

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590413

研究課題名(和文) 胃腸管間質腫瘍における低酸素応答関連分子異常の臨床病理学的意義に関する研究

研究課題名(英文) Clinicopathological significance of hypoxia-related molecules in gastrointestinal stromal tumor

研究代表者

山元 英崇 (Yamamoto, Hidetaka)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：30404073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：胃腸管間質腫瘍(GIST)において、HIF (hypoxia-induced factor)の蓄積や、それに影響を与えるSDH(succinate dehydrogenase)の異常を解析した。HIF-1 の過剰発現例は有意に予後不良であった。さらにHIF-1 の標的遺伝子であるmiR-210は、高悪性度GISTにおいて発現が上昇していた。従ってGISTにおいて、HIF-1 の蓄積やそれに伴うmiR-210過剰発現はGISTの悪性化進展に関与することが示唆された。また一部のGISTでは、SDH欠失により、HIF-1 が蓄積される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the significance of accumulation of HIF (hypoxia-induced factor) and SDH (succinate dehydrogenase) in gastrointestinal stromal tumor (GIST). HIF-1 overexpression was correlated with worse prognosis. The expression level of miR-210, a target of HIF-1 was higher in high-grade GISTs. Therefore, HIF-1 accumulation and miR-210 overexpression may play an important role in the progression of GIST. In addition, in a subset of GIST, SDH deficiency may induce the accumulation of HIF-1 .

研究分野：人体病理

キーワード：胃腸管間質腫瘍 低酸素 HIF コハク酸脱水素酵素 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃腸管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor; 以下 GIST) は主に胃や小腸など消化管に発生し、KIT または血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFRA) 遺伝子の機能獲得型変異が腫瘍発生において重要な役割を果たしている。KIT や PDGFRA 蛋白を阻害する分子標的治療薬が一定の効果があるが、“根治できるがん”とまでは至っていない。よって、より詳細に腫瘍発育進展のメカニズムを解明し、個々の分子病態を正確に診断する方法と、より効果的な治療方法の開発が必要である(文献)。

(2) コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase; SDH) は TCA 回路関連分子で、A-D の 4 つのサブユニットで構成され、その遺伝子変異が家族性パラングリオーマの原因遺伝子として知られている。多発 GIST とパラングリオーマが合併する Carney-Strakitakis 症候群において、SDHB, C, D の変異が発見され、GIST とパラングリオーマに共通した原因遺伝子であることが判明した(文献)。また、散発性 KIT/PDGFRA 野生型 GIST の約 5-10% に SDHB 遺伝子変異を有することが報告された(文献)。

(3) HIF (hypoxia-induced factor)、とくに HIF-1 α 、HIF-2 α は本来、低酸素化で誘導されて核内に移行し、血管新生や代謝に関わる標的遺伝子 (VEGF, GLUT1 等) の転写を誘導し、細胞を生存させるのに働く。VHL (von-Hippel-Lindau) は PHD (prolyl hydroxylase) と協調して、HIF を分解する。TCA 回路の中間代謝産物であるコハク酸 (succinate) とフマル酸 (fumarate) はそれぞれ SDH, FH (fumarate hydratase) により代謝を受けているが、蓄積すると PHD を抑制するため、HIF は増加する。パラングリオーマや腎細胞癌では VHL, SDH, FH の異常により、HIF が蓄積することが腫瘍発生に重要と考えられている(文献)。いくつかの癌腫では、特定のマイクロ RNA (miRNA) の発現が HIF により誘導されることが報告されたが(文献)、GIST における HIF の役割については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

(1) GIST における HIF の発現レベルやその調節機構の異常の頻度、臨床病理学的意義、予後や病理組織像との関係を明らかにする。

(2) GIST における HIF の発現レベルと HIF 標的遺伝子の発現レベルの関係ならびにそれらの臨床病理学的意義を明らかにする。とくに HIF の標的遺伝子としての (miRNA) 発現の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) サンプル: 外科的に切除された GIST のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) 150 例、うち新鮮凍結標本 19 例

(2) miRNA array: 新鮮凍結標本から RNA を抽出し、約 900 個の miRNA がスポットされたチップと反応させ、miRNA の相対的発現レベルを測定する。

(3) 定量的 RT-PCR: (2) と同じサンプルを用い、特定の miRNA や mRNA の発現レベルを測定する。

(4) 免疫組織化学染色 (免疫染色): FFPE を用い、特定の蛋白の発現レベルを測定する。陽性細胞の割合 (proportion) と陽性強度 (intensity) の組み合わせにより、高発現と低発現に分けた。

4. 研究成果

(1) miRNA 発現の検討:

