

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15555

研究課題名（和文）GISTにおける薬剤耐性、悪性度に関する血清バイオマーカーの同定

研究課題名（英文）Identification of serum biomarkers associated with drug resistance and malignancy in gastrointestinal stromal tumor(GIST)

研究代表者

古閑 悠輝 (Koga, Yuki)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：40835170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：GIST（gastrointestinal stromal tumor）における、悪性度や薬剤感受性を予測する血清バイオマーカーの報告はない。がん抑制遺伝子であるFBXW7発現が全症例及び高リスク症例に限定した上でも、GISTの予後に関与することを示した。またイマチニブ投与の有無で検討し、FBXW7発現がイマチニブ耐性、感受性に関与する可能性が示唆された。細胞実験でイマチニブ耐性GIST細胞を樹立し、イマチニブ耐性に関与する可能性のある遺伝子を検索した。Pathway解析でPI3k-Akt-mTOR経路が候補として同定された。同経路とFBXW7の関与も報告されており、更なる実験を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はGISTの悪性度や薬剤耐性に関わる血清バイオマーカーの同定を目的とし研究を行った。臨床検体の免疫染色、細胞実験により前述の結果が得られた。GIST治療薬であるイマチニブが作用するKIT蛋白の下流に位置するPI3k-Akt-mTOR経路の遺伝子変動を認めた。この経路の遺伝子が何らかのイマチニブの耐性に関与する可能性が示唆され、さらにはFBXW7と同経路の関連も報告されている。これらの遺伝子を標的とした治療法の開発、また遺伝子発現による治療効果、悪性度の予測が可能になる可能性がある。さらに、血清で同定できれば、血液検査で簡便に治療効果や予後が予測できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：There are no reports of serum biomarkers predicting malignancy or drug sensitivity in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). However, expression of the cancer suppressor gene FBXW7 has been shown to be involved in the prognosis of GISTs in all cases and high-risk cases only. Furthermore, when considering the use of imatinib, it was suggested that FBXW7 expression may be involved in imatinib resistance or sensitivity. In cell experiments, we established imatinib-resistant GIST cells and searched genes involved in imatinib resistance. The PI3K-Akt-mTOR pathway was identified as candidate pathway. The involvement of the PI3k-Akt-mTOR pathway and FBXW7 has been reported.

研究分野：消化管間質腫瘍であるGISTにおける悪性度や薬剤耐性に関する研究

キーワード：GIST バイオマーカー 薬剤耐性 FBXW7

1. 研究開始当初の背景

(概要)

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。GIST は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。近年、イマチニブの一次耐性、二次耐性の獲得が臨床上、問題となっているが、その耐性の機序は明らかとなっていない。また予後、悪性度を規定する因子として現在は腫瘍径など腫瘍に関する因子しか用いられておらず有用なバイオマーカーはない。さらに GIST の診断に際し血中 c-kit 遺伝子の発現が有用であると報告されている (*J Mol Biomark Diagn, 2014*) が、GIST の悪性度、薬剤耐性における有用な血清バイオマーカーの報告はない。イマチニブへの耐性に c-kit 遺伝子変異が、悪性度に様々な遺伝子が関係することが報告されているが、臨床応用に十分なデータはなく、血清マーカーとの関連の報告もない。今後イマチニブの耐性機序を解明すること、血清マーカーから悪性度、薬剤耐性を予測することは臨床的に非常に重要となると考えられる。

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、高リスク、低リスク) 細胞株 (親株、耐性株) を用いて、シーケンサーによる網羅的解析を行い高悪性度、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、高悪性度、低悪性度の症例で、その発現の変化の評価を行う。GIST 患者より採取した血液における発現について評価する。またこの結果を利用しバイオマーカー同定、新規治療への応用を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞株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少量からの持続暴露 (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。

(2) 細胞株、臨床検体でのイマチニブ耐性、悪性度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、高リスク症例、低リスク症例 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、悪性度に関するタンパクの同定、解析を行う。上記のように網羅的解析、比較を行い耐性、悪性度に関する候補遺伝子、タンパクを同定する。

(3) 細胞株、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、腫瘍増殖能、浸潤能、遊走能を検証する。またイマチニブ耐性症例、高リスク症例、低リスク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ことで同定した因子が細胞株、臨床検体においてイマチニブ耐性と悪性度に関することを確認する。

(4) 血清バイオマーカーの同定

前向きにイマチニブ耐性症例、高リスク、低リスク症例の血液サンプルを各々 5 例ずつ採取する。マイクロアレイ法でイマチニブ耐性、悪性度に関する血清バイオマーカーの候補分子を同定する。前述の臨床検体、細胞株で同定した因子との関連、相関について統計学的解析を行う。最も関連の高い分子を血清バイオマーカーの候補として抽出する。

