

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592503

研究課題名(和文)個別化治療を目指した子宮体癌の遺伝子変異プロファイリング

研究課題名(英文)Genetic mutational profiling of endometrial cancer aiming at individualized treatment

研究代表者

水口 剛雄 (Minaguchi, Takeo)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40372396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体癌において癌抑制遺伝子PTENおよびp53の蛋白発現・遺伝子異常を解析し、臨床病理学的因子・予後との関連性を統計学的に検討した。PTEN発現陰性は類内膜腺癌および脈管侵襲無しと相関し予後良好因子であったのに対し、p53発現陽性は非類内膜腺癌および進行癌と相関し予後不良因子であった。術後放射線療法はp53陰性の患者でのみ予後を改善し、p53陰性の患者において予後良好因子であった。以上の結果より、子宮体癌においてPTEN遺伝子異常はより緩徐な生物学的特性をもたらす、逆にp53遺伝子異常はより急速な進行と放射線低感受性をもたらす、それぞれ独立して子宮体癌の予後に影響していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Protein expressions and genetic mutations of PTEN and p53 were analyzed and correlated with clinicopathological factors and prognosis in endometrial cancers. Negative PTEN expression was associated with endometrioid histology and absent lymphovascular invasion and was a favorable prognostic factor, while positive p53 was associated with non-endometrioid histology and advanced stage and was a poor prognostic factor. Postoperative radiotherapy improved survival only in p53 negative patients, and was a favorable prognostic factor for p53 negative patients. Accordingly, it is suggested that PTEN genetic aberration causes indolent biological property and p53 aberration causes rapid progression and low radiosensitivity, affecting endometrial cancer prognosis independently.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：PTEN p53 子宮体癌 遺伝子変異 蛋白発現 予後因子 放射線治療

### 1. 研究開始当初の背景

近年国内では、食生活の欧米化によるいわゆるメタボリックシンドロームの増加と、晩婚化・少子化といった女性のライフサイクルの変化に伴い、子宮内膜への内因性エストロゲン作用の増加により、子宮体癌の罹患率が急増傾向にあり、子宮頸癌の罹患率を追い越さんばかりの勢いである。またこれまでに、各種癌の様々な原因遺伝子が報告されており、最近ではそれらを標的とする数多くの分子標的治療薬が開発され、個々の癌が持つ遺伝的特徴に基づき、オーダーメイド治療を行う gene targeting therapy が盛んになりつつある。例えば乳癌では、HER2 蛋白の強発現例に対してトラスツズマブ（ハーセプチン）が用いられ、また抗癌剤の選択においても、薬剤耐性遺伝子の有無や、塩酸イリノテカンにおける UGT1A1 遺伝子のように、患者の有害事象をより強く起こしやすい遺伝子多型に基づいて抗癌剤を選択することが、臨床応用化されている。また例えば、ペバシズマブ（アバスタ）は卵巣癌の維持療法として併用することによる予後改善効果が報告されているが、分子標的薬は非常に高価であるために、より多くのベネフィットが期待できる患者群を同定することが、医療経済学的に非常に重要である。我々はこれまでに、当科で初回治療を施行した子宮体癌症例において、PTEN および p53 癌抑制蛋白の発現量が、患者の予後と相関していることを発見し、報告してきた。これら PTEN, p53 蛋白は、ともに子宮内膜の発癌過程において重要な機能を持つ癌抑制蛋白であり、子宮体癌において高頻度に遺伝子異常が報告されている。一般に PTEN 蛋白発現陰性の腫瘍は PTEN 遺伝子変異を有することが予測され、一方 p53 蛋白発現陽性の腫瘍は p53 遺伝子変異を有することが予測される。そこでこれまでの我々の結果に基づき、当科での初回治療症例における子宮体癌組織から DNA を抽出し、それを用いて実際に PTEN および p53 遺伝子の変異を解析し、手術・化学療法・放射線療法などの各治療法や投与した抗癌剤の種類、予後との相関性を調べることにより、どの遺伝子の異常を持つ癌にはどのような治療をすべきか、またどのような抗癌剤を投与すべきかについて解析する。更に、PTEN 蛋白は多くの癌の発癌過程において非常に重要な PI3-Kinase/Akt シグナル伝達経路上に存在し、近年この経路上の様々な蛋白を標的とした分子標的治療薬が次々に開発され、多くの臨床試験が進行中である。近い将来これらの分子標的薬が子宮体癌治療で臨床応用化された場合に、どの遺伝子異常を持つ癌にはどの分子標的薬を併用すべきか、本研究の結果はその選択基準についての重要な基礎 data となる。

