

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18691

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるFGFR c-isoformの発現機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) Functional analyses of FGFR1(IIIc) in oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

堀田 麻実(Hotta, Asami)

山梨大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00754607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系様形質を示す口腔扁平上皮癌はESRP1/ESRP2の発現が低くZEB1/ZEB2の発現が高い結果、FGFR c isoformが持続的に発現していることを見出した。反対に上皮系様口腔扁平上皮癌は逆の発現特性を示しており、持続的にFGFR2b isoformが発現している事が明らかになった。重要な事は、ERKsは間葉系口腔扁平上皮癌細胞から自律的に分泌される因子によってFGFR(IIIc)が活性化しERKsが持続的にリン酸化され、ZEB1を高いレベルで発現維持する事に關与していた事である。阻害剤及びsiRNAによるFGFR(IIIc)の拮抗はZEB1の発現をかなり抑制し上皮様形質へ修復した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近FGFRとN-cadherinの結合は双方の膜上の安定性を高めN-cadherinへの接着を増強させ運動性を抑制する事が報告された。間質内を模倣しているとはいえないが、FGFR1IIIcとN-cadherinの相互作用によってあらたなシグナルが構築されている可能性は高い。また膀胱癌及び結腸癌においてE-cadherinが減少したFGFR2IIIbの発現低下が悪性形質に貢献していることが報告された。IIIbが上皮細胞特異的なE-cadherinと結合しEMTを抑制し逆にMETを誘導するようなシグナルを伝達しているとするとこのような会合を制御するような分子も将来治療薬として有用かもしれない。

研究成果の概要(英文)： We show that the mesenchymal-like phenotypes of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells are dependent on autocrine FGF-FGFR signaling. Mesenchymal-like OSCC cells express low levels of ESRP1/2 and high levels of ZEB1/2, resulting in constitutive expression of the IIIc-isoform of FGFR, FGFR(IIIc). By contrast, epithelial-like OSCC cells showed opposite expression profiles for these proteins and constitutive expression of the IIIb-isoform of FGFR2, FGFR2(IIIb). Importantly, ERK was constitutively phosphorylated through FGFR1(IIIc), which was activated by factors secreted autonomously by mesenchymal-like OSCC cells and involved in sustained high-level expression of ZEB1. Antagonizing FGFR1 with either an inhibitor or siRNAs considerably repressed ZEB1 expression and restored epithelial-like traits.

研究分野：口腔扁平上皮癌

キーワード：FGFR1c isoform EMT ZEB1/2 FGF2 口腔扁平上皮癌 CSC

## 1. 研究開始当初の背景

近年、原発固形腫瘍からの遺伝子診断に基づく薬剤感受性診断など、いわゆるオーダーメイド治療が進められている。一方で、「上皮間葉転換 (EMT)」や「がん幹細胞」の概念が浸透するに伴い、原発巣細胞の形質の不均一性 (heterogeneity) の問題が浮上し、結果、細胞増殖に特化する胞巣内癌細胞と、運動性に特化する胞巣外 (浸潤先端) 癌細胞などが「癌組織」を形成している (Semin Cancer Biol 2012)。このような、運動性の高い癌細胞は、間葉系細胞様の形質を持ち、ひとたび間質内に浸潤すると周囲線維芽細胞との鑑別が非常に困難となる。したがって、癌組織内にわずかに存在する悪性度の高い癌細胞を的確に評価診断することが重要である。上皮間葉転換 (EMT: Epithelial-mesenchymal transition) は、本来、上皮細胞が間葉細胞に分化する形質転換機構で個体発生時に観察された現象である。近年、癌細胞が悪性度の高い低・未分化性の形質を獲得する機構として受け入れられるようになり、また、がん幹細胞の発生にも関与しているとされる (Cell 2016)。EMT を獲得した癌細胞は、上皮性形質から逸脱し線維芽細胞様の形質をとり、運動性などが亢進し、効率よく浸潤できるようになるばかりでなく、強い抗がん剤耐性能も獲得する (Nature, 2015 p472, Nature 2015 p525)。近年、EMT 転写因子である、ZEB1 の発現の上昇により、ESRP1/2 の発現が抑制され、b isoform から c isoform へ変換されることが報告されている (Oncogene 2012)。口腔扁平上皮癌細胞は、頭頸部癌において、もっとも一般的な悪性腫瘍のひとつである。多くの患者は、最初に病院を訪れたときに、病気の局所的な初期の症状だと診断される。外科的処置、化学療法、放射線療法や併用の様々な処置ののちの5年生存率は、その悪性度と薬剤耐性のため 50%より低くとどまっている。このように、診断や治療戦略の開発は、治療の成功へおおいに前進するであろう。癌細胞の浸潤の過程は細胞-細胞間相互作用が喪失し、運動性を獲得することと関連している。また、部分的に EMT と関連している。

