Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks.

Kataoka, Yu

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2014-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6072号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006072

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks.

METとVEGFRsのマルチキナーゼ阻害薬であるForetinib (GSK1363089)はチロシンキナーゼ受容体群を遮断することにより胃癌細胞株の成長を阻害する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腫瘍・血液内科学

（指導教員：南　博信教授）

片岡　優

論文要約

＜緒言＞

胃癌は全世界においてがんによる死因の第二位である。初診または術後に診断される転移性胃癌は既存の治療では治療が困難なほど進行しており、細胞障害性のある抗がん剤を用いた積極的な治療を行ったとしても診断からの平均生存期間は1年未満である。臨床では新しい種類の抗がん剤が必要とされていたが、研究はほとんど実施されてこなかった。

1990年代後半より様々な臨床背景において受容体型チロシンキナーゼ（以下RTKsとする）を標的とする分子標的治療は成功をおさめた。これらの分子標的薬の中でも異常活性化による遺伝子変化をもつRTKsを標的とする薬剤は有効性を示した。トラスツズマブやラパチニブはHER2陽性乳がん細胞においてHER2を、エルロチニブやゲフィチニブは非小細胞肺がんにおいて体細胞変異のある上皮成長因子受容体（以下EGFRとする）、イマチニブとスニチニブは消化管間質腫瘍に対してKITをを標的とすることにより作用を示す。対照的に胃癌細胞では不十分な遺伝子相関研究と治療適応のために、HER2過剰発現腫瘍におけるトラスツズマブを除いて胃癌細胞に有効な分子標的薬の中で臨床治験に進むものは存在しなかった。

胃癌細胞においても繊維芽細胞成長因子受容体2（以下FGFR2とする）やMET, HER2遺伝子などが報告されるようになった。HER2過剰発現は大部分が高分化型のサブタイプで見つかる一方、METやFGFR2の過剰発現は低分化型のサブタイプで頻繁に認められる。最近の第3相試験で転移性胃癌において従来の治療法と比較してトラスツズマブ併用療法の有効性が示されている。このように他のタイプの固形腫瘍においても、RTKを標的とすることで胃がん治療において有用であると考えられる。

フォレチニブは血管内皮成長因子受容体やPDGFR-β、Tie-2、RON、AXLに加えて近年METにも阻害作用があることが報告されたマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害薬である。最近のフォレチニブの第1相試験において腫瘍形成に関与するとされるMETが過剰発現している乳頭腎臓癌発症患者4人のうち2人で有効性が認められた。一方METの過剰発現のない甲状腺髄様癌発症においても有効性が認められる報告もあり、フォレチニブはMETを介さない機構に作用すると考えられる。

本研究の目的はフォレチニブの作用メカニズムを明らかにし、胃がん細胞を使用することにより細胞活性を示すバイオマーカーを同定することである。

＜方法＞

細胞株

MET，FGFR2遺伝子が増幅されている5種の胃がん細胞株KATO-Ⅲ，MKN-1，MKN-7, MKN-45, MKN-74を理研より購入した。FGFR2が過剰発現しているOCUM-2M

は大阪市立大学より提供いただいた。

OCUM-2MはDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cellgro, VA, USA)に、その他の細胞株はRPMI 1640 (Cellgro)に10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin,2 mM glutamineを添加し培養を行った。

全ての細胞株は5%CO_2,37℃条件下で保存し、初期細胞より3か月以内のものを使用した。

薬剤

フォレチニブは Glaxo SmithKline (UK)より提供いただいた。PHA665752, PD173074,とCL-387,785 は Calbiochem (Darmstadt, Germany).より購入した。

薬剤は DMSO にて溶解し-20℃以下で保存し、使用直前に培養液に溶解した。いずれの実験においても DMSO の最終濃度は 0.1%以下である。

ウエスタンブロッティングと抗体

細胞は冷やした PBS にて洗浄し、速やかに剥離後 20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP40, 2 mM EDTAに蛋白分解、リン酸化阻害阻害薬である 100 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1 mM Na3VO4,2μg/ml aprotinin, 5 μg/ml leupetin を加えた溶解液を加えた。溶解液は 14000g で 10 分間遠心分離し、上質液を蛋白抽出液として 7.6%の SDS ゲルを用いて分離した。Phospho-MET (Tyr1234/1235)(D26), phospho-HER2/ErbB (Tyr1221/1222)(6B12), phospho-Akt (Ser473)(D9E), phospho-HER3/ErbB3 (Tyr1289)(21D3), phospho-FGFR (Tyr653/654), phospho-STAT3 (Tyr705)(D3A7)は Cell Signaling Technology (MA, USA)より購入した。Phospho-EGFR (Y1068), phospho-ERK1/2 (pT185/pY187), the FGFR-3 (c-15), ß-actin はそれぞれ Invitrogen (CA, USA), Biosource International (CA, USA), Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), and Sigma- Aldrich (MO, USA)から購入した。

