

口腔癌の自己増殖促進因子及び血管新生因子遺伝子を  
標的とした遺伝子診断・治療の研究

(課題番号:11470437)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金  
基盤研究B(2)研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 岡本哲治  
(広島大学歯学部教授)

口腔癌の自己増殖促進因子及び血管新生因子遺伝子を  
標的とした遺伝子診断・治療の研究

(課題番号：11470437)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金  
基盤研究B(2)研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 岡本哲治  
(広島大学歯学部教授)

## 研究組織

研究代表者：岡本哲治（広島大学歯学部教授）

研究分担者：虎谷茂昭（広島大学歯学部附属病院講師）

研究分担者：林堂安貴（広島大学歯学部附属病院講師）

## 研究経費

平成11年度	9,600千円
平成12年度	6,200千円
計	15,800千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1 : Zhang, Y., Wang, H., Toratani, S., Sato, J.D., Kan, M., McKeehan, W. L., and Okamoto, T., Wild-type keratinocyte growth factor receptor (KGF<sub>R</sub>) inhibits the growth and induces differentiation and apoptosis of human salivary adenocarcinoma cells in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, in press,
- 2 : Furue, M., Zhang, Y., Okamoto, T., Hata, R-I., and Asashima, M. Activin A induces expression of rat *Sel-11* mRNA, a negative regulator of Notch signaling, in rat salivary gland-derived epithelial cells, Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001, in press,
- 3 : Michimukai, E., Kitamura, N., Zhang, Y., Wang, H., Hiraishi, Y., Hayashido, Y., Toratani, S., and Okamoto, T., Mutation of human homologue of *Drosophila* patched in oral squamous cell carcinoma cell lines and its unresponsiveness to sonic hedgehog, In Vitro Cell. Dev. Biol., 2001, in press,
- 4 : Liu, X., Kan, M., Okamoto, T., Sato, G.H. and Sato, J.D., Fibroblast growth factor binding protein HBp17 confers a tumorigenic phenotype to an epidermoid carcinoma variant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, in press,
- 5 : Hayashido, Y., Urabe, Yoshioka, Okamoto, T. and Matsuya, T.: Fibroblasts enhance the ability of oral squamous cell carcinoma cells to activate matrix metalloproteinase-2 by inducing the expression of membrane type-1 MMP. Cancer Letter, 2001. in press,
- 6 : Ogata, K., Michimukai, E., Tanaka, Y., Sakamoto, A., Yamamoto, Ozaki, T., Okamoto, T. : Nevoid basal cell carcinoma syndrome with a palmer epidermoid cyst and jaw cyst. British J. Dermatology, 2001. in press,
- 7 : Wang, H., Zhang, Y. and Okamoto, T., Gene diagnosis of venous malformations, J. Biomedicine and Therapeutics, 34:95-99, 2000.
- 8 : Yamanaka, T., Sakamoto, A., Tanaka, Y., Zhang, Y., Hayashido, Y., Toratani, S., Akagawa, Y. and Okamoto, T. : Isolation and serum-free culture of epithelial cells derived from epithelial rests of Malassez in human periodontal ligament. In Vitro Cell. Dev. Biol., 36:548-553, 2000.

- 9 : Nii, M., Kayada, Y., Yoshiga, K. and Okamoto, T.: Suppression of metastasis by tissueinhibitor of metalloproteinase-1 in a newly established human oral squamous cellcarcinoma cell line. *Int. J. Oncology*, 16:119-124, 2000.
- 1 0 : Furue, M., Okamoto, T. and Asajima, M., : Isoleucine prevents rat salivary glandepithelial cells from apoptosis in serum-free culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 36: 187-189, 2000.
- 1 1 : 道向栄二, 田中良治, 北村直也, 越智康, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治: 正常口腔上皮細胞および口腔癌細胞におけるSonic HedgehogおよびPatched遺伝子の発現と機能解析: 口腔組織培養学会誌 第9巻 第一号 Vol. 9, No. 1, 63-64, 2000.
- 1 2 : 張雁, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治: Ex Vivoにおける野生型KGF受容体遺伝子導入による口腔組織培養学会誌 第9巻 第一号 Vol. 9, No. 1, 69-70, 2000.
- 1 3 : Furue, M., Okamoto, T., Asajima, M. and Sato, J.D.: Effects of hepatocyte growth factorand activin A on the three dimensional growth and morphogenesis of rat submandibulargland epithelial cells embedded in collagen gels. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 35:131-135, 1999.
- 1 4 : Toratani, S., Kimoto, N., Shinki, T. and Okamoto, T.: Effect of photodynamic action withphcophorbide-a on human oral carcinoma cells in serum-free culture. *Tissue CultureResearch Communications*, 18:345-352, 1999.
- 1 5 : Furue, M., Okamoto, T. and Asajima, M. : Effectt of transforming growth factor-b (TGF-b) on morphogenesis in rat salivary gland-derived RSMG-1 cells. *Tissue CultureResearch Communications*, 18:339-343, 1999.

(3) 出版物

- 1 : Sato, J. D., Hayashi, I., Hayashi, J., Hoshi, H., McKeehan, W. L., Matsuda, R., Okamoto, T., Serrero, G. and Kan, M. Specific cell types and their requirements: In: *Basic Animal Cell Culture: A practical approach* (J.M. Davis ed. 2nd Edition). Oxford Univ. Press, Oxford, England, pp.181-222, 2001.

B) その他の出版物

- 1 : FGF結合蛋白 (FGFBP/HBp17)を標的とした「扁平上皮癌の分子標的治療, 712-713, 文部省科学研究費補助金による がん特定 研究報告集録 平成11年度 (1999) 領域350がんの診断治療の基礎研究
- 2 : 口腔組織毛細血管における分泌型血管増殖因子・受容体の機能に及ぼす喫煙の影響, 195-200, 平成11年度 喫煙科学研究財団研究年報
- 3 : 口腔組織毛細血管における分泌型血管増殖因子・受容体の機能に及ぼす喫煙の影響, 195-200, 平成12年度 喫煙科学研究財団研究年報

(2) 口頭発表

招待シンポジウム

- 1 : Zhang Yang, Shigeaki TORATANI and Tetsuji OKAMOTO  
Wild Type-FGFR2-(IIIb)/KGF Gene Inhibits Growth and Induces Differentiation/Apoptosis in Salivary Gland Tumors In Vitro and In Vivo; 2000 World Congress On In Vitro Biology ( San Diego, USA) Jun 10-15,2000
- 2 : Gene/Molecular Diagnosis of Oral-Craniofacial Disorders  
T. OKAMOTO, Y. ZHANG, H. WANG, Y. TANAKA, Y. HIRAISHI, Y. HAYASHIDO and S. TORATANI  
第48回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会, シンポジウム ゲノムサイエンスの展開

ワークショップ

- 1 : Fibroblast Growth Factor 受容体(FGFR)およびFGF結合蛋白 (HBp17/FGFBP) を標的した口腔癌の分子標的治療に関する研究: 田中良治, 張雁, 新谷 智章, 平石佳子, シャハナ・ベガム, 坂本哲彦, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治: 第44回 (社) 日本口腔外科学会総会 (東京) 1999.

一般口演

- 1: 口腔扁平上皮癌細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ2 (MMP-2) 活性化機構における線維芽細胞の関与: 林堂安貴, 占部一彦, 平石佳子, 岡本哲治, 松矢篤三: 第53回日本口腔科学会総会 (東京) 1999.
- 2: Sonic hedgehog (Shh) および patched (PTC) 遺伝子の口腔粘膜由来正常上皮細胞および扁平上皮癌由来細胞株における発現と機能解析: 道向栄二, 坂本哲彦, 田中良治, 越智康, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治: 第53回日本口腔科学会総会 (東京) 1999.
- 3: 唾液中のクロモグラニンA (CgA) および分泌型IgA量を指標とした歯科診療ストレス定量化の試み: 小林雅史, 谷亮治, 中村順子, 田中良治, 坂本哲彦, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 中根英雄, 山田幸生, 岡本哲治 第53回日本口腔科学会総会 (東京) 1999.
- 4: 口腔扁平上皮癌細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ2 (MMP-2) 活性化機構における線維芽細胞の関与: 林堂安貴, 占部一彦, 平石佳子, 新谷智章, 坂本哲彦, 田中良治, 張雁, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 松矢篤三 日本組織培養学会第72回大会 (富山) 1999.
- 5: 野性型 KGF受容体遺伝子導入による唾液腺由来腺癌細胞のアポトーシス誘導: 張雁, 田中良治, 坂本哲彦, 汪華, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治 日本組織培養学会第72回大会 (富山) 1999.
- 6: 嚢胞様病態を呈したWarthin腫瘍の1例: 朝日保幸, 尾崎輝彦, 小泉浩一, 坂本哲彦, 林堂安貴, 小川郁子, 岡本哲治: 第28回 (社) 日本口腔外科学会中・四国地方会 (岡山) 1999.
- 7: 自然消失した悪性リンパ腫の1例: 虎谷茂昭, 小川郁子, 岡本哲治: 第28回 (社) 日本口腔外科学会中四国地方会 (岡山) 1999.
- 8: ヒト肝癌細胞株におけるFibroblast Growth Factor (FGF), FGF受容体 (FGFR) およびFGF結合蛋白(HBp17)の発現: 鎌田耕治, 田中良治, 松本明子, 浅田 備之, 坂本哲彦, 北本幹也, 中西敏夫, 梶山梧朗, 岡本哲治: 第58回日本癌学会総会 (広島) 1999.
- 9: 扁平上皮癌由来細胞株におけるSonic hedgehog (Shh) およびpatched (PTC) 遺伝子の発現と機能解析: 道向栄二, 田中良治, 北村直也, 越智康, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治: 第58回日本癌学会総会 (広島) 1999.
- 10: 野性型 KGF/FGFR2-Jb遺伝子導入による唾液腺由来腺癌細胞のアポトーシス誘導: 張雁, 田中良治, 坂本哲彦, 汪華, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治: 第58回日本癌学会総会 (広島) 1999.

- 1 1: 血管腫の増殖および退化におけるVEGF, FGF-2およびTie-2の役割:汪華, 張雁, 田中良治, 坂本哲彦, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治: 第58回日本癌学会総会 (広島) 1999.
- 1 2: ヒト口腔扁平上皮癌におけるカテプシンDの発現と浸潤・転移: 平石佳子, 林堂安貴, 吉岡秀郎, 占部一彦, 張雁, 虎谷茂昭, 田中良治, 松矢篤三, 岡本哲治: 第58回日本癌学会総会 (広島) 1999.
- 1 3: ヘパリン結合性FGF結合蛋白HBp17の扁平上皮癌における発現とその機能解析: 新谷智章, シヤハナベガム, 田中良治, 坂本哲彦, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治, :第58回日本癌学会総会 (広島) 1999.
- 1 4: 頭蓋早期癒合症および軟骨異形成症の遺伝子診断: 田中良治, 張雁, 道向榮二, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 森山啓司, 岡本哲治: 第44回 (社) 日本口腔外科学会総会 (東京) 1999.
- 1 5: 逆行性超選択的動注化学療法を施行した頭頸部悪性腫瘍の臨床的検討: 中村謙一, 尾崎輝彦, 越智康, 谷亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 木曾哲司, 木村昭二郎, 桐山健, 原潤一, 岡本哲治: 第44回 (社) 日本口腔外科学会総会 (東京) 1999.
- 1 6: 頭頸部領域血管腫の増殖・退縮におけるVEGF, FGF-2および Tie-2の役割: 張雁, 汪華, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 周中華, 岡本哲治: 第44回 (社) 日本口腔外科学会総会 (東京) 1999.
- 1 7: Venous malformationsにおけるEndothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie-2遺伝子の変異: 汪華, 張雁, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 周中華, 岡本哲治: 第44回 (社) 日本口腔外科学会総会 (東京) 1999.
- 1 8: ヘパリン結合性FGF結合蛋白HBp17の扁平上皮における発現とその機能解析: 新谷智章, 田中良治, シヤハナ・ベガム, 林堂安貴, 越智康, 坂本哲彦, 虎谷茂昭, 岡本哲治: 第44回 (社) 日本口腔外科学会総会 (東京) 1999.
- 1 9: ヒト口腔扁平上皮癌におけるカテプシンDの発現と浸潤・転移: 平石佳子, 林堂安貴, 吉岡秀郎, 占部一彦, 張雁, 虎谷茂昭, 田中良治, 松矢篤三, 岡本哲治: 第44回 (社) 日本口腔外科学会総会 (東京) 1999.
- 2 0: 口腔粘膜由来正常上皮細胞および扁平上皮癌由来細胞株におけるpatched(PTC)遺伝子の発現と機能解析, 第22回, 日本分子生物学会年会 (福岡) 1999.
- 2 1: 静脈奇形 (Venous Malformation) の遺伝子診断: 王華, 張雁, 平石佳子, 岡本康生, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 第22回, 日本分子生物学会年会 (福岡) 1999.
- 2 2: CEAが高値を示した顎骨中心性扁平上皮癌の一例: 木本直孝, 中村謙一, 越智康, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 小川郁子, 芳村喜道, 岡本哲治, 第47回日口科学会中国・四国地方部会 (愛媛) 1999.
- 2 3: 静脈奇形 (Venous malformations: VMs) におけるTie-2遺伝子の機能, 張雁, 王華, 平石佳子, 岡本康生, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 第47回日口科学会中国・四国地方部会 (愛媛) 1999.
- 2 4: 菌原性角化嚢胞の臨床的検討およびpatched遺伝子変異の解析: 北村直也, 重森和子, 道向榮二, 田中良治, 坂本哲彦, 越智康, 谷亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 小川郁子, 岡本哲治 第29回日本口腔外科学会 中国四国地方部会 (山口) 平成12年4月15日 (土)
- 2 5: マウス軟骨前駆細胞ATDC5の増殖・分化とFGFシグナル伝達の役割  
神田拓, 田中良治, 張雁, 坂本哲彦, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治  
第54回日本口腔科学会総会 (東京) 平成12年5月12日 (金) ~ 13日 (土)

- 26 : Odontogenic Keratocystの遺伝子診断  
北村 直也, 道向 栄二, 田中 良治, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第54回日本口腔科学会総会(東京)平成12年5月12日(金)~13日(土)
- 27 : 口腔扁平上皮癌細胞および唾液腺癌細胞におけるMAPキナーゼシグナル  
平石 佳子, 張 雁, 岡本 康正, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第54回日本口腔科学会総会(東京)平成12年5月12日(金)~13日(土)
- 28 : Expression and Function of Sonic Hedgehog and Patched Genes in Oral Epithelial Cells and Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines: Michimukai, E., Tanaka, Y., Kitamura, N., Toratani, S., and Okamoto, T.,  
2000 World Congress On In Vitro Biology ( San Diego, USA) Jun 10-15, 2000
- 29 : ヘパリン親和性FGF結合蛋白HBp17の扁平上皮癌細胞における機能解析  
新谷 智章, 坂本 哲彦, 林堂 安貴, 越智 康, 田中 良治, イスラム カムルル,  
虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
日本組織培養学会第73回大会(岡山)平成12年9月7日(木)~8日(金)
- 30 : 血管新生におけるEndothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie-2遺伝子の機能  
張 雁, 汪 華, 平石 佳子, 岡本 康正, 新谷 智章, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 安部 まゆみ,  
佐藤 靖史, 岡本 哲治  
日本組織培養学会第73回大会(岡山)平成12年9月7日(木)~8日(金)
- 31 : ヘパリン親和性FGF結合蛋白HBp17の扁平上皮癌細胞における機能解析  
新谷 智章, 坂本 哲彦, 林堂 安貴, 越智 康, 田中 良治, イスラム カムルル,  
虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第59回日本癌学会総会(横浜)平成12年10月4日(水)~6日(金)
- 32 : 血管新生におけるEndothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie-2の機能解析  
汪 華, 張 雁, 平石 佳子, 岡本 康正, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 佐藤 靖史, 岡本 哲治  
第59回日本癌学会総会(横浜)平成12年10月4日(水)~6日(金)
- 33 : ヘパリン結合性FGF結合蛋白HBp17, FGF-2およびVEGFの口腔前癌病変および扁平上皮癌における発現: シャハナ ベガム, 新谷 智章, 張 雁, 坂本 哲彦, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第59回日本癌学会総会(横浜)平成12年10月4日(水)~6日(金)
- 34 : 口腔扁平上皮癌細胞および唾液腺癌細胞におけるMAPキナーゼシグナル  
岡本 康正, 張 雁, 平石 佳子, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第59回日本癌学会総会(横浜)平成12年10月4日(水)~6日(金)
- 35 : ヘパリン親和性FGF結合蛋白HBp17の扁平上皮癌細胞における機能解析  
新谷 智章, 坂本 哲彦, 林堂 安貴, 越智 康, 田中 良治, イスラム カムルル,  
虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第45回日本口腔外科学会総会(千葉)平成12年10月12日(木)~13日(金)
- 36 : 静脈異形成症におけるVEGF, FGF-2およびEndothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie-2の役割  
汪 華, 張 雁, 新谷 智章, 平石 佳子, 岡本 康正, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第45回日本口腔外科学会総会(千葉)平成12年10月12日(木)~13日(金)
- 37 : 静脈異形成症および血管形成におけるTie-2の役割  
張 雁, 汪 華, 新谷 智章, 平石 佳子, 岡本 康正, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第45回日本口腔外科学会総会(千葉)平成12年10月12日(木)~13日(金)

- 38：メラノーマ細胞の遊走能に対する血管内皮増殖因子の影響  
越智 康, 林堂 安貴, 新谷 智章, 坂本 哲彦, 岡本 哲治  
第45回日本口腔外科学会総会(千葉)平成12年10月12日(木)～13日(金)
- 39：口腔扁平上皮癌におけるFGFR3遺伝子の変異  
平石 佳子, 張 雁, 汪 華, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第45回日本口腔外科学会総会(千葉)平成12年10月12日(木)～13日(金)
- 40：正常口腔粘膜上皮細胞および口腔扁平上皮癌細胞におけるMAPキナーゼシグナル  
岡本 康正, 張 雁, 平石 佳子, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第45回日本口腔外科学会総会(千葉)平成12年10月12日(木)～13日(金)
- 41：動注療法を施行した上歯肉および上顎洞原発扁平上皮癌の臨床的検討  
神田 拓, 越智 康, 谷 亮治, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 岡本 哲治  
第48回日本口腔科学会 中国四国地方部会(岡山)平成12年11月18日(土)
- 42：セミパラチンスク核実験場周辺住民における顎・顔面・口腔疾患の実態調査  
ズマジローバ・アナラ, 坂本 哲彦, 林堂 安貴, 虎谷 茂昭, 笹原 妃佐子, アザット・ボレンバ  
エフ, ズマジロフ・ザクシバ, 武市 宣雄, 星 正治, 岡本 哲治,  
第48回日本口腔科学会 中国四国地方部会(岡山)平成12年11月18日(土)
- 43：FGF結合蛋白HBp17の扁平上皮癌細胞における機能解析  
新谷智章, 坂本哲彦, 林堂安貴, 張 雁, 汪 華, 田中良治, イスラム カムルル, 越智 康, 虎谷  
茂昭, 岡本哲治：第29回日本口腔組織培養学会(盛岡) 平成12年11月18日(土)
- 44：静脈奇形におけるEndothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie-2遺伝子の機能  
解析：汪 華, 張 雁, 平石佳子, 岡本康正, 新谷智章, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治  
第29回日本口腔組織培養学会(盛岡) 平成12年11月18日(土)

口腔扁平上皮癌におけるFGF受容体遺伝子3の変異  
とその機能解析

# 目 次

第1章	緒言	1
第2章	材料と方法	3
第1節	口腔扁平上皮癌(Oral Squamous Cell Carcinoma: OSCC)における FGFR3 の変異	3
	1) 材料	3
	2) DNA の抽出	3
	3) Polymerase Chain Reaction( PCR )	4
	4) PCR—Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP)	5
	5) 塩基配列の決定(direct sequence)	6
第2節	口腔扁平上皮癌組織および正常上皮組織 における FGFR3 タンパクの発現	7
第3節	野生型および変異型 FGFR3 チロシンキナーゼ リン酸化活性の検討	8

1) ヒト正常口腔粘膜上皮細胞由来 RNA の抽出	8
2) 野生型 FGFR3 チロシンキナーゼ発現 ベクターの作製	8
3) 変異型 FGFR3 チロシンキナーゼ発現 ベクターの作製	9
4) ベクターの組み替え	10
5) 昆虫細胞の培養	10
6) Co-transfection	11
7) サンプルの調整	11
8) SDS-PAGE および Western Blotting	12
第3章 結果	13
第4章 考察	15
第5章 総括	20
参考文献	21
図表	

## 第1章 緒言

Fibroblast Growth Factor (FGF) は、繊維芽細胞に対する増殖因子として 1970 年代初頭に塩基性 FGF (FGF-2) が見出されて<sup>1)</sup>以来、現在までに、21 種類の異なる遺伝子にコードされる FGF ファミリーが明らかにされている<sup>2)</sup>。FGF の活性は、細胞表面の高親和性 FGF 受容体 (FGFR) を介しており、FGFR は細胞外に 2 個あるいは 3 個の免疫グロブリン様ループ構造 (Ig)、膜貫通ドメイン、細胞内に二つに分割されたチロシンキナーゼ領域を持った構造をしている<sup>3)-5)</sup> (図1)。FGFR は、ヘパリンやヘパラン硫酸プロテオグリカンの存在下で FGFs と結合すると、二量体となり、レセプターのチロシン残基を自己リン酸化あるいは相互にリン酸化し、細胞増殖や分化等のシグナルを伝達すると考えられている<sup>6)-8)</sup>。

FGFR をコードする遺伝子として FGFR1<sup>9)-11)</sup>、FGFR2<sup>11), 12)</sup>、FGFR3<sup>13), 14)</sup>、FGFR4<sup>15), 16)</sup> の 4 種類の遺伝子が同定されている (表1)<sup>17)</sup>。また、細胞外のリガンド結合部位に相当する免疫グロブリン様領域 (IgIII) をコードするエクソンの選択的スプライシングの違いにより、FGFR1、FGFR2、FGFR3 にはそれぞれ 2 種類のスプライシングバリエントが存在し、全部で 7 種類の FGFR が存在することが知られている<sup>18), 19)</sup>。また、各 FGFR は FGFs との結合能が異なる<sup>17), 20)-24)</sup>。

最近、FGFR の異常は、種々の先天性骨格・軟骨形成異常を引き起こす事が明らかにされた。FGFR1 遺伝子の異常では Pfeiffer 症候群を、FGFR2 の異常では Crouzon 症候群、Jackson-Weiss 症候群、Pfeiffer 症候群、Apert 症候群などを、FGFR3 の異常では軟骨無形成症や軟骨低形成症、Crouzon

症候群に acanthosis nigricans を合併したもの、Thanatophalic dysplasia (1 型, 2 型)、FGFR3-associated coronal synostosis 症候群などを引き起こすことが報告されている<sup>25), 26)</sup>。

口腔扁平上皮癌細胞および正常口腔粘膜由来上皮細胞は、4 種類の FGFR 全てを発現している (表2) が、その増殖は正常上皮細胞では FGFs に依存するのに対し口腔扁平上皮癌細胞では FGFs に依存しない<sup>27), 28)</sup>。その原因として、口腔扁平上皮癌においても、FGFR の変異に基づく機能異常が存在する可能性が考えられる。そこで、本研究では、口腔扁平上皮癌における FGFR3 の変異およびその機能について解析を行った。

