

論文の内容の要旨

論文題目 子宮体癌における PI3K 経路活性化機序の解明と
分子標的治療への応用に関する研究

氏名 庄司 恵子

[序論]

RAS-MAPK (MAP kinase)経路、PI3K (Phosphatidylinositol 3' kinase)-AKT/mTOR 経路は増殖因子受容体の下流において、さまざまな遺伝子の発現異常を通して多くの癌で活性化され、細胞の生存を促進する。特に子宮体癌では、本経路を活性化する遺伝子変異が高頻度に存在し (*K-RAS* 変異約 20%、*PIK3CA* 変異約 30%、*PTEN* 変異約 50%)、高率に共存して起こることが知られている。近年、PI3K-AKT/mTOR 経路を活性化する新たな因子として、*AKT1* (E17K)の変異が注目されている。これまで確認されている *AKT1* の変異は、エクソン 4 に存在する E17K のみであり、乳癌、大腸癌、肺癌、卵巣癌、悪性黒色腫などで報告されているが、子宮体癌における変異の有無は報告されていない。子宮体癌は PI3K 経路の活性化が高頻度であることから、*AKT1* の変異も存在している可能性が考えられる。mTOR は AKT によってリン酸化を受ける主要な分子の一つであり、mTOR 単独阻害剤 (RAD001, everolimus) は進行性腎癌の治療薬として既に日本でも保険承認されている。mTOR 単独阻害剤は、PI3K-AKT 経路の主要なシグナルを阻害する効果を有するが、AKT は他にも GSK3 β 、FOXO1、FOXO3a といった種々の分子をリン酸化することで、細胞増殖・生存に寄与すると考えられており、mTOR 単独阻害剤では本経路の阻害効果が部分的であることが示唆される。こうした中で、mTOR 単独ではなく、上流の PI3K も同時に阻害する作用を有する薬剤や AKT を阻害する薬剤などの開発が進められてきた。中でも、PI3K/mTOR 同時併用阻害剤である NVP-BEZ235 は固形癌に対して臨床第 I / II 試験が進行中である。

本研究では子宮体癌の発生・進展過程における PI3K 経路の関与に着目し、子宮体癌における *AKT1* 遺伝子変異の検索と他の遺伝子変異との共存の有無、また PI3K および mTOR 経路を標的とした治療薬である RAD001 (mTOR 単独阻害剤)、NVP-BEZ235 (PI3K/mTOR 同時阻害剤) の抗腫瘍効果と、その有効性を予測するバイオマーカーについて検討を行った。

[方法]

1、*AKT1* の遺伝子変異解析

東京大学医学部附属病院における子宮体癌 89 症例を対象とした。手術時の摘出検体から腫瘍を採取し、ゲノム DNA を抽出した。検体の採取に際しては、東京大学医学部附属病院倫理委員会の承認のもと、患者の同意を得たうえで使用した。ゲノム DNA を抽出、精製し、PCR-ダイレクトシーケンス法にて *AKT1* のエクソン 4 の遺伝子変異を解析した。

2、子宮体癌における PI3K-AKT/mTOR 経路阻害剤の抗腫瘍効果の解析

子宮体癌細胞株 13 株を使用した。

PI3K-AKT/mTOR 経路を阻害する薬剤として、mTOR 単独阻害剤 RAD001 (everolimus)、PI3K/mTOR 同時阻害剤 NVP-BEZ235 (Novartis 社)を使用した。MAPK 経路の阻害剤として、市販の MEK 阻害剤 (PD98059 と UO126) を購入した。

薬剤添加時の PI3K-AKT/mTOR 経路の標的蛋白のリン酸化抑制をウエスタンブロット法にて確認した。細胞増殖抑制能を MTT アッセイにて評価し、50%阻害濃度 IC₅₀ 値を算出した。細胞周期に与える影響を Flow cytometry 法で解析した。また、*in vivo* の実験として、ヌードマウスの皮下に子宮体癌細胞株 (HEC-59 と AN3CA) を移植した担癌マウスを作成し、RAD001 または NVP-BEZ235 を連日経口投与し、抗腫瘍効果を検討した。

[結果]

1、*AKT1* の遺伝子変異の同定

AKT1 の E17K 遺伝子変異は子宮体癌臨床検体の 2.2%、89 例中 2 例に認められた。他の PI3K-AKT/mTOR 経路を活性化する遺伝子変異として、*PTEN* (61%)、*PIK3CA* (35%)、*K-RAS* (18%)が認められ、相互に重複例が多かった (*PIK3CA* 陽性例で共存率 82%、*K-RAS* 陽性例で共存率 76%) が、*AKT1* 変異の 2 症例においては、これら 3 遺伝子の変異や染色体コピー数異常は認められなかった。

