

博士論文

癌治療に向けた線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR)

選択的阻害剤の創製と FGFR の機能解析

中西 義人

本学位論文は、下記の投稿論文を基に作成されたものである。

1. **Nakanishi Y**, Akiyama N, Tsukaguchi T, Fujii T, Sakata K, Sase H, Isobe T, Morikami K, Shindoh H, Mio T, Ebiike H, Taka N, Aoki Y, and Ishii N. The fibroblast growth factor receptor genetic status as a potential predictor of the sensitivity to CH5183284/Debio 1347, a novel selective FGFR inhibitor. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(11):2547-58.

2. **Nakanishi Y**, Akiyama N, Tsukaguchi T, Fujii T, Satoh Y, Ishii N, and Aoki M. Mechanism of Oncogenic Signal Activation by the Novel Fusion Kinase FGFR3-BAIAP2L1. *Molecular cancer therapeutics*. 2015;14(3):704-12.

3. **Nakanishi Y**, Mizuno H, Sase H, Fujii T, Sakata K, Akiyama N, Aoki Y, Aoki M, and Ishii N. ERK Signal Suppression and Sensitivity to CH5183284/Debio 1347, a Selective FGFR Inhibitor. *Molecular cancer therapeutics*. 2015;14(12):2831-9.

略語	1
第1章 要旨.....	3
第2章 序論.....	6
2.1 癌とは.....	6
2.2 癌治療の現状	12
2.3 線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) と癌.....	15
2.4 FGFR 阻害剤研究開発状況.....	24
2.5 研究の目的.....	26
第3章 FGFR 遺伝子変異を持つ癌に対し選択的な新規 FGFR 低分子阻害剤の創製	27
3.1 緒言	27
3.2 方法と材料.....	27
3.2.1 試薬と細胞.....	27
3.2.2 プロテインキナーゼアッセイ	28
3.2.3 細胞増殖阻害アッセイ	28
3.2.4 ウェスタンブロット解析.....	28
3.2.5 ラットテレメトリー試験.....	29
3.2.6 マウスゼノグラフト試験.....	29
3.2.7 免疫染色実験	30
3.2.8 FGFR1 と CH5183284/ Debio 1347 の結晶構造解析	30
3.2.9 各種 FGFR を恒常的に発現する Ba/F3 細胞の構築.....	31
3.2.10 FGFR2 の免疫沈降アッセイ	31
3.3 結果	31
3.3.1 FGFR1、FGFR2 と FGFR3 に対する選択的阻害活性	31
3.3.2 CH5183284/Debio 1347 と FGFR1 複合体の結晶構造解析.....	42
3.3.3 FGFR 遺伝子異常癌に対する選択的な増殖阻害活性	50
3.3.4 In vivo モデルにおける FGFR 選択的な抗腫瘍効果の確認.....	59
3.3.5 FGFR2 ゲートキーパー変異に対する効果.....	62
3.4 考察と小括	69
第4章 新規 FGFR3 融合遺伝子の発見とその機能解析	70
4.1 緒言	70
4.2 材料と方法.....	75
4.2.1 試薬と細胞.....	75
4.2.2 FGFR3-BAIAP2L1 融合遺伝子の PCR 法による増幅とシーケンス.....	75

4.2.3	ソフトアガーコロニーフォーメーションアッセイ、スフェロイド形成アッセイとゼノグラフトマウスモデル作成.....	75
4.2.4	In vitro と in vivo 薬効試験.....	76
4.2.5	RNA シークエンスと mRNA 発現解析.....	76
4.2.6	各 FGFR3 のリン酸化レベルと二量体化レベルの確認.....	77
4.3	結果.....	78
4.3.1	FGFR3-BAIAP2L1 融合遺伝子陽性患者の探索.....	78
4.3.2	FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼの癌化促進作用.....	81
4.3.3	FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼのパスウェイ解析.....	86
4.4.4	FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼの持つ BAR ドメインの機能解析.....	92
4.4.5	FGFR3-BAIAP2L1 の BAR ドメインが二量体化に与える影響.....	94
4.4	考察と小括.....	96
第 5 章	ERK シグナル阻害と FGFR 阻害剤の効果.....	98
5.1	緒言.....	98
5.2	材料と方法.....	99
5.2.1	試薬と細胞.....	99
5.2.2	マイクロアレイ解析.....	99
5.2.3	遺伝子シグネチャー解析.....	100
5.2.4	細胞増殖阻害アッセイ.....	100
5.2.5	ウェスタンブロット解析.....	100
5.3	結果.....	101
5.3.1	FGFR1 遺伝子増幅癌における FGFR 阻害剤による MAPK 経路阻害....	101
5.3.2	FGFR 阻害剤の効果と ERK シグナル阻害との相関.....	103
5.3.3	FGFR 阻害剤の効果と DUSP6 発現変化との相関.....	105
5.4.4	フィードバック活性化を伴わない MAPK 経路阻害活性の重要性.....	111
5.4	考察と小括.....	115
第 6 章	総括.....	118
第 7 章	引用文献.....	120
第 8 章	謝辞.....	130

略語

ABL:	Abelson tyrosine protein kinase 1
ADCC:	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AKT:	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ATP:	Adenosine triphosphate
BAIAP2L1:	BAI1-associated protein 2-like 1
BAR:	Bin/Amphiphysin/Rvs
BCR:	Breakpoint cluster region
BRAF:	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
cDNA:	Complementary DNA
c-KIT:	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DNA:	Deoxyribonucleic acid
DUSP6:	Dual specificity phosphatase 6
E2F1:	E2F transcription factor 1
E2F2:	E2F transcription factor 2
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
EML4:	Echinoderm microtubule associated protein like 4
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
FGF:	Fibroblast growth factor
FGFR:	Fibroblast growth factor receptor
FGFR1:	Fibroblast growth factor receptor 1
FGFR2:	Fibroblast growth factor receptor 2
FGFR3:	Fibroblast growth factor receptor 3
FGFR4:	Fibroblast growth factor receptor 4
FRS:	Fibroblast growth factor receptor substrate
HER2:	Human epidermal growth factor receptor 2
IC50:	Inhibitory concentration 50
IL3:	Interleukin 3
KDR:	Kinase insert domain receptor
KRAS:	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MAPK:	Mitogen-activated protein kinases
MEK:	MAPK/ERK kinase
mRNA:	Messenger ribonucleic acid
MYC:	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NF1:	Neurofibromin 1
NPM:	Nucleophosmin
PDGFR:	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K:	Phosphoinositide 3-kinase
RB1:	Retinoblastoma 1
RET:	Ret proto-oncogene
RNA:	Ribonucleic acid
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl (lauryl) sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SH:	Src Homology 2
SRC:	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
STAT1:	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT3:	Signal transducer and activator of transcription 3
TACC3:	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
TEL:	The translocation E26 transforming-specific leukaemia
TFG:	TRK-fused gene
UTR:	Untranslated region
VEGF-A:	Vascular endothelial growth factor A
WT:	Wild type

第1章 要旨

現在、癌は世界的にも主要な死因のひとつである。世界保健機構によると、世界的な高齢化により今後も癌患者数は増加し、2030年には死亡者数が1300万人に達すると推測されている。依然として治療満足度の低い疾患ではあるが、近年、特定の分子を治療標的とした分子標的薬が数多く開発され、いくつかはある特定の癌患者の生存期間を延長する有効性が確認されている。現在までに、EGFR阻害剤、抗HER2抗体、BCR-ABL阻害剤のようなチロシンキナーゼを標的とした薬剤が上市されており、各々の薬剤の標的遺伝子が増幅、変異、転座等により活性化している癌、又は標的蛋白質が過剰発現している癌に対して効果を発揮することが示されている。しかし、これら分子標的薬が効果を示さない癌はまだ多く残っており、分子標的薬以外の既存抗癌剤の治療成績も十分とは言えず、有効かつ安全で、患者の **quality of life** を高める新規薬剤の開発が望まれている。

線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) は、4種類のファミリー (FGFR1~4) からなる受容体型チロシンキナーゼである。通常 FGFR は、リガンド依存的に二量体を形成することにより活性化し、下流の MAPK 経路や PI3K/AKT 経路を活性化することが知られている。FGFR の癌との関連性については、*FGFR* 遺伝子の増幅、変異、転座や FGFR 蛋白質の過剰発現による活性化が癌を引き起こす原因となっていることが知られている。また、FGFR は癌細胞の増殖、血管新生、細胞遊走、浸潤、転移等に関わっていることも知られている。

FGFR の活性化が悪性化の原因となっている癌を治療することを目的とし、FGFR 選択的な低分子阻害剤、CH5183284/Debio 1347 を創製した。本化合物は、*in vitro* の酵素阻害試験において FGFR1、FGFR2 及び FGFR3 を選択的に阻害することが示された。選択性が得られた原因を検証するため FGFR1 と CH5183284/Debio 1347 の複合体の結晶構造解析を行い、CH5183284/Debio 1347 の持つベンズイミダゾール部位が特徴的な役割をしていることが示唆された。また、*in vitro* 及び *in vivo* において、*FGFR1*、*FGFR2* 及び *FGFR3* 遺伝子の増幅、変

異、転座を有する癌に対して高い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。さらに、既存の FGFR 阻害剤に耐性を示す変異を持つ癌に対しても効果を示すことがわかった。したがって、CH5183284/Debio 1347 は、*FGFR1*、*FGFR2* 及び *FGFR3* 遺伝子に異常を有する癌患者に対して新たな治療機会を提供することが期待される。

次に、CH5183284/Debio 1347 の新しい治療対象患者を見出すため、新規の FGFR 活性化機構を探索し、その機能評価を行った。これまで癌細胞株でのみ見つけていた *FGFR3*-*BAIAP2L1* 融合遺伝子が一部の肺癌、膀胱癌患者において初めて発見され、*FGFR3*-*BAIAP2L1* 融合遺伝子を過剰発現するラット正常細胞は非常に強い腫瘍形成能を持つことが分かった。また、CH5183284/Debio 1347 が *FGFR3*-*BAIAP2L1* 融合遺伝子により形成された腫瘍の増殖を抑えることも示された。シグナル解析を行うと、*FGFR3*-*BAIAP2L1* 融合遺伝子発現により MAPK 経路とその下流の転写因子が活性化するとともに、p53 や RB などのがん抑制遺伝子の活性が抑えられていることが分かった。また、*FGFR3*-*BAIAP2L1* 融合キナーゼの活性化は BAR ドメインを介した恒常的な *FGFR3* の二量体化によるものであるということが示された。したがって、恒常的に活性化している *FGFR3*-*BAIAP2L1* 融合遺伝子を持つ癌患者は、CH5183284/Debio 1347 により高い効果を得られることが期待される。

最後に、CH5183284/Debio 1347 投与による薬効発揮をより高い精度で予測するため、FGFR のシグナル解析を行った。マイクロアレイを用い、CH5183284/Debio 1347 を *FGFR* 遺伝子変異保有癌細胞株に添加することにより発現変化する遺伝子を抽出したところ、MAPK 経路関連遺伝子が多く変化していることが分かった。一方で、FGFR の下流経路として良く知られている PI3K-AKT 経路に一貫した変化はなかった。MAPK 経路関連遺伝子の中でも特に強く応答している遺伝子として *DUSP6* が抽出され、CH5183284/Debio 1347 投与による *DUSP6* の発現減少は CH5183284/Debio 1347 の抗腫瘍効果と一致することが示された。一方で、MAPK 経路阻害剤は *FGFR* 遺伝子変異保有癌細胞株には効果を示さなかった。それは、FGFR 以外の経路が活性化することにより MAPK 経路阻害の効果を打ち消していることが原因である可能性が示唆さ

れた。つまり、*FGFR* 遺伝子変異癌における *DUSP6* 遺伝子の発現変化は *FGFR* 阻害剤特有の効果予測マーカーであることが示唆された。

FGFR 選択的阻害剤 CH5183284/Debio 1347 は、*DUSP6* のようなマーカーで効果をモニタリングしながら、*FGFR* 遺伝子に異常を有する癌患者を治療することで、最大限の効果を発揮し、癌患者の生存延長と健康に貢献することが期待される。

第2章 序論

2.1 癌とは

現在、我が国における人口あたりの死亡率は癌が一番高く、平成26年の死亡率は人口10万人当たり293.5となっており、圧倒的に高い比率を示している。続いて、心臓病が157、脳炎が95.4、脳卒中が91.1、老衰が60.1となっている。年次推移をみると、癌の死亡率は昭和22年の統計開始後から一貫して上昇を続け、約4倍になっている(図1)(1)。これは人口の高齢化も関係しているため、その集団における人口の年齢構成の差を取り除いて比較すると、各死亡率は総じて低下傾向にはあるが、癌は依然として第一位である(図2)(1)。この傾向は日本だけでなく諸外国でも同様であり、癌の治療薬に対するニーズは世界的に非常に高いものと考えられる(図3)(1)。

がんとは、関連する疾患の総称であり、すべてのがんは、正常な細胞が変化したものである。正常な組織において、正常な細胞は必要な分だけ分裂・増殖し、ダメージを受けたり老化したりするとアポトーシスなどにより死滅し、新しい細胞に置き換わるというサイクルが回っている。一方でがん細胞は、この正常なサイクルが様々な理由により制御不能になっており、死ぬべき時に死なず、際限なく増殖する。がん細胞が増殖した結果、腫瘍と呼ばれる物体が形成される。腫瘍には悪性腫瘍と良性腫瘍があり、良性腫瘍は通常の場合は無害で周辺組織に浸潤していくことはない。一方で悪性腫瘍は際限なく増殖し、さらに一部のがん細胞は血管系やリンパ系を使って原発巣と離れた場所に転移し、そこでまた増殖する。部位別にみたがんの死亡率は、男女ともに肺癌、胃癌、大腸癌がトップ3位に入っている(図4)(1)。特に胃癌は日本を含むアジアで罹患率の多い癌として知られている。

がんは主には遺伝子の病気だと考えられている。つまり、細胞の増殖に必要な遺伝子に変異が入って活性化したり、細胞の増殖を抑える遺伝子に変異が入って不活性化されたりすることで、細胞が際限なく増殖できるようになっているということである。遺伝子の変異は先天的なものと

後天的なものがある。後天的な変異は、たばこに含まれる化学物質やアルコール、太陽の紫外線などによる刺激により DNA が損傷することにより起こる。多くは DNA 修復酵素の働きにより正常な DNA 配列に修復されるが、かなり低い確率ではあるが修復されずに変異が残ったままになる。この変異ががん細胞の増殖などに必要な遺伝子に起こることで正常細胞ががん化すると考えられており、変異が蓄積していくことががんの悪性化と関連しているとも考えられている。

DNA 修復に失敗し、変異が入った DNA を持つ細胞も多くの場合は免疫細胞によって除去される。変異が入った DNA 配列は変異蛋白質に翻訳され、通常はこの変異蛋白質が異物として認識され免疫細胞の攻撃を受けるからである。しかし、がん細胞は免疫細胞の免疫反応を抑制する機能を持つことで、生存・増殖していく。このように、がんは様々な原因により無限の増殖能を手に入れ、生体内の何段階ものがん化防御機構を潜り抜け、人間を死に至らしめる。つまり、がんが増殖するメカニズム、生体内の防御システムを克服するメカニズムについて深く理解することが、がんの治療薬を開発することに繋がると考えられる。

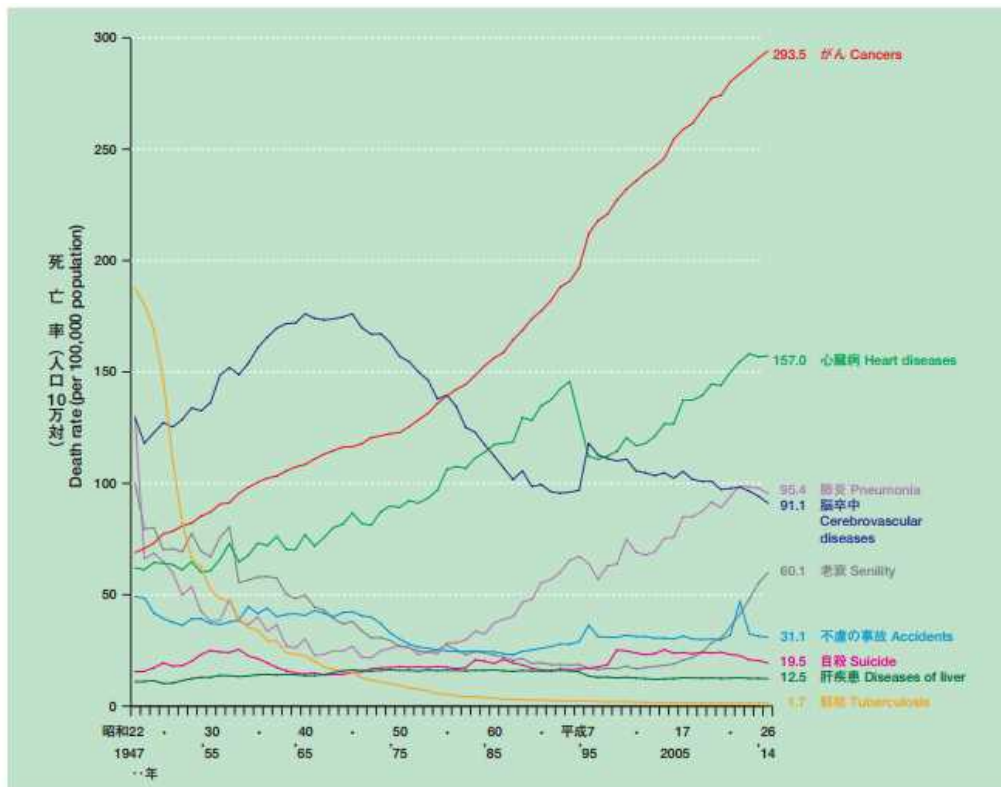
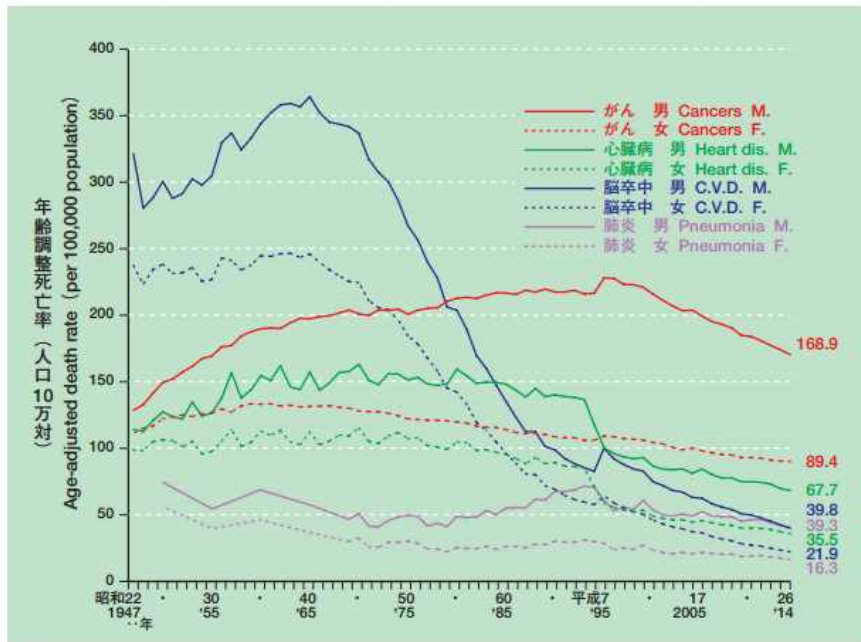


図 1 主な死因にみた死亡率の年次推移 —昭和 22～平成 26 年—
厚生労働省、平成 26 年我が国の人口動態より引用



- 注：1) C.V.D. ← Cerebrovascular diseases
 2) Heart dis. ← Heart diseases(excluding hypertensive heart diseases)
 3) 年齢調整死亡率については、5頁、55頁を参照
 4) 肺炎については、昭和25～40年までは5年ごと、44年以降は各年のデータである。

図 2 主な死因別にみた性別年齢調整死亡率の年次推移 昭和 22～平成 26 年
 厚生労働省、平成 26 年我が国の人口動態より引用

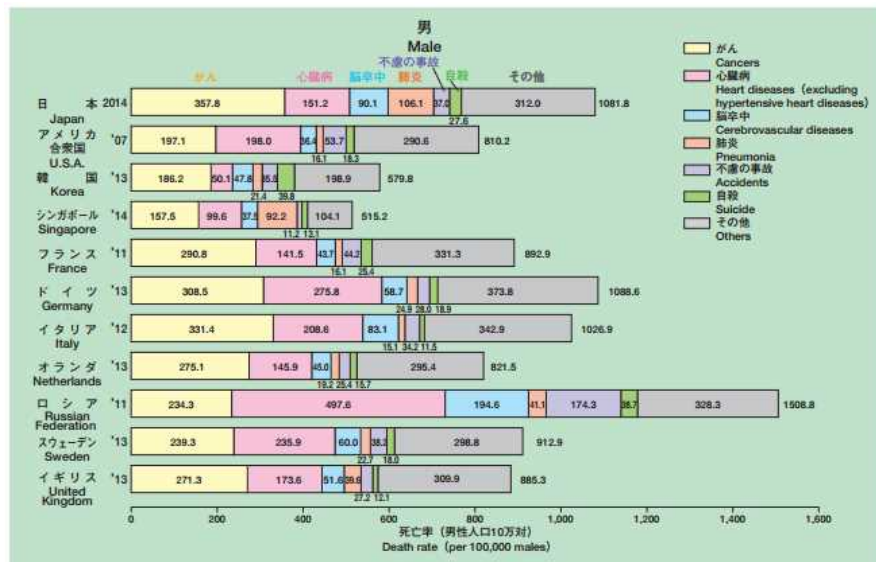
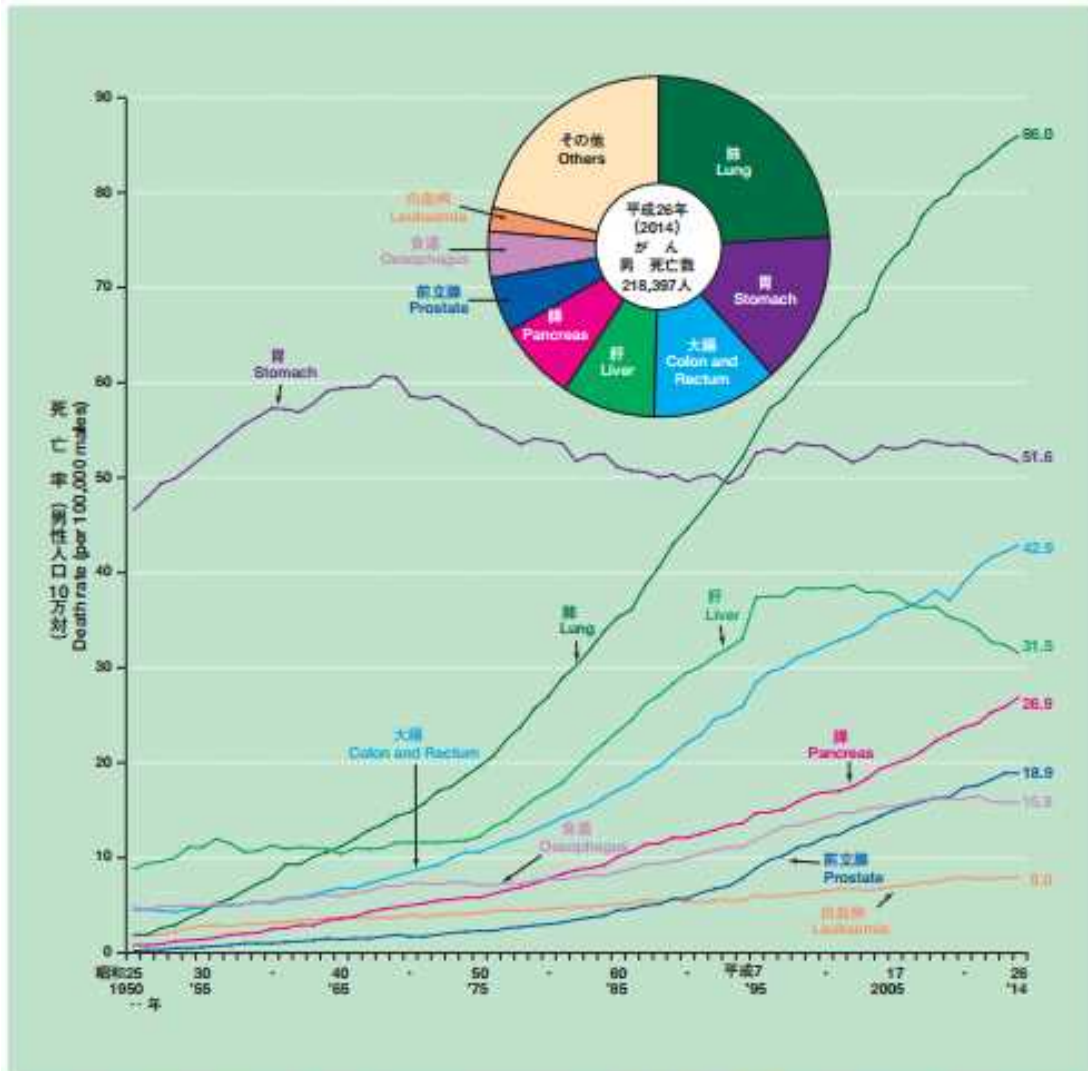


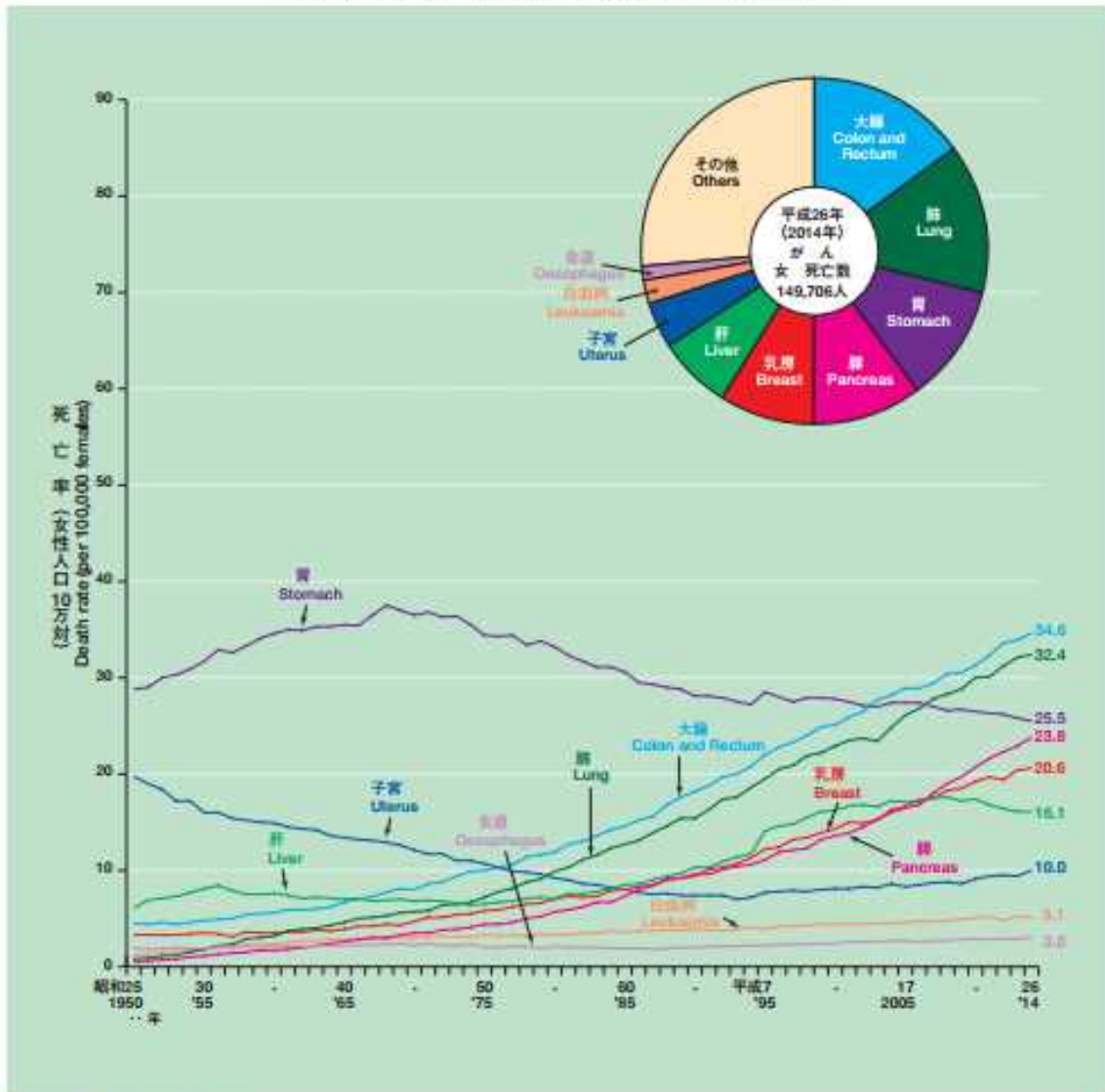
図 3 主な死因別死亡率の諸外国との比較 (男)
 厚生労働省、平成 26 年我が国の人口動態より引用

部位別にみたがんの死亡率の年次推移，男—昭和25～平成26年—
Trends in death rates for cancers by site, Male, 1950-2014



注：1) 大腸—結腸と直腸S状結腸移行部及び直腸（昭和42年まで直腸肛門部を含む。） Colon and Rectum—Colon and rectosigmoid junction and rectum
2) 肝—肝及び肝内胆管（昭和32年まで胆のう及び肝外胆管を含む。） Liver—Liver and intrahepatic bile ducts
3) 肺—気管、気管支及び肺 Lung—Trachea, bronchus and lung

部位別にみたがんの死亡率の年次推移，女—昭和25～平成26年—
Trends in death rates for cancers by site, Female, 1950-2014



注：平成8年以前の「子宮」は卵巣を含む。

図 4 部位別にみたがんの死亡率の年次推移

厚生労働省、平成26年我が国の人口動態より引用

2.2 癌治療の現状

近年、特定の分子を治療標的とした分子標的薬が数多く開発され、いくつかは臨床で患者の生存期間を延長する有効性が確認されている（図 5）。例えば、EGFR キナーゼ阻害剤の erlotinib や gefitinib は *EGFR* 遺伝子に活性型変異を持つ肺癌患者に高い効果を示している。EGFR は受容体型チロシンキナーゼの一つで、通常は EGF などのリガンドの刺激により活性化することが知られている。もともと erlotinib や gefitinib は、進行・再発性の非小細胞肺がんの患者に広く使われていた。しかしその当時の効果は非常に限定的で、erlotinib 投与群の無増悪生存期間中央値は 2.2 ヶ月、プラセボ投与群は 1.8 ヶ月であった(2)。また erlotinib は、膵癌でも、代謝拮抗薬である gemcitabine との併用で使われているが、その効果も限定的で erlotinib と gemcitabine の併用群の無増悪生存期間中央値が 3.75 ヶ月なのに対して、gemcitabine のみの投与群では 3.55 ヶ月である (3)。そんな中、肺癌の患者の一部に erlotinib が非常によく効くことが示されてきた。当時は女性の非喫煙者に対する効果が高いという情報しかなかったが、その原因を調べると、*EGFR* 遺伝子に活性型変異が入っている患者に対して特に高い効果を示すことがわかってきた。その証拠をもとに行った臨床試験の結果が次のような結果である。erlotinib 投与群の無増悪生存期間の中央値が 9.4 ヶ月、当時の標準治療を受けた群では 5.2 ヶ月だった (4)。EGFR 阻害剤を投与すべき患者に投与すれば非常に高い効果を示すことができるという一つの例である。

抗 HER2キナーゼ抗体の trastuzumab は *HER2*遺伝子増幅陽性もしくは蛋白質高発現の乳がん患者や胃がん患者に、ABL 阻害剤の imatinib は *BCR-ABL* 融合遺伝子陽性の慢性骨髄性白血病患者に、ALK 阻害剤の alectinib は *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性の肺癌患者に対して高い効果を示している。これらの薬剤の特徴は、それぞれの標的遺伝子に対する阻害活性が非常に選択的であるということと、各々の薬剤の標的遺伝子が増幅、変異、転座等により活性化している癌、又は標的蛋白質が過剰発現している癌に対してのみ効果を発揮しており、それ以外の癌にはほとんど効果を示さないということである。つまり、正常細胞に対する作用も少なく、安全性が非常

に高いことが立証されている。これらの抗癌剤の台頭により、一部の癌の治療体系は大きく変化した。これまでは癌種ごとに治療方針が決められていたが、現在では、癌の遺伝子解析を行った後に、その人の持つ癌に適した治療方針を決定するというようにである。一般的にこれは個別化医療と呼ばれる。基本的に個別化医療は、効く患者を選んで行うものであるが、大腸癌においては効かない患者を除くということも行われている。例えば、抗 EGFR 抗体 cetuximab を用いた治療がそうである。cetuximab は、EGFR のシグナルを抑制し癌の増殖を抑える作用と免疫細胞を介した細胞障害活性（ADCC 活性）により癌を殺す作用を持つことが知られており、大腸癌において標準治療との併用で使用されていた。しかし、KRAS という EGFR の下流にある遺伝子に変異があり活性化していると cetuximab が効果を示さないことがわかってきた。KRAS 野生型群に対する cetuximab 投与による生存期間中央値が9.5ヶ月、KRAS 変異型群の生存期間中央値が4.8ヶ月だった (5)。その後、cetuximab 以外の抗 EGFR 抗体においても同じことが示されたことにより、抗 EGFR 抗体投与前には KRAS 遺伝子の変異有無を判定し、変異が無い患者にのみ抗 EGFR 抗体が投与されることとなっている。現在、ある種の癌に対する治療においては、治療前の遺伝子診断が大きな役割を果たしており必須のものとなっているが、まだすべての癌に対して遺伝子診断が有効活用されているわけではない。遺伝子診断はその遺伝子の治療薬があつて初めて意味があるものだからである。したがって、既存の癌遺伝子以外の癌遺伝子を研究し、その薬を開発し続けることが、より多くの癌患者に対して個別化医療を行うことに繋がると考えられる。

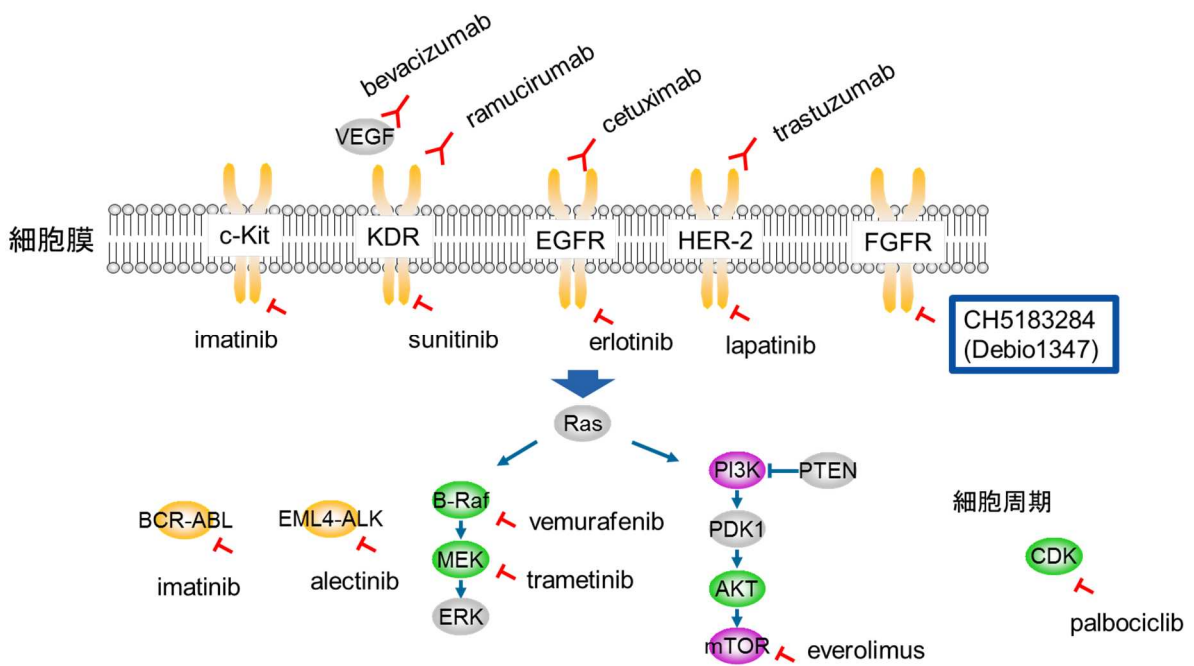


図 5 これまで開発されてきた分子標的薬の例

2.3 線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) と癌

線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) は、4 種類ファミリー (FGFR1~4) からなる受容体型チロシンキナーゼであり、細胞外領域の IgI ドメイン、IgII ドメインと IgIII ドメイン、細胞内領域のチロシンキナーゼドメインで構成されている (図 6a) (6)。各 FGFR キナーゼドメイン間の相同性は比較的高く、75%から 92%程度ある (図 7)。また、選択的スプライシングにより 7 種類の FGFR 蛋白質 (FGFR1b、FGFR1c、FGFR2b、FGFR2c、FGFR3b、FGFR3c、FGFR4) が存在する (図 6b)。FGFR のリガンドである線維芽細胞増殖因子 (FGF) は 23 種類存在し、多様な FGF と多様な FGFR がそれぞれ組織特異的に発現することにより、形態形成、組織修復、代謝調節等の多様な作用と役割を果たしている。また、上述した FGFR のアイソフォームごとにリガンド選択性が変化することも知られている (図 6c)。FGF はヘパリナーゼやプロテアーゼなどによって細胞外マトリクスから遊離する。ヘパリンは遊離した FGF と FGFR との結合を安定化し、FGF-FGFR コンプレックスの最終形態形成に寄与している。通常 FGFR は、FGF リガンド依存的に二量体を形成することによりチロシン残基がリン酸化され活性化し、FRS2 などのアダプター蛋白質をリン酸化し結合して下流の MAPK 経路や PI3K/AKT 経路を活性化することが知られている (図 8)。

