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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13185
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71767
Type	doctoral thesis
File Information	Osamu_Maehara.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

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

前原　経

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床病態解析学研究室

2018 年 3 月

目 次

1.略語表.....1 頁
2.序論.....3 頁
2-1 日本における食道癌.....3 頁
2-1-1 統計と現状
2-1-2 危険因子
2-1-3 ESCC に対する標準的な治療
2-1-4 ESCC 治療における現在の課題
2-2 発がんメカニズムとがん幹細胞(CSCs).....5 頁
2-2-1 発がんメカニズム研究の変遷(クローン進化モデル)
2-2-2 がん幹細胞(Cancer stem-like cells : CSCs)説
2-2-3 ESCC における CSCs マーカー
2-2-4 がん組織の多様性と不均一性
2-3 CSCs の可塑性と上皮間葉転換(EMT).....8 頁
2-3-1 CSCs の可塑性
2-3-2 上皮間葉転換(EMT)と間葉上皮転換(MET)
2-3-3 EMT のプロセスと関連する因子・シグナル
2-3-4 EMT と CSCs
2-4 本研究に直接関連する先行研究.....11 頁
2-4-1 我々の研究グループによる先行研究
2-4-2 本研究の予備実験(ESCC-CSCs で重要な新規因子の探索)
2-5 線維芽細胞増殖因子(FGF)-2.....13 頁
2-5-1 FGF-2 と FGF ファミリー
2-5-2 FGF-2 の機能とシグナル伝達
2-5-3 ESCC と FGF シグナルの先行研究
2-6 本研究の目的.....15 頁

3.実験方法.....16 頁
3-1 細胞株および細胞培養.....16 頁
3-1-1 ESCC 細胞株
3-1-2 試薬および材料
3-1-3 細胞培養条件(一般・継代)
3-2 qRT-PCR.....16 頁
3-2-1 試薬および材料

3-2-2 実験操作(細胞)
3-2-3 実験操作(RNA 抽出～遺伝子発現解析)
3-3 Western blotting..... 18 頁
3-3-1 試薬および材料
3-3-2 実験操作(細胞 ; E-cad、Vimentin 検出用)
3-3-3 実験操作(細胞 ; FGFR 下流シグナル検出用)
3-3-4 実験操作(タンパク抽出)
3-3-5 実験操作(SDS-PAGE~タンパク検出)
3-4 ELISA..... 20 頁
3-4-1 試薬および材料
3-4-2 実験操作(細胞)
3-4-3 実験操作(測定)
3-5 soft-agarose colony formation assay..... 20 頁
3-5-1 試薬および材料
3-5-2 実験操作(基底層ゲル、細胞含有層ゲル、培地層)
3-5-3 コロニー計測
3-6 フローサイトメトリーおよび FACS..... 21 頁
3-6-1 試薬および材料
3-6-2 実験操作(細胞)
3-6-3 実験操作(抗体反応、FACS 解析)
3-7 drug sensitivity assay..... 22 頁
3-7-1 試薬および材料
3-7-2 実験操作(細胞、測定)
3-8 Xenograft experiment *in vivo*..... 22 頁
3-8-1 動物(ヌードマウス)
3-8-2 試薬および材料
3-8-3 実験操作(ESCC 細胞株移植)
3-8-4 実験操作(腫瘍測定と屠殺)
3-9 免疫組織染色(IHC)..... 24 頁
3-9-1 試薬および材料
3-9-2 実験操作(検体処理～染色)
3-10 データ処理と統計解析..... 25 頁
4.実験結果..... 26 頁
4-1 ESCC 細胞株-CSCs 分画の特徴および FGF-2 の発現・分泌の検討..... 26 頁
4-1-1 ESCC 細胞株の表面抗原解析と細胞ソーティング

4-1-2 ESCC-CSCs 分画と非 CSCs 分画の EMT マーカーの発現解析
4-1-3 ESCC-CSCs 分画と非 CSCs 分画の FGF-2 の発現解析
4-2 ESCC 細胞株に対する FGF-2 の作用の検討 ..... 29 頁
4-2-1 FGF-2 による CSCs マーカーの発現変動解析
4-2-2 FGF-2 による EMT マーカーの発現変動解析
4-2-3 FGF-2 による ESCC 細胞株の足場非依存的な腫瘍形成能の検討(*in vitro*)
4-3 ESCC 細胞株に対する FGFR 阻害剤の作用の検討 ..... 32 頁
4-3-1 FGFR 阻害剤(AZD4547)による CSCs マーカーの発現変動解析
4-3-2 FGFR 阻害剤(AZD4547)による EMT マーカーの発現変動解析
4-3-3 FGFR 阻害剤による ESCC 細胞株の足場非依存的な腫瘍形成能の検討(*in vitro*)
4-4 ESCC-CSCs の増幅に重要な FGF-2/FGFR 下流シグナル経路の探索①..... 35 頁
4-4-1 MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析
4-5 ESCC-CSCs の増幅に重要な FGF-2/FGFR 下流シグナル経路の探索②..... 37 頁
4-5-1 活性変異型 H-RAS を過剰発現させた T-TeRAS 細胞
4-5-2 FGFR 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析(T-TeRAS)
4-5-3 MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析(T-TeRAS)
4-5-4 MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤による薬剤感受性の発現変動解析(T-TeRAS)
4-6 ESCC に対する FGFR 阻害剤および MEK 阻害剤の効果の検討(*in vivo*)..... 41 頁
4-6-1 ESCC に対する FGFR 阻害剤および MEK 阻害剤の効果の検討(腫瘍増殖)
4-6-2 ESCC に対する FGFR 阻害剤および MEK 阻害剤の効果の検討(IHC)

5.考察 ..... 43 頁
5-1 CSCs を治療標的とする意義 ..... 43 頁
5-2 本研究で用いた ESCC 細胞株の特徴..... 43 頁
5-3 EMT と CSCs..... 44 頁
5-4 FGF-2 と腫瘍・CSCs ..... 44 頁
5-5 EMT や CSCs における FGF と他シグナルとのクロストーク ..... 45 頁
5-6 ESCC-CSCs に重要な FGF-2/FGFR の下流シグナル ..... 46 頁

6.総括 ..... 47 頁
7.謝辞 ..... 48 頁
8.引用文献 ..... 49 頁

1 略語表

A.A	acrylamide
7-AAD	7-amino actinomycin D
ALDH1	aldehyde dehydrogenase 1
APC	allophycocyanin
APS	ammonium persulfate
Bis	N,N'-methylenebisacrylamide
BPB	bromophenol blue
BPE	bovine pituitary extract
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CD24H	CD24 high and CD44 high
CD24L	CD24 low and CD44 high
CSC	cancer stem-like cell
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethyrenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ESCC	esophageal squamous cell carcinoma
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	FGF receptor
5-FU	5-fluorouracil
HBSS	Hank's balanced salt solution
HE	hematoxylin eosin
HGF	hepatocyte growth factor
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
IGF	insulin-like growth factor
i.p.	intraperitoneal injection
KSFM	keratinocyte serum-free medium

MAPK	mitogen-activated protein kinases
2-ME	2-mercaptoethanol
MEK	MAPK/ERK kinase
MET	mesenchymal-epithelial transition
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PE	phycoerythrin
PI3K	phosphoinositide-3 kinase
Rb	retinoblastoma-associated protein
SDS	sodium dodecyl sulfate
SH2	src homology 2
Src	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
TBS	tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TGF-β	transforming growth factor-β
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
WST-8	water soluble tetrazolium salts-8

2 序論

2-1　日本における食道癌

2-1-1 統計と現状 [1,2]

食道癌は本邦において癌部位別死亡数で第 10 位、罹患数で第 14 位の致死的な疾患である。男女間で罹患数に大きな差があり、男性で多いことが特徴である(男性のみの統計では死亡数・罹患数ともに第 8 位、罹患数の男女比は約 6 : 1)。年齢は 60~70 歳代に好発し全年代の約 70%、占居部位は胸部中部食道に最も多く、全体の約 50%を占めている。腫瘍の組織型は扁平上皮癌が圧倒的に多く、全体の 90%以上を占めているが、この特徴は本邦におけるものであり西洋諸国においてはむしろ腺癌の方が多い。

2-1-2 危険因子 [2]

食道扁平上皮癌(esophageal squamous cell carcinoma : ESCC)の重要な危険因子としては飲酒と喫煙が挙げられ、両者の併用により危険性が増加することも知られている。また、ビタミン欠乏も危険因子の 1 つであり緑黄色野菜や果物は予防因子とされている。

2-1-3 ESCC に対する標準的な治療 [2-6]

ESCC に対する治療は個々の患者状況に応じて決定されることは言うまでもないが、病期ごとの標準的な治療法としては、早期症例であれば内視鏡的治療、局所進行症例に対しては外科手術や化学放射線療法、高度進行・再発症例に対しては化学療法が適応となることが多い。化学療法で用いられる薬剤としては 1 次治療ではプラチナ系薬剤(シスプラチンやネダプラチン)とフッ化ピリミジン系薬剤(5-FU)の併用が標準治療として確立されている。1 次治療不応例に対する 2 次治療としてはタキサン系の薬剤であるドセタキセルやパクリタキセルが選択されることが多い。

2-1-4 ESCC 治療における現在の課題 [2,10]

現在の ESCC 治療における課題として高度進行・再発症例に対する治療法が非常に限られている点が挙げられる。前項で述べたように、高度進行・再発症例に対しては主に化学療法が適応となるが、現在までに明確に生存期間延長効果を示した薬剤(療法)は存在していない。もとより有効な薬剤が非常に少ないことが原因と考えられ、他の様々ながんでは分子標的薬などの有効な新薬が次々と承認されている中、ESCC に対して分子標的薬は一切承認されていない。このような現状から ESCC に対する新規治療法(薬剤)の開発が望まれている。

Fig A.1

日本における食道癌

・*統計*

死亡数第10位, 罹患数第14位(癌部位別, 男女計, 2017年予測)

男性が多い(死亡数,罹患数ともに第8位), 男女比= 約 6:1

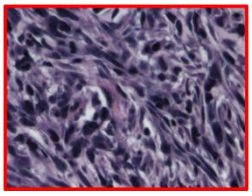
・*組織型*

扁平上皮癌(Esophageal Squamous Cell Carcinoma：ESCC)....90%以上

ESCCの内視鏡像



ESCCの病理写真



・*危険因子*

喫煙, 飲酒

Fig A.2

食道扁平上皮癌(ESCC)の治療

・*標準的な治療法*

早期症例.....主に内視鏡治療(切除)が適応

局所進行症例.....主に手術 or 化学放射線療法が適応

高度進行・再発症例.....主に化学(放射線)療法が適応

化学療法で主に用いられる薬剤

1次治療.....プラチナ系 + フッ化ピリミジン系の併用が中心的
例：シスプラチン + 5-FU

2次治療..... 1次治療不応例への治療, タキサン系が中心的
例：ドセタキセル or パクリタキセル

Figure A. 日本における食道癌の現状と代表的な治療法

日本において食道癌は男性で多く、組織型は扁平上皮癌、危険因子は喫煙・飲酒である(Fig A.1:引用文献 1,2 をもとに作成)。治療は病期に応じて内視鏡治療・手術・化学放射線療法が選択される(Fig A.2:引用文献 2 をもとに作成)。

2-2　発がんメカニズムとがん幹細胞(CSCs)

2-2-1　発がんメカニズム研究の変遷(クローン進化モデル)[7-9,46,47]

発がんに関する研究は古くから活発に行われていた。最も重要な発見の 1 つとして 1911 年のラウス肉腫ウイルスが挙げられる(当時はウイルスの存在が発見される前であり、ろ過病原体とみなされていた)。この発見を契機に「発がんの原因は感染症」という考え方が注目されたが、がんが人から人へ伝染することや特定地域で集団発生する事実が確認できないため、次第に否定的な意見が優勢となり、その後 50 年ほどに渡って目立った進展はなかった。1970 年代になると分子生物学的研究手法の急速な発展に伴い、発がんメカニズムの解明もブレイクスルーを迎えた。1971 年に Knudoson が網膜芽細胞腫の研究から「がん抑制遺伝子」の存在とそれを説明する「2 ヒット仮説」を提唱した。この仮説は 1986 年に Weinberg らによる *RB* 遺伝子の単離によって実際に証明された。一方、1977 年には Varmus と Bishop によりラウス肉腫ウイルスゲノムにコードされている *src* 遺伝子が「がん遺伝子」として初めて同定された。また、さらなる研究により *src* などのがん遺伝子が元々はウイルスではなく宿主自身に由来することが明らかとなり、発がんの原因は宿主細胞の遺伝子の発現異常や変異であるという理解が進んだ。同年には Nowell によって「遺伝子の多重変異によるクローン進化モデル」が発がんメカニズムとして提唱されている。1990 年には Vogelstein らによって「多段階発がんモデル」が報告され、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異の蓄積が実際の発がん過程で生じていることが明らかとなった。

2-2-2　がん幹細胞(Cancer stem-like cells : CSCs)説 [11,12,48]

がん組織においても正常組織の体性幹細胞と同様に自己複製能や多分化能を併せ持つ少数の幹細胞が存在し、それらの細胞が腫瘍形成を担っているという「がん幹細胞」説が存在する。この考え方自体は新しいものではなく、血液がんに関しては造血幹細胞が発見された 1960 年代から 70 年代にかけて、がん組織の中の幹細胞様細胞の存在に言及した報告が複数存在している。ただし、当時は解析技術が乏しかったことや、前項で述べたクローン進化モデルの台頭があったために大きく注目されることはなかった。1990 年頃になると現在の幹細胞研究に欠かせないフローサイトメーターや免疫不全マウスの技術発展が進み、1997 年に急性骨髄性白血病において $CD34^+/CD38^-$ 細胞が CSCs として初めて同定された。2000 年代に入ると固形癌においても CSCs の存在を示唆する研究が次々と報告され、現在でも活発に研究が進められている。

CSCs は高い腫瘍形成能を持ち、自己複製や腫瘍の維持に関与するほか、薬剤排出能や DNA 修復能に優れ、高い治療抵抗性を示す。そのため抗がん剤や放射線による

治療を行っても、CSCs が残存すると再び腫瘍が形成され、再発の原因となることや、CSCs は遊走能も高いことから転移の原因にもなると考えられている。

Fig B.1

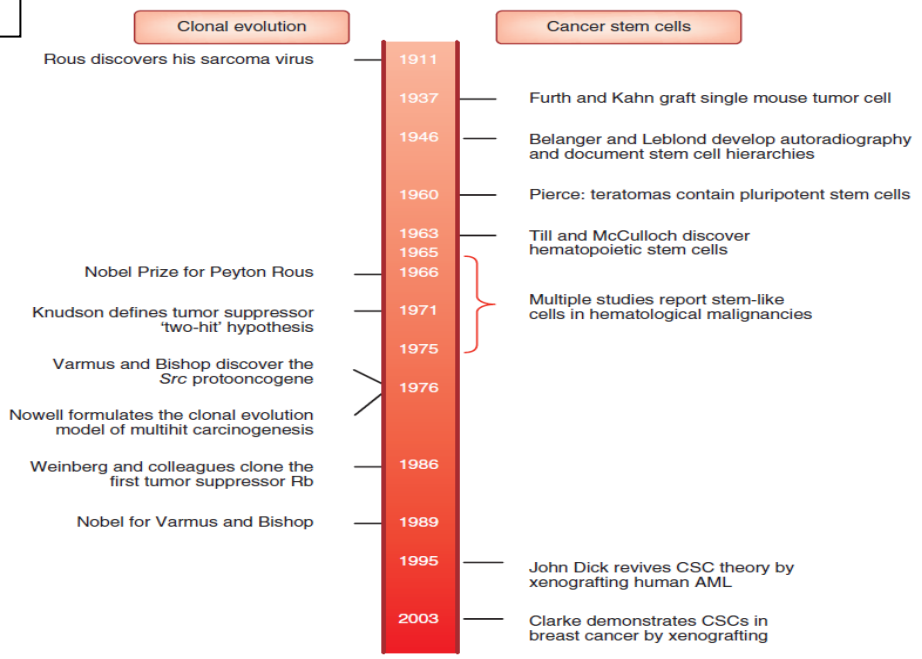


Fig B.2

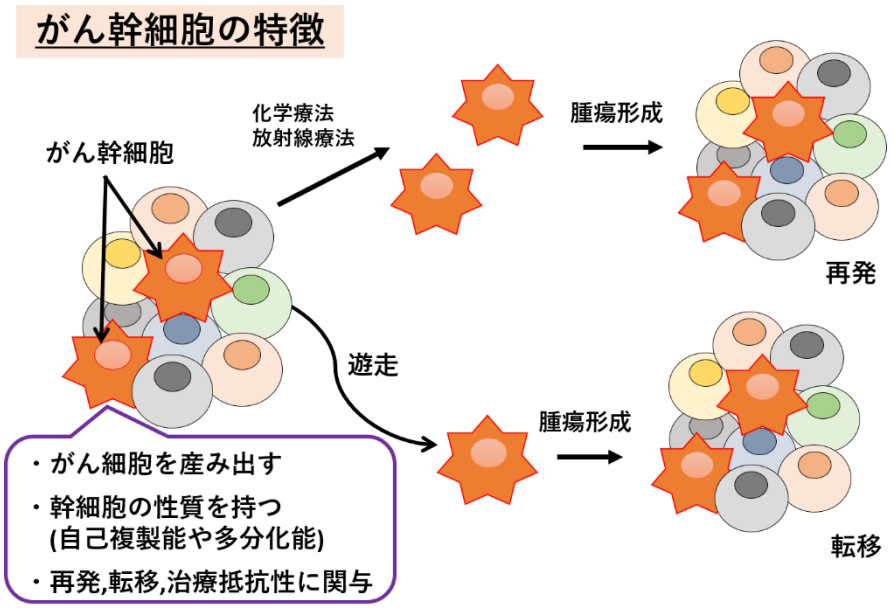


Figure B. 発がんメカニズム研究の変遷とがん幹細胞説

発がんメカニズム研究における重大な発見の経過図(Fig B.1:引用文献 11 より抜粋)。左側がクローン進化説、右側ががん幹細胞説を示している。がん幹細胞(CSCs)の特徴をまとめた模式図(Fig B.2)

2-2-3　ESCC における CSCs マーカー[21-23]

CSCs マーカーとみなされている表面抗原は数多くあり、各がんそれぞれにおいて報告されてきている。しかしながら、それらの多くは組織幹細胞のマーカーとして使用されているものと重複しており、CSCs を特異的に同定するマーカーは現在までに発見されていない。ESCC の CSCs に関しては陽性の表面抗原として CD44、CD90、CD271、陰性の表面抗原として CD24、その他アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH1)活性や薬剤排出トランスポーターである ABCG2 の発現も報告されており、これらのマーカーが単独および組み合わせで使用されている(Figure C)。