## 第2章 材料と方法

### 第1節 口腔扁平上皮癌 (Oral Squamous Cell Carcinoma: OSCC) における FGFR3 の変異

#### 1) 材料

1996年1月から2000年6月までの4年半の間に、広島大学歯学部附属病院第一口腔外科を受診し、病理組織学的に扁平上皮癌 (Squamous Cell Carcinoma: SCC) と診断された71症例のパラフィン包埋組織ブロックを用いた。TNM分類および病期分類はUICC (1987) の分類<sup>29)</sup>に従った (表3)。

#### 2) DNA の抽出

パラフィン包埋病理組織標本からのDNAの抽出はDexpat (TaKaRa) を用いて行った。抽出後のDNAを1/10倍量の3M sodium acetate および2.5倍量の100% ethanolで沈殿、精製後 Spectrophotometer (Beckman) にて定量した。

### 3) Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR<sup>30)</sup>は Kawasaki ら<sup>31)</sup>の方法に準じて行った。FGFR3 遺伝子の細胞内領域全 exon にあたる、exon 10 から exon 19 をそれぞれ増幅する primer ペアをイントロン部に以下のように設計した<sup>13)</sup>。

exon 10	upstream	5'—CTA GAC TCA CTG GCG TTA C—3'
	downstream	5'—GCA GCT CAG AAC CTG GTA T—3'
exon 11	upstream	5'—CCT GCT GAC CCA AGC AGG T—3'
	downstream	5'—CCT ACA GCC AAC GCT GGC C—3'
exon 12	upstream	5'—CCT TAC GAA CAG TCT GTA GG—3'
	downstream	5'—CAT CGT CTG TGC ACG GAG C—3'
exon 13	upstream	5'—CGC TCC GTG CAC AGA CGA TG—3'
	downstream	5'—CCT CAG ACG GGC TGC CAG G—3'
exon 14	upstream	5'—GTA GGT GCG GTA GCG GCG—3'
	downstream	5'—CTC CCA GCA TCT CAG GGC—3'
exon 15	upstream	5'—TGC CCT GAG ATG CTG GGA G—3'
	downstream	5'—GCT CAC GTT GGT TGT CTT C—3'
exon 16	upstream	5'—CAT GCC AGT AGG ACG CCT G—3'
	downstream	5'—GCT GTC CTG AGA CTC CCA G—3'
exon 17	upstream	5'—GAC CGA GTC TAC ACT CAC C—3'
	downstream	5'—GAC AGG TCC AGG TAC TCG T—3'
exon 18	upstream	5'—GAC TCA CTC CTG AGC GCC C—3'
	downstream	5'—CGC ACA GCC ACC TCT GTG C—3'



を用い、泳動終了後、ゲルを PlusOne DNA 銀染色キット（Amersham Pharmacia Biotech, USA）にて染色し、DNA のバンドを検出した。

#### 5) 塩基配列の決定 (direct sequence)

PCR-SSCP で変異の存在が予想された exon について、direct sequence により塩基配列を決定し、変異部位を同定した。3) で得られた PCR 産物 1.5  $\mu$ l に pre-mix (DNA Sequencing Kit ; Perkin-Elmer Cetus Instrument Co. Ltd., Branchburg, NJ) 3  $\mu$ l および 10pM upstream primer を加え全量を 20  $\mu$ l にし、変性反応 96°C 20 秒、アニーリング 50°C 15 秒および伸長反応 60°C 4 分を 1 サイクルとするプログラムを 25 サイクル繰り返した後、4°C に冷却した。反応後のサンプルに 4 容の 100% ethanol、続いて 70% ethanol にて精製した後、ペレットを 13  $\mu$ l の Template Suppression Reagent (Perkin-Elmer Cetus Instrument Co. Ltd., Branchburg, NJ) で溶解し、95°C 5 分の変性を行った後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Cetus Instrument Co. Ltd., Branchburg, NJ) を用い Dye Terminator 法にて塩基配列の決定を行った。

## 第2節 口腔扁平上皮癌組織および正常上皮組織における FGFR3 タンパクの発現

FGFR3 蛋白の発現をベクタステイン ABC kit (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により検討した。

4  $\mu$ m 厚の切片を、ポリ-L-リジンコートしたスライド上に作製した。37°C 4 日間静置した後、キシレンおよびエタノール系列にて水和、MeOH/0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温 30 分で内因性ペルオキシダーゼの除去を行い、0.1% Triton X-100/PBS 氷上 10 分、続いて 0.05% Protenase-K/PBS 室温 5 分の処理を行った。非特異的反応を防ぐため、10% ヤギ血清/PBS で 37°C 1 時間のブロッキングを行った。1次抗体は抗 FGFR3 ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) を 4°Cで一晩作用させた。次いで、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG+IgA+IgM を 37°C 1 時間、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体を室温にて 30 分間反応させ、最後に DAB 溶液 (0.25mg/ml 3,3-diaminobenzidine, 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50mM Tris-HCl buffer; pH 7.6) にて発色させた。また、核の染色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。コントロールは抗ウサギ IgG を用いた。

### 第3節 野生型および変異型 FGFR3 チロシンキナーゼリン酸化活性の検討

#### 1) ヒト正常口腔粘膜上皮細胞由来 RNA の抽出

ヒト正常口腔粘膜由来上皮培養細胞からの RNA 抽出を Chomczynski ら<sup>32)</sup>の方法に準じて以下の方法で行った。培養正常上皮細胞を denaturing solution (4M guanidide thiocyanate, 25mM sodium citrate; pH 7.0, 0.1M 2-mercaptoethanol, 0.5% N-lauryl sarcosine) で採取後、20G 注射針にてホモジナイズし、1/10 容の 2M sodium acetate pH 4.0 を加えた後、平衡化酸性フェノール (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) 野生型 FGFR3 チロシンキナーゼ発現ベクターの作製

FGFR3 のチロシンキナーゼ領域の ATP-binding site から C 末端までを増幅するような特異的プライマーを以下のごとく設計した。

upstream 5'-TGG AAT TCA ACG CGT CCA TGA GCT CCA AC-3'  
downstream 5'-CAG AAT TCC TTC ACG TCC GCG AGC CCC-3'

続いて、ヒト正常上皮由来 RNA を用い、RT-PCR を行った。RT-PCR には、GeneAmp RNA PCR Core kit (Perkin-Elmer Cetus Instrument Co. Ltd., Branchburg, NJ) を使用し、DNA の増幅には DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus Instrument Co. Ltd., Branchburg, NJ) を用いた。まず、RT 溶液 (10mM Tris-HCl; pH8.3, 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP, 1U Ribonuclease inhibitor, 2.5mM random hexamer, 2.5U MuLV reverse transcriptase) 中に、全 RNA 1 μg/2 μl を加え、42°C 30 分、99°C 5 分間の逆転写反応を行った。その後、PCR 溶液 (10mM Tris-HCl; pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 25pM upstream primer, 25pM downstream primer, 2.5U AmpliTaq DNA Polymerase) を加え、全量を 100 μl にし、変性反応 95°C 45 秒、アニーリング 56°C 15 秒、伸長反応 70°C 2 分 45 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返した。得られた PCR 産物をエタノールで精製した後、EcoRI 制限酵素処理した。一方、pALTER<sup>®</sup>-MAX vector (Promega Madison, WI., USA) を EcoRI 制限酵素処理およびセルフライゲーションを防ぐために Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) 処理し、このベクターに先の EcoRI 処理済の DNA を組み込み、野生型 FGFR3 チロシンキナーゼ領域発現ベクターを作製した (図2)。同ベクターの塩基配列は direct sequence で確認した。

### 3) 変異型 FGFR3 チロシンキナーゼ発現ベクターの作製

G2128T 変異を有した、変異型 FGFR3 チロシンキナーゼ発現ベクターの作

製には、Altered Sites II Mammalian Mutagenesis System (Promega Madison, WI., USA) を用いた。

まず、以下に示すような G2128T 変異を含む FGFR3 Mutagenic Oligo Nucleotide を設計した。

5'-CCG TAC CCC TGC ATC ATC CCT G-3'

この oligo および2)で作製したベクターを用い、ES1301 MutS Competent cell (Promega Madison, WI., USA) にて変異型ベクターを作製した。同ベクターを JM109 Competent cell (Promega Madison, WI., USA) にて増幅した。塩基配列は direct sequence で確認した。

#### 4) ベクターの組み替え

2)、3)で作製した、pALTER<sup>®</sup>-MAX vector に組み込んだ野生型および変異型 FGFR3 チロシンキナーゼ発現ベクターから、N 末端にヒスチジンタグを付加した pAcHLT-A vector (Pharmlngen) に組み替えた (図3)。

#### 5) 昆虫細胞の培養

昆虫細胞は、Sf9 細胞 (Pharmlngen) を用いた。培地は、Grace's Insect Medium Supplemented (GIBCO BRL) に 5% 仔牛血清 (Calf serum, Hy

Clone, USA) を添加したものをを用い、25cm<sup>2</sup>フラスコ (Falcon Cat.#3081) にて継代培養した。培養は、インキュベーター MIR-153 (SANYO) 内で、27°Cの条件下で行った。

## 6) Co-transfection

遺伝子導入は、Baculovirus Expression Vector System (Pharmlngen) に基づき行った。まず、昆虫細胞 Sf9 を 6cm 培養皿に  $2 \times 10^6$  個の細胞を播種した。一方、BaculoGold<sup>®</sup> DNA 5  $\mu$ g と2)、3) で作製した野生型または変異を有した FGFR3 チロシンキナーゼ領域を組み込んだ DNA 5  $\mu$ g を混和し、5分静置、1ml の Transfection Buffer B (HEPES buffer) をこれに加えた。培地を 1ml の Transfection Buffer A (10% CS Grace's Medium) におきかえ、これに、mix 溶液をゆっくり添加し co-transfect した。4 時間後に 5% CS 添加 Grace's Insect Medium に置き換えた。1 日ごとに観察し、5 日後に感染像が観察されたので継代した。

## 7) サンプルの調整

継代を繰り返し、ウイルスタイターをあげ、野生型および変異型の培養上清を収集した。これを、Ni-NTA アガロース (QIAGEN) と混和、4°C で 1 時間インキュベートした。次にアガロースを遠心回収し、続いてリン酸化反応 buffer (50mM Tris-HCl; pH6.8, 200mM KCl, 0.1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT,

1mM PMSF) を加え、37°C 15 分反応させた。反応終了後直ちに、4×SDS-PAGE loading buffer (200mM Tris-HCl; pH6.8, 400mM DTT, 8% SDS, 40% glycerol, 0.04% bromophenol blue) に溶解し、100°C 10 分処理した<sup>33)</sup>。

## 8) SDS-PAGE および Western Blotting

各サンプルについて、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて、5% 2-mercaptoethanol 存在下で、タンパクの分離を行った。分離用として 10%、濃縮用として 4%のゲル濃度をそれぞれ用い、厚さは 1mm とした。電気泳動は、恒温式 2 連ミニゲルスラブ電気泳動装置 (日本エイドー) を用い、Lastick<sup>34)</sup>らの方法に準じ、100V 2 時間半行った。次に、Towbin<sup>35)</sup>らの方法に準じて、ゲルを Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) を用いて 20V 2 時間通電して PVDF 膜 (Millipore, USA) へ転写した。非特異的反応を阻害するため、転写後の PVDF 膜を 5% 脱脂ミルク/TBS (50mM Tris-HCl; pH7.6, 150mM NaCl) +0.1% Tween20 に室温で 1 時間反応させた。

その後、一次抗体として 1000 倍希釈 anti-phosphotyrosine antibody (モノクローナル抗体 4G10) (Upstate biotechnology Lake Placid, NY) を 4°C で一晩、二次抗体として、1000 倍希釈 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-AP Conjugate (Bio-Rad Laboratories) を室温で 1 時間半反応させた。発色は、BCIP/NBT Membrane Phosphatase Substrate System (Kirkegard & Perry Laboratories, Maryland, USA) を用いて行った。なお、各反応終了後は、0.1% Tween20/TBS にて洗浄した。

## 第3章 結 果

### 1. 口腔扁平上皮癌における FGFR3 の変異

OSCC 由来 DNA における FGFR3 細胞内領域の exon 10 から exon 19 までの変異の有無を PCR-SSCP にて検討した結果、FGFR3 遺伝子の exon 17 に変異が存在する可能性が示唆された（図4）。他の exon においては変異を示唆する結果は得られなかった。そこで、exon17 の塩基配列を direct sequence で検討した結果、PCR-SSCP にて変異が示唆された症例全てに *FGFR3* 2128 番目の塩基 グアニンがチミンへ変異する point mutation を認めた（図5）。これは、検索した症例 71 症例中、44 症例の約 62%に認めた。この変異は FGFR3 遺伝子のコドン 697 のアミノ酸、グリシンのシステインへの置換を示唆した。

### 2. 正常口腔粘膜上皮組織および口腔扁平上皮癌組織における FGFR3 タンパクの発現

正常上皮組織において、FGFR3 タンパクは有棘層の細胞の細胞質にその発現を認めた（図6）。*FGFR3* に変異を有さない口腔扁平上皮癌組織においては、癌細胞の細胞質および核に FGFR3 タンパクの発現を認めた（図7）。一方、G2128T 変異を有した口腔扁平上皮癌組織においては、癌細胞の細胞膜に FGFR3 タンパクの強い発現を認めた（図8）。

### 3. G2128T 変異を有した FGFR3 の機能についての解析

バキュロウイルスタンパク発現系にて、野生型および G2128T 変異型 FGFR3 タンパクの細胞内領域を作製し、そのチロシンリン酸化活性を抗ホスホチロシン抗体を用いてウエスタンブロッティング法で比較検討した結果、野生型ではチロシンリン酸化を示すバンドはほとんど確認できなかったが、変異型タンパクでは明らかに高いチロシンリン酸化を示すバンドが検出され（図9）、G2128T 変異により G697C アミノ酸置換を有する FGFR3 タンパクでは野生型と比べ、チロシンキナーゼリン酸化活性の上昇が認められた。

## 第4章 考 察

口腔扁平上皮癌においては、FGFR3 遺伝子の 2128 番目の塩基 グアニンのチミンへの変異 (G2128T) に基づく FGFR3 タンパクのコードン 697 番目のアミノ酸 グリシンのシステインへのアミノ酸置換 (G697C) が高い頻度 (約 62%) で存在することが明らかとなった。

*FGFR* の異常は、先天性骨格・軟骨形成異常の原因として報告されている。そのうち頭蓋縫合早期癒合症を伴う先天奇形である Crouzon 症候群<sup>36)-38)</sup>では FGFR2 の Cys342Tyr、Ser354Cys、Tyr340His などの変異が、Pfeiffer 症候群<sup>39)-42)</sup>では FGFR1 の Pro252Arg などが、また Jackson-Weiss 症候群<sup>37)</sup>では FGFR2 の Ala344Gly、Apert 症候群<sup>43)</sup>では FGFR2 の Ser252Trp や Pro253Arg が知られている。その他、軟骨形成不全 (Achondroplasia)<sup>44)、45)</sup>では、FGFR3 膜貫通領域の Gly380Arg、Thanatophoric Dysplasia 1 型 (TD I)<sup>46)</sup>では FGFR3 の Arg248Cys が、Thanatophoric Dysplasia 2 型 (TD II)<sup>46)</sup>では FGFR3 の Lys650Glu、Crouzon 症候群に Acanthosis nigricans を合併した症例<sup>47)</sup>では FGFR3 の Ala391Glu などの変異が報告されている。これら先天疾患における FGFR 分子を解析すると、リガンドに依存しないレセプター自身の二量体化による恒常的チロシンリン酸化活性が認められ、また、レセプターのチロシンキナーゼの活性化の程度が疾患の重症度と相関しているといわれている<sup>25)</sup>。

*FGFR3* の G2128T 変異は、コードン 697 番目のアミノ酸 グリシンのシステインへのアミノ酸置換 (G697C) を示唆している。システインは-SH 基を持ち disulfide bond を形成し、タンパクの立体構造に深く関与しており、タンパ

クの生物活性の維持に重要なアミノ酸であることから、グリシンのシステインへの置換は、FGFR 分子のリガンドに依存しない二量体化を引き起こすことにより、FGFR3 の発現量の増加や FGFR3 の自己リン酸化活性の上昇等、レセプターの機能的変化を生じさせていると考えられる。

*FGFR3* の G2128T 変異は、今回検討した 71 症例中 44 症例、約 62% に認められた。扁平上皮癌においては p53 や H-ras、MTS1 (p16)、ING1 (p33) などの癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異が存在することが報告されている。これら遺伝子変異の頻度は、癌遺伝子 H-ras で約 10%<sup>48)-51)</sup>、癌抑制遺伝子 MTS1 で約 20%<sup>52), 53)</sup>、ING1 においては約 10%<sup>54), 55)</sup>、p53 で約 55%<sup>49)</sup> の報告がある。

今回、口腔扁平上皮癌における *FGFR3* の G2128T 変異が 71 症例中 44 症例、約 62% という高い頻度で認められたことは、同変異が口腔扁平上皮癌の遺伝子診断の有用な分子標的マーカーとして利用できる可能性が高いと考えられる。

今回検討し得た 71 症例において、変異の有無と腫瘍の大きさ (T)、所属リンパ節転移の有無 (N)、後発転移の有無や X 線写真における骨吸収像の有無などの臨床所見との関係について統計学的に検討を行ったが、変異を有する症例で T 値が高値を示す傾向が認められたものの、統計学的に有意差は認められなかった。これは 62% という高い頻度で *FGFR3* の変異が存在するためであることによると考えられる。

正常口腔粘膜扁平上皮組織においては、その有棘細胞の細胞質に *FGFR3* タンパクの発現を認め、変異を有さない口腔扁平上皮癌組織においては、細胞質および核に発現を認めた。一方、*FGFR3* G2128T 変異を有する症例では、その細胞膜に *FGFR3* タンパクの強い発現を認めた。

Johnston ら<sup>56)</sup>は、特異的抗体を用いた免疫蛍光染色法により、COS 細胞において FGFR1、FGFR2 および FGFR4 は細胞質に、FGFR3 は核に発現するが、同細胞に野生型 FGFR3 を過剰発現させると、膜に FGFR3 の発現を認めたことを報告している。FGFR3 の G2128T 変異を有する OSCC において FGFR3 タンパクの細胞膜での過剰発現を認めたことから、これら OSCC では FGFR3 が変異により過剰発現している可能性を示唆していると考えられる。

FGFR は細胞質で合成され、膜上で機能している。細胞質で認める受容体タンパクは活性を持たず、膜で発現している受容体タンパクは活性化して機能していると考えられる。したがって、変異症例において認められた細胞膜上での FGFR3 タンパクの過剰発現は FGFR3 タンパクが機能していることを示唆していると考えられる。正常においても、膜での発現をまったく認めないわけではなく、その発現量が少ないため明らかな陽性所見を認めなかったが、変異症例では有意に膜に発現しているという結果に至ったと考える。

このように、タンパク発現の局在に差が生じるということは、単に発現量の差を示すだけでなく、レセプタータンパクの場合、機能に差が生じている可能性も考えられる。そこで、FGFR3 の機能について検討した。

FGFR は FGF と結合し、細胞の増殖、分化等のシグナル伝達に関与する分子と考えられている。なかでも、FGFR3 は以下のように、正常の増殖や分化をコントロールする分子と考えられている。

Su ら<sup>57)</sup>は、TD II で認められる Lys650Glu を有する変異型 FGFR3 を 293T 細胞に遺伝子導入して、変異型 FGFR3 が恒常的チロシンキナーゼ活性を示すことを明らかにしている。また、Deng ら<sup>58)</sup>は、FGFR3 deficient マウスにおける、骨成長の促進を明らかにし、さらに、Colvin ら<sup>59)</sup>は

FGFR3 ノックアウトマウスを作製し、骨の過成長と内耳の分化形成不全に由来する重度の難聴を示すことを明らかにしている。これら結果から、彼らは、FGFR3 シグナルは骨において成長抑制に関与するシグナルとして働くと考えている。

一方、Onose ら<sup>60)</sup>は甲状腺癌細胞に FGFR3 を過剰発現させ、FGFR3 の機能を解析している。それによると、FGFR3 を過剰発現させた細胞は、コントロールと比べ、増殖能 (growth rate) に差は認めないものの、コントロール群の細胞増殖が止まってもなお、FGFR3 過剰発現細胞は増殖を続けたことから、FGFR3 は接触増殖阻止の制御に関係している可能性を報告している。

今回、口腔扁平上皮癌における FGFR3 G697C 変異の機能的意義に関し、FGFR3 細胞内領域の野生型と G697C 変異型タンパクをバキュロウイルス発現系にて発現させ、チロシンキナーゼリン酸化活性について比較検討した結果、変異型において自己リン酸化活性の上昇が認められた。この結果から、同変異はリガンドに依存しない FGFR3 の恒常的自己リン酸化を引き起こし、FGFR3 のシグナル伝達を促進することにより、正常な細胞分化が制御されなくなるとともに、細胞間接触による増殖抑制も起こらなくなることにより、口腔扁平上皮の癌化に関与していると考えられる。

以上の結果から、口腔扁平上皮癌において、FGFR3 チロシンキナーゼ領域に G2128T 変異に基づく G697C 置換が高い頻度で存在することが明らかとなり、FGFR3 は遺伝子診断、治療の分子標的として有用である可能性が示唆された。

さらに、G697C 変異は、FGFs に依存しない FGFR3 チロシンキナーゼの恒常的活性化を引き起こすことにより、口腔扁平上皮癌の発症および進展に深く関与していることが考えられた。

## 第5章 総括

- 1、口腔扁平上皮癌 71 症例中 44 症例、約 62%に *FGFR3* の 2128 番目の塩基グアニンのチミンへの変異を認めた。同変異は 697 番目のコドン、グリシンのシステインへのアミノ酸置換を示唆した。
- 2、*FGFR3* タンパクの正常口腔粘膜扁平上皮、および口腔扁平上皮癌における発現を免疫組織学的に検討した結果、正常上皮では有棘層の細胞の細胞質に、変異を有する症例では、*FGFR3* タンパクの細胞膜での過剰発現を認めたが、変異のない症例では、*FGFR3* は細胞質および核に局在していた。
- 3、遺伝子組み替え野生型および変異型 *FGFR3* チロシンキナーゼ領域タンパクをバキュロウイルス発現系を用いて作製し、リン酸化活性を比較した結果、変異型では野生型と比べチロシンキナーゼリン酸化活性が上昇していることが明らかになった。

以上の結果から、口腔扁平上皮癌において、*FGFR3* チロシンキナーゼ領域に G2128T 変異に基づく G697C 置換が高い頻度で存在することが明らかとなり、*FGFR3* は遺伝子診断、治療の分子標的として有用である可能性が示唆された。

さらに、G697C 変異は、FGFs に依存しない *FGFR3* チロシンキナーゼの恒常的活性化を引き起こすことにより、口腔扁平上皮癌の発症および進展に深く関与していることが考えられた。

## 参考文献

- 1) Gospodarowics, D., Jones, K.L., Sato, G. : Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA.* ; 71 : 2295-2299, 1974
- 2) Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., Itoh, N. : Identification of novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver<sup>1</sup>. *Biochem-Biophys-Acta* ; 1492 : 203-206, 2000
- 3) Johnson, D.E., Williams, L.T. : Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advances in Cancer-Res.* ; 60 : 1-41, 1993
- 4) Adnane, J., Gausray, P., Dionne, C.A., Crumley, G., Jaye, M., Schlessinger, J., Jeanteur, P., Birnbaum, D., Theillet, C. : *BEK* and *FLG*, two receptors to member of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* ; 6 : 659-663, 1991
- 5) Muenke, M., Shell, U. : Fibroblast growth factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends in Genetics* ; 11: 308-313, 1995
- 6) Mason, I.J. : The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell* ; 78 : 547-552, 1994