RTK リン酸化分析

70%コンフルの状態で KATO-III と MKN-45 より蛋白抽出を行った。抽出液は同一のメンブレン内で 42 種の異なる RTK のリン酸化レベルを判定できる Human Phospho-RTK Array (R&D Systems, MN, USA)に使用した。分析は添付指示に従って行った。

細胞成長分析

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carbox-ymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)の 490nm の蛍光分析にて測定可能な溶解性の formazan への生物学的還元に基づいた比色分析法である MTS assay (Promega, WI, USA)を用いて成長阻害を評価した。

siRNA 遺伝子導入

48 から 72 時間 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)を用いて遺伝子導入する前に 50-60%コンフルエントの状態で 6 cm plates (Corning)にて 24 時間培養を行った。ヒト HER3 並びに FGFR3 mRNA に対する特異 siRNA は Invitrogen より購入した。作成した細胞を免疫ブロット法や MTS assay を用いて評価した。

＜結果＞

5 種の胃がん細胞はMET , HER2 およびFGFR2が過剰発現していることが証明されている細胞株であり、フォレチニブの細胞抑制効果を確認するために使用した（表1)。MKN-45とKATO-Ⅲがフォレチニブに感受性のあることが示された(IC50 MKN-45 : 8 nM , KATOⅢ: 30 nM) (図1)。フォレチニブは従来MET阻害薬であることが報告されており、同系統のMET阻害薬であるPHA665752を用いて再現性を評価したところMKN-45では感受性が認められたものの(IC50 0.2 nM)、KATOⅢでは感受性が認められなかった(IC50 8 nM)。これよりMKN-45 と KATOⅢではフォレチニブの作用機序が異なることが示唆された。

我々は生化学的なメカニズムを解明するために,これら 2 種のがん細胞に対して 1uM の PHA665752 とフォレチニブ共存下でのシグナルの計測を行った(図 2)。両薬剤とも MET のリン酸化を阻害したが KATOⅢにおいてフォレチニブのみが Akt 、ERK1/2 のリン酸化を抑制した。このことより MKN-45 においてフォレチニブは MET を介して細胞増殖を抑制するが、KATOⅢでは異なる機序で作用することが示唆された。

KATOⅢは FGFR2 を過剰発現していることが報告されており、FGFR 選択阻害剤である PD173074 を用いて成長抑制のメカニズムを検討した。図 1 に示す通り、PD173074 は KATOⅢにおいて MKN45 と比較して顕著に細胞抑制効果があることが示された。また、図 2 に示す通り FGFR の抑制に伴い下流シグナルが抑制されていることから KATOⅢにおいてフォレチニブは FGFR を介して作用を示すことが示唆された。他の FGFR 過剰発現細胞である OCUM-2M を使用したところ FGFR を抑制することにより下流シグナルが抑制されることが証明された（図 3a)。

MET 選択阻害薬である PHA665752 は MKN-45 細胞において FGFR のリン酸化を抑制する一方、FGFR 選択阻害薬である PD173074 は KATOⅢ細胞において MET のリン酸化を抑制し、両細胞株にはそれぞれ鍵となる受容体が存在することが示唆される。

鍵となる受容体を同定するために 42 種の RTK のリン酸化を測定できるキットを用いて検討を行った。KATOⅢでは PD173074 とフォレチニブでは FGFR に対して同様な傾向が認められた（図 4)。加えて両薬剤は PHA665752 が MET のみを抑制するのに対して EGFR , HER3 をも抑制している。これらの結果より、FGFR は KATOⅢにおいて RTK シグナルの鍵となることが示唆される（図 5）。

対照的に MKN-45 では PHA665752、フォレチニブにて MET のみならず FGFR3 の抑制が認められた。MKN-45 では RET や Tie-2 の高度にリン酸化しているが、PHA665752

とフォレチニブによりそれらも抑制されている。以上のことより MKN-45 では MET が RTK シグナルの鍵となり EGFR , HER3 , FGFR3 , RET , Tie-2 のリン酸化を抑制することが示唆される（図 5）。

KATOⅢにおいてEGFRやHER2などはFGFRに依存していることが報告されている。そのため、MKN-45でもMETへの依存性の確認のためにEGFR/HER2阻害薬のCL-387,785を用いて検討を行った。図6aに示す通り、MKN-45においてCL-387,785のEGFR , HER2のリン酸化抑制効果は少なかった。加えてHER2を過剰発現しているMKN-7やBT474と比較してMKN-45ではCL-387,785の感受性が低かった(Fig.6b)。以上のことよりMKN-45ではHER3 , FGFR2のリン酸化はMETに依存していることが示唆された。

