

子宮頸癌における FGFR-2 IIIc を標的とした 新規分子標的治療法の基礎的検討

FGFR-2 IIIc: A Novel Molecular Target for Uterine Cervical Cancer

川瀬里衣子^{1,2)}・松田陽子³⁾・内藤善哉³⁾・石渡俊行³⁾

子宮頸癌は女性生殖器の腫瘍では2番目に多く、進行性の子宮頸癌の死亡率は30%にもなる。これまでに我々は、子宮頸癌における線維芽細胞増殖因子受容体 (fibroblast growth factor receptor/FGFR) の発現と役割について検討してきた。子宮頸癌における FGFR-2 IIIb の発現は86%の症例で認められた。一方、FGFR-2 IIIc は子宮頸癌の全症例で認められ、前癌病変の進行度に一致して発現の増加が見られた。FGFR-2 IIIc 過剰発現ヒト子宮頸癌細胞株では、*in vitro* での細胞増殖亢進、及びマウス皮下腫瘍において腫瘍体積の増大を示した。さらに、FGFR-2 阻害剤 (PD173074) 投与により、ヒト子宮頸癌細胞の増殖が著明に抑制された。以上より、子宮頸癌の発癌過程や進展において FGFR-2 IIIc が重要な役割を担っている可能性があり、子宮頸癌の予防や治療の標的として有用である可能性がある。

Uterine cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide, and nearly one-third of patients who present with invasive cervical cancer die of this disease. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) 1-3 have IIIb and IIIc isoforms. Previously, we reported the expression levels and roles of FGFR-2 IIIb and IIIc in cervical cancer. FGFR-2 IIIb was expressed in 86% of cervical cancer patients. FGFR-2 IIIc was detected in all invasive cervical cancer patients and its expression was correlated with the malignancy grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). FGFR-2 IIIc-transfected human cervical cancer cells showed an increase in cell growth *in vitro* and the subcutaneous tumor volume in nude mice. PD173074, an inhibitor of FGFR-2, markedly suppressed *in vitro* cell growth of human cervical cancer cell lines. In conclusion, FGFR-2 IIIc plays important roles in the carcinogenesis and progression of uterine cervical cancer. Anti-FGFR2 IIIc therapies may represent therapeutic strategies for inhibiting the growth of CIN and cervical cancer.

Key words: uterine cervical cancer; fibroblast growth factor receptor 2; FGFR-2 IIIc

Rieko Kawase^{1,2)}, Yoko Matsuda³⁾, Zenya Naito³⁾, Toshiyuki Ishiwata³⁾

1) 神奈川県立がんセンター 婦人科 2) 日本医科大学 女性診療科・産科 3) 日本医科大学 病理学 (統御機構・腫瘍学)

1)Department of Gynecology, Kanagawa Prefectural Cancer Center, 2)Department of Gynecology, Nippon Medical School, 3)Departments of Pathology and Integrative Oncological Pathology, Nippon Medical School

背景：

子宮頸癌は女性生殖器の腫瘍では乳癌に次いで多く、進行性の子宮頸癌の場合には死亡率は30%にもなる。子宮頸癌の治療法は、手術による病変部または子宮の全摘が基本であるが、進行した手術適応のない症例や、若年者、特に挙児希望者では、手術療法だけではなく薬物療法等の非侵襲性的治療法の開発が待ち望まれている。子宮頸癌においては、様々な増殖因子やその受容体の癌特異的な過剰発現が相次いで報告され、それらを標的とした分子標的治療法は、従来の抗癌剤と比べて副作用が少なく高い効果が期待されている。

我々は、子宮頸癌における線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor/FGF) 及びその受容体 (fibroblast growth factor receptor/FGFR) の発現と役割について検討してきた。FGFRにはFGFR-1～4までの4種類が存在し、FGFR-2には細胞外ドメインの選択的スプライシングによりIIIbとIIIcアイソフォームが存在し、IIIbは主に上皮細胞に、IIIcは間質細胞に局在する (図1)。FGFR2

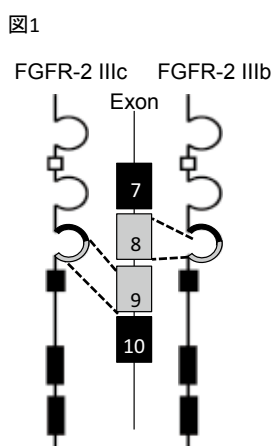


図1. FGFR-2におけるスプライシングアイソフォームIIIbとIIIc.