新鮮凍結標本 19 例を用いた miRNA array にて、GIST の悪性度に関連して発現が上昇または低下している miRNA が多数リストアップされた。発現が上昇している miRNA には miR-210、低下しているのは miR-133b などであった。他の研究グループから報告されているデータと比較したところ、我々のデータと一致していたのは、miR-133b であり、高悪性度 GIST において発現が低下していた。Web 上のデータベースを参照し、miR-133b の標的遺伝子候補を検討した。その中で我々はとくに Fascin-1 に注目した。Fascin-1 は、癌の浸潤や転移に関与することが知られているアクチン結合蛋白である。定量的 RT-PCR による解析では、GIST において Fascin-1 mRNA 発現量は miR-133b 発現量と負の相関を示し、高悪性度 GIST において発現が上昇していた。さらに、GIST 147 例の FFPE を用いた免疫染色では Fascin-1 蛋白の過剰発現は組織学的悪性度と相関しており、予後不良因子であった (発表論文)。

(2) HIF-1 α 発現と臨床病理学的意義:

FFPE 検体での免疫染色にて、GIST における HIF-1 α 発現 (核内蓄積) の程度を検討した。HIF-1 α の核内発現は様々な程度に観察されたが (図 1)、過剰発現は、腫瘍径や核分裂数の増加と有意に相関していた。また、HIF-1 α 過剰発現例は、無病生存期間も有意に短縮しており (図 2)、腫瘍径、核分裂数、組織学的悪性度とともに、予後不良因子であった。HIF-1 α は GIST の新しい予後マーカーになる可能性が示唆された (論文執筆中)。

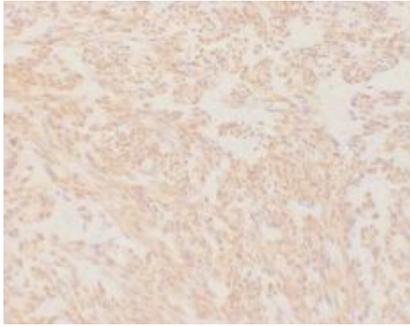


図 1. GIST における HIF-1 発現

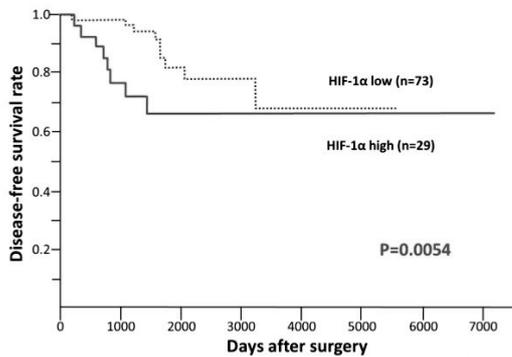


図 2. HIF-1 発現と無病生存期間の関係

(3) HIF-1α が標的としての miR-210 発現の意義：

(1),(2)の結果から、GIST において、核内に蓄積した HIF-1α の標的遺伝子の発現が誘導され、GIST の悪性化に関与しているメカニズムが存在しているのではないかと考えられた。癌腫では、miR-210 は HIF-1α によって発現が上昇する標的の一つであることが報告されていたので(文献)、我々は GIST における HIF-1α と miR-210 の発現レベルの関係を検討した。GIST の新鮮凍結標本を用いた定量的 RT-PCR にて、HIF-1α 蛋白過剰発現例は、miR-210 発現量が高い傾向があった(図 3)。さらに、組織学的悪性度が高い症例群ならびに腫瘍径が大きい(>10cm)症例群において、miR-210 発現量が高値であった。以上の結果より、HIF-1α の核内蓄積とそれに誘導された miR-210 の過剰発現が GIST の悪性化進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆された(論文執筆中)。

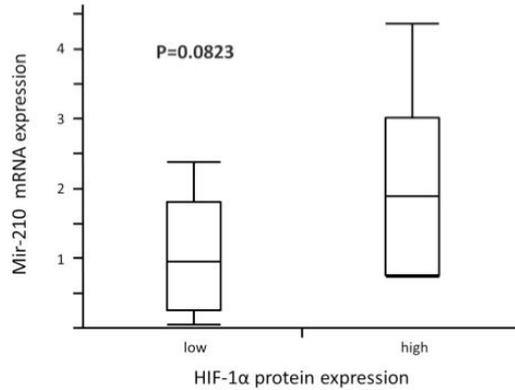


図 3. HIF-1 発現レベルと miR-210 発現レベルの関係

(4) SDH 欠失型 GIST における HIF-1α 発現：SDH のサブユニット A, B, C, D のいずれかに異常があると、SDH complex 全体が不安定化すると考えられており、免疫染色による SDHB 発現消失として現れる。我々の検討では、免疫染色による SDHB 欠失は GIST の 5% に観察され、胃発生、類上皮細胞形態と相関していた。さらに SDHB 欠失型 GIST の全例が HIF-1α 過剰発現を示していた。これは、パラングリオーマなどと同様に、SDH 欠失により、細胞内に過剰に蓄積したコハク酸が HIF-1α の蓄積を促すメカニズムが SDHB 欠失型 GIST の腫瘍発生に重要な役割を果たしていることが示唆された(論文執筆中)。

