

FGFR3融合*in vivo*異種移植 モデルプラットフォーム

豊富なFGFR3融合*in vivo*異種移植モデルパネルによる非臨床FGFR阻害剤の
開発



FGFR3融合遺伝子は、がんを形成する可能性が高いことが知られており、化学療法に耐性を獲得した患者を含む特定のがん患者に対してのドラッグブル (druggable)、すなわち治療標的となりうる分子です。

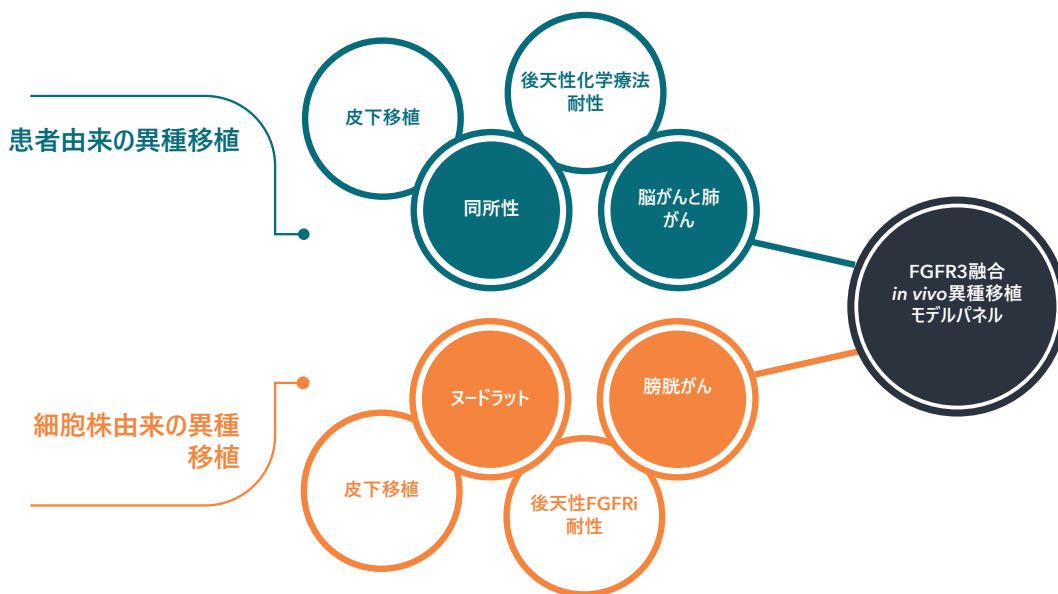
これらの融合タンパク質を標的とするFGFR阻害剤 (FGFRi) は、臨床で実際に観察されるFGFR3融合遺伝子型とそれによる薬剤耐性の表現型を再現するモデルを用いて *in vivo* での開発や評価が必須です。

Crown Bioscienceは、非臨床開発のあらゆる段階で有用な様々なモデルを用い、FGFR3融合タンパク質の *in vivo* 異種移植モデルを数多く提供します。

- モデルパネルは以下の通りです:
 - リード化合物の初期開発に利用可能な各種細胞株由来の異種移植モデル
 - 予測性の高い治療有効性データを提供する各種患者由来異種移植 (PDX) モデル
- 融合タンパク質として実臨床で認められる、膀胱がん、肺がん、および脳がんにおけるFGFR3-TACC3およびFGFR3-JAKMIP1にも対応しています。
- 新規FGFRiの検証に使用できる後天性耐性モデルの使用が可能です:
 - 基礎のFGFRiに耐性のある細胞株由来異種移植モデル
 - 臨床症状を模倣してFGFRiに対して感受性のある、化学療法耐性PDXモデル

Crown Bioscienceは、臨床試験につながるように、新規FGFRiの非臨床試験を効率的に実施すべく、豊富なFGFR3融合 *in vivo* 異種移植モデルパネルを提供します:

