

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461999

研究課題名(和文)食道癌の治療選択に関わるPI3K/AKTpathway関連遺伝子変異の網羅的検索

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of mutation in PI3K/AKT pathway genes in esophageal cancer.

研究代表者

志垣 博信 (SHIGAKI, Hironobu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：30594874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：習慣的な飲酒、喫煙歴の無い食道扁平上皮癌症例は喫煙歴または飲酒歴のある症例と比べ、女性の割合が有意に高く、食道癌の家族歴を有する割合が多く、食道内多発病変は少なく、高分化型の割合が多かった。飲酒、喫煙歴の無い食道扁平上皮癌は発癌の機序が異なる可能性があり、geneticな変化がある可能性が示唆された。

シチジン脱アミノ化酵素であり遺伝子変異に関連を示唆されている酵素APOBEC3Bの発現レベルを評価し、食道扁平上皮癌切除症例においてAPOBEC3Bの発現はPIK3CA遺伝子変異と有意に相関している結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), compared with the smoking and drinking (SD) group, the non-smoking and non-drinking (NSND) group included more females and those who had family history of the esophageal cancer. The incidence of multiple lesion was significantly lower, and the rate of histological grade G1 was higher in the NSND group compared to the SD group. Further analysis is needed to clarify difference in molecular mechanisms during carcinogenesis between both groups.

Several mutations in various cancers have been linked to APOBEC3B, suggesting a crucial role for this protein in carcinogenesis and cancer development. In ESCC, APOBEC3B expression was significantly correlated with PIK3CA mutation, particularly with C to T transitions of PIK3CA. Given the crucial roles of PIK3CA mutation, our findings might provide new insights into the biological mechanisms of ESCC tumorigenesis and progression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 遺伝子変異 PIK3CA 喫煙・飲酒 Pyrosequence

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は、もっとも悪性度の高い癌種の一つであり、手術、化学療法、放射線療法、化学放射線療法などを含む集学的治療の発達にも関わらず、その予後は未だに不良である。そのため、基礎研究及び臨床研究により、分子標的療法に代表される革新的な治療法の開発が模索されている。PIK3CA 遺伝子は、発癌経路として注目される PI3K/AKT シグナル伝達経路の PI3K の subunit である 110 をエンコードしている遺伝子であり PIK3CA 遺伝子変異は大腸癌、乳癌、脳腫瘍など、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。これまで我々は 209 例の食道扁平上皮癌を対象とし、PIK3CA 遺伝子変異は、22.2% で認め、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ることを報告し (Clin Cancer Res 2013 )、食道扁平上皮癌においても、PIK3CA 遺伝子変異は分子バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。また、PIK3CA 変異型大腸癌の患者において、癌診断後のアスピリン使用が生存期間の延長に関連していることが認められており、補助療法としてのアスピリンの効果を予測する分子バイオマーカーとして注目されている (Liao X, Baba Y et al. N Engl J Med 2013 )。PIK3CA 遺伝子のような予後や化学療法の感受性に関連するジェネティックな変化を同定することは、リスクに応じた治療方針決定に役立ち、また、その変化を標的とした治療法が開発された際には、対象患者選別のマーカーとして用いられることが期待される。

2. 研究の目的

発癌の過程において PI3K/AKT シグナル伝達経路が注目されており、PIK3CA の変異は、臨床的にも極めて重要なジェネティックな変化である。食道癌治療の high volume センターであるがん研有明病院と熊本大学医学部附属病院のデータベースを用いて、食道扁平上皮癌における遺伝子の変異を 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し、将来的に発癌機序の解明、治療効果の予測因子としての、新たな genetic biomarker を探索することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

食道扁平上皮癌症例の臨床病理学的因子の調査、データベースの構築、解析を行う。当科で切除された食道扁平上皮癌 500 例以上のパラフィン包埋切片および食道癌治療前の生検検体から腫瘍組織 (癌細胞) を回収する。その組織から DNA を抽出し、DNA データバンクを構築する。

治療前の臨床検体としては、上部消化管内視鏡の際に採取した生検サンプルから DNA を抽出する。その後の化学療法の奏効率との関係を評価。また、同一患者における治療前の生検検体から抽出した DNA と手術検体から採取した DNA それぞれの遺伝子変異を評価。化学療法前後における遺伝子変異の評価と、予後や、臨床病理学的因子との関連性を検証に用いる。

抽出した DNA を用いて “Pyrosequencing technology” により遺伝子の変異の有無を評価する。その後、SAS program (SAS Institute, Cary, NC) を用いて、各遺伝子変異と、予後、臨床病理学的因子、疫学的因子との関係を網羅的に解析する。

