

学位論文

ヒト唾液腺腫瘍の悪性転換に伴う
fibroblast growth factor receptor 遺伝子群
の differential expression

学位申請者 田中良治

広島大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任 : 岡本哲治教授)

1997

謝辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った広島大学歯学部口腔外科学第一講座高田和彰前教授，並びに岡本哲治教授に深厚なる謝意を表します。また，本研究を進めるに際し，終始御助言，御校閲を頂いた本学歯科薬理学講座，土肥敏博教授ならびに本学口腔生化学講座，加藤幸夫教授に心から御礼申し上げます。尚，本研究を進めるに際し，多大の御配慮，御指導を賜りました本学口腔外科学第一講座，坂本哲彦博士，W. Alton Jones Cell Science Center, J. Denry Sato博士及びTexas A & M University, Institute of Biosciences and Technology, 菅 幹雄博士ならびにWallace L. McKeehan教授に深謝致します。

最後に，本学口腔外科学第一講座の諸先生方に感謝致します。

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 材料と方法	4
第 1 節 細胞培養法	4
1) 基礎培地	4
2) 培養細胞およびその培養法	4
3) 細胞増殖に対するFGF-1, -2, およびKGF/FGF-7の影響	5
第 2 節 正常唾液腺組織におけるKGF蛋白の発現	5
第 3 節 各培養細胞におけるFGF-RmRNAの発現	6
1) Total RNAの分離	6
2) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法およびPCR-Southern hybridization法を用いたKGFおよびFGF-RmRNAの発現の検討	7
第 4 節 ドミナントネガティブFGF-R1遺伝子(Δ FGF-R1)を用いた唾液腺腺癌細胞におけるFGF-R1遺伝子の機能の検討	9
1) 野生型FGF-R1受容体と Δ FGF-R1受容体の構造	9
2) 脂質小胞を介する遺伝子導入	9
3) Δ FGF-R1-HSY細胞におけるFGF受容体結合試験	10
4) Δ FGF-R1-HSY細胞における細胞増殖試験	10
5) ノードマウス背部皮下における Δ FGF-R1-HSY細胞の造腫瘍性の検討	11

第 3 章 結果	12
第 4 章 考察	15
第 5 章 総括	20
参考文献	22
図表	32

略号

FGF : fibroblast growth factor

KGF/FGF-7 : keratinocyte growth factor

△ : dominant-negative

bp : base pair(s)

SGF : submandibular gland-derived fibroblasts

SGE : submandibular gland-derived epithelial cells

PAT : pleomorphic adenoma-derived cells

ACC : adenoid cystic carcinoma cell line

HSG : salivary gland adenocarcinoma cell line

HSY : parotid gland adenocarcinoma cell line

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

第1章 諸言

近年、正常細胞の悪性転換に伴って細胞増殖因子の発現が増大し、同時に細胞の増殖因子要求性に異常が生じていることが報告されている¹⁾。また、細胞の腫瘍化に重要な役割を担う癌遺伝子産物の中には、ある種の細胞増殖因子あるいは増殖因子受容体と高い類似性を有するものがあることが知られている^{2), 3)}。細胞増殖因子の作用は、増殖因子と細胞表面の受容体の結合、受容体チロシンキナーゼの活性化とそれに続くシグナル伝達により増殖・分化が導かれると考えられている⁴⁾。さらに、ヒト腫瘍細胞における増殖因子の過剰発現は、腫瘍の*in vivo*における増殖動態とよく相関することも報告されている⁵⁾。

Fibroblast growth factor (FGF)はヘパリンやグルコサミノグルカンに親和性を持つポリペプチド増殖因子であり、神経外胚葉、中胚葉および外胚葉に由来する細胞の増殖および分化を調節する因子である⁶⁾。また、発生過程で細胞特異的に発現することが報告されている⁶⁾。一方、悪性度の高い腫瘍細胞でのFGFの過剰発現や、FGF遺伝子を導入してその発現を高めることにより、細胞の悪性転換が認められること^{7), 8)}、さらにFGFファミリーに属する12種類のポリペプチドの中にはINT2やHST等の癌遺伝子産物も存在することから⁹⁾、細胞の腫瘍化と密接に関与していることが示唆されている。これらFGFファミリーの内、FGF-1とFGF-2は最もよく研究されており、互いに53%のアミノ酸配列の類似性を持つ。また、FGF-1とFGF-2 (aFGF, bFGF)の*in vitro*および*in vivo*における生物活性には類似点が多い⁵⁾。FGF-1, -2はシグナル配列を持たないため、細胞内蛋白として発現されることが考えられているが、細胞外でのFGF-1, -2の局在が報告されていることから、何らかの分泌メカニズムが存在することが示唆されている¹⁰⁾。

FGFの活性は細胞表面の高親和性受容体を介しており、その主な構造は細胞内にチロシンキナーゼ領域、細胞外に3個の免疫グロブリン様ループ構造(Ig)を持つことが明らかにされ^{11, 12)}、現在までに、FGFR-1 (flg), FGFR-2 (Bek), FGFR-3およびFGFR-4の4種類のヒトFGF受容体遺伝子が報告されている¹³⁾。さらにFGF-R1, -R2, -R3では、3番目のIgの後半部分はalternative splicingによりそれぞれIIIb型とIIIc型が存在し、数多いFGFファミリーに対して特異性を示している¹⁴⁾。いずれも一本鎖の蛋白質であり、ヒトFGFRではファミリー間の相同性は55%以上である。FGFのシグナル伝達経路は、まずFGFが細胞外部位に結合して2量体化¹⁵⁾ (dimerization)し、細胞内領域の複数のチロシン残基が自己リン酸化するとともに、Src¹⁶⁾、PLC- δ ¹⁷⁾などの数種類の蛋白質がリン酸化される。その結果、受容体のinternalization、細胞形態の変化、分化、細胞の移動および増殖などが引き起こされると考えられている。一方、keratinocyte growth factor (KGF)/FGF-7は、FGFファミリーに属するシグナルペプチドを有する分泌型増殖因子であり、線維芽細胞由来のケラチノサイトを標的とする増殖因子として発見された¹⁸⁾。KGF/FGF-7は、真皮層の線維芽細胞で産生され、パラクライン的にKGF受容体であるFGF-R2(IIIb)遺伝子の発現が高い表皮層の基底角化細胞に働き、増殖・分化を誘導すると考えられている¹⁹⁾。

唾液腺はその機能と構造を維持するため、密接に連絡しあった上皮系と間葉系の高度に分化した細胞構築を示す。また、唾液腺腫瘍は多形性腺腫に代表される高い分化能を持った比較的増殖のおそい良性腫瘍から、腺様嚢胞癌や唾液腺腺癌に代表される未分化で増殖能や転移能の高い悪性腫瘍まで多様なphenotypeを示す。このような、多様なphenotypeを示す原因は明らかにされていないが、何らかの癌遺伝子や分子の変化に起因していることが考えられる。

Myokenら^{20), 21)}は、唾液腺腫瘍においてはFGF-1, -2の過剰発現がおこっていること、さらにFGF-1, -2に対する中和抗体やアンチセンスオリゴヌクレオチドが唾液腺由来腺癌細胞の増殖を抑制することを明らかにし、内在性のFGF-1, -2が唾液腺腫瘍の悪性転換とその自己増殖機構に深く関与していることを報告した。

本研究では、正常唾液腺および同組織由来腫瘍におけるFGFとFGF receptor (FGF-R)の働きを細胞内分泌学的にさらに明らかにするため、無血清培養系を用いて、ヒト正常唾液腺由来上皮細胞、ヒト多形性腺腫由来腫瘍細胞ならびにヒト唾液腺腺癌由来細胞の増殖におけるFGF-1, FGF-2およびKGF/FGF-7依存性と、これら細胞が発現するFGF受容体遺伝子の相違を検討した。また、KGF/FGF-7に対する抗血清を作製し、唾液腺組織でのKGFの発現を免疫組織学的に検討した。さらに、唾液腺癌細胞におけるFGF-R遺伝子の機能を解明するために、dominant negative (Δ) FGF-R1 遺伝子を作製し、 Δ FGF-R1 導入唾液腺癌細胞HSYの*in vitro* および*in vivo*における増殖能を検討した。

第2章 材料と方法

第1節 細胞培養法

1) 基礎培地

RPMI1640 medium²²⁾ と Dulbecco's Modified Eagle's medium²³⁾ (DMEM, 以上極東製薬) を1:1の割合で配合した培地 (以下RDと略す)^{24), 25)} および modified MCDB153(m'-MCDB)²⁶⁾ 培地を, 脱イオン化及び逆浸透により純化した水 (Puric model-S, オルガノ) に溶解後, aminobenzylpenicillin 90mg/L, Kanamycin sulfate 90mg/L(以上明治製薬), sodium pyruvate 110mg/Lを加え, さらに N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES, 同仁化学)を15mM, sodium bicarbonate(和光純薬)をRDに2g/L, m'-MCDBに1.2g/L添加し pH7.4に調節した後, 0.2 μ mフィルター (Acrocap, Gelman Science Inc., USA)で濾過滅菌した培地を基礎培地として用いた。

2) 培養細胞およびその培養法

ヒト正常唾液腺組織は, 腫瘍患者の頸部郭清手術時に摘出した病理組織学的に正常な顎下腺より得た。また, 多形性腺腫組織は, 手術時に摘出した腫瘍組織より得た。それぞれの組織を70%エタノールで消毒後, 0.5mm大に細切り, I型コラーゲン処理した60mm径プラスチックディッシュ上で組織片培養を開始した。SGEの培養は, RDとm'-MCDBを1:9の割合で混合した基礎培地 (以下RD153と略す) に, 10 μ M 2-mercaptoethanol, 10 μ M 2-aminoethanol, および10nM sodium selenite (以上片山化学), 10 μ g/ml crystalline bovine insulin, 5 μ g/ml human transferrin (以上Sigma) の5つの因子を加えた

無血清培地（以下RD153-5Fと略す）を用いた。また、PATもRD153-5Fを用いて培養を行った。

ヒト唾液腺由来腺癌細胞株としては、当科で樹立したACC細胞およびHSG、HSY細胞²⁷⁾（徳島大学歯学部口腔外科学第2講座、佐藤光信教授より供与）を用いた。ACC細胞はRDに3F, crystalline bovine insulinを加えた無血清培地で継代維持し、HSGおよびHSY細胞は5%仔牛血清（Calf serum, Hy Clone, USA）を含むRD培地で継代維持した。これら細胞は、TE-HER型CO₂インキュベーター（平沢製作所）内で、5%CO₂ 37°Cの条件下で静地培養を行った。

3) 細胞増殖に及ぼすFGF-1, -2およびKGF/FGF-7の影響

SGE, PATおよびHSY細胞を、I型コラーゲン処理した24wellプレートに1wellあたり 2×10^4 細胞/mlの細胞密度で各1ml植え込み、種々の濃度のFGF-1, FGF-2およびKGF/FGF-7を加え5日後に各wellの細胞数をコールターカウンター（Coulter Electronics, England）にて計測した。これら増殖実験の無血清培地として、SGEおよびPAT細胞はRD153-5F培地を、HSG, HSY細胞はRD5F培地を用いた。

