

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390218

研究課題名(和文) 発癌の機序における線維芽細胞増殖因子の役割と新たな分子標的治療への戦略

研究課題名(英文) Role of fibroblast growth factors in pathogenesis of lung cancer

研究代表者

別役 智子 (Betsuyaku, Tomoko)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60333605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年肺癌に関して新たな分子標的薬の開発が日進月歩である。近年線維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor; FGF)シグナルは、肺癌を含む多数の癌での活性化が注目され、FGF受容体チロシンキナーゼを抑制する新規分子標的薬が開発されている。我々は肺上皮細胞特異的に線維芽細胞増殖因子9 (FGF9)を強制発現することにより肺癌を発症するマウスモデルを利用し、FGFの発癌における役割を明らかにするとともに、FGF受容体チロシンキナーゼを標的とした分子標的治療に繋げる基礎的データを蓄積した。さらに、FGF9過発現肺癌患者の特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent progress is remarkable in molecular target therapy of lung cancer. The signaling of fibroblast growth factor (FGF) signaling has been interested in many cancers including lung cancer. We have developed the mouse model of lung adenocarcinoma by overexpressing FGF9 in lung epithelial specific manner. Using that model, we have investigated the molecular mechanism of FGF9-induced lung cancer by identified the putative receptor of this pathway. We have also tested the several potential drugs as novel FGFR targeting therapy. We have also characterized the patients of lung cancer with overexpression of FGF9.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：線維芽細胞増殖因子

1. 研究開始当初の背景

わが国の肺癌死亡数は増加の一途をたどり、男性では癌死亡数の第一位、女性でも胃癌、大腸癌について第3位である。さらに今後25年間に男女とも約3倍に増加すると予想されている。近年肺癌に関して多様な遺伝子変異が明らかにされている(Ding, Nature, 2008)。上皮成長因子受容体(EGFR)に対する活性型遺伝子変異を有する一部の線癌に対してはEGFR-TKIの有効性が証明され、肺癌治療において飛躍的な進展を遂げた(Saijo, Intern Med, 2010)。それに引き続き、新たな分子標的薬の開発が日進月歩であるが、癌の多様な分子生物学的特性を踏まえた薬剤の選択こそが有効性の面でも安全性の面でも鍵を握ると考えられている。研究者は、肺細胞の分子生物学に関する一連の研究の中で、気道系と肺胞構造の接合部に存在する細気管支上皮細胞の役割に注目してきた。特記すべきことは、肺細胞に対して laser capture microdissection (LCM)法を世界に先駆け応用し、複雑な肺組織において、細胞特異的な分子生物学的研究を進めてきたことである(右図)。選択的に採取した細胞よりRNAを抽出しin vivoの状態における細胞特異的な網羅的遺伝子発現の解析を確立し(Betsuyaku, Micron, 2004)、線維化肺(Betsuyaku, AJRCMB, 2001)(Odajima, J Histochem Cytochem, 2007)、喫煙曝露(Betsuyaku, Respir Res, 2008)(Adir-Kirk, Am J Respir Cell Mol Biol, 2008)、LPS誘導性急性肺障害(Ito, Biogerontology, 2009)等の様々な難治性肺疾患の動物モデルのプロファイルを報告し、この技術を臨床研究レベルに応用してきた(Fuke, AJRCMB, 2004)(Suzuki, Inhal Toxicol, 2008)(Suzuki, Am J Respir Cell Mol Biol, 2008)(Atkinson, AJRCCM, 2010)。さらに、microRNAに踏み込んだ研究に発展させている(H21-23年度基盤研究(C)「肺における細胞特異的エピジェネティクスへの挑戦(研究課題番号21590961)」)。2005年、Kimらが初めてマウス肺において、細気管支上皮に存在する surfactant protein-C(SP-C)/Clara cell secretory protein(CDSP)共陽性細胞(=肺上皮細胞と気道Clara細胞両方の性質を有する細胞)を bronchioalveolar stem cells(BASCs)と定義し分離に成功した(Kim, Cell 2005)(左図)。自己複製能および多分化能をもつ肺上皮幹細胞であるだけでなく、BASCsが肺腺癌の癌幹細胞となりうると結論づけた。しかし、細胞分離法、幹細胞としての定義(Sca-1, CD34, CD45, CD31等の細胞表面マーカー)に関して反論が相次ぎ、系統追跡の結果からは、BASCsの肺上皮細胞への分化を認めないという報告(Rawlins, Cell Stem Cell 2009)もあり見解の統一をみていない。近年FGFシグナルは、肺癌を含む多数の癌での活性化が注目され、FGF受容体チロシンキナーゼを抑制する多くの新規分子標的薬が

