

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791302

研究課題名（和文） 胃粘膜下腫瘍切除検体を用いた初代細胞の樹立と薬剤耐性機序の解明

研究課題名（英文） Establishment and characterization for imatinib-resistant GIST cell lines from patients

研究代表者

迫 裕之 (SAKO HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10445364

研究成果の概要（和文）：

樹立した 2 株のイマチニブ耐性株について薬剤抵抗性機能を評価した結果、ABC トランスポーターである ABCC2 及び ABCC5 の発現強度の亢進、また、Src 及び Erk1/2 のリン酸化亢進が検出された。更に、Src の阻害剤である PP2 及びイマチニブ併用により耐性株に対する抗腫瘍効果の増強作用が認められた。イマチニブ耐性株は、ABC トランスポーターを高発現させることで薬剤ストレスに対する抵抗性を獲得し、Src 及び Erk1/2 の活性化が耐性株の増殖及び生存を向上させている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In GK7C-IR and GK22C-IR, the resistance to imatinib had been increasing from 2.56 to 3.73 fold comparing with the parental cells. Expression of ABC transporters: ABCC2 and ABCC5 has been shown in imatinib resistant cell lines and associated with its capacity to export a broad range of cytotoxic drugs. The status of phosphorylation of key cell signaling pathways (receptor tyrosine kinase: KIT, PDGFRα and its downstream-signaling AKT and ERK1/2 or non-receptor tyrosine kinase: SRC) was analyzed in established cell lines. As a result, the phosphorylation of SRC and ERK1/2 was increased compare to wild type cells. These results suggested that in imatinib resistant cell, the growth and survival has been to improve by high expression of ABC transporter and activation of Src and Erk1/2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総 計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：GIST, c-kit, PDGFRA, Src

1. 研究開始当初の背景

GIST とは、間葉系腫瘍（Gastrointestinal

mesenchymal tumor：GIMT）の大部分を占める 1 つの腫瘍単位とみなされている。

われわれは、胃粘膜下腫瘍に対する治療経験から GIST の鑑別診断において、最近 11 年間に於ける 114 の胃粘膜下腫瘍（腹腔鏡 74 例、開腹 40 例）を対象とし術前診断を中心に臨床病理学的な検討を行い安全で正診率の高い診断法の確立に寄与してきた(図 1)。

当施設は GIST 治療における有数の施設であり臨床検体を用いた研究に優位な施設である。

GIST の起源となる正常細胞が何であるかは未だ定説に至っていないが、カハールの間細胞(interstitial cells of Cajal; ICC)が有力視されている。ICC は消化管運動のペースメーカー細胞として機能しており、細胞膜を貫通する位置に、KIT 蛋白という表面抗原を有している。この蛋白は c-kit 遺伝子によりコードされ受容体型チロシンキナーゼとして機能している。先天的に KIT 蛋白が欠如する個体は、ICC の欠損を来している。これまで、本質的な寛解を得るための唯一有効な治療は外科手術とされてきたが、KIT や PDGFR を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤が開発され、臨床応用されている。

一方、乳癌、脳腫瘍などの様々な固形癌において、少数のがん幹細胞を基点とした階層性の存在が示唆されはじめている。しかしながら、GIST における起点細胞の存在を明確した報告はこれまでにない。その一因として、組織幹細胞研究は比較的歴史が浅く、幹細胞を特異的に認識するマーカー・遺伝子群の同定が進展していないことがあげられる。

本研究は、新鮮臨床検体を研究サンプルに使用し、GIST モデルマウスの作製、初代培養細胞の樹立を確立し、GIST の発生機序及び薬剤耐性メカニズムを解明するものである。

