

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591941

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌におけるAKT及びERK pathway関連遺伝子変異の網羅的解析

研究課題名(英文)Global analysis of genomic alterations associated with AKT and ERK pathway in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

宮成 信友(MIYANARI, Nobutomo)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：90336230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌切除標本を用いてKRAS、BRAF、PIK3CA遺伝子の変異をPyrosequencing technologyにて評価した結果、食道扁平上皮癌にてKRAS、BRAF遺伝子変異はほぼ認めず臨床的意義を示さないのに対し、PIK3CA遺伝子変異は21.0%に認め変異群が野生型群に比べて無病生存及び癌特異的生存が有意に短い事を示した。同時性肝転移を有する大腸癌症例の内、同時切除術施行症例を対象に原発巣26例、肝転移巣42例、転移陽性リンパ節6例のKRAS、BRAF、PIK3CA遺伝子の変異とLINE-1メチル化レベルを評価、遺伝子の一致率は高値でLINE-1メチル化レベルも相関性を認めた。

研究成果の概要(英文)：Using resected ESCC specimens, we investigate mutations of KRAS, BRAF and PIK3CA by Pyrosequencing technology. As a result, the KRAS mutation was found to be extremely rare (1 of 203; 0.5%), and the BRAF mutation was absent (0 of 203; 0%), suggesting that KRAS and BRAF mutations play a limited role in the development of ESCC. However, PIK3CA mutations in ESCC are associated with longer overall survival and cancer-specific survival, suggesting its role as a prognostic biomarker. We evaluated colorectal cancer with synchronous liver metastases. We evaluated KRAS, BRAF, and PIK3CA mutation status and microsatellite instability (MSI) status in 42 liver metastases, 26 matched primary tumors, and 6 matched lymph node (LN) metastases by Pyrosequencing technology. We also quantified LINE-1 methylation levels. The concordance rate was 94% for KRAS, 100% for BRAF, 88% for PIK3CA, and 97% for MSI. Primary tumors showed LINE-1 methylation levels similar to those of matched liver and LN metastases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：genomic alteration 食道扁平上皮癌 KRAS BRAF PIK3CA

1. 研究開始当初の背景

KRAS, BRAF, 及び PIK3CA 遺伝子の変異は、様々な癌種において報告されており、臨床的にも極めて重要なジェネティックな変化である。しかしながら、食道扁平上皮癌における KRAS, BRAF, PIK3CA 遺伝子変異と臨床病理学的因子、予後との関係を網羅的に解析した研究は皆無である。

KRAS 遺伝子は癌遺伝子の一つで、RAS/ERK シグナル伝達経路上にあり、細胞増殖に重要な役割を果たす。KRAS 遺伝子に変異があると、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) を阻害しても、KRAS 蛋白が活性化し、腫瘍細胞の増殖を促す。切除不能な転移性結腸直腸癌において、セツキシマブ (抗 EGFR 抗体療法) の標準的治療法への追加は、KRAS 遺伝子野生型の患者では奏効率と無増悪生存期間を改善したが、変異型では上乗せ効果は見られないことが分かっている。

BRAF 遺伝子の変異は、RAS/ERK 経路を過度に活性化して腫瘍細胞増殖を促進する。BRAF は MEK をリン酸化することで下流のシグナル伝達を開始させ、最終的には ERK を活性化する。BRAF 遺伝子変異は、ヒトメラノーマにおいて高頻度に認められ、BRAF 遺伝子の多型が男性のメラノーマ発症リスクを高めることが報告されている。さらに、メラノーマを対象に、選択的 BRAF 阻害薬の開発が進んでいる。また、BRAF 遺伝子に変異を持つ転移性大腸癌患者は、セツキシマブによる治療効果がないことも明らかになっている。

PIK3CA 遺伝子は、PI3K/AKT シグナル伝達経路における重要な遺伝子であり、その変異は、様々な癌種において報告されている。大腸癌においては、PIK3CA 遺伝子変異型大腸癌は、野生型に比べて、予後不良であることが報告されている。また、PIK3CA 遺伝子変異とセツキシマブ治療効果の関係も報告され始めている。

このように、KRAS, BRAF, 及び PIK3CA 遺伝子変異の頻度、臨床病理学的特徴を理解することは、癌研究において極めて重要である。しかしながら、食道扁平上皮癌における KRAS, BRAF, PIK3CA 遺伝子変異と臨床病理学的因子、予後との関係を網羅的に解析した研究は皆無である。

