

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790689

研究課題名(和文) GISTの病態・悪性化に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of GIST related to malignant behavior

研究代表者

船坂 好平 (Funasaka, Kohei)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70599034

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)：消化管間葉系腫瘍GISTの病態解明を目的に悪性化に関与する新規遺伝子を同定する研究を行った。まず中心的な役割をするkit遺伝子が他の遺伝子をどのように影響するかを調べるため細胞株を用いマイクロアレイ解析を行ったところ1000以上の遺伝子発現が有意に変動していた。変動幅の大きい遺伝子を実際のGIST検体で調べたが悪性予測遺伝子は見つからなかった。そこで臨床的に良性に近いものと悪性であったGIST8検体をマイクロアレイで解析し、悪性群で大きく発現亢進した遺伝子を9つ同定することが出来た。今後はこの結果を用いてGIST悪性化に関する遺伝子を絞り込んでいくことで病態が更に解明されていくと考える。

研究成果の概要(英文)：We conducted a research to explore new genes involved in malignant behavior in GIST. Firstly, mutated or wild type c-kit gene was transfected exogenously to 293T cell line. Extracted mRNA was subjected to microarray analysis in order to compare with the influence of each kit gene. More than 1000 genes had significantly changed by exogenous c-kit. 11 genes were dramatically up or down regulated more than ten times. Their expressions were evaluated in actual GIST sample. However, there were no genes related to malignancy. From this result, we next analyzed clinical GIST samples which are classified to benign or malignancy by using a microarray. Then nine genes had significantly increased their expressions in malignant group. New candidate genes which are related to malignant features will be found by analyzing in actual many kinds of GIST samples.

研究分野：消化管学

キーワード：GIST

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管間葉系腫瘍 GIST は歴史の変遷を経て現在の診断基準が確立したが、臨床的には緩徐な発育を来すものから急激に増大し転移浸潤する悪性度の高いものまで多様性のある腫瘍である。しかし上皮性腫瘍と異なり良悪性という区別が困難なため、すべての GIST は潜在的に悪性要素をもっていると考え、手術が推奨され、術後再発や生命予後に関して大きさ、増殖能(核分裂像, Mib1 Index)を用いてリスク分類がなされている。1998年に Hirota らにより消化管筋層内に存在するペースメーカー細胞といわれるカハール介在細胞 (ICC) と同様に c-kit 蛋白が GIST でも高発現していることから ICC の腫瘍化が示唆された。また c-kit 遺伝子の機能獲得型変異が腫瘍形成に関与していることも合わせて報告され、非常に注目された。

その後 c-kit 遺伝子 exon9, 11, 13, 17 に欠失、点変異、挿入など様々なタイプの遺伝子変異の報告がなされ、これまでに臨床像と対比検討がされ、exon11 codon557-558 を含む欠失が術後再発、生命予後に関与するとの報告がなされた。

GIST の形成において重要な鍵となる遺伝子 c-kit は、イマチニブが c-kit リン酸化を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する点からも明らかであるが、どのように悪性化に関与しているかは不明である。例えば遺伝子変異が同じであっても臨床経過が一致しないことも多く経験する。そこで c-kit 遺伝子以外が腫瘍形成、悪性化に関与していることが示唆される中、2010 に転写因子 ETV1 が GIST の形成に関与すると報告された。このように c-kit 以外の遺伝子の中で腫瘍形成および悪性化に影響する遺伝子を見つけ出すことは GIST 病態および悪性化の解明に重要と考えられている。

2. 研究の目的

(1) c-kit 機能獲得型変異が非癌細胞株において形質転換をもたらすか否か、また活性化されるシグナル経路について検討する。

(2) 転写因子 ETV1 強制発現の c-kit 遺伝子発現への影響を評価すると共に網羅的マイクロアレイ遺伝子解析により c-kit および ETV1 が遺伝子発現系の全体に及ぼす影響を検討し変動幅の大きな遺伝子を抽出する。

