



# BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR REGULATES MATRIX METALLOPROTEINASES PRODUCTION AND IN VITRO INVASIVENESS IN HUMAN BLADDER CANCER CELL LINES

三宅, 秀明

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1750

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001750>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	三宅秀明	（京都府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1145号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成10年3月31日	
学位論文題目	BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR REGULATES MATRIX METALLOPROTEINASES PRODUCTION AND IN VITRO INVASIVENESS IN HUMAN BLADDER CANCER CELL LINE （塩基性線維芽増殖因子によるヒト膀胱癌細胞株のマトリックス メタロプロテナーゼ産生および in vitro 浸潤能の制御）	
審査委員	主査 教授 守 殿 貞 夫	
	教授 熊 谷 俊 一	教授 前 田 盛

## 論文内容の要旨

### 1. 序 文

Basic fibroblast growth factor (FGF-2) は、最も協力的な血管新生因子の1つであるが、この他にも細胞増殖、各種プロテアーゼの産生およびアポトーシスの制御等、極めて多岐にわたり細胞機能を調節していることが知られている。近年、腎細胞癌および膀胱癌患者の血清あるいは尿中に FGF-2 様蛋白が高濃度に存在する等、FGF-2 とこれらの癌の間に何らかの関係が存在することが示唆されてきた。しかし、その機能的役割の多くは解明されていない。我々は先に FGF-2 が Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の分泌亢進を介して腎細胞癌の浸潤・転移能を増大させることを報告した(Miyake et al., Cancer Res 56:2440, 1996)。本研究では、膀胱癌の浸潤・移転過程における FGF-2 発現の意義を解明することを目的として、2種類のヒト膀胱癌細胞株を用いて FGF-2 の発現レベルの変化が MMP の分泌および浸潤能に与える影響を検討した。

### 2. 方 法

#### I. 細胞株

本研究で用いたヒト膀胱間細胞株は、FGF-2 の発現が認められない HT1376 および FGF-2 を高発現している KoTCC-1 である。HT1376 は大日本製薬より購入し 10% FCS 添加 MEM にて継代培養した。KoTCC-1 は神戸大学泌尿器科の江藤らにより樹立された細胞株で、10% FCS 添加 RPMI にて継代培養した。

#### II. 遺伝子導入

Human FGF-2 cDNA を Subcloning した pT732 expression vector および薬剤選択のための pSV2neo を、標準的なリン酸カルシウム法で HT1376 にトランスフェクションした。G418 を用い薬剤選択をし、3週間後にコロニーをピックアップし Cell line 化した。

#### III. Oligonucleotides 処理

Murphy らの報告 (Mol.Endo.16:877, 1992) した FGF-2 に特異的な Antisense oligonucleotides

(5'-TAG-CTT-GAT-GTG-AGG-3') および Sense oligonucleotides (5'-CCT-CAC-ATC-AAG-CTA-3')を用いた。

#### IV. Sandwich ELISA

種々の濃度の Oligonucleotides で96時間処理した後のKoTCC-1およびFGF-2をトランスフェクションしたHT1376 (HT1376sublines) における FGF-2 蛋白レベルを, Watanabeらの方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 175:229, 1991) に準じSandwich ELISAにて測定した。

#### V. Zymography

KoTCC-1の培養液をSerm free DMEM/F12と交換し種々の濃度のOligonucleotidesで96時間処理した後, その培養上清中のMMP 活性をNakajimaらの方法(J. Natl. Cancer Inst., 82:1890, 1990) に準じGelatin zymographyで分析した。同様にSerum free DME/F12 でHT1376 sublinesを24時間培養し, その培養上清をGelatin zymographyにより分析した。

#### VI. In vitro tumor cell invasion assay

Gelatin zymography を施行したのと同様の条件でKoTCC-1およびHT1376sublinesを処理し, その浸潤能をAlbiniらの方法 (Cancer Res., 47:3239, 1987) に準じIn vitro tumor cell invasion assay にて測定した。

#### VII. 統計解析

統計学的処理はStudent's t testを用い,  $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

### 3. 結 果

#### I. HT1376における内在生FGF-2発現の影響

##### (1) FGF-2高発現株の樹立

HT1376 にFGF-2cDNA を含む pTB732 expression vectorおよびpSV2neoをトランスフェクション後, G418によるセレクションを経て10個のコロニーをCell line 化した。Cell line 化したトランスフェクタントのFGF-2蛋白発現レベルをSandwich ELISAで測定した結果, Parental HT1376 (HT1376/P) のFGF-2蛋白発現レベルは検出感度以下であったが, トランスフェクタントはいずれも色々なレベルのFGF-2蛋白を発現していた。このうち, HT1376/PおよびFGF-2蛋白を高発現していた2クローンのトランスフェクタント (HT1376/F2およびHT1376/F4) 計3クローンを用いて以下の実験を施行した。

