

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09328

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌におけるFGFR遺伝子異常の解明と検出

研究課題名(英文) The analysis of the FGFR gene abnormalities in the head and neck squamous cell carcinoma.

研究代表者

肥後 隆三郎 (Ryuzaburo, Higo)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10301110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：FGFRは受容体型チロシンキナーゼファミリーに属しFGFR1-4のファミリーを構成している。頭頸部扁平上皮癌のFGFRのプロファイルは未だ不明であり本研究では頭頸部癌におけるFGFRの Insertion/deletion (Indel) および Single nucleotide Polymorphism (SNP) について解析した。Indelは16の変異を認め、SNPはexonic部で26の変異を認めた。変異はFGFR4で多く認められた。FGFR4遺伝子異常がみられた癌種の報告は少なく頭頸部癌の発癌との関連について今後FGFR4遺伝子異常について研究を進めるが必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGFRを介して伝達されるシグナルはMAPK経路やPI3K/AKT経路に流れ、細胞増殖、血管新生、細胞遊走、浸潤、転移などに関わる。FGFR阻害薬は頭頸部扁平上皮癌においても治療効果が期待され、本研究では頭頸部扁平上皮癌治療に対しFGFR阻害薬が効果を示す症例を明らかにするためFGFR遺伝子異常の解析を行った。今後これらの異常に対し有効な治療薬の開発など研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated genomic abnormalities of fibroblast growth factor receptor 1,2,3 and 4 of the head and neck cancer (HNC). Insertion/deletion (Indel) and Single nucleotide Polymorphism (SNP) were analyzed, using Next-generation sequencer. Whole Exome Sequencing (WES) was adopted. Sixteen Indels were detected in oropharyngeal and hypopharyngeal cancers, and the most abnormalities was detected in FGFR2 (9 Indels). Those were included in intronic sequence of the reference gene (GRCh38/hg38). Eighty four SNPs were detected in oropharyngeal and hypopharyngeal cancers. The most abnormalities in exonic sequence was detected in FGFR4 (13 SNPs). The role of FGFR4, concerning the mechanism of carcinogenesis, is still unknown. Thus, the relationships between carcinogenesis and FGFR4 of the HNC are thought to be the next target to study.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：頭頸部癌 扁平上皮癌 線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) 遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

癌に対する治療戦略は分子標的治療薬の登場によって大きく変化した。特に肺癌についてはドライバー遺伝子変異による治療の個別化が進んでいる。翻ってみた場合、頭頸部扁平上皮癌に対する分子標的治療薬の治療戦略はまだ十分な検討がされていない。本邦においてがん治療の分子標的薬治療の先駆けとなったのは 2002 年に肺癌に対し承認された epidermal growth factor (EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬のゲフィニチブであり、2004 年に EGFR 遺伝子活性化変異が最大の効果予測因子として同定され変異陽性患者に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の劇的な治療効果を目の当たりにして以降、ドライバー遺伝子異常の同定とそれに対する分子標的治療薬の適用が本格的となった。頭頸部扁平上皮癌に対しても EGFR 阻害薬（セツキシマブ）が保険収載され、実臨床に取り入れられている。しかしながら実際の臨床の場においては予想された効果を下まわり、未だ決定打となるものではない。

線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) 阻害薬はその機序から頭頸部扁平上皮癌に対し効果が期待されるが、頭頸部扁平上皮癌におけるプロファイルは未だ不明瞭であり、どの症例に対し治療効果が得られるかを予測する因子が明らかにされる必要がある。FGFR は、受容体型チロシンキナーゼファミリーに属しているキナーゼで、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 により FGFR ファミリーを構成している。リガンドは線維芽細胞増殖因子 (FGF) であり、22 種の構造的に類似したタンパク質がファミリーを構成している。FGFR を介して伝達されるシグナルは MAPK 経路や PI3K/AKT 経路に流れ、このシグナル伝達は、癌においては、細胞増殖、血管新生、細胞遊走、浸潤、転移などに関わっている。また FGFR は、過剰発現、遺伝子過増幅、変異、転座によって活性化することが報告されている。

