

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293302

研究課題名(和文) 食道癌における繊維芽細胞増殖因子受容体様タンパクに対する抗体治療の研究

研究課題名(英文) Research on the treatment of esophageal cancer with anti-human fibroblast growth factor receptor like-1

研究代表者

嶋田 裕 (SHIMADA, Yutaka)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30216072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌においてFGFRL1が予後因子であり、さらにDuoLinkによりFGF2の作用下にFGFRL1とFGFR1またはFGFRL1とFGFR4が共にHeterodimerを形成することを明らかとした。FGFRL1ノックアウト細胞では細胞突起の減少、アクチンの形成障害、MMP-1の著明な減少が認められ、増殖速度の低下を生じた。マウス移植でも増殖速度の低下が認められ、組織所見では角化形成促進による分化傾向が認められた。さらに単独で80%の増殖抑制効果が得られる抗FGFRL1モノクローナル抗体の作成に成功した。以上より、食道癌患者における抗FGFRL1抗体治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified fibroblast growth factor receptor like-1 (FGFRL1) as the main prognostic factor among 5 different FGFR receptors. The DuoLink method revealed that FGFRL1 formed heterodimers with FGFR1, 3, and 4 following an inoculation with FGF-2. The phage display method showed anti-FGFRL1 antibodies in the blood of esophageal cancer patients. We then newly established an anti-FGFRL1 monoclonal antibody that inhibits (80%) the growth of several esophageal cancer cell lines in vitro.

We established two FGFRL1 knockout cells (KO15 and KO21). These cells reduced actin fragments, resulting in growth suppression not only in vitro, but also in vivo. A histological examination revealed that in contrast to parental cells, FGFRL1 knockout cells exhibited the ability to differentiate. Furthermore, the expression of MMP-1 was markedly suppressed in knockout cells. Our results demonstrate that anti-FGFRL1 treatments represent a promising strategy for esophageal cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌 FGFRL1 食道癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1)日本人の死亡原因の第一位は癌であり、中でも消化管癌は全癌の約1/2を占めており年々増加している。特に食道癌は進行癌での予後は不良であり、この現状を打破するためには新たな治療法の開発と癌の早期発見が不可欠である。

(2)食道癌進行癌の標準治療は5-Fu, CDDPによる術前治療とされているが(Ando N et al. Ann Surg Oncol 2012), Docetaxelを加えた化学療法ならびに、化学放射線療法の臨床試験が進行中である(JCOG試験)。しかしながら、これらは従来からの抗癌剤と放射線療法の組み合わせでしかなく、食道癌では他癌腫で導入されている分子標的剤に有効なものは認められていない。したがって、食道癌に対する抗体などの分子標的剤が渴望されてきた。

(3)一方、食道癌のバイオマーカーも SCC, Cyfra が未だに主体であり、早期発見が可能となるバイオマーカーは未同定である。近年導入された p53 抗体は早期癌検出にも有効であるとの報告がなされているが、それ以外のバイオマーカーは見いだされていない。我々は、以前に患者末梢血に自己腫瘍を同定する免疫細胞の存在を明らかとしてきたが(Kanaoka S et al. J Surg Res 1999), 同様にリンパ球が癌抗原に対する特異的抗体を弱いながらも発現していることが示唆され、食道癌にはまだ同定されていない癌特異的抗体が存在すると考えられる。

(4)我々は食道癌細胞株と切除標本の miRNA 解析から食道癌では mir210 が低下しておりそのターゲットとして Fibroblast growth factor receptor like -1 (FGFRL-1) を同定した(Tsuchiya S, Shimada Y et al. J Bio Chem 2011)。さらには血中に FGFRL1 細胞外ドメイン断片が放出されていることを見いだしていた。

(5)miRNA210 発現と FGFRL-1 は逆相関を示し、FGFRL-1 は細胞周期を通じて食道癌の細胞増殖に関与する。FGFRL-1 は FGFR5 として既に同定されていた FGF 受容体であるが細胞内ドメインが欠如していることから decoy receptor (囮受容体)とされ重要視されて来なかった(Trueb B et al. Genomics 2000)。

(6)しかしながら、miR210 での検討で、細胞増殖における関与が示唆されたことから、組織アレイによる食道癌組織での発現解析を行ったところ、FGFRL-1 発現症例は予後不良であった(Shimada Y. Esophagus 2013)。さらには組織アレイによる FGFR1,2,3,4, 発現との対比から FGFRL-1 が食道癌では主たる oncogenic driver gene であり、FGFR1 と FGFR4 がサポート機能を果たしている事が判明し

た。(Shimada Y AACR 2014)

(7)また polyclonal 抗体により mir210 と同等の細胞増殖抑制効果を認めたために、FGFRL-1 抗体による食道癌抗体治療の可能性が示唆された。

(8)一方、近年抗体の同定にバクテリオファージに抗体を提示させる、ファージディスプレイ法が開発されてきた(Winter G et al. Nature 1990)。連携研究者の伊東らはファージディスプレイにより提示させた抗体を効率よく濃縮同定する方法を開発した(Biol. Pharm. Bull.2007、J Biochem 2010)。