(5) 血清マーカーと臨床検体での発現の比較検討

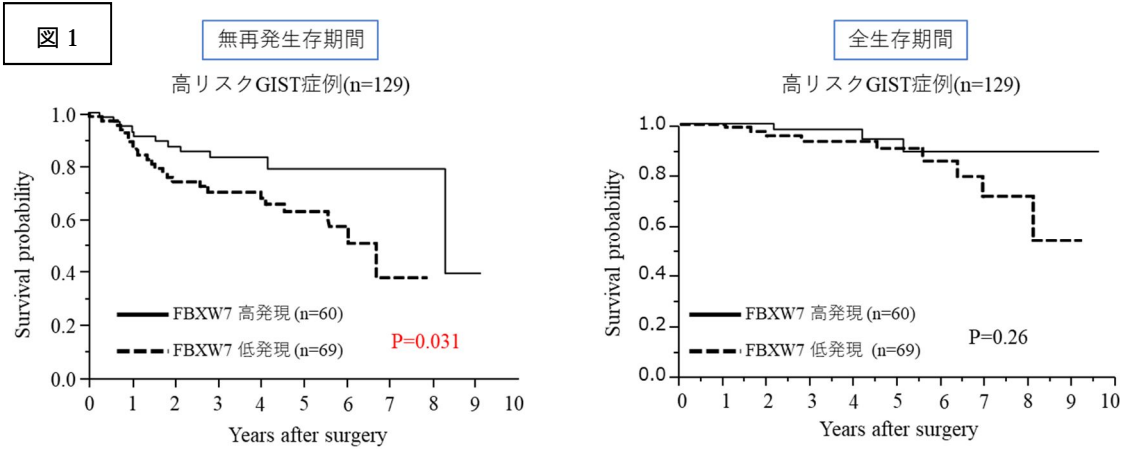
さらに validation のために追加で GIST、非 GIST 患者の血液サンプルを 10 例ずつ取得する。実臨床に有用なマーカーを選別していく。健常患者と GIST 患者 (低リスク、高リスク、イマチニブ耐性など) の血清での上記同定因子の発現を比較し解析、検討を行い臨床利用への応用が可能か検討を行う。

4. 研究成果

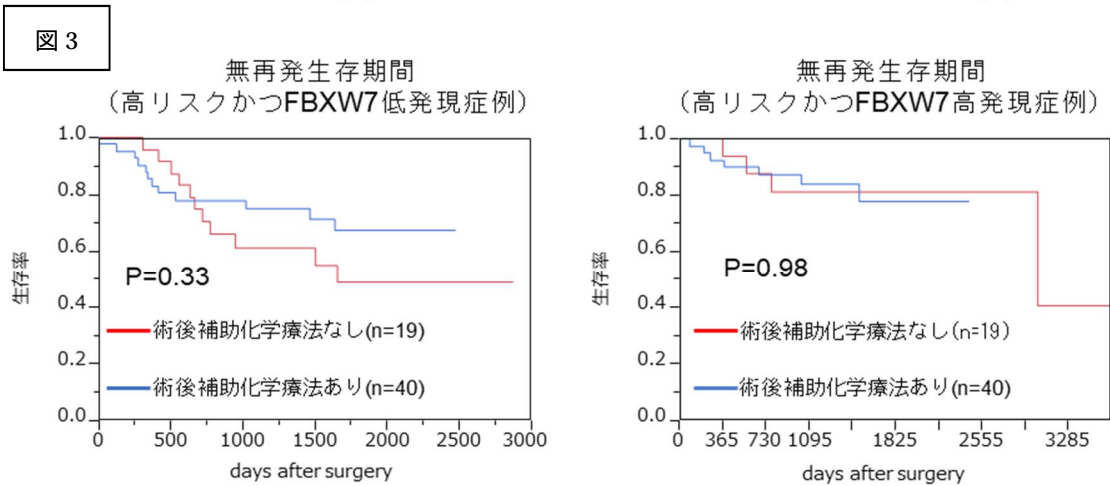
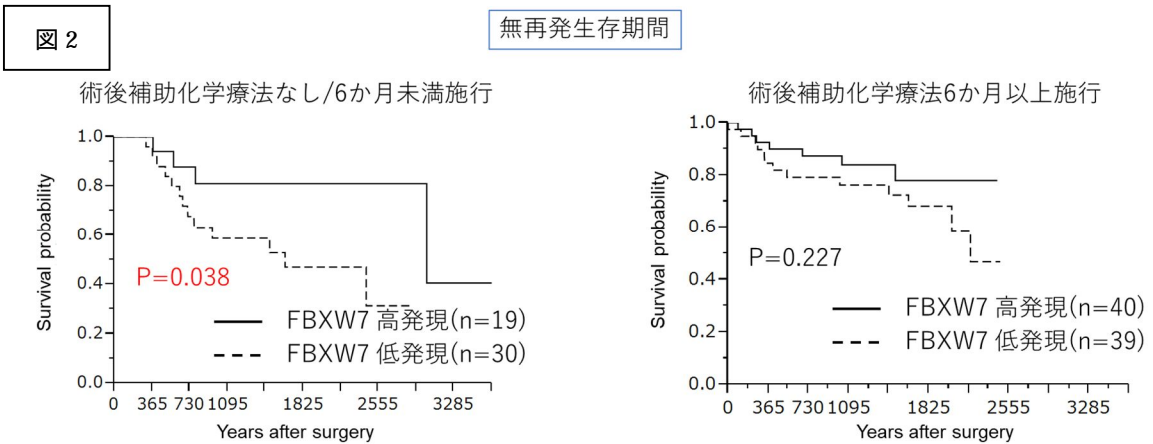
(1) 臨床検体を用いた研究結果