Fig C

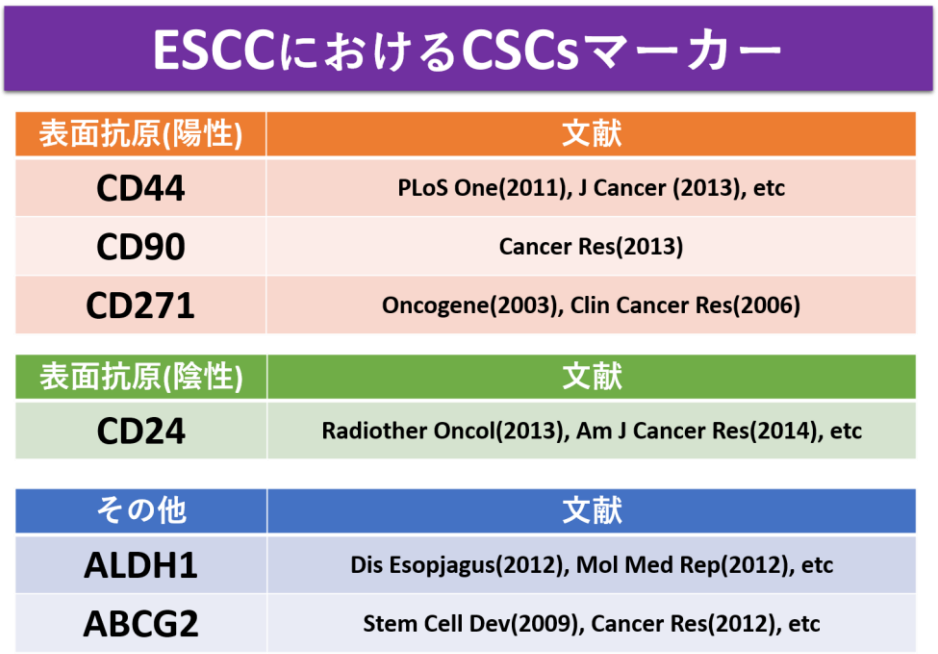


Figure C. ESCC における CSCs マーカー

ESCC において報告されている CSCs マーカー。本研究では CD44 陽性かつ CD24 陰性の細胞を CSCs 集団とした。

2-2-4　がん組織の多様性と不均一性[49,50]

がん組織は、性質の異なる(遺伝および分化度)多様ながん細胞から構成される不均一な細胞集団である。クローン進化モデルに基づく細胞の確率論的な遺伝子変異(ジェネティックな多様性)だけではがん組織の多様性の説明は十分ではなく、微小環境(ストレスなど)の変化によるエピジェネティックな変化も関係すると考えられている。さらに、前述のがん幹細胞説に従うと、がん組織における「分化度の異なる多様性」を上手く説明することができるため、この点はがん幹細胞説が支持される根拠の 1 つとなっている。

2-3　CSCs の可塑性と上皮間葉転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)

2-3-1　CSCs の可塑性 [51-53]

ここ数年の研究の進展に伴い、がん幹細胞の概念も変わりつつある。古典的な概念である「少数のがん幹細胞から様々な subclone が創出される」というものは白血病などの血液がんでは現在でも支持されているが、ESCC などの固形癌においては適さず、新たに「がん幹細胞性を有する可塑性の高い細胞が分化・脱分化を繰り返し、動的に移行する」というような概念が現在では受け入れられつつある。この概念に従うと、一度分化したがん細胞が脱分化して CSCs となることや、その逆の現象もがん細胞を取り巻く微小環境の変化(がん細胞やニッチ細胞から分泌される様々な因子の影響など)によって容易に起こり得ると考えられる。このような CSCs の可塑性に関連する現象の 1 つとして上皮間葉転換やその逆の間葉上皮転換があげられ、本研究ではこの現象に着目している(Figure D)。

Fig D

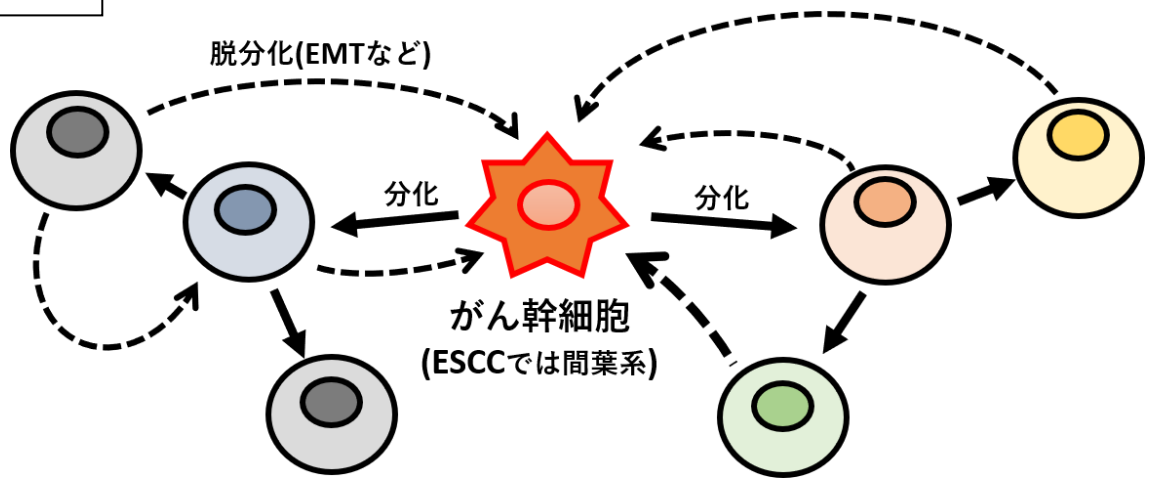


Figure D. CSCs の可塑性の概念図

CSCs は従来から考えられていた「静的な存在」ではなくがん細胞の分化・脱分によって生み出される「動的な存在」であるという概念が受け入れられつつある。

2-3-2　上皮間葉転換と間葉上皮転換 [38,41,45,54]

上皮間葉転換(EMT)は上皮系の形態を持つ細胞が間葉系の形態を持つ細胞に転換する現象であり、Greenburg, G.と Hay, E.D.によって 1982 年に提唱された。この現象は可逆的と考えられており、逆の現象である間葉上皮転換(MET)も起こることが知られている。現在では、EMT は大きく分けて 3 つの場面で起こると考えられている。1 つ目は、発生過程における EMT であり、胎生期に起こる様々な現象(組織

や器官の形成や成長・分化など)において重要な役割を果たしている(Type I EMT)。2 つ目は、創傷治癒・組織線維化における EMT であり、創傷治癒過程で中心的に働く線維芽細胞の一部は上皮細胞の EMT によって供給されることが知られている(Type II EMT)。3 つ目は、がんにおける EMT であり、本研究で着目したものである(TypeIII EMT)。がん細胞は EMT によって間葉系の形態(紡錘形)を獲得するとともに運動能・浸潤能の亢進、細胞老化やアポトーシスへの耐性の獲得といった形質の変化も生じる。この現象ががんの浸潤・転移・悪性化とうまく結びつくことから、がんにおける EMT の重要性が示唆されている。

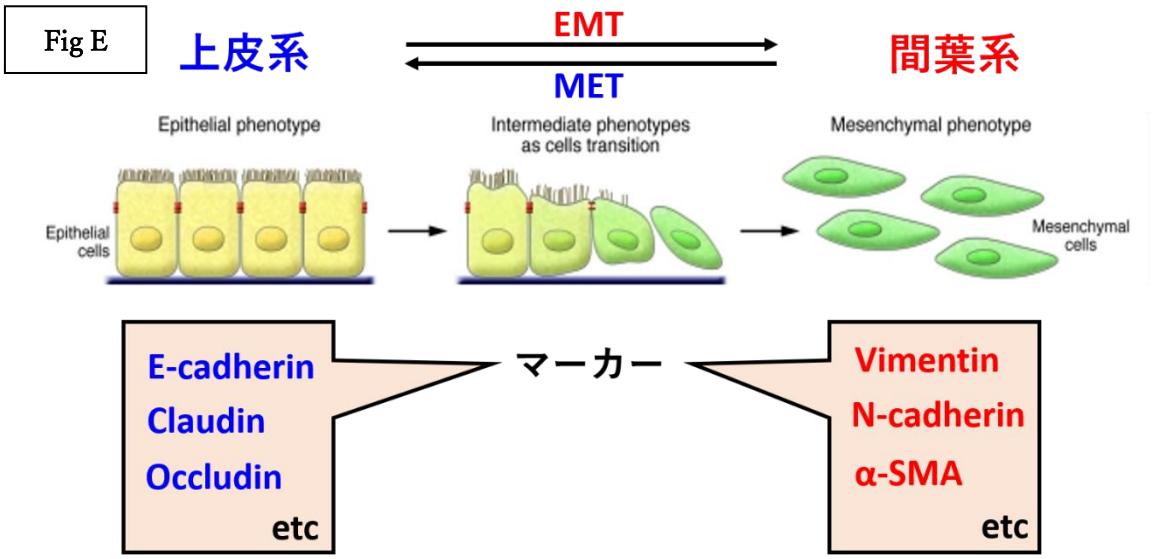


Figure E. EMT の模式図と代表的なマーカー遺伝子

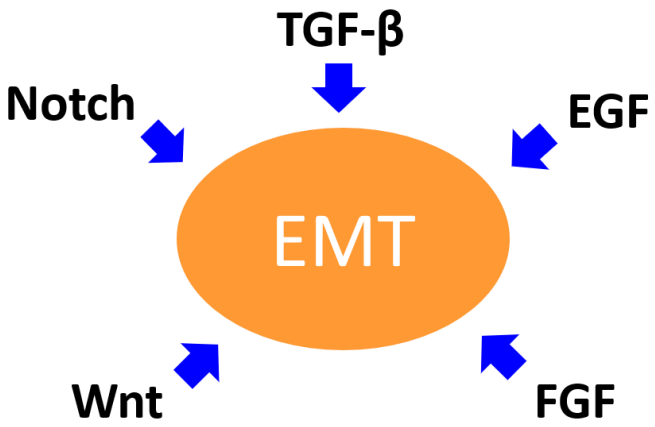
EMT とは上皮系細胞が間葉系細胞に転換する形態変化のことで可逆的である。EMT に伴って上皮・間葉それぞれのマーカー遺伝子の発現が変化する(引用文献 54 より抜粋、一部追加)。

2-3-3 EMT のプロセスと関連する因子・シグナル [38,41,45,54]

EMT のプロセスとしては、上皮系の細胞接着において中心的な役割を果たしている E-cadherin の発現の低下が最も重要である。E-cadherin の発現低下に伴い細胞間接着が消失し、アクチンは細胞-細胞接着の構成配列から、細胞-細胞外マトリックスの接着点につながるアクチンストレスファイバーへと再構成され細胞は上皮としての形態を失う。これに伴って上皮系のマーカー遺伝子の発現は低下し、代わって間葉系のマーカー遺伝子の発現が上昇し、最終的に間葉系の形態となる。上皮系の代表的なマーカーとしては E-cadherin や claudin などが、間葉系の代表的なマーカーとしては vimentin や N-cadherin が挙げられる。また、両方のマーカーを持つも

のは、上皮-間葉の中間的な表現型を持つものと考えられる(Figure E)。
また、EMT に対しては多くの因子やシグナルが関わることが報告されている。具体的には、TGF-β、EGF、 FGF、 Notch、 Wnt などが挙げられる。さらには生体環境として炎症や酸化ストレス、低酸素状態でも EMT が誘導されることが知られている。細胞内のエフェクターとしては SNAIL、ZEB、TWIST などの転写因子が直接あるいは間接的にマーカー遺伝子の発現を制御することが知られている(Figure F)。

Fig F



	遺伝子	調節・制御シグナル
代表的な EMT関連 転写因子	SNAIL1, SNAIL2(SLUG)	TGF-β, Wnt, Notch, EGF, FGF
	TWIST1	MAPK(EGF,FGF,HGF, etc)
	ZEB1, ZEB2	TGF-β, Wnt, MAPK
	FOXO3A	AKT
	FOXA1, FOXA2	TGF-β, HGF, AKT

Figure F. EMT に関連するシグナルと転写因子

EMT には上図に示したように様々な因子・シグナルが関与する。細胞内のエフェクターとしては表に示した転写因子などが EMT 関連遺伝子の発現を調節している。

2-3-4 EMT と CSCs [38,41,44,45,54]

EMT と CSCs に関する知見も現在までに多数報告されており、EMT が幹細胞性の維持に重要であると考えられている。上皮系の癌細胞を TGF-β などを用いて EMT を起こさせると CSCs に類似した形質(遺伝子発現や性質)を獲得することが知られている。例えば、乳癌においては乳癌細胞に EMT を誘導すると $CD44^{high}/CD24^{low}$ の細胞(CSCs)が増加し、腫瘍形成能や薬剤耐性能、浸潤能などが増加する。さらに、CSCs マーカーである CD44 に関しては EMT によって isoform switch(CD44v form→CD44s form)が起こることも報告されている。このように、一度分化したがん細胞が

脱分化することも EMT によって説明できるため、前述した「腫瘍の不均一性」や「CSCs の可塑性」において EMT が重要であると考えられている。

2-4 本研究に直接関連する先行研究

2-4-1 我々の研究グループによる先行研究 [13-15,40,55]

これまでの我々の研究グループの先行研究として、大きく分けて 3 つのことを明らかにしている。1 つ目は、CSCs マーカーに関するものであり、「ESCC においては CD44 陽性かつ CD24 陰性の細胞($CD44^{high}/CD24^{low}$)が CSCs を多く含んでいる」ことを見出している。2 つ目は ESCC における EMT と CSCs の関連性についてであり、「EMT が ESCC の CSCs の増幅・維持に重要である」ことを明らかにしている。また、3 つ目は、ESCC において EMT に関連する各シグナルの阻害剤の CSCs に対する影響を検討した研究であり、「TGF-β、EGFR、 Notch の各阻害剤は ESCC の EMT を抑制し CSCs の増加を抑制するものの、既存の CSCs には影響を与えない」ということを明らかにした。

これらの先行研究から、ESCC に対して EMT の抑制のみならず、既存の CSCs を標的とした新たな治療戦略が必要と考えられる。

Fig G

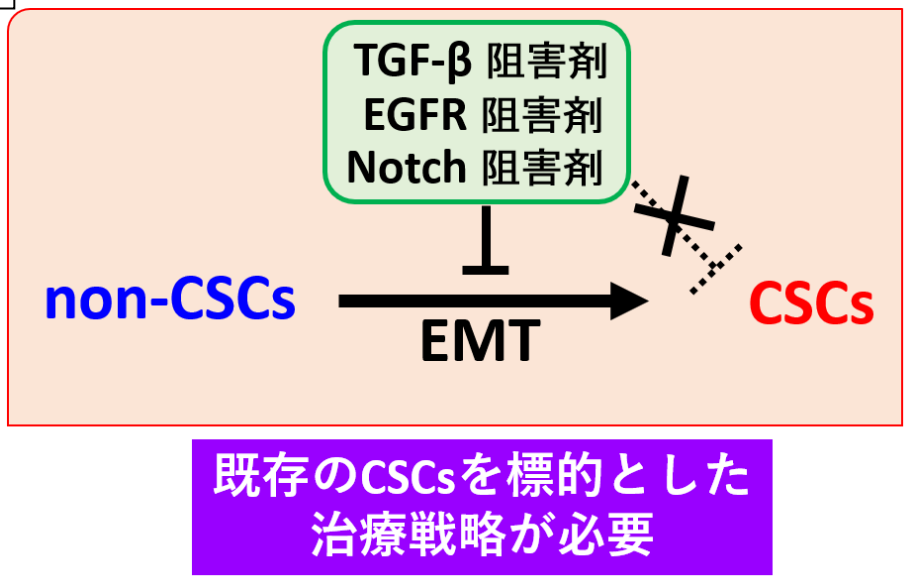


Figure G. 我々の研究グループによる先行研究のまとめ図

ESCC においても EMT によって CSCs が維持されており、TGF-β・EGFR・Notch の各シグナルの阻害による EMT 抑制により CSCs の増加は阻止できる。しかしながら、既存の CSCs に対しては各シグナルの阻害剤は影響を与えないため、既存の CSCs を標的とした治療戦略が必要である。

2-4-2 本研究の予備実験(ESCC-CSCs で重要な新規因子の探索)

先行研究を踏まえ、ESCC のがん幹細胞において重要な因子を同定するために予備実験として DNA マイクロアレイを行った。具体的には、セルソーターを用いて ESCC の CSCs 分画と非 CSCs 分画を分取し、遺伝子発現の違いを DNA マイクロアレイを用いて比較し、CSCs 分画で発現が上昇していた遺伝子をピックアップした(Figure H)。その結果、我々はこの中から EMT との関連性が報告されている FGF-2 に注目した。

Fig H

FACSを用いてCSCsとnon-CSCsを分取し遺伝子発現の違いを検討したデータ

ESCC-CSCsで発現が上昇している遺伝子

EMTとの関連性が高い FGF-2に注目

DNA microarray

Top 15 up-regulated genes in ESCC-CSCs

	Gene symbol	Fold change	p value
1	POSTN	31.3932	0.00017838
2	RSAD2	31.1157	6.48E-06
3	DCN	27.3992	1.04E-05
4	TNFAIP6	25.5706	7.38E-06
5	CCL2	21.3015	2.76E-07
6	IL8	20.6637	7.71E-05
7	SLC7A2	19.9647	2.43E-05
8	IFI44L	18.5502	9.05E-05
9	FGF-2	18.3714	1.62E-05
10	FAP	17.7659	8.03E-06
11	FBN1	17.4466	4.13E-05
12	CXCL1	17.0794	2.14E-07
13	IRAK3	16.943	5.58E-07
14	MX2	15.9709	4.12E-05
15	PTX3	15.1565	2.34E-06

DNA microarray (CSCs vs. Non-CSCs)
p values: significance analysis of microarrays (SAM)

Figure H. ESCC-CSCs で重要な新規因子の探索

ESCC の CSCs と非 CSCs の間での遺伝子発現の違いを DNA マイクロアレイを用いて比較した。その結果、CSCs 分画で発現が上昇していた FGF-2 に注目した。

2-5 線維芽細胞増殖因子-2(Fibroblast growth factor 2 : FGF-2)

2-5-1 FGF-2 と FGF ファミリー[16,17]

FGF-2 は塩基性 FGF(bFGF)とも呼ばれ、線維芽細胞を増殖させる因子として 1970 年代前半にウシの脳や下垂体抽出物から同定された。288 アミノ酸からなるプロペプチドの 142 番目と 143 番目の間が切断されることで成熟 FGF-2(C 末端側の 146 アミノ酸)となることが知られている。FGF-2 は線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーに属しており、現在ヒトではファミリーとして 22 種類の遺伝子が同定されている。さらに、アミノ酸配列の相同性から 7 つのサブファミリーに分けられる。また、機能面からは大きく 3 つのタイプに分けることができ、パラクライン作用で近傍細胞に働くもの、エンドクライン作用で遠隔の細胞に働くもの、イントラクライン作用で直接細胞内に働くものがある。今回我々が注目している FGF-2 はパラクライン作用を有するタイプに属している(Figure I)。