- モデルパネルには、様々なリード化合物の研究開発のために有用な ValidatedXeno™細胞株由来の異種移植が含まれています:
- FGFR3-TACC3融合タンパク質を発現するRT4およびRT112/84皮下移植膀胱がんモデル
- ドセタキセル、パクリタキセル、シスプラチンなどの標準治療 (SoC) 薬に固有の反応性、耐性があり、さらにマルチチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) であるスニチニブやレンバチニブには反応のあるモデルをラインナップ
- FGFRiへの応答性のあるモデル、および検証に使用できるFGFRi耐性モデルにおける実験的治療データを提供
- 薬動学 (PK) 実験用のヌードラットRT4およびRT112モデル
- 臨床試験への移行を適切に判断するための信頼性のある非臨床の治療有効性データを取得すべく、HuPrime® PDXモデルを活用します:
 - NGSで十分に分析された、FGFR3-TACC3およびFGFR3-JAKMIP1融合タンパク質を発現する肺がん (NSCLC, SCC) および脳腫瘍モデル
 - 皮下および同所性移植モデル
 - シスプラチンを含む一連の標準治療薬に対して感受性、あるいは抵抗性があり、検証のために使用可能なパクリタキセル+カルボプラチン併用に対する耐性を示すモデル
 - 臨床的に関連する薬剤耐性モデリング研究のため、化学療法に感受性または後天的抵抗性があり、かつFGFRiに感受性のあるモデル



FGFR3融合タンパク質を標的としたがん治療薬の開発

チロシンキナーゼ受容体であるFGFRファミリーは、増殖、文化、生存などの細胞活動に広く関与しています。突然変異、一塩基多型 (SNP)、増幅、およびFGFRファミリー分子同士であるFGFR1からFGFR4への転座は、様々ながん種における原因因子として関係していると考えられています⁽¹⁾。

これらの転座には、固形がんの染色体再配列によって引き起こされるFGFR3融合も含まれ、膀胱がんや肺がん、膠芽腫、および胆管がんで観察されます⁽²⁾。同定されたいくつかの融合タンパク質は発がん性があるとされており、その下流のシグナル伝達をブロックすることが新しい治療コンセプトになっています⁽²⁾。

たとえば、FGFR3-TACC3融合タンパク質は、様々な癌腫で研究されており、以下のことが実証されています：

- 神経膠腫、膀胱および肺がん細胞は、FGFR TKI治療に感受性がある^(3,4)
- 臨床試験において、SD (Stable disease)を示す子宮頸がんの患者はFGFRを標的とするマルチキナーゼTKI治療に感受性がある⁽⁵⁾
- EGFRシグナル伝達駆動型HNSCCがん細胞株においては、EGFR標的療法に対して耐性が誘導される⁽⁴⁾

これらの治療反応性と種々のデータにより、FGFR3融合タンパク質が特定されると、それ自身が、がん患者のための創薬ターゲットとなり、特定のがんタイプにおける治療後耐性に対処するための重要なこととなる可能性があることを示唆しています。

現在、FGFR3融合タンパク質を標的とする新薬の評価や、そのような融合タンパクの機能に関する研究のためには、患者で観察された融合遺伝子型を持つ適切なモデルが必要です。

表1: Validated Xeno FGFR3モデルの概要

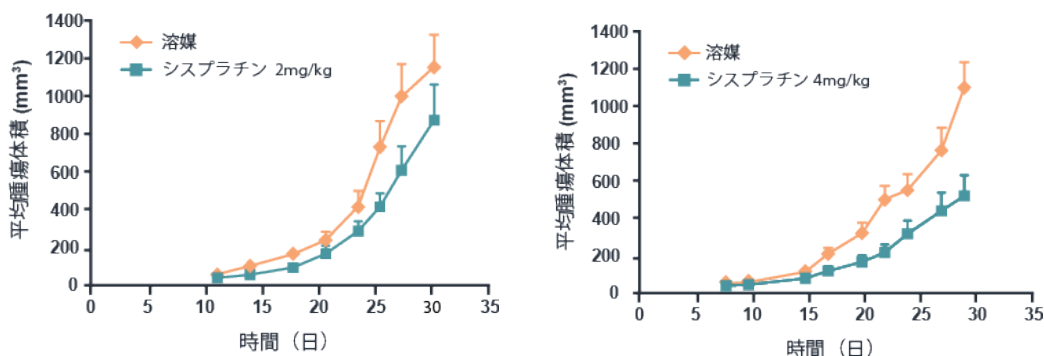
モデル	がん種	モデルタイプ	モデル情報
RT4	膀胱	皮下	腫瘍形成性を有するヒト白人男性上皮移行上皮乳頭腫。異数性細胞株(9)
RT112/84	尿路;膀胱	皮下	ヌードマウスで腫瘍化するヒト女性上皮性膀胱癌。RT112細胞株のクローン誘導体(10,11)

