

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462594

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌におけるPI3K阻害薬の至適併用療法選択と感受性予測マーカー探索

研究課題名(英文) Development of combination therapy using PI3K inhibitor and its predictive biomarker in clear cell carcinoma of the ovary

研究代表者

大石 徹郎(Oishi, Tetsuro)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80359877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：標準的化学療法に抵抗性を示すことが知られている卵巣明細胞腺癌において、PI3K-Akt-mTOR 経路およびARID1A蛋白について検討した。腫瘍組織検体を用いた検討では、PIK3CA遺伝子変異を有する症例が変異のない症例と比して有意に予後不良であること、I/II期症例ではARID1A蛋白発現陰性例の予後が陽性例と比して有意に予後不良であり、多変量解析の結果、独立予後因子となることが明らかとなった。培養細胞を用いた検討では、PI3K/mTOR阻害剤NVP-BE2235によるリン酸化Akt発現の低下と細胞増殖抑制が示され、マウス移植モデルにおいても腫瘍の発育抑制が認められた。

研究成果の概要(英文)： We investigated PI3K-Akt-mTOR pathway molecules and ARID1A expression in clear cell carcinoma of the ovary (CCC), which is known to be resistant to standard chemotherapy. The study using tumor tissue specimens indicated that PIK3CA mutant cases showed significantly worse overall survival than wild-type cases. The 5-year survival rate for FIGO stage I or II patients with negative tumor expression of ARID1A was lower than those with positive tumor expression of ARID1A. Multivariable analysis revealed that ARID1A expression was an independent prognostic factor in stage I or II CCC patients. In vitro study revealed that treatment with the PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BE2235 suppressed p-Akt expression and cell proliferation in CCC cells. BE2235 significantly inhibited tumor growth in mice bearing OVI5E and TU-OC-1 cell tumors.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 明細胞腺癌 PI3K

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮性卵巣癌に対するタキサン化合物とプラチナ製剤との併用化学療法は高い奏効率を示し、その短期予後を改善した。しかしながら、再発卵巣癌の多くは化学療法に抵抗性を示し、長期予後はいまだ不良である。

近年増加傾向にある卵巣明細胞腺癌は本邦における上皮性卵巣癌の約 15-20%を占め、標準的的化学療法に抵抗性を示すことが知られている。そのため、進行例の予後は漿液性腺癌に比して極めて不良である。したがって、その細胞生物学的特性に基づいた新たな治療法の開発が切望されている。

(2) PI3K 経路は卵巣癌の約 70%で活性化されているとされ、特に PIK3CA 遺伝子変異は明細胞腺癌で 33%と他の組織亜型に比して高頻度であることが報告されている。このことから、明細胞腺癌においては PI3K-Akt-mTOR 経路を標的とする分子標的治療の開発が期待される。

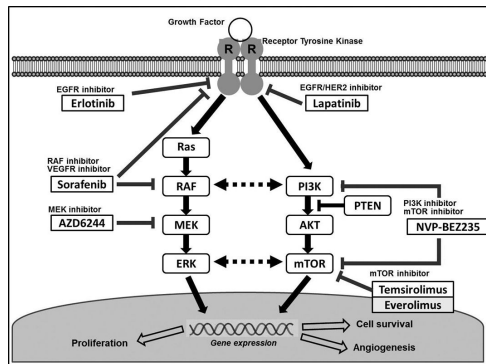


図1 細胞内シグナル伝達経路と分子標的治療薬

2. 研究の目的

(1) 卵巣明細胞腺癌および漿液性腺癌組織を対象として、PI3K/mTOR 経路および ARID1A の発現異常を検索し、遺伝子プロファイルの違いを検索する。

(2) 卵巣明細胞腺癌細胞を対象として、PI3K- Akt -mTOR 経路を標的とした阻害剤（低分子化合物）の細胞増殖抑制効果を明らかにする。さらに、殺細胞型抗がん剤あるいは他の分子標的治療薬との併用効果を検討する。

以上の成績から、卵巣明細胞腺癌に対する PI3K- Akt -mTOR 経路を標的とする分子標的治療薬を用いた新たな治療法開発の可能性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PI3K- Akt -mTOR 経路に着目した卵巣明細胞腺癌の遺伝子プロファイル

岩手医科大学産婦人科、自治医科大学産科婦人科および鳥取大学医学部産科婦人科で治療を行い、同意が得られた卵巣明細胞腺癌 112 例および漿液性腺癌 108 例を対象とした。手術時に採取した腫瘍組織検体を用いて、PIK3CA、PTEN、リン酸化(p-)Akt、p-mTOR、

p-p70S6K、p-4E-BP1 ならびに明細胞腺癌の発癌への関与が示唆されている ARID1A 蛋白発現を免疫組織化学で検索した。染色強度は Remmele and Stegner の immunoreactive score (IRS) を用いてスコアリングし、PTEN については IRS 1-12 点を発現陽性、それ以外の蛋白については 4-12 点を陽性と定義した。凍結腫瘍組織の得られた明細胞腺癌 31 例および漿液性腺癌 36 例では、レーザーマイクロダイセクションを用いて腫瘍部分の DNA を抽出し、ダイレクトシークエンス法により PIK3CA 遺伝子の変異解析 (exon9, 20) を行い、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により遺伝子増幅の有無も検討した。生存率は Kaplan-Meier 法で、有意差は log-rank 法を用いて検討するとともに、Cox の比例ハザードモデルを用いて予後因子解析を行った。