一方、遺伝子変異の検索は現在様々な technology を用いて行われているが、Pyrosequencing technology は極めて有望である。Pyrosequencing technology は、多数の検体を対象とした遺伝子変異解析やメチル化解析において非常にすぐれた tool であり、大腸癌における KRAS 変異解析に Pyrosequencing が臨床の現場で用いられている施設もある (Brigham and Women's hospital and Harvard medical school)。

2. 研究の目的

KRAS, BRAF, 及び PIK3CA 遺伝子の変異は、様々な癌種において報告されており、臨床的にも極めて重要なジェネティックな変化である。しかしながら、食道扁平上皮癌における KRAS, BRAF, PIK3CA 遺伝子変異と臨床病理学的因子、予後との関係を網羅的に解析した研究は皆無である。食道扁平上皮癌における KRAS, BRAF, 及び PIK3CA 遺伝子の変異を Pyrosequencing technology を用いて評価し、予後、抗癌剤感受性、疫学的因子 (喫煙、飲酒) などとの関係を網羅的に解析する。KRAS, BRAF 及び PIK3CA の下流にあたる mTOR や AKT 活性との関連も評価する。また、食道癌細胞株を用いた基礎研究 (浸潤能、細胞サイクル、抗癌剤感受性 assay など) 結果を、臨床研究の結果と対比し検証する。

3. 研究の方法

Pyrosequencing technology による食道扁平上皮癌の KRAS, BRAF, 及び PIK3CA 遺伝子変異検索

当科において外科的に切除された 200 例以上の食道癌検体を用いて、KRAS, BRAF, 及び PIK3CA 遺伝子変異の有無を評価する。その際、Macro dissection を用い、DNA を抽出した結果を、Laser micro dissection による結果と比較し、その妥当性を検討する。また、各遺伝子 (KRAS, BRAF, 及び PIK3CA) 変異と臨床的因子 (年齢、性別など)、疫学的因子 (喫煙歴、飲酒歴、家族歴など)、病理学的因子 (脈管浸潤、深達度、分化度など) との関係を網羅的に解析する。

食道癌における KRAS, BRAF, 及び PIK3CA 遺伝子変異と予後の検討

大腸癌において、PIK3CA 遺伝子変異症例は予後不良である [Ogino S et al. JCO 2008]。当科の確立された食道癌データベースを用い、各遺伝子変異と予後との関連を retrospective に評価する。それぞれの遺伝子変異の予後に対する相互作用 (interaction) も十分に検討する。解析ソフトとして SAS programming を用い、SAS "proc phreg" command の "strata" option を利用することにより、stage の影響を適切に調節する。

原発巣と転移巣における遺伝子変異の相関性

食道扁平上皮癌は集学的治療を駆使してもなお予後不良であり、早期に他臓器転移を伴う事がある。従って、原発巣及び転移巣における遺伝子変異の相関性を明らかにする事は临床上極めて重要である。転移を有する食道癌に対して転移巣を含めた同時切除を施行する事は現時点ではなく、まず大腸癌を対象に評価を行う。

当科において外科的に切除された 20 例以

上の同時性肝転移を有する大腸癌症例の切除検体を用いる。KRAS、BRAF、PIK3CA 遺伝子の変異を Pyrosequencing technology にて評価し、相関性を検討する。また、消化管癌における DNA 低メチル化のマーカーとして注目される LINE-1 メチル化レベルについても評価する。

4. 研究成果

我々は食道扁平上皮癌における KRAS, BRAF, 及び PIK3CA 遺伝子の変異を Pyrosequencing technology を用いて評価した。当科で切除された食道扁平上皮癌 200 例以上のパラフィン包埋切片から Macro dissection もしくは Laser micro dissection により、腫瘍組織(癌細胞)及び正常上皮をそれぞれ回収し、その組織から DNA を抽出し、“Pyrosequencing technology”により KRAS, BRAF, PIK3CA 遺伝子の変異の有無を評価した。食道扁平上皮癌切除標本 203 例を対象に解析を行った結果、KRAS 遺伝子変異は 1 例(0.5%)のみであり、BRAF 遺伝子変異は認められなかった。食道扁平上皮癌においては、KRAS 遺伝子変異は稀であり、BRAF 遺伝子変異はほぼ皆無であるため、臨床的な意義を成さない可能性が示された。この結果を Annals of Surgical Oncology に発表した。次に PIK3CA 変異について検討を行った。PIK3CA 遺伝子変異は、219 症例中 46 例(21.0%)で認めた。PIK3CA 遺伝子変異群と野生型群で臨床病理学的背景を比較したところ、統計学的有意な差は認められなかった。Kaplan-Meier 法による生存率を比較したところ、Disease free survival および Cancer-specific survival において PIK3CA 遺伝子変異群は野生型群に比べて有意に予後が良好であった(P=0.0089, P=0.021)。食道扁平上皮癌において PIK3CA 遺伝子変異は、21.0%で認めた。また、PIK3CA 遺伝子変異が予後因子になる可能性が示唆された。この結果を Clinical Cancer Research に報告した。

