

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861203

研究課題名(和文) FGFR2を標的とした食道胃接合部癌に対する新規治療法の確立

研究課題名(英文) Development of FGFR2 targeting therapy for the patients with EGJ adenocarcinoma.

研究代表者

今村 裕 (Imamura, Yu)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・医員

研究者番号：70583045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道胃接合部癌の治療標的因子としてFGFR2の可能性を検討した。今回の検討の結果、FGFR2遺伝子増幅(コピー数1以上)は15%、FGFR2高発現は61%の症例に認め、互いに有意な相関関係を認めた($P < 0.05$)。FGFR2高発現(IHC)には深達度の深いものと強く相関し($P < 0.05$)、低発現群に比べ有意に予後不良であった($P = 0.007$)。in vitroでは、FGFR2を強制発現させることで、細胞増殖、細胞周期亢進、抗アポトーシス活性が上昇することを確認し、si-FGFR2により抗腫瘍増殖効果が確認された。FGFR2は新たな治療ターゲットとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that FGFR2 amplification is associated with FGFR2 expression, resulting in tumor growth and poorer outcome in esophagogastric junction (EGJ) adenocarcinoma. FGFR2 amplification and FGFR2 IHC expression were 15% and 61%, respectively. Although these two statuses were significantly correlated ($P < 0.05$), only FGFR2 IHC expression was significantly associated with tumor depth ($P < 0.001$) and overall survival of patients (univariate $P = 0.007$). Supporting these findings, FGFR2 overexpression was associated with tumor cell proliferation, cell cycle progression, and anti-apoptosis. Selective inhibition of FGFR2 sufficiently suppressed tumor cell proliferation. FGFR2 amplification was significantly associated with FGFR2 expression. FGFR2 expression (but not FGFR2 amplification) was associated with tumor growth and patient outcomes. Our findings support FGFR2 as a novel therapeutic target for EGJ adenocarcinoma.

研究分野：食道胃接合部腺癌

キーワード：食道胃接合部腺癌 FGFR2 予後 遺伝子増幅

1. 研究開始当初の背景

我が国において、食道胃接合部癌は食道胃接合部上下2cm以内に腫瘍の中心をもつ腺癌と定義され、この領域の癌は欧米諸国においてここ30年で6倍に増加しており、その5年生存率は約15%と非常に予後不良の疾患である[Reid et al. Nature Rev 2010]。欧米において、食道胃接合部癌は、食道腺癌もしくはバレット食道癌として扱われ、胃食道逆流症(GERD)による食道上皮の円柱上皮化生(バレット食道)を背景に、軽度~高度異型性上皮を経て癌化するものと考えられている。

近年、我が国においても食生活の欧米化や逆流性食道炎の増加を要因に食道胃接合部癌の増加が指摘されている1。しかし、日本および東アジアにおけるこの分野の研究は未だ限られたものであり、我が国における食道胃接合部癌の研究の必要性が高まっている。実際、日本胃癌学会および日本食道学会が共同でワーキンググループを設置してその実態把握のための全国調査を開始したばかりである。

申請者は米国 Dana-Farber Cancer Institute で新鮮凍結サンプルを用いた食道胃接合部癌(食道腺癌)、胃癌、大腸癌における遺伝子異常の網羅的解析に携わってきた。従来での報告では、食道胃接合部癌において主に遺伝子変異(TP53, CDKN2A等)が報告されてきた。しかし今回、我々の上記癌組織における遺伝子コピー数の変化を網羅的に解析した結果、食道接合部癌(N=186)において、新たに以下の6つの癌関連の遺伝子MCL1, PRKCI, MYB, CDK6, MET, FGFR2 に有意な Amplification を認めた。このうち食道胃接合部癌での FGFR2 の遺伝子増幅は、我々が初めて報告した2。

