の発現

(A) と同様に免疫蛍光染色をおこなった。一次抗体として FGFR3IIIc (R&D) (赤) と、上皮細胞接着分子であり上皮系細胞マーカーに対する抗 EpCAM 抗体 (緑) を使用した。DNA (核) を DAPI (青) で染色した。Merge では画像を重ね合わせた。これらの染色結果から、オルガノイドを構成する細胞が EpCAM 陽性の上皮系細胞 (白矢印, 緑) であり、同時に FGFR3IIIc を発現している (白矢印, 赤) ことを確認した。

## (C) FGFR3IIIc とがんマーカー CEA の発現

(A) と同様に免疫蛍光染色をおこなった。一次抗体として、それぞれ FGFR3IIIc (R&D) (赤) と腫瘍マーカーに対する抗 CEA 抗体 (緑) を使用した。DNA (核) を DAPI (青) で染色した。Merge では画像を重ね合わせた。これらの染色結果から、オルガノイドを構成する細胞は CEA 陽性の 大腸がん細胞 (白矢印, 緑) であり、FGFR3IIIc を発現している (白矢印, 赤) ことを確認した。

ライシングの制御が大腸がん患者ごとに FGFR3IIIb 産生タイプ（上皮型）か、または FGFR3IIIc 産生タイプ（間葉型）に傾いていることを示すものと言える。

これまでの研究室の研究において、大腸がん細胞株 Caco2 を用いた FGFR3IIIc の機能性評価で FGFR3 をノックアウトすることにより、細胞増殖能の低下及び 5-FU の感受性亢進が認めれた<sup>10</sup>。また、FGFR3IIIc の過剰発現により、細胞増殖能の亢進及び 5-FU の耐性獲得が認められたことから、大腸がん細胞において、FGFR3IIIc の発現亢進は大腸がん細胞の悪性化に関与していることが考えられる<sup>10</sup>。本研究では大腸がんオルガノイドを用いた FGFR3IIIc 発現による悪性化関与の可能性について検証した。FGFR3IIIc 発現量と 5-FU の感受性との相関係数は 0.057 を示し、FGFR3IIIb と 5-FU の感受性との相関係数は  $R=-0.481$  を示したことから、FGFR3IIIb 発現量が高くなることにより、5-FU の感受性が高まり、FGFR3IIIc 発現が高くなることにより、5-FU への感受性が減弱する傾向を示していた。したがって、FGFR3IIIc 発現により、5-FU に対する耐性を獲得する可能性があり、大腸がん細胞株 Caco2 の実験と同様に大腸がんオルガノイドにおいても FGFR3IIIc 発現は大腸がんの悪性化に関与していることが予想される。

本研究で大腸がんオルガノイドを作製した患者 cc-36 のステージは IVb であり末期癌であったが、5-FU に対する IC50 値は  $267.3\mu\text{M}$  と比較的低い値を示したことから、オルガノイドの 5-FU に対する IC50 値は大腸がんのステージには関係ないことが予想される。また、IC50 値が最も低い cc-25 のオルガノイドは KRAS G12D の変異型であり、cc-36 も同様に KRAS G12S 変異型であったことから、5-FU への薬剤感受性が KRAS シグナルの活性化には依存していないことが予想される。一方、2 番目に IC50 値が高い cc-35 は、BRAF 変異陽性であった。BRAF は RAS の下流シグナルタンパク質で MAPK 経路の最初の酵素になる。BRAF が活性変異するとがんは悪性化するが、本研究において、BRAF 変異は 1 例なので、BRAF 変異と 5-FU 感受性との関連性は不明である。

大腸がん患者検体から作製したオルガノイドを用いた免疫蛍光染色で、上皮系細胞のマーカーである EpCAM 陽性及びがんマーカーである CEA 陽性の細胞が FGFR3IIIc を発現しており、増殖していることを示した（図 4）。EpCAM は上皮細胞接着因子であり、ヒト大腸がん細胞に高く発現しがん幹細胞シグナルに重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>13</sup>。これらの免疫蛍光染色から本研究で作製したオルガノイドは、大腸がん患者由来の上皮細胞でありかつ純粋な大腸がん細胞で構成されており、間葉系の細胞は混入していないことが確認された。また、FGFR3IIIc 陽性細胞において細胞増殖が確認されていることから、FGFR3IIIc が活性化している可能性がある。大腸がん細胞において FGF9 の発現が亢進していることが報告されており<sup>14</sup>、オートクラインにより、FGFR3IIIc が活性化していることが予想される。

本研究で、現在までに確立された大腸がんオルガノイドだけでは十分な傾向と結論を示すだけの症例数として十分とはいえないので、さらに検体数を増やして 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統計的に明らかにする予定である。加えて、FGFR3IIIc の細胞内シグナルを阻害する化合物をスクリーニングし、新規分子標的薬の開発に役立てたい。

