

## 原 著

ヒト子宮頸癌培養細胞における fibroblast growth factor (FGF)-10 の  
発現と細胞内情報伝達経路の検討

古力娜尔 庫尔班 石渡 俊行 呂 月平 藤井 雄文  
川原 清子 内藤 善哉 山田 宣孝 浅野 伍朗  
日本医科大学病理学第2教室

Expression and Intracytoplasmic Signal Transduction Pathway of Fibroblast Growth Factor  
(FGF)-10 in Human Cervical Cancer Cell Lines

Gulnar Kurban, Toshiyuki Ishiwata, Yue-Ping Lu, Takenori Fujii, Kiyoko Kawahara,  
Zenya Naito, Nobutaka Yamada and Goro Asano  
Department of Pathology, Nippon Medical School

## Abstract

Fibroblast growth factor (FGF)-10 is a new member of the FGF family initially reported in Japan. It is mainly synthesized by mesenchymal cells and acts on epithelial cells in a paracrine manner. FGF-10 actions are dependent on their binding to the iiib form of FGF receptor 2 (FGFR 2) iiib, also known as keratinocyte growth factor receptor (KGFR). FGF-10 has high amino acid homology to keratinocyte growth factor (KGF) and plays an important role in fetal limb and lung development and skin wound healing. In the present study, the expression of FGF-10 and FGFR 2 iiib messenger RNA (mRNA) in two different human uterine cervical cancer cell lines (CaSki and ME-180) were examined. Both CaSki and ME-180 cells expressed FGFR 2 iiib mRNA, while only CaSki cells expressed FGF-10 mRNA and protein. Recombinant FGF-10 (1 ng/ml) increased the growth rate of ME-180 cells and also enhanced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation of the cells. These data indicate that FGF-10 may directly promote the growth of squamous cell cancer in the uterine cervix via the MAPK pathway (J Nippon Med Sch 2001; 68: 253-258).

Key words: FGF-10, Cervical cancer, RT-PCR, Western blot

## 緒 言

子宮癌は本邦における女性の全癌死亡数の4.7%を占め、その内、子宮頸癌は70%以上であることが知られている<sup>1,2</sup>。さらに子宮頸癌の90%は扁平上皮癌で

あり、これらが産生する塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor (basic FGF) や platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) などの細胞増殖因子が、癌細胞の増殖、進展に関与していることが現在までに報告されている<sup>3,7</sup>。

ヘパリン結合型の細胞増殖因子である線維芽細胞増殖因子グループは塩基配列の相同性から、酸性線維芽細胞増殖因子 (acidic FGF, FGF-1), basic FGF (FGF-2), int-2 (FGF-3), hst/K-FGF (FGF-4), FGF-5, FGF-6, FGF-7, androgen-induced growth factor (AIGF),

Correspondence to Toshiyuki Ishiwata, Department of Pathology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan  
E-mail: ishiwata@nms.ac.jp  
Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jnms/>)

FGF-8), glia-activating factor (GAF, FGF-9), FGF-10, FGF-11 (FGF homologous factor-3, FHF-3), FGF-12 (FHF-1), FGF-13 (FHF-2), FGF-14 (FHF-4), FGF-15, 16, 17, 18, 19 が報告されている<sup>8-13</sup>.

Fibroblast growth factor (FGF)-10 は 1996 年に、ラットの胎児 cDNA より初めて分離同定され、FGF-10 は主に間葉系細胞によって産生され、上皮細胞の細胞膜上に局在する Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR 2) iiib, 別名 keratinocyte growth factor receptor (KGFR) を介して上皮細胞の増殖に関与していることが知られている<sup>14-16</sup>. FGF-10 は FGF-7 (keratinocyte growth factor, KGF) ととくに塩基配列の相同性が高く、同じ受容体に結合するなど、その機能も類似点が多いため KGF-2 とも呼ばれている<sup>15</sup>.

