

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791544

研究課題名(和文) Ras-PI3K 経路を標的とした選択的 p110 阻害剤による抗腫瘍効果の解析

研究課題名(英文) Anti-tumor activity of p110 isoform selective inhibitors targeting Ras-PI3K pathway.

研究代表者 織田 克利 (ODA KATSUTOSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30359608

研究成果の概要(和文)：

我々は子宮体癌における Ras-PI3K 経路の活性化に着目し、その活性化に関わる因子を網羅的に解析した。また、本経路を阻害する mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果を子宮体癌細胞株で検証した。

1. 癌遺伝子 *AKT1* (*E17K*) の変異を子宮体癌において初めて報告した。*AKT1* (*E17K*) 変異は子宮体癌臨床検体 89 例中 2 例 (2.2%) にみられ、この 2 例はいずれも他の PI3K 関連遺伝子 (*PIK3CA*, *P TEN* および *K-Ras*) に変異を有さなかった。

2. 我々は 31 例の子宮体癌検体において染色体不安定性、マイクロサテライト不安定性 (MSI)、さらには Ras-PI3K 経路の遺伝子変異を含めて、網羅的なゲノム解析を施行した。染色体コピー数異常を 5 か所以上で有するもの (CIN-Extensive) は 29% にみられ、1-4 か所 (CIN-Intermediate) は 55%、コピー数異常なし (CIN-Negative) は 16% であった。MSI 陽性は CIN-Extensive 症例において頻度が低い傾向があった。多変量解析の結果、CIN-Extensive は独立した予後不良因子であることが明らかとなった。Ras-PI3K 経路に関連した遺伝子発現異常は、ゲノム不安定性の種類によらず、子宮体癌において極めて高頻度にみられることを証明した。

3. Ras-PI3K 経路を標的とした分子標的治療薬として、子宮体癌 13 株に対して mTOR 阻害剤 RAD001 (everolimus) を添加した。MTT アッセイにて、細胞増殖抑制能が確認され、特に *K-Ras/P TEN/PIK3CA* のいずれかが変異陽性である 11 株のうち、10 株で感受性が高かった。

研究成果の概要(英文)：

We elucidated various factors involved in the Ras-PI3K pathway activation through genome-wide comprehensive survey in endometrial carcinomas. In addition, we evaluated anti-tumor activity of an mTOR inhibitor in endometrial cancer cell lines.

1. We published the first report showing oncogenic mutation of *AKT1* (*E17K*) mutation in endometrial cancer samples. We detected *AKT1* (*E17K*) mutations in two out of the 89 endometrial carcinomas (2.2%). These two *AKT1* mutant tumors do not possess any other mutations in *PIK3CA*, *P TEN* and *K-Ras* in the Ras-PI3K pathway.

2. We performed a comprehensive genomic survey in 31 endometrial carcinomas for chromosomal imbalances, microsatellite instability (MSI) status and mutational status in the Ras-PI3K pathway genes. We detected five or more copy number changes (classified as CIN-extensive) in 29%, one to four changes (CIN-intermediate) in 55%, and no changes (CIN-negative) in 16%. Positive MSI was less common in CIN-extensive tumors, compared with CIN-intermediate/negative tumors. Multivariate analysis showed that CIN-extensive is an independent poor prognostic factor. We demonstrated that genomic alterations in

the Ras-PI3K pathway are remarkably widespread in endometrial carcinomas, regardless of the type of genomic instability.

3. We added RAD001 (everolimus, an mTOR inhibitor) to 13 endometrial cancer cell lines. We confirmed by MTT assay that RAD001 suppressed cell proliferation in these cells, especially in ten out of the eleven cell lines with mutations of *PIK3CA*, *PTEN* and/or *K-Ras* in the Ras-PI3K pathway.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：(1)Ras (2)PI3K (3)SNP タイピングアレイ法 (4)染色体不安定性 (5)染色体コピー数異常 (6)予後不良因子 (7)AKT1 (8)子宮体癌