### 2. 研究の目的

これまでに我々は子宮体癌において、腫瘍組

織における癌抑制蛋白 PTEN および p53 の発現量が、予後と有意に相関することを報告してきた。この結果に基づいて今回更に、当科で初回治療を行った子宮体癌症例の腫瘍組織における PTEN および p53 の遺伝子変異を解析し、手術・化学療法・放射線療法などの各治療および各種抗癌剤での予後を比較検討することにより、個々の癌における遺伝子異常に基づいて、どのような治療を選択すべきか、またどのような薬剤を投与すべきか、遺伝子異常に基づいた個別化治療のための基礎データを取得することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

まず当科において 1999 年～2009 年の間に一貫した治療方針のもとに初回治療を施行した子宮体癌症例の、手術検体のパラフィン包埋ブロックから組織片数 mm<sup>3</sup> を採取し、そこから proteinase K を使用して腫瘍組織 DNA を抽出し、それを用いてまず PCR-SSCP 法により PTEN および p53 遺伝子変異のスクリーニングを行った。すなわち、PTEN 遺伝子の exon 1～9 (計 11 primer set) および p53 遺伝子の変異 hot spot である exon 5～8 (計 4 primer set) の PCR 産物を SSCP 法により変性条件下に 12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (15 ) したのち、分離した PCR 産物を自動染色装置による銀染色で可視化し、異常な band を検出した。次に異常な band の認められた PCR 産物をゲルから切り出し精製したのち、SSCP に用いたのと同じ primer を使用して direct sequence 法により塩基配列を決定し、正常配列と比較することで実際に遺伝子変異が存在するかどうかを解析した。更に、それぞれの変異がどの exon 上に存在し、フレームシフト変異・ミスセンス変異・ナンセンス変異のうちのどれなのか、どのようなアミノ酸の変化を生じ、その遺伝子がコードする蛋白の機能上重要なアミノ酸配列への影響の有無、等について詳細な解析を行った。

次に各症例の臨床情報の収集を行い、予後や治療内容等との関連性を解析した。関連性の統計学的解析については、予後に関しては Cox 比例ハザード・モデルを使用して、PTEN および p53 異常の有無別・治療の種類別に、全生存期間・無増悪生存期間・無病生存期間などについて解析を行った。組織型や進行期などといった各臨床病理学的因子との関連性の解析には Fisher's exact test により行った。これらの統計学的解析には全て、数多くの文献で利用されている統計解析ソフト R (<http://www.r-project.org/>) を使用した。

### 4. 研究成果

子宮体癌における遺伝子変異解析の結果から、PTEN 蛋白発現陰性は PTEN 遺伝子変異の有無とは相関せず、むしろフレームシフト変

異やナンセンス変異といった PTEN 蛋白が途中で切断されるタイプの遺伝子変異と相関することがわかった。これは実験に使用している PTEN 抗体が認識するエピトープが PTEN 蛋白の C 末端に存在することから合理的な結果であった。また p53 蛋白発現陽性は p53 遺伝子変異の有無と相関し、p53 変異と PTEN 変異は互いに共存しないことがわかった。次に臨床病理学的因子との関連性および生存分析の結果からは、PTEN 発現陰性は類内膜腺癌および脈管侵襲無しと相関し有意な予後良好因子であった (図 1) のに対し、逆に p53 発現陽性は非類内膜腺癌および進行癌と相関し有意な予後不良因子であった (図 2)。