- 7) Heldin, C.H. : Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* ; 80 : 213–223, 1995
- 8) Ornitz, D.M. : FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays* ; 22 : 108–112, 2000
- 9) Isacchi, A., Bergonzoni, L., Sarmientos, P. : Complete sequence of human receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Nucl-Acid-Res.* ; 18 : 1906, 1990
- 10) Johnson, D.M., Lee, P.L., Lu, J., Williams, L.T. : Diverse forms of a receptor for acidia and basic fibroblast growth factors. *Mole-Cell-Biol.* ; 10 : 4728–4736, 1990
- 11) Dionne, C.A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J.M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W.H., Jaye, M., Schlessinger, J. : Cloning and expression of two distinct high-affinity receptor cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO-J.* ; 9 : 2685–2692, 1990
- 12) Houssaint, E., Blanquet, P.R., Champion, Arnaud, P., Gesnel, M.C., Torriglia, A., Courtois, Y., Breathnach, R. : Related fibroblast growth factor receptor genes exist in the human genome. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA.* ; 87 : 8180–8184, 1990

- 13) Keegan, K., Johnson, D.E., Williams, L.T., Hayman, M.J. : Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA.* ; 88 : 1095-1099, 1991
- 14) Thompson, L.M., Plummer, S., Schalling, M., Altherr, M.R., Gusella, J.F., Housman, D.E., Wasmuth, J.J. : A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington disease gene region of human chromosome 4. *Genomics* ; 11 : 1133-1142, 1991
- 15) Partanen, J., Makela, T.P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson, Welsh, L., Alitalo, K. : FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO-J.* ; 10 : 1347-1354, 1991
- 16) Vainkka, S., Partanen, J., Bellosta, P., Coulier, F., Birnbaum, D., Basilico, C., Jaye, M., Alitalo, K. : Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO-J* ; 11 : 4273-4280, 1992
- 17) Jaye, M., Schlessinger, J., Dionne, C.A. : Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochem-Biophys-Acta.* ; 1135 : 185-199, 1992

- 18) Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., Goldfarb, M. : Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J-Biol-Chem* ; 271 : 15292–15297,1996
- 19) Avivi, A., Yayon, A., Givol, D. : A novel form of FGF receptor–3 using an alternative exon in the immunoglobulin domain III. *FEBS-lett.* ; 330 : 249–252, 1993
- 20) Murgue, B., Tsunekawa, S., Rosenberg, I., deBeaumont, M., Podolsky, D.K. : Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer-Res.* ; 54 : 5206–5211, 1994
- 21) Johnson, D.E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., Williams, L.T. : The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol-Cell-Biol* ; 11 : 4627–4634, 1991
- 22) Werner, S., Duan, D.S., de Vries, C., Peters, K.G., Johnson, D.E., Williams, L.T. : Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand–binding specificities. *Mol-Cell-Biol* ; 12 : 82–88, 1992

- 23) Shi, E., Kan, M., Xu, J., Wang, F., Hou, J., McKeegan, W.L. : Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants. *Mol-Cell-Biol* ; 13 : 3907-3918, 1993
- 24) Chellaiah, A.T., McEwen, D.G., Werner, S., Xu, J., Ornitz, D.M. : Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. *J-Biol-Chem* ; 269 : 11620-11627, 1994
- 25) Webster, M.K., Donoghue, D.J. : FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends in Genetics* ; 13 : 178-182, 1997
- 26) Gorlin, R.J. : Fibroblast growth factors, their receptors and receptor disorders. *J-Cranio-Maxillofacial-Surgery* ; 25 : 69-79, 1997
- 27) Drugan, C.S., Paterson, I.C., Prime, S.S. : Fibroblast growth factor receptor expression reflects cellular differentiation in human oral squamous carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* ; 19 : 1153-1156, 1998
- 28) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J.D., Takada, K. : Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC) . *J-Oral-Pathol-Med.* ; 23 : 451-456, 1994

- 29) TNM classification of malignant tumors. 4<sup>th</sup> ED. UICC-International-Union-Against-Cancer; Springer-Verlag, 1987
- 30) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. SCIENCE ; 239 : 487-491, 1988
- 31) Kawasaki, E.S., Clark, S.S., Coyne, M.Y., Smith, S.D., Champlin, R., Witte, O.N., McCormick, 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
- 32) Chomczynski, P., Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal-Biochem. ; 162 : 156-159, 1987
- 33) Kasahara, M., Ohmori, M. : Activation of a cyanobacterial adenylyate cyclase, CyaC, by autophosphorylation and a subsequent phosphotransfer reaction. J-Biol-Chem ; 274 : 15167-15172, 1999
- 34) Lastick, S.M., McConkey, E.D. : Exchange and stability of HeLa ribosomal proteins *in vivo*. J-Biol-Chem ; 251 : 2867-2875, 1976

- 35) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* ; 76 : 4350-4354, 1979
- 36) Reardon, W., Winter, R.M., Rutland, P., Pulleyn, L.J., Jones, B.M., Malcom, S. : Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat-Genet.* ; 8 : 98-103, 1994
- 37) Jabs, E.W., Li, X., Scott, A.F., Meyers, G., Chen, W., Eccles, M., Mao, J., Charnas, L.R., Jackson, C.E., Jaye, M. : Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat-Genet.* ; 8 : 275-279, 1994
- 38) Li, X., Park, W.J., Pyeritz, R.E., Jabs, E.W. : Effect on splicing of a silent FGFR2 mutation in Crouzon syndrome. *Nat-Genet.* ; 9 :232-233, 1995
- 39) Muenke, M., Schell, U., Hehr, A., Robin, N.H., Loskenm, H.W., Schinzel, A., Pulleyn, L.J., Rutland, P., Reardon, W., Malcolm, S., Winter, R.M. : A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat-Genet.* ; 8 : 269-274, 1994

- 40) Rutland, P., Pulleyn, L.J., Reardon, W., Baraitser, M., Hayward, R., Jones, B., Malcom, S., Winter, R.M., Oldridge, M., Slaney, S.F., Poole, M.D., Wilkie, A.O.M. : Identical mutations in the *FGFR2* gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nat-Genet.* ; 9 : 173-176, 1995
- 41) Lajeunie, E., Ma, H.W., Bonaventure, J., Munnich, A., Merrer, M.L. : *FGFR2* mutations in Pfeiffer syndrome. *Nat-Genet.* ; 9 : 108, 1995
- 42) Shell, U., Hehr, A., Feldman, G.J., Robin, N.H., Zackai, E.H., Die Smulders, C., Viskochil, D.H., Stewart, J.M., Wolff, G., Ohashi, H., Price, R.A., Cohen.Jr., M.M., Muenke, M. : Mutations in *FGFR1* and *FGFR2* cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum-Mole-Genet.* ; 4 : 323-328, 1995
- 43) Wilkie, A.O.M., Slaney, S.F., Oldridge, M., Poole, M.D., Ashworth, G.J., Hockley, A.D., Hayward, R.D., David, D.J., Pulleyn, L.J., Rutland, P., Malcolm, S., Winter, R.M., Reardon, W. : Apert syndrome results from localized mutations of *FGFR2* and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat-Genet.* ; 9 : 165-171, 1995
- 44) Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Church, D.M., Fielder, T.J., Bocian, M., Winokur, S.T., Bocian, M., Winokur, S.T., Wasmuth, J.J. : Mutations in the transmembrane domain of *FGFR3* cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* ; 78 : 335-342, 1994

- 45) Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeal, M.L., Pelet, A., Rozrt, J.M., Maroteaux, P., Merrer, M.L., Munnich, A. : Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *NATURE* ; 371 : 252-254, 1994
- 46) Tavormina, P.L., Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Wilkin, D.J., Lachman, R.S., Wilcox, W.R., Rimoin, D.L., Cohn, D.H., Wasmuth, J.J. : thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat-Genet.* ; 9 : 321-328, 1995
- 47) Meyers, G.A., Orlow, S.J., Munro, I.R., Przylepa, K.A., Jabs, E.W. : Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat-Genet.* ; 11 : 462-464, 1995
- 48) Sakata, K. : Alterations of tumor suppressor genes and the H-ras oncogene in oral squamous cell carcinoma. *J-Oral-Pathol-Med.* ; 25 : 302-307, 1996
- 49) Ramchurren, N., Cooper, K., Summerhayes, I.C. : Molecular events underlying schistosomiasis-related bladder cancer. *Int-J-Cancer* ; 62 : 237-244, 1995

- 50) Sakai, E., Rikimaru, K., Ueda, M., Matsumoto, Y., Ishii, N., Enomoto, S., Yamamoto, H., Tsuchida, N. : The p53 tumor-suppressor gene and ras oncogene mutations in oral squamous-cell carcinoma. *Int-J-Cancer* ; 52 : 867-872, 1992
- 51) Shibata, M.A., Shirai, T., Ogawa, K., Takahashi, S., Wild, C.P., Montesano, R., Tsuda, H., Ito, N. : DNA methylation adduct formation and H-ras gene mutations in progression of N-butyl-N- (4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder tumors caused by a single exposure to N-methyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis* ; 15 : 2965-2968, 1994
- 52) Dawson, C.D., Chang, K.W., Solt, D.B. : MTS1 gene mutations in archival oral squamous cell carcinoma. *J-Oral-Pathol-Med.* ; 25 : 541-546, 1996
- 53) Lang, J.C., Tobin, E.J., Konbloch, T.J., Schuller, D.E., Bartynski, K.J., Mountain, R.E., Micholson, R., De Yonug, B.R., Weghorst, C.M. : Frequent mutation of p16 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* ; 108 : 923-928, 1998
- 54) Gunduz, M., Ouchiba, M., Fukushima, K., Hanafusa, H., Etani, T., Nishioka, S., Nishizaki, K., Shimizu, K. : Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer-Res.* ; 60 : 3143-3146, 2000

- 55) Oki, E., Maehara, Y., Tokunaga, E., Kakeji, Y., Sugimachi, K. : Reduced expression of p33 (ING1) and the relationship with p53 expression in human gastric cancer. *Cancer-Lett.* ; 147 : 157-162, 1999
- 56) Johnston, C.L., Cox, H.C., Gomm, J.J., Coombes, R.C. : Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartment. *J-Biol-Chem* ; 270 : 30643-30650, 1995
- 57) Su, W.S., Kitagawa, M., Xue, N., Xie, B., Garofalo, S., Cho, J., Deng, C., Horton, W.A., Fu, X.Y. : Activation of STAT1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *NATURE* ; 386 : 288-292, 1997
- 58) Deng, C., Wynshaw Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., Leder, P. : Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* ; 84 : 911-921, 1996
- 59) Colvin, J.S., Bohne, B.A., Harding, G.W., McEwen, D.G., Ornitz, D.M. : Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat-Genet.* ; 12 : 390-397, 1996

- 60) Onose, H., Emoto, N., Sugihara, H., Shimizu, K., Wakabayashi, I. :  
Overexpression of fibroblast growth factor receptor 3 in a human thyroid carcinoma cell line results in overgrowth of the confluent cultures.  
*European-J-Endocrinology* ; 140 : 169-173, 1999

# Nomenclature of Genes Encoding FGFR Proteins

FGFR proteins	Types of FGFR proteins	Alternative names	Genes cloned from
<i>fgfr</i>	FGFR1	<i>flg, fms, cek-1</i>	Human, newt, rat, mouse, <i>Xenopus</i> , chick, bovine, fish
	FGFR2	<i>bek, K-sam, kgfr, cek-3</i>	Human, newt, rat, fish, <i>Xenopus</i> , chick, mouse
	FGFR3	<i>cek-2</i>	Human, newt, chick, mouse, fish
FGFR4	<i>frek</i>		Human, newt, <i>Xenopus</i> , quail, fish, monkey

(表 1)

## FGFR Isootypes Expressed in OE and OSCC

FGFR Variant	FGFR1	FGFR2		FGFR3		FGFR4
		-IIIb	-IIIc	-IIIb	-IIIc	
OE	+	-	-	-	-	+
OSCC	+	+	-	+	-	+

OE: 正常齒肉由來上皮細胞

OSCC: 口腔扁平上皮癌細胞

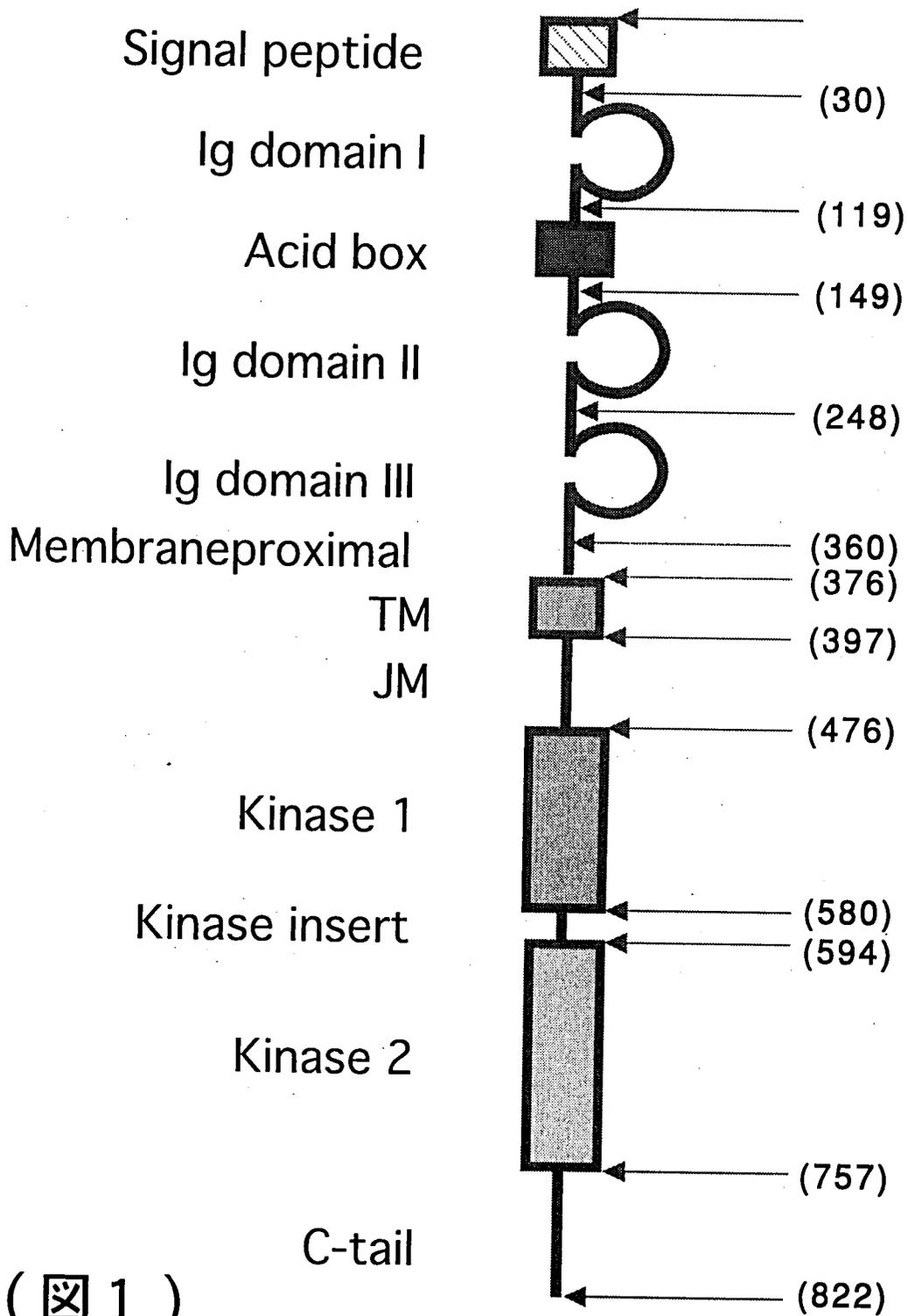
(表 2)

# 症例一覽

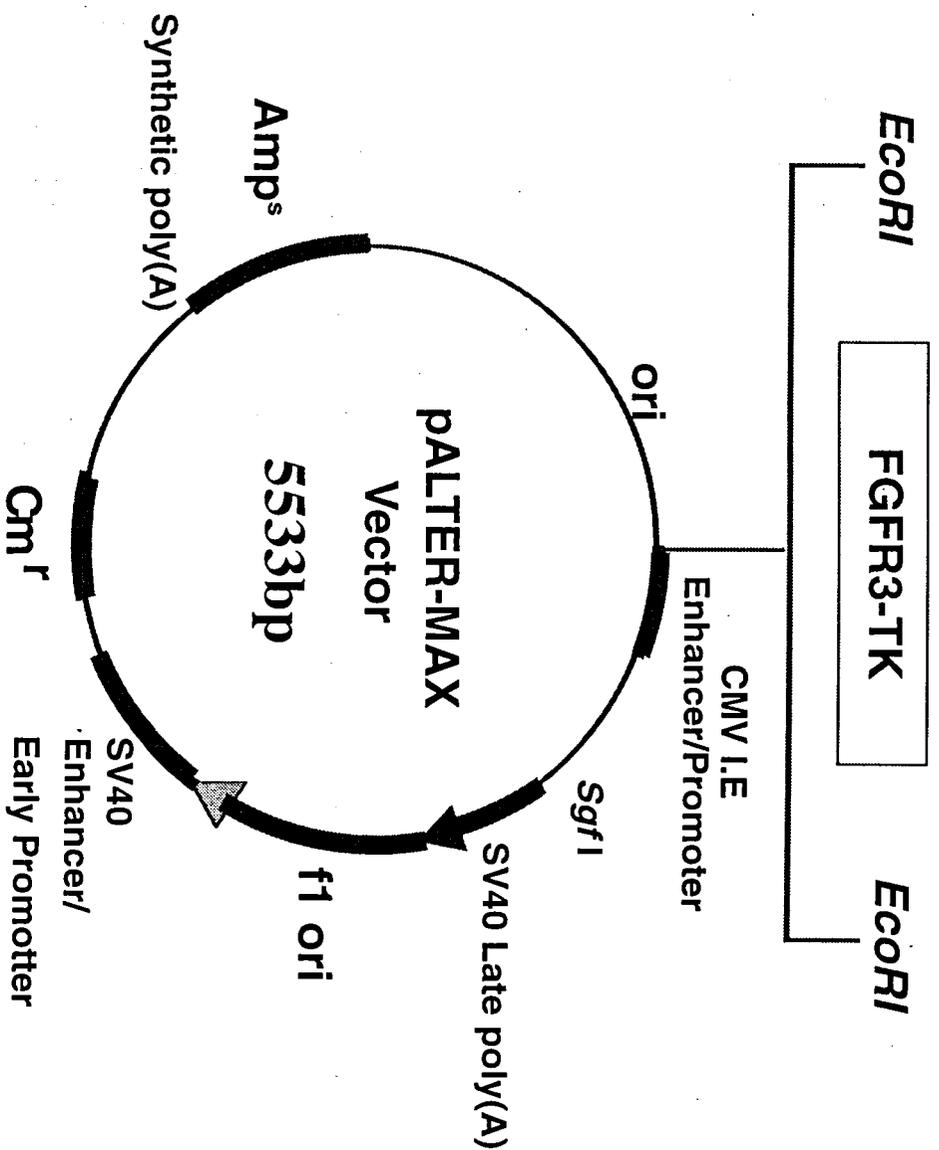
Case No.	年齡	性別	臨床診斷名	TNM分類	STAGE分類	Case No.	年齡	性別	臨床診斷名	TNM分類	STAGE分類
1.	64	F	舌癌	T2N1M0	III	37.	38	M	舌癌	T2N0M0	II
2.	64	F	下顎癌	T4N0M0	IV	38.	61	M	上顎癌	T3N0M0	III
3.	54	F	舌癌	T1N0M0	I	39.	49	F	舌癌	T3N0M0	III
4.	80	F	下齒肉癌	T4N0M0	IV	40.	71	M	舌癌 + 下顎癌	T1N0M0	I
5.	62	M	上顎癌	T2N0M0	II	41.	69	M	下齒肉癌	T2N0M0	II
6.	74	M	頬粘膜癌	T2N0M0	II	42.	74	M	口底癌	T4N2bM0	IV
7.	66	M	舌癌	T4N0M0	IV	43.	57	M	上顎癌	T4N0M0	IV
8.	63	M	上顎癌	T4N0M0	IV	44.	89	F	口底癌	T4N2bM0	IV
9.	39	F	舌癌	T1N0M0	I	45.	72	M	下顎癌	T4N2bM0	IV
10.	54	M	舌癌	T3N0M0	III	46.	51	F	舌癌	T2N2bM0	IV
11.	81	F	舌癌	T2N0M0	II	47.	66	M	下顎癌	T2N0M0	II
12.	79	M	上顎癌	T4N0M0	IV	48.	56	M	舌癌	T1N0M0	I
13.	66	F	上齒肉癌	T2N0M0	II	49.	64	F	上齒肉癌	T4N0M0	IV
14.	68	M	下顎癌	T4N0M0	II	50.	74	M	下顎癌	T4N0M0	IV
15.	67	F	上齒肉癌	T4N0M0	IV	51.	88	F	頬粘膜癌	T1N0M0	I
16.	68	M	下顎癌	T3N2M0	IV	52.	67	F	下顎癌	T2N2bM0	IV
17.	52	M	舌癌	T2N0M0	II	53.	65	F	舌癌	T1N0M0	I
18.	72	F	下顎癌	T3N1M0	III	54.	75	F	上顎癌 + 下顎癌	T4N0M0	IV
19.	74	F	下顎癌	T1N0M0	I	55.	67	M	口底癌	T2N0M0	II
20.	70	F	頬粘膜癌	T4N0M0	IV	56.	47	M	下顎癌	T2N0M0	II
21.	61	M	下齒肉癌	T3N0M0	III	57.	67	F	舌癌	T2N0M0	II
22.	64	M	軟口蓋腫瘍	T1N0M0	I	58.	59	F	舌癌	T3N2bM0	IV
23.	71	F	下顎癌	T4N0M0	IV	59.	67	F	舌癌 + 口底癌	T1N0M0	I
24.	82	M	上顎癌	T4N0M0	IV	60.	58	M	舌癌	T4N2bM0	IV
25.	56	M	舌癌	T1N0M0	I	61.	56	M	舌癌	T1N0M0	I
26.	59	M	上顎癌	T4N0M0	IV	62.	69	M	下齒肉癌	T2N2bM0	IV
27.	88	F	舌癌	T2N0M0	II	63.	77	F	口底癌	T2N0M0	II
28.	65	F	舌癌	T2N0M0	II	64.	68	M	下顎癌	T4N0M0	IV
29.	68	F	下顎癌	T1N2M0	IV	65.	66	F	上齒肉癌	T2N0M0	II
30.	78	M	頬粘膜癌	T1N0M0	I	66.	68	M	口底癌	T2N0M0	II
31.	75	M	口底癌	T2N0M0	II	67.	56	M	上齒肉癌	T4N0M0	IV
32.	75	M	上顎癌	T4N0M0	IV	68.	73	M	下顎癌	T4N1M0	IV
33.	81	F	頬粘膜癌	T2N1M0	III	69.	56	F	軟口蓋腫瘍	T1N0M0	I
34.	51	M	舌癌	T4N0M0	IV	70.	64	F	舌癌	T4N0M0	IV
35.	68	M	舌癌 + 口底癌	T4N2cM0	IV	71.	73	M	上齒肉癌	T3N0M0	III
36.	79	F	下顎癌	T2N0M0	II						

