

令和元年6月7日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05166

研究課題名(和文) 特殊な変異を有するGISTに対する特異抗体を用いた診断法の開発と治療への応用

研究課題名(英文) Development of diagnostic method and its application to treatment in GIST with particular mutations through creating monoclonal antibodies

研究代表者

廣田 誠一 (Hirota, Seiichi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：50218856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：GISTの遺伝子変異のうち、分子標的薬耐性を示すことの多いc-kit遺伝子のDup-502&503とPDGFRA遺伝子のAsp842Val、頻度・悪性度の高いc-kit遺伝子のDel-557&558に対し、特異的なモノクローナル抗体を作製して画像診断や治療に応用する研究を進め、ELISAでの高抗体価分画は確認できたものの、最終的には有望なクローンは得られなかった。補助金による研究終了後もさらなる工夫を行って継続したい。GISTに関する並行研究として、NF1患者のGISTに関する臨床病理学的研究や胃の大型GISTに対する術前イマチニブ治療の有効性、再発高リスクGIST症例の実態等を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GISTの治療はその病態解明に伴って劇的に進歩したが、分子標的治療に対する二次耐性の問題は患者のさらなる予後改善の足かせとなっている。GISTに特徴的なc-kit遺伝子やPDGFRA遺伝子の変異に対する特異的なモノクローナル抗体の作製が可能となれば、これまでの分子標的薬とは異なった機序で病気を制御できる可能性があり、画像診断にも応用できると考えたが、思いのほか抗体作製に難渋し、達成できなかった。補助金による研究終了後もさらなる工夫を行って継続したい。並行する研究では、各種GISTの病態の解明や実臨床での再発高リスクGIST症例の実態等が明らかにでき、今後のGIST診療に役立つものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Among the gene mutations observed in GISTs, Dup-502&503 of the c-kit gene, Asp842Val of the PDGFRA gene and Del-557&558 of the c-kit gene were targeted to make specific antibodies to use for image diagnosis and therapy. High titer fraction on ELISA was obtained, but the final products of specific antibodies for them were not gained. We also investigated the clinicopathological characteristics of GISTs in NF1 patients, effective neoadjuvant imatinib therapy for giant gastric GISTs and condition of management of high-risk GIST patients in the real world.

研究分野：人体病理学

キーワード：GIST c-kit PDGFRA mutation antibody

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでに Gastrointestinal stromal tumor (GIST) が消化管蠕動運動のペースメーカー細胞であるカハールの介在細胞 (Interstitial cell of Cajal; ICC) に由来し、c-kit 遺伝子や PDGFRA 遺伝子の機能獲得性突然変異が GIST の発生原因であることや、germline の c-kit 遺伝子の機能獲得性変異が GIST の多発家系を引き起こすことを明らかにしてきた。これらの知見をもとに、現在では GIST に対して小分子化合物を用いた分子標的治療が行われるようになり、再発 GIST の予後は劇的に改善した。GIST に見られる c-kit・PDGFRA 遺伝子変異は、細胞外領域や傍細胞膜領域、キナーゼドメイン I・II に様々なタイプが存在し、c-kit 遺伝子の傍細胞膜領域の変異がその多くを占めるが、c-kit 遺伝子の細胞外領域 (exon 9) の重複変異 (Dup-Ala502Tyr503) と PDGFRA 遺伝子のキナーゼドメイン II (exon 18) の点突然変異 (Asp842Val) は、それぞれ全 GIST の約 10% を占め、個別のタイプとしては最も多い変異型である。しかし、これら 2 種類の変異は分子標的薬のイマチニブに初期耐性を示すことが多く、再発時の治療に難渋するとともに、完全切除後の分子標的薬による補助療法も行われない方向にあり、臨床的な取り扱いが難しい。

2. 研究の目的

上記の、GIST に見られるイマチニブ初期耐性の c-kit 遺伝子の細胞外領域 (exon 9) の重複変異 (Dup-502&503) と PDGFRA 遺伝子のキナーゼドメイン II (exon 18) の点突然変異 (Asp842Val)、そして比較的頻度が高く、悪性度も高いことから、治療標的としての重要性があると考えられる c-kit 遺伝子の傍細胞膜領域 (exon 11) の欠失 (Del-557&558) に対して、特異的に反応するモノクローナル抗体の作製し、GIST の診断と治療方針の決定を容易にするとともに、その抗体を利用して転移部位の可視化 (画像診断) や分子標的治療に応用することである。

3. 研究の方法

c-kit 遺伝子の細胞外領域 (exon 9) の Dup-Ala502Tyr503 変異部の合成ペプチド鎖をマウスに免疫し、細胞融合により Dup-Ala502Tyr503 変異を持つ KIT と特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を産生するクローンを得る。このモノクローナル抗体が Dup-Ala502Tyr503 変異を持つヒト KIT と特異的に反応することを、ウェスタンブロット法および病理標本上の免疫染色により確認する。ヌードマウスに移植した Dup-Ala502Tyr503 変異を持つ GIST 培養細胞由来の腫瘍に対し、放射性ラベルしたモノクローナル抗体が腫瘍を認識できるか、また、このモノクローナル抗体が抗腫瘍効果を示すかを検証する。この特異的なマウスモノクローナル抗体を人体に投与可能な抗体に改変するためにキメラ抗体を作製する。同様にイマチニブ耐性の代表的な変異である PDGFRA 遺伝子の exon 18 の Asp842Val 変異を特異的に認識するキメラ抗体の作製も目指す。本研究はヒトに投与可能な特異的抗体薬の開発への足掛かりであり、最終的には Dup-Ala502Tyr503 変異を持つ GIST の転移・再発患者および PDGFRA 遺伝子の exon 18 の Asp842Val 変異を持つ GIST 転移・再発患者に対し、放射性ラベルしたキメラ抗体による腫瘍の可視化、およびキメラ抗体の抗腫瘍効果を検定する臨床試験へと繋げる。

