

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10098

研究課題名(和文) 消化管間葉系腫瘍に対する分子標的治療薬耐性のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanisms for acquired imatinib resistance beyond secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumor

研究代表者

高橋 剛 (Takahashi, Tsuyoshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50452389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：消化管間質腫瘍は、分子標的治療薬が高い奏効率を示すことが示された。一方、約2年で半数に耐性が生じることが知られ臨床問題となっている。細胞株を用いて、遺伝子変異解析を用いた発現解析を行い、IM耐性のメカニズムを明らかにすることを目的とした。GIST細胞株にIM暴露によりIM耐性細胞株を作成する過程において、エキソーム解析を行い、遺伝学的変化を検討した。IM耐性過程におけるGIST細胞株の変化につきエキソーム解析の結果より細胞系統図を作成した。GISTにおけるイマチニブ耐性化は、driver geneであるKITの二次耐性変異が重要な意義をもつことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The GIST is the most common mesenchymal tumor of the digestive tract, in which proliferation is driven by gain-of-function mutations in KIT. Despite the revolutionary benefits of imatinib, more than 80% of patients eventually develop disease progression driven by secondary resistance mutations in KIT kinase domains. To comprehensively characterize the variants associated with imatinib resistance, we performed a genomic and transcriptomic analysis of four fully resistant cell lines and one partially resistant cell line before acquiring full resistance. We identified single nucleotide variants and copy number alterations by exome sequencing and transcriptional changes from microarrays. The cell line with partial resistance exhibited drastic transcriptional changes despite the few genomic changes. In contrast, fully resistant cell lines had many more genomic changes while the transcriptomic changes were less dramatic.

研究分野：外科学

キーワード：GIST イマチニブ 分子標的治療薬耐性

1. 研究開始当初の背景

消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor:GIST) は、1998年 *KIT* 遺伝子の機能獲得型変異によって生じる腫瘍であることが発見報告された比較的稀な消化管間葉系腫瘍である。この病因に基づき開発されたキナーゼ阻害剤であるイマチニブが臨床導入され、高い腫瘍効果と安全性により分子標的治療の成功モデルとされている。一方、French sarcoma group において実施された BFR14 trial において、1年、3年、5年間の長期寛解例において、治療の中断がほぼ全例で再燃をきたすことが報告され、一生涯の治療が必要であると考えられている。組織学的にも、GIST にイマチニブを投与すると腫瘍細胞はアポトーシスを起こし、硝子化変性を生じるが、腫瘍細胞は死に絶えることはないといわれる。イマチニブ投与奏功症例の切除例においては、大部分は硝子化変性を認める一方で、*KIT* 染色陽性の残存細胞が必ず確認される。こういった細胞は、イマチニブ治療下増殖力の殆ど無い **GIST 細胞 (persistent cells)** と考えられる。

persistent cells はイマチニブ存在下で、1. 増殖活性は無く、2. *KIT* を発現するが活性指標のリン酸化は認めない、3. 元の *KIT* 遺伝子変異を持つが二次耐性遺伝子変異はない。ただし、イマチニブの中止に伴い再増殖を開始し、治療中止により再燃を生じる原因となると考えられている。

一方、イマチニブ耐性病変では、治療前と同じく盛んに増殖する **GIST 細胞 (resistant cells)** を認める。resistant cells はイマチニブ存在下でも1. 増殖分裂し、2. *KIT* リン酸化を認め、3. *KIT* 遺伝子に二次遺伝子変異を認める (Nishida 2008, 2009; Heinlich 2003, 2008)。本研究では、まず persistent cells に着目し、その特徴を明らかにすることで耐性を未然に防ぐ新規治療法の開発をめざす。

2. 研究の目的

本研究では、GIST における 1. persistent cells の特徴を明らかにし、2. persistent cells に対する新規治療法の開発を目的とする。さらに、その先の imatinib resistant cells が出現を誘発しやすい環境等についても検討を行い、3. 二次耐性発生機構を明らかにする事を目的とする。その特定により、耐性出現の抑制への研究開発につながれると考える。

3. 研究の方法

イマチニブ耐性を誘導する過程については、GIST 細胞株を用いて作成し、親株、persistent cell, resistant cell のそれぞれについてエキソーム解析を行うことで、遺伝子変異の過程について検討を行う。さらに、イマチニブ治療前後の同一患者検体を用いることで、上記変異の臨床的意義を検討し候補を絞る予定である。さらには、deep sequence を用いて、遺伝子変異を有する細胞の割合についての検討を行い、バイオインフォマティクス技術による数学的解析を加えることで、発生時期についての検討を行う。さらには、特定の分子、変異を持った遺伝子の耐性発生に関与の評価に関しては、in vitro で遺伝子導入を行うことでその意義の同定を試みる。耐性に関連する分子、条件を発見することで耐性を生じにくくする治療法の開発につなげる。