(表 3)

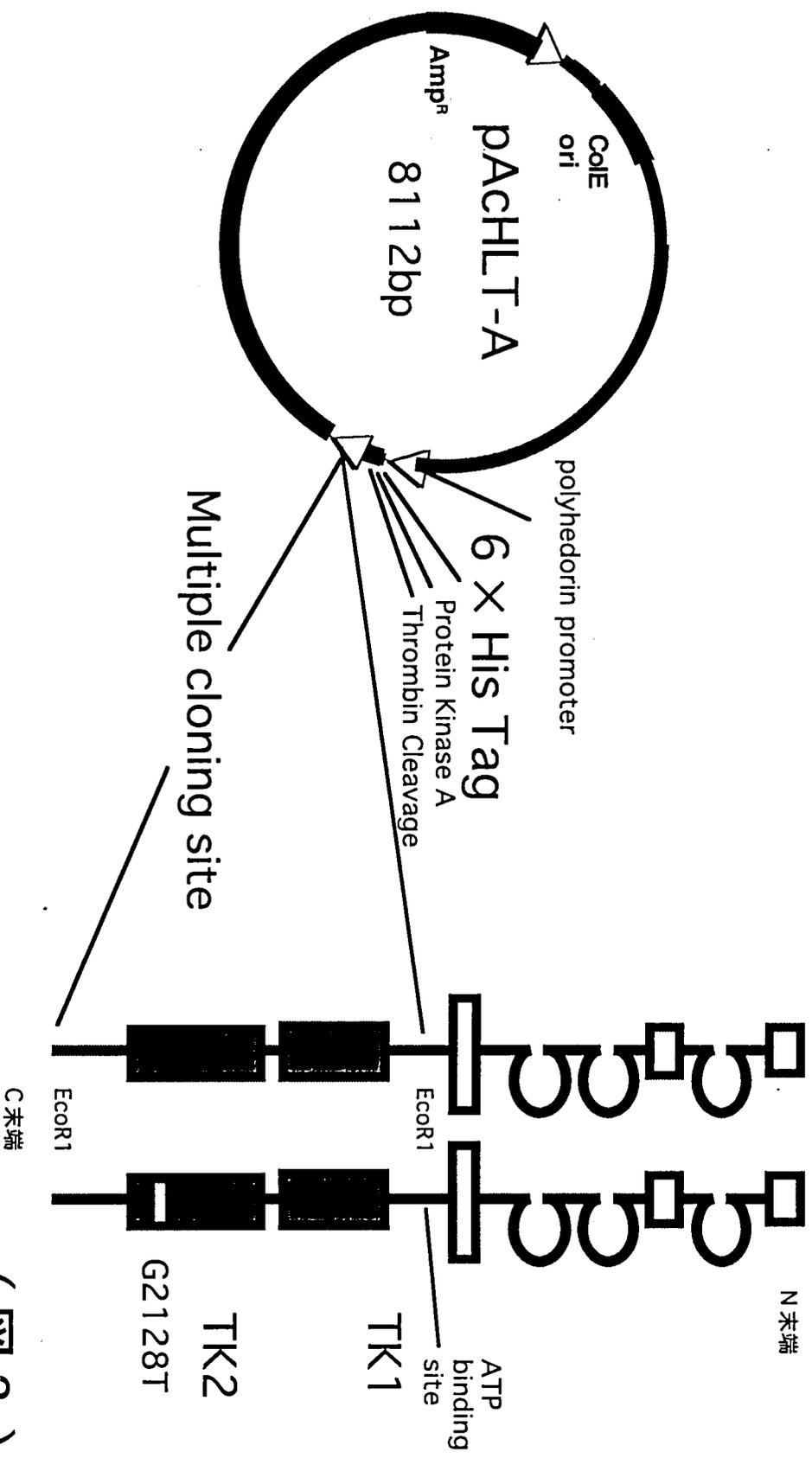
# Structure of FGFR Proteins



# Construction of Wild-Type FGFR3-TK Expression Vector



# Construction of Baculovirus Expression Vector

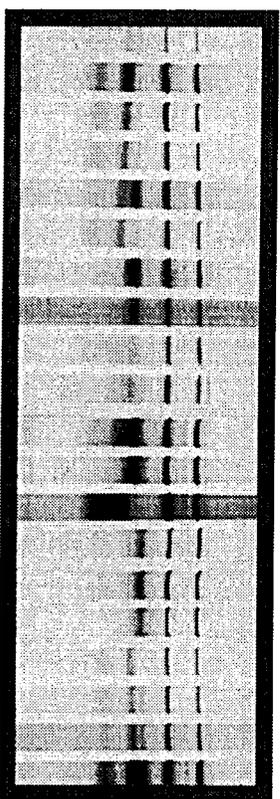


( 图 3 )

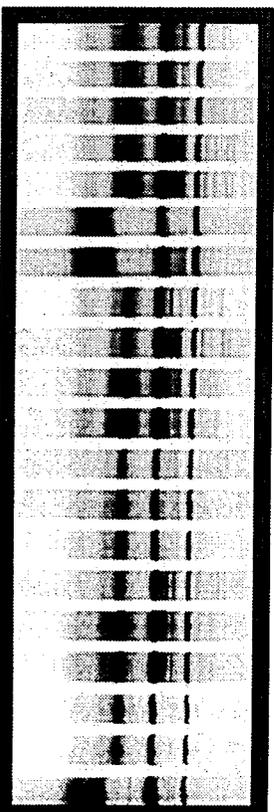
# PCR-SSCP Analysis (exon 17)

case no.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20.



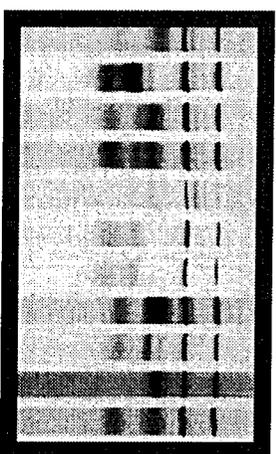
21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40.



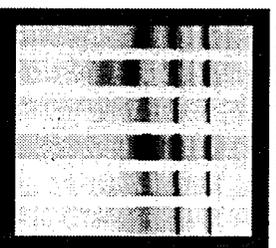
- - - - + - + + + + + - - - -

+ + + + - - + + + + + + + -

41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51.



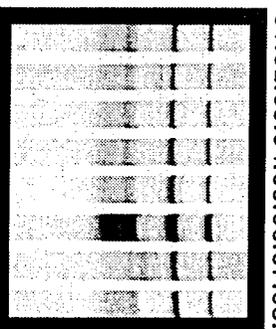
52. 53. 54. 55. 56. 57.



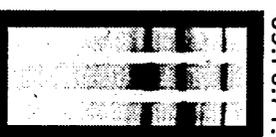
58. 59. 60.



61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68.



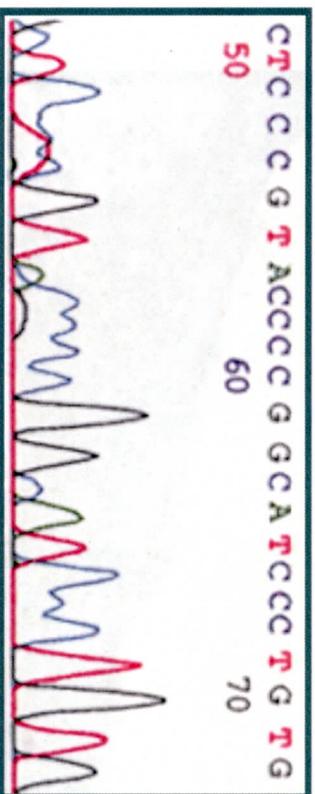
69. 70. 71.



( ㉨ 4 )

# Direct Sequence Analysis

正常上皮

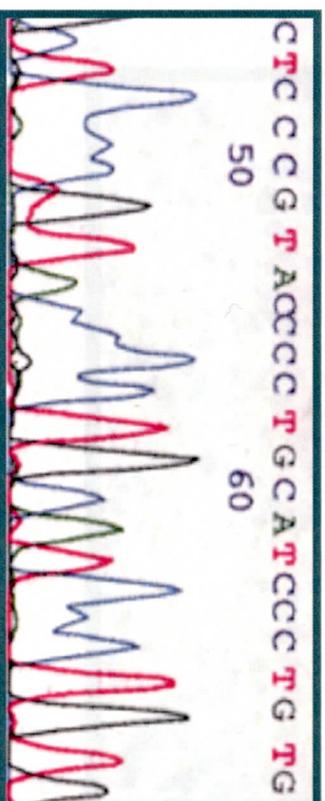


G2128T

GGC



変異症例

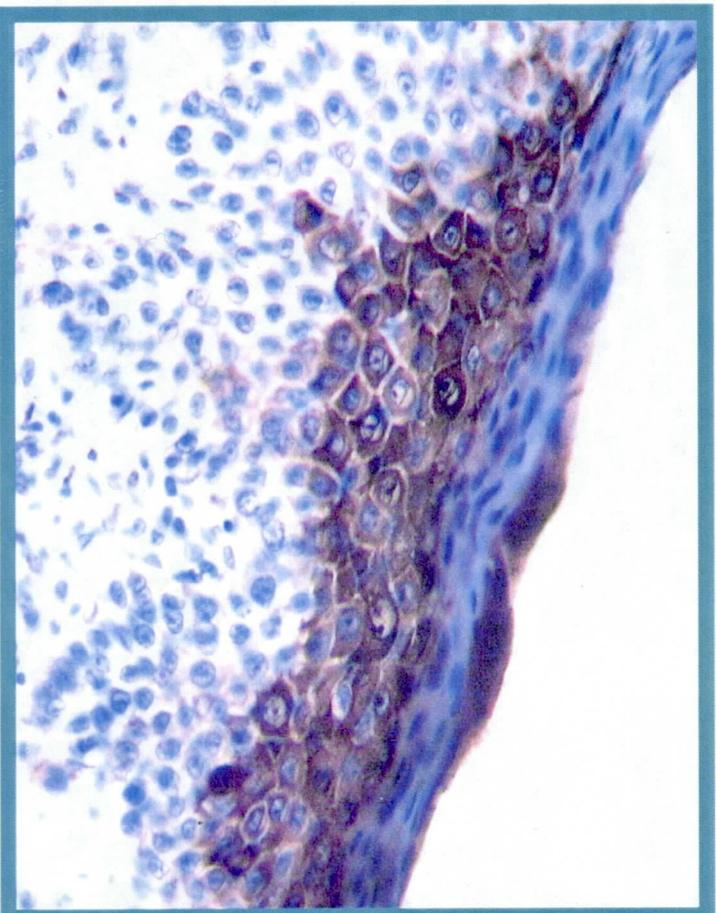


TGC

Gly697Cys

( 図 5 )

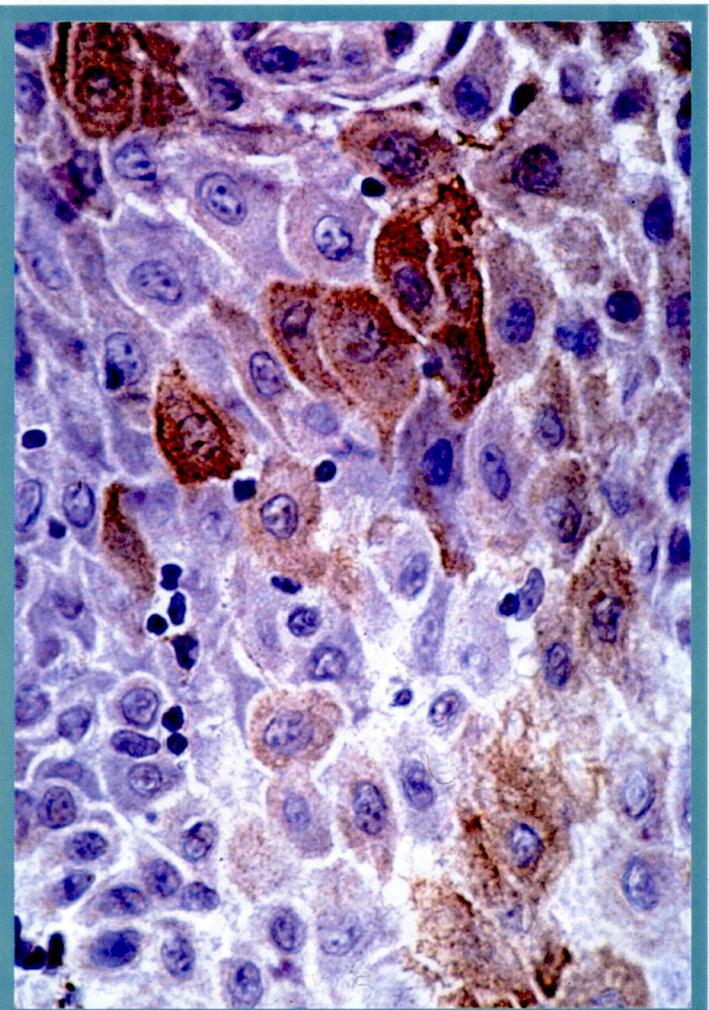
Immunohistochemical Study of FGFR3  
(normal epithelium)



( × 200 )

( 图 6 )

Immunohistochemical Study of FGFR3  
(mutation -)



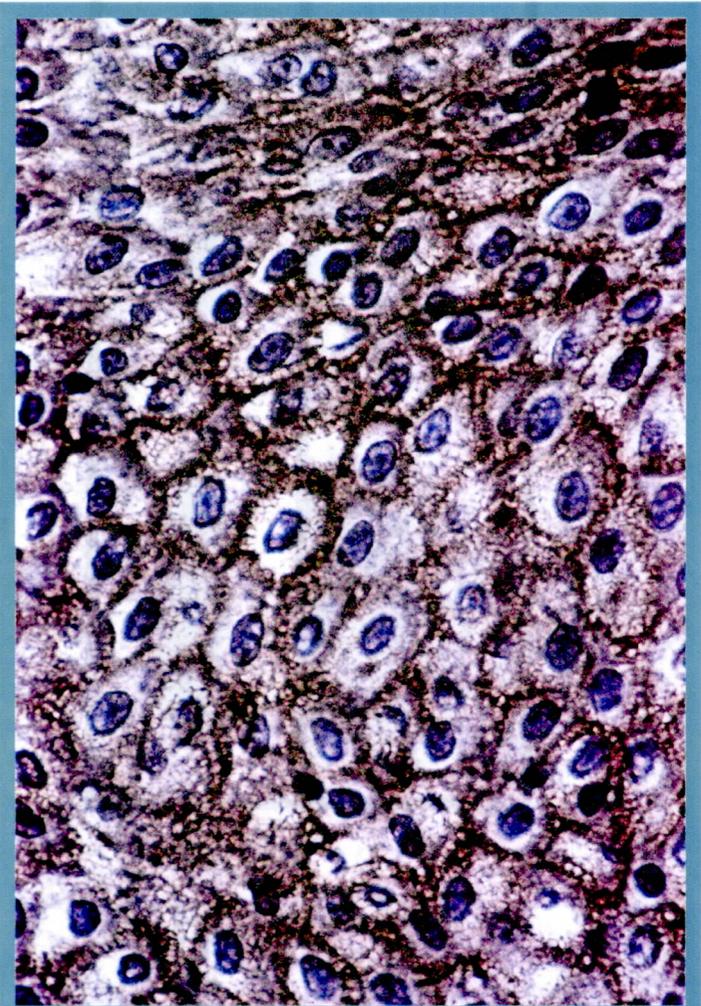
( × 400 )

( 図 7 )

# Immunohistochemical Study of FGFR3

Mutant FGFR3

(mutation +)



( × 400 )

( 8 )

Tyrosine Kinase Activities of Wild Type and

Mutant FGFR3

野生型

変異型



anti-pTyr

anti-FGFR3

( 図 9 )

Heparin-Binding protein 17を標的とした扁平上皮癌の

分子標的治療に関する基礎的研究

# 目次

|   |    |
|---|----|
| 第1章 緒論  | 1  |
| 第2章 材料および方法   | 3  |
| 第1節 細胞培養法   | 3  |
| 1) 基礎培地   | 3  |
| 2) 細胞株と培養方法   | 3  |
| 第2節 扁平上皮癌細胞におけるHBp17の発現と局在  | 4  |
| 1) 蛍光抗体法  | 4  |
| 2) 細胞からのtotal RNAの抽出  | 5  |
| 3) Northern Blot法によるHBp17発現の検討  | 5  |
| 第3節 HBp17 sense cDNA導入によるA431#4細胞の増殖とHBp17及びFGF-2<br>発現・分泌の変化の検討                | 6  |
| 1) senseHBp17発現ベクターの構築  | 6  |
| 2) pCI-neo/sense HBp17およびpCI-neoのA431#4細胞への遺伝子導入                                | 7  |
| 3) 細胞増殖能の判定   | 8  |
| 4) 培養上清中のFGF様活性の検索  | 8  |
| 5) ノードマウスでの造腫瘍性の判定  | 9  |
| 6) ノードマウス形成腫瘍からの細胞分離  | 9  |
| 7) Northern Blot法によるHBp17およびFGF-2mRNA発現の検討                                      | 10 |
| 8) Dot Blot法によるHBp17及びFGF-2の定量  | 11 |
| 第4節 antisenseHBp17 cDNA導入A431細胞の <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> の増殖能<br>の検討 | 11 |
| 1) antisenseHBp17発現ベクターの構築  | 11 |
| 2) pCI-neo/antisenseHBp17およびpCI-neoのA431細胞への遺伝子導入                               | 12 |

|   |     |
|---|-----|
| 3) Western Blot法によるHBp17蛋白発現の検討                                   | 1 2 |
| 4) antisense HBp17遺伝子導入細胞の増殖能の判定                                  | 1 3 |
| 5) antisense HBp17遺伝子導入細胞のヌードマウスでの造腫瘍性の判定                         | 1 3 |
| 第5節 <i>in vivo</i> transfectionによる扁平上皮癌組織へのHBp17 antisense遺伝子導入   | 1 4 |
| 1) <i>in vivo</i> electroporation法によるHBp17antisense cDNA導入        | 1 4 |
| 2) ヘマトキシリンおよびエオジン染色   | 1 4 |
| <br>  |     |
| <b>第3章 結果</b>   | 1 5 |
| 1) A431細胞でのHBp17とFGF-2の局在   | 1 5 |
| 2) A431細胞及び#4細胞でのHBp17mRNA発現                                      | 1 5 |
| 3) HBp17 sense cDNA導入によるA431#4細胞の増殖能の検討                           | 1 5 |
| 4) #4mock細胞および#4senseHBp17細胞の培養上清中のFGF様活性の検討                      | 1 6 |
| 5) A431#4細胞の造腫瘍性とA431#4形成腫瘍由来細胞株の造腫瘍能の検討                          | 1 6 |
| 6) #4senseHBp17, Tu4, Tu4-A及びTu4-B細胞におけるHBp17mRNA及びFGF-2mRNA発現    | 1 7 |
| 7) #4senseHBp17, Tu4, Tu4-A及びTu4-B細胞におけるHBp17蛋白及びFGF-2蛋白発現        | 1 7 |
| 8) antisenseHBp17遺伝子導入によるHBp17蛋白の発現抑制                             | 1 8 |
| 9) A431細胞の増殖能に対するHBp17 antisense cDNA導入の影響                        | 1 8 |
| 1 0) A431細胞の造腫瘍性に対するHBp17 antisense cDNA導入の影響                     | 1 8 |
| 1 1) <i>in vivo</i> transfectionによるantisenseHBp17遺伝子導入による腫瘍増殖抑制効果 | 1 9 |
| <br>  |     |
| <b>第4章 考察</b>   | 2 0 |
| <br>  |     |
| <b>第5章 結語</b>   | 2 5 |
| <br>  |     |
| <b>文献</b>   | 2 6 |

## 第1章 緒論

細胞のがん化やがん細胞の増殖は液性因子や細胞外基質などの細胞間に介在する微小環境によって支配されている。線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor ; FGF) は、当初、線維芽細胞の増殖を促進する因子として脳下垂体から単離されたタンパク質で、現在まで相同性のある分子21種が報告されている (Burgess and Maciag, 1989; Klagsbrun, 1989; Ohbayashi, et al., 1998)。特にFGF-1及びFGF-2は線維芽細胞の増殖のみならず骨・軟骨形成への関与 (Burgess and Maciag, 1989; Okamoto et al., 1996a)、血管内皮細胞の増殖及び遊走などを促進する血管新生因子としての役割や、腫瘍増殖に対し促進活性を示すことが知られている (Myoken, et al., 1994a)。

FGF-1やFGF-2の発現が扁平上皮のがん化にともない亢進すること (Myoken, et al., 1994b)や、扁平上皮癌細胞がFGFを高発現しその培養上清中にもFGFs様活性が存在することから、FGFが扁平上皮癌細胞の増殖を促進するほか、血管新生を誘導し腫瘍の増殖・浸潤に重要な役割を担っていると考えられている (Myoken, et al., 1994c)。FGF-1及びFGF-2をはじめとするFGFの多くは扁平上皮癌細胞の他、唾液腺腫瘍細胞など種々の培養細胞の上清中に存在するが (Myoken, et al., 1994d)、細胞外分泌に関与するシグナルペプチドがないため、その分泌機構は明らかにされていない (Baird, 1994; Bansal et al., 1996)。

Heparin-Binding protein17 (HBp17) は外陰部由来扁平上皮癌細胞株A431の培養上清からFGF様物質を分離する際に、FGF-2とともに精製された17kDaのヘパリン親和性分泌型蛋白である(Wu et al., 1991; Xin-Chang et al., 1998). HBp17はヒト角化細胞や唾液腺細胞などの上皮細胞に遺伝子発現が認められ、その悪性化とともに発現が亢進することが知られている(Okamoto et al., 1996b). さらにHBp17がin vitroにおいてFGF-1やFGF-2と可逆的に結合することから、FGFsの分泌・活性化に関与し、上皮細胞の悪性化やがん細胞の増殖を制御している可能性が指摘されている(Czubayko, et al., 1997).

本研究では、FGFsを介した扁平上皮のがん化や扁平上皮癌の増殖におけるHBp17の役割を明らかにするため、扁平上皮癌細胞へのHBp17遺伝子導入によるHBp17発現誘導が扁平上皮癌細胞のFGF-2産生・分泌や増殖に与える影響について検討した。さらに、HBp17アンチセンス遺伝子導入によるHBp17発現抑制が扁平上皮癌細胞の増殖に与える影響について解析することにより、HBp17を分子標的とした扁平上皮癌に対する遺伝子治療の可能性について検討した。

## 第2章 材料および方法

### 第1節 細胞培養法

#### 1) 基礎培地

Dulbecco's Modified Eagle's Mediumと Nutrient Mixture Ham F-12を1:1に混合したDF培地 (DF; Sigma Chemical Co., USA) (Dulbecco and Freeman, 1959; Sato et al., 1987; Eagle, 1955)を脱イオン化および逆浸透により純化した水 (ELIX水純化装置, Millipore) に溶解し, 90mg/L ペニシリンGナトリウム (明治製菓), 110mg/Lピルビン酸ナトリウム (和光純薬), 90mg/L カナマイシン (明治製菓), 15mM N-2ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES, 同仁化学) を添加後, 重炭酸ナトリウム (和光純薬) にてpH 7.4に調整したものをメンブレンフィルター (孔径0.2 $\mu$ m, Acrocap, Gelman Science Inc., USA) で濾過滅菌し基礎培地として用いた.