第2節 正常唾液腺組織におけるKGF蛋白の発現

抗KGFウサギ血清は、リコンビナントラットKGFをウサギに免疫することにより得た。

正常唾液腺組織におけるKGF蛋白の発現を免疫組織学的に検討した²⁸⁾。ベクタスタインABCキット(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)を用いてavidin-biotin-peroxidase complex method(ABC法)による免疫ペルオキシダーゼ染色法を行った。組織を4°Cアセトンで24時間固定後、パラフィン包

埋を行い4 μm 厚の切片を作製した。つぎに、エタノール系列にて水和後、メタノール/1% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼを除去し、10%ヤギ血清で非特異的反応をブロックした。続いて、一次抗体として抗KGFウサギポリクローナル抗体を、次いでビオチン化ヤギ抗ウサギIgG+IgA+IgM、さらにavidin-biotin-peroxidase complexの順にそれぞれ30分間ずつ反応させ、最後にDAB溶液(0.25mg/ml 3, 3-diaminobenzidine 0.01% H_2O_2 , 50mM Tris-HCl buffer, pH7.6)にて発色させた。核染はヘマトキシリンにて行った。なお、各段階で反応終了後にPBSにて洗浄した。コントロールとして正常ウサギ血清を15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用いた。

第3節 各培養細胞におけるFGF-RmRNAの発現

1) Total RNAの分離

各培養細胞からのtotal RNAの抽出は、Chomczynskiら²⁹⁾の方法に準じて以下の方法で行った。各培養細胞をdenaturing solution (4M guanidide thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH 7.0, 0.1M 2-mercaptoethanol, 0.5% N-lauryl sarcosine)で採取後、18G注射針にてホモジナイズし、1/10容の2M sodium acetate pH4.0を加えた後、飽和フェノール(フェノール/TE)およびフェノールとクロロホルムを等量混和したフェノール/クロロホルムを用いてtotal RNAを分離した。次に、1容のイソプロパノールを加えることによりRNAを沈殿させた。このRNAを、再度denaturing solutionにて溶解後1容のイソプロパノールを加えることによりRNAを沈殿させ、全RNAを得た。

2) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)
法およびPCR-Southern hybridization法を用いたKGFおよびFGF-RmRNAの
発現の検討

各細胞におけるFGF-RmRNAの発現をRT-PCR法およびPCR-Southern hybridization法を用いて検討した。PCR法はKawasakiら³⁰⁾の方法に準じて行った。プライマー^{31), 32)}は以下に示す, それぞれFGF-R1-(IIIc), FGF-R2-(IIIb), FGF-R2-(IIIc), FGF-R3-(IIIb), FGF-R3-(IIIc)の領域とFGF-R4の3番目のイムノグロブリンループの後半をコードする領域に設計した。KGFプライマーは, 牛KGFシーケンス³³⁾より設計した。

KGF (upstream : 5'-GGGTCGACCTGCAGTCTAGAAAGCTTATACTGACATGGATCCTGCCA-3'

downstream : 5'-CTCGGATCCTCCAAGTCCACGGTCCTGAT-3')

FGF-R1-(IIIc) (upstream : 5'-GGCAAGGAATTCAAACCTGAC-3' ,

downstream : 5'-CATCACGGCTGGTCTCTCTTC-3') ,

FGF-R2-(IIIb) (upstream : 5'-AACGGGAAGGAGTTTAAGCAG-3' ,

downstream : 5'-GGAGCTATTTATCCCCGAGTG-3') ,

FGF-R2-(IIIc) (upstream : 5'-TGGCAGAACTGTCAACCATGC-3' ,

downstream : 5'-TGGCAGGACAGTGAGCCAGGC-3') ,

FGF-R3-(IIIb) (upstream : 5'-AACGGCAGGGAGTCCGCGGC-3' ,

downstream : 5'-CTTGGGGCCCGTGAACACGCAGCC-3') ,

FGF-R3-(IIIc) (upstream : 5'-AACGGCAGGGAGTCCGCGGC-3' ,

downstream : 5'-CTTGGGGCCCGTGAACACGCAGCC-3') ,

FGF-R4 (upstream : 5'-GATGGACAGGCCTTTCATGGG-3' ,

downstream : 5'-TGCTGCGGTCCATGTGGGGTCCTC-3')

RT-PCRは, GeneAmp RNA PCR Core kit (Perkin-Elmer Cetus, USA)

を用いた。DNA増幅には、DNAサーマルサイクラー(Perkin-Elmer Cetus Instrument Co.Ltd., USA)を用いた。まず、RT溶液(10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM dNTP, 1U Ribonuclease inhibitor, 2.5mM random hexamer, 2.5U MuLV reverse transcriptase)中に全RNA 1 μ g/2 μ lを加え、42°C, 15分間逆転写反応を行った。その後、PCR溶液(10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.15 μ M upstream, 0.15 μ M downstream, 2.5U Amplitaq DNA polymerase)を加え全量100 μ lにし、変性反応95°C, 1分, アニール55°C, 1分, 伸長反応72°C, 1.5分間を1サイクルとし、このプログラムを35サイクル行うことによりPCR産物を得た。また、PCR-Southern法は以下の方法で行った。泳動されたDNAサンプルを6 \times SSC (0.9M NaCl, 0.09M sodium citrate)を用いてナイロンメンブレン(BIODYNE B, Pall, USA)に転写した。転写したナイロンメンブレンを十分乾燥させた後、UV光線を5分間照射することにより、ナイロンメンブレンとDNAの架橋固定を行った。非特異的反応を阻害するために、固定されたナイロンメンブレンをハイブリダイゼーションバッファー(6 \times SSC, 0.5%SDS, 10mMEDTA, 5 \times Denhart's soln., 0.1mg/ml sonicated salmon sperm DNA)で68°C, 90分間反応させた後、変性 [³²P]標識 FGF-Rプローブ 1 μ g (100cpm/ μ g)を含んだハイブリダイゼーションバッファー中で68°C下10時間ハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、ナイロンメンブレンを2 \times SSC, 0.5%SDS溶液に浸し室温で洗浄し、風乾後、オートラジオグラフィを行った。各 FGF-Rプローブとして、ヒト Keratinocyte細胞の mRNAより上記プライマーを用いて RT-PCRを行った PCR産物を pCR IITMベクター (INVITROGEN, USA)にサブクローニングし、ジデオキシ法にて塩基配列を確認した後、大腸菌株 XL-1 Blue にトランスフェクトさせ、大量培養し、plasmid DNAを分離後、制限酵素 EcoRI 処理で得た部分的 cDNAを用いた。各 cDNAの塩基配列の決定は、

T7 DNA polymeraseを用いたシーケンスキット(オートリードシーケ
エンシングキット, Pharmacia, USA)およびALFオートシーケンサー
(Pharmacia, USA)を用い決定した。

第4節 ドミナントネガティブFGF-R1遺伝子(Δ FGF-R1)を用いた唾
液腺腺癌細胞におけるFGF-R1遺伝子の機能の検討

1) 野生型FGF-R1受容体と Δ FGF-R1受容体の構造

野生型FGF-R1受容体と、今回作製したチロシンキナーゼ機能を欠失した Δ
FGF-R1受容体の構造を示す(図14)。 Δ FGF-R1は、FGF-R1 β 2遺伝子の3'側の
tyrosine kinase domain に25bp(GTGTGGAACCTGAAGGCTCCCCTGG)のinsertionを
挿入し、両端をBamHIにて切断した後、pcDNAIneo(Invitrogen, USA)にライ
ゲートし作製した(図15)。なお、コントロールとしてpcDNAIneoをセルフラ
イゲートしたベクターを用いた。

2) 脂質小胞を介する遺伝子導入(lipofection)

I型コラーゲン(Cell-matrix type I-A, 新田ゼラチン)処理した35mm dish
に、HSY細胞を $1-3 \times 10^4$ /wellの細胞密度で植え込み、50-70%コンフルエント
まで増殖(18-24時間培養)後、以下の方法で遺伝子導入を行った。

細胞を抗生物質不含RDで2回洗浄後、 $2\mu\text{g}$ の plasmid DNAを加えた $100\mu\text{l}$ の抗
生物質不含RD(A液)と $6\mu\text{l}$ のLIPOFECTAMINETM Reagent^{34),35)}(GIBCO BRL)を
含む $100\mu\text{l}$ の抗生物質不含RD(B液)を穏やかに混和し、室温で30分間静地し
た。続いて、A液とB液の混和液をRD5Fに $12\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度で添加し、トランスフェ

クションを行った。トランスフェクションの時間は6時間、12時間および24時間に設定し、それぞれトランスフェクション終了後RD5F+10% CSに培地交換を行いさらに24時間培養した。つぎに、細胞を400 μ g/ml の G418 (Genestin, 和光純薬)を含むRD5F+10% CS培地でさらに培養し、G418耐性細胞を選択した。

3) Δ FGF-R1-HSY細胞におけるFGF受容体結合試験

I型コラーゲン処理した48well プラスチックプレート(48well Multi Plate 48F, MS-80480, 住友ベメディカル) に2) で選択した細胞を、 1.5×10^4 /wellの細胞密度で植え込み、2日間培養後、FGF受容体結合試験を以下の方法で行った。

種々の濃度の放射性ヨード標識FGF-2および25 μ g/mlのヘパリンを加えて4時間氷上にて結合試験を行った。反応終了後、細胞をRD buffer(RD, 25mM HEPES, 1mg/ml BSA, 0.02% NaN₃, pH7.4)にて洗浄し、1% TritonX-100 (和光純薬) にて可溶化し、その放射活性をガンマカウンター (オートウェルガンマシステム, ARC-600, Aloka) にて測定し、FGF結合能の高いクローンを6クローン選択した。

4) Δ FGF-R1-HSY細胞における細胞増殖試験

3) で得た Δ FGF-R1-HSY細胞6クローンをRD5Fを用い、I型コラーゲン処理した24wellプレートに、1wellあたり 2×10^4 /well/mlの細胞密度で植え込み、RD5Fに各濃度のFGF-2を10 μ g/mlのヘパリン存在下に加え、5日後にその細胞数をコールターカウンターにて計測した。また、HSYneo細胞と Δ FGF-R1-HSY細胞をI型コラーゲン処理した24wellプレートに、1wellあたり 2×10^4 /well/mlの細胞密度で植え込み、FGF非存在下で培養し24時間毎にその細胞数を計測する

