

178. 食道胃接合部癌に対する FGFR 標的治療法の確立

今村 裕

Key words : 食道胃接合部癌, 食道腺癌, 分子標的治療, FGFR2, copy number variation

*熊本大学 医学部附属病院 消化器外科

緒 言

食道胃接合部癌は、食道胃接合部の口側 5 cm, 胃側 5 cm 以内に腫瘍中心を有する上皮性悪性腫瘍であり、食道腺癌と合わせて取り扱われることが多く、欧米諸国においてここ 30 年で 6 倍に増加している¹⁾。その 5 年生存率は約 15% と非常に予後不良の疾患である。近年、我が国においても食生活の欧米化や逆流性食道炎の増加を要因に本疾患の増加が指摘されている²⁾。しかし、この食道胃接合部癌に対する有効な治療法は未だ開発途上であり、本疾患の治療法の開発が必要であると考えられる。

我々は、これまで新鮮凍結サンプルを用いた食道胃接合部癌（食道腺癌を含む）における遺伝子コピー数異常の網羅的解析を行い、食道腺癌と食道胃接合部癌に特異的なコピー数異常を同定してきた³⁾。その中で、我々は FGFR2 の遺伝子増幅異常を食道胃接合部癌で初めて報告した。FGFR は染色体 10q26.12 にコードされ、下流の RAS-ERK および PI3K-AKT を介して細胞の Proliferation と Survival に関与するとされている⁴⁾。これまで、FGFR2 と癌との関連は、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、乳癌、胃癌、大腸癌で報告されている。また、FGFR をターゲットとして含むマルチチロシンキナーゼ阻害剤が多く開発され様々な腫瘍において臨床試験が進行中である。しかし、FGFR2 の食道胃接合部癌における悪性度との関連性、さらにはこの分子が治療の標的になりうるかどうかは未だ報告はない。

そこで我々は、本研究において、食道胃接合部癌における FGFR2 の臨床病理学的特徴を明らかにし、さらに細胞株を用いてこの分子の悪性化にかかわる役割を明らかにすることで、FGFR2 が本疾患の治療の標的となりうるかどうかを検討することとした。

方 法

1. 臨床検体を用いた実験

熊本大学附属病院消化器外科にて切除手術を受けた食道胃接合部癌 (Siewert type I~III) 101 例を対象とした。免疫染色には抗-FGFR2 抗体 [ab58201, Anti-Mouse Monoclonal, 1:1000] を用いて、臨床検体のパラフィン包埋切片の免疫染色を行った。免疫染色の評価は negative, weak, moderate, strong の 4 段階とし、weak/moderate 間をカットオフとし、低発現群と高発現群に分けて検討した。

2. 細胞株を用いた実験

食道胃接合部癌細胞株 2 種 (SKGT4, OACM5.1) を用いた。FGFR2 コピー数の評価は Taqman copy number assay (FGFR2, Human, Cat. #4400291) および TaqMan Copy Number Reference Assay, (RNase P, Human, Cat. #4403328) を用い、その比率 (FGFR2/RNaseP) を用いて評価した (カットオフ値は 2 に設定)。RNA 干渉実験には si-RNA-2 (5'-GUAGGACUGUAGACAGUGATT-3'), および si-RNA-3 (5'-GAACAGUAUUCACCUAGUUTT-3') を作製した。細胞浸潤能の変化はマトリゲルチャンバー [BD Matrigel basement membrane matrix (BD Biosciences)] を用いて、アポトーシスの評価は propidium iodide (Sigma), Annexin V staining (Millipore) と BD FACS Verse flow cytometer (BD

*現所属：がん研有明病院 消化器センター 消化器外科

Biosciences) を用いて評価した。Western blotting では、抗 FGFR2 抗体 (#11835s, Cell signaling), 抗 β アクチン抗体 (#4967s, Cell signaling) を用いた。