(5) 消化管原発平滑筋肉腫：

c-kit 遺伝子変異が発見される前は、GIST は“平滑筋肉腫”と診断されてきた。本研究課題で GIST 症例を抽出する過程で、過去に平滑筋肉腫と診断された症例の再検討を行った。それらの大半が GIST と再診断されたが、真の平滑筋肉腫も稀に存在し、7 例を得た。GIST と平滑筋肉腫の頻度は 65:1 であった。腫瘍径(5cm 以上)は予後不良因子であったが、核分裂数(50/50HPF 以上)と予後に相関は認められなかった(発表論文)。

(6) 消化管間葉系腫瘍における IMP3 発現：insulin-like growth factor II messenger RNA-binding protein 3 (IMP3)は癌胎児性蛋白の一種で、様々な悪性腫瘍で高発現していることが報告されている。免疫染色にて、消化管平滑筋肉腫、炎症性筋線維芽細胞腫瘍、消化管悪性黒色腫、腹膜悪性中皮腫の 33-94% には IMP3 過剰発現が認められたのに対して、GIST(n=150)では認められなかった。消化管平滑筋肉腫や炎症性筋線維芽細胞腫瘍では、より悪性度の高い症例において、IMP3 陽性率が高かった。IMP3 は GIST 以外の悪性間葉系

腫瘍の発生・進展に関与し、これらの同定に役立つマーカーとなりうる可能性が示唆された（発表論文）。

<引用文献>

Yamamoto H, et al. Pathol Int 2015
McWhinney SR, et al. N Engl J Med 2007
Janeway KA, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2011
Baldewijns MM, et al. J Pathol 2010
Huang X, et al. Mol Cell 2009

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 10 件）

Yamamoto H, Oda Y. Gastrointestinal stromal tumor: Recent advances in pathology and genetics. Pathol Int 65(1):9-18, 2015. doi: 10.1111/pin.12230 査読あり

山元英崇、小田義直. 胃腸管間質腫瘍（GIST）の遺伝子異常に基づく亜型分類と臨床的意義. 福岡医学雑誌 105 (8):157-65, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25509882> 査読あり

Yamamoto H, et al. (10 人中 1 番目). Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) expression in gastrointestinal mesenchymal tumors. Hum Pathol 45(3):481-7, 2014. doi:10.1016/j.humpath.2013.10.010. 査読あり

Yamamoto H, et al. (9 人中 1 番目). Clinicopathological features of primary leiomyosarcoma of the gastrointestinal tract following recognition of gastrointestinal stromal tumours. Histopathology 63(2):194-207, 2013. doi: 10.1111/his.12159. 査読あり

Yamamoto H, Kohashi K, Fujita A, Oda Y. Fascin-1 overexpression and miR-133b down-regulation in the progression of gastrointestinal stromal tumor. Mod Pathol 26(4):563-71, 2013. doi:10.1038/modpathol.2012.198. 査読あり

〔学会発表〕（計 9 件）

山元英崇. 胃 GIST の特徴と病理診断上の注意点. 第 87 回日本胃癌学会総会スポンサーシンポジウム 1 GIST 標準診断・治療のピットフォール～押さえておきたい外科、内

科、病理のポイント～, 2015 年 3 月 5 日、広島

山元英崇. 分子病態に基づいた胃腸管間質腫瘍の亜型の確立と腫瘍進展メカニズムの解明. 第 59 回日本病理学会秋期特別総会, 2013 年 11 月 21 日, 甲府

山元英崇、他. 分子病理学的予後因子と FNCLCC grading system の比較. 第 46 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, シンポジウム 軟部肉腫の病理学的悪性度評価, 2013 年 7 月 12 日, 東京

山元英崇. 消化管間葉系腫瘍の鑑別(症例 11-15) 第 102 回日本病理学会総会 診断ワークショップ 2, 2013 年 6 月 7 日, 札幌

山元英崇、他. Fascin-1 overexpression and miR-133b down-regulation in the progression of gastrointestinal stromal tumor. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 21 日, 札幌

〔図書〕（計 1 件）

山元英崇. 非上皮性腫瘍. 青笹克之、八尾隆史、編；癌診療指針のための病理診断プラクティス 下部消化管 . pp208-218, 中山書店、東京、2012

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山元 英崇 (YAMAMOTO, Hidetaka)
九州大学・病院病理診断科・准教授
研究者番号 30404073

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

財津 瑛子 (ZAITSU, Yoko)