過去に我々は GIST における細胞増殖、浸潤、遊走に FBXW7 が関与することを示した。さらに約 200 例の臨床検体の免疫染色からこの遺伝子が GIST の予後、再発リスクに関与することを証明した (*Koga Y et al. Gastric Cancer, 2019*)。さらに症例の集積を全国多施設研究で行った。集積した高リスク GIST 臨床検体 129 例を用いて過去に悪性度に関連する因子として報告したがん抑制遺伝子 FBXW7 が高リスク症例の中でもさらに予後不良群で低発現であることを証明

した (図 1a,b)。



また術後補助化学療法未施行症例で FBXW7 低発現症例が予後不良であり、施行症例で FBXW7 発現によらず予後に差を認めなかった (図 2)。何らかのイマチニブ耐性、治療効果と FBXW7 が関与している可能性が示唆された。さらに FBXW7 高発現症例では術後補助化学療法の有無で予後が変わらず、高発現症例で術後補助化学療法の省略が許容される可能性が示唆された。(図 3)



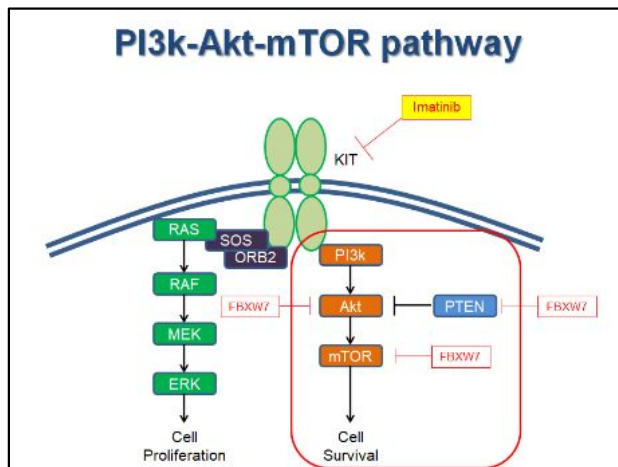
(2) 細胞株を用いた研究結果

GIST 細胞株と、当科でイマチニブ暴露により樹立したイマチニブ耐性 GIST 細胞株での遺伝子発現を Microarray 解析にて網羅的に比較検討した。PI3k/Akt/mTOR pathway が候補遺伝子として挙げられた (図 4)。過去の報告では PI3k/Akt/mTOR pathway とイマチニブ耐性の関連の報告、また mTOR と FBXW7 蛋白の関連が報告されている (Li et al. *Med Oncol.* 2015, Jian-Hua et al. *Science.* 2008) (図 5)。しかしながら現時点では細胞実験では再現性が確認できておらず薬剤耐性、FBXW7 との関与についても引き続き検証中である。

図 4

GIST細胞株/イマチニブ耐性株での発現遺伝子比較	
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 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩槻 政晃、古閑 悠輝
2. 発表標題 高リスクGISTにおけるFBXW7の意義
3. 学会等名 日本胃癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩槻 政晃、古閑 悠輝
2. 発表標題 GISTにおける再発予測因子マーカーとしてのFBXW7発現の意義
3. 学会等名 日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------