

|             |                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | いし べ たつ や<br>石 部 達 也                                                                                                                                                                                                         |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                    |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 2946 号                                                                                                                                                                                                                 |
| 学位授与の日付     | 平 成 18 年 3 月 23 日                                                                                                                                                                                                            |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                                                                                                      |
| 研 究 科 ・ 専 攻 | 医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻                                                                                                                                                                                                          |
| 学 位 論 文 題 目 | Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas : potential application of signal inhibitors to molecular target therapy.<br>(線維芽細胞増殖因子シグナル経路の破綻は滑膜肉腫の増殖を阻害する：分子標的療法への応用の可能性) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 真 鍋 俊 明      教 授 武 藤      誠      教 授 瀬 原 淳 子                                                                                                                                                                    |

### 論 文 内 容 の 要 旨

滑膜肉腫は軟部肉腫の1割程度を占める悪性腫瘍である。局所治療及び転移予防のために化学療法が施行されるが、その効果は限定されており、新たな薬剤の開発が期待されている。軟部肉腫における遺伝子発現プロファイリングを行った結果から、線維芽細胞増殖因子（以下 FGF）18 の発現が滑膜肉腫に共通して亢進していることが判明した。そこで滑膜肉腫の増殖における FGF シグナルの関与を追究した。

まず、22種の FGF 遺伝子と4種の FGF 受容体（以下 FGFR）遺伝子の発現を、滑膜肉腫組織18例と滑膜肉腫細胞株5株において半定量的 RT-PCR 法で調べたところ、FGF2, 8, 9, 11, 18, FGFR1, 2b, 2c, 3, 4 の発現が検出された。更に定量的 RT-PCR を用いて他の肉腫での発現と比較したところ、FGF8, 18, FGFR2b, 3 が滑膜肉腫において有意に高値を示した。更に滑膜肉腫細胞株培養上清中の FGF18蛋白および細胞溶解液中の FGFR3蛋白の存在がウェスタンブロット法で確認された。以上の結果から、滑膜肉腫は複数種の FGF とこれらをリガンドとする受容体とともに発現していることが確認された。

次に、FGF シグナルが滑膜肉腫細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。細胞株に組換え FGF8, 18蛋白を投与し、プロモデオキシウリジン取り込み検査を行ったところ、FGF8 により5株、FGF18 により1株で濃度依存性の増殖促進効果が確認された。更に、リン酸化特異的抗体を使用して mitogen-activated protein kinases (MAPK) の活性化を検討したところ、FGF8, 18蛋白はいずれも extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 および p38 を活性化したが、c-Jun NH2-terminal kinase には影響を与えなかった。

次に、FGF シグナルの阻害が滑膜肉腫に及ぼす効果を検討した。免疫沈降ウェスタンブロット法により、血清非存在下でも FGFR3 はリン酸化されており、リン酸化の程度は FGF18 蛋白投与により亢進し、FGFR 阻害剤の投与により低下することを確認した。次に FGFR 阻害剤による増殖抑制効果を検討したところ、全5株で濃度依存性に増殖が阻害された。また、FACS を用いて FGFR 阻害剤の細胞周期へ与える影響を検討したところ、FGFR 阻害剤は G1 期停止を誘導していた。シグナル経路に関しては、FGFR 阻害剤は4株でほぼ検出不能なレベルまで ERK1/2 のリン酸化を抑制していたが、p38 のリン酸化には影響を与えなかった。さらに、ERK1/2 の上流に位置する MAPK/ERK kinase (MEK) 1/2 の阻害剤を投与することにより、ERK1/2 のリン酸化抑制とともに、FGFR 阻害剤と同様に増殖抑制効果を認めた。これらの結果から、FGF の増殖シグナルは ERK1/2 を介したものであることが判明した。

ヌードマウスを用いたマウス滑膜肉腫モデルを用いて、in vivo での FGFR 阻害剤の効果を検討した。FGFR 阻害剤の腹腔内投与により、濃度依存性の腫瘍増殖抑制効果を認め、この効果は、腫瘍内での ERK1/2 のリン酸化の抑制および proliferating cell nuclear antigen 染色性の低下によっても確認された。

以上より、滑膜肉腫には FGF/FGFR/MEK/ERK を介した増殖シグナルが存在しており、このシグナルを阻害することが滑膜肉腫の治療に有用であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

滑膜肉腫は成人軟部肉腫の1割程度を占める悪性腫瘍である。補助療法として多剤併用化学療法が施行されるが、その効果は限定されており、新たな薬剤の開発が期待されている。これまでに申請者の所属する研究グループにより、線維芽細胞増殖因子（以下 FGF）18の発現が滑膜肉腫に共通して亢進していることが明らかにされている。本研究では滑膜肉腫の増殖における FGF シグナルの関与が解析された。

まず定量的 RT-PCR による発現解析により、他の軟部肉腫に比較して滑膜肉腫組織および細胞株は FGF8 と 18, FGF 受容体(FGFR) 2b と 3 の発現が高値であることが判明した。更に FGF18 および FGFR3 に関しては蛋白レベルでも高発現が確認された。次に培養細胞株を用いて FGF シグナルの増殖に対する影響が解析された。滑膜肉腫 *in vitro* 培養系に FGF8 及び 18 蛋白を添加すると、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 が活性化され、濃度依存性に増殖が促進された。逆に FGFR 阻害剤を添加すると ERK1/2 の活性はほぼ消失し、G1 期で細胞周期が停止した。更にヌードマウスを用いた *in vivo* の実験でも FGFR 阻害剤は有意に滑膜肉腫の増殖を抑制した。これらの結果より、滑膜肉腫には FGF/FGFR/ERK を介した増殖シグナルが存在しており、このシグナルを阻害することが滑膜肉腫の治療に有用であると考えられた。以上の研究は、滑膜肉腫の増殖機構の解明に貢献し、新規治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年1月30日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。