

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591547
 研究課題名（和文） EGFRリガンド阻害剤による低分化型胃癌に対する新しい癌治療法の開発
 研究課題名（英文） Analysis of EGFR ligand pathway in gastric cancer and as a target for anti-cancer drug discovery
 研究代表者
 沖 英次 (OKI EIJI)
 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究部・統括診療部・医師
 研究者番号：70380392

研究成果の概要：

PI3K/AKT シグナル伝達経路は成長因子のリン酸化シグナルを細胞内に伝達し、細胞の増殖や浸潤、抗アポトーシス作用に関わっている。このシグナル伝達を抑制するフォスファターゼである PTEN は前立腺癌、子宮内膜癌、神経膠芽腫、消化器癌など、様々な癌で発現の異常が報告されている。また PTEN の胚細胞での変異は Cowden 病や Bannayan-Zonana 症候群などの遺伝病を生じ、甲状腺がんや乳癌の頻度が著しく上昇することが知られている。我々は胃癌における PTEN や AKT/PI3K のシグナル経路の異常を系統的に解析し、新しい分子標的としての意義を検討している。その過程で、この経路の活性化が低分化胃癌の治療に重要な意義をもつ可能性を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：(1)胃十二指腸外科学、(2)EGFR、(3)AKT、(4)PTEN、(5)化学療法

1. 研究開始当初の背景

PI3K/AKT シグナル伝達経路は、MAP kinase 系シグナル伝達とともに、成長因子であるリガンドからのシグナルを細胞内に伝える重要な経路である。PI3K は、調節機能をもつ p85 と触媒機能をもつ p110 の二つのサブユニットから成り、IGF-1R, HER2/Neu,

VEGF-R, PDGF-R などの細胞表面チロシンキナーゼレセプターからのシグナルにより活性化される。p110 サブユニットは PIP2(Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) をリン酸化して PIP3(phosphatidylinositol

(3,4,5)-trisphosphate)を形成し、AKT を膜にリクルートしてこれをリン酸化する。PTEN(tensin homologue deleted on chromosome 10)は逆に PIP3 を PIP2 にするフォスファターゼとして働く。PI3K/AKT シグナル伝達経路は、アポトーシスの抑制や細胞の増殖、浸潤、血管新生などに関与する。AKTはサイクリン D1 のリン酸化を介して細胞増殖に関わり、さらにアポトーシスに関係する BAD や caspase-9 をリン酸化し、これらの働きを阻害することによってアポトーシスを抑制する。したがって抗癌剤感受性に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。AKT はまた、血管新生および癌の周囲組織への浸潤にも、VEGF や MMP を介して深く関わる(2, 3)。PTEN のヘテロ接合性ノックアウトマウスは、PI3K/AKT シグナルが持続的に活性化されており、腫瘍が形成される。PI3K/AKT の調節機構はさまざまな固形癌や血液腫瘍で異常を認めている。PTEN は癌抑制遺伝子として働くとされ、胃癌、大腸癌、子宮癌などで遺伝子変異や LOH が認められるが、メチル化の報告は少ない。胃癌では低分化腺癌に異常が多く報告されている。AKT に関しては乳癌や胃癌で DNA の overexpression やタンパクの過剰発現が認められる場合があり、AKT は薬物治療の新しい分子標的として注目されている。PI3K に関しては乳癌、卵巣癌で遺伝子増幅の報告があり、大腸癌や胃癌では遺伝子変異も認められる。我々は胃癌において、PTEN の異常と AKT の活性化が従来の抗癌剤の抵抗性と関係していることを明らかにしており、PI3K/AKT 経路の阻害剤や AKT のリン酸化の評価による感受性予測が胃癌治療に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