(2) PI3K- Akt -mTOR 経路を標的とした阻害剤の卵巣明細胞腺癌における増殖抑制効果

卵巣明細胞腺癌由来細胞株 8 株 (KK、KOC-7C、OVTOKO、OVISE、OVMANA、RMG-I、SMOV-2、TU-OC-1) および漿液性腺癌由来細胞株 5 株 (KF、KOC-2S、TU-OS-3、TU-OS-4、SHIN-3) を用いた。ダイレクトシークエンス法により PIK3CA 遺伝子 (exon9, 20) および KRAS 遺伝子 (exon2, 3) の変異解析を行った。PI3K-Akt-mTOR 経路の蛋白発現を western blot 法にて検討した。また、mTOR 阻害剤 temsirolimus および PI3K/mTOR 阻害剤 NVP-BE235 を用いて、明細胞腺癌株に対する細胞増殖抑制効果を WST-8 assay により検討するとともに、BEZ235 添加による細胞周期の変化とアポトーシスの有無を flow cytometry および Annexin V 染色により検索した。ヌードマウス皮下移植モデルを作成し、BEZ235 連日経口投与による腫瘍発育抑制の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) PI3K- Akt -mTOR 経路に着目した卵巣明細胞腺癌の遺伝子プロファイル

対象症例の FIGO 進行期は明細胞腺癌が I 期 75 例、II 期 12 例、III 期 18 例、IV 期 7 例、漿液性腺癌が I 期 24 例、II 期 5 例、III 期 60 例、IV 期 19 例であった。

核内 p-Akt 蛋白発現は明細胞腺癌で 21% (25/112) と漿液性腺癌 (6%、6/108) に比して有意に高頻度であり、PTEN 蛋白発現は明細胞腺癌の 71% (80/112) と漿液性腺癌 (86%、93/108) に比して有意に低頻度であった。明細胞腺癌における PIK3CA 蛋白発現は 27% (30/112) の症例で、漿液性腺癌では 35% (38/108) の症例で観察され、差を認めなかった。p-mTOR、p-S6K、p4E-BP1 蛋白も同様に組織型での差を認めなかった。これらの蛋白発現と進行期や予後との間に関連

は見られなかった。

PIK3CA 遺伝子変異は明細胞腺癌の 22% (7/32) 漿液性腺癌の 14% (5/36) で認められ、明細胞腺癌においては変異を有する症例の予後は有意に不良であった。一方、PIK3CA 遺伝子の増幅は明細胞腺癌の 33% (10/31) 漿液性腺癌の 33% (12/36) で認められ、いずれの組織型においても増幅の有無と予後との間に関連は見られなかった。

ARID1A 蛋白発現は明細胞腺癌の 39% (44/112) の症例で陰性であった。ARID1A 発現と進行期との間に関連はみられなかったが、I/II 期症例では ARID1A 陰性例の予後は有意に不良であった (図 1)。多変量解析の結果、ARID1A 蛋白発現は I/II 期明細胞腺癌における独立予後因子となった。

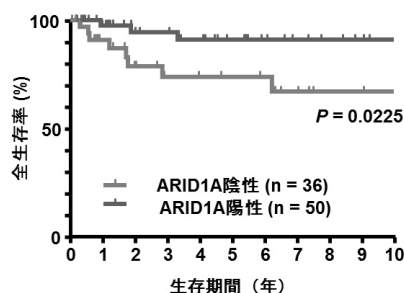


図 2 I/II 期明細胞腺癌における ARID1A 蛋白発現と生存率

(2) PI3K- Akt -mTOR 経路を標的とした阻害剤の卵巣明細胞腺癌における増殖抑制効果

明細胞腺癌細胞では、BEZ235 に対する IC50 値は漿液性腺癌細胞と比して著明に低値であった。また明細胞腺癌細胞において、Temsirrolimus に対する IC50 値は BEZ235 と比して高値であった。明細胞腺癌細胞 8 株中 4 株で PIK3CA 遺伝子変異 (exon9、20) を認めた (表)。