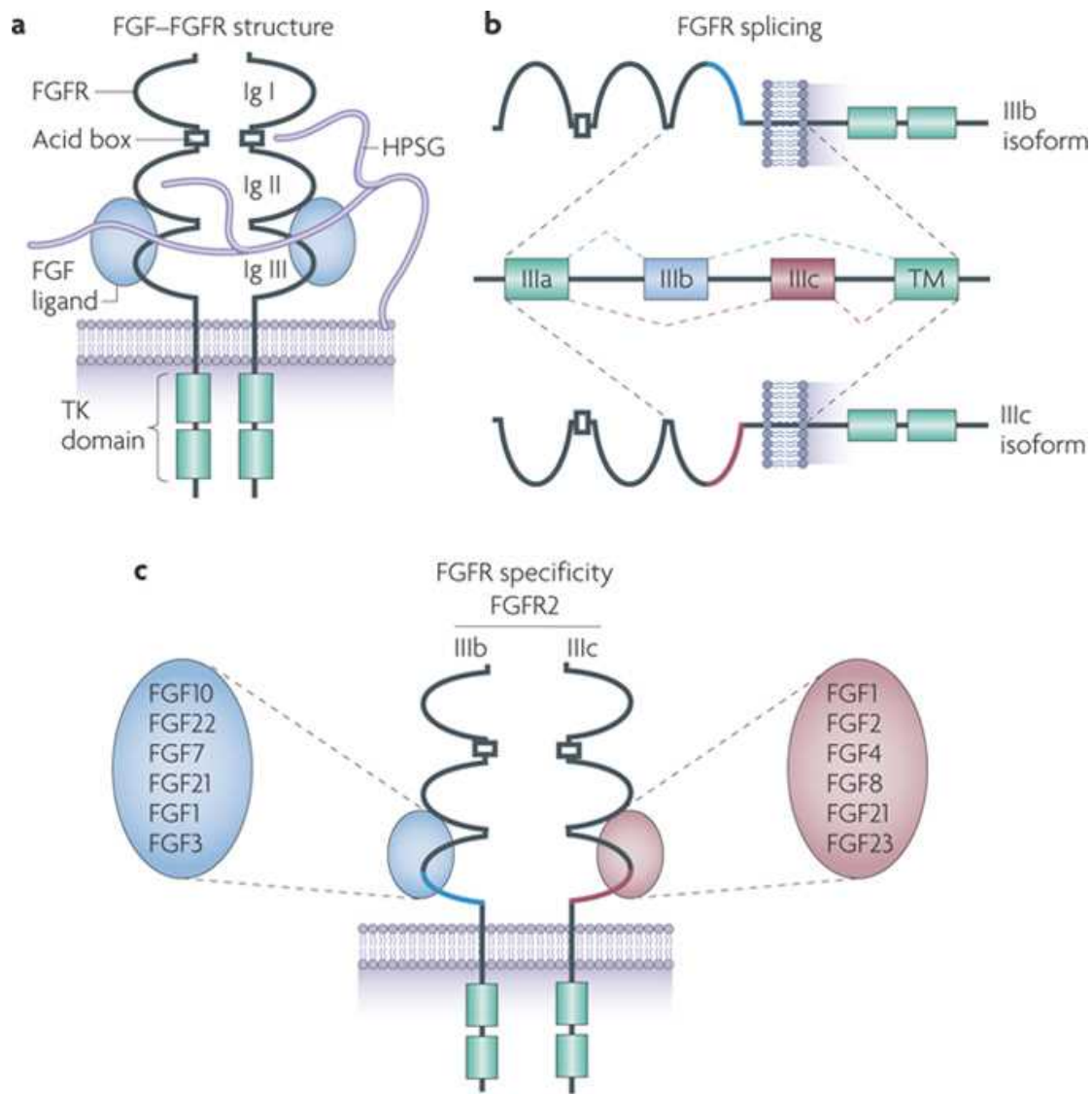


図 6 FGFR の基本構造とリガンド選択性

a. FGF-FGFR コンプレックスの基本構造。b. FGFR のアイソフォームのパターン。c. FGFR2 におけるアイソフォームごとのリガンド選択性の例。HSPG: heparan sulphate proteoglycan、Ig: immunoglobulin、TK: tyrosine kinase、TM: transmembrane。

Nat Rev Cancer. 2010;10(2):116-29.


```

FGFR1  HNPEEQLSSKDLVSCAYQVARGMEYLASKKC IHRDLAARNVLVTEDNVMK IADFGGLARD I
FGFR2  RVPEEQMTFKDLVSCYQLARGMEYLASQKC IHRDLAARNVLVTENNVMK IADFGGLARD I
FGFR3  KPPEEQLTFKDLVSCAYQVARGMEYLASQKC IHRDLAARNVLVTEDNVMK IADFGGLARD I
FGFR4  RSSEGPLSFPVLVSCAYQVARGMQYLESRKC IHRDLAARNVLVTEDNVMK IADFGGLARGV
: . *  : :  ***:*.***:*. * :*****:*****:

```

```

FGFR1  HHIDYKKTNGRLPVKWMPEALFDR IYTHQSDVWSFGVLLWE IFTLGGSPYPGVPVEE
FGFR2  NNIDYKKTNGRLPVKWMPEALFDRVYTHQSDVWSFGVLMWE IFTLGGSPYPGIPVEE
FGFR3  HNLDYKKTNGRLPVKWMPEALFDRVYTHQSDVWSFGVLLWE IFTLGGSPYPGIPVEE
FGFR4  HHIDYKKTNSGRLPVKWMPEALFDRVYTHQSDVWSFG ILLWE IFTLGGSPYPGIPVEE
: : *****:*****:*****:*.*****:*****

```

```

FGFR1  LFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDR IVALTSNGEYLD
FGFR2  LFKLLKEGHRMDKPANCTNELYMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDR I LTLTTNEEYLD
FGFR3  LFKLLKEGHRMDKPANCTHDLYMI MRECWHAAPSQRPTFKQLVEDLDRVLTVTSTDEYLD
FGFR4  LFSLLREGHRMDRPPHCPPELYGLMRECWHAAPSQRPTFKQLVEALDKVLLAVS-EEYLD
**.*:*****:*. :*. :** :**:* ** :***** **:: . : :****

```

```

FGFR1  LSMPLDQYSPSPDTRSSTCSSGEDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR
FGFR2  LSQPLEQYSPSPDTR-SSCSSGDDSVFSPDPMPYEPCLPQYPHINGSVKT---
FGFR3  LSAPFEQYSPGGQDTP-SSSSGDDSVFAHDLLPPAPPSSGGSRT-----
FGFR4  LRLTFGPYSPSGGDAS--STCSSSDSVFSDPLPLGSSSFPGSGVQT-----
* . :  **,*  * :  :.*.****: : :* .

```

図 7 FGFR ファミリーのアライメント

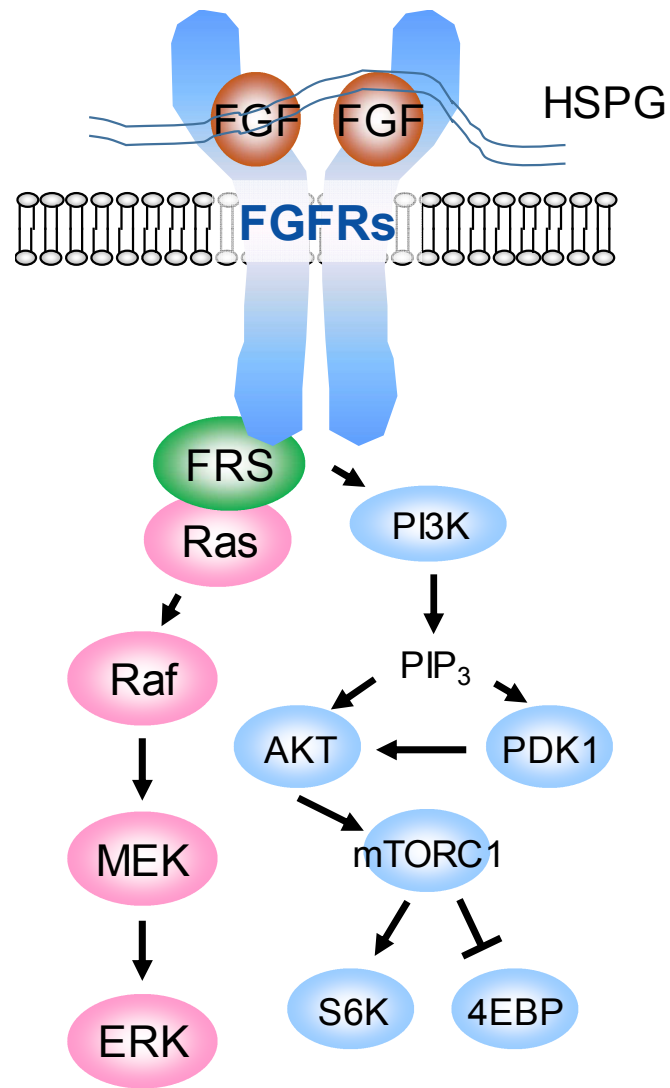


図 8 FGFR とその下流シグナル

FGFR の癌との関連性については、*FGFR* 遺伝子の増幅、点変異、転座や FGFR 蛋白質の過剰発現による FGFR の活性化が癌を引き起こす原因となっていることが知られている。また、FGFR は癌細胞の増殖、血管新生、細胞遊走、浸潤、転移等に関わっていることが知られている (7, 8)。癌で認められる FGFR の変化として、FGFR1、FGFR2 及び FGFR3 の各々で以下の変化が認められている。*FGFR1* では、乳癌、非小細胞性肺癌、小細胞性肺癌、食道癌及び頭頸部癌における遺伝子増幅 (9-14)、急性骨髄性白血病及び脳腫瘍における遺伝子転座による融合蛋白質形成 (15, 16)、膵癌、膀胱癌、前立腺癌及び食道癌における FGFR1 蛋白質の過剰発現が認められている (6, 17)。乳癌においては、エストロゲン受容体陽性群の中でもより悪性度の高いルミナル B タイプにおいて *FGFR1* の遺伝子増幅がより高い頻度で起こっていることがわかっている (11)。非小細胞肺癌においては、扁平上皮癌で 10-20%、腺癌で 3%程度の患者が *FGFR1* 遺伝子増幅を持つことが報告されており、さらには、頭頸部扁平上皮癌、食道扁平上皮癌においてもそれぞれ 10%程度の遺伝子増幅が報告されており、癌扁平上皮癌に特徴的な遺伝子の変化であることがわかる (9, 13, 14)。*FGFR2* では、胃癌及び乳癌における遺伝子増幅 (18-20)、子宮体癌における遺伝子点変異 (21, 22)、前立腺癌、食道癌、卵巣癌、膵癌及び大腸癌における FGFR2 蛋白質の過剰発現が認められている (17)。胃癌において、*FGFR2* の遺伝子増幅頻度は 4-10%程度で、遺伝子増幅により蛋白質が高発現し FGFR2 が恒常的に活性化していると考えられている。特に、胃癌の中でも非常に予後の悪い、スキルス型の胃癌における遺伝子増幅頻度が高く、治療標的として非常に期待されている (23, 24)。乳癌全体でみると *FGFR2* の遺伝子増幅頻度は低いが、トリプルネガティブ乳癌という治療成績の非常に悪い患者群においては、4%の頻度がある (20)。子宮体癌においては 10-16%の頻度で *FGFR2* の活性型点変異が起きている (21)。子宮体癌で報告されている点変異の多くはアペール症候群やクルーゾン症候群という発達不全の遺伝病で報告されているものである (22)。子宮体癌では 11 種の点変異が報告されており、S252W という点変異の頻度が一番高い。この点変異は FGF リガンド結合ドメインに位置しており、FGF リガンドとの結合能が上昇することで FGFR2 が活性化していると考えられてい

る (25)。その他、キナーゼドメインの点変異による活性化なども報告されている (21, 26)。

FGFR3 では、膀胱癌及び肺扁平上皮癌における遺伝子点変異 (26-29)、多発性骨髄腫、脳腫瘍、膀胱癌及び肺扁平上皮癌における遺伝子転座 (16, 30-33)、卵巣癌、非小細胞性肺癌、肝細胞癌における *FGFR3* 蛋白質の過剰発現が認められている(17)。膀胱癌において、*FGFR3* の点変異の頻度は癌の進行度によって異なることが報告されている。非浸潤性の膀胱癌では 38-66%、浸潤性の膀胱癌では 15-20%という具合である(28, 29)。なぜ癌が進行するにしたがって *FGFR3* 点変異の頻度が落ちていくのかは未だ不明であるが、S249C という一番頻度が高く報告されている活性型点変異に限ると、進行度が高い癌においてもある程度の点変異頻度を維持している。このことから、点変異の種類によって癌の進行に与える影響が違ふことが示唆されている。S249C 点変異による *FGFR3* 活性化のメカニズムは、システインにより *FGFR3* が共有結合し、それによる恒常的なホモダイマーの形成である(34, 35)。膀胱癌で報告されているほとんどすべての点変異は、致死性骨異形成症かその他の先天性頭蓋骨癒合症で報告されている点変異である (36)。*FGFR3* は骨形成において負の作用をしていると考えられている。つまり、*FGFR3* が活性化していると骨が伸びない。上記の疾患では、*FGFR3* 点変異により *FGFR3* が活性化し骨形成の異常などが起こっていると考えられている。また、いくつかの癌種で起こっている *FGFR3* の遺伝子転座の主要なものは *FGFR3-TACC3* 融合遺伝子の形成である (16)。これまでに報告されている、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子である *BCR-ABL* や一部の肺癌の原因遺伝子である *EML-ALK* などと同様、融合パートナー遺伝子にコイルドコイルドメインを持ち、それにより恒常的に二量体化が誘導され活性化していると考えられている (37)。最後に、*FGFR4* については、いくつかの論文で *FGFR4* の点変異と癌との関わりが報告されているが、*FGFR1*、*FGFR2* や *FGFR3* と比較するとその寄与度は低いと考えられている。表 1 に *FGFR1*、*FGFR2*、*FGFR3* の遺伝子異常の各癌種における頻度を纏める。

表 1 各種の癌における *FGFR* 遺伝子異常の頻度

Gene	遺伝子異常	癌種
<i>FGFR1</i>	遺伝子点変異	乳癌（稀）、肺癌（稀）
	遺伝子増幅	肺扁平上皮癌（10-20%）、肺腺癌（~3%）、乳癌（10-15%）、食道癌（~10%）、頭頸部癌（~10%）
	遺伝子転座	肺扁平上皮癌（0.3-0.6%）、脳腫瘍（~3%）
<i>FGFR2</i>	遺伝子点変異	肺扁平上皮癌（~3%）、子宮体癌（10-16%）
	遺伝子増幅	胃癌（4-10%）、乳癌（~4%）
	遺伝子転座	肺扁平上皮癌（~0.3%）
<i>FGFR3</i>	遺伝子点変異	膀胱癌（10-15%）、肺扁平上皮癌（~3%）
	遺伝子転座	肺扁平上皮癌（1-3.5%）、肺腺癌（~0.5%）、膀胱癌（~6%）、脳腫瘍（3-7%）
<i>FGFR4</i>	遺伝子点変異	肺癌（稀）、子宮体癌（稀）

2.4 FGFR 阻害剤研究開発状況

FGFR 阻害剤を大きく分類すると、FGFR 以外の種類のキナーゼも阻害してしまう第一世代の FGFR 阻害剤と、FGFR ファミリーに対する選択性が非常に高い第二世代の FGFR 阻害剤がある。まず、dovitinib (38)、cediranib (39)、E-3810 (40)のような FGFR に対する選択性の低い化合物の臨床開発が行われ、それに続いて、AZD4547 (41)、NVP-BGJ398 (42)、CH5183284/Debio 1347 (43) (本研究で用いている化合物) などの FGFR に対する選択性の高い化合物の臨床開発が行われているのが現状である。第一世代 FGFR 阻害剤の特徴は FGFR を阻害するとともに KDR を阻害するという点である。KDR キナーゼは、癌においては血管新生に関わっており、阻害すると癌中の血管形成が阻害され、抗腫瘍効果をもたらすことが知られている。例えば、KDR のリガンドである VEGF-A に対する中和抗体である bevacizumab はすでに様々な癌種で効果があることが立証され、治療に用いられている(44-46)。一方で、KDR 阻害は血圧上昇を引き起こすことも知られており、第一世代 FGFR 阻害剤の臨床試験では、KDR 阻害による血圧上昇が、FGFR 阻害による薬効よりも低い投与量で出てしまったため、FGFR 阻害に必要な暴露を得るまで投与量を増やすことができず、明確な臨床効果が確認されていなかった(47, 48)。そんな中、前述した *FGFR1* 遺伝子増幅を持つ乳癌に対しては dovitinib の効果の兆しが確認され、より選択的な FGFR 阻害剤であれば、血圧上昇のリスクを伴わずより高い薬効を発揮できるのではないかと考えられ、第二世代 FGFR 阻害剤が研究開発されているところである。以下、表 2 に、紹介した化合物も含めた FGFR 阻害剤開発状況をまとめる(49)。

表 2 FGFR 阻害剤研究開発状況まとめ

薬剤	会社	開発ステージ
第一世代		
Dovitinib	Novartis	Phase III
Pazopanib	Novartis	Phase III
Ponatinib	ARIAD	Phase III
Brivanib	Bristol-Myers Squibb	Phase III
Nintedanib	Boehringer Ingelheim	Phase III
Lucitanib (E-3810)	Clovis Oncology	Phase II
第二世代		
NVP-BGJ398	Novartis	Phase II
AZD4547	Astrazeneca	Phase II
JNJ-42756493	Janssen	Phase II
CH5183284/Debio 1347	Chugai/Debiopharm	Phase I
LY2874455	Eli Lilly	Phase I
TAS-120	Taiho Oncology	Phase I

2.5 研究の目的

上述の通り、癌は依然として非常に治療成績が悪く、新しい薬剤のニーズが非常に高い疾患である。これまでに様々な阻害剤が開発・研究され、いくつかは上市され実医療で使用されているが、全ての癌の治療が満足いくものになっているわけではない。本研究では、*FGFR* の遺伝子点変異、遺伝子増幅もしくは遺伝子転座により活性化した癌を治療するために *FGFR* 選択的な低分子阻害剤を創製し（第 3 章）(43)、新たな *FGFR* 選択的阻害剤の治療対象患者探索のために *FGFR* 遺伝子転座を同定・解析し（第 4 章）(32)、そして *FGFR* 阻害剤の薬効発揮をより高い精度で予測するため、*FGFR* のシグナル解析を行った（第 5 章）(50)。

第3章 *FGFR* 遺伝子変異を持つ癌に対し選択的な新規 *FGFR* 低分子阻害剤の創製

3.1 緒言

前述の通り、*FGFR* は様々な癌において、遺伝子増幅、遺伝子変異、遺伝子転座などにより活性化し、癌の悪性化に関与していると考えられている。このような *FGFR* 活性化により悪性化した癌を治療するため、これまでに *FGFR* に対する選択性の低い、第一世代 *FGFR* 阻害剤が開発されてきたが、*KDR* キナーゼ阻害による血圧上昇というオフターゲット阻害による副作用により顕著な効果を示すに至っていなかった。そこで *FGFR* 選択的な阻害剤、特に *KDR* を阻害しない *FGFR* 阻害剤の創製を目指した。また、先行していた第二世代 *FGFR* 阻害剤との違いを見出すことを試みた。

3.2 方法と材料

3.2.1 試薬と細胞

CH5183284/Debio 1347 と AZD4547 は中外製薬にて特許情報に従い作成した (WO2011016528 および WO2008075068)。NVP-BGJ398、PD173074、cediranib と dovitinib は Active Biochem 社もしくは Sigma-Aldrich 社から購入した。使用した細胞はそれぞれ、American Type Culture Collection 社、Health Science Research Resources Bank 社、Health Protection Agency Culture Collections 社、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 社、Immuno-Biological Laboratories 社もしくは Asterand 社から購入し、推奨培地にて培養した。

3.2.2 プロテインキナーゼアッセイ

FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT1、KDR、ABL、EPHA2、KIT、SRC、FLT3、TIE2、EGFR、MET、INSR、ALK、JAK2、HER2、EPHB2、RON、AXL、LTK、FAK、PKA、AKT1、PKAC α 、PKAC β 1、PKAC β 2、p38 α 、AurA、CDC2/CycB1、CHK1、CHK2、TBK1、と FGFR2 N549H は Carna Biosciences 社から、PDGFR beta、MEK1、Raf-1 は Millipore Corporation から購入した。それぞれのキナーゼ阻害活性は、化合物存在時にそれぞれのキナーゼがどれくらい基質ペプチドをリン酸化するかを測定することで解析した。測定は、time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) アッセイ もしくは fluorescence polarization (FP) アッセイで実施した。

3.2.3 細胞増殖阻害アッセイ

用いたすべての細胞は、販売元の推奨する培地で培養した。細胞は、0.076 ~ 10,000 nmol/L の濃度の CH5183284/Debio 1347 を含む 96 ウェルプレートに撒き、37°Cで培養した。4日後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories)を添加し、数時間のインキュベーションの後、450 nm の吸光度を iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories)で測定した。細胞増殖阻害活性の計算は、以下の式で行った。 $(1-T/C) \times 100(\%)$ 。T は化合物処理されたウェルの吸光度を示し、C は DMSO コントロールの吸光度を示す。

3.2.4 ウェスタンブロット解析

in vitro の細胞内シグナル解析を行う際は、様々な濃度の CH5183284/Debio 1347 を細胞に添加し 2 時間インキュベーションしたのちに、プロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤を添加した細胞溶解バッファー (Cell signaling Technology)を使って細胞を融解しタンパク調製を行った。ゼノグラフト腫瘍内のシグナル解析を行う際は、BioMasher (k. K. Ashisuto) を用いて組織をホモジェナイズしたのちに、細胞溶解バッファーを添加した。抽出細胞タンパクは SDS-

PAGE用のサンプルバッファー(Life technologies)で変性させ、定法に従いウェスタンブロット解析を行った(51)。使用した抗体は以下の抗体である。一次抗体として、Phospho-FGF receptor (Tyr653/654) 抗体 (#3471)、phospho-PDGF receptor α (Tyr849)/PDGF receptor β (Tyr857) 抗体 (#3170)、PDGF receptor α 抗体 (#3164)、phospho-c-Kit (Tyr719) 抗体 (#3391)、c-Kit 抗体 (#3392)、phospho-VEGF receptor 2 (Tyr1059) (D5A6) 抗体 (#2474)と KDR 抗体 (#2479)は Cell Signaling Technology から購入した。FGFR2 抗体 (F0300)は Sigma-Aldrich 社から購入した。FGFR1 抗体 (sc-7945)、FGFR4 抗体 (sc-124)と FGFR3 抗体 (sc-13121) は Santa Cruz Biotechnology から購入した。また、二次抗体として、Anti-rabbit IgG、HRP-linked 抗体 (NA934V)と Anti-mouse IgG、HRP-linked 抗体 (NA931V)は GE Healthcare Life Sciences から購入した抗体を使用した。

3.2.5 ラットテレメトリー試験

テレメトリー送信機を移植したウィスターラットを血圧測定実験に用いた。投与溶媒は、終濃度で 0.5%のカルメロースナトリウム、0.5%のポリソルベート 20 と 0.9%のベンジルアルコールを水に溶解させたものを用いた。CH5183284/Debio 1347 は 10 mg/kg もしくは 30 mg/kg を一日一回、4日間経口投与した。血圧は継続的に5分ごとに自動測定した。ベースラインの血圧は実験前 24 時間の平均値を採用し、血圧の変化はそこからの増減とした(52)。全ての *in vivo* 試験は中外製薬 Animal Care and Use Committee に承認されたものである。

3.2.6 マウスゼノグラフト試験

BALB nu/nu マウス (CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrlCrlj nu/nu)は Charles river Laboratories から購入し、無菌下で飼育した。4x10⁶から 1.1x10⁷の細胞を 100 から 200 μ L の無血清培養培地に懸濁し、皮下に移植した。腫瘍径を週に二度測定し、以下の計算式に従って腫瘍体積を算出した。TV (tumor volume) = $ab^2/2$ 。a は腫瘍の長さを意味し、b は腫瘍の幅を意味する。腫瘍体積

が 200 から 300 mm³に達したのちに腫瘍体積に基づいてランダマイズを行い、薬効試験を開始した。CH5183284/Debio 1347 または AZD4547 は一日一回経口投与を行った。

3.2.7 免疫染色実験

化合物投与後に採材されたゼノグラフト腫瘍をホルマリンに 24 時間浸し、パラフィン固定した。固定されたサンプルを薄切りスライドに張り付け、染色を行った。染色は DISCOVERY XT 自動染色プラットフォーム (Ventana Medical Systems) を用いて行った。使用した抗体は以下。phospho-FRS (ab78195)に対する抗体を Abcam から購入し、phospho-FGFR (#3471)、phospho-ERK (#4780)と phospho-S6 (#4858) に対する抗体を Cell Signaling Technology から購入した。

3.2.8 FGFR1 と CH5183284/ Debio 1347 の結晶構造解析

GST タグ付きヒト FGFR1 キナーゼドメイン(462 から 763 残基まで)を大腸菌で発現させ、プロテアーゼ処理により GST タグを分離後、GST カラム、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。結晶は 4°Cにおけるシッティングドロップ法 (平衡化溶液 : 5-20% PEG 550 MME、0.1 M マレイン酸 [pH 5.5]) で得た。回折データ取得前に 22%のエチレングリコールを付加し液体窒素下で凍らせた。回折データは SLS のビームライン PXII の放射光を用いて PILATUS 6M detector (DECTRIS Ltd.製)で測定した。回折データは XDS で処理して空間群 C121 で SCALA でスケーリングした。FGFR1/ CH5183284/Debio 1347 複合体の三次元構造は、まずインシュリン受容体キナーゼ (PDB ID 1GAG)の三次元構造から Phaser を用いて分子置換して求めた。結晶の非対称要素の中に 2 個の蛋白が入っていた。更にモデル (三次元構造) は COOT を用いて手動で再構築して REFMAC5 で精密化した。最終的な分解能は 2.2 Åになった。原子変位因子 (温度因子) は等方的な因子にした。最終的な三次元構

造には 464 から 763、462 から 762 の残基の座標が含まれている。最終的な電子密度から、はっきりとした CH5183284/Debio 1347 の結合形式が確認できた。

3.2.9 各種 FGFR を恒常的に発現する Ba/F3 細胞の構築

TEL という転写因子の二量体化促進ドメインと FGFR2 の細胞内ドメインの融合遺伝子をクローニングし、pCXND3 発現ベクターにサブクローニングした。使用した FGFR2 は野生型 (WT) と 564 番目のバリンをフェニルアラニンに変異させた V564F 変異体である。それぞれの発現ベクターを NucleoFector device (Amaxa) を用いてトランスフェクションし、TEL-FGFR2 WT もしくは V564F が導入された Ba/F3 細胞を作成、その後、IL3 を培地から除いても生き残ってくる細胞を単離し、FGFR2 に依存して増殖する Ba/F3-TEL-FGFR2 WT と Ba/F3-TEL-FGFR2 V564F 細胞とした。

3.2.10 FGFR2 の免疫沈降アッセイ

HEK293 細胞を用いて、pCXND3-FGFR2-WT、FGFR2 V564F、FGFR2 V564I と FGFR2 V564L 発現ベクターを一過性に発現させた。細胞を前述の通り溶解しタンパクを調製したのち、Dynabeads Protein G (Life technologies) が結合した FGFR2 抗体 (Sigma F0300) と 1 時間インキュベーションし、2 度洗浄し、キナーゼアッセイにそのまま用いた。

3.3 結果

3.3.1 FGFR1、FGFR2 と FGFR3 に対する選択的阻害活性

FGFR 選択的な阻害剤を得るため、中外製薬の化合物ライブラリーを用いてハイスループットスクリーニングを行った。最初に同定した化合物は、既知の FGFR 阻害剤とは異なる母核を

持つが、比較的キナーゼ選択性の悪い化合物であった。化合物誘導体化を行うことで、より FGFR に選択的で、より物性の良い化合物を創製することに成功し、CH5183284/Debio 1347 を得た (図 9)。FGFR1、FGFR2 と FGFR3 に加え 20 種のチロシンキナーゼ、14 種のセリン・スレオニンキナーゼに対する CH5183284/Debio 1347 の阻害活性を測定した (表 3)。

FGFR1、FGFR2、FGFR3 と FGFR4 に対する阻害活性 (IC₅₀) はそれぞれ、9.3、7.6、22、290 nmol/L であった。一方で、KDR に対する阻害活性 (IC₅₀) は 2.1 μmol/L であり、FGFR1/2/3 と比較して十分な選択性を保持していることが酵素レベルで確認できた。その他 33 種のキナーゼに対しても同様に選択性を保持していることが確認された。さらにその選択性を確認するため、DiscoverX 社の KINOMEscan アッセイを用いて 442 種のキナーゼに対する選択性を確認した (<https://www.discoverx.com/technologies-platforms/competitive-binding-technology/kinomescan-technology-platform>)。CH5183284/Debio 1347 は 100 nmol/L もしくは 1.0 μmol/L の濃度を用いてアッセイを行った。それぞれのキナーゼに対して、ATP アナログとの競合阻害活性を測定する系であり、それぞれの化合物濃度での阻害%を算出した (表 4)。結果、100 nmol/L の化合物濃度において、80%以上の阻害活性を示したキナーゼは FGFR1、FGFR2 と FGFR3 を含む 5 キナーゼのみであり、本系においても CH5183284/Debio 1347 の高い選択性が示された。

次に、FGFR1、FGFR2 と FGFR3 に対する選択性を細胞内においても確認するため、様々な受容体型チロシンキナーゼの自己リン酸化阻害活性をウェスタンブロットによって検出した。リン酸化 FGFR の検出には FGFR1、FGFR2、FGFR3 と FGFR4 に対して同じ抗体を用いた。様々な濃度の CH5183284/Debio 1347 を各種の細胞に添加し、2 時間後に細胞からタンパクを抽出し実験に用いた。FGFR1 の自己リン酸化阻害は、*FGFR1* 遺伝子増幅を持つ DMS114 肺癌細胞株において、*FGFR2* の自己リン酸化阻害は、*FGFR2* 遺伝子増幅を持つ SNU-16 胃がん細胞株において、*FGFR3* の自己リン酸化阻害は、*FGFR3* Y373C 変異を持つ KMS-11 多発性骨髄腫細胞株において確認した。FGFR4、KDR、PDGFRalpha と c-KIT の阻害活性は、それぞ

れ、*FGFR4* Y367C 変異を持つ MD-MB-453 乳癌細胞株、KDR を発現する HUVEC ヒト血管細胞株、*PDGFRalpha* 遺伝子増幅を持つ NCI-H1703 肺癌細胞株、*c-KIT* N822K 変異を持つ Kasumi-1 血液がん細胞株において確認した。その結果、FGFR1、FGFR2、FGFR3 に対しては 100~300 nmol/L においてその阻害活性が確認された(図 10)。一方、その他のキナーゼに対する阻害活性は同程度の化合物濃度においては確認されなかった。

さらに、KDR に対する選択性をより詳細に検証するため、ヒト血管細胞 HUVEC の増殖阻害活性測定とラット血圧上昇活性測定を行った。HUVEC 細胞は VEGF-KDR のシグナルもしくは FGF-FGFR のシグナルに依存して増殖できることが知られている。このことを利用し選択性を確認しようと試みた。培地中に VEGF もしくは FGF を添加し HUVEC の細胞増殖を促し、その細胞増殖活性を CH5183284/Debio 1347 がどの程度阻害するかを確認した。4 日間のインキュベーションののち、細胞増殖阻害活性を測定した結果、FGF-FGFR 依存的な増殖阻害活性 (IC₅₀) は 29 nmol/L だったのに対し、VEGF-KDR 依存的な増殖阻害活性 (IC₅₀) は 780 nmol/L であった (図 11)。さらに、KDR 阻害剤の特徴の一つである血圧上昇作用を CH5183284/Debio 1347 が保持しているかどうかを確認するため、ラットを用いて血圧上昇活性測定を行った。テレメトリー送信機が移植されたラットに一日一回の CH5183284/Debio 1347 の投与 (10 mg/kg もしくは 30 mg/kg) を 4 日間行い、血圧を測定した。その結果、CH5183284/Debio 1347 はほとんど血圧を上昇させないことが確認された (図 12)。本実験で得られている血中化合物濃度は *in vivo* で薬効を発揮するのに十分な濃度であることから (未公開データ)、CH5183284/Debio 1347 は血圧上昇という副作用を引き起こさずに FGFR 依存的な癌に対して効果を示す可能性が示唆された。

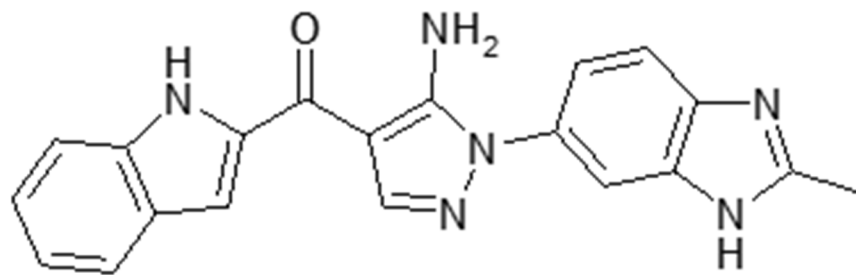


図 9 CH5183284/Debio 1347 の化学構造

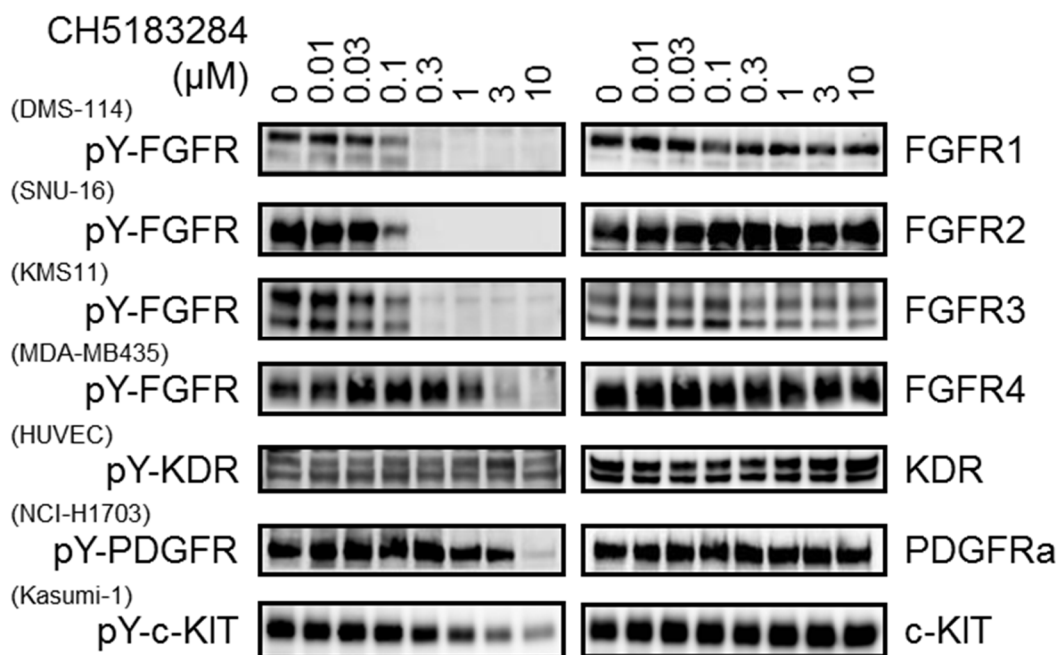


図 10 細胞内における各受容体型チロシンキナーゼ阻害活性

FGFR1 阻害を DMS-114 小細胞肺癌細胞にて、FGFR2 阻害を SNU-16 胃癌細胞にて、FGFR3 を KMS11 多発性骨髄腫細胞にて、FGFR4 を MDA-MB435 乳癌細胞にて、KDR を HUVEC ヒト血管細胞にて、PDGFR α を NCI-H1703 非小細胞肺癌細胞にて、cKIT を Kasumi-1 血液がん細胞にて検証した。CH5183284/Debio 1347 を各濃度において 2 時間処理後、細胞タンパクを抽出しウェスタンブロット解析した。