FGFR とは Fibroblast growth factor (FGF) と高い親和性をもつチロシンキナーゼレセプターであり、FGFR1, 2, 3, 4 が存在する。その遺伝子である FGFR は 染色体 10q26.12 にコードされている。主に下流の RAS-ERK および PI3K-AKT を介して細胞の Proliferation と Survival に関与し、その活性化は Oncogenic な働きを持つ。FGFR2 と癌との関連は、FGFR2 遺伝子変異(Mutation)が子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、胃癌で、FGFR2 遺伝子増幅(Amplification)が乳癌および胃癌(低分化型)で報告されている。大腸癌においては FGFR2 の過剰発現が転移浸潤と関与することが報告されている。また、FGFR をターゲットとして含むマルチチロシンキナーゼ阻害剤が多く開発され様々な腫瘍において臨床試験が進行中である(図4)。FGFR2 の発現が食道胃接合部癌の発癌に関与するという免疫染色レベルでの報告はあるものの3、食道胃接合部癌において、FGFR2 が治療の標的になりうるかどうかは未だ検討されていない。

そこで、申請者らは食道接合部癌において FGFR2 が新たな標的になりうるのではないかと着想した。欧米とは異なり、日本人の食道胃接合部癌は背景にバレット上皮を認めない噴門腺由来の癌が多く、バレット食道由来の癌は少ないとされている。しかし、バレット粘膜を背景とした食道腺癌と噴門腺由来の胃癌とは染色体変化が類似しているとの報告から4、我が国における食道胃接合部癌においても FGFR2 シグナルが Oncogenic な役割を果たしている可能性が極めて高いと考えられる。

2. 研究の目的

食道胃接合部癌における FGFR2 シグナルの関与を明らかにし、治療のターゲットになりうることを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた実験

熊本大学付属病院消化器外科にて切除手術を受けた食道胃接合部癌(Siewert type I~III) 176例を対象とした。免疫染色には抗-FGFR2抗体[ab58201, Anti-Mouse Monoclonal, 1:1000]を用いて、臨床検体のパラフィン包埋切片の免疫染色を行った。免疫染色の評価は negative, weak, moderate, strong の4段階とし、weak と moderate 間をカットオフとし、低発現群と高発現群に分けて検討した。

FISHの検討には、KRAS-FISH probe 作成を bacterial artificial chromosomes (BACs), RP11-7P17, RP11-984I17, RP11-78A18, RP11-615K11 and RP11-62L18 を用いて作成し、Cy3 で標識した。FISH chromosome 10 centromere (CEN10) も度応用に BACs RP11-300L24, RP11-178A10, RP11-110L24, RP11-379D2 を用い FITC で認識した。

(2) 細胞株を用いた実験

食道胃接合部癌細胞株5種(OACM5.1C, OE19, OE33, SK-GT-4, FLO-1)を用いた。FGFR2 コピー数の評価は Taqman copy number assay (FGFR2, Human, Cat. # 4400291) および TaqMan Copy Number Reference Assay, (RNase P, Human, Cat. #4403328) を用い、その比率(FGFR2/RNaseP)を用いて評価した。RNA 干渉実験には si-RNA-1(5'-GUAGGACUGUAGACAGUGATT-3')、および si-RNA-2(5'-GAACAGUUAUCCUAGUUTT-3') を作製した。また FGFR2 強制発現株作成のために FGFR2IIIb cDNA から Nhe I/Xho I で digest し、AcGFP1 を導入した。細胞浸潤能の変化はマトリゲルチャンパー [BD Matrigel basement membrane matrix (BD