のアイソフォームの違いによって、これらに特異的に結合するFGFの種類 (FGF1～FGF23) が規定されることになる。また、さまざまな悪性腫瘍においてFGFR-2 IIIbからIIIcへのクラススイッチが癌の悪性度や上皮間葉転換 (EMT) と関連することが報告されている^[1]。これまでの我々の検討で、

子宮頸癌におけるFGFR-2 IIIbの発現は約86%の症例で認められ、非腫瘍部ではほとんど発現が見られなかった^[2]。一方で、FGFR-2 IIIcは子宮頸癌の全症例で認められ、前癌病変の進行度に一致して発現の増加が見られた^[3]。FGFR-2 IIIc過剰発現ヒト子宮頸癌細胞株では、マウス皮下腫瘍において腫瘍体積の増大を認めた。以上より、子宮頸癌の発癌過程や進展においてFGFR-2 IIIcが重要な役割を担っている可能性があり、子宮頸癌の予防や治療の標的として有用である可能性がある。本研究では、in vitroで子宮頸癌におけるFGFR-2 IIIcの役割を検討し、その分子標的としての有用性を検討した。

方法：

FGFR-2 IIIc 過剰発現細胞株の作成

FGFR-2 IIIcのcDNAを組み込んだpIRES2-EGFP vector (Clontech, CA, USA)を作成した。細胞にFuGENE HDを用いて遺伝子導入を行い、geneticin (500 μ g/ml)に遺伝子導入細胞を選択後にクローンを樹立した。陰性対照として、ベクターのみを遺伝子導入した細胞を用意した。PCR, western blotにて遺伝子導入効果を確認した。

FGFR-2 IIIc 過剰発現細胞株におけるFGF1, FGF2 投与の影響

上記の細胞 (5,000 cells/well) を10%血清入り培地で調整し、96-well plateにて培養し24時間後に、recombinant human FGF1, FGF2 (100 ng/ml, R&D systems, OH, USA)入りの無血清培地に交換した。24、48、72、96時間後にWST-8 cell counting reagent (和光純薬工業株式会社、大阪)を投与し、4時間後に、ELISA plate reader (Bio-Rad Laboratory, CA, USA)にて450 nmの発色強度を測定した。

FGFR-2 阻害剤投与による細胞増殖抑制効果の検討

細胞 (5,000 cells/well) を10%血清入り培地で調整、96-well plateにて培養し24時間後に、

FGFR-2 阻害剤である PD173074 (Stemgent, CA, USA) を 1, 3, 6, 10 μ mol 投与した。対照として DMSO を同量投与した。48 時間後に WST-8 cell counting reagent を投与し、4 時間後に、ELISA plate reader にて 450 nm の発色強度を測定した。

結果：

FGFR-2 IIIc 過剰発現 CaSki 細胞に、FGF1, FGF2 を投与したところ、明らかな細胞増殖能の変化を認めなかった。10%FBS 入り培地では、FGFR-2 IIIc 過剰発現細胞で増殖能の亢進を認めたことから、FGF1, FGF2 以外のリガンドの関与が示唆された。

quantitative real time RT-PCR 法にて、ヒト子宮頸癌培養細胞 CaSki、及び ME-180 のいずれも同程度の FGFR-2 の発現量を認めた (図 2A)。これらの細胞株に FGFR-2 阻害剤 PD173074 を投与したところ、CaSki 細胞では 1 μ mol の濃度から増殖抑制効果を認めた (図 2B, *P<0.05 vs nontreated cells)。一方で ME-180 細胞では、10 μ mol の濃度にて有意な抑制効果を認めた (*P<0.05 vs nontreated cells)。

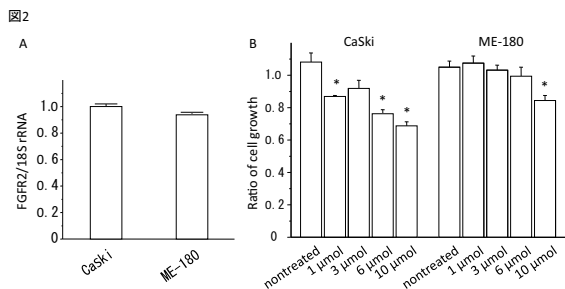


図 2. FGFR-2 阻害剤 PD173074 の増殖抑制効果の検討。コントロールの DMSO 投与群に対して、阻害剤投与群の吸光度の比を示す。CaSki 細胞では阻害剤濃度 1 μ mol から、ME-180 細胞では 10 μ mol から増殖抑制効果を認めた (*P<0.005 vs nontreated)。