#### 2) 細胞株と培養方法

実験には外陰部由来扁平上皮癌細胞株A431とBussらによってニトロソグアニジン処理により得られたA431由来でA431細胞に比べ増殖能が低下し, 造腫瘍性を持たないクローンA431#4細胞を用いた (表1) (Buss et al., 1982). 各細胞は5%仔牛血清 (CS; Hy Clone, USA) を含むDFを増殖培養液として37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>気相下で培養した. 継代培養は細胞が増殖飽和状態になった時

点で行った。すなわち、0.08%トリプシン (Sigma) と1.4%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA; 同仁化学, 熊本) を含むDulbecco's Ca, Mg-free phosphate-buffer saline (PBS) で15分37℃で処理することにより単一細胞を得た。細胞を5%CSを含むDFにて洗浄後、細胞が $2 \times 10^4$ 個/mlなるように5%CSを含むDFに浮遊させたものを培養皿に加え細胞の継代を行った。

## 第2節 扁平上皮癌細胞におけるHBp17の発現と局在

### 1) 蛍光抗体法

$3 \times 10^4$ 個のA431細胞をLAB-TEK II Chamber Slide (Nalgen Nunc International, Naperville, IL, USA) に加え72時間培養後、4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、PBSで洗浄した。25倍希釈したマウス抗HBp17モノクローナル抗体 (C9; American Type Culture Collection, J.D.Sato 博士より供与) 及び100倍希釈したウサギ抗FGF-2ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) で湿箱中で37℃, 1時間反応させた。PBSで洗浄後、100倍希釈したFITC標識抗マウスIgG抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および100倍希釈したローダミン標識抗ウサギIgG抗体 (Santa Cruz Biotechnology) でさらに37℃, 1時間反応させた。PBSで洗浄し90%グリセリン/PBSで封入後、落射蛍光顕微鏡 (日本光学) を用いて検鏡した。

## 2) 細胞からのtotal RNAの抽出

total RNAの抽出は Acid Guanidinidium-Phenol-Chloroform法に準じて行った。すなわち培養細胞にdenaturing solution (4M グアニジンイソチオシアン酸, 25mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0) , 0.1M 2-メルカプトエタノール, 0.5% N-ラウロイルサルコシン) を加え18G注射針にてホモジナイズし, 1/10容量の2M 酢酸ナトリウム (pH4.0) を加え混和した。さらに等量の平衡化酸性フェノールと1/5用量のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え混和し, 氷上にて15分間静置後, 遠心した。回収された上層に等量のイソプロパノールを加えることによりRNAを沈殿させ, さらにdenaturing solutionで溶解し, イソプロパノール沈殿後, エタノールで洗浄したものをtotal RNAとして使用した。

## 3) Northern Blot法によるHBp17発現の検討

各細胞から抽出したtotal RNA 20  $\mu$ g をホルムアルデヒド変性1%アガロースゲルで泳動後, ナイロンメンブレン (Amersham, Buckinghamshire, England) に転写しスペクトロリンカーXL-1000 (トミー精工, 東京) でUV照射した。HBp17発現ベクター, pCI-neo/senseHBp17 (第3節, 1で作製) を制限酵素Eco R I及びXba Iで切断後, 1%アガロースゲルで電気泳動を行い, アガロースゲルよりHBp17cDNA回収し, ランダムプライマー法を用いて[ $\alpha$

$^{-32}\text{P}$ ]dCTP (Amersham) で標識した。メンブレンをプレハイブリダーゼーション溶液 (0.75M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH7.5), 2.5mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml 熱変性サケ精子DNA, 50%ホルムアミド, 5 x Denhardt液) で42℃, 4時間プレハイブリダーゼーションを行った。次に [ $^{32}\text{P}$ ]標識DNAプローブ 1 x 10<sup>6</sup>cpm/mlを含むハイブリダーゼーション溶液 (0.75M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH7.5), 2.5mM EDTA, 50%ホルムアミド, 5 x Denhardt液, 10% 硫酸デキストラン) で42℃, 16時間ハイブリダーゼーションを行った。ハイブリダーゼーション後, メンブレンを0.1%SDSを含む2 x SSCにて55℃で15分間, 2回洗浄し, さらに0.1%SDSを含む0.1 x SSCで55℃にて55℃で15分間, 2回洗浄した後, バイオ・イメージングアナライザー (BAS-2500; 富士フィルム) で解析した。

### 第3節 HBp17 sense cDNA導入によるA431#4細胞の増殖とHBp17及び

#### FGF-2発現・分泌の変化の検討

##### 1) senseHBp17発現ベクターの構築

A431細胞より回収したtotal RNA 1  $\mu$ gに対しReverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を行いHBp17のopen reading frameを含む領域を増幅した(Kawasaki et al., 1988)。すなわち, total RNA 1  $\mu$ gにランダムヘキサマー (Perkin Elmer, Foster, CA, USA) 及び Superscript II<sup>TM</sup>逆転写酵素 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) を加

え、42℃、45分反応させて cDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型として、制限酵素 *EcoRI* 認識配列を付加した5'末端プライマー (5'-cggaattcatgaagatctgtagcctcacc-3') と *XbaI* 認識配列を付加した3'末端プライマー (5'-gctctagattagcatgacgtgtcctgcac-3') と AmpliTaq gold™ (Perkin Elmer) を用い Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) にて95℃、10分間処理後、94℃；1分、57℃；1分、72℃；1分を1サイクルとして30サイクルの反応を行った。PCR産物と哺乳動物発現ベクター pCI-neo (Promega, Madison, WI, USA) を制限酵素 *EcoRI* (New England Biolabs) と *XbaI* (New England Biolabs) で消化した後、DNA Ligation Kit Ver.2 Solution (宝酒造) で16℃で8時間リガーゼ反応を行った。これを *E. coli* JM109株に形質転換し 100 μg/ml (和光純薬) アンピシリン添加LB寒天培地 (GIBCO BRL) 上の形質転換株を選択した。得られた形質転換株からプラスミドを調整し ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) を用いて pCI-neo に組み込まれた sense HBp17 遺伝子の塩基配列を確認した。sense HBp17 遺伝子が組み込まれたプラスミドを pCI-neo/sense HBp17 として実験に用いた (図1)。

## 2) pCI-neo/sense HBp17 および pCI-neo の A431#4 細胞への遺伝子導入

A431#4細胞にリポフェクトアミン法にて遺伝子導入を行った。すなわち  $2 \times 10^6$  個の A431#4細胞を60mm培養皿で24時間培養後、培養液を除去し、5 μg の pCI-neo/sense HBp17 または pCI-neo と 15 μl の TransFast™ Regent

(Promega, Madison, WI, USA) を添加したDF2mlを加え, 1時間37℃で反応した. その後, 10%CSを含むDF4mlを加え48時間培養した. 0.08%トリプシン及び1.4%EDTAを含むPBSで15分37℃で処理することにより得られた単一細胞を5%CS及び600  $\mu$ g/ml G418 (GENETICIN; GIBCO BRL) を含むDFで培養し, G418耐性細胞を分離した. A431#4細胞にpCI-neoまたはpCI-neo/senseHBp17が導入された細胞をそれぞれ#4mockまたは#4senseHBp17とし実験に用いた.

### 3) 細胞増殖能の判定

細胞増殖能の判定には2-メルカプトエタノール, 10  $\mu$ M 2-アミノエタノール, 10  $\mu$ M 10nMセレン酸ナトリウム (以上 片山化学), 10  $\mu$ g/ml ウシインシュリン, 5  $\mu$ g/ml ヒトトランスフェリン, 20  $\mu$ g/ml ウシ血清アルブミン (BSA) (以上 Sigma Chemical Co., USA) の6種類の因子 (6F) を加えたDF (DF6F) を用いた. DF6Fに浮遊させた5 x 10<sup>3</sup>個の細胞を16mm径培養皿に加え培養し, 24時間ごとに細胞数をコールターカウンター (Coulter Electronics, Luton Beds, UK) を用いて測定することにより, 7日間の細胞増殖数を比較検討した.

### 4) 培養上清中のFGF様活性の検索

増殖飽和状態の#4mock細胞及び#4senseHBp17細胞をDF6Fで48時間培養

した上清150mlをPBSで平衡化したヘパリンセファロースCL-6Bカラム (Pharmacia, USA) に展開後, 0.65M NaClを含むPBSで洗浄し2MNaClで溶出した. ヘパリンセファロースCL-6Bカラム2MNaCl溶出画分を増殖飽和状態のSwiss3T3細胞に加え培養した. 24時間後,  $1\ \mu\text{Ci}$  [3H]-thymidineを加えさらに1時間培養し, 細胞をPBSで洗浄後, 5%トリクロロ酢酸を加え4時間静置した. 5%トリクロロ酢酸で2回洗浄した後, 1N NaOHで可溶化し, 6N HClで中和した後, 液体シンチレーションカウンター (LKB-1215 RACK-BETA; LKB, Wallac, Finland) にて放射活性を測定した.

#### 5) ノードマウスでの造腫瘍性の判定

$4 \times 10^6$ 個の# 4mockまたは# 4senseHBp17細胞を0.1mlのDFに浮遊させ, 4週齢ノードマウス (Balb/cAJC nu/nu) の皮下に接種し, 経時的に腫瘍の大きさを測定した. 腫瘍体積は以下に示す計算式にて算定した.

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

なおノードマウスを使用した一連の実験は, 広島大学医学部附属動物実験施設で行った.

#### 6) ノードマウス形成腫瘍からの細胞分離

# 4senseHBp17細胞をノードマウスに移植し形成された腫瘍から組織を切除し, 70%エタノールに3秒間,  $5\ \mu\text{g/ml}$ ファンギゾンを含むPBSに1分間浸

漬した。次に腫瘍組織を0.5mm大に細切し、I型コラーゲンコートした60mm径培養皿上で5%CSを含むDFで培養した。組織片より増殖した細胞を0.08%トリプシン及び1.4%EDTAを含むPBSで処理することにより単一細胞を回収し5%CSを含むDFで培養し、再度ヌードマウスに移植した。この過程を数回繰り返すことによって得られた細胞を#4senseHBp17-Tu4細胞、#4senseHBp17-Tu4A細胞及び#4senseHBp17-Tu4B細胞とし実験に用いた。

#### 7) Northern Blot法によるHBp17およびFGF-2mRNA発現の検討

各細胞から抽出したtotal RNA 20 $\mu$ gをホルムアルデヒド変性1%アガロースゲルで泳動後、ナイロンメンブレン (Amersham, Buckinghamshire, England) に転写しスペクトロリンカーXL-1000 (トミー精工, 東京) でUV照射した。メンブレンをプレハイブリダーゼーション溶液 (0.75M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH7.5), 2.5mM EDTA, 100 $\mu$ g/ml 熱変性サケ精子DNA, 50%ホルムアミド, 5 x Denhardt液) で42 $^{\circ}$ C, 4時間プレハイブリダーゼーションを行った。次にランダムプライマー法にて $[^{32}\text{P}]$ 標識したsenseHBp17cDNA, FGF-2cDNAまたは $\beta$ -actin cDNAを含むハイブリダーゼーション溶液 (0.75M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH7.5), 2.5mM EDTA, 50%ホルムアミド, 5 x Denhardt液, 10% 硫酸デキストラン) で42 $^{\circ}$ C, 16時間ハイブリダーゼーションを行った。ハイブリダーゼーション後、メンブレンを0.1% SDSを含む2 x SSC (0.3M NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム) にて55 $^{\circ}$ Cで15分間, 2回洗浄し,

さらに0.1%SDSを含む0.1 x SSCで55℃にて55℃で15分間、2回洗浄した後、バイオ・イメージングアナライザー (BAS-2500; 富士フィルム) で解析した

#### 8) Dot Blot法によるHBp17及びFGF-2の定量

増殖飽和状態の各細胞をPBSで3回洗浄後、DF6Fで48時間培養し、上清を回収した。各細胞をlysis buffer (1% Triton X-100, 0.15M NaCl, Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA, 3mM PMSF) に溶解し、遠心後上清を回収し細胞画分を分離した。培養上清の2M NaClへパリンセファローズ溶出画分または細胞画分をバキュームブロット (BIO-RAD) にてPVDFメンブレン (Millipore, USA) に転写した。5%スキムミルク及び0.05%Tween20を含む0.1M Tris-HCl (pH 7.4) でブロッキングし、第2節 1) で2000倍希釈抗したウサギ抗FGF-2ポリクローナル抗体またはマウス抗HBp17モノクローナル抗体と1時間反応後、それぞれ2000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体または抗マウスIgG抗体を1時間反応させた。PVDFメンブレンをBCIP/NBT Phosphatase Substrate System (Kappel, USA) にて発色し、比色定量した。

#### 第4節 antisenseHBp17 cDNA導入A431細胞の*in vivo*および*in vitro*の増殖能の検討

##### 1) antisenseHBp17発現ベクターの構築

A431 total RNA1  $\mu$ gにランダムヘキサマー及びSuperscript II<sup>TM</sup>逆転写酵素

を加え、42℃、45分反応させてcDNAを合成した。合成したcDNAをtemplateとして、antisenseHBp17発現ベクター作製のためにXba I認識配列を付加した5'末端プライマー（5'-gctctagaatgaagatctgtagcctcacc）とEco RI認識配列を付加した3'末端プライマー（5'-cggaattcttagcatgacgtgtcctgcac）でPCRを行いopen reading frameを含むHBp17を合成した。PCR産物と哺乳動物発現ベクターpCI-neoを制限酵素Eco R IとXba Iで消化した後、DNA Ligation Kitでリガーゼ反応を行った。これをE.coli JM109株に形質転換し100 μg/mlアンピシリン添加LB寒天培地上の形質転換株を選択した。得られた形質転換株からプラスミドを調整しABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いて組み込まれたantisense HBp17遺伝子の塩基配列を確認し、pCI-neo/antisense HBp17として実験に用いた（図2）。

## 2) A431細胞へのantisenseHBp17遺伝子導入

2 x 10<sup>6</sup>個のA431細胞を60mm培養皿で24時間培養後、遺伝子導入用脂質試薬TransFast™ Regent (Promega)を用いたリポフェクトアミン法にて遺伝子導入を行った。その後600 μg/ml G418を含む選択培地で培養し、G418耐性細胞を分離した。A431細胞にpCI-neoまたはpCI-neo/antisenseHBp17が導入された細胞をそれぞれA431mock細胞またはA431antiHBp17細胞とした。

## 3) Western Blot法によるHBp17蛋白発現の検討

各細胞をLaemmliのsample bufferで可溶化し，還元下で15%SDS-ポリアクリドアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）後，PVDFメンブレンに転写した（Laemmli, 1970; Lastick and McConkey, 1976; Towbin et al., 1979）. PVDFメンブレンを5%スキムミルク及び0.05%Tween20を含む0.1M Tris-HCl（pH 7.4）でブロッキング後，2000倍希釈したマウス抗HBp17モノクローナル抗体と一時間室温で反応させた．メンブレンを0.05%Tween20を含む0.1Mトリス緩衝液で洗浄後，4000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体で1時間反応させた．発色にはBCIP/NBT Phosphatase Substrate Systemを用いた．

#### 4) antisense HBp17 遺伝子導入細胞の増殖能の判定

DF6Fに浮遊させた $3 \times 10^3$ 個のA431mock細胞またはA431antiHBp17細胞を16mm径培養皿に加え培養し，24時間ごとに細胞数をコールターカウンターを用いて測定することにより，7日間の細胞増殖を比較検討した．

#### 5) antisense HBp17 遺伝子導入細胞のヌードマウスでの造腫瘍性の判定

$4 \times 10^6$ 個の細胞を0.1mlの無血清培地に浮遊させ，4週齢ヌードマウスの皮下に接種し，経時的に腫瘍の大きさを測定し，腫瘍体積を以下に示す計算式にて算定した．

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

## 第5節 *in vivo* transfectionによる扁平上皮癌組織へのHBp17

### antisense遺伝子導入

#### 1) *in vivo* electroporation法によるHBp17 antisense cDNA導入

1x10<sup>7</sup>個のA431細胞を0.1mlの無血清培地に浮遊させ、4週齢ヌードマウスの背部皮下に接種1週間後、形成された腫瘍にpCI-neo/*antisenseHBp17*あるいはpCI-neoを*in vivo* electroporation法で遺伝子導入した。すなわちヌードマウスをジエチルエーテルで麻酔後、腫瘍中心部に50 μgのpCI-neo/*antisenseHBp17*あるいはpCI-neoを溶解したPBS100 μlを27G注射器で注入した。DNA注入後直ちに、形成腫瘍周辺に電極（明和商事）を挿入しパルス発生装置Electro Square Porator（BTX ECM2001M）にて50V、50msecのスクエアパルスを8回かけた。遺伝子導入後、経時的に腫瘍の大きさを測定した。腫瘍体積は以下に示す計算式にて算定した。

体積 = 1/2 x 長径 x (短径)<sup>2</sup>.

#### 2) ヘマトキシリンおよびエオジン染色

接種後20日目のヌードマウス形成腫瘍から、腫瘍を摘出しホルマリン固定後パラフィン包埋し、ヘマトキシリンおよびエオジン染色を行った。

### 第3章 結果

#### 1) A431細胞でのHBp17とFGF-2の局在

HBp17がA431細胞の培養上清からFGF-2とともに精製されたことから、HBp17がFGF-2を介した細胞のがん化やがんの増殖およびFGF-2の活性化に重要な役割を担っているのではないかと推測された。そこで、A431細胞でのHBp17とFGF-2の局在を間接蛍光抗体法で観察した。

Triton X-100で処理しなかった細胞（-）ではHBp-17、FGF-2とも細胞膜上に局在していた。Triton X-100処理によりpermealizeした細胞（+）は抗HBp-17抗体及び抗FGF-2抗体で細胞質が染色されていた。さらにHBp-17とFGF-2は細胞膜上及び細胞質中ではほぼ同様のパターンで発現していることが観察された（図3）。

#### 2) A431細胞及び#4細胞でのHBp17mRNA発現

扁平上皮癌細胞の増殖能とHBp17発現との関連を検討するため、A431細胞と#4細胞のHBp17遺伝子の発現をNorthern Blotにて解析した。A431細胞はHBp17mRNAを発現しているのに対し、#4細胞ではHBp17mRNAの発現が認められなかった（図4）。

### 3) HBp17 sense cDNA 導入によるA431#4細胞の増殖能の検討

HBp17を発現せず造腫瘍性の欠失したA431由来クローン#4細胞にHBp17sense cDNAを導入しHBp17を発現を誘導することによる#4細胞の増殖能の変化を検討した。HBp17遺伝子が導入された#4senseHBp17細胞は*in vitro*において#4mock細胞に比べ高い増殖能を示し、培養7日目では約2.5倍の増殖細胞数を示した(図5)。

### 4) #4mock細胞および#4senseHBp17細胞の培養上清中のFGF様活性の検討

#4senseHBp17細胞が高い増殖能を示したことから、その培養上清中に自らの増殖を促進させる因子を産生している可能性が考えられた。そこで#4mock細胞及び#4senseHBp17細胞の培養上清から分離されたヘパリン結合画分がSwiss3T3細胞のDNA合成に与える影響について検討した。#4senseHBp17細胞の培養上清のヘパリン結合画分は、#4mock細胞に比べSwiss3T3細胞の $[^3\text{H}]$ -thymidineの取り込みを約10倍促進した(図6)。

### 5) A431#4細胞の造腫瘍性とA431#4形成腫瘍由来細胞株の造腫瘍能の検討

#4senseHBp17細胞がにおいて#4mock細胞に比べ高い*in vitro*増殖能を示したことから、HBp17発現誘導が*in vivo*での増殖能も亢進させている可能性が考えられた。そこで#4senseHBp17細胞及び#4mock細胞をヌードマウスに移植しその造腫瘍性について検討した。#4mock細胞を移植したヌードマウス

では腫瘍形成が認められなかったのに対し，#4senseHBp17細胞では接種後，6日目に腫瘍形成が認められた（図7）．さらに#4senseHBp17細胞をヌードマウスに移植することにより形成された腫瘍組織から組織片培養法によって分離された#4senseHBp17-Tu4，Tu4-AおよびTu4-B細胞は#4senseHBp17細胞に比べ，極めて高い造腫瘍能を示した（図8）．

6) #4senseHBp17，Tu4，Tu4-A及びTu4-B細胞におけるHBp17mRNA及び  
FGF-2mRNA発現

増殖能及び造腫瘍能の亢進とHBp17及びFGF-2遺伝子発現との相関性を検討するため各細胞のHBp17及びFGF-2mRNA発現をNorthern Blotにて解析した．

#4senseHBp17細胞ではHBp17mRNAの発現が認められた．ヌードマウスで極めて高い腫瘍形成を示したTu4，Tu4-AおよびTu4-B細胞では，著明なHBp17mRNA発現の上昇が認められた．これに対しFGF-2のmRNA発現にはいずれの細胞においても差はみられなかった（図9）．

7) #4senseHBp17，Tu4，Tu4-A及びTu4-B細胞におけるHBp17蛋白及び  
FGF-2蛋白発現

#4senseHBp17，Tu4，Tu4-A及びTu4-B細胞の培養上清と細胞内のHBp17蛋白及びFGF-2蛋白をDot Blot法にて定量した．培養上清中のHBp17蛋白発現とFGF-2蛋白の発現は正の相関を示し，HBp17高発現細胞の培養上清中には，

低発現細胞に比べ10倍から30倍のFGF-2が存在していた。しかし、細胞中のFGF-2蛋白量には差は認められなかった（図10）。

#### 8) antisenseHBp17遺伝子導入によるHBp17蛋白の発現抑制

HBp17蛋白発現促進が細胞の増殖能や造腫瘍能を亢進させた。そこでHBp17を発現しているA431細胞にantisense HBp17遺伝子を導入し、HBp17蛋白発現の抑制を行った。antisense HBp17遺伝子導入によるA431細胞のHBp17蛋白発現への影響をWestern Blot法にて検索した。HBp17antisense cDNAが導入された細胞はいずれも、A431細胞およびA431 mock細胞に比べ、HBp17蛋白発現が著明に低下していた（図11）。

#### 9) A431細胞の増殖能に対するHBp17 antisense cDNA導入の影響

HBp17蛋白の発現抑制が扁平上皮癌細胞の増殖に与える影響について検討するため、HBp17蛋白発現が低下したクローンantiHBp17-cl.9, 11, 21, 24, 32の*in vitro*での増殖について解析した。これらの細胞はいずれもA431 mock細胞に比べ増殖が著明に低下し、培養7日目のantiHBp17-cl.9, 11の増殖細胞数はA431 mock細胞の約1/10であった（図12）。

#### 10) A431細胞の造腫瘍性に対するHBp17 antisense cDNA導入の影響

HBp17蛋白発現が低下したantiHBp17-cl.9, 11, 21, 24, 32の*in vivo*での

造腫瘍能について検討したところ、各細胞はいずれもヌードマウスにおいても造腫瘍能の著明な低下が認められた。特に*in vitro*で低い増殖能を示した antiHBp17-cl.9は造腫瘍性を欠失していた（図13）。

#### 1.1) *in vivo* transfectionによるantisenseHBp17遺伝子導入による腫瘍増殖抑制効果

*in vitro*におけるHBp17antisensecDNA導入によりA431細胞は増殖能及び造腫瘍能が著明に低下した。そこでHBp17を分子標的とした扁平上皮癌の遺伝子治療の可能性を探るため、A431細胞をヌードマウス背部皮下に移植することにより形成された扁平上皮癌組織にHBp17antisense cDNAを*in vivo* electroporation法にて導入し、腫瘍増殖に与える影響について検討した。HBp17antisensecDNAを導入した腫瘍はコントロールベクター、pCI-neoが導入された腫瘍に比べ、約50%まで増殖が抑制された（図14）。形成腫瘍を組織学的に検索するとHBp17antisense cDNAが導入された腫瘍には広範な壊死組織が認められた（図15）。

## 第4章 考察

FGFs及びFGFs受容体と癌化との関連を示唆する知見は唾液腺細胞、肝細胞やメラノーマ細胞などの種々の細胞系において確認されている(Herlyn et al., 1987; Rols et al., 1998; Albino et al., 1991). 扁平上皮の悪性化においてもFGF-1やFGF-2発現が亢進することが報告されている. 扁平上皮癌細胞がFGF-1やFGF-2を過剰発現し、細胞外に遊離・分泌することからFGF-1やFGF-2が扁平上皮癌細胞の自律性増殖に重要な役割を担っていると推測されているが、細胞外分泌のためのシグナルペプチドがないため(Abraham et al., 1986; Gospodarowicz et al., 1987; Wang et al., 1989; Schulze et al., 1990), その分泌機構は明らかにされていない(Seno et al., 1998; Soutter et al., 1993).