ことにより、6日間の細胞増殖を経時的に比較検討した。

5) ノードマウス背部皮下における Δ FGF-R1-HSY細胞の造腫瘍性の検討

各 Δ FGF-R1-HSY細胞をTrypsin-EDTAで分散後、 10^7 cells/0.1ml PBSの細胞密度に調整し、ノードマウス背部皮下に100 μ l移植した。腫瘍体積は以下に示す計算式を用いて、2日毎に測定した。

$$\text{体積} = 1/2 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$$

第3章 結果

1, 各細胞の無血清培養下での増殖に及ぼす, FGF-1, FGF-2およびKGF/FGF-7の影響

SGEの増殖はFGF-1およびKGFにより濃度依存的に促進された。しかし, FGF-2は促進作用を示さなかった。またKGFはFGF-1より強い増殖促進活性を示した。PAT細胞の増殖もFGF-1およびKGFにより促進されたが, FGF-1はKGFより強い活性を示した。しかし, FGF-2は活性を示さなかった。一方, 唾液腺由来腺癌細胞HSYの増殖はFGF-1およびFGF-2により濃度依存的に促進された。しかしKGFは活性を示さなかった(図1, 表1)。

2, 正常唾液腺組織におけるKGF蛋白の発現

ウエスタンブロットの結果, 今回作製したKGFに対する抗血清はlong form, short formのいずれのKGFも認識することが明らかとなった(図2)。また, 免疫組織学的検討の結果, 正常唾液腺組織においてはストローマ組織, 導管上皮細胞と導管内腔側にKGFの陽性所見を認めた(図3)。

3, 各細胞におけるKGFmRNAおよびFGF-RmRNAの発現

各細胞におけるKGFmRNAの発現をRT-PCRで解析した結果, 唾液腺由来線維芽細胞SGFは予想サイズ344bpのKGF遺伝子を発現していた。しかし, 唾液腺由来上皮細胞や腫瘍細胞は発現していなかった(図4)。また, PCR-Southern法においてもRT-PCRの結果が確認された(図5)。各細胞におけるFGFRmRNAの発現

を検討した結果、ACC、HSGおよびHSY細胞は予想サイズ528bpのFGF-R1 (Ⅲc) 遺伝子を発現していた。しかしSGE細胞およびPAT細胞は発現していなかった (図6)。また、PCR-Southern法の結果、RT-PCRの結果と同様に、ACC、HSG、HSY細胞においてのFGF-R1 (Ⅲc) 遺伝子が発現されていることが確認された (図7)。SGE、PAT、ACC細胞はKGF受容体である予想サイズ382bpのFGF-R2 (Ⅲb) 遺伝子を発現していたが、HSGおよびHSY細胞は発現していなかった (図8)。PCR-Southern法においてもRT-PCRの結果が確認された (図9)。予想サイズ499bpのFGF-R2 (Ⅲc) 遺伝子はすべての細胞で発現されてなかった (図10)。PAT細胞およびACC細胞は予想サイズ561bpのFGF-R3 (Ⅲb) 遺伝子を発現していた。しかし他の細胞は発現していなかった (図11)。予想サイズ499bpのFGF-R3 (Ⅲc) 遺伝子はすべての細胞で発現されていなかった (図12)。ACC、HSGおよびHSY細胞は予想サイズ526bpのFGF-R4 遺伝子を発現してたが、他のSGEおよびPAT細胞は発現していなかった (図13)。また、SGF細胞はFGF-R1 (Ⅲc) 遺伝子のみを発現していた (未発表データ) (表2)。

4. 腫瘍細胞における Δ FGF-R1の発現

1) 遺伝子導入細胞の選択

Δ FGF-R1遺伝子導入後、400 μ g/mlのG418を含むRD10%CS培地にてG418耐性細胞を約50クローン選択した。つぎに、コントロールのHSYneo細胞より高いFGF結合能を示すクローンを選択した。その結果、6*1*1, 6*1*7, 6*1*8, 12*1*1, 6*2*5, 12*1*3, 12*1*5, 12*2*1, 24*2

1) Δ FGF-R1-HSY細胞を8クローン得た(図16)。

2) Δ FGF-R1-HSY細胞の無血清培養条件下における細胞増殖能の検討

コントロールのHSYneo細胞は、RD5F培地で良好な増殖を示したが、 Δ FGF-R1-HSY細胞はほとんど増殖することが出来ないことが明らかとなった(図17)。

4) Δ FGF-R1-HSY細胞の増殖に対するFGF-2の影響

各 Δ FGF-R1-HSY細胞の無血清培養下での増殖に及ぼすFGF-2の影響を検討した結果、コントロールのHSYneo細胞はFGF-2により濃度依存的に増殖促進されたが、 Δ FGF-R1-HSY細胞のFGF-2に対する反応性は消失していた(図18)。

5) Δ FGF-R1-HSY細胞のヌードマウス背部皮下における Δ FGF-R1-HSY細胞の造腫瘍性の検討

Δ FGF-R1-HSY細胞をbalb/cヌードマウスの背部皮下に移植し、その造腫瘍性および増殖性をコントロールのHSYneo細胞と比較検討した結果、コントロールのHSYneo細胞に比較し、 Δ FGF-R1-HSY細胞の増殖性は低下していた。さらに、6*1*8クローンの造腫瘍性は消失していた(図19)。

第4章 考察

本研究において著者は、ヒト正常唾液腺由来上皮細胞、ヒト多形性腺腫由来腫瘍細胞ならびにヒト唾液腺由来腺癌細胞の増殖におけるFGF-1、FGF-2およびKGF/FGF-7依存性を、Myokenら²¹⁾がすでに報告している無血清培養系を用いて検討した。本培養系では、正常唾液腺や同腫瘍組織由来の上皮系細胞のみを選択的に培養でき、結合組織由来の線維芽細胞は増殖できない。正常唾液腺由来上皮細胞およびヒト多形性腺腫由来腫瘍細胞の増殖は、FGF-1およびKGF/FGF-7により促進された。しかし、FGF-2には反応しなかった。また、ストローマ細胞はFGF-1およびFGF-2に反応し、その増殖は促進された（未発表データ）。一方、ヒト唾液腺由来腺癌細胞の増殖はFGF-1およびFGF-2により促進されたが、KGF/FGF-7には反応しなかった。したがって、ヒト唾液腺腫瘍の悪性転換に伴って、FGF要求性に変化が生じていることが明らかとなった。このFGF要求性の変化は、各細胞が発現しているFGF-R分子種の相違を反映している可能性が考えられた。そこで、これら細胞におけるFGF-R遺伝子の発現を検討した結果、唾液腺腫瘍の悪性化に伴い、FGF-R2(IIIb)遺伝子の発現の消失とFGF-R1(IIIc)およびFGF-R4遺伝子の発現が生じていることが明らかとなった。

FGF-R1遺伝子f1gとFGF-R2(IIIc)遺伝子bekの産物は、FGF-1およびFGF-2の高親和性受容体であることが明らかにされている。一方、KGF-R/FGF-R2(IIIb)はbek遺伝子にコードされているが、第3 Igループの後半はbek型とは異なったエキソンにコードされており³⁶⁾、FGF-2に対する結合能はない。Beckerら³⁷⁾は、FGF-R1が、黒血球や悪性黒色腫の増殖や分化を制御していることを報告している。また、Muenkeら³⁸⁾は、顎・顔面骨の先天奇形を伴うPfeiffer syndromeでは、FGF-R1遺伝子のExon 5(link 2nd and 3rd Ig-like domain)とFGF-R2(IIIc)遺伝子のExon 9 (2nd 1/2 of 3rd Ig-like

domain)にpoint mutationが起こっていることを報告している。また、Pfeiffer syndromeと類似した先天奇形を伴うJackson-Weiss syndrome, Crouzon syndromeおよびApert syndromeにおいてFGF-R2(IIIc)遺伝子のpoint mutationが見いだされている³⁹⁻⁴¹⁾。

免疫組織学的検討により、正常唾液腺組織では、ストローマ組織、導管上皮と導管内腔側にKGF蛋白の発現を認めたが、腺房細胞ではその発現を認めなかった。しかし、RT-PCRの結果、導管上皮細胞はKGFmRNAを発現していないことが明らかとなった。KGFはストローマ組織で発現され、上皮細胞に特異的な分化誘導因子としてパラクライン的に働いていると考えられる。また、KGFはFGF-1やFGF-2とは異なりシグナルペプチドを持つ分泌蛋白であるため、遠隔細胞への相互作用を有していると考えられている。Wernerら¹⁹⁾は、マウスの創傷治癒過程における各種FGFおよびFGF-R遺伝子の発現をRNAプロテクション法およびin situ ハイブリダイゼーション法で検討し、皮膚損傷の起こった翌日よりストローマ細胞でのKGFmRNAの発現が損傷前の160倍上昇するが、受容体についてはFGF-R1, -R2, -R3ともに皮膚損傷の前後でその発現に大きな変化はないことを報告している。Myokenら⁴²⁾, Okamotoら⁴³⁾は、唾液腺上皮細胞の増殖・分化にとってFGF-1およびKGF/FGF-7が必須であり、またこれら因子はコラーゲンゲル3次元培養系では同細胞の導管形成を誘導することを報告している。これらの結果から、唾液腺のストローマ組織で産生・分泌されたKGFはKGF受容体であるFGF-R2(IIIb)を発現する導管上皮細胞に働き、その増殖・分化を維持していることが推察された。したがって、KGF-KGF受容体系を中心とした上皮-間葉系相互作用により、正常唾液腺の高度に分化した細胞構築とその機能が維持されていることが強く示唆された。また、導管内腔側にKGFの発現を認めたことから、KGFは導管細胞を經由して唾液中に外分泌されて、口腔粘膜を含む消化管上皮の増殖・分化や創傷治癒にも関与している可能性がある。

一方、多形性腺腫由来腫瘍細胞の増殖はFGF-1およびKGFにより促進されたが、FGF-2には反応しなかった。さらに、RT-PCRの結果、同細胞は正常唾液腺上皮由来細胞で発現されていたFGF-R2(IIIb) 遺伝子に加えて、新たにFGF-R3 (IIIb) 遺伝子を発現していることが判明した。FGF-R3(IIIb) はFGF-1の高親和性受容体であり、FGF-2やKGFとの結合能はない。Myokenら⁴⁴⁾ は多形性腺腫組織におけるFGF-1とFGF-2の発現を免疫組織学的に検討し、2層性導管構造の内層腫瘍細胞がFGF-1を強く発現することを報告している。したがって、彼女らおよび著者の結果から、同腫瘍細胞の増殖は依然、ストローマ組織で産生されたKGFに依存しているものの、自己が産生するFGF-1により自己増殖が可能となると考えられ、その緩慢な増殖性が裏付けられた。また、典型的な小人症であるAchondroplasiaは、FGF-R3の細胞膜貫通領域をコードする遺伝子のpoint mutationにより発症することが報告されており⁴⁵⁾、PAにおけるFGF-R3遺伝子の発現は、PAの持つ軟骨分化能と一致している。

一方、腺癌細胞はFGF-1およびFGF-2により増殖促進され、KGFには反応しないことが明らかとなった。さらに、RT-PCRの結果、同細胞はFGF-R1 (IIIc) 遺伝子とFGF-R4遺伝子を発現し、KGF受容体遺伝子であるFGF-R2(IIIb)遺伝子は発現していないことが判明した。FGF-R1(IIIc)およびFGF-R4遺伝子によりコードされるFGF受容体蛋白は、いずれもFGF-1およびFGF-2の高親和性受容体である。これらの結果は、唾液腺腫瘍の悪性転換に伴ってKGFR/FGF-R2(IIIb)遺伝子の発現の消失が起こるとともに、FGF-R1(IIIc)およびFGF-R4遺伝子の発現が生じていることを示唆している。