Fig I.1

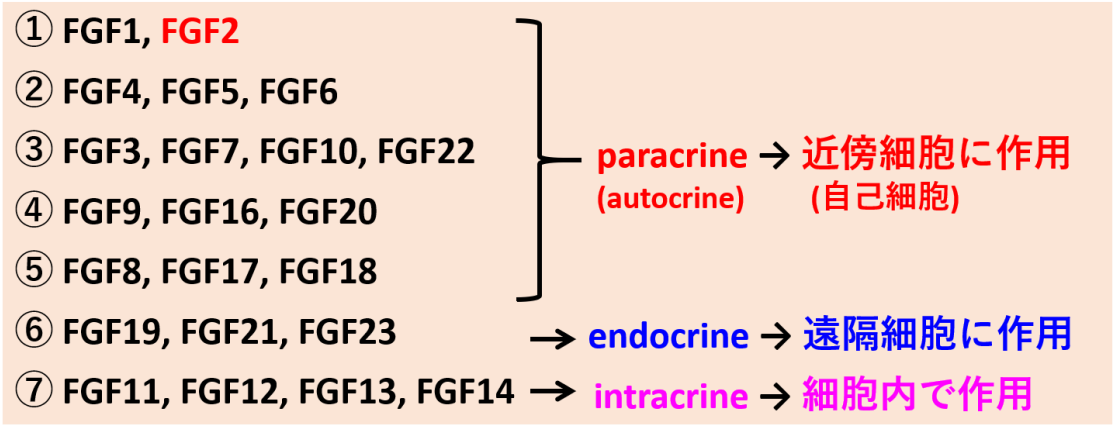


Fig I.2



Figure I. FGF ファミリーの分類と FGF-2 製剤

FGF ファミリーはアミノ酸配列の相同性で 7 つのサブファミリーに分類され、作用の面からは 3 つのグループに分けられる(Fig I.1)。FGF-2 の遺伝子組み換え体であるトラフェルミン製剤は臨床でも使用されている(Fig I.2 : 科研製薬 HP より引用)。

2-5-2 FGF-2 の機能とシグナル伝達 [16,17,58]

FGF-2 は線維芽細胞以外の様々な細胞にも働き、細胞の生存・分裂・分化・遊走に関与するだけではなく、血管新生、さらには前述の EMT をも誘導するなど多彩な機能を有していることが知られている。また、現在では実臨床においても FGF-2 の作用を応用して、遺伝子組み換え体であるトラフェルミン製剤が褥瘡と歯周組織再生の治療に用いられている。

分泌された FGF-2 のシグナルは細胞表面に存在する FGF 受容体(FGFR)へ結合することで細胞内に伝達される。FGFR はチロシンキナーゼ型受容体であり、FGFR1~4 までの 4 種類が同定されている。FGFR の細胞外ドメインに FGF-2 などのリガンドが結合すると 2 量体を形成し、細胞内ドメインがトランス自己リン酸化される。その後、SH2 ドメインをもつアダプター分子と結合することで MAPK 経路や PI3K 経路などの下流シグナルを活性化することが知られている。その他 STAT や PLCγ/PKC 経路の活性化も報告されている(Figure J)。

Fig J

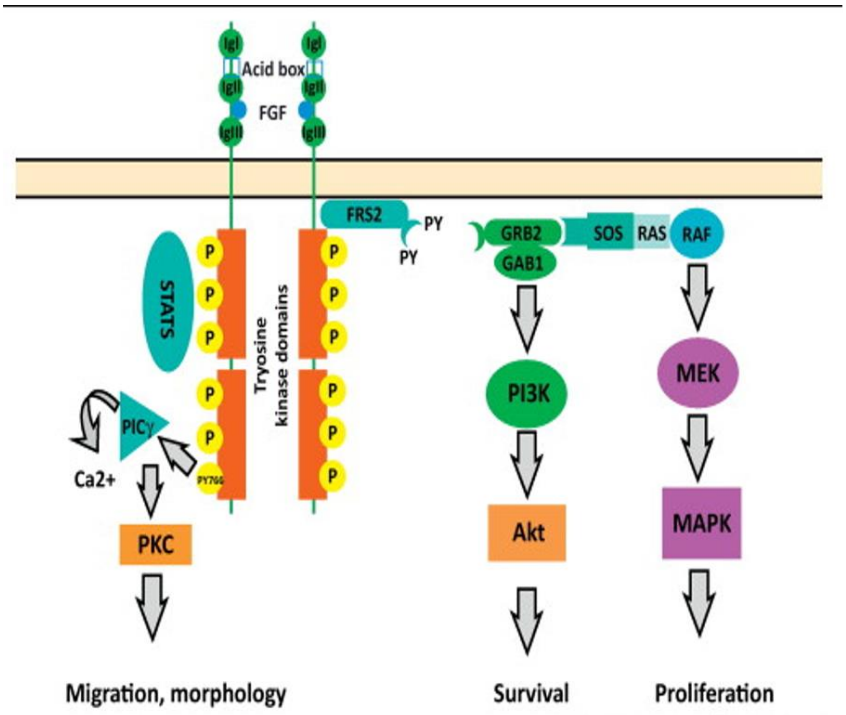


Figure J. FGF/FGFR シグナルの模式図

FGF はチロシンキナーゼ型受容体である FGFR に結合し、細胞内へシグナルを伝達する。関与する細胞内シグナルは MAPK 経路、PI3K/AKT 経路の他、STAT や PLCγ/PKC 経路などが報告されている(引用文献 58 より抜粋)

2-5-3 ESCC と FGF シグナルの先行研究 [18,56,57]

ESCC と FGF シグナルに関する研究は現在までに臨床サンプルを用いた研究が複数報告されている。具体的には、FGF-2 の発現が ESCC の再発や予後不良に関連するという報告や、FGFR1 の遺伝子増幅が ESCC の予後不良に関連するといった報告がある。基礎研究レベルでは、FGF シグナルが ESCC の lapatinib(EGFR、HER2 阻害剤)耐性に重要であることが報告されているが、FGF-2(FGF シグナル)と ESCC-CSCs との関連を調べた研究は現在まで行われていない。

2-6 本研究の目的

ここまでの序論で述べた背景を踏まえ、本研究では以下の 2 点を目的とした。

・FGF-2 が ESCC のがん幹細胞に及ぼす影響を解析すること

・FGF-2 シグナルが ESCC の新規治療標的となり得るか検討すること

3 実験方法

3-1 細胞株および細胞培養

3-1-1 ESCC 細胞株

TE8　　京都大学大学院医学研究科-腫瘍薬物治療学講座 大橋真也先生より譲受
HCE4　　京都大学大学院医学研究科-腫瘍薬物治療学講座 大橋真也先生より譲受
T-TeRAS ペンシルバニア大学-消化器科 中川裕先生より譲受

3-1-2 試薬および材料

DMEM(High glucose)	(ナカライテスク)
PBS pH 7.4 (1×)	(Life Technologies)
FBS	(Moregate Biotech)
Penicillin-Streptomycin solution(100×)	(Wako)
0.25%Trypsin-EDTA	(Life Technologies)
Keratinocyte-SFM(1×)	(Life Technologies)
Human Recombinant EGF	(Life Technologies)
BPE	(Life Technologies)

3-1-3 細胞培養条件(一般・継代)[31,32]

TE8 細胞および HCE4 細胞は DMEM(10%FBS, Penicillin-Streptomycin(1×))を用いて、37℃、5%CO_2 条件下で培養した。2~3 日おきに培地を交換し、細胞が 80~90%コンフルエントになった際に継代を施行した。継代の手順としては PBS で洗浄後 0.25% Trypsin-EDTA(37℃, 3 min)で処理して細胞をはがし、遠心分離(300×g , 3 min)後、上清を除去し、沈殿した細胞を DMEM に再懸濁して新しい培養皿に播種した。T-TeRAS 細胞は、正常ヒト食道上皮細胞をレトロウイルスにて hTERT、SV40LargeT 抗原、活性変異型 H-RAS(H-RAS^{V12})を導入し、形質転換(不死化・癌化)させた細胞株である。この細胞は KSFM(BPE 40 ng/ml, EGF 1 ng/ml, Penicillin-Streptomycin(1×))と DMEM(10%FBS, Penicillin-Streptomycin(1×))を 1:1 の割合で混合した培地を用いて 37℃、5%CO_2 条件下で培養した。培地交換・継代等は TE８細胞と同様の手順で行った。

3-2 qRT-PCR

3-2-1 試薬および材料

PBS pH 7.4 (1×)	(Life Technologies)
RNeasy® Mini Kit	(Qiagen)
UltraPure Distilled Water	(Life Technologies)

Prime Script™ RT Master Mix (Takara)
SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara)

3-2-2 実験操作(細胞)

day0 に 6 well プレートに細胞を 3×10^5 個/2 ml 播種し、day1 に各試薬を含んだ培地に交換し、48 hr 後(day3)に RNA 抽出を行った。試薬の添加のない実験系においては day2 に RNA を抽出した。

3-2-3 実験操作(RNA 抽出～遺伝子発現解析)

RNA 抽出は PBS で細胞を洗浄後に RNeasy® Mini Kit を用いて添付のプロトコールに従って行った。濃度測定は分光光度計(Nano Drop 2000, Thermo Scientific)を用いて行った。cDNA 合成は Prime Script™ RT Master Mix を用いて添付のプロトコールに従って行った。具体的には RNA (500 ng)と H_2O で 8 µl とし、そこに Master Mix を 2 µl 加えて total 10 µl の溶液にした。逆転写反応は 37℃で 15 min の後 85℃で 10 sec 反応させた。合成した cDNA は H_2O を 290 µl 加えて希釈した(最終濃度 : 約 1.67 ng/µl)。qRT-PCR の実験は、SYBR® Premix Ex Taq™を試薬として用い、装置およびソフトウェアは Step One real-time PCR system と Step One software version2.2.2 を用いた。具体的な実験条件は下表に記した。遺伝子発現レベルの解析は β -actin を内因性コントロールとして用いて、comparative threshold cycle (ddCt) method で計算した。なお、使用した primer の一覧は下表に記した。

qRT-PCR の反応液		
SYBR® Premix Ex Taq™	10	µl
Forward primer(10 µM)	0.5	µl
Reverse primer(10 µM)	0.5	µl
cDNA 希釈液	9	µl
total	20	µl

反応条件

95℃ 20 sec
95℃ 1 sec
60℃ 20 sec
} 40 cycle

qRT-PCR で使用した primer

FGF-2	Forward primer	: 5'-GCTGTACTGCAAAAACGGGG-3'
	Reverse primer	: 5'-TAGCTTGATGTGAGGGTCGC-3'
CDH1	Forward primer	: 5'-GAATGACAACAAGCCCGAAT-3'
	Reverse primer	: 5'-ACCTCCATCACAGAGGTTCC-3'
Vimentin	Forward primer	: 5'-AGGCGAGGAGAGCAGGATTT-3'
	Reverse primer	: 5'-AGTGGGTATCAACCAGAGGGA-3'
CD24	purchased from Qiagen. QuantiTect primer QT00216811	
CD44(total)	Forward primer	: 5'- TAAGGACACCCCAAATTCCA-3'

	Reverse primer	：5'- ACTGCAATGCAAACTGCAAG-3'
CD44s	Forward primer	：5'-TCCCTGCTACCAGAGACCAA-3'
	Reverse primer	：5'-ACAGCTCCATTGCCACTGTT-3'
CD44v	Forward primer	：5'-AGCAACTGAGACAGCAACCA-3'
	Reverse primer	：5'-CCGTGGTGTGGTTGAAATGG-3'
β -actin	Forward primer	：5'-TTGCCGACAGGATGCAGAA-3'
	Reverse primer	：5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'

3-3 Western blotting

3-3-1 試薬および材料

PBS pH 7.4 (1×)	(Life Technologies)
Tris ultra pure	(MP Biomedicals)
HCl	(Wako)
SDS	(Wako)
Glycerol	(Wako)
BPB	(Wako)
2-ME	(関東化学)
Glycine	(関東化学)
Methanol	(関東化学)
NaCl(sodium chloride)	(関東化学)
Tween20	(関東化学)
Can Get Signal® Solution1	(TOYOBO)
Immobilon™ Western chemiluminescent HRP substrate	(MILLIPORE)
スキムミルク	(CO・OP)

各種使用溶液

SDS-sample Buffer(1×)

(Tris-HCl pH 6.8(25 mM), SDS(1%), glycerol(5%), BPB(0.01%), 2-ME(2%),in H_2O)

SDS-PAGE-buffer

(Tris(25 mM), glycine(192 mM), SDS(0.1%), in H_2O)

SDS-PAGE-running gel(10%)

(Tris-HCl pH 8.8(375 mM), A.A-Bis(9.7%-0.3%), SDS(0.1%), APS(0.05%)
TEMED(0.1%))

SDS-PAGE-running gel(7.5%)

(Tris-HCl pH 8.8(375 mM), A.A-Bis(7.3%-0.2%), SDS(0.1%), APS(0.05%)

TEMED(0.1%))
SDS-PAGE-stacking gel
(Tris-HCl pH 6.8(125 mM), A.A-Bis(3.9%-0.1%), SDS(0.1%), APS(0.04%)
TEMED(0.2%))
Transfer buffer
(Tris(25 mM),glycine(192 mM), methanol(10%), in H_2O)
TBS-T
(Tris-HCl pH 7.5(20 mM), NaCl(0.8%), Tween20(0.05%), in H_2O)

3-3-2 実験操作(細胞 ; E-cad,Vimentin 検出用)

day0 に 6 well プレートに細胞を 3×10^5 個/2 ml 播種し、day1 に各試薬を含んだ培地に交換し、48 hr 後(day3)にタンパク抽出を行った。試薬の添加のない実験系においては day2 にタンパク質を抽出した。

3-3-3 実験操作(細胞 ; FGFR 下流シグナル検出用)

day0 に 6 well プレートに細胞を 3×10^5 個/2 ml 播種し、day1 に無血清培地に交換(over night)、day2 に各阻害剤と血清を含む培地あるいは FGF-2 を含む無血清培地に交換し、15 min 後にタンパク抽出を行った。

3-3-4 実験操作(タンパク抽出)

PBS で細胞を洗浄後、SDS-sample Buffer(1×)350 µl を添加しセルスクレイパーを用いて回収した。回収溶液は氷冷下で超音波破砕(10 sec)を行った後、遠心し(20,400 rpm, 5 min)上清を回収後、95℃で 15 min 加熱した。

3-3-5 実験操作(SDS-PAGE~タンパク検出)[30]

SDS-PAGE 用のゲルは 7.5%~10%のものを自作し、使用した。SDS-PAGE は専用の buffer(SDS-PAGE-buffer)を用い、ゲル 1 枚あたり電流を 20 mA に固定して約 1 hr 泳動した。Transfer はセミドライ法を用いて行った。具体的には、ろ紙、ゲル、PVDF 膜、ろ紙の順に重ね合わせ、専用の buffer(transfer buffer)で十分浸し、ゲル 1 枚あたり電流を 85 mA(高分子量タンパクが目的の際は 120 mA)に固定して 70 min 行った。ブロッキングは 5%スキムミルク/TBS-T に浸して行った(室温, 30 min)。1 次抗体は Solution1 を用いて下表に示す希釈濃度でそれぞれ反応させた(室温, 1~2 hr)。TBS-T で洗浄後(5 min×3 回)、2 次抗体は 10000 倍で TBS-T に希釈し反応させた(室温, 30 min)。TBS-T で洗浄後(5 min×3 回)、Immobilon™ を用いて化学発光によりタンパク質の検出を行った。なお、検出には ImageQuant LAS4000(GE)を使用した。

3-4　ELISA

3-4-1 試薬および材料

PBS pH 7.4 (1×)	(Life Technologies)
Human FGF basic ELISA Kit(FGF2)	(Abcam)

3-4-2 実験操作(細胞)

day0 に 24 well プレートに細胞を 1×10^5 個/500 µl 播種し、day1 に PBS で洗浄後、新しい培地 500 µl に交換し、48 hr 後(day3)に培養上清を回収した。回収した培養上清は遠心分離を行い(720×g, 5 min)、沈殿物を除去した。

3-4-3 実験操作(測定)

培養上清に含まれる FGF-2 の量は Human FGF basic ELISA Kit(FGF2)を用いて、添付のプロトコールに従って測定した。なお、培養上清は 1 well あたり 100 µl 使用し、吸光度(450 nm)の検出は GloMax®-Multi Detection System(Promega)を用いて行った。

3-5　soft-agarose colony formation assay

3-5-1 試薬および材料

DMEM(High glucose)	(ナカライテスク)
FBS	(Moregate Biotech)
Penicillin-Streptomycin solution(100×)	(Wako)
DMEM powder(High glucose, pyruvate)	(Thermo fisher scientific)
$NaHCO_3$	(SIGMA-Aldrich)
Ultra pure™ LMP agarose	(Thermo fisher scientific)

1×DMEM
(10%FBS, Penicillin-Streptomycin(1×) in DMEM(High glucose))

2×DMEM
(DMEM powder(1×),10%FBS, Penicillin-Streptomycin(1×),$NaHCO_3$(44 mM) in DMEM(High glucose))

3-5-2 実験操作(基底層ゲル、細胞含有層ゲル、培地層)

準備

LMPagarose1.6 g と H_2O 80 ml を混合後電子レンジで加熱し、2%ゲル溶液とした。

2%ゲル溶液、1×DMEM、2×DMEM は全てウォーターバスで 40℃に保温した。

基底層ゲルの作成

2%ゲル溶液と 2×DMEM を 1:1 の割合で混合し(1%agarose in DMEM)、350 µl ずつ 24 well プレートにすばやく分注し、室温で 30 min インキュベートした(基底層ゲル)。

細胞含有層ゲルの作成

ESCC 細胞株の懸濁液(1×10^4 個/ml in DMEM)と基底層ゲル作成時に用いた 1% agarose in DMEM 溶液を 1:2 の割合で混合し、基底層ゲルの上に各ウェル 300 µl ずつすばやく分注し、室温で 30 min インキュベートした(細胞含有ゲル層)。その後 37℃、5% CO_2 の通常培養環境下に置いた。24 hr 後より細胞含有ゲル層の上部に各条件の試薬を含んだ DMEM を 500 µl ずつ入れ 2 week 培養した。なお、培地交換は 3 日に 1 回の頻度で行った。

3-5-3 実験操作(コロニー計測)

100 µm 以上のコロニーを対象に光学顕微鏡目視下でカウントした。カウントは 1 ウェル当たり 2 人が独立に行い、2 人の計測値の平均をウェルの代表値とした。なお、この実験は n=4 で行った。

3-6　フローサイトメトリーおよび FACS

3-6-1 試薬および材料

PBS pH 7.4 (1×)	(Life Technologies)
0.25%Trypsin-EDTA	(Life Technologies)
HBSS(1×,Ca(-),Mg(-))	(Thermo fisher scientific)
BSA	(SIGMA-Aldrich)
APC mouse anti-human CD44	(BD Bioscience)
PE/Cy7 anti-human CD24	(BioLegend)
7-AAD	(BD Bioscience)