#### 1. 研究開始当初の背景

子宮体癌において Ras-PI3K(フォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ) 経路は *Ras* や *PIK3CA* の活性型遺伝子変異、癌抑制遺伝子 *PTEN* の機能喪失型変異による活性化が知られているが、*AKT1* 遺伝子変異の有無は明らかでなかった。また、PI3K 経路活性化機序と染色体不安定性 Chromosomal Instability (CIN) による染色体コピー数異常 (Copy Number Alterations; CNA) との関連も知られていない。子宮体癌ではマイクロサテライト (MSI) 不安定性が約 20% に存在することが知られているが、CIN との関連も不明であった。子宮体癌における mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果も未報告である。

#### 2. 研究の目的

今回、子宮体癌において、*AKT1* 遺伝子変異を含む、種々の PI3K 経路関連遺伝子変異の探索、Ras-PI3K 経路活性化機序の解明とゲノム不安定性との関連、CIN と MSI との相関、子宮体癌における分子生物学的な予後不良因子の同定、を研究の目的とした。また、PI3K 経路の重要性を明らかとするため、下流の mTOR 経路を阻害する RAD001 の抗腫瘍効果を明らかとすることも目的とした。

#### 3. 研究の方法

(1) 倫理委員会の承認のもと同意が

得られた子宮体癌 89 例において *AKT1* 遺伝子変異を PCR-Direct sequencing 法にて解析した。また、他の PI3K 経路関連遺伝子 *K-Ras*, *PTEN*, *PIK3CA* との共存についても検討した。

(2) 上記のうち 31 例において、SNP タイピングアレイ (50K/250K) を行い、染色体コピー数異常を網羅的に解析した。PI3K 経路に関わる、*PTEN*/*PIK3CA*/*K-Ras*/*NF1* 領域のコピー数異常についても検討した。また、マイクロサテライト不安定性についても、5 つのマイクロサテライトマーカーを用いて検証した。

(3) RAD001 を子宮体癌細胞株 13 株に添加し、細胞増殖に与える影響を検証した。

#### 4. 研究成果

(1) 子宮体癌に *AKT1* の遺伝子変異が存在することを初めて報告した (*Br J of Cancer*, 2009)。変異部位は他の癌種と同じであり、一塩基変異により、17 番アミノ酸がグルタミン酸からリシンに置換されていた (E17K) (図 1)。頻度は子宮体癌の 2% であった。

図 1



4E-BP1 と S6 のリン酸化は RAD001 濃度依存性に抑制された。

図 4

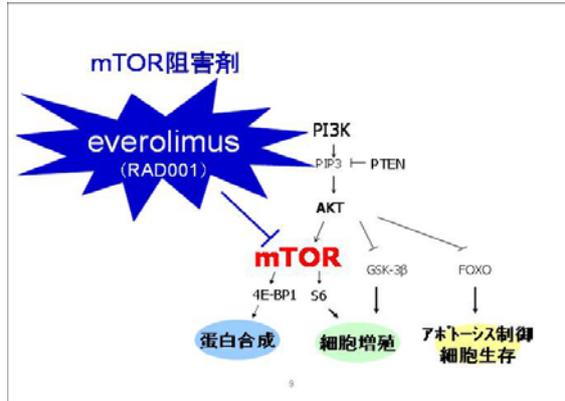
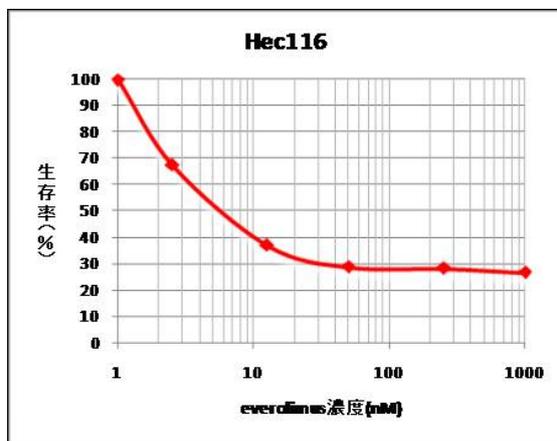


図 5 (PIK3CA/PTEN変異細胞株 ; Hec116)



## 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 14 件)

1. Arimoto T, Nakagawa S, Oda K, Kawana K, Yasugi T, Taketani Y. Second-line chemotherapy with docetaxel and carboplatin in paclitaxel and platinum-pretreated ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. Med Oncol 2011, In press [Epub ahead of print] PMID:21380784 査読有

