

日本財団補助金による

1998 年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1998 年 10 月 21 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 張 雁
研究機関 石島大学歯学部口腔外科 I 研究指導者 岡本雄治 職名 教授
所在地 〒734-8553 石島市南正親 1-2-3 電話 082-257-5667 内線 _____

研究テーマ 野生型 KGF 受容体遺伝子導入によるヒト唾液腺由来腺癌細胞の分化誘

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

1. 悪性唾液腺腫瘍に対する遺伝子治療の基礎的研究
第52回 口腔科学会総会, 松山, 平成10年4月16日-17日
2. wild type KGF 遺伝子導入によるヒト唾液腺由来腺癌細胞の増殖制御
第57回 日本癌学会, 横浜, 平成10年9月30日-10月2日
3. 野生型 KGF 受容体導入によるアポトーシス誘導
第43回 口腔外科学会, 松本, 平成10年10月7日-8日

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

今後の研究：

野生型KGF受容体及びドミナントネガティブFGFR1(IIIc)遺伝子を唾液腺腺癌細胞にco-transfection後、neomycin及びzeocin耐性細胞を選択する。続いて、in vitro及びin vivoにおける分化能を検討し、唾液腺腫瘍におけるFGFR1およびKGFの機能を明らかにするとともに、ヌードマウス移植腫瘍に野生型KGF受容体遺伝子をex vivoの系で遺伝子導入しその増殖、分化に及ぼす影響を検討し、最終的には唾液腺腺癌の遺伝子分化誘導療法への応用の可能性を探究する。

指導者の意見：



正常唾液腺上皮細胞の増殖・分化は間葉系組織が産生するKGFにより制御されているが、悪性化に伴いその間葉依存性は消失し、自己の産生するFGF-2と自己の発現するFGF-2受容体であるFGFR1受容体によりオートクリン機構により増殖が可能となる。したがって、野生型KGF受容体遺伝子を腫瘍細胞に導入することにより、悪性化にともない消失した腫瘍細胞の間葉依存性を回復し、間葉系が発現・産生するKGFによる分化誘導を期待するものである。現在までのところ、野生型KGF受容体遺伝子導入唾液腺由来腺癌細胞は、in vitroにおいてはその増殖能を失いKGFによりapoptosisが誘導されること、さらに、ヌードマウス背部皮下移植により、in vivoにおいても造腫瘍性は低下し組織学的に分化像を認め、一部の導入細胞は造腫瘍性を失うことを明らかにしている。

本研究は悪性腫瘍の成立を、上皮-間葉相互作用の消失ととらえ、それを回復することにより悪性腫瘍の分化誘導遺伝子療法を目指したものであり独創性は非常に高い。

張 雁

中国での所属、役職：中国広州南方医院口腔外科学 助手

日本での指導者：岡本哲治 広島大学歯学部口腔外科学第1講座 教授

要旨：唾液腺はその正常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造を示す。唾液腺腫瘍は2つのステージに分類され、初期においては多形性腺腫に代表される多分化能を持った比較的増殖の遅い腫瘍であり、後期においては腺様嚢胞癌に代表される未分化で増殖能や転移能の高い悪性度の非常に高い腫瘍である。

我々は、唾液腺腫瘍の悪性転換過程に、腫瘍細胞におけるFGF-2の発現異常および過剰発現が伴うこと、さらに、悪性化に伴い、唾液腺のstroma組織が発現するFGF-7/KGFの受容体遺伝子FGFR2(IIIb)の発現が消失し、正常唾液腺上皮細胞では発現していないFGF-2をリガンドとするFGFR1(IIIc)遺伝子が発現してくることを明らかにした。したがって、正常唾液腺においては、上皮細胞と間葉系細胞はKGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系を介して互いに依存しあってその増殖、分化と機能を維持しているが、腺癌細胞は間葉系組織とはまったく独立して自己増殖することが可能となりその悪性化が強く裏付けられた。これらの結果は、FGF-2-FGFR1系シグナルがヒト唾液腺腫瘍の悪性化深く関与している可能性を示唆していると共に、KGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系シグナルが唾液腺上皮の正常分化の維持に重要な働きをしていることを示唆している。

本研究においては、チロシンキナーゼ領域を欠失したドミナントネガティブ型FGFR1遺伝子(dnFGFR1)を唾液腺腺癌細胞に発現させることによりFGF-2-FGFR1系によるオートクリンループを遮断すると共に、KGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系シグナルが唾液腺上皮の正常な分化能の維持に重要な働きをしているという仮説に基づき、野生型(wt)KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子をFGFR1(IIIc)発現唾液腺由来腺癌細胞に導入することにより、in vitro およびin vivoにおいて唾液腺由来腺癌細胞の分化を誘導する、唾液腺腺癌の遺伝子分化誘導療法を目指すことを目的とする。