胃癌における PTEN や AKT/PI3K のシグナ

ル経路の異常を系統的に解析し、新しい分子標的としての意義を検討する。

3. 研究の方法

1998年から2003年までの切除された119症例の胃癌を対象とした。すべての症例からは遺伝子解析を行うことについての同意書を取得している。手術時に得られた一部の組織より DNA を抽出し、PTEN のメチル化の検討と Loss of heterozygosity(LOH)について解析した。メチル化は既知の報告通りプロモーターの配列を標的とした MSP 法を行い、LOH については2つのマイクロサテライトマーカーによる解析を行った。AKT については Cell Signaling 社の Ser473 に対するメチル化特異的抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。さらに PTEN の遺伝子の働きを破壊した PTEN-DN を細胞に導入することにより、AKT を持続的に活性化させた細胞を作製した。この細胞と親株の RNA の発現状態を Affimetrix 社の RNA EXPRESSION マイクロアレイを用いて胃癌の悪性化に関わる因子を探索した

4. 研究成果

1. 胃癌における PTEN の異常

まず、胃癌におけるメチル化の異常を検討した。図1には一部の症例の結果を示したが、検討したすべての症例で非癌部から得られた DNA、癌部から得られ DNA ともにメチル化のバンドは認められなかった。次に、PTEN の LOH を行った。この方法では、癌部から得られた波形が非癌部より 20%以上低下している場合を LOH と判定する。判定不能例を除くと104例中20例(19.2%)で LOH が認められた。この PTEN の LOH は臨床病理学的因子と関係を認めなかったが、PTEN が LOH である症例では予後がきわめて不良であった。

2. 胃癌における AKT の異常

pAKT (リン酸化 AKT) は、前述の PTEN の解析を行った症例のうちプレパラートが得られた 76 例について解析した。このうち 22 例(28.9%)で陽性であった。AKT のリン酸化に関しても臨床病理学的因子とはいかなる関係も認めなかったが、PTEN に LOH を認めない症例では 20.5%のみに pAKT が観察されたのに対し、PTEN が LOH の症例では、77.8%が pAKT 陽性であり、明らかに PTEN の LOH と AKT のリン酸化の間に有意な関係を認めた。これら症例の抗癌剤感受性を MTT assay で評価すると、pAKT 陽性の癌では抗癌剤に耐性である傾向を認めた。

3、AKT/PI3K 下流シグナルの検討

我々は PTEN の遺伝子の働きを破壊した PTEN-DN を導入することにより、AKT を持続的に活性化させた細胞を作製した。この細胞は親株に比べて AKT が持続的に活性化されていること、また増殖能が高いことが確認された (未発表データ)。この細胞と親株の RNA の発現状態を Affimetrix 社の RNA EXPRESSION マイクロアレイを用いて胃癌の悪性化に関わる因子を探索したところ。既知の遺伝子では低分化胃癌の進展に関わる MMP-9 などの発現が変化していることが確認された (未発表データ)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Tokunaga E, Oki E, Kimura Y, Yamanaka T, Egashira A, Nishida K, Koga T, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast

carcinoma. Breast Cancer Res Treat. 101(3):249-57. 2007

- ② Sakurai M, Zhao Y, Oki E, Kakeji Y, Oda S, Maehara Y. High-resolution fluorescent analysis of microsatellite instability in gastric cancer. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2007 Aug;19(8):701-9.
- ③ Oki E, Morita M, Kakeji Y, Ikebe M, Sadanaga N, Egasira A, Nishida K, Koga T, Ohata M, Honboh T, Yamamoto M, Baba H, Maehara Y. Salvage esophagectomy after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer. Dis Esophagus. 2007;20(4):301-4.
- ④ Oki E, Kakeji Y, Baba H, Nishida K, Koga T, Tokunaga E, Egashira A, Ikeda K, Yoshida R, Yamamoto M, Morita M, Maehara Y. Clinical significance of cytokeratin positive cells in bone marrow of gastric cancer patients. J Cancer Res Clin Oncol. 2007 113:995-1000
- ⑤ Egashira A, Morita M, Kakeji Y, Sadanaga N, Oki E, Honbo T, Ohta M, Maehara Y. p53 Gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma and their relevance to etiology and pathogenesis: Results in Japan and comparisons with other countries. Cancer Sci. 2007 Aug;98(8):1152-6. Epub 2007
- ⑥ Yotsumoto F, Yagi H, Suzuki SO, Oki E, Tsuchioka H, Hachisuga T, Sonoda K, Kawarabayashi T, Mekada E, Miyamoto S. Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. Biochem Biophys Res