##### (2) 細胞増殖への影響

HT1376sublinesの細胞増殖能を比較したが3 クローン間に有意な差を認めなかった。

##### (3) MMP産生への影響

HT1376sublinesのGelatin zymographyによる分析の結果, HT1376/F2 および HT1376/F4はHT1376/Pに比し明らかに高レベルのMMP-2およびMMP-9を分泌していた。しかし, 抗ヒトFRF-2単クローン抗体の投与は, HT1376/F2およびHT1376/F4のMMP 産生に影響を与えなかった。

##### (4) 浸潤能への影響

HT1376sublinesのIn vitro浸潤能は, HT1376/F2およびHT1376/F4のそれがHT1376/Pに比し有意に亢進していたが, 同時に測定した運動能はHT1376sublines 間に有意な差を認めなかった。

#### II. KoTCC-1におけるFGF-2antisenseoligonucleotides 処理の影響

##### (1) 細胞増殖への影響

KoTCC-1を, 種々の濃度のFGF-2specific antisenseoligonucleotidesおよびsenseoligonucleoti-

desで処理したが、いずれの Oligonucleotides 処理を行ったKoTCC-1の細胞増殖能も、無処理のそれに比し有意な差を認めなかった。

#### (2) FGF-2蛋白発現への影響

FGF-2antisenseoligonucleotides で処理したKoTCC-1細胞抽出液中のFGF-2蛋白レベルは無処理のそれに比し有意に低下し、かつFGF-2 antisenseoligonucleotides の濃度依存性の低下であった。一方、FGF-2oligonucleotides処理を施行したKotcc-1のFGF-2蛋白レベルには変化を認めなかった。

#### (3) MMP産生への影響

Zymographyにより定量的に分析するとKotcc-1が分泌するMMP-2はFGF-2antisenseoligonucleotidesの濃度依存性、つまりFGF-2蛋白レベルに応じて減少していた。しかし、FGF-2 senseoligonucleotides は KoTCC-1のMMP-2分泌レベルに影響を与えなかった。抗ヒトFGF-2単クローン抗体投与もKoTCC-1のMMP-2分泌レベルに影響しなかった。

#### (4) 浸潤能への影響

KoTCC-1のIn vitro浸潤能はFGF-2 antisenseoligonucleotides の濃度依存性に低下したが、FGF-2 senseoligonucleotides 処理によるKoTCC-1 の浸潤能の変化はみられなかった。また、KoTCC-1の運動能はいずれの Oligonucleotides の処理によっても変化しなかった。

### 3. 考 察

我々は、本研究においてFGF-2を発現していないヒト膀胱癌細胞株HT1376にFGF-2cDNAを導入することにより、HT1376のMMP-2およびNMMP-9の顕著な分泌亢進が認められることを明らかにした。また、FGF-2を高発現しているヒト膀胱癌細胞株KoTCC-1をFGF-2に特異的なAntisenseoligonucleotides で処理することにより、KoTCC-1のMMP-2産生能が減少することを示した。しかも、いずれの細胞株においても、そのIn vitro 浸潤能はMMPの産生レベルと密接に相関していた。これらの所見はヒト膀胱癌株においてFGF-2がMMPの産生を刺激し、その結果、浸潤能を亢進させていることを強く示唆するものである。

MMP産生の制御機序は、今なお不明な部分が多い。我々は先にFGF-2cDNAを導入したマウス腎癌細胞株のMMP-2産生能が、母細胞のそれに比し顕著に亢進することを報告した (Miyake et al, Cancer Res 56:2440, 1996)。この他にも、ある種のサイトカインやグロヘスファクターが悪性腫瘍細胞のMMP 分泌を刺激するとの報告は散見される。しかし、HT1376において認められた様に、FGF-2 の作用によりMMP-2だけでなくMMP-9の産生が亢進する減少は本研究において初めてあきらかにされたものである。

FGF-2によるMMP分泌刺激機序については一定の見解が得られていなが、今回の抗ヒトFGF-2単クローン抗体を用いた実験系により、ヒト膀胱癌細胞株においてFGF-2が典型的なAutocrineやParacrineとはことなるIntracrine様の機序で作用しMMPの分泌刺激をしている可能性を示した。