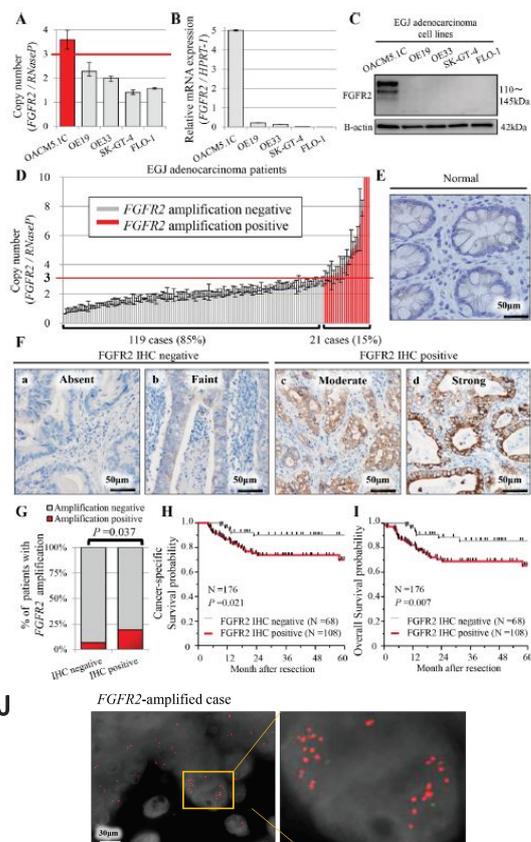
Biosciences)]を用いて、アポトーシスの評価は propidium iodide (Sigma)、Annexin V staining (Millipore)と BD FACS Verse flow cytometer (BD Biosciences)を用いて評価した。Western blotting では、抗 FGFR2 抗体 (#11835s, Cell signaling) 抗 アクチン抗体 (#4967s, Cell signaling) を用いた。

(3) 統計解析

全ての統計学的解析は JMP11(SAS)にて行った。P<0.05 を有意差基準とした。

4. 研究成果

【図 1. 細胞株および臨床検体を用いたコピー数異常と IHC の結果】



細胞株を用いて copy number assay をおこなった (図 1 A)。RNaseP により標準化した場合、コピー数 3 以上を占めた OACM5.1C 飲み FGFR2-mRNA の上層と FGFR2 タンパクの共発現を認めた (図 1B, C)。よって本 copy number assay のコピー数増幅異常のカットオフ値は 3 コピーとした。臨床サンプルより DNA を抽出し、FGFR2 copy number assay が可能であった 140 例を検討した結果、21 症例 (15%) において 3 コピー以上の増幅を認めた (図 1 D)。また、3 コピー以上の症例において、FGFR2 の遺伝子増幅を FISH でも確認した (図 1J)。FGFR2-IHC を行った結果、FGFR2 の発現は正常胃粘膜には認めず (図 1E)、108 例 (61%) の癌部において moderate-strong の FGFR2 の過剰発現を認めた (図 1F)。FGFR2 遺伝子増幅 (コ

ピー数 3 以上) と FGFR2-IHC 過剰発現は有意に相関した (P=0.037, 図 1G)。FGFR2-IHC 過剰発現は患者の予後 (Cancer-specific survival, overall survival) と有意に相関した。

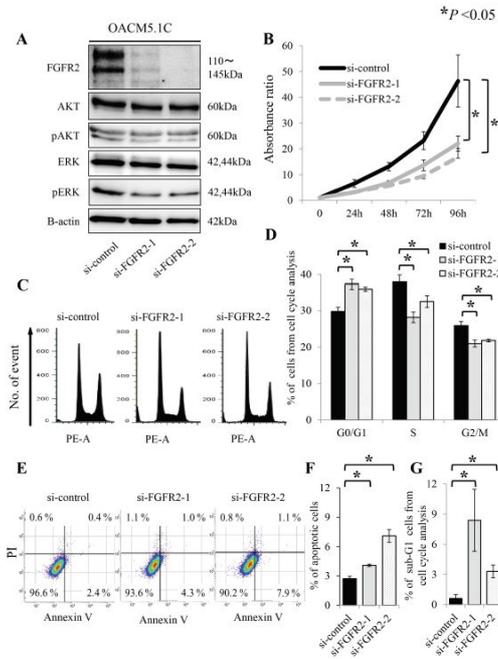
FGFR2-IHC 過剰発現の臨床病理学的因子との相関関係について検討した (表 1)。FGFR2-IHC 過剰発現は、腫瘍占居部位が口側に近いものが多く (Siewert type I, P=0.025)、腫瘍深達度の深い症例 (P<0.001)、リンパ節転移陽性例 (P<0.001)、遠隔転移を有する症例 (P=0.030) に有意に頻度が高く認められた。さらに、Logistic-regression 解析を行った結果、深達度 (pT2-4) が最も有意に FGFR2-IHC 過剰発現と相関することが判明した (P<0.001)。

