

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09400

研究課題名(和文)胆道癌におけるFGFR阻害薬の薬剤耐性獲得機序の追求

研究課題名(英文) Identification of sensitization markers and elucidation of drug resistance mechanism for FGFR inhibitors on cholangiocarcinoma

研究代表者

宮部 勝之(Miyabe, Katsuyuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：00543985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：FGFR 阻害剤の薬剤抵抗性獲得に寄与する機序をを検討した。in-vitro実験として、FGFR増幅を持つ肝内胆管細胞株KMBCを使用し、薬剤耐性株を作成し現在解析を進めている。また、in-vivo実験として、FGFR2阻害薬耐性のPDXにてCopy Number Variation (CNV) analysisを行うと、FGFR2阻害薬耐性PDXにおいて、コントロールと比較し、複数の遺伝子異常が認められた。さらに、臨床試験にてPonatinibを投与された患者検体との比較を行ったところ、計22個の遺伝子異常が共通していた。現在、さらなるexome sequenceを同一検体にて施行している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGFR 阻害剤の薬剤抵抗性獲得に寄与する機序をを検討した。すでにFGFR阻害剤を投与されたサンプルおよび投与されていないサンプルとの比較をすることにより、薬剤耐性に関わる遺伝子を探り出すことができた。FGFR阻害剤は近年胆管癌の治療に有望な分子標的薬として注目されており、一部の胆管癌患者の予後を延長するものと期待されている。その薬剤耐性機序を探るうえでのヒントを見つけて出すことにより、本阻害剤が実際の患者に投与され、耐性となった際の次の治療戦略を考える上で、本研究が重要な意義を果たすものと思われる。

研究成果の概要(英文)： We investigated drug resistance mechanism for Fiber Growth Factor Receptor (FGFR) inhibitors on cholangiocarcinoma.

In an in-vitro study, we generated a cell line which possessed drug resistance against FGFR inhibitors using a KMCH cell stain harboring the fibroblast growth factor receptor (FGFR) amplifications. Additionally, we are analyzing what mechanisms are associated with drug resistance for FGFR inhibitors using the cell line.

In an in-vivo study, Copy Number Variation (CNV) analysis was performed using patients-derived xenografts (PDX) administered FGFR inhibitors (Ponatinib or BGJ398) and possessed drug resistance against the inhibitors. Compared with control PDXs, the drug-resistance PDX had some specific gene aberrations. Furthermore, a total of 22 gene aberrations were detected by the comparison between the PDX and a real human tissue sample administered Ponatinib. We are further investigating the role of detected genes by exome sequence using the PDX samples.

研究分野：消化器内科 胆膵分野

キーワード：FGFR阻害剤 胆管癌 薬剤耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胆管癌に代表される胆管癌は手術切除場合でも5年生存率が30%以下と依然予後不良で、分子生物学的な検討による遺伝子変異と診断・治療効果との関連を追及することが必須である。最近、肝内胆管癌、肺・頭頸部扁平上皮癌、乳がん、膀胱癌、甲状腺癌、膠芽腫、口腔内癌の一部が、FGFR 癒合遺伝子を有し、*in vitro* においてFGFR 阻害剤が細胞増殖を阻害したという報告がなされた(Wu, YM et al. Cancer Discov. 3: 636-47, 2013)。さらに肝内胆管癌の一部症例において、FGFR2 チロシンキナーゼ遺伝子による癒合遺伝子を2種類(FGFR2-AHICYL1 とFGFR2-BICC1)同定し、*in vitro*、*in vivo* 双方においてFGFR 阻害剤によって腫瘍の縮小がみられたと報告された(Arai Y et. al. Hepatology. 59:1427-34, 2014)。一方でメイヨークリニックのグループらは、FGFR2-TACC3 癒合遺伝子を持つ肝内胆管癌患者に対するFGFR2 を含めたマルチキナーゼ阻害剤 pazopanib 投与により腫瘍縮小効果を認めたと報告した。現在国の内外においてFGFR 阻害剤に対する複数の臨床試験が実施されており、将来的に日本においても胆道癌の治療薬として承認されることが期待されている。