KGF は子宮内膜に局在し、内膜の性周期によって増減していることが知られ、内膜癌において KGF は性周期を持つ正常子宮内膜より減少するものの、KGFR の量は変化しないと言われている<sup>17-19</sup>.

一方、FGF-10 は肺臓、心臓、皮膚、脳、前立腺、乳腺、骨格筋などでその局在が報告されている<sup>14,16</sup>. 子宮では間質細胞に FGF-10 mRNA 発現がみられるとの報告が近年なされたが、子宮頸癌での FGF-10 の発現やその受容体の発現、役割については未だ報告がみられない<sup>20</sup>.

今回、我々は高分化と低分化由来で異なった形態像を示す CaSki と ME-180 の 2 種類のヒト子宮頸癌培養細胞における FGF-10 と、その受容体である FGFR 2 iiib の発現、さらに FGF-10 の外的投与による、これら

癌細胞の増殖動態と細胞内シグナル伝達経路につき検討した.

### 研究対象および方法

#### (1) 研究対象

東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより供与された、子宮頸癌培養細胞の扁平上皮癌 CaSki (TKG 0366) と ME-180 (TKG 0437) を用いて実験を行った.

#### (2) 研究方法

##### 1) 形態学的検討

それぞれの 2 種類の子宮頸癌培養細胞を Chamber slide 上で 10% 胎児ウシ血清を含む RPMI 培地で培養した後、H&E 染色にて形態像の観察を行った.

##### 2) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

子宮頸癌培養細胞における FGF-10 messenger RNA (mRNA) 発現の検討のために、CaSki と ME-180 の子宮頸部扁平上皮癌細胞を 10% 胎児ウシ血清を含む RPMI 培地で培養した後、Isogen (Nippon Gene 社) で total RNA を抽出し RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (Takara 社) にて cDNA 合成後 PCR を行った. FGF-10 の受容体である FGFR 2 iiib isoform の発現についても同様に RT-PCR 法で検討した. プライマーは FGF-10 (238 bp) が sense; nucleotides (nt) 77 ~ 96 (5'-CGC-GGA-TCC-TGC-TGT-TCT-TGG-TGT-CTT-CC-3'), antisense; nt 276 ~ 296 (5'-CGG-AAT-TCT-

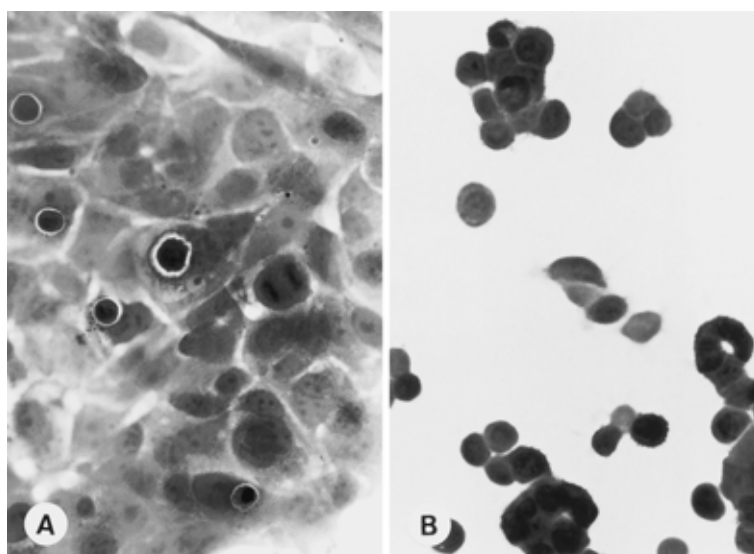


Fig. 1 Histological appearance of cervical cancer cell lines. CaSki cells show alveolar structure and many dyskeratotic lesions (A). In contrast, ME-180 cells present diffuse proliferation and non-keratotic lesions (B).

