

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18154

研究課題名(和文) GISTにおけるイマチニブ耐性因子の網羅的解析と創薬への応用

研究課題名(英文) Comprehensive gene analysis of imatinib resistance and development of new drugs for treatment in GIST

研究代表者

古閑 悠輝 (KOGA, Yuki)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：40835170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：消化管間質腫瘍(gastrointestinal stromal tumor; GIST)は化学療法や放射線療法に抵抗性で、切除不能・再発症例は、予後不良である。治療薬であるイマチニブ(チロシンキナーゼ阻害薬)に対する耐性機序の解明が本研究の目的である。GIST細胞株と樹立したイマチニブ耐性細胞株の遺伝子解析を行い、イマチニブ耐性に関与する可能性のある遺伝子を抽出した。また細胞周期調節因子FBXW7に着目し、臨床検体の免疫染色にてFBXW7がGISTの予後、悪性度に関与することを示した。またイマチニブによる術後補助治療とFBXW7発現を検討し、イマチニブ耐性とFBXW7の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は消化管間質腫瘍(GIST)の悪性度、薬剤耐性に関与する研究を行いました。癌の細胞増殖を抑えるがん抑制遺伝子であるFBXW7がGISTの予後不良因子であることを免疫染色で示した。またイマチニブによる補助治療の有無でFBXW7の発現と予後が変化していた。以上のことからFBXW7遺伝子はGISTの予後に関連し、薬剤耐性にも関与する可能性が考えられた。今後治療の効果予測や、新規の治療ターゲットとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gastrointestinal stromal tumor (GIST) has highly resistant to chemotherapy and radiation therapy in unresectable or recurrent cases, therefore those cases have a poor prognosis. The purpose of this study is to elucidate the mechanism of resistance to the therapeutic drug imatinib (tyrosine kinase inhibitor). Gene analysis in two cell lines, normal GIST cell line and the established imatinib-resistant cell line, showed that several genes may be associated with imatinib resistance. Focusing on the cell cycle regulator FBXW7 (tumor suppressor gene), immunostaining of clinical samples showed that FBXW7 is involved in the prognosis and malignancy of GIST. In addition, there was a difference in prognosis between the presence or absence of postoperative adjuvant treatment with imatinib and the expression of FBXW7, suggesting the involvement of imatinib resistance and FBXW7.

研究分野：GISTとがん抑制遺伝子であるFBXW7の関係を中心にGISTの悪性度、薬剤耐性など

キーワード：GIST 薬剤耐性 FBXW7

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor ; GIST) は年間 10 万人に 2 人程度の発症率といわれており、KIT や CD34 を発現する。約 90% の GIST で *c-kit* 遺伝子変異を認める。化学療法や放射線療法に抵抗性が高く、とくに切除不能・再発の症例は、予後不良である。切除不能・再発 GIST に対してはチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブの投与が行われる。しかし近年、イマチニブの一次耐性(投与開始後 6 か月以内に耐性獲得)、二次耐性(投与開始後 6 か月以降に耐性獲得)の獲得が臨床上問題となっている(図 1)。イマチニブの耐性に *c-kit* 遺伝子変異が相関することが報告されている(図 2)が、その耐性獲得の分子生物学的メカニズムについては明らかになっていない。

現在、GIST 診療ガイドラインでは切除不能、再発 GIST に対してイマチニブ投与が第一選択だが、イマチニブ耐性 GIST に対してはスニチニブ、レゴラフェニブ投与が行われる。臨床試験も含め新たな治療の検討が世界で行われているが、実臨床で認められているものは未だないのが現状である。さらにこれら薬剤への耐性も課題となっている。

新たに耐性獲得のメカニズムを明らかにすることは治療効果予測、治療方針の決定に有用である。さらに、有効な治療も限られている GIST 治療において新規の治療法、薬剤の開発への応用も期待できる。

