

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19429

研究課題名(和文) 肺癌におけるFGF9の役割の解明

研究課題名(英文) FGF9 is an important factor in lung cancer

研究代表者

扇野 圭子(OHGINO, KEIKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40573324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、FGFを含む各種増殖因子が癌の生物学において重要であることが報告されており、我々はFGF9に注目し肺癌におけるFGF9の役割について研究を行った。FGF9を発現していない肺上皮細胞株及び肺癌株にFGF9遺伝子を導入しFGF9過剰発現細胞を作製した。非小細胞肺癌(肺腺癌)の細胞株であるA549にFGF9を過剰発現させたところFGF9過剰発現細胞株で足場非依存性の増殖能を獲得したことを確認した。FGF9を高発現した2型肺胞上皮細胞株MLE12-FGF9では免疫不全マウスに皮下移植したところ、小細胞癌を形成し、FGF9は肺小細胞癌においてもoncogeneとしての働きがある可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been reported that various growth factors including FGF are important in biology of cancer, and we focus on FGF 9 and investigated the role of FGF 9 in lung cancer. FGF9 gene was introduced into lung epithelial cell line and lung cancer cell line not expressing FGF9 to prepare FGF9 overexpressing cells. Overexpression of FGF9 in A549, a cell line of non small cell lung cancer (lung adenocarcinoma), confirmed that it acquired anchorage independent growth ability in FGF9 overexpressing cell line. In the type 2 alveolar epithelial cell line MLE12-FGF9 highly expressing FGF9, subcutaneous transplantation into immunodeficient mice forms small cell carcinoma and it is thought that FGF9 may act as oncogene in lung small cell carcinoma.

研究分野：呼吸器腫瘍

キーワード：FGF9 肺癌 分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦および世界において癌死亡の第一位でありさらに増加の一途をたどっている。種々の治療法の進歩にもかかわらず肺癌の平均5年生存率は15%以下であり、治療の新たな標的となる分子生物学的特徴を解明することが切実に求められている。

肺癌の中で最も頻度の高い組織型である肺腺癌においては、近年の盛んな研究により、発癌の原因となる多くの癌遺伝子が同定された。それに伴い癌遺伝子特異的な治療法が開発され、患者の予後を改善させている。肺小細胞癌は肺癌全体の約15%、大細胞癌(神経内分泌腫瘍も含む)は約5-10%を占めるが、肺腺癌等と比べ相対的に頻度が低いことや、手術適応症例が少ないこともあり今まで病態の詳細な解明が一向に進んでいない。悪性度が極めて高く、これだけ多くの患者がいるにも関わらず、近年の分子標治療薬開発の恩恵を受けられておらず、有効な新規治療の展望が未だに開けていない。結果として、肺小細胞癌や神経内分泌性大細胞癌(LCNEC: large cell neuroendocrine carcinoma)などのneuroendocrine tumorと診断された患者の予後は依然として極めて不良である。

近年、FGFを含む各種増殖因子が癌の生物学において重要であることが報告されている。FGFは現在までに23種が知られており、その受容体であるFGFRは1-4まで4種類が知られている。別役らはFGFの中でも肺の発生に関わり、成人では発現しない増殖因子であるFGF9が肺癌の発生に深く関わり、トランスジェニックマウスを用いた実験でFGF9を肺上皮細胞選択的に過剰発現させることで肺腺癌を形成することを報告した(Cancer Research, 2013)。

我々はFGF9が肺癌患者が与える影響に注目し、当院での手術検体を用いたcDNA microarrayによる解析でFGF9の発現を検

討し、非小細胞肺癌においてFGF9高発現症例は、非発現症例と比較して有意に予後が不良であることを確認した(Lung Cancer, 2014)。さらに免疫染色による検討で、非小細胞肺癌のみならず肺小細胞癌ではFGF9は60%以上の症例でFGF9の発現を認めていることを確認した。

そこで我々は予備実験としてFGF9を含めたFGFが肺癌細胞及び肺上皮細胞に及ぼす影響を検討した。FGF9はその発現が低い細胞において添加することで腫瘍増殖能を亢進することを見出した。さらに、驚くべきことにFGF9を肺上皮細胞株MLE12に過剰発現することで、肺小細胞癌を形成した。

また、細胞株レベルではあるが、我々が所持している各種肺癌細胞株のmRNAレベルでのFGF9の発現を見たところ、H2016およびH1770にて非常に発現が高く、これら2細胞株共にLCNECであることも非常に興味深い。以上より、FGF9の非小細胞肺癌、かつ今まで報告のない小細胞癌や神経内分泌系大細胞癌(LCNEC)などのneuroendocrine tumor双方における役割・重要性に関してさらなる研究が必要である。

## 2. 研究の目的

肺癌におけるFGF9/FGFRシグナルの役割を解明し、臨床への応用が可能か評価することである。

## 3. 研究の方法

FGF9の肺小細胞癌に与える影響を明らかにするためにin vitro及びin vivoの実験を計画した。まずは肺小細胞癌細胞株におけるFGF9の発現をmRNAレベルで確認した。また、臨床検体及びデータベースを用いた解析を行い各種細胞株においてFGF9の発現をみた。その発現の絶対量の違いによる機能的役割を評価するため、siRNAを用いてFGF9