種々の悪性腫瘍細胞株においても、FGF-1およびFGF-2の過剰発現が報告されている^{6), 10), 46), 47)}。Murphyら⁴⁸⁾はFGF-1, FGF-2およびFGF受容体を過剰発現している悪性度が高いとされているglioblastoma細胞株は、FGF非存在下でも自己増殖が可能であることを報告している。今回実験に用いた唾液

腺由来腺癌細胞HSYは、FGF-1, -2および高親和性FGF-Rを発現している²¹⁾。

したがって、無血清培養系において、増殖にFGFを必要とする正常上皮細胞と異なり、外因性FGFに非依存的に自己増殖が可能となったと考えられる。また、KGF-R/FGFR2(IIIb)を発現していないことから、*in vivo*においてもストローマ組織で産生されたKGFには依存せず、自己の産生するFGF-1およびFGF-2により自己増殖が可能となり、同腫瘍が未分化で増殖能の高い腫瘍であることを裏付けている。このように、唾液腺腫瘍の悪性化とFGF-R 1 (IIIc) やFGF-R4 遺伝子の発現は密接に関係していることが明らかとなった。

唾液腺癌細胞におけるFGF受容体の機能をさらに検討するために、腺癌細胞HSYにドミナントネガティブ (Δ)-FGF-R1遺伝子⁴⁹⁾を形質導入した。 Δ FGF-R1-HSY細胞は、インスリン、トランスフェリンを含む無血清培地では増殖できず、FGF-1, 2により増殖促進を受けなかった。さらに Δ FGF-R1-HSY細胞のヌードマウス背部皮下での増殖性は低下し、 $6 \times 1 \times 8$ クローンの造腫瘍性は消失していた。

FGFは哺乳類の胚発生過程においてその誘導を引き起こし、多様な器官の形成に関与する重要なmorphogenとしての機能を有することが明らかにされている^{50), 51)}。Wernerら^{52), 53)}は、正常の受容体機能を欠損したドミナントネガティブFGF受容体を発現しているマウス皮膚重層扁平上皮では、正常のケラチンパターンが失われ、極性のない皮膚が形成されることを明らかにし、FGFが上皮細胞の重要な分化誘導因子であると結論している。また、彼らはドミナントネガティブKGF受容体を発現させたマウス皮膚重層扁平上皮では、毛包において上皮の萎縮、異常を認め、真皮の厚い組織に覆われており、また、治癒機転の遅延があると結論している。Johnstonら⁵⁴⁾は、乳癌細胞において正常細胞とドミナントネガティブFGF-R3を発現させた悪性細胞の細胞運動能を検討し、発現細胞においてラッフル膜形成が起こるこ

とを報告している。

FGF受容体のシグナルは、FGFが細胞外部位に結合して二量体化¹⁵⁾し、FGF-R1 (IIIc) のホモダイマーでも FGF-R4とのヘテロダイマーであっても細胞内領域のTK1では複数のチロシン残基が自己リン酸化するとともに、多種類の蛋白質がリン酸化され、伝達されると考えられている。本研究では、TK2に25bpのkinase insertを導入し、続くすべてのコドンは変更され不正なアミノ酸配列をコードするframeshift mutation (図16) を起こすことにより、FGFとの受容体結合能は持つがキナーゼ活性を持たないドミナントネガティブ受容体を用いた。その結果、キナーゼの活性化は引き起こされなかった(未発表データ)。Ras経路、MAPキナーゼ等のシグナル伝達は今回検索していないが、細胞形態に差は認められなかった。したがって、ドミナントネガティブFGFRを用いて唾液腺癌の増殖を制御出来ることが明らかとなり、同遺伝子を用いた唾液腺癌の遺伝子治療への応用の可能性が考えられた。また、著者が見いだした唾液腺腫瘍の悪性化に伴うFGF受容体遺伝子群の発現の変化は、唾液腺腫瘍の遺伝子診断として臨床応用が可能性であることを示している。

以上、正常唾液腺においては、上皮系細胞と間葉系細胞が細胞内分泌学的に互いに依存しあって、その増殖・分化が制御されているが、悪性化の過程で腫瘍細胞は間葉系からの独立性と自己増殖能を獲得することが示され、唾液腺癌の高い増殖能や転移能が裏付けられた。さらに、唾液腺腫瘍の悪性化に伴うFGF-R遺伝子群の発現の変化は、唾液腺腫瘍の遺伝子診断や遺伝子治療の可能性を示唆している。

第5章 総括

1. FGF-1およびKGFは、正常唾液腺由来上皮細胞SGEおよび多形性腺腫由来腫瘍細胞PAT細胞の増殖を促進した。SGE細胞に対して、KGFはFGF-1より強い増殖促進活性を示したが、PAT細胞に対しては、FGF-1がKGFより強い活性を示した。FGF-2はいずれの細胞にも活性を示さなかった。FGF-1およびFGF-2は唾液腺由来腺癌細胞HSG、HSY細胞の増殖を促進したが、KGFは活性を示さなかった。

2. 唾液腺由来線維芽細胞SGFはKGF遺伝子を発現していたが、SGE、PAT、HSGおよびHSY細胞は発現していなかった。

3. SGE細胞はKGFレセプターであるFGF-R2 (IIIb) 遺伝子のみを発現していた。PAT細胞はFGF-R2 (IIIb) 遺伝子とFGF-1をリガンドとするFGF-R3 (IIIb) 遺伝子が発現していた。一方、唾液腺癌細胞HSGおよびHSY細胞はFGF-R2 (IIIb) 遺伝子が発現せず、FGF-1およびFGF-2をリガンドとするFGF-R1 (IIIc)およびFGF-R4 遺伝子が発現していた。

4. HSY細胞にチロシンキナーゼ機能を欠失した Δ FGF-R1 遺伝子が発現させ、 Δ FGF-R1-HSY細胞を8クローン得た。 Δ FGF-R1-HSY細胞はインスリン、トランスフェリンを含む無血清培地では増殖できず、FGF-1およびFGF-2により増殖促進されなかった。さらに Δ FGF-R1-HSY細胞のヌードマウス背部皮下における増殖能は低下し、6*1*8クローンの造腫瘍性は消失した。

以上の結果から、正常唾液腺の増殖・分化は、上皮系細胞と間葉系細胞が、互いに依存しあって維持されているが、悪性化過程で腫瘍細胞は間葉系からの独立性と自己増殖能を獲得することが明らかとなり、その悪性化が強く裏付けられた。さらに、FGF-R遺伝子を指標とした唾液腺癌の遺伝子診断および同遺伝子を標的とした唾液腺癌の遺伝子治療が可能であることが示唆された。

参考文献

- 1) DeLarco, J. E. and Todaro, G. J.:Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 4001-4005, 1978.
- 2) Waterfield, M. D., Scrace, G. T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, A., Westermark, B., Heldin, C. H., Huang, J. S. and Deuel, T. F.:Platelet derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p 28^{sis} of simian sarcoma virus. Nature 304:35-39, 1983.
- 3) Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M. D.:Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb B oncogene protein sequence. Nature 307:521-527, 1984.
- 4) Ullrich, A. and Schlessinger, J.:Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. Cell 61:203-212, 1990.
- 5) Sporn, M. B. and Roberts, A. B.:Autocrine growth factors and cancer. Nature 313:745-747, 1985.
- 6) Burgess, W. H. and Maciag, T.:The heparin-binding(fibroblast) growth factor family of protein. Annu. Rev. Biochem. 58:575-606, 1989.

- 7) Jaye, M., Lyall, R. M., Mudd, R., Schlessinger, J. and Sarver, N.: Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J.* 7: 963-969, 1988.
- 8) Sasada, R., Kurokawa, T., Iwane, M. and Igarashi, K.: Transformation of mouse BALB/c 3T3 cells with human basic fibroblast growth factor cDNA. *Mol. Cell. Biol.* 8:588-594, 1988.
- 9) Theillet, C. Le, R. X., De-Lapeyriere., O., Grosgeorges, J., Adnane, J., Raynaud, S. D., Simony, L. J., Goldfarb, M., Escot, C. and Birnbaum, D.: Amplification of FGF-related genes in human tumors: possible involvement of HST in breast carcinomas. *Oncogene* 4(7):915-22, 1989.
- 10) Wu, D., Kan, M., Sato, G. H., Okamoto, T. and Sato, J. D.: Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J. Bio. Chem.* 266: 16778-16785, 1991.
- 11) Adnane, J., Gaudray, P., Dionne, C. A., Crumley, G., Jaye, M., Schlessinger, J., Jeanteur, P., Birnbaum, D. and Theillet, C.: BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene.* 6(4): 659-663, 1991.

- 12) Muenke, M. and Schell, U.:Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. trends in GENETICS 11: 308-313, 1995.
- 13) Jaye, M., Schlessinger, J. and Dionnie, C. A.:Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases : molecular analysis and signal transduction. Biochim. Biophys. Acta 1135:185-199, 1992.
- 14) Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M.:Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J. Biol. Chem. 21;271 (25):15292-15297, 1996.
- 15) Heldin, C. H.:Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction. Cell 80:213-223, 1995.
- 16) George, B., Cohen, R. R. and David, B.:Molecular binding domains in signal transduction protein. Cell 80:237-248, 1995.
- 17) Tony, P.:Protein module and signalling networks. Nature 373: 573-580, 1995.
- 18) Finch, P. W., Rubin, J. S., Miki, T., Ron, D. and Aaronson, S. A.:Human KGF Is FGF-Related with Properties of a Paracrine Effector of Epithelial Cell Growth. Science 245:752-755, 1989.

- 19) Werner, S., Peters, K. G., Longaker, M. T., Fuller, P. F., Banda, M. J. and Williams, L. T.: Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis wound healing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:6896-6900, 1992.
- 20) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J. D., Kan, M., McKeehan, W. L., Nakahara, M. and Takada, K.: Immunohistochemical study of overexpression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 in human malignant salivary gland tumors. J. Pathol. 178:429-436, 1996.
- 21) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J., D., Kan, M., McKeehan, W. L. and Takada, K.: Expression of fibroblast growth factor (FGF-1), and FGF-2 and FGF receptor-1 in a human salivary-gland adenocarcinoma cell line.: Evidence of autocrine growth. Int. J. Cancer 65:650-657, 1996.
- 22) Moore, G. E., Gerner, R. E. and Franldin, H. A.: Culture of normal human leukocyte. JAMA 199 : 519-524, 1967.
- 23) Dulbecco, R. and Freeman, G.: Plaque production by the polyoma virus. Virology 8:396-397, 1959.
- 24) Sato, J. D., Kawamoto, T. and Okamoto, T.: Cholesterol requirement of P3-X63 Ag8.653 and X63-Ag8.653 mouse myeloma cells

- for growth in vitro. *J. Exp. Med.* 657:1761-1766, 1987.
- 25) Myoken, Y., Okamoto, T., Osaki, T., Yabumoto, M., Sato, G. H., Takada, K. and Sato, J. D.:An alternative method for the isolation of NS-1 hybridoma using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:477-480, 1989.
- 26) Tsao, M. C., Walthall, B. J. and Ham, R. G.:Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cell. Physiol.* 110:219-229, 1982.
- 27) Yanagawa, T., Hayashi, Y., Nagamine, S., Yoshida, S., Yura, Y. and Sato, M.:Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athymic nude mice. *Virchows Arch[B]* 51:185-195, 1986.
- 28) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J. D. and Takada, K.:Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). *J. Pathol.* 23:451-456, 1994.
- 29) Chomczynski, P. and Sacchi, N.:Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1987.