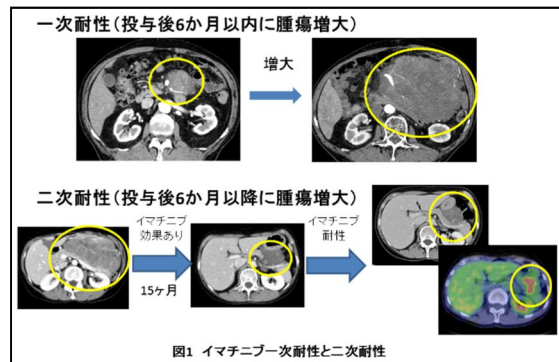


図1 イマチニブ一次耐性と二次耐性

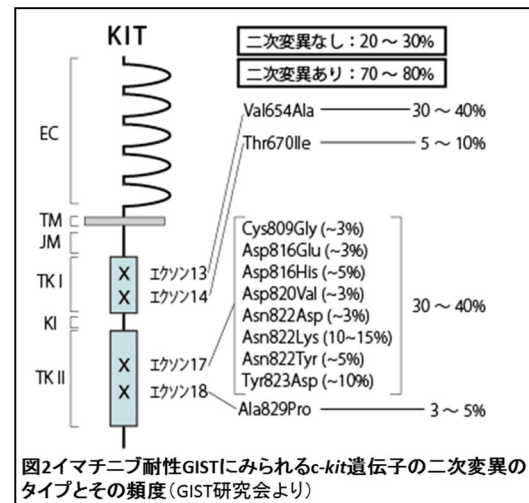


図2イマチニブ耐性GISTにみられる*c-kit*遺伝子の二次変異のタイプとその頻度(GIST研究会より)

2. 研究の目的

GIST 臨床検体 (イマチニブ耐性症例、イマチニブ感受性症例) 細胞株 (親株、耐性株) PDX マウス (イマチニブ耐性腫瘍、感受性腫瘍) を用いて、シーケンサーによる網羅的解析を行いイマチニブ耐性に関わる因子を同定する。さらに実臨床においてイマチニブ耐性症例、イマチニブ治療前後の症例で、その発現の変化の評価を行う。またこの結果を利用し新規治療への応用を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞株、PDXマウスでのイマチニブ耐性腫瘍の樹立

GIST 細胞株へのイマチニブ持続投与 (6 か月以上) により、イマチニブ耐性株 (IC50: 5nM 323nM) を樹立している。PDX マウスにおいては臨床検体よりイマチニブ耐性症例、未治療例、また樹立したイマチニブ耐性細胞株をマウスに移植し耐性腫瘍モデルマウスと未治療腫瘍モデルマウスを樹立する。

(2) 細胞株、臨床検体、PDXマウスでのイマチニブ耐性に関する因子の同定

イマチニブ耐性株と親株、臨床検体 (イマチニブ耐性症例、イマチニブ感受性症例 5 例ずつ) より RNA、DNA、タンパクを抽出する。腫瘍細胞から抽出された DNA/RNA は Exome sequencing と RNA sequencing に提出しゲノムの網羅的解析を行う。蛋白解析では質量分析器を用い、耐性

に關与するタンパクの同定、解析を行う(図 3)。上記のように網羅的解析、比較を行い耐性に關与する候補遺伝子を同定する。PDXにて樹立したイマチニブ耐性腫瘍と未治療の腫瘍の網羅的解析を同様に統計学的な耐性因子の検討を行う。

(3) 細胞株、マウス、臨床検体を用いた検証

上記にて同定した遺伝子を GIST 細胞株に siRNA 導入、また強制発現などを行い発現変化させることでイマチニブの感受性の変化を検証する。またイマチニブ耐性症例の臨床検体で免疫染色での検証を行う。イマチニブ投与前後のペア症例ではその発現の変化も検証する。

さらに PDX マウス(イマチニブ耐性腫瘍、イマチニブ感受性腫瘍)において上記遺伝子の発現を PCR,免疫染色などを用いて評価する。またその発現によるイマチニブ投与による腫瘍への効果の評価する。さらにイマチニブ耐性を獲得した PDX マウスにおいては既存のスニチニブ、レゴラフェニブなどの二次治療以降で用いられる薬剤の効果、またイマチニブを含めた治療前後での発現の変化も検証することで治療や効果予測など臨床への応用が可能か検討を行う。

(4) 新規治療への応用

前述の過程で同定したイマチニブ耐性に關与する因子のうち耐性細胞株で発現変化させることで、細胞増殖能やアポトーシスの抑制など評価し、治療標的となり得るか検証する。治療標的となり得る因子を同定し、細胞株(耐性株、親株) PDX マウス(イマチニブ耐性腫瘍、イマチニブ未投与腫瘍)へ投与を行うことで治療効果の評価を行う。また PDX マウスでは併用療法による効果も評価可能であり、既存の薬剤の組み合わせ、既存の薬剤と新規治療薬の組み合わせなどによる新たな治療法の検討も行う。