- Commun. 2007
- ⑦ Morita M, Yoshida R, Ikeda K, Egashira A, Oki E, Sadanaga N, Kakeji Y, Yamanaka T, Maehara Y. Advances in esophageal cancer surgery in Japan: an analysis of 1000 consecutive patients treated at a single institute. *Surgery*. 2008 Apr;143(4):499-508.
- ⑧ Tokunaga E, Oki E, Egashira A, Sadanaga N, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 Feb;8(1):27-36.
- ⑨ Maehara Y, Egashira A, Oki E, Kakeji Y, Tsuzuki T. DNA repair dysfunction in gastrointestinal tract cancers. *Cancer Sci*. 2008 Mar;99(3):451-8.
- ⑩ Emi Y, Sumiyoshi Y, Oki E, Kakeji Y, Fukui Y, Maehara Y. Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL), the anti-angiogenic metabolites of oral fluoropyrimidine UFT, in patients with gastric cancer. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2007 Dec;98(12):418-24.
- ⑪ Morita M, Yoshida R, Ikeda K, Egashira A, Oki E, Sadanaga N, Kakeji Y, Ichiki Y, Sugio K, Yasumoto K, Maehara Y. Acute lung injury following an esophagectomy for esophageal cancer, with special reference to the clinical factors and cytokine levels of peripheral blood and pleural drainage fluid. *Dis Esophagus*. 2008;21(1):30-6.
- ⑫ Morita M, Yoshida R, Ikeda K, Egashira A, Oki E, Sadanaga N, Kakeji Y, Yamanaka T, Maehara Y. Advances in esophageal cancer surgery in Japan: An analysis of 1000 consecutive patients treated at a single institute. *Surgery*. 2008; :499-508
- ⑬ Yamamoto M, Baba H, Egashira A, Oki E, Ikebe M, Kakeji Y, Maehara Y. Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction in Japan. *Hepato-Gastroenterology* 2008; 55: 103-107
- ⑭ Morita M, Egashira A, Yoshida R, Ikeda K, Ohgaki K, Shibahara K, Oki E, Sadanaga N, Kakeji Y, Maehara Y. Esophagectomy in patient 80 years of age and older with carcinoma of the thoracic esophagus. *J Gastroenterology* 2008; 43:345-351
- ⑮ Koga T, Tokunaga E, Sumiyoshi Y, Oki E, Oda S, Takahashi I, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. Detection of circulating cancer cells in peripheral blood using real-time quantitative RT-PCR. *Hepatogastroenterology* 2008 55:1131-1135
- ⑯ 沖英次、掛地吉弘、前原喜彦 胃、十二指腸潰瘍 消化器外科レビュー2008 21-25
- ⑰ 沖英次、掛地吉弘、徳永えり子、前原喜彦 エビデンスに基づいたがん化学療法 臨床と研究 85 巻 3 号 328-331, 2008
- ⑱ 沖英次、徳永えり子、吉田倫太郎、塩谷聡子、掛地吉弘、前原喜彦 PI3K/AKTの機能と癌治療への応用について教えてください *Surgery frontier* Vol 15 No.2, 2008 88-90
- ⑲ 沖英次、掛地吉弘、吉田倫太郎、大垣吉平、芝原幸太郎、定永倫明、森田勝、前原喜彦 胃癌の集学的治療と化学療法 外科治療 Vo198 2008 109-115
- ⑳ 沖英次、掛地吉弘、大垣吉平、佐伯浩司、

森田勝、江見泰徳、前原喜彦
Oxaliplatinを用いた化学療法における
GSTP1 の塩基多型の関与 癌と化学療法
35 (7) :1094-1096 2008

〔学会発表〕(計 20 件)

