

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08943

研究課題名(和文) FGF受容体阻害剤を用いた食道扁平上皮癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) FGFR inhibitors eliminate cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

夏井坂 光輝 (Natsuzaka, Mitsuteru)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：80642446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：CD44の発現の高い腫瘍細胞が食道扁平上皮癌(ESCC)における癌幹細胞(CSC)であることが明らかとなった。CSCを標的とした新たな治療法の開発はESCC患者の予後を飛躍的に向上させることが期待される。我々はESCCのCSCにおいて高発現しているFGF2に着目した。FGF2はCSCを増幅させ、逆にFGFR阻害剤はCSCを抑制した。更に、FGFR経路の下流であるMek/Erk経路がESCCのCSC維持、増幅に重要な役割を担っていることを明らかにした。動物実験においてもFGFR阻害剤、Mek阻害剤は腫瘍増殖を有意に抑制した。FGFR/Mek/Erk経路は新たな治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), a subset of cells defined by high expression of CD44 and low expression of CD24 has been reported to be cancer stem-like cells (CSCs). Novel therapies directly targeting CSCs have the potential to improve prognosis of ESCC patients. We report that FGF-2 is significantly upregulated in CSCs and significantly increases CSC content in ESCC cell lines by inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT). Conversely, the FGFR inhibitor sharply diminishes CSCs via induction of mesenchymal-epithelial transition (MET). Further experiments revealed that Mek/Erk pathway is crucial for FGF-2-mediated CSC regulation. Consistent with these findings in vitro, xenotransplantation studies demonstrated that inhibition of FGF-2-mediated FGFR/Erk signaling significantly delayed tumor growth. Inhibition of FGFR and/or Mek signaling represents a potential novel therapeutic option for targeting CSCs in ESCC.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道扁平上皮癌 癌幹細胞 CD44 EMT FGFR阻害剤 MEK阻害剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 食道扁平上皮癌 (ESCC) における癌幹細胞

現在までに癌幹細胞の表面マーカーとして CD24、CD44、CD90、CD133、EpCAM、ALDH1 活性等が用いられているが、申請者らは複数の ESCC 細胞株を用いて、CD24^{Low}/CD44^{High} 細胞が ESCC における癌幹細胞であることを見出した。CD24^{Low}/CD44^{High} 細胞は間葉系細胞の形態、性質を有し、各種抗癌剤 (5FU、CDDP) に対し有意に治療抵抗性であった。ヌードマウス、ESCC 細胞株を用いた連続腫瘍移植実験では、わずか 10 個の CD24^{Low}/CD44^{High} 細胞で腫瘍形成が認められた。重要なことに、連続腫瘍移植実験で CD24^{Low}/CD44^{High} 細胞は親腫瘍と同性質 (分化度) の腫瘍を再形成した。これらの結果は ESCC において間葉系の性質を持った CD24^{Low}/CD44^{High} 細胞が癌幹細胞であることを示している。

(2) 上皮間葉移行 (EMT) を標的とした治療法の限界

間葉系の性質を有する ESCC 癌幹細胞の維持、増幅には上皮間葉移行 (EMT) が非常に重要な役割を担っている。ESCC 細胞株をセルソーターにより非癌幹細胞のみを分離し、非癌幹細胞を TGF- β で処理すると EMT が生じる。EMT を起こした間葉系癌細胞が癌幹細胞であることが示唆されており、申請者らの実験系においても EMT の結果として癌幹細胞は著明に増幅された。EMT が ESCC の癌幹細胞の維持、増幅機構に重要である点に着目し、申請者らは ESCC の EMT において重要な因子である Notch1、EGFR を標的とした治療法の開発に取り組んできた。しかし、Notch 阻害剤、EGFR 阻害剤を用いることで EMT を阻害し癌幹細胞の増幅を抑制することが可能であったが、完全に癌幹細胞を死滅させることはできなかった。EMT を効率良く阻害できる Notch 阻害剤、EGFR 阻害剤に対しても既存の癌幹細胞は治療抵抗性であった。EMT を阻害すると同時に既存の癌幹細胞に対する有効な治療法の開発が必要であると考えられた。

(3) Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) を標的とした ESCC 癌幹細胞治療の可能性

FGF-2 は癌の進行、悪性度と関連するとの報告がなされており、ESCC においても FGF-2 が再発、生存率に与える重要な因子であることが報告されている。しかし、ESCC 癌幹細胞における FGF-2 の役割に関しては明らかにされていない。申請者らは ESCC 癌幹細胞における遺伝子発現を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、FGF-2 が複数の ESCC 細胞株において非癌幹細胞と比較して癌幹細胞で著明に発現が亢進していることを確認した。癌幹細胞は多くの薬剤に対し治療抵抗性であるが、FGF 受容体阻害剤 (SU5402、AZD4547) に対しては非癌幹細胞と同等の薬剤感受性を示した。また、癌幹

