

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18448

研究課題名(和文)腎癌におけるFGFR4の働きと新規治療戦略の開発

研究課題名(英文)Role of FGFR4 in clear cell renal carcinoma and its potential as a new drug target.

研究代表者

櫻井 俊彦 (Sakurai, Toshihiko)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60534154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：淡明型腎細胞癌遺伝子網羅解析の結果、FGFR4遺伝子コピー数の増加が特徴的であることから、FGFR4の淡明型腎細胞癌増殖における役割を調査し、新規治療標的としての可能性について検討を行った。腎癌患者臨床検体と細胞株を用いて、免疫組織化学染色、ウエスタンブロットとqRT-PCR法で、FGFR4蛋白発現量と遺伝子数の関連を認めた。siRNA法によるFGFR4ノックダウンを行い、細胞生存を評価したところ、FGFR4ノックダウンによって細胞死が誘導され、細胞内増殖因子のリン酸化阻害も認めた。選択的FGFR4阻害剤のBLU9931を用いても同様の結果が得られ、細胞死解析でもアポトーシス誘導が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive genetic analysis of ccRCC in Japanese patients has reported that the tumors have an increased copy number of the FGFR4 gene. We analyzed the role of FGFR4-mediated signals in ccRCC, and investigated a possibility as new therapeutic target. FGFR4 expression was analyzed via IHC. FGFR4 gene-CN determined using qRT-PCR. Protein expression levels were determined via Western blotting. We determined the effect of FGFR4 knockdown and FGFR4 inhibitor, via MTS assay. Analysis of cell death was conducted using FACS. IHC revealed an increase in expression of FGFR4 in clinical specimens. FGFR4 expression was also confirmed in WB in RCC cell line. Suppression of cell proliferation was confirmed via siFGFR4 knockdown, pAKT, pERK1/2 was also inhibited. Cell proliferation was suppressed also in BLU9931. Cell death analysis revealed that apoptosis was induced. Therefore we think FGFR4 is involved in proliferative signaling in ccRCC.

研究分野：泌尿器科悪性腫瘍

キーワード：腎癌 線維芽細胞増殖因子受容体4

1. 研究開始当初の背景

転移性腎癌治療において、治療成績は分子標的薬の出現で飛躍的に改善しているが、未だ致命的な疾患である。血管新生阻害を目的とした分子標的薬に対する耐性の克服または新たな治療標的の探索が重要な臨床的課題の一つである。

日本人の淡明型腎細胞癌遺伝子網羅解析に関する文献から、FGFR4 遺伝子コピー数増加が示されており、我々は FGFR4 を介した直接的な細胞増殖シグナルが淡明型腎細胞癌増殖に寄与している可能性を考えた。また既存分子標的薬作用の迂回路として、治療耐性獲得に寄与する可能性にも注目した。

2. 研究の目的

FGFR4 が淡明型腎細胞癌の増殖にどのように寄与するかを調査すること。FGFR4 の寄与が認められた場合、新規治療標的の一つとしての可能性についても探索すること。

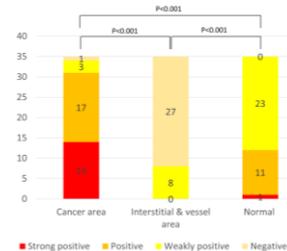
3. 研究の方法

- ① 実臨床検体（有転移腎癌患者の腎癌摘出標本）を用いて、免疫組織化学染色法による FGFR4 染色を行い、腎癌組織と正常腎組織での FGFR4 発現量の差を評価した。また対応する検体から DNA を抽出し、qRT-PCR 法による FGFR4 遺伝子コピー数を正常腎組織との相対定量法で算出し、蛋白発現と遺伝子コピー数の相関を評価した。
- ② 腎癌細胞株を用いて、ウェスタンブロット法による FGFR4 蛋白発現量を半定量し、qRT-PCR 法による FGFR4 遺伝子コピー数との相関を評価した。
- ③ 腎癌細胞株において、FGFR4 を siRNA 法でノックダウンを行い、細胞増殖能に与える影響を MTS アッセイを用いて評価し、顕微鏡下にも評価を合わせて行った。
- ④ FGFR4 ノックダウンを行った細胞株から溶出したサンプルを用いて、細胞内増殖シグナルの変化を AKT、ERK1/2、STAT3 の三経路においてリン酸化推移を追跡し評価した。
- ⑤ 選択的 FGFR4 阻害剤 (BLU9931) を用いて、細胞増殖を阻害するか、MTS アッセイおよびウェスタンブロットによる細胞内シグナル発現解析で評価した。
- ⑥ BLU9931 添加後の細胞死の意味について、