例えば FGFR3 は多発性骨髄腫で遺伝子転座、膀胱癌で遺伝子変異、卵巣癌、非小細胞性肺癌、肝細胞癌で過剰発現が知られている。また、転移性胆管癌、転移性乳癌および前立腺癌において FGFR2 遺伝子融合が検出されている。FGFR 遺伝子異常によって細胞内シグナル伝達の活性化が生じると、癌細胞がこれらの遺伝子の活性化に依存した状態、つまり癌遺伝子中毒 (oncogene addiction) 状態となる。そのため、異常 FGFR ドライバー遺伝子産物の活性を阻害する FGFR 阻害薬は、異常 FGFR ドライバー遺伝子が検出された癌に対して従来の殺細胞性抗癌剤よりも高い治療効果を示すことが期待される。

2. 研究の目的

治療選択においてはドライバー遺伝子変異の有無を知ることが重要であり、患者検体の遺伝子検査を行い治療標的となりうるドライバー遺伝子異常があれば、それを標的とした分子標的治療薬が選択されるべきである。当研究では今後頭頸部扁平上皮癌治療に導入が予想される FGFR 阻害薬が効果を示す症例を明らかにするため、頭頸部扁平上皮癌における FGFR 遺伝子異常の実態を解明を目的とした。

頭頸部扁平上皮癌では同じ扁平上皮癌であっても上咽頭癌では EB ウイルス、中咽頭癌では HPV ウイルスの関与が原因としてあがり、下咽頭癌では喫煙、アルコールによる発癌機序が推測されており遺伝子異常のプロファイリングは異なる。治療効果が得られない薬剤を用いることは患者に副作用をもたらすばかりでなく、分子標的薬は高価であり医療経済学的にみても不利益が大きい。今後頭頸部扁平上皮癌に導入が考慮される FGFR 阻害薬については、FGFR ドライバー遺伝子異常のプロファイリングが必須である。これにより頭頸部扁平上皮癌を遺伝子情報に基づいた個別化治療の対象とすることが可能となり、患者の利益と医療経済における多大な貢献が期待できるものである。

3. 研究の方法

本研究では、口腔、上咽頭、中咽頭、下咽頭、喉頭の各亜部位別より得られた臨床検体を用いて、FGFR 遺伝子の配列をサンガー法により解析し、結果を正常な遺伝子配列と比較することにより頭頸部扁平上皮癌における FGFR 遺伝子の変異を解析を試みた。研究の初期における計画では対象として口腔、上咽頭、中咽頭、下咽頭、喉頭の5亜部位からサンプルを採取し、各亜部位別に FGFR 遺伝子変異の検査を行う予定であった。しかしながら、喉頭癌と下咽頭癌で喉頭を手術で合併切除した症例においては脱灰の際に組織サンプルへの影響が大きく十分な核酸抽出ができないことが多いことが明らかとなったため、脱灰操作が必須となる喉頭癌症例は除外することとした。さらに下咽頭癌症例からも咽喉食摘後などの脱灰した手術標本から十分な核酸量を得ることができず解析を途中で中止せざるを得ない症例が生じた。また、コロナ禍によるエントリーの減少があり、研究期間内で研究に同意を得られた上咽頭癌、口腔癌が少なく、今回解析した症例は中咽頭癌、および脱灰の操作が加わらなかった（経口的切除症例など）下咽頭癌が対象となった。