3. 統計解析

全ての統計学的解析は JMP11 (SAS) にて行った。P < 0.05 を有意差基準とした。

結 果

1. 臨床検体を用いた実験結果

免疫染色では、FGFR2 の発現は癌細胞特異的に発現していた (図 1)。また正常細胞における FGFR2 の発現は認めなかった。

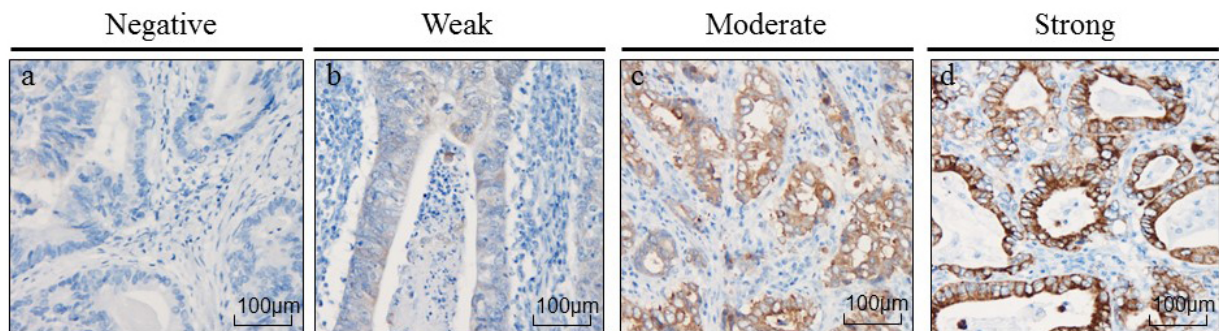


図 1. 食道胃接合部癌における FGFR2 タンパクの発現。

FGFR2 免疫染色の評価は negative, weak, moderate, strong の 4 段階で行った。

上記評価方法をもとに、カットオフを negative-weak と moderate-strong の 2 群に分類し、前者を FGFR2 expression high 群に、後者を同 low 群に分類し、臨床病理学的因子との相関関係について検討した (表 1)。

表 1. FGFR2 の発現と臨床病理学因子の比較

		FGFR2 expression		P value
		Low	High	
No. of patients (%)		46 (45.5)	55 (54.5)	
Depth of invasion	<MP	26(65.0)	14 (26.4)	0.0002
	≥MP	14 (35.0)	39(73.6)	
Lymph node metastasis	+	7 (18.4)	31 (58.5)	0.0004
	—	31 (81.6)	22 (41.5)	
Distant metastasis	+	0 (0)	4 (13.2)	0.0040
	—	40 (100)	46 (86.8)	
Stage (TNM classification)	I	32 (80.0)	17 (32.1)	0.0001
	II	5 (12.5)	9 (17.0)	
	III	3 (7.5)	23 (43.4)	
	IV	0 (0)	4 (7.5)	
Lymphatic invasion	+	6 (15.0)	27 (52.9)	0.0001
	—	34 (85.0)	24 (47.1)	
Vascular invasion	+	14 (35.0)	36 (67.9)	0.0015
	—	26 (65.0)	17 (32.1)	

FGFR2 expressoin は腫瘍深達度，リンパ節転移，遠隔転移，Stage, lymphatic invasion, vascular invasion と有意に相関した.

全症例 (N=101) 中, FGFR2 低発現群は 46 例 (45.5%), FGFR2 高発現は 55 例 (54.5%) において認めた. 特記すべきこととして, FGFR2 高発現例は, FGFR2 低発現例と比べて, 深達度の深い症例 (P=0.0002), リンパ節転移陽性症例 (P=0.0002), 遠隔転移を有する症例 (P=0.0040) と相関し (表 1), そのため最終病期の進行度とも非常に強い相関関係を認めた (P=0.0001, 表 1). また, FGFR2 はリンパ管侵襲症例 (P=0.0001) や静脈侵襲症例 (P=0.00015) において有意に高発現症例を認めた (表 1).

また, 生存解析を行った結果, FGFR2 高発現群は有意に予後不良であることが判明した (P=0.0375, 図 2).

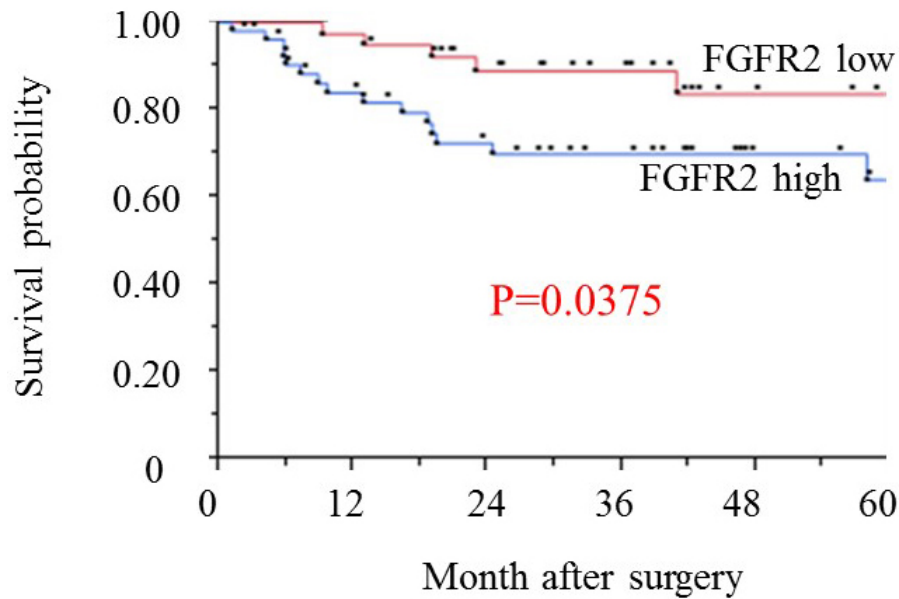


図 2. FGFR2 の発現と予後.