本研究の特色は、唾液腺腫瘍の悪性転換過程を、上皮系細胞の間葉系細胞へのKGF-KGF受容体系を介したによる依存性から、FGF-2-FGFR1系へのスイッチによる間葉系細胞からの独立ととらえた点である。そして、逸脱した癌細胞の自己増殖性をdnFGFR1の導入により抑制し、さらに、KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子導入により間葉依存性細胞へ回復することにより、癌細胞の分化を誘導する遺伝子療法を目指すものである。本治療法が有効になれば唾液腺腫瘍だけでなく他の腫瘍の治療への応用が可能となる。

Key Words: fibroblast growth factor(FGF); FGF receptor(FGFR) ; human normal salivary gland ; adenocarcinoma; differentiation; apoptosis; signal transduction

研究報告

目的：我々は、正常ヒト唾液腺上皮細胞のin vitroにおける増殖およびコラーゲンゲル内培養系における管腔形成にFGF-1あるいはFGF-7/KGFが必須であることを明らかにした(1, 2)。さらに、唾液腺腫瘍の悪性転換過程において、腫瘍細胞におけるFGF-2の発現異常および過剰発現が伴うこと(3, 4)、さらに、唾液腺の間葉系細胞が発現するFGF-7/KGFの受容体遺伝子FGFR2(IIIb)/KGFRの腫瘍細胞における発現が消失し、正常唾液腺上皮細胞では発現していないFGF-2の受容体遺伝子であるFGFR1(IIIc)遺伝子が発現してくることを報告した(5, 6)。したがって、正常唾液腺においては、上皮細胞と間葉系細胞はKGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系を介して互いに依存しあってその増殖、分化と機能を維

持っているが、腺癌細胞は間葉系組織とはまったく独立して自己増殖することが可能となりその悪性化が強く裏付けられた。これらの結果は、FGF-2-FGFR1系シグナルがヒト唾液腺腫瘍の悪性化に深く関与している可能性を示唆していると共に、KGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系シグナルが唾液腺上皮の正常分化の維持に重要な働きをしていることを示唆している。

本研究においては、チロシンキナーゼ活性を欠失したドミナントネガティブ型FGFR1(IIIc)遺伝子(dnFGFR1(IIIc))を唾液腺腺癌細胞に発現させることによりFGF-2-FGFR1系によるオートクリンループを遮断すると共に、KGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系シグナルが唾液腺上皮の正常な分化能の維持に重要な働きをしているという仮説に基づき、wild-type(wt)KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子を唾液腺腺癌細胞に導入して、*in vitro* および*in vivo*において唾液腺由来腺癌細胞の分化を誘導する唾液腺腺癌の遺伝子分化誘導療法を目指した。

方法：dnFGFR1(IIIc)遺伝子はpcDNA1/neo vectorを用いて、wild-type(wt)KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子はpcDNA 3.1/Zeo mammalian expression vectorを用いて、リポフェクション法にて唾液腺由来腺癌細胞HSYに導入した。Neomycin およびZeocin耐性細胞をそれぞれ選択後、125I-FGF-2および125I-KGFを用いて高発現細胞をクローニングすることにより、dnFGFR1(IIIc)過剰発現HSY細胞dnHSYR1(IIIc) およびwtKGFR過剰発現HSY細胞HSYR2(IIIb)を得た。対照として、pcDNA1/neoおよびpcDNA 3.1/Zeo vectorのみを導入したNeomycin およびZeocin耐性HSY細胞をいた。つぎに、これら細胞の*in vitro*における増殖能、FGF-1,-2およびKGFに対する反応性をRD培地にinsulin, transferrin, 2-ethanolamine, 2-mercaptoethanol, sodium seleniteを加えた無血清培地(RD5F)で検討すると共に、*in vivo*における増殖能、造腫瘍性についてBALB/cヌードマウス背部皮下移植系を用いて検討した。そして、dnFGFR1(IIIc)および(wt)KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子導入により、分化マーカーであるアミラーゼを検討すると共に、FGF-2-FGFR1系とKGF-FGFR2系のシグナル伝達経路およびアポトーシスシグナル下流のカスパーゼ活性を検討した。

結果：

HSY細胞にdnFGFR1(IIIc)遺伝子およびwtKGFR/FGFR2(IIIb)を発現させ、dnHSYR1(IIIc)及びwtHSYR2(IIIb)のクローンを得た。dnHSYR1(IIIc)とwtHSYR2(IIIb)細胞は無血清培地では増殖できず、dnHSYR1(IIIc)細胞はFGF-1及びFGF-2により増殖促進されなかった。wtHSYR2(IIIb)細胞はFGF-1により増殖促進されたが、FGF-2及びKGFにより増殖促進されなかった。dnHSYR1(IIIc)及びwtHSYR2(IIIb)細胞のヌードマウス背部皮下における増殖能はコントロールと比較して低下し、さらに、一部のクローンは造腫瘍性は消失した、組織学的には分化像を認めた。親HSY細胞及びwtHSYR2(IIIb)細胞における、アミラーゼのmRNA量を測定した。その結果、wtHSYR2(IIIb)細胞においてアミラーゼmRNAおよび蛋白質が高発現されていることが明らかになった。

