

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16767

研究課題名（和文）FGFR2遺伝子増幅胃癌におけるFGFR2C3variantを標的とした研究

研究課題名（英文）Targeting FGFR2 C3 variant in FGFR2 amplified gastric cancer

研究代表者

足立 雄太（Adachi, Yuta）

愛知県がんセンター（研究所）・がん標的治療TR分野・主任研究員

研究者番号：30833842

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）：FGFR2C3 silencingがin vivo modelにおいても有効であることを検証すべくドキシサイクリン誘導shRNAの作成を試みた。当初shRNAの作成に難渋したが作成に成功し、in vitroの解析を行ったところドキシサイクリン添加によりFGFR2 C3の遺伝子発現が低下し、FGFR2の下流である下流シグナルの低下が確認できた。しかしin vivo皮下腫瘍モデルでの腫瘍増殖抑制は認められなかった。そこでin vivo siRNAを皮下腫瘍に直接注入することでFGFR2C3のノックダウンを試みたところ、腫瘍増殖抑制が確認できた一方で、その抗腫瘍効果は大きくなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

in vitroで確認できた細胞増殖抑制効果がin vivoで再現されなかった原因として薬剤送達という点が考慮された。またin vivoでの腫瘍微小環境による抵抗性獲得の可能性も十分に考えられ、今後の治療開発を進めるという観点からは妥当性を担保できない可能性が示唆され、in vivoにおける腫瘍増殖抑制効果を示すような、シーケンス及び核酸医薬の媒体を考慮する必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To verify that FGFR2C3 silencing is effective in vivo model, we attempted to create a doxycycline-induced shRNA for FGFR2-C3 transcript. After some initial difficulties in generating shRNAs, we succeeded in generating shRNAs, and in vitro analysis showed that the addition of doxycycline decreased FGFR2-C3 gene expression and downstream signaling of FGFR2. However, no inhibition of tumor growth was observed in vivo subcutaneous tumor model. Therefore, we attempted to knock down FGFR2-C3 gene by direct injection of in vivo siRNA into subcutaneous tumors, and while inhibition of tumor growth was confirmed, its antitumor effect was not significant compared with growth suppression we confirmed in vitro model.

研究分野：分子標的薬耐性

キーワード：FGFR2 分子標的薬耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌での FGFR2 遺伝子増幅は 1.2~4.9%で認められ、従来の殺細胞性抗癌薬治療においては予後不良因子とされており、新たな治療戦略が期待されている。FGFR2 遺伝子増幅胃癌は基礎的な検討では汎 FGFR 阻害薬感受性であり、臨床開発が期待されたが進行 FGFR2 遺伝子増幅胃癌に対する二次治療として Paclitaxel と汎 FGFR 阻害薬である AZD4547 の有効性を比較した第 Ⅲ 相試験では単剤での有効性を示すには至らなかった。しかしながら、*in vitro* の解析では FGFR2 遺伝子増幅胃癌細胞は FGFR2 経路に依存しており、同経路を標的とするのは合理的であると考えるが、汎 FGFR 阻害薬の on target effect として高 P 血症に代表される様々な有害事象が認められることが明らかとなっており、他薬剤との併用療法の観点からも、FGFR2 遺伝子増幅胃癌細胞における FGFR2 経路により標的を絞った治療戦略は患者の QOL を改善させる可能性を有するだけでなく、他薬剤との併用療法を考慮する上で重要であると考えられるが、今日まで明らかとされていない。

FGFR2 の splice variants の中でも C 末端の C3 variant が FGFR2 の下流生存シグナルの異常活性化及び癌化に関与しており、C3 splice variant は正常細胞には発現していないことが分かっている。FGFR2 C3 variant は FGFR2 遺伝子増幅胃癌細胞株及び FGFR 阻害薬感受性の臨床検体で認められており、FGFR2 C3 variant に対する標的治療は発現の認められない正常細胞に対する影響は汎 FGFR 阻害薬と比較して極めて少なくできることが予想される。

