

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893229

研究課題名(和文) 子宮体癌におけるCDK4/6阻害薬の有効性の検討

研究課題名(英文) Effect of CDK4/6 inhibitor in endometrial cancer

研究代表者

池田 悠至 (Ikeda, Yuji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80713453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：CDK4/6の活性および発現の同時測定法およびKi67の発現を検討した所、術後抗癌剤を使用しない低リスク群の患者における非常に強い予後因子であった。CDK4/6阻害薬は他癌腫と比較し子宮体癌細胞株における効果が弱く、p21を介してCDK4/6を抑制すると同時にアポトーシスに關するTP53に着目し放射線照射を行った所、TP53変異株において細胞死により多くの線量を必要とした。また放射線照射によりHIF-1 $\alpha$ の発現増強を認め、PI3K/mTOR同時阻害薬であるNVP-BE235の併用にてその発現は抑制され、VEGFAの発現においても著明な減退を認めた。

研究成果の概要(英文)：The result of combination both CDK4/6 activity/expression and Ki67 expression was significantly correlated with the prognosis in patients with low risk endometrial cancer. However, the efficacy of CDK4/6 inhibitor to the endometrial cancer celllines was inferior to the other cancer types. Because not only CDK4/6 is suppressed by TP53 via p21, but also TP53 is related with apoptosis, we focused on TP53 and irradiation in endometrial cancer. Our result indicated mutation of TP53 could serve a biomarker to predict radioresistance, a dual PI3K/mTOR inhibitor sensitized cells to irradiation, and suppression of HIF1 $\alpha$ , which was regulated at least in part by the PI3K/mTOR pathway, enhanced the cytotoxic effect of irradiation.

研究分野：婦人科癌

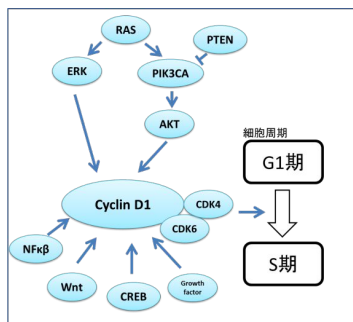
キーワード：CDK4/6 子宮体癌 PI3K経路 TP53 放射線治療

### 1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は近年、先進国の女性の生殖器癌の中で最も罹患率が高い疾患である。エストロゲン依存性の有無により、Type および Type に分類され、全症例数の 80% を占めると言われる Type には「エストロゲンの持続刺激」が関与している。そのため本邦では晩婚化や少子化、生活習慣病の増加によって今後さらに罹患率が増加することが懸念されている。

子宮体癌の治療は主に手術療法を行う。摘出検体の筋層浸潤、脈管侵襲、分化度、Stage といった臨床病理学的所見により低リスク、中リスク、高リスク群に分類し術後化学療法が施行される。しかし化学療法が施行されなかった群においても 10-15% の症例に再発を認め、**再発後の 5 年生存率は 15% 程度と極めて低い。既存の治療法と異なる高い奏効率の治療法の開発が責務**である

発癌の原因は一昔前、喫煙や食生活など、抽象的な環境因子を中心に語られてきた。しかし近年になり、様々な遺伝子の発現異常が蓄積していくことで浸潤、転移などの悪性形質を獲得する事が明らかとなってきた。我々は今までに子宮体癌に RAS/PI3K 経路の主要遺伝子である KRAS、PIK3CA、PTEN、AKT1 およびその下流の カテニン (CTNNB1) の遺伝子変異を高率に有している事を発見、報告してきた (Oda K et al. Can Res 2005)



(Oda K et al. Can Res 2008) (Shoji K et al. Br J Cancer 2009) (Shoji K, Ikeda Y et al. Plos one 2012) (Ikeda Y, Oda K et al. Int J Gynecol Cancer, 2012)。

RAS/PI3K 経路からのシグナルは、Cyclin D1 に伝達される。Cyclin D1 は細胞周期に関わる重要なタンパク質であり、様々な因子からのシグナルを受け、Cyclin dependent kinase (CDK)4/6 と結合し、細胞周期を G1 期から S 期へと移行させ、細胞分裂を促進する。従って癌遺伝子の一つとして機能していると考えられるが、今までその遺伝子変異や予後との関連の報告は稀少である。申請者は組織検体を用い、子宮体癌の症例の中に**機能獲得型の Cyclin D1 (CCND1) の遺伝子変異**を有するものがあり、**非常に強い細胞増殖因子となる**事を発見した。(Ikeda et al. Oncol Rep. 2013 Aug;30(2):584-8)。