GAC-CTT-CCC-GTT-CTT-CTC-A-3')で FGFR 2 iiib (149 bp) は sense; nt 1346 ~ 1365 (5'-CGC-GGA-TCC-GCC-GCC-GGT-AAC-ACC-AC-3'), antisense; nt 1456 ~ 1475 (5'-CGG-AAT-TCA-CCA-TGC-AGA-GTG-AAA-GGA-T-3')を用いた<sup>14,20</sup>. PCR 反応は 95 °C 5 分の後, 95 °C, 1 分, 55 °C, 1 分, 72 °C, 2 分を 30 回行った後, 2% アガロースゲルにて解析した.

### 3) Western blot 法

CaSki 細胞より抽出したタンパクを BCA kit (Pierce 社) にて定量した後 Western blot 法を行った. Western blot 法は 20 µg のサンプルを 10% ポリアクリルアミド上に loading し電気泳動後, ナイロン膜に転写し 3% スキムミルクにて overnight 浸漬しブロッキングを行なった. その後 20,000 倍に希釈したウサギ抗ヒト FGF-10 抗体 (Santa Cruz 社) にて 2 時間反応し, 洗浄後 2,000 倍希釈した Horseradish peroxidase 結合ヤギ抗ヒト IgG 2 次抗体 (Santa Cruz 社) にて 1 時間インキュベートした. Super Signal West Pico (Pierce 社) にて化学発光し X 線フィルム上に感光させたバンドを検出した.

次に FGF-10 タンパクが ME-180 細胞の mitogen-activated kinase (MAPK) のリン酸化を誘導するかを検討した. ME-180 細胞を 6 穴のプレート上で 24 時間培養し, さらに無血清の RPMI-1640 培地で 24 時間培養した. 1 ng/ml の recombinant FGF-10 (R&D Systems 社) を加え, 5, 10, 15, 20 分後に細胞を Phosphate buffer saline (PBS) で洗浄しタンパク抽出を行った. その後 1,000 倍に希釈した抗リン酸化 ERK 抗体 (E-4, Santa Cruz 社) を用いて, 前述と同様に Western blot 法を行った. この際ブロッキング液は 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20, 1% Bovine Serum Albumin, 0.05% NaN<sub>3</sub> を用いた.

### 4) FGF-10 添加による細胞増殖能の検討

ME-180 細胞を 10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地で 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した. その後 96 穴プレート上に 1 well 当たり 10,000 個の ME-180 細胞を無血清培地の中に 24 時間培養した. FGF-10 を 1, 10, 100 ng/ml の濃度で添加し, さらに 24 時間培養した. 細胞増殖能は WST-1 試薬 (和光純薬) にて 2 時間反応後, ELISA プレートリーダーで 415 nm の波長で測定した.

## 結果

### 1. 形態学的検討

CaSki と ME-180 細胞の形態的特徴を検討するた

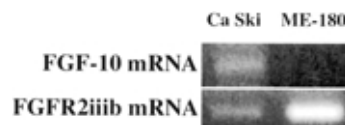


Fig. 2 RT-PCR analysis of FGF-10 mRNA in cervical cancer cell lines.

FGF-10 mRNA is expressed in CaSki cells, but not in ME-180 cells (upper panel). FGFR 2 iiib, receptor for FGF-10 is expressed in both of CaSki and ME-180 cells (lower panel)

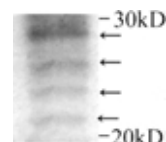


Fig. 3 Western blot analysis of FGF-10 protein in cervical cancer cells.

In CaSki cells, four bands corresponding to FGF-10 proteins with molecular weight from 20 to 30 kD are detected.

め, H&E 染色を行った. CaSki 細胞は好酸性の豊富な胞体を有し, シート状に増殖する高分化扁平上皮癌様の形態を示すのに対し, ME-180 細胞は円形から類円形で核/細胞質比が高く低分化癌に相当する形態を示していた (Fig. 1 A, B).