FGFR2 expression high 群は low 群に比べて有意に予後不良であった ($P=0.0375$).

2. 細胞株を用いた実験結果

2 種類の細胞株, SK-GT4 と OACM5.1C における FGFR2 コピー数 (FGFR2/RNaseP 比)を確認したところ, SK-GT4 ではコピー数 (Copy number, CN) の上昇は認められず ($CN=1.3$), OACM5.1 においてコピー数の上昇を認めた ($CN=2.8$, 図 3A). さらに, FGFR2-mRNA の発現量は, OACM5.1C で有意に高く (図 3B), 同様にタンパクレベルでも OACM5.1C に FGFR2 タンパクの高発現を確認した (図 3C).

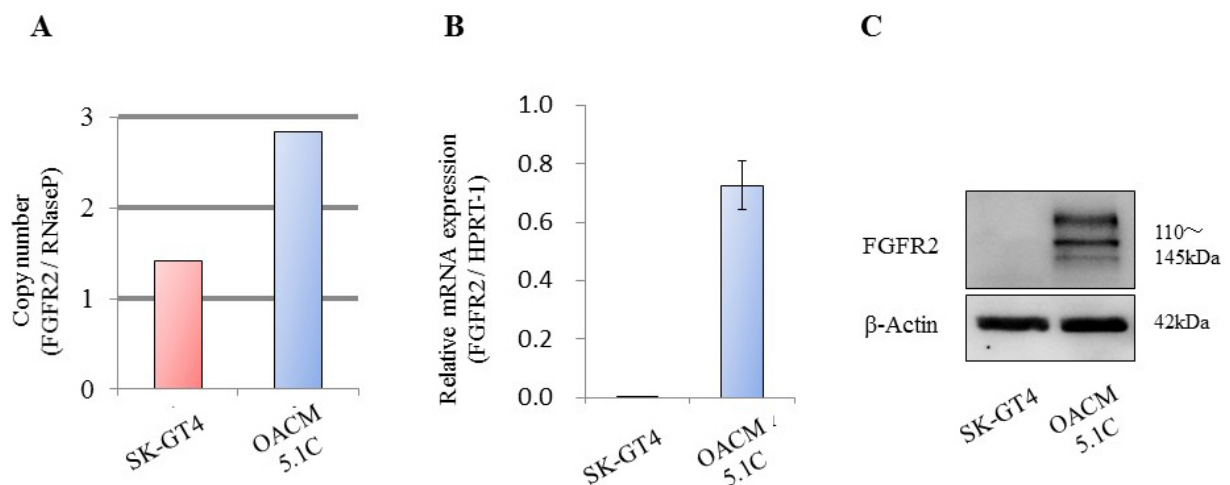


図 3. 食道接合部腺癌細胞株 SK-GT4 と OACM5.1 における FGFR2 コピー数, mRNA, FGFR2 タンパク発現.

SK-GT4 は FGFR2 のコピー数, mRNA, FGFR2 タンパク発現がいずれも低い細胞株であり, OACM5.1C はそれらがいずれも高い細胞株であった.

2 種類の si-RNA (si FGFR2-2, FGFR2-3) を作製し, FGFR2 コピー数の増幅を認めた OACM5.1 を用いて, FGFR2 タンパクの発現を抑えることができることを確認した (図 4A). これらの si-RNA を用いて, OACM5.1 の細胞増殖が

著明に抑制されることを確認した ($P < 0.01$, 図 4B). また, FGFR2 を si-RNA で抑えることによって, 有意に浸潤能 ($P < 0.05$) とアポトーシス ($P < 0.05$) を抑制できることが明らかになった.

