

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10611

研究課題名(和文)食道がん悪性化におけるFGFR3IIIcの分子メカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism by which FGFR3IIIc promotes esophageal cancer progression.

研究代表者

瀬尾 美鈴 (SE0, Misuzu)

京都産業大学・生命科学部・教授

研究者番号：60211223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、食道がん患者検体(n=20)における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FGFR3IIIcの発現を免疫組織化学染色により評価し、患者の予後との関連を解析した。その結果、食道がん部位におけるFGFR3IIIcの発現は正常上皮部位と比べて1.6倍高く($p < 0.01$)、食道がんにおけるFGFR3IIIcの発現が高いほど、患者の全生存期間が短くなった($r = 0.436$)。食道がん培養細胞株を用いて、抗がん剤フルオロウラシルとドセタキセルに対する耐性を獲得することを示した。以上の結果から、FGFR3IIIcは食道がんの治療の標的としての可能性が高いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における食道がん患者の5年生存率は約40%と低く、他の消化器がんの60%と比較して予後が悪いことから、食道がん患者の予後が悪いメカニズムを解明することが、効果的な治療薬の開発に重要である。線維芽細胞増殖因子受容体3(FGFR3)はチロシンキナーゼ型受容体で、がんの悪性化に働く。本研究で、FGFR3IIIcの発現が高いほど、食道がん患者の生存期間が短くなることが証明された。さらに、FGFR3IIIcが発現することで標準治療薬である抗がん剤への薬剤耐性も獲得し、再発の可能性が高くなることが分かった。FGFR3IIIcの発現または機能を阻害することができれば、食道がん患者の治療に大きく役立つ。

研究成果の概要(英文)：Esophageal cancer patients (EC) have poor prognosis among all cancers. In this study, clinical significance of the increased expression of an alternatively spliced isoform of Fibroblast Growth Factor Receptor 3, FGFR3IIIc, in the specimens of esophageal cancer patients was examined by analyzing the immunohistochemical staining. As a result, the FGFR3IIIc expression levels in the EC were higher than those in the normal esophagus epithelium ($p < 0.01$). In addition, the ratio of FGFR3IIIc expression levels in the EC patients was negatively correlated with overall survival (OS) ($r = -0.436$). OS in the EC patients with higher expression levels of FGFR3IIIc was shorter than that in those with lower expression levels of FGFR3IIIc ($P < 0.01$). In addition, overexpression of FGFR3IIIc in EC cells increased the resistance (IC50) for anti-cancer drugs such as fluorouracil and Docetaxel. In conclusion, FGFR3IIIc has the potential to be a molecular target for EC therapy.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：食道がん 線維芽細胞増殖因子受容体3 がん悪性化 抗がん剤耐性 選択的スプライシング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における食道がん患者の5年生存率は約40%であり、他の消化器がんの平均60%と比較して予後が悪いことから、食道がん患者の予後が悪いメカニズムを解明することが、効果的な治療薬の開発に重要である。線維芽細胞増殖因子受容体3(FGFR3)は、チロシンキナーゼ型受容体で、遺伝子増幅や活性変異、転座などにより、がん遺伝子として働く。正常上皮細胞では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 FGFR3IIIb が発現し、間葉系細胞では FGFR3IIIc が発現するが、これまでに報告者らが、早期食道がんのステージ0において FGFR3IIIc の発現が上昇することを明らかにしたことから、FGFR3IIIc の発現と食道上皮のがん化(悪性化)において何らかの関連があることが示唆された¹⁾。

2. 研究の目的

本研究において FGFR3IIIc の発現が食道がんの悪性化に働くことで、食道がん患者の予後にどのような影響を与えるのかを調べるため、食道がん患者検体を用いて FGFR3IIIc 発現と患者の治療経過・予後との関連を解析した。さらに、食道がん培養細胞株を用いて、FGFR3IIIc の発現と抗がん剤耐性獲得との関係を解析した。

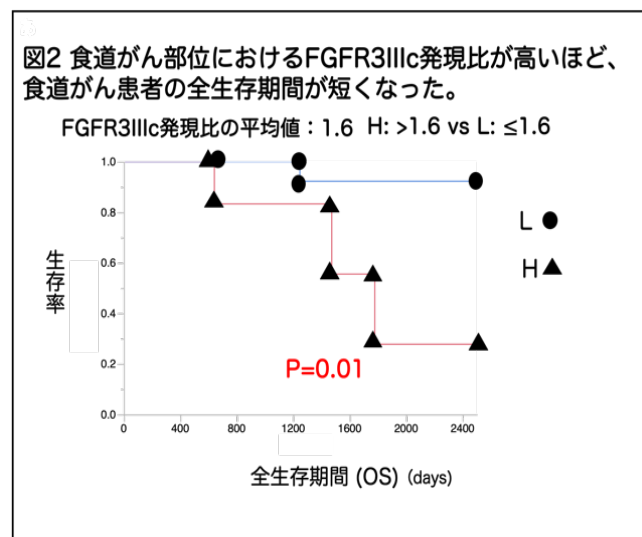
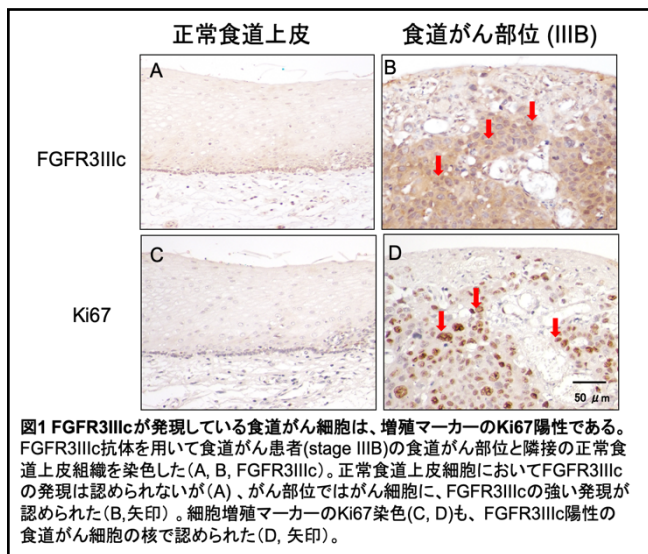
3. 研究の方法