これらの症例において癌診断のために行った生検サンプルあるいは手術の際に採取した組織サンプルを用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）切片を作成し扁平上皮癌の病理判定を行った。FFPE 切片の残余サンプルから切片サンプルのがんを一定割合以上含む部分を削りだし、削り取った組織サンプルから核酸（DNA+RNA）を抽出精製した。研究開始前の予定では抽出精製した核酸より FGFR 遺伝子配列をサンガー法による遺伝子解析を用いて調べて正常な遺伝子配列と比較することにより、頭頸部扁平上皮癌における FGFR 遺伝子の変異を解析することを目標としたが、エントリー数の減少でデータ解析が不十分となる可能性があり、FGFR 遺伝子のみならず FGFR 関連遺伝子なども解析できるようサンガー法から次世代シーケンサー（HiSeq2500 システム：illumina 社）を用いて WES（全エクソームシーケンシング:Whole Exome Sequencing）へ解析法を変更とした。最終的に中咽頭癌4例、下咽頭癌1例に対し WES 解析を行った。この結果をデータベース GRCh38/hg38 を対照として1) FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 における Insertion/deletion (Indel) の検出、2) FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 における SNP の評価を行った。

4. 研究成果

(1)FGFR1,2,3,4 における Insertion/deletion (Indel)の検出

今回検出された Indel は FGFR1 で1箇所、FGFR2 で9箇所、FGFR3 で3箇所、FGFR4 で4箇所であった(表1)。

表1 FGFR1,2,3,4 における Indel

	CHROM	POS	REF gene (GRCh38/hg38)	ALT
FGFR1	chr8	38419760	A	AAAGACTGCCCTTT
FGFR2	chr10	121482073	A	AAG
	chr10	121487218	TTTCTAAGGCCAGCTCCTGCACC	T
	chr10	121488237	T	TA
	chr10	121496830	T	TTTAAG
	chr10	121518152	G	GTA
	chr10	123270292	A	ATTTATTTTAT
	chr10	123279743	AGCTGT	A
	chr10	123279751	TGTCC	T
	chr10	123279756	AGAG	A
FGFR3	chr4	1807030	GC	G
	chr4	1807400	CGT	C
FGFR4	chr5	177090135	C	CGTGT
	chr5	177090135	C	CGT
	chr5	177093790	G	GA
	chr5	176516968	CGT	C

今回の研究では全ての症例に共通の Indel は検出されなかった。FGFR1 の変異の検出は 1 箇所のみであった。これまでの報告では FGFR1 遺伝子異常がみられる腫瘍として肺扁平上皮癌患者では FGFR1 遺伝子増幅や、8p11 骨髄増殖症候群で 100%の遺伝子変異が検出されている。頭頸部癌では今回の結果より FGFR1 の Indel は少ないものと考えられる。遺伝子増幅は症例数が少ないため今回の検討では残念ながら調べることができなかった。reference gene (REF) GRCh38/hg38 におけるこの Indel 部の function は intronic であり、exonic でないことよりこの Indel が発ガン機構に關与する可能性は低いと考えられる。FGFR2 では最も多く変異が検出された。中咽頭癌の 1 症例を除き全ての症例で FGFR2 の Indel が検出されている。FGFR2 の Indel が検出されなかった中咽頭癌症例において、転移リンパ節からの WES を施行することができたが、興味深いことにリンパ節転移からは 3 箇所の Indel が検出された (position 123279743 AGCTGT A、position 123279751 TGTCC T、position 123279756 AGAG A)。この結果より FGFR2 遺伝子においては primary と転移リンパ節で Indel が変化している可能性が示唆される。REF gene の function 対応部は 1 箇所が 3'側非翻訳領域、残りは intronic であり、Indel の検出は多いが発癌に關連する可能性は低いことが推測される。これまでの報告では FGFR2 の遺伝子変異は胆管癌において 13 ~14%の頻度で融合/再構成の報告があり、また転移性乳癌および前立腺癌において FGFR2 遺伝子融合の報告がある。頭頸部癌においても FGFR2 では Indel よりも遺伝子融合が關連する可能性が高いと推測される。FGFR3 に関しては検出数は少なく、また変異を呈した症例数も少なかった。また、これらは全て REF gene の対応 function 部位は intronic であった。FGFR3 は尿路上皮癌で最大 80%の遺伝子変異が発生するが、浸潤性の高グレード膀胱癌では 20%未満となると報告されている。FGFR3 は頭頸部扁平上皮癌においても Indel が發癌に關連する可能性あるものの頻度は少ないと思われる。FGFR4 では 4 箇所の Indel を検出した。これらは中咽頭癌 2 症例、下咽頭癌 1 症例からの検出であった。検出しなかった中咽頭癌症例では primary、転移リンパ節からの検出を共に認めなかった。検出した症例における REF gene の function は intronic であり、發癌に關連する可能性は少ないと推測されるが、これまで FGFR4 遺伝子異常がみられる癌種の報告は少なく、頭頸部癌における發癌との關連は今後の課題である。