- 30) Kawasaki, E. S., Clark, S. S., Coyne, M. Y., Smith, S. D., Champlin, R., Witte, O. N. and McCormic, F. P.:Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:5698-5702, 1988.
- 31) Yan, G., Fukabori, Y., McBrige, G., Nikolaropolous, S. and McKeehan, W. L.:Exon switching and action of stromal and embryonic fibroblast growth factor(FGF)-FGF receptor gens in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. Mol. Cell. Biol. 13:4513-4533, 1993.
- 32) Okamoto, T., Sakamoto, A., Kan, M., Tanaka, Y., Takada, K. and Sato, J. D.:Expression of fibroblast growth factor binding protein HBp17 in normal and tumor cells. In Vitro Cell. Dev. Biol. 32 : 69-71, 1996.
- 33) Parrott, J. A., Vigne, J. L., Chu, B. Z. and Skinner, M. K.: Mesenchymal-Epithelial Interactions in Ovarian Follicle Involve Keratinocyte and Hepatocyte Growth Factor Production by Thecal Cells and Their Action on Granulosa Cells. Endocrinology 135-2: 569-575, 1994.
- 34) Felger, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W. and Wenz, M.:Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. USA. 84:7413-7417, 1987.

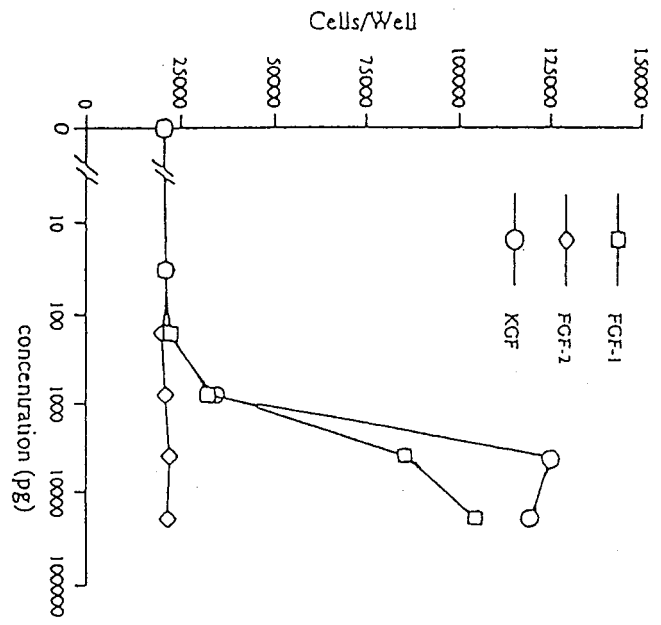
- 35) Leventis, R. and Silviu, J. R.: Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* 1023:124-132, 1990.
- 36) Miki, T., Fleming, T. P., Rubin, J. S., Ron, D. and Aaronson, S. A.: Expression cDNA Cloning of the KGF receptor by Creation of a Transforming Autocrine Loop. *Science* 251:72-75, 1991.
- 37) Becker, D., Lee, P. L., Rodeck, U. and Herlyn, M.: Inhibition of the fibroblast growth factor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene* 7: 2303-2313, 1992.
- 38) Muenke, M., Schell, U., Hehr, A., Nathaniel, H., Robin, H., Losken, W., Schinzel, A., Pulleyn, L. J., Rutland, P., Reardon, W., Malcolm, S. and Winter, R. M.: A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet.* 8:269-274, 1994.
- 39) Ethylin, W. J., Xiang, L., Alan, F. S., Gregory, M., Wendy, C., Michael, E., Jen-i, M., Lawrence, R. C., Charles, E. J. and Michael, J.: Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nature Genet.* 8:275-279, 1994.

- 40) Williams, R., Robin, M. W., Paul, R., Louise, J. P., Barry, M. J. and Sue, M.: Mutation in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nature Genet.* 8:98-103, 1994.
- 41) Przylepa, K. A., Paznekas, W., Zhang, M., Golabi, M., Bias, W., Bamshad, M. J., Carey, J. C., Hall, B. D., Stevenson, R., Orlow, S., Cohen, M. M. Jr. and Jabs, E. W.: Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nature Genet.* 13(4):492-494, 1996.
- 42) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J. D. and Takada, K.: Effect of fibroblast growth factor-1 on the three-dimensional growth and morphogenesis of human salivary gland epithelial cells embedded in collagen gels. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31:84-86, 1995.
- 43) Okamoto, T., Myoken, Y., Yabumoto, M., Osaki, T., Fujita, Y., Whitney, R. G., Kan, M., Crabb, J. W., Sato, G. H., Kato, Y., Takada, K. and Sato, J. D.: Androgen-dependent expression of fibroblast growth factor-1 in submaxillary gland of mouse. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 221 :795-802, 1996.
- 44) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J. D. and Takada K.: Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor (FGFR-1) in pleomorphic adenoma of the salivary gland., *J. Patholol.* :(in press), 1996.

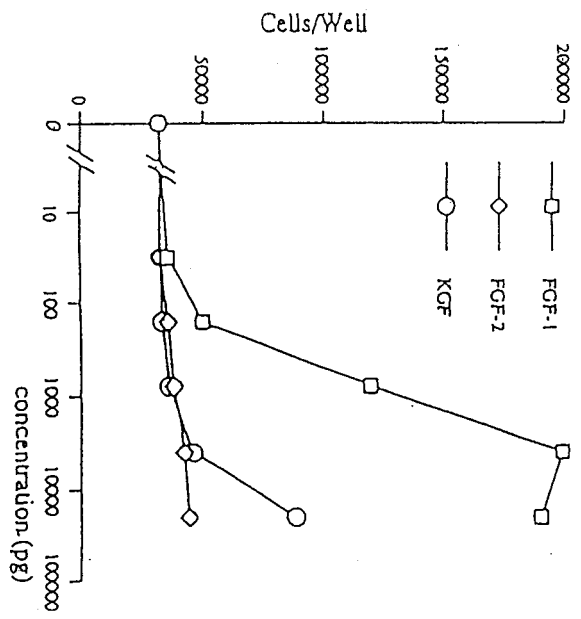
- 45) Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Church, D. M., Fielder, T. J., Bocian, M., Winokur, S. T. and Wasmuth, J. J.: Mutation in the Transmembrane Domain of FGFR3 Cause the Most Common Genetic Form of Dwarfism, Achodroplasia. *Cell* 78:335-342, 1994.
- 46) Yamamoto, N., Matsutani, S., Yoshitake, Y. and Nishikawa, K.: Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Histochemistry* 96:479-485. 1991.
- 47) Schultz, H. S. and Haghayegh, S.: β -fibroblast growth factor expression in human and murine squamous cell carcinomas and its relationship to regional endothelial cell proliferation. *Cancer Res.* 53:1444-1449, 1993.
- 48) Murphy, P. R., Sato, Y. and Knee, R. S.: Phosphorothioate antisense oligonucleotides against basic fibroblast growth factor inhibit anchorage-dependent and anchorage-independent growth of a malignant glioblastoma cell line. *Mol. Endocrinol.* 6:877-884, 1992.
- 49) Hou, J., Kan, M., McKeenan, K., McBride, G., Adams, P. and McKeenan, W. L.: Fibroblast Growth factor Receptors from Liver Vary in Three Structural Domains. *Science* 251:665-668, 1991.

- 50) Kimelman, D., Abraham, J. A., Haaparanta, T., Palisi, T. M. and Kirshner, M. W.:The presence of fibroblast growth factor in the Frog Egg : its role as a natural mesoderm inducer. *Science* 242; 1053-1056, 1988.
- 51) Slack, J. M. W., Darlington, B. G., Heath, J. K. and Godsave, S. F.:Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factor. *Nature* 326:197-200, 1987.
- 52) Werner, S., Weinberg, W., Liao, X., Peters, K. G., Blessing, M., Yuspa, S. H., Weiner, R. L. and Williams, L. T.:Targeted expression of a dominant-negative FGF receptor mutant in the epidermis of transgenic mice reveals a role of FGF in keratinocyte organization and differentiation. *EMBO J.* 12:2653-2643, 1993.
- 53) Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M. T., Krieg, T., Hofschneider, P. H. and Williams, L. T.:The function of KGF in Morphogenesis of Epithelium and Reepithelialization of Wounds. *Science* 266:819-822, 1994.
- 54) Johnston, C. L., Cox, H. C., Gomm, J. J. and Coomers, R. C. : bFGF and aFGF induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal epithelial cells. :FGFR-4 involvement. *Biochem. J.* 306 :609-616, 1995.

A



B



C

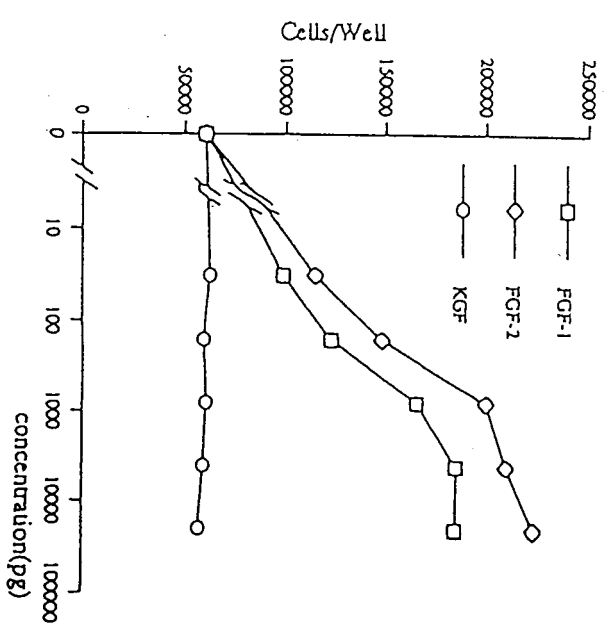


図1, 正常細胞と腫瘍細胞の増殖に対する無血清培養下での外因性FGFの影響

A; 正常唾液腺由来上皮細胞

B; 多形性腺腫由来腫瘍細胞

C; 唾液腺由来腺癌細胞株

	FGF-1	FGF-2	FGF-7 /KGF
SGE	+	-	++
PAT	++	-	+
HSG, HSY	+	++	-

表1. 正常細胞と腫瘍細胞の増殖に対する無血清培養下での
外因性FGFの影響

図2, Western blot analysis of human KGF by antiserum raised against Recombinant rat KGF.