### 2. 研究の目的

各種悪性腫瘍の治療効果が改善されるなか、胆管癌に代表される胆道癌は依然治療成績が不良である。今後胆道癌患者の予後を改善するには、さらなる効果的な治療薬の発見、分子生物学的な解明が社会的にも必須である。最近、肝内胆管癌では次世代シーケンサーを使用した解析にて、ドライバー変異として作用するFGFR2 癒合遺伝子が発見され、FGFR 阻害剤の将来的な治療への応用が期待されており、臨床試験も開始されているものの、他の薬と同様に治療抵抗性を示す病態の存在が予想される。我々はFGFR 阻害剤の薬剤抵抗性獲得に寄与する機序を解明し、腫瘍発生・進展メカニズムへの影響を検討することとした。最終的には本機序の臨床的意義解明を目的としたい。

### 3. 研究の方法

FGFR2-CCDC6 癒合遺伝子を持つ肝内胆管癌 primary cell である LIV31 もしくは他のFGFR 阻害薬が効果を示す胆管細胞癌株を使用し、

- (1) LIV31 にて作成された patient-derived xenograft(PDX)を用いてFGFR 阻害剤を投与し、薬剤耐性株を作成する。
- (2) 作成された薬剤耐性株を用いて、よく知られた癌遺伝子やがん抑制遺伝子に特化した遺伝子パネルにて目的遺伝子の変異を検索する。
- (3) さらに薬剤耐性株を使用して、Copy Number Variation Analysis (CNV) を行い、他の数多くの癌関連遺伝子変異を検索する。
- (4) 以前、臨床試験にてFGFR 阻害剤を投与された患者のサンプルを用いて、共通の遺伝子変異を検索する。
- (5) さらに遺伝子変異が薬剤耐性に関連していることの信頼性を高めるため、Exome Sequence を施行する。
- (6) 上記と同時に、FGFR 阻害薬耐性を示す薬品濃度の同定および細胞株を作成し、(1)から(5)にて同定された薬剤耐性遺伝子変異の確認を行う。
- (7) 遺伝子が特定できた場合には、LIV31 に(5)遺伝子導入を行い、コロニー増殖能の比較、western blotting を用いたシグナル変化の解析など、薬剤耐性獲得株のFGFR 阻害薬耐性を評価する。
- (8) *In vivo* での薬剤耐性遺伝子変異の評価も行い、FGFR 阻害剤耐性遺伝子導入細胞株をヌードマウスに皮下移植しFGFR 阻害薬を投与、腫瘍増殖能を検討する。

