

第18回 神澤医学賞受賞講演 要旨

婦人科悪性腫瘍における包括的ゲノムプロファイルの解明と個別化治療法の開発

Comprehensive genomic profiling and development of personalized medicines in gynecologic cancers

東京大学大学院医学系研究科産婦人科学講座 准教授

織田 克利

はじめに

近年、分子標的薬の開発・臨床応用が進められており、婦人科悪性腫瘍においても、子宮肉腫に対するパゾパニブ（マルチチロシンキナーゼ阻害薬）、卵巣癌に対するベバシズマブ（血管新生阻害薬）、外陰部等の悪性黒色腫に対するニボルマブ（免疫チェックポイント阻害薬）といった薬剤が実地臨床で用いられている。今後も様々な分子標的薬の臨床応用が期待されるが、薬剤の感受性を予測するバイオマーカーが明らかでない場合、臨床試験で十分なエビデンスが確立されず、有効な薬剤活用に結びつかないという問題が生じる。ゲノム解析技術の進歩により、網羅的遺伝子解析を従来よりも低コストで行える時代が近づいてきており、個々人のゲノムプロファイルによって治療法や薬剤の副作用を予測するような「個別化医療」「プレジジョン・メディシン」といった概念も定着してきている。これまでの研究において、婦人科悪性腫瘍（特に卵巣癌と子宮体癌）を中心に、ドライバーとなる遺伝子変異の同定、網羅的なゲノム解析、治療標的候補分子の同定、新規分子標的治療法の探索、治療効果や予後を予測するバイオマーカーの同定を行ってきた。これまでの研究成果と今後の展望について紹介する。

子宮体癌における RAS/PI3K 経路の活性化の意義とその治療戦略

子宮体癌では、*KRAS* 変異、*PTEN* 変異が高頻度（各々約 20%と 50-60%）にみられることが知られており、ともに PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 経路の活性化に関与する。倫理委員会の承認と患者同意のもと、子宮体癌臨床手術検体（n=89）を用いて、PI3K 経路における他の遺伝子変異を検索した。その結果、PI3K の触媒サブユニット p110 α をコードする *PIK3CA* 変異が 36%に認められ、*PTEN*, *KRAS* 変異と高頻度に共存することが明らかとなった [1-3]。さらに、同経路の *AKT1* 遺伝子変異も 2.2%に存在した [4, 5]。また、遺伝子変異以外に染色体コピー数異常も RAS/PI3K 経路の活性化に関与しており、*KRAS* を負に制御する *NF1* (neurofibromin 1) の LOH が 13%、*PTEN* の LOH が 28%、*KRAS*, *PIK3CA*

のコピー数増加が各々13%、19%に存在した [6]。全体として、子宮体癌全体の 96%で RAS/PI3K 経路の遺伝子変異またはコピー数異常が存在しており、普遍的であることが明らかとなった [6-8]。

RAS/PI3K 経路は上皮細胞の悪性転化に重要と考えられており、子宮体癌において RAS、PTEN 変異は子宮内膜異型増殖症の段階から高頻度に認められる。一方、*PIK3CA* 変異は非浸潤癌ではほとんど認められない。そこで、不死化上皮細胞に *KRAS* 変異、または *PIK3CA* 変異を導入し、足場非依存性増殖能を検討したところ、各々単独ではコロニーが形成されなかったが、*KRAS* 変異と *PIK3CA* 変異が共存した場合、コロニー形成能が飛躍的に上昇した [2]。以上より、子宮体癌では、PI3K 経路の協調的な活性化が浸潤能獲得のプロセスに関わっており、*PIK3CA* 変異が浸潤癌への進行に重要であることが示された。