1×FACS buffer
(HBSS(1×,Ca(-),Mg(-)),0.5%BSA)

3-6-2 実験操作(細胞)

day0 に 6well プレートに細胞を 3×10^5 個/2 ml 播種し、day1 に各試薬を含んだ培地に交換し、48 hr 後(day3)に細胞を回収し FACS による解析を行った。試薬の添加のない実験系においては day2 に細胞を回収し FACS による解析を行った。なお、細胞の回収方法は継代時と同様に PBS で洗浄後 Trypsin で剥がし、遠心分離により回収

した。

3-6-3 実験操作(抗体反応、FACS 解析)

回収した細胞を 2~3×10^5 個/100 µl の濃度になるように 1×FACS buffer に再懸濁し、セルストレイナーを通過させた後、100 µl ずつ測定チューブに分注した。抗体は 2.5 µl ずつ(50 倍希釈)各チューブに入れ、氷上、暗所で 30 min インキュベートした後、洗浄操作(1×FACS buffer　2 ml を各チューブに加え、混合した後、遠心分離(300×g, 3 min)して上清を除去)を 2 回行い、最終的に 1×FACS buffer 500 µl に再懸濁してフローサイトメーター (FACS Canto II, BD)もしくはセルソーター(FACS AriaⅢ, BD)により、解析および目的細胞の分離を行った。なお死細胞は 7-AAD の取り込みを指標に除外した。

3-7　Drug sensitivity assay

3-7-1 試薬および材料

Cell counting Kit　(Dojindo)

3-7-2 実験操作(細胞)

Day0 に T-TeRAS 細胞を 5×10^3 個/100 µl の濃度にし、96 ウェルプレートに 100 µl ずつ播種した。Day1 に各薬剤を含んだ培地に交換し、Day4 に WST-8 アッセイを行った。WST-8 アッセイは Cell counting Kit を用いて添付のプロトコールに従って行った。

3-8　Xenograft experiment *in vivo*

3-8-1 動物(ヌードマウス)

BALB/c slc-nu/nu　6 週齢、メス　(Japan SLC)

動物実験は北海道大学医歯学総合研究棟の動物実験施設を利用し、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」を順守し、承認された実験プロトコールに基づいて行った。

ヌードマウスは 1 ケージ当たり 5 匹ずつ入れ、餌、飲水共に自由に行えるようにした。ケージの交換は 3 日に 1 回の頻度で行った。

3-8-2 試薬および材料

Matrigel®　(CORNING)

ソムノペンチル(64.8 mg/ml)　(共立製薬)

UltraPure Distilled Water　(Life Technologies)

PBS pH 7.4 (1×)　(Life Technologies)
DMSO　(Wako)

麻酔液
(ソムノペンチル原液を UltraPure Distilled Water で 10 倍希釈した: 6.48 mg/ml)

3-8-3 実験操作(ESCC 細胞株移植)

細胞株の移植は麻酔下で行った。麻酔液は投与量が 64.8mg/kg となるように各マウスの体重から計算し腹腔内投与した。TE8 細胞および T-TeRAS 細胞はそれぞれに適した培地(3-1-3 参照)に 1×10^6 個/50 µl の濃度の懸濁液を作成し氷上に置いた。Matrigel®は細胞移植前日から氷上に置き、緩やかに融解させた。細胞懸濁液と Matrigel®を 1:1 の割合で混合し、1 ml シリンジ(27G 針)に充填後、速やかにヌードマウスの肩付近の皮下に注入した(100 µl/injection)。

3-8-4 実験操作(腫瘍測定と屠殺)

腫瘍の測定は実験プロトコールで示したように麻酔下で週に 1 度の頻度で行った。麻酔液は投与量が 64.8 mg/kg となるように各マウスの体重から計算し腹腔内投与した。腫瘍のマウスへの生着の判定は予備実験の結果から移植後 14 日に行い、その時点で腫瘍の生着が認められないもの(移植箇所の腫脹の消失)は以降の測定対象から除外した。腫瘍の測定は digital calipers を用いて各腫瘍の長径と短径を計測し、腫瘍体積を算出した。なお、算出式は体積＝長径×短径×短径÷2 を用いた。屠殺は麻酔液を 80~100 mg/kg 投与して充分な意識消失を確認した後、頚椎脱臼法により行った。

3-8-5 実験操作(薬剤投与)

薬剤投与は実験プロトコール(Figure K)で示したように 1 ml シリンジ(27G 針)を用いて隔日に腹腔内投与にて行った。投与時の溶媒は PBS と DMSO を 1:1 の割合で混合した溶液とした(投与用量: 200 µl/mouse)。なお、AZD4547 は 5 mg/kg、trametinib は 2 mg/kg の用量を投与した。

Fig K.1

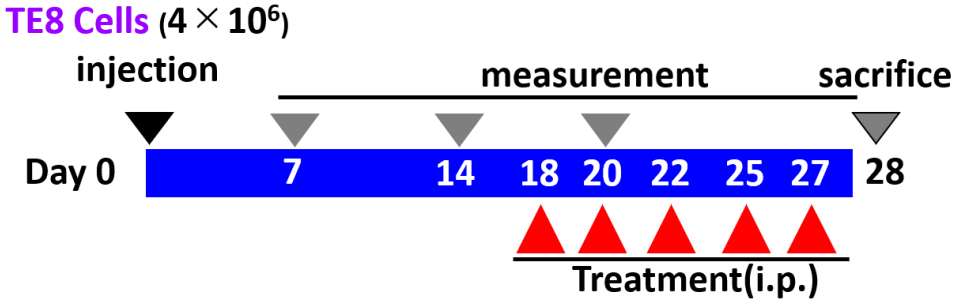


Fig K.2

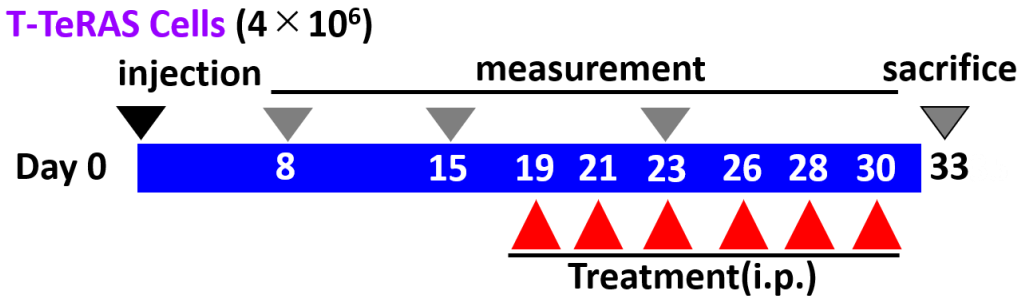


Figure K. 動物実験のプロトコール図

TE8 細胞(FigK.1)、T-TeRAS 細胞(FigK.2)

3-9　免疫組織染色(IHC)

3-9-1 試薬および材料

10%ホルマリン液	(Wako)
UltraPure Distilled Water	(Life Technologies)
anti-phosphorylated-FGFR1 antibody(Y653+Y654)	(Abcam)
anti-phosphorylated-ERK(phospho-p44/42 MAPK)	(Cell Signaling Technologies)
anti-Vimentin	(Biocare Medical)
anti-E-cadherin	(Dako)

3-9-2 実験操作(検体処理～染色)[24]

HE 染色および IHC は文献 24 の方法を参考に行った。具体的には、屠殺後に摘出した腫瘍検体を 10%ホルマリン溶液で浸し、以後の操作(切片作成や染色)を株式会社モルフォテクノロジーに依頼した。脱パラフィン過程は Target retrieval solution(pH9.0)を用いて Dako PT Link system を使用し 95℃ で 20 min 行なった．その後、各条件の抗体(下表)で染色し、検出は EnVision Flex system(Dako)にて行った。

IHC で用いた抗体の反応条件

p-FGFR	1:50	over night	4℃
p-ERK	1:200	60 min	room temperature
E-cadherin	1:100	60 min	room temperature
Vimentin	1:300	30 min	room temperature

3-10 データ処理と統計解析

In vitro の実験結果は平均値±SD で表示した。実験群が 2 群の場合の比較はステューデント両側 *t* 検定を用い、実験群が 3 群以上の場合はテューキー多重比較検定を用いて解析した。*In vivo* の実験結果は平均値±SEM で表示した。実験群間の比較はテューキー多重比較検定を用いて解析した。全ての実験に関して $P<0.05$ を統計学的に有意とした。なお、データ処理・解析は GraphPad Prism (Version 6, GraphPad Software, Inc. USA)を使用して行った。

4 実験結果

4-1 ESCC 細胞株-CSCs 分画の特徴および FGF-2 の発現・分泌の検討

4-1-1 ESCC 細胞株の表面抗原解析と細胞ソーティング

まず、ESCC 細胞株である TE8 細胞と HCE4 細胞を CD44、CD24 に対する抗体で染色し、フローサイトメーターで細胞集団の分布を解析した。その結果、先行研究通り、TE8 細胞と HCE4 細胞は大部分の細胞で CD44 が陽性であった。そのため、CD24 を指標にセルソーターを用いて CSCs 分画である CD24L 細胞と非 CSCs 分画である CD24H 細胞に分取した(Figure 1)。

Fig 1.1

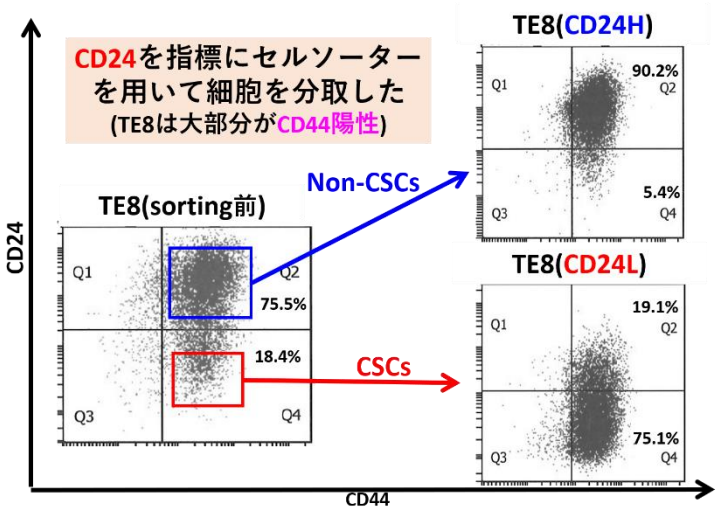


Fig 1.2

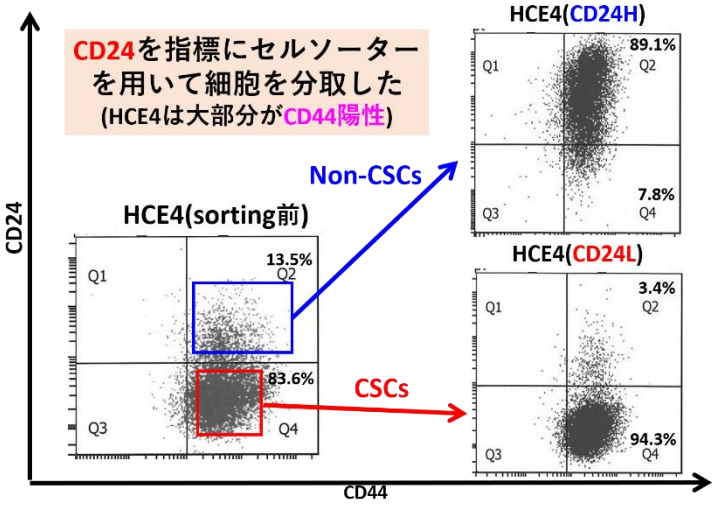


Figure 1　TE8 細胞および HCE4 細胞の表面抗原解析と細胞ソーティング

TE8(Fig1.1)、HCE4(Fig1.2)の両細胞を CD24、CD44 の抗体で染色し、フローサイトメーターで細胞分布を解析後、セルソーターを用いて CSCs 分画と非 CSCs 分画に分離した。

4-1-2 ESCC-CSCs 分画と非 CSCs 分画の EMT マーカーの発現解析

分取した細胞を用いて、これらの細胞間の EMT マーカーの発現を上皮系のマーカーである E-cadherin を指標に比較した。その結果、TE8 細胞と HCE4 細胞のどちらの細胞においても、E-cadherin の発現(mRNA、タンパク質)が CSCs 分画である CD24L 細胞で低下していた(Figure 2)。先行研究においても CD24L 細胞は間葉系の形態であることが示されており、そのことに準じた結果といえる。

Fig 2.1

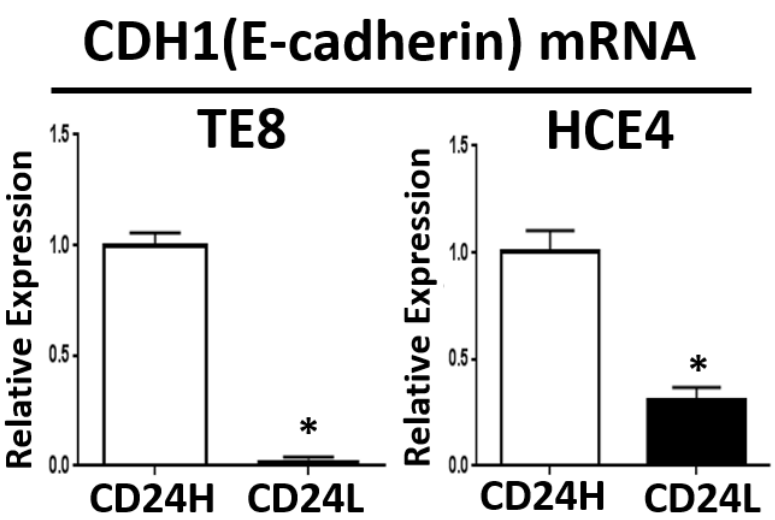


Fig 2.2

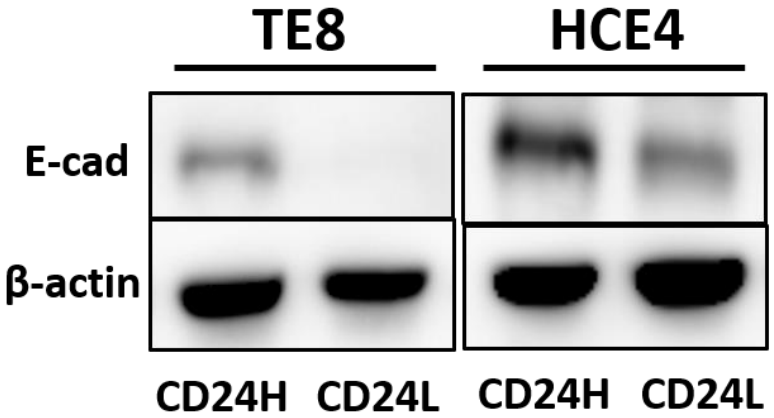


Figure 2　CD24H(非 CSCs)と CD24L(CSCs)細胞間の EMT マーカー発現解析

上皮系のマーカーである E-cadherin(CDH1)の発現を mRNA レベル(Fig2.1)、タンパク質レベル(Fig2.2)で検討した。TE8、HCE4 の両細胞で CD24L(CSCs)では E-cadherin の発現が減少していた。(*P < 0.05 vs CD24H 細胞)

4-1-3 ESCC-CSCs 分画と非 CSCs 分画の FGF-2 の発現解析

続いて、分取した細胞を用いて本研究で注目している FGF-2 の発現・分泌をそれぞれ qRT-PCR 法および ELISA 法を用いて検討した。その結果、CSCs 分画である CD24L 細胞は非 CSCs 分画である CD24H 細胞よりも FGF-2 の発現(mRNA)と分泌（培養上清含有量）が高いことが明らかとなった(Figure 3)。このことは予備実験で行ったマイクロアレイの結果と一致しており、信頼性の高い結果と考えられる。

Fig 3.1

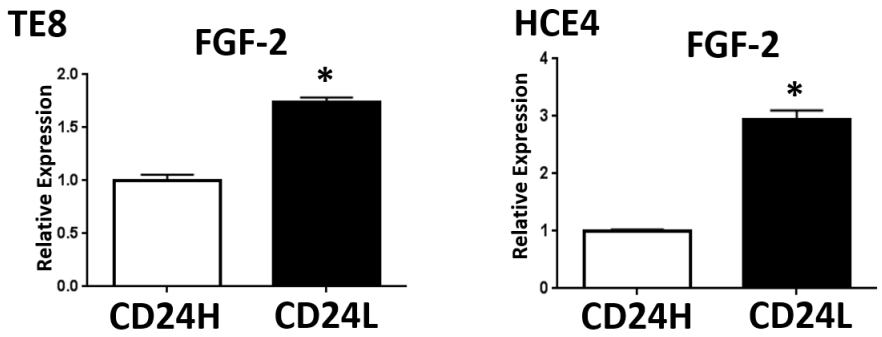


Fig 3.2

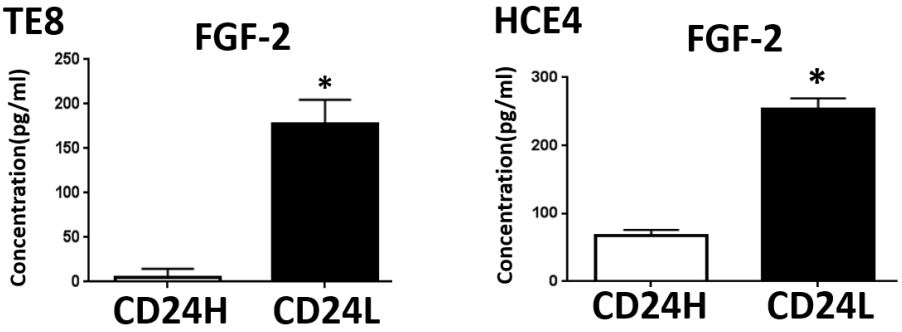


Figure 3　ESCC-CSCs 分画と非 CSCs 分画の FGF-2 の発現解析

TE8、HCE4 の両細胞ともに CD24H(非 CSCs)細胞よりも CD24L(CSCs)細胞の方が FGF-2 の発現(Fig3.1)および分泌(Fig3.2)が亢進していた。(*P < 0.05 vs CD24H 細胞)

4-2 ESCC 細胞株に対する FGF-2 の作用の検討

4-2-1 FGF-2 による CSCs マーカーの発現変動解析

前項の結果から、FGF-2 の発現・分泌が CSCs 分画で実際に亢進していることが確認できたので、次に FGF-2 が CSCs の増幅(増加)に関与しているか検討した。具体的な手法としては ESCC 細胞株からセルソーターを用いて非 CSCs 分画である CD24H の細胞を分取し、そこに FGF-2 を添加して培養した後、細胞表面抗原の発現変化をフローサイトメーターを用いて、遺伝子発現変化を qRT-PCR 法および western blot 法により検討した。その結果、FGF-2 によって CD24H 細胞が CSCs 分画である CD24L 細胞へと転換することが認められた(Figure 4)。