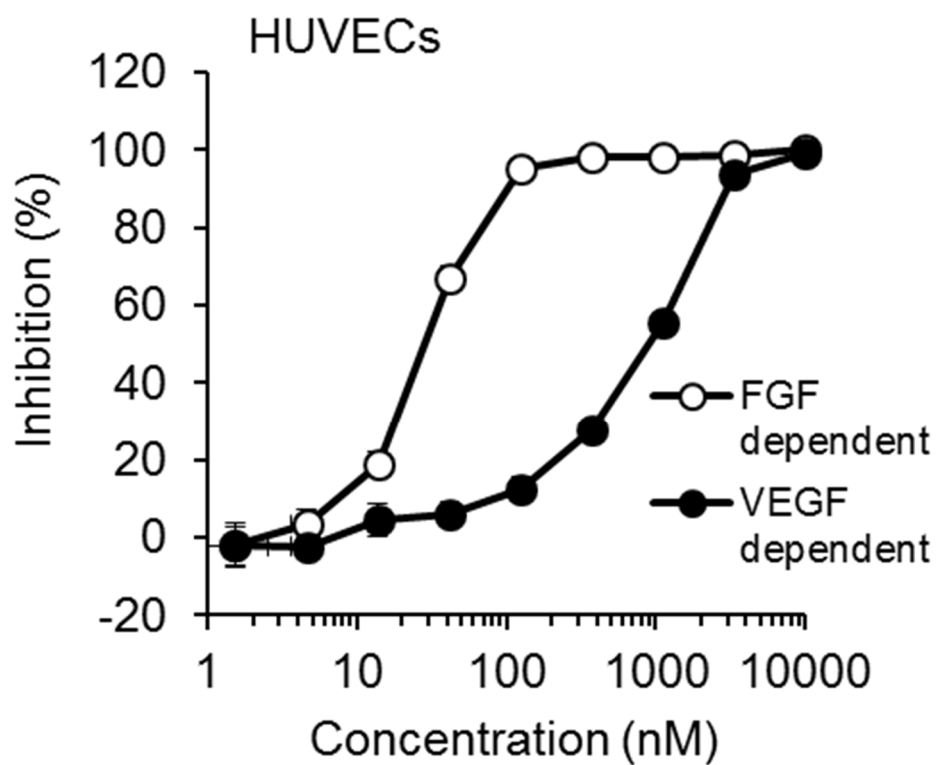


図 11 ヒト血管細胞 HUVEC に対する細胞増殖阻害活性

CH5183284/Debio 1347 のヒト血管細胞 HUVEC に対する細胞増殖阻害活性。HUVEC を VEGF (20 ng/mL) もしくは ECGF (30 µg/mL) を含む培地で培養し、CH5183284/Debio 1347 添加 4 日後に測定した。

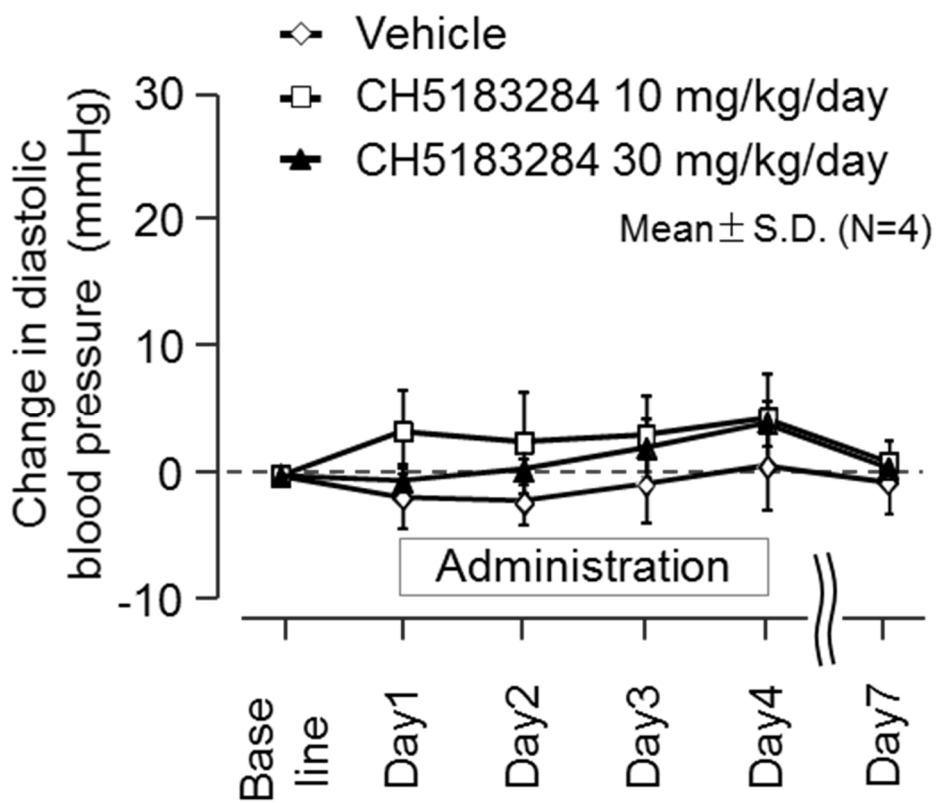


図 12 ラットでの血圧上昇への影響

CH5183284/Debio 1347 を 0、10、30 mg/kg でラットに投与し、拡張期血圧を測定し、ベースラインの血圧と比較した。

表 3 CH5183284/Debio 1347 のキナーゼ阻害活性

Class	Enzyme	IC ₅₀ (nmol/L)	Class	Enzyme	IC ₅₀ (nmol/L)
Tyrosine kinase	FGFR1	9.3	Serine/ threonine kinase	Raf-1	>10,000
	FGFR2	7.6		MEK1	>10,000
	FGFR3	22		PKA	>10,000
	FGFR4	290		AKT1	>10,000
	PDGFRβ	560		PKACα	>10,000
	FLT1	1,000		PKACβ1	>10,000
	KDR	2,100		PKACβ2	>10,000
	ABL	4,900		p38α	>10,000
	EPHA2	5,000		AurA	>10,000
	KIT	5,500		CDC2/ CycB1	>10,000
	SRC	5,900		CHK1	>10,000
	FLT3	6,400		CHK2	>10,000
	TIE2	>10,000		TBK1	>10,000
	EGFR	>10,000			
	MET	>10,000			
	INSR	>10,000			
	ALK	>10,000			
	JAK2	>10,000			
	HER2	>10,000			
	EPHB2	>10,000			
RON	>10,000				
AXL	>10,000				
LTK	>10,000				
FAK	>10,000				

表 4 KINOMEscan による CH5183284/Debio 1347 の選択性確認

DiscoverRx 社の KINOMEscan アッセイに、CH5183284/Debio 1347 を 0.1 μ M もしくは 1 μ M 添加し、%競合阻害を測定した。

Kinase	% competition at 100 nM in KINOMEscan	% competition at 1,000 nM in KINOMEscan
FGFR1	90	100
FGFR2	87	97
FGFR3	80	99
FGFR3(G697C)	85	99
KIT(V559D)	95	100
KIT	92	100
PDGFRB	92	100
KIT(L576P)	87	99
CSF1R	76	99
PDGFRA	76	99
RET(M918T)	<65	94
EPHB6	<65	92
RET	<65	91
BLK	<65	85
KIT(V559D,V654A)	<65	83
FGR	<65	82
ABL1(H396P)-nonphosphorylated	<65	74
ACVR2B	<65	72
DDR1	<65	72
MEK5	<65	70
ABL1(Q252H)-nonphosphorylated	<65	65
LYN	<65	65

以下のキナーゼはどちらの化合物濃度においても 65%未満の阻害活性

AAK1, ABL1(E255K)-phosphorylated, ABL1(F317I)-nonphosphorylated, ABL1(F317I)-phosphorylated, ABL1(F317L)-nonphosphorylated, ABL1(F317L)-phosphorylated, ABL1(H396P)-phosphorylated, ABL1(M351T)-phosphorylated, ABL1(Q252H)-phosphorylated, ABL1(T315I)-nonphosphorylated, ABL1(T315I)-phosphorylated, ABL1(Y253F)-phosphorylated, ABL1-nonphosphorylated, ABL1-phosphorylated, ABL2, ACVR1, ACVR1B, ACVR2A, ACVRL1, ADCK3, ADCK4, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AMPK-alpha1, AMPK-alpha2, ANKK1, ARK5, ASK1, ASK2, AURKA, AURKB, AURKC, AXL, BIKE, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BMX, BRAF,

BRAF(V600E), BRK, BRSK1, BRSK2, BTK, CAMK1, CAMK1D, CAMK1G, CAMK2A, CAMK2B, CAMK2D, CAMK2G, CAMK4, CAMKK1, CAMKK2, CASK, CDC2L1, CDC2L2, CDC2L5, CDK11, CDK2, CDK3, CDK4-cyclinD1, CDK4-cyclinD3, CDK5, CDK7, CDK8, CDK9, CDKL1, CDKL2, CDKL3, CDKL5, CHEK1, CHEK2, CIT, CLK1, CLK2, CLK3, CLK4, CSK, CSNK1A1, CSNK1A1L, CSNK1D, CSNK1E, CSNK1G1, CSNK1G2, CSNK1G3, CSNK2A1, CSNK2A2, CTK, DAPK1, DAPK2, DAPK3, DCAMKL1, DCAMKL2, DCAMKL3, DDR2, DLK, DMPK, DMPK2, DRAK1, DRAK2, DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, EGFR, EGFR(E746-A750del), EGFR(G719C), EGFR(G719S), EGFR(L747-E749del, A750P), EGFR(L747-S752del, P753S), EGFR(L747-T751del, Sins), EGFR(L858R), EGFR(L858R, T790M), EGFR(L861Q), EGFR(S752-I759del), EGFR(T790M), EIF2AK1, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK8, ERN1, FAK, FER, FES, FGFR4, FLT1, FLT3, FLT3(D835H), FLT3(D835Y), FLT3(ITD), FLT3(K663Q), FLT3(N841I), FLT3(R834Q), FLT4, FRK, FYN, GAK, GCN2(Kin.Dom.2, S808G), GRK1, GRK4, GRK7, GSK3A, GSK3B, HCK, HIPK1, HIPK2, HIPK3, HIPK4, HPK1, HUNK, ICK, IGF1R, IKK-alpha, IKK-beta, IKK-epsilon, INSR, INSR, IRAK1, IRAK3, IRAK4, ITK, JAK1(JH1domain-catalytic), JAK1(JH2domain-pseudokinase), JAK2(JH1domain-catalytic), JAK3(JH1domain-catalytic), JNK1, JNK2, JNK3, KIT(A829P), KIT(D816H), KIT(D816V), KIT(V559D, T670I), LATS1, LATS2, LCK, LIMK1, LIMK2, LKB1, LOK, LRRK2, LRRK2(G2019S), LTK, LZK, MAK, MAP3K1, MAP3K15, MAP3K2, MAP3K3, MAP3K4, MAP4K2, MAP4K3, MAP4K4, MAP4K5, MAPKAPK2, MAPKAPK5, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4, MAST1, MEK1, MEK2, MEK3, MEK4, MEK6, MELK, MERTK, MET, MET(M1250T), MET(Y1235D), MINK, MKK7, MKNK1, MKNK2, MLCK, MLK1, MLK2, MLK3, MRCKA, MRCKB, MST1, MST1R, MST2, MST3, MST4, MTOR, MUSK, MYLK, MYLK2, MYLK4, MYO3A, MYO3B, NDR1, NDR2, NEK1, NEK11, NEK2, NEK3, NEK4, NEK5, NEK6, NEK7, NEK9, NIM1, NLK, OSR1, p38-alpha, p38-beta, p38-delta, p38-gamma, PAK1, PAK2, PAK3, PAK4, PAK6, PAK7, PCTK1, PCTK2, PCTK3, PDPK1, PFCDPK1(P.falciparum), PFPK5(P.falciparum), PFTAIRE2, PFTK1, PHKG1, PHKG2, PIK3C2B, PIK3C2G, PIK3CA, PIK3CA(C420R), PIK3CA(E542K), PIK3CA(E545A), PIK3CA(E545K), PIK3CA(H1047L), PIK3CA(H1047Y), PIK3CA(I800L), PIK3CA(M1043D), PIK3CA(Q546K), PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK4CB, PIM1, PIM2, PIM3,

PIP5K1A, PIP5K1C, PIP5K2B, PIP5K2C, PKAC-alpha, PKAC-beta, PKMYT1, PKN1, PKN2, PKNB(M.tuberculosis), PLK1, PLK2, PLK3, PLK4, PRKCD, PRKCE, PRKCH, PRKCI, PRKCQ, PRKD1, PRKD2, PRKD3, PRKG1, PRKG2, PRKR, PRKX, PRP4, PYK2, QSK, RAF1, RET(V804L), RET(V804M), RIOK1, RIOK2, RIOK3, RIPK1, RIPK2, RIPK4, RIPK5, ROCK1, ROCK2, ROS1, RPS6KA4(Kin.Dom.1-N-terminal), RPS6KA4(Kin.Dom.2-C-terminal), RPS6KA5(Kin.Dom.1-N-terminal), RPS6KA5(Kin.Dom.2-C-terminal), RSK1(Kin.Dom.1-N-terminal), RSK1(Kin.Dom.2-C-terminal), RSK2(Kin.Dom.1-N-terminal), RSK3(Kin.Dom.1-N-terminal), RSK3(Kin.Dom.2-C-terminal), RSK4(Kin.Dom.1-N-terminal), RSK4(Kin.Dom.2-C-terminal), S6K1, SBK1, SgK110, SGK3, SIK, SIK2, SLK, SNARK, SNRK, SRC, SRMS, SRPK1, SRPK2, SRPK3, STK16, STK33, STK35, STK36, STK39, SYK, TAK1, TAOK1, TAOK2, TAOK3, TBK1, TEC, TESK1, TGFBR1, TGFBR2, TIE1, TIE2, TLK1, TLK2, TNIK, TNK1, TNK2, TNKI3K, TRKA, TRKB, TRKC, TRPM6, TSSK1B, TTK, TXK, TYK2(JH1domain-catalytic), TYK2(JH2domain-pseudokinase), TYRO3, ULK1, ULK2, ULK3, VEGFR2, VRK2, WEE1, WEE2, YANK1, YANK2, YANK3, YES, YSK1, YSK4, ZAK, ZAP70

3.3.2 CH5183284/Debio 1347 と FGFR1 複合体の結晶構造解析

CH5183284/Debio 1347 の FGFR1、FGFR2 と FGFR3 に対する選択性獲得メカニズムを考察するため、FGFR1 のキナーゼドメイン (462-763 残基) と CH5183284/Debio 1347 の共結晶を取得し、構造解析を行った (PDB ID 3WJ6、表 5、図 13)。その結果、CH5183284/Debio 1347 は FGFR1 の DFG-in の状態の ATP 結合ポケットに 5 つの水素結合で相互作用していることがわかった。キナーゼは活性化ループの N 末端に保存された DFG モチーフ (Asp-Phe-Gly) を持ち、キナーゼが活性化している状態においては、DFG-in と呼ばれる構造を取り、不活性化している状態においては DFG の Phe が活性化ループの外側に移動し、DFG-out と呼ばれる構造を取る(53)。参考として、ATP アナログと FGFR1 が相互作用している構造 (PDB:3GQI) を示した。ATP が FGFR1 と相互作用している部位と CH5183284/Debio 1347 と FGFR1 とが相互作用している部位は非常に近いことがわかる (図 14)。つまり CH5183284/Debio 1347 は活性化型の FGFR1 と相互作用していることがわかった。次に、構造既知の FGFR 阻害剤との違いを検証した (図 15)。解析に使用した NVP-BGJ398 と PD173074 の化学構造を示した (図 16)。NVP-BGJ398 と PD173074 は 3,5-ジメトキシフェニルモチーフが ATP 結合ポケットの奥の部分と相互作用している可能性が示唆されるのに対して、CH5183284/Debio 1347 はベンズイミダゾール部分での相互作用が示唆された。例えば、CH5183284/Debio 1347 は ATP 結合ポケットの最も奥に位置する Phe642 と相互作用できる。CH5183284/Debio 1347 創製の過程で、ベンズイミダゾール部分にメチル基を持たない化合物を評価したが、FGFR の阻害活性と他キナーゼに対する選択性が減弱したことから、この部分は活性と選択性の維持に重要な働きをしていることが示唆されている。また、Met535 の硫黄原子とベンズイミダゾール部分の窒素原子とメチル基との相互作用も CH5183284/Debio 1347 だけで示唆されている。最後に、FGFR のゲートキーパー部位と考えられている Val561 との相互作用についてであるが、CH5183284/Debio 1347 はベンズイミダゾール部分の芳香環で相互作用している。他の化合物が共通して持つメトキシ部分と Val561 との相互作用も示唆されているが、CH5183284/Debio 1347 は芳香環で相互

作用していることから、Val561 と化合物の間の空間がより広いことが示唆される。これは、薬剤治療中にゲートキーパー部位に変異が生じてもある程度許容されることを示唆する。ゲートキーパー部位に関する詳細は後述する (p.57)。このように、CH5183284/Debio 1347 は Phe642、Met535 と Val561 と既存の化合物とは異なる相互作用をしていることが示唆されているが、そのうち Met535 との相互作用は KDR との選択性を獲得することに貢献していることが示唆されている。KDR は同じ部位にロイシンを持ち、モデリング上、CH5183284/Debio 1347 と KDR の Leu889 は有効な相互作用を示さないことが示唆されている (図 17)。次に、ゲートキーパー部位のバリンについてだが、490 種のキナーゼのうち、ゲートキーパー部位にバリンを保有しているキナーゼはわずか 15 種であり、上述のフェニルアラニンとメチオニンも同じ位置に保有しているキナーゼは 7 種であった。これらの FGFR に特徴的なアミノ酸と相互作用することで高い選択性を発揮していることが示唆される。最後に、FGFR4 に対する選択性についてだが、CH5183284/Debio 1347 と FGFR1 の相互作用に重要な箇所の一つ Tyr563 の部分が FGFR4 ではシステインになっており、CH5183284/Debio 1347 は相互作用ができないことが示唆され、このことにより FGFR4 との選択性を獲得していると示唆される。

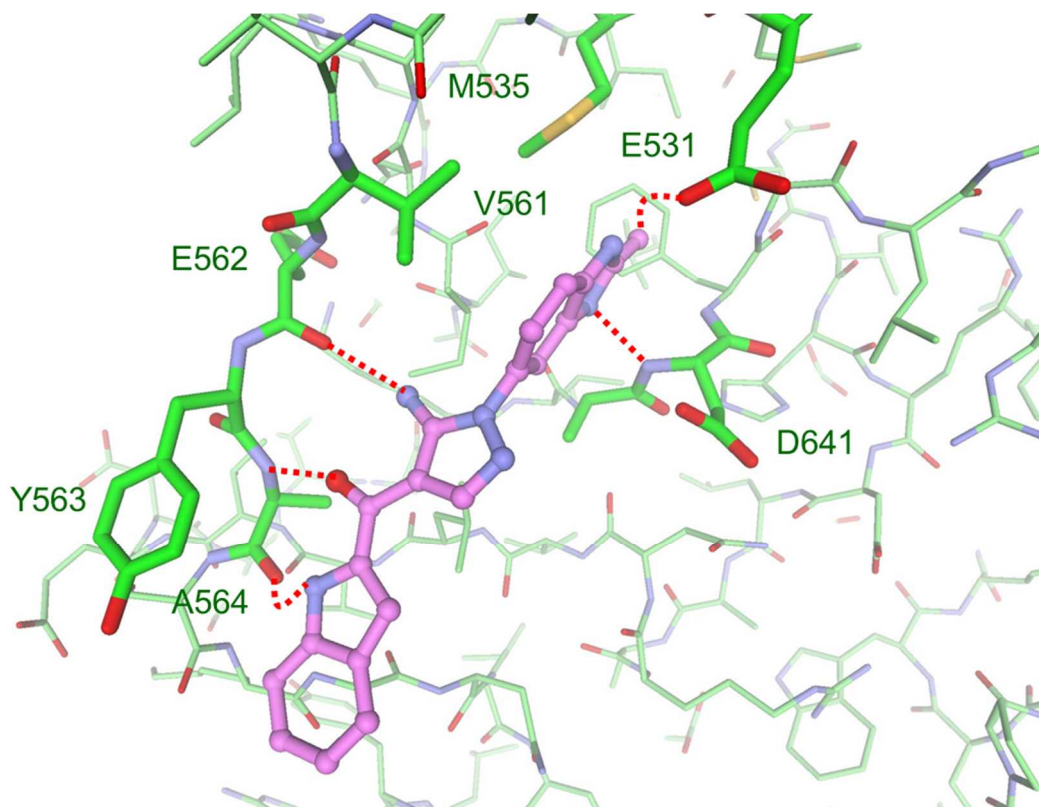
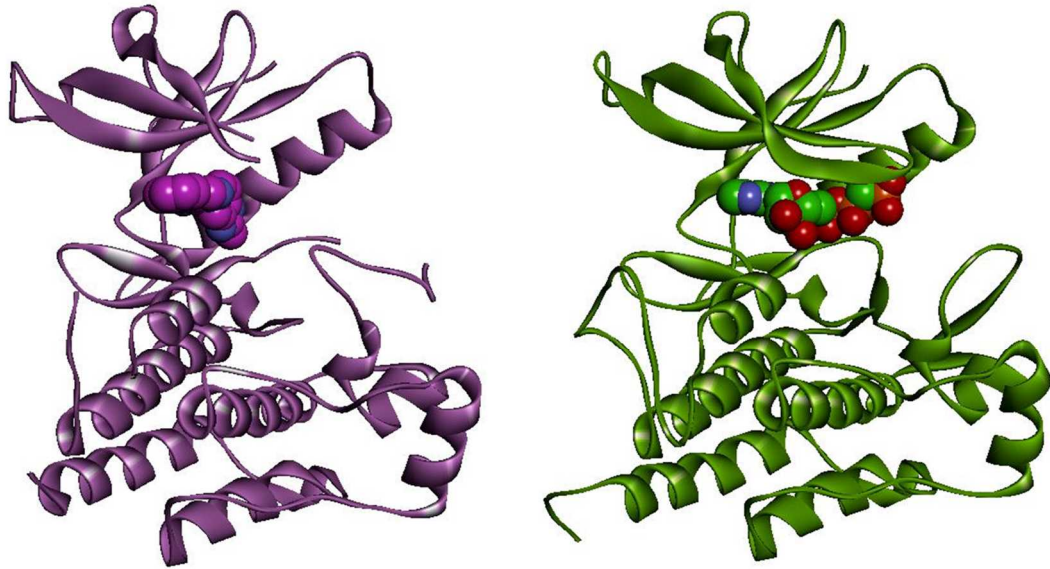


図 13 CH5183284/Debio 1347 と FGFR1 の X 線結晶構造解析

ATP 結合サイトにおける、CH5183284/Debio 1347 と FGFR1 の相互作用(PDB ID 3WJ6)。CH5183284/Debio 1347 はボール&スティックモデルで示した。炭素原子は紫、酸素原子は赤、窒素原子は青で示し、水素結合は赤点線で示した。



crystal structure of FGFR1/CH5183284 (PDB:5B7V)
crystal structure of FGFR1/ATP analog (PDB:3GQI)

図 14 FGFR1 と CH5183284/Debio 1347 もしくは ATP アナログの相互作用

左図は FGFR1 と CH5183284/Debio 1347 の構造、右図は FGFR1 と ATP アナログの構造。酸素原子は赤色、窒素原子は青色、リン原子は茶色、CH5183284/Debio 1347 の炭素原子は紫色、ATP アナログの炭素原子は緑色で表した。

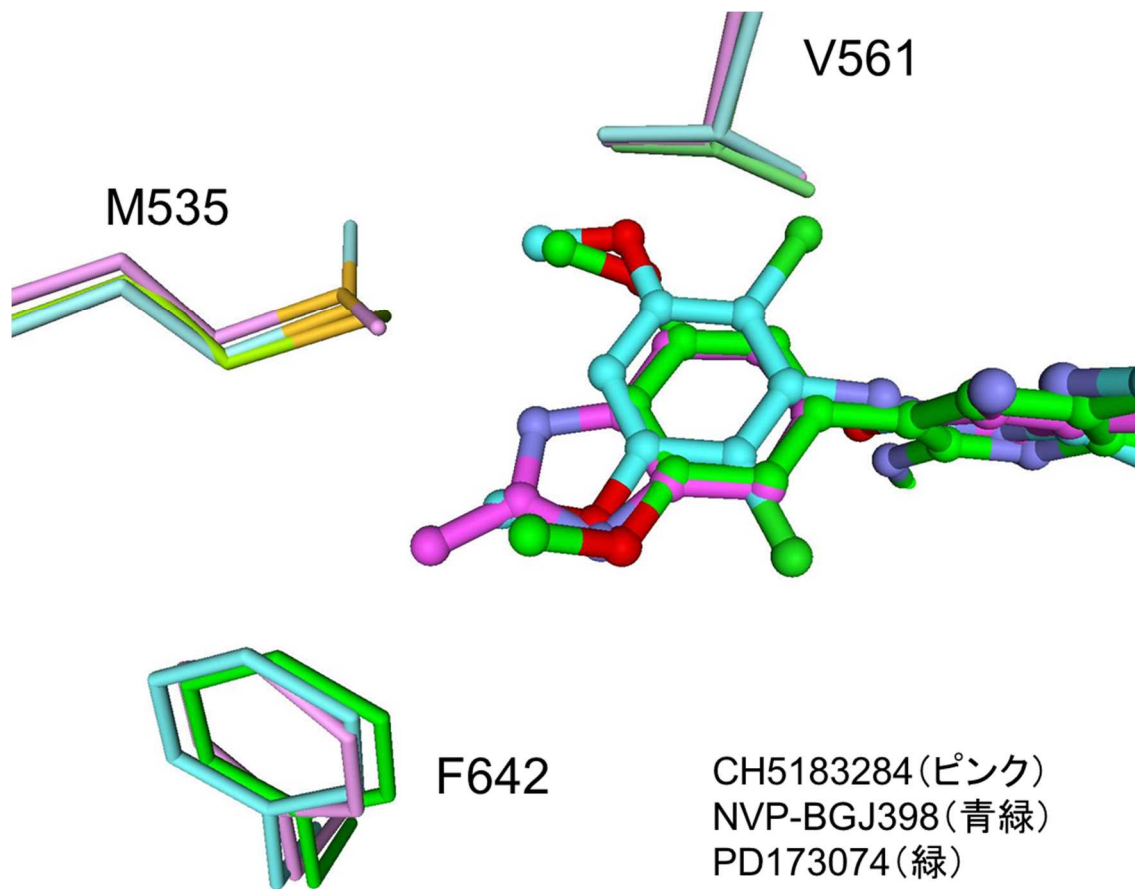
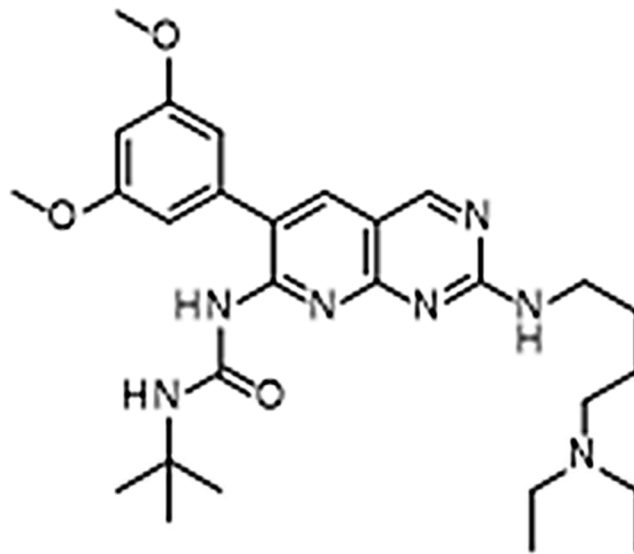
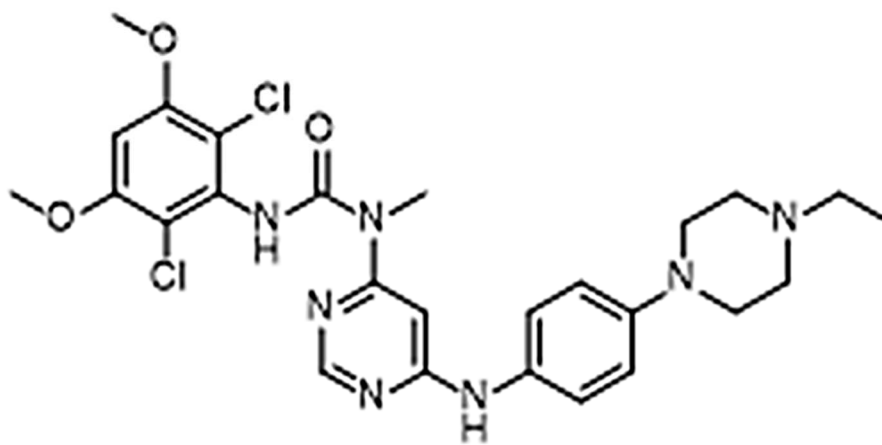


図 15 CH5183284/Debio 1347、NVP-BGJ398 もしくは PD173074 と FGFR1 との重ね合わせ

CH5183284/Debio 1347 と FGFR1、NVP-BGJ398 と FGFR1 (PDB ID 3TT0) と PD173074 と FGFR1 (PDB ID 2FGI) (54) の重ね合わせ。Phe642 の芳香環の中心と CH5183284/Debio 1347 のベンズイミダゾール部位のメチル基との距離は 0.37 nm、Val561 の C_{γ2} 原子と CH5183284/Debio 1347 のベンズイミダゾール部位の X-position 炭素原子との距離は 0.37 nm、また、Met535 の硫黄原子と CH5183284/Debio 1347 のベンズイミダゾール部位の Y-position 窒素原子との距離は 0.38 nm であった。NVP-BGJ398 (青緑) と PD173074 (緑) のボール&スティックモデルは CH5183284/Debio 1347 (ピンク) に重ね合わせた。



PD173074



NVP-BGJ398

図 16 PD173074 と NVP-BGJ398 の構造

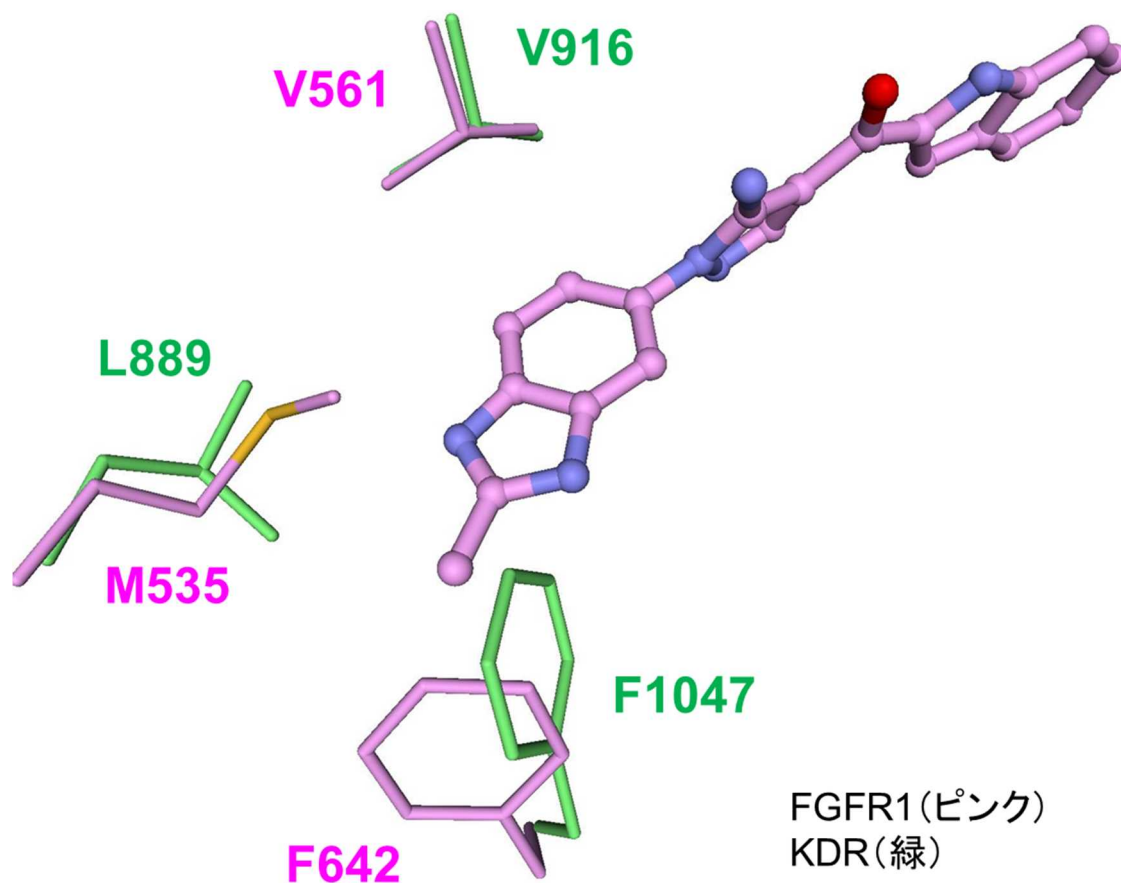


図 17 CH5183284/Debio 1347-FGFR1 と CH5183284/Debio 1347-KDR の結合モデルとの重ね合わせ

CH5183284/Debio 1347-FGFR1 (ピンク)と CH5183284/Debio 1347-KDR (緑) の結合モデルとの重ね合わせ。

表 5 3D 結晶構造解析

FGFR1 と CH5183284/Debio 1347 の共結晶の結晶構造解析データ

Data collection		
X-ray source	PXII/X10SA (SLS)	
Wavelength [Å]	1.000	
Detector	PILATUS 6M	
Temperature [K]	100	
Resolution [Å]	47.1-2.02	2.13-2.02
Observed reflections	163718	23073
Unique reflections	48444	7015
Completeness [%]	99.3	99.1
R _{sym} [%]	3.3	69.6
R _{meas} [%]	4.4	93.2
I/sigma(I)	14.9	1.5
Space group	C 1 2 1	
Unit cell (a, b, c) [Å]	211.21, 56.75, 65.45, 90, 107.43, 90	
Refinement		
Resolution	43.35-2.15	
Number of reflections (working/test)	39318 / 1954	
R _{cryst} [%]	22.3	
R _{free} [%]	25.7	
Number of atoms:		
Protein	4460	
Ligand	54	
Water	75	
Phosphate ion	5	
Deviation from ideal geometry:		
Bond lengths [Å]	0.010	
Bond angles [°]	1.03	
Ramachandran plot:		
Most favoured regions	92.2	
Additional allowed regions	7.0	
Generously allowed regions	0.8	

3.3.3 *FGFR* 遺伝子異常癌に対する選択的な増殖阻害活性

FGFR 選択的なキナーゼ阻害活性を持つ CH5183284/Debio 1347 が癌細胞に対しても同様な選択性を持つかどうか確認するため、様々な癌種を含む 327 種類の癌細胞株に対する細胞増殖阻害活性を測定した (図 18、表 6)。その結果、24 株が CH5183284/Debio 1347 に感受性があった。その 24 株のうち 20 株はなんらかの *FGFR* 遺伝子異常を持つ癌細胞であったことから、CH5183284/Debio 1347 が *FGFR* 遺伝子異常を持つ癌に特異的に効果を発揮することが期待された。効果があつた癌は、*FGFR2* 遺伝子増幅を持つ胃癌、乳がんや大腸癌、*FGFR2* 遺伝子変異を持つ子宮体癌、*FGFR3* 遺伝子変異を持つ膀胱癌や多発性骨髄腫、*FGFR3* 遺伝子転座を持つ膀胱癌、*FGFR1* 遺伝子増幅を持つ肺癌などであつた。

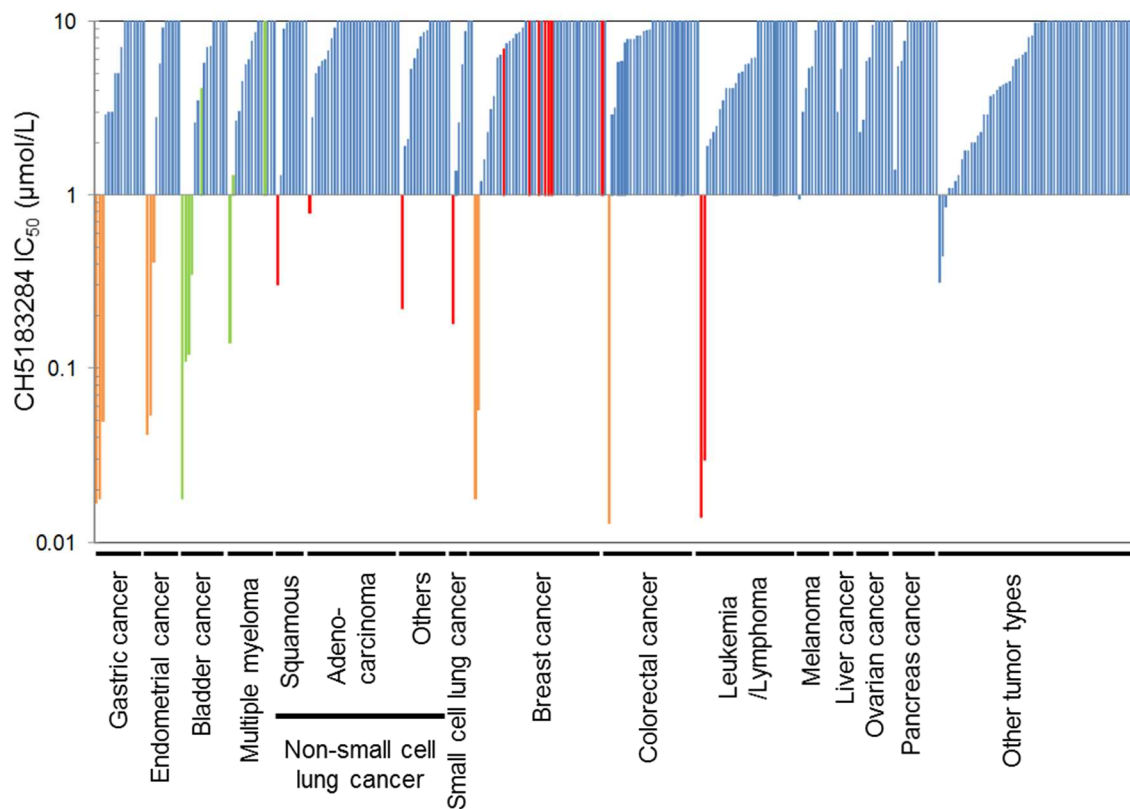


図 18 CH5183284/Debio 1347 の選択的な癌細胞増殖阻害活性

327 種類の癌細胞株に CH5183284/Debio 1347 を添加し 4 日間インキュベーションしたのちに、WST-8 を用いて細胞増殖阻害活性を測定し、IC₅₀ 値を算出した。赤色の棒は、*FGFR1* 遺伝子異常を持つ癌細胞株、橙色の棒は、*FGFR2* 遺伝子異常を持つ癌細胞株、緑色の棒は、*FGFR3* 遺伝子異常を持つ癌細胞株、その他は青色の棒で示した。