また、申請者は子宮体癌の臨床検体を用いて CDK4/6 の発現および活性が同時に計測可能なアッセイでその評価を行った。その結果、CDK4/6 の比活性値は他の病理学的因子との相関関係を持たない**独立予後因子**である事、及び**抗癌剤感受性の予測因子 (バイオマーカー)**である事を発見している。前述した上流シグナル (RAS/PI3K 経路) の高頻度の遺伝子変異、および細胞周期の key protein である事を考えると **Cyclin D1 および CDK4/6 は子宮体癌における治療ターゲットとなる可能性**がある。

CDK4/6 の阻害剤の一つである PD0332991 は乳癌にて臨床第 II 相試験が行われ、2012 年 12 月に開催された San Antonio Breast Cancer Symposium にて、アロマターゼ阻害薬であるレトゾール単剤投与群 (L) と比べ、**PD0332991 を併用した群 (LP) で著明に無病再発期間の中央値の延長が認められ** (L 群 7.5 カ月、LP 群 26.1 カ月、ハザード比 0.37、95% 信頼区間:0.21-0.63、 $p < 0.001$ )、新規治療法として大きな注目を集めており、年内に臨床第 III 相試験が開始される予定である。

子宮体癌における CDK4/6 阻害薬に関する

検討は未だ行われていないが、乳癌の結果、および前述した申請者らのデータより、**子宮体癌への CDK4/6 阻害薬は新規の治療戦略として大きな可能性を秘めていると考えられる。**

## 2. 研究の目的

子宮体癌における

**CDK4/6 の治療有効性を評価するバイオマーカーの同定**

**CDK4/6 阻害薬の有用性の検討**

**CDK4/6 阻害薬と既存抗癌剤との併用療法の有用性の検討**

を目的とした。

## 3. 研究の方法

Immunohistochemistry により、子宮体癌における Ki67 の発現とその予後を CDK4/6 の活性/発現とともに検討した。

細胞株における PD0332991 の効果を MTT assay にて評価した

細胞株に Irradiation を照射し、その細胞死を検討した

Western blotting により、PI3K pathway 関連の蛋白発現および HIF - 1 の発現を確認した。その際、SiRNA を用いたノックダウンによる検討も併用した。

## 4. 研究成果

**CDK4/6 の治療有効性を評価するバイオマーカーの同定**

バイオマーカー選定を目的とした CDK4/6 の発現、活性同時測定法 (C2P assay) では術後抗癌剤を施行しない (low risk) 群にて予後と有意に相関した (N=74, p=0.024)。細胞周期マーカーの 1 つと考えられている Ki67 との併用による測定結果の解釈を目的とし、Tissue micro array を作成し、Ki67 の組織免疫染色を行った。その結果、C2P assay 単独に比し、**Ki67 との統合解析では CDK4/6**

**specific activity (activity/expression) 高値かつ Ki67 high expression の群において、low risk 群にてより強い有意差が得られた (P=0.002)。** 本結果は CDK4/6 関連薬剤のバイオマーカーのみならず、**術後抗癌剤適応症例を決定する際のバイオマーカーとなる可能性**が示されており、今後更なる検討を行う予定となっている。

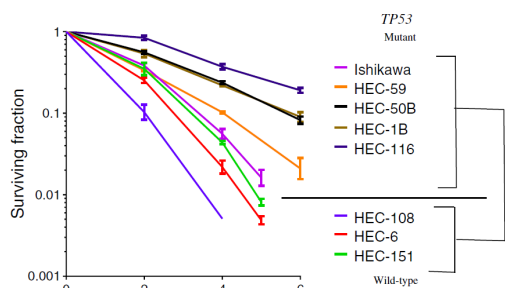
## CDK4/6 阻害薬の有用性の検討

子宮体癌細胞株 8 株において CDK4/6 阻害薬の Palbociclib を用い MTT assay を施行した。全ての細胞株で IC50 は 10 $\mu$ M 前後を記録し、1 $\mu$ M 未満のものは存在しなかった。これは**既報の他癌腫の細胞株の効果とは大きくかけ離れた結果であった。** 子宮体癌において CDK4/6 阻害薬が効果を示さない機序には、RAS/PI3K - CyclinD1 経路に加え、別の機序が深く関与している可能性が考えられた。

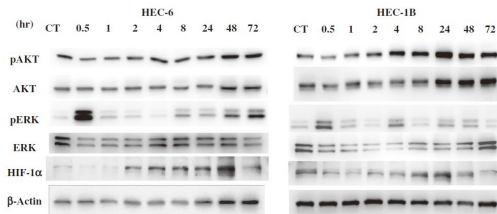
## 子宮体癌における TP53 の関与、および治療法の検討

我々は子宮体癌に 15%の変異を認める癌抑制遺伝子の TP53 に着目した。TP53 は p21 を介して CDK4/6 を抑制する。また修復不能な DNA 損傷に対し細胞のアポトーシス誘導を行う。つまり TP53 の失活は癌細胞の CDK4/6 経路の活性のみならず、アポトーシスの失活を意味し、CDK4/6 阻害剤が効果を示さない原因の 1 つの可能性があると考えられた。

