

論文題目 下咽頭癌における Focal Adhesion Kinase 発現と関連遺伝子異常の
臨床的意義に関する研究

氏 名 小 村 豪

【背景、目的】近年、頭頸部癌ではヒトパピローマウイルス(HPV)の感染が特に中咽頭癌において有力な予後バイオマーカーであることが明らかになった。一方で下咽頭癌においては飲酒が発癌リスクとされ、2 型アルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde dehydrogenase-2 以下、ALDH2) の遺伝子多型がエタノールの代謝産物であるアルデヒドの代謝活性を低下させ、その発生頻度を高める。日本人における *ALDH2**1/*2 保因率は白人・黒人(ほぼ 0%)と比較して高率(40.9%)で、下咽頭癌は日本人に多い癌種である。今日、手術療法が当疾患で最も良好な局所制御率を得られる治療だが、さらなる成績向上には遠隔転移出現率の改善が重要と考えられる。

Focal Adhesion Kinase (FAK)は p53 との相互作用、PI3K/AKT 経路の活性化、上皮間葉移行など様々なシグナル経路を通じて、癌細胞の増殖、浸潤、転移に関与しており、様々な癌腫において FAK 高発現が予後不良あるいは再発予測因子であると報告されている。下咽頭癌においても、FAK が予後予測のバイオマーカーとなり、術後補助療法の治療標的になりうることが予想される。また、頭頸部癌は *TP53* 変異や PI3K/AKT 経路活性化が多く認められる癌腫であり、FAK 発現との相関を調べることで下咽頭癌における FAK の具体的な機能を明らかにできると考えた。また、頭頸部癌全部位を対象とした欧米からの既報では *TP53* 変異は予後不良因子とされるが、それらには欧米人で頻度の少ない下咽頭癌症例はほとんど含まれていない。

そこで下咽頭癌手術治療例の切除検体を用いて、FAK 発現が予後予測因子になりうるかを検討し、さらに FAK と *TP53* の変異、及び *PIK3CA* の変異・増幅との相関性を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。また、下咽頭癌の発癌原因を探るため、HPV 感染及び *ALDH2* 多型との関連を検討した。

【対象、方法】2004 年～2014 年に東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科で初回に手術療法を施行した下咽頭癌新鮮例 107 例の手術材料を用いて FAK の免疫染色を

行い、腫瘍の FAK 発現状態と予後、ならびに臨床病理学的背景因子との関係を検討した。また、腫瘍組織及び正常粘膜の Western blot を行い、FAK の免疫染色による評価との整合性を確認した。

次に 2008 年～2014 年の 57 例を対象に①p16 免疫染色及び HPV in situ hybridization を用い、下咽頭癌発症における HPV の関与について、②Sanger 法による *ALDH2* 多型検索と *ALDH2* 多型と飲酒量の関係性について、③Sanger 法による *TP53* 変異検索とその頻度及び *ALDH2* 多型、p53 タンパク発現、予後との関連、FAK 発現との相関性について、④Sanger 法による *PIK3CA* 変異検索ならびに定量的 real-time PCR による *PIK3CA* 増幅とその頻度、予後との関連、及び FAK 発現の相関性を検討した。

【結果】107 例全体の 5 年疾患特異的生存率は 60%であった。FAK 免疫染色の結果、FAK 陽性例では陰性例と比較して有意に病理学的リンパ節個数が多く ($P=0.046$)、予後不良 ($P=0.003$)で、高率に遠隔転移が出現していた ($P=0.004$)。次に FAK 発現の有無、既存の術後予後不良因子とされる切除断端と節外浸潤の有無、及び病理学的 T 分類について多変量解析を行い、FAK 陽性 ($P=0.01$; ハザード比 $=2.55$; 95%信頼区間 $=1.24-5.23$) 及び節外浸潤 ($P=0.004$; ハザード比 $=2.80$; 95%信頼区間 $=1.40-5.62$) が独立した予後不良因子であることがわかった。

次に 2008 年以降の 57 例について p16 免疫染色は 3 例で陽性と判定された。しかし p16 陽性 3 例全てで ISH-HPV 陰性と判定された。従って、全例が HPV 非関連癌と判断された。

ALDH2 多型を検索したところ、*ALDH2**1/*1 症例は 24 例 (42%)、*ALDH2**1/*2 症例は 33 例 (58%) であった。飲酒量を Sake-Index に換算し *ALDH2* 多型毎の飲酒量について比較検討を行ったところ、*ALDH2**1/*2 症例は有意に少ない飲酒量で下咽頭癌を発症していた。 ($P=0.02$)