表2: RT4およびRT112/84に 治療および実験的治療データ

モデル	ターゲット療法		化学療法	
	耐性	感受性	耐性	感受性
RT4	-	レンパチニブ、ルシタニブ、スニチニブ	-	-
RT112/84	-	レンパチニブ、ルシタニブ、スニチニブ AZD4547 (FGFR阻害剤) によるがんの退縮/安定	ドセタキセル、パクリタキセル	シスプラチンに対して部分的に反応
RT112/84R	AZD4547 (FGFR阻害剤) 耐性モデルが作製されています	-	-	-

RT4: BALB/cマウスによるデータ。RT112/84: MF-1雌ヌードマウスおよびBALB/c雌ヌードマウスによるデータ。

図1: シスプラチンに対するRT112/84腫瘍の部分的な治療応答性



PBS中の細胞を使用して、MF-1雌ヌードマウス(グループあたりn =9/10マウス)で作られた腫瘍。



Crown Bioscienceは、FGFRiの研究開発のためにFGFR3融合 *in vivo*異種移植プラットフォームをご提案します

当社のプラットフォームとして、FGFR3融合タンパク質を標的とする薬剤の*in vivo*評価のための2つの補足的なシステムを提供します:

- 初期のリード化合物開発のために有効なXeno細胞株由来の異種移植。当社の各種FGFR3融合モデルにより、タイムリーでコストパフォーマンスの高い非臨床開発プログラムを進めることができます。
- HuPrime PDXモデルの提供が可能です。原発腫瘍の組織(プラスチックへの曝露がない)から直接派生したPDXは、元の患者の腫瘍の組織病理学および遺伝学的な特徴を完全に再現するため、薬剤評価に利用できる最も予測的な非臨床モデルと考えられています⁽⁶⁾。重要な次のステップ以降のご判断のため、当社は2,500ものPDXモデルを持ち、信頼性の高い非臨床データの取得が可能です。

FGFRiのリード薬剤開発のためのXeno FGFR3融合遺伝子発現がん細胞の異種移植モデル

初期の*in vivo*研究では、FGFR3-TACC3融合を組み込んだRT4およびRT112 / 84膀胱がんモデルを提供します^(7,8)。これらの異種移植モデルは、FGFR3融合をターゲットとする新規の評価薬、および膀胱がんのSoC薬に使用できます。モデルの種類、情報、背景を表1に示します。

当社のすべての異種移植モデルは、十分に特性評価され、検証されており、それらの背景情報、変異状態、および治療データは、当社で作成した細胞株/細胞株由来の異種移植モデルのためのオンラインデータベースであるXenoBase[®]で全て検索することができます。XenoBaseには、Crown BioscienceのWebサイト(www.crownbio.com)から、またはxenobase.crownbio.comから直接アクセスも可能です。初期

図2: FGFR阻害剤治療に非常に鋭敏なRT112/84皮下モデル

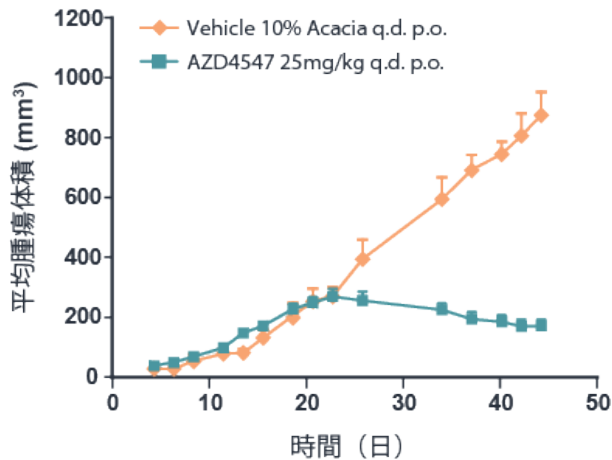
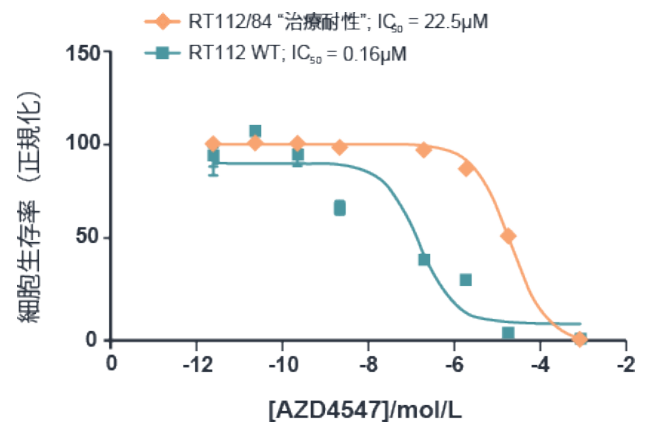
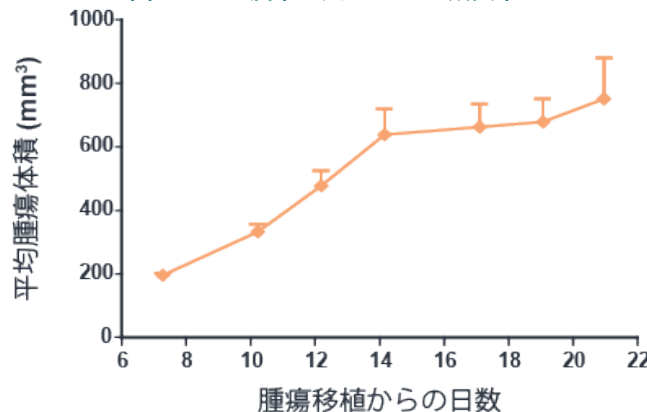