KATOⅢにおいては PI3K シグナル、細胞成長に FGFR2 に依存した HER3 が必要なことが既に証明されている。それゆえに我々は MKN-45 において siRNA を用いて HER3 , FGFR3 をノックダウンすることにより生物学的・生化学的な MET の影響を検討した。図 7 a に示す通り、HER3 , FGFR3 をノックダウンすることにより、Akt や下流の ERK1/2 を抑制した。ノックダウンは細胞成長にも影響を及ぼすことより、細胞シグナル並びに細胞成長において MET は HER3 , FGFR3 と結合することが示唆される。

＜考察＞

本研究では胃癌細胞株においてフォレチニブは MET のみでなく FGFR2 を阻害することにより細胞成長を抑制することを発見した。我々の知る限りでは FGFR2 に対するフォレチニブの効果を評価した初めての研究である。また、フォレチニブは MET や FGFR2 などの鍵となる受容体を介して様々な RTK シグナルを抑制することを発見した。

KATOⅢにおいて EGFR , HER3 , MET の活性化は FGFR2 に依存している（図 5）。EGFR や HER3 の FGFR2 に対する依存性は先行研究と一致する一方、MET に関する研究は報告されていなかった。PHA665752 による下流へのシグナル伝達や細胞増殖における MET 阻害は KATOⅢにおいて FGFR2-MET シグナル網に影響を及ぼさなかった（図 1c,2)。MET は転移や浸潤などの発がん過程に寄与している可能性がある。

KATOⅢとは対照的に MKN-45 では EGFR, HER3, FGFR3 や他の RTK は MET に依存することが明らかになった（図 5)。先行研究において MKN-45 や他の MET 過剰発現胃癌細胞株である GTL16 において PHA665752 による細胞シグナルや細胞成長は外因性の EGF やヘレグリンによって回復可能であることが報告されている。これらの発見は MET 過剰発現細胞株において HER 関連受容体が生物学的に活性のあることを示唆している。これらの報告と一致して、我々の今回実験では MKN-45 において siRNA を用いて HER3 をノックダウンすることにより Akt のリン酸化発現量や成長速度の減少を示した（図 7）。加えて FGFR3 のリン酸化は MET に依存することを発見した。FGFR3 のノックダウンにより細胞成長速度や Akt , ERK1/2 のリン酸化が減少したことから、FGFR3 は MKN-45 において生物学的に活性があることが示唆される。RTK シグナルの生物学的な役割はまだ解明されていないが、胃癌において MET や FGFR2 が効果的に細胞増殖を促進するために他の RTK に影響を及ぼすのかもしれない。

本研究において PD173074 並びに CL-387,785 は MKN-45 において MET 依存的な FGFR3 , EGFR , HER3 のリン酸化に影響を及ぼさなかった。同様にゲフィチニブも FGFR2 に依存的な EGFR のリン酸化に影響を及ぼさないことが報告されている。特定の阻害薬に対する下流シグナルの抵抗性のメカニズムについてはまだ解明されていないが、鍵となる RTK を同定することは臨床上価値のあることである。

胃癌において MET や FGFR2 の過剰発現がよく認められることを考えれば、フォレチニブは MET や FGFR2 過剰発現している癌に対して新しい種類の薬剤となり得ると考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2434号	氏　名	片岡 優
論文題目 Title of Dissertation	Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks. MET と VEGFRs のマルチキナーゼ阻害薬である Foretinib (GSK1363089)はチロシンキナーゼ受容体を遮断することにより胃癌細胞株の成長を阻害する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	掛地吉弘 錦織千佳子 栗　健	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

胃癌は全世界においてがんによる死因の第二位である。臨床では新しい種類の抗がん剤が必要とされていたが、研究はほとんど実施されてこなかった。

1990 年代後半より様々な臨床背景において受容体型チロシンキナーゼ（以下 RTKs とする）を標的とする分子標的治療は成功をおさめた。これらの分子標的薬の中でも異常活性化による遺伝子変化をもつ RTKs を標的とする薬剤は有効性を示した。

胃癌細胞においても繊維芽細胞成長因子受容体 2（以下 FGFR2 とする）や MET , HER2 遺伝子などが報告されるようになった。HER2 過剰発現は大部分が高分化型のサブタイプで見つかる一方、MET や FGFR2 の過剰発現は低分化型のサブタイプで頻繁に認められる。最近の第 3 相試験で転移性胃癌において従来の治療法と比較してトラスツズマブ併用療法の有効性が示されている。このように他のタイプの固形腫瘍においても、RTK を標的とすることで胃がん治療において有用であると考えられる。

