

子宮内膜癌及び前癌病変における FGFR2IIIc の役割の解明 と新規治療及び予防を標的とした有効性の研究

日本医科大学 病理学講座（統御機構・腫瘍学）

助教 彭 為霞

（共同研究者）

日本医科大学 病理学講座（統御機構・腫瘍学）教授 内藤 善哉

日本医科大学 病理学講座（統御機構・腫瘍学）准教授 石渡 俊行

日本医科大学 病理学講座（統御機構・腫瘍学）講師 松田 陽子

日本医科大学 病理学講座（統御機構・腫瘍学）助教 山本 哲志

はじめに

子宮内膜癌は生活習慣の欧米化に伴い急増しており、エストロゲン依存型の type I とエストロゲン非依存型の type II に分類されている。Type I の子宮内膜癌の組織型は主に類内膜腺癌で、子宮内膜癌の 86%程度を占めている。また、正常内膜→増殖症→異型増殖症→ type I 子宮内膜癌といった前癌病変の過程を経て発癌することが明らかとなっている。類内膜腺癌は、分化の度合いによって、3 段階（Grade1～3）に細分類される⁽¹⁾。類内膜腺癌における Grade 分類は予後に関係し、Grade3 は Grade1 に比して、明らかに予後不良である⁽²⁾。

線維芽細胞増殖因子受容体（fibroblast growth factor receptor/FGFR）は、FGFR1 から FGFR4 までの 4 種類が存在し、その内、FGFR2 の SNPs が乳癌、子宮内膜癌の発癌リスクと強く関連していることが報告された⁽³⁻⁶⁾。FGFR2 には、細胞外ドメインの選択的スプライシングにより IIIb と IIIc アイソフォームが存在し、IIIb は主に上皮細胞に、IIIc は間質細胞に局在すると報告されている⁽³⁾。これまでに我々は、FGFR2IIIb が類内膜腺癌の 70%で発現し、細胞増殖経路である MAPK 経路の活性化に関与することを報告した⁽⁷⁾。しかし、子宮内膜癌における FGFR2IIIc の役割については報告がなく、未だ不明な点が多い。本研究では、免疫組織化学染色法を用い、類内膜腺癌における FGFR2IIIc の発現と局在性を検討し、発癌過程における FGFR2IIIc の役割を解明し、さらに、FGFR2IIIc を標的とした新規治療法の有効性を検討することを目的とする。

材料と方法

2004 から 2006 年まで日本医科大学付属病院にて切除された、ホルマリン固定パラフィン包埋された 32 例の子宮類内膜腺癌の手術症例を対象として、検討した（表 1）。患者年齢は 32-84 歳、中間年齢 57 歳であった。病期分類は FIGO（International Federation of gynecology and obstetrics）stage 分類を用いた。

各症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本から 3.5 μ m の切片を作成し、免疫組織化学染色を施

行した。一次抗体としては、抗 FGFR2IIIc ポリクローナル抗体（1:200）を使用した。免疫組織化学染色の結果評価については、3 人の病理医が染色の範囲及び染色の強度について、それぞれ評価した。染色範囲に対しては、3 人のうち 2 人以上が、陽性細胞は全体の 50%以上を占めると判断する場合、score2 とし、それ以外の場合は score1 とした。染色強度に対しては、3 人のうち 2 人が、染色強度中等度以上と判断する場合、score2（図 1）とし、それ以外の場合は score1（図 2）とした。Total score は、染色範囲 score × 染色強度 score という計算式で算出し、Total score が 4 以上の症例は FGFR2IIIc 高発現群、それ以外の症例は FGFR2IIIc 低発現群と二群に分類し、各群における年齢、組織分化度、病期との関連性の有無について比較した。なお、今回の実験は、2008 年ヘルシンキ宣言の基準に従った。

次に、ヒト子宮内膜癌培養細胞株 ECC-1, Ishikawa 細胞を用いて、real-time PCR, western blot を行い、FGFR2IIIc の mRNA, タンパク質の発現を確認した。

統計処理

2 群間における臨床病理学因子の統計学的差異について、Fisher's exact test 法を用い検討した。有意基準は、 $p < 0.05$ とした。

結 果

対象症例 32 例の中、FGFR2IIIc 高発現（high expression）を示す症例は 12 例（37.5%）であった。そのうち、1) Grade1 9 例、Grade2 もしくは Grade3 3 例、2) 57 歳未満 5 例、57 歳以上 7 例、3) FIGO StageI 8 例、StageII 以上 4 例であった（表 2）。FGFR2IIIc 蛋白高発現群と低発現群における年齢、組織学分化度、病期を比較した結果、FGFR2IIIc 蛋白発現の高低は、患者年齢、病期分類と有意な相関は見られなかったが、FGFR2IIIc 蛋白の過剰発現は、高い分化度（Grade1）を示す類内膜腺