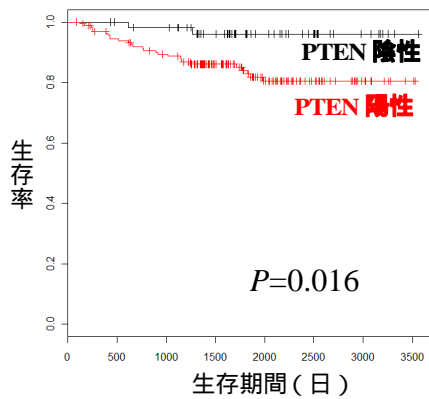


図 1. PTEN 発現による生存率の相違

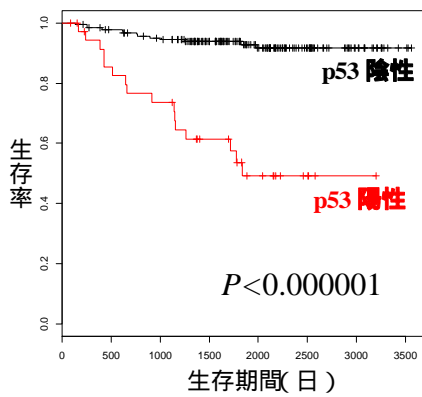


図 2. p53 発現による生存率の相違

また PTEN 発現陰性が予後良好である傾向は、早期癌症例よりも進行癌症例においてより強く認められた (図 3, 4)。更に術後追加治療に関する解析から、術後放射線療法の追加は p53 陰性の患者でのみ予後を改善し (図 5, 6) p53 陰性の患者においては有意な予後良好因子であった。一方、術後化学療法の追加についてはそのような傾向は見られなかった。以上の結果より、子宮体癌において PTEN 遺伝子異常はより緩徐な生物学的特性をもたらし、逆に p53 遺伝子異常はより急速な進行と放射線に対する低感受性をもたらし、それぞれ独立して子宮体癌の予後に逆の影響を及ぼしていることが示唆された。従って、PTEN 遺伝子異常を有する子宮体癌で