近年、PI3K とその下流の mTOR を阻害する分子標的薬が開発されており、特に mTOR 阻害剤は腎細胞癌をはじめとして日本でも保険収載に至っている。そこで、子宮体癌株 (n=13) において、PI3K/mTOR 同時阻害剤 (BEZ-235) と mTOR 阻害剤 (everolimus) の抗腫瘍効果を検討した。MTT アッセイにおいて、13 株中 12 株において、BEZ-235 のほうが everolimus に比して、濃度依存性の増殖抑制効果が高かった [9]。特徴として、everolimus では低濃度 (2.5 nM 以下) から標的蛋白 (4E-BP1, S6) のリン酸化抑制がみられるが、BEZ-235 では mTOR の標的蛋白のリン酸化抑制は同様に低濃度からみられるのに対し、AKT の標的蛋白 (GSK-3 β , FOXO1/3a, MDM2 等) のリン酸化抑制は高濃度 (>50 nM) において認められた。BEZ-235 は濃度依存的に細胞周期 G1 停止を誘導し、ヌードマウス皮下移植モデルにおいても有意に腫瘍増殖を抑制した。50%増殖抑制濃度からは、*KRAS* 変異陽性株において BEZ-235 の感受性が低い傾向にあった。RAS 変異は PI3K/mTOR 経路以外に MAPK 経路の活性化に深く関与している。実際に、PI3K/mTOR 阻害剤と MAPK 阻害剤 (MEK 阻害剤) を併用すると、相乗的な増殖抑制効果を示した [10]。また、放射線照射は PI3K 経路を活性化することが知られており、子宮体癌株においても放射線照射による PI3K 経路の更なる活性化が生じる [11]。子宮体癌株において、BEZ-235 を添加すると放射線に対する感受性が高まる結果が得られた [11]。このように PI3K/mTOR 阻害剤を Radiosensitizer として活用できる可能性が期待される。

子宮体癌における他の治療標的経路

子宮体癌において、化学療法抵抗性にオートファジーの亢進が関与しており、オートファジー阻害剤クロロキンがシスプラチン抵抗性子宮体癌株で感受性を回復させる可能性があることを示した [12]。また、SIRT6 (Sirtuin family の一つ) が子宮体癌細胞において、がん抑制遺伝子としての作用を有し、survivin (抗アポトーシス因子) 発現が抗アポトーシスに関与していることも報告した [13]。PARP 阻害剤は主として遺伝性乳癌卵巣癌 (HBOC: Hereditary Breast and Ovarian Cancer) 症例で有効性が示されているが、BRCA 変異陰性例でも有効な場合があり、我々は子宮体癌細胞株においても PARP 阻害剤に高感受性を示すもの

があることを報告した [14]。

子宮体癌におけるゲノム不安定性と予後予測因子

ゲノム不安定性はマイクロサテライト不安定性と染色体コピー数異常に大別され、子宮体癌（特に類内膜腺癌）ではマイクロサテライト不安定性が高頻度に認められる。子宮体部類内膜腺癌の臨床検体における解析の結果、マイクロサテライト不安定性は全体の 34%にみられ、染色体不安定性と負に相関していることが明らかとなった。さらに、マイクロサテライト不安定性は予後良好な傾向を示したが、染色体不安定性は臨床進行期や分化度といった臨床病理学的因子とは独立した予後不良因子であることが明らかとなった [6]。

ゲノム不安定性以外にも形態学的診断のみでは判断しがたい癌の生物学的特性が存在する可能性があり、サイクリン依存性キナーゼ（Cyclin Dependent Kinase; CDK）活性に着目した。子宮体癌では Cyclin D1 変異が存在しており [15]、RAS/PI3K 経路の活性化の観点からも、CDK 活性が子宮体癌における細胞増殖能と関連している可能性が考えられた。そこで、Cell Cycle Profiling (C2P)アッセイによって CDK4/5 の酵素活性と発現量をもとに CDK4/6 Specific activity(CDK4/6SA)を臨床検体で測定した。その結果、Low risk 群（主として IA 期や高分化型）では、CDK4/6SA 高値は有意に予後不良因子であったのに対し、Low risk 群（主として III/IV 期）では、CDK4/6SA 高値はむしろ予後良好であった[16]。すなわち、CDK4/6SA が予後予測、化学療法感受性予測のバイオマーカーとなる可能性が示された。