## 2. 研究の目的

FGFR c isoform は間葉系細胞 (M-OSCC cells) に、b isoform は上皮系細胞 (E-OSCC cells) に発現し、上皮特異的選択的スプライシング因子 ESRP によって発現制御され、EMT (上皮間葉転換) に深く関与している。さらに c isoform のリガンドである FGF-2, 4 は TGF- $\beta$  誘導性 EMT を協調的に増強する。そこで本研究では口腔癌における IIIc isoform の機能解析を目的に、その発現・機能解析や細胞機能との関連性を検討した。

## 3. 研究の方法

複数の口腔扁平上皮癌細胞を用いて FGFR と ESRP の発現特性を rRT-PCR 法ならびにウェスタンブロット法により解析した。さらに c isoform のノックダウン細胞を作製し、浸潤能、細胞増殖能を検討した。

## 4. 研究成果

### 口腔癌細胞と EMT

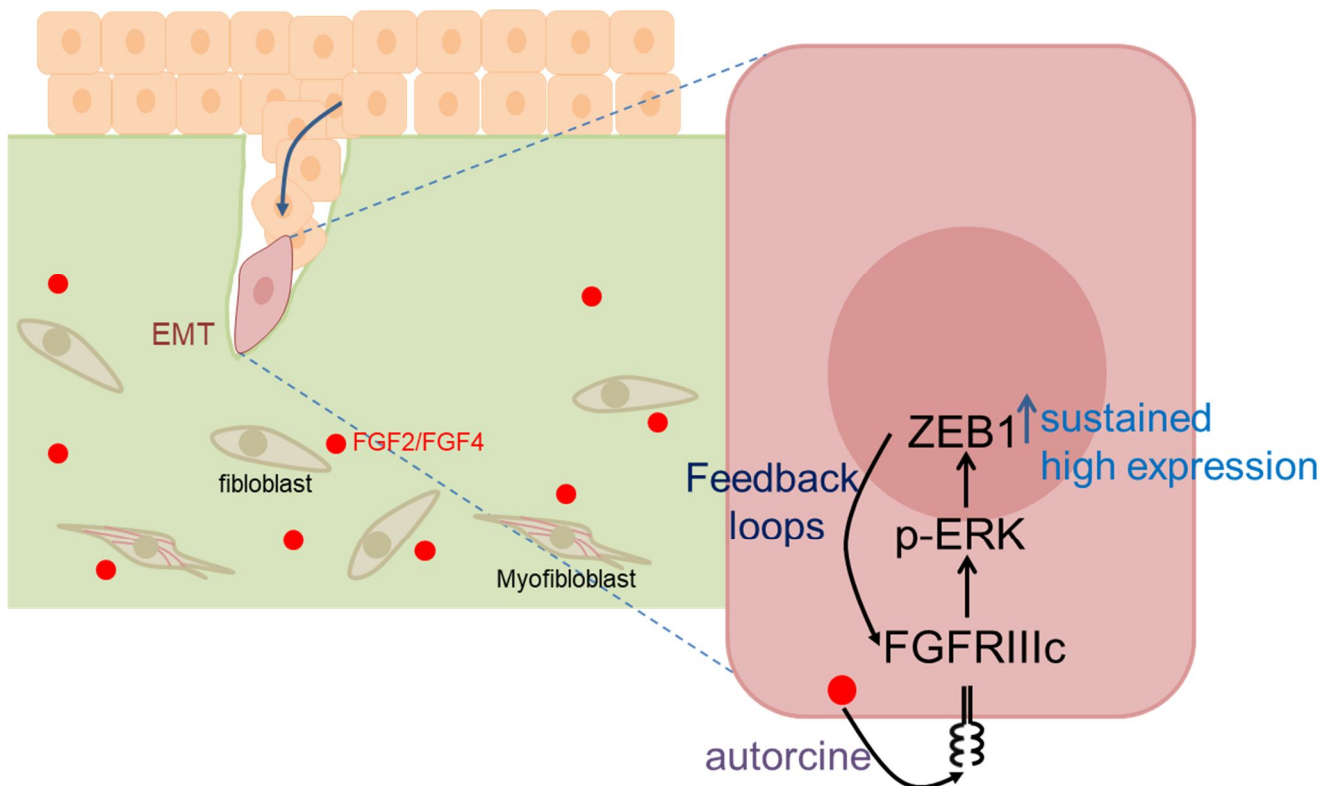
EMT に伴い、FGFR IIIc isoform が発現することは乳癌細胞などで、すでに知られていた。そこで、われわれは口腔癌細胞を用いて、IIIc isoform を活性化するようリガンドに関する研究をおこなった。まず、複数の口腔癌細胞株を用い、EMT 特性を検討すると、9種類の細胞は上皮系 (E-OSCC cells) で、2種類のみが間葉系形質 (M-OSCC cells) をもっており、さらに、M-OSCC cells は ZEB を高発現し、ESRP の発現も低く、予想通り、FGFR IIIc isoform の発現を確認し、ERK1/2 の高い活性化も確認した。そこで、FGFR IIIc isoform の siRNA や阻害剤を作用させると、ERK1/2 の活性化の抑制と ZEB の発現低下、さらには部分的に EMT 形質が抑制された。また興味深いことに、E-OSCC cells の ERK1/2 のリン酸化は、血清飢餓により減弱されるのに対し、M-OSCC cells の ERK1/2 のリン酸化は、血清飢餓状態でも持続された。このことから、FGFR

