

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592517

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌に対するFGFR2を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Fibroblast growth factor receptor 2 is associated with poor overall survival in clear cell carcinoma of the ovary and may be a novel therapeutic approach

研究代表者

板持 広明 (ITAMOCHI, Hiroaki)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：20314601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺癌112例の組織検体を用い、免疫組織化学にてFGFR2およびその下流のシグナル伝達経路の蛋白発現を検討した。

腫瘍組織中のFGFR2蛋白発現は96%の症例で観察された。FGFR2中・高発現群の生存率は有意に低く、その発現強度は独立予後因子であった。明細胞腺癌株に対するFGFR阻害剤(PD173074)のIC50は、FGFR2強発現株で有意に低かった。また、FGFR阻害剤添加によりpAktおよびpERK蛋白発現の抑制と、G1期停止が観察された。したがって、難治性卵巣明細胞腺癌においてFGFR2は重要なバイオマーカーであり、FGFR2経路を標的とした新規治療戦略の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We previously found that gene and protein expression of FGFR2 were increased in ovarian clear cell carcinoma (CCC); here, we examined FGFR2 expression in CCC tumor tissues and its correlation with clinical parameters. We also analyzed the effect of an FGFR inhibitor on the growth of CCC cells to investigate whether FGFR2 could be a therapeutic target for this disease. The expressions of FGFR2 were found in 96% of CCC. The 5-year survival rate for patients with a moderate or strong expression of FGFR2 was significantly lower than that for those with an absent or poor expression of FGFR2 (54% vs 79%). Multivariable analysis revealed that FGFR2 expression was independent prognostic factors. The FGFR inhibitor effectively suppressed the growth of CCC cells with induction of G1 cell cycle arrest and down-regulated the expression of phosphorylated Akt and phosphorylated ERK. We conclude that FGFR2 is an important biomarker predictive of patient outcome and is a potential target for CCC.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣明細胞腺癌 FGFR2

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮性卵巣癌に対するタキサン化合物とプラチナ製剤との併用化学療法は高い奏効率を示し、その短期予後を改善した。しかしながら、再発卵巣癌の多くは化学療法に抵抗性を示し、長期予後はいまだ不良である。一方、近年増加傾向にある卵巣明細胞腺癌は化学療法の奏効率が10%程度と非常に低く、進行例の予後は極めて不良である。卵巣癌治療において薬剤耐性は重要な予後因子であり、その克服が切望されている。さらに、卵巣癌においては、腫瘍の生物学的特性に基づいた治療の個別化や組織型別の治療法選択の必要性が指摘されている。

(2) これまでに、子宮内膜症の悪性化の検討(平成20-23年度文部科学省科学研究費補助金基盤研究(A))において、卵巣チョコレート嚢胞およびチョコレート嚢胞合併卵巣明細胞腺癌組織から上皮性分のみを単離し、網羅的遺伝子解析を行った。その結果、明細胞腺癌上皮では、fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) 遺伝子発現が著明に亢進していることをはじめに明らかにした。また、免疫組織学的検討により、明細胞腺癌上皮ではFGFR2 蛋白発現の亢進がみられることを確認した。

FGF 受容体は膜貫通ドメインを有する受容体型チロシンキナーゼであり、発生の様々な局面で重要な役割を果たしている。FGF 受容体にはFGFR1~4の4種類が存在するとともに、細胞外ドメインのスプライシングの違いによるアイソフォームが同定されている。また、FGFリガンドとして18種類がFGF受容体に結合し、その下流のシグナル伝達系を活性化し、その下流の経路としては、Ras-Raf-MAPK、PI3K-Akt、STAT、PLC $\gamma$  経路が知られており、細胞増殖促進、抗アポトーシス、浸潤能亢進および血管新生促進作用などを示す(図1)。