細胞を FGF 受容体阻害剤で処理し FACS で解析すると、CD44 の発現が有意に低下し、さらに癌幹細胞分画である CD24^{Low}/CD44^{High} 細胞分画が著明に減少した。FGF 受容体阻害剤による ESCC 癌幹細胞を標的とした新たな治療法開発の可能性が考えられた。

2. 研究の目的

前述の学術的背景および申請者らが行ってきた基礎的研究成果から、FGF 受容体 (FGFR) 阻害剤を用いることで ESCC 癌幹細胞を標的とした新規治療法開発の萌芽となる可能性が考えられた。本研究は ESCC における FGF 受容体阻害剤の癌幹細胞に対する有効性を *in vitro* 及び *in vivo* の実験系において検証することを目的に遂行された。

3. 研究の方法

(1) FGF 受容体阻害剤の ESCC 癌幹細胞に対する有効性の検討 (*in vitro*)

複数の ESCC 細胞株 TE8、HCE4、T-TeRAS 細胞から癌幹細胞 (CD24^{Low}/CD44^{High} 細胞) および非癌幹細胞 (CD24^{High}/CD44^{Low} 細胞) をセルソーター (FACS Aria III) を用いて分離した。分離された細胞に FGFR 阻害剤を添加し、癌幹細胞表面マーカー (CD24、CD44) を FACS により解析した。

(2) FGF 受容体阻害剤が癌幹細胞内パスウェイに及ぼす影響

複数の ESCC 細胞株から CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞を分離し、FGFR 阻害剤で処理した。FGFR 経路の下流である、Akt/PI3K 経路、RAS/MEK/ERK 経路に及ぼす影響を WB により確認した。さらに、Akt 阻害剤、MEK 阻害剤で CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞を処理し、癌幹細胞マーカーの変化を解析した。

(3) FGFR 阻害剤、MEK 阻害剤の ESCC 癌幹細胞に対する有効性の検討 (*in vivo*)

ESCC 細胞株 TE8、T-TeRAS をヌードマウスへ皮下移植し、移植 2 週間後より FGFR 阻害剤を投与した。移植 6 ~ 8 週後にマウスをト殺し、以下の項目を評価した。

腫瘍サイズの経時的変化を測定した。

FGF 受容体活性をリン酸化抗体を用いて免疫染色により評価し、阻害剤の効果を確認した。

ERK 活性をリン酸化抗体を用いて免疫染色により評価した。

上皮系マーカーとして E-cadherin、間葉系マーカーとして vimentin を用いて腫瘍内における EMT を評価した。

4. 研究成果

(1) CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞における FGF-2 CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞において FGF-2 分泌は mRNA レベル、蛋白レベルともに著明に亢進していた。また、既報の通り、CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞では、非癌幹細胞分画と比較して、間葉系マーカーの vimentin

の発現が亢進し、上皮系マーカーの E-cadherin の発現は有意に低下していた。逆に、非癌幹細胞分画を FGF-2 で処理すると EMT が生じ、CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞が有意に増幅した。

(2) FGFR 阻害剤が CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞に及ぼす影響

FGF 阻害剤は AZD4547、BGJ398、SU5402 を用いた。何れの阻害剤も TE8、HCE4 において CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞を有意に抑制した。この際、FGFR 経路下流の ERK 活性は TE8、HCE4 細胞ともに抑制されていたが、Akt 活性は TE8 のみで抑制されていた。

(3) CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞における RAS/MEK/ERK 経路の重要性

FGFR 阻害剤は TE8、HCE4 細胞において癌幹細胞を有意に抑制したが、RAS 変異体である T-TeRAS 細胞には無効であった(図1)。この結果から FGF シグナルの下流において RAS/MEK/ERK 経路が CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞の制御において重要であることが示唆された。MEK 阻害剤を用いることで T-TeRAS 細胞においても CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞は有意に抑制された(図2)。逆に、EGF 経路の下流である AKT 経路を阻害しても、何れの細胞株においても CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞は抑制されなかった。

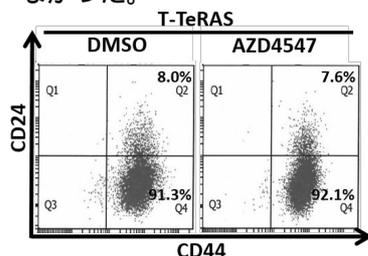


図1 FGFR 阻害剤は T-TeRAS 細胞に無効

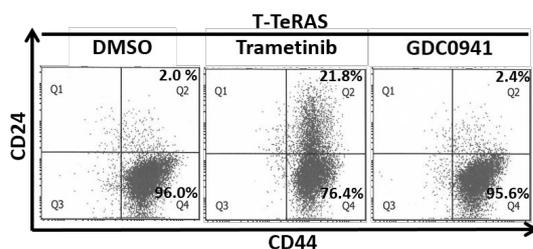


図2 MEK 阻害剤は T-TeRAS 細胞に有効

これらの結果から CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞は FGFR/RAS/MEK/ERK 経路により制御されていることが明らかになった。