卵巣明細胞癌における PI3K 経路、TP53 シグナルを標的とした治療戦略

p53 は、細胞周期停止（細胞生存）とアポトーシス誘導（細胞死）という、一見矛盾する事象を使い分けている。新規標的遺伝子 p53AIP1 の機能を解析したところ、p53 (Ser-46)の特異的なリン酸化によりその発現が上昇し、p53 依存性アポトーシスを誘導することが明らかとなった [17, 18]。PI3K 経路の活性化は、MDM2 の活性化を介して、p53 機能を抑制し、抗アポトーシス作用をもたらす。卵巣明細胞腺癌では、PIK3CA 変異を含めて、子宮体癌と同様に PI3K 経路が広く活性化されている。そこで、PI3K/mTOR 同時阻害剤 DS-7423 を、p53 変異陰性の卵巣明細胞腺癌細胞株 6 種類に添加したところ、すべての株でアポトーシス誘導が確認された [19]。PI3K/mTOR 阻害により、MDM2 のリン酸化抑制、p53 の活性化および p53 (Ser-46)のリン酸化が生じており、その結果、p53AIP1 の発現上昇、アポトーシス誘導に至ることが示された。

卵巣癌における染色体コピー数異常と網羅的発現解析

卵巣明細胞癌においても、染色体不安定性は予後不良な傾向を示した。染色体コピー数異常の発生頻度をみたところ、卵巣漿液性癌では Focal な(微細な領域の)増幅や欠損が多いのに対し、卵巣明細胞癌では Arm level（染色体の前腕・長腕全体）の増幅や欠損頻度が高い

ことが明らかとなった [20]。また、卵巣明細胞癌におけるマイクロアレイ解析により、予後を既定するクラスターが存在することを明らかとした [20]。現在、卵巣漿液性癌、卵巣明細胞癌のそれぞれ約 80 例について、全エクソン解析を施行しており、遺伝子変異プロファイル、予後に関連する因子、新たな治療標的分子の同定、塩基置換パターンの特徴について検討を進めている。

今後の展望

上皮性卵巣癌における分子標的薬として、血管新生阻害剤である **Bevacizumab** に加え、**PARP** 阻害剤や免疫チェックポイント阻害剤といった新たな薬剤の有効性が示されている。特に、**PARP** 阻害剤オラパリブは 2014 年 12 月に欧米（FDA、EMA）で承認されており、日本でも今後の臨床応用が待たれる。しかしながら、オラパリブの欧米における適応は生殖細胞系を主とした **BRCA** 遺伝子変異陽性進行卵巣癌に限定されており、コンパニオン診断として遺伝子検査が必須となる。このように、卵巣癌における分子標的薬においてもバイオマーカーに基づく個別化治療が不可欠となりつつある。婦人科腫瘍領域の臨床医にとっても、分子標的薬・ゲノム医療の知識がますます求められるようになるであろう。現在、これまでの研究成果をふまえて、卵巣癌・子宮体癌における新規治療法の確立を目指し、独自の臨床試験を立案中である。基礎研究の継続とあわせて、産官学連携のもと、臨床試験および新規治療法の臨床応用に向けたトランスレーショナルリサーチについても積極的に取り組んでいきたい。

参考文献

1. **Oda K**, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F: High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 65:10669-10673, 2005
2. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, **Oda K**, Okada J, Rauen K, McCormick F: Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:461-467, 2005
3. **Oda K**, Okada J, Timmerman L, Rodriguez Viciana P, Stokoe D, Shoji K, Taketani Y, Kuramoto H, Knight ZA, Shokat KM, McCormick F: PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. *Cancer Res* 68:8127-8136, 2008
4. 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
5. 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
6. 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
7. Ikeda Y, **Oda K**, Nakagawa S, Murayama Hosokawa S, Yamamoto S, Ishikawa S, Wang L, Takazawa Y, Maeda D, Wada Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y: Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays as a diagnostic tool in patients with synchronous endometrial and ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 22:725-731, 2012
8. **Oda K**, Ikeda Y, Kawana K, Fujii T. mTOR Signaling in Endometrial Cancer: From a Molecu-