一方、FGF 受容体はその異常と抗がん剤感受性や癌患者の予後との関連が示唆されており、治療標的としても注目されている。現在、FGF 受容体を標的とした分子標的治療薬が開発され、乳癌や子宮内膜癌などの固形腫瘍を対象とした臨床試験が進行中である。

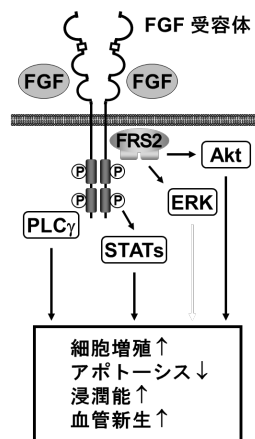


図1 FGF 受容体を介したシグナル伝達経路

2. 研究の目的

(1) 上皮性卵巣癌の新鮮凍結保存検体およびパラフィン包埋ブロックを用い、FGFR2 の遺伝子異常、蛋白発現量を検索する。これらの変化を組織型別に検討するとともに、化学療法の奏効率や患者の予後に与える影響を

検索する。

(2) 卵巣明細胞腺癌および漿液性腺癌由来細胞株を用いて、FGF 受容体阻害剤の細胞増殖抑制効果や、細胞生存シグナル伝達経路に与える影響を検討する。

以上の成績から、卵巣明細胞腺癌におけるFGFR2 のバイオマーカーとしての可能性を明らかにするとともに、FGFR2 制御による新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) FGFR2 の卵巣明細胞腺癌におけるバイオマーカーとしての可能性

岩手医科大学産婦人科、自治医科大学産科婦人科および鳥取大学医学部産科婦人科で治療を行い、同意が得られた卵巣明細胞腺癌112例を対象とした。手術時に採取した腫瘍組織検体を用いて、FGFR2 およびその下流のシグナル伝達経路であるPI3K p110 $\alpha$ 、PTEN、リン酸化(p-)Akt、p-mTOR、p-p70S6K、p-4E-BP1 ならびに明細胞腺癌の発癌への関与が示唆されているARID1A 蛋白発現を免疫組織化学で検索した。染色強度は Remmele and Stegner の immunoreactive score (IRS) を用いてスコアリングし、IRS 0点を無発現群、1-3点を低発現群、4-8点を中発現群、9点以上を高発現群と定義した。FGFR2 遺伝子増幅の有無は fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により検討した。生存率はKaplan-Meier 法で、有意差は log-rank 法を用いて検討するとともに、Cox の比例ハザードモデルを用いて予後因子解析を行った。

(2) FGFR2 の卵巣明細胞腺癌に対する治療標的としての可能性

卵巣明細胞腺癌由来細胞株11株(HAC-2、KK、KOC-7C、OVTOKO、OVAS、OVISE、OVMANA、OVSAYO、RMG-I、SMOV-2、TU-OC-1)および漿液性腺癌由来細胞株1株(KOC-2S)を用いた。FGFR2 およびその下流のシグナル伝達経路の蛋白発現を western blot 法にて検討した。また、FGFR のチロシンキナーゼ阻害剤である PD173074 を用いて、明細胞腺癌株に対する細胞増殖抑制効果を WST-8 assay により検討するとともに、PD173074 添加による細胞周期の変化を flow cytometry により検索した。

4. 研究成果

(1) FGFR2 の卵巣明細胞腺癌におけるバイオマーカーとしての可能性

対象症例のFIGO 進行期はIa期27例、Ic期47例、IIc期12例、IIIa期1例、IIIb期2例、IIIc期15例、IV期8例であった。腫瘍組織中のFGFR2 蛋白発現は96%(108/112)の症例で観察された(無発現群: 4例、低発現群: 55例、中発現群: 52例、

高発現群：1例）。FGFR2 遺伝子は検討した 13 例すべてで 2 倍以上の増幅がみられた。一方、ARID1A は 39% (44/112) の症例で欠失していた。FGFR2 および ARID1A 蛋白染色強度と進行期ならびに PI3K/Akt/mTOR 経路の蛋白染色強度との間に関連はみられなかった。累積 5 年生存率は FGFR2 蛋白の中および高発現群では 54% であり、無および低発現群の 79% に比して有意に低かった (図 2)。