- ① 第4回 Kyushu Oncology Forum 化学療法著効 切除か、継続か - 当科における対応 沖 英次、掛地吉弘、定永倫明、森田 勝、前原喜彦 福国際会議場 平成19年3月10日
- ② 第3回 日本消化管学会総会 於) 東京プリンスホテルパークタワー 平成19年2月1~2日 コアシンポジウム4 消化管癌の診断・治療戦略~消化管の分子機序解明に基づいた新しい治療戦略 p53 遺伝子変異からみた各消化管臓器におけるDNA障害と発癌 沖 英次、掛地吉弘、太田光彦、本坊拓也、江頭明典、定永倫明、森田 勝、前原喜彦
- ③ 第45回日本癌治療学会総会学術集会 2007年10月24日(水)~26日(金) 京都国際会館 パネルディスカッション: 外来化学療法の現状と問題点 当院における外来化学療法室の現状と問題点 沖 英次¹⁾、掛地吉弘¹⁾、大垣吉平¹⁾、今村一郎¹⁾、芝原幸太郎¹⁾、定永倫明¹⁾、森田 勝¹⁾、馬場英司²⁾、中西洋一³⁾、前原喜彦¹⁾ 1) 九州大学大学院 消化器・総合外科 2) 九州大学大学院 病態・修復内科 3) 九州大学大学院 胸部疾患研究施設
- ④ 第49回消化器病学会大会 (DDW-JAPAN) 平成19年10月19日 神戸国際会議場 進行・再発胃癌に対するTS-1/Docetaxel併用化学療法とその二次治療についての検討 沖 英次、掛地吉弘、大垣吉平、今村一郎、芝原幸太郎、定永倫明、森田 勝、前原喜彦
- ⑤ 第61回日本食道学会学術集会: 平成19年6月21日(木)~22日(金) パシフィコ横浜 一般演題ポスター 食道癌におけるp53異常の意義—遺伝子変異スペクトラムの解析と他臓器癌との比較 沖英次、森田勝、江頭明典、岡田敏子、増田隆伸、池田圭介、吉田倫太郎、太田光彦、本坊拓也、定永倫明、掛地吉弘、前原喜彦
- ⑥ 第16回癌病態治療研究会 ホテル日航東京 一般講演 癌におけるAKT/PI3K系シグナル伝達系の活性化と抗がん剤耐性 沖 英次、掛地吉弘、大垣吉平、芝原幸太郎、塩谷聡子、徳永えり子、定永倫明、森田 勝、前原喜彦
- ⑦ 第66回日本癌学会総会学術総会 2007年10月3日(水)~5日(金) パシフィコ横浜 ポスター The difference p53 abnormalities between cancer of the upper and lower digestive tract E. Oki, Y. Kakeji, K. Ohgaki, S. Shiotani, I. Imamura, K. Shibahara, R. Yoshida, Egashira, N. Sadanaga, M. Morita, Y. Maehara
- ⑧ 第62回 7月18日~20日 消化器外科学会総会 京王プラザホテル シンポジウム p53 遺伝子変異スペクトラムからみた消化管癌における治療戦略 沖英次、掛地吉弘、森田 勝、吉田倫太郎、池田圭介、太田光彦、本坊拓也、江頭明典、定永倫明、前原喜彦
- ⑨ 第40回 制癌剤適応研究会 横浜 月日 一般口演 抗癌剤の副作用を予測するSNP(single nucleotide polymorphism)の同定と感受性を規定するシグナル伝達因子の検討 沖 英次、掛地吉弘、岡田敏子、増田隆伸、池田圭介、吉田倫太郎、徳永えり子、太田光彦、本坊拓也、江頭