2. 織田 克利 特集 ; 婦人科がんの Molecular Biology 4. シグナル伝達系 産科と婦人科 78; 45-52, 2011 査読無

3. Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Yasugi T, Ikeda Y, Takazawa Y, Kozuma S, Taketani Y: Aromatase inhibitor

anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report. Med Oncol, 2010 [Epub ahead of print] PMID: 20354812 査読有

4. Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Shirane A, Hiraike H, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Ikeda Y, Shoji K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Multifunctional transcription factor TFII-I is an activator of BRCA1 function. Br J Cancer 104:1349-1355, 2010 査読有

5. Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Oral immunization with a Lactobacillus casei vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7. Vaccine 28:2810-2817, 2010 査読有

6. Maeda D, Takazawa Y, Oda K, Nakagawa S, Fukayama M. Glomus tumor of the ovary: a case report. Int J Surg Pathol. 18:557-560, 2010 査読有

7. Okuma K, Yamashita H, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Nakagawa K: Advanced age is a significant determinant of poor prognosis in patients treated with surgery plus postoperative radiotherapy for endometrial cancer. J Obstet Gynaecol Res 36:757-763, 2010 査読有

8. Yamashita H, Okuma K, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Yano T, Kobayashi S, Wakui R, Ohtomo K, Nakagawa K: Comparison between conventional surgery plus postoperative adjuvant radiotherapy and concurrent chemoradiation for FIGO stage IIB cervical carcinoma: a retrospective study. Am J Clin Oncol 33:583-586, 2010 査読有

9. 織田 克利 プロゲステンの臨床応用 (3) 子宮内膜癌とプロゲステン HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 17, 129-134, 2010 査読無

10. Murayama Hosokawa S, Oda K, Nakagawa S, Ishikawa S, Yamamoto S, Shoji K, Ikeda Y, Uehara Y, Fukayama M, McCormick F, Yano T, Taketani Y, Aburatani H: Genome-wide single-nucleotide polymorphism arrays in

endometrial carcinomas associate extensive chromosomal instability with poor prognosis and unveil frequent chromosomal imbalances involved in the PI3-kinase pathway. Oncogene. 29:1897-1908, 2010 査読有

11. Koyama S, Wada Hiraike O, Nakagawa S, Tanikawa M, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, **Oda K**, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y: Repression of estrogen receptor beta function by putative tumor suppressor DBC1. Biochem Biophys Res Commun 392:357-362, 2010 査読有

12. Hiraike H, Wada Hiraike O, Nakagawa S, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tanikawa M, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, **Oda K**, Shoji K, Fukuhara H, Saji S, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y: Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. Br J Cancer 102:1061-1067, 2010 査読有

13. Shoji K, **Oda K**, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Hiraike Wada O, Nei T, Kawana K, Kuramoto H, Aburatani H, Yano T, Taketani Y: Reply, Somatic mutations are present in all members of the AKT family in endometrial carcinoma. Br J Cancer. 101: 1220-1221, 2009 査読有

14. Shoji K, **Oda K**, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Hiraike Wada O, Nei T, Kawana K, Kuramoto H, Aburatani H, Yano T, Taketani Y: The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. Br J Cancer. 101: 145-148, 2009 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1. **織田克利** 他 シンポジウム 15 分子標的治療におけるバイオマーカーの役割 子宮体癌におけるRas-PI3K/mTOR経路を標的とした治療法とそのバイオマーカー 第 48 回日本癌治療学会学術集会 2010 年 10 月 29 日 京都

2. 樫山智子, **織田克利** 他 卵巣漿液性腺癌におけるp53, Rb, p16INK4a/ARF遺伝子の染色体コピー数異常 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 24 日 大阪

3. 池田悠至, **織田克利** 他 子宮体癌におけ

る  $\beta$ -catenin, CyclinD1 の遺伝子変異は Ras-PI3K経路活性化に関わる遺伝子変異と高頻度に共存する 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 24 日 大阪

4. **織田克利** 他 腫瘍別 6 シンポジウム 婦人科がん治療標的探索の最前線 子宮体癌における遺伝子発現異常に基づいた分子標的治療法の探索 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日 大阪

