

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 28日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591531

研究課題名（和文） FGFR2 IIIc アイソフォームの制御による膵臓癌の治療戦略

研究課題名（英文） Treatment strategy of pancreatic cancer by regulating FGFR2IIIc isoform

研究代表者

石渡 俊行 (ISHIWATA TOSHIYUKI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90203041

研究成果の概要（和文）：線維芽細胞増殖因子受容体 2 IIIc (FGFR-2 IIIc)は、ヒト膵臓癌症例の約70%に発現しており、FGFR-2 IIIc 陽性症例は術後の肝転移再発までの期間の短縮を認めた。FGFR-2 IIIc 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した膵臓癌培養細胞は、細胞増殖能の亢進と、皮下移植および同所移植腫瘍の体積の増大が見られた。FGFR-2 IIIc に対するポリクローナル抗体を作成し、膵臓癌培養細胞に投与したところ、細胞増殖能と遊走能が抑制された (Ishiwata, Am J Pathol, 2012)。FGFR-2 の別のアイソフォームである FGFR-2 IIIb へのスプライシングを促進させる epithelial splicing regulatory protein (ESRP) 1 を遺伝子導入すると、膵臓癌の転移が抑制された。以上より、膵臓癌の FGFR-2 IIIc の発現制御は、膵臓癌の治療標的となると考えられた。

研究成果の概要（英文）: Fibroblast Growth Factor Receptor 2 IIIc (FGFR-2 IIIc) was abundant in 70% of pancreatic cancer cases, which correlated with the decreased duration of the development of liver metastasis after surgery. FGFR-2 IIIc transfected cells exhibited increased proliferation in vitro and formed larger subcutaneous and orthotopic tumors. Suppression of FGFR-2 IIIc expression inhibited the proliferation of pancreatic cancer cells, whereas an anti-FGFR-2 IIIc antibody inhibited the proliferation and migration of the cells (Ishiwata et al., Am J Pathol, 2012). Epithelial Splicing Regulatory Protein 1 (ESRP1) binds the FGFR2 in the intron between exon IIIb and IIIc, and primarily promotes FGFR-2 IIIb expression. ESRP1 transfected pancreatic cancer cells formed significantly fewer liver metastases as compared to control cells. Thus, high FGFR-2 IIIc levels in pancreatic cancer contribute to disease aggressiveness, and FGFR-2 IIIc may be a novel and important therapeutic target in pancreatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000

2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：FGFR-2 IIIc, ESRP1, siRNA, 癌幹細胞、選択的スプライシング、線維芽細胞増殖因子受容体

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌の予後はきわめて不良で、5年生存率は5%にも満たないため、新たな治療手段の開発が待ち望まれていた。線維芽細胞増殖因子受容体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) には FGFR-1-4 の4種類があり、そのうち、FGFR-2 の single nucleotide polymorphisms (SNPs) が乳癌や子宮内膜癌の発癌と関連するとの報告が相次いでなされ、FGFR-2 の癌における発現とその役割が注目されていた。FGFR-2 IIIc と FGFR-2 IIIb は FGFR-2 のスプライシングアイソフォームで、組織特異的にその発現が制御されており、FGFR-2 IIIc は間葉系細胞に多く発現するのに対して FGFR-2 IIIb は上皮系細胞に主に発現する。FGFR-2 のリガンドには FGF1-23 があり、FGFR-2 のスプライシングアイソフォームの種類によって FGF との結合性が決定される。前立腺癌、膀胱癌においては、FGFR-2 IIIb から FGFR-2 IIIc へのクラススイッチが悪性度や上皮間葉転換 (EMT) と関連すると報告されていた。我々は、膵臓癌組織において、FGFR-2 IIIb とそのリガンドである FGF-7 が高発現していることを報告しており (Ishiwata et al, Am J Pathol: 1998)、FGFR-2 IIIb と FGF-7 を共発現している膵臓癌症例においては脈管侵襲が強く予後も悪いこと、膵臓癌細胞にリコンビナント FGF-7 を投与すると血管新生因子の vascular endothelial growth factor (VEGF)-A 発現が誘導されるこ