アポトーシス誘導によるものか、蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーによる評価を Caspase3/7、AnnexinV について行った。

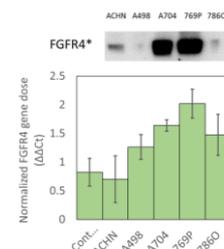
4. 研究成果

①有転移淡明型腎癌の FGFR4 免疫染色結果では、腎癌組織では正常部よりも FGFR4 発現増加を認めた。また同様の検体のうち、DNA 抽出が可能だった 15 検体で FGFR4 遺伝子コピー数の qRT-PCR 評価を行った所、免疫染色での FGFR4 発現量との相関を認めた。



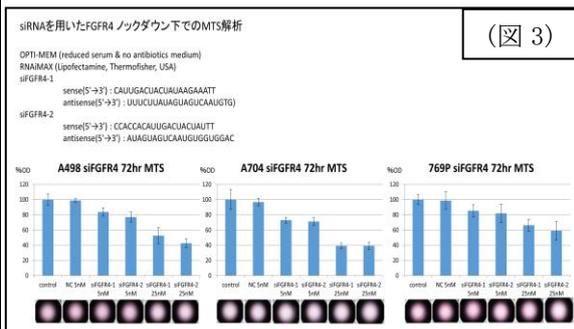
(図 1)

②腎癌細胞株 (ACHN, A498, A704, 769p, 786o) の FGFR4 蛋白発現量と FGFR4 遺伝子コピー数の比較検討を行った。臨床検体と同様、FGFR4 コピー数と発現量には関連があることが(図 2)より示唆され、FGFR4 遺伝子増幅が蛋白の機能発現増加の原因になっている可能性が推察された。



(図 2)

③FGFR4 を siRNA ノックダウンし、72 時間後の細胞生存数を MTS アッセイ (図 3) で比較する事で、FGFR4 シグナルが細胞増殖に寄与している可能性について評価した。

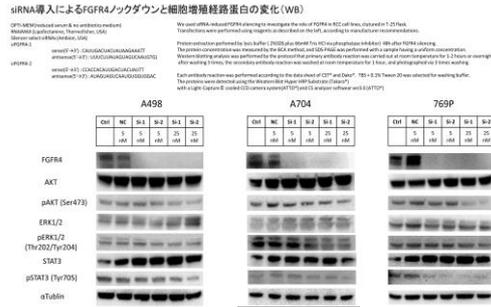


(図 3)

2 種の siFGFR4 ノックダウン後、両者ともに対象と非特異対象と比べても 2-4 割程度の細胞数差が 72 時間で発生する事が確認された。

④FGFR4 ノックダウンが生細胞数の減少に与える影響を、下流の細胞増殖シグナルのリン酸化を見ることから評価した。既存の報告より、通常チロシンキナーゼ受容体としては AKT/mTOR 経路、MAPK 経路との関連が重要視されているが、FGF/FGFR 経路では STAT3 も関与していることが言われており、3 経路に

ついて評価を行った。



(図 4)

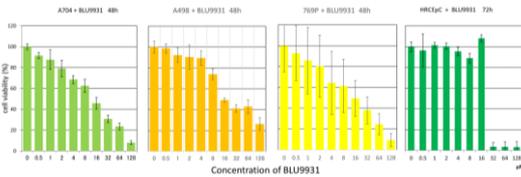
FGFR4 ノックダウンに伴い Akt, ERK1/2, STAT3 のリン酸化レベルが低下する事が確認された。

本来 FGF/FGFR 経路は腫瘍の血管新生などの癌生存環境への関与に関する報告が多いが、淡明型腎細胞癌においては癌直接的な増殖シグナルの一つになっている可能性があるかと推察した。

そこで選択的 FGFR4 阻害剤として販売されている小分子化合物の BLU9931 を用い、治療応用の可能性を探索する事とした。(BLU9931 は FGFR4 のみを選択的かつ非可逆的に阻害する薬物で、現在臨床試験応用には他癌腫でも至っていない、比較的新しく、データベース上の受容体阻害効果が現在最も強いとされる化合物である。)