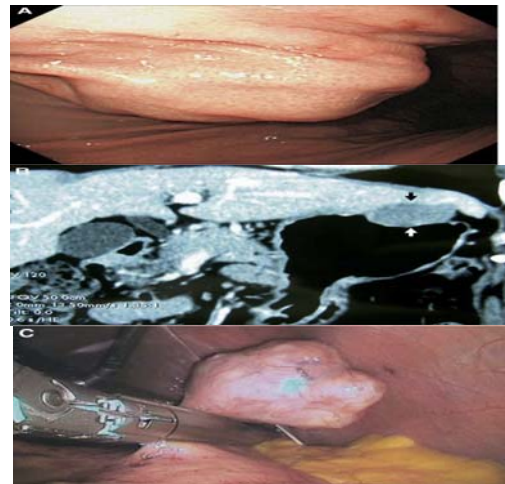


図 1. A, Endoscopy showed the tumor to be located in the anterior wall of the upper third of the stomach. B, CT showed it to have originated from the gastric wall and to have extended externally from the stomach. C, Laparoscopic wedge resection was performed successfully in a procedure lasting approximately 1 hour. (Surgery. 2006; 139(4): 484-92)

2. 研究の目的

本課題では、GIST 患者よりインフォームドコンセントにもとづき新鮮腫瘍組織を研究材料として入手し、初代培養、耐性株の樹立、モデルマウスの作製を行う。初代培養細胞を用いた single cell culture 法による癌細胞のクローニングにより、癌細胞集団における生着能の高い細胞のスクリーニングを行う。次に、初代培養細胞及び各クローンについて増殖能、生着能、薬剤耐性能および造腫瘍形成能の評価を行う。得られた結果から示される表現型について、タンパク発現解析および遺伝子発現解析を行い、その制御タンパクあるいは遺伝子の同定を行い。これらの結果より、特異性の高いマーカーの選定を行い、GIST 起源細胞の prospective な分離・同定を試みる。また、薬剤耐性株を樹立し、グリベックの

耐性メカニズムの解明を目指す。最終的には、GIST の分化や増殖に関与する遺伝子群を同定し、腫瘍形成抑制に働く因子をつきとめ、GIST の発生抑制及び再発防止に寄与する薬剤あるいは低分子化合物等をつきとめ、GIST の根治が可能な治療法を確立に寄与することを目指す。

3. 研究の方法

本課題では、GIST 腫瘍組織を研究材料として利用し、初代培養細胞、抗がん剤耐性株の樹立、GIST Xenograft モデルマウスの作製を行う。初代培養細胞を用いた single cell culture 法による単一癌細胞のクローニングにより、癌細胞のクローニングを行う。次に、初代培養細胞及び各クローンについて分化・増殖能、生着能、薬剤耐性能および造腫瘍形成能の評価を行う。更に、タンパク発現解析および遺伝子発現解析を行い、各現象に関与していると考えられる機能タンパクあるいは、遺伝子のスクリーニング解析を実施する。これらの結果に基づき、GIST 腫瘍の発生増殖に関与の高いマーカー分子の選定を行い、GIST 起源細胞の prospective な分離・同定を試みる。また、薬剤耐性株を樹立し、グリベック等の薬剤耐性メカニズムの解明を目指す。最終的には、GIST の分化や増殖に関与する遺伝子群を同定し、腫瘍形成抑制に働く因子をつきとめ、GIST の発生抑制及び再発防止に寄与する薬剤あるいは低分子化合物等をつきとめ、GIST の根治が可能な治療法を確立に寄与することを目指す。

(1)初代培養細胞の樹立

新鮮臨床検体を物理的、化学的に処理を施し、細胞を RPMI1640、10%FBS 及びペニシリンストレプトマイシン、10ng/ml SCF 含有液体培地及び

Matrigel コーティングされた Dish を用いて培養を行った。

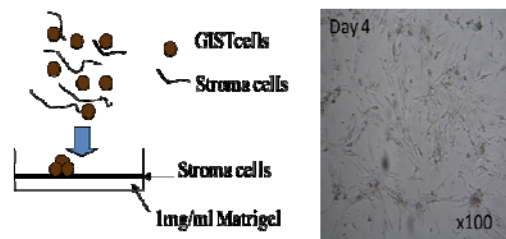
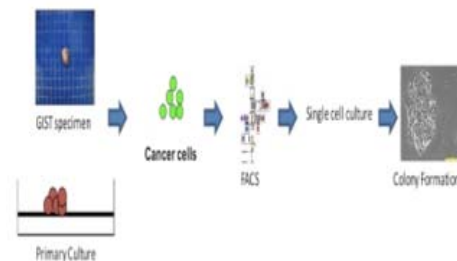


