

# 胆管癌における線維芽細胞増殖因子レセプター(FGFR)遺伝子異常の追及

## Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) family gene aberrations in cholangiocarcinoma

名古屋市立大学	宮部 勝之
派遣期間	2015年4月23日～2016年5月9日
研究機関	Mayo Clinic 200 First Street SW Rochester, MN 55905, United States
研究指導者	Prof. Lewis R. Roberts

Cholangiocarcinoma (CCA) frequently presents at an advanced stage at which the current treatments are only minimally effective. Fusions of fibroblast growth factor receptor (FGFR) genes with other partner genes have recently been discovered in CCA. Additionally, other FGFR gene family aberrations are potential therapeutic targets in CCA. My research goal is to identify and characterize FGFR family gene aberrations, and determine the effectiveness of targeting the aberrations in treatment of CCA. So far, we performed RNA sequencing in 11 CCA xenografts and FGFR3 RNA expression was significantly overexpressed compared to 9 normal TCGA samples. Furthermore, 5 out of 11 cases have FGFR4 p.G388R mutation. These FGFR aberrations are likely to be related to tumorigenesis, and we are trying to verify how the gene aberrations can affect to cancer progression using cell lines and will also conduct *in vivo* experiment. We expect to identify additional novel FGFR target aberrations and to determine their relative sensitivities to different FGFR inhibitors. The results of our studies will allow us to personalize the therapeutic options for patients with CCA by selecting the specific FGFR inhibitor that is most likely to achieve a clinical effect, and therefore enhance patient outcomes.

### 研究目的

胆管癌はすでに進行している段階で発見されることが多く、手術療法が根治治療であるものの、手術適応のない進行がんの段階で発見されることも多く、これらの進行胆管癌患者は不良である。最近、線維芽細胞増殖因子レセプター (FGFR) と他のパートナー遺伝子との遺伝子転座が胆道癌にて発見され、これらの転座は機能的に発癌性を有し、分子標的治療の有望なターゲットとなっている。実際、メイヨークリニックの研究では FGFR2-TACC3 癒合遺伝子を伴った胆管癌患者が、FGFR2 キナーゼ阻害剤の治療に反応したことが示された (Mitesh J. Borad et al. PLoS Genet. 2014 Feb 13;10(2):e1004135.)。一方で同じくメイヨークリニックから発表された、156人の胆管がん患者を用いた retrospective

study では、FGFR2 癒合遺伝子を持つ胆管癌患者は、本癒合遺伝子を持たない患者に比べ有意に長く生存するという結果が出ており (Graham RP, et al. Hum Pathol. 2014;45(8):1630-8.)、FGFR1 増幅や FGFR3 の重複など、他の FGFR ファミリー遺伝子異常が胆管癌治療の別の標的になる可能性がある。そこで、胆管癌 FGFR ファミリー遺伝子変異の特徴やその機能面での特徴を同定し、さらには FGFR キナーゼ阻害剤を使用した分子標的治療の効果を評価することを、研究の目的とした。

### 研究経過

まず、胆管癌患者より採取した凍結保存標本より作製した xenograft 11 例を用いて、Whole transcriptome sequencing を行い、The Cancer Genome Atlas (TAGA)

データにおける正常胆管標本の RNA シークエンスデータとの比較を行うことで、FGFR ファミリー遺伝子の異常を調べた。その結果、FGFR3 RNA が胆管癌グループにおいて、正常 TCGA 標本に比較し優位に多く発現していることが判明した。この結果を元に、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)解析を行ったところ、FGFR3 の発現は、STAT1 などの STAT グループ遺伝子の発現と関連しているほか、癌進展に関与している FOS 遺伝子、または癌マーカーとして期待されている PLG 遺伝子の発現と深く関わっていることが示された。

