HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	食道扁平上皮癌がん幹細胞におけるFGF-2の機能解析および新規治療法への展開［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	前原, 経
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13185号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69733
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Osamu_Maehara_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士(臨床薬学)　氏 名　　前原　経

学 位 論 文 題 名
食道扁平上皮癌がん幹細胞における FGF-2 の機能解析および新規治療法への展開

【序論】

食道癌は本邦において癌部位別死亡数で 10 番目、罹患数で 14 番目の致死的な疾患である。腫瘍の組織型としては 90%以上が扁平上皮癌である。食道扁平上皮癌（ESCC）の治療としては、早期症例や局所進行症例に対して外科治療（含内視鏡治療）や放射線化学療法が選択されるが、高度進行症例に対する有効な治療法は未だ確立されていない。そのため、薬剤を含めた新規治療法の開発が望まれている。近年、癌治療の標的の一つとして、がん幹細胞(CSCs)が注目されている。CSCs は癌組織中に存在する腫瘍を産み出す細胞であり、癌の転移・再発・治療抵抗性に深く関与すると考えられている。さらに、ここ数年では CSCs の概念も変わりつつあり、従来の「階層の頂点に位置する少数の細胞」という概念よりも、分化・脱分化を繰り返して様々な階層の細胞に変化できる「可塑性の高い細胞」という概念が受け入れられつつある。ESCC の CSCs を同定するマーカーに関しては $CD44^{high}/CD24^{low}$ 細胞が CSCs 様の性質を持つことが我々や他のグループの先行研究から既に明らかにされている。また、上述の「可塑性」に関連した研究としては癌細胞の上皮間葉転換(EMT)や間葉上皮転換(MET)が挙げられ、ESCC に関しても EMT によって間葉系の形態を獲得した細胞が CSCs に近い性質を持つことが示されている。FGF-2 は線維芽細胞増殖因子ファミリーに属しており、細胞の生存・増殖・分化といった様々な現象に関与することが知られている。ESCC においても、FGF-2 の過剰発現が再発や生存率、薬剤耐性などに関与することが報告されているものの、CSCs に対する FGF-2 の作用は明らかにされていない。

【目的】

本研究では FGF-2 が ESCC-CSCs に及ぼす影響を解析するとともに、FGFR 阻害剤を使用した実験も行い、この経路の阻害が ESCC の新規治療法となり得るかについても併せて検討した。

【結果・考察】

ESCC-CSCs に関するこれまでの先行研究を踏まえ、本研究では CD44 の発現が高く、間葉系の形態を有している細胞株(TE8, HCE4)を主に使用した。まず、各細胞株を CD44 と CD24 に対する抗体で染色し、セルソーターを用いて CSCs 分画($CD44^{high}/CD24^{low}$：CD24L)と非 CSCs 分画($CD44^{high}/CD24^{high}$ ： CD24H)に分取した。各分画間の EMT マーカーおよび FGF-2 の発現を比較した結果、CSCs 分画は非 CSCs 分画と比べて、より間葉系の形態であるとともに FGF-2 の発現・分泌も高いことが明らかとなった。

次に、FGF-2 の ESCC-CSCs における作用を解明するために、非 CSCs 分画である CD24H 細胞に対して FGF-2 を添加し、CSCs マーカーおよび EMT マーカーの発現の変動を解析した。その結果、FGF-2 の添加により CSCs が増加するとともに EMT が確認された。さらに、FGF-2 の有無による ESCC 細胞株の足場非依存的な腫瘍形成能を soft-agarose colony formation assay により検討したところ、FGF-2 の添加によってコロニー形成数が増加した。これらの結果から、FGF-2 は ESCC において EMT の誘導および CSCs の増殖・維持に重要な因子であることが示唆された。

ここまでの結果から、FGF シグナルの抑制が ESCC-CSCs を標的とした新たな治療法となり得る可能性が考えられた。そこで、実際に FGFR 阻害剤である AZD4547 を CSCs 分画である CD24L 細胞に対して添加し、CSCs マーカーおよび EMT マーカーの発現の変動を解析した。そ

の結果、AZD4547 の添加により CSCs が減少するとともに MET が確認された。さらに、AZD4547 の有無による ESCC 細胞株の足場非依存的な腫瘍形成能も併せて検討したところ、AZD4547 の添加によってコロニー形成数が減少した。これらの結果から、FGF シグナルは ESCC-CSCs の増殖・維持に重要な因子であり、FGFR 阻害剤は ESCC-CSCs を標的とした治療に応用できる可能性が示唆された。

次に ESCC-CSCs の増殖・維持に重要な FGF-2/FGFR 下流経路の解明を試みた。FGFR の代表的な下流経路としては MAPK 経路(RAS/MEK/ERK)と PI3K/AKT 経路の 2 つの経路が存在する。そこで、それぞれの経路の阻害剤である Trametinib(MEK 阻害剤)と GDC0941(PI3K 阻害剤)を CSCs 分画である CD24L 細胞に対して添加し、CSCs マーカーおよび EMT マーカーの発現の変動を解析した。その結果、MEK 阻害剤を添加した細胞では前述の FGFR 阻害剤の添加時と同様の結果が確認でき、CSCs が減少するとともに MET が認められた。一方、GDC0941 の添加では CSCs の減少は認められなかった。このことから、MAPK 経路が ESCC-CSCs の増殖・維持に重要な FGF-2/FGFR 下流経路である可能性が示唆された。

続いて、MAPK 経路自体が ESCC-CSCs の産生・維持に重要であるかを明らかにするために、活性変異型 RAS(G12V)を発現している T-TeRAS 細胞を用いた実験を行った。まず、T-TeRAS 細胞に対して AZD4547 を添加し、CSCs マーカーおよび EMT マーカーの発現の変動を解析した。その結果、予想していたように AZD4547 の添加では RAS のシグナルを抑制できないため、CSCs マーカーおよび EMT マーカーの発現に有意な変化は認められなかった。一方、MEK 阻害剤を作用させると、T-TeRAS 細胞であっても CSCs が減少するとともに MET が認められた。さらに、T-TeRAS 細胞を用いて *in vitro* における薬剤感受性の変化を WST-8 assay により検討したところ、MEK 阻害剤の併用により 5-FU への感受性が増大した。以上の結果から、ESCC-CSCs の増殖・維持には RAS/MEK/ERK 経路が重要であることが示された。

最後に、ESCC に対する FGFR 阻害剤および MEK 阻害剤の腫瘍抑制効果について動物実験により検討した。ヌードマウスの皮下に TE8 細胞、T-TeRAS 細胞を移植し、各薬剤を腹腔内投与して腫瘍の成長を比較した。また、屠殺後に腫瘍を摘出し、免疫組織染色法により EMT マーカーの発現等も併せて検討した。その結果、TE8 細胞を移植したマウスにおいては FGFR 阻害剤と MEK 阻害剤のいずれの投与でも腫瘍増大の抑制効果が認められた。一方、T-TeRAS 細胞を移植した細胞では、FGFR 阻害剤の効果は限定的であるのに対して MEK 阻害剤では腫瘍増大の著しい抑制が認められた。さらに、免疫組織染色の結果、MET が認められた。これらの結果から、*in vivo* の実験においても *in vitro* の実験結果で示した内容と一致した結果が得られたと考えられる。

【まとめ】

本研究の結果から、FGF-2 は ESCC-CSCs の維持に重要であり、その機能を抑制する FGFR 阻害剤や MEK 阻害剤は ESCC-CSCs を標的とした新規治療薬となり得る可能性が考えられる。