図3: 開発されたAZD4547に対するRT112 / 84の*in vitro*耐性 (検証に利用可能な*in vivo*モデル)



AZ4567治療は、MF-1雌ヌードマウスの腫瘍体積が200 mm³になったときに開始された。

図4: RT112皮下ラットモデルの成長率



FGFR3融合異種移植モデルはFGFRiに対して治療応答性をしめしており、薬剤耐性モデルは開発中です

当社のRT4およびRT112/84モデルについては、SoCの幅広い薬剤と、FGFR3-TACC3融合を標的とする実験的治療を用いて、社内でも、またお客様との間で実施した試験でも検証済みです。(社内データの概要を表2にまとめました)。

膀胱がんに対するSoCとして使用する薬剤には、外科的手術や放射線療法で治療が不可能ながんに対するシスプラチンや、シスプラチンの投与ができない患者に対するタキサンなどが含まれます。RT112/84モデルは、シスプラチンに対して部奏効を示しています(図1)。また、RT112 / 84モデルでは、ドセタキセルとパクリタキセルの両剤に対する耐性も認められており、すべてのデータとがん増殖曲線はXenoBase内で確認することが可能です。

また、FGFR 発現している様々ながん種に対して現在臨床試験が行われているFGFR1、2、および3に対する阻害剤であるAZD4547では、FGFR-TACC3融合を標的としています⁽¹²⁾。RT112/84モデルでは、この薬剤に対する感受性が高いことが示されています(図2)。

*in vitro*でAZD4547に耐性を示すRT112/84モデルがすでに確立されていますが(図3)、これは耐性の作用機序が特徴づけられている場合の*in vivo*試験での検証に利用することができます。

FGFRに対して作用するマルチターゲットTKIについても、これらのモデルで試験が行われています。RT4モデルおよびRT112/84モデルはいずれもスニチニブ、ルシタニブ、レンバチニブに感受性があり、XenoBaseでは、すべてのデータとがん増殖曲線を閲覧することができます。

ヒトとの類似点が比較的多いげっ歯類のプラットフォームで薬剤を評価する必要がある場合

ラットは、生理学的にマウスよりもヒトに近く、幅広い試験の選択肢として魅力的で、化合物のPK特性も一般的にヒトで観察される内容に近いです。

そこで、当社では、RT4およびRT112(RT112/84が起源となる親細胞株)のヌードラットモデルを確立しました。RT112モデルの成長データの例を図4に示します。さらなるRT4データにつきましてはXenoBaseでご確認ください。