Fig 4.1

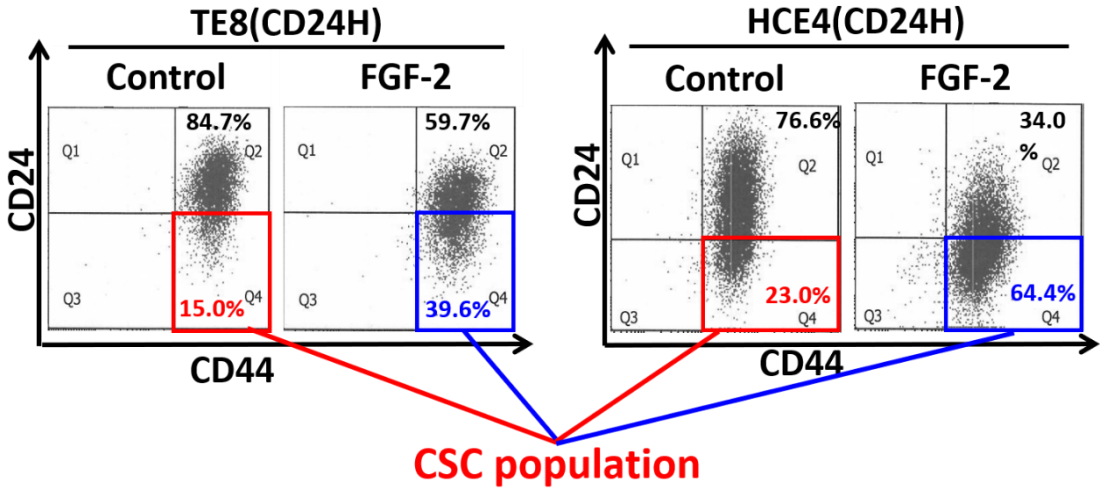


Fig 4.2

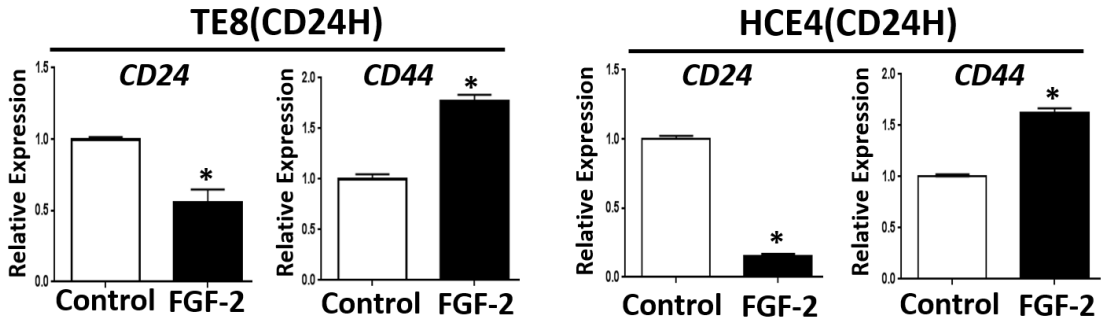


Figure 4　FGF-2 による CSCs マーカーの発現変動解析

TE8、HCE4 細胞の CD24H(非 CSCs)細胞を FGF-2(50 ng/ml)を含んだ培地で 48 時間培養後、CSCs マーカーの発現変化を解析した。FGF-2 によって CD24 が低下し、CD44 が増加した(CD24L 細胞が増加)。(*P < 0.05 vs Control)

4-2-2 FGF-2 による EMT マーカーの発現変動解析

さらに EMT マーカーの発現に関しても FGF-2 によって上皮系マーカー(E-cadherin、CD44v)の発現低下および間葉系マーカー(vimentin、CD44s)の発現上昇が確認され、EMT の進行(より間葉系の細胞へのシフト)が示唆される結果となった(Figure 5)。

Fig 5.1

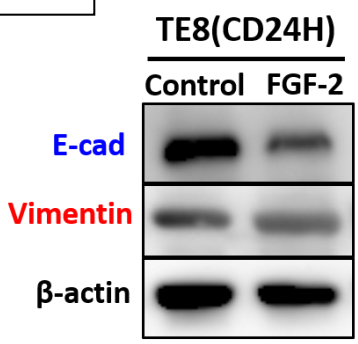


Fig 5.2

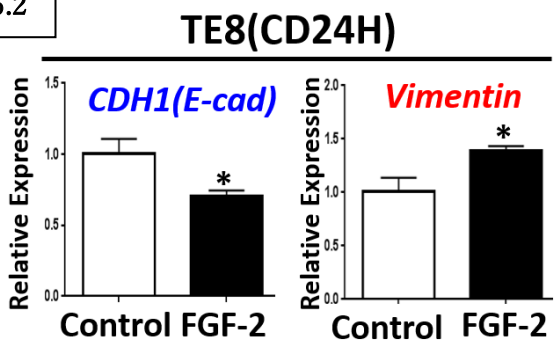


Fig 5.3

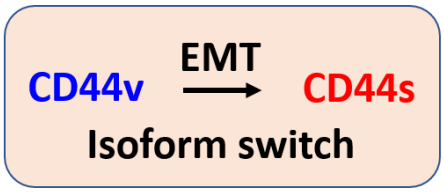


Fig 5.4

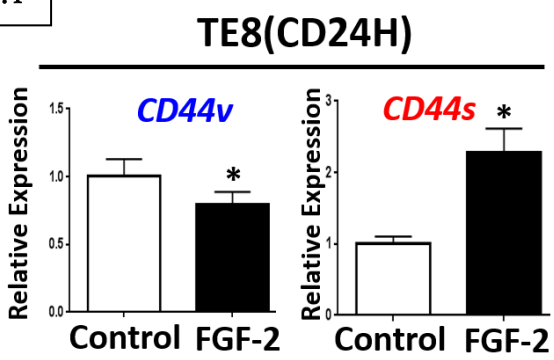


Figure 5　FGF-2 による EMT マーカーの発現変動解析

TE8、HCE4 細胞の CD24H(非 CSCs)細胞を FGF-2(50 ng/ml)を含んだ培地で 48 時間培養後、EMT マーカーの発現変化を解析した。FGF-2 によって E-cadherin が低下し、vimentin が増加した(Fig 5.1-2)。また、CD44 の isoform switch も同時に起こっていた(Fig5.3-4)。(*P < 0.05 vs Control)

4-2-3 FGF-2 による ESCC 細胞株の足場非依存的な腫瘍形成能の検討(*in vitro*)

次に、FGF-2 添加時の CSCs 増加を機能面で検証するために、CSCs の特徴の 1 つである足場非依存的な腫瘍形成能を soft-agarose colony formation assay を用いて検討した。その結果、FGF-2 添加群ではコントロール群と比較してコロニー形成数が増加し、腫瘍形成能の上昇が確認された(Figure 6)。以上の結果から、FGF-2 は CSCs の増幅に重要である可能性が示唆された。なお、FGF-2 添加時の細胞内シグナル応答(FGF-2 の作用確認)に関しては代表的な FGFR 下流シグナルである MAPK 経路(ERK のリン酸化)と PI3K-AKT 経路(AKT のリン酸化)を指標に western blot 法を用いて確認した(両経路ともに伝達を確認、Figure 6)。

Fig 6.1

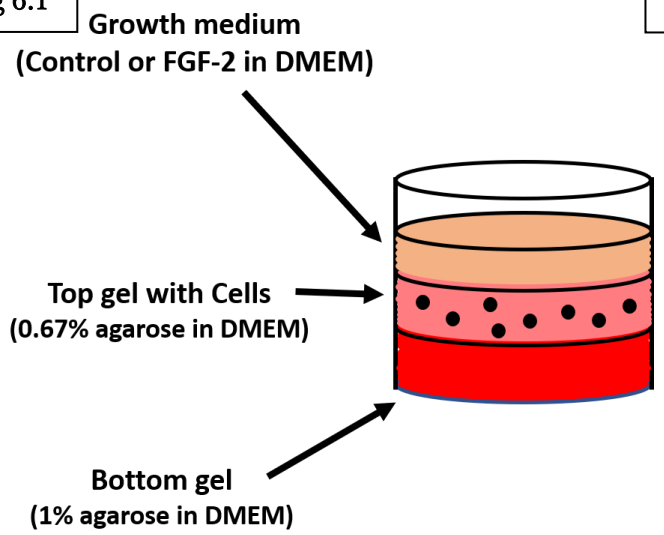


Fig 6.2

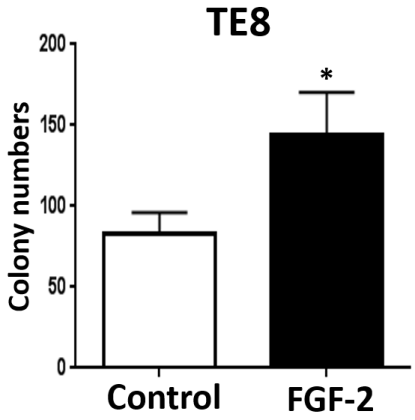


Fig 6.3

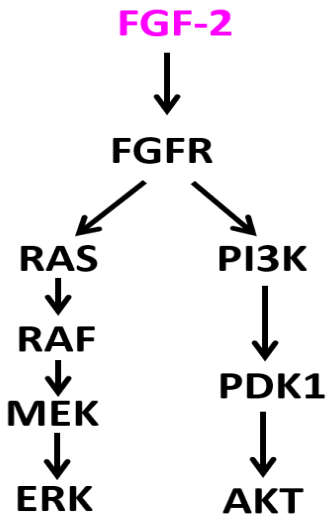


Fig 6.4

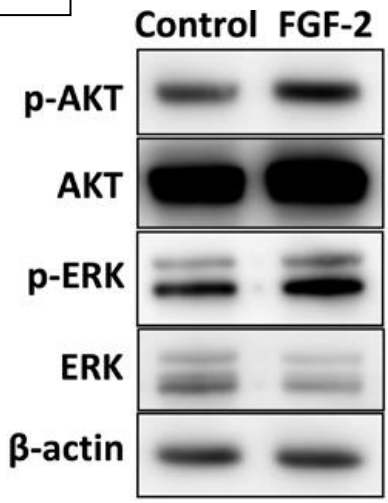


Figure 6　FGF-2 による ESCC 細胞株の足場非依存的な腫瘍形成能の検討(*in vitro*)および FGF-2 の作用確認(下流シグナル)

Soft-agarose colony formation assay は TE8 細胞を用いて行った。FGF-2(50 ng/ml)は最上部の growth medium 層に添加し 2 週間培養後、形成したコロニー数を計測した。FGF-2 添加によってコロニー形成数が増加した（Fig 6.1-2)。また、FGF-2 の作用(下流シグナル)を TE8 細胞を用いて確認した。TE8 細胞は無血清培地で一晩培養した後、Control or FGF-2(50 ng/ml)を含んだ培地(有血清)で 15 分刺激し、タンパク抽出後 Western blotting を行い ERK と AKT のリン酸化を評価した（Fig6.3-4)。(*P < 0.05 vs Control)

4-3 ESCC 細胞株に対する FGFR 阻害剤の作用の検討

4-3-1 FGFR 阻害剤(AZD4547)による CSCs マーカーの発現変動解析

これまでの結果から、FGF シグナルを阻害することで ESCC-CSCs を減少させることができるのではないかと考えた。そこで、FGFR の特異的阻害剤である AZD4547 を用いた際の ESCC-CSCs に与える影響を検討した。具体的な手法としては ESCC 細胞株からセルソーターを用いて CSCs 分画である CD24L の細胞を分取し、そこに AZD4547 を添加して培養した後、細胞表面抗原の発現変化をフローサイトメーターを用いて、遺伝子発現変化を qRT-PCR 法および western blot 法により検討した。その結果、AZD4547 によって CD24L 細胞が CD24H 細胞へと転換することが認められた(Figure 7)。

Fig 7.1

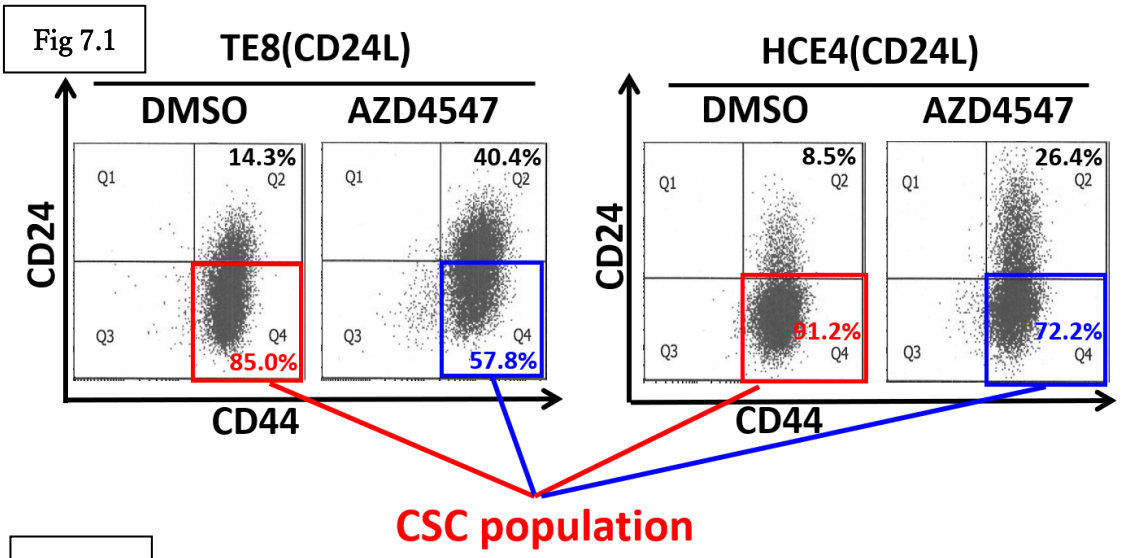


Fig 7.2

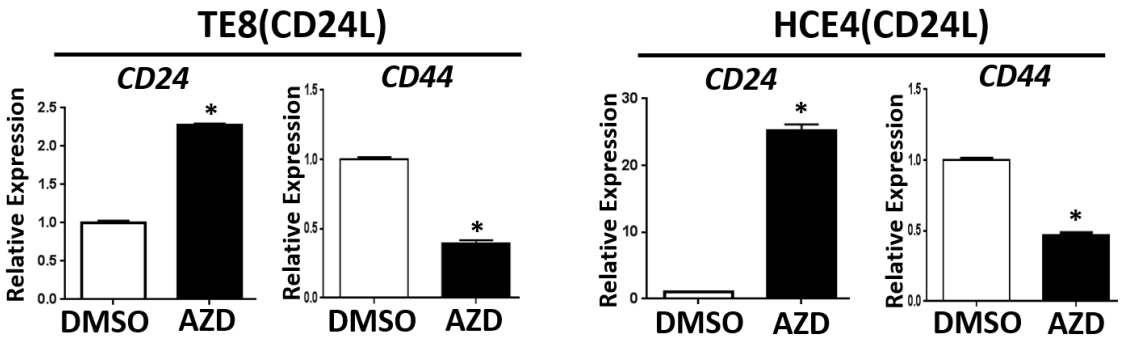


Figure 7　FGFR 阻害剤(AZD4547)による CSCs マーカーの発現変動解析

TE8、HCE4 細胞の CD24L(CSCs)細胞を AZD4547(2 μM)を含んだ培地で 48 時間培養後、CSCs マーカーの発現変化を解析した。AZD4547 によって CD24 が増加し、CD44 が減少した(CD24H 細胞が増加)。(*P < 0.05 vs DMSO)

4-3-2 FGFR 阻害剤(AZD4547)による EMT マーカーの発現変動解析

さらに EMT マーカーの発現に関しても AZD4547 によって上皮系マーカー(E-cadherin、CD44v)の発現上昇および間葉系マーカー(vimentin、CD44s)の発現低下が確認され、CSCs の減少とともに MET の進行(上皮系の細胞へのシフト)が示唆される結果となった(Figure 8)。

Fig 8.1

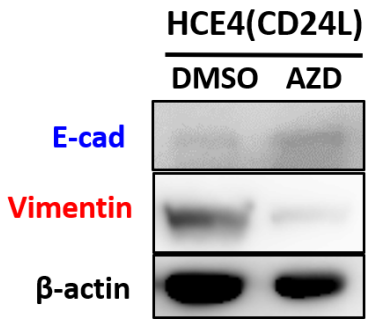


Fig 8.2

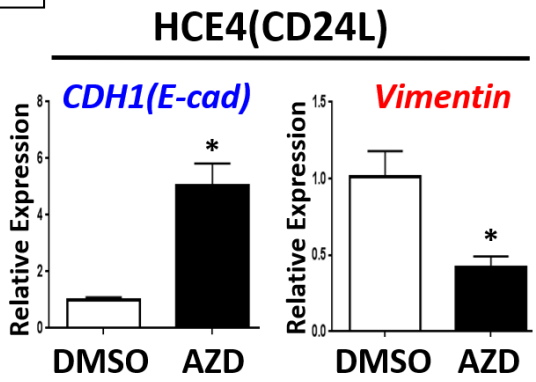


Fig 8.3

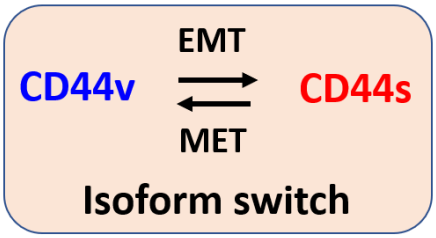


Fig 8.4

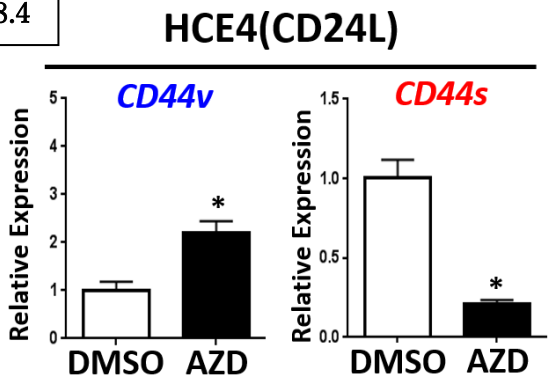


Figure 8　AZD4547 による EMT マーカーの発現変動解析

TE8、HCE4 細胞の CD24L(CSCs)細胞を AZD4547(2 μM)を含んだ培地で 48 時間培養後、EMT マーカーの発現変化を解析した。AZD4547 によって E-cadherin が増加し、vimentin が減少した(Fig 8.1-2)。また、CD44 の isoform switch も同時に起こっていた(Fig 8.3-4)。(*P < 0.05 vs DMSO)

4-3-3 FGFR 阻害剤による ESCC 細胞株の足場非依存的な腫瘍形成能の検討(*in vitro*)