(9)この技術を応用し、食道癌患者の B リンパ球より産生される抗体をファージディスプレイ法により発現させ、その中からバイオパニングにて抗 FGFRL-1 ヒト抗体の精製ならびに食道癌特異的抗体の濃縮同定が可能であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

(1)FGFRL-1 機能を効率よく抑制する抑制抗体を作成し、その作用機序、正常細胞への作用の解析から食道癌治療の抗体標的治療の道を開き開く。血中 FGFRL-1 断片の食道癌におけるバイオマーカー可能性についても明らかにする。

(2)ファージディスプレイ法により、抗 FGFRL-1 ヒト抗体の精製を行うと共に食道癌特異的抗体のライブラリー作成から、FGFRL-1 に加えて有効な食道癌抗体を同定し、早期発見、経過評価のバイオマーカーとしての可能性を追求する。

## 3. 研究の方法

### (1)抗体作成

FGFRL-1 に対する抗体作成において、これまでの数種類の抗体の検討から、その増殖抑制力により標的部分を 50peptide 断片までに絞り込み、絞り込んだ部分に対するポリクローナル抗体を作成する。結合力がこれまでより数倍強力で、増殖抑制効果が得られればモノクローナル抗体作成に取りかかる。また立体構造から予測される FGF 結合部位に対する抗体も平行して作製する。

得られた抗体により食道癌細胞増殖抑制活性を検討し、マイクロアレイ、タンパク解析により作用機序の解明を行う。すなわち、シグナル伝達系の解析、ターゲット部位の特定、遺伝子変異の解析、癌部と正常部での差異などについて検討する。食道癌細胞株は我々がこれまでに樹立してきた 40 株以上の食道癌細胞株 KYSE-series (Shimada Y Cancer 1992)、10 株以上の正常食道上皮細胞株 (Kawabe A et al. Life Science 2003 など) より FGFRL-1 発現および細胞内シグナル伝達



ス調べたところ、IgG1 抗体および IgG2b 抗体であった。この中から in vitro での ADCC 活性も期待できる IgG2b 抗体である 2 抗体を選択し、精製抗体を約 100 mg ずつ調製した。

食道癌細胞株を皮下移植した担がんマウスに精製抗体を複数回投与し、in vivo における抗体の抗腫瘍活性を調べた結果、約 20% の腫瘍縮小効果が確認された (図 3)。

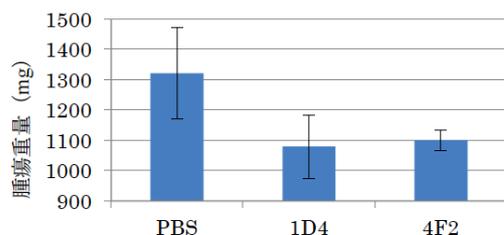


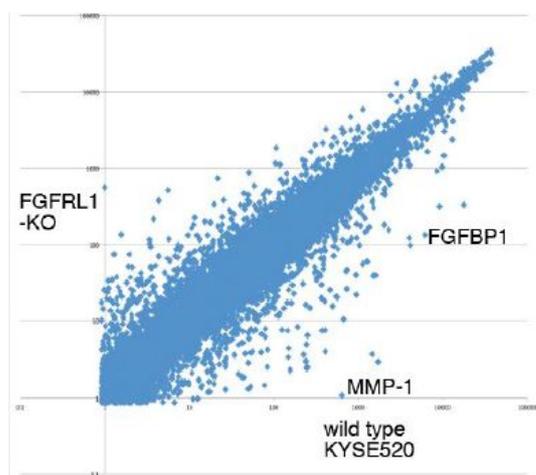
図3. 担がんマウスに対する抗腫瘍効果 (n=4)

現在、併用療法による効果判定を行うと共に抗体作用後のシグナル伝達系の解析中である。さらに動物実験に必要な量を確保するために大量培養中であり、抗体量が確保できた時点で動物実験の予定である。

#### (4)FGFRL1 ノックアウト細胞

FGFRL1 ノックアウト細胞では細胞突起の減少、アクチンの形成障害、増殖速度の低下が認められた。マウス移植でも増殖速度の低下が認められ、組織所見では角化形成促進による分化傾向が認められている。(投稿中)

さらには FGFRL1 のノックアウト細胞において FGFBP-1, MMP-1 の著明な減少が認められ、その他の変動遺伝子を含めて現在解析中である。(図 4、投稿中)



#### (5)血中バイオマーカー

血中 FGFRL1 断片の検出は感度が低く現時点では ELISA などによるバイオマーカーとはなり得なかった。今後継続の予定である。

#### (6)ファージディスプレイによる抗体解析

食道癌患者の抗体ライブラリーの作成を行い、食道癌患者における抗 FGFRL1 の存在が確認された。

リコンビナント FGFRL1 をターゲットにしたファージディスプレイによる抗体作成は、がん患者および健常人由来のリンパ球から抗体ライブラリーを作成した。FGFRL1 に対するバイオパニング (7-10 回) を経て、FGFRL1 に対する特異的な抗体の単離に成功した。得られた可溶性 scFV 抗体の FGFRL1 に対する結合親和性を確認した結果、解離定数  $KD = \text{約 } 10^{-6} \text{M}$  であり、可溶性 scFV 型抗体では結合力が弱いことがわかった。今後、全長の抗体に改変するなど抗体の改良が必要と思われる。