開発されている(Turner, Nat Rev Cancer, 2010)。非小細胞肺癌に対する体細胞変異の網羅的解析の結果からは、FGF受容体のひとつであるFGFR4のチロシンキナーゼドメインにおける変異が高率に発見された(Ding, Nature, 2008)。77例の非小細胞肺癌手術摘出検体と40例の正常肺をAffymetrixU133Plus2 Platform上で網羅的に遺伝子発現解析を行った結果からは、FGF9をはじめ多数のFGFが肺癌組織において発現亢進している(右図)。FGF9はFGFR4に対するリガンドのひとつであり、FGF9は肺発生段階において上皮原基に発現し上皮・間質の分化増殖に必須な役割を果たすが、成熟肺では発現を見ない。Wnt/ β -cateninシグナルの活性化により発現が亢進し、マウスにおいて催腫瘍効果があること(Hendrix, Cancer Res, 2006)、FGF9を高発現させた肺癌細胞株では浸潤能が亢進すること、肺癌組織に高発現しその程度が病期の進行・リンパ節転移と有意な関係があることが報告されている(Wang, Int J Cancer, 2009)(Ueng, Arch Toxicol, 2010)。近年、ワシントン大学Ornitz教授らは、FGF9を肺上皮細胞特異的に、かつドキシサイクリン依存的に発現を制御できることを可能にしたマウスを樹立した(*SPC-rtTA, TRE-Fgf9-IRES-eGfp* double transgenic mice)(White, Development, 2006)。申請者は、2010年3月同大学に招聘され、同マウスを用いたFGF9と肺癌の関係について共同研究を立ち上げている。

2. 研究の目的

肺上皮細胞特異的に線維芽細胞増殖因子9(FGF9)を強制発現することにより肺癌を発症するマウスモデルを利用し、FGFの発癌における役割を明らかにするとともに、FGF受容体チロシンキナーゼを標的とした分子標的治療に繋げる基礎的データを蓄積する。「上皮幹細胞様細胞の増殖が癌性転化を起こしうるか」、「上皮幹細胞様化へのプライミングが、喫煙誘導、線維化病巣に由来する癌化のリスクを高めるか」という視点から、申請者の確立したlaser capture microdissection (LCM)法を駆使し分子生物学的研究を進める。一方で、invitro, invivoの系で、FGF9誘導肺癌の責任受容体の検索と同定を行う。さらにFGF受容体インヒビターのこのモデルにおける有効性を検証し、同種薬剤に感受性をもつ肺癌患者の同定、治療計画に有用な情報を提供する。

3. 研究の方法

5つの実験計画を下図のように有機的に統合し、期間内に本プロジェクトを遂行する。実験1) FGF9を肺上皮特異的に強制発現させる遺伝子改変マウス *SPC-rtTA, TRE-Fgf9-IRES-eGfp* を用いた、癌化の機序に関する分子生物学的解析。実験2) In vitro系 FGF9投与による細気管

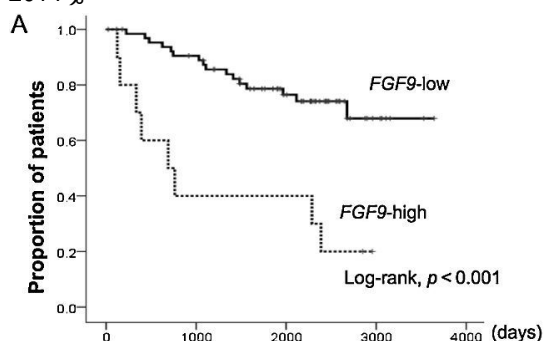
支上皮細胞の“幹細胞様化”の誘導系の確立
実験3) FGF9 誘導肺癌モデルにおいて FGF9 に対する責任受容体の同定。

実験4) FGF9 の細気管支上皮細胞への強制発現が喫煙曝露や線維化による体細胞遺伝子変異頻度、長期喫煙曝露による発癌個体頻度を増加させるか否かの検討

実験5) FGF9 誘導性肺癌と化学発癌における FGF 受容体チロシンキナーゼインヒビターの抗腫瘍効果の比較検討

4. 研究成果

1) FGF9 を肺上皮細胞特異的に、かつドキシサイクリン投与にて発現を制御できることを可能にしたマウス (SPC-rtTA, TRE-Fgf9-IRES-eGfp double transgenic mice) は肺腺癌を発症し、その責任受容体は FGFR3 であることを明らかにし、同モデルを用いてその発癌メカニズムを追及した (Yin, *Cancer Res*, 2013)。さらに、FGF9 の臨床的な意義を明らかにする目的で、ヒト非小細胞肺癌手術検体 100 例を用いた網羅的解析から、FGF9 高発現群は低発現に比べ予後不良であることを明らかにした (Ohgino, *Lung Cancer*, 2014)。