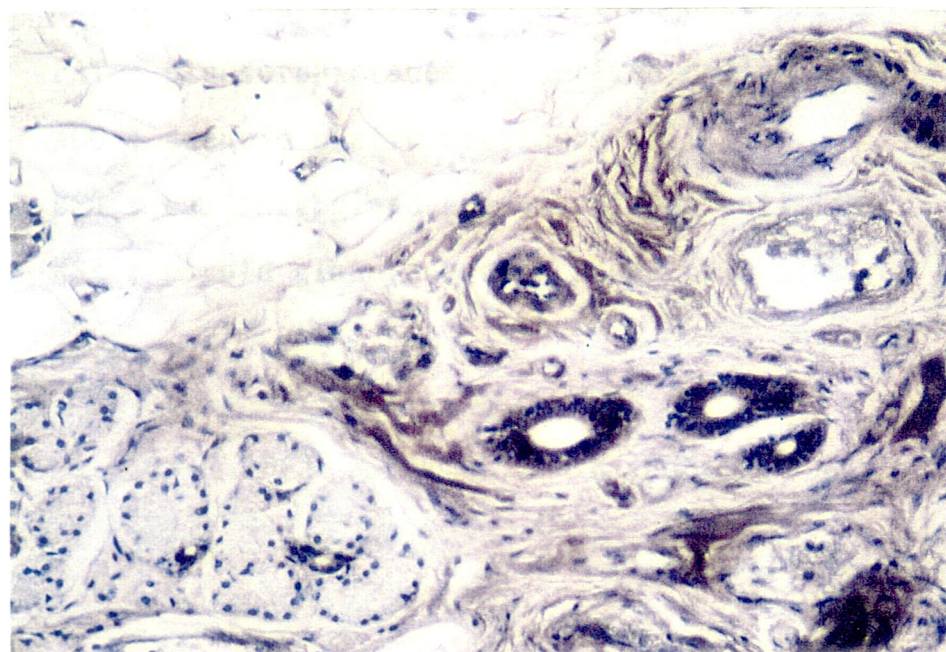
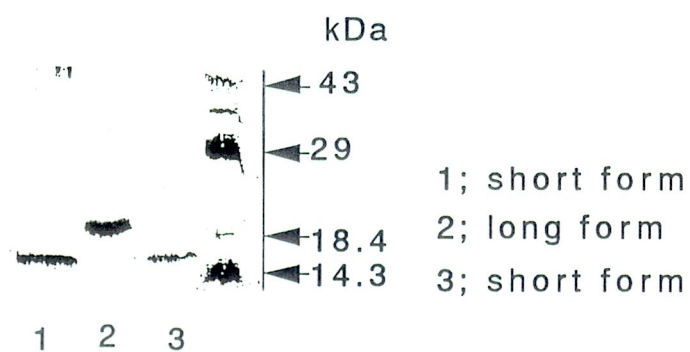
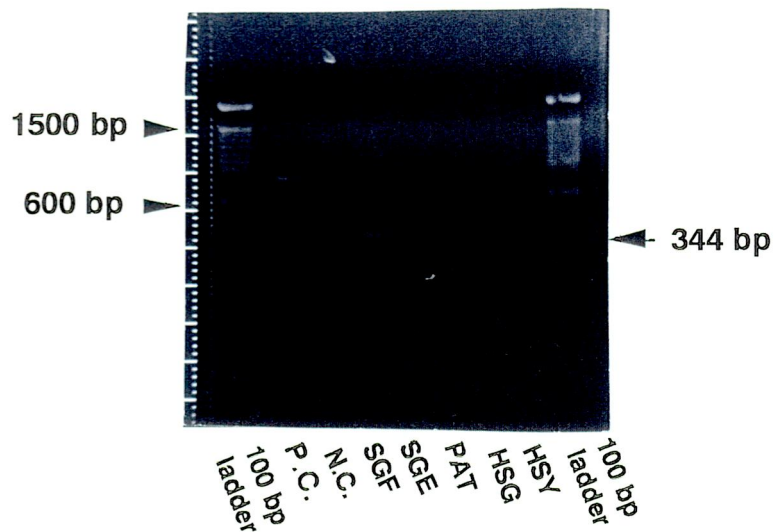