### 2. RT-PCR法による FGF-10 と FGFR2 iiib mRNA の発現の検討

子宮頸癌培養細胞における FGF-10 mRNA 発現の検討をするために RT-PCR 法を行った. CaSki 細胞は 238 bp 付近に明瞭な FGF-10 mRNA のバンドを認めるのに対し, ME-180 細胞では FGF-10 mRNA は検出されなかった (Fig. 2 上段). FGF-10 受容体の FGFR 2 iiib (KGFR) は CaSki と ME-180 のいずれの細胞にもその発現が認められた (Fig. 2 下段).

### 3. Western blot 法による FGF-10 タンパクの検討

CaSki 細胞において発現した, FGF-10 mRNA のタンパクへの翻訳を確認するために Western blot 法を行った. CaSki 細胞では 20 から 30 kD の間に以前の報告にみられるように 4 本の FGF-10 タンパクを示すバンドが認められた<sup>16</sup> (Fig. 3).

### 4. FGF-10 添加による細胞増殖能の検討

ME-180 細胞について FGF-10 の細胞増殖における効果を検討するため, recombinant FGF-10 添加の実験を行った. Recombinant FGF-10 の 1 ng/ml 投与より

細胞増殖の亢進がみられ, 100 ng/ml では無投与群に比べて約 20% の増殖亢進がみられた (Fig. 4).

#### 5. Western blot 法による MAPK シグナル伝達の検討

ME-180 細胞の FGF-10 による細胞増殖に MAPK のリン酸化が関与しているかを検討した. リン酸化した MAPK を示す Activated ERK-1 と ERK-2 は経時的に増加がみられ, 特に ERK-2 の増加が著明であった (Fig. 5).

#### 考 察

FGF-10 は KGF と 54% の相同性があり, KGF と同様に主に間葉系細胞で産生され, 上皮細胞に働く新しい細胞増殖因子である<sup>15</sup>. FGF-10 は分泌のためのシグナル配列を持つことから, aFGF や bFGF とは異なり細胞内から効率よく細胞外へ分泌されていると考えられている<sup>14</sup>. FGF-10 は KGF と同じく上皮細胞膜上の FGFR 2 iib (KGFR) に特異的に強固に結合し, 細

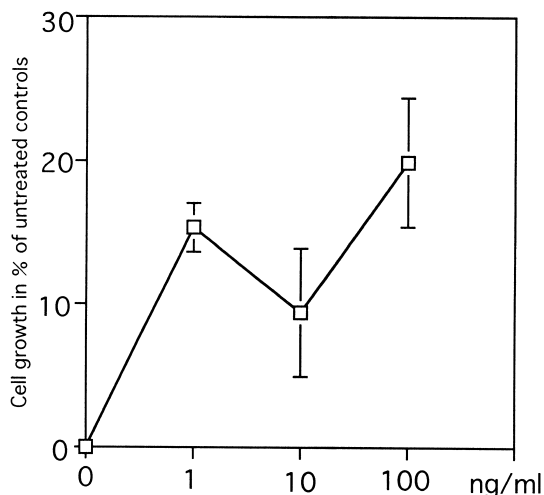


Fig. 4 Effect of FGF-10 on cervical cancer cells. ME-180 cells are grown in serum-free medium in the presence or absence of increasing concentrations of FGF-10. Data are expressed as percent increase above untreated controls and are the mean  $\pm$  S.D. from quadruplicate determinations.

胞増殖を誘導することが知られている<sup>22</sup>. 皮膚の創傷治癒モデルでは FGF-10 は KGF や TGF-beta などに比べてより強い上皮細胞の再生を誘導し, 皮膚の瘢痕形成をおこさないとの報告がみられる<sup>23</sup>. また, KGF のノックアウトマウスでは体毛の発育に異常が認められただけでマウスは臓器の奇形もみられず成長するが, FGF-10 のノックアウトマウスの検討では上下肢の形成がみられず, さらに気管は形成されるが肺の形成がなく出産前後に死亡するとされている<sup>24,25</sup>. FGF-10 が胎児期の器官形成に重要な役割を果たしていることは癌細胞においても oncofetal protein として, その細胞増殖に関与していることが推察されるが未だ, 癌における FGF-10 の役割についての報告はみられていない.