食道扁平上皮癌は集学的治療を駆使してもなお予後不良であり、早期に他臓器転移を伴う事がある。従って、原発巣及び転移巣における遺伝子変異の相関性を明らかにする事は临床上極めて重要である。転移を有する食道癌に対して転移巣を含めた同時切除を施行する事は現時点ではなく、今回はまず大腸癌を対象に評価を行った。

同時性肝転移を有する大腸癌症例のうち、同時切除術を施行した症例を対象に評価した。原発巣 26 例、肝転移巣 42 例、転移陽性リンパ節 6 例の KRAS、BRAF、PIK3CA 遺伝子の変異を Pyrosequencing technology にて評価し、相関性を検討した。また、消化管癌における DNA 低メチル化のマーカーとして注目される LINE-1 メチル化レベルについても評価した。KRAS、BRAF、PIK3CA 遺伝子の一致率は 94%、100%、88%と高値だった。LINE-1 メチル化レベルについても、原発巣、肝転移

巣、転移陽性リンパ節において相関性を認めた。以上より、原発巣と転移巣の遺伝子発現及び LINE-1 メチル化レベルに相関性がある事を British Journal of Cancer に報告した。

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3件)

Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Murata A, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Noshio K, Baba H. PIK3CA mutation is associated with a favorable prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2013 ;19(9):2451-9. 査読有
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3559.

Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Miyake K, Murata A, Iwagami S, Ishimoto T, Iwatsuki M, Yoshida N, Baba H. KRAS and BRAF Mutations in 203 Esophageal Squamous Cell Carcinomas: Pyrosequencing Technology and Literature Review. Ann Surg Oncol. 2013;20(3):S485-91. 査読有
DOI: 10.1245/s10434-012-2819-z.

Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Noshio K, Baba H. Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. Br J Cancer. 2013 23;109(2):408-15. 査読有
DOI: 10.1038/bjc.2013.289.

[学会発表](計6件)

馬場 祥史、渡邊 雅之、志垣 博信、小澄 敬祐、原田 和人、村田 飛鳥、石本 崇胤、岩上 志朗、吉田 直矢、馬場 秀夫、「食道扁平上皮癌における AKT pathway の網羅的解析」、第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月 24 日、国立京都国際会館

村田 飛鳥、馬場 祥史、渡邊 雅之、志垣 博信、岩上 志朗、坂本 快郎、宮本 裕士、別府 透、馬場 秀夫、「大腸癌原発巣と遠隔転移巣における Genetic and Epigenetic Alteration の網羅的比較」、第 68 回日本消化器外科学会、2013 年 7 月 17 日、サンホテルフェニックス(宮崎県)

志垣 博信、馬場 祥史、渡邊 雅之、村田 飛鳥、石本 崇胤、岩槻 政晃、尾崎 宣之、岩上 志朗、坂本 快郎、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫、「Pyrosequencing technology を用いて食道癌における PIK3CA 遺伝子変異の検討」、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 12 日、マリンメッセ福岡

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Iwagami S, Iwatsuki M, Ishimoto T, Baba H.

Relationship between LINE-1 methylation level, allelic imbalance and PIK3CA mutation in esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2013, 2013年4月9日, Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC

Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Miyake K, Murata A, Ozaki N, Iwagami S, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. PIK3CA mutation is associated with a favorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, 2013年2月22日, Hyatt Regency Maui, Hawaii

志垣 博信、馬場 祥史、渡邊 雅之、三宅 慧輔、尾崎 宣之、岩上 志朗、石本 崇胤、吉田 直矢、馬場 秀夫、「The frequency of BRAF mutation in esophageal squamous cell carcinoma detected by Pyrosequencingパイロシーケンスで検出された食道扁平上皮癌における BRAF 変異率の検討」, 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、ホテルロイトン札幌(北海道)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮成 信友 (MIYANARI, Nobutomo)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：90336230

(2) 研究分担者

馬場 秀夫 (BABA, Hideo)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20240905

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：20599708

岩槻 政晃 (IWATSUKI, Masaaki)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：50452777

(3) 連携研究者

()

研究者番号：