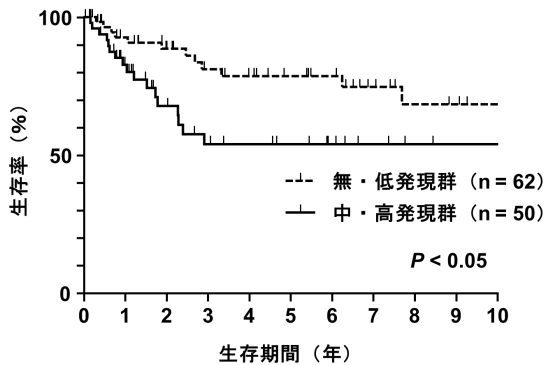


図2 FGFR2 蛋白染色強度と生存率

しかしながら、ARID1A および PI3K/Akt/mTOR 経路の蛋白染色強度と患者の予後との間に関連はみられなかった。多変量解析の結果、FGFR2 蛋白染色強度は進行期とともに独立予後因子であった (表)。

表 Coxの比例ハザードモデル

因子	ハザード比 (95%信頼区間)	P-value
進行期		
I・II期	7.247 (3.429 - 14.025)	<0.0001
III・IV期		
FGFR2		
無・低発現	2.162 (1.020 - 4.736)	0.0442
中・高発現		

したがって、卵巣明細胞腺癌において FGFR2 蛋白は予後予測マーカーとなることが明かとなった。

(2) FGFR2 の卵巣明細胞腺癌に対する治療標的としての可能性

検討したすべての卵巣癌株において FGFR2 および Ras/Raf/MAPK 経路、PI3K/Akt/mTOR 経路の蛋白発現を認めた。また、FGFR2 蛋白発現は明細胞腺癌 11 株中

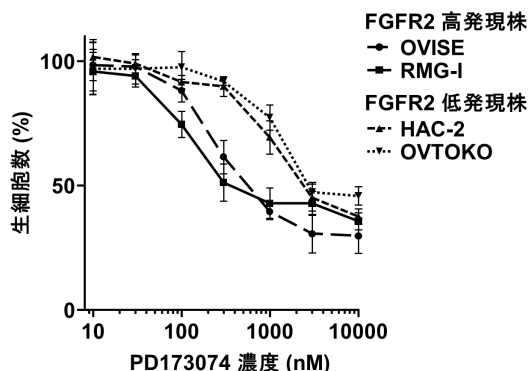


図3 FGFR 阻害剤感受性

8 株において、漿液性腺癌株に比して 5 倍以上の発現を認めた。本検討では、これら 8 株を FGFR2 高発現株と定義した。FGFR 阻害剤の感受性は、FGFR2 高発現株 (OVISE、RMG-I) で低発現株 (HAC-2、OVTOKO) に比して高かった (図 3)。FGFR2 高発現株では、FGFR 阻害剤添加により p-Akt および p-ERK 蛋白発現が著明に抑制された。また、FGFR 阻害剤添加により、FGFR2 高発現株 (OVISE、RMG-I) において有意な G1 期細胞比率の増加と S 期および G2/M 期細胞比率の低下が観察された (図 4)。