子宮では KGF が内膜癌では発現が減少しているのにもかかわらず, その受容体の KGFR の発現量は変化しないとの報告がみられる<sup>17</sup>. 子宮頸癌はその 95% が扁平上皮癌で, 本邦でも近年増加しており, ヒトパピロウイルスの関与が注目されている<sup>26,27</sup>. 子宮頸癌培養細胞では ME-180 細胞の FGF-10 発現がみられなかったのに対し, CaSki 細胞では上皮細胞由来であるにもかかわらず FGF-10 の発現がみられた. 形態的に CaSki 細胞は比較的分化度の高い扁平上皮癌の形態, ME-180 は低分化に相当する類円形のリンパ球様の形態を示しており, FGF-10 発現と癌細胞の分化度との関連性が推察された. 現在までに FGF-10 が上皮系細胞で発現していたという報告は見られておらず, さらに癌細胞における FGF-10 の発現も, 今回の CaSki 細胞以外では確認されていない. 一方, ME-180, CaSki 細胞ともに FGFR 2 iib 受容体の mRNA 発現がみられ, 上皮系細胞としての性格は保持されており, FGF-10 の標的細胞になりうるものと考えられた. ME-180 細胞では FGF-10 が paracrine 的に, CaSki 細胞では CaSki 細胞自身の産生した FGF-10 mRNA が FGF-10 タンパクへ翻訳されていることから, paracrine のみならず autocrine 的にも増殖に関与している可能性が示唆された. FGF-10 タンパクが分子量の異なる 4 種類のフォームからなるのは結合している糖鎖の違いによると報告されている<sup>16</sup>.

ME-180 細胞への FGF-10 の外的投与によって対照



Fig. 5 FGF-10 effect on mitogen-activated protein kinase (MAPK) in ME-180 cells. After plating for 24 hr in serum-free medium, cells were incubated with or without 1 ng/ml FGF-10 for the indicated times. Western blotting was performed with specific anti-active MAPK antibodies.

群に比し,癌細胞の増殖亢進がみられ,FGF-10が子宮頸部由来の扁平上皮癌の増殖に強く関与していることが確認された.さらに,FGF-10刺激の細胞内シグナル伝達には他のFGFグループ同様,MAPKのリン酸化が関与し,この経路がFGF-10による子宮頸癌細胞増殖に重要な役割を果たしていると考えられた<sup>28</sup>.今後ヒト子宮頸癌組織でのFGF-10局在の検討を行い,FGF-10産生における癌細胞周囲の間質細胞の関与についても,さらに研究をすすめる必要があると考えられた.

## 結 論

FGF-10が培養子宮頸癌細胞の増殖を亢進し,その経路は癌細胞膜上のFGFR 2 iibレセプターと,細胞質内のMAPK pathwayを介していることが示唆された.さらに,一部の培養子宮頸癌細胞はFGF-10を自ら産生していることが確認された.

