

## 主論文

Fibroblast growth factor 13 regulates glioma cell invasion and is important for bevacizumab-induced glioma invasion

(Fibroblast growth factor 13 はグリオーマ細胞の浸潤を制御し、ベバシズマブ誘導グリオーマ浸潤に重要な役割を果たす)

### 【緒言】

悪性グリオーマは、高い浸潤能、増殖能、血管新生能を特徴とする予後不良な疾患である。現行の標準的治療である手術、化学療法、放射線治療を行った場合でも膠芽腫の生存期間中央値は14.6ヶ月である。悪性グリオーマの表現型の解明は新規治療法の開発に必須であり、我々は浸潤性グリオーマ細胞(J3T-1とJ3T-2)を使用し、浸潤関連遺伝子の探索を行ってきた。

今回、新たに同定した浸潤関連遺伝子 fibroblast growth factor13(FGF13)について検討した。FGF13は、通常の FGF と異なり、細胞外へは分泌されず細胞内で作用することが報告されている。核に局在する FGF13A と、細胞質に局在する FGF13B があり、特に FGF13B は神経細胞の移動に関与するが、これまでグリオーマにおける役割は報告されていない

### 【材料と方法】

#### 細胞株

イヌグリオーマ細胞(J3T-1、J3T-2)、ヒトグリオーマ細胞(U87ΔEGFR、U251、LNZ308、A172、Gli36Δ5)、ヒトグリオーマ幹細胞を使用した。

#### ヒトグリオーマ組織

2006 年から 2016 年に当科で治療を行ったグリオーマ症例のうち 25 例の組織を使用した。また、Cancer Genome Atlas project および IVY Glioblastoma Atlas Project のデータを用いてヒトグリオーマ組織における FGF13 の発現を調べた。

#### マイクロアレイ

J3T-1 および J3T-2 細胞より抽出した RNA を用いてマイクロアレイを行い、グリオーマ浸潤に関与する遺伝子の候補を検索した。

#### FGF13 遺伝子発現調整

siRNA または shRNA を用いて FGF13 発現をノックダウンしたグリオーマ細胞を、リポフェクション法に

より FGF13B を強制発現させたグリオーマ細胞を準備した。

#### Migration および invasion assay

Migration assay として、scratch assay および transwell assay を行った。Scratch assay では、0.1%ウシ胎児血清条件下で培養した細胞にスクラッチを行い、24 時間後にスクラッチ部分へ浸潤した細胞数を観察した。Transwell assay では ThinCert Tissue Culture Insert を用い、24 時間後に insert の下層へ移動してきた細胞数を観察した。Invasion assay では BioCoat Matrigel invasion chamber を用い、同様に細胞数を観察した。細胞はギムザ染色を行った。

#### ウエスタンブロッティング

細胞および組織は RIPA 溶液および PMSF に溶解し、超音波破碎した。チューブリン抽出に際しては、microtubule stabilization buffer 内に溶解し、遠心分離を用いてアセチル化およびチロシン化チューブリンを抽出した。抗 FGF13 抗体、抗  $\beta$  アクチン抗体、抗アセチル化チューブリン抗体、抗  $\alpha$  チューブリン抗体でウエスタンブロッティングを行った。

#### 免疫蛍光および免疫組織染色

免疫蛍光染色では、1 次抗体として抗 FGF13 抗体、抗  $\beta$  チューブリン抗体、抗ビメンチン抗体を、2 次抗体として Alexa Fluor 488-もしくは 594-抗体を使用した。F アクチン染色には CytoPainter F-actin Labelling kit を使用した。

免疫組織染色では、1 次抗体として抗 FGF13 抗体、抗 HLA 抗体、抗 CD31 抗体、抗 Iba-1 抗体、抗 Ki67 抗体を用い、発色には Dako Envision+System-HRP kit を使用した。

#### アポトーシスアッセイ

培養細胞およびヒトグリオーマ組織におけるアポトーシスの検出には、*in situ* Cell Death Detection kit を使用した。

#### 細胞増殖アッセイ

培養細胞の増殖を測定するために water-soluble tetrazolium-1 assay を使用した。

#### 動物実験

グリオーマ細胞(コントロール群もしくは FGF13 ノックダウン群)を無胸腺マウスもしくは重度複合免疫不全マウスの大脳基底核へ移植し、生存期間の観察および組織学的評価を行った。ベバシズマブ誘導グリオーマ浸潤モデルは、移植後 5 日目より週 3 回の頻度でベバシズマブ(6mg/kg)を投与し、作製した。