Figure Primary cultures of GIST cells. Primary cultures of GIST showed a homogeneous population of spindle-shaped cells (primary culture of GIST, original magnification 100).

(2)Single cell culture 法クローニング

初代培養細胞及び臨床検体を用いてフローサイトメトリーを使用し、single cell sorting 法により分取した細胞を、培養しクローニングを行った。



(3)増殖能の評価

樹立された各クローン細胞の増殖能を WST-8 Assay 法により評価を行った。

(4)Cell Cycle 及びアポトーシス解析

増殖能の評価として細胞周期解析について PI 染色法を用いた。アポトーシスの評価は、AnnexinV-FITC 抗体をもいいて評価を行った。測定には、フローサイトメトリーにより検出を行った。

(5)機能タンパクの発現及びリン酸化の解析

増殖、分化、接着に係る機能タンパク質の発現解析をフローサイトメトリーにより評価する。

<増殖マーカー>

AKT, Erk1/2, KIT, CD140a, Src,

FGFR, HER2, HGFR, PDGFR

<分化マーカー>

CD15, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60,
CXCR-4

<接着マーカー>

CD24, CD29, CD44, CD49Fa,
CD49Fb, CD49Fc, CD49Fd,
CD49Fe, CD50

(6)腫瘍形成能の解析

初代培養細胞及び樹立した各クローン細胞における造腫瘍性能の評価を免疫不全マウス (NOG mice or SCID mice) への皮下移植により評価を行った。

(7)GIST モデルマウスの作製

手術切除検体を 5mm 角にカットし、免疫不全マウスである NOG マウスの背部皮下へ移植を行った。毎週経過を観察し推定体積を測定した。

(8)耐性株の樹立

初代培養細胞、細胞株を低濃度の分子標的薬 (グリベック) に曝露し、持続的に抗癌剤暴露を行うことで耐性株を樹立する。耐性化の評価としては、IC₅₀ を測定して評価する。

(9)薬剤感受性試験

初代培養細胞、樹立クローン細胞及び耐性株を抗癌剤に曝露し、WST-8 法により耐性能の評価を行う。

(10)薬剤耐性機能の解析

薬剤耐性に関与している ABC トランスポーター (ABCG2、MDR1、MRP1、MRP2 等) の FACS による網羅的解析。

(11)Src 阻害剤併用による抗腫瘍効果の検証

Src 阻害剤である PP2 をイマチニブと併用することにより、イマチニブ耐性株に

対する抗腫瘍効果の増強作用を WST-8 により評価を行った。

4. 研究成果

GIST 切除組織 (29 検体) より 2 株の細胞 (GK7C, GK22C) (図 1) 及び 3 株の Xenograft (GK7X, GK15X, GK22X) の作製に成功した (図 2)。樹立した各細胞及び Xenograft について免疫組織 (細胞) 染色法による KIT の発現解析の結果、全ての樹立株において陽性であることが示された。

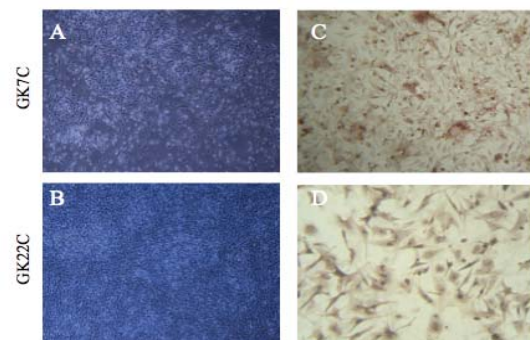


図 1 GIST 臨床検体より樹立した GIST 細胞株 (A: GK7C, B: GK22C) の評価. A, B: 樹立した細胞の形態像. C, D: 抗ヒト KIT 抗体を用いた DAB 染色による組織像。(Magnification ×200-400)。