表 6 CH5183284/Debio 1347 の細胞増殖阻害活性まとめ

Cell line	Tumor type	CH5183284 IC50 (μM)	FGFR genetic alterations
SNU-16	Gastric cancer	0.017	FGFR2 gene amplification
Kato-III	Gastric cancer	0.018	FGFR2 gene amplification
HSC-39	Gastric cancer	0.050	FGFR2 gene amplification
AGS	Gastric cancer	2.9	
HGC-27	Gastric cancer	3.0	
MKN-1	Gastric cancer	3.0	
MKN-45	Gastric cancer	5.0	
SNU-1	Gastric cancer	5.0	
JR-St	Gastric cancer	7.1	
NCI-N87	Gastric cancer	10	
NUGC-4	Gastric cancer	>10	
MKN-74	Gastric cancer	>10	
NUGC-3	Gastric cancer	>10	
SCH	Gastric cancer	>10	
MKN-28	Gastric cancer	>10	
SNU-5	Gastric cancer	>10	
MFE-296	Endometrial cancer	0.042	FGFR2 N549K mutation
AN3 CA	Endometrial cancer	0.054	FGFR2 K310R/N549K mutation
MFE-280	Endometrial cancer	0.41	FGFR2 S252W mutation
HEC-59	Endometrial cancer	2.8	
HEC-1-B	Endometrial cancer	5.7	
HEC-1-A	Endometrial cancer	9.2	
KLE	Endometrial cancer	10	
HEC-151	Endometrial cancer	10	
RL95-2	Endometrial cancer	>10	
HEC-50B	Endometrial cancer	>10	
HEC-108	Endometrial cancer	>10	
RT112/84	Bladder cancer	0.018	FGFR3-TACC3 fusion
UM-UC-14	Bladder cancer	0.11	FGFR3 S249C mutation
SW780	Bladder cancer	0.12	FGFR3-BAIAP2L1 fusion
RT4	Bladder cancer	0.35	FGFR3-TACC3 fusion
T24	Bladder cancer	2.6	
5637	Bladder cancer	3.5	
J82	Bladder cancer	4.1	
SCaBER	Bladder cancer	5.8	
JMSU1	Bladder cancer	7.1	
UM-UC-3	Bladder cancer	7.2	
HT-1376	Bladder cancer	10	
HT-1197	Bladder cancer	>10	
TCCSUP	Bladder cancer	>10	
BFTC-905	Bladder cancer	>10	
647-V	Bladder cancer	>10	
KMS-11	Multiple Myeloma	0.14	FGFR3 Y373C mutation
OPM-2	Multiple Myeloma	1.3	
KMS-12-PE	Multiple Myeloma	2.7	
KMS-26	Multiple Myeloma	3.0	
KMS-21BM	Multiple Myeloma	4.5	FGFR3 K650E mutation
NCI-H929	Multiple Myeloma	5.6	
IM-9	Multiple Myeloma	6.0	FGFR3 F386L mutation
KMS-34	Multiple Myeloma	7.7	

Cell line	Tumor type	CH5183284 IC50 (μM)	FGFR genetic alterations
KMM-1	Multiple Myeloma	8.6	
KMS-12-BM	Multiple Myeloma	>10	
KHM-1B	Multiple Myeloma	>10	
LP-1	Multiple Myeloma	>10	
KMS-20	Multiple Myeloma	>10	
L-363	Multiple Myeloma	>10	
KMS-28BM	Multiple Myeloma	>10	
NCI-H520	Non-small cell lung cancer, Squamous	0.30	FGFR1 gene amplification
PC-1	Non-small cell lung cancer, Squamous	1.3	
HARA	Non-small cell lung cancer, Squamous	9.1	
HARA-B	Non-small cell lung cancer, Squamous	9.8	
NCI-H226	Non-small cell lung cancer, Squamous	>10	
QG-56	Non-small cell lung cancer, Squamous	>10	
NCI-H2170	Non-small cell lung cancer, Squamous	>10	
Calu-1	Non-small cell lung cancer, Squamous	>10	
PC-10	Non-small cell lung cancer, Squamous	>10	FGFR2 V12M mutation
SK-MES-1	Non-small cell lung cancer, Squamous	>10	
NCI-H1703	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	0.79	FGFR1 gene amplification
PC-9	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	2.8	
HCC78	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	5.0	
ABC-1	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	5.5	
NCI-H1395	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	5.9	
NCI-H23	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	6.0	
NCI-H2009	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	6.8	
NCI-H1755	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	8.0	
NCI-H1568	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	9.2	
NCI-H2122	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H838	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1355	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1944	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
COR-L105	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
SK-LU-1	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1437	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
HCC827	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H2347	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H522	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1993	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1792	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
A549	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H2023	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1975	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H2228	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
Calu-3	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H2030	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1838	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1793	Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma	>10	
NCI-H1581	Non-small cell lung cancer, Large cell	0.22	FGFR1 gene amplification
NCI-H292	Non-small cell lung cancer, Mucoepidermoid	1.9	
NCI-H1155	Non-small cell lung cancer, Large cell	2.1	
NCI-H1666	Non-small cell lung cancer, Bronchiolo-Alveolar	5.3	

Cell line	Tumor type	CH5183284 IC50 (μM)	FGFR genetic alterations
NCI-H596	Non-small cell lung cancer, Adenosquamous	6.1	
NCI-H2110	Non-small cell lung cancer	6.9	
Calu-6	Non-small cell lung cancer	8.2	
NCI-H661	Non-small cell lung cancer, Large cell	8.6	
NCI-H460	Non-small cell lung cancer, Large cell	8.9	
NCI-H441	Non-small cell lung cancer, Papillary	>10	
HCC366	Non-small cell lung cancer, Adenosquamous	>10	
PC-13	Non-small cell lung cancer, Large cell	>10	
NCI-H1299	Non-small cell lung cancer, Large cell	>10	
NCI-H1650	Non-small cell lung cancer, Bronchiolo-Alveolar	>10	
NCI-H1781	Non-small cell lung cancer, Bronchiolo-Alveolar	>10	
LCLC-103H	Non-small cell lung cancer, Large cell	>10	
DMS 114	Small cell lung cancer	0.18	FGFR1 gene amplification
NCI-H2227	Small cell lung cancer	1.4	
NCI-H82	Small cell lung cancer	2.6	
SHP-77	Small cell lung cancer	5.6	
NCI-H526	Small cell lung cancer	8.7	
NCI-H1930	Small cell lung cancer	>10	
DMS 53	Small cell lung cancer	>10	
SUM-52PE	Breast cancer	0.018	FGFR2 gene amplification
MFM-223	Breast cancer	0.058	FGFR2 gene amplification
HCC2218	Breast cancer	1.2	
MCF10DCIS.com	Breast cancer	1.6	
MDA-MB-157	Breast cancer	2.3	
DU-4475	Breast cancer	3.1	
Hs 578.T	Breast cancer	3.7	
MCF10A	Breast normal	6.2	
HCC38	Breast cancer	6.4	
SUM-44PE	Breast cancer	6.9	FGFR1 gene amplification
SUM-229PE	Breast cancer	7.4	
MDA-MB-453	Breast cancer	7.7	
MDA-MB-468	Breast cancer	8.0	
MCF7	Breast cancer	8.4	
HCC1500	Breast cancer	8.6	
HCC1187	Breast cancer	9.2	
MDA-MB-175-VII	Breast cancer	>10	
CAL-120	Breast cancer	>10	FGFR1 gene amplification
HCC1569	Breast cancer	>10	
HCC1599	Breast cancer	>10	
ZR-75-1	Breast cancer	>10	FGFR1 gene amplification
MDA-MB-231	Breast cancer	>10	
JIMT-1	Breast cancer	>10	FGFR1 gene amplification
CAMA-1	Breast cancer	>10	FGFR1 gene amplification
HCC1395	Breast cancer	>10	FGFR1 S125L mutation
BT-474	Breast cancer	>10	
HCC1806	Breast cancer	>10	
HCC70	Breast cancer	>10	
HCC1954	Breast cancer	>10	
T47D	Breast cancer	>10	
HCC1419	Breast cancer	>10	

Cell line	Tumor type	CH5183284 IC50 (μM)	FGFR genetic alterations
ZR-75-30	Breast cancer	>10	
HCC1937	Breast cancer	>10	
SK-BR-3	Breast cancer	>10	
HCC1428	Breast cancer	>10	
COLO-824	Breast cancer	>10	
UACC-812	Breast cancer	>10	
HCC1143	Breast cancer	>10	
MDA-MB-361	Breast cancer	>10	
BT-20	Breast cancer	>10	
MDA-MB-134-VI	Breast cancer	>10	FGFR1 gene amplification
BT-483	Breast cancer	>10	
NCI-H716	Colorectal cancer	0.013	FGFR2 gene amplification
COLO-205	Colorectal cancer	2.9	
HCT-8	Colorectal cancer	3.2	
CaR-1	Colorectal cancer	5.8	
SW48	Colorectal cancer	5.9	
LS174T	Colorectal cancer	7.5	
LS513	Colorectal cancer	7.9	
HT-29	Colorectal cancer	7.9	
COLO-201	Colorectal cancer	7.9	
NCI-H508	Colorectal cancer	8.3	
SW620	Colorectal cancer	8.3	
RKO	Colorectal cancer	8.7	
SW480	Colorectal cancer	8.8	
LS411N	Colorectal cancer	9.0	
HCT-116	Colorectal cancer	10	
LS1034	Colorectal cancer	>10	
HCT-15	Colorectal cancer	>10	
WiDr	Colorectal cancer	>10	
CW-2	Colorectal cancer	>10	
T84	Colorectal cancer	>10	
SW948	Colorectal cancer	>10	
SW1417	Colorectal cancer	>10	
DLD-1	Colorectal cancer	>10	
SW1463	Colorectal cancer	>10	
LoVo	Colorectal cancer	>10	
SW403	Colorectal cancer	>10	
Caco-2	Colorectal cancer	>10	
COLO-320DM	Colorectal cancer	>10	
SW1116	Colorectal cancer	>10	
KG-1	Leukemia, Myeloid, Acute	0.014	FGFR1OP-FGFR1 fusion
KG-1a	Leukemia, Myeloid, Acute	0.030	FGFR1OP-FGFR1 fusion
MV-4-11	Leukemia, Biphenotypic, Acute	1.9	
NB-4	Leukemia, Promyelocytic, Acute	2.1	
10C9	Lymphoma, Non-Hodgkin	2.3	
MOLM-13	Leukemia, Myeloid, Acute	2.5	
Raji	Burkitt Lymphoma	3.1	
Ramos	Burkitt Lymphoma	3.5	
MEG-01	Leukemia, Myelogenous, Chronic	4.1	
MC/CAR	Plasmacytoma	4.1	

Cell line	Tumor type	CH5183284 IC50 (μM)	FGFR genetic alterations
KARPAS-299	Lymphoma, Large-Cell, Anaplastic	4.1	
U-698-M	Lymphoma, B-Cell	4.4	
K-562	Leukemia, Myelogenous, Chronic	5.0	
CMK-11-5	Leukemia, Megakaryoblastic, Acute	5.1	
ARH-77	Leukemia	5.6	
NKM-1	Leukemia, Myeloid, Acute	5.7	
U-937	Lymphoma, Large B-Cell, Diffuse	6.1	
SR	Lymphoma, Large-Cell, Immunoblastic	6.2	
SU-DHL-1	Lymphoma, Large-Cell, Anaplastic	>10	
HEL	Leukemia, Erythroblastic, Acute	>10	
U266B1	Plasmacytoma	>10	
CEM/C2	Leukemia, T-Cell	>10	
TF-1a	Leukemia, Erythroblastic, Acute	>10	
CCRF-CEM	Leukemia	>10	
RPMI-8226	Plasmacytoma	>10	
NOMO-1	Leukemia, Myeloid, Acute	>10	
HL-60	Leukemia, Promyelocytic, Acute	>10	
HDLM-2	Lymph Nodes	>10	
F-36P	Leukemia, Myeloid, Acute	>10	
THP-1	Leukemia, Monocytic, Acute	>10	
SKM-1	Leukemia, Myeloid, Acute	>10	
HMCB	Melanoma	0.94	
SK-MEL-5	Melanoma	3.0	
A2058	Melanoma	4.1	
A-375	Melanoma	5.4	FGFR2 E636K mutation
SK-MEL-30	Melanoma	5.5	
SK-MEL-1	Melanoma	8.9	
SK-MEL-28	Melanoma	>10	
MDA-MB-435S	Melanoma	>10	
MeWo	Melanoma	>10	
A-431	Skin cancer, Squamous Cell	>10	
SK-MEL-2	Melanoma	>10	
C32	Melanoma	>10	
HuH-7	Liver cancer	3.0	
HuH-1	Liver cancer	5.3	
HepG2	Liver cancer	>10	
PLC/PRF/5	Liver cancer	>10	
Hep3B	Liver cancer	>10	
SK-HEP-1	Liver cancer	>10	
HLE	Liver cancer	>10	
Hs 38.T	Ovarian cancer	2.3	
OVMANA	Ovarian cancer	2.7	
RMG-I	Ovarian cancer	5.9	
ES2	Ovarian cancer	6.2	
PA-1	Ovarian cancer	9.5	
COLO-704	Ovarian cancer	>10	
SW626	Ovarian cancer	>10	
SK-OV-3	Ovarian cancer	>10	
OVCAR-3	Ovarian cancer	>10	
MCAS	Ovarian cancer	>10	

Cell line	Tumor type	CH5183284 IC50 (μM)	FGFR genetic alterations
EFO-21	Ovarian cancer	>10	
HPAC	Pancreas cancer	1.4	
KP-4	Pancreas cancer	5.5	
YAPC	Pancreas cancer	5.9	
Mia PaCa-2	Pancreas cancer	7.7	
Panc-1	Pancreas cancer	>10	
BxPC-3	Pancreas cancer	>10	
HuP-T4	Pancreas cancer	>10	
SU.86.86	Pancreas cancer	>10	
Capan-1	Pancreas cancer	>10	
HPAF-II	Pancreas cancer	>10	
CFPAC-1	Pancreas cancer	>10	
Capan-2	Pancreas cancer	>10	
AsPC-1	Pancreas cancer	>10	
Hs 766.T	Pancreas cancer	>10	
A-172	Glioblastoma	0.31	
NCCIT	Teratocarcinoma	0.44	
SW579	Thyroid cancer	0.85	
U-2197	Histiocytoma	1.1	
NTERA-2	Teratocarcinoma	1.1	
CCF-STTG1	Astrocytoma	1.2	
KYSE-150	Esophageal cancer	1.3	
D-341MED	Medulloblastoma	1.6	
NB-1	Neuroblastoma	1.8	
HT-1080	Fibrosarcoma	1.8	
C-33 A	Cervix cancer	2.0	
COLO-684	Uterus cancer	2.0	
IMR-32	Neuroblastoma	2.2	
KYSE-70	Esophageal cancer	2.3	
TT	Thyroid cancer	2.9	
143B	Osteosarcoma	2.9	
SK-N-DZ	Neuroblastoma	3.7	
RPMI-2650	Nasal cancer	3.8	
SH-SY5Y	Neuroblastoma	4.0	
Ca Ski	Cervix cancer	4.2	
SJCRH30	Rhabdomyosarcoma	4.3	
SCC-9	Tongue cancer	4.4	
T98G	Glioblastoma	4.5	
Daoy	Medulloblastoma	5.5	
786-O	Renal cancer	6.0	
D-283MED	Medulloblastoma	6.1	
OE19	Esophageal cancer	6.4	
NCI-H358	Bronchial cancer	6.6	
EGI-1	Cholangiocarcinoma	8.1	
KYSE-520	Esophageal cancer	8.3	
U-138 MG	Glioblastoma	9.8	
SK-N-SH	Neuroblastoma	9.8	
LN-18	Glioblastoma	9.9	
SK-N-F1	Neuroblastoma	9.9	
RH-30	Rhabdomyosarcoma	10	

Cell line	Tumor type	CH5183284 IC50 (μM)	FGFR genetic alterations
SK-ES-1	Ewing sarcoma	10	
Detroit 562	Pharynx cancer	>10	
CAL-27	Tongue cancer	>10	
NCI-H28	Mesothelioma	>10	
SK-N-AS	Neuroblastoma	>10	
KELLY	Neuroblastoma	>10	
HuH-28	Cholangiocarcinoma	>10	
ACHN	Renal cancer	>10	
Caki-1	Renal cancer	>10	
A-204	Rhabdomyosarcoma	>10	
ME-180	Cervix cancer	>10	
SNG-M	Uterus cancer	>10	
SCC-25	Tongue cancer	>10	
A-673	Rhabdomyosarcoma	>10	
PC-3	Prostate cancer	>10	
SCC-15	Tongue cancer	>10	
SCC-4	Tongue cancer	>10	
22Rv1	Prostate cancer	>10	
U-118 MG	Glioblastoma	>10	
8305C	Thyroid cancer	>10	
DU-145	Prostate cancer	>10	
U-87 MG	Glioblastoma	>10	
VCaP	Prostate cancer	>10	
MG-63	Osteosarcoma	>10	
Y79	Retinoblastoma	>10	
RB247c	Retinoblastoma	>10	
WERI-Rb-1	Retinoblastoma	>10	

3.3.4 *In vivo* モデルにおける FGFR 選択的な抗腫瘍効果の確認

In vitro の細胞増殖阻害アッセイで確認された *FGFR* 遺伝子異常癌に対する選択性を *in vivo* でも確認するためゼノグラフトマウスモデルを用いて薬効試験を実施した。その結果、CH5183284/Debio 1347 が *in vitro* で示していた *FGFR* 遺伝子変異癌に対する選択性が *in vivo* モデルにおいても確認された (図 19)。効果が確認された *in vivo* モデルは、KG1 (血液がん、*FGFR1OP-FGFR1* 遺伝子転座、最大抗腫瘍効果 134%)、SNU-16 (胃癌、*FGFR2* 遺伝子増幅、最大抗腫瘍効果 147%)、MFE280 (子宮体癌、*FGFR2* S252W 変異、最大抗腫瘍効果 100%)、UM-UC-14 (膀胱癌、*FGFR3* S249C 変異、最大抗腫瘍効果 116%) と RT112/84 (膀胱癌、*FGFR3-TACC3* 遺伝子転座、最大抗腫瘍効果 125%) であった。一方で、FGFR 遺伝子異常を持たない癌である MKN-45 胃癌細胞株モデルにおいては、最大抗腫瘍効果が 8% であり、薬効は確認されなかった。次に、CH5183284/Debio 1347 が本当に腫瘍内の FGFR を阻害しているかを検証するために、SNU-16 胃癌ゼノグラフトモデルに CH5183284/Debio 1347 を 30 mg/kg 投与し、腫瘍中の FGFR のリン酸化阻害をウェスタンブロット法で確認した。その結果、少なくとも投与後 7 時間まではほぼ完全に FGFR のシグナルが抑えられていることが確認された (図 20)。最後に、CH5183284/Debio 1347 が FGFR の下流シグナルも抑制しているかを確認する目的で、化合物投与 4 時間後に SNU-16 ゼノグラフト腫瘍組織を採材し、免疫染色を行った。その結果、溶媒投与群と比較すると、リン酸化 FGFR だけでなく、下流因子である FRS、ERK や S6 のリン酸化も抑えられていることが観察された (図 21)。これまでの結果から、CH5183284/Debio 1347 は *in vitro* においても *in vivo* においても *FGFR* 遺伝子異常を持つ癌に選択的な薬効を発揮する薬剤であることが示唆された。

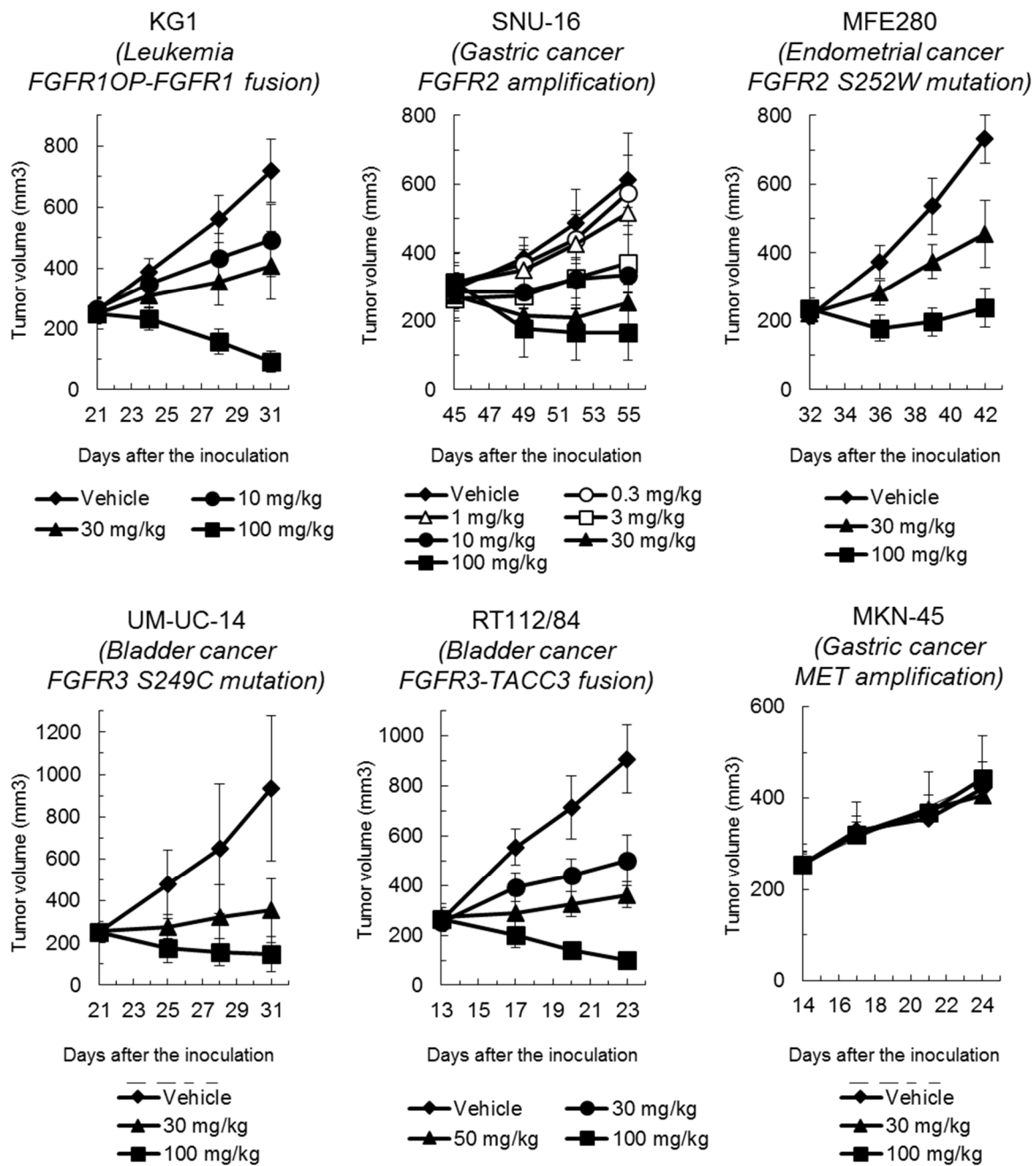


図 19 *in vivo* モデルにおける FGFR 選択的な抗腫瘍効果の確認

CH5183284/Debio 1347 のマウスゼノグラフトモデルにおける *in vivo* 抗腫瘍効果。KG1、SNU-16、MFE280、UM-UC-14、RT112/84、もしくは MKN-45 細胞を移植されたマウスに CH5183284/Debio 1347 を 11 日間投与し、腫瘍サイズを測定した。データは平均と標準偏差を示した。

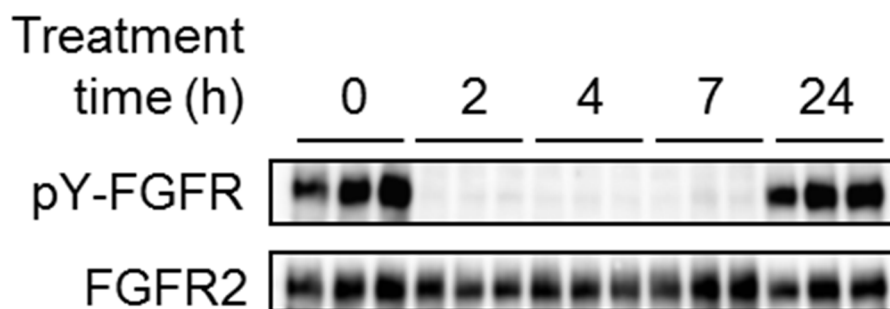


図 20 腫瘍中のリン酸化 FGFR 阻害活性測定

SNU-16 ゼノグラフトモデルマウスに CH5183284/Debio 1347 を 30 mg/kg 投与し、リン酸化 FGFR 量の経時的変化をウェスタンブロット解析で検出した。N=3

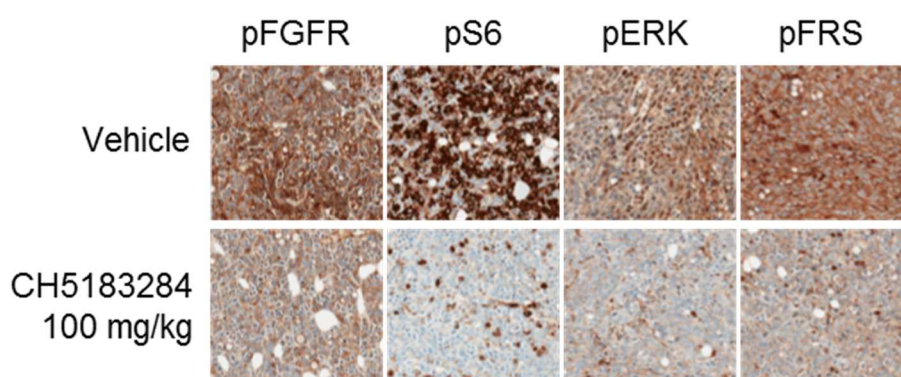


図 21 FGFR 経路関連因子のリン酸化阻害

溶媒もしくは 100 mg/kg の CH5183284/Debio 1347 を SNU-16 ゼノグラフトマウスモデルに投与し、4 時間後にゼノグラフト組織を採材し、ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを作成し、各リン酸化タンパク質を免疫染色した。

3.3.5 FGFR2 ゲートキーパー変異に対する効果

ゲートキーパーとは、ATP 結合ポケットの奥に位置し、そのポケットの立体構造決定に大きな影響を与えることが知られている部位である。これまでに、このゲートキーパー部位に変異が入ることで薬剤に対する獲得耐性を得て、薬剤の効果が発揮されなくなる例が実医療でも問題となっている。例えば、*EGFR* の T790M 変異(55)、*BCR-ABL* の T315I 変異(56)や *EML4-ALK* の L1196M 変異(57)などであり、近年、これらの変異を獲得した癌にも効果がある薬剤の研究開発が進められ、例えば、既存の *EGFR* 阻害剤が効かない *EGFR* T790M 変異にも効果のある osimertinib は目覚ましい効果を示している(58)。これらのことから、ゲートキーパー変異にも効果のある薬剤は大きなメリットがあると考えられるため、CH5183284/Debio 1347 が FGFR2 のゲートキーパー変異を阻害することができるかの検証を試みた。まず、FGFR2 ゲートキーパー変異体のキナーゼ活性を測定した。FGFR2 の WT もしくは V564F、V564I、V564L を HEK293 細胞に一過性に発現させ、細胞タンパク質を抽出し、抗 FGFR2 抗体で FGFR2 を免疫沈降後、それぞれの FGFR2 のキナーゼ活性を測定した。結果、ゲートキーパー変異を持つ FGFR2 は WT と比較してより高いキナーゼ活性を持つことが示唆された(図 22)。次に、CH5183284/Debio 1347 と AZD4547 がこれらの FGFR2 ゲートキーパー変異体を阻害することができるかを検証した。HCT116 細胞に一過性に FGFR2 の WT もしくは V564F、V564I、V564L を発現させ、CH5183284/Debio 1347 もしくは AZD4547 を添加、2 時間後に細胞抽出液を回収し、ウェスタンブロット解析を行った。AZD4547 はすべてのゲートキーパー変異に活性の減弱が見られたのに対し、CH5183284/Debio 1347 は V564F 変異に対しては活性を維持することがわかった(図 23)。そこで、FGFR2 V564F 変異についてより詳細に解析を行うこととした。

まず、FGFR2 に依存して増殖する Ba/F3 細胞の構築を試みた。転写因子 TEL 遺伝子の二量体化を促進するドメインと FGFR2 の細胞内ドメインを融合させた遺伝子をクローニングした。これにより FGFR2 はリガンド非依存的な恒常的な二量体化と活性化を維持することができる。

そして、TEL-FGFR2 を発現する Ba/F3 細胞を構築した。本来 Ba/F3 細胞は IL3 という液性因子依存的に増殖するが、TEL-FGFR2 のような増殖を誘導する遺伝子を強制発現させると、IL3 非依存的に、FGFR2 依存的に増殖するようになる。この細胞を用いて、各種 FGFR 阻害剤の効果を確認した。まず、*in vitro* の細胞増殖阻害活性を測定した (図 24)。結果、リン酸化阻害の結果と同様、CH5183284/Debio 1347 の Ba/F3 FGFR2 V564F 細胞増殖阻害活性 (IC₅₀) と Ba/F3 FGFR2 WT 細胞増殖阻害活性 (IC₅₀) は 7.3 倍の差しかなかったのにも関わらず、AZD4547 の場合は 215 倍、NVP-BGJ398 の場合は 8,460 倍もあり、強い耐性を獲得していることが示された。次に、*in vivo* ゼノグラフトモデルにおいて、FGFR2 V564F の AZD4547 に対する耐性度と CH5183284/Debio 1347 がその耐性を克服しているかどうかを検証した。両化合物とも Ba/F3 FGFR2 WT モデルにおいては同等の抗腫瘍効果を示したが (図 25A)、Ba/F3 FGFR2 V564F モデルにおいては AZD4547 の抗腫瘍効果はほぼ完全に消失し、CH5183284/Debio 1347 の薬効は維持されていることが確認された (図 25B)。また、腫瘍内のリン酸化阻害の程度も抗腫瘍効果と相関しており、CH5183284/Debio 1347 が強く FGFR のリン酸化を阻害したのに対し、AZD4547 は全く阻害できなかった (図 26)。

最後に、CH5183284/Debio 1347 が V564F に対して効果を維持し、AZD4547 や NVP-BGJ398 の効果が減弱した理由を考察するため、FGFR2 の 3D モデリングを行った (図 27)。それぞれのモデルは、FGFR1 と CH5183284/Debio 1347 の共結晶構造 (PDB code 3WJ6)、FGFR1 と AZD4547 誘導体の共結晶構造 (PDB code 4F65) (59)、FGFR1 と NVP-BGJ398 の共結晶構造 (PDB code 3TT0) (42)をもとに作成した。本モデルは、CH5183284/Debio 1347 の 7 の部位と Phe564 とがファンデルワールス相互作用していることを示唆したが、AZD4547 や NVP-BGJ398 の持つ 3, 5-ジメトキシフェニル部分は Phe564 と物理的な障害が発生することが示唆された。このことが CH5183284/Debio 1347 が FGFR2 V564F に対する効果を維持している原因であることが示唆された。一方、V564I や V564L と CH5183284/Debio 1347 とは、物理的な障害が発生するために有意に相互作用できないことが示唆された。

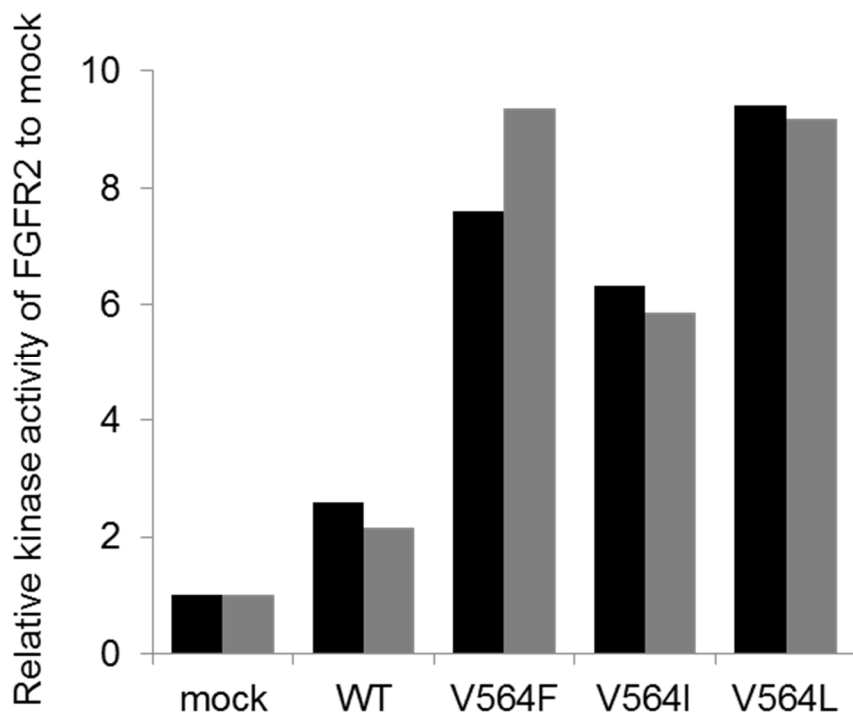


図 22 FGFR2 ゲートキーパー変異体のキナーゼ活性

HEK293 細胞に FGFR2 WT、FGFR2 V564F、FGFR2 V564I、もしくは FGFR2 V564L を一過性に発現させ、トランスフェクションして 24 時間後に細胞タンパクを回収し、抗 FGFR2 抗体にて FGFR2 を免疫沈降し、FGFR2 のキナーゼ活性を測定した。N=2。それぞれのデータを違う色のバーで示した。

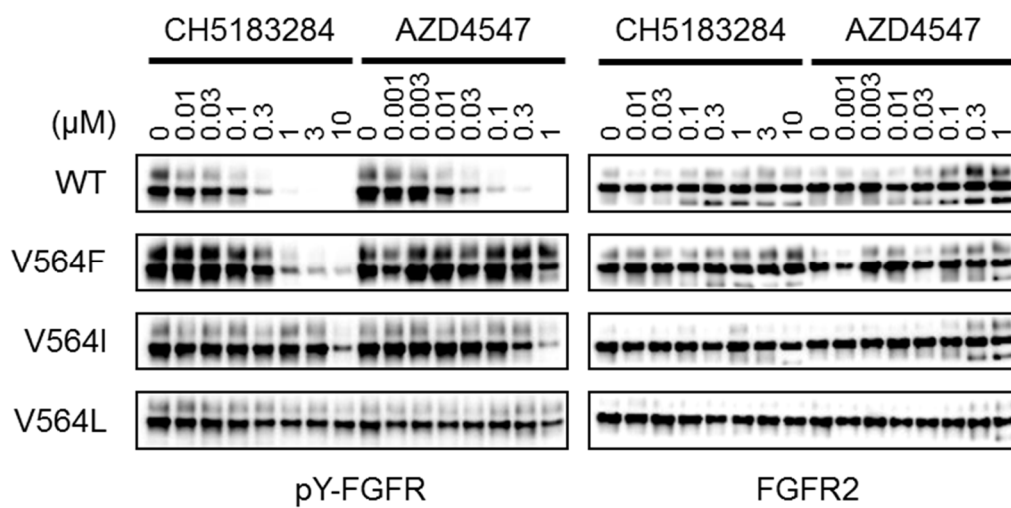


図 23 FGFR2 ゲートキーパー変異阻害活性測定

HCT116 細胞に FGFR2 WT、FGFR2 V564F、FGFR2 V564I、もしくは FGFR2 V564L を一過性に発現させ、トランスフェクションして 24 時間後に CH5183284/Debio 1347 もしくは AZD4547 を添加し、2 時間後に細胞タンパクを回収し、ウェスタンブロット法で FGFR のリン酸化を測定した。

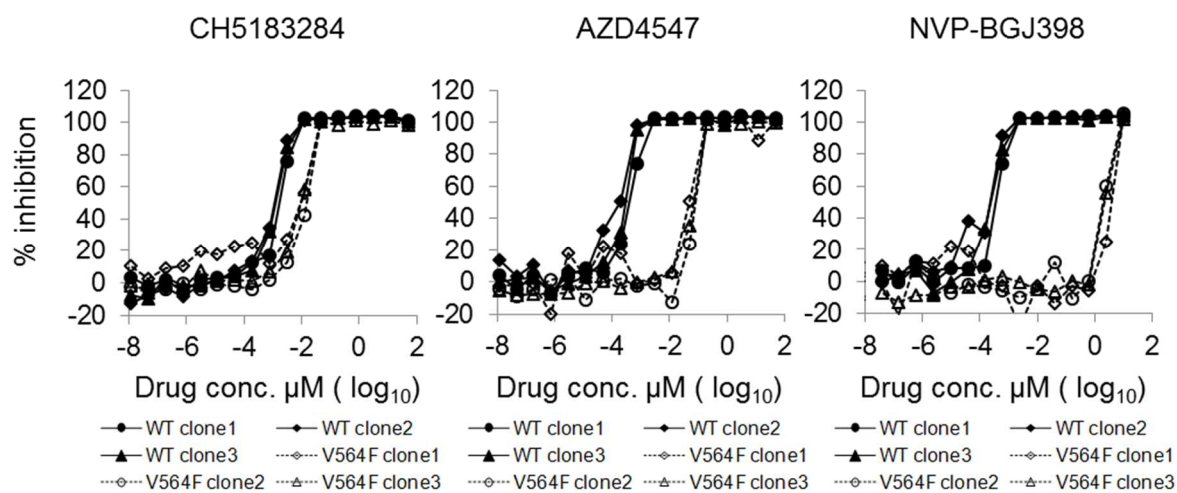


図 24 各種 Ba/F3 細胞に対する FGFR 阻害剤の増殖阻害活性

CH5183284/Debio 1347、AZD4547 もしくは NVP-BGJ398 を Ba/F3-TEL-FGFR2 WT 細胞、もしくは Ba/F3-TEL-FGFR2 V564F 細胞に添加、4 日後に細胞増殖阻害活性を WST8 で検出した。各細胞は 3 クローンずつ用いた。