図3, ヒト正常唾液腺組織におけるKGFの免疫染色



N.C. ; Negative Control

P.C. ; β -actin

SGF ; submandibular gland-derived fibroblasts

SGE ; submandibular gland-derived epithelial cells

PAT ; pleomorphic adenoma-derived cells

ACC ; adenoid cystic carcinoma cell line

HSG ; salivary gland adenocarcinoma cell line

HSY ; paroid gland adenocarcinoma cell line

図4, RT-PCR AnalysisによるKGFmRNAの発現の検討

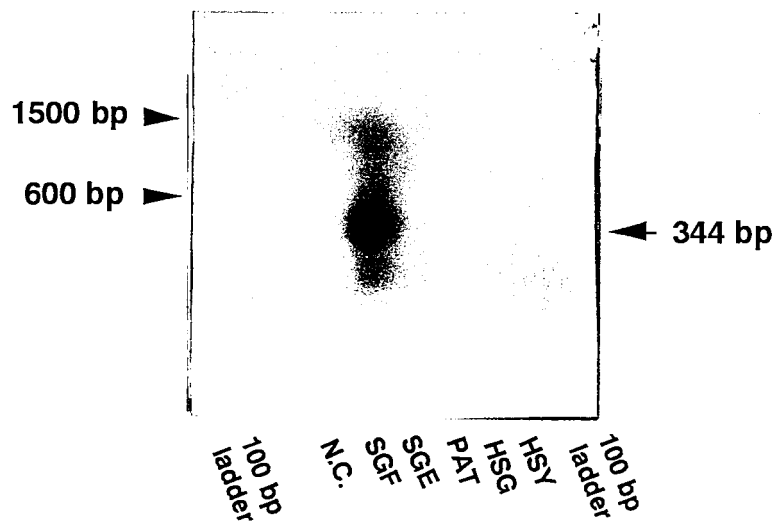


図5, PCR-Southern hybridization法によるKGFmRNA
の発現の検討

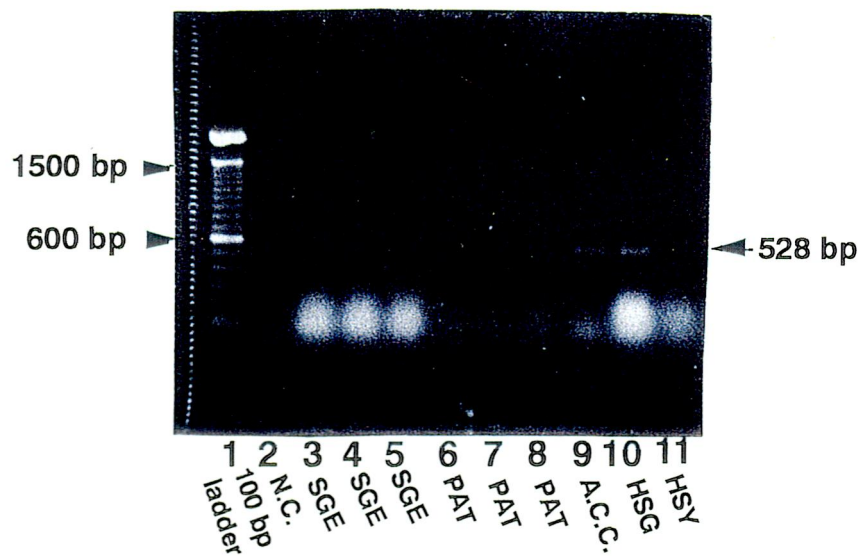


図6, RT-PCR AnalysisによるFGF-R1(IIIc) mRNA
 の発現の検討

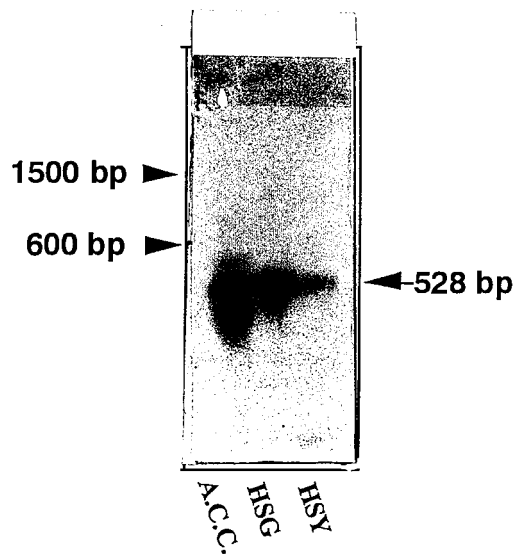


図7. PCR-Southern hybridization法によるFGF-R1(IIIc) mRNA
の発現の検討

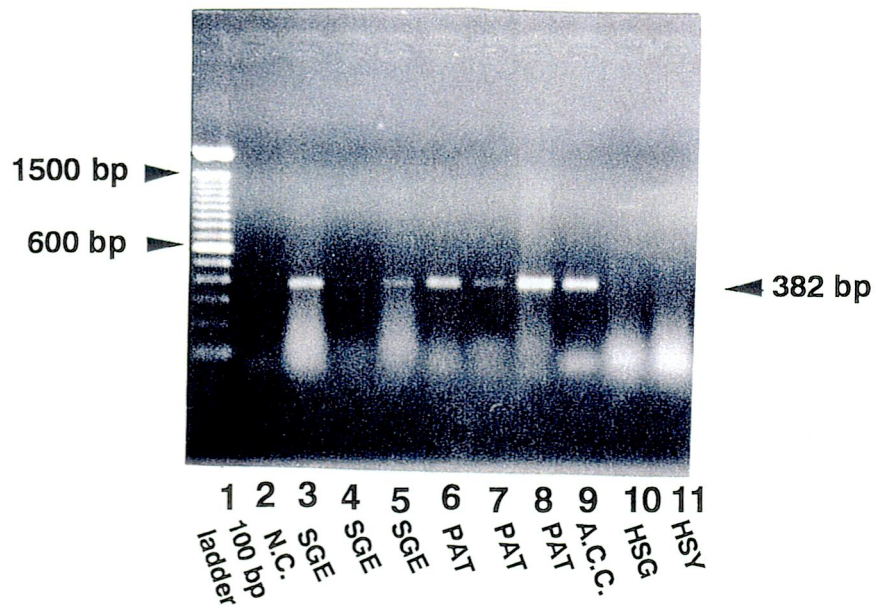


図8, RT-PCR AnalysisによるFGF-R2(IIIb) mRNA
 の発現の検討

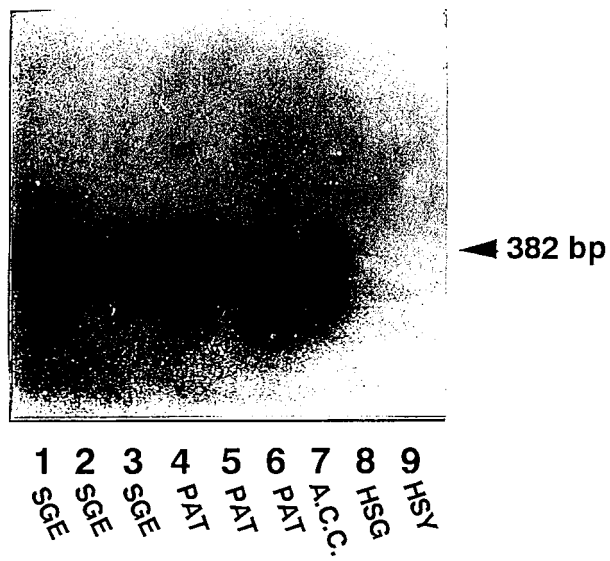


図9, PCR-Southern hybridization法によるFGF-R2(IIIb) mRNA
の発現の検討

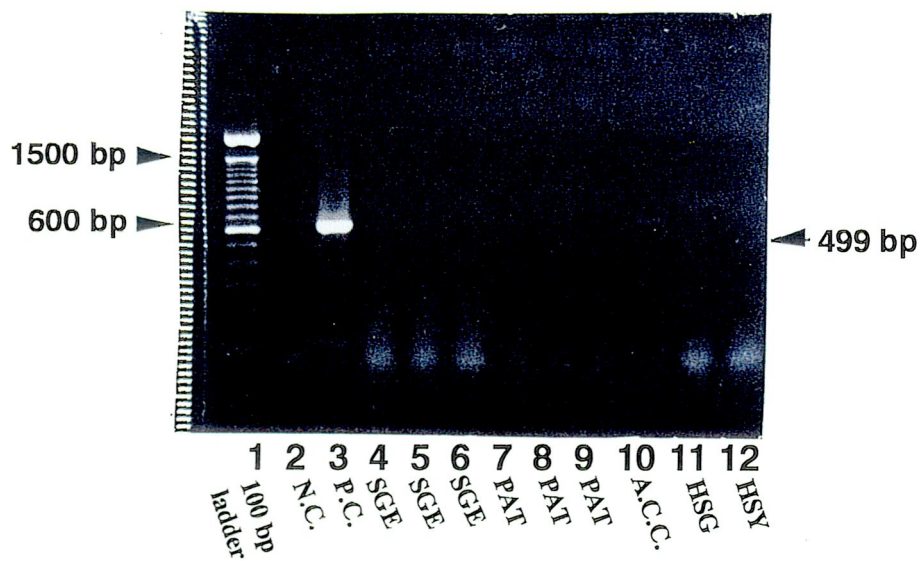


図10, RT-PCR AnalysisによるFGF-R2(IIIc) mRNA
の発現の検討

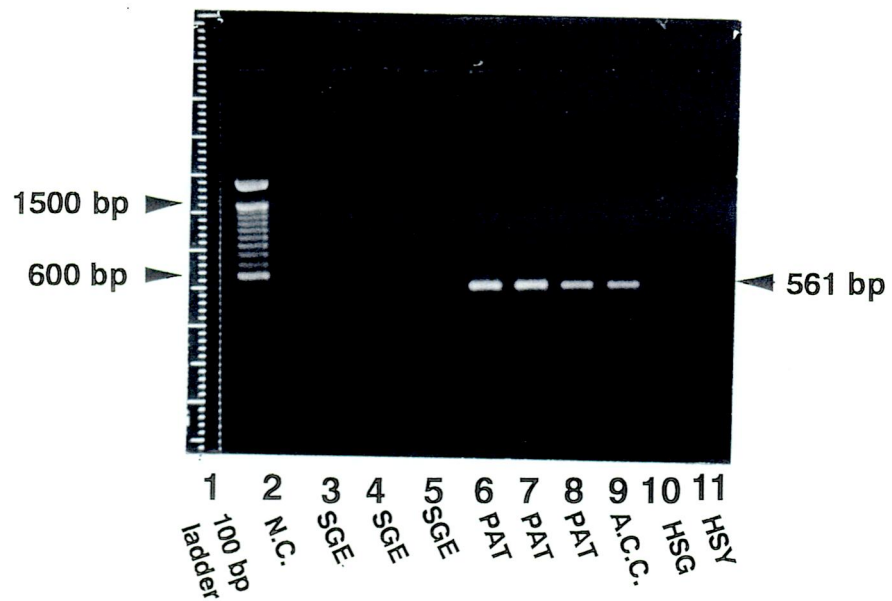


図11, RT-PCR AnalysisによるFGF-R3(IIIb) mRNA
の発現の検討

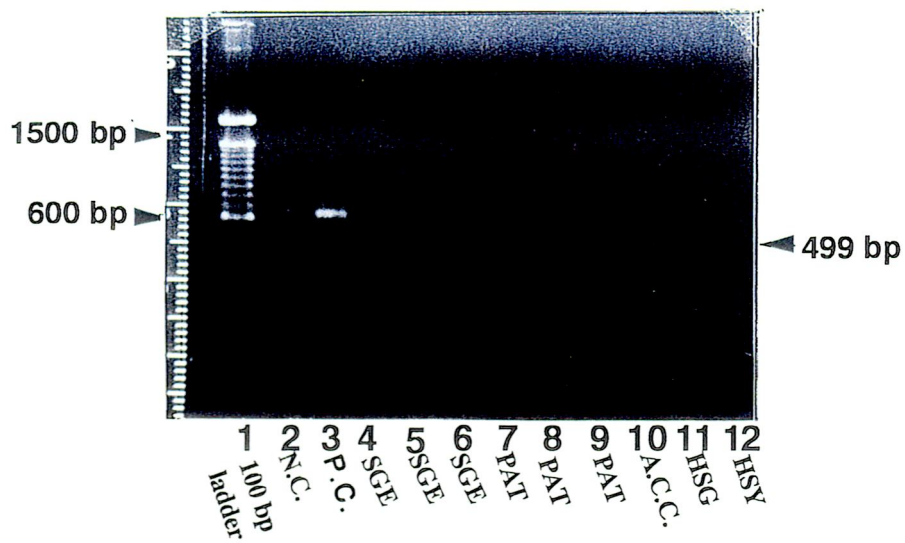


図12, RT-PCR AnalysisによるFGF-R3(IIIc) mRNA
の発現の検討

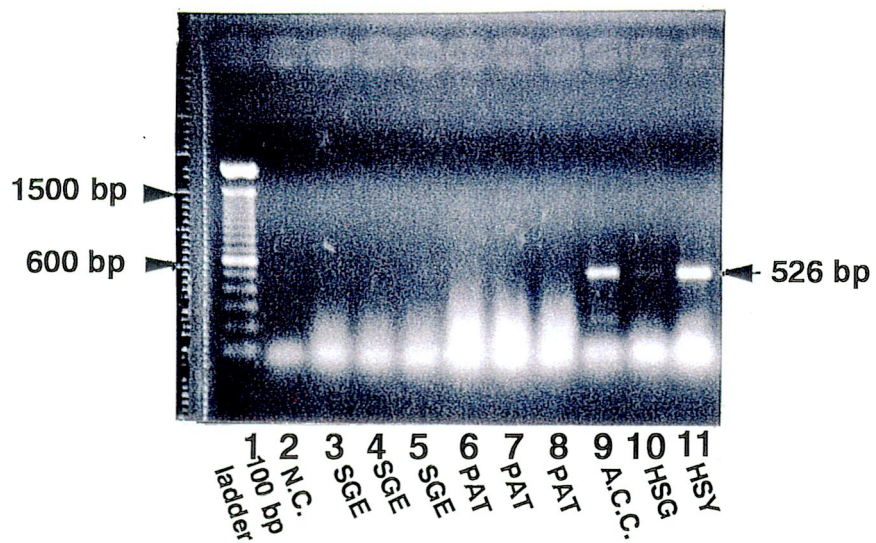


図13, RT-PCR AnalysisによるFGF-R4mRNA
の発現の検討

	FGFR1 (III)c	FGFR2 (III)b	FGFR2 (III)c	FGFR3 (III)b	FGFR3 (III)c	FGFR4
SGE(3)	-	+	-	-	-	-
PAT(3)	-	+	-	+	-	-
ACC(1)	+	+	-	+	-	+
HSG,HSY	+	-	-	-	-	+