(1) 選択的スプライシングアイソフォーム FGFR3IIIc を特異的に認識する抗体を作成し、各ステージの食道がん患者検体から、食道がん部位及び隣接した正常上皮部位の免疫組織化学染色を行い、FGFR3IIIc の発現比を求め、患者の臨床情報との間に何らかの関連が認められるかを解析した。(2) 食道がん細胞に発現する FGFR3 を siRNA によってノックダウンし、食道がんの標準治療薬として用いられるフルオロウラシル、ドセタキセル、シスプラチンなどの抗がん剤に対する耐性を MTT アッセイによって解析した。さらに、FGFR3 の発現をノックダウンした食道がん細胞に FGFR3IIIc または FGFR3IIIb のレンチウイルスベクターを用いて過剰発現し、細胞増殖と抗がん剤耐性への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) FGFR3IIIc を特異的に認識するウサギポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて、北野病院消化器外科において治療のために外科手術された各ステージの食道がん患者検体(n=20)を免疫組織化学染色し、FGFR3IIIc の発現と患者の予後等の臨床情報との関連を解析した。図1には、ステージ IIIB の食道がん患者食道組織切片の免疫組織染色の結果を1例として示した。B の食道がん部位で FGFR3IIIc が茶色に強く染まるがん細胞が認められ(赤矢印)、D で連続切片の同領域のがん細胞では細胞増殖のマーカである Ki67 が核に染色された(赤矢印)。この結果は、FGFR3IIIc を発現している食道がん細胞の増殖が促進されていることを示している。

一方、隣接する正常食道上皮では、FGFR3IIIc の発現は認められず、Ki67 陽性細胞も基底膜以外には認められなかった。20名の患者の解析結果をまとめると、食道がん組織における FGFR3IIIc の発現は正常上皮組織と比べて1.6倍高かった。(p<0.01)。各患者の食道がん対正常上皮における FGFR3IIIc の発現比を比べると、特に術前後化学療法無群では FGFR3IIIc の発現比が高いほど、全生存期間(OS)が短くなった(r=0.436)。さらに、発現比の平均値1.6よりも高い群の食道がん患者と低い群の2つのグループに分けて、OSを比較したところ、発現比が高い群は低い群よりもOSが有意に短くなった(図2、p=0.01)。FGFR3IIIc の発現が高い患者群の予後が短くなるこ



とは、大変重要な知見であり、そのメカニズムについては今後解析されなければならない。

(2) 食道がん細胞株 KYSE220 を用いて、FGFR3IIIc を強制発現させ抗がん剤耐性を調べると、シスプラチンに対する変化は見られなかったが、ドセタキセルまたは 5-Fu に対する耐性が約 3 倍に上昇した。食道がん細胞株 TE4 では、シスプラチンとドセタキセルに対する耐性の変化は見られなかったが、5-Fu に対する耐性が約 6 倍に上昇した。KYSE220 と TE4 において、FGFR3IIIc 発現による細胞内シグナル伝達を解析したところ、PI3K/AKT 経路と、MAPK、および PLC γ 経路が活性化されていることが示された。以上の結果から、FGFR3IIIc は食道がんの増殖促進と食道がん患者の全生存期間の短縮、及び抗がん剤耐性獲得に関わっていると考えられる。従って、FGFR3IIIc は、食道がんの早期診断マーカーおよび治療の標的としての可能性が高いことが示された。

引用文献

1. 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*. 2016 Jan;64(1):7-17. (査読あり)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野 信洋, 上田 修吾, 浅野 弘嗣, 神吉 正太郎, 菖蒲池 香奈, 瀬尾 美鈴
2. 発表標題 食道がんにおけるFGFR3IIIcアイソフォーム発現の臨床的意義
3. 学会等名 ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田成美、上野信洋、上田修吾、菖蒲池香奈、米倉寛人、神吉正太郎、瀬尾美鈴
2. 発表標題 食道がん細胞におけるFGFR3IIIc発現と抗がん剤耐性の獲得
3. 学会等名 第65回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misuzu Kurokawa-Seo and Shugo Ueda
2. 発表標題 Enhanced FGFR3IIIc expression is correlated with poor prognosis in human esophageal cancer patients.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Fukumitsu, Hiroto Yonekura, Narumi Ota, Nobuhiro Ueno, Shugo Ueda, Seima Nakanishi, Atsushi Yamaguchi, Misuzu Seo.
2. 発表標題 Enhanced FGFR3IIIc expression is correlated with poor prognosis in human esophageal cancer patients and induces acquired resistance to cancer drugs.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

教員紹介 瀬尾美鈴
<https://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/nls/seo-misuzu.html>
京都産業大学 大学院教員紹介 生命科学研究科 教授 瀬尾美鈴
http://www.kyoto-su.ac.jp/graduate/g_ls/kyoin/seo.html
Division of Life Sciences Professor Misuzu Seo
http://www.kyoto-su.ac.jp/english/department/graduate/g_ls/fm/seo.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上田 修吾 (UEDA Shugo) (80372580)	公益財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究主幹 (74314)	
研究協力者	上野 信洋 (UENO Nobuhiro)		