表 1

Clinicopathological features		Cases
Age (year)	<57	15
	≥57	17
FIGO (Stsge)	Ia	4
	Ib	10
	Ic	9
	II	3
Grade	III	6
	1	14
	2	12
	3	6

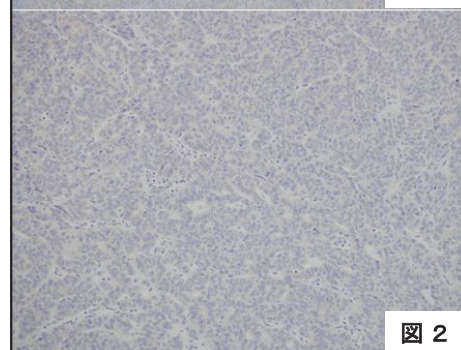
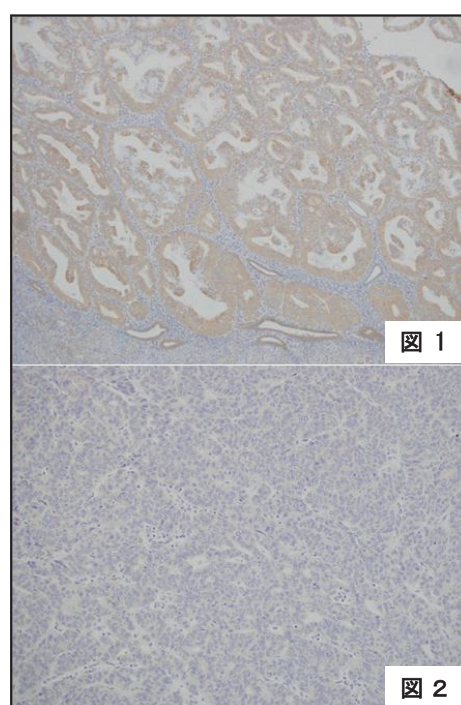


表 2

FGFR2IIIc expression	Grade *		Age		Stage (FIGO)	
	1	2 or 3	<57	≥57	I	More than I
High (n=12)	9	3	5	7	8	4
Low (n=20)	5	15	10	10	15	5
* P<0.05						

癌に有意に見られた ($P=0.011$)。また、症例数は少なく、有意な結果を得られなかったが、一部類内膜腺癌組織の近傍に見られた異型増殖症においても FGFR2IIIc 蛋白の過剰発現も認めた (data not shown)。正常子宮内膜においては、FGFR2IIIc は全例に陽性を認めたが、いずれも軽度であった。

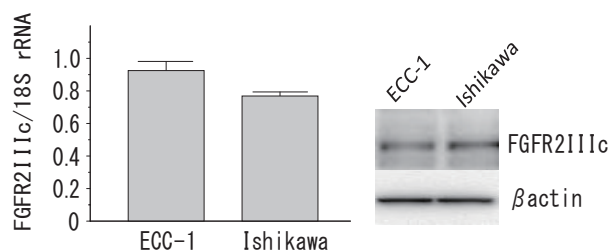


図3. 子宮内膜癌細胞における FGFR2IIIc の発現

次に、ヒト子宮内膜癌培養細胞 ECC-1、Ishikawa を用いて、FGFR2IIIc の発現レベルを real-time PCR, western blot にて確認したところ、いずれの細胞株においても FGFR2IIIc の発現が認められた (図3)。現在、FGFR2IIIc に対するヒト型モノクローナル抗体を作成し、FGFR2IIIc 抗体投与による抗腫瘍効果を in vitro, in vivo にて、解明を行っている。

考 察

類内膜腺癌の発癌は、正常内膜→増殖症→異型増殖症→ type I 類内膜癌を経て発生することが知られており、この癌化過程ではミスマッチ修復機構の破綻及び癌抑制遺伝子 PTEN の不活化が主な原因とされているが、その他には、K-ras, β -catenin, p53 など複数の遺伝子異常が多段階かつ複合的に関与していることが知られている。特に、PTEN や K-ras は前癌病変である子宮内膜増殖症においても、それぞれ 80% と 5-20% 程度高率に認められ、類内膜腺癌発癌における早期変化とされている⁽⁸⁻¹²⁾。これまでこの癌化段階に関連する遺伝子異常はいくつか同定されているが、創薬標的として有望なものは開発されていない。