4. 研究成果

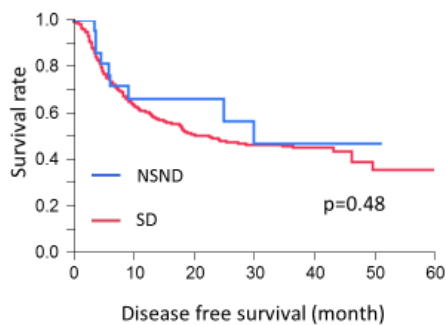
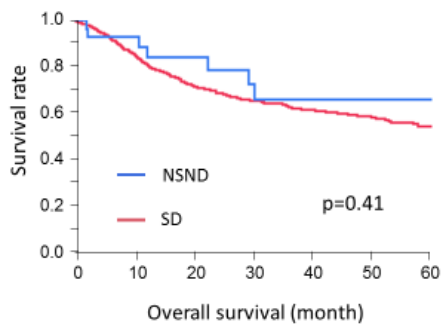
臨床病理学的背景の調査として、2005 年 1 月 ~ 2013 年 12 月に食道扁平上皮癌に対して切除術を施行した 711 例を対象とし、習慣的な飲酒、喫煙の無い症例を non-smoking and non-drinking (NSND) 群とし、喫煙歴または飲酒歴のある smoking and drinking (SD) 群と臨床病理学的因子を比較検討した。NSND 群は 711 例中 30 例 (4.2%) であった。NSND 群は SD 群と比べ、女性の割合が有意に高く (73.3% vs 12.3% P < 0.001 )、食道癌の家族歴を有する割合が多かった (20% vs 7.5% P=0.01 )。また、食道内多発病変は少なく (3.3% vs 18.8% P=0.03 )、高分化型の割合が多かった (53.3% vs 32.6% P<0.027 )。

Clinical, epidemiologic feature	NSND (N=30)	SD (N=661)	P value
Mean age ± SD	66.9 ± 10.5	63.9 ± 8.07	0.054
Sex			<0.0001
Male	8 (27%)	579 (88%)	
Female	22 (73%)	82 (12%)	
BMI ± SD	21.6 ± 3.9	20.8 ± 3.3	
Previous history of cancer			0.59
Yes	7 (23%)	144 (22%)	
No	23 (77%)	495 (75%)	
Unknown	0 (0%)	22 (3%)	
Family history of cancer			0.41
Yes	17 (57%)	414 (63%)	
No	13 (43%)	227 (34%)	
Unknown	0 (0%)	20 (3%)	
Family history of EC*			0.026
Yes	6 (20%)	48 (7%)	
No	24 (80%)	589 (89%)	
Unknown	0 (0%)	24 (4%)	
Location of tumor			0.72
Upper	4 (13%)	121 (18%)	
Middle	14 (47%)	329 (50%)	
Lower	12 (40%)	211 (32%)	
Multiple lesion			0.026
Yes	1 (3.3%)	103 (16%)	
No	29 (96.7%)	554 (84%)	

治療前の深達度が深い傾向があり(P=0.05)、Stageは有意に進行していた(P=0.03)。

cT				0.038
T1	7 (23%)	238 (36%)		
T2	5 (17%)	145 (22%)		
T3	15 (50%)	262 (40%)		
T4	3 (10%)	16 (2%)		
cN				0.46
Negative	11 (37%)	287 (43%)		
Positive	19 (63%)	374 (57%)		
cStage				0.57
I	8 (27%)	229 (34%)		
II	7 (23%)	164 (25%)		
III	14 (47%)	262 (40%)		
IV	1 (3%)	6 (1%)		
Preoperative treatment				0.46
Present	10 (33%)	299 (45%)		
Absent	20 (67%)	362 (55%)		

両群間の全生存率に有意な差は認められなかった(P=0.31 log-rank 検定) NSND 群の食道扁平上皮癌はSD 群と発癌の機序が異なる可能性があった。



また、細胞内に存在するタンパク質の1種であるシチジン脱アミノ化酵素であり、発癌や遺伝子変異に関連を示唆されている酵素のAPOBEC3Bに注目し、食道扁平上皮癌切除例におけるAPOBEC3Bの発現レベルを評価し、臨床病理学的因子やPIK3CA遺伝子変異、ゲノム全体のメチル化の指標となるLINE-1メチル化レベル、p53発現との関係性を解析した。食道癌組織において、APOBEC3Bの免疫活性やmRNAの発現レベルは、正常食道上皮に比べて、有意に高い結果であった(p=0.05)。また、APOBEC3B

の発現はPIK3CAの遺伝子変異と有意に相関しており(P=0.013)LINE-1の低メチル化とも相関していた(P=0.027)。

今回の研究では、個別化診療に寄与する新たなgenetic biomarkerの発見には至らなかったものの、疫学的な素因のない食道扁平上皮癌の発生に遺伝子変異がかかわる可能性を示唆する臨床病理学的結果や、PIK3CA変異に関連する酵素の発見が得られた。現在、本研究の一環である、DNAデータバンクの構築は年間100例近くのペースで継続しており、基盤を作ることによって、さらなるgenetic biomarkerの発見の礎になっていくものと考えられる。