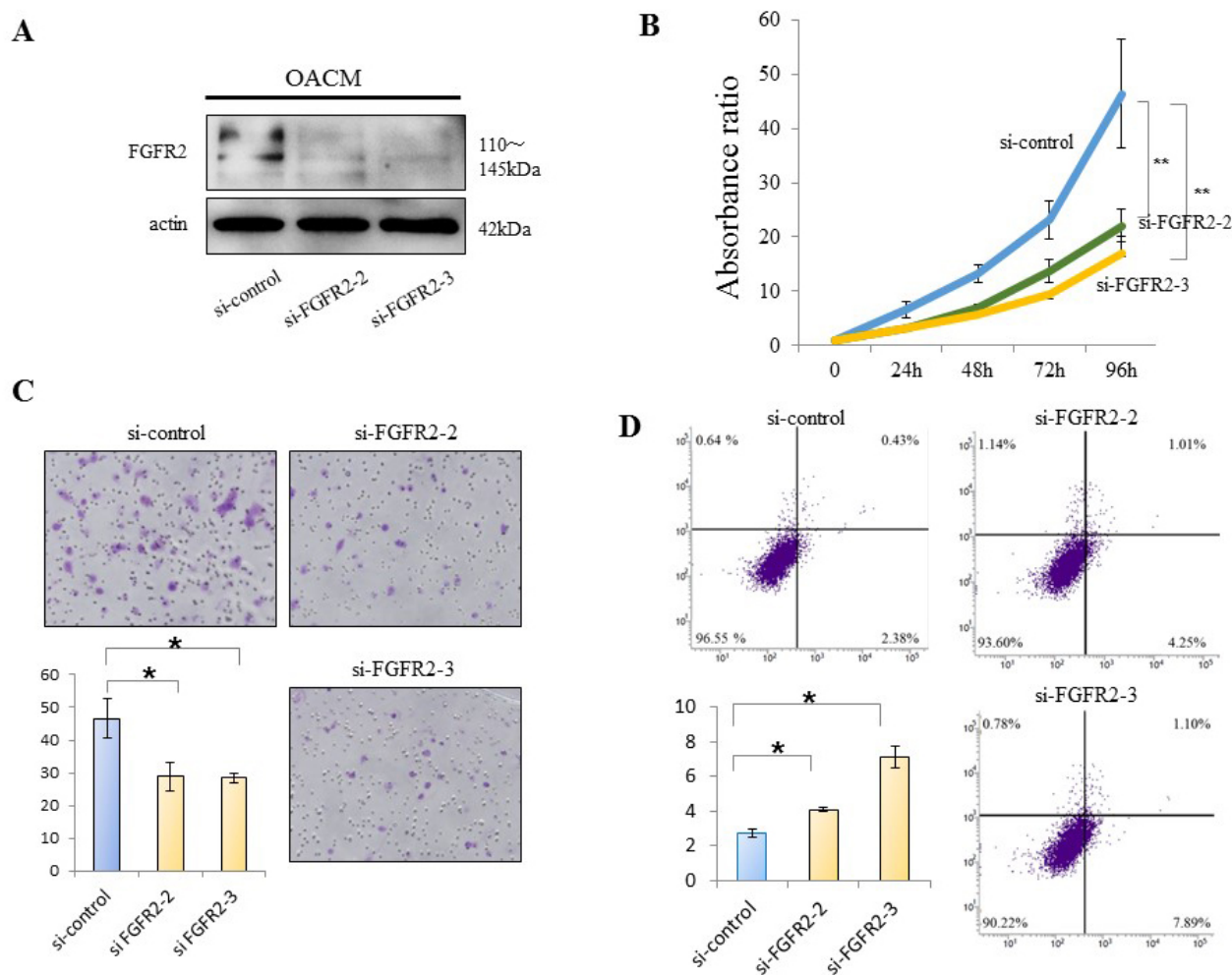


図 4. 食道胃接合部腺癌細胞株 OACM5.1C における siRNA による FGFR2 の発現抑制と phenotype の変化.

A) siRNA による FGFR2 の抑制確認. B) Proliferation assay. C) Invasion assay. D) Apoptosis assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (いずれも Student's t 検定).

考 察

FGFR とは Fibroblast growth factor (FGF) と高い親和性をもつチロシンキナーゼレセプターであり, FGFR1, 2, 3, 4 が存在する. その遺伝子である FGFR の活性化は Oncogenic な働きを持つとされている⁴⁾. FGFR2 と癌との関連は, FGFR2 遺伝子変異 (Mutation) が子宮内膜癌⁵⁾, FGFR2 遺伝子増幅 (Amplification) が胃癌 (低分化型)^{6,7)}で報告されている. 大腸癌においては FGFR2 の過剰発現が転移浸潤と関与することが報告されている⁷⁾. FGFR2 の発現が食道胃接合部癌の発癌に関与するという免疫染色レベルでの報告はあるものの⁸⁾, 臨床病理学的因子との相関は認められなかった.