## 【結果】

### FGF13 はびまん性浸潤を呈する J3T-2 で発現上昇している

マイクロアレイ(Gene Ontology 解析)の結果、J3T-2 ではチューブリンおよび細胞骨格に関連する遺伝子発現が上昇していた。特に、その中でも FGF13 が高発現していた。

### FGF13 はグリオーマ細胞の細胞質に発現し、組織内では浸潤部分に高発現する

免疫染色、ウエスタンブロッティングの結果、J3T-2、ヒトグリオーマ細胞株、ヒトグリオーマ組織において FGF13 は主に細胞質に発現していた。ヒトグリオーマ組織の免疫染色では、浸潤境界部分のグリオーマ細胞に発現が高く認められたが、血管内皮やマクロファージなどの微小環境細胞には発現していなかった。IVY Glioblastoma Atlas Project の RNA-seq データでも同様に、FGF13 は浸潤部分に強く発現していた。

### FGF13 は in vitro におけるグリオーマの浸潤能に関与する

siRNA を用いて FGF13 の発現を抑制させた細胞を使用し、migration および invasion assay を用いて浸潤能の変化を観察した。その結果、FGF13 を発現低下させた J3T-2 およびグリオーマ細胞において、浸潤能低下が観察された。一方、細胞増殖アッセイでは増殖能の変化はなく、アポトーシスアッセイでも細胞死の変化は認められなかった。

### FGF13 は in vivo におけるグリオーマの浸潤能およびマウスモデルの生存期間に関与する

shRNA により FGF13 発現を抑制した J3T-2 もしくはヒトグリオーマ幹細胞をマウスへ投与すると、コントロール群と比較して浸潤能の低下が認められ、生存期間の延長も確認された。一方、免疫染色による組織評価では、血管新生や Ki67 による細胞増殖能に有意な変化は認められなかった。

### FGF13 は細胞質においてチューブリンを制御する

J3T-2 細胞を用いて FGF13、チューブリン、F アクチンの 3 重染色を行ったところ、FGF13 はチューブリンと共に局在していた。次に、ヒトグリオーマ細胞をチューブリン阻害薬である nocodazole で処理したところ安定化チューブリンであるアセチル化チューブリンの発現量が低下したが、FGF13B を過剰発現させた細胞ではアセチル化チューブリンの発現低下が抑制された。

### 低酸素条件で FGF13 の発現は低下する

ヒトグリオーマ細胞を低酸素条件(1%酸素もしくは deferoxamine 投与下)で培養すると、ウエスタンブロッティングの結果、FGF13 の発現低下が確認された。

## FGF13 はベバシズマブ誘導グリオーマ浸潤にも関与する

ヒトグリオーマ細胞をベバシズマブ投与下に培養した場合、FGF13 の発現量は変化しなかった。また、ヒトグリオーマ組織のマクロアレイ結果でも、FGF13 の発現量はベバシズマブ投与前後で変化はなかった。In vitro において、ヒトグリオーマ細胞をベバシズマブ投与下に培養すると浸潤能の上昇が認められたが、FGF13 をノックダウンすると浸潤が抑制された。また、in vivo でも同様に、FGF13 ノックダウン群において、浸潤能の低下が観察された。

## **【考察】**

### グリオーマおよび他の腫瘍における FGF13 の意義

FGF13 は、子宮頸癌においてシスプラチニ耐性に関与し、FGF13 高発現症例は予後が悪いと報告されている。また、前立腺癌においても細胞質における FGF13 発現と術後再発が相關することが報告されている。一方、グリオーマにおいては、 $\gamma$ -secretase 阻害薬の非反応群で FGF13 の発現が高いこと、SOX2 の発現と相關することが知られているが、その機能は不明である。本研究では、FGF13 がチューブリンを制御し、グリオーマの浸潤に関与することを報告した。

### グリオーマにおける細胞骨格を標的とした治療について

細胞骨格には、チューブリン、アクチン、中間径フィラメントがある。細胞骨格がグリオーマ浸潤に関与することが知られており、patupilone、バルプロ酸、tumor-treating fields などのチューブリン阻害治療が有用である。

### ベバシズマブ誘導グリオーマ浸潤について

初発グリオblastoma患者に対するベバシズマブ投与(AVAglia および RTOG 0825 試験)は全生存期間の延長には至っていない。この理由の 1 つとして、ベバシズマブ投与により MET、PI3K 経路などの活性化が起こり、表現型が変化することが知られている。今回の検討では、ベバシズマブ投与前後で FGF13 発現量は変化せず、ベバシズマブ誘導浸潤に関与することを示した。

## **【結論】**

FGF13 はグリオーマの浸潤に関与する遺伝子であることを新たに同定し、また新規治療標的になる可能性を示した。