

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 29 日現在

機関番号：86301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791266

研究課題名（和文） ホスファチジルイノシトール三キナーゼ遺伝子変異が乳癌薬物治療に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effect of *PIK3CA* mutation to anti-cancer drugs of breast cancer.

研究代表者

原 文堅（FUMIKATA HARA）

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター 臨床研究センター 医師

研究者番号：00507717

研究成果の概要（和文）：*PIK3CA*遺伝子変異は細胞の癌化、薬効耐性に関与するとされる。我々は乳癌薬物治療の代表的抗がん剤であるドセタキセル(DTX)とタモキシフェン(TAM)について検討した。DTX単剤による乳癌術前化学療法を施行された57症例の*PIK3CA*遺伝子変異解析を行い臨床病理因子、DTXの効果との関係を検討したが、DTXの効果と*PIK3CA*遺伝子変異の有無との間に有意な相関は認められなかった。次に補助療法でタモキシフェン投与のみがなされた132症例の遺伝子変異解析を同様に行ったが、Exon9 *PIK3CA*変異があると予後良好である傾向が見られたが有意差には至らなかった。今回の検討により*PIK3CA*遺伝子変異はDTX、TAMの耐性の原因とはならないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*PIK3CA* mutation plays a critical role in the tumorigenesis and resistance of anti-cancer drugs. We evaluated whether *PIK3CA* mutation would contribute to resistance of docetaxel or tamoxifen in this study. First, we analyzed association between *PIK3CA* mutation and efficacy of docetaxel in patients who received neoadjuvant docetaxel chemotherapy, but *PIK3CA* mutation was not associated with sensitivity to docetaxel. Next, we sought to examine interaction between *PIK3CA* mutation and breast cancer outcomes in patients who are treated with adjuvant tamoxifen alone. In our homogenous dataset of patients treated with tamoxifen alone, the incidence of *PIK3CA* mutation was 34.1% as consistent to previous studies. Exon9 *PIK3CA* mutation had a trend to favorable prognosis, in contrast with Exon20 *PIK3CA* wild type. These two hot spot sites could be different prognostic factor. This may help stratify patients likely to benefit endocrine therapy alone, but our dataset is too small to conclude. Therefore, further studies are needed to confirm this association.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌、薬剤耐性、*PIK3CA* 遺伝子変異、ドセタキセル、タモキシフェン

1. 研究開始当初の背景

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) シグナル経路は細胞の生存に関して重要な経路であり、この経路の遺伝子的異常が細胞の癌化に大きな役割を果たしていることがこれまで数多くの研究により明らかとなってきた。PI3K は p110 catalytic domain と p85 regulatory subunit よりなる heterodimeric lipid kinase であり、主に 2 つの経路により PI3K は活性化を受けることが分かっている。一つは細胞膜に存在する Growth factor receptor (GFR) の Tyrosine kinase が PI3K をリン酸化する経路。二つ目は RAS が PI3K の GTPase-Ras binding site に結合し、活性化する経路である。PI3K の活性化はさらに下流に存在する Akt を活性化し、細胞増殖促進、アポトーシス抑制、転移、血管新生などに影響を及ぼす。

近年、この癌進展に大きな影響を及ぼしている PI3K の catalytic domain (遺伝子コードは *PIK3CA*) に遺伝子変異が高率に起こっていることが報告された。この遺伝子変異は細胞の癌化に影響を及ぼし、下流のリン酸化活性を促進する恒常的活性化変異であることが分かった。つまり、*PIK3CA* の遺伝子変異は細胞増殖、アポトーシス抑制、転移・血管新生促進に働きかける可能性があるということの意味する。

これまでのエビデンスの蓄積より乳癌においてこの遺伝子変異は 10-40% と高率に見られることが分かっている。また、この変異はいわゆる”変異 hotspot” といわれる helical domain をコードする exon9 (E542K、E545G) と kinase domain をコードする exon20 (H1047R) に見られ、この 3 つの遺伝子変異で 90% を占めることがわかっている。In vitro の実験ではこれら 3 つの遺伝子変異は下流の Akt を恒常的に活性化し、機能的に active mutation であることが示唆されている。Barbareschi M らは 163 例の乳がん術後サンプルを用いて Direct sequencing 法による *PIK3CA* の遺伝子変異を検索しており、さらに臨床病理学的因子、予後との関係を検討している。その中で彼らは Exon9 の遺伝子変異は 53% の症例に見られ、Exon20 の遺伝子変異は 47% の症例に見られたことを報告している。また Maruyama N らの 188 例の日本人乳癌サンプルの検討では、*PIK3CA* 遺伝子変異は 29% の症例に見られたと報告している。