とも明らかにした (Cho et al, Am J Pathol 2007)。これらの結果より膵臓癌に発現している FGFR-2 IIIb は腫瘍血管新生を促進させ、癌の血行性転移に重要な役割を果たしていると考えられた。一方で、FGFR-1 の IIIc アイソフォームの発現増加により膵臓癌の増殖が亢進することが報告されていたが、FGFR-2 IIIc の役割は十分に解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

FGFR-2 IIIc の膵臓癌における発現機構及び作用機序を解明することで、FGFR-2 IIIc のシグナル伝達系阻害による新たな膵臓癌の分子標的治療薬の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 膵臓癌における FGFR-2 IIIc の発現の検討：117例の浸潤性膵管癌症例を用いて FGFR-2 IIIc の発現を酵素抗体法と ISH 法にて検討した。さらに6種類の膵臓癌培養細胞における FGFR-2 IIIc 発現を検討した。

(2) FGFR-2 IIIc 遺伝子発現ベクター導入膵臓細胞における検討：FGFR-2 IIIc 過剰発現膵臓癌細胞を作成し、*in vitro*での細胞動態と、同所移植、異所移植モデルを用いた *in vivo* 実験を行い、癌の増殖と転移への影響を検討した。さらに FGFR-2 IIIc に関連して活性化する細胞内シグナル伝達タンパクについて検討した。癌幹細胞との関連を検討するため、FGFR-2 IIIc 過剰発現細胞における side population (SP) 細胞と、sphere の形成

能についても検討した。

(3) FGFR-2 IIIc 抑制による、膵臓癌治療の可能性の検討:FGFR-2 IIIc に対する small interfering RNA (siRNA) と FGFR-2 IIIc 特異抗体を膵臓癌培養細胞に投与し、細胞動態の変化を検討した。

(4) Epithelial Splicing Regulatory Protein1 (ESRP1)によるスプライシングの調節:ESRP1 を膵臓癌培養細胞に遺伝子導入し、*in vitro* での細胞動態の変化と、肝転移の抑制効果を *in vivo* で検討した。

#### 4. 研究成果

6 種類すべての膵臓癌培養細胞において、FGFR-2 IIIc の発現が確認され、ヒト膵臓癌症例の約 70%にも FGFR-2 IIIc の高発現がみられた。FGFR-2 IIIc 陽性膵臓癌症例では、手術後の肝転移までの期間が有意に短いことが明らかとなった。内因性の FGFR-2 IIIc 発現の低い膵臓癌培養細胞 KLM-1 に、FGFR-2 IIIc 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入し安定過剰発現株を作成したところ、*in vitro* での細胞増殖能の亢進がみられ、皮下移植モデルにおいても対照群と比べ、腫瘍体積が増加し、同所移植でも肝転移の増加が確認された。一方、FGFR-2 IIIc に対する siRNA を作成し、PANC-1 細胞に導入したところ、細胞増殖の抑制が認められた。さらに FGFR-2 IIIc に対するポリクローナル抗体を作成し、PANC-1 細胞に投与したところ、用量依存性に増殖抑制効果が認められ、細胞の遊走能も抑制された。細胞内シグナル伝達系では、ERK の活性化が FGFR-2 IIIc と関連していた。多くの膵臓癌症例で FGFR-2 IIIc が発現しており、その機能を siRNA または抗体によって制御することは、新たな膵臓癌治療法となる可能性が示唆された。

さらに、FGFR-2 IIIb へのスプライシングを促進させる ESRP-1 を膵臓癌細胞に遺伝子

導入すると肝転移が抑制された。FGFR-2 IIIc 過剰発現膵臓癌細胞では、SP 細胞が増加し、sphere 形成も亢進することから、FGFR-2 IIIc が癌幹細胞機能の調節に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