また、11 例の xenograft 中、5 例において、FGFR4 p.G388R 遺伝子変異を認めた。この変異は 4 例が homozygous mutation で、1 例が heterozygous mutation であった。本遺伝子変異は germline mutation に分類されるものであるが、COSMIC データベースにおいて甲状腺がんや結腸直腸がんが存在する遺伝子変異として登録されている。また、ClinVar データベース上では、腫瘍細胞の運動や癌の発展に関与する遺伝子変異と登録されていた。この遺伝子変異は正常人にも広く存在(文献により相違はあるものの、50%までの正常人に存在)するものではあるが、上記のように癌との関連が指摘されており、最近では、本遺伝子変異が STAT3 の細胞膜内面への付着を促し、癌の進展に関与するとの報告がなされており (Ulaganathan VK, Sperl B, Rapp UR, Ullrich A. Nature. 2015;528:570-4.)、注目に値する。さらなる IPA 解析では、本 FGFR4 遺伝子変異も FOS や PLG、STAT ファミリー遺伝子、および MAPK3 に関連が認められた。本結果は、2016 年 2 月にソルトレイクシティにて開催された The Cholangiocarcinoma Foundation Annual Conference 2016 にて発表し、現在その機能解析を行っているところである。

胆管癌 FGFR プロジェクトの RNA シークエンスに約 8 ヶ月を要したため、その結果を待機している間、他の実験を行い、発表した。こちらに来て 2 週間の内視鏡見学を行った後、新規 CK2 キナーゼ阻害剤 CX-4945 の胆管癌への治療効果を検討した。細胞実験は私の前の研究者にて行われていたため、私はマウス実験を行った。ヌードマウスに胆管癌 xenograft を作成し、コントロール群、CX-4945 単独投与群とともに、既存の化学療法治療である、ジェムシダビン+シスプラチン(GEM+CIS)群、GEM+CIS 群および CX-4945 を組み合わせた治療群の 4 群に分

け、それぞれ約 15 匹のマウスに合計 35 日間薬剤を投与し、腫瘍の増殖能を検討した。

結果は、コントロール群に比較し治療群である 3 群とも優位に腫瘍の増殖を抑え、また GEM+CIS 群に比較して CX-4945 単独投与群は効果が低かったものの、GEM+CIS+CX-4945 の 3 つの薬剤とも投与した群は有意に腫瘍増殖能を抑制した。また、気になる毒性の評価は体重減少の有無にて行ったが、CX-4945 単独投与群では体重減少はなく、GEM+CIS 群と、GEM+CIS+CX-4945 群にて、GEM+CIS を投与している期間のみ体重減少し、その後 CX-4945 のみ継続投与した間は体重が劇的に回復した。このことより、CX-4945 には既存の薬剤に存在するほどの毒性はなく、マウス実験からは併用が可能と考えられた。

また、Xenograft 内の薬物効果を調べるため、PI3K/AKT 回路に存在する AKT、PTEN、また細胞 DNA 修復に必要な蛋白である MDC1、XRCC1 を、7 例ずつ各群の xenograft を用い、ウエスタンブロット法にて調べ定量化したところ、CX-4945 使用群はコントロール群および GEM+Cis のみ投与した群と比較して、有意に AKT、PTEN のリン酸化が抑制され、また MDC1、XRCC1 のリン酸化も有意に抑制されていた。このことから、PI3K/AKT 回路の進行を抑制し、GEM+Cis 投与後の DNA 修復も抑制することから、CX-4945 の GEM+Cis への相加効果の機序を示すことができた。

さらに、Ki-67 染色および TUNEL 染色アッセイにて細胞増殖能および細胞アポトーシス能を調べた結果、CX-4945 を投与した群がコントロールに比較して有意に Ki-67 染色陽性細胞が減少しており、TUNEL 染色陽性細胞が増加していた。特に、Gem、Cis、CX-4945 を併用した群において、Gem+Cis 併用のみの群と比較し、有意に細胞増殖能が抑えられ、アポトーシス能が増加していた(図 1)。

本結果は 2016 年 5 月サンディエゴで行われた Digestive Disease Week 2016 にて発表し、AGA/AGA-GRG Fellow Abstract Prize を受賞した。現在、メイヨークリニック及び他の複数の施設にて Phase I b および Phase II 試験が進行中である。---