HBp17はA431細胞の培養上清からFGF活性を分離する際に、ヘパリン親和性画分からFGF-2とともに精製された17kDaの分泌型蛋白で、*in vitro*においてFGF-1やFGF-2と可逆的に結合することから、HBp17がFGF-2の細胞外への遊離・分泌を制御している可能性が推測されている(Yoshimura et al., 1998; Violaine et al., 2000; Rene et al., 2000). HBp17とFGF-2のA431細胞内での発現及び局在について間接蛍光抗体法で検索したところ、HBp17とFGF-2はA431の細胞膜上及び細胞質に発現し、co-localizeしている所見が得られた. このことからHBp17が扁平上皮癌細胞内でFGF-2と結合し細胞外へのFGF-2遊離を調節することにより、扁平上皮癌細胞の増殖に何らかの影響を及ぼして

いる可能性が考えられた。

HBp17発現と細胞増殖の関連を検索するため、A431細胞と増殖能が低く造腫瘍性の欠失したA431由来#4細胞のHBp17遺伝子発現を検討した。その結果、A431細胞ではHBp17mRNAの発現が認められたのに対し、#4細胞はHBp17遺伝子を発現していなかった。さらにA431細胞と#4細胞の増殖能及び造腫瘍能の差異とHBp17発現の関係を明らかにするため、#4細胞でのHBp17発現誘導がその増殖能や造腫瘍性に与える影響について検討した。HBp17遺伝子が導入された#4senseHBp17細胞は増殖能が亢進し、ヌードマウスでの造腫瘍性を獲得した。さらに、#4senseHBp17細胞のヌードマウス形成腫瘍から細胞株を分離し、HBp17の遺伝子及び蛋白発現を検索したところ、HBp17発現と造腫瘍性は極めてよく相関していた。一方、HBp17高発現細胞株である#4senseHBp17やTu4、Tu4-A及びTu4-B細胞は培養上清中には#4mock細胞に比べ10倍から30倍のFGF-2を産生していたが、これら細胞間でのFGF-2遺伝子発現や細胞蛋白中のFGF-2量には明らかな差は認められなかった。すなわちHBp17は扁平上皮癌細胞のFGF-2産生には影響を与えないが、FGF-2の細胞外への遊離・分泌を促進し、その増殖や造腫瘍能を亢進させていると考えられた。

これらの結果から、HBp17発現抑制が扁平上皮癌細胞の増殖能や造腫瘍性を低下させる可能性が考えられた。細胞での遺伝子発現を抑制する方法として標的遺伝子の翻訳開始部位付近の15～20merの配列に相補的なオリゴヌク

レオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド；AS-ODN）の導入や(Perlaky et al., 1993; Croxtall et al., 1994; Kinlaw et al., 1995), 細胞内で標的遺伝子のRNAに相補的なantisense RNAを産生するプラスミドの導入が行われている(al Ramadi et al., 1996; Davidkova et al., 1996; Voisin et al., 1996; Zhou et al., 1996). AS-ODN導入による遺伝子発現抑制は簡便に行えるものの、一過性の遺伝子発現抑制のため細胞株を樹立して行う研究には適していない。本研究ではantisense RNAの発現調節に困難があるものの、一過性ではなく安定した遺伝子の発現抑制細胞株の分離が可能な、プラスミド導入によるHBp17遺伝子発現抑制を行った(Burland et al., 1992; Dabholkar and Reed, 1992; Nickoloff and Reynolds, 1992). 強力なプロモーター下流にアンチセンス方向にHBp17cDNAを組み込んだベクター, pCI-neo/*antisense HBp17*を作製し遺伝子導入を行った。pCI-neo/*antisense HBp17*が導入されたA431細胞は, A431細胞やコントロールベクター, pCI-neoが導入されたA431 mock細胞に比べ著明なHBp17蛋白発現の低下が認められ, HBp17蛋白を発現抑制するためにpCI-neo/*antisense HBp17*導入が効果的であることが確認された。pCI-neo/*antisense HBp17*が導入された細胞株はいずれもA431 mock細胞に比べ細胞増殖が著明に低下し, 一部の細胞株では造腫瘍性を失っていた。このことは扁平上皮癌細胞でのHBp17発現と増殖能及び造腫瘍能が正の相関を示した結果を裏付けるものである。

癌は癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の失活によって発生する疾患であり,

その進展過程においてもさまざまな遺伝子の発現変化が伴うことが明らかにされてきた(Gannon et al., 1990; Lemoine et al., 1990; Owen et al., 1990; Viallet et al., 1990). そのため従来の外科手術, 放射線治療や抗癌剤による化学療法にかわる新しい治療法としてこれら遺伝子を標的とした癌治療法の開発が試みられている(Carew et al., 1998; Gurnani et al., 1999; Liu et al., 1997).

HBp17蛋白発現の抑制が扁平上皮癌細胞の増殖や造腫瘍性を低下させたことから, 腫瘍組織においてHBp17遺伝子発現を抑制することで腫瘍進展を阻止できる可能性が考えられた. そこでHBp17を分子標的にした扁平上皮癌の遺伝子治療の可能性について検討した. A431細胞をヌードマウス皮下に移植し形成された腫瘍にHBp17antisense遺伝子を*in vivo* transfectionし形成腫瘍の増殖抑制効果について解析した. 腫瘍組織に遺伝子導入する方法としてはレトロウイルスやアデノウイルスなどのウイルスベクターを用いた方法が広く行われている(DeMatteo et al., 1995; Bennett et al., 1995; Lieber et al., 1995). これらのウイルスベクターを用いた方法は効率よく腫瘍組織に遺伝子導入を行えるものの感染や発癌の可能性が報告されているため(Chang et al., 1991; Featherstone et al., 1993; Hofmann et al., 1999), 本研究では, より安全に遺伝子導入ができるプラスミドDNAの直接組織内注入を行い, 遺伝子導入効率を向上させるためプラスミドDNA内注入後, 腫瘍組織に電気パルスを加えた(Mir et al., 1999; Muramatsu et al., 1998; Nishi et al., 1996). A431

細胞をヌードマウス皮下に移植し7日目に腫瘍形成が認められた時点で、pCI-neo/*antisense HBp17*を腫瘍組織に導入した。HBp17*antisense* 遺伝子が導入された腫瘍の増殖は、対照群であるpCI-neoが導入された腫瘍に比べ著明に低下し、遺伝子導入2週間目では約50%の増殖抑制を受けていた。遺伝子導入された腫瘍を組織学的に検索したところ、対照群では腫瘍組織全体に扁平上皮癌細胞の増殖がみられたのに対し、HBp17*antisense* 遺伝子が導入された組織は一部に腫瘍細胞の増殖が認められたものの、その中心部に広範な壊死が認められた。

以上の研究結果から、扁平上皮癌細胞とHBp17の関係を以下のように説明することができる。HBp17蛋白は扁平上皮癌細胞内でFGF-2と共存し、FGF-2の細胞外への遊離・分泌を調整し、扁平上皮癌細胞の増殖を制御していると推測された。HBp17高発現細胞がその増殖や造腫瘍性を亢進していたことから、扁平上皮癌組織でのHBp17遺伝子及び蛋白発現を検索することは、その悪性度評価や予後予測を行う上で極めて有用であると考えられる。*in vitro*におけるHBp17*antisense*遺伝子導入は扁平上皮癌細胞におけるHBp17蛋白の産生（発現）と増殖及び造腫瘍能を低下させた。さらに扁平上皮癌組織へのHBp17*antisense*遺伝子の*in vivo* transfectionによっても腫瘍の増殖、進展が強く抑制されたことから、HBp17を分子標的とした扁平上皮癌の遺伝子治療の可能性が強く示唆された。

## 第5章 結語

扁平上皮癌細胞のFGF分泌と増殖にHBp17がいかなる影響を及ぼしているか検討し以下の結果を得た。

1. HBp-17遺伝子導入細胞は、培養上清中への高いFGF-2分泌能を示し、ヌードマウスでの造腫瘍性を獲得した。
2. 扁平上皮癌細胞は造腫瘍能の亢進とともにHBp-17発現が亢進し、それとともにFGF-2分泌能も上昇していた。
3. HBp17アンチセンス遺伝子導入により扁平上皮癌細胞はその増殖と造腫瘍能が抑制された。
4. ニードマウス形成腫瘍はHBp17アンチセンス遺伝子の*in vivo* transfectionにより増殖が抑制された。

## 文献

Abraham, J. A., Whang, J. L., Tumolo, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D. and Fiddes, J. C. 1986. Human basic fibroblast growth factor : Nucleotide sequence and genomic organization. *Embo J.* 5: 2523-2528.

Albino, A. P., Davis, B. M. and Nanus, D. M. 1991. Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation. *Cancer Res.* 51: 4815-4820.

al Ramadi, B.K., T. Nakamura, D. Leitenberg, and A.L. Bothwell. 1996. Deficient expression of p56(lck) in Th2 cells leads to partial TCR signaling and a dysregulation in lymphokine mRNA levels. *J Immunol.* 157:4751-4761.

Baird, A. 1994. Potential mechanisms regulating the extracellular activities of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Mol Reprod Dev.* 39: 43-48.

Bansal, R., M. Kumar, K. Murray, and S.E. Pfeiffer. 1996. Developmental and FGF-2-mediated regulation of syndecans (1-4) and glypican in oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 7: 276-288.

Bennett, M. R., Evan, G. I. and Schwartz, S. M. 1995. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ Res.* 77: 266-273.

Burland, T.G., J. Bailey, L. Adam, M.J. Mukhopadhyay, W.F. Dove, and D. Pallotta. 1992. Transient expression in *Physarum* of a chloramphenicol acetyltransferase gene under the control of actin gene promoters. *Curr Genet.* 21:393-398.

Burgess, W.H. and Maciag, T. 1989. The heparin-binding(fibroblast)growth factor family of proteins. *Ann Rev Biochem.* 58: 575-606.

Carew, J.F., H. Federoff, M. Halterman, D.H. Kraus, H. Savage, P.G. Sacks, S.P. Schantz, J.P. Shah, and Y. Fong. 1998. Efficient gene transfer to human squamous cell carcinomas by the herpes simplex virus type 1 amplicon vector. *Am J Surg.* 176:404-408.

Chang, H. C., Samaniego, F., Nair, B. C., Buonaguro, L. and Ensoli, B. 1997. HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *Aids.* 11: 1421-1431.

Croxtall, J. D. and Flower, R. J. 1994. Antisense oligonucleotides to human lipocortin-1 inhibit glucocorticoid-induced inhibition of A549 cell growth and eicosanoid release. *Biochem Pharmacol.* 48: 1729-1734.

Czubayko, F., Liaudet-Coopman, E. D. E., Aigner, A., Tuveson, A. T., Berchem, G. and Wellstein, A. 1997. A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nat Med.* 3: 1137-1140.

Dabholkar, M., and E. Reed. 1992. Host cell reactivation of cisplatin-damaged plasmid DNA in human non-T leukocyte cell lines. *Cancer Lett.* 63:143-150.

Davidkova, G., S.P. Zhang, R.A. Nichols, and B. Weiss. 1996. Reduced level of calmodulin in PC12 cells induced by stable expression of calmodulin antisense RNA inhibits cell proliferation and induces neurite outgrowth. *Neuroscience.* 75:1003-1019.

DeMatteo, R. P., Raper, S. E., Ahn, M., Fisher, K. J., Burke, C., Radu, A., Widera, G., Claytor, B. R., Barker, C. F. and Markmann, J. F. 1995. Gene transfer to the thymus. A means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus. *Ann Surg.* 222: 229-239.

Dulbecco, R. and Freeman, G. 1959. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* . 8: 396-397.

Eagle, H. 1955. Nutrition needs of mammalian cell in tissue culture. *Science.* 122: 501-504.

Featherstone, C. 1993. Electroporation: an effective technique for drug delivery and gene therapy. *Am Biotechnol Lab.* 11: 16.

Gannon, J. V., Greaves, R., Iggo, R. and Lane, D. P. 1990. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J.* 9: 1595-1602.

Gospodarowicz, D., Jones, K. and Sato, G. H. 1974. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72: 2295-2299.

Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L. and Neufeld, G. 1987. Structural characterization and biological function of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* 8: 95-114.

Gurnani, M., P. Lipari, J. Dell, B. Shi, and L.L. Nielsen. 1999. Adenovirus-mediated p53 gene therapy has greater efficacy when combined with chemotherapy against human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 44:143-151.

Herlyn, M., W.H. Clark, U. Rodeck, M.L. Mancianti, J. Jambrosic, and H. Koprowski. 1987. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest.* 56:461-474.

Hofmann, G. A., Dev, S. B., Nanda, G. S. and Rabussay, D. 1999. Electroporation therapy of solid tumors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 16: 523-569.

Janice, E. B., Jeffrey, E. K., Cheri, S. L. and Gordon, N. G. 1982. Altered epidermal growth factor (EGF)-stimulated protein kinase activity in variant A431 cells with altered growth responses to EGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2574-2578.

Kawasaki, E. S., Clark, S.S., Coyne, M. Y., Smith, S. D., Champlin, R., Witte, O. N. and McCormic, F. P. 1998. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5698-5702.

Kinlaw, W. B., Church, J. L., Harmon, J. and Mariash, C. N. 1995. Direct evidence for a role of the "spot 14" protein in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem.* 270: 16615-16618.

Klagsbrun, M. 1989. The fibroblast growth factor family : structural and biological properties. *Prog. Growth Factor Res.* 1: 207-235.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of a head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lastick, S. M. and McConkey, E. D. 1976. Exchange and stability of HeLa ribosomal proteins in vitro. *J Biol Chem.* 251: 2867-2875.

Lemoine, N. R. and Hall, P. A. 1990. Growth factors and oncogenes in pancreatic cancer. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 4: 815-832.

Lieber, A., Vrancken Peeters, M. J., Meuse, L., Fausto, N., Perkins, J. and Kay, M. A. 1995. Adenovirus-mediated urokinase gene transfer induces liver regeneration and allows for efficient retrovirus transduction of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 6210-6214.

Liu, R., T.D. Oberley, and L.W. Oberley. 1997. Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. *Hum Gene Ther.* 8:585-595.

Mir, L.M., M.F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J.M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz, and D. Scherman. 1999. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4262-4267.

Muramatsu, T., A. Nakamura, and H.M. Park. 1998. In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review). *Int J Mol Med.* 1: 55-62.

Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J. D. and Takada, K. 1994a. Release of fibroblast growth factor-1 by human squamous cell carcinoma correlates with autocrine cell growth. *In Vitro Cell Dev Biol.* 30: 790-795.

Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J. D. and Takada, K. 1994b. Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 23: 451-456.

Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J. D. and Takada, K. 1995c. 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.

Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J. D., Kan, M., Mckeehan, W. L. and Takada, K. 1996d. Expression of fibroblast growth factor-1(FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 in a human salivary-gland adenocarcinoma cell line. : Evidence of autocrine growth. *Int J Cancer* 65: 650-657.

Nickoloff, J.A., and R.J. Reynolds. 1992. Electroporation-mediated gene transfer efficiency is reduced by linear plasmid carrier DNAs. *Anal Biochem.* 205:237-243.

Nishi, T., K. Yoshizato, S. Yamashiro, H. Takeshima, K. Sato, K. Hamada, I. Kitamura, T. Yoshimura, H. Saya, J. Kuratsu, and Y. Ushio. 1996. High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation. *Cancer Res.* 56:1050-1055.

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. 1996a. Androgen-dependent expression of fibroblast growth factor-1 in submaxillary gland of mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 221: 795-802.

Okamoto, T., Tanaka, Y., Kan, M., Sakamoto, A., Takada, K. and Sato, J. D. 1996b. Expression of fibroblast growth factor binding protein HBp17 in normal and tumor cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 32: 69-71.

Owen, T. A., Carter, R., Whitman, M. M., Soprano, D. R. and Soprano, K. J. 1990. Evidence that density-dependent growth arrest is a two-stage process in WI-38 cells. *J Cell Physiol.* 142: 137-148.

Perlaky, L., Saijo, Y., Busch, R. K., Bennett, C. F., Mirabelli, C. K., Crooke, S. T. and Busch, H. 1993. Growth inhibition of human tumor cell lines by antisense oligonucleotides designed to inhibit p120 expression. *Anticancer Drug Des.* 8: 3-14.

Rene, L., Jan, T. R., Laust, B. J., Stig, P., Kristen, S., Torben, E. P. and Christian, W. H. 2000. Structural characterization of the fibroblast growth factor-binding protein purified from bovine prepartum mammary gland secretion. *J Biol Chem.* 275: 19469-19474.

Rols, M.P., C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros, and J. Teissie. 1998. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol.* 16:168-171.

Sato, J. D., Kawamoto, T. and Okamoto, T. 1987. Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8.653 mouse myeloma cells for growth in vitro. *J Exp Med.* 165: 1761-1766.

Schulze, O. K., Risau, W., Vollmer, E. and Sorg, C. 1990. In situ detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies. *Am J Pathol.* 137: 85-92.

Seno, M., A. Masago, A. Nishimura, H. Tada, M. Kosaka, R. Sasada, K. Igarashi, S. Seno, and H. Yamada. 1998. BALB/c 3T3 cells co-expressing FGF-2 and soluble FGF receptor acquire tumorigenicity. *Cytokine.* 10:290-294.

Soutter, A.D., M. Nguyen, H. Watanabe, and J. Folkman. 1993. Basic fibroblast growth factor secreted by an animal tumor is detectable in urine. *Cancer Res.* 53:5297-5299.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.

Viallet, J. and Minna, J. D. 1990. Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2: 225-232.

Violaine, K. H., Christine, M. C., Heinz-Joachim, L., Anton, W. and Anna, T. R. 2000. Mitogen-induced expression of the fibroblast growth factor-binding protein is transcriptionally repressed through a non-canonical E-box element. *J Biol Chem.* 275: 28539-28548.

Violaine, K. H., Christine, M. C., Bebjamin, L. K., Shakeel, A., Anton, W. and Anna, T. R. 2000. Induction of the angiogenic modulator fibroblast growth factor-binding protein by epidermal growth factor is mediated through both MEK/ERK and p38 signal transduction pathways. *J Biol Chem.* 275: 10802-10811.

Voisin, T., A.M. Lorinet, and M. Laburthe. 1996. Partial knockdown of G $\alpha$ i2 protein is sufficient to abolish the coupling of PYY receptors to biological response in renal proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 225:16-21.

Wang, W. P., Lehtoma, K., Verban, M. L., Krishnan, I. and Chiu, I. M. 1989. Cloning of the gene coding for human class 1 heparin-binding growth factor and its expression in fetal tissues. *Mol Cell Biol.* 9: 2387-2395.

Wu, D., Kan, M., Sato, G. H., Okamoto, T. and Sato, J. D. 1991. Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J Biol Chem.* 266: 16778-16785.

Xin-Chang Wang., Jun-Hui Chen., J. W. Crab. and Sato, J. D. 1998. Purification of heparin-binding protein HBp17 and identification of HBp17 heparin binding site. *Bioche Mol Biol Int.* 46: 81-87.

Yoshimura, N., H. Sano, A. Hashiramoto, R. Yamada, H. Nakajima, M. Kondo, and T. Oka. 1998. The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol Immunopathol.* 89:28-34.

Zhou, C., I. Bahner, J.J. Rossi, and D.B. Kohn. 1996. Expression of hammerhead ribozymes by retroviral vectors to inhibit HIV-1 replication: comparison of RNA levels and viral inhibition. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:17-24.