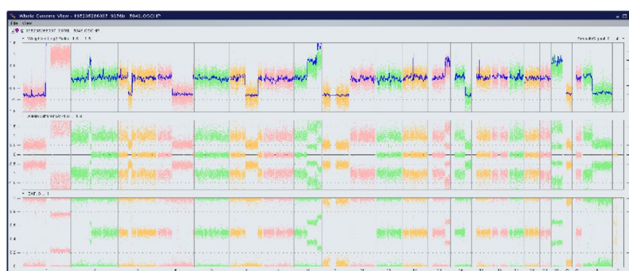
### 4. 研究成果

- (1) LIV31 にて作成された PDX を用いて、2種類のFGFR 阻害剤(Ponatinib、BGJ 398)およびvehicle を、それぞれ約10体のマウスに投与した。Vehicle を投与した群はPDXのサイズが急激に増大した一方で、Ponatinib もしくはBGJ398 を投与した群では当初PDXが緩徐に増大し、ほぼサイズが維持される個体が全体の約80%にみられた。平均5か月後には、腫瘍サイズをほぼ維持しながら緩徐に増大を始めた群と、急激に増大を始めた群に分かれ、この2群間では薬剤耐性の違いがあることが疑われた。
- (2) そこで、PDXが400mm<sup>3</sup>を5か月後に越えた群を薬剤抵抗群と想定し、Vehicle を投与した4例のPDXと共に、BGJ398 感受性5例、BGJ 抵抗群4例、Ponatinib 抵抗群3例、Ponatinib 抵抗群3例のPDXを用いてDNAを抽出し、がん遺伝子の増幅・変異を特定する遺伝子パネル検査を行った。結果としては、薬剤感受性軍と抵抗群にて明らかな遺伝子変異や転座・増幅は認めなかったものの、Vehicle 群にはみられなかった、10q21.3 に存在する遺伝子の変異が50%でみられた(Table 1)。これが薬剤耐性に関与している可能性もあるが、もともとのLIV31にみられる変異である可能性も高く、有意義な所見とはいえないものであった。また、薬剤抵抗群と感受性群に分けて検討を試みたが、同じ細胞株で作成されたPDXそれぞれの個体と同じ薬品を投与したものであって、感受性の違いはSNPなどヌードマウスそのものの遺伝子の違いが関与している可能性も考えられた。

Group	Results
PDXs administrated vehicles	None
PDXs administrated vehicles	None
PDXs administrated vehicles	None
PDXs administrated vehicles	None
BGJ398 sensitive PDXs	10q21.3 変異
BGJ398 sensitive PDXs	None
BGJ398 sensitive PDXs	10q21.3 変異
BGJ398 sensitive PDXs	10q21.3 変異
BGJ398 sensitive PDXs	10q21.3 変異
BGJ398 resistance PDXs	10q21.3 変異
BGJ398 resistance PDXs	None
BGJ398 resistance PDXs	None
BGJ398 resistance PDXs	None
Ponatinib sensitive PDXs	None
Ponatinib sensitive PDXs	10q21.3 変異
Ponatinib sensitive PDXs	None
Ponatinib resistance PDXs	10q21.3 変異
Ponatinib resistance PDXs	10q21.3 変異
Ponatinib resistance PDXs	None

**Table1.** FGFR 阻害剤を投与した PDX を使用して行った遺伝子パネル検査の結果。

- (3) そこで、Vehicle 投与群 2 例、Ponatinib 投与群 2 例、BGJ398 投与群 2 例の PDX をから同様に DNA 抽出を行い、今度は Copy Number Variation (CNV) analysis を行った。合計 6 個の CNV analysis (**Table 2**)のうち、BGJ398 投与群では明らかな異常を認めなかったが、Ponatinib を投与した xenograft においてはコントロールと比較し、SLIT2 の欠失、TBC1D15 の増幅など、複数の遺伝子異常が認められた。



Change (CN)	Region	Genome Coordinates	Size (Mb)
Loss (1)	1p36.33p34.2	chr1:754191-43731341	42.9
Loss (1)	1p34.1p12	chr1:44289079-118953104	74.7
Gain (3)	1p12p12	chr1:118966066-120297295	1.3
Gain (4)	1p12q44	chr1:120300053-249212878	128.9
cnLOH (2)	2p25.3p11.2	chr2:21493-90245035	90.2
Gain (4)	2q11.1q11.1	chr2:95429196-96795944	1.4
Gain (3)	2q11.2q12.1	chr2:96841792-105219317	8.4
Loss (1)	3p21.31p14.1	chr3:48857804-69667120	20.8
Loss (1)	4p15.31p15.31	chr4:20287859-20628259	304 kb
Loss (1)	4q13.3q35.1	chr4:75872977-185496157	109.6
Loss (1)	6q14.1q24.3	chr6:80228540-147019755	66.8
Gain (3)	8q13.2q24.12	chr8:68118794-120653842	52.5
Gain (4)	8q24.12q24.3	chr8:120679571-146292734	25.6
Loss (1)	Chromosome 9		
cnLOH (2)	Chromosome 10		