表3:HuPrime FGFR3融合PDXモデルの概要

HuPrime モデル	FGFR3融合パートナー	患者背景	がんの病理学的診断	PDX 腫瘍病理 QC	背景とモデルタイプ	ゲノムプロファイリング	FGFR3 遺伝子発現
BN2289	TACC3	.アジア人女性、75歳。未治療。	退形成性乏突起膠腫(WHOグレード3)。IHCの結果:GFAP(+), S-100(+), Syn(-), Ki-67(10%+), MMP-9(-), MGMT(-), P53(-), PCNA(+), P170(+)	Pa, P2: 乏突起膠腫、グレード3	BALB/c ヌードマウス。皮下と同所性	P5: RNAseq P2: Affy U219 P1: Affy SNP 6.0	5.5694
LU5147	JAKMIP1	白人男性、65歳。前治療不明	NSCLC, SCC	SCC	NOD SCID. 皮下	P3: RNAseq	7.262
LU6426	TACC3	白人男性、80歳、喫煙者。未治療。	NSCLC, SCC	P11: 低分化 SCC	MF-1ヌードマウス、hMSCサプリメント; BALB/cヌードマウス。皮下	P10: RNAseq	8.904

hMSC:ヒト間葉系幹細胞。#RNAseq遺伝子発現、Log2(FPKM)値。



HuPrime FGFR3 Fusion PDXモデル:非臨床段階での薬物評価に使用する予測性の高い代替モデル

HuPrimeコレクションのうち、アメリカ、ヨーロッパ、アジアの集団に由来する、TACC3またはJAKMIP1とのFGFR3融合イベントを保有する3つのPDXモデルを同定しました(表3に要約)。

当社のPDXモデルは、いずれも特徴が明確化され検証済みであり、PDXの背景情報、特性およびQC、変異ステータス、および治療データについては、当社のオンライン照会のPDXデータベースHuBase™を介して検索することができます。HuBaseは、当社のWebサイトwww.crownbio.comから、またはhubase.crownbio.comから直接アクセスすることができます。

PDXおよび細胞株由来の異種移植モデルについては、当社の統合型オンライン腫瘍学検索エンジンであるOncoExpress™を介して(あるいは当社のWebサイトから、または直接oncoexpress.crownbio.comにアクセスすることで)同時に検索することができます。

FGFR3融合については、RNAseqによってすべてのモデルで確認済みであり、またPCRによりBN2289モデルで検証されています。図5は、モデルBN2289の第4染色体上において、FGFR3遺伝子のエクソン16とTACC3遺伝子のエクソン6の融合データを示しています。

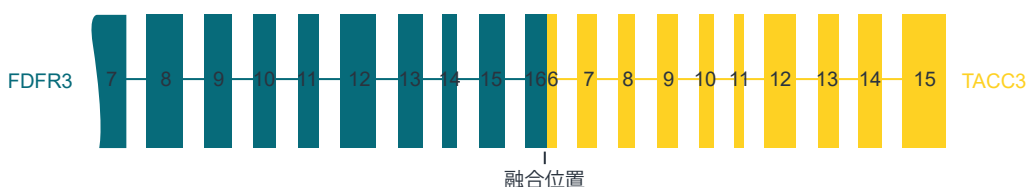
HuBaseには、すべてのモデルの融合に関する詳細データが記載されており、リクエストに応じてsequencing検証データも提供しています。

このモデルのFGFR3遺伝子発現データを表3に示しました。LU6426モデルでは、FGFR3のDNAコピー数の増幅が認められました(DNAコピー数6)。

化学的感受性および化学的耐性の設定のためにFGFRiに応答性を示すPDXモデル

当社のPDXモデルは、臨床応用へのトランスレーションに関する主要な意思決定を下すために、有効性の予測に優れた堅牢なデータを提供するために有用です。様々なSoCや実験的治療薬(その概要を表4にまとめており、データはHuBaseからも入手可能)を使用してモデルを検証しており、FGFRiの評価に向けて臨床的に関連性の高いSoC耐性PDXモデルを開発しました。

図5:HuPrime FGFR3-TACC3融合PDXモデルのゲノムプロファイリング:BN2289



PDXモデル	上流の融合遺伝子	上流の染色体	上流のストランド	上流のゲノム接合位置	下流の融合遺伝子	下流の染色体	下流のストランド	下流のゲノム接合位置
BN2289	FGFR3	4	+	1808661	TACC3	4	+	1737000

FGFR3-TACC3融合の第4染色体の位置。

表4:FGFR3融合PDXモデルSoCおよび実験的治療薬のデータ

モデル	化学療法		ターゲット療法	
	耐性	感受性	耐性	感受性
BN2289	-	テモゾロミド	-	BGJ398 (FGFR 阻害剤)
LU5147	-	シスプラチン	-	-
LU6426	パクリタキセル+カルボプラチン(獲得耐性)	パクリタキセル+カルボプラチン	-	AZD4547 (阻害剤)