IIIc isoform を活性化する因子の自己分泌が示唆され、実際 FGF2 の mRNA が M-OSCC cells では非常に高いことがわかった。さらに、これらの M-OSCC cells の培養上清を、FGFR IIIc isoform のみを発現している細胞に添加すると、ERK1/2 の活性化が上昇する。一方で、E-OSCC cells の培養上清ではそのような現象は認められないことから、M-OSCC cells は FGF2 や FGF4 などの IIIc isoform を活性化する因子を自己分泌していることが示唆された。したがって、EMT の獲得にともない、IIIc isoform への変化のみならず、その受容体を活性化するようリガンドの自己分泌も促進していることを示している。

### EMT のシグナル中心としての ERK

上述したように FGFR IIIc isoform からの ERK の活性化は EMT を持続させるための、ポジティブ フィードバックの中心と考えられる。これを裏付ける研究として、最も有名ながん遺伝子である Ras の活性化型変異は、ERK 経路を持続的に活性化する。さらに、この持続的な活性化が TGF- $\beta$  による EMT 誘導に必須である。したがって、ERK シグナルの抑制は、がんの悪性転化機構を抑制できる可能性がある。しかしながら、ERK シグナルは正常上皮細胞の増殖にも必須であることから、安易に抑制できない。そこで、ERK の下流で EMT に必須の分子を探索すると、ETS であった。ETS は ZEB のプロモーター活性を上昇させ、ZEB の発現を増加している。さらに、ETS ファミリーの ESE1 {the epithelium-specific subfamily of the larger E26 transformation-specific (ETS) transcription factor family} は ETS の作用を抑制している。したがって、このような分子を標的にすることで、将来的な分子標的薬として創薬開発が可能であると思われる。

FGF-FGFR1IIIc isoform axis FGFR1IIIc isoform を発現した間葉系 OSCC 細胞は、自らが分泌する液性因子及び、間葉組織に広く分布する FGF2/4 によって、ERK1/2 のリン酸化が持続的に起こり、それによって、ZEB1 の発現が高く維持される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mai Koizumi Ichikawa, Kaori Endo, Yuka Itoh, Asami Hotta Osada, Yujiro Kimura, Koichiro Ueki, Kunio Yoshizawa, Keiji Miyazawa and Masao Saitoh	4. 巻 -
2. 論文標題 Ets family proteins regulate the EMT transcription factors Snail and ZEB in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS openbio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀田麻実、吉澤邦夫、角田達哉、木村裕二郎、諸井明德、上木耕一郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞とFGF受容体IIIc isoform
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 堀田麻実、吉澤邦夫、木村裕二郎、諸井明憲、上木耕一郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞における線維芽細胞増殖因子受容体阻害剤の細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 第39回日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 堀田麻実、市川舞、藤本佳那、木村裕二郎、高山明裕、井口蘭、諸井明德、吉澤邦夫、上木耕一郎
2. 発表標題 臍帯 血移植後に生じたnon-gingival soft tissue growthsが自然消失した1例
3. 学会等名 第35回日本口腔診断学会 ・ 第32回日本口腔内科学会 ・ 第33回日本臨床口腔病理学会 3学会合同学術大会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------