5. 庄司恵子, **織田克利** 他 子宮体癌におけるPI3K/mTOR同時阻害剤BEZ235 およびmTOR阻害剤 RAD001(everolimus)の抗腫瘍効果の解析 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日 大阪

6. **織田克利** 他 子宮体癌におけるPI3K経路を活性化する遺伝子変異とp110 isoform (PI3K触媒サブユニット)の選択性所 第 9 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 2010 年 9 月 10 日 滋賀

7. **織田克利** 他 子宮体癌における染色体不安定性と Ras-PI3K (phosphatidylinositol 3'-kinase) 経路の活性化 第 15 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2010 年 8 月 20 日 大阪

8. Keiko Shoji, **Katsutoshi Oda** et al Activity of dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and mTOR inhibitor, RAD001 (everolimus), in endometrial cancer cell lines. 2010 ASCO (American Society of Clinical Oncology) Annual Meeting 2010 年 6 月 5 日 Chicago, IL, USA

9. 細川さつき, **織田克利** 他 子宮体癌ではマイクロサテライト不安定性でなく高度の染色体不安定性が予後不良と相関する 第 62 回 日本産科婦人科学会学術講演会 2010 年 4 月 25 日 大阪

10. **織田克利** 他 子宮体癌における染色体不安定性の分類に基づく Ras-PI3K(phosphatidylinositol 3'-kinase) 経路活性化機序の解明 第 62 回 日本産科婦人科学会学術講演会 2010 年 4 月 23 日 大阪

11. 池田悠至, **織田克利** 他 子宮体癌における  $\beta$ -catenin, CyclinD1 の遺伝子変異は Ras-PI3K経路活性化に関わる遺伝子変異と高頻度に共存する 第 62 回 日本産科婦人科学会学術講演会 2010 年 4 月 23 日 大阪

12. 庄司恵子, **織田克利** 他 子宮体癌におけ

るmTOR阻害剤Everolimus(RAD001)の抗腫瘍効果の解析第 62 回 日本産科婦人科学会学術講演会 2010年4月23日 大阪

13. Yuji Ikeda, Katsutoshi Oda et alChromosomal copy number alterations involved in Ras/PI3-kinase pathway in endometrial carcinomas. 101st AACR Annual Meeting 2010年4月20日Washington, DC., USA

14. Katsutoshi Oda et al Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays in endometrial carcinomas associate extensive chromosomal instability with poor prognosis and unveil prevalent alterations in Ras/PI3-kinase pathway. 101st AACR Annual Meeting 2010年4月19日 Washington, DC., USA

15. 織田克利 子宮体癌で臨床応用が期待される分子標的治療 第 10 回関東ホルモンと癌研究会2010年1月23日 東京

16. 有本貴英、織田克利 他子宮体癌術後治療としての放射線療法の効果と有害事象についての検討 第 47 回癌治療学会学術集会 2009年10月24日 横浜

17. 池田悠至、織田克利 他 若年発症した腔明細胞腺癌の1例 第47回癌治療学会学術集会 2009年10月24日 横浜

18. 池田悠至、織田克利 他 子宮体癌におけるK-Ras, NF1 遺伝子領域の染色体コピー数異常 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日 横浜

19. 庄司恵子、織田克利 他 子宮体癌におけるAKT1(E17K)遺伝子変異の解析 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日 横浜

20. 庄司恵子、織田克利 他アロマトラーゼインヒビターが奏功した低悪性度子宮内膜間質肉腫の一例 第46回婦人科腫瘍学会 2009年7月11日 新潟

21. 庄司恵子、織田克利 他Microsatellite Instability (MSI) は Ras-PI3K (phosphatidylinositol3'-kinase) 経路の遺伝子変異と相関する 第61回 日本産科婦人科学会学術講演会 2009年4月4日 京都

22. 織田克利 他 PIK3CA遺伝子変異によるPI3K(phosphatidylinositol 3'-kinase)経路活性化は浸潤癌への悪性転化を促進する 第61回 日本産科婦人科学会学術講演会

2009年4月3日 京都

23. 富尾賢介、織田克利 他 進行卵巣癌(T3c期)に対するInterval Debulking Surgeryにおける予後因子の検討 第61回日本産科婦人科学会学術講演会 2009年4月3日 京都

〔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0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

<http://go.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織田 克利 (ODA KATSUTOSHI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30359608

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：