【表 1. FGFR2 の発現と臨床病理学因子の比較】

	FGFR2 amplification		P value	FGFR2 IHC		P value
	Negative	Positive		Negative	Positive	
No. patients (%)	119 (85%)	21 (15%)	0.971	68 (39%)	108 (61%)	0.520
Age						
Mean ± SD	68 ± 12	67 ± 12		67 ± 11	69 ± 12	
Sex			1.000			0.308
Male	96 (81%)	17 (81%)		51 (75%)	88 (81%)	
Female	23 (19%)	4 (19%)		17 (25%)	20 (19%)	
Siewert classification			0.945			0.025
I	20 (17%)	4 (19%)		5 (7%)	24 (22%)	
II	25 (21%)	4 (19%)		18 (27%)	23 (21%)	
III	74 (62%)	13 (62%)		45 (66%)	61 (57%)	
Tumor depth			0.689			< 0.001
T1	37 (31%)	6 (29%)		42 (62%)	23 (21%)	
T2	19 (16%)	2 (9%)		13 (19%)	10 (9%)	
T3	46 (39%)	8 (38%)		9 (13%)	52 (48%)	
T4	17 (14%)	5 (24%)		4 (6%)	23 (22%)	
Tumor size (mm)			0.919			0.110
Mean ± SD	54 ± 7	56 ± 16		45 ± 10	67 ± 8	
Lymph node metastasis			0.286			< 0.001
Negative	66 (55%)	9 (43%)		53 (78%)	49 (45%)	
Positive	53 (45%)	12 (57%)		15 (22%)	59 (55%)	
Distant metastasis			0.990			0.030
Negative	108 (91%)	19 (90%)		66 (97%)	94 (87%)	
Positive	11 (9%)	2 (10%)		2 (3%)	14 (13%)	
Histopathological types			0.305			0.235
Well-moderate	80 (67%)	17 (81%)		52 (76%)	73 (68%)	
Poorly	39 (33%)	4 (19%)		16 (24%)	35 (32%)	

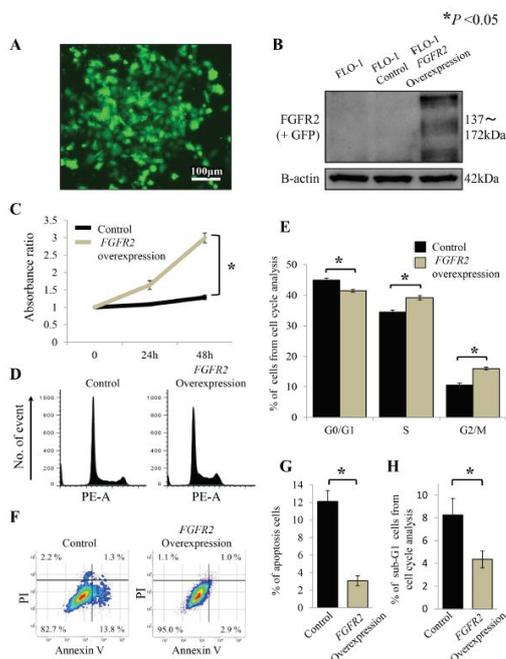
そこで、我々は FGFR2 の過剰発現は、細胞増殖と関連があるのではないかと推察し、以下、細胞増殖 assay、アポトーシス関連 assay を行う方針とした。

【図 2. si-FGFR2 による細胞株実験】



2種類のsi-RNA(si-FGFR2-1, FGFR2-2)を作製し、これらのsi-RNAを用いて、FGFR2の過剰発現した食道胃接合部癌細胞株であるOACM5.1を用いて観察した結果、si-FGFR2によりAKT, ERKのリン酸化が阻害され、細胞増殖が抑制されることが判明した(図2AB)。さらに細胞周期を観察すると、G0/G1期の割合が有意に増加し、G2/M期は有意に減少していた(図2CD)。また、同時にアポトーシス細胞の割合が増え、sub-G1期の割合が増加していることから、FGFR2の発現を抑制することは、細胞増殖を細胞周期を停止させ、アポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑えるということが観察された。

【図 3. FGFR2 過剰発現ベクター導入による細胞株実験】



FGFR2の発現を確認できないFLO-1細胞にFGFR2ベクターを導入し、同時に導入したGFPの発現を確認することでStable transfectantであることを確認した(図3A)。このFGFR2導入細胞株はFGFR2を過剰発現することを確認し、さらに細胞増殖が有意に亢進することを確認した(図3BC)。FGFR2を導入することで、G0/G1期の増加とG2/M期の減少が有意に進行し(図3DE)、導入細胞は抗アポトーシス活性が有意に増加することが判明した(図3FG)。

(まとめ)

以上より、FGFR2は食道胃接合部癌において過剰発現し、細胞増殖によりその悪性化に関与することが班目下。また、その抑制により抗腫瘍効果を発揮することが確認され、本疾患の有効な治療標的因子となることが示唆された。

<引用文献>

1. Kusano C, Gotoda T, Khor CJ, et al. Changing Trends in the Proportion of Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction in a Large Tertiary Referral Center in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1662-5, 2008
2. Dulak AM, Stojanov P, Peng S, et al. Exome and Whole-Genome Sequencing of Esophageal Adenocarcinoma Identifies Recurrent Driver Events and Mutational Complexity. *Nat Genet* 45:478-86, 2013
3. Paterson AL, O'Donovan M, Provenzano E, et al. Characterization of the Timing and Prevalence of Receptor Tyrosine Kinase Expression Changes in Oesophageal Carcinogenesis. *J Pathol* 230:118-28, 2013
4. Weiss MM, Kuipers EJ, Hermsen MA, et al. Barrett's Adenocarcinomas Resemble Adenocarcinomas of the Gastric Cardia in Terms of Chromosomal Copy Number Changes, but Relate to Squamous Cell Carcinomas of the Distal Oesophagus with Respect to the Presence of High-Level Amplifications. *J Pathol* 199:157-65, 2003
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 3 件)

1. Tokunaga R, Imamura Y, Nakamura K, et al.

Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Expression, but Not Its Genetic Amplification, Is Associated with Tumor Growth and Worse Survival in Esophagogastric Junction Adenocarcinoma. Oncotarget, 2016

2. Imamura Y, Oki E, Ohgaki K, et al. Real-Time Accurate Identification of Tumor Site Using a Mobile X-Ray Image-Intensifier System During Laparoscopic Gastrectomy. J Am Coll Surg, 2015

3. Tokunaga R, Imamura Y, Nakamura K, et al. Carbohydrate Antigen 19-9 Is a Useful Prognostic Marker in Esophagogastric Junction Adenocarcinoma. Cancer Med 4:1659-66, 2015

〔学会発表〕(計 5 件)

第 116 回日本外科学会定期学術集会
2016/4/14 大阪府大阪市
「食道胃接合部癌における FGFR2 の有用性」
徳永竜馬、今村裕、他

第 47 回制癌剤適応適応研究会
2014/3/7 愛知県名古屋市
「食道胃接合部癌における FGFR2 と臨床病理学的因子の検討」徳永竜馬、今村裕、他

第 74 回日本癌学会学術総会
2015/10/8 愛知県名古屋市
「食道胃接合部癌において FGFR2 は治療標的となりうる」徳永竜馬、今村裕、他

AACR Annual Meeting 2015
2015/4/18, Philadelphia, Pennsylvania
「Fibroblast Growth Factor Receptors 2 is a novel therapeutic target in Esophagogastric Junction Adenocarcinoma」
Ryuma Tokunaga, Yu Imamura, et al.

第 88 回日本胃癌学会総会
2016/3/17 大分県別府市
「食道胃接合部癌腺癌における予後因子解析」今村裕、他

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 裕 (IMAMURA, Yu)

がん研有明病院・消化器外科・食道外科・医員

研究者番号：70583045

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

馬場 秀夫 (BABA, Hideo)
熊本大学・消化器外科・教授
研究者番号：20240905

(4) 研究協力者

徳永 竜馬 (TOKUNAGA, Ryuma)