表2, RT-PCR法とPCR-Southern hybridization法の結果

Structure of wild and dominant negative mutant FGF β -R1

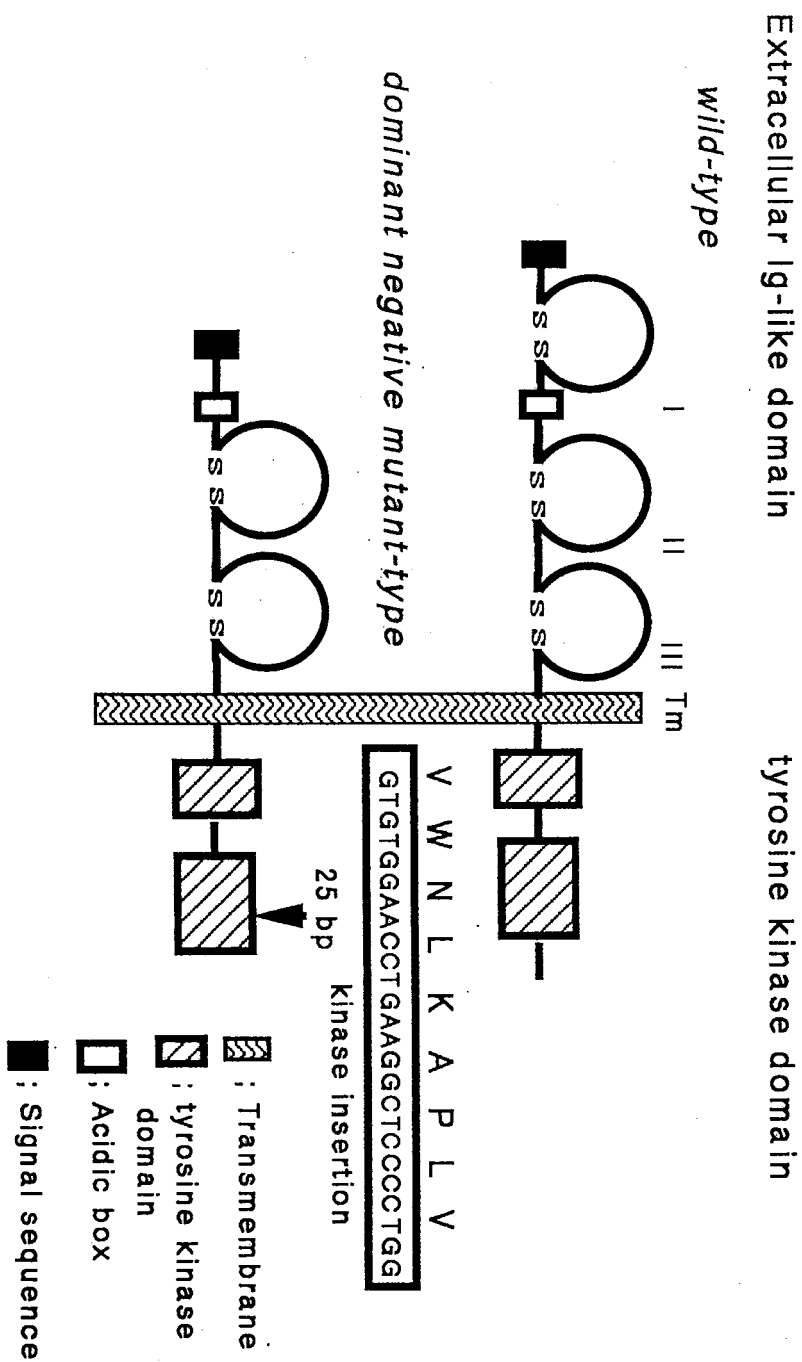


図14, 野生型FGF-R1受容体とチロシンキナーゼ機能を欠失したドミナントネガティブFGF受容体の構造

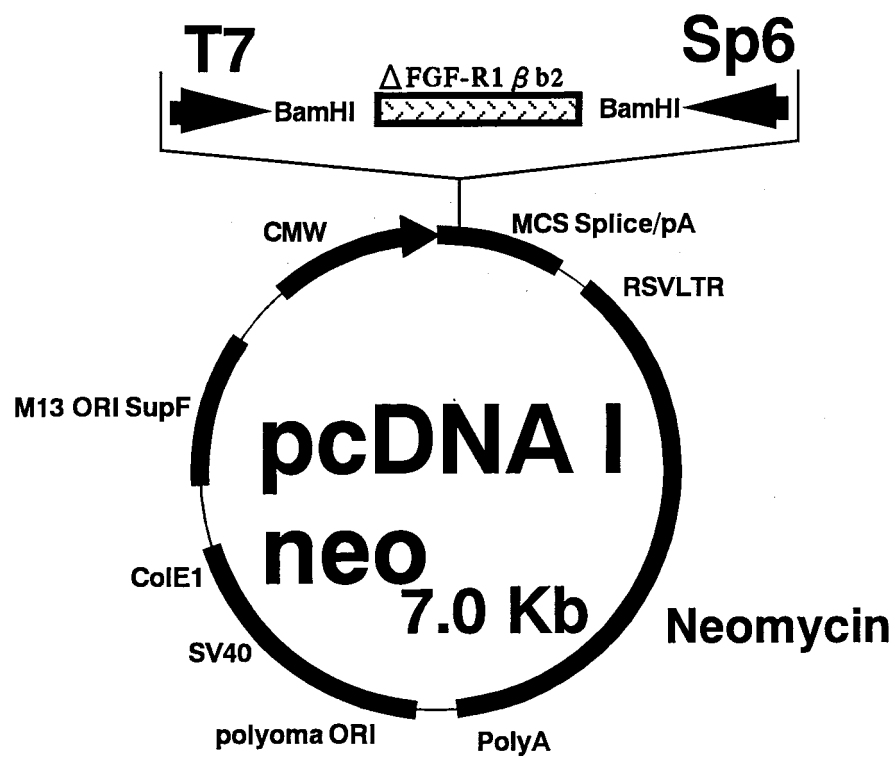


図15, Dominant negative FGF β -R1 expression vector の構造

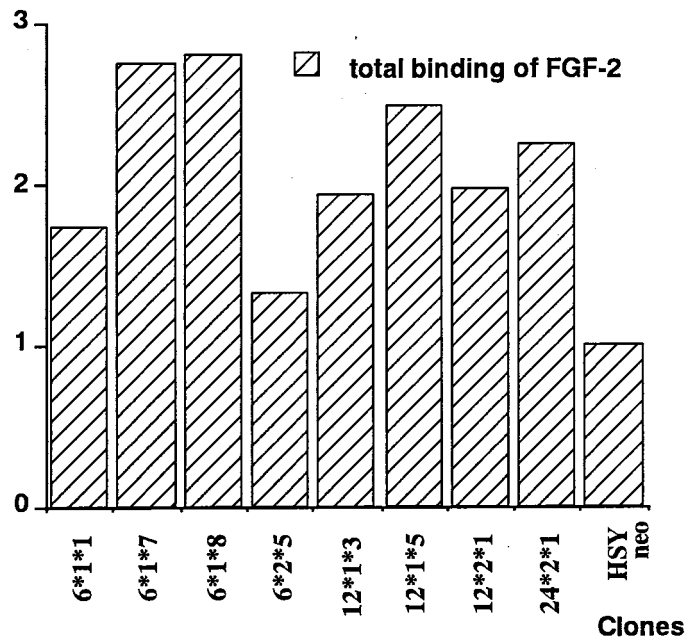


図16, HSYneo細胞および Δ FGF-R1-HSY細胞における
FGF受容体結合試験

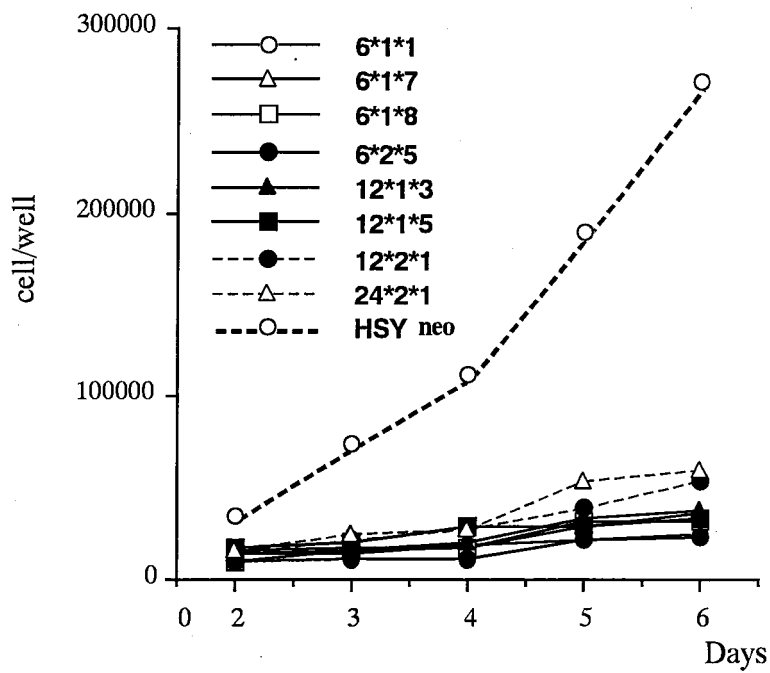


図17, FGF非存在下でのHSYneo細胞と Δ FGF-R1-HSY細胞の増殖試験

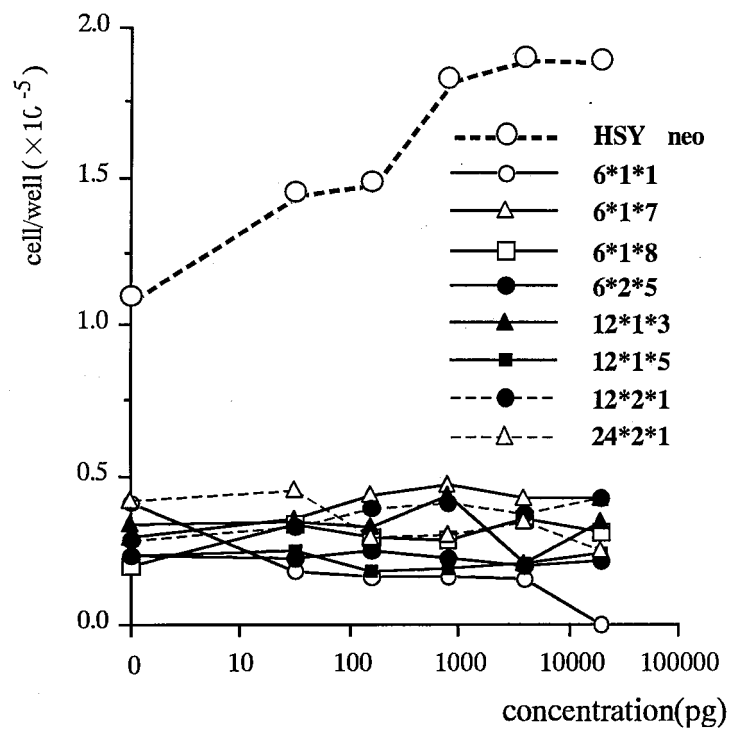


図18, FGF-2のHSYneo細胞および△FGF-R1-HSY細胞の増殖
におよぼす影響

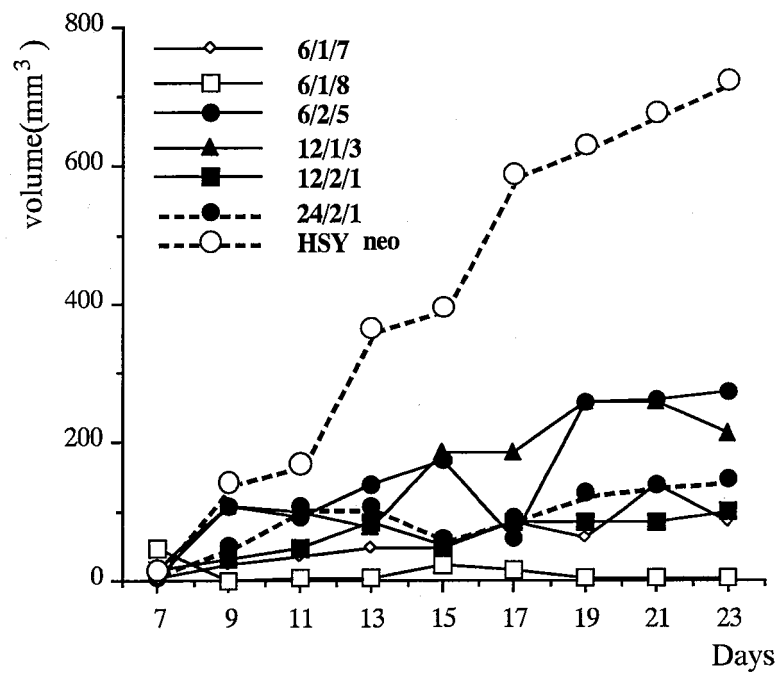


図19, HSYneo細胞および△FGF-R1-HSY細胞におけるヌードマウス背部皮下の造腫瘍性

Affinity between receptor & ligand

	ligand
FGFR-1 (IIIc)	FGF-1, FGF-2
FGFR-2	
(IIIb)	KGF/FGF-7, FGF-1
(IIIc)	FGF-1, FGF-2
FGFR-3	
(IIIb)	FGF-1
(IIIc)	FGF-1, FGF-2
FGFR-4	FGF-1, FGF-2

表3, FGFリガンドとFGF受容体の親和性