次に、足場非依存的な腫瘍形成能に関しても soft-agarose colony formation assay を用いて検討した。その結果、AZD4547 添加群ではコントロール群と比較してコロニー形成数が減少し、腫瘍形成能の低下が確認された(Figure 9)。以上の結果から FGFR 阻害剤は ESCC-CSCs の維持を抑制できることが示唆された。なお、AZD4547 添加時の細胞内シグナル応答に関しては MAPK 経路(ERK のリン酸化)と PI3K-AKT 経路(AKT のリン酸化)を指標に western blot 法を用いて確認した。TE8 細胞に関しては

両経路の阻害が確認されたが、HCE4 細胞に関しては MAPK 経路のみ阻害が確認され、PI3K/AKT 経路の阻害は確認できなかった(Figure 9)。

Fig 9.1

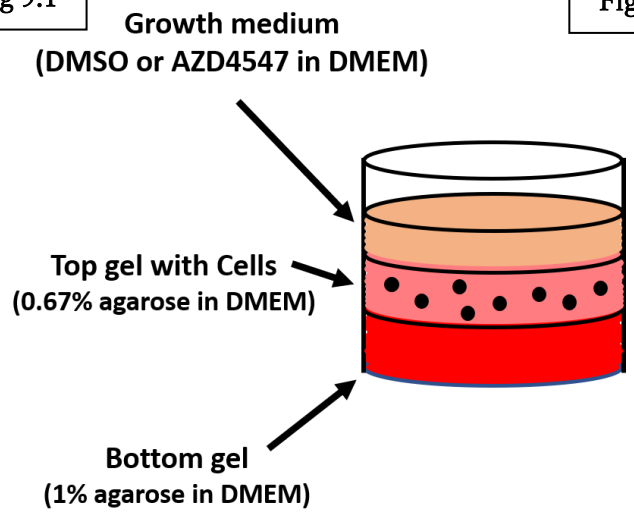


Fig 9.2

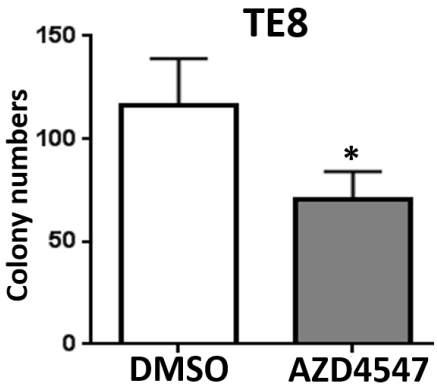


Fig 9.3

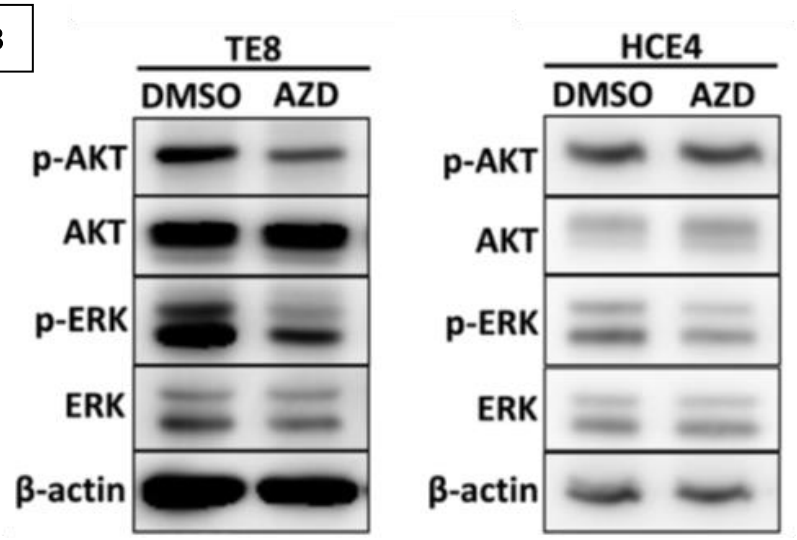


Figure 9　FGFR 阻害剤による ESCC 細胞株の足場非依存的な腫瘍形成能の検討(*in vitro*)および FGFR 阻害剤の作用確認(下流シグナル)

Soft-agarose colony formation assay は TE8 細胞を用いて行った。AZD4547(2 μM)は最上部の growth medium 層に添加し 2 週間培養後、形成したコロニー数を計測した。AZD4547 添加によってコロニー形成数が増加した（Fig 9.1-2)。また、AZD4547 の作用(下流シグナル)を TE8 細胞と HCE4 細胞を用いて確認した。両細胞は無血清培地で一晩培養した後、DMSO or AZD4547(2 μM)を含んだ培地(有血清)で 30 分刺激し、タンパク抽出後 western blotting を行い ERK と AKT のリン酸化を評価した（Fig9.3)。(*P < 0.05 vs DMSO)

4-4 ESCC-CSCs の増幅に重要な FGF-2/FGFR 下流シグナル経路の探索①

4-4-1 MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析

前項までの結果から FGF-2/FGFR シグナルが ESCC-CSCs の増幅・維持に重要であることが示唆されたため、次に細胞内における FGF/FGFR の下流シグナルの中で、どの経路が重要であるか検討した。

前述のように FGF/FGFR の代表的な下流シグナル経路としては MAPK 経路と PI3K/AKT 経路が知られている。そこで、両経路の特異的阻害剤を用いた際の ESCC-CSCs に与える影響を検討した。具体的な手法としては ESCC 細胞株からセルソーターを用いて CSCs 分画である CD24L の細胞を分取し、そこに MEK 阻害剤である trametinib、あるいは PI3K 阻害剤である GDC0941 を添加して培養した後、細胞表面抗原の発現変化をフローサイトメーターを用いて、遺伝子発現変化を qRT-PCR 法により検討した。

その結果、MEK 阻害剤である trametinib によって CD24L 細胞が CD24H 細胞へと転換することが認められ(Figure 11.1-2)、EMT マーカーの発現に関しても E-cadherin の発現上昇および vimentin の発現低下が確認された(Figure 11.3-4)。このことから MEK 阻害剤は FGFR 阻害剤の作用と同様に CSCs を減少および MET を進行(上皮系の細胞へのシフト)させることが示唆された。一方、PI3K 阻害剤である GDC0941 によっては CD24L 細胞がコントロール群(DMSO)よりもさらに増加することが認められた。EMT マーカーの発現に関しても E-cadherin の発現低下および vimentin の発現上昇が確認され、EMT の進行が示唆された。なお、各阻害剤の特異性は western blot 法により確認した(Figure 10.1-2)。

Fig 10.1

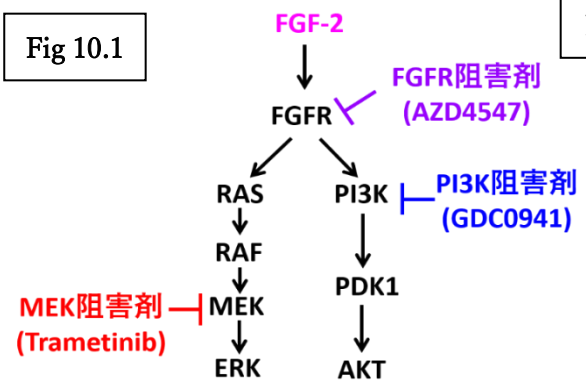


Fig 10.2

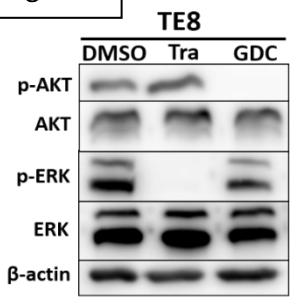


Figure 10　MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤の作用確認(下流シグナル)

MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤の作用(下流シグナル)を TE8 細胞を用いて確認した。本研究では trametinib と GDC0941 を使用した(Fig 10.1)。細胞は無血清培地で一晩培養した後、DMSO or trametinib(2.5 μM) or GDC0941(1 μM)を含んだ培地(有血清)で 30 分刺激し、タンパク抽出後 western blotting を行い ERK と AKT のリン酸化を評価した（Fig 10.2)。

Fig 11.1

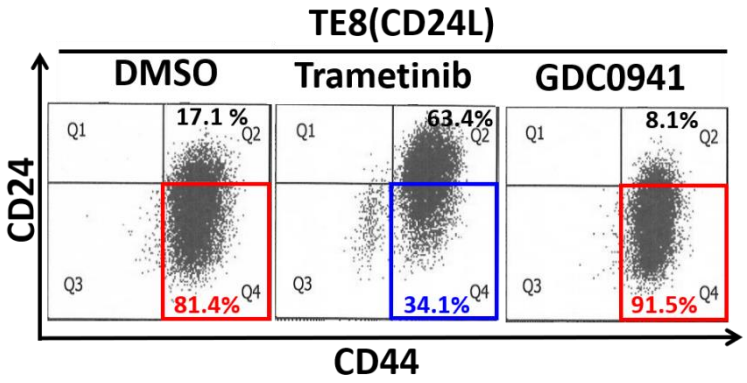


Fig 11.3

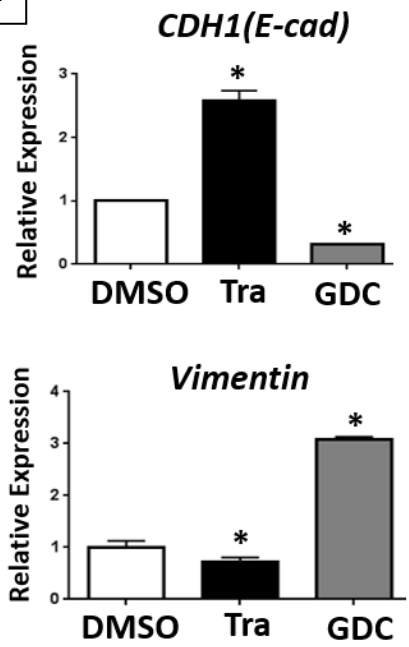


Fig 11.2

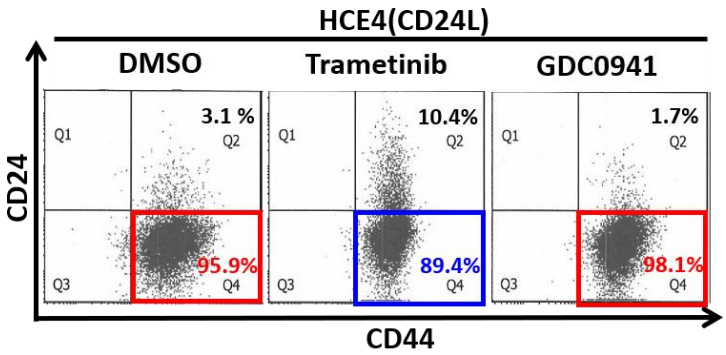


Fig 11.4

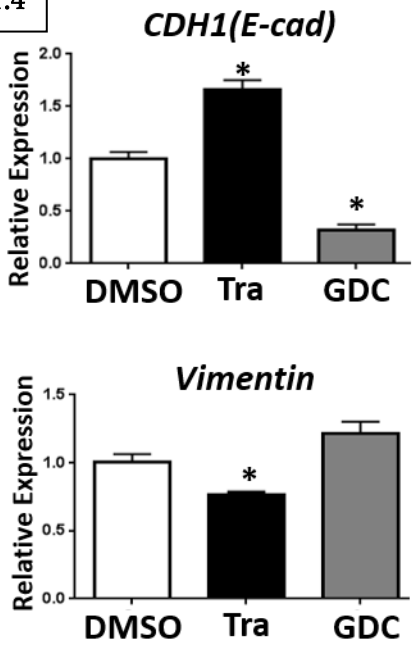


Figure 11　MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析

TE8、HCE4 細胞の CD24L(CSCs)細胞を trametinib(2.5 μM)、GDC0941(1 μM)を含んだ培地で 48 時間培養後、CSCs・EMT マーカーの発現変化を解析した。MEK 阻害剤によってのみ CD24L 細胞が減少(CD24H 細胞が増加)すると同時に MET の誘導も確認された。(*P < 0.05 vs DMSO)

4-5 ESCC-CSCs の増幅に重要な FGF-2/FGFR 下流シグナル経路の探索②

4-5-1 活性変異型 H-RAS を過剰発現させた T-TeRAS 細胞

次に MAPK 経路自体が ESCC の CSC の維持に重要かどうかを確かめるために、活性変異型 RAS(H-RAS^{V12})が過剰発現しており、常に RAS の下流のシグナルが恒常的に活性化していると考えられる T-TeRAS 細胞を用いて実験を行った。

Fig 12.1

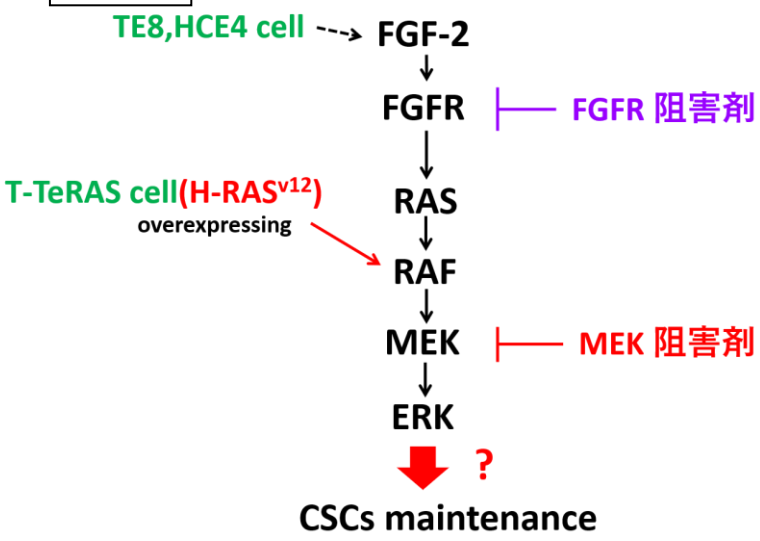


Fig 12.2

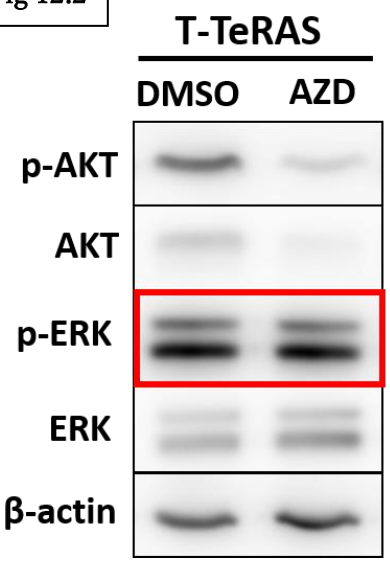


Figure 12　T-TeRAS 細胞に対する FGFR 阻害剤の作用確認(下流シグナル)

MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤の作用(下流シグナル)を T-TeRAS 細胞を用いて確認した。FGF シグナルと T-TeRAS 細胞の関係図(Fig 12.1)。細胞は無血清培地で一晩培養した後、DMSO or AZD4547(2 μM)を含んだ培地(有血清)で 30 分刺激し、タンパク抽出後 western blotting を行い ERK と AKT のリン酸化を評価した（Fig 12.2)。T-TeRAS 細胞では活性変異型 H-RAS が過剰発現しているため、FGFR 阻害剤でも ERK のリン酸化を抑制できていない。

4-5-2　FGFR 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析(T-TeRAS 細胞)

まず、4-3 項で行った FGFR 阻害剤の作用に関して T-TeRAS 細胞についても改めて検討した。その結果、予期していた通り FGFR 阻害剤である AZD4547 では T-TeRas 細胞に影響を及ぼさず、CSCs マーカー、EMT マーカーともに顕著な変化は認められなかった(Figure 13)。この結果は CSCs や EMT に重要な FGFR 下流のシグナルが MAPK 経路であることを更に示唆するものと考えられる。実際、western blot の結果からも T-TeRAS 細胞では ERK のリン酸化が FGFR 阻害剤では抑制できていなかった(Figure 12)。

Fig 13.1

Fig 13.2

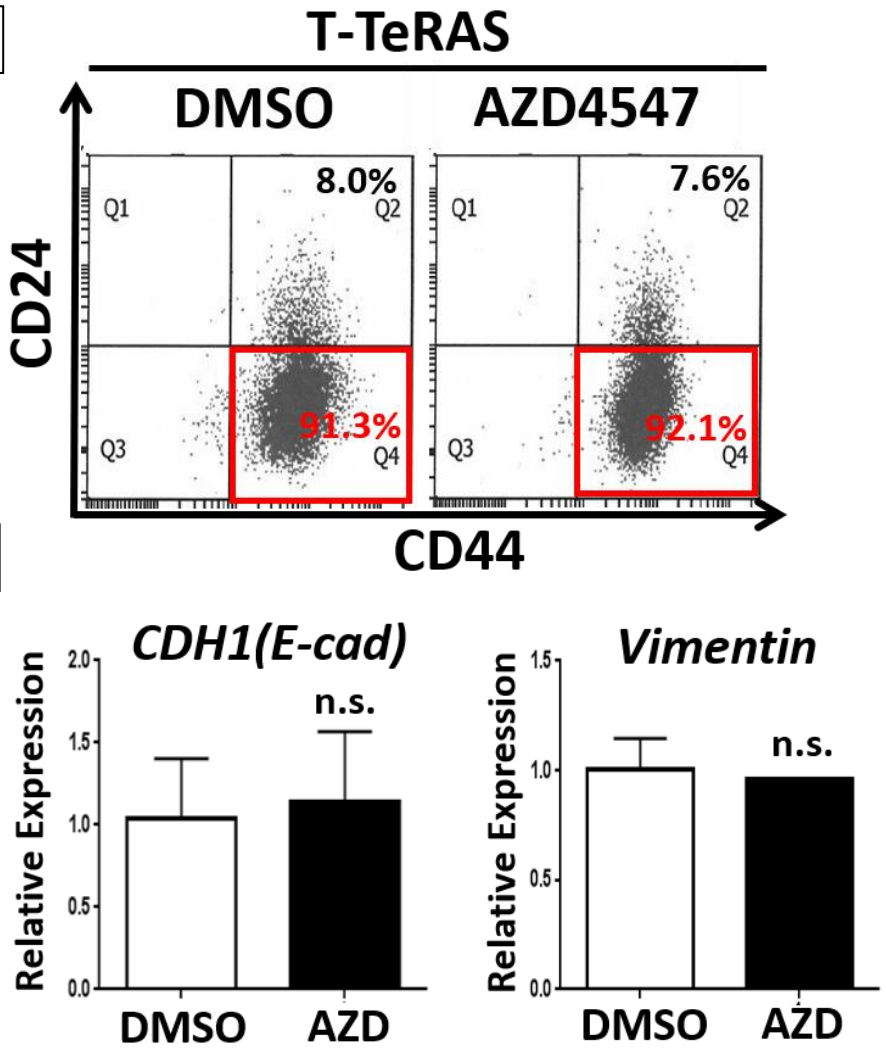


Figure 13　FGFR 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析(T-TeRAS 細胞)

T-TeRAS 細胞を AZD4547(2 μM)を含んだ培地で 48 時間培養後、CSCs および EMT マーカーの発現変化を解析した。T-TeRAS 細胞に対しては FGFR 阻害剤の影響は確認できない。(*P < 0.05 vs DMSO)