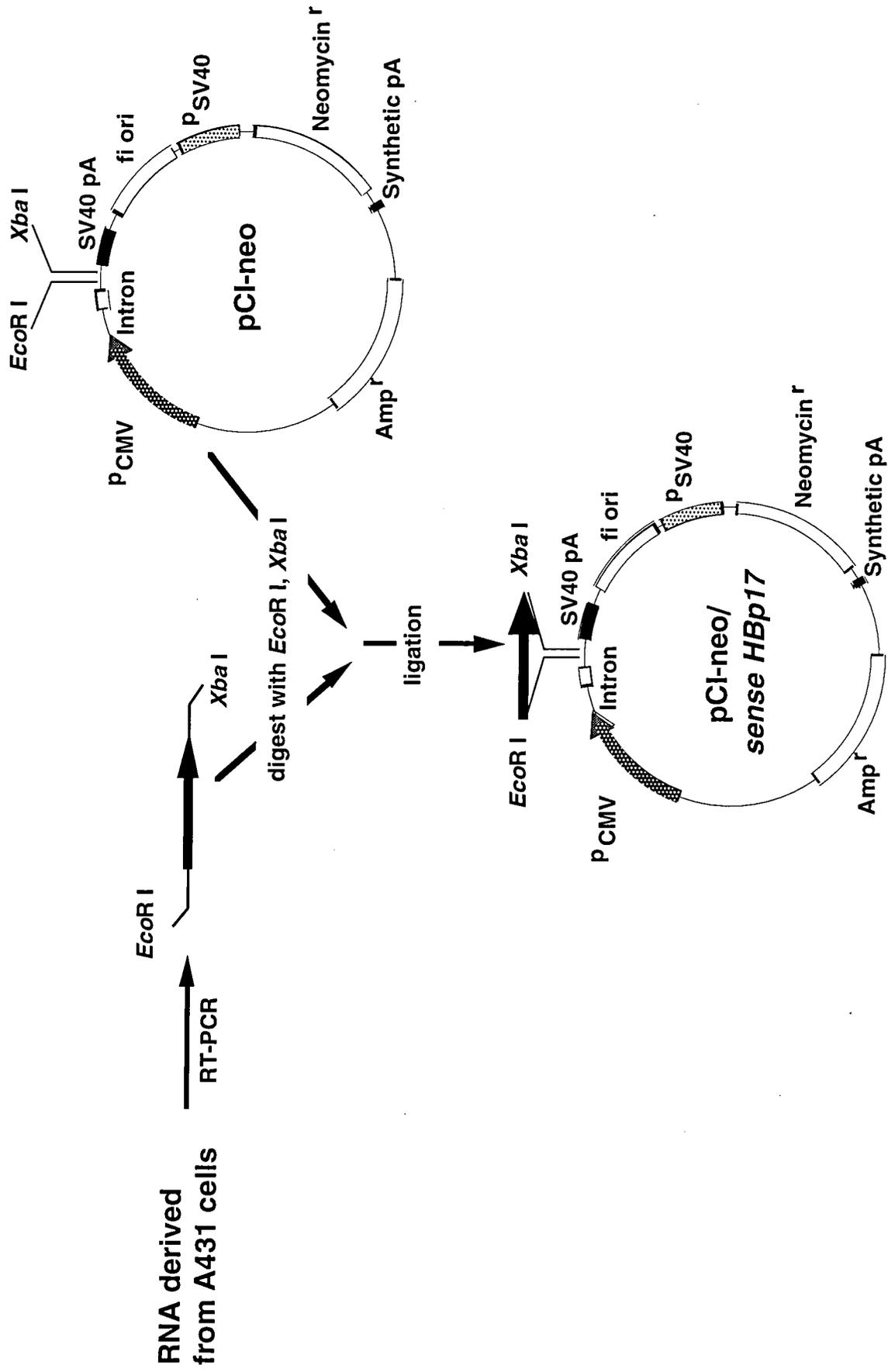


図1 sense HBp17の発現ベクター構築の概略

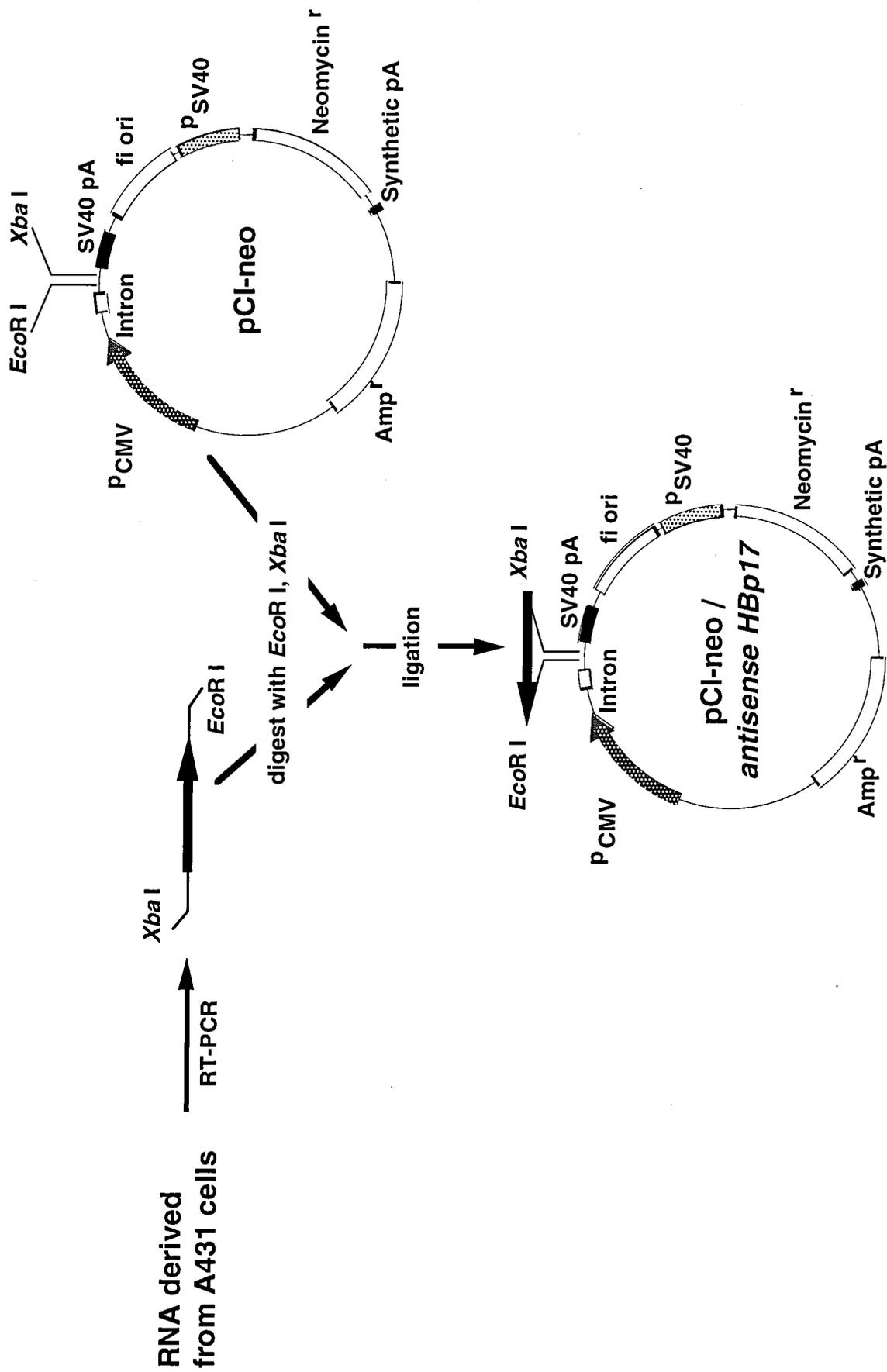


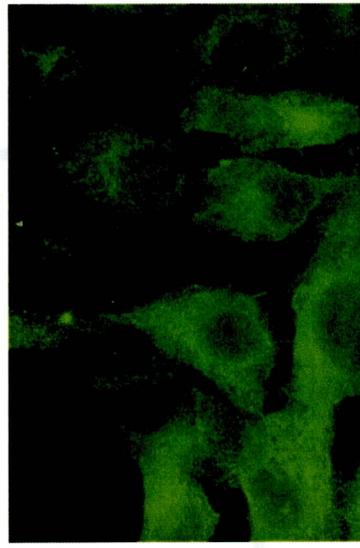
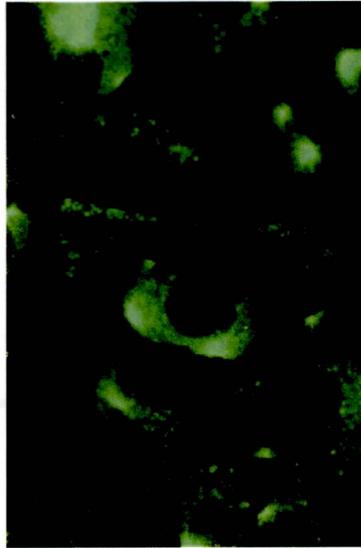
図2 antisense HBp17 の発現ベクター構築の概略

Triton X  
-100

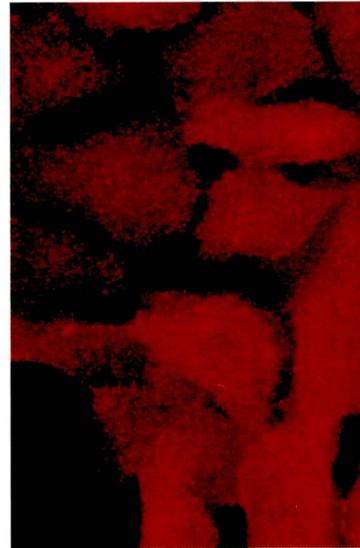
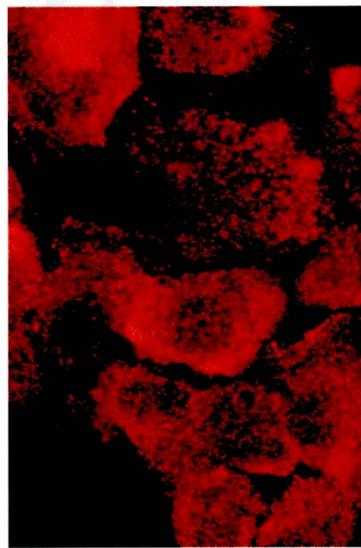
-

+

HBp17



FGF-2



merged

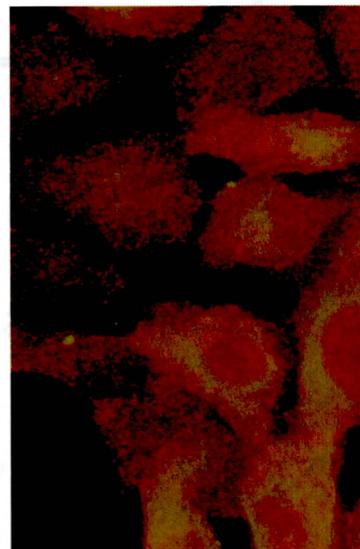
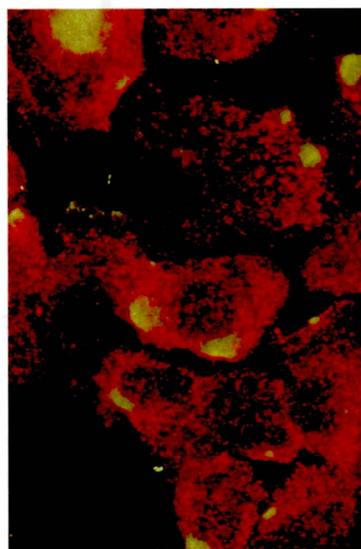


図3 A431細胞におけるHBp17とFGF-2の局在

HBp17とFGF-2は細胞膜上及び細胞質中でほぼ同様のパターンで発現していることが観察された。

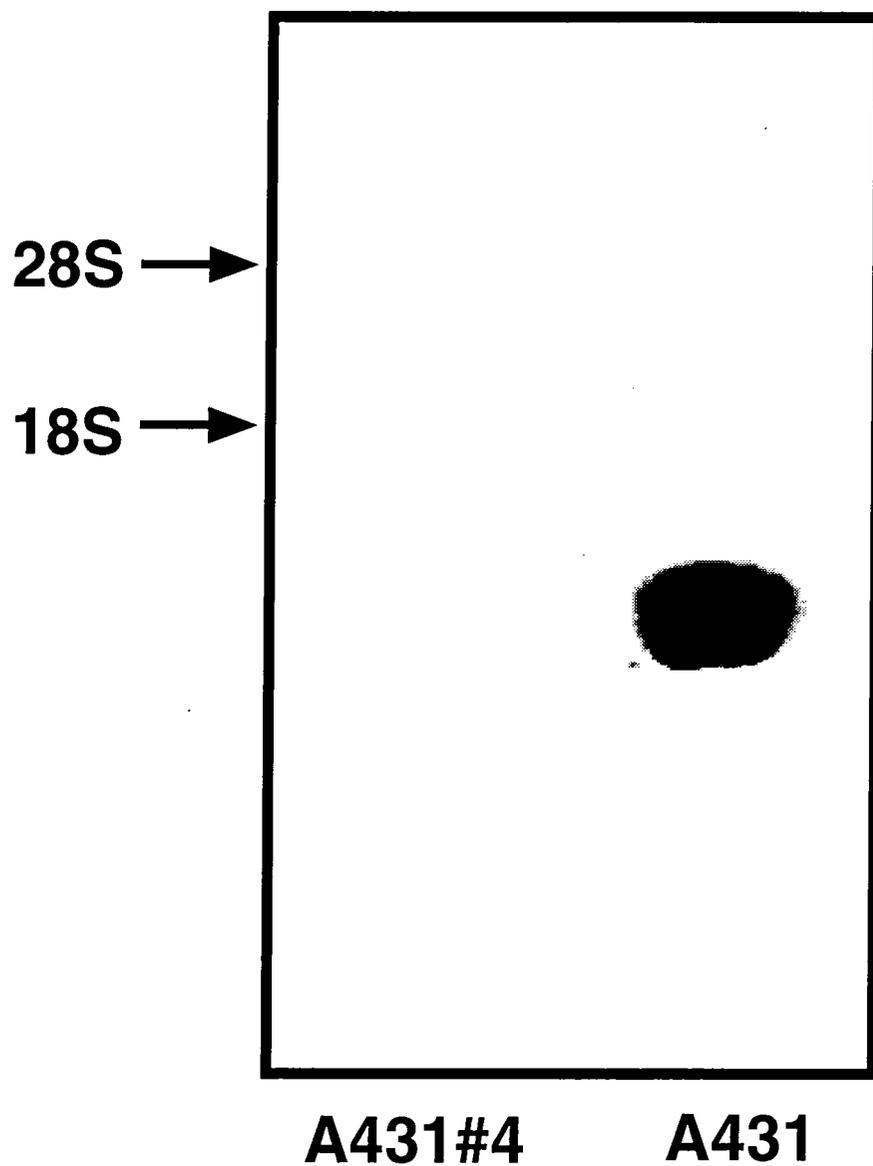


図4 A431#4細胞とA431細胞におけるHBp17mRNA発現の検討

A431#4細胞ではHBp17mRNAの発現が認められなかったが、A431細胞では発現していた。

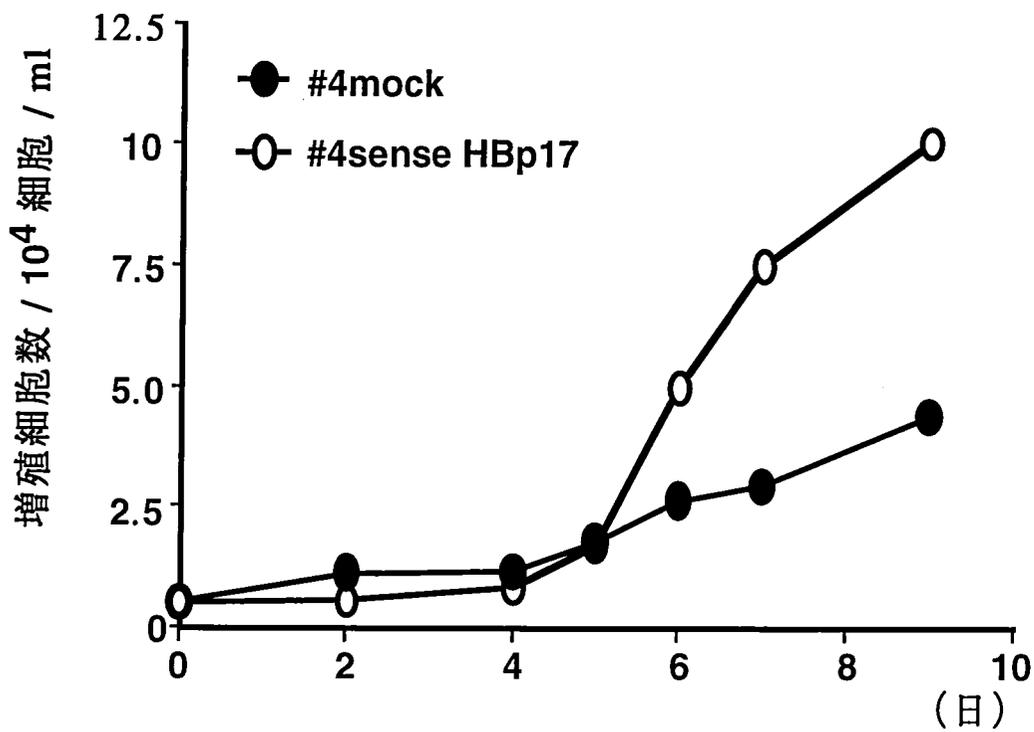


図5 #4mock細胞と#4sense HBp17細胞のin vitroにおける増殖能の検討

DF6Fに浮遊させた $5 \times 10^3$ 個の細胞を16mm径培養皿に加え培養し、経時的に細胞数をコールターカウンターを用いて算定した。

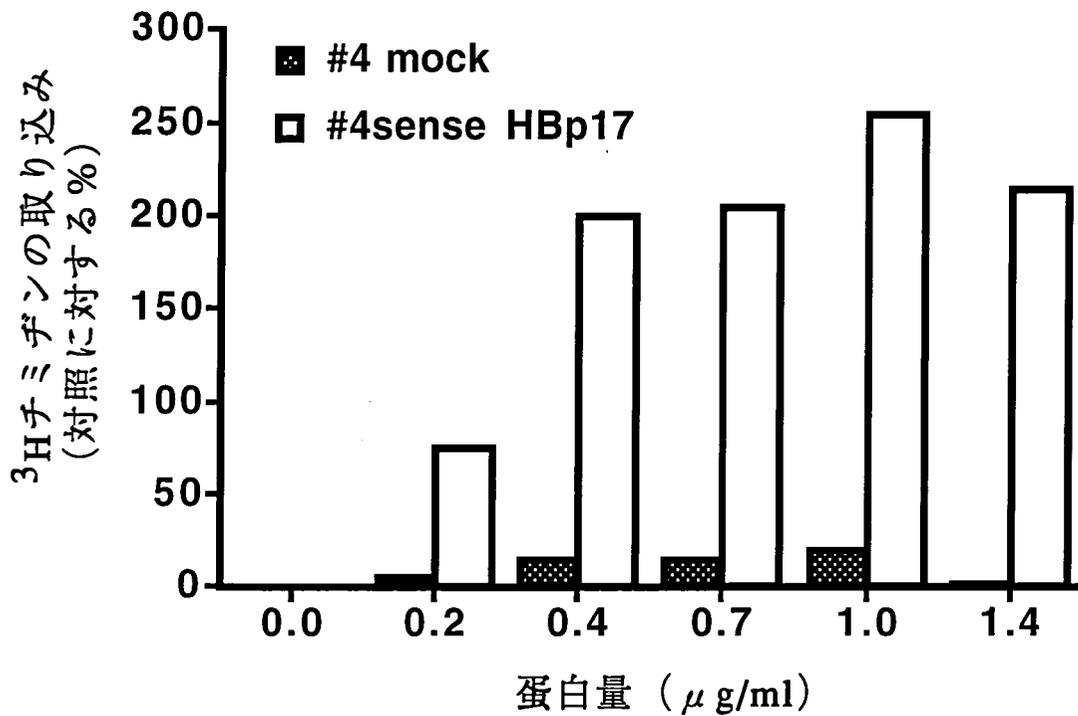


図6 #4mock細胞および#4sense HBp17 R胞の培養上清中のFGF様活性

血清枯渴状態のSwiss3T3細胞に培養上清150mlのヘパリンセファローズ溶出画分を各濃度加え24時間培養した。1 μCi<sup>3</sup>H-thymidineを加えさらに1時間培養し、酸不溶画分への<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みを指標としてFGF様活性を評価した。

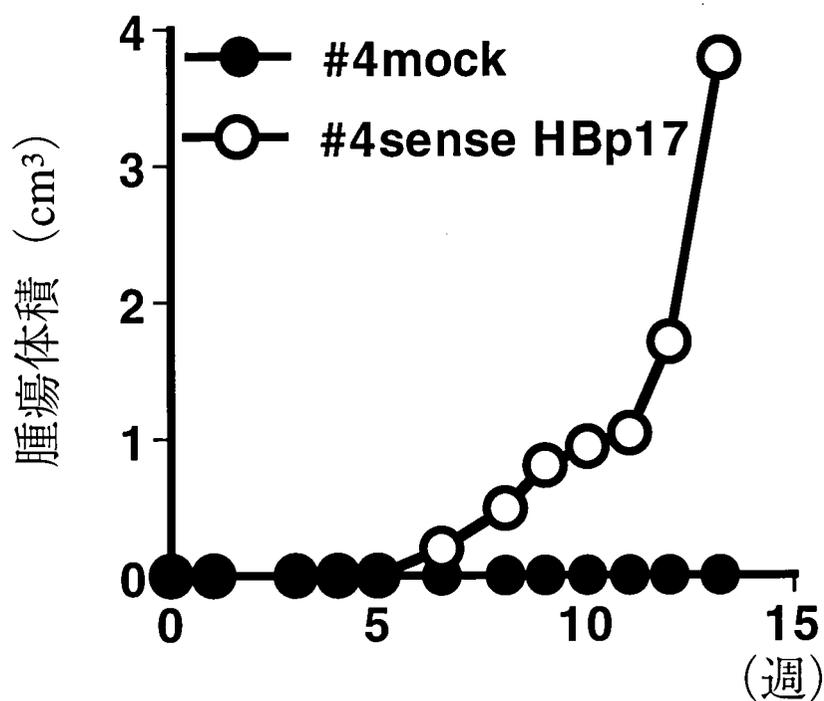


図7 #4mock細胞と#4sense HBp17細胞のヌードマウスにおける増殖能の検討

4X10<sup>6</sup>個の細胞を0.1mlのDFに浮遊させ、4週齢ヌードマウスの皮下に接種し経時的に腫瘍の大きさを測定し、以下の計算式に基づき体積を算定した。

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

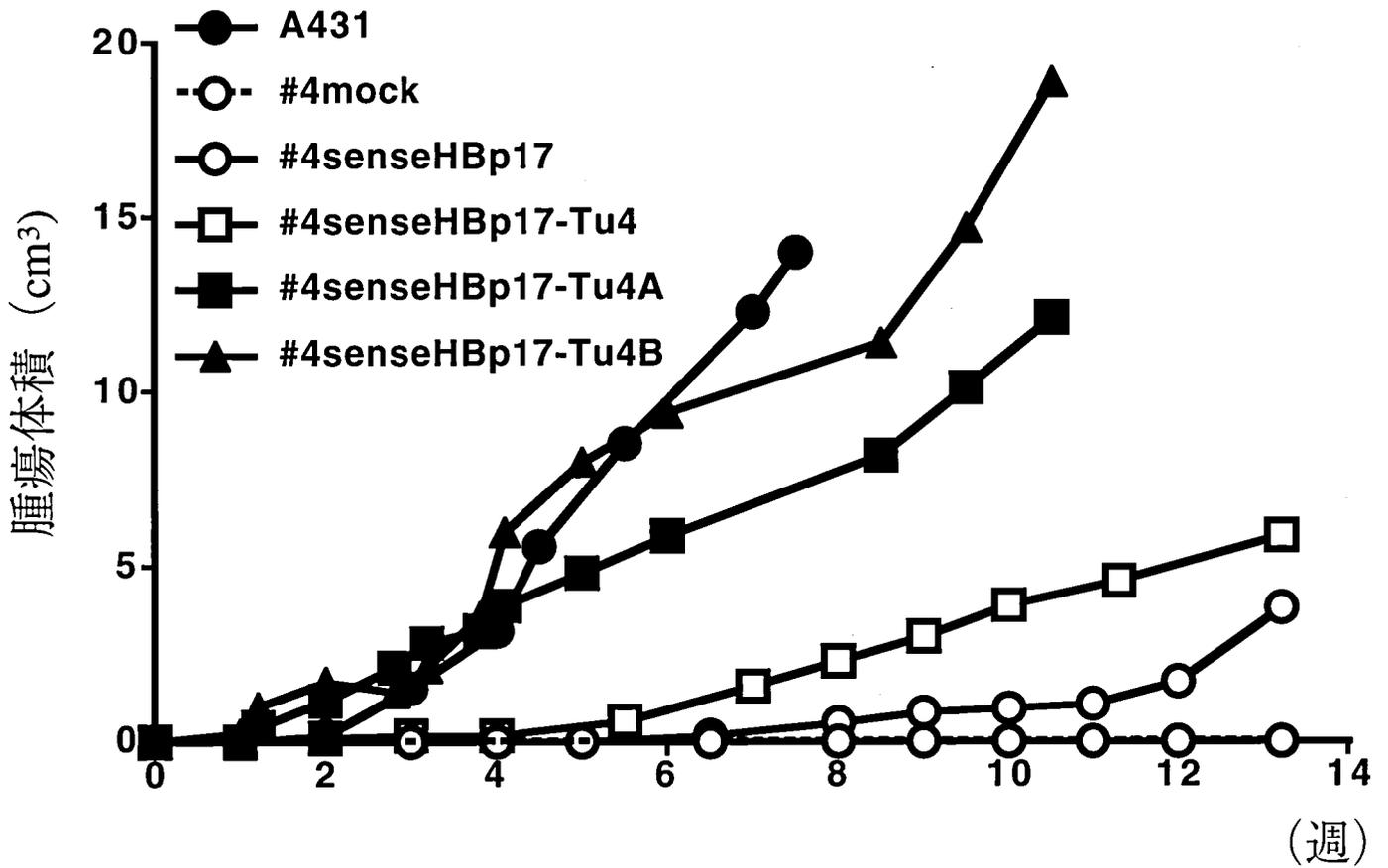
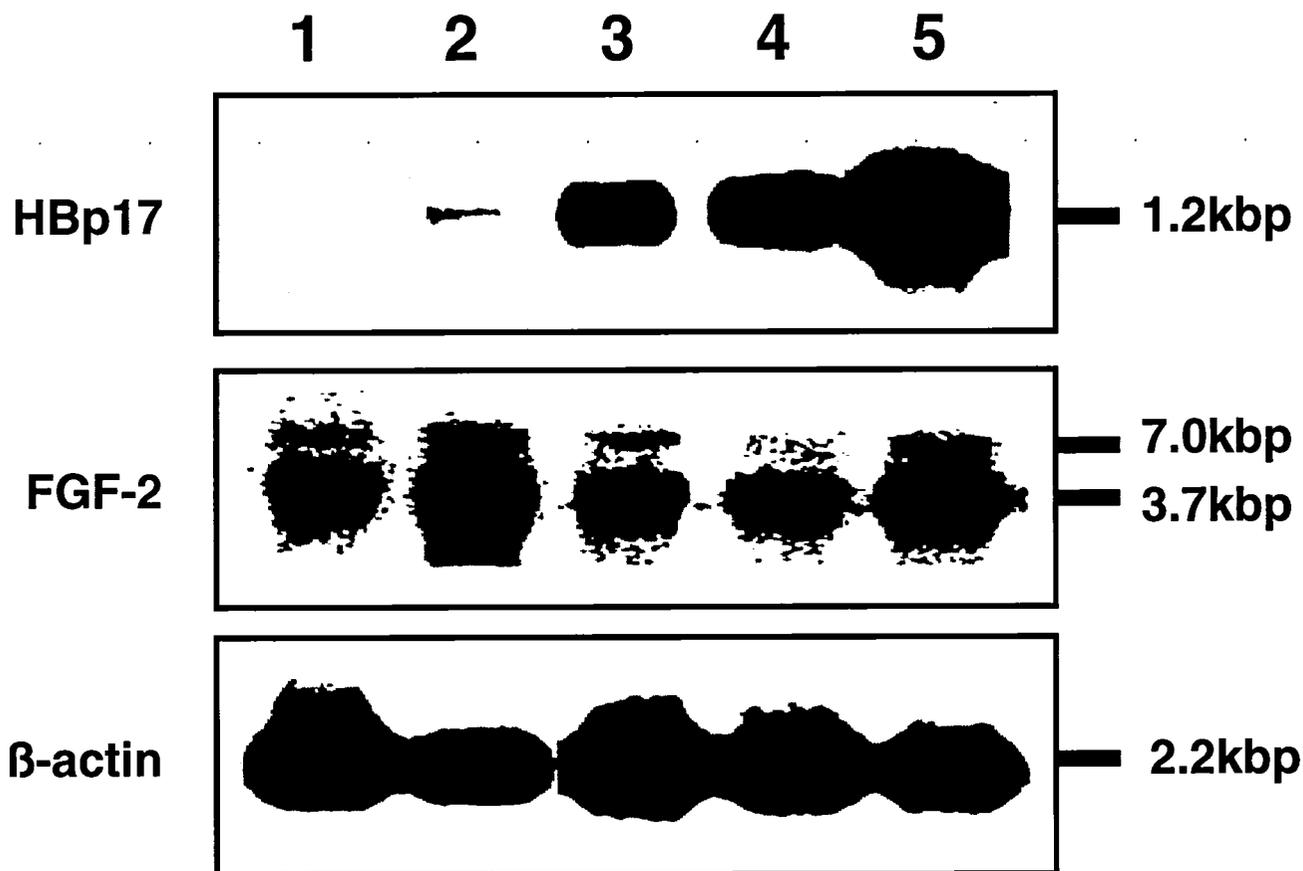