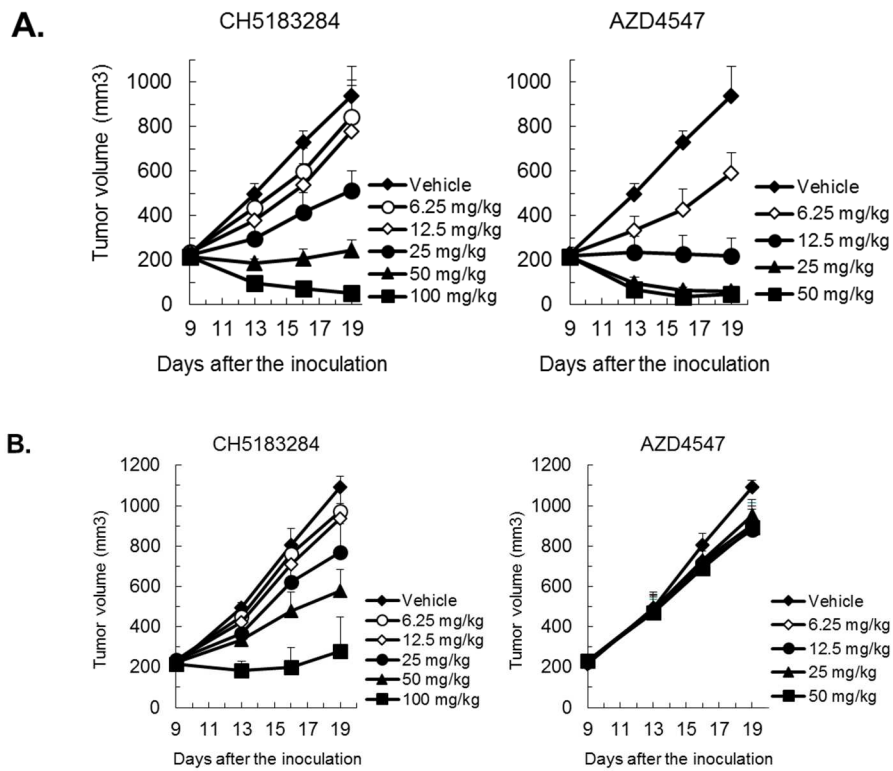


図 25 FGFR2 WT と V564F 変異に対する *in vivo* 抗腫瘍効果

(A) Ba/F3-TEL-FGFR2 WT 細胞を移植されたゼノグラフトモデルマウスに CH5183284/Debio 1347 もしくは AZD4547 を 11 日間投与し、腫瘍径を測定した。データは平均と標準偏差を示した。(B) Ba/F3-TEL-FGFR2 V564F 細胞を移植されたゼノグラフトモデルマウスに CH5183284/Debio 1347 もしくは AZD4547 を 11 日間投与し、腫瘍径を測定した。データは平均と標準偏差を示した。

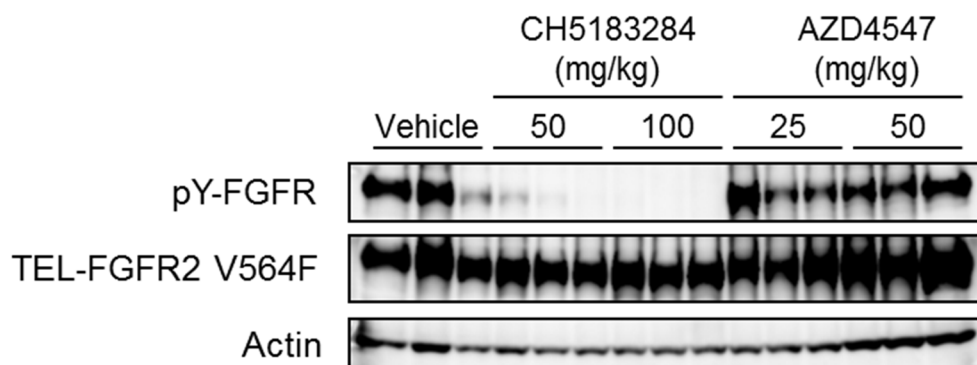


図 26 腫瘍中のリン酸化 FGFR 阻害活性

Ba/F3-TEL-FGFR2 V564F 細胞を移植されたゼノグラフトモデルマウスに CH5183284/Debio 1347 もしくは AZD4547 を 11 日間投与し、最終投与 4 時間後に腫瘍を採材し、タンパクを抽出し、ウェスタンブロット法にて FGFR のリン酸化を測定した。N=3

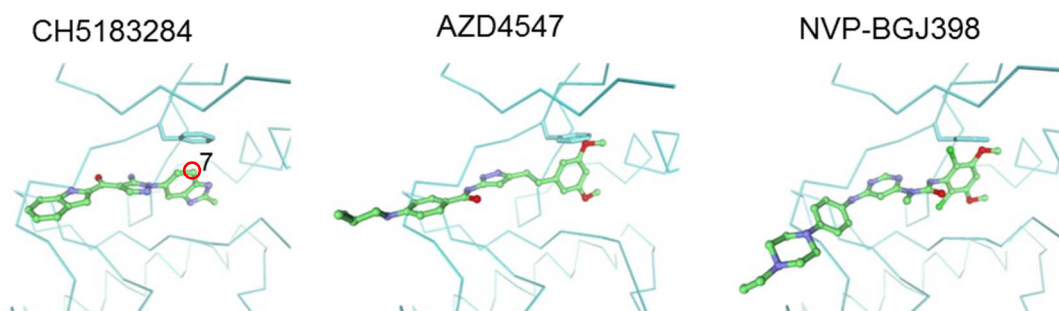


図 27 各 FGFR 阻害剤と FGFR2 V564F の結合様式モデリング

CH5183284/Debio 1347、AZD4547 と NVP-BGJ398 の結合モデル。分子はボール&スティックモデルで示した。炭素原子は緑色、酸素原子は赤色、窒素原子は青色、塩素原子は深緑色で示した。Phe654 残基の側鎖もボール&スティックモデルで青緑色で示した

3.4 考察と小括

本章では、FGFR 選択的阻害剤 CH5183284/Debio 1347 の創製とその評価、既存 FGFR 阻害剤との違いについて述べた。本研究開始当初は FGFR 選択的な阻害剤は存在せず、KDR も阻害してしまい血圧上昇という副作用を引き起こす化合物のみが存在していた。そこで KDR を阻害しない FGFR 選択的阻害剤の創製を試み、CH5183284/Debio 1347 を得た。CH5183284/Debio 1347 は酵素アッセイにおいても細胞内においても KDR やその他のキナーゼを強く阻害せず、FGFR に選択的であることが確認された。血圧上昇の副作用がないこともラットテレメトリー試験によって確認された。また、その高い選択性により、FGFR 遺伝子異常を持つ癌にのみ *in vitro* 細胞増殖阻害活性や *in vivo* 抗腫瘍活性を示すことが確認された。CH5183284/Debio 1347 が獲得した高い FGFR 選択性は、CH5183284/Debio 1347 の持つ特徴的なベンズイミダゾール構造によるものであることが X 線結晶構造解析により示唆された。最後に、現在臨床開発中の FGFR 選択的阻害剤に耐性の癌に対して CH5183284/Debio 1347 が効果を示す可能性があるかどうかを検証するため、*FGFR2* ゲートキーパー変異に対する活性を測定した。AZD4547 や NVP-BGJ398 などの既存 FGFR 選択的阻害剤に耐性を示した *FGFR2* V564F 変異を持つ癌に CH5183284/Debio 1347 を添加すると *in vitro* においても *in vivo* においてもその機能を阻害し、腫瘍の増殖を阻害することが確認された。これは、AZD4547、NVP-BGJ398 や PD173074 の持つ 3, 5-ジメトキシフェニル部分は *FGFR2* のゲートキーパー変異部位 Phe564 と物理的な障害が発生することが示唆されるが、CH5183284/Debio 1347 は Phe564 とファンデルワールス相互作用することが示唆されるためである。以上のことから、既存化合物とは異なる骨格を持つ CH5183284/Debio 1347 は、既存 FGFR 選択的阻害剤の耐性を克服できる可能性を持つ FGFR 選択的阻害剤であることが示唆された。

第4章 新規 *FGFR3* 融合遺伝子の発見とその機能解析

4.1 緒言

前述の通り、FGFR は様々な癌で遺伝子変異、遺伝子増幅、遺伝子転座などによって活性化し、癌の悪性化と関わっていることが知られている。本章では特に、*FGFR3* 融合遺伝子について述べる。遺伝子転座により他の遺伝子と融合することで活性化するキナーゼとして最初に注目されたのは BCR-ABL キナーゼである。*BCR-ABL* は 22 番染色体と 9 番染色体の転座によって形成される融合キナーゼで、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子と考えられている(60)。近年、*imatinib* や *nilotinib* といった選択的 ABL キナーゼ阻害剤が開発され、目覚ましい効果を上げている(61)。これまで融合キナーゼは血液がんでのみ発見されていたが、最近、肺癌においても *EML-ALK*、*TFG-ALK* や *KIF5B-RET* などの融合キナーゼが発見され(62)、選択的 ALK 阻害剤 *alectinib* などは、ALK 融合キナーゼを持つ肺癌患者に著効を示している(63)。FGFR に関しては最近、脳腫瘍や膀胱癌などの患者から *FGFR3* と *TACC3* の融合遺伝子が発見され、機能解析が行われてきた。一般的に FGFR はリガンド依存的に二量体化が促進され、さらにリガンドが結合することにより細胞内の三次構造を変化し、自己リン酸化が促進され、活性化することが知られている(64) (図 28)。TACC3 タンパクは Coiled-coil ドメインという二量体化を促進するドメインを有しており、*FGFR3-TACC3* 融合遺伝子はこのドメインを介して二量体化し、リガンド非依存的に活性化することが報告されている (31)。*FGFR3-TACC3* 融合遺伝子は MAPK 経路や STAT3 を活性化することで癌化に寄与していることが示唆されている (16, 33) (図 29)。また、miR-99a は *FGFR3* の 3'-UTR を標的とし、*FGFR3* のタンパク発現を抑制していることが知られ、*FGFR3-TACC3* 融合遺伝子の場合、その 3'-UTR が欠損していることで、より高いタンパク発現量を維持していることが報告されている (65)。

一方、*FGFR3* と *BAIAP2L1* の融合遺伝子はこれまでに細胞株でしか見つかっておらず(31)、臨床検体で発見された報告はなかった。また、*FGFR3-BAIAP2L1* 融合キナーゼの癌化への寄与やメカニズムも詳細に解析されていなかった。そこで本章では、*FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子の臨床検体における発生頻度解析を行い、*FGFR3-BAIAP2L1* 融合キナーゼの癌化促進能を検証し、そのメカニズムとして BAR ドメインを介した *FGFR3-BAIAP2L1* 融合キナーゼの二量体化について解析した。図 30 に、いくつかの融合キナーゼの模式図を示した。

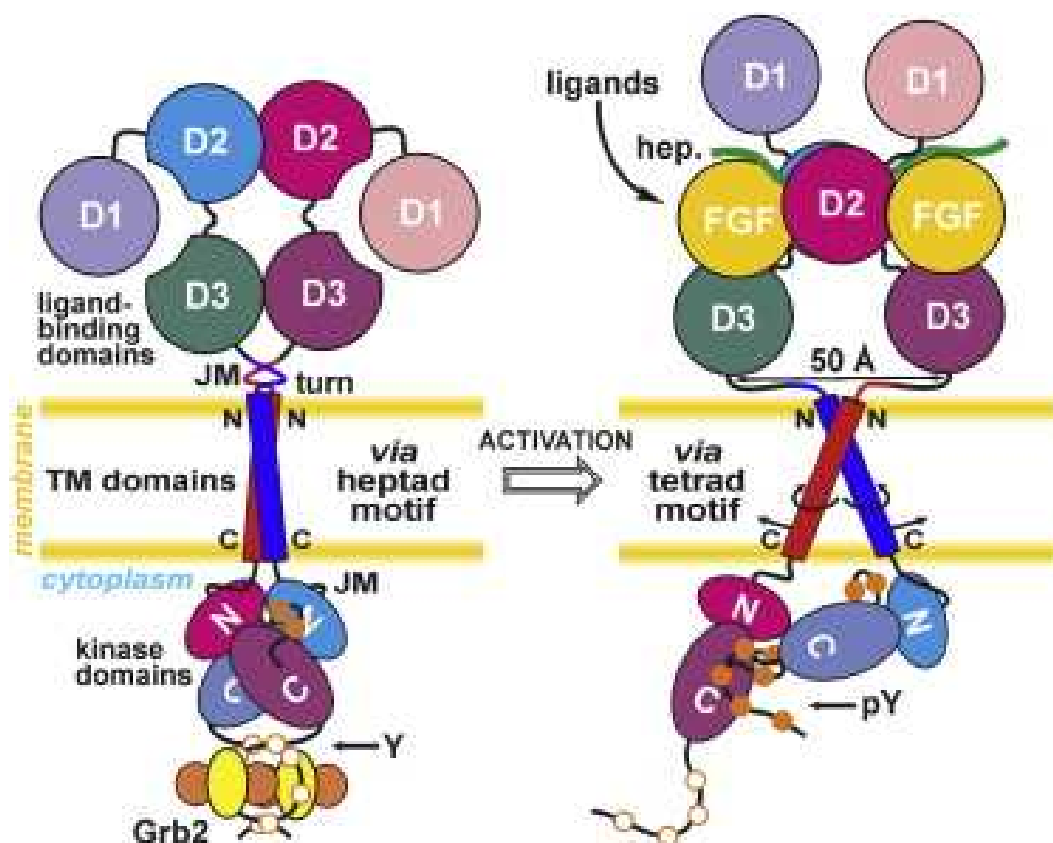


図 28 FGF リガンド結合による FGFR の構造変化

左図は FGF リガンド未結合の FGFR の構造の模式図、右図は FGF リガンドが結合した FGFR の構造の模式図。

Structure. 2013;21(11):2087-93.

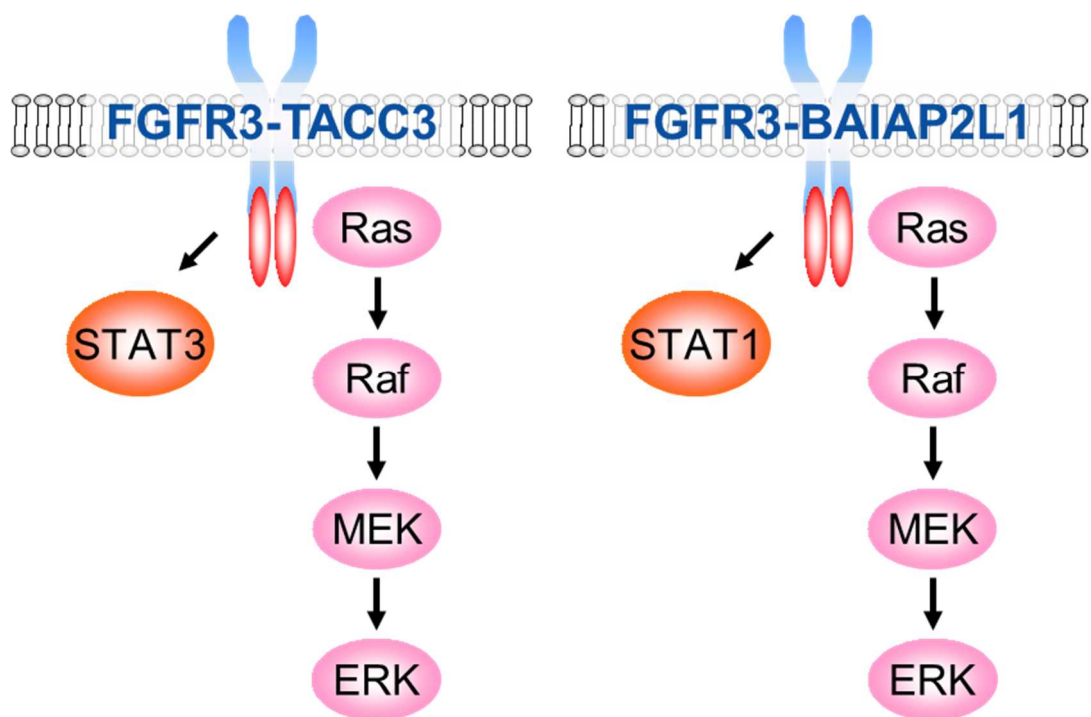


図 29 FGFR 融合キナーゼの既知のパスウェイ

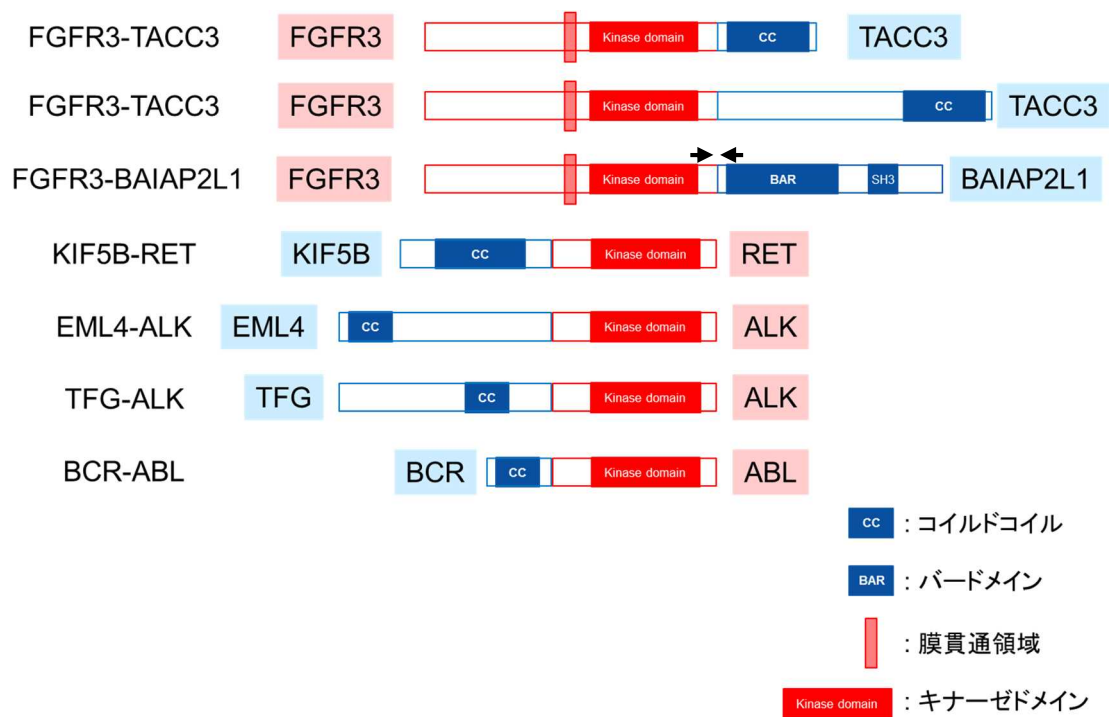


図 30 融合キナーゼの模式図

4.2 材料と方法

4.2.1 試薬と細胞

CH5183284/Debio 1347 は特許情報 (WO2011016528) に従って中外製薬にて作成した。細胞株は American Type Culture Collection、Health Science Research Resources Bank もしくは Health Protection Agency Culture Collections から購入し、各機関の推奨する培地で培養した。

4.2.2 *FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子の PCR 法による増幅とシーケンス

臨床検体から得た DNA を用いた実験は、中外製薬の倫理委員会で承認された範囲内で行われた。46 例の膀胱癌患者、83 例の肺癌患者、17 例の頭頸部癌患者と 18 例の食道癌患者の腫瘍組織から得た cDNA は Origene Technologies, Inc.社と TriStar Technoogy Group LLC.社から購入した。以下のプライマー配列を用いて PCR 反応を行い、*FGFR3-BAIAP2L1* 断片を検出した。5'-TGTTTGACCGAGTCTACTCACC-3' と 5'-GACATGTCCCAGTTCAGTTGAC-3'。増幅した箇所を図 30 に示した。PCR 断片は、BigDye Terminator Kit と DNA Analyzer 3730xl (Applied Biosystems)を用いてサンガーシーケンスを行い、塩基配列確認を行った。

4.2.3 ソフトアガーコロニーフォーメーションアッセイ、スフェロイド形成アッセイとゼノグラフトマウスモデル作成

FGFR3 WT、FGFR3-BAIAP2L1、BAIAP2L1、EML-ALK を発現させるピューロマイシン耐性ベクターを保有するレンチウイルスを Rat2 ラット正常繊維芽細胞もしくは NIH-3T3 マウス正常繊維芽細胞に感染させたのち、1 µg/mL のピューロマイシンを添加し、各 FGFR3 の恒常発現株を作成した。ソフトアガーコロニーフォーメーションアッセイでは、各種 Rat-2 細胞を CytoSelect 96 well Cell Transformation assay kit (CELL BIOLABS, INC)に播種し、14 日間培養したのちに顕微鏡で細胞形態を撮影した。スフェロイド形成アッセイでは、各種 Rat-2 細胞を

スフェロイドプレート (Sumilon Celltight Spheroid 96U; Sumitomo Bakelite, Inc.) に播種し 15 日後に細胞形態を撮影し、長径を測定した。ゼノグラフトマウスには、Charles River Laboratories Japan から購入した BALBnu/nu マウス (CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrlCrlj nu/nu) を用いた。各 Rat-2 細胞を 5x10⁶ 個ずつ皮下に移植し、腫瘍径を測定した。全ての *in vivo* 試験は中外製薬 Animal Care and Use Committee に承認されたものである。

4.2.4 *In vitro* と *in vivo* 薬効試験

In vitro 細胞増殖阻害活性測定のため、各細胞を 96 ウェルプレートに播種し、CH5183284/Debio 1347 が終濃度 0.003 から 20,000 nmol/L になるように添加、37 度で 4 日間培養後、生存細胞数を CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega) で検出した。*In vivo* マウスゼノグラフトモデル試験は、各細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍径が 200 から 300 mm³ になったのちにマウスをランダムイズし、CH5183284/Debio 1347 を連日経口投与することで実施した。

4.2.5 RNA シークエンスと mRNA 発現解析

各 Rat-2 細胞からトータル RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc.) を用いて抽出した。抽出したトータル RNA を MacroGen 社に送付し、HiSeq 2000 Sequencing System (Illumina) を用いて次世代シークエンスを行った。mRNA ライブラリーは TruSeq RNA sample preparation kit (Illumina) を用いて調製され、各 DNA 断片の両端を 100 bp ずつをシークエンスした。RefSeq データベースに対し RSEM ソフトウェアを用いて読まれた配列をアライメントし、それぞれの遺伝子の mRNA 発現レベルを解析した(66)。Rat-2_mock 細胞とそのほかの細胞を比較して、mRNA の発現変化が 80% よりも小さくなっている遺伝子群を発現低下遺伝子群、120% よりも大きくなっている遺伝子群を発現上昇遺伝子群とした。また、Rat-2_F3-B 細胞に 1 μM の CH5183284/Debio 1347 を添加し 24 時間後に回収したトータル RNA も RNA シークエンスで

発現解析した。DMSO 処理群と比較して、mRNA の発現変化が 50%よりも小さくなっている遺伝子群を発現低下遺伝子群、200%よりも大きくなっている遺伝子群を発現上昇遺伝子群とした。得られた RNA シークエンスデータは NCBI に登録されている (accession #SRP050232)。

4.2.6 各 FGFR3 のリン酸化レベルと二量体化レベルの確認

各種発現ベクターを作成した。FGFR3 WT、F3-B、F3-B- Δ BAR (BAR ドメインを欠損した BAIAP2L1 との融合遺伝子)、BAIAP2L1、F3-B- Δ SH (BAIAP2L1 の SH ドメイン (342–401 残基) が欠損)、F3-B- Δ BAR/SH (BAIAP2L1 の SH ドメインと BAR ドメインが欠損) と、FGFR3 K508M (キナーゼ活性欠損変異) を pCXND3 (Kaketsuken) に導入し、発現ベクターとし、HEK293 細胞へのトランスフェクションに使用した。FuGene HD reagent (Promega) を用いてトランスフェクションし 72 時間後、細胞タンパク質を Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) を用いて回収し、ウェスタンブロット法で解析した。また、FLAG タグもしくは MYC タグが付与された発現ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞は、FGFR3 の二量体化形成実験に用いた。トランスフェクション 3 日後に細胞タンパク質を回収し、免疫沈降実験を行った。その際、抗 FLAG M2 アフィニティーゲル (Sigma-Aldrich) を用いた。

4.3 結果

4.3.1 *FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子陽性患者の探索

これまでに癌細胞株でしか見つかっていなかった *FGFR3-BAIAP2L1* が本当に臨床検体でも存在するかを検証するため、*FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子が検出可能な PCR アッセイ系を構築した。様々な癌種の臨床検体から抽出した mRNA を逆転写し作成された cDNA を Origene Technologies 社と Tristar Technology Group 社から購入し、PCR 法で *FGFR-BAIP2L1* 融合遺伝子の検出を行った。その結果、肺腺癌 28 症例のうち 1 症例、肺扁平上皮癌 28 症例のうち 1 症例、膀胱癌 46 症例のうち 2 症例で PCR 断片の増幅が検出された（表 7）。PCR 断片をサンガーシーケンスで配列確認したところ、全ての PCR 陽性例で *FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子であることが確認された。代表例のシーケンス波長を示した（図 31）。4 例とも同じ塩基配列であり、*FGFR3* の 18 番目のエクソンと *BAIAP2L1* の 2 番目のエクソンが融合していることが確認された。未確認ではあるが、ゲノム上ではイントロン部分で転座が起こっていることが推察される。

表 7 各癌種における *FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子陽性率

Tumor type		N (%)
Lung cancer	Adenocarcinoma (n = 28)	1 (3.6)
	Squamous cell (n = 28)	1 (3.6)
	Others (n = 27)	0 (0)
Bladder cancer (n = 46)		2 (4.3)
Head & neck cancer (n = 17)		0 (0)
Gastroesophageal cancer (n=18)		0 (0)

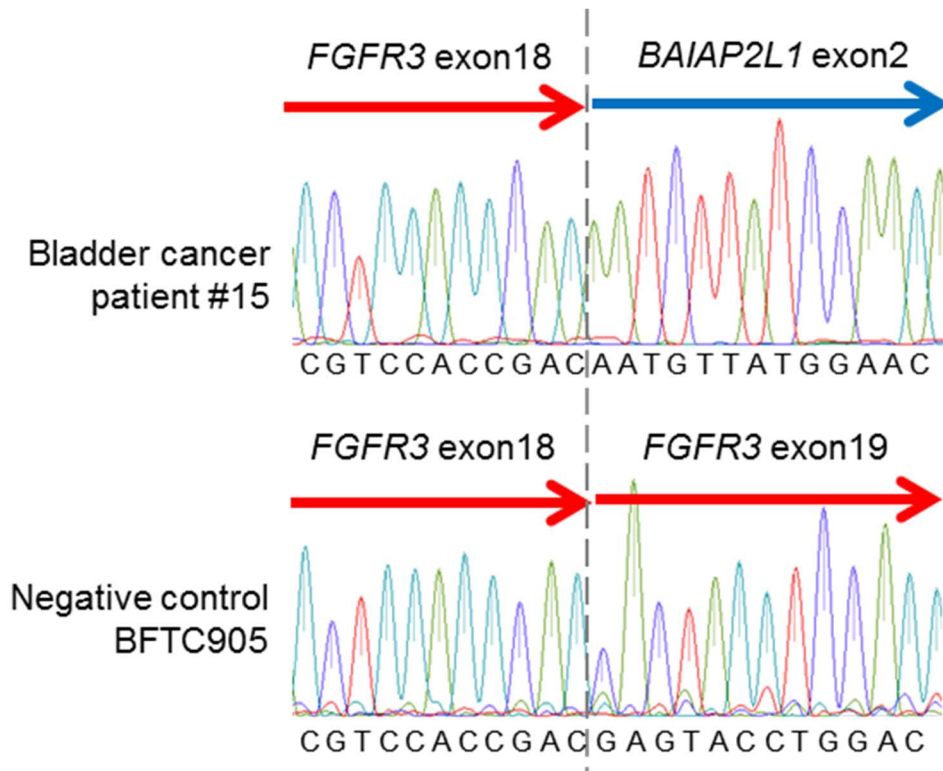


図 31 *FGFR3*-*BAIAP2L1* 融合遺伝子のシーケンス解析

PCR で増幅された断片の塩基配列をサンガーシーケンス法で確認した。代表例の波長を示した。上の図に、膀胱癌患者 (#15) の cDNA から同定された *FGFR3*-*BAIAP2L1* の配列、下の図に、野生型 *FGFR3* を持つ BFTC905 膀胱癌細胞株の cDNA から検出された野生型 *FGFR3* の配列を示した。

4.3.2 FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼの癌化促進作用

FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼの癌化促進能を検証するため、レンチウイルスを用いて mock vector、FGFR3、FGFR3-BAIAP2L1 もしくは BAIAP2L1 を恒常的に発現させている正常ラット繊維芽細胞 Rat-2 細胞を構築した。それぞれ、Rat-2_mock、Rat-2_FGFR3、Rat-2_F3-B、もしくは Rat-2_BAIAP2L1 と呼ぶ。それぞれの細胞の *in vitro* における癌化促進能を検証するため、ソフトアガーを用いた足場非依存的なコロニーフォーメーション能とスフェロイド形成能を測定した。その結果、Rat-2_F3-B 細胞はその他の細胞と比較して非常に強いコロニーフォーメーション能 (図 32A) とスフェロイド形成能 (図 32B) を獲得していることが分かった。次に、これらの細胞をそれぞれ 5×10^6 個ずつマウスに移植し、15 日後に腫瘍径を測定した。Rat-2_F3-B 細胞を移植されたマウスは 5 匹中 5 匹で腫瘍径が $1,000 \text{ mm}^3$ を超え、その他の細胞を移植されたマウスの腫瘍径は 100 mm^3 を超えなかった (図 32C)。このことから、FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼは強い癌化促進能を持つことが示唆された。次に、この癌化促進能が FGFR3 のキナーゼ活性に由来しているかを確認するため、FGFR キナーゼ阻害剤である CH5183284/Debio 1347 を用いて細胞増殖阻害アッセイを行った。FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼに依存して増殖している細胞として、FGFR3-BAIAP2L1 融合遺伝子を持つ SW780 膀胱癌細胞株、Rat-2_F3-B と 3T3 正常マウス繊維芽細胞に FGFR3-BAIAP2L1 を恒常的に発現させた細胞株である 3T3_F3-B を用いた。その結果、EML4-ALK 融合キナーゼを発現する 3T3 細胞や FGFR3 WT を持つ HT1376 膀胱癌細胞株と比較すると、FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを発現する細胞は CH5183284/Debio 1347 に高い感受性を示した (図 33A)。細胞内のシグナル阻害を確認するため、 $1 \mu\text{M}$ の CH5183284/Debio 1347 をそれぞれの細胞に添加し、2 時間後に FGFR の下流因子である FRS と ERK のリン酸化阻害の程度をウェスタンブロット法で測定した。CH5183284/Debio 1347 により両タンパク質のリン酸化が抑制されており、FGFR シグナルが阻害されていることが確認された (図 33B)。次に、FGFR 阻害剤を用いて FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを持つ癌が治療できるかをより高次の系で確認するため、マウスゼノ

グラフトモデルを用い CH5183284/Debio 1347 の *in vivo* 抗腫瘍効果を検証したところ、FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを発現している SW780 膀胱癌細胞と Rat-2_F3-B 細胞を移植されたゼノグラフトモデルマウスは CH5183284/Debio 1347 に感受性があることがわかり、FGFR3 WT である HT1376 膀胱癌ゼノグラフトマウスモデルは感受性を示さなかった (図 34A)。また、CH5183284/Debio 1347 を投与した 4 時間後の Rat-2_F3-B ゼノグラフトマウスから腫瘍を採取し、腫瘍内のシグナル阻害を解析したところ、FGFR と FRS2 のリン酸化が阻害されていることが確認された (図 34B)。これらのことから、FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼはそのキナーゼ活性を使って癌化促進能を獲得していることが示唆され、CH5183284/Debio 1347 のような FGFR キナーゼ阻害剤で FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを持つ癌を治療できる可能性が示唆された。

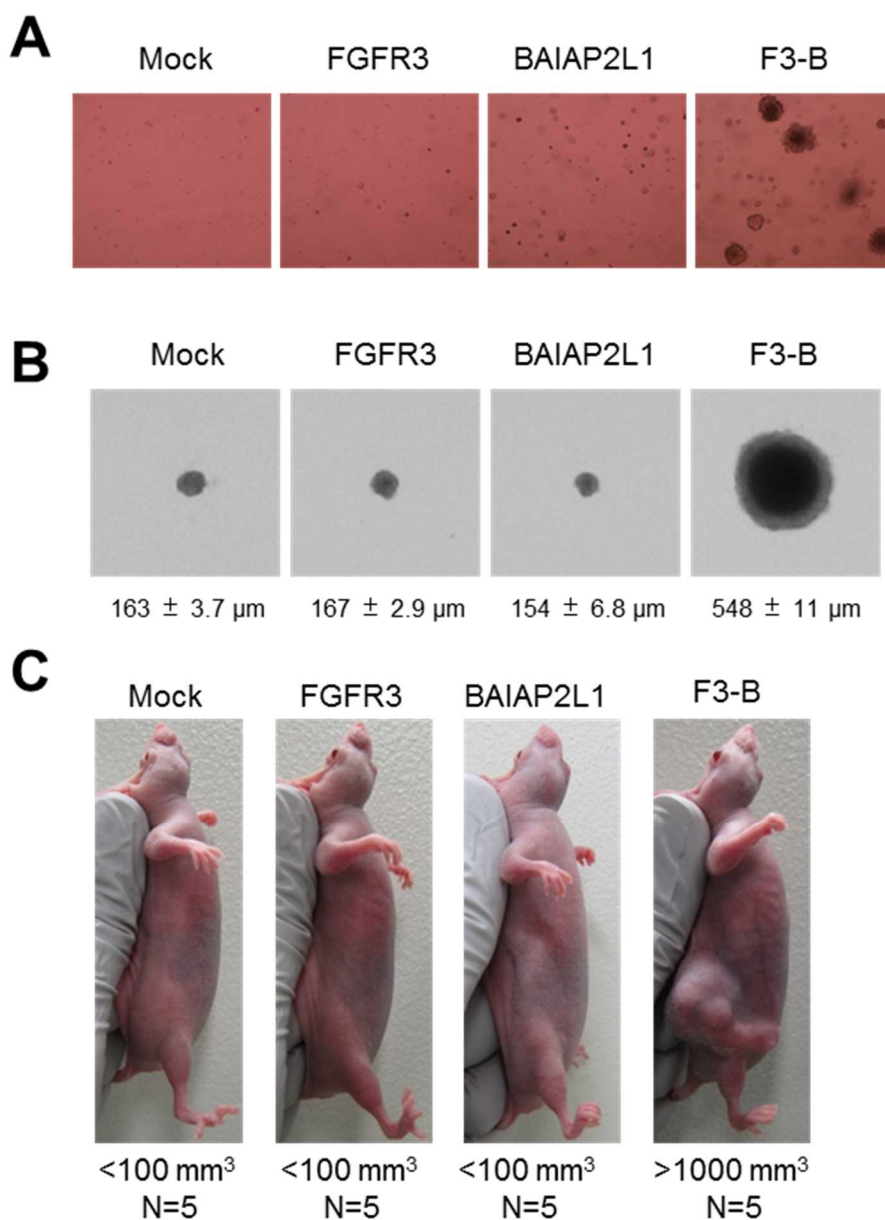


図 32 FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼの癌化促進能の確認

(A) ソフトアガーコロニーフォーメーションアッセイ。Rat-2_mock、Rat-2_FGFR3、Rat-2_F3-B もしくは Rat-2_BAIAP2L1 細胞を 15 日間 96 ウェルプレートで培養し、顕微鏡で細胞形態を撮影した。(B) スフェロイド形成アッセイ。それぞれの細胞を 14 日間 96 ウェルプレートで培養し、顕微鏡で細胞形態を撮影した。N=6 でスフェロイドの長径を計測し、その平均値を示した。(C) *In vivo* 腫瘍形成能の測定。5x10⁶の細胞をヌードマウスに移植し 15 日後に腫瘍径を測定した。