2. 研究の目的

乳癌治療における最大の問題は薬剤耐性で

あり、これを打開することは個別化治療、乳癌完治につながると考えられる。PI3K-Akt 経路は種々の癌治療薬剤耐性に関与しているとの報告が多数あり、この経路を活性化する *PIK3CA* の遺伝子変異の存在は耐性機序の一因となっている可能性がある。タキサン系薬剤は乳癌治療における Key drug となる抗癌剤である。我々は PI3K/Akt 経路が Taxane 系薬剤耐性に関与することをこれまでに報告してきたが、*PIK3CA* の遺伝子変異の存在は恒常的な Akt の活性化により Taxane 耐性につながると考えられる。また、ホルモン治療は Estrogen receptor (ER) 陽性乳癌の非常に強力な武器であるが、少なからず抵抗を示す乳癌が存在する。ホルモン治療抵抗性の機序に関する報告は多く存在するが、その一つに GFR シグナルとのクロストークがある。これは GFR からのシグナルカスケードによりリン酸化された Akt がリガンドであるエストロゲン非依存的に、ER のセリン残基をリン酸化し転写活性能が上昇する。Akt の活性化する *PIK3CA* の遺伝子変異はホルモン治療抵抗性となると可能性がある。本研究の目的は *PIK3CA* の遺伝子変異が上記 2 つの薬剤耐性の機序となっている可能性を検討するものである。

3. 研究の方法

ドセタキセル (DTX) の耐性機序解明のため、我々はドセタキセル単剤による乳癌術前化学療法を施行された症例 57 例における治療開始前針生検パラフィン包埋標本を用いて *PIK3CA* 遺伝子変異の測定をおこなった。DNA を抽出には QIAampDNA を使い、Hotspot 近傍 Primer を以下の如く設計し PCR を行った。exon 9 (5'-AAT CAT CTG TGA ATC CAG AGG-3'、5'-ATG CTG AGA TCA GCC AAA T-3') exon 20 (5'-CAT TTG AGC AAA GAC CTG AAG G-3'、5'-TGA GCT TTC ATTTTC TCA GTT ATC-3') PCR 増幅産物を、ダイレクトシーケンス法にて遺伝子変異解析し、臨床病理データ、Docetaxel 感受性との関係を検討した。

タモキシフェン (TAM) の耐性機序解明のため、1999/1 から 2002/3 まで当院で手術された乳癌補助療法でタモキシフェン投与のみを受けた患者 132 例を対象として検討した。新鮮凍結サンプルから QIAampDNA を使い、DNA を抽出し、PCR 増幅産物を上記同様シーケンス法にて変異を解析した。*PIK3CA* 遺伝子変異と各種因子、生存期間の関係を解析した。

PIK3CA の遺伝子変異と臨床病理学的因子の解析は、 χ 二乗検定、t-test または

Mann-Whitney test により行う。*PIK3CA* の遺伝子変異の有無と予後との関係は log-rank test および Cox proportional hazard model を用いて解析した。

4. 研究成果

ドセタキセル単剤による乳癌術前化学療法を施行された症例 57 例中 8 例 (14.0%) に *PIK3CA* 遺伝子変異を認めた。内訳は Exon9 に 3 例 (5.3%)、Exon20 に 5 例 (8.8%) であった。*PIK3CA* 遺伝子変異の有無と閉経状況、治療前腫瘍径・リンパ節転移・核グレード、ホルモン受容体、HER2 状況には有意な相関は見られなかった。また、ドセタキセルによる病理学的奏効割合に関しても *PIK3CA* 遺伝子変異の有無との間に有意な相関は認められなかった。今回の解析の結果は我々の仮説と異なるものであった。この原因としてサンプルサイズの不足、経年変化した可能性のあるパラフィンブロックからの DNA 抽出し、ダイレクトシーケンス法を用いたことにより腫瘍細胞量が少ないサンプルでは偽陰性となった可能性が考えられた。しかしながら、MD Anderson Cancer Center の Liedtke らの報告でもアンストラサイクリン、タキサン系薬剤の感受性と *PIK3CA* 遺伝子変異に相関関係を見出しておらず我々の同様の結果であったことを考えると、*PIK3CA* 遺伝子変異は抗がん剤耐性機序には関与しないことが示唆される。