4. 研究成果

GIST の遺伝子変異のうち、分子標的薬耐性を示すことの多い c-kit 遺伝子の Dup-502&503 と PDGFRA 遺伝子の Asp842Val、頻度・悪性度の高い c-kit 遺伝子の Del-557&558 に対し、特異的なモノクローナル抗体を作製して画像診断や治療に応用する研究を進め、ELISA での高抗体価分画は確認できたものの、最終的には有望なクローンは得られなかった。補助金研究終了後もさらなる工夫を行って継続したい。GIST に関する並行研究として、NF1 患者の GIST に関する臨床病理学的研究や胃の大型 GIST に対する術前イマチニブ治療の有効性、再発高リスク GIST 症例の実態等を明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Iemura Y, Katsushima H, Kataoka TR, [Hirota S](#), Shimada T. An unusual case of duodenal gastrointestinal stromal tumour combined with the neuronal elements. **Pathol Int.** in press. 査読有

Nishida T, Sakai Y, Takagi M, Ozaka M, Kitagawa Y, Kurokawa Y, Masuzawa T, Naito Y, Kagimura T, [Hirota S](#), and the members of the STAR ReGISTry Study Group. Adherence to the guidelines and the pathological diagnosis of high-risk gastrointestinal stromal tumors in the real world. **Gastric Cancer.** in press. doi: 10.1007/s10120-019-00966-4. 査読有

Nishida T, Cho H, [Hirota S](#), Masuzawa T, Chiguchi G, Tsujinaka T, Kinki GIST Study Group. Clinicopathological features and prognosis of primary GISTs with tumor rupture in the real world. **Ann Surg Oncol.** 25:1961-1969, 2018. doi: 10.1245/s10434-018-6505-7. 査読有

Sugase T, Takahashi T, Serada S, Fujimoto M, Ohkawara T, Hiramatsu K, Nishida T, [Hirota S](#), Saito

Y, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Nakajima K, Hanasaki K, Kishimoto T, Mori M, Doki Y, Naka T. SOCS1 gene therapy has antitumor effects in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells through FAK/PI3 K signaling. **Gastric Cancer**. 2018 in press doi: 10.1007/s10120-018-0822-1. 査読有

Kitagawa H, Kaneko M, Kano M, Ibuki Y, Amatya VJ, Takeshima Y, Hirota S, Hirabayashi N. Coexistence of gastrointestinal stromal tumor and leiomyosarcoma of the stomach presenting as a collision tumor: a case report and review of literature. **Pathol Int**. 68:313-317, 2018. doi: 10.1111/pin.12662. 査読有

Kurokawa Y, Yang HK, Cho H, Ryu MH, Masuzawa T, Park SR, Matsumoto S, Lee HJ, Honda H, Kwon OK, Ishikawa T, Lee KH, Nabeshima K, Kong SH, Shimokawa T, Yook JH, Doki Y, Im SA, Hirota S, Hahn S, Nishida T, Kang YK. Phase II study of neoadjuvant imatinib in large gastrointestinal stromal tumours of the stomach. **Br J Cancer**. 117:25-32, 2017. doi: 10.1038/bjc.2017.144. 査読有

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**. 37:1425-1431, 2017. DOI: 10.21873/anticancer.1146.6 査読有

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**. 56:303-313, 2017. doi: 10.1002/gcc.22438. 査読有

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**. 2:137, 2016. doi なし. 査読有

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**. 94:30-36, 2016. doi: 10.1159/000447665. 査読有

Tomatsu M, Isogaki J, Watanabe T, Yajima K, Okumura T, Yamashita K, Suzuki K, Kawabe A, Komiyama A, Hirota S. Multiple gastric gastrointestinal stromal tumors in a patient with neurofibromatosis type 1. **Case Rep Surg**. 2016;2016:1515202 (5 pages). doi: 10.1155/2016/1515202. doi: 10.1155/2016/1515202. 査読有

Wada N, Kurokawa Y, Takahashi T, Hamakawa T, Hirota S, Naka T, Miyazaki Y, Makino T, Yamasaki M, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Detecting secondary c-KIT mutations in the peripheral blood of patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. **Oncology**. 90:112-117, 2016. doi: 10.1159/000442948. 査読有

Sato S, Tsujinaka T, Yamamoto K, Takahashi T, Kishi K, Imamura H, Fujita J, Takagi M, Hirota S, Nishida T. Primary surgery as a frontline treatment for synchronous metastatic gastrointestinal stromal tumors: an analysis of the Kinki GIST registry. **Surg Today**. 46:1068-1075, 2016. doi: 10.1007/s00595-015-1282-4. 査読有

Kanda T, Ishikawa T, Kosugi S-I, Ueki K, Naito T, Wakai T, Hirota S. Prognostic factors after imatinib secondary resistance: survival analysis in patients with unresectable and metastatic gastrointestinal stromal tumors. **Int J Clin Oncol**. 21:295-301, 2016. doi: 10.1007/s10147-015-0903-7. 査読有

Nishida T, Tsujimoto M, Takahashi T, Hirota S, Blay J-Y, Wataya-Kaneda M. Gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients with neurofibromatosis type I. **J Gastroenterol**. 51:571-578, 2016. doi: 10.1007/s00535-015-1132-6. 査読有

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。