臨床的に膀胱癌の予後を推測しうる適切なマーカーは未だ存在しないが、本研究からFGF-2の発現が膀胱癌の悪性度の指標となりうる可能性が考えられる。我々は既に、FGF-2を高発現させたヒト膀胱癌細胞株が、シスプラチンに対して高度の耐性を獲得していることを明らかにしている(Miyake et al, Cancer Letters in press)。本研究の結果は、膀胱癌におけるFGF-2の発現と治療抵抗性あるいは予後との関係を明らかにする上で重要な知見と考えられる。

#### 4. 結 論

FGF-2はヒト膀胱癌細胞においてIntracrine様の機序でMMPの分泌を亢進させ、その結果、膀胱癌の浸潤能を増強させることを明らかにした。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Basic fibroblast growth factor (FGF-2)は、最も協力的な血管新生因子の1つであるが、この他にも細胞増殖および各種プロテアーゼ産生等、極めて多岐にわたり細胞機能を調節していることが知られている。近年、腎細胞癌および膀胱癌患者の血清あるいは尿中にFGF-2様蛋白が高濃度に存在する等、FGF-2とこれら癌の間に何らかの関係が存在することが示唆されてきた。申請者は先にFGF-2がMatrix metalloproteinase-2 (MMP-2)の分泌亢進を介して腎細胞癌の浸潤・転移能を増大させることを報告している(Miyake et al. Cancer Res. 6:2440-1996)。本研究では、膀胱癌の浸潤・転移過程におけるFGF-2発現の意義を解明することを目的として、FGF-2の発現レベルの変化がヒト膀胱癌細胞株のMMP分泌および浸潤能に与える影響をはじめて検討し、以下の知見を得た。

### 方 法

#### 【細胞株】

用いた細胞株は、FGF-2の発現が認められないHT1376およびFGF-2を高発現しているKoTCC-1である。HT1376にHuman FGF-2cDNAを標準的なリン酸カルシウム法でトランスフェクションしFGF-2狡猾減株を得た。KoTCC-1をFGF-2specific antisense oligonucleotidesで処理し、そのFGF-2発現レベルを低下させた。

#### 【Zymography】

KoTCC-1の培養液を無血清培養液と交換し種々の濃度のOligonucleotidesで96時間処理した後、その培養上清中のMMP活性はNakajimaらの方法(J.Natl.Cancer Inst, 82:1890, 1990)に順次Gelatin zymographyで分析した。同様に無血清培養液でHT1376母細胞およびFGF-2高発現株を24時間培養し、その培養上清をGelatin zymographyにより分析した。

#### 【In vitro tumor cell invasion assay】

Gelatin zymographyを施行したのと同様の条件でKoTCC-1およびHT1376sublinesを処理し、その浸潤能をAlbiniらの方法(Cancer Res, 47:3239, 1987)に準じIn vitro tumor cell invasion assayにて測定した。

### 結 果

#### 【FGF-2発現のMMP産生への影響】

遺伝子導入により得られたHT1376のFGF-2高発現株は、母細胞HT1376に比し明らかに高レベルのMMP-2およびMMP-9を分泌していた。KoTCC-1が分泌するMMP-2はFGF-2 antisense oligonucleotidesの濃度依存性に、つまりFGF-2蛋白発現レベルに応じて減少していた。

#### 【FGF-2発現の浸潤能への影響】

FGF-2高発現株のIn vitro 浸潤能は、母細胞HT1376に比し有意に亢進していたが、同時に測定した運動能はクローン間に有意な差を認めなかった。KoTCC-1のIn vitro浸潤能はFGF-2antisense oli

gonuc-leotides の濃度依存性に低下したが、KoTCC-1 の運動能はOligonucleotidesの処理によっても変化しなかった。

## 考 察

申請者は本研究においてFGF-2を発現していないヒト膀胱癌細胞株HT1376にFGF-2cDNAを導入することにより、HT1376のMMP-2およびMMP-9の顕著な分泌亢進が認められることを明らかにした。また、FGF-2を高発現しているヒト膀胱癌細胞株KoTCC-1をFGF-2に特異的なAntisenseoligonucleotidesで処理することにより、KoTCC-1のMMP-2産生能が減少することを示した。しかも、いずれの細胞株においても、そのIn vitro浸潤能はMMPの産生レベルと密接に相関していた。これらの所見はヒト膀胱癌細胞株においてFGF-2がMMPの産生を刺激し、その結果、浸潤能を亢進させていることを強く示唆するものである。

本兼杞憂は、膀胱癌のMMP産生および浸潤能の調節についてFGF-2がおよぼす影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった細胞増殖因子による細胞外基質分解酵素の分泌刺激機序について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る四角があると認める。