

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16828

研究課題名(和文)子宮頸癌におけるPIK3CA遺伝子変異をターゲットとした新規分子標的治療の探索

研究課題名(英文)The study of the molecular inhibitors targeting PIK3CA mutation in cervical cancers

研究代表者

秋山 梓(Akiyama, Azusa)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80647272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PI3K/Aktシグナル経路はシスプラチンや放射線療法抵抗性に関連することが知られている。シスプラチン併用同時放射線療法を施行された進行子宮頸癌におけるPIK3CA遺伝子変異の臨床的意義を解明し、さらに分子標的薬の併用によるPI3K/Akt経路の抑制が同時放射線療法による奏効率や生存率を改善する可能性についての基礎データを取得することを、研究の目的とした。III～IV期子宮頸癌50例において、PIK3CA遺伝子変異は12%に認められた。臨床病理学的因子を解析し、子宮頸癌においてPIK3CA遺伝子変異は正常例に比べ、全生存期間とがん特異的生存率において有意な予後不良因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行子宮頸癌においてPIK3CA遺伝子変異を12%に認めた。子宮頸癌におけるPIK3CA遺伝子変異は有意な予後不良因子であることを示した。

PIK3CA遺伝子変異によるPI3K/Akt経路の活性化のために放射線感受性およびシスプラチン感受性が減少し、CCRTの効果が減弱し予後が不良となるのであれば、PI3K/Aktシグナル経路をターゲットとした分子標的治療薬は、PIK3CA遺伝子変異を有する進行子宮頸癌において予後を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The activated PI3-kinase/Akt pathway is known to be involved in both cisplatin-resistance and radioresistance, to date, only a few studies have reported significant associations between PIK3CA gene mutational status and outcome by CCRT in the disease. The aim of this study was to clarify the prognostic significance of PIK3CA mutational status in cervical cancers treated by CCRT. PIK3CA mutation was found in 7 of 59 patients (12%). Subsequent survival analyses revealed that PIK3CA mutation was a significant prognostic factor for poor overall survival [multivariate adjusted HR, 3.9; 95% CI, 1.3-11.8; P=.017] and cancer-specific survival [multivariate adjusted HR, 3.6; 95% CI, 1.2-11.0; P=.024].

Molecular inhibitors targeting the PI3-kinase/Akt pathway may improve the outcome by CCRT in cervical cancers harboring PIK3CA mutation, providing significant implications for novel treatment strategy based on precision medicine in the disease.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 化学放射線療法 PIK3CA遺伝子変異 シスプラチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

国内では近年 HPV ワクチンが導入され、今後子宮頸癌の罹患率減少が期待される。一方で、ワクチンや検診を受けない集団が罹患すると考えられる進行子宮頸癌(Ⅲ～Ⅳ期)の5年生存率は約30～50%と依然として非常に不良であり、予後改善のための新たな治療戦略の開発が早急に望まれる。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。PIK3CA 遺伝子変異は子宮頸癌においても13～36%に報告されており、また PI3K/Akt 経路の活性化はシスプラチン感受性および放射線感受性に関与していることが知られ、進行子宮頸癌の同時放射線療法後の奏効率や生存率が PIK3CA 遺伝子変異と相関することが報告されているが、未だコンセンサスには至っていない。もし PIK3CA 遺伝子変異による PI3K/Akt 経路の活性化のために放射線感受性およびシスプラチン感受性が減少し、CCRT の効果が減弱し予後が不良となるのであれば、分子標的薬により PI3K/Akt 経路を阻害すれば、進行子宮頸癌の予後を改善できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

シスプラチン併用同時放射線療法を施行された進行子宮頸癌における PIK3CA 遺伝子変異の臨床的意義を解明し、さらに分子標的薬の併用による PI3K/Akt 経路の抑制が同時放射線療法による奏効率や生存率を改善する可能性についての基礎データを取得することを、研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