(3) GIST 切除検体において細胞株で変化した遺伝子発現を検討し GIST の病態、悪性化に関与する遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) c-kit 遺伝子 (野生株および変異株 ex11codon557-558deletion) および転写因子 ETV1 のクローニングを行い、レトロウイルスベクター-pMX、pQCX1N、pQCX1H を用いて非癌

細胞株細胞株 293T に遺伝子導入し恒常発現株を作成する。Western blotting にて発現の確認を行い、下流シグナルとされる MAPK、AKT、STAT のリン酸化を観察する。

(2) 細胞増殖能を MTT assay にて計測する。癌の特徴のひとつとされる足場非依存性増殖について colony formation にて評価する。

(3) 作成した細胞株から抽出した RNA を逆転写し、c-kit、ETV1 発現を Applied Biosystems 社製 StepOne™ を用いて定量的 PCR で計測、GAPDH で補正し互いに影響しているか否か調べる。

(4) 網羅的 cDNA アレイ解析で c-kit、ETV1 発現により制御される遺伝子を調べ、発現が亢進もしくは低下する遺伝子を抽出する。提出サンプルとして以下の6種類の細胞株から RNA を抽出後に cDNA へ逆転写したものをアジレント社製マイクロチップで委託解析した。

293T、

293T + 変異型 c-kit (293T-mt)、

293T + 野生型 c-kit (293T-wt)、

293T + ETV1 (293T-ETV1)、

293T-mt + ETV1 (293T-mtETV1)、

293T-wt + ETV1 (293T-wtETV1)

(5) 抽出した変動幅の大きい遺伝子において、臨床検体 (非 GIST4 例、GIST 低リスク 8 例、浸潤転移 GIST 8 例) を用いて発現解析を行い、悪性度と関連する遺伝子を同定する。

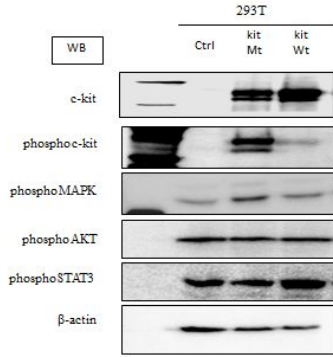
(6) 1-4 の細胞株実験から抽出した遺伝子群で適切な遺伝子候補が選定できなかった場合、臨床サンプルの中から明らかな浸潤転移を持つ悪性 GIST と低リスク GIST を選び、その中で c-kit 遺伝子変異が類似したものを網羅的 cDNA アレイ解析を行い、遺伝子発現プロファイルから両者の区別が可能か検討する。また悪性度関連遺伝子候補として両者で有意に発現の異なる遺伝子を抽出しておく。

4. 研究成果

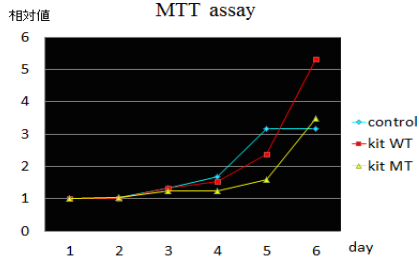
(1) 変異型 c-kit は 293T 細胞株において足場非依存的増殖を亢進したが細胞増殖能自体に影響しなかった。

変異型 c-Kit を発現した細胞株 293T は、明らかな形態的な変化を認めなかった。MTT assay において野生株、変異型で違いを認めず、細胞増殖能への影響は確認できなかった。しかし、colony formation assay において野生型を発現したものに比べ、足場非依存的増殖の顕著な亢進が確認された。

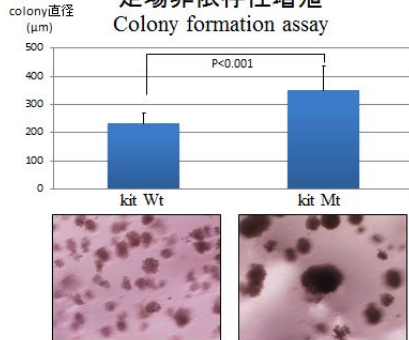
細胞シグナル伝達



細胞増殖能 MTT assay



足場非依存性増殖 Colony formation assay



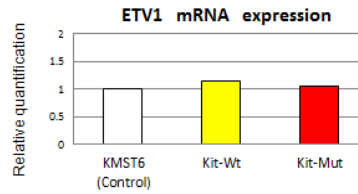
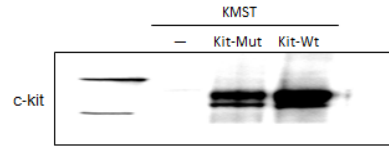
(2) 変異型 c-kit は著明なリン酸化を来たしたが MAPK リン酸化はわずかに亢進するのみである。

シグナル伝達系では変異型 c-Kit で著明なリン酸化を認めるものの、MAPK リン酸化はわずかに亢進するのみで AKT は変化しなかった。逆に STAT 3 は野生型で軽度亢進していた。

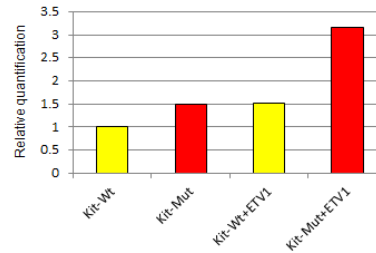
(3) 転写因子 ETV1 は c-kit 発現を軽度亢進させた。一方 c-kit は ETV1 発現に影響を与えなかった。

定量的 PCR で ETV1 強制発現による c-kit 発現の変化を計測したところ、c-kit 発現が約 1.5-2 倍上昇していた。一方で、c-kit 強制発現による ETV1 発現は変化を認めなかった。このことから転写因子 ETV1 と c-kit のそれぞれの発現に与える影響はあまり強くないことが分かった。

なぜ GIST において c-kit および ETV1 が共発現しているかについてのメカニズムは更なる研究が必要となる。



c-Kit mRNA expression



(4) 網羅的解析により膨大な遺伝子発現が変動することが判明した。

細胞株 293T に c-kit 変異遺伝子を強制発現させ、マイクロアレイにて発現変動を解析したところ、2 倍以上発現変動が確認されたものとして、- (c-kit 変異遺伝子) で 1346 遺伝子、- (c-kit 野生型遺伝子) で 1011 遺伝子、- (ETV1) で 4600 遺伝子、- (変異型 c-kit 下での ETV1) で 4257 遺伝子、- (野生型 c-kit 下での ETV1) で 1368 遺伝子認められた。

いずれの結果も予想以上であり、多数の遺伝子発現に影響を与えていることが判明した。中でも転写因子 ETV1 遺伝子の及ぼす影響は c-kit に比べ大きかった。

そこで c-kit 変異遺伝子に注目して変動が大きい (10 倍以上変動) 11 遺伝子を抽出した。

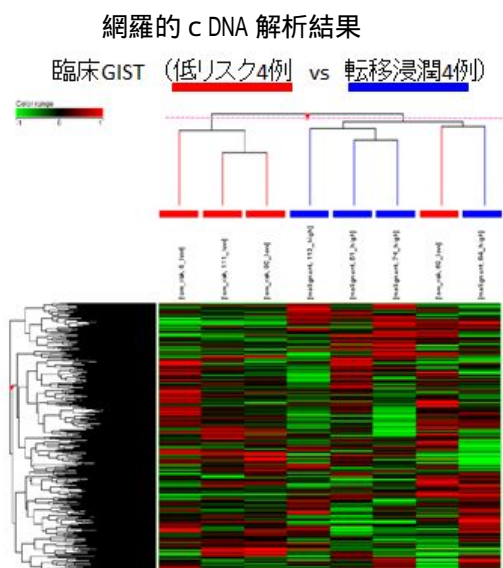
kit MT発現株変動遺伝子におけるkit WT発現株での変化

Gene Symbol	293Tmt /293T		293Twt /293T	
KIT	27.69	up	18.22	up
HES5	15.22	up	7.75	up
ANKRD36BP2	13.84	up	1.03	down
HMBOX1	12.99	up	123.53	up
GPR182	12.33	up	103.57	up
CD86	12.09	up	63.71	up
PRICKLE4	11.82	up		
SMCR7L	10.55	up	12.40	up
LRR2	10.15	up	54.28	up
MYBL1	26.22	down	21.56	down
DSCR8	14.34	down	1.23	down

(5) 切除検体で発現解析を行ったところ、GIST でのみ発現が特異的であったものは認

めなかった。臨床 20 検体（非 GIST4 検体、低リスク GIST8 検体、高リスク GIST8 検体）を用いて定量的 PCR で mRNA 発現を調べリスク分類と対比した。GIST のみで特異的に発現している遺伝子は認めなかった。GIST に限って解析したが、低、高リスク 2 群で有意差をもって発現が異なる遺伝子は認めなかった。今後更なる検討が必要であると考えられた。

(6) 細胞株実験から適切な遺伝子候補が選定できなかったため、臨床検体を用いたマイクロアレイ解析を行った。当施設で切除された GIST 検体から RNA を抽出、保存し遺伝子変異解析を行っているものの中から c-kit 遺伝子の変異型および部位をマッチングさせた低リスクおよび転移浸潤 GIST の 2 群各 4 検体に対しマイクロアレイ解析でクラスター解析、主成分分析、変動遺伝子抽出を行った。クラスター解析および主成分分析の両者より 2 群間で遺伝子発現パターンが区別できると考えた。



2 群間で有意差 ($p < 0.001$) をもって変動した遺伝子を抽出し 371 gene 認め、うち悪性群で発現が 10 倍以上亢進した遺伝子が 9 つ (SOX11, FOXL1, CYTL1, EDNRA, ADAMTS8, NEK2, NXP4, ETV4, ASPM) 同定された。ほかに低リスクで発現の亢進しているものも抽出可能であるため、今後の研究としては、これらの GIST 悪性群予測遺伝子を臨床サンプルで評価し有効な予測マーカーの同定を進めると共に発現亢進群の遺伝子の中からターゲットとなりうる pathway がないか GIST 悪性化メカニズムに迫る研究が必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 0 件)

[学会発表](計 9 件)

船坂好平、宮原良二、後藤秀実
GIST に対する EUS-FNA を用いた遺伝子解析
第 89 回日本消化器内視鏡学会総会
2015.5.29 名古屋国際会議場(愛知県名古屋)

船坂好平、宮原良二、後藤秀実
当院における GIST の自然経過の検討
第 11 回日本消化管学会総会
2015.2.13 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Kohei Funasaka, Ryoji Miyahara, Hidemi Goto, et al. (他 9 名 1 番目)
Novel Biomarker Candidates for predicting high-risk GIST.

APDW2014, 2014.11.25, バリ、インドネシア
船坂好平、宮原良二、後藤秀実 (他 14 名 1 番目)

GIST における新規遺伝子マーカーの探索
JDDW2014, 2014.10.23, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Kohei Funasaka, Ryoji Miyahara, Hidemi Goto, et al. (他 9 名 1 番目)
Molecular Characteristics of Malignant GIST.

DDW2014, 2014.5.3, シカゴ、アメリカ
船坂好平、宮原良二、後藤秀実 (他 13 名 1 番目)

EUS-FNA を用いた GIST 遺伝子解析の有用性と問題点
JDDW2013, 2013.10.10 高輪プリンスホテル(東京都港区)

Kohei Funasaka, Ryoji Miyahara, Hidemi Goto, et al. (他 9 名 1 番目)
c-kit expression could be a predictor of high risk GIST.

TDDW2013, 2013.10.6, 台北 台湾
船坂好平、宮原良二、後藤秀実
GIST 遺伝子解析と臨床的悪性度の比較検討
第 99 回日本消化器病学会総会 2013.3.22
城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

船坂好平、宮原良二、後藤秀実 (他 15 名 1 番目)
転写因子 ETV1 による PDGFRA 発現と MAPK 活性化の新しい知見
JDDW2012, 2012.10.10, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

JDDW2012, 2012.10.10, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船坂 好平 (FUNASAKA Kohei)
名古屋大学 医学部附属病院 病院助教
研究者番号: 70599034

(2) 研究分担者

なし