#### 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 8 件)

Shimada Y, Okumura T, Nagata T, Hashimoto I, Sawada S, Yoshida T, Fukuoka J, Shimizu K, Tsukada K. Expression analysis of fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1) in esophageal squamous cell carcinoma. Esophagus (2014) 11:48-53. 査読有  
DOI:10.1007/s10388-013-0394-4

Okumura T, Shimada Y, Moriyama M, Takei Y, Omura T, Sekine S, Nagata T, Shimizu K, Tsukada K. MicroRNA-203 inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma with restored epithelial tissue architecture in vivo. Int J Oncol. (2014) 44:1923-1932. 査読有  
DOI:10.3892/ijo.2014.2365

Okumura T, Shimada Y, Sakurai T, Hori R, Nagata T, Sakai Y, Tsukada K. Abnormal cell proliferation in the p75NTR-positive basal cell compartment of the esophageal epithelium during squamous carcinogenesis. Dis Esophagus. (2015) 28: 634-643. 査読有  
DOI:10.1111/dote.12245.

Okumura T, Shimada Y, Omura T, Hirano K, Nagata T, Tsukada K. MicroRNA Profiles to Predict Postoperative Prognosis in Patients with Small Cell Carcinoma of the Esophagus. AntiCancer Res (2015) 35:719-27. 査読有

Shimada Y, Okumura T, Takei Y, Watanabe K, Nagata T, Hori T, Tsuchiya S, Tsukada K, Shimizu K. Role of fibroblast growth factor receptors in esophageal squamous cell carcinoma. Esophagus (2016) 13:30-41. 査読有. DOI:10.1007/s10388-015-0486-4

Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. p75 neurotrophin receptor expression is a characteristic of the mitotically quiescent cancer stem cell population present in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* (2016) 48: 1943-1954. 査読有. DOI:10.3892/ijo.2016.3432.

Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. Detection of circulating tumor cells by p75NTR expression in patients with esophageal cancer. *World Journal of Surgical Oncology* (2016)14:40. 査読有 DOI:10.1186/s12957-016-0793-9.

Okumura T, Kojima H, Miwa T, Sekine S, Hashimoto I, Hojo S, Nagata T, Shimada Y. The expression of microRNA 574-3p as a predictor of postoperative outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology* (2016)14:228. 査読有 DOI:10.1186/s12957-016-0985-3

〔学会発表〕(計 4 件)

Shimada Y, Okumura T, Takei Y, Watanabe K, Nagata T, Tsukada K, Yamane A, Nishiyama M, Hirasawa A, Shimizu K. Establishment of an esophageal small cell carcinoma cell line (TYUC-1). 2015 annual meeting of AACR Philadelphia 2015.4.22

Shimada Y, Okumura T, Nagata T, Matsui K, Sawada S, Sekine S, Moriyama M, Hirano K, Arai H, Takei Y, Watanabe K, Tsukada K, Shimizu K. Three newly established pancreato-biliary carcinoma cell lines. 50th anniversary congress of ESSR. Liverpool 2015.06.13

Shimada Y, Takei Y, Watanabe K, Okumura T, Nagata T, Tsukada K, Fujinami H, Arima M, Abe T, Niwa Y, Tajika M, Sudo T, Shimizu K. Serum MicroRNA Expression Profiles As A Novel Diagnostic Biomarker For Esophageal Squamous Cell Carcinoma. 51th congress of the ESSR. Prague 2016.05.27

Shimada Y, Takei Y, Okumura T, Nagata T, Fujinami H, Arima M, Abe T, Niwa Y, Tajika M, Sudo T, Shimizu K. Circulating microRNA expression profiles as a novel diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. 108th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2017 Apr 1-5; Washington, DC. Philadelphia (PA)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 裕 (SHIMADA Yutaka)  
京都大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 30216072

(2) 研究分担者

清水 一治 (SHIMUZU Kazuharu)  
京都大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 50456836

武井 義則 (TAKEI Yoshinori)  
京都大学・薬学研究科・講師  
研究者番号: 30502455

(3) 連携研究者

伊東 祐二 (ITOU Yuji)  
鹿児島大学・理工学研究科・教授  
研究者番号: 60223195

土屋 創建 (TUCHIYA Soken)  
熊本大学・生命科学研究部・講師  
研究者番号: 80423002

丸澤 宏之 (MARUSAWA Hiroyuki)  
京都大学・医学(系)研究科・講師  
研究者番号: 80324630

大辻 英吾 (OHTSUJI Eigo)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科・教授  
研究者番号: 20244600

塚田 一博 (TSUKADA Kazuhiro)  
富山大学・医学薬学研究部(医学)・教授  
研究者番号: 90171967

松本 治 (MATSUMOTO Osamu)  
千葉科学大学・薬学部・教授  
研究者番号: 10231599

(4) 研究協力者

( )