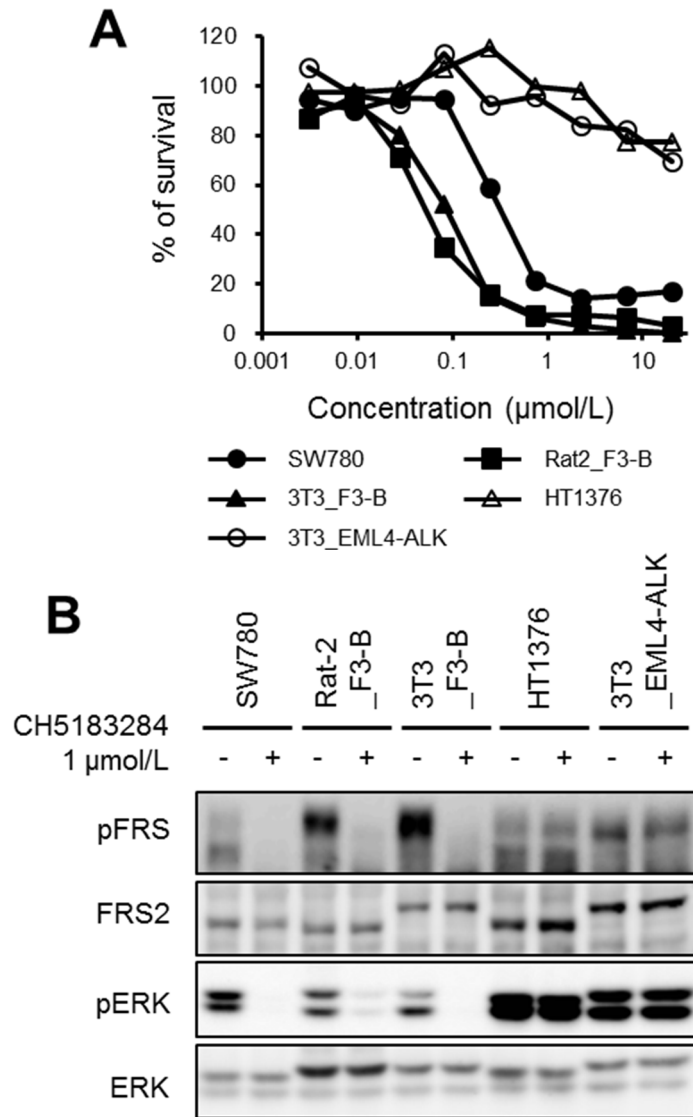


図 33 FGFR3-BAIAP2L1 発現細胞の CH5183284/Debio 1347 への感受性

(A) FGFR3-BAIAP2L1 発現細胞の CH5183284/Debio 1347 への感受性。SW780、Rat-2_FGFR3、3T3_F3-B、HT1376 もしくは 3T3_EML4-ALK 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、化合物を添加し 4 日間培養した。その後 CellTiter-Glo kit を用いて生存細胞数を測定した。(B) FGFR シグナル阻害の確認。CH5183284/Debio 1347 を各細胞に添加し、2 時間後に細胞タンパクを抽出、ウェスタンブロット法で解析した。

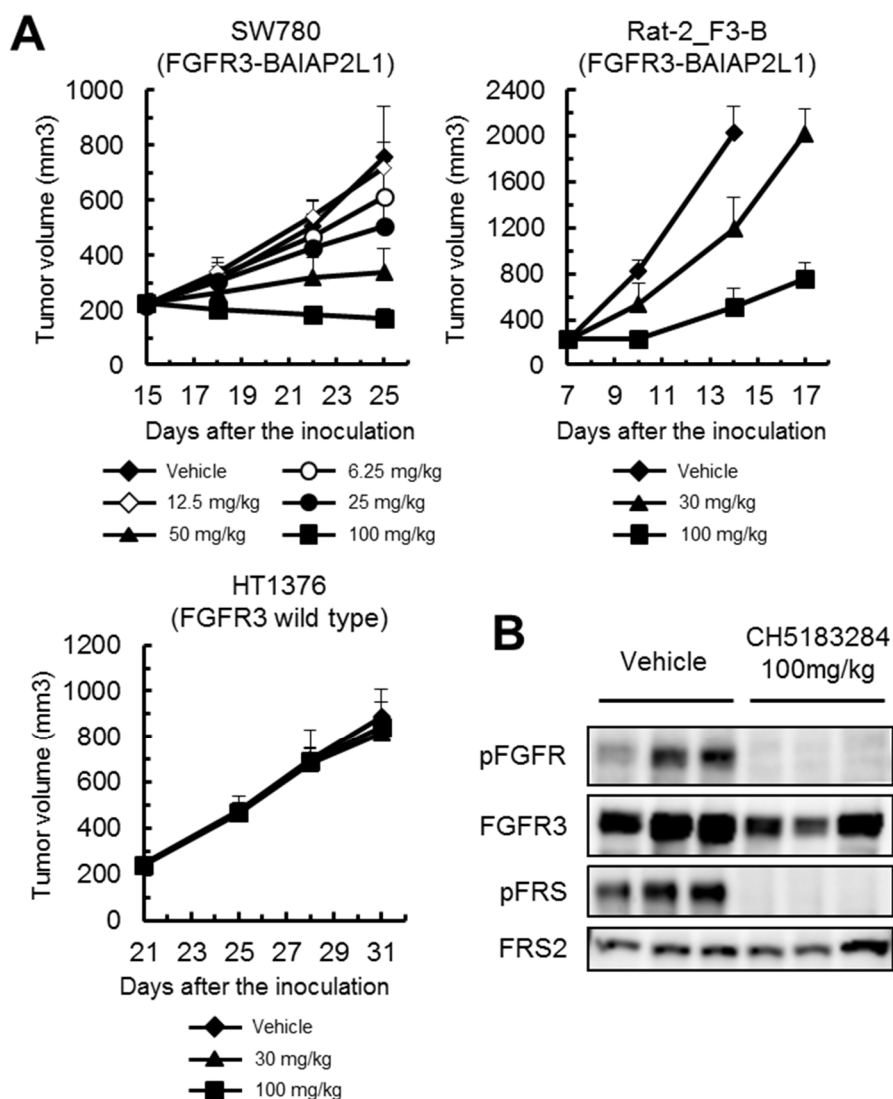


図 34 CH5183284/Debio 1347 の FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを持つ癌に対する *in vivo* 抗腫瘍効果

(A) SW780、Rat-2_F3-B もしくは HT1376 細胞を移植されたゼノグラフトマウスモデルに CH5183284/Debio 1347 を 11 日間連日経口投与した。腫瘍径の平均値と標準偏差の値を示した。(B) CH5183284/Debio 1347 100 mg/kg を Rat-2_F3-B ゼノグラフトマウスモデルに投与し、4 時間後に腫瘍組織を回収し、タンパク質を抽出した。その後ウェスタンブロット法で FGFR と FRS のリン酸化レベルを解析した。N=3。

4.3.3 FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼのパスウェイ解析

これまでに FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼは、*in vitro* の条件下において ERK と STAT1 のシグナルを亢進することは知られていたが(33) (図 29) 、それ以上の詳細は不明であり、*in vivo* における腫瘍形成促進作用のメカニズムも不明であったことから、これまでに構築した各 Rat-2 細胞 (Rat-2_mock、Rat-2_FGFR3、Rat-2_F3-B、Rat-2_BAIAP2L1) を用いてパスウェイ解析を行った。まず、mRNA 発現解析のため、*in vitro* で培養した各 Rat-2 細胞からトータル RNA を抽出し、Illumina HiSeq2000 を用いて RNA シークエンスを行った。まず、それぞれの細胞で発現が変化している遺伝子を抽出するため、Rat-2_mock 細胞との mRNA 発現レベル比較を行った。その結果、発現上昇遺伝子数は、Rat-2_FGFR3、Rat-2_F3-B、Rat-2_BAIAP2L1 細胞においてそれぞれ、1,232、2,263、3,195 遺伝子だった。発現減少遺伝子数はそれぞれ、855、2,460、687 遺伝子であった。これらの遺伝子のうち FGFR3-BAIAP2L1 に特徴的なシグナル経路を見出すため、Rat-2_F3-B 細胞でのみ発現変化している遺伝子を抽出すると、発現上昇遺伝子として 1,566 遺伝子が、発現減少遺伝子として 1,916 遺伝子が同定された (図 35A) 。これらの mRNA の発現レベルが変動している遺伝子のうち、FGFR3 のキナーゼ活性に応答して変動している遺伝子を抽出するため、*in vitro* で培養した Rat-2_F3-B 細胞に 1 μ M の CH5183284/Debio 1347 を添加し、24 時間後にトータル RNA を抽出、Illumina HiSeq2000 を用いて RNA シークエンスを行い、mRNA 発現解析を行った。その結果、化合物処理により発現レベルが低下する遺伝子が 663 遺伝子同定され、そのうち 143 遺伝子が Rat-2_F3-B 細胞では発現レベルが上昇している遺伝子であった。化合物処理により発現レベルが上昇する遺伝子が 227 遺伝子同定され、そのうち 67 遺伝子が Rat-2_F3-B 細胞では発現レベルが減少している遺伝子であった (図 35B) 。合計、210 遺伝子を *FGFR3-BAIAP2L1* 融合キナーゼ遺伝子セットとし、パスウェイ解析ソフトウェア Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてこの遺伝子セットを制御しているパスウェイを解析した。その結果、*RB1*、*p53* と *p16* といった因子が制御する遺伝子群が抑制されていること、*E2F2* と *E2F1* といった因子が制御する遺伝子群が活性化しているこ

とがわかった (表 8)。このことが *in vivo* でも起こっているかどうかを確認するため、それぞれの Rat-2 細胞をマウスに移植し、形成された腫瘍からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法でシグナルを解析した。その結果、これまでの報告通り Rat-2_F3-B 腫瘍内では MEK や ERK のリン酸化が上昇しており、それらの下流因子である CyclinD1 の発現も上昇していたことから、MAPK 経路が活性化していることが分かった。一方で、AKT のリン酸化は減少し、PI3K 経路は逆に抑制されている可能性が示唆された。IPA での解析結果と一致し、p53 の発現レベルは抑制され、下流因子である p21 の発現も抑制されていた。また、RB1 のリン酸化は顕著に上昇していることから、RB1 の活性が抑制され、その結果 E2F2 や E2F1 が活性化され、最終的に p27 の抑制へと繋がっていると示唆された (図 36)。これらのことから、FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼは MAPK 経路を活性化すると同時に、RB1 や p53 のような癌抑制的な経路を抑制することによって癌化能を得ていることが示唆された (図 37)。

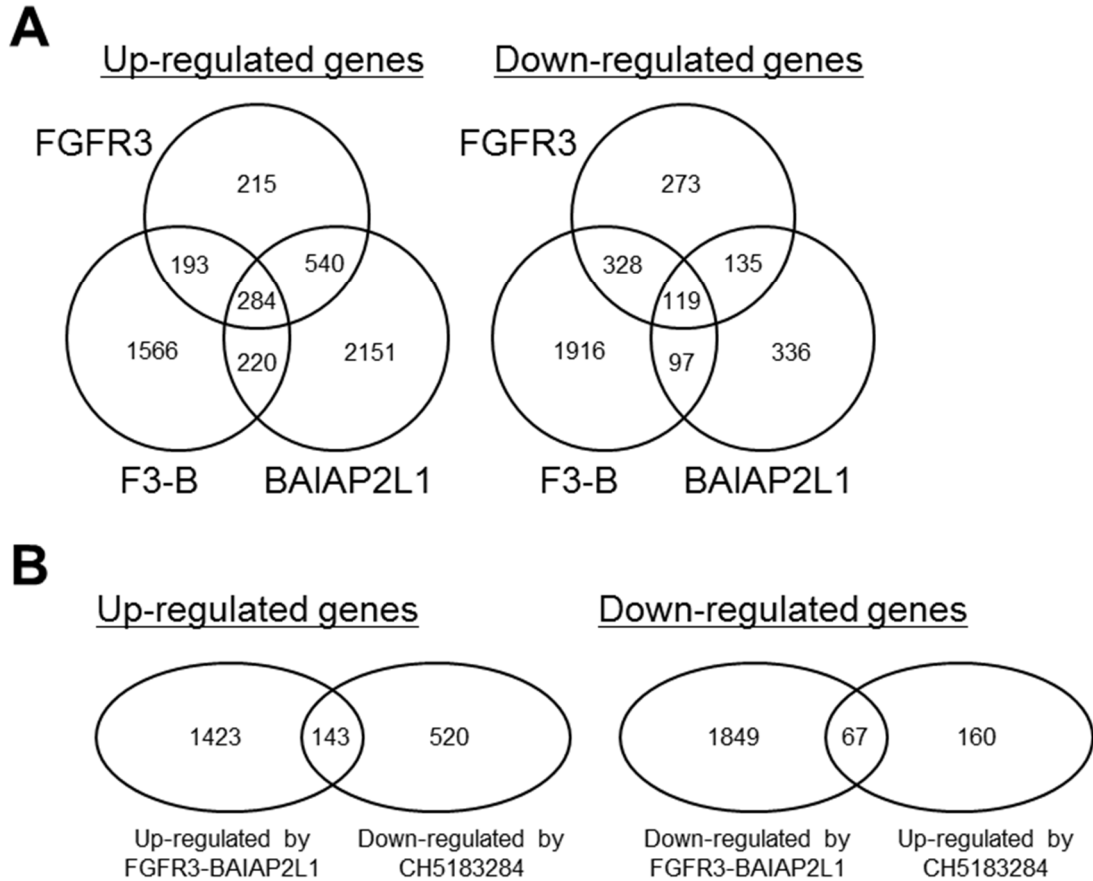


図 35 FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼのパスウェイ解析

(A) Rat-2_FGFR3、Rat-2_F3-B と Rat-2_BAIAP2L1 細胞間で mRNA 発現レベルの異なる遺伝子を抽出した。それぞれ Rat-2_mock 細胞の mRNA 発現レベルと比較し、80%よりも小さくなっていた遺伝子は発現減少遺伝子、120%よりも大きくなっていた遺伝子は発現上昇遺伝子として、ベン図で表した。(B) (A)で解析した Rat-2_F3-B 細胞で発現変化していた遺伝子群と CH5183284/Debio 1347 添加により発現変化した遺伝子群を比較し、ベン図で表した。1 μ M の CH5183284/Debio 1347 を Rat-2_F3-B 細胞に添加し 24 時間後の mRNA 発現レベルの変化を解析した。50%よりも小さくなっていた遺伝子は発現減少遺伝子、200%よりも大きくなっていた遺伝子は発現上昇遺伝子とした。

表 8 FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼにより制御されている因子リスト

Ingenuity Pathway Analysis により導き出された FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼにより制御されると推定される因子のリスト

Upstream regulator	Predicted state in Rat-2_F3-B cells	Activation z-score	p-value of overlap
RB1	Inhibited	-2.95	9.5E-17
TP53	Inhibited	-2.05	1.4E-12
RBL1	Inhibited	-2.75	1.1E-11
CDKN2A	Inhibited	-2.31	4.9E-10
NUPR1	Inhibited	-3.21	2.2E-06
E2F2	Activated	2.00	1.4E-13
E2F1	Activated	3.52	1.3E-12
TBX2	Activated	2.83	1.9E-08
CEBPB	Activated	2.36	1.9E-05
STAT3	Activated	2.40	2.7E-04

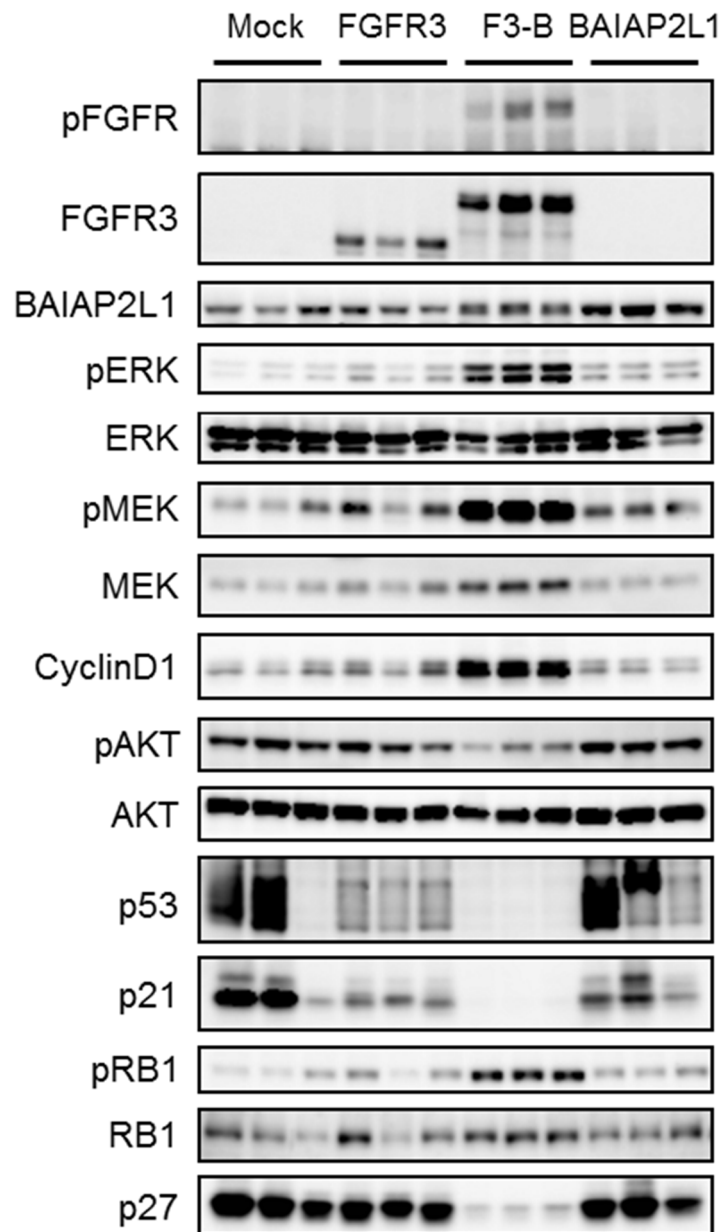


図 36 各 Rat-2 細胞ゼノグラフト腫瘍組織内のシグナル解析

Rat-2_mock、Rat-2_FGFR3、Rat-2_F3-B もしくは Rat-2_BAIAP2L1 細胞を移植されたゼノグラフトマウスモデルの腫瘍からタンパク質を Cell lysis buffer を用いて抽出したのち、それぞれの抗体を用いてウェスタンブロット法で解析した。

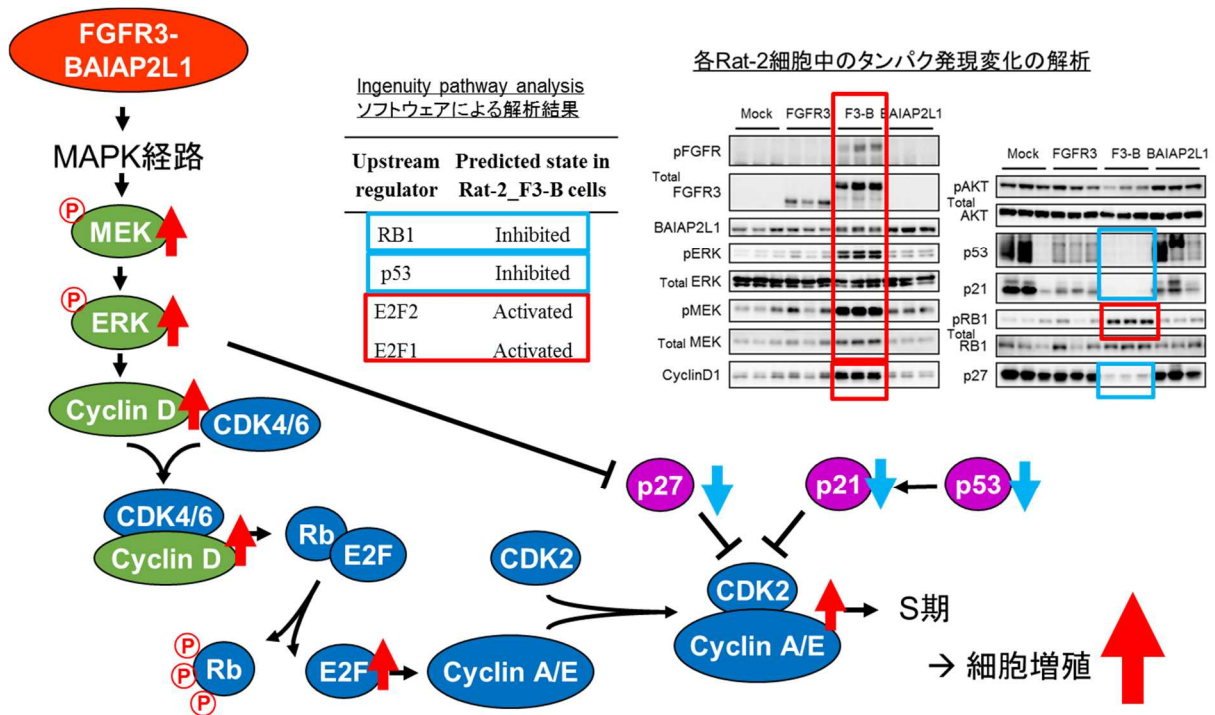


図 37 FGFR3-BAIAP2L1 が活性化するシグナル

4.4.4 FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼの持つ BAR ドメインの機能解析

これまでに報告されている融合キナーゼのパートナー遺伝子はコイルドコイルドメインのような二量体化ドメインを保有しており、通常、リガンド依存的に二量体化するキナーゼを、リガンド非依存的に二量体化させ、恒常的にキナーゼ活性を活性化させていることが知られている

(67)。BAIAP2L1 の持つ BAR ドメインは二量体化モチーフとして知られているが、これまでに BAR ドメインを持つ融合キナーゼの報告はなく、BAR ドメインが二量体化キナーゼ形成を促進し、癌化能を促進するかはまだわかっていなかった。そこで FGFR3-BAIAP2L1 の BAR ドメインの機能解析をするため、BAR ドメイン欠損 FGFR3-BAIAP2L1 を発現する Rat-2 細胞(Rat-2_F3-B- Δ BAR)を作成し(図 38A)、解析を行った。まず、*in vitro*、*in vivo* での癌化促進能を検証した。*In vitro* スフェロイド形成アッセイでは、Rat-2_F3-B- Δ BAR 細胞のスフェロイド形成能は顕著に低下していることが示された(図 38B)。また、マウスゼノグラフトモデルにおいて *in vivo* 腫瘍形成能を検証したところ、Rat-2_F3-B 細胞は平均 1,600 mm³ の腫瘍を形成したのに対し、Rat-2_F3-B- Δ BAR 細胞は平均 89 mm³ の腫瘍サイズであった(図 38C)。最後に、Rat-2_F3-B- Δ BAR 細胞の BAR ドメインが欠損した FGFR3-BAIAP2L1 が機能し得る構造を維持しているかどうかを確認するため、FGF1 リガンド添加によるスフェロイド形成能を検証した(図 38D)。Rat-2_F3-B 細胞はリガンド非依存的なスフェロイド形成能を示し、恒常的な FGFR3 の活性化が示唆された。一方で、Rat-2_F3-B- Δ BAR 細胞は FGF1 リガンド濃度依存的にスフェロイド形成活性が促進されたことから、Rat-2_F3-B- Δ BAR 細胞の BAR ドメインが欠損した FGFR3-BAIAP2L1 は機能し得る構造を維持していたことが示唆された。以上のことから、FGFR3-BAIAP2L1 は BAR ドメインを介して恒常的に活性化し、癌化能を獲得していることが示唆された。

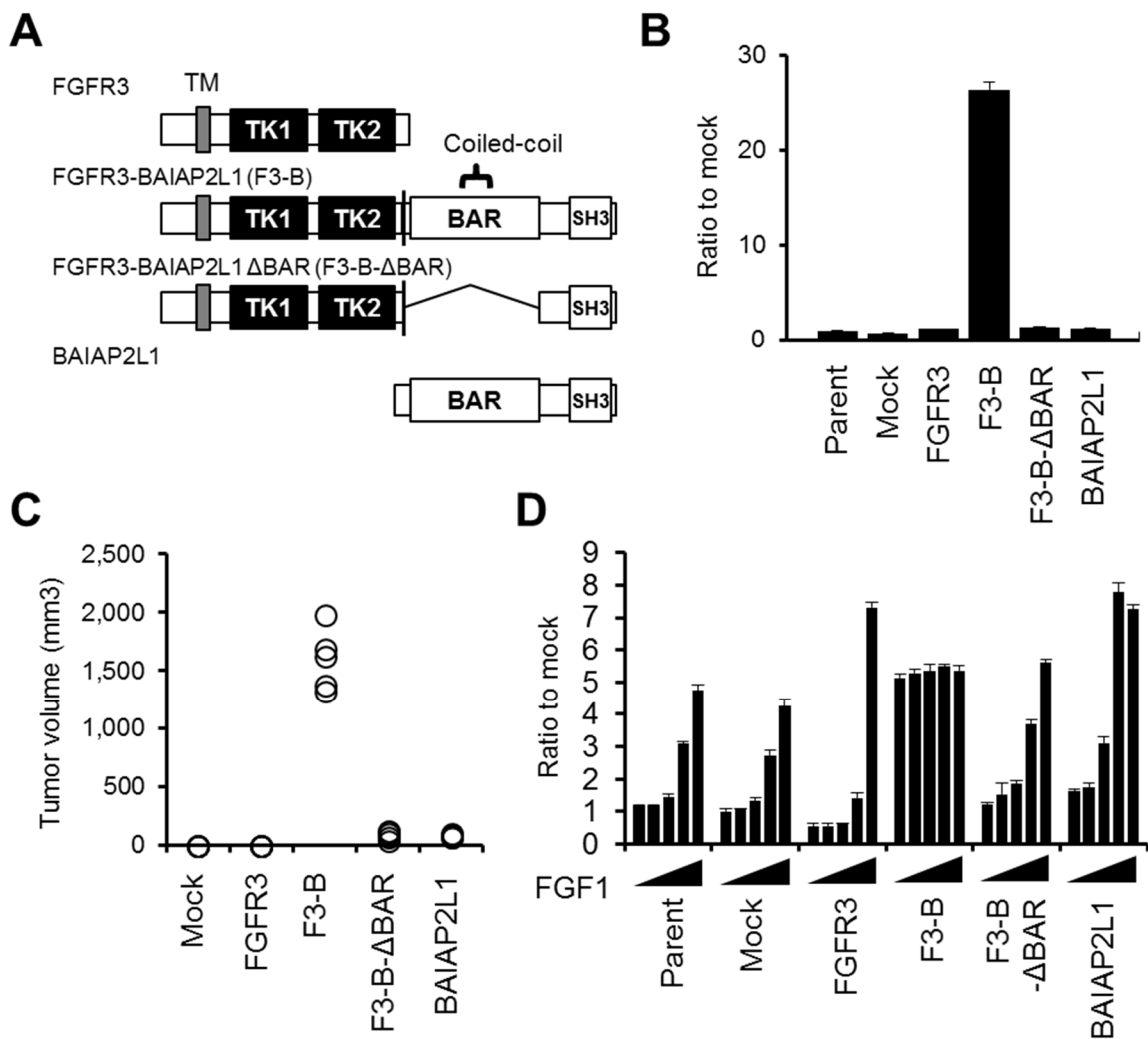


図 38 FGFR3-BAIAP2L1 の BAR ドメインが癌化能に与える影響

(A) FGFR3 WT、FGFR3-BAIAP2L1 (F3-B)と BAR ドメイン欠損 FGFR3-BAIAP2L1 (F3-B-ΔBAR)の模式図。(B) スフェロイド形成活性測定。Rat-2、Rat-2_mock、Rat-2_FGFR3、Rat-2_F3-B、Rat-2_F3-B-ΔBAR と Rat-2_BAIAP2L1 細胞を 96 ウェルスフェロイドプレートに播種し、4 日間培養したのち、生存細胞数を CellTiter-Glo assay で検出した。(C) In vivo 腫瘍形成活性測定。5x10⁶の細胞をヌードマウスの皮下に移植し 14 日後に腫瘍径を測定した。(n = 5) (D) リガンド依存性の検証。FGF1(0、0.1、1、10 もしくは 100 ng/mL)とヘパリン(10 μg/mL)存在下で細胞をスフェロイドプレートに播種し、96 時間培養後、CellTiter-Glo で生存細胞数を検出した。(n = 3)

4.4.5 FGFR3-BAIAP2L1 の BAR ドメインが二量体化に与える影響

FGFR3-BAIAP2L1 の BAR ドメインが二量体形成に影響を与えているかを検証するため、各種のドメインを欠損した FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを発現させる pCXND3 ベクターを構築し二量体化能を検証した (図 39A)。作成したコンストラクトを以下に示す。FGFR3 WT、F3-B、F3-B- Δ BAR、BAIAP2L1 の SH ドメインが欠損した F3-B (F3-B- Δ SH)、BAR ドメインと SH ドメインが両方欠損した F3-B (F3-B- Δ BAR/ Δ SH) と不活性型キナーゼとなる変異を入れた kinase dead F3-B (F3-B-KD)。まず、これらの発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、72 時間後に細胞タンパク質を回収、ウェスタンブロット法で FGFR3 のリン酸化状態を解析した。その結果、F3-B 発現細胞では高い FGFR3 のリン酸化が確認されたが、F3-B-KD 発現細胞では FGFR3 のリン酸化が確認されなかったことから、このリン酸化は FGFR3 のキナーゼ活性によるものであることが確認された。また、BAR ドメインを欠損した F3-B- Δ BAR 発現細胞もしくは BAR ドメインと SH ドメイン両方を欠損した F3-B- Δ BAR/ Δ SH 発現細胞では FGFR3 のリン酸化が弱かったのに対し、SH ドメインのみを欠損した F3-B- Δ SH 発現細胞の FGFR3 のリン酸化は F3-B と同様に高かった (図 39B)。このことから BAR ドメインが FGFR3 のリン酸化に重要な役割を持つ可能性が示唆された。次に、FGFR3-BAIAP2L1 の二量体化を直接確認するため、免疫沈降実験を行った。FLAG タグもしくは Myc タグが C 末端に付与された FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを HEK293 細胞に発現させ、細胞タンパク質を抽出後、抗 FLAG M2 アフィニティーゲルを用いて免疫沈降し、抗 Myc 抗体でウェスタンブロット解析を行った。F3-B 発現細胞では抗 Myc 抗体によりバンドが検出されたが、F3-B- Δ BAR 発現細胞ではほとんど検出されなかった (図 39C)。つまり、BAR ドメイン欠損 FGFR3-BAIAP2L1 は二量体化していないと結論した。以上の結果より、BAR ドメインは FGFR3-BAIAP2L1 の二量体化とキナーゼ活性の活性化に必須であることが示唆された。

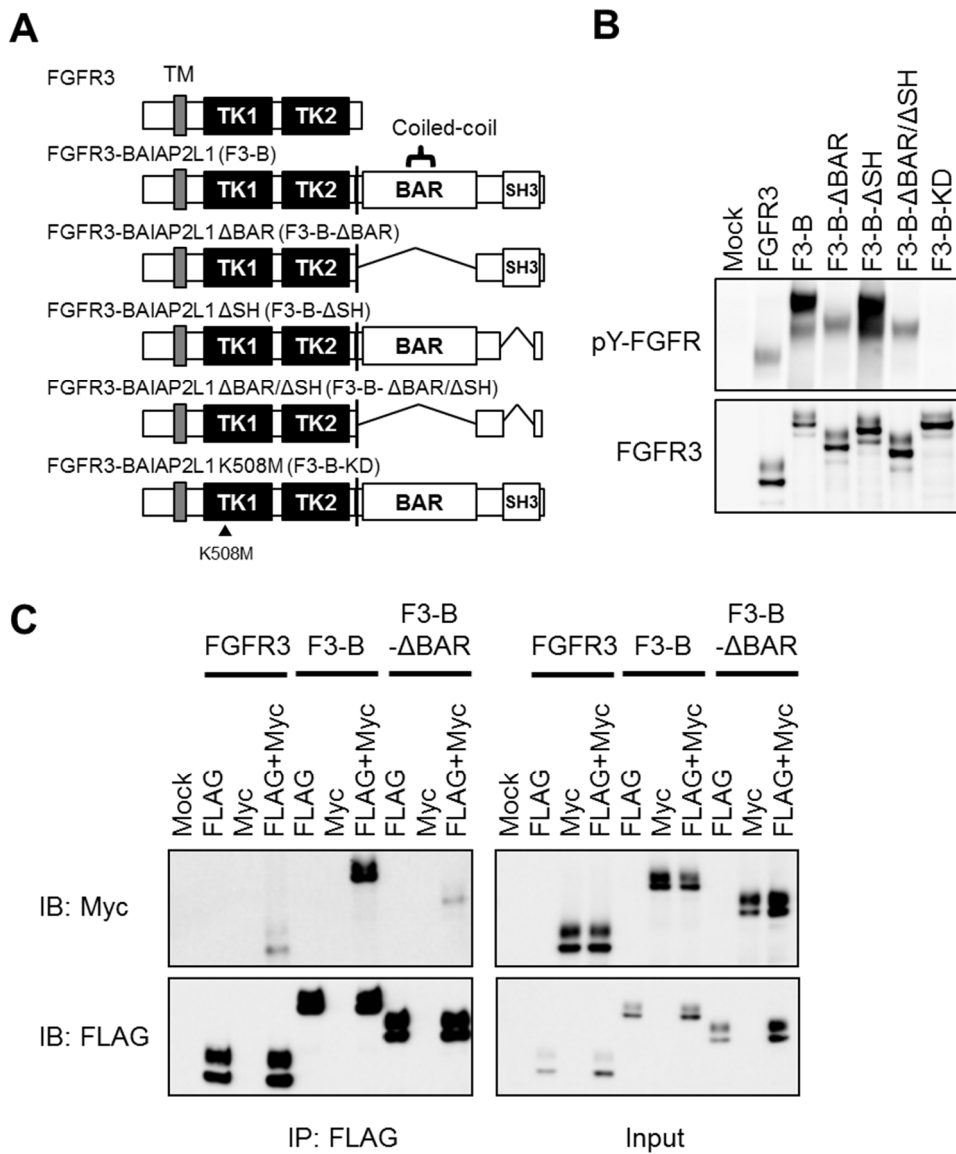


図 39 FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼの BAR ドメインを介した二量体化

(A) FGFR3 と各種 FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼ変異体の模式図。(B) FGFR3 リン酸化レベルの比較。(A)に示した各種 FGFR3-BAIAP2L1 発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、72 時間後に細胞タンパクを回収しウェスタンブロット法で解析した。(C) 二量体化形成活性検証。HEK293 細胞に、FGFR3、F3-B もしくは F3-B-ΔBAR 発現ベクターをトランスフェクションし、72 時間後に細胞タンパクを回収し、抗 FLAG M2 アフィニティーゲルを用いて免疫沈降し、ウェスタンブロット法で解析した。

4.4 考察と小括

本章では、FGFR3-BAIAP2L1 の臨床における発現頻度とその機能について論じた。FGFR3-BAIAP2L1 融合遺伝子はこれまでに細胞株でのみ見つかり、臨床検体での報告はなかった。これまでに次世代シーケンスを用いた大規模な臨床検体での融合遺伝子探索が行われてきたにも拘らず本融合遺伝子が発見されなかったのは、次世代シーケンス法は多数の検体からの多数の融合遺伝子探索には適しているが、検出感度が通常の PCR 法と比較すると劣り、そのことにより見逃されていたからであると考えられる。本融合遺伝子のような全体の数%の頻度で発生するような新規融合遺伝子や新規変異遺伝子をすべて正確に検出し分析するには、理論上、1 癌種につき 2,000 検体の解析を行わなければならないことが示唆されており(68)、そのことから本論文で用いたような、より正確で感度の高い検出系が必要であると考えられる。

癌の治療戦略を考えるうえでは、各癌原遺伝子が活性化するシグナルパスウェイを理解することは、併用治療戦略や治療抵抗性メカニズムの理解のためには非常に重要である。融合キナーゼは融合パートナー遺伝子によって異なるパスウェイを活性化して癌の悪性を促進していることが知られている。例えば、リンパ腫で発生する NPM-ALK 融合キナーゼは STAT3 を活性化するのに対し、肺癌で発生する EML4-ALK 融合キナーゼは STAT3 を活性化しない(69)。つまり、融合キナーゼごとにシグナル解析を行い、それに基づいた併用戦略や治療抵抗性の予防などについて考えなければならない。そこで、本研究では FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼが活性化するシグナルパスウェイを解析した。その結果、主に、MAPK 経路の活性化と RB1 や p53 といった癌抑制因子の活性の抑制を見出したが、癌抑制因子を抑制するというメカニズムは非常に興味深い。正常細胞の防御機構として、癌原遺伝子が活性化した場合、RB1 や p53 も同時に活性化し細胞の活動を停止させることが知られている(70-72)。これは癌原遺伝子誘導セネッセンスと呼ばれている。通常、p53 の変異や RB 遺伝子がゲノム上から欠損するなどして、癌原遺伝子誘導セネッセンスが解除され、癌細胞が悪性化していくと考えられている。しかし、FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼの場合は、そういった変異などのイベントに依らず RB や p53

の活性を抑えることで癌を悪性化していることが示唆された。このことから、FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを保有する癌に対しては、FGFR 阻害剤と共に RB や p53 を再活性化することのできる薬剤を併用することでより強い効果を発揮する可能性が考えられた。

これまでに発見され解析されてきた融合キナーゼのパートナー遺伝子には、コイルドコイルドメインのような二量体化ドメインがあり、そのドメインを介して二量体化し活性化していることが分かっていた。本研究では、FGFR3-BAIAP2L1 は BAR ドメインという二量体化ドメインで二量体化し活性化することが見出された。BAR ドメインによる二量体化が FGFR3 のキナーゼ活性の活性化に必須であることから、FGFR キナーゼ阻害剤以外にも、BAR ドメインを介した二量体化を阻害する薬剤が効果を示す可能性も期待される。これまで、数多くのキナーゼ阻害剤が開発され上市されているが、キナーゼドメインの点変異により効果を示さなくなる例が多く報告されており、FGFR 阻害剤においても例外ではない(73, 74)。したがって、将来的にキナーゼ活性阻害以外の方法で治療する方法が必要になる可能性があり、BAR ドメインを介した二量体化阻害剤はその可能性の 1 つであるかもしれない。