(2) FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 における SNP の検出

FGFR1 においては 6 箇所 で SNP を認めた。全ての SNP の REF gene の function 部位は intronic であった。このうち中咽頭癌症例で、primary 部と転移リンパ節において chr8 position 38281914 G A の SNP が共通にみられた。FGFR2 においては 28 箇所 で SNP を認めた。REF gene の対応 function 部位で 5 箇所が exonic であった(表 2)。中咽頭癌の primary 部と転移リンパ節において chr10 position 123239112 G A、chr10 position 123298158 T

C は SNP が共通であった。FGFR3 においては 22 箇所 で SNP を認めた。このうち REF gene の対応 function 部位で 8 箇所が exonic であった(表 2)。FGFR3 においても、primary と転移リンパ節において chr4 position 1807894 G A の SNP が共通にみられた。FGFR4 においては 28 箇所 で SNP を認めた。このうち REF gene の対応 function 部位で 13 箇所が exonic であった(表 2)。primary と転移リンパ節において chr5 position 176517461 T G、chr5 position 176517797 C T、chr5 position 176518784 C T、chr5 position 176520243 G

A の 4 箇所 で共通の変異を認めた。今回の研究では SNP は FGFR4 が最も多い結果であった。これまでの報告では FGFR4 遺伝子異常がみられた癌種の報告は少ないことから頭頸部癌における發癌との關連について研究を進めるにあたり、FGFR4 遺伝子変異を集中的に行う

ことが必要であると考えらる。

表 2 exon 領域に認めた SNP

	CHROM	POS	REF	ALT	function
FGFR2	chr10	121479598	G	A	exonic
	chr10	121538644	T	C	exonic
	chr10	123239112	G	A	exonic
	chr10	123298158	T	C	exonic
	chr10	123310871	A	G	exonic
FGFR3	chr4	1799492	C	T	exonic
	chr4	1801509	C	T	exonic
	chr4	1801524	T	C	exonic
	chr4	1801977	T	C	exonic
	chr4	1804906	C	T	exonic
	chr4	1806167	G	A	exonic
	chr4	1807894	G	A	exonic
	chr4	1807894	G	A	exonic
FGFR4	chr5	177089630	G	A	exonic
	chr5	177090460	T	G	exonic
	chr5	177090796	C	T	exonic
	chr5	177091036	A	G	exonic
	chr5	177091783	C	T	exonic
	chr5	177093242	G	A	exonic
	chr5	176516631	G	A	exonic
	chr5	176517461	T	G	exonic
	chr5	176517797	C	T	exonic
	chr5	176518037	A	G	exonic
	chr5	176518784	C	T	exonic
	chr5	176520243	G	A	exonic
	chr5	176516608	G	A	exonic

今後これらの異常に対し、FGFR 阻害薬の効果があるか、またどの異常に対し最も有効な治療法となるかを、扁平上皮癌由来の cell line を用いて in vitro の研究への発展させるとともに、今後日本での治験導入時のバックグラウンドとして活用することを展望とする。

引用文献

- 1) Jackson CC, et al. 8p11 myeloproliferative syndrome: a review . Hum Pathol. 41:461-476, 2010.
- 2) Graham RP, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 translocations in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hum Pathol. 45:1630-1638, 2014.
- 3) Ross JS, et al. New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. Oncologist. 19:235-242,2014.
- 4) Dienstmann R, et al. Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. Ann Oncol. 25:552-563, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大峽 慎一 (Ohba Shinichi) (20549274)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	山内 宏一 (Yamauchi Hi rokazu) (70407047)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	中途退職にて分担者から削除済み

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関