Table 2. CNV analysis の 1 例

- (4) この Ponatinib においては、米国の臨床研究にて投与された患者検体が存在し、すでに CNV analysis が同様に終了していたため、この検体との比較を行うと同時に、Vehicle のみ投与された PDX における CNV analysis との比較検討も行った。すると、患者臨床研究で得られたサンプルと今回 Ponatinib 投与された PDX 間では、8 個の遺伝子の欠失、14 個の遺伝子の増幅が共通していた。
- (5) 現在、これらの遺伝子の pathway での関連を調べるべく、さらなる Exome sequence を同一検体にて施行しているところである。
- (6) まず、FGFR 阻害剤に感受性を示す胆管癌細胞株を用いて、薬剤耐性を示す細胞株作成を行った。FGFR 阻害剤感受性を持つには、どの細胞株でもいいわけではなく、FGFR の癒合遺伝子を持っているか、FGFR シグナルが増幅している細胞株を使用しなくてはならない。まず我々は、FGFR2-CCDC6 癒合遺伝子を持ち、Mayo Clinic にて樹立された LIV31 を使用しての薬剤耐性株作成を試みた。しかしながら LIV31 は細胞株の成長が予想以上に遅く、なかなか薬剤耐性細胞株を樹立できなかったため、久留米大学病理学教室より共同研究ということで FGFR 蛋白が高発現している KMCH 細胞株を譲り受け、現在 Ponatinib の濃度を徐々に上げながら継代し、FGFR 阻害剤耐性株を作成中である。
- (7) FGFR 阻害剤に耐性を獲得した胆管癌細胞株を樹立後、(2)-(5)の結果にて明らかにされた標的遺伝子の遺伝子異常が見られるのかどうかをウエスタンブロッティングもしくは qPCR にて確認す予定である。
- (8) FGFR 阻害剤に耐性を持つ遺伝子を導入した細胞株をマウスに皮下移植し xenograft を作成、FGFR 阻害剤を投与することで、薬剤耐性遺伝子をもたない細胞株を皮下移植した xenograft に比較して腫瘍増殖能に変化が見られるかどうかを検討する予定である。さらには、同定された薬剤耐性遺伝子に対する分子標的薬を購入できればそれを投与し、腫瘍縮小がみられるかどうかを検討できることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wang Yu, Ding Xiwei, Wang Shaoqing, Moser Catherine D., Miyabe Katsuyuki, McNulty Melissa S., Ndzengue Albert, Barr Fritcher Emily G., Knudson Ryan A., Greipp Patricia T., Clark Karl J., Torbenson Michael S., Kipp Benjamin R., Borad Mitesh J., Roberts Lewis R., et. al.	4. 巻 380
2. 論文標題 Antitumor effect of FGFR inhibitors on a novel cholangiocarcinoma patient derived xenograft mouse model endogenously expressing an FGFR2-CCDC6 fusion protein	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 163 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2016.05.017	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 -

1. 著者名 Abou-Alfa Ghassan K., Miyabe Katsuyuki, Rhim Andrew, Saha Supriya, Sia Daniela, Tanasanvimon Suebpong, Venook Alan, Valle Juan W., Walesky Chad, Whetstine Jonathan, Willenbring Holger, Zhu Andrew X., Mayer Donna, Stanger Ben Z.	4. 巻 7
2. 論文標題 Advances in cholangiocarcinoma research: report from the third Cholangiocarcinoma Foundation Annual Conference	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Gastrointestinal Oncology	6. 最初と最後の頁 819 ~ 827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jgo.2016.11.11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyabe Katsuyuki, Zen Yoh, Cornell Lynn D., Rajagopalan Govindarajan, Chowdhary Vaidehi R., Roberts Lewis R., Chari Suresh T.	4. 巻 155
2. 論文標題 Gastrointestinal and Extra-Intestinal Manifestations of IgG4?Related Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 990 ~ 1003.e1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2018.06.082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zakharia Kais, Miyabe Katsuyuki, Wang Yu, Wu Dehai, Moser Catherine D., Borad Mitesh J., Roberts Lewis R.	4. 巻 12
2. 論文標題 Preclinical In Vitro and In Vivo Evidence of an Antitumor Effect of CX-4945, a Casein Kinase II Inhibitor, in Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 143 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2018.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Tsukasa, Hijioka Susumu, Miyabe Katsuyuki, Kojima Yasushi, Matsuo Keitaro, Yoshitomi Hideyuki, Nakamori Shoji, Yanagimoto Hiroaki, Yatabe Yasushi, Furuse Junji, Mizuno Nobumasa, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Surgery for Pancreatic Neuroendocrine Tumor G3 and Carcinoma G3 Should be Considered Separately	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1385 ~ 1393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07252-8	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 -