(4) In vivo における FGFR 阻害剤及び MEK 阻害剤の効果の検討

ヌードマウスを用いた腫瘍移植実験においても FGFR 阻害剤 (AZD4547) は FGFR のリン酸化、MEK 阻害剤 (trametinib) は ERK のリン酸化を十分に抑制していた。AZD4547 は TE8 細胞の腫瘍増殖を抑制したが、RAS に変異のある T-TeRAS 細胞には無効であった。一

方で、MEK 阻害剤である trametinib は TE8 細胞および T-TeRAS 細胞何れの腫瘍増殖も有意に抑制した(図3)。重要なことに、trametinib により腫瘍細胞の上皮系マーカーである E-cadherin の発現が増強し、間葉系マーカーである vimentin の発現は抑制されていた。

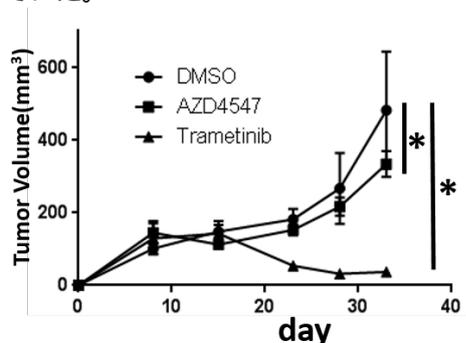


図3 FGFR 阻害剤、MEK 阻害剤による腫瘍抑制効果 (T-TeRAS 細胞)

In vitro での結果と同様に、動物実験においても CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞は抑制され、MET (mesenchymal-epithelial transition) が生じることで腫瘍増殖が抑制された。動物実験においても FGFR/RAS/MEK/ERK 経路が CD24^{Low}/CD44^{High} 癌幹細胞の制御に重要であることが示され、同経路の阻害が癌幹細胞を標的とした新規治療法となる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 5 件)

1. Natsuizaka M, Whelan KA, Kagawa S, Tanaka K, Giroux V, Chandramouleeswaran PM, Long A, Sahu V, Darling DS, Que J, Yang Y, Katz JP, Wileyto P, Basu D, Kita Y, Natsugoe S, Naganuma S, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Bass AJ, Wong K, Rustgi AK, Nakagawa H. Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma. Nat commun. 2017. Nov 24;8(1):1758. (査読有り)
2. Maehara O, Suda G, Natsuizaka M* (* corresponding author), Ohnishi S, Komatsu Y, Sato F, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Shimazaki T, Kimura M, Asano A, Fujimoto Y, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Naganuma S, Whelan KA, Nakagawa H, Nakagawa K, Takeda H, Sakamoto N. Fibroblast growth factor-2-mediated FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis. 2017. Oct 26;38(11):1073-1083. (査読有り)
3. Yoshioka M, Ohashi S, Ida T, Nakai Y, Kikuchi O, Amanuma Y, Matsubara J, Yamada A, Miyamoto S, Natsuizaka M, Nakagawa H,

- Chiba T, Seno H, Muto M. Distinct effects of EGFR inhibitors on epithelial- and mesenchymal-like esophageal squamous cell carcinoma cells. J Exp Clin Cancer Res. 2017. Aug 1;36(1):101. (査読有り)
4. Whelan KA, Chandramouleeswaran PM, Tanaka K, Natsuizaka M, Guha M, Srinivasan S, Darling DS, Kita Y, Natsugoe S, Winkler JD, Klein-Szanto AJ, Amaravadi RK, Avadhani NG, Rustgi AK, Nakagawa H. Autophagy supports generation of cells with high CD44 expression via modulation of oxidative stress and Parkin-mediated mitochondrial clearance. Oncogene. 2017. Aug 24;36(34):4843-4858. (査読有り)
5. Mizushima T, Ohnishi S, Shimizu Y, Hatanaka Y, Hatanaka KC, Hosono H, Kubota Y, Natsuizaka M, Kamiya M, Ono S, Homma A, Kato M, Sakamoto N, Urano Y. Fluorescent imaging of superficial head and neck squamous cell carcinoma using a -glutamyltranspeptidase-activated targeting agent: a pilot study. BMC Cancer. 2016; 16:411. (査読有り)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://halo.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏井坂 光輝 (NATSUIZAKA Mitsuteru)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：80642446

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

前原 経 (MAEHARA Osamu)

北海道大学・生命科学院・大学院生