当科において一貫した治療方針のもとでシスプラチン併用同時化学放射線療法(CCRT)により初回治療された進行子宮頸癌ⅡIB～ⅣA期の症例59名において、治療前の生検組織検体のパラフィン包埋ブロックからDNAを抽出し、PIK3CA 遺伝子変異のホットスポットであるエクソン9および20をPCRにより増幅し、その産物を電気泳動したのちゲルから切り出し、DNAを抽出・精製し、それを鋳型としてダイレクト・シーケンシング法によりDNA配列を解析する。解析した各症例のDNA配列を正常なPIK3CA 遺伝子のDNA配列と比較し、変異の有無と種類(ノンセンス、ミスセンス、フレームシフト)、蛋白質上の変異の位置(重要なドメインの上か否か)などを決定する。

各症例の臨床病理学的因子、治療に対する反応性、予後などの臨床情報の収集を行い、予後に関してはCox比例ハザード・モデルを使用して、PIK3CA 遺伝子変異の有無別に、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う。年齢、組織型、リンパ節転移の有無、進行期、治療に対する奏効率などといった各臨床病理学的因子とPIK3CA 遺伝子変異の有無とに関連性の解析は、Fisher's exact testにより行い、遺伝子変異を有する子宮頸癌にはどのような臨床的特徴があるのかを検討する。

既にPIK3CA 遺伝子変異を有することが知られているヒト子宮頸癌細胞株CaSkiを使用し、分子標的薬によるPI3K/Akt経路の阻害による効果を調べる。

### 4. 研究成果

シスプラチン毎週投与併用同時化学放射線療法が施行されたⅢ～Ⅳ期子宮頸癌59症例において、治療前の生検検体のパラフィン包埋ブロックからDNAを抽出し、ダイレクト・シーケンシング法によりDNA配列を解析した。PIK3CA 遺伝子変異は12%に認められた。認められた変異は全てPIK3CA 遺伝子がコードするp110 蛋白質のヘリカルドメインまたはキナーゼドメイン内に位置していた。(Table 1)

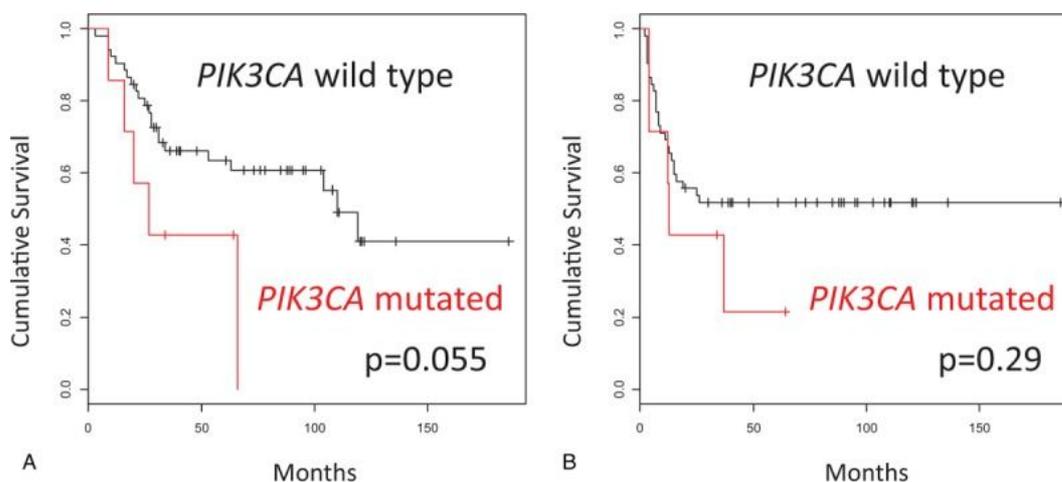
PIK3CA 変異の有無により全生存期間を比較したところ、PIK3CA 変異症例は正常例に比べ有意に予後不良であった。さらに予後不良因子の単変量解析を行ったところ、進行期、骨盤リンパ節転移、PIK3CA 遺伝子変異の3因子が有意な予後不良因子であった(それぞれ $p=0.033$ ,  $0.047$ ,  $0.024$ )。これら3因子においてさらに多変量解析を行ったところ、進行期およびPIK3CA 遺伝子変異が有意な独立した予後不良因子であった(それぞれ $p=0.034$ ,  $0.0085$ )。(Figure 1, Table 2)