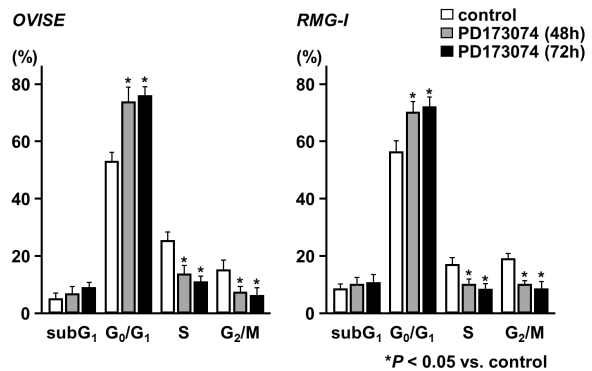


図4 FGFR 阻害剤曝露後の細胞周期の変化

したがって、卵巣明細胞腺癌において FGFR2 は治療標的となることが示唆された。

以上の成績から、難治性卵巣癌の一つである明細胞腺癌において FGFR2 は重要なバイオマーカーであるとともに、FGFR2 関連経路を標的とした新規治療戦略による予後改善が期待される。

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 5 件)

Itamochi H, Oumi N, Oishi T, Taniguchi F, Shoji T, Fujiwara H, Sugiyama T, Suzuki M, Kigawa J, Harada T. Fibroblast growth factor receptor 2 is associated with poor overall survival in clear cell carcinoma of the ovary and may be a novel therapeutic approach. *Int J Gynecol Cancer*, 25, 2015, 570-576, doi: 10.1097/IGC.0000000000000414 (査読有)

Itamochi H, Oumi N, Oishi T, Shoji T, Fujiwara H, Sugiyama T, Suzuki M, Kigawa J, Harada T. Loss of ARID1A expression is associated with poor prognosis in patients with stage I/II clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Clin Oncol*, 2015, Epub ahead of print. (査読有)

Kudoh A, Oishi T, Itamochi H, Sato S, Naniwa J, Sato S, Shimada M, Kigawa J, Harada T. Dual inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase and

mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach for mucinous adenocarcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*, 24, 2014, 444-453, doi: 10.1097/IGC.0000000000000091 (査読有)  
Itamochi H, Nishimura M, Oumi N, Kato M, Oishi T, Shimada M, Sato S, Naniwa J, Sato S, Kudoh A, Kigawa J, Harada H. Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 overcomes cisplatin resistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*, 24, 2014, 61-69, doi: 10.1097/IGC.0000000000000014 (査読有)  
Itamochi H, Kato M, Nishimura M, Oumi N, Oishi T, Shimada M, Sato S, Naniwa J, Sato S, Nonaka M, Kudoh A, Terakawa N, Kigawa J, Harada T. Establishment and characterization of a novel ovarian clear cell adenocarcinoma cell line, TU-OC-1, with a mutation in the PIK3CA gene. *Hum Cell*, 26, 2013, 121-127, doi: 10.1007/s13577-013-0062-y (査読有)

[学会発表](計2件)

Itamochi H, Oumi N, Oishi T, Taniguchi F, Shoji T, Saga Y, Fujiwara H, Shimada M, Sugiyama T, Suzuki M, Kigawa J, Harada T. Fibroblast growth factor receptor 2 is associated with poor overall survival in clear cell carcinoma of the ovary and may be a novel therapeutic approach. 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research、2015年4月21日、Philadelphia (United States of America)  
板持広明、卵巣明細胞腺癌に対する線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) 2 シグナル伝達経路を標的とした新規治療戦略 難治性卵巣癌の克服を目指して、第66回日本産科婦人科学会学術講演会、2014年4月19日、東京国際フォーラム (東京・千代田区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板持 広明 (ITAMOCHI, Hiroaki)  
鳥取大学・医学部・准教授  
研究者番号：20314601

### (2) 研究分担者

佐藤 慎也 (SATO, Syinya)  
鳥取大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10423261

佐藤 誠也 (SATO, Seiya)  
鳥取大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30621007

原田 省 (HARADA, Tasuku)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：40218649

島田 宗昭 (SHIMADA, Muneaki)  
鳥取大学・医学部・講師  
研究者番号：40362892

千酌 潤 (CHIKUMI, Jun)  
鳥取大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：70467702

大石 徹郎 (OISHI, Tetsuro)  
鳥取大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80359877

紀川 純三 (KIGAWA, Junzo)  
鳥取大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：00177784