本研究では, Siewert I~III 型の食道胃接合部癌において, FGFR2 タンパクの高発現を約半数の症例認め, FGFR2 高発現腫瘍は深達度が深く, リンパ節転移を伴うものが多く, 予後不良な腫瘍であることが判明した. また, 細胞株による実験では FGFR2 のコピー数の増加が, FGFR2 タンパク高発現の原因であり, FGFR2 の転写を特異的に阻害することで, 細胞レベルでの proliferation, invasion を進行させ, apoptosis を阻害することで cell survival へ寄与している

ことが示された。ゆえに、FGFR2 は食道胃接合部癌の悪性度を進行させる重要な分子であると考えられ、本疾患における分子標的治療のターゲットになりうると考えられた。

今後の展開としては、本研究において、臨床検体における FGFR2 のコピー数の増加が臨床病理学的因子とどのように関連し、予後因子となりうるかどうかである。現時点で 58 症例における FGFR2 コピー数の解析を行った結果、約 21% の症例において FGFR2 のコピー数の増加を認めた。以前米国での症例に基づいたデータ（約 7%）よりも多い。理由としては、方法論やカットオフの問題があるであろう。今回の検討では、頻用されている Taman copy number assay kit を用い、一般的に用いられているカットオフ値を 2 に設定した。FGFR2/RNaseP 比=2.8 を示した OACM5.1 では FGFR2 が明らかに細胞の悪性化に関与していることが示され、カットオフ値は妥当であると考えられた。一方で、この 21% という FGFR2 遺伝子増幅症例の割合は、今回我々が確認した免疫染色での高発現の割合 (54.5%) よりも少ない。今後、これらのコピー数の変化が免疫染色とどのように関連し、FGFR2 の免疫染色とコピー数の変化のどちらがこの疾患のバイオマーカーになりうるのか、非常に興味深い。また、FGFR2 の下流シグナルの解明や、FGFR 阻害剤で加療を行った際の抵抗性メカニズムの解明も重要であると考えられる。今後も精力的に研究を重ねていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は熊本大学大学院生命科学研究部消化器外科学分野大学院生の徳永竜馬君と実験補佐員の緒方陽子である。本稿を終えるにあたり、本研究にご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Reid, B. J., Li, X., Galipeau, P. C. & Vaughan, T. L. : Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nat. Rev. Cancer*, **10** : 87-101, 2010.
- 2) Kusano, C., Gotoda, T., Khor, C. J., Katai, H., Kato, H., Taniguchi, H. & Shimoda, T. : Changing trends in the proportion of adenocarcinoma of the esophagogastric junction in a large tertiary referral center in Japan. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **23** : 1662-1665, 2008.
- 3) Dulak, A. M., Schumacher, S. E., van Lieshout, J., Imamura, Y., Fox, C., Shim, B., Ramos, A. H., Saksena, G., Baca, S. C., Baselga, J., Tabernero, J., Barretina, J., Enginger, P. C., Corso, G., Roviello, F., Lin, L., Bandla, S., Luketich, J. D., Pennathur, A., Meyerson, M., Ogino, S., Shivdasani, R. A., Beer, D. G., Godfrey, T. E., Beroukhi, R. & Bass, A. J. : Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res.*, **72** : 4383-4393, 2012.
- 4) Brooks, A. N., Kilgour, E. & Smith, P. D. : Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin. Cancer Res.*, **18** : 1855-1862, 2012.
- 5) Dutt, A., Salvesen, H. B., Chen, T. H., Ramos, A. H., Onofrio, R. C., Hatton, C., Nicoletti, R., Winckler, W., Grewal, R., Hanna, M., Wyhs, N., Ziaugra, L., Richter, D. J., Trovik, J., Engelsens, I. B., Stefansson, I. M., Fennell, T., Cibulskis, K., Zody, M. C., Akslen, L. A., Gabriel, S., Wong, K. K., Sellers, W. R., Meyerson, M. & Greulich, H. : Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105** : 8713-8717, 2008.
- 6) Wesche, J., Haglund, K. & Haugsten, E. M. : Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem. J.*, **437** : 199-213, 2011.
- 7) Kunii, K., Davis, L., Gorenstein, J., Hatch, H., Yashiro, M., Di Bacco, A., Elbi, C. & Lutterbach, B. : FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer Res.*, **68** : 2340-2348, 2008.
- 8) Paterson, A. L., O'Donovan, M., Provenzano, E., Murray, L. J., Coleman, H. G., Johnson, B. T., McManus, D. T., Novelli, M., Lovat, L. B. & Fitzgerald, R. C. : Characterization of the timing and prevalence of receptor tyrosine kinase expression changes in oesophageal carcinogenesis. *J. Pathol.*, **230** : 118-128, 2013.