4-5-3　MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析(T-TeRAS 細胞)ならびに薬剤感受性の変動解析

続いて、4-4 項で行った実験と同様に T-TeRas 細胞に対して MEK 阻害剤や PI3K 阻害剤を添加して培養した後、細胞表面抗原の発現変化をフローサイトメーターを用いて検討した。その結果、MEK 阻害剤である trametinib によってのみ CSCs 分画である CD24L 細胞の減少が認められた(Figure 14)。さらに、EMT マーカーに関しても MEK 阻害剤では MET の誘導が確認された(Figure 14)。

Fig 14.1

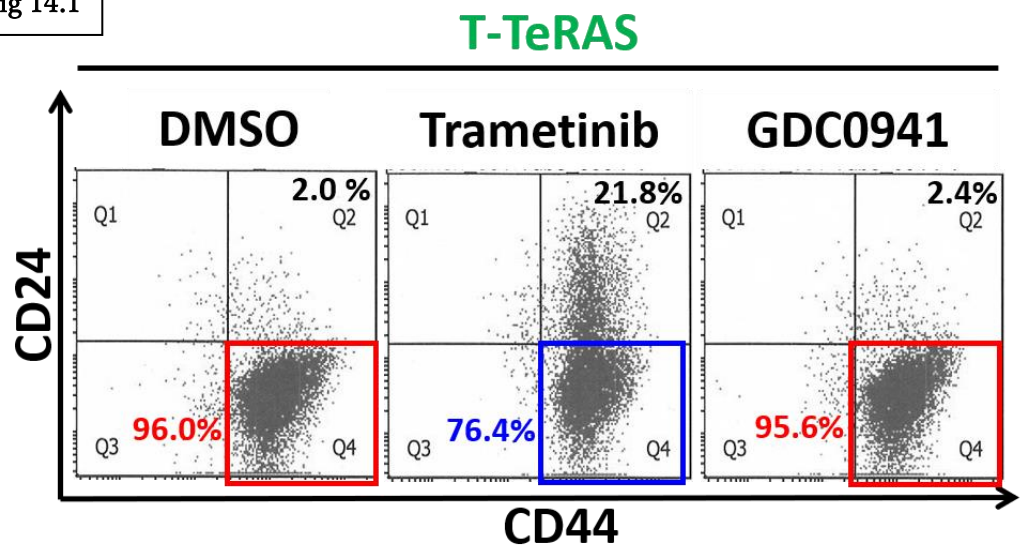


Fig 14.2

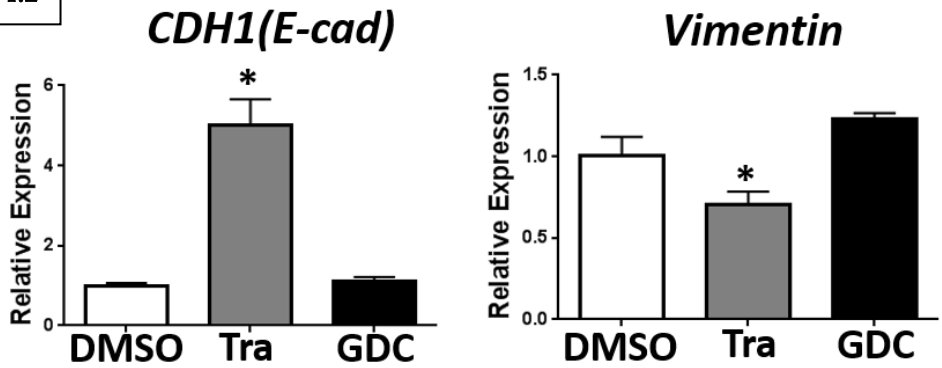


Figure 14　MEK 阻害剤および PI3K 阻害剤による CSCs・EMT マーカーの発現変動解析(T-TeRAS 細胞)

T-TeRAS 細胞を trametinib(2.5 μM)、GDC0941(1 μM)を含んだ培地で 48 時間培養後、CSCs および EMT マーカーの発現変化を解析した。T-TeRAS 細胞に対しても MEK 阻害剤によって CD24L 細胞が減少すると同時に MET の誘導も確認された。(*P < 0.05 vs DMSO)

4-5-4　MEK 阻害剤および FGFR 阻害剤による薬剤感受性の変動解析(T-TeRAS 細胞)

さらに T-TeRAS 細胞の CSCs を機能面で検証するために、CSCs の特徴の 1 つである治療抵抗性(薬剤耐性)に関して WST-8 アッセイを用いて検討した。その結果、T-TeRAS 細胞に対して FGFR 阻害剤は CSCs を減少できないため、5-FU との併用によって細胞増殖に与える影響は少なかったが、MEK 阻害剤と 5-FU を併用した群では他の群と比較して細胞増殖が著しく減少しており、CSCs の減少による治療抵抗性の解除を示唆する結果となった(Figure 15)。

以上の結果から MAPK 経路が ESCC-CSCs の増幅・維持に重要な FGF-2 下流経路と考えられる。

Fig 15

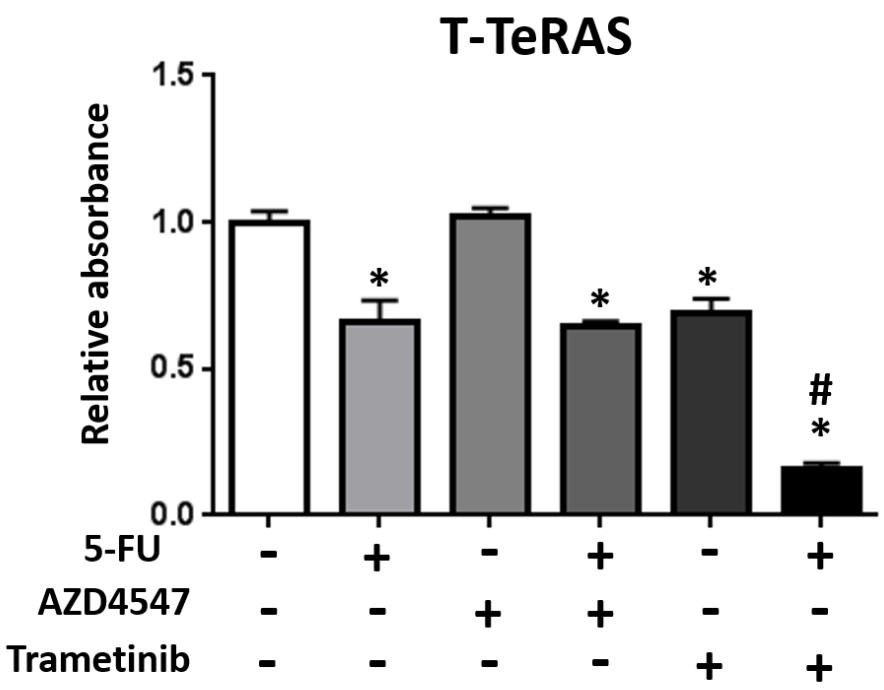


Figure 15　MEK 阻害剤および FGFR 阻害剤による薬剤感受性の変動解析(T-TeRAS 細胞)

T-TeRAS 細胞を trametinib(2.5 μM)、AZD4547(2 μM)、5-FU(5 μM)を含んだ培地で 72 時間培養後、細胞増殖を WST-8 assay により測定した。T-TeRAS 細胞に対して CSCs を減少させる MEK 阻害剤と 5-FU の併用により細胞増殖が著しく減少した。(*$P < 0.05$ vs DMSO、$^{\#}P < 0.05$ vs 5-FU)

4-6 ESCC に対する FGFR 阻害剤および MEK 阻害剤の効果の検討(*in vivo*)

4-6-1 ESCC に対する FGFR 阻害剤および MEK 阻害剤の効果の検討(腫瘍増殖)

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。方法としては、6 週齢メスのヌードマウス(BALB/c slc-nu/nu)の皮下に TE8 細胞および T-TeRAS 細胞を移植し、約 2 週間後に生着を確認した後、各薬剤を腹腔内投与(i.p.)し腫瘍の成長を比較した。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(Figure 16)。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(Figure 16)。

Fig 16.1

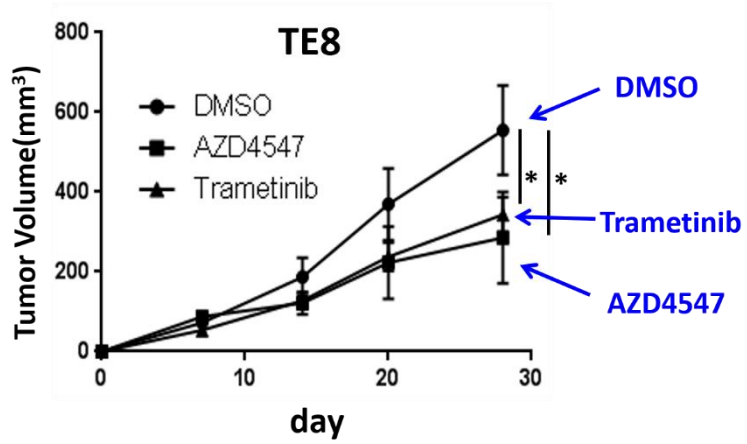


Fig 16.2

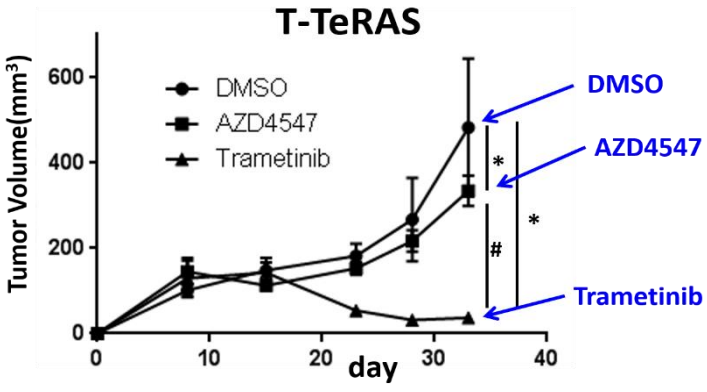


Figure 16　ESCC に対する FGFR 阻害剤および MEK 阻害剤の効果の検討(*in vivo*)

TE8 細胞に対しては MEK 阻害剤、FGFR 阻害剤ともに腫瘍抑制効果が認められた(Fig 16.1)。一方、T-TeRAS 細胞に対しては MEK 阻害剤投与時に著しい腫瘍抑制効果が認められた(Fig 16.2)。(*$P < 0.05$ vs DMSO、$^{\#}P < 0.05$ vs AZD4547)

4-6-2 ESCC に対する FGFR 阻害剤および MEK 阻害剤の効果の検討(IHC)

さらに、屠殺後の腫瘍を免疫組織染色によって解析した結果、腫瘍抑制効果の現れた検体では MET の進行(E-cadherin の増加、vimentin の減少)が認められた(Figure 17)。なお、各阻害剤の細胞内シグナルへの影響は FGFR のリン酸化および ERK のリン酸化を指標に確認した(Figure 17)。

以上の結果から *in vivo* の実験においても前項までの *in vitro* の実験に準じた結果が得られたと考えられる。

Fig 17

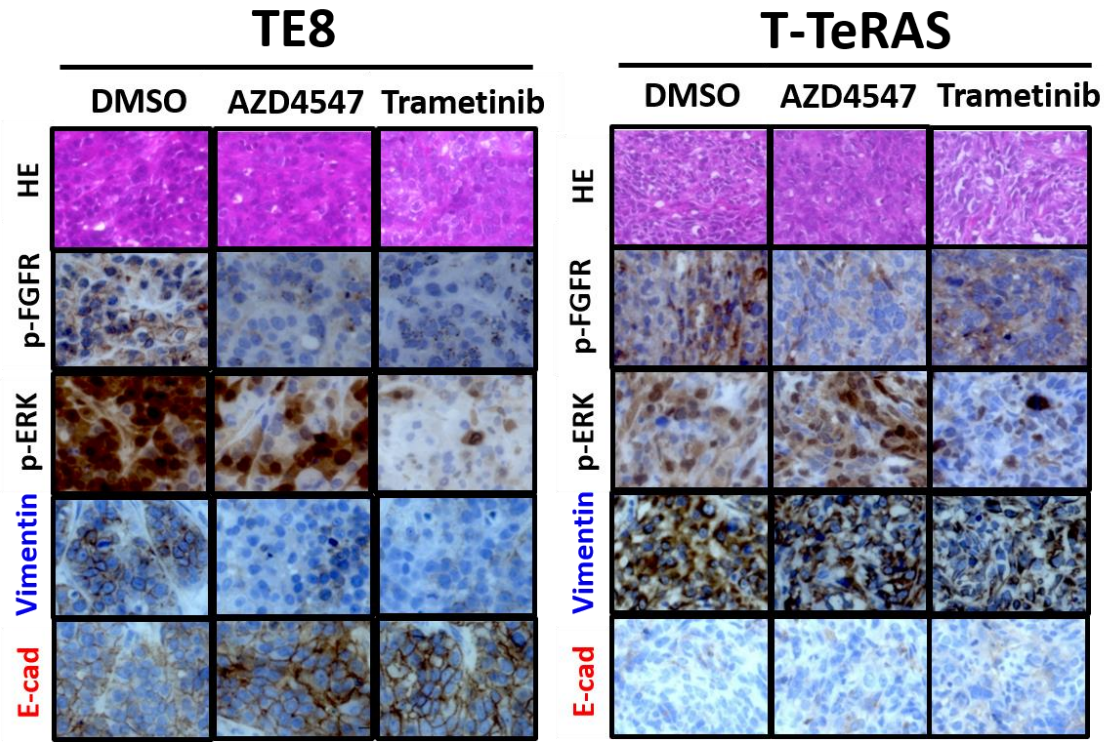


Figure 17　摘出腫瘍組織の免疫組織染色(*in vivo*)

摘出腫瘍組織の免疫組織染色を行った。腫瘍抑制効果の認められた検体では E-cadherin の発現が上昇し、vimentin の発現が低下していた。ERK のリン酸化に関しても腫瘍抑制と相関する結果が得られた(腫瘍抑制検体ではリン酸化減少)。

5 考察

5-1 CSCs を治療標的とする意義

がん治療を行う上で最も大きな課題となっていることは「既存治療への治療抵抗性」である。この「治療抵抗性をいかに解除するか」という命題に向かって、日夜世界中のがん研究者が様々なアプローチで取り組んでいる。その中で我々の研究グループでは治療抵抗性の大きな原因の 1 つと考えられている CSCs を研究対象にした。

CSCs の定義自体が曖昧であることと「幹細胞」という表現から、どうしても古典的な概念の CSCs のイメージが強い印象があり、誤解を招いている現状がある。例えば、前述のような、従来の古典的な CSCs のイメージで考えると CSCs は少数であるため、大多数の非 CSCs を標的にした方が治療戦略として優れているように感じる人もいるであろう。しかしながら、この発想は CSCs の概念と現実的な治療の 2 つの面で誤解があり、適当ではない。

CSCs の概念の面では、前述のように CSCs の概念は現在では新しくなっており、CSCs は必ずしも少数である必要性がなくなっている。また、現実的な治療の面については「大多数の非 CSCs を狙う」という戦略は、従来から行われてきた化学療法や放射線治療といった戦略の「言い換え」に過ぎないと考えられ、早期や初発の治療においては有効であろうが、治療抵抗性の高度進行症例(再発・転移含)には効果は期待できない。つまり、再発や転移した高度進行がんは、CSCs の性質を持ち合わせたがん細胞の割合が非常に高くなっているため、結果として治療抵抗性を示していると考えられる。そのため、治療抵抗性を解除する手段として CSCs の性質を無くす(CSCs を減少させる)ことが重要と考え、我々は CSCs を標的とした研究を行っている。

5-2 本研究で用いた ESCC 細胞株の特徴

本実験で使用した TE8 細胞と HCE4 細胞は、ESCC 細胞株の中でも間葉系の性質を有した細胞株である。光学顕微鏡下での観察では非 CSCs 分画と CSCs 分画の細胞形態に顕著な違いは認められなかった。遺伝子発現解析の結果においても vimentin の発現に関してはほとんど差が認められなかったが、上皮系のマーカーである E-cadherin の発現においては非 CSCs と CSCs で顕著に発現の差が確認された。これらの結果から考えると、非 CSCs 分画は間葉系と上皮系の中間に位置する細胞であり、CSCs 分画は間葉系の性質がより強い細胞であることが示唆される(Figure S1)。

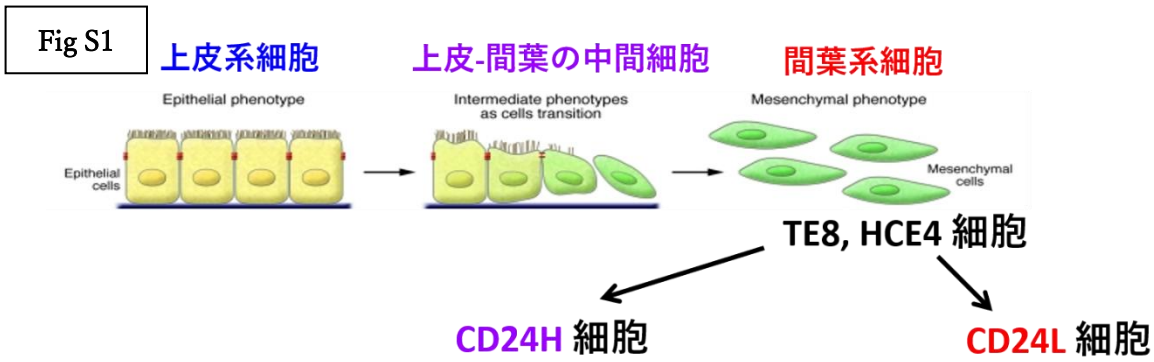


Figure S1　CD24H 細胞と CD24L 細胞の形態的位置づけ

TE8、HCE4 の両細胞ともに元来間葉系の形態の細胞である。Fig2 の結果から、CD24H 細胞は上皮-間葉の中間細胞、CD24L 細胞は間葉系の性質がより強い細胞であることが推測される。

5-3 EMT と CSCs [14,27-29,31,38]

いくつかの腫瘍タイプにおいては、EMT を起こしたがん細胞は幹細胞様の性質を獲得しており、浸潤・転移・薬剤耐性能が上昇することが知られている。ESCC についても、我々は先行研究において、TGF-β による EMT が CSCs(CD24L 細胞)の制御において重要なプロセスであることを明らかにしてきた。複数のがん種において、FGF-2 が EMT を起こすことを踏まえると、ESCC に対しても FGF-2 が CSCs を増加させることで最終的に予後の増悪を促進している可能性が考えられた。