1. 著者名 Miyabe Katsuyuki, Notohara Kenji, Asano Go, Kachi Kenta, Kato Akihisa, Natsume Makoto, Jinno Naruomi, Horii Yasuki, Yoshida Michihiro, Naitoh Itaru, Hayashi Kazuki, Ohara Hirotaka, Takahashi Satoru, Kataoka Hiromi	4. 巻 58
2. 論文標題 Laterally Spreading Adenocarcinoma Involving the Lower Bile Duct and Duodenum Expressing Heterogeneous Immunohistochemical Phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3087 ~ 3092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2801-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyabe Katsuyuki, Yoshida Michihiro, Hayashi Kazuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Pancreatic stone extraction using a pancreatoscopy directed, thin sheathed basket catheter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13405	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 -

1. 著者名 Miyabe Katsuyuki, Kato Akihisa, Asano Go, Horii Yasuki, Yoshida Michihiro, Naitoh Itaru, Hayashi Kazuki	4. 巻 51
2. 論文標題 Successful endoscopic transpapillary gallbladder stenting using a new easily maneuverable guidewire: a report of two cases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endoscopy	6. 最初と最後の頁 E349 ~ E351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-0929-4645	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yang Ju Dong, Miyabe Katsuyuki, Allotey Loretta K., Gores Gregory J., Roberts Lewis R., et al.	4. 巻 28
2. 論文標題 GALAD Score for Hepatocellular Carcinoma Detection in Comparison with Liver Ultrasound and Proposal of GALADUS Score	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention	6. 最初と最後の頁 531 ~ 538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1055-9965.EPI-18-0281	査読の有無 無
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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Katsuyuki Miyabe, Kais Zakharia, Wang Yu, Catherine D. Moser, John Lim, Sean O' Brien, Mitesh J. Borad, Lewis R. Roberts
2. 発表標題 Preclinical in vitro and in vivo evidence of an antitumor effect of CX-4945, a CK2 inhibitor, in cholangiocarcinoma.
3. 学会等名 The Cholangiocarcinoma Foundation Annual Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsuyuki Miyabe, Kais Zakharia, Yu Wang, Catherine D. Moser, John Lim, Sean O' Brien, Mitesh J. Borad, Lewis R. Roberts
2. 発表標題 The casein kinase II inhibitor CX-4945 has an additive effect with gemcitabine and cisplatin on cholangiocarcinoma xenografts.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Katsuyuki Miyabe, Lewis R. Roberts
2. 発表標題 Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Gene Family Aberrations in Cholangiocarcinoma.
3. 学会等名 The Cholangiocarcinoma Foundation Annual Conference 2016 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮部勝之, Lewis R. Roberts, Mitesh J Borad
2. 発表標題 胆管癌治療における新規Casein Kinase2阻害剤有用性の基礎的検討
3. 学会等名 第60回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2018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
研究分担者	林 香月  (Hayashi Kazuki)  (00405200)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授   (23903)	
研究分担者	内藤 格  (Naitoh Itaru)  (30527750)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師   (23903)	
研究分担者	吉田 道弘  (Yoshida Michihiro)  (20636328)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教   (23903)	