まとめると、数%の頻度で肺癌もしくは膀胱癌患者が保有している FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼは、BAR ドメインを介した二量体化促進により活性化し、MAPK 経路の活性化、p53 や RB といった癌抑制因子の活性抑制によって、癌を悪性化していることがわかった。また、その活性化は FGFR3-BAIAP2L1 のキナーゼ活性に由来することから、FGFR 選択的キナーゼ阻害剤である CH5183284/Debio 1347 は FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼを持つ癌に対する 1 つの治療オプションであることが示唆された。

第5章 ERK シグナル阻害と FGFR 阻害剤の効果

5.1 緒言

現在、癌の治療において最も問題になっている事柄の一つが、癌が治療抵抗性を獲得するということである。癌細胞が治療に耐性を示すメカニズムに関しては様々な研究がなされているが、その多くは、薬剤によって抑制されたパスウェイをもう一度何らかの形で活性化するというメカニズムである。第3章でも述べたが、例えばキナーゼドメインのゲートキーパー部位に変異が生じ、治療中の薬剤には阻害できない構造変換を起こすことで耐性を示す例があり、それは慢性骨髄性白血病の治療薬 imatinib (BCR-ABL 阻害剤) などに耐性を示す *BCR-ABL* T315I 変異や (75)、肺腺癌の治療薬 erlotinib (EGFR 阻害剤) などに耐性を示す *EGFR* T790M 変異(76)などが挙げられる。また、MAPK 経路の構成因子の一つである *BRAF* に V600E 変異が入った悪性黒色腫に対しては *BRAF* 阻害剤や *MEK* 阻害剤が治療に用いられているが、その耐性メカニズムとして、*BRAF* スプライスバリエントの発現(77)や、*MEK* 変異(78)が報告されている。FGFR においても例外ではなく、非臨床ではあるが、FGFR2 や FGFR3 に変異を獲得することで FGFR 阻害剤に対して耐性になることが報告されている(43, 73, 74)。このように癌は、悪性化に必須なパスウェイを阻害されると、そのパスウェイを再活性化し耐性になることが多いことから、治療中にそのパスウェイが抑制され続けているかをモニタリングすることが、治療効果をより早期に予測する一助となると考えられる。

FGFR が活性化すると MAPK 経路や PI3K-AKT 経路が活性化されると言われているが、FGFR 依存的に増殖している癌細胞がどの経路に依存しているか、FGFR 阻害剤がどの経路を阻害しているときに効果を発揮するかは依然としてよくわかっていない。前章では FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼが活性化する経路を調べたが、FGFR3-BAIAP2L1 融合キナーゼは MAPK 経路の

みを活性化し、PI3K-AKT 経路は寧ろ抑制していた。この結果から、FGFR シグナルは主に MAPK 経路を活性化し、FGFR 遺伝子異常を持つ癌は MAPK 経路依存的に増殖すると仮説を立て、様々な FGFR 遺伝子異常を持つ癌細胞と FGFR 阻害剤 CH5183284/Debio 1347 を用いて検証した。まず、網羅的な遺伝子発現解析などにより、FGFR 阻害剤がどのパスウェイを抑制するかを解析し、そのパスウェイの下流因子のうち、FGFR 阻害剤の効果を最もよく予測するマーカーの探索を行った。

5.2 材料と方法

5.2.1 試薬と細胞

CH5183284/Debio 1347 (FGFR 阻害剤)、CH4987655 (MEK 阻害剤)、CH5126766 (RAF-MEK 阻害剤)と CH5132799 (PI3K 阻害剤)は中外製薬にて既報に従って合成した(43, 79-81)。AZD4547 は特許情報に従って中外製薬にて合成した(WO2008075068)。PD173074 (FGFR 阻害剤)、PD0325901 (MEK 阻害剤)、selumetinib (MEK 阻害剤)は Sigma-Aldrich 社もしくは Selleck Chemicals 社から購入した。使用した細胞はそれぞれ、American Type Culture Collection 社、Health Science Research Resources Bank 社、Health Protection Agency Culture Collections 社、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 社、Immuno-Biological Laboratories 社もしくは Asterand 社から購入し、推奨培地にて培養した。

5.2.2 マイクロアレイ解析

1 μ M の各阻害剤を各細胞に添加し、24 時間培養したのちに、トータル RNA を RNeasy kit (Qiagen)を用いて精製した。Affymetrix 社 Human Genome U133 Plus 2.0 array の推奨プロトコルに従い、トータル RNA を逆転写し、ラベルし、マイクロアレイにハイブリダイズした。マ

マイクロアレイの解析データは GEO データベースで入手可能である (GEO number: GSE73024)。アレイ上の各プローブの発現レベルは、*guanine-cytosine robust multi-array analysis (GC-RMA)* というアルゴリズムを用いて解析した(82)。非特異的に検出された可能性のあるシグナルを減らすため、10 よりも小さいシグナル値を示しているプローブは発現解析から除いた。DMSO 処理時の mRNA 発現レベルと化合物処理時の mRNA 発現レベルの比を計算し、シグナルが 50% よりも小さくなっている遺伝子を発現低下遺伝子、200% よりも大きくなっている遺伝子を発現上昇遺伝子と規定した。クラスタリングには Cluster 3.0 を用い、ヒートマップの作成には Java Treeview を用いた(83)。

5.2.3 遺伝子シグネチャー解析

ERK シグネチャーとして、*ERK1/2* の siRNA をヒト角化細胞に添加したのちに得たマイクロアレイデータ(GSE15417)を Gene Expression Omnibus データベースから得た(84)。各プローブの発現値をログ化し、*ERK* siRNA により統計学的に有意 ($p < 0.01$) に発現減少しているプローブを t 検定により抽出した。22,277 プローブのうち、672 プローブを *ERK1/2* 遺伝子シグネチャーとして同定した。

ヒストグラム作成において、*ERK1/2* 遺伝子シグネチャーに属するプローブのシグナル値のログ比、属さないプローブのシグナル値のログ比をプロットした。プロットの分布の差がシグネチャーに属する遺伝子発現の差を示す。計算には R (<http://www.r-project.org/>)を用いた。

5.2.4 細胞増殖阻害アッセイ

前章に示した。

5.2.5 ウェスタンブロット解析

前章に示した。

5.3 結果

5.3.1 *FGFR1* 遺伝子増幅癌における FGFR 阻害剤による MAPK 経路阻害

まず、FGFR 阻害剤が抑制するパスウェイを同定するために、1 μ M の CH5183284/Debio 1347 (FGFR 阻害剤)、AZD4547 (FGFR 阻害剤)、CH4987655 (MEK 阻害剤)もしくは CH5132799 (PI3K 阻害剤)を、*FGFR1* 遺伝子増幅を持つ肺癌細胞株 NCI-H1581 に添加し、24 時間後に RNA を回収しマイクロアレイ解析を行った。DMSO を添加した細胞の発現レベルをコントロールに、各化合物添加条件下の各プローブの発現レベルのログ比を計算し、ヒートマップとして表した。また、発現変化の似ているプローブのクラスタリングを行った。全体像として FGFR 阻害剤による発現変化は、PI3K 阻害剤による発現変化よりも MEK 阻害剤による発現変化に類似していることがわかった (図 40A)。より具体的には、CH5183284/Debio 1347 添加により変化したプローブ数は 2,850 個であったが、そのうち、AZD4547、CH4987655 もしくは CH5132799 添加でも共通してシグナル値が変化したプローブを抽出したところ、それぞれ 2,273 個、1,675 個、158 個であった。

それぞれの化合物添加による発現変化が MAPK 経路阻害によるものかどうかを確認するため、*ERK1/2* シグネチャーを用いて発現変化解析を行った。ヒートマップ作成時に用いたログ比を、X 軸はログ比、Y 軸は頻度を表すヒストグラムにプロットし、*ERK1/2* シグネチャーに属する遺伝子は青色、それ以外の遺伝子は赤色で示した。その結果、MEK 阻害剤 CH4987655 添加の場合に *ERK1/2* シグネチャーに属する遺伝子群が良く変化しており、PI3K 阻害剤 CH5132799 添加の場合はほとんど変化していなかったことから、このシグネチャー解析が妥当であることが確認され、CH5183284/Debio 1347 もしくは AZD4547 添加の場合にも *ERK1/2* シグネチャーに属する遺伝子群が良く変化していることから、*FGFR1* 遺伝子増幅を持つ肺癌細胞において、FGFR 阻害剤は主に ERK シグナルを制御していることが確認された (図 40B)。

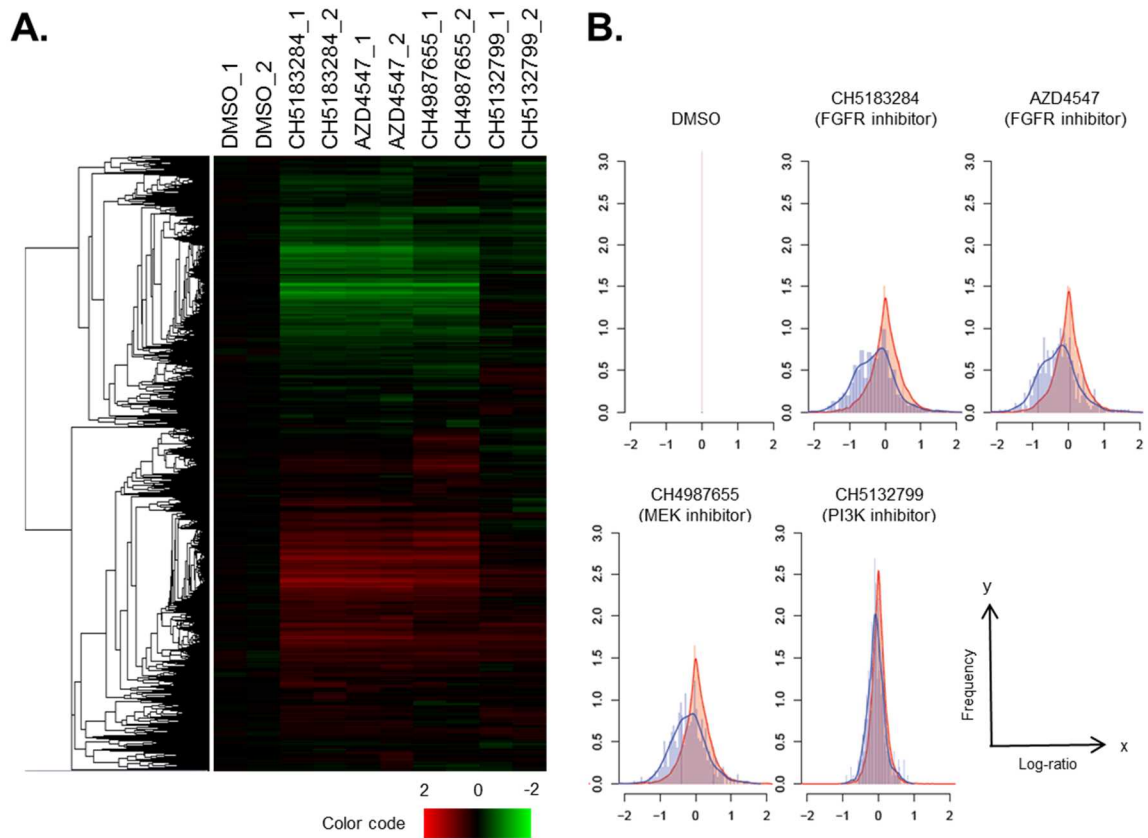


図 40 NCI-H1581 細胞における各パスウェイ阻害剤による遺伝子発現変化

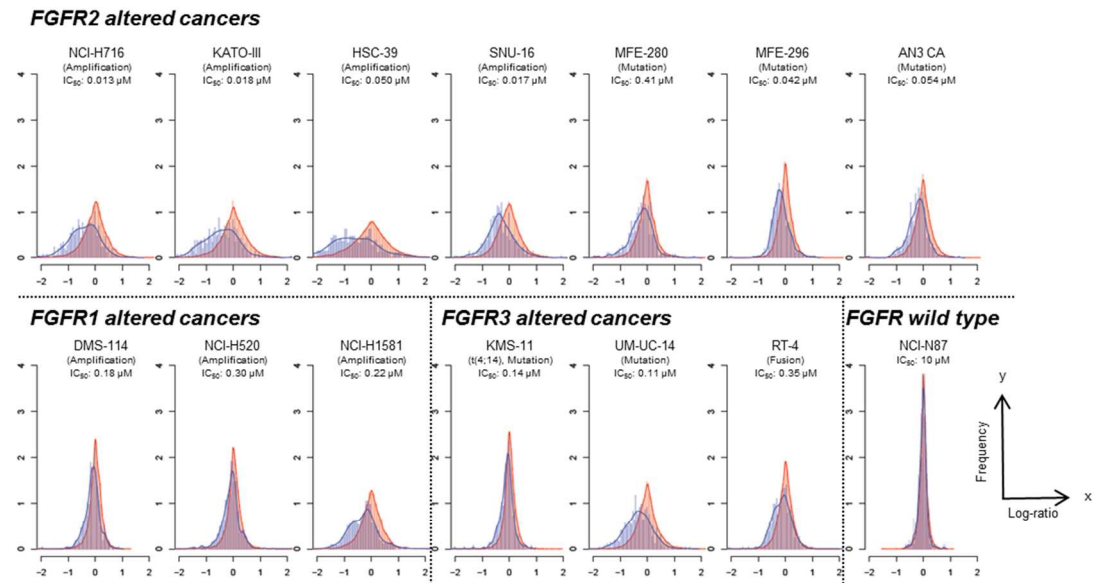
(A) 1 μ M の CH5183284/Debio 1347、AZD4547 (FGFR 阻害剤)、CH4987655 (MEK 阻害剤)、もしくは CH5132799 (PI3K 阻害剤)を、*FGFR1* 遺伝子増幅を持つ肺癌細胞株 NCI-H1581 に添加し、24 時間後に RNA を回収しマイクロアレイ解析をした (n=2)。DMSO を添加した細胞の発現レベルをコントロールに、各プローブの発現レベルのログ比を計算し、ヒートマップとして表した。また、発現変化の似ているプローブのクラスタリングを行った。(B) (A)で得たログ比をヒストグラムにプロットした。X 軸はログ比、Y 軸は頻度を表す。*ERK1/2* シグネチャーに属する遺伝子は青色、それ以外の遺伝子は赤色で示した。

5.3.2 FGFR 阻害剤の効果と ERK シグナル阻害との相関

FGFR 阻害剤による ERK シグナル抑制をより一般化するため、*FGFR* 遺伝子異常を持ち、かつ、CH5183284/Debio 1347 に感受性を示す癌細胞株を 13 種類用いて図 40B と同様の解析を行った。*FGFR1* 遺伝子異常を持つ癌細胞株として DMS-114、NCI-H520 と NCI-H1581 細胞を用い、*FGFR2* 遺伝子異常を持つ癌細胞株として NCI-H716、KATO-III、HSC-39、SNU-16、MFE-280、MFE-296 と AN3 CA 細胞を用い、*FGFR3* 遺伝子異常を持つ癌細胞株として KMS-11、UM-UC-14 と RT-4 細胞を用いた。陰性対象として、*FGFR* 遺伝子異常を持たず、*HER2* 遺伝子増幅を持つ NCI-N87 細胞を用いた。1 μ M の CH5183284/Debio 1347 を、各細胞に添加し、24 時間後に RNA を回収しマイクロアレイ解析をした。DMSO を添加した細胞の発現レベルをコントロールに、化合物添加条件下の各プローブの発現レベルのログ比を計算し、X 軸はログ比、Y 軸は頻度を表すヒストグラムにプロットし、*ERK1/2* シグネチャーに属する遺伝子は青色、それ以外の遺伝子は赤色で示した。その結果、CH5183284/Debio 1347 に感受性を示す 13 株すべてにおいて *ERK1/2* シグネチャーが抑制されていることがわかった。一方で、CH5183284/Debio 1347 に感受性を示さない NCI-N87 細胞においてはその変化はなかった (図 41A)。

シグネチャー解析と一致し、CH5183284/Debio 1347 添加により *FGFR* 遺伝子異常を持つ細胞 7 株中 7 株において ERK のリン酸化が抑制されることがわかった。一方で、AKT のリン酸化阻害は 4 株でのみ起こっていた (図 41B)。これらのことから、*FGFR* 遺伝子異常を持つ癌は MAPK 経路に依存して増殖をしており、ERK シグナル阻害の有無が FGFR 阻害による薬効と相関することが示唆された。

A.



B.

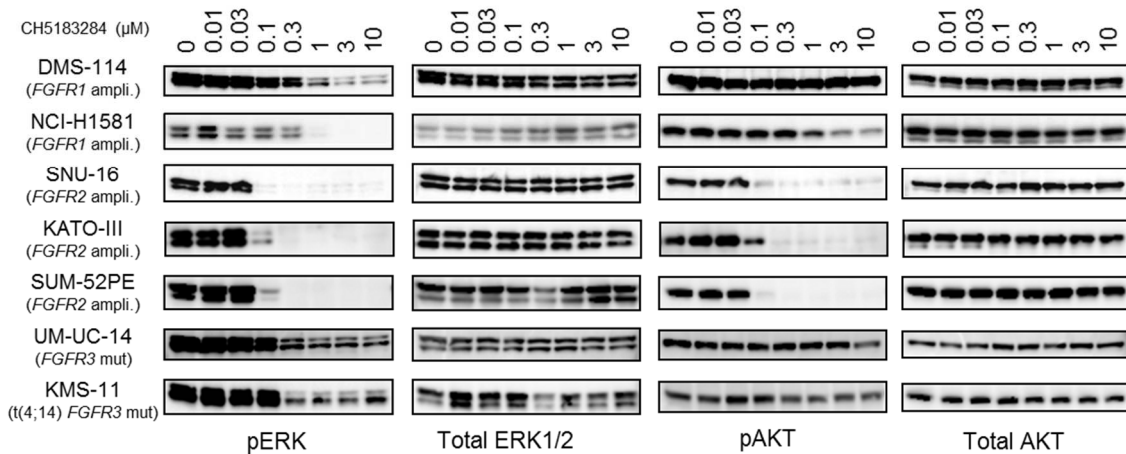


図 41 様々な *FGFR* 遺伝子異常を持つ癌細胞における ERK シグナル変化

1 μ M の CH5183284/Debio 1347 を、DMS-114、NCI-H520、NCI-H1581、NCI-H716、KATO-III、HSC-39、SNU-16、MFE-280、MFE-296、AN3 CA、KMS-11、UM-UC-14、RT-4 もしくは NCI-N87 細胞に添加し、24 時間後に RNA を回収しマイクロアレイ解析をした (n=2)。DMSO を添加した細胞の発現レベルをコントロールに、各プローブの発現レベルのログ比を計算し、ヒストグラムにプロットした。X 軸はログ比、Y 軸は頻度を表す。*ERK1/2* シグネチャーに属する遺伝子は青色、それ以外の遺伝子は赤色で示した。また、各細胞株に対する CH5183284/Debio 1347 の細胞増殖阻害活性 (IC_{50}) を示した。

5.3.3 FGFR 阻害剤の効果と DUSP6 発現変化との相関

次に、MAPK 経路に関与する遺伝子の中で FGFR 阻害剤の効果をもよく予測する遺伝子の探索を行った。まず、これまでに用いてきた *ERK* シグネチャーに属する 672 遺伝子の中から、CH5183284/Debio 1347 処理により、最も大きく、最も統計学的に有意に変化する遺伝子の抽出を試みた。図 41 で用いたマイクロアレイデータから *ERK* シグネチャーに属する 672 遺伝子を抽出し、DMSO 処理と CH5183284/Debio 1347 処理とで発現比を計算した。発現変化の比を FGFR 遺伝子異常を持つ全 13 細胞で平均化し、Log₂ 変換した。DMSO 処理時の各プローブのシグナル値と化合物処理後のシグナル値を全細胞でそれぞれ平均化し、t test により二群比較の p 値を算出し、Log₁₀ 変換した。それぞれの値をボルケーノプロットとしてプロットした (図 42A)。X 軸は、比を Log₂ 変換した値、Y 軸は、p 値を Log₁₀ 変換した値を示した。赤で示したプローブは、p 値が 0.05 より小さく、でシグナル値の変化が 2 倍よりも大きいプローブ群である。その結果、47 遺伝子 (51 プローブ) が上記の評価基準を満たして抽出された (表 9)。その中で、最も大きな発現変化を示したのが *DUSP6* であった。各細胞のデータを詳細に見ると、*FGFR* 遺伝子異常を持ち、FGFR 阻害剤に感受性のある 13 株中 13 株において *DUSP6* の発現変化が評価基準を満たしていることがわかった (図 42B)。このような変化を示した遺伝子は他には同定できなかった。*DUSP6* とは、*ERK* のリン酸化部位を脱リン酸化するフォスファターゼで、MAPK 経路の活性を抑制する分子である (図 43) (85)。その発現レベルは MAPK 経路の活性で制御されることから、MAPK 経路の活性が高いと発現が上昇し、活性が低いと発現が抑制されることが知られている。つまり、FGFR 阻害剤を処理すると MAPK 経路の活性が低くなり、*DUSP6* 発現は抑制されると考えられる。次に、タンパク質レベルでも *DUSP6* の発現が抑制されているかを検証した。*FGFR* 遺伝子異常を持つ FGFR 阻害剤感受性株として NCI-H1581 (*FGFR1* 遺伝子増幅)、DMS-114 (*FGFR1* 遺伝子増幅)、AN3 CA (*FGFR2* 遺伝子変異)、SNU-16 (*FGFR2* 遺伝子増幅) と KMS-11 (*FGFR3* 遺伝子転座、変異) 細胞を、*FGFR* 遺伝子異常を持つが FGFR 阻害剤非感受性な株として ZR-75-1 (*FGFR1* 遺伝子増幅) 細胞、*FGFR* 遺伝

子異常を持たず FGFR 阻害剤非感受性な株として NCI-N87 と HCT116 細胞を用いた。3 μM の FGFR 阻害剤 PD173074 もしくは 1 μM の MEK 阻害剤 PD0325901 を各癌細胞株に 24 時間処理し、細胞タンパク質を回収、ウェスタンブロット法で解析した。FGFR 阻害剤 PD173074 は既出の AZD4547 や NVP-BGJ398 と似た構造を持つ化合物である。全ての細胞株において、MEK 阻害剤 PD0325901 が ERK のリン酸化に伴った DUSP6 タンパク発現を抑制する条件において、FGFR 阻害剤 PD173074 は、*FGFR* 遺伝子異常を持つ FGFR 阻害剤感受性株においてのみ DUSP6 のタンパク発現を抑制した。マイクロアレイデータと一致して、*FGFR* 遺伝子異常を持たない細胞においては何も反応を示さなかった。面白いことに、*FGFR1* 遺伝子増幅を持つ FGFR 阻害剤に感受性を示さない ZR-75-1 細胞においても DUSP6 発現抑制は確認されなかった (図 44A)。最後に、*in vivo* の腫瘍中においても同様の現象が起こるか検証した。FGFR 阻害剤感受性モデルとして SNU-16 (*FGFR2* 遺伝子増幅)と DMS-114 (*FGFR1* 遺伝子増幅)を、FGFR 阻害剤非感受性モデルとして *FGFR* 遺伝子異常を持たない NCI-N87 と MKN-45 を用いた。各癌細胞を移植されたマウスゼノグラフトモデルに 100 mg/kg の CH5183284/Debio 1347 を投与し、4 時間後に腫瘍組織を回収、タンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法で解析した。その結果、*in vitro* での結果と同様に、FGFR 阻害剤感受性株においてのみ ERK のリン酸化抑制と DUSP6 タンパク発現抑制が確認された (図 44B)。これらの結果から、*FGFR* 遺伝子異常を持つ癌治療において、DUSP6 の発現レベルの変化をモニターすることが治療効果を最もよく予測する可能性が示唆された。

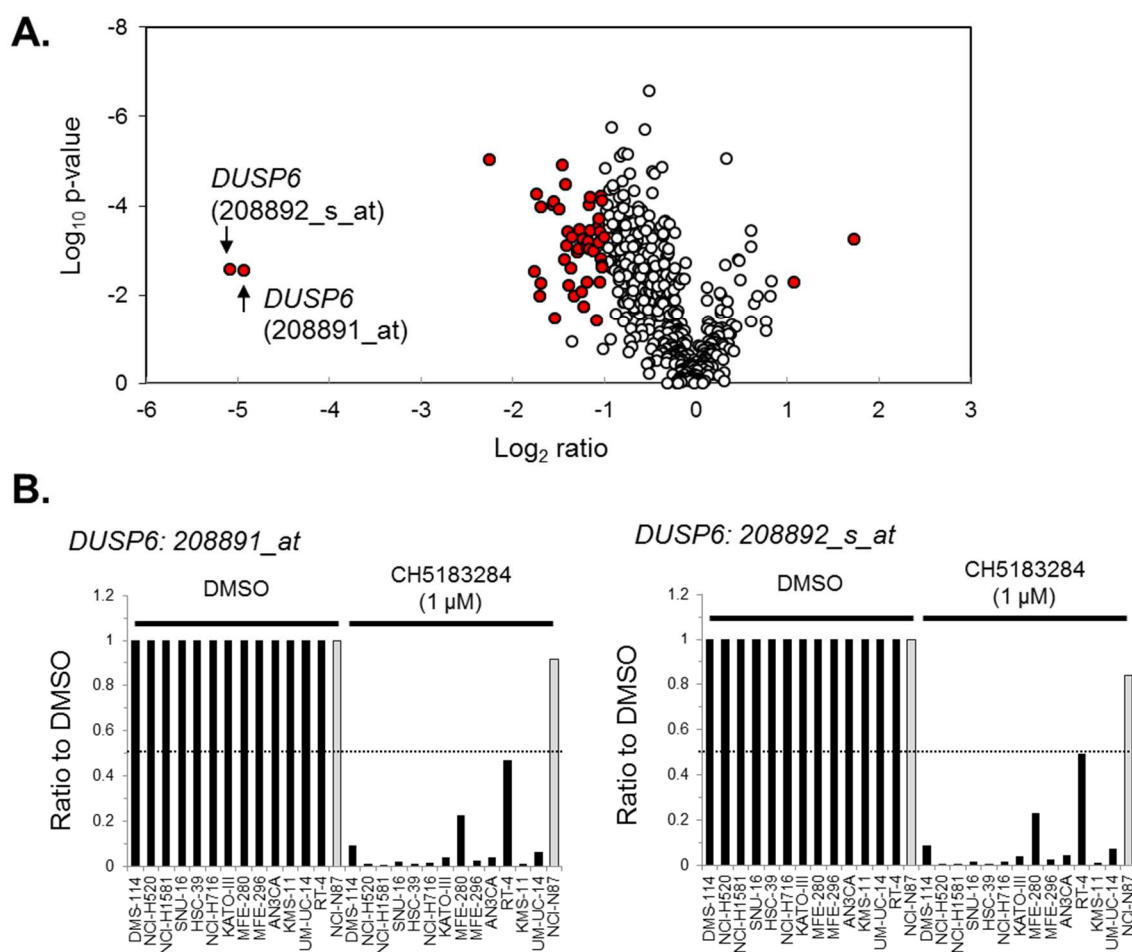


図 42 *FGFR* 阻害剤による *DUSP6* mRNA 発現変化

(A) *ERK* シグネチャーに属する全遺伝子のシグナル変化をボルケーノプロットで示した。図 24 で用いたマイクロアレイデータから *ERK* シグネチャーに属する遺伝子を抽出し、DMSO 処理時に対する発現比を計算した。発現変化の比を *FGFR* 遺伝子異常を持つ全 13 細胞で平均化し、 Log_2 変換した。DMSO 処理時の各プローブのシグナル値と化合物処理後のシグナル値を全細胞でそれぞれ平均化し、t test により二群比較の p 値を算出し、 Log_{10} 変換した。X 軸は、比を Log_2 変換した値、Y 軸は、p 値を Log_{10} 変換した値を示した。赤で示したプローブは、p 値が 0.05 より小さく、シグナル値の変化が 2 倍よりも大きいプローブ群である。(B) 14 細胞株における、*DUSP6* の発現変化。*DUSP6* を認識する 2 種類のプローブのデータを示した。黒棒は *FGFR* 遺伝子異常を持つ細胞株、白棒は *FGFR* 遺伝子異常を持たない細胞株。

表 9 CH5183284/Debio 1347 処理により有意に発現変化したプローブリスト

PROBE_ID	SYMBOL	Log2 ratio	Log10 p-value
215728_s_at	ACOT7	-1.04	-2.83
220223_at	ATAD5	-1.06	-3.71
202769_at	CCNG2	1.72	-3.26
204695_at	CDC25A	-1.56	-4.02
203968_s_at	CDC6	-1.74	-4.27
218726_at	DKFZp762E1312	-1.04	-4.21
218585_s_at	DTL	-1.49	-3.93
208892_s_at	DUSP6	-5.08	-2.58
208891_at	DUSP6	-4.94	-2.56
218488_at	EIF2B3	-1.15	-3.44
204768_s_at	FEN1	-1.55	-4.10
204767_s_at	FEN1	-1.42	-4.49
203023_at	HSPC111	-1.35	-3.31
201631_s_at	IER3	-1.33	-1.98
209100_at	IFRD2	-1.40	-3.44
218305_at	IPO4	-1.05	-2.30
203882_at	ISGF3G	1.07	-2.30
36711_at	MAFF	-1.70	-1.98
220651_s_at	MCM10	-2.25	-5.04
202107_s_at	MCM2	-1.12	-3.00
201555_at	MCM3	-1.06	-3.56
216237_s_at	MCM5	-1.16	-4.04
210983_s_at	MCM7	-1.29	-2.97
208795_s_at	MCM7	-1.27	-3.46
212789_at	NCAPD3	-1.03	-4.21
212949_at	NCAPH	-1.46	-4.92
219031_s_at	NIP7	-1.02	-2.63
218889_at	NOC3L	-1.05	-3.43
201695_s_at	NP	-1.08	-1.44
219105_x_at	ORC6L	-1.15	-4.18
201014_s_at	PAICS	-1.02	-4.13
219148_at	PBK	-1.03	-2.69
217996_at	PHLDA1	-1.39	-2.22
209803_s_at	PHLDA2	-1.54	-1.47
203622_s_at	PNO1	-1.19	-3.15
205909_at	POLE2	-1.36	-2.61
206653_at	POLR3G	-1.23	-1.74
218866_s_at	POLR3K	-1.29	-3.04
1053_at	RFC2	-1.17	-3.04
204128_s_at	RFC3	-1.43	-2.81
204127_at	RFC3	-1.17	-3.21
201890_at	RRM2	-1.69	-3.99
219037_at	RRP15	-1.00	-3.30
219493_at	SHCBP1	-1.24	-3.26
201920_at	SLC20A1	-1.19	-3.05
221020_s_at	SLC25A32	-1.06	-3.19
219911_s_at	SLCO4A1	-1.77	-2.53
218145_at	TRIB3	-1.69	-2.26
204033_at	TRIP13	-1.41	-3.12
213334_x_at	UCHL5IP	-1.19	-2.30
209825_s_at	UCK2	-1.25	-2.08

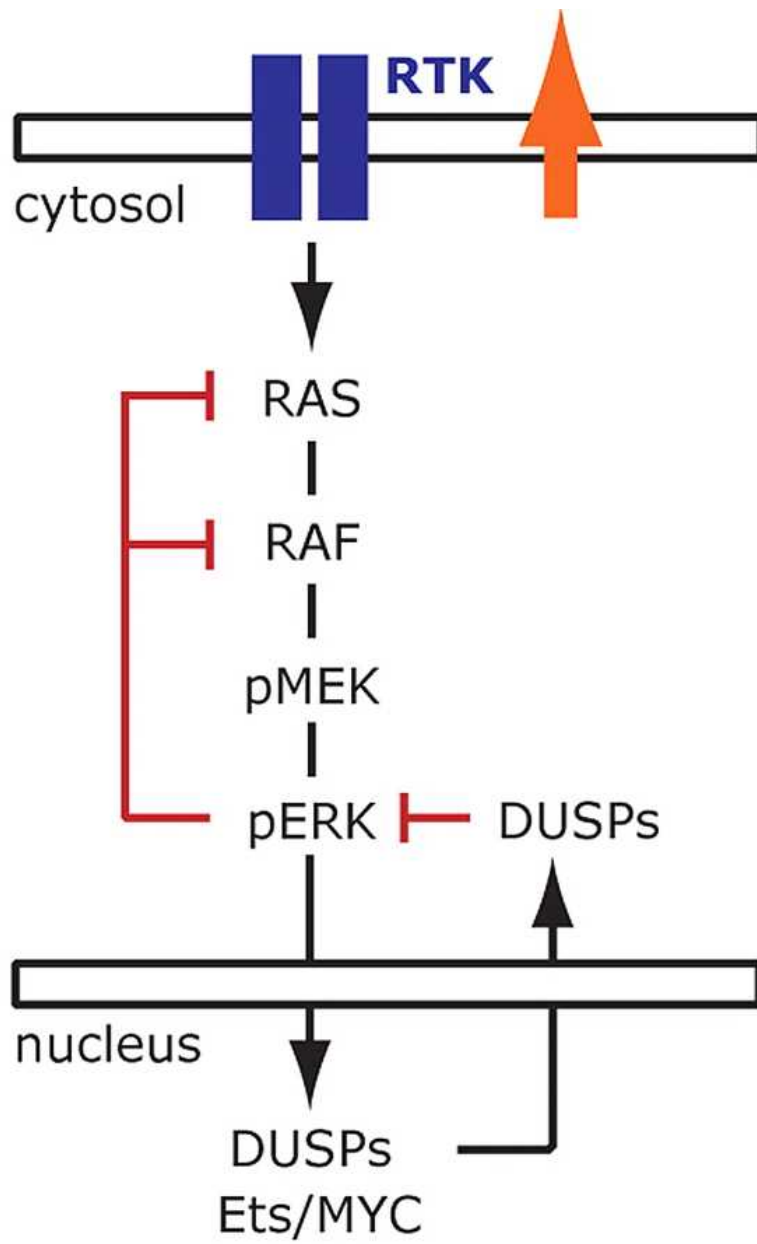


図 43 MAPK 経路と DUSP の関係

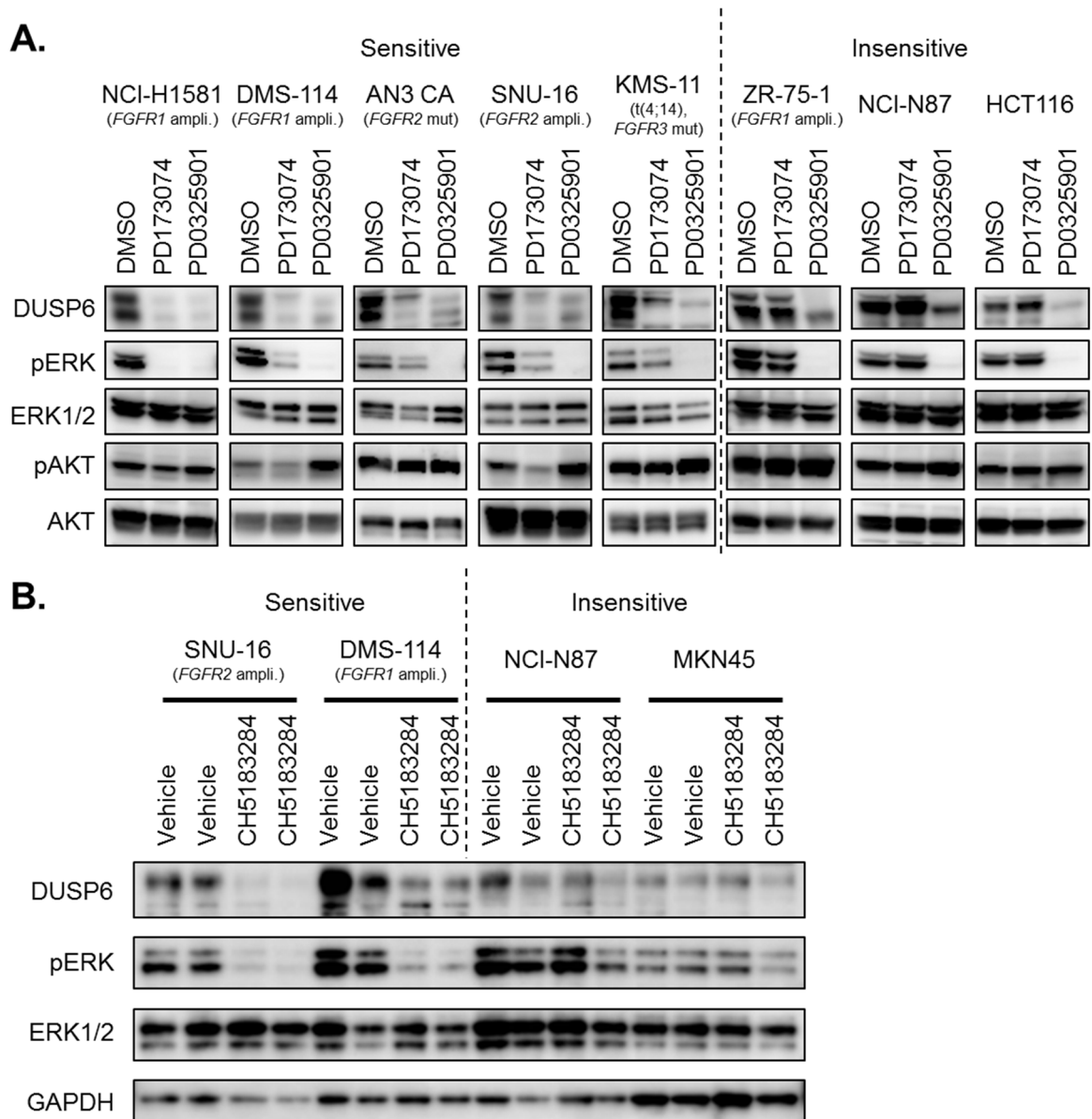


図 44 FGFR 阻害剤による DUSP6 タンパク発現変化

(A) リン酸化 ERK 阻害と DUSP6 タンパク発現抑制。3 μ M の FGFR 阻害剤 PD173074 もしくは 1 μ M の MEK 阻害剤 PD0325901 を各癌細胞株に 24 時間処理し、タンパク質を回収、ウェスタンブロット法で解析した。(B) *In vivo* ゼノグラフトマウスモデルにおけるリン酸化 ERK 阻害と DUSP6 タンパク質発現抑制。各癌細胞を移植されたマウスゼノグラフトモデルに 100 mg/kg の CH5183284/Debio 1347 を投与し、4 時間後に腫瘍組織を回収、タンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法で解析した。Ampli: 遺伝子増幅、Mut: 遺伝子変異

5.4.4 フィードバック活性化を伴わない MAPK 経路阻害活性の重要性

これまでの結果より単純に考えると、MAPK 経路を阻害するためには MEK 阻害剤のような薬剤を用いればよいと考えられるかもしれないが、FGFR 阻害剤で MAPK 経路を抑制することの意義を検証するため、まず *FGFR* 遺伝異常を持ち FGFR 阻害剤に感受性を示す細胞株を用いて、各 MEK 阻害剤に対する感受性を測定した。MEK 阻害剤は、CH4987655、CH5126766 と Selumtinib を用い、陽性対象の細胞株として、*BRAF* 変異を持つ黒色腫細胞 SK-MEL-1、NF1 変異を持つ黒色腫細胞 MeWo、*KRAS* 変異を持つ大腸癌細胞 HCT-116 細胞を用いた。これらの MEK 阻害剤感受性株と比較して *FGFR* 遺伝子異常を持つ細胞株がどれくらいの強い感受性を示すかを検証した。その結果、図 44 で示したように、MEK 阻害剤はリン酸化 ERK と DUSP6 タンパク発現を抑制するにもかかわらず、使用した全ての癌細胞株において、陽性対象と比較して MEK 阻害剤への感受性が低いことがわかった (図 45)。どの MEK 阻害剤でもその傾向は変わらなかった。

次に、MEK 阻害剤が薬効を示さないメカニズムを探るため、FGFR 阻害剤 CH5183284/Debio 1347、RAF-MEK 阻害剤 CH5126766、PI3K 阻害剤 CH5132799 を用いて細胞内のシグナル変化を調べた。これらの化合物を、単剤もしくは併用で *FGFR2* 遺伝子増幅を持つ胃癌細胞株 SNU-16 に添加し、24 時間後にシグナル解析を行った。これまで確認されている通り、CH5183284/Debio 1347 添加により、FGFR、ERK と AKT などのリン酸化が抑制され、DUSP6 タンパク発現も抑制された。一方で、CH5126766 添加においては、リン酸化 ERK と DUSP6 タンパク発現抑制が起こっていると同時に、FGFR、MET や EGFR といった受容体型チロシンキナーゼのリン酸化が上昇していること、それらの下流の AKT、SRC や STAT3 のリン酸化も上昇していることが確認された (図 46)。一方で、PI3K 阻害剤添加によって同様の現象は起きなかった。MEK 阻害剤添加によるリン酸化の上昇は、CH5183284/Debio 1347 を同時に添加すると起こらないことから、*FGFR2* を介したフィードバック活性化であることが示唆された。また、MEK 阻害剤添加時と FGFR 阻害剤添加時とで、リン酸化 ERK の抑制程度と

MAPK 経路の下流因子である DUSP6 や Cyclin D1 の発現抑制の程度とを比較すると、FGFR 阻害剤添加時の方が、リン酸化 ERK の阻害程度が弱いところから下流因子である DUSP6 や Cyclin D1 の発現を抑制していた。これらのことから、*FGFR* 遺伝子異常を持つ癌を治療する目的において、フィードバック活性化を伴わずに MAPK 経路を阻害し薬効を発揮するためには MEK 阻害剤ではなく、FGFR 阻害剤が有効であることが示唆された。

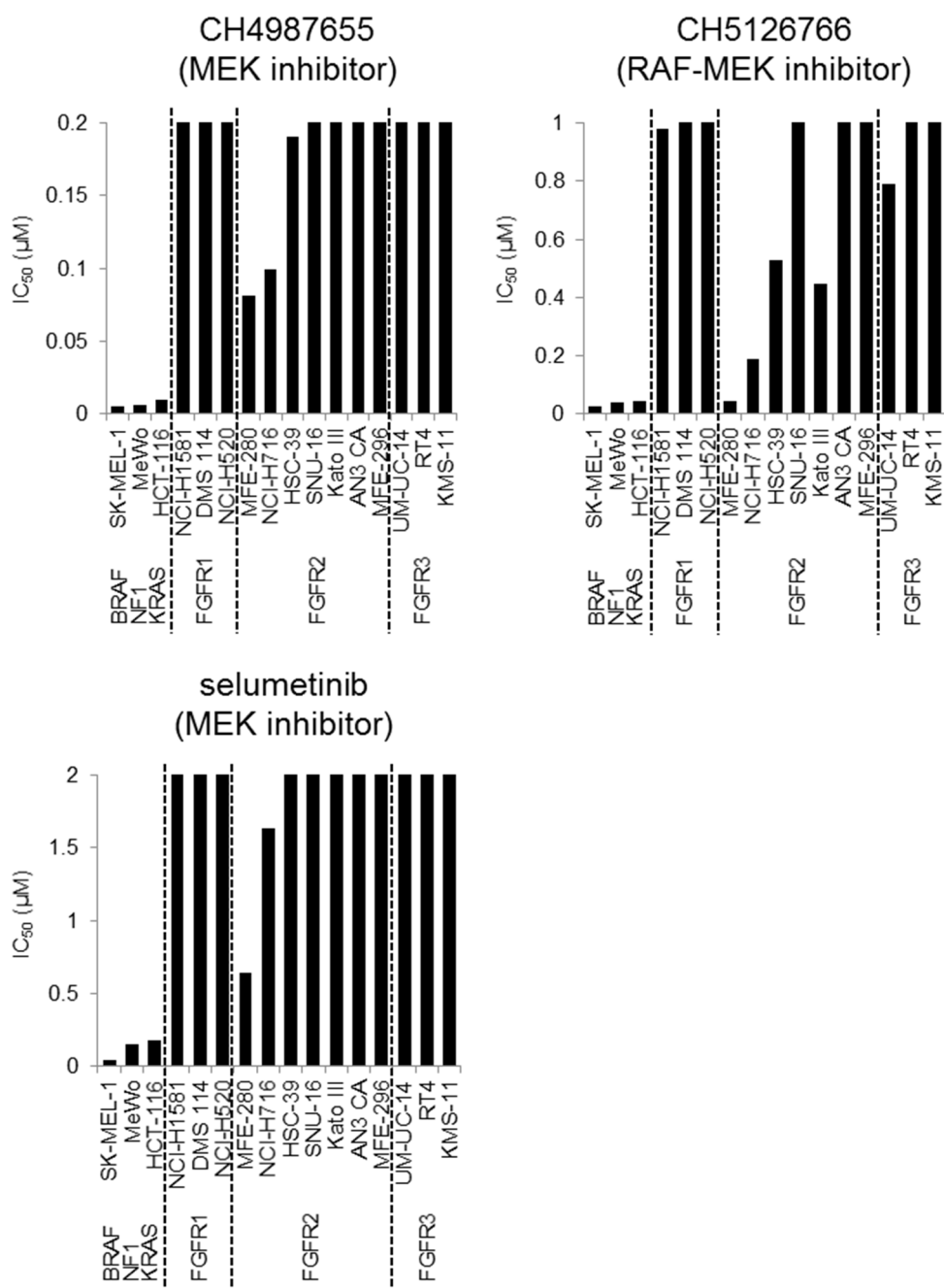


図 45 *FGFR* 遺伝子異常を持つ細胞株の MEK 阻害剤に対する感受性

各種細胞を 96 ウェルプレートに播種し、化合物添加後インキュベーションした。4 日後、WST-8 kit を用いて生存細胞数を測定し、IC₅₀ 値を算出した。CH4987655 (MEK 阻害剤)、CH5126766 (RAF-MEK 阻害剤)、selumetinib (MEK 阻害剤)を用いた。

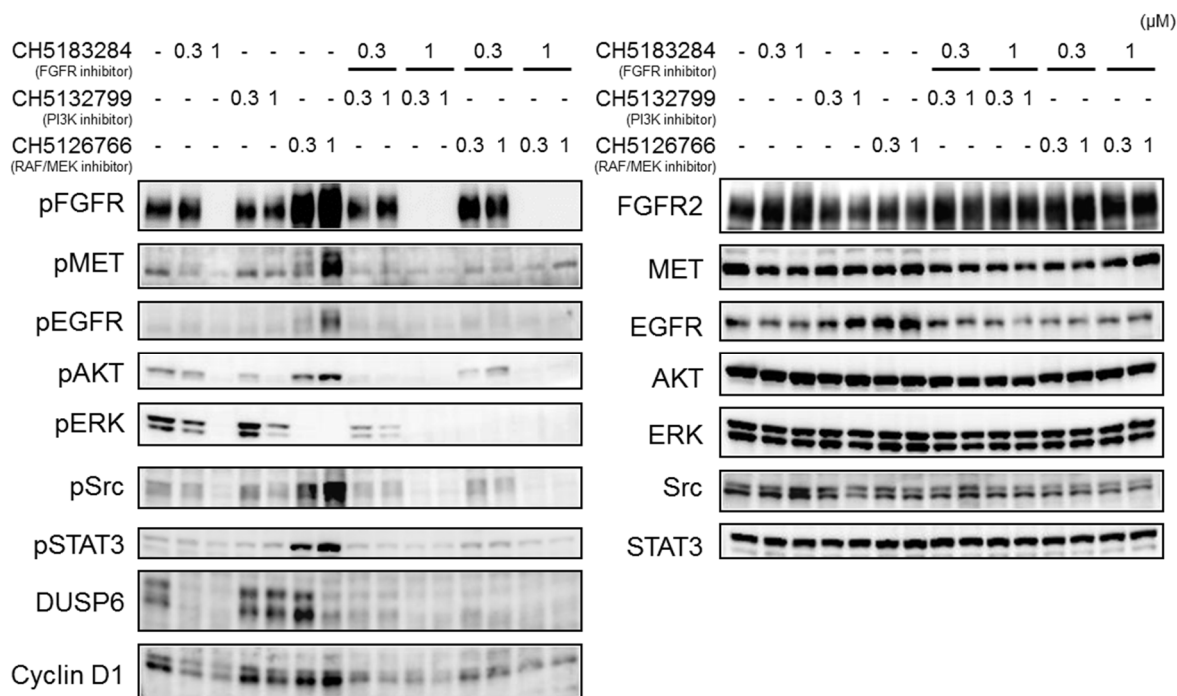


図 46 *FGFR2* 遺伝子増幅細胞での MEK 阻害剤によるシグナル変化

CH5183284/Debio 1347、CH5132799 (PI3K 阻害剤)、CH5126766 (RAF-MEK 阻害剤)もしくはそれらのうち二剤を、*FGFR2* 遺伝子増幅を持つ SNU-16 に添加し、24 時間後にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法で解析した。化合物濃度は 0.3 もしくは 1 μM とした。

5.4 考察と小括

癌細胞がどのシグナル経路に依存して増殖しているかを理解することは、併用治療を考えるうえでも、耐性を克服する治療を考えるうえでも非常に重要である。例えばホルモン治療耐性乳癌の場合、PI3K-AKT 経路が活性化し、下流因子である S6K というキナーゼがエストロゲン受容体を活性化してホルモン治療耐性を示している可能性が示唆されている(86)。この場合、ホルモン治療（エストロゲン受容体阻害剤）と PI3K-AKT 経路阻害剤との併用治療が効果を発揮する可能性が考えられ、実際に臨床で目覚ましい効果を示している(87)。本章では、FGFR が依存しているシグナル経路の探索を行った結果、主に MAPK 経路に依存している可能性が示唆された。このことは、膀胱癌や子宮体癌において、FGFR の活性化変異と RAS の活性化変異が相互排他的に発生していることや(21, 88)、逆に、FGFR 阻害剤の耐性メカニズムの一つとして KRAS 変異が報告されていることから支持される(11)。つまりこれらの癌においては、MAPK 経路の活性化が癌の悪性化に重要で、FGFR もしくは RAS に活性化変異が入ることで MAPK 経路が活性化を獲得していると考えられる。しかし面白いことに、FGFR 遺伝子異常を持つ癌は MAPK 経路阻害剤である MEK 阻害剤では治療できないことが示された。同様のことは、HER2 遺伝子異常を持つ癌でも報告されている(89)。HER2 は PI3K-AKT 経路を活性化して癌の悪性化に寄与しているにもかかわらず、PI3K 阻害剤を処理すると逆に HER2 を活性化してしまい、癌を治療することができなかった。このような癌において、HER2 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用治療がより強い抗腫瘍効果を発揮することが示されている。これらのことから考えると、FGFR 遺伝子異常を持つ癌において、FGFR 阻害剤とその下流因子の阻害剤である MEK 阻害剤の併用治療が、より強い抗腫瘍効果を発揮することも期待され得る。

DUSP6 は、本章で、FGFR 遺伝子異常を持つ癌に FGFR 阻害剤を処理した場合に発現が変化する遺伝子として見出され、その発現変化は FGFR 阻害剤の効果と相関することが示された。

DUSP6 は、プロテインフォスファターゼファミリーのうちの 1 つで、例えば ERK のリン酸化を認識し、脱リン酸化することで ERK の活性を抑制することが知られている。また、RAS や

BRAF の活性化に伴い発現上昇し、上記のメカニズムで抑制的フィードバックとして MAPK 経路の活性を抑制することが知られている(90-94)。したがって、MAPK 経路の活性化の程度は DUSP6 の発現の程度で予測することができると考えられる。また、マウスの胚において、FGF リガンド由来の MAPK 経路の活性化を DUSP6 が抑制していることが報告されているし、*DUSP6* に機能欠損変異が導入されたマウスは、誕生直後の致死、低身長症、冠状頭蓋骨癒合症や耳が聞こえないなどの症状を持つことが報告されている(95, 96)。これらの症状は、生まれながらにして遺伝的に FGFR に活性型変異を持つアペール症候群やクルーゾン症候群などの患者の症状と非常によく似ている。これらのことから DUSP6 と FGFR は深く関係しており、DUSP6 は FGFR 阻害活性をモニターする最も良いマーカーであると考えられる。

臨床試験において、薬剤によるシグナル阻害の程度をいかに測定するかは、薬の開発スピードを上げる観点からも重要であると考えられている(97, 98)。一般的には、免疫染色法を用い、標的キナーゼの下流タンパク質のリン酸化阻害が評価されているが(99, 100)、リン酸化タンパク質は不安定で、測定サンプル調製中にリン酸化が分解し、測定が難しくなることが問題視されている(101)。したがって、薬剤によるシグナル阻害程度を正確に知るためには、リン酸化測定以外の方法でも同時に評価する必要がある。例えば、非浸潤的な方法の代表例として、血液中の癌細胞由来の DNA を測定するという方法が最近注目されつつある(102)。例えば *EGFR* 活性型変異を持つ肺癌において、*EGFR* 阻害剤による治療が奏功している期間は、*EGFR* 活性型変異 DNA 量が血中から少なくなり、その DNA 量が増えてくると、のちに *EGFR* 阻害剤抵抗性であることが判明するということが報告されている(103, 104)。FGFR 阻害剤の場合は、様々な種類の *FGFR* 遺伝子異常を持つ癌の治療に使われる可能性があるため、1つの変異を同定するような方法ではなく、どの *FGFR* 遺伝子異常においても共通して変化する事象を捉える必要があり、DUSP6 の発現量の検出はその問題点を克服する可能性があると考えられる。例えば、癌組織中の DUSP6 の測定はリン酸化の測定ではないので結果が安定することが期待され、癌組織以外でも、血中を滞留している癌細胞中の mRNA 測定や、癌細胞から分泌されるエクソソーム中の

mRNA 測定など、これまでにない方法で FGFR 阻害剤の効果をモニターすることができるようになると考えられる。

まとめると、*FGFR* 遺伝子異常を持つ癌は MAPK 経路に依存して悪性化していることが示唆され、FGFR 阻害剤による ERK シグナル阻害の有無はその薬効を予測することが示された。その ERK シグナルの中で、最も変化が大きく、最も効果予測精度が高かった遺伝子として *DUSP6* を同定し、*DUSP6* は FGFR 阻害剤の効果がモニターできる新しい遺伝子として期待される。

第6章 総括

本研究では、*FGFR* の遺伝子点変異、遺伝子増幅もしくは遺伝子転座により活性化した癌を治療するために *FGFR* 選択的な低分子阻害剤を創製し（第3章）、新たな *FGFR* 選択的阻害剤の治療対象患者探索のために新規 *FGFR* 遺伝子転座を同定・解析し（第4章）、そして *FGFR* 阻害剤の薬効発揮をより高い精度で予測するため、*FGFR* のシグナル解析を行った（第5章）。

第3章では、*FGFR* の活性化が悪性化の原因となっている癌を治療することを目的とし、*FGFR* 選択的な低分子阻害剤、CH5183284/Debio 1347 を創製した。本化合物は、*in vitro* の酵素阻害試験において *FGFR1*、*FGFR2* 及び *FGFR3* を選択的に阻害することが示された。選択性が得られた原因を検証するため *FGFR1* と CH5183284/Debio 1347 の複合体の結晶構造解析を行い、CH5183284/Debio 1347 の持つベンズイミダゾール部位が特徴的な役割をしていることが示唆された。また、*in vitro* 及び *in vivo* において、*FGFR1*、*FGFR2* 及び *FGFR3* 遺伝子の増幅、変異、転座を有する癌に対して高い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。さらに、既存 *FGFR* 阻害剤に耐性を示す変異を持つ癌に対しても効果を示すことがわかった。したがって、CH5183284/Debio 1347 は、*FGFR1*、*FGFR2* 及び *FGFR3* 遺伝子に異常を有する癌患者に対して新たな治療機会を提供することが期待される。

次に第4章では、CH5183284/Debio 1347 の新しい治療対象患者を見出すため、新規の *FGFR* 活性化機構を探索し、その機能評価を行った。これまで癌細胞株でのみ見つかった *FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子が一部の肺癌、膀胱癌患者において初めて発見され、*FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子を過剰発現するラット正常細胞は非常に強い腫瘍形成能を持つことが分かった。また、CH5183284/Debio 1347 が *FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子により形成された腫瘍の増殖を抑えることも示された。シグナル解析を行うと、*FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子発現により MAPK 経路とその下流の転写因子が活性化するとともに、p53 や RB などのがん抑制遺伝子の活性が抑えられていることが分かった。また、*FGFR3-BAIAP2L1* 融合キナーゼの活性化

は BAR ドメインを介した恒常的な FGFR3 の二量体化によるものであるということが示された。したがって、恒常的に活性化している *FGFR3-BAIAP2L1* 融合遺伝子を持つ癌患者は、CH5183284/Debio 1347 により高い効果を得られることが期待される。

最後に第 5 章では、CH5183284/Debio 1347 投与による薬効発揮をより高い精度で予測するため、FGFR のシグナル解析を行った。マイクロアレイを用い、CH5183284/Debio 1347 を *FGFR* 遺伝子変異保有癌細胞株に添加することにより発現変化する遺伝子を抽出したところ、MAPK 経路関連遺伝子が多く変化していることが分かった。一方で、FGFR の下流経路として良く知られている PI3K-AKT 経路に一貫した変化はなかった。MAPK 経路関連遺伝子の中でも特に強く応答している遺伝子として *DUSP6* が抽出され、CH5183284/Debio 1347 投与による *DUSP6* の発現減少は CH5183284/Debio 1347 の抗腫瘍効果と一致することが示された。一方で、MAPK 経路阻害剤は *FGFR* 遺伝子変異保有癌細胞株には効果を示さなかった。それは、FGFR 以外の経路が活性化することにより MAPK 経路阻害の効果を打ち消していることが原因である可能性が示唆された。つまり、*FGFR* 遺伝子変異癌における *DUSP6* 遺伝子の発現変化は FGFR 阻害剤特有の効果予測マーカーであることが示唆された。

本研究で新規に創製された FGFR 選択的阻害剤 CH5183284/Debio 1347 は、*DUSP6* のようなマーカーで効果をモニタリングしながら、*FGFR* 遺伝子に異常を有する癌患者を治療することで、最大限の効果を発揮し、癌患者の生存延長と健康に貢献することが期待される。

第 7 章 引用文献

1. 厚生労働省. 平成 26 年我が国の人口動態 - 厚生労働省. 2015.
2. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(2):123-32.
3. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figier A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(15):1960-6.
4. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(3):239-46.
5. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;359(17):1757-65.
6. Turner N, and Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(2):116-29.
7. Eswarakumar VP, Lax I, and Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(2):139-49.
8. Wang Y, and Becker D. Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nature medicine*. 1997;3(8):887-93.
9. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519-25.
10. Elbauomy Elsheikh S, Green AR, Lambros MB, Turner NC, Grainge MJ, Powe D, Ellis IO, and Reis-Filho JS. FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis. *Breast Cancer Res*. 2007;9(2):R23.
11. Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, Natrajan R, Marchio C, Iorns E, Mackay A, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy

- resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer research*. 2010;70(5):2085-94.
12. Weiss J, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, Heuckmann JM, Ullrich RT, Menon R, Maier S, Soltermann A, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Science translational medicine*. 2010;2(62):62ra93.
 13. Goke F, Bode M, Franzen A, Kirsten R, Goltz D, Goke A, Sharma R, Boehm D, Vogel W, Wagner P, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 amplification is a common event in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2013;26(10):1298-306.
 14. von Loga K, Kohlhaussen J, Burkhardt L, Simon R, Steurer S, Burdak-Rothkamm S, Jacobsen F, Sauter G, and Krech T. FGFR1 Amplification Is Often Homogeneous and Strongly Linked to the Squamous Cell Carcinoma Subtype in Esophageal Carcinoma. *PloS one*. 2015;10(11):e0141867.
 15. Macdonald D, Reiter A, and Cross NC. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1. *Acta haematologica*. 2002;107(2):101-7.
 16. Singh D, Chan JM, Zoppoli P, Niola F, Sullivan R, Castano A, Liu EM, Reichel J, Porrati P, Pellegatta S, et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science*. 2012;337(6099):1231-5.
 17. Wesche J, Haglund K, and Haugsten EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *The Biochemical journal*. 2011;437(2):199-213.
 18. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, et al. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *British journal of cancer*. 2012;106(4):727-32.
 19. Deng N, Goh LK, Wang H, Das K, Tao J, Tan IB, Zhang S, Lee M, Wu J, Lim KH, et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut*. 2012;61(5):673-84.
 20. Turner N, Lambros MB, Horlings HM, Pearson A, Sharpe R, Natrajan R, Geyer FC, van Kouwenhove M, Kreike B, Mackay A, et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene*. 2010;29(14):2013-23.
 21. Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, Mallon MA, Keenan JB, Powell MA, Goodfellow PJ, and Pollock PM. Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial

- cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation. *Cancer research*. 2008;68(17):6902-7.
22. Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, Mohammadi M, Futreal PA, Stratton MR, Trent JM, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene*. 2007;26(50):7158-62.
 23. Su X, Zhan P, Gavine PR, Morgan S, Womack C, Ni X, Shen D, Bang YJ, Im SA, Ho Kim W, et al. FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study. *British journal of cancer*. 2014;110(4):967-75.
 24. Inokuchi M, Fujimori Y, Otsuki S, Sato Y, Nakagawa M, and Kojima K. Therapeutic targeting of fibroblast growth factor receptors in gastric cancer. *Gastroenterology research and practice*. 2015;2015(796380).
 25. Yu K, Herr AB, Waksman G, and Ornitz DM. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(26):14536-41.
 26. Liao RG, Jung J, Tchaicha J, Wilkerson MD, Sivachenko A, Beauchamp EM, Liu Q, Pugh TJ, Pedamallu CS, Hayes DN, et al. Inhibitor-sensitive FGFR2 and FGFR3 mutations in lung squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2013;73(16):5195-205.
 27. Heney NM. Natural history of superficial bladder cancer. Prognostic features and long-term disease course. *The Urologic clinics of North America*. 1992;19(3):429-33.
 28. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thierry JP, and Radvanyi F. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nature genetics*. 1999;23(1):18-20.
 29. Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, and Knowles MA. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *The Journal of pathology*. 2007;213(1):91-8.
 30. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003;101(11):4569-75.
 31. Williams SV, Hurst CD, and Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Human molecular genetics*. 2013;22(4):795-803.
 32. Nakanishi Y, Akiyama N, Tsukaguchi T, Fujii T, Satoh Y, Ishii N, and Aoki M. Mechanism of Oncogenic Signal Activation by the Novel Fusion Kinase FGFR3-BAIAP2L1. *Molecular cancer therapeutics*. 2015;14(3):704-12.

33. Wu YM, Su F, Kalyana-Sundaram S, Khazanov N, Ateeq B, Cao X, Lonigro RJ, Vats P, Wang R, Lin SF, et al. Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer discovery*. 2013;3(6):636-47.
34. Hadari Y, and Schlessinger J. FGFR3-targeted mAb therapy for bladder cancer and multiple myeloma. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(5):1077-9.
35. di Martino E, L'Hote CG, Kennedy W, Tomlinson DC, and Knowles MA. Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signaling and cellular transformation in a cell type- and mutation-specific manner. *Oncogene*. 2009;28(48):4306-16.
36. van Rhijn BW, van Tilborg AA, Lurkin I, Bonaventure J, de Vries A, Thiery JP, van der Kwast TH, Zwarthoff EC, and Radvanyi F. Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. *European journal of human genetics : EJHG*. 2002;10(12):819-24.
37. Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, Tsuchihara K, Matsumoto S, Yoh K, and Goto K. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Translational lung cancer research*. 2015;4(2):156-64.
38. Trudel S, Li ZH, Wei E, Wiesmann M, Chang H, Chen C, Reece D, Heise C, and Stewart AK. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood*. 2005;105(7):2941-8.
39. Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, Smith NR, James NH, Dukes M, Curwen JO, et al. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Cancer research*. 2005;65(10):4389-400.
40. Bello E, Colella G, Scarlato V, Oliva P, Berndt A, Valbusa G, Serra SC, D'Incalci M, Cavalletti E, Giavazzi R, et al. E-3810 is a potent dual inhibitor of VEGFR and FGFR that exerts antitumor activity in multiple preclinical models. *Cancer research*. 2011;71(4):1396-405.
41. Gavine PR, Mooney L, Kilgour E, Thomas AP, Al-Kadhimi K, Beck S, Rooney C, Coleman T, Baker D, Mellor MJ, et al. AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer research*. 2012;72(8):2045-56.
42. Guagnano V, Furet P, Spanka C, Bordas V, Le Douget M, Stamm C, Brueggen J, Jensen MR, Schnell C, Schmid H, et al. Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *Journal of medicinal chemistry*. 2011;54(20):7066-83.

43. Nakanishi Y, Akiyama N, Tsukaguchi T, Fujii T, Sakata K, Sase H, Isobe T, Morikami K, Shindoh H, Mio T, et al. The fibroblast growth factor receptor genetic status as a potential predictor of the sensitivity to CH5183284/Debio 1347, a novel selective FGFR inhibitor. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(11):2547-58.
44. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(23):2335-42.
45. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, and Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355(24):2542-50.
46. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, and Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;349(5):427-34.
47. Dreves J, Siegert P, Medinger M, Mross K, Strecker R, Zirrgiebel U, Harder J, Blum H, Robertson J, Jurgensmeier JM, et al. Phase I clinical study of AZD2171, an oral vascular endothelial growth factor signaling inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(21):3045-54.
48. Sarker D, Molife R, Evans TR, Hardie M, Marriott C, Butzberger-Zimmerli P, Morrison R, Fox JA, Heise C, Louie S, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of TKI258, an oral, multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(7):2075-81.
49. di Martino E, Tomlinson DC, Williams SV, and Knowles MA. A place for precision medicine in bladder cancer: targeting the FGFRs. *Future oncology*. 2016.
50. Nakanishi Y, Mizuno H, Sase H, Fujii T, Sakata K, Akiyama N, Aoki Y, Aoki M, and Ishii N. ERK Signal Suppression and Sensitivity to CH5183284/Debio 1347, a Selective FGFR Inhibitor. *Molecular cancer therapeutics*. 2015;14(12):2831-9.
51. Tanaka H, Yoshida M, Tanimura H, Fujii T, Sakata K, Tachibana Y, Ohwada J, Ebiike H, Kuramoto S, Morita K, et al. The selective class I PI3K inhibitor CH5132799 targets human cancers harboring oncogenic PIK3CA mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(10):3272-81.

52. Isobe T, Komatsu R, Honda M, Kuramoto S, Shindoh H, and Tabo M. Estimating the clinical risk of hypertension from VEGF signal inhibitors by a non-clinical approach using telemetered rats. *The Journal of toxicological sciences*. 2014;39(2):237-42.
53. Pargellis C, Tong L, Churchill L, Cirillo PF, Gilmore T, Graham AG, Grob PM, Hickey ER, Moss N, Pav S, et al. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nature structural biology*. 2002;9(4):268-72.
54. Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, Eliseenkova AV, Green D, Schlessinger J, and Hubbard SR. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J*. 1998;17(20):5896-904.
55. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, and Halmos B. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*. 2005;352(8):786-92.
56. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, Cross NC, Linkesch W, Druker BJ, Hehlmann R, et al. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science*. 2001;293(5538):2163.
57. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *The New England journal of medicine*. 2010;363(18):1734-9.
58. Janne PA, Yang JC, Kim DW, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, Ahn MJ, Kim SW, Su WC, Horn L, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;372(18):1689-99.
59. Norman RA, Schott AK, Andrews DM, Breed J, Foote KM, Garner AP, Ogg D, Orme JP, Pink JH, Roberts K, et al. Protein-ligand crystal structures can guide the design of selective inhibitors of the FGFR tyrosine kinase. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(11):5003-12.
60. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-3.
61. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2001;344(14):1031-7.
62. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-6.

63. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, Riely GJ, Cetnar J, West H, Camidge DR, Socinski MA, Chiappori A, Mekhail T, et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(2):234-42.
64. Bocharov EV, Lesovoy DM, Goncharuk SA, Goncharuk MV, Hristova K, and Arseniev AS. Structure of FGFR3 transmembrane domain dimer: implications for signaling and human pathologies. *Structure*. 2013;21(11):2087-93.
65. Parker BC, Annala MJ, Cogdell DE, Granberg KJ, Sun Y, Ji P, Li X, Gumin J, Zheng H, Hu L, et al. The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(2):855-65.
66. Li B, and Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*. 2011;12(323).
67. Shaw AT, Hsu PP, Awad MM, and Engelman JA. Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(11):772-87.
68. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, and Getz G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505(7484):495-501.
69. Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, Oikawa N, Tsukuda T, Ishii N, and Aoki Y. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer cell*. 2011;19(5):679-90.
70. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, and Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88(5):593-602.
71. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, and Peepers DS. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720-4.
72. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436(7051):642.
73. Byron SA, Chen H, Wortmann A, Loch D, Gartside MG, Dehkoda F, Blais SP, Neubert TA, Mohammadi M, and Pollock PM. The N550K/H mutations in FGFR2 confer differential resistance to PD173074, dovitinib, and ponatinib ATP-competitive inhibitors. *Neoplasia*. 2013;15(8):975-88.
74. Chell V, Balmanno K, Little AS, Wilson M, Andrews S, Blockley L, Hampson M, Gavine PR, and Cook SJ. Tumour cell responses to new fibroblast growth factor receptor tyrosine

- kinase inhibitors and identification of a gatekeeper mutation in FGFR3 as a mechanism of acquired resistance. *Oncogene*. 2013;32(25):3059-70.
75. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, Herrmann R, Lynch KP, and Hughes TP. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*. 2002;99(9):3472-5.
 76. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, and Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS medicine*. 2005;2(3):e73.
 77. Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, Shi H, Atefi M, Titz B, Gabay MT, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011;480(7377):387-90.
 78. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, Hatton C, Chopra R, Oberholzer PA, Karpova MB, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20411-6.
 79. Isshiki Y, Kohchi Y, Iikura H, Matsubara Y, Asoh K, Murata T, Kohchi M, Mizuguchi E, Tsujii S, Hattori K, et al. Design and synthesis of novel allosteric MEK inhibitor CH4987655 as an orally available anticancer agent. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011;21(6):1795-801.
 80. Ishii N, Harada N, Joseph EW, Ohara K, Miura T, Sakamoto H, Matsuda Y, Tomii Y, Tachibana-Kondo Y, Iikura H, et al. Enhanced inhibition of ERK signaling by a novel allosteric MEK inhibitor, CH5126766, that suppresses feedback reactivation of RAF activity. *Cancer research*. 2013;73(13):4050-60.
 81. Ohwada J, Ebiike H, Kawada H, Tsukazaki M, Nakamura M, Miyazaki T, Morikami K, Yoshinari K, Yoshida M, Kondoh O, et al. Discovery and biological activity of a novel class I PI3K inhibitor, CH5132799. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011;21(6):1767-72.
 82. Mizuno H, Nakanishi Y, Ishii N, Sarai A, and Kitada K. A signature-based method for indexing cell cycle phase distribution from microarray profiles. *BMC genomics*. 2009;10(137).
 83. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*. 2004;20(17):3246-8.

84. Dumesic PA, Scholl FA, Barragan DI, and Khavari PA. Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *The Journal of cell biology*. 2009;185(3):409-22.
85. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, and Rosen N. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4519-24.
86. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC, Brodt ZN, Murphy CJ, and Holz MK. S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem*. 2009;284(10):6361-9.
87. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(6):520-9.
88. Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, van Rhijn BW, van der Kwast TH, and Zwarthoff EC. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One*. 2010;5(11):e13821.
89. Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJ, Ibrahim YH, Chandarlapaty S, Markman B, Rodriguez O, Guzman M, Rodriguez S, et al. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene*. 2011;30(22):2547-57.
90. Warmka JK, Mauro LJ, and Wattenberg EV. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 is a tumor promoter target in initiated cells that express oncogenic Ras. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33085-92.
91. Croonquist PA, Linden MA, Zhao F, and Van Ness BG. Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells. *Blood*. 2003;102(7):2581-92.
92. Bloethner S, Chen B, Hemminki K, Muller-Berghaus J, Ugurel S, Schadendorf D, and Kumar R. Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis*. 2005;26(7):1224-32.
93. Furukawa T, Fujisaki R, Yoshida Y, Kanai N, Sunamura M, Abe T, Takeda K, Matsuno S, and Horii A. Distinct progression pathways involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol*. 2005;18(8):1034-42.
94. Ramnarain DB, Park S, Lee DY, Hatanpaa KJ, Scoggin SO, Otu H, Libermann TA, Raisanen JM, Ashfaq R, Wong ET, et al. Differential gene expression analysis reveals

- generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res.* 2006;66(2):867-74.
95. Li C, Scott DA, Hatch E, Tian X, and Mansour SL. Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development.* 2007;134(1):167-76.
96. Dickinson RJ, Eblaghie MC, Keyse SM, and Morriss-Kay GM. Expression of the ERK-specific MAP kinase phosphatase PYST1/MKP3 in mouse embryos during morphogenesis and early organogenesis. *Mech Dev.* 2002;113(2):193-6.
97. Ang JE, Kaye S, and Banerji U. Tissue-based approaches to study pharmacodynamic endpoints in early phase oncology clinical trials. *Current drug targets.* 2012;13(12):1525-34.
98. Neal JW, Gainor JF, and Shaw AT. Developing biomarker-specific end points in lung cancer clinical trials. *Nature reviews Clinical oncology.* 2014.
99. Felip E, Rojo F, Reck M, Heller A, Klughammer B, Sala G, Cedres S, Peralta S, Maacke H, Foernzler D, et al. A phase II pharmacodynamic study of erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2008;14(12):3867-74.
100. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(9):809-19.
101. Pinhel IF, Macneill FA, Hills MJ, Salter J, Detre S, A'Hern R, Nerurkar A, Osin P, Smith IE, and Dowsett M. Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R76.
102. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BG, Hicks RJ, Hampton GM, Amler LC, Pirzkall A, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res.* 2012;18(8):2391-401.
103. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, Inserra E, Diederichs S, Iafrate AJ, Bell DW, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med.* 2008;359(4):366-77.
104. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DW, Kaper F, Dawson SJ, Piskorz AM, Jimenez-Linan M, Bentley D, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012;4(136):136ra68.

第 8 章 謝辞

本論文の執筆及び研究発表にあたり、大変お忙しい中丁寧なご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻酵素学研究室教授、伏信進矢先生に心より感謝申し上げます。

本論文の共同研究者であり、本研究の研究方針に対して様々なご指導、ご助言、ご議論をいただきました中外製薬株式会社の青木裕子博士、青木雅弘博士、石井暢也博士、海老池啓達博士、三尾俊之博士、高直樹博士に心より感謝申し上げます。また、本研究の実験面で様々な援助をいただきました、水野英明博士、森上賢治博士、佐瀬仁志博士、進藤英俊博士、坂田清明氏、藤井俊彦氏、塚口俊之氏、秋山貫則氏、佐藤靖子氏、立花由佳子氏、磯部剛仁氏に心より感謝申し上げます。

本研究にあたり、中外製薬株式会社研究所の先輩後輩同期、FGFR 阻害剤プロジェクトチームメンバー、多くの皆様にご協力とご支援をいただき、心より感謝申し上げます。

最後に、学位取得に際し、支えてくれた家族に深く感謝いたします。