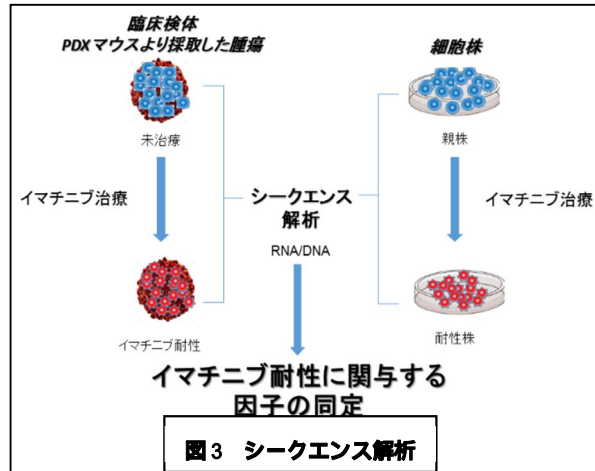


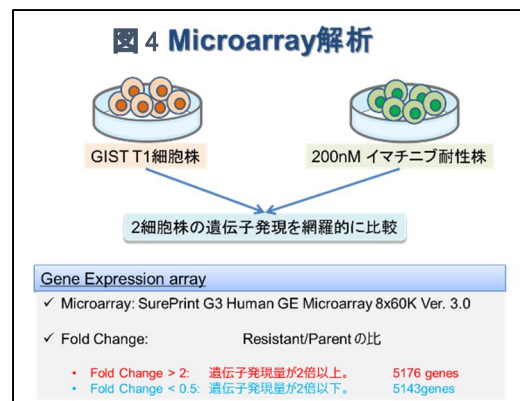
図3 シーケンス解析

4. 研究成果

(1) GIST 細胞株とイマチニブ持続暴露により樹立したイマチニブ耐性細胞株の 2 細胞株を microarray 解析に提出した(図 4)。pathway 解析を行うことでイマチニブ耐性と關与する可能性のある遺伝子を抽出した。PI3K/Akt/mTOR 経路遺伝子が候補に挙がった(図 5)。

(2) GIST 臨床検体の免疫染色と GIST 細胞株を用いて細胞周期調節因子 FBXW7 が GIST の予後、悪性度に關与することを示した(*Gastric Cancer*;

2019)。さらに全国の 9 施設より GIST の切除検体を集積、免疫染色を施行し同様の結果が得ることができた。305 例の GIST 症例において FBXW7 低発現症例が無再発生存期間において有意に予後不良であった($P=0.0016$)。また高リスク症例 129 例においても FBXW7 低発現症例が無再発生存期間において予後不良であった($P=0.031$)。全生存期間では全症例、高リスク症例で差は認めなかった($P=0.089, 0.26$)(図 6)。またサブグループ解析を modified fletcher 分類高リスク症例で行った。イマチニブによる補助化学療法を行わなかった症例で、FBXW7 低発現群が無再発生存期間で予後不良な傾向($P=0.079$)であることに対し、イマチニブによる化療



を行った症例で FBXW7 発現により予後に差は認めなかった (P=0.18) (図 7)。前述の結果よりイマチニブによる治療効果と FBXW7 の関与が示唆された。以上より FBXW7 は GIST における予後因子であることを臨床検体から示した。また高リスク症例においても予後因子となっており、今後悪性度を反映するバイオマーカーとして期待される。さらには FBXW7 発現とイマチニブの治療効果が相関する可能性が示唆され、今後も症例の蓄積、また PI3k-Akt シグナルの遺伝子も含め細胞レベルでの実験の追加が望まれる。

図 5 Pathway解析

Pathway	変動遺伝子数
Pathways in cancer	134
PI3k-Akt signaling pathway	107
hsa05166:HTLV-I infection	92
hsa04144:Endocytosis	91
hsa04010:MAPK signaling pathway	85
hsa05168:Herpes simplex infection	75
hsa05205:Proteoglycans in cancer	72
hsa04510:Focal adhesion	71
hsa05169:Epstein-Barr virus infection	66
hsa03013:RNA transport	61
hsa05164:Influenza A	61
hsa05202:Transcriptional misregulation in cancer	57
hsa04145:Phagosome	56
hsa04141:Protein processing in endoplasmic reticulum	56
hsa04921:Oxytocin signaling pathway	54
hsa04110:Cell cycle	51
hsa04120:Ubiquitin mediated proteolysis	50
hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	50
hsa04068:FoxO signaling pathway	49
hsa05145:Toxoplasmosis	49
hsa04360:Axon guidance	48
hsa04550:Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	47