9. Shoji K, **Oda K**, Kashiyaama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Koso T, Matsumoto Y, Wada Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y: Genotype-Dependent Efficacy of a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR Inhibitor, RAD001, in Endometrial Carcinomas. *PLoS One* 7:e37431, 2012
10. Inaba K, **Oda K**, Ikeda Y, Sone K, Miyasaka A, Kashiyaama T, Fukuda T, Uehara Y, Arimoto T, Kuramoto H, Wada-Hiraike O, Kawana K, Yano T, Osuga Y, Fujii T: Antitumor activity of a combination of dual PI3K/mTOR inhibitor SAR245409 and selective MEK1/2 inhibitor pi-masertib in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol* 138:323-31, 2015
11. Miyasaka A, **Oda K**, Ikeda Y, Sone K, Fukuda T, Inaba K, Makii C, Enomoto A, Hosoya N, Tanikawa M, Uehara Y, Arimoto T, Kuramoto H, Wada-Hiraike O, Miyagawa K, Yano T, Kawana K, Osuga Y, Fujii T: PI3K/mTOR pathway inhibition overcomes radioresistance via suppression of the HIF1-alpha/VEGF pathway in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 138:174-180, 2015
12. Fukuda T, **Oda K**, Wada Hiraike O, Sone K, Inaba K, Ikeda Y, Miyasaka A, Kashiyaama T, Tanikawa M, Arimoto T, Kuramoto H, Yano T, Kawana K, Osuga Y, Fujii T: The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition. *Gynecol Oncol* 137:538-545, 2015
13. FukudaT, Wada-Hiraike O, **Oda K**, Tanikawa M, Makii C, Inaba K, Miyasaka A, Miyamoto Y, Yano T, Maeda D, Sasaki T, Kawana K, Fukayama M, Osuga Y, Fujii T: Putative tumor suppression function of SIRT6 in endometrial cancer. *FEBS Lett* 589:2274-81, 2015
14. Miyasaka A, **Oda K**, Ikeda Y, Wada-Hiraike O, Kashiyaama T, Enomoto A, Hosoya N, Koso T, Fukuda T, Inaba K, Sone K, Uehara Y, Kurikawa R, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Nakagawa S, Kuramoto H, Miyagawa K, Yano T, Kawana K, Osuga Y, Fujii T: Anti-tumor activity of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. *BMC Cancer* 14:179,2014
15. Ikeda Y, **Oda K**, Hiraike-Wada O, Koso T, Miyasaka A, Kashiyaama T, Tanikawa M, Sone K,

- Nagasaka K, Maeda D, Kawana K, Nakagawa S, Fukayama M, Tetsu O, Fujii T, Yano T, Kozuma S: Cyclin D1 harboring the T286I mutation promotes oncogenic activation in endometrial cancer. *Oncol Rep* 30:584-588, 2013
16. Ikeda Y, **Oda K**, Ishihara H, Wada-Hiraike O, Miyasaka A, Kashiyaama T, Inaba K, Fukuda T, Sone K, Matsumoto Y, Arimoto T, Maeda D, Ikemura M, Fukayama M, Kawana K, Yano T, Aoki D, Osuga Y, Fujii T. *Br J Cancer* 113:1477-83, 2015
 17. **Oda K**, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y: p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102:849-862, 2000
 18. **Oda K**, Ikeda Y, Kashiyaama T, Miyasaka A, Inaba K, Fukuda T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Asada K, Sone K, Osuga Y, Fujii T. Characterization of TP53 and PI3K signaling pathways as molecular targets in gynecological malignancies. *J Obstet Gynaecol Res*, in press
 19. Kashiyaama T, **Oda K**, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji K, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T: Antitumor Activity and Induction of TP53-Dependent Apoptosis toward Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma by the Dual PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423. *PLoS One* 9:e87220, 2014
 20. Uehara Y, **Oda K**, Ikeda Y, Koso T, Tsuji S, Yamamoto S, Asada K, Sone K, Kurikawa R, Makii C, Hagiwara O, Tanikawa M, Maeda D, Hasegawa K, Nakagawa S, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Fujiwara K, Yano T, Osuga Y, Fujii T, Aburatani H: Integrated copy number and expression analysis identifies profiles of whole-arm chromosomal alterations and subgroups with favorable outcome in ovarian clear cell carcinomas. *PLoS One* 10:e0128066, 2015