BN2289: BALB /cヌードマウスで得られたデータ; LU5147: NOD SCIDマウスで得られたデータ; LU6426: MF-1ヌードマウスで得られたデータ。



FGFR3融合モデルを使用して化学療法の薬剤の試験をする際には、特定の病型に適したモデルが用いられます。BN2289モデルはテモゾロミドに感受性があり、LU5147モデルはシスプラチンに感受性があり、LU6426モデルはパクリタキセルとカルボプラチンの併用療法に感受性があります。

FGFR3融合は、がんが薬剤耐性を獲得するための潜在的なドライバー遺伝子であり、かつ「ドラッグابل (druggable)」な標的である可能性が高いことから、当社ではFGFRi評価のための薬剤耐性PDXモデル

を開発しています。パクリタキセルおよびカルボプラチンに対する耐性を獲得したLU6426のPoCモデルは、耐性表現型が出現するまで *in vivo*での薬剤投与を繰り返すことで得られ、検証に利用することができます(図6)。これらの化学療法感受性モデルと耐性モデルの両方は、AZD4547治療には感受性を示しました(図7)。

他のマルチターゲットTKI についてもPDXモデルで検証済みであり、BN2289モデルは汎FGFR阻害剤のBGJ398に対して強力な応答性を示しました(図8)。

図6:LU6246:パクリタキセル+カルボプラチンに対して耐性を示すPDXモデル

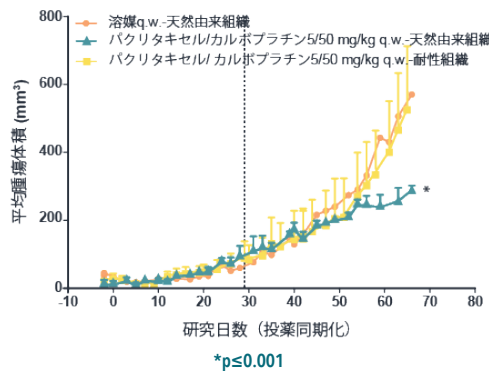
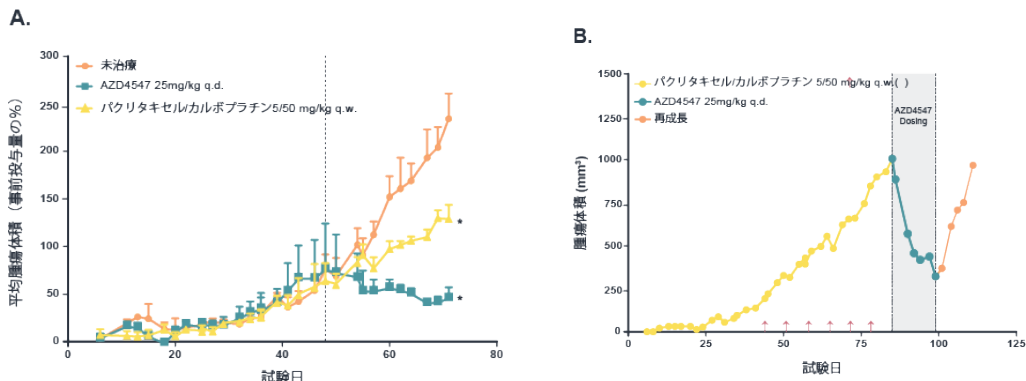
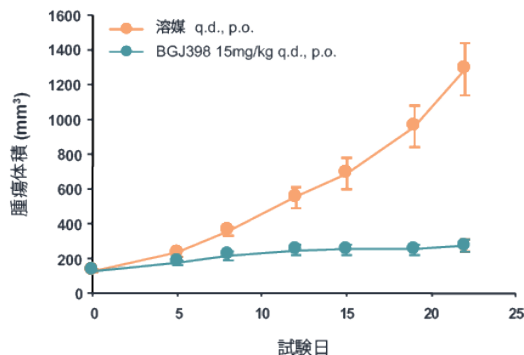


図7: 化学的感受性および化学的耐性の設定のためにFGFRiに応答性を示すLU6426PDXモデル



A: パクリタキセルおよびカルボプラチン治療に感受性のあるLU6426モデルにおけるAZD4547への応答性。B: パクリタキセルおよびカルボプラチン療法に対して獲得耐性を示すLU6426モデルにおけるAZD4547への応答性。* $p \leq 0.001$ 。