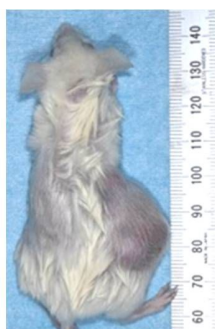
を knock down し、細胞増殖、腫瘍形成能、および下流シグナルへ及ぼす影響を評価した。FGF9 を肺上皮細胞に過剰発現させたモデルを作成し、FGF9 過剰発現に伴う癌化能、腫瘍形成能を評価し、上記データを受けて、In vivo で FGF9 依存性の肺小細胞癌を形成させ（免疫不全マウスの皮下に腫瘍を移植する）FGFR 阻害剤を投与し腫瘍増殖抑制、腫瘍縮小効果を評価する。

#### 4. 研究成果

FGF9 を発現していない肺上皮細胞株及び肺癌株にレトロウイルスベクターを用いて FGF9 遺伝子を導入し、FGF9 過剰発現 stable cell line を作製した。

FGF9 過剰発現の肺上皮細胞あるいは肺癌細胞に与える影響を評価するため、FGF9 導入後、in vitro では SAGCFA、MTS アッセイで行った。非小細胞肺癌（肺腺癌）の細胞株である A549 にレトロウイルスベクターを用いて FGF9 を過剰発現させ、過剰発現させていない A549 と SAGCFA を施行したところ、FGF9 過剰発現細胞株で足場非依存性の増殖能を獲得したことを確認した。

また、in vivo では FGF9 を導入した肺癌株と導入していない肺癌株を免疫不全マウスに別々に皮下移植し、形成される腫瘍体積を比較することで腫瘍形成能への影響を評価を予定している。さらに腫瘍形成能以外にも他臓器への転移能、生命予後に与える影響を評価する。具体的には、CT を用いた転移巣の検索も行い継続的変化も観察する予定



MLE12-FGF9は腫瘍（小細胞癌）を形成した

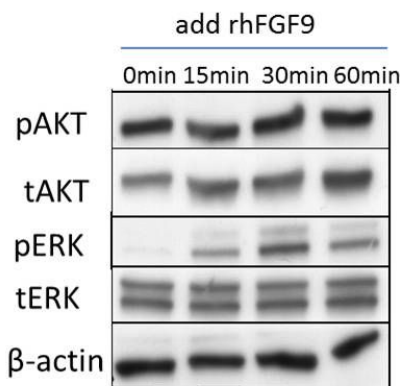
である。  
FGF9 を高発現した 2 型肺上皮細胞株 MLE12-FGF9 では免疫不全マウスに皮下移植したところ、小細胞癌を形成（左図）し、FGF9 は肺小

細胞癌においても oncogene としての働きがある可能性が考えられた。

現在 FGFR 阻害薬による治療を行い腫瘍の縮小傾向が得られるかを確認しており、その再現性含め検討中である。

FGF9 を高発現し、そのシグナルに依存している可能性のある肺癌株を選択し、siRNA もしくは shRNA を用いて FGF9 を knock down する。FGF9 に依存して増殖する細胞株があれば増殖抑制や細胞死を起こすと考えられ、細胞増殖能を MTS アッセイで足場非依存性のコロニー形成能を soft agarose gel colony formation assay (SAGCFA) で評価したところ、足場非依存性にコロニーを形成することを確認した。現在データの再現性確認を行っている。また、in vivo においても腫瘍形成への影響を評価中である。

下流シグナルについて、FGF9-MLE12 細胞において、FGF9 は FGFR1 と FGFR3 を介して MAPK 経路を活性化した。下図は MLE12 細胞に FGF9 添加蛋白を回収し、western blotting を行ったものである。FGF9 添加に伴い ERK のリン酸化レベルが上昇していることが分かった。MLE12 に FGF9 添加し細胞から蛋白を回収する。その後、FGF9 に対する抗体を用いて免疫沈降を行い各種 FGFR 抗体を用いた western blotting で FGF9 の受容体を同定する。



pERK シグナルが活性化している

また FGFR を同定する別の方法として、siRNA を用いて FGFR を knockdown した後 に FGF9 を添加し MAP kinase 経路の活性化 が抑制されるかを western blotting で確認す る。

臨床データの解析を並行して行い、小細胞 肺癌患者検体の免疫染色での検討では約 67%(n:10/15)で FGF9 の発現を認めた。

これらの得られたデータおよび現在進め ている研究を重ね、FGF9 の肺癌に与える影 響をさらに解析し、特に小細胞癌での働きに 注目した解析を加え論文執筆予定である。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[ その他 ]

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

扇野 圭子 ( OHGINO KEIKO )

慶應義塾大学・医学部・職名 : 助教

研究者番号 : 40573324