図8 senseHBp17導入A431#4細胞のヌードマウスにおける増殖能の検討

4X10<sup>6</sup>個の細胞を0.1mlのDFに浮遊させ、4週齢ヌードマウスの皮下に接種し経時的に腫瘍の大きさを測定し、腫瘍体積は以下の計算式を用いて算定した。

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

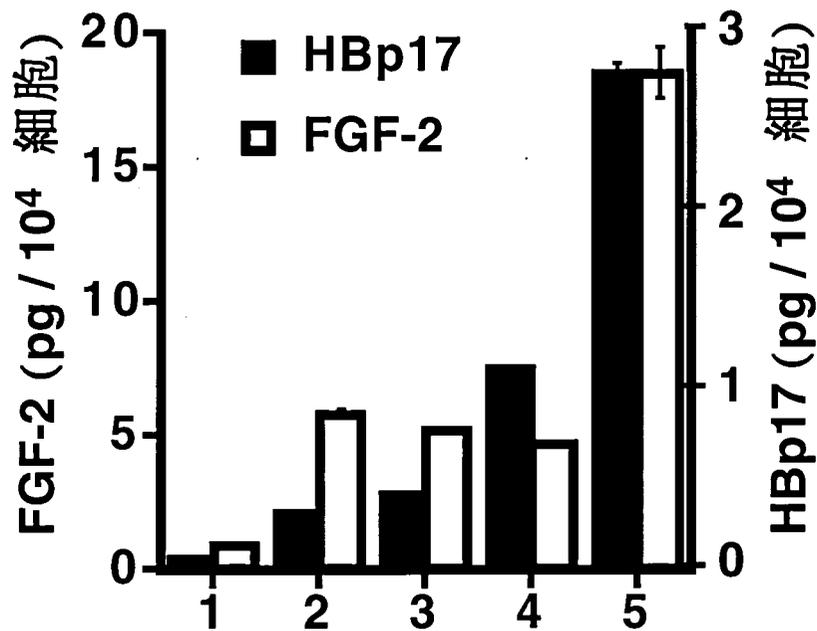


- 1: # 4 mock
- 2: # 4 senseHBp17
- 3: # 4 senseHBp17-Tu4
- 4: # 4 senseHBp17-Tu4A
- 5: # 4 senseHBp17-Tu4B

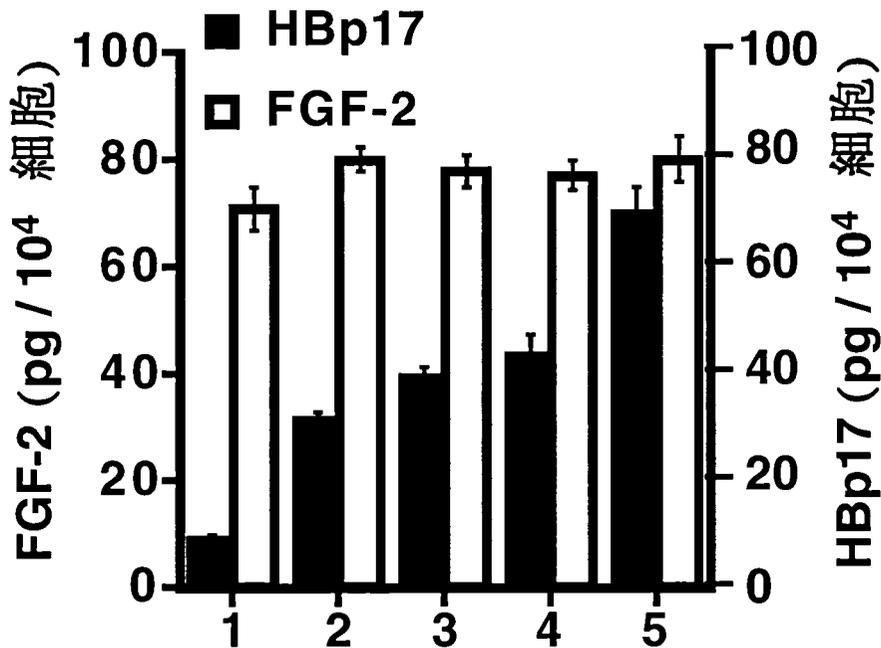
図9 HBp17とFGF-2のmRNA発現の検討

#4senseHBp17細胞ではHBp17mRNAの発現が認められ、さらにヌードマウスで極めて高い腫瘍形成能を示したTu-4,Tu-4AおよびTu-4B細胞では著明なHBp17mRNA発現の上昇が認められた。しかし、FGF-2のmRNA発現はいずれの細胞においても差はみられなかった。

## 1. 培養上清



## 2. 細胞蛋白



1. #4mock

2. #4sense HBp17

3. #4sense HBp17-Tu4

4. #4sense HBp17-Tu4A

5. #4sense HBp17-Tu4B

図10 ドットプロットによる培養上清中および細胞蛋白中のHBp17とFGF-2の定量

培養上清の2MNaClヘパリンセファローズ溶出画分または細胞画分をPVDF膜に転写し，1次抗体および2次抗体で反応させた後，比色定量した．数値は3ウェルの平均値±標準偏差を示す．

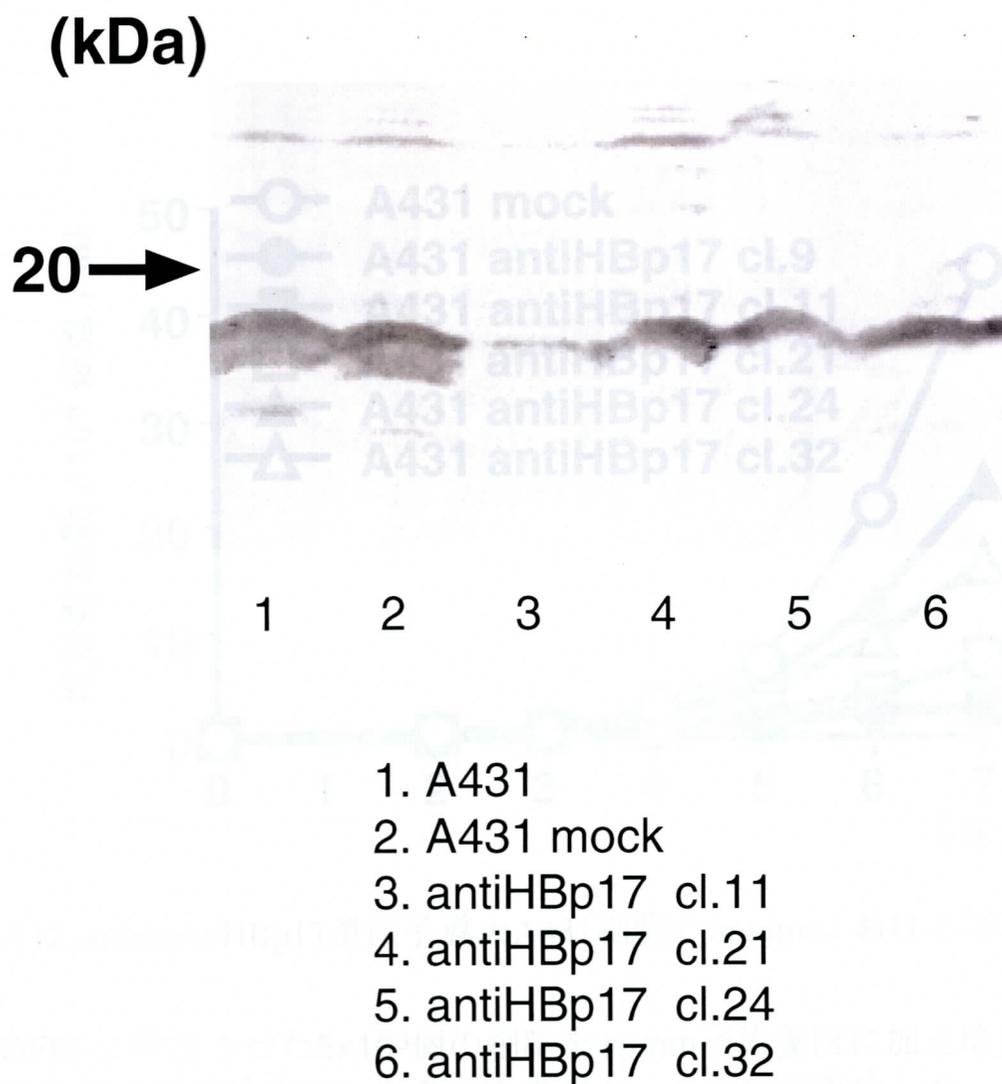


図11 ウェスタンブロッティングによるHBp17蛋白発現の検討

各細胞をLaemmliのsample bufferで可溶化し、還元下で15%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、PVDFメンブランフィルターに転写した。ブロッキング後、1次抗体および2次抗体で反応後、発色させた。

HBp17antisensecDNAが導入された細胞では、A431細胞およびA431 mock細胞に比べ、HBp17蛋白発現が著しく低下していた。

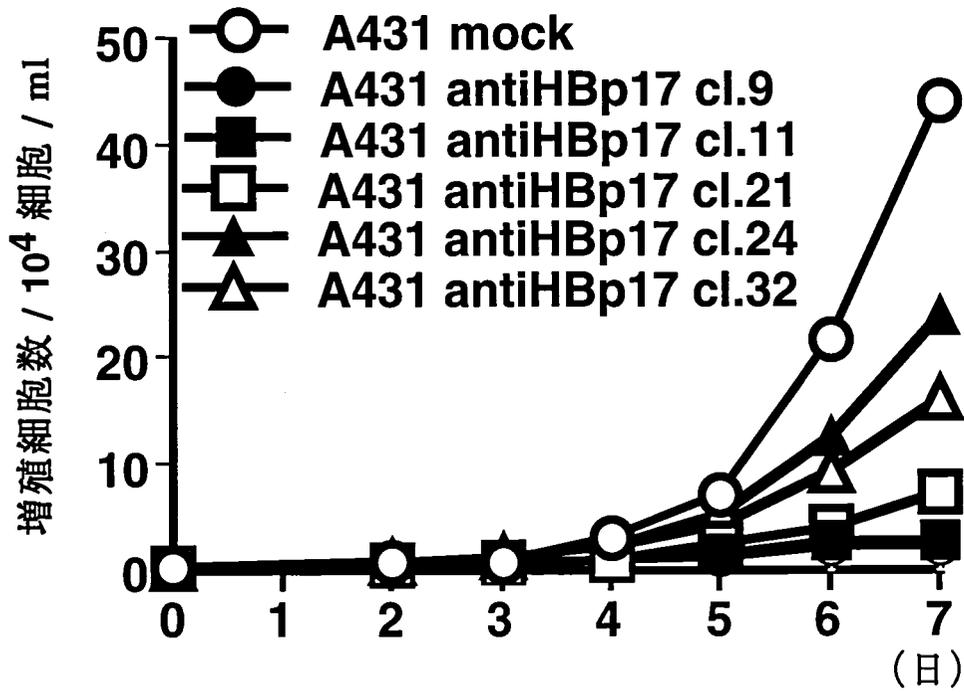


図12 antisense HBp17遺伝子導入A431細胞の*in vitro*における増殖能の検討

DF6Fに浮遊させた $5 \times 10^3$ 個の細胞を16mm径培養皿に加え培養し、経時的に細胞数をコールターカウンターを用いて算定した。数値は3ウェルの平均値±標準偏差を示す。

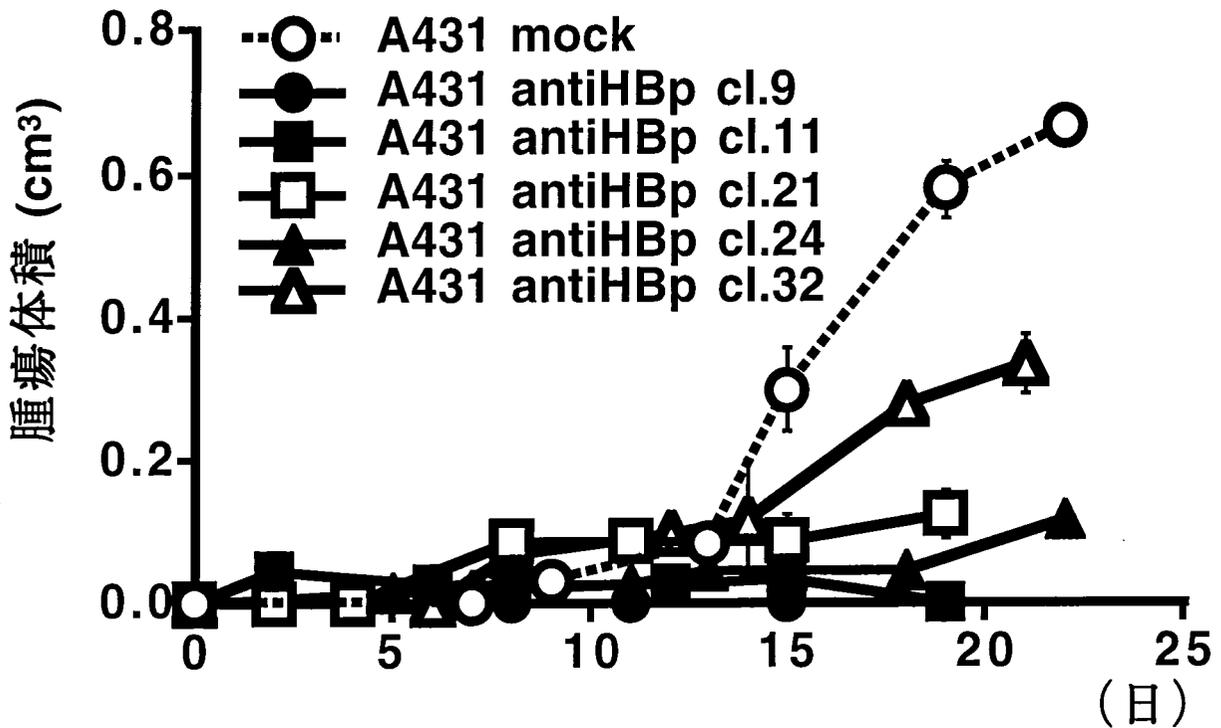


図13 antisense HBp17導入A431細胞の*in vivo*における増殖能の検討

4X10<sup>6</sup>個の細胞を0.1mlのDFに浮遊させ、4週齢ヌードマウスの皮下に接種し経時的に腫瘍の大きさを測定し、腫瘍体積は以下に示す計算式にて算定した。腫瘍体積 = 1/2 X 長径 X (短径)<sup>2</sup>  
 数値はマウス3匹の平均値±標準偏差を示す。

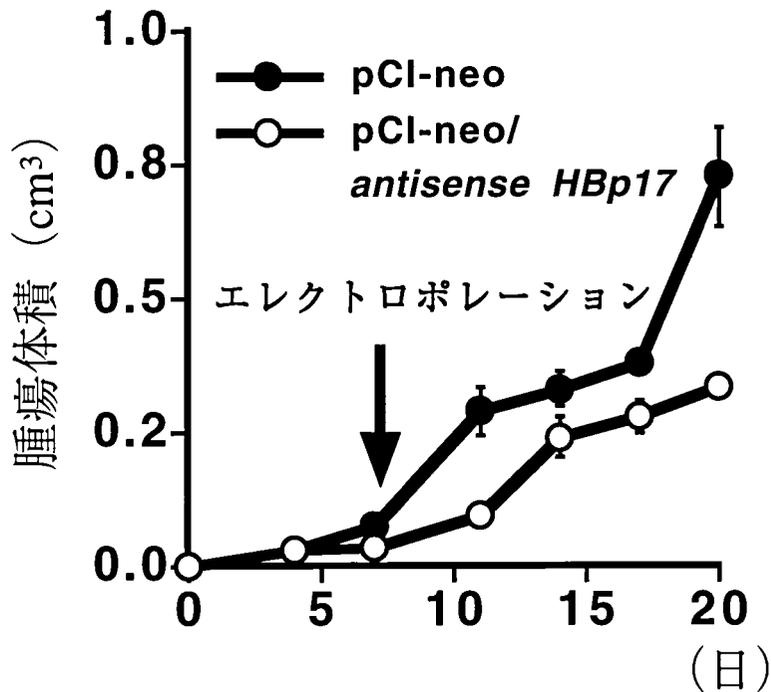
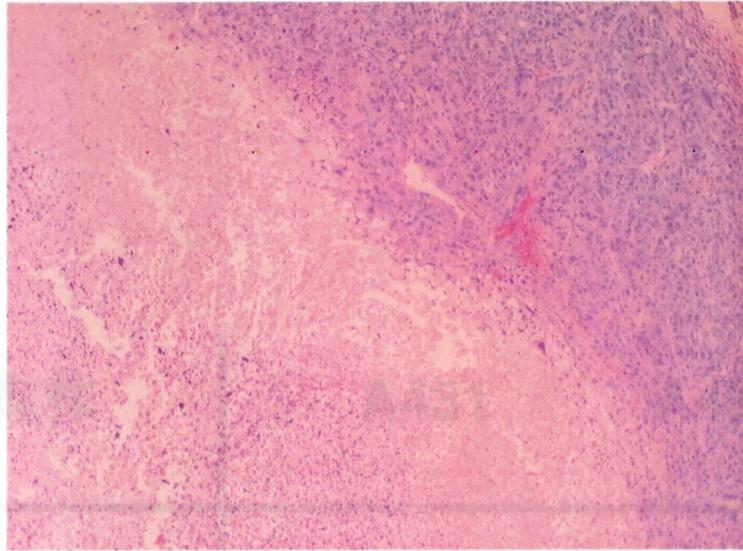
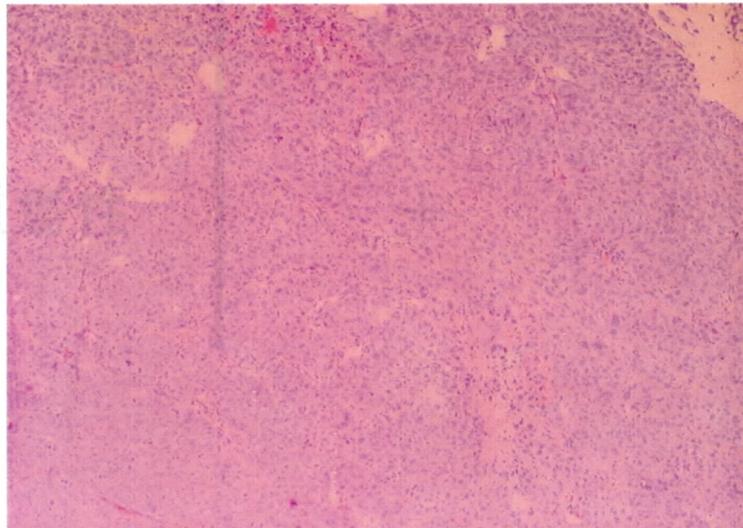


図14 antisenseHBp17遺伝子直接導入によるヌードマウス移植腫瘍の増殖に及ぼす影響

1X10<sup>7</sup>個のA431細胞を4週齢ヌードマウス背部皮下に接種1週間後、形成された腫瘍にpCI-neo/antisense HBp17あるいはpCI-neoを *in vivo* electroporation法で遺伝子導入した。遺伝子導入後、経時的に腫瘍の大きさを測定し、腫瘍体積は以下に示す計算式にて算定した。腫瘍体積 = 1/2 X 長径 X (短径)<sup>2</sup>  
 数値はマウス3匹の平均値±標準偏差を示す。



**pCI-neo/antisense HBp17 導入腫瘍**



**pCI-neo 導入腫瘍**

図15 ヘマトキシリンおよびキシリン染色による組織像の検討

pCI-neo/antisense HBp17が導入された腫瘍には、広範な壊死組織が認められた。

| 細胞株  | A431 | A431 #4 |
|------|------|---------|
| 増殖能  | 高    | 低       |
| 造腫瘍性 | +    | -       |

表1 A431細胞とA431#4細胞の特徴