また、KGF処理したwtHSYR2(IIIb)細胞では、位相差顕微鏡下、HE染色およびTUNELにおいて、アポトーシスを示唆する所見が認められた。さらに、DNAを抽出し、電気泳動を行ったところ、DNAの断片化を示すladder formationが認められた。カスパーゼの1つであるCPP32をCaspase activity assayおよび免疫蛍光染色法で検討した。その結果、CPP32の高い活性が認められた。

シグナル伝達経路について、KGF-FGFR系とFGF-2-FGFR1(IIIc)系シグナルの伝達経路は異なった。FGFR1は、FGFsの結合を受けて二量体化し、チロシンキナーゼ活性が上昇し、FRS2(FGF receptor substrate)/SNT/SLP-Grb2-SHCのシグナリングコンプレックス形成、リン酸化続いて、ERK型のMAPKが活性化されるという報告がなされている。ところが、本研究では、親HSY細胞における、FRS2及びSHCのリン酸化認められたが、wtHSYR2(IIIb)細胞における、FRS2及びSHC(P66 Isoform)のリン酸化は認められなかった。

考察：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し、FGF受容体のホモダイマーあるいはヘテロダイマー形成により、TK1領域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。

唾液腺腫瘍の悪性化に伴い、FGFR2(IIIb)遺伝子の発現の消失とFGFR1 (IIIc) 及びFGFR4遺伝子の発現が生じていることが明らかとなった。本研究では、TK1に25bpのインサートをHSY細胞に導入し、frameshift mutation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。wt KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子をHSY細胞に導入すると、FRS2及びSHCのリン酸化活性は抑制され、Ras経路やMAPキナーゼなどのシグナル伝達が遮断された。さらに、SHC-Grb2コンプレックスの形成、リン酸化は悪性転換に必須で(8)、HSY2(IIIb)細胞におけるSHCリン酸化過程が阻害されることにより、唾液腺腫瘍の悪性形質転換をある程度に遮断出来る可能性が考えられる。したがって、ドミナントネガティブFGFR1 (IIIc) およびwt KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子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、アポトーシスは、さまざまな生物にとって必要不可欠な生命現象である。アポトーシスに特異的なシグナル伝達分子もいくつか同定されるに至った。実行段階ではいずれも共通なシグナル伝達経路を介する、この経路ではカスパーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素群が順次活性化され、最終的に多数の基質タンパク質を切断することが共通にみられる(7)。wt KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子導入により、ERK1, 2型のMAPKとは異なるJNK/MKK4型のMAPKおよびP38 MAPKが活性化され、CPP32の活性化を誘導し、アポトーシスを引き起こすの可能性が考えられる(9)。

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と考えられる。今回の研究結果から、唾液腺腫瘍の悪性転換過程を、上皮系細胞の間葉系細胞へのKGF-KGF受容体系を介した依存性から、FGF-2-FGFR1系へのスイッチによる間葉系細胞からの独立ととらえた点である。そして、逸脱した癌細胞の自己増殖性をdnFGFR1の導入により抑制し、さらに、KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子導入により間葉依存性細胞へ回復させることにより癌細胞の分化を誘導する遺伝子治療法の可能性が示唆された。本治療法は唾液腺腫瘍だけでなく他の悪性腫瘍の治療への応用が可能となる。

参考文献：

1. Myoken, Y., et al. 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. Devel. Biol.*, 31:84-86, 1995.
2. Okamoto, T., et al. Androgen-dependent expression of fibroblast growth factor-1 in submandibular gland of mouse. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 221:795-802, 1996.
3. Myoken, Y., et al. Expression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor in a human salivary gland adenocarcinoma cell line, evidence of autocrine growth. *Int. J. Cancer*, 65:652-657, 1996.
4. Myoken, Y., et al. Immunohistochemical study of overexpression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 in human malignant salivary gland tumors. *J. Pathology*, 178: 429-436, 1996.
5. Myoken, Y., et al. Immunohistochemical location of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 (FGFR-1) in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Oral Pathol. Med.*, 26:17-22, 1997.
6. Okamoto, T., et al. Expression of fibroblast growth factor binding protein HBp17 in normal and tumor cells. *In Vitro Cell. Devel. Biol.*, 32:69-71, 1996.
7. Allen, R.T., et al. Mechanisms controlling cellular suicide: role of bcl-2 and caspases. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 54: 427-445, 1998.
8. Salcini, A. E., et al. Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogen*, 9:2827-2836, 1994.
9. Shine, G.S., et al. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/

Yama during topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Can. Res.*, 59:391-398,1999.