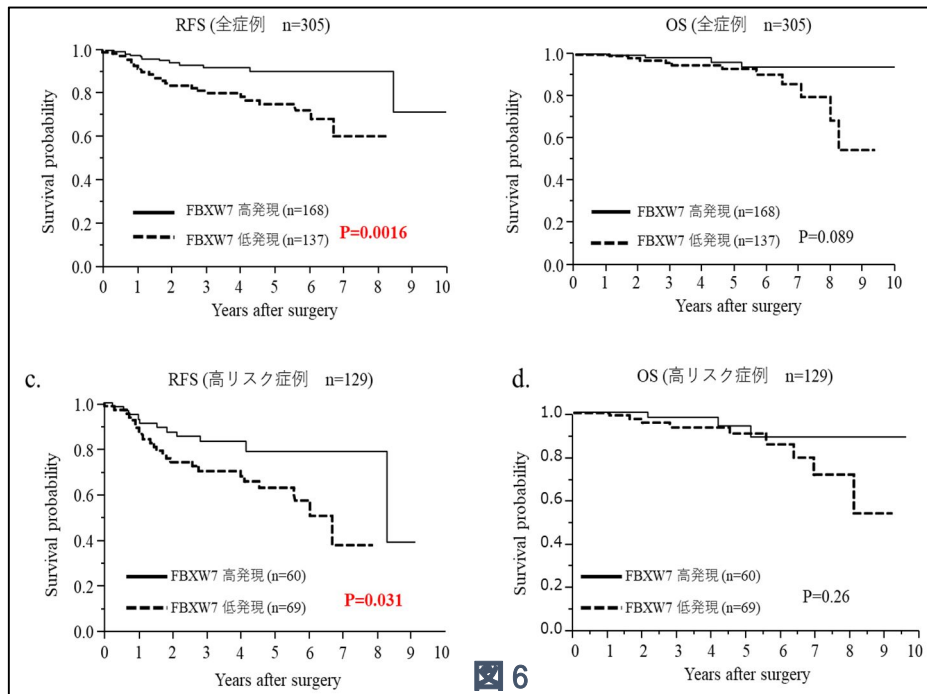
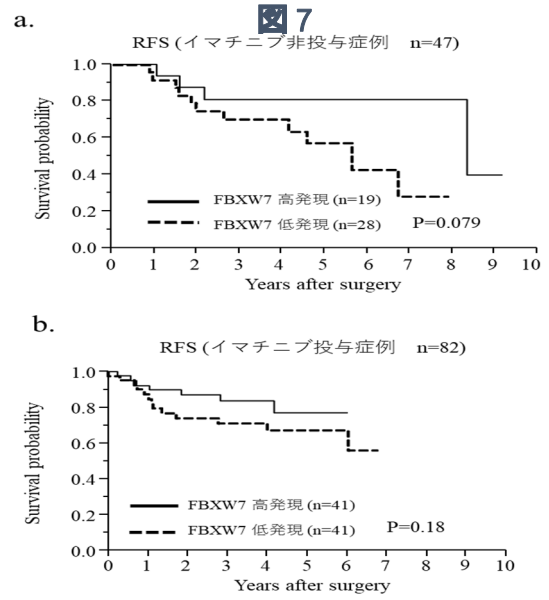


図 6

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 0件）

1. 著者名 Koga Y, Iwatsuki M, Yamashita K, Kiyozumi Y, Kurashige J, Masuda T, Eto K, Iwagami S, Harada K, Ishimoto T, Baba Y, Yoshida N, Miyanari N, Takamori H, Ajani JA, Baba H	4. 巻 22(6)
2. 論文標題 The role of FBXW7, a cell-cycle regulator, as a predictive marker of recurrence of gastrointestinal stromal tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 1100-1108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-019-00950-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古閑悠輝
2. 発表標題 高リスクGISTにおけるFBXW7発現と予後の検討
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y.Koga, Masaaki Iwatsuki, Kouhei Yamashita, Taisuke Yagi, Tomoyuki Uchihara, Yuki Kiyozumi, Hiroshi Sawayama, Yuki Haru Hiyoshi, Takatsugu Ishimoto, Yoshifumi Baba, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba
2. 発表標題 The significance of FBXW7, mediating cell proliferation and drug resistance in Gastrointestinal stromal tumor
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------