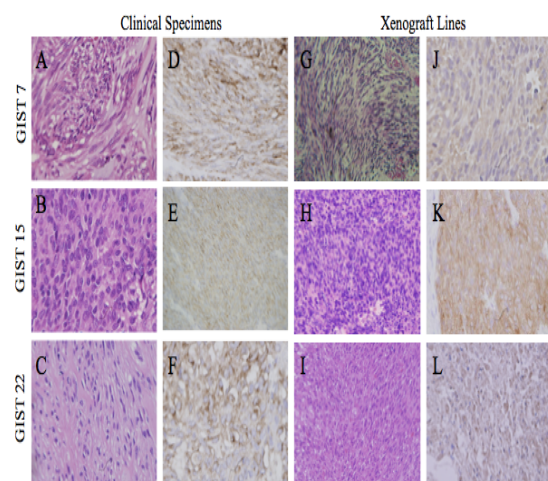


図 2 GIST 臨床検体及び GIST Xenograft lines における免疫染色法による KIT 発現解析. A-C, G-I は, HE 染色による組織像. D-F 及び J-L は, 抗ヒト KIT 抗体を用いた DAB 染

色による組織像．（Magnification×200-400）．

樹立した2つのGIST細胞株（GK7C, GK22C）について、SCID マウス皮下移植による造腫瘍能を評価した結果、2株とも腫瘍を形成することができた。また、形成された腫瘍は、免疫組織化学染色法の評価においてKIT 陽性であることが示された（図3）。

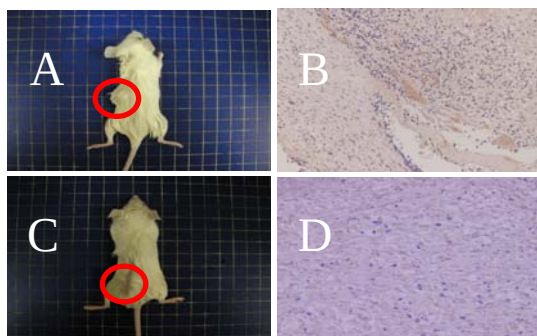


図3 GIST 細胞株 GK7C 及び GK22C の腫瘍形成能の評価. 移植 3 及び 6 カ月後に腫瘍形成確認 (A, C)。形成腫瘍の免疫染色法による KIT 発現評価 (B, D) （Magnification×200-400）．

分子標的薬であるイマチニブの72時間曝露による感受性試験では、2株とも濃度依存的に感受性を示し、 IC_{50} 値はそれぞれ GK7C で $4.6 \mu M$ 、GK22C では $11.0 \mu M$ を示した（図4）。

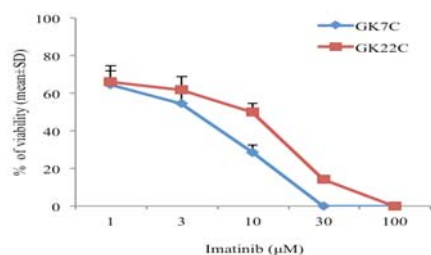


図4 GIST 細胞株におけるイマチニブ感受性評価.

同様に、3株のGIST 皮下移植モデルマウスを用いたイマチニブの感受性試験におけ

る28日間経口持続投与を施行した結果、コントロール群に対し、イマチニブ投与群において3株とも有意に抗腫瘍効果が得られ、イマチニブに対し感受性を有することが示唆された（図5）。

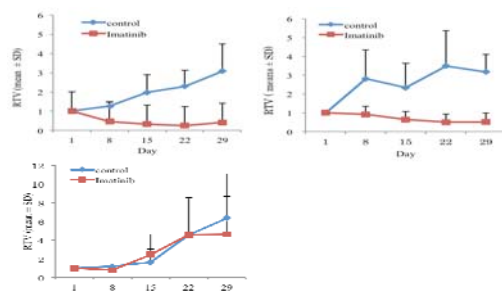


図5 スードマウス皮下移植モデルにおけるイマチニ経口投与によるRTV(Relative tumor volume)の経時推移.