## 文 献

- 厚生省大臣官房統計情報部(編):平成7年人口統計上巻,1997,pp 270-285.厚生統計協会,東京.
- 富永祐民,大島 明,黒石哲生,青木國雄:がん・統計白書 罹患/死亡/予後 1999.1999;pp 1-84.篠原出版,東京.
- Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its mRNA in uterine cervical cancers. *Br J Cancer* 1999; 80: 827-833.
- Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Pecorelli S, Cannon MJ, Parham GP: Secretion of vascular endothelial growth factor in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 78-82.
- Kodama J, Seki N, Tokumo K, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T: Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 485-489.
- Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T: Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in advanced uterine cervical cancers. *Cancer Lett* 1997; 111: 21-26.
- Fujimoto J, Ichigo S, Sakaguchi H, Hirose R, Tamaya T: Expression of platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its mRNA in uterine cervical cancers. *Br J Cancer* 1999; 79: 1249-1254.
- Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, Macke JP, Hendry SHC, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J: Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: New members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9850-9857.
- McWhirter JR, Goulding M, Weiner JA, Chun J, Murre C: A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E 2 A-Pbx 1. *Development* 1997; 124: 3221-3232.
- Miyake A, Konishi M, Martin FH, Hernday NA, Ozaki K, Yamamoto S, Mikami T, Arakawa T, Itoh N: Structure and expression of a novel member, FGF-16, of the fibroblast growth factor family. *Biochem Biophys Res Com* 1998; 243: 148-152.
- Hoshikawa M, Ohbayashi N, Yonamine A, Konishi M, Ozaki K, Fukui S, Itoh N: Structure and expression of a novel fibroblast growth factor, FGF-17, preferentially expressed in the embryonic brain. *Biochem Biophys Res Com* 1998; 244: 187-191.
- Hu MC, Qiu WR, Wang YP, Hill D, Ring BD, Scully S, Bolon B, DeRose M, Luethy R, Simonet WS, Arakawa T, Danilenko DM: FGF-18 a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6063-6074.
- Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, Ohuchi H, Itoh N: Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1444: 148-151.
- Yamasaki M, Miyake A, Tagashira S, Itoh N: Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996; 271: 15918-15921.
- Emoto H, Tagashira S, Mattei MG, Yamasaki M, Hashimoto G, Katsumata T, Negoro T, Nakatsuka M, Birrbaum D, Coulier F, Itoh N: Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. *J Biol Chem* 1997; 272: 23191-23194.
- Beer HD, Florence C, Dammeier J, McGuire L, Werner S, Duan DR: Mouse fibroblast growth factor 10: cDNA cloning, protein characterization, and regulation of mRNA expression. *Oncogene* 1997; 15: 2211-2218.
- Siegfried S, Pekonen F, Nyman T, Ammala M, Rutanen E-M: Distinct patterns of expression of keratinocyte growth factor and its receptor in endometrial carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 1166-1171.
- Matsui H, Taga M, Kurogi K, Minaguchi H: Gene expression of keratinocyte growth factor and its receptor in the human endometrium/decidua and chorionic villi. *Endocrinol J* 1997; 44: 867-871.
- Siegfried S, Pekonen F, Nyman T, Ammala M: Expression of mRNA for keratinocyte growth factor and its receptor in human endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74: 410-414.
- Chen C, Spencer TE, Bazer FW: Fibroblast growth factor-10: A stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. *Biol Reprod* 2000; 63: 959-966.
- Watanabe M, Ishiwata T, Nishigai K, Moriyama Y, Asano G: Overexpression of keratinocyte growth factor in cancer cells and enterochromaffin cells in human colorectal cancer. *Pathol Int* 2000; 50: 363-372.
- Finch PW, Murphy F, Cordiale I, Krueger JG: Altered expression of keratinocyte growth factor and its receptor in psoriasis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1619-1628.
- Xia YP, Zhao Y, Marcus J, Jimenez PA, Ruben SM, Moore PA, Khan F, Mustoe TA: Effects of keratino-

- cyte growth factor-2 ( KGF-2 ) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. *J Pathol* 1999; 188: 431-438.
- 24 . Guo L, Degenstein L, Fuchs E: Keratinocyte growth factor is required for hair development, but not for wound healing. *Genes Dev* 1996; 10: 165-175.
- 25 . Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, DeRose M, Simonet WS: Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* 1998; 12: 3156-3161.
- 26 . 細根 勝, 石渡俊行, 野村信夫, 川並汪一: ヒト乳頭腫ウイルスの局在に関する分子病理学的検討. *J Nippon Med Sch* 1995; 62: 39-49.
- 27 . Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- 28 . Kornmann M, Ishiwata T, Beger HG, Korc M: Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: Evidence for autocrine and paracrine actions. *Oncogene* 1997; 15: 1417-1424.

( 受付 : 2000 年 12 月 7 日 )

( 受理 : 2001 年 1 月 16 日 )

---