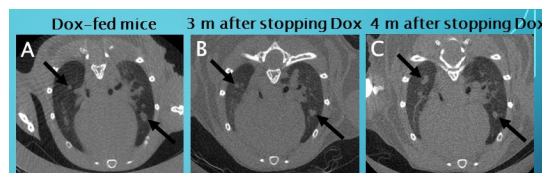


当研究室では、肺癌細胞が上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) に対する耐性獲得機序に FGF2-FGFR1 の autocrine 機構が関与すること (Terai, *Mol Cancer Res*, 2013)、各種ヒト肺癌細胞株培養液に FGF2,9 を添加すると癌細胞の増殖が亢進すること (Suzuki, *Int J Oncol*, in press) など、一貫して肺癌における FGFs の役割に関する研究に取り組んできた。

申請者は FGF9 による発癌誘導の機序に取り組む過程で、**予想していなかった驚くべき二つの知見**を得た。一つめは、FGF9 に誘導されたマウス肺腺癌の増殖が FGF9 非依存性に変化し、さらに二次発癌を誘導する“癌幹細胞”様の特質を獲得することである。micro-CT を用いて同一個体を継時的に観察すると FGF9 により誘導された肺腺癌は、ドキシサイクリン投与中止後も残存し、一部は増大する。

また、腫瘍細胞を含む肺細胞浮遊液を野生型マウスに皮下移植、あるいは経気道的に投与すると、二次肺腺癌を発症する、いわゆる tumor propagation potential を有する。こ

の知見に基づき行った実験で、FGF9 誘導肺腺癌が FGF9 非依存性になる過程で癌細胞自体に発現する FGF 受容体の種類に変化が起こること、一方、腫瘍の微小環境(腫瘍関連線維



芽細胞)にも劇的な変化が起こることが明らかになった。二つ目の驚くべき知見を次に述べる。マウス肺胞 II 型上皮細胞 mouse lung epithelial cell (MLE) 12 に FGF9 を恒常的に強制発現させると、足場非依存性増殖能を有する癌細胞に形質転換し、さらに免疫不全マウスの皮下に移植すると、皮下腫瘍が形成された。予想外だったことは、組織学的に腺癌ではなく小細胞癌であったことである。小細胞癌のマーカーである CGRP 及び ASH-L1 に対する定量 RT-PCR 及び免疫蛍光染色を行った結果、両マーカーの発現も分子レベルで確認された。

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 4 件)

1: Arai D, Hegab AE, Soejima K, Kuroda A, Ishioka K, Yasuda H, Naoki K, Kagawa S, Hamamoto J, Yin Y, Ornitz DM, Betsuyaku T. Characterization of the cell of origin and propagation potential of the fibroblast growth factor 9-induced mouse model of lung adenocarcinoma. *J Pathol*. 2015 Mar; 235(4):593-605. doi:10.1002/path.4486 (査読有)

2: Suzuki T, Yasuda H, Funaishi K, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Tani T, Hamamoto J, Ohashi A, Naoki K, Betsuyaku T, Soejima K. Multiple roles of extracellular fibroblast growth factors in lung cancer cells. *Int J Oncol*. 2015 Jan;46(1):423-9. doi: 10.3892/ijo.2014.2718. (査読有)

3: Ohgino K, Soejima K, Yasuda H, Hayashi Y, Hamamoto J, Naoki K, Arai D, Ishioka K, Sato T, Terai H, Ikemura S, Yoda S, Tani T, Kuroda A, Betsuyaku T. Expression of fibroblast growth factor 9 is associated with poor prognosis in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014 Jan;83(1):90-6. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.016. (査読有)

4: Yin Y, Betsuyaku T, Garbow JR, Miao J, Govindan R, Ornitz DM. Rapid induction of

lung adenocarcinoma by fibroblast growth factor 9 signaling through FGF receptor 3. Cancer Res. 2013 Sep 15;73(18):5730-41. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0495. (査読有)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
<http://www.keio-med.jp/pulmonary/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
別役 智子(Tomoko Betsuyaku)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60333605