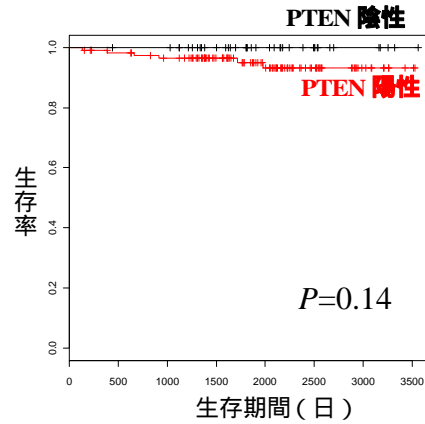


図 3. 早期症例における PTEN 発現による生存率の相違

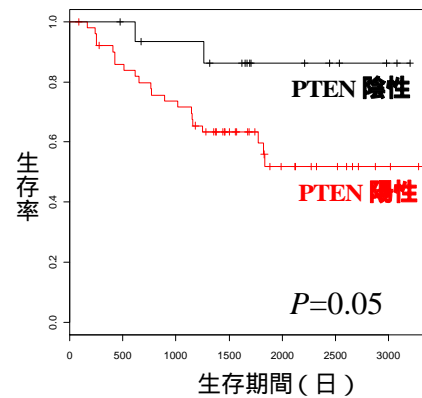


図 4. 進行症例における PTEN 発現による生存率の相違

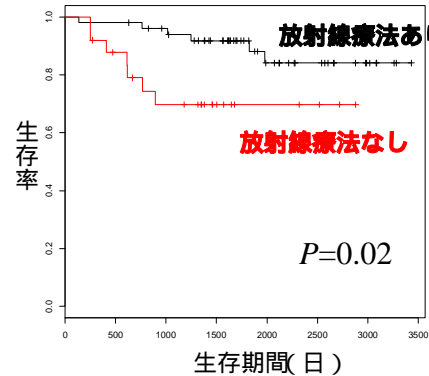


図 5. p53 陰性症例における術後放射線追加の有無による生存率の相違

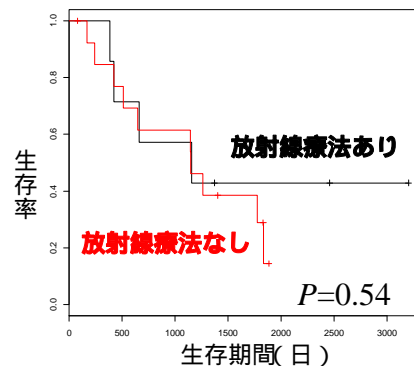


図 6. p53 陽性症例における術後放射線追加の有無による生存率の相違

は、特に進行症例において PTEN の下流蛋白に対する分子標的薬治療の恩恵をより多く受ける可能性があり、また p53 遺伝子正常の子宮体癌では特に術後放射線治療の追加が有効である可能性がある。今後これらについて更に検証することにより、遺伝子異常に基づいた子宮体癌の個別化治療の実現へさらに一歩近づくことが期待される。

#### 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 2 件)

Akiyama-Abe A, Minaguchi T, Nakamura Y, Michikami H, Shikama A, Nakao S, Sakurai M, Ochi H, Onuki M, Matsumoto K, Satoh T, Okai A, Yoshikawa H. Loss of PTEN expression is an independent predictor of favourable survival in endometrial carcinomas. *Br J Cancer*. 査読有り 2013;109(6):1703-10. doi: 10.1038/bjc.2013.455.

水口 剛雄, 吉川 裕之: リスク因子を考慮した子宮体がん予防. **臨床婦人科産科** 査読有り 67(8):798-804, 2013

##### [学会発表](計 4 件)

志鎌あゆみ, 水口剛雄, 秋山 梓, 中尾砂理, 越智寛幸, 小貫麻美子, 松本光司, 佐藤豊実, 沖 明典, 吉川裕之: 子宮内膜癌におけるミスマッチ修復機構の解析. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜)9月, 2014

秋山 梓, 水口 剛雄, 志鎌 あゆみ, 中尾 砂理, 越智 寛幸, 小貫 麻美子, 松本 光司, 佐藤 豊実, 吉川 裕之: p53 蛋白の異常蓄積は子宮体癌の独立した予後不良因子である. 第 72 回日本癌学会学術総会(横浜)10月, 2013

秋山 梓, 水口 剛雄, 中村 優子, 田坂 暢崇, 中尾 砂理, 吉川 智之, 櫻井 学, 越智 寛幸, 小貫 麻美子, 松本 光司, 佐藤 豊実, 吉川 裕之: p53 蛋白の異常蓄積は子宮体癌の独立した予後不良因子である. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会(札幌)5月, 2013

水口 剛雄, 安倍 梓, 中村 優子, 田坂 暢崇, 中尾 砂理, 越智 寛幸, 小貫 麻美子, 岡田 智志, 松本 光司, 佐藤 豊実, 沖 明典, 吉川 裕之: PTEN 蛋白発現の欠失は子宮体癌の独立した予後良好因子である. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会(神戸)4月, 2012

##### [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:  
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

水口 剛雄(MINAGUCHI, Takeo)  
筑波大学・医学医療系・産科婦人科学・講師  
研究者番号: 40372396

##### (2) 研究分担者

吉川 裕之(HIROYUKI, Yoshikawa)  
筑波大学・医学医療系・産科婦人科学・教授  
研究者番号: 40158415

沖 明典(OKI, Akinori)  
筑波大学・医学医療系・産科婦人科学・教授  
研究者番号: 60334067

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: