

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590494

研究課題名(和文)カハールの介在細胞による消化管蠕動運動の制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of gene expression on interstitial cells of Cajal

研究代表者

磯崎 耕次 (Isozaki, Koji)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00425117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カハールの介在細胞(ICC)および平滑筋細胞のcDNAライブラリーを差分化法により解析し、ICCに特異的に発現する複数の分子を見出し、その中で免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子CADM1に注目し、検討した。ICCのcounterpartである消化管間質細胞腫(GISTs)におけるCADM1の発現を調べたところ、小腸ではGISTsのほとんどもCADM1が発現しているが、胃のGISTsではほとんども発現がみられないことがわかった。GISTsにおいて部位特異的にCADM1が発現していることは、ICCの部位特異性を反映している可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：By using cDNA library of interstitial cells of Cajal(ICC), we first clarified that CADM1, one of cell adhesion molecules, is specifically expressed by ICCs. We investigated CADM1 expression in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) which are considered to be originated from ICCs, and found that most of GISTs in the small intestine express CADM1, but most of gastric GISTs do not. The specific expression of CADM1 in small intestinal GISTs might mean that specific expression of CADM1 in ICCs in the small intestine. ICCs in different sites may show different protein expression pattern and may have different role.

研究分野：病理学

キーワード：カハールの介在細胞 c-kit GISTs CADM1

1. 研究開始当初の背景

(1) カハールの介在細胞(ICC)は消化管平滑筋細胞と神経の間に存在し、突起部を介して複数の平滑筋細胞と結合し、神経からの刺激を効率よく平滑筋細胞に伝えるとともに、自律的に電気的な興奮をし、消化管蠕動運動のペースメーカーの役割をしている。ICCは消化管筋間神経叢および筋層粘膜境界部に密に分布している。消化管蠕動運動については、交感神経・副交感神経による調節が研究されてきたが、ICCを介した消化管運動調節機構についてはほとんどわかっていない。

(2) 我々はICCのcounterpartであるGastrointestinal stromal tumors (GISTs)の腫瘍発生機構にc-kit,PDGFR遺伝子の機能獲得性変異が関与していることを明らかにしてきた。つまり、c-kit,PDGFR遺伝子に機能獲得性変異が起こると、それらの遺伝子産物がリガンドの刺激なしで恒常的に、リン酸化、活性化され、細胞増殖シグナルが常に伝えられることが、ICCの腫瘍化につながることを明らかにした。その成果がキナーゼ阻害剤 imatinib, nilotinib などを用いた GISTs に対する分子標的治療へ展開した。しかし、imatinib や nilotinib を用いた分子標的治療の経過中に GISTs 細胞に新たな変異が出現し、それらの薬剤に対して耐性獲得することが大きな問題となっている。

(3) GISTs の腫瘍発生機構に c-kit,PDGFR 遺伝子の機能獲得性変異が関与するが、変異のタイプにより、分子標的治療のキナーゼ阻害作用に違いがある。このことは分子標的治療の効果、予後予測に極めて重要であるが、十分に解明されていない。分子標的治療の効果が低いと考えられる症例に対して、漫然と薬物投与を行うことは、患者にとっても、医療経済的に不利益である。したがって、分子標的治療の効果予測ができるようにすることは極めて重要である。

2. 研究の目的

- (1) ICC に発現する分子を調べる。
- (2) (1)で見つかった分子が GISTs に発現し、腫瘍発生機構に関与するか、検討する。
- (3) GISTs の腫瘍発生に関与する c-kit 遺伝子変異が imatinib, nilotinib にどのように抑制されるのかを検討し、GISTs に対する分子標的治療の効果予測ができるようにする。

3. 研究の方法

(1) ICC の過形成を起こす遺伝子改変マウスを用いて、ICC を効率よく大量に採取し、回収した ICC より mRNA の抽出および、逆転写酵素を用いて cDNA に変換後、cDNA ライブラリーを作製。差分化法により平滑筋細胞に発現する分子との違いを比較検討する。

(2) (1)によりみつかった分子が GISTs に発現しているかどうか、免疫染色、in situ ハイブリダイゼーション、ノーザンブロット等により検討する。(1)で見つかった分子の発現の違いが、病理組織学的な悪性度の違いと関係があるか検討する。

(3)これまで imatinib, nilotinib によるキナーゼ阻害作用が、明らかになっていないタイプの c-kit 遺伝子変異を持つ GISTs の病理組織学的特徴を検討する。in vitro レベルで、imatinib, nilotinib による変異 c-kit チロシンキナーゼ(KIT)の自己リン酸化の変化を調べる。上記の GISTs の中で、分子標的治療が行われた症例を探し、その効果を評価する。

4. 研究成果

(1)ICC および平滑筋細胞の cDNA ライブラリーを差分化法により解析し、ICC に発現する複数の分子を発見した。その中で、1回膜貫通型の免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子の一つである CADM1 に注目した。CADM1 は肺、脳、精巣において上皮細胞間接着に関わり、精子形成、シナプス形成、神経のシナプス形成に関与することが知られている。さらに、活性化 NK 細胞に認識され抗原として働き、癌細胞の免疫監視の面より、がん抑制タンパク質として働くことも知られている。シナプス形成、がん抑制作用があることより、ICC および counterpart である GISTs を研究する上で、CADM1 が重要な分子であると考え、研究を進めた。

ICC は形態学的に、筋間神経叢に多くみられるタイプ(ICC-MP)と筋層 粘膜境界部に密に存在するタイプ(ICC-SM)に大別される。免疫染色、in situ ハイブリダイゼーション法により、ICC における CADM1 の発現を調べた結果、ICC-MP に強い発現みられるのに対して、ICC-SM には発現がみられないことがわかった。以上より、CADM1 が ICC-MP、平滑筋細胞、神経細胞間の接着に重要な役割をしていると考えられた。

さらに、CADM1 は非小細胞肺癌などの腫瘍発生に抑制因子として関与していることから、ICC の counterpart である GISTs における発現を調べた。その結果、CADM1 はほとんどの小腸 GISTs に発現しているのに対して、胃 GISTs では、その発現が稀であることがわかった。以上より、胃と小腸 GISTs では、起源となる ICC のタイプが異なる、つまり、小腸 GISTs は ICC-MP、胃 GISTs は ICC-SM より発生していることが示唆された。また、CADM1 は小腸 GISTs の腫瘍発生メカニズムに関与するが、胃 GISTs の発生に関与しない、つまり、GISTs の発生メカニズムは臓器により異なることが示唆された。CADM1 の発現の有無により、GISTs の病理組織学的な違い

はみられなかった。以上の結果を投稿準備中である。

(2)ICC の研究の一環として、ICC の counterpart である GISTs について研究を進めることは極めて重要である。GISTs の発生には、様々な c-kit 遺伝子変異が関与している。マスト細胞性白血病やマスト細胞増多症において、c-kit 遺伝子 exon9 に新しいタイプの変異 codon 501Ser, codon 502 Ala の重複変異が報告された。そこで、我々は GISTs 500 例について遺伝子解析を行った結果、2 例に、codon 501Ser, codon 502Ala の重複変異が見つけた。2 例の臨床病理学的特徴を下表に示す。

Clinicopathological characteristics of GISTs with KIT-Dup-Ser501Ala502

	Site	Mitosis/50HPFs
Case 1	Jejunum	7
Case 2	Jejunum	2

2 例の GISTs はいずれも小腸に発生し、mitosis がみられ、実際に転移がみられた。また、2 例ともに、KIT、CD34 陽性であった。この変異を CHO-K1 細胞に導入し変異 KIT のリン酸化を調べたところ、変異 KIT は恒常的に活性化しており、機能獲得性変異であることを確認した。次に、我々がすでに見つけていた codon 502Ala, codon 503Tyr の重複変異 KIT の性質との比較を行った。codon 501Ser, codon 502Ala の重複を持つ変異 KIT は imatinib 濃度 0.1 μM で機能が抑制されたのに対して、codon 502Ala, codon 503Tyr の重複変異 KIT は 10 μM で抑制された。また、nilotinib は、codon 501Ser, codon 502Ala 変異 KIT の機能を抑制したのに対して、codon 502Ala, codon 503Tyr の変異 KIT の機能は抑制しなかった。

実際に、codon 501Ser, codon 502Ala 重複変異を持つ GISTs 症例に、imatinib が投与され、高い抗腫瘍効果が示された。以上のことより、c-kit 遺伝子 exon9 に変異があるかどうかの検索だけでなく、変異のタイプを調べることは、分子標的治療を行う際の、効果予測のために極めて重要であると考えられた。

(3)最近、GISTs において c-kit 遺伝子の exon8 の変異が報告された。しかし、exon8 の変異の頻度や exon8 に変異を持つ GISTs の病理学的、臨床的な特性は明らかになっていない。そこで、1000 例の散発性 GISTs について遺伝子解析を行った結果、3 例に exon8 の変異を見つけた(codon 419 欠失タイプと codon 417~419 置換タイプの 2 種)。Table に示すように、Exon8 に変異を持つ GISTs はいずれも mitosis が多くみられ、病理組織学的悪性度が高かった。

Clinicopathological characteristics of

GIST with exon8 gene mutation

	Mitosis/50HPFs	Metastasis
Case 1	51	Bone
Case 2	13	Peritoneum Liver
Case 3	32	This case is During adjuvant therapy

1 例に骨転移、もう 1 例には後腹膜、肝転移がみられ、exon8 に変異を持つ GISTs は臨床的にも悪性度が高いと考えられた。これらの GISTs 症例に対して imatinib による分子標的治療が行われ、下表に示すように、高い抗腫瘍効果がみられた。

Case imatinib therapy (400mg/day)

Case No.	Outcome
1	stable for 22 months
2	stable for 18 months
3	no recurrence for 29months

GISTs に対して imatinib による分子標的治療を行う際には、効果予測のために c-kit 遺伝子の exon8 の変異を調べることは極めて重要であると考えられた。

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 2 件)

1. Isozaki Koji, Hirota Seiichi, Gastrointestinal stromal tumors with exon 8 c-kit gene mutation might occur at extragastric sites and have metastasis-prone nature Int J Clin Exp Pathol 7(11),2014,8024-8031 査読あり

2. Isozaki Koji, Hirota Seiichi, Extracellular domain c-kit mutation with duplication of Ser501Ala502 found in gastrointestinal stromal tumors is more imatinib- and nilotinib-sensitive than that with duplication of Ala502Tyr503 Lab Invest 93,2013,502-507 査読あり

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯崎 耕次 (ISOZAKI, Koji)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：00425117

(2) 研究分担者

廣田 誠一 (HIROTA, Seiichi)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：50218856