#### 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 10 件)

1. Kure S, Matsuda Y, Hagio M, Ueda J, Naito Z, Ishiwata T: Expression of Cancer Stem Cell Markers in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias and Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Int J Oncol.* 41:1314-1324, 2012 (査読有)
2. Matsuda Y, Hagio M, Seya T, Ishiwata T: Fibroblast Growth Factor Receptor 2 IIIc as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics.* 11(9):2010-20, 2012 (査読有)
3. Hagio M, Matsuda Y, Suzuki T, Ishiwata T: Nestin regulates epithelial-mesenchymal transition marker expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Molecular and Clinical Oncology.* 1:83-87, 2013 (査読有)
4. Ishiwata T, Matsuda Y, Yamamoto T, Uchida E, Korc M, Naito Z: Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. *Am J Pathol.* 180(5):1928-1941, 2012 (査読有)
5. Yamamoto T, Matsuda Y, Kawahara K, Ishiwata T, Naito Z: Secreted 70 kilodalton lumican stimulates growth and inhibits invasion of human pancreatic cancer. *Cancer Letters,* 320(1):31-39, 2012 (査読有)
6. Yamahatsu K, Matsuda Y, Ishiwata T, Uchida E, Naito Z: Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. *Int J Oncol,* 40(5):1345-1357, 2012 (査読有)
7. Cho K, Matsuda Y, Ueda J, Uchida E, Naito Z, Ishiwata T: Keratinocyte growth factor induces matrix metalloproteinase-9 expression and correlates with venous invasion in pancreatic cancer. *Int J Oncol,*

- 40(4):1040-1048, 2012 (査読有)
8. Yamamoto T, Mastuda Y, Kawahara K, Naito Z, Ishiwata T : Keratinocyte growth factor stimulates growth of MIA PaCa-2 cells through ERK phosphorylation. *Oncology Letters*. 3(2):307-310, 2012 (査読有)
  9. Mastuda Y, Ishiwata T, Yamahatsu K, Kawahara K, Hagio M, Peng W-X, Yamamoto T, Nakazawa N, Seya T, Ohaki Y, Naito Z : Overexpressed fibroblast growth factor receptor 2 in the invasive front of colorectal cancer as a potential therapeutic target of colorectal cancer. *Cancer Letters*. 309(2):209-19, 2011 (査読有)
  10. Matsuda Y, Naito Z, Kawahara K, Nakazawa N, Korc M, Ishiwata T : Nestin is a novel target for suppressing pancreatic cancer cell migration, invasion and metastasis. *Cancer Biol Ther*. 11(5):512-23, 2011 (査読有)
- [学会発表] (計9件)
1. Ishiwata T. Fibroblast Growth Factor Receptor-2 IIIc as a Novel Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. 第2回延世(ヨンセイ)大学・日本医科大学合同膵癌研究会. 2012年11月17-18日. 東京
  2. Ishiwata T. Inhibitory Effects of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Pancreatic Cancer. *Pancreas Cancer 2012 in Kyoto / 国際膵癌シンポジウム*. 2012年10月4-6日. 京都
  3. Ishiwata T : Molecular therapeutic targets for gastrointestinal cancer: Fibroblast growth factor receptor 2. 第18回 国際チャールズハイデルベルガー 癌研究シンポジウム、ドイツ (18th International Heidelberger Symposium on Cancer Research). 2012年6月28日-30日. ドイツ)
  4. 石渡 俊行. 膵癌の新規分子標的としての線維芽細胞増殖因子受容体2 (FGFR-2). 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月3日-5日. 名古屋
  5. 石渡 俊行. 線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR-2)を標的とした膵癌治療の研究. 第100回日本病理学会総会. 2011年4月28日-30日. 横浜
  6. Ishiwata T. Fibroblast growth factor receptor 2 as a novel therapeutic target for cancer cell growth and angiogenesis in human pancreatic cancer. 第102回米国癌学会 (American association for cancer research, 102th annual meeting). 2011年4月3

- 日-6日. フロリダ
7. Ishiwata T. Fibroblast growth factor receptor 2 as a novel therapeutic target for pancreatic cancer. 第56回日本病理学会秋期特別総会. 2010年11月25-26日. 北九州
  8. Ishiwata T. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2 IIIc, is a novel molecular target for suppressing pancreatic cancer cell growth and migration. 第101回米国癌学会 (American association for cancer research, 101th annual meeting 2010). 2010年4月16日-22日, ワシントンDC)
  9. 石渡 俊行. 線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR-2 IIIc)を標的とした膵癌治療法の研究. 第99回日本病理学会総会. 2010年4月27日-29日. 東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.nms-pathology.com/related/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石渡 俊行 (ISHIWATA TOSHIYUKI)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90203041

### (3) 連携研究者

日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
内藤 善哉 (NAITO ZENYA)  
研究者番号：20237184

松田 陽子 (MATSUDA YOKO)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20363187

山本 哲志 (YAMAMOTO TETSUSHI)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20453920