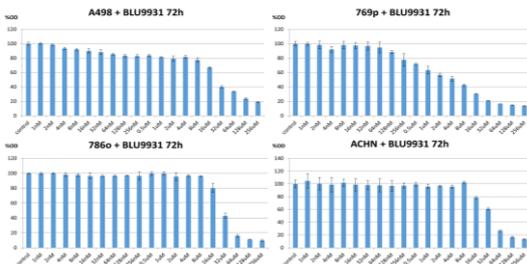
⑤BLU9931 を用いた腎癌細胞株の細胞増殖抑制評価 (MTS アッセイ) では BLU9931 は nM レベルで 20%程度の細胞増殖抑制を 72 時間で認め、uM レベルになると濃度依存性に細胞死を引き起こすようになることが示された。

また正常尿細管上皮細胞株での検討では 32uM で毒性を示すことが判明した。(図 5)



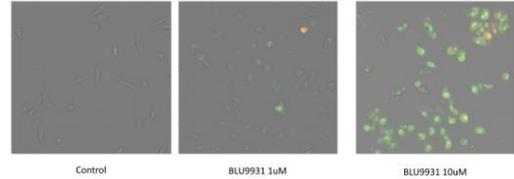
(図 5)

また nM レベルでの検討では、PTEN 異常が一般に知られている細胞株 786o および乳頭状腎癌の形質とされる ACHN においては効果が弱く、形質的にも淡明型腎細胞癌らしい細胞株においてより効果が見られた。(図 6)

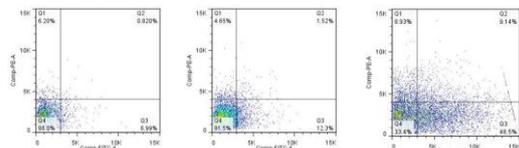


(図 6)

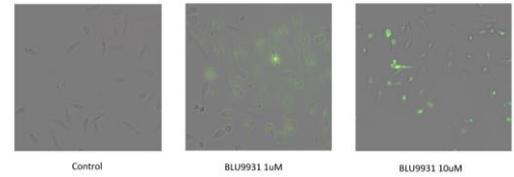
⑥BLU9931 投与後の細胞死について、siFGFR4 検討の際にも確認された細胞増殖シグナルの軽減からくるアポトーシス誘導であることを確認するため、細胞の形態学的観察と AnnexinV や Caspase3/7 といったアポトーシスマーカーと合わせて、蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーによる評価を行った。



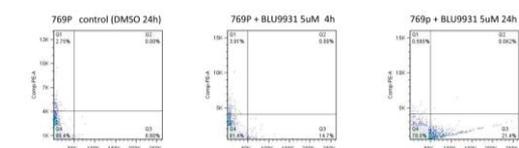
(図 7: A498 細胞株に BLU9931 添加 4 時間後の AnnexinV 反応(緑)を生細胞下に観察)



(図 8: 769p 細胞株に BLU9931 添加 4 時間後の AnnexinV 反応(X 軸/FITC)を FACS で定量)



(図 9: A498 細胞株に BLU9931 添加 4 時間後の Caspase3/7 (緑)を生細胞下に観察)



(図 10: 769p 細胞株に BLU9931 添加 4 時間後の Caspase3/7 反応(X 軸/FITC)を FACS 定量)

AnnexinV を早期アポトーシスとして、Caspase3/7 を中期としての指標に用い、顕微鏡下にも FACS でもアポトーシス反応を引き起こし、BLU9931 濃度依存的にその誘導活性は高まる可能性が示唆された。

以上の研究結果より、淡明型腎細胞癌の増殖シグナルの一つとして FGFR4 も関与している可能性があり、治療標的となりうる可能性がある。また FGFR4 選択的阻害剤である BLU9931 は標的が単独であるにもかかわらず腎癌増殖を抑制する事から、比較的臨床応用しやすい新規薬剤としての可能性はあるが、動物実

験も含めた今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 第76回日本癌学会学術総会(2017 横浜)
成澤貴史、桜井俊彦、土谷順彦 ほか

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記事項なし

5. 研究組織

(1) 研究代表者

桜井 俊彦 (SAKURAI, Toshihiko)

山形大学医学部
腎泌尿器外科学講座 助教

研究者番号：60534154