本研究では、ESCC-CSCs(CD24L 細胞)において FGF-2 の発現が有意に増加していること(Figure 3)そして、FGF-2 の添加によって EMT が進行すると同時に ESCC-CSCs が増加することを示した(Figure 4)。逆に、FGFR 阻害剤は CSCs を減少させるともに E-cadherin の発現上昇、vimentin の発現低下をもたらし、MET を促進させた(Figure 7)。このように、FGF-2 は ESCC において、細胞の可塑性を伴った CSCs の制御に非常に重要であることが示された点は本研究でのハイライトの 1 つであると考えている。

5-4 FGF-2 と腫瘍・CSCs [25,26,33,34,43]

様々ながんにおいて FGF-2 は病状の進行を促進し、また FGF-2 や FGFRs の過剰発現は進行がん患者の予後不良と関連していることが報告されている。FGF-2 はがん細胞の増殖を促進させるだけではなく、がん細胞の薬剤耐性能も上昇させる。さらに、FGF-2 は腫瘍の微小環境に存在する間質細胞や炎症細胞を刺激することで血管新生を促進することも報告されている。最近、Fessler E らは腫瘍の微小環境に存在する

FGF-2 が CSCs の制御に重要であることを報告した。具体的には、グリオブラストーマにおいて、腫瘍微小環境の内皮細胞から放出された FGF-2 が分化型のグリオブラストーマ細胞を未分化型の CSCs へ転換させるという内容である。このように、FGF-2 は様々な種類のがんにおいて多様な作用によって CSCs の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。ESCC に関しては、FGF-2 が CSCs の制御にどのように関わっているかについての詳細は明らかになっていなかったが、FGF-2 が ESCC の腫瘍促進効果を有していること自体は既にいくつか報告されている。例として、FGF-2/FGFR1 シグナルが腫瘍関連マクロファージやがん細胞の生存や遊走を制御していることや、FGF-2 の受容体である FGFR3-IIIc の過剰発現による FGF シグナルのオートクライン作用が ESCC の細胞増殖を促進することなどが報告されている。

このように、FGF-2 は腫瘍組織の微小環境においてオートクライン作用とパラクライン作用の両方の作用で機能している。本研究においては、ESCC 細胞株の単一培養において CSCs(CD24L 細胞)で FGF-2 の発現・分泌が高いことを示しており、FGF-2 の供給源を考えるとがん細胞自身となる。この観点では FGF-2 のオートクライン作用とみなせるが、CSCs と非 CSCs を別種の細胞と考えるとパラクライン作用とも解釈できるため、由来に関係なく FGF-2 が環境に存在することが腫瘍の進展に何より重要と考えられる。

また、動物実験の結果では T-TeRAS 細胞移植マウスにおいても FGFR 阻害剤は限定的ではあるが効果を示した。その理由として、移植したがん細胞とともに腫瘍組織を形成する周囲の細胞からの FGF シグナルを FGFR 阻害剤が抑制したことが予想できる。このことから、CSCs を含むがん細胞のみではなく、がん組織の微小環境を構成する他の細胞(癌関連線維芽細胞、炎症細胞、間質細胞など)とがん細胞(CSCs 含)との生体での相互作用を明らかにすることが新たな治療戦略の開発につながると考えられる。このため、今後の研究課題としては *in vivo* の研究はもちろんであるが、*in vitro* においても、より生体環境に近い 3 次元培養モデルやオルガノイドを用いた解析を行っていく必要があると考える。

5-5 EMT や CSCs における FGF と他シグナルとのクロストーク [14,35-37,41,42]

EMT を引き起こす因子としては TGF-β が最もよく知られているが、他のシグナル、例えば、FGF や EGF、HGF、IGF なども EMT に関与することが報告されている。興味深いことに、EMT の制御に関する TGF-β と FGF-2 のクロストークは既に明らかとなっている。Shirakihata らは、TGF-β によって FGFR の isoform swtich(FGFR2IIIb→FGFR1IIIc)が起こり、FGF-2 への感受性が増大することを報告した(FGF-2 は FGFR1IIIc のリガンドであるが、FGFR2IIIb のリガンドではない)。

また、FGF シグナルと他のシグナルとのクロストークも CSCs の動態(変化)に寄与

することが複数報告されている。非小細胞肺癌においては、FGFR1 シグナルによって Hedgehog シグナルの中心的転写因子である GLI1 遺伝子の発現が上昇し、がん細胞が幹細胞の形質を獲得する。トリプルネガティブ乳癌においては、FGFR シグナルと Notch1 シグナルが協調的に働いて CSCs を制御し、mTOR1/2 阻害剤に対する薬剤耐性能を維持している。さらに、肝細胞癌の CSCs では、FGF シグナルと IGF シグナルが亢進しており、sorafenib に対する薬剤耐性に寄与している。これらの先行研究から CSCs のバイオロジーにおいて FGFR シグナルの重要性が示されている。また、我々の先行研究から、ESCC において EGFR 阻害剤である erlotinib や cetuximab が TGF-β による EMT を阻害し、CSCs の増大を抑制することを示している。これらを踏まえると、FGF・EGF・TGF-β のシグナルのクロストークが ESCC においては EMT の誘導と CSCs の制御(増大)を司っていることが予想される。しかしながら、本研究ではそれらのクロストークについては検討できていないため、今後の研究課題の 1 つと考えている。

5-6 ESCC-CSCs に重要な FGF-2/FGFR の下流シグナル [19,20,39]

FGFR の代表的な下流シグナルとして MAPK シグナルと PI3K/AKT シグナルが知られている。しかしながら、どちらのシグナルが CSCs の制御に重要かについては未解決の問題であった。本研究において、FGFR 阻害剤は TE8、HCE4 の両細胞で CSCs を抑制した。興味深いことに、ERK のリン酸化は両細胞で抑制されていたのに対して AKT のリン酸化は HCE4 細胞では抑制されていなかった。この結果から CSCs の維持に関しては MAPK シグナルが重要ではないかと予測した。この予測を支持するように、PI3K 阻害剤ではなく MEK 阻害剤が ESCC-CSCs を抑制した。さらに、H-RAS^{V12} の過剰発現により RAS の下流シグナルが恒常的に活性化している T-TeRAS 細胞では FGFR 阻害剤は ERK のリン酸化が抑制できておらず、CSCs(CD24L 細胞)にも影響を与えなかった。これに対して MEK 阻害剤である trametinib や U0126(データ未表示)は T-TeRAS 細胞に対しても ERK のリン酸化を抑制するとともに、CSCs も減少させた。このように、ESCC においては FGF-2/FGFR/RAS/ERK 経路が CSCs の維持に重要であることを見出した点は本研究の新奇性の 1 つと考えている。

加えて、本研究では *in vivo* の ESCC xenograft モデルに対しても、FGFR 阻害剤と MEK 阻害剤が腫瘍の抑制に効果的であることを示した。現在、trametinib は実臨床でも承認されている薬物であり、BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫(メラノーマ)の生命予後を有意に改善することが報告されている。本研究の結果から、trametinib は ESCC-CSCs を標的とした新規治療オプションとなり得る可能性が考えられる。特に、有効な治療薬が存在しない高度進行の ESCC 症例に対しては非常に有益な可能性があるため、今後の ESCC 治療への応用が期待される。

6 総括

FGF-2 は ESCC-CSCs(CD24L 細胞)で発現・分泌が亢進しており、CSCs の維持を制御している重要な因子である。FGF-2 が CSCs を制御する際に重要な細胞内シグナルは MAPK(RAS/RAF/MEK/ERK)経路であり、これらのシグナルを抑制する FGFR 阻害剤や MEK 阻害剤は CSCs を減少させる。そのため、これらの阻害剤は ESCC-CSCs を標的とした新規治療法となる可能性があり、治療法の限られていた高度進行 ESCC 症例に対する効果が期待される。特に、MEK 阻害剤である trametinib は悪性黒色腫において既に実臨床で使用されており、ESCC に対しても臨床応用されることが期待される。

Fig S2

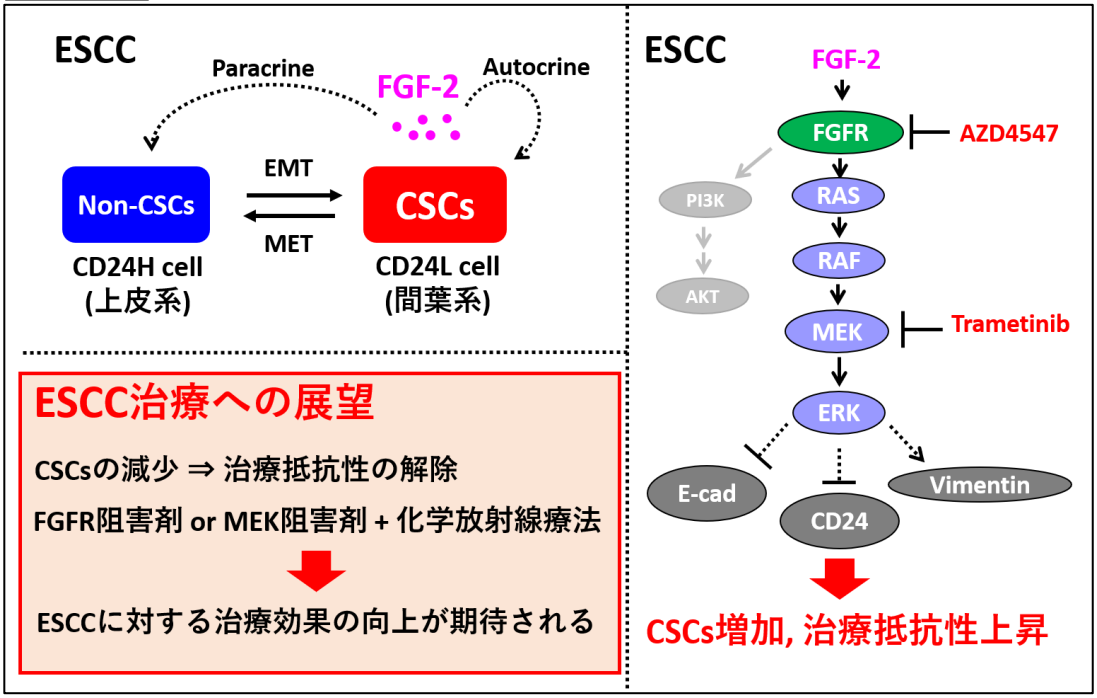


Figure S2　本研究のまとめ図

＊本論文は学術雑誌に掲載された下記の原著論文を基礎とするものである。

Maehara, O. et al. (2017) Fibroblast growth factor-2-mediated FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, **38**, 1073-1083.

7 謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益なご指導・ご助言を頂きました、
北海道大学大学院-薬学研究院-臨床病態解析学研究室
武田宏司　　教授
中川宏冶　　講師
大久保直登　特任助教
に深く感謝いたします。**武田宏司教授**と**中川宏冶講師**には 7 年半、**大久保直登特任助教**には 5 年という長期の間、常に親身になってご指導頂きました。深く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたって的確なご指導・ご助言とともに実際の研究環境を提供して頂きました、**北海道大学大学院-医学研究科-内科学講座-消化器内科学分野**
坂本直哉　　教授
大西俊介　　准教授
夏井坂光輝　客員研究員
須田剛生　　特任助教
に深く感謝いたします。特に**大西俊介准教授**と**夏井坂光輝客員研究員**には研究指導・論文作成の他、様々な面において終始ご指導・ご支援を頂き、感謝の念に堪えません。誠に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の審査を担当して頂きました、
北海道大学大学院-薬学研究院-薬剤分子設計学研究室
原島秀吉　　教授
山田勇磨　　准教授
に深く感謝いたします。特に**山田勇磨准教授**には学位論文発表会の座長も務めて頂きました。厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるに当たって、様々な面でサポートして頂きました、消化器内科学分野のスタッフの皆様、臨床病態解析学研究室のスタッフ・学生の皆様に深く感謝いたします。

最後に、研究・学生生活を支えて頂きました両親と親族及び友人に感謝いたします。

8 引用文献

1. 2017 年のがん統計予測　国立がん研究センターがん情報サービス (http://ganjoho.jp)
2. 食道癌診療ガイドライン(2017 年版)　日本食道学会編　金原出版
3. Oyama, T. et al. (2005) Endoscopic submucosal dissection of early esophageal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **3**(7suppl 1), S67-S70.
4. Shimizu, Y. et al. (2002) Long-term outcome after endoscopic mucosal resection in patients with esophageal squamous cell carcinoma invading the muscularis mucosae or deeper. *Gastrointest Endosc,* **56**, 387-390.
5. Bergman, J.J. et al. (2011) Outcomes from a prospective trial of endoscopic radiofrequency ablation of early squamous cell neoplasia of the esophagus. *Gastrointest Endosc*, **74**, 1181-1190.
6. Fokas, E. et al. (2013) The role of radiotherapy in the multimodal management of esophageal cancer. *Dig Dis*, **31**, 30-37.
7. Knudson, A. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-823
8. Friend, S.H. et al. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**, 643-646.
9. Stehelin, D. et al. (1977) Detection and enumeration of transformation-defective strains of avian sarcoma virus with molecular hybridization. *Virology*, **76**, 675-684
10. Kraus, D.S. et al. (2005)Tyrosine Kinases as Targets for Cancer therapy. *N Engl J Med*, **353**, 172-187.
11. Clevers, H. (2011)The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, **7**, 313-319.
12. Visvader, J.E. et al. (2012) Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, **10**, 717-728.
13. Natsuizaka, M. et al.(2014) IGFBP3 promotes esophageal cancer growth by suppressing oxidative stress in hypoxic tumor microenvironment. *Am J Cancer Res*, **4**, 29-41.
14. Sato, F. et al. (2015) EGFR inhibitors prevent induction of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther*, **16**, 933-940.
15. Kagawa, S. et al. (2015) Cellular senescence checkpoint function determines differential Notch1-dependent Oncogenic and tumor suppressor activities. *Oncogene*, **34**, 2347-59.

16. Itoh, N. et al. (2011) Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development,metabolism and disease. *J Biochem*, **149**, 121-30.
17. Turner, N. et al. (2010) Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*, **10**, 116-29.
18. Barclay, C. et al. (2005) Basic Fibroblast growth factor(FGF-2) overexpression is a risk factor for esophageal cancer recurrence and reduced survival, which is ameliorated by coexpression of the FGF-2 antisense gene. *Clin Cnacer Res,* **11**, 7683-91.
19. Akl, M.R. et al. (2016) Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget*, **7**, 44735-44762.
20. Eswarakunar, V.P. et al. (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev,* **16**, 139-149.
21. Smit, J.K. et al. (2013) Prediction of response to radiotherapy in the treatment of esophageal cancer using stem cell makers. *Radiother Oncol*, **107**, 434-441.
22. Islam, F. et al. (2015) Cancer stem cells in oesophageal squamous cell carcinoma: Identification, prognostic and treatment perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*, **96**, 9-19.
23. Qian, X. et al. (2016) Esophageal cancer stem cells and implications for future therapeutics. *Onco Targets Ther*, **9**, 2247-2254.
24. Naganuma, S. et al. (2012) Notch receptor inhibition reveals the importance of cyclin D1 and Wnt signaling in invasive esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res*, **2**, 459-475.
25. Ueno, N. et al. (2016) Enhanced expression of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 lll c Promotes Human Esophageal Carcinoma Cell Prolifelation. *J Histochem Cytochem*, **64**, 7-17.
26. Takase, N. (2016) NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenvironment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells. *Cancer Lett*, **380**, 47-58.
27. Kurimoto, R. et al. (2016) Drug resistance originating from a TGF-β/FGF-2-driven epithelial-to-mesenchymal transition and its reversion in human lung adenocarcinoma cell lines harboring an EGFR mutation. *Int J Oncol*, **48**, 1825-1836.
28. Liu, Z.C. et al. (2014) AKT/GSK-3β regulates stability and transcription of snail which is crucial for bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition of prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, **1840**, 3096-3105.

29. Ohashi, S. et al. (2010) Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res*, **70**, 4174-4184.
30. Ohnishi, S. et al. (2013) Hypoxia-Indusible Factors Activative CD133 Promoter through ETS Family transcription factors. *PLoS ONE*, **8**, e66255.
31. Ohashi, S. et al. (2011) A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res*, **71**, 6836-6847.
32. KIM, S.H. et al. (2006) Tumorigenic conversion of primary human esophageal epithelial cells using oncogene combinations in the absence of exogenous Ras. *Cancer Res*, **66**, 10415-10424.
33. Fessler, E. et al. (2015) Endothelial cells induce cancer stem cell features in differentiated glioblastoma cells via bFGF. *Mol Cancer*, **14**, 157.
34. Li, S. et al. (2015) Nuclear basic fibroblast growth factor regulates triple-negative breast cancer chemo-resistance. *Breast Cancer Res*, **17**, 91.
35. Ji, W. et al. (2016) FGFR1 promotes the stem cell-like phenotype of FGFR-amplified non-small cell lung cancer cells through Hedgehog pathway. *Oncotarget*, **7**, 15118-15134.
36. Bhola, N.E. et al. (2016) Treatment of Triple-negative breast cancer with TORC1/2 Inhibitors Sustains a Drug-resistant and Notch-Dependant Cancer stem cell Population. *Cancer Res*, **76**, 440-452.
37. Tovar, V. et al. (2017) Tumour initiating cells and IGF/FGF signalling contribute to sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Gut*, **66**, 530-540.
38. Mani, S.A. et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells . *Cell*, **133**, 704-715.
39. Flaherty, K.T. et al. (2012) Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*, **367**, 107-114.
40. Kinugasa, H. et al. (2015) Mitocondrial SOD2 regulates epithelial-mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene,* **34**, 5229-5239.
41. Lamouille, S. et al. (2014) Molcular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**, 178-196.
42. Shirakihara, T. et al. (2011) TGF-β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*, **30**, 783-795.
43. Lorusso, G. et al. (2008) The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*, **130**, 1091-1103.

44. Brown, R.L. et al. (2011) CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest,* **121**, 1064-1074.
45. Greenburg, G. et al. (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol,* **95**, 333-339.
46. Nowell, P.C. et al. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 3-28
47. Fearon, E.R. et al. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**,759-767.
48. Bonnet, D. et al. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med,* **3**, 730-737.
49. Navin, N. et al. (2011) Tumor evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, **472**, 90-94.
50. Greaves, M. et al. (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature*, **481**, 306-313.
51. Meacham, C.E. et al. (2013) Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, **501**, 328-337.
52. Roesch, A. et al. (2010) A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell,* **141**, 583-594.
53. Shimokawa, M. et al. (2017) Visualization and targeting of LGR5^{+} human colon cancer stem cells. *Nature*, **545**, 187-192.
54. Kalluri, R. et al. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest*, **119**, 1420-1428.
55. Natsuizaka, M. et al. (2017) Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma. *Nat Commun*, **8**, 1758.
56. Kim, H.S. et al. (2015) Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival in patients with resected esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, **6**, 2562-2572.
57. Saito, S. et al. (2015) The role of HGF/MET and FGF/FGFR in fibroblast-derived growth stimulation and lapatinib resistance of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, **15**, 82.
58. Liang, G. et al. (2012) Anticancer molecules targeting fibroblast growth factor receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **33**, 531-541.