フォレチニブは血管内皮成長因子受容体や PDGFR-β、Tie-2、RON、AXL に加えて近年 MET にも阻害作用があることが報告されたマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害薬である。最近のフォレチニブの第 1 相試験において腫瘍形成に関与するとされる MET が過剰発現している乳頭腎臓癌発症患者 4 人のうち 2 人で有効性が認められた。一方 MET の過剰発現のない甲状腺髄様癌発症においても有効性が認められる報告もあり、フォレチニブは MET を介さない機構に作用すると考えられる。

本研究の目的はフォレチニブの作用メカニズムを明らかにし、胃がん細胞を使用することにより細胞活性を示すバイオマーカーを同定することである。

MET , FGFR2 遺伝子増幅が確認されている 5 種の胃がん細胞株 KATO-Ⅲ , MKN-1 , MKN-7 , MKN-45 , MKN-74 並びに FGFR2 が過剰発現している OCUM-2M 細胞を用いた。

各薬剤は DMSO にて溶解し最終濃度 0.001~10uM で 3 日間暴露した。その後 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carbox-ymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)の 490nm の蛍光分析にて測定可能な溶解性の formazan への生物学的還元に基づいた比色分析法である MTS assay を用いての薬剤感受性試験を実施した。

また、1uM で 3 日間薬剤暴露した細胞株にウエスタンブロット法を用いてシグナル伝達の変化を確認した。

KATO-III と MKN-45 において、同一のメンブレン内で 42 種の異なる RTK のリン酸化レベルを判定できる Human Phospho-RTK Array (R&D Systems, MN, USA)を使用し、RTK リン酸化分析を行った。

さらに、Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)を用いて MKN-45 におけるヒト HER3 並びに FGFR3 ノックダウン時の評価を行った。

本研究では胃癌細胞株においてフォレチニブは MET のみでなく FGFR2 を阻害することにより細胞成長を抑制することを発見した。我々の知る限りでは FGFR2 に対するフォレチニブの効果を評価した初めての研究である。また、フォレチニブは MET や FGFR2 などの鍵となる受容体を介して様々な RTK シグナルを抑制することを発見した。

KATOⅢにおいて EGFR，HER3，MET の活性化は FGFR2 に依存している（図 5）。EGFR や HER3 の FGFR2 に対する依存性は先行研究と一致する一方、MET に関する研究は報告されていなかった。PHA665752 による下流へのシグナル伝達や細胞増殖における MET 阻害は KATOⅢにおいて FGFR2-MET シグナル網に影響を及ぼさなかった（図 1c,2）。MET は転移や浸潤などの発がん過程に寄与している可能性がある。

KATOⅢとは対照的に MKN-45 では EGFR, HER3, FGFR3 や他の RTK は MET に依存することが明らかになった（図 5）。先行研究において MKN-45 や他の MET 過剰発現胃癌細胞株である GTL16 において PHA665752 による細胞シグナルや細胞成長は外因性の EGF やヘレグリンによって回復可能であることが報告されている。これらの発見は MET 過剰発現細胞株において HER 関連受容体が生物学的に活性のあることを示唆している。これらの報告と一致して、我々の今回実験では MKN-45 において siRNA を用いて HER3 をノックダウンすることにより Akt のリン酸化発現量や成長速度の減少を示した（図 7）。加えて FGFR3 のリン酸化は MET に依存することを発見した。FGFR3 のノックダウンにより細胞成長速度や Akt，ERK1/2 のリン酸化が減少したことから、FGFR3 は MKN-45 において生物学的に活性があることが示唆される。RTK シグナルの生物学的な役割はまだ解明されていないが、胃癌において MET や FGFR2 が効果的に細胞増殖を促進するために他の RTK に影響を及ぼすのかもしれない。

本研究において PD173074 並びに CL-387,785 は MKN-45 において MET 依存的な FGFR3，EGFR，HER3 のリン酸化に影響を及ぼさなかった。同様にゲフィチニブも FGFR2 に依存的な EGFR のリン酸化に影響を及ぼさないことが報告されている。特定の阻害薬に対する下流シグナルの抵抗性のメカニズムについてはまだ解明されていないが、鍵となる RTK を同定することは臨床上価値のあることである。

胃癌において MET や FGFR2 の過剰発現がよく認められることを考えれば、フォレチニブは MET や FGFR2 過剰発現している癌に対して新しい種類の薬剤となり得ると考えられる。

以上、本研究は、胃癌細胞株においてフォレチニブは MET のみでなく FGFR2 を阻害することにより細胞成長を抑制することを初めて明らかにした。また、フォレチニブは MET や FGFR2 などの鍵となる受容体を介して様々な RTK シグナルを抑制するなど重要な知見を得ており、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。