- 明典、定永倫明、森田 勝、前原喜彦
- ⑩ 平成 19 年度九州大学生活習慣病COE国際シンポジウム 平成 19 年 11 月 6 日(水)九州大学医系キャンパスコラボステーション 2 階 The spectrum of mutation and the frequency of allelic deletion of the p53 gene in gastrointestinal cancer : The difference between the upper and lower digestive tract Eiji Oki, Maehara Yoshihiko
- ⑪ 2007 American Society of Clinical Oncology annual meeting Chicago Akt-mediated YB-1 phosphorylation induces resistance to anti-cancer drugs for the treatment of gastric cancer Authors: E. Oki, Y. Kakeji, M. Ohata, H. Honboh, E. Tokunaga, A. R. Yoshida, Egashira, N. Sadanaga, M. Morita, K. Taguchi, M. Kuwano, Y. Maehara
- ⑫ 2008 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium General Session III Translation Research The spectrum of mutation and the frequency of allelic deletion of the p53 gene in gastrointestinal cancer : The difference between the upper and lower digestive tract Eiji Oki*, Yoshihiro Kakeji, Kippei Ohgaki, Kotaro Shibahara, Imamura Ichiro Noriaki Sadanaga, Masaru Morita, and Yoshihiko Maehara
- ⑬ 44th Annual meeting of American Society of Clinical Oncology (ASCO) Chemosensitivity and survival in gastric cancer patients with microsatellite instability Eiji Oki, Yoshihiro Kakeji, Kippei Ohgaki, Kotaro Shibahara, Imamura Ichiro Satoko Shiotani, Noriaki Sadanaga, Masaru Morita, and Yoshihiko Maehara
- ⑭ 第 108 回日本外科学会 平成20年5月 15 日 (木) ~ 17 日 (土) パネルディスカッション スキルス胃癌発生の分子背景と新しい治療戦略に関する基礎的検討 沖 英次、吉田倫太郎、掛地吉弘、安藤幸滋、杉山雅彦、岡田敏子、増田隆伸、大垣吉平、今村一郎、塩谷聡子、芝原幸太郎、定永倫明、森田勝、前原喜彦
- ⑮ 第 62 回日本食道学会学術集会 平成 19 年 6 月 21 日 (土) ~ 22 日 (日) 一般演題「食道癌におけるp53 蛋白発現とp53 遺伝子解析の意義」沖英次、森田勝、安藤幸滋、杉山雅彦、増田隆伸、吉田倫太郎、今村一郎、大垣吉平、芝原幸太郎、定永倫明、掛地吉弘、前原喜彦
- ⑯ 第 4 回 日本消化管学会総会 平成 19 年 2 月 7~8 日 コアシンポジウム4 消化管癌の診断・治療戦略-臨床応用に向けた分子生物学的技術・技法 消化管癌におけるp53 変異とマイクロサテライト不安定性解析の臨床応用 沖 英次、掛地吉弘、吉田倫太郎、岡田敏子、増田隆伸、大垣吉平、今村一郎、芝原幸太郎、定永倫明、森田 勝、前原喜彦
- ⑰ 第46回日本癌治療学会総会学術集会 2008年10月30日(木)~11月1日(土)一般口演 転移性大腸癌の治療戦略における肝障害の新しい評価法 沖 英次、大垣吉平、武富紹信、森田 勝、掛地吉弘、藤也寸志、前原喜彦
- ⑱ 第94回日本消化器病学会 平成20年5月 8日~5月10日 消化器癌におけるp53 変異解析とマイクロサテライト不安定性解析の診断的意義 沖 英次、掛地吉弘、趙岩、吉田倫太郎、岡田敏子、増田隆伸、大垣吉平、今村一郎、芝原幸太郎、定永

倫明、森田 勝、前原喜彦

- ⑱ 第41回制がん剤適応研究会 胃癌におけるマイクロサテライト不安定性と抗癌剤感受性に関する検討 沖 英次、掛地吉弘、杉山雅彦、安藤幸滋、岡田敏子、増田隆伸、吉田倫太郎、今村一郎、大垣吉平、芝原幸太郎、定永倫明、森田 勝、前原喜彦
- ⑳ 2008年 胃癌学会 ゲノム不安定性からみた胃癌の分子背景の検討 沖 英次、掛地吉弘、杉山雅彦、安藤幸滋、岡田敏子、増田隆伸、吉田倫太郎、今村一郎、大垣吉平、芝原幸太郎、定永倫明、森田勝、前原喜彦

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

沖 英次 (OKI EIJI)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター
一臨床研究部・統括診療部・医師

研究者番号：70380392

(2)研究分担者(平成19年度)

定永 倫明 (NORIAKI SADANAGA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20304826

(3)連携研究者

なし