## 5. 引用論文

- 1 国立がんセンター, 最新がん統計 [https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)
- 2 大腸がん治療ガイドライン医師用 2022 年版  
[https://www.jsccr.jp/guideline/2022/index\\_guide.html](https://www.jsccr.jp/guideline/2022/index_guide.html)
- 3 Kanai, M., Goke, M., Tsunekawa S., Podolsky D. K., Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein. *J. Biol. Chem* 272, 6621-6628 (1997)
- 4 Murgue, B., Tsunekawa, S., Rosenberg, I., deBeaumont, M., & Daniel K. Podolsky Identification of a Novel Variant Form of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3IIIb) in Human Colonic Epithelium. *Cancer Res.* 54, 5206-5211 (1994)
- 5 Holzmann, K., Grunt, T., Heinzele, 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)
- 6 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)
- 7 Sonvilla, G., Allerstorfer, S., Heizle, C., Statner, S., Karner, J., Klimpfinger, M., Wrba, F., Fischer, H., Gaughhofer, 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)
- 8 Shinagawa T., Tanaka T., Nozawa H., Emoto S., Muro K., Kaneko M., Sasaki K., Otani K., Nishikawa T., Hata K., Kawai, K., Watanabe T., Comparison of the guidelines for colorectal cancer in Japan, the USA and Europe. *Ann Gastroenterol Surg.*, 2, 6-12 (2018)
- 9 瀬尾美鈴, 福光一生, 上田修吾, 上野信洋 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の応用. 京都産業大学総合学術研究所報 第 16 号, 101-116 (2021)
- 10 福光一生, 大腸がん細胞における FGFR3IIIc の働きと特異的な分子標的薬の開発に向けて. 京都産業大学大学院 生命科学研究所生命科学専攻 修士論文 (2022)
- 11 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製への応用, (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
- 12 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)
- 13 Munz M., Baeuerle P.A., Gires O. The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Res.* 69, 5627. (2009)
- 14 Zhang Z., Zhang Y., Qin X., Wng Y., Fu J. FGF9 promotes cisplatin resistance in colorectal cancer via regulation of Wnt/b-catenin signaling pathway. *Exp. Ther. Med.* 19, 1711-1718 (2020)

## 6. 謝辞

大腸がんオルガノイド作製に必要な StemPro hESC medium をお貸しいただき, 多くのアドバイスを頂戴した京都大学医学研究科クリニカルバイオリソース研究開発講座 井上正宏特定教授に深く感謝いたします。本研究は, 京都産業大学科研費申請再挑戦プログラム「消化管がん患者オルガノイドを用いた FGFR3IIIc シグナルの抑制と抗がん剤耐性の克服」(課題番号 E2214) の研究として実施された。

# Suppression of Fibroblast Growth Factor Receptor 3IIIc Signaling and Overcoming Anticancer Drug Resistance Using Patients-derived Colorectal Cancer-Stem Organoids.

Misuzu SEO  
Moe NAKAMOTO  
Kazuki FUKUMITSU  
Yoshihisa OKUCHI  
Shugo UEDA  
Nobuhiro UENO

## Abstract

Advanced colorectal cancer is difficult to cure completely because it has acquired drug resistance against anticancer drugs, which are the standard treatments. In our previous study on cultured colon cancer cells, we proposed that the upregulated expression of fibroblast growth factor receptor 3IIIc (FGFR3IIIc), a selective splicing isoform of FGFR3, may be one of the causes of anticancer drug resistance in colon cancer. In this study, we generated organoids from clinical specimens of patients with colorectal cancer and analyzed the relationship between FGFR3IIIc expression and resistance to fluorouracil (5-FU), a standard treatment. Immunohistochemical analysis of colorectal cancer organoids revealed FGFR3IIIc expression in cells positive for the epithelial cell marker epithelial cell adhesion molecule (EpcAM), cell proliferation marker Ki67, and cancer marker carcinoembryonic antigen (CEA). The expressions of FGFR3IIIc and another isoform FGFR3IIIb were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction using mRNA extracted from organoids. The correlation between the values of FGFR3IIIb and FGFR3IIIc expression levels relative to housekeeping gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the drug sensitivity IC<sub>50</sub> value of each organoid to 5-FU was examined. Consequently, the relationship between FGFR3IIIb expressed in normal epithelium and IC<sub>50</sub> values for 5-FU was negative with a correlation function of  $-0.481$ , whereas the relationship between FGFR3IIIc expressed in colon cancer cells and IC<sub>50</sub> values for 5-FU was positive with a correlation function of  $0.057$ . These

results suggest that there is an association between increased FGFR3IIIc expression and acquired drug resistance to 5-FU in the colorectal cancer organoids.

**Keywords :** Fibroblast growth factor receptor 3IIIc, patients-derived colorectal cancer stem organoids, colorectal cancer marker carcinoembryonic antigen, anticancer drug resistance, fluorouracil, ATP assay