図8: FGFR阻害剤BGJ398に応答性を示すBN2889PDXモデル



サマリー

FGFR3遺伝子融合は、構成的に活性化されたがん形成に関与するキナーゼタンパク質を生成し、がん研究においてドラッグブルな創薬ターゲットとなります。また、その融合は、FGFR阻害剤で治療される患者を層別化することもできる可能性があります。これらの融合イベントについてFGFRiの非臨床評価を進めるため、Crown Bioscienceでは、細胞株およびヒト異種移植モデルを含む、FGFR3 Fusion *In Vivo* Xenograft Panel (FGFR3融合*in vivo*異種移植パネル)を提供しています

当社のValidatedXeno細胞株由来の異種移植は、様々なリード化合物の開発試験で使用されています。FGFR3融合のリソースとしては、RT4およびRT112/84モデルが含まれます。当社の異種移植モデルは、SoC化学療法に応答性を示します。これには、様々なマルチターゲットTKIや、FGFR1、2、および3に対する実験的な阻害剤に高い感受性のあるモデルも含まれています。

現在、FGFRi (AZD4547) 療法に耐性を示すRT112/84のモデルを複製しているところであり、*in vitro*での耐性が確立されているため、この

耐性を克服する薬剤を開発するための*in vivo*研究に移行することができる*in vitro*耐性が確立されています。

当社の細胞株由来の異種移植は、HuPrime PDXモデルによって補完され、元の患者のがんの組織病理学的プロファイルおよび遺伝子プロファイルを完全に再現し、トランスレーショナルの次の段階の重要な意思決定に向けて有効性のデータを提供します。

当社のFGFR3融合PDXリソースは、神経膠腫およびNSCLC SCCモデルを対象としています。当社のモデルにおける臨床的に関連性の高いFGFR3-TACC3やFGFR3-JAKMIP1の融合では、RNAseqとデータ利用が可能なフルシークエンスデータを用いて確認が得られています。

これらのPDXモデルは、その疾患タイプに特異的なSoC薬剤、および実験的なFGFR阻害剤のいずれにも感受性を示します。LU6426 NSCLCモデルを使用して、SoCであるバクリタキセルとカルボプラチンの併用レジメンに対する獲得耐性を検証することができます。FGFRiがFGFR融合によって引き起こされる獲得耐性に治療効果が発揮できるかの研究に利用することができます。

参考文献

- 1 Ahmad, I, Iwata T, and Leung HY. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2012;1823(4): 850-860.
- 2 Katoh M. FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 2016;38(1): 3-15.
- 3 Capelletti M, Dodge ME, Ercan D et al. Identification of recurrent FGFR3-TACC3 fusion oncogenes from lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 2014; 20(24): 6551-6558.
- 4 Daly C, Castanaro C, Zhang W et al. FGFR3-TACC3 fusion proteins act as naturally occurring drivers of tumor resistance by functionally substituting for EGFR/ERK signalling. *Oncogene* epub doi: 10.1038/onc.2016.216.
- 5 Carneiro BA, Elvin JA, Kamath SD et al. FGFR3-TACC3: A novel gene fusion in cervical cancer. *Gynecologic Oncology Reports* 2015;13: 53-56.
- 6 Hidalgo M, Amant F, Biankin AV et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discovery* 2014;4: 998-1013.
- 7 Acquaviva J, He S, Zhang C et al. FGFR3 translocations in bladder cancer: differential sensitivity to HSP90 inhibition based on drug metabolism. *Molecular Cancer Research* 2014;12(7): 1042-1054.
- 8 Williams SV, Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Human Molecular Genetics* 2013;22(4): 795-803.
- 9 ATCC® website. RT4 (ATCC® HTB-2™) General Information and Characteristics. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-2.aspx#generalinformation> Accessed 04 January 2017.
- 10 European Collection of Cell Cultures, Public Health England website https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85061106&collection=ecacc_gc Accessed 31 October 2014.
- 11 Cancer Cell Line Encyclopedia website <http://www.broadinstitute.org/ccle/home> Accessed 31 October 2014.
- 12 Clinical Trials.gov website <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=AZD4547&Search=Search> Accessed 09 June 2016.

MBL 株式会社 医学生物学研究所

A JSR Life Sciences Company <https://crownmbi.co.jp/>

©学術部

〒105-0012

東京都港区芝大門2丁目11番8号 住友不動産芝大門二丁目ビル

TEL: +81-3-4363-1361 E-mail: consultation@crownmbi.co.jp