子宮体癌細胞株 8 株に対して放射線照射での DNA 損傷によるアポトーシスを検討した所、**TP53 変異株群において有意に多くの線量を必要とした。**

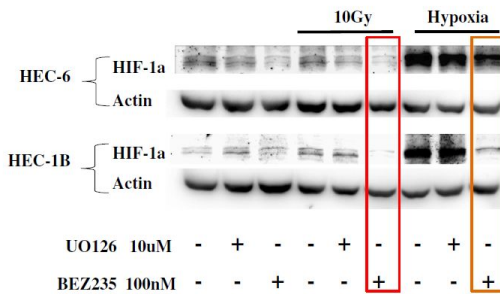


また放射線照射により低酸素誘導物質の HIF-1 の発現の増強を認めた。



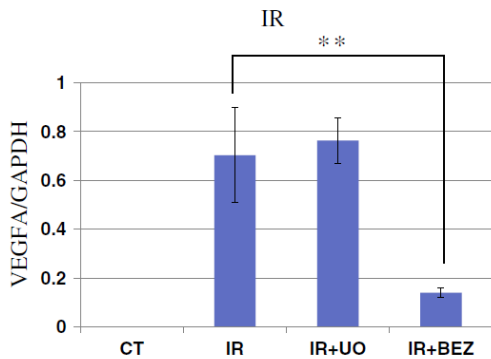
(Gynecol Oncol. 2015 Apr 22. (15)00835-5)

HIF-1 は癌の進展に不可欠な血管造成因子である VEGF を誘導する因子であり、PI3K/mTOR 同時阻害薬である NVP-BE235 を放射線に併用した所、その発現は抑制されていた。



(Gynecol Oncol. 2015 Apr 22. (15)00835-5)

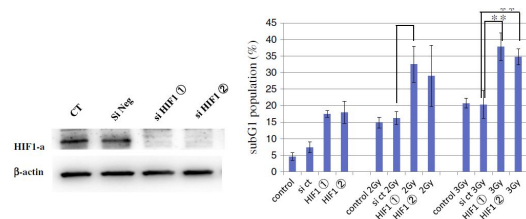
また VEGFA の発現に関しても放射線照射と NVP-BE235 の併用により著明な減速を認めた。



(Gynecol Oncol. 2015 Apr 22. (15)00835-5)

また、SiRNA を利用し HIF 1 をノックダ

ウンした所、放射線照射下における細胞周期の停止が見られた。



(Gynecol Oncol. 2015 Apr 22. (15)00835-5)

以上より、本研究において

**1 CDK4/6 の活性/発現および Ki67 発現が子宮体癌の予後のバイオマーカーとなる**

**2 CDK4/6 単剤での子宮体癌治療効果は低い**

**3 子宮体癌の抗癌剤治療効果に TP53 の変異が関与している可能性がある**

**4 子宮体癌の治療戦略として放射線療法に CyclinD1 の上流にあたる PI3K/mTOR の同時阻害剤と放射線療法の併用が有用となる可能性がある**

という事が示された。

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 1 件 )

Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, Sone K, Fukuda T, Inaba K, Makii C, Enomoto A, Hosoya N, Tanikawa M, Uehara Y, Arimoto T, Kuramoto H, Wada-Hiraike O, Miyagawa K, Yano T, Kawana K, Osuga Y1, Fujii T.

**PI3K/mTOR pathway inhibition overcomes radioresistance via suppression of the HIF1-α/VEGF pathway in endometrial cancer.**

DOI : 10.1016/j.ygyno.2015.04.015.

Gynecol Oncol. 2015 Apr 22. (15)00835-5 査読あり

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

2014.4 The American college of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) Annual Clinical Meeting (Chicago)  
CDK4/6 specific activities as a biomarker for prognosis and chemo-sensitivity in endometrial cancer

Yuji Ikeda, Katsutoshi Oda, Hideki Ishihara, Osamu Wada-Hiraike, Aki Miyasaka, Tomoko Kashiya, Takahiro Kohso, Kanako Inaba, Tomohiko Fukuda, Kenbun Sone, Yoko Matsumoto, Takahiro Arimoto, Kei Kawana, Daisuke Aoki, Yutaka Osuga, & Tomoyuki Fujii

〔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：  
出願年月日：  
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

池田 悠至 (IKEDA, Yuji)  
東京大学医学部附属病院 産科婦人科 助教

研究者番号：80713453

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：