考察：

様々な増殖因子やその受容体の過剰発現が癌の増殖や進展に関与しているため、これらを標的とした分子標的治療の有用性が期待されている。増殖因子受容体の一つである FGFR-2 IIIc は、子宮頸癌の発癌過程に応じて発現が亢進し、癌では全

ての症例で過剰発現を認めた。さらに、ヒト培養細胞を用いた検討で、FGFR-2 IIIc の発現が癌細胞の増殖と密接に関連することが明らかになった。以上より、FGFR-2 IIIc は子宮頸癌の新規治療標的として有用である可能性がある。

近年の分子標的治療の戦略としては、小分子、抗体、RNA 干渉を用いた阻害といった異なる手法がそれぞれ試みられている状況である (図 3)。

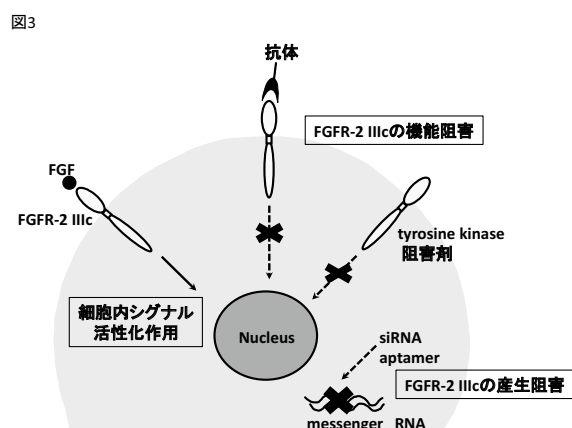


図 3. FGFR-2 IIIc を標的とした治療方法。FGFR-2 IIIc に特異的リガンドである FGF が結合すると細胞内シグナル伝達系が活性化され、細胞増殖が亢進する。抗体、小分子による FGFR-2 IIIc の機能阻害や、RNA 干渉による FGFR-2 IIIc 産生抑制によって、FGFR-2 IIIc を阻害する。

FGFR-2 に対しても様々な小分子化合物による阻害剤の開発が進んでいるが、FGFR-2 特異的な阻害剤や FGFR-2 のスプライシングアイソフォームに特異的な阻害剤は未だ開発されていない。本研究で用いた FGFR-2 阻害剤 PD173074 も、FGFR-1, FGFR-3 や VEGFR に対する阻害効果が認められている。これまでの我々の検討で、膀胱癌では FGFR-2 IIIb と IIIc のアイソフォームは異なる働きを有しており、FGFR-2 IIIc 特異的抗体を投与することによって癌細胞の増殖や遊走が抑制されたことから^[4]、今後、アイソフォーム特異的阻害方法の確立が望まれている。

現在までに、我々は FGFR-2 IIIc に対する polyclonal 抗体および monoclonal 抗体を作成し、それぞれが膀胱癌や大腸癌細胞における増殖抑制効果を認めることを明らかにしている^[4,5]。今後はこれら特異的抗体の子宮頸癌に対する有用性を解明

し、臨床応用へ向け、検討を行っていく予定である。

References

1. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, and Williams ED: Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res*, 2006; 66: 11271-8.
2. Kurban G, Ishiwata T, Kudo M, Yokoyama M, Sugisaki Y, and Naito Z: Expression of keratinocyte growth factor receptor (KGFR/FGFR2 IIIb) in human uterine cervical cancer. *Oncol Rep*, 2004; 11: 987-91.
3. Kawase R, Ishiwata T, Matsuda Y, Onda M, Kudo M, Takeshita T, and Naito Z: Expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc in human uterine cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Oncol*, 2010; 36: 331-40.
4. Ishiwata T, Matsuda Y, Yamamoto T, Uchida E, Korc M, and Naito Z: Enhanced Expression of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 IIIc Promotes Human Pancreatic Cancer Cell Proliferation. *Am J Pathol*, 2012; 180: 1928-41.
5. Matsuda Y, Hagio M, Seya T, and Ishiwata T: Fibroblast Growth Factor Receptor 2 IIIc as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer Cells. *Mol Cancer Ther*, 2012; 11: 2010-20.