PIK3CA 遺伝子変異を有することが知られているヒト子宮頸癌細胞株CaSki細胞を用い、細胞増殖を調べ、シスプラチンとPI3K阻害薬であるcopanlisibをそれぞれ投与、シスプラチンとcopanlisib併用の効果について調べた。Cell viability assayを行い、シスプラチン単剤とcopanlisib単剤と、それぞれの併用で50%阻害濃度を測定したところ、併用することで相乗効果を認めた。

**Table 1** Results of PIK3CA mutation analysis.

|   | <b>Nucleotide</b> | <b>Amino acid</b> | <b>Exon</b> | <b>Domain</b> |
|---|-------------------|-------------------|-------------|---------------|
| 1 | 1571G>A           | R524K             | 9           | Helical       |
| 2 | 1624G>A           | E542K             | 9           | Helical       |
| 3 | 1624G>A           | E542K             | 9           | Helical       |
| 4 | 1633G>A           | E545K             | 9           | Helical       |
| 5 | 1633G>A           | E545K             | 9           | Helical       |
| 6 | 1634A>C           | E545A             | 9           | Helical       |
| 7 | 3073A>G           | T1025A            | 20          | Kinase        |

**Figure 1** Kaplan–Meier curves in cervical cancers treated by CCRT. (A) Overall survival in cases with wild-type *PIK3CA* (n=52) versus mutant *PIK3CA* (n=7); (B) Progression-free survival in cases with wild-type *PIK3CA* (n=52) versus mutant *PIK3CA* (n=7)



**Table 2** Univariate and adjusted multivariate analyses of PIK3CA mutational status for survival.

|                           | <b>Univariate</b> |               |          | <b>Multivariate adjusted</b> |               |          |
|---------------------------|-------------------|---------------|----------|------------------------------|---------------|----------|
|                           | <b>HR</b>         | <b>95% CI</b> | <b>P</b> | <b>HR</b>                    | <b>95% CI</b> | <b>P</b> |
| Progression-free survival | 1.7               | 0.64–4.4      | .29      | 2.3                          | 0.81–6.5      | .12      |
| Overall survival          | 2.6               | 0.95–6.9      | .062     | 3.9                          | 1.3–11.8      | .017     |
| Cancer-specific survival  | 2.7               | 0.99–7.3      | .051     | 3.6                          | 1.2–11.0      | .024     |

CI = confidence interval, HR = hazard ratio.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Bouchra Lachkar, Takeo Minaguchi, Azusa Akiyama, Shuling Liu, Shuang Zhang, Chenyang Xu, Ayumi Shikama, Nobutaka Tasaka, Manabu Sakurai, Sari Nakao, Hiroyuki Ochi, Hiroyuki Yoshikawa, Toyomi Satoh | 4. 巻<br>97           |
| 2. 論文標題<br>Prognostic significance of PIK3CA mutation in stage IIB to IVA cervical cancers treated by concurrent chemoradiotherapy with weekly cisplatin   | 5. 発行年<br>2018年      |
| 3. 雑誌名<br>Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>e11392 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1097   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Lachkar Bouchrar  |
| 2. 発表標題<br>毎週シスプラチンの同時併用化学放射線療法により治療されたステージIIBまたはIVの子宮頸癌におけるPIK3CA変異の予後的影響 |
| 3. 学会等名<br>日本産科婦人科学会   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|