表 卵巣癌細胞株における PI3K/mTOR 阻害剤感受性と遺伝子変異

細胞株	由来組織型	IC50値 (nM)		EGFR			KRAS		PIK3CA	
		BEZ235	Temsirrolimus	ex19	ex21	ex2	ex3	ex9	ex20	
OVISE	明細胞腺癌	44	9122	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
SMOV-2	明細胞腺癌	64	8924	wt	wt	wt	wt	wt	3141A>A/T	
KK	明細胞腺癌	74	9229	wt	wt	wt	wt	1634A>A/C	wt	
TU-OC-1	明細胞腺癌	131	7224	wt	wt	wt	wt	1624G>G/A	wt	
OVTKO	明細胞腺癌	534	12776	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
KOC-7c	明細胞腺癌	600	9779	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
OVIANA	明細胞腺癌	641	17550	wt	wt	wt	wt	1634A>T	wt	
RMG-1	明細胞腺癌	777	4045	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
KF	漿液性腺癌	779	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
KOC-2s	漿液性腺癌	989	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
TU-OS-3	漿液性腺癌	1004	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
TU-OS-4	漿液性腺癌	3951	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	
SHIN-3	漿液性腺癌	25400	wt	wt	34G>A	wt	wt	wt	wt	

全ての明細胞腺癌細胞株で pAkt あるいは pmTOR 蛋白発現を認めた。OVISE 細胞では BEZ235 曝露により pAkt 発現の減弱が観察されたが、Temsirrolimus 曝露では変化を認めなかった。BEZ235 曝露 (10 or 100 nM) により細胞周期の G1 期停止がみられ、より高濃度の曝露 (1 or 5 μM) ではアポトーシス細胞比率の増加も観察された。

皮下移植モデルにおいて、BEZ235 投与により腫瘍の発育は有意に抑制された (図 3)。

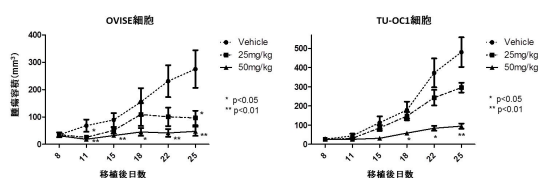


図 3 BEZ235 投与による移植腫瘍発育の抑制

以上の成績から、難治性卵巣癌の一つである明細胞腺癌において PI3K-mTOR 経路を標的とした新規治療戦略開発の可能性が示された。

## 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 4 件)

Itamochi H, Oumi N, Oishi T, Shoji T, Fujiwara H, Sugiyama T, Suzuki M, Kigawa J, Harada T. Loss of ARID1A expression is associated with poor prognosis in patients with stage I/II clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Clin Oncol*, 2015, 20(5):967-73. doi: 10.1007/s10147-015-0811-x. (査読有)

Oishi T, Itamochi H, Kudoh A, Nonaka M, Kato M, Nishimura M, Oumi N, Sato S, Naniwa J, Sato S, Shimada M, Kigawa J, Harada T. The PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 reduces the growth of ovarian clear cell carcinoma. *Oncol Rep*, 32, 2014, 553-558, doi: 10.3892/or.2014.3268. (査読有)

Kudoh A, Oishi T, Itamochi H, Sato S, Naniwa J, Sato S, Shimada M, Kigawa J, Harada T. Dual inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach for mucinous adenocarcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*, 24, 2014, 444-453, doi: 10.1097/IGC.0000000000000091 (査読有)

Itamochi H, Kato M, Nishimura M, Oumi N, Oishi T, Shimada M, Sato S, Naniwa J, Sato S, Nonaka M, Kudoh A, Terakawa N, Kigawa J, Harada T. Establishment and characterization of a novel ovarian clear cell adenocarcinoma cell line, TU-OC-1, with a mutation in the PIK3CA gene. *Hum Cell*, 26, 2013, 121-127, doi: 10.1007/s13577-013-0062-y (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

大石徹郎、板持広明、近江奈央、加藤みさき、庄子忠宏、嵯峨 泰、藤原寛行、島田宗昭、杉山 徹、鈴木光明、紀川純三、原田 省、上皮性卵巣癌における PI3K-Akt-mTOR 経路の系統的解析と臨

床的意義の検討、第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会、2014 年 4 月 19 日、東京国際フォーラム（東京・千代田区）  
Oishi T, Itamochi H, Oumi N, Kato N, Shoji T, Saga Y, Fujiwara H, Shimada M, Sugiyama T, Suzuki M, Kigawa J, Harada T. Comprehensive analysis of the PIK3-Akt-mTOR pathway in epithelial ovarian carcinoma. 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research、2014 年 4 月 5 日、San Diego（United States of America）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大石 徹郎（OISHI, Tetsuro）  
鳥取大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80359877

### (2)研究分担者

板持 広明（ITAMOCHI, Hiroaki）  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20314601

島田 宗昭（SHIMADA, Muneaki）  
鳥取大学・医学部・講師  
研究者番号：40362892

佐藤 慎也（SATO, Syinya）  
鳥取大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10423261

千酌 潤（CHIKUMI, Jun）  
鳥取大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：70467702

佐藤 誠也（SATO, Seiya）  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30621007

原田 省（HARADA, Tasuku）  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：40218649