次にタモキシフェン (TAM) の耐性機序解明のため、補助療法でタモキシフェン投与のみがなされた 132 症例の術後凍結標本を用い、ダイレクトシーケンス法にて遺伝子変異解析し、臨床病理因子、生存期間の関係を検討した。結果は 45/132 (34.1%) 例に変異が認められた。内訳は Exon9 が 13.6%、Exon20 が 20.5% であった (Fig. 1)。*PIK3CA* 遺伝子変異の有無と臨床病理学的因子 (閉経状況、腫瘍径、腋窩リンパ節転移有無、核グレード、脈管侵襲、PgR 発現状況) に有意な相関は認めなかった。予後に関しては、*PIK3CA* 遺伝子変異を持つ患者であっても、TAM 単剤投与により予後不良ではなかった (Fig. 2)。変異部位別に予後を検討した結果、Exon9 *PIK3CA* 変異があると予後良好である傾向が見られたが有意差には至らなかった (Fig. 3)。これまでの報告では、ER 陽性 *PIK3CA* 変異乳癌の予後は良いとの報告があるが、患者治療背景が様々であり、我々の検討は TAM 単剤投与の患者のみでの検討である点が異なる。また変異部位別の検討では Kalinsky らは Exon20 の Kinase domain 変異において予後が良好であると報告している。我々の報告はこの点に関しても異なるが、理由として ER 陽性のみが対象でない、人種、病理学的背景が異なるなどが考えられる。

本研究から *PIK3CA* 遺伝子変異は DTX、TAM の耐性の原因となるという仮説は証明されなかった。しかしながら、本検討はサンプルサイズが小さく、今後さらに対象を増やし検討を重ねる必要があると思われる。

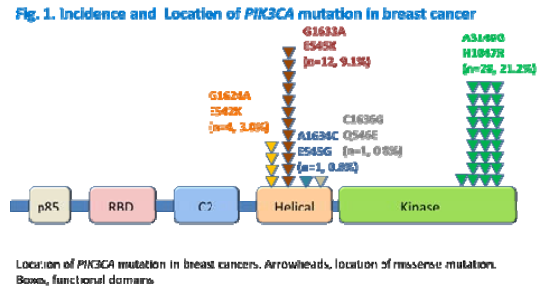


Fig. 2. Disease-free Survival according to *PIK3CA* mutation status

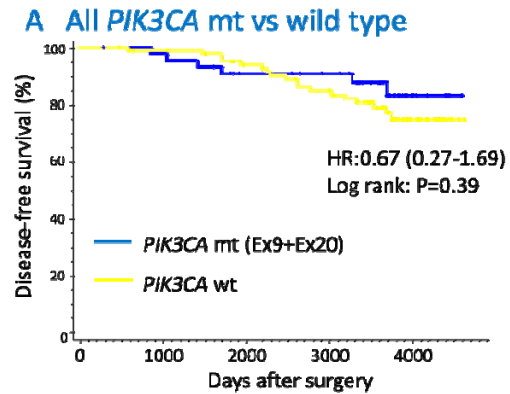
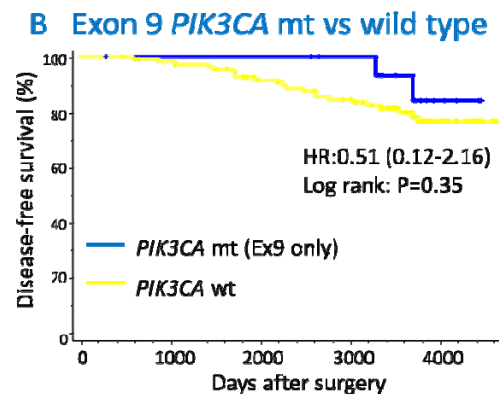


Fig. 3. Disease-free Survival according to Exon 9 *PIK3CA* mutation status



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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Fumikata Hara, Sachiko Kiyoto, Mina Takahashi, Daisuke Takabatake, Seiki Takashima, Kenjiro Aogi, Shozo Ohsumi. Breast Cancer with *PIK3CA* Mutations Associated with a Favorable Prognosis in Patients Treated with Tamoxifen Alone. 8th European Breast Cancer Conference. March 22, 2012. Vienna, Austria.
- ② 原文堅、清藤佐知子、高橋三奈、高嶋大典、高嶋成輝、青儀健二郎、大住省三. ドセタキセル単剤術前化学療法を施行された乳癌患者における *PIK3CA* 変異と治療効果の関係、第 8 回日本乳癌学会中国四国地方会、平成 23 年 9 月 10 日、香川県高松市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原文堅 (FUMIKATA HARA)

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター 臨床研究センター 医師

研究者番号：00507717

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：