TP53 遺伝子の変異を検索したところ、*TP53* 変異様式の頻度は、野生型 18 例 (32%)、ミスセンス変異 24 例 (42%)、ナンセンス変異 9 例 (16%)、スプライシング異常 4 例 (7%)、フレームシフト変異 2 例 (3%) であり、39 例 (68%) で変異をきたしていた。また、*TP53* 変異と p53 タンパク発現の関連性について検討すると、野生型症例では p53 陰性/陽性 $=13/5$ 例、ミスセンス変異症例では p53 陰性/陽性 $=7/17$ 例、Truncated 変異症例では p53

陰性/陽性=15/0例であり、有意差を認めた ($P=0.0001$)。次にTP53変異と予後について検討を行った。3年疾患特異的生存率はそれぞれ野生型/ミスセンス変異/Truncated変異症例が94%/58%/42%であった。TP53変異症例は野生型TP53症例と比較し、有意に予後不良 ($P=0.01$)、かつTruncated変異症例は野生型+ミスセンス変異症例と比較し、有意に予後不良 ($P=0.03$) であった。FAK発現とTP53変異の相関性は認めなかったが、多変量解析にてTP53変異 ($P=0.03$; ハザード比=4.89; 95%信頼区間=1.12–21.3) とFAK陽性 ($P=0.04$; ハザード比=3.02; 95%信頼区間=1.07–8.49) は独立した予後不良因子であることがわかった。

PIK3CA遺伝子の変異検索を行い、9例(16%)で変異を認めた。また、定量的real-time PCRの結果、19例(33%)を増幅症例と判定した。PIK3CA変異・増幅には予後との関連は見られなかった。また、FAK発現とPIK3CA変異・増幅の間にも相関性を認めなかった。

【考察】これまでいくつかの頭頸部癌の他部位の既報において、FAK発現は予後不良因子であると報告されている。本研究では、下咽頭癌においてもFAK発現が予後バイオマーカーになりうる可能性を示した。原発巣切除後に行うFAK発現状況の評価は、経口腔的切除術後の予防的頸部郭清術の追加、あるいは遠隔転移予防のための補助療法の適応を判断する上で有用となる可能性がある。また、FAK阻害剤が実臨床に導入される暁には、下咽頭癌においても有力な治療薬となることが期待される。

下咽頭癌の発癌に関与する要因については、本研究においてp16陽性の割合は5%と低く、またp16陽性症例でのHPV-ISH 結果は全例陰性であった。従って下咽頭癌発症にHPVはほぼ関与しないと考える。一方で①下咽頭癌症例におけるALDH2*1/*2頻度が日本人健常者コホート(40.9%)より17%も多かったこと、②ALDH2*1/*2保因者がALDH2*1/*1保因者と比較してより少ない飲酒量で発症していることが明らかになった。以上より、下咽頭癌の発症には飲酒とALDH2多型が深く関与していることが再認識された。

またTP53変異が下咽頭癌手術治療例においても予後因子になることが示された。The Cancer Genome Atlas (TCGA)から報告されたHPV非関連頭頸部癌の網羅的変異解析データ(84%)と比較して、本研究ではTP53変異は68%とやや低い結果であっ

た。この理由として、人種・部位による差異の他に、TCGAデータは次世代シーケンサーによるexome sequence解析であり、Sanger法と比較して検出精度に優れる可能性が挙げられる。*TP53*変異とp53タンパク発現の関係については、①野生型症例は、正常p53タンパクがユビキチン-プロテアソーム系により速やかに分解される、②ミスセンス変異症例は、異常p53タンパクが分解されずに蓄積することで高発現し、蓄積した変異型p53は、優性阻害変異あるいは機能獲得型変異として発癌に寄与する、③Truncated変異症例は、mRNA decayによりmRNAでの分解されるもしくはそもそも一次抗体が認識可能なp53タンパクが作られない、以上の機序が考えられた。

本研究では、FAK 発現とその下流カスケードに位置する *TP53* 変異、*PIK3CA* 変異・増幅との相関関係は見出せず、FAK 発現と *TP53* 変異が独立した予後因子であることがわかった。FAK は多彩な下流カスケードを持つがゆえに、癌種毎での知見の蓄積が必要であると考えられる。

【まとめ】下咽頭癌手術治療例において、①原発巣の FAK 高発現が予後、リンパ節転移個数、そして遠隔転移出現率に相関すること、②下咽頭癌の発癌要因として HPV は関与せず、*ALDH2* 多型と飲酒量が寄与すること、③*TP53* 変異が予後に相関すること、④FAK 発現が *TP53* あるいは *PIK3CA* 遺伝子異常との関連をもたない可能性を明らかにした。