4. 研究成果

ヒト臨床検体ならびに GIST 細胞株を用いたエキソーム解析を実施し、変異による細胞の遺伝子学的系統図を作成した。その結果、耐性取得後の細胞 (resistant cells) においては、元の親細胞株と比して数多くの遺伝子変異を認める一方で、persistent cells においては、遺伝子変異は生じていないことがわかり、epigenetic な要因が関連していることが示された。

さらに、それぞれのマイクロアレイを用いた発現解析の結果、resistant cellsに比してpersistent cellsにおいて大きくその発現系が変化していることを確認した。

上記結果をもって、親株と persistent cells に対して、メタボローム解析を実施した結果グルタミン等の代謝に変化を認めることを確認、フェロトシスによる細胞死が有望な可能性が示唆された。

現在上記結果を踏まえ、persistent cells に対するフェロトシスに着目した新規治療法の開発を模索中である。

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 7件)

Takahashi T, Elzawahry A, Mimaki S, Furukawa E, Nakatsuka R, Nakamura H, Nishigaki T, Serada S, Naka T, Hirota S, Shibata T, Tsuchihara K, Nishida T, Kato M. Genomic and transcriptomic analysis of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017; 56(4):303-313

Takahashi T, Nakatsuka R, Hara H, Higashi S, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Nakajima K, Feasibility study of real-time intestinal bloodstream evaluation by using probe-based confocal laser endomicroscopy in a porcine intestinal ischemia model accepted *Surg endosc* 2018 Feb;32(2):1043-1050.

Wada N, **Takahashi T**, Kurokawa Y, Nakajima K, Masuzawa T, Nakatsuka R, Kawada J, Nishida T, Kimura Y, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Yamasaki M, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Appropriate Follow-Up Strategies for Gastrointestinal Stromal Tumor Patients Based on the Analysis of Recurrent Interval and Patterns. *Digestion*. 2017;95(2):115-121.

Sekido Y, Ohigashi S, **Takahashi T**, Hayashi N, Suzuki K, Hirota S. Familial Gastrointestinal Stromal Tumor with Germline KIT Mutations Accompanying Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Anticancer Res*. 2017 Mar;37(3):1425-1431.

Sugase T, **Takahashi T**, Nakajima K, Hirota S, Masuzawa T, Nishida T, Kimura Y, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Clinicopathological Characteristics, Surgery and Survival Outcomes of Patients with Duodenal Gastrointestinal Stromal Tumors. *Digestion*. 2016 13;94(1):30-36.

Sugase T, **Takahashi T**, Ishikawa T, Ichikawa H, Kanda T, Hirota S, Nakajima K, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Takiguchi S, Wakai T, Mori M, Doki Y. Surgical resection of recurrent gastrointestinal stromal tumor after interruption of long-term nilotinib therapy. *Surg Case Rep*. 2016 2(1):137

Hara H, **Takahashi T**, Nakatsuka R, Higashi S, Naka T, Sumiyama K, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Nakajima K. A novel approach of optical biopsy using probe-based confocal laser endomicroscopy for peritoneal metastasis. *Surg Endosc*. 2016 Aug;30(8):3437-46

[学会発表](計 3件)

高橋剛、黒川幸典、西田俊朗、廣田誠一、西垣貴彦、和田範子、田中晃司、宮崎安弘、牧野知紀、山崎誠、中島清一、瀧口修司、森正樹、土岐祐一郎 消化管間葉系肉腫 (GIST) に対する分子標的治療耐性メカニズムの検討 日本がん転移学会 2017 大阪

高橋剛、黒川幸典、西田俊朗、廣田誠一、西垣貴彦、和田範子、田中晃司、宮崎安弘、牧野知紀、山崎誠、中島清一、瀧口修司、森正樹、土岐祐一郎 消化管間葉系肉腫 (GIST) に対する分子標的治療耐性メカニズムの検討 2017 日本消化器癌発生学会 鹿児島

高橋剛、西田俊朗、土原一哉、加藤護、宮崎安弘、牧野知紀、黒川幸典、山崎誠、中島清一、瀧口修司、仲哲治、森正樹、土岐祐一郎 分子標的薬耐性 GIST に関わる遺伝子変異の検討 消化器癌発生学会 2015 鳥取

[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

高橋 剛 (Takahashi Tsuyoshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50452389

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

1. 山崎 誠 (Yamasaki Makoto)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号・50444518
2. 黒川 幸典 (Kurokawa Yukinori)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号・10470197
3. 牧野 知紀 (Makino Tomoki)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号・80528620
4. 宮崎 安弘 (Miyazaki Yasuhiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号・00571390
5. 田中 晃司 (Tanaka Kouji)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号・70621019