2、子宮体癌における PI3K-AKT/mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果の解析

PIK3CA, *PTEN*, *K-RAS*, *AKT1* の遺伝子変異解析の結果、子宮体癌細胞株 13 株は以下の 4 群に分類された。A 群 (n=4) ; *PIK3CA*, *PTEN* 重複変異陽性、B 群 (n=5); *PTEN* のみ変異陽性、C 群 (n=2); *K-RAS*, *PIK3CA* 重複変異陽性、D 群 (n=2); *K-RAS* (12p12.1) の染色体増幅陽性。全 13 株が、*PIK3CA*, *PTEN*, *K-RAS* 遺伝子のいずれかの変異 (発現異常) を有していた。

in vitro において、RAD001、NVP-BEZ235 とともに子宮体癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示した。添加濃度を振って細胞増殖曲線を作成したところ、12.5 nM 以下の低濃度下では、RAD001 は NVP-BEZ235 と全株で同等以上の細胞増殖抑制効果を示したが、50%抑制効果を示す IC₅₀ 値は、RAD001 では A 群/B 群の 9 株中の 6 株で 100nM 以上 (低感受性) であるのに対し、NVP-BEZ235 では 9 株中すべてにおいて 100nM 以下 (高感受性) であった。C 群、D 群では NVP-BEZ235、RAD001 とともに IC₅₀ は 100nM 以上 (低感受性) であった。標的蛋白のリン酸化抑制を調べたところ、両薬剤とも、低濃度下 (0.625-2.5nM) の時点で、mTOR の下流分子である S6 と 4E-BP1 のリン酸化が抑制されていた。一方、PI3K の下流にあたる Akt (Ser473, Thr308)、GSK3 β 、FOXO1/3a のリン酸化抑制は、

NVP-BEZ235 でのみ、高濃度下 (50-1000nM) において認められた。感受性株 {HEC-59 (A 群)、AN3CA (B 群)} において、薬剤添加後の細胞周期を調べたところ、Sub-G1 (細胞死) の比率は上昇していなかったが、両薬剤ともに G1 期の比率が上昇しており、特に NVP-BEZ235 100nM 添加時に、コントロールに比べ 24-31% 上昇していた。K-Ras 変異陰性、PTEN 変異陽性の子宮体癌株 {HEC-59 (A 群)、AN3CA (B 群)} 担癌マウスを作成し、RAD001、NVP-BEZ235 の経口連日投与を行ったところ、両群において Control 群に比べ、有意な腫瘍増殖抑制効果が確認された。K-RAS 遺伝子発現異常陽性の 4 株では、いずれの阻害剤に対しても低感受性を示したが、MAPK 経路阻害剤 (MEK 阻害剤) を併用することで、相加・相乗的に抗腫瘍効果が認められた。

[考察]

子宮体癌において AKT1 の変異を同定したが、その頻度は 2.2% のみであった。AKT1 の変異頻度は他の癌腫においても 5.9% 以下と低頻度であり、様々な PI3K-AKT/mTOR 経路活性化因子の一つとして、寄与している可能性が高いと考えられる。子宮体癌を含め、AKT1 遺伝子変異が報告されている癌腫では、K-RAS、PIK3CA、PTEN のいずれかの遺伝子変異は高頻度に報告されており、本経路の活性化が重要な役割を果たしていると考えられた。

RAD001 と NVP-BEZ235 の薬効を *in vitro* で比較したところ、両薬剤とも抗腫瘍効果を示したが、濃度依存性の差異が明らかとなった。RAD001 では、濃度依存性の影響が NVP-BEZ235 に比較して弱く、高濃度下では NVP-BEZ235 のほうが細胞増殖抑制効果が高かった。添加濃度と標的蛋白のリン酸化抑制効果の解析結果より、mTOR 経路の抑制は RAD001、NVP-BEZ235 とともに低濃度から観察され、NVP-BEZ235 による AKT および mTOR 経路以外の標的蛋白のリン酸化抑制は、高濃度においてのみ認められた。以上より、NVP-BEZ235 は PI3K/mTOR の両者を阻害するが、低濃度では mTOR の抑制効果が主であり、PI3K の同時阻害効果は高濃度において発揮されると考えられた。また、NVP-BEZ235 の抗腫瘍効果の少なくとも一部は、mTOR 非依存性蛋白のリン酸化抑制に起因していることが示唆された。*in vivo* において、両薬剤間に有意な差がみられなかったことより、NVP-BEZ235 をヒトに応用する場合、十分な薬効を示す血中濃度が維持されているかどうかを含めて検討することが必要と思われる。今回の解析では、K-RAS 変異陰性かつ PTEN 変異陽性 (A 群、B 群のすべて) であれば、NVP-BEZ235 への感受性が高く、この 2 分子の検索がバイオマーカーとして有用であることが示唆された。また、K-RAS 遺伝子変異陽性の C 群、及び K-RAS 遺伝子増幅陽性の D 群において、PI3K/mTOR 経路阻害剤と MAPK 経路阻害剤の併用による相加・相乗的な抗腫瘍効果が確認された。この結果より、子宮体癌の発育において、PI3K/mTOR 経路が不可欠な役割を果たしており、本経路阻害剤がより広く臨床応用できる可能性があると考えられた。

以上、本研究結果より、PI3K/mTOR 経路を標的とした阻害剤は、子宮体癌において、有望な治療戦略であることが示された。