## 2. 研究の目的

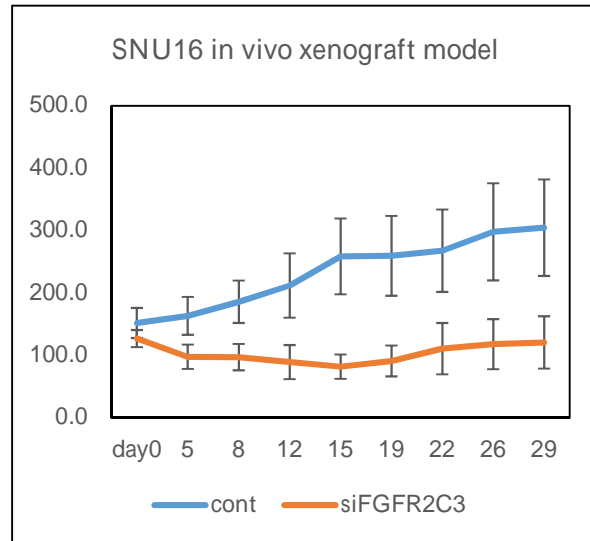
予備的検討において、FGFR2 C3 mRNA sequence を特異的に標的とした siRNA を作成し(これらの sequence は BLAST 検索により FGFR2 の splice variant のうち FGFR2 C3 にのみ存在する sequence を標的としている。また哺乳類細胞における、その他の重要な生物学的反応を規定するような因子に対する阻害効果を有さないものを選択した)、siRNA による FGFR2 C3 knockdown を *in vitro* で行った結果、FGFR2 の下流シグナルが抑制され、アポトーシスが誘導できた。一方でこれらの siRNA は正常線維芽細胞に対する増殖抑制及びアポトーシス誘導は認められなかった。以上から本研究の目的は FGFR2-C3 を標的とした治療の *in vivo* での有効性が明らかになることで、現在標的治療の対象となっていない FGFR2 遺伝子増幅胃癌に対して新たな治療戦略が提示することである。

## 3. 研究の方法

FGFR2 C3 splice variant に対する Tetracycline 誘導 shRNA を作製し、その *in vivo* での有効性を mouse xenograft model を用いて解析する。Mouse xenograft model での有効性が認められた場合はさらなる臨床応用の可能性を考慮し核酸医薬の観点から創薬化の可能性を探り、バイオマーカーとしての有用性も検討する。

## 4. 研究成果

FGFR2 遺伝子増幅胃癌細胞 (kato3, snu16)における FGFR2-C3 の silencing の in vivo mouse model においても有効であることを検証すべくドキシサイクリン誘導 shRNA の作成を試みた。当初 shRNA の作成に難渋したが、度重なる試行の末作成に成功し、in vitro の解析を行ったところドキシサイクリン添加により FGFR2 C3 の遺伝子発現が低下し、FGFR2 の下流である FRS2、ERK のリン酸化の低下が確認できた。しかし in vivo 皮下腫瘍モデルでの腫瘍増殖抑制は認められず、その原因として invitro における siRNA と比較しノックダウン効率が悪いことが考えられた。



そこで in vivo siRNA を皮下腫瘍に直接注入することで FGFR2-C3 のノックダウンを試みたところ、皮下腫瘍モデルで腫瘍増殖抑制が確認できた一方で、in vitro で確認できた著明な細胞増殖抑制効果と比較し、in vivo での抗腫瘍効果は大きくなかった。in vivo siRNA を投与した腫瘍を用いて定量的 PCR 解析を行うと、FGFR2C3 transcript の著明な抑制が認められていなかったことから、siRNA の in vivo における薬剤送達という点において改善を要する必要があるが、本研究要件の内容を大きく超えるものであり、その改善に至ることは困難と考えられた。また in vitro における抗腫瘍効果及びシグナル経路の解析から同シーケンスを標的とした核酸医薬の開発は有望であると考えられたが、上述の薬剤送達性のみならず、in vivo での腫瘍微少環境による抵抗性獲得の可能性も十分に考えられ、よって上記で示されるような発展的な課題へ進む妥当性が担保できないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Adachi Yuta, Ito Kentaro, Hayashi Yuko, Kimura Ryo, Tan Tuan Zea, Yamaguchi Rui, Ebi Hiromichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Epithelial-to-Mesenchymal Transition is a Cause of Both Intrinsic and Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibitor in KRAS G12C Mutant Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5962 ~ 5973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-20-2077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 足立雄太
2. 発表標題 EMT is a cause of both intrinsic and acquired resistance to KRAS G12C inhibitor in KRAS G12C mutant NSCLC
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 足立雄太
2. 発表標題 KRAS変異癌における標的治療耐性機構の克服
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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