## 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1件)

1. Kosumi K, Baba Y, Ishimoto T, Harada K, Nakamura K, Ohuchi M, Kiyozumi Y, Izumi D, Tokunaga R, Taki K, Higashi T, Miyata T, Shigaki H, Kurashige J, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Baba H. APOBEC3B is an enzymatic source of molecular alterations in esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2016 33(3):26. 査読あり  
DOI: 10.1007/s12032-016-0739-7.

[学会発表](計10件)

1. 志垣博信、徳永竜馬、小澄敬祐、原田和人、藏重淳二、岩槻政晃、馬場祥史、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫  
「術前補助療法によりpStage 0/Iにdown stageとなった食道扁平上皮癌の成績」  
第71回日本消化器外科学会総会、2016年7月14日、アスティとくしま(徳島県)
2. 志垣博信、丸野正敬、徳永竜馬、藏重淳二、岩槻政晃、馬場祥史、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫  
「食道癌術後の胃管癌に対する臨床病理学的検討」  
第70回日本食道学会学術集会、2016年7月5日、ザ・プリンスパークタワー東京(東京都)
3. 志垣博信、上村紀雄、原田和人、馬場祥史、岩槻政晃、藏重淳二、宮本裕士、坂本快郎、小澄敬祐、徳永竜馬、吉田直矢、河中功一、山下康行、馬場秀夫

- 「食道癌の転移性肺腫瘍に対するラジオ波凝固療法の治療成績」  
第 116 回日本外科学会定期学術集会、  
2016 年 4 月 16 日、リーガロイヤルホテル大阪（大阪府）
4. 志垣博信、野元大地、小澄敬祐、徳永竜馬、藏重淳二、岩槻政晃、馬場祥史、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫  
「食道小細胞癌 7 例に対する治療成績についての検討」  
第 49 回日本制癌剤適応研究会、2016 年 3 月 25 日、会津東山温泉御宿東鳳（福島県）
5. 志垣博信、渡邊雅之、峯真司、西田康二郎、松本晶、熊谷厚志、布部創也、比企直樹、佐野武、山口俊晴  
「食道癌切除後の心房細動発症についての検討」  
第 70 回日本消化器外科学会総会、2015 年 7 月 17 日、アクトシティ浜松（静岡県）
6. 志垣博信、秋山貴彦、原田和人、馬場祥史、岩槻政晃、藏重淳二、坂本快郎、宮本裕土、小澄敬祐、徳永竜馬、吉田直矢、馬場秀夫  
「食道癌肺転移に対する化学療法 + ラジオ波凝固療法の治療成績」  
第 43 回九州食道癌合併療法 2015 年 7 月 4 日、ホテルニューオータニ福岡（福岡県）
7. 志垣博信、渡邊雅之、峯真司、西田康二郎、松本晶、本田通考、佐野武  
「術前化学療法により CT-pStage I となった胸部食道扁平上皮癌の成績」  
第 69 回日本食道学会学術集会、2015 年 7 月 3 日、パシフィコ横浜会議センター（神奈川県）
8. 志垣博信、松本晶、西田康二郎、峯真司、渡邊雅之、福長洋介、長山聡、藤本佳也、小西毅、秋吉高志、佐野武、山口俊晴  
「非飲酒かつ非喫煙者に発生した食道扁平上皮癌の臨床病理学的特徴」  
第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 16-18 日、名古屋国際会議場（愛知県）
9. Hironobu Shigaki, Masayuki Watanabe, Shinji Mine, Koujiro Nishida, Yasuhiro Okumura, Akira Matsumoto  
“ Indication for salvage esophagectomy after definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. ”  
14th World Congress of the ISDE、2014

年 9 月 22-24 日、Vancouver ,Canada (アメリカ)

10. 志垣博信、渡邊雅之、山田和彦、峯真司、大矢周一郎、布部創也、藤本佳也、小西毅、有田淳一、秋吉高志、大橋学、福永洋介、長山聡、谷村慎哉、高橋祐、齋浦明夫、上野雅資、比企直樹、佐野武、山口俊晴  
「食道癌術後合併症に対する再手術が予後に及ぼす影響について」  
第 114 回日本外科学会定期学術集会、  
2014 年 4 月 4 日、国立京都国際会館（京都府）

〔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  
志垣 博信 (SHIGAKI, Hironobu)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：30594874

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

渡邊 雅之 (WATANABE, Masayuki)  
公益財団法人がん研究会・有明病院消化器外科・部長  
研究者番号：80254639