これまでに我々は、FGFR2IIIb が type I 子宮内膜癌の約 70% で発現する重要な受容体であり、細胞増殖経路である MAPK 経路の活性化に関与することを明らかにした⁽⁷⁾。しかし、子宮内膜癌における FGFR2IIIc の役割については、これまでのところ報告がなく、未だ不明な点が多い。

前立腺癌において、FGFR2IIIc の発現は腫瘍の進行に相関するとの報告があるが、子宮内膜癌では検討されていない^(13,14)。そこで今回、われわれは、32 例の類内膜腺癌組織中での FGFR2IIIc の局在について検討をおこなった。その結果、正常子宮内膜においては、FGFR2IIIc は全例に陽性を認めたが、いずれも軽度の発現であった。しかし、異型増殖症や、Grade1 類内膜腺癌においては、FGFR2IIIc の発現は著明に増加しており、類内膜腺癌の Grade1 に比し、Grade2, 3 と分化度の低下した癌では、FGFR2IIIc の発現量は有意に減少していくことを明らかにした。以上の結果より、FGFR2IIIc の発現は正常粘膜→前癌病変→子宮内膜癌への発癌進行に重要な役割を担っていると推測できる。さらに、FGFR2IIIc の発現異常は K-ras や PTEN の異常とともに、癌化過程において早期の変化である可能性が考えられる。

さらに、最近、FGFR2 の遺伝子変異は K-ras の遺伝子変異と共存することではなく、PTEN 遺伝子の変異と同時に見られるとの報告がされている。また、PTEN が不活化された細胞においても、FGFR2 ショートヘアピン RNA (shRNA) を用いて FGFR2 をノックダウンすると、細胞周期が停止し細胞死が誘導されることも明らかにされている⁽¹⁵⁾。従って、我々は、子宮内膜癌の発癌過程において、FGFR2IIIc が、FGFR2IIIb と同様に MAPK 経路の活性化に関与し、正常子宮内膜→子宮内膜増殖症、子宮内膜増殖症→

子宮内膜癌への発癌を促進する重要な因子と考えている。また、AKT 経路にも関与し、PTEN の下流に作用し、アポトーシスの誘導を抑制する可能性についても推定している。

FGFR2 は類内膜腺癌の 16% で活性化変異を認め、さらに変異を持つ細胞は FGFR チロシンキナーゼ阻害薬に対する感受性が、活性化変異を有さない細胞より 10-40 倍も高く、FGFR2 活性化変異を持つ子宮内膜癌では、FGFR2 を阻害する治療が有効である可能性が報告されている⁽¹⁵⁾。今回の検討で我々は、FGFR2IIIc の過剰発現が、Grade1 類内膜腺癌において高率に認めることを明らかにしたが、このことは、免疫組織染色が、FGFR2IIIc を標的とした子宮内膜癌治療の有効症例の選別に役に立つ可能性を示唆している。さらに、FGFR2IIIc の異常発現は類内膜腺癌の発癌過程早期に関与することが考えられ、FGFR2IIIc の発現制御による前癌病変から内膜癌への進行を抑制する予防法の開発に繋がる可能性がある。

文 献

1. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumors.2003,IARC Press,Lyon.
2. Kuwabara Y, Susumu N, Banno K, et al. Clinical characteristics of prognostic factors in poorly differentiated (G3) endometrioid adenocarcinoma in Japan.Jpn J Clin Oncol.2005;35:23-7.
3. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:139-49.
4. Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, et al. Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA.2008;105:8713-7.
5. Katoh Y, Katoh M. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics. Int J Mol Med.2009;23:307-11.
6. Katoh M. Cancer genomics and genetics of FGFR2. Int J Oncol.2008;33:233-7.
7. Ishikawa A, Kudo M, Nakazawa N, et al. Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human endometrial cancer in cooperation with steroid hormones. Int J Oncol.2008;32:565-74.
8. Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, et al. Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. Cancer Res.1993;53:1906-10.
9. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, et al. Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. Cancer Res.1994;54:1604-1607.
10. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, et al. Abnormalities of the APC/ β -catenin pathway in endometrial cancer. Oncogene.2002;21:7981-90.
11. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. J Natl Cancer Inst.2000;92:924-30.
12. Kaku T, Kamura T, Hirakawa T, et al. Endometrial carcinoma associated with hyperplasia-immunohistochemical study of angiogenesis and p53 expression. Gyne Oncol.1999;22:51-5.

13. Oltean S, Sorg BS, Albrecht T, et al. Alternative inclusion of fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIc in Dunning prostate tumors reveals unexpected epithelial mesenchymal plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*.2006;103:14116-21.
14. Yan G, Fukabori Y, McBride G, et al. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF) -FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol*.1993;13:4513-22.
15. Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, et al. Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation. *Cancer Res*. 2008;68:6902-7.