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

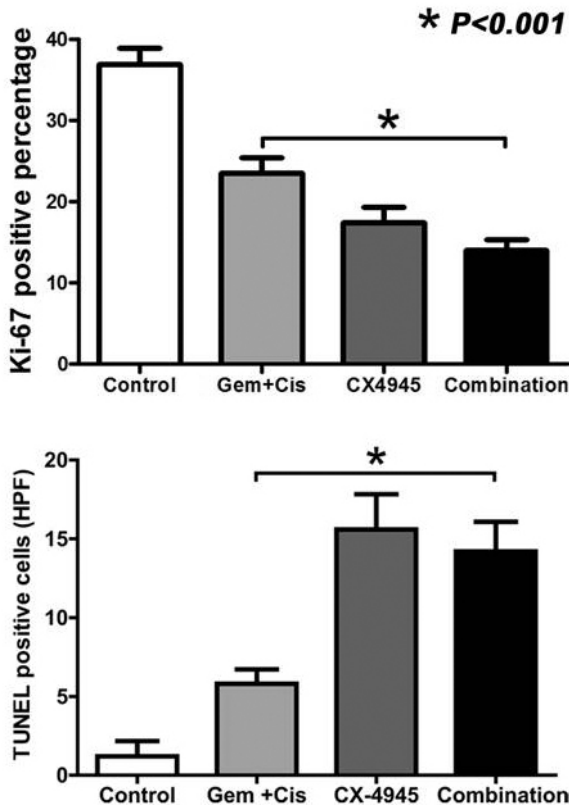


図1: Ki-67染色およびTUNEL染色アッセイにて細胞増殖能および細胞アポトーシスを調べた結果。CX-4945を投与した群がコントロールに比較して優位にKi-67染色陽性細胞が減少しており、TUNEL染色陽性細胞が増加していた。特に、Gem、Cis、CX-4945を併用した群において、Gem+Cis併用のみの群と比較し、有意に細胞増殖能が抑えられ、アポトーシス能が増加していた。

## 考察

胆管癌治療はまだまだ他分野の癌治療に比べて遅れている感がぬぐえないものの、まだまだ解明されていないことが多く、見方を変えればこの分野が「現代医学のフロンティア」であることを示している。現在 FGFR 遺伝子の追求については、FGFR3 高発現、または FGFR4 遺伝子変異と腫瘍化の関係をまずは細胞レベルで確認を行っている最中である、将来的にはさらに、マウス実験にて検討していく予定である。未知の FGFR 関連遺伝子異常と癌との関連を見出せれば、既存の FGFR 阻害剤を使用可能であり、将来の胆管癌に対する分子標的治療につながるものと思われる。

留学に関して一つ大切なことを挙げるのであ

れば、それは「勇気」ではないだろうか。私は Dr. Lewis R. Roberts の研究室に入ること、胆管癌の治療に関する特別な研究プロジェクトに参加することができ、留学中に勉強しえた事項はどれも私にとって新たな挑戦ばかりであったためすべてを学ぶ必要があった。同じ日本人の同僚に助けて頂くことも多かったが、研究に関して肝心なことはやはり同じ研究室の同僚や、上司、アメリカ人の事務の方に聞く必要があった。この際、あやふやな英語を駆使しながらも必死で質問を繰り返すことで、一つ一つの難関を乗り越えていくことができた。慎重に物事を進めなければならないことが言うまでもないが、この際、敢えて「勇気」を持って質問・行動をしたから克服することができたことが非常に多かったのではないかと、思う。これから留学を目指される若い方々の参考になればと思い、書かせていただいた。

稿の最後に、今回貴重な援助と機会を提供して頂いた山田科学振興財団に、心より深くお礼を申し上げたい。

## 研究の発表

### 口頭発表

1. Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Gene Family Aberrations in Cholangiocarcinoma. Katsuyuki Miyabe, Lewis R. Roberts, The Cholangiocarcinoma Foundation Annual Conference 2016, February 5, 2016, Salt lake City, UT
2. The casein kinase II inhibitor CX-4945 has an additive effect with gemcitabine and cisplatin on cholangiocarcinoma xenografts. Katsuyuki Miyabe, Kais Zakharia, Yu Wang, Catherine D. Moser, John Lim, Sean O'Brien, Mitesh J. Borad, Lewis R. Roberts1 Digestive Disease Week 2016, May 21, 2016, San Diego, CA

### 誌上発表

1. 研究途中段階であるため、まだ誌上発表はありません。