これらの結果より、樹立した細胞株及び Xenograft 株は、GIST の増殖能、薬剤耐性機能を研究するにあたり有用な生物材料であることが示唆された。

イマチニブ持続曝露により作製した耐性株（GK7C-IMR, GK22C-IMR）におけるイマチニブ感受性試験では、 IC_{50} 値は、それぞれ $11.7 \mu M$ ($p<0.01$) 及び $41.4 \mu M$ ($p<0.01$) を示し、親株に比べイマチニブに対する IC_{50} 値が 2.56～3.73 倍に上昇していることが確認された（図6）。

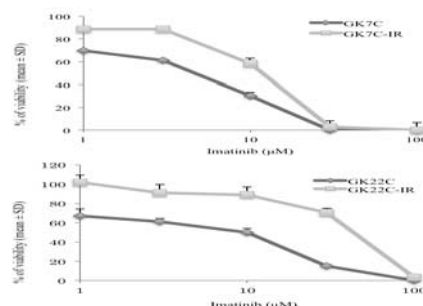


図6 GIST 細胞株 GK7C 並びに GK22C の wild 型及びイマチニブ耐性 (IM-R) 株におけるイマチニブ感受性評価.

イマチニブ耐性株について、イマチニブによるアポトーシス誘導効果を検証した結果、野生株と比べ耐性株においてアポトーシスの誘導効果が減弱している傾向が示された。

樹立したイマチニブ耐性株について薬剤抵抗性機能について ABC トランスポーター (ABCC1, ABCC2, ABCC4, ABCC5, ABCC10, ABCC12, ABCG1) の遺伝子発現を評価した結果、野生型に比べイマチニブ耐性株において ABCC2 及び ABCC5 の mRNA の発現が亢進していること示唆された。

細胞シグナル伝達分子のリン酸化解析では、イマチニブ耐性株において Src 及び Erk1/2 のリン酸化亢進が検出された。更に、Src の阻害剤である PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3, 4-d]pyrimidine) 及びイマチニブ併用によりイマチニブ耐性株に対する抗腫瘍効果の増強作用が認められた (図 10)。

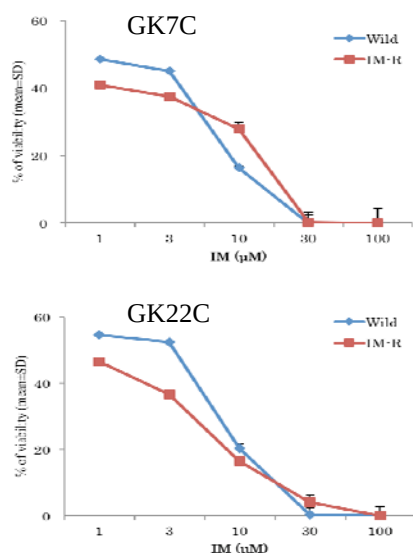


図 10 イマチニブ及び PP2 併用による in vitro 抗腫瘍効果の検証.

以上の結果より、イマチニブ耐性株は、薬剤排出トランスポーターである ABC トランス

ポーターを高発現させることで薬剤ストレスに対する抵抗性を獲得し、更に、Src の活性化が耐性株の増殖及び生存を向上させている可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 第 69 回 日本癌学会学術総会
迫裕之, Establishment and characterization of imatinib mesylate-resistance gastrointestinal stromal tumor cells, 2010 年 9 月 23 日, 大阪国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

迫 裕之 (SAKO HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 10445364