

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640110

研究課題名(和文) 分子標的治療薬に対する二次遺伝子変異は予防可能か

研究課題名(英文) Is secondary resistance preventable in the molecularly targeted therapy

研究代表者

西田 俊朗 (Nishida, Toshiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・病院長

研究者番号：40263264

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)：GIST T1親株をイマチニブ環境下で培養し、イマチニブ耐性株を作成した。それぞれに通常のNGS解析、アレイ解析、UDSを行った。結果、①親株に比しpersistent cellsではトランスクリプトームで大きな変化を示し、耐性株では遺伝子変異が培養時間依存性に高くなっていた。②KIT二次遺伝子変異は、親株には確認できず、イマチニブ処理前に耐性変異を持つ細胞が存在する確率は非常に低いと考えられた。③分子進化を見ると全ての耐性株は、ある時点で一気分枝していた。臨床検体での遺伝子解析でも治療前後共通の変異は無く、耐性を起こしやすい細胞集団が治療前からあるとは考えられなかった。

研究成果の概要(英文)：GIST T1 cell line has been incubated with various concentrations of imatinib and generated imatinib-resistant cells with and without secondary mutations. We found the results as follows; 1. Persistent cells had great changes in the transcriptomes, whereas resistant cells showed great changes in the genetic mutations. 2. Secondary KIT mutations found in resistant cells could not be chased into and detected in parental cells. This was also confirmed using clinical materials. 3. Phylogenetic-tree analysis, in which branch lengths represent evolutionary time measured by VAF increments, indicated that all resistant cell lines had a similar break point time in generating imatinib-resistance.

These results may suggest that, in the cell lines, imatinib-resistant cells may be considered to be generated from a crowd which have expression of detoxification and apoptosis-resistance genes, but not from pre-existing parental cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：抗がん剤耐性 二次遺伝子変異 KIT遺伝子 次世代シーケンサー mRNAアレイ解析

1. 研究開始当初の背景

近年、肺がん、大腸癌、乳癌、腎がん、メラノーマ、肉腫で数多くの分子標的治療薬が臨床開発され、画期的な治療効果を発揮し、進行再発がん患者の予後を改善した。しかし、効果を認めた患者さんの殆どで、治療継続と共に耐性株が出現し、薬効が無くなり、治療継続が難しくなる。標準治療の治療ラインが限定的な現状では、分子標的治療薬に対する獲得耐性は、進行再発がん患者の標的治療薬による治療を制限し、予後を規定する。標的治療薬への獲得耐性の主たる原因は二次遺伝子変異であり、二次遺伝子変異の原因やメカニズムを明らかにすることは喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal Stromal Tumor: GIST) の分子標的治療をモデルにし、二次遺伝子変異の発現が治療介入後、何らかの方法で将来的に制御・抑制可能かどうかを検討する。具体的には、1. 二次遺伝子変異が治療介入前に存在するか、介入後に発生するか、2. 二次遺伝子変異を起こしやすい細胞特性や細胞環境が存在するかどうかを明らかにする。更に、治療介入後に二次遺伝子変異が起こっており、二次遺伝子変異を誘発する特定の細胞特性が存在すれば、その特定を行い、次研究で耐性抑制法 (薬剤等) の開発研究につなげる。

3. 研究の方法

単純な GIST cell line と、複雑な臨床症例の初発腫瘍或いは再発腫瘍とイマチニブ治療後耐性腫瘍の paired samples (同じ個人からのサンプル) を用い、Next Generation Sequencer (NGS) と mRNA マイクロアレイ解析を行い、治療介入前に耐性遺伝子変異が存在するかどうかを確認する。次に、遺伝子変異解析とアレイ発現解析の統計学的手法から二次遺伝子変異を起こしやすい特定の「条件」や「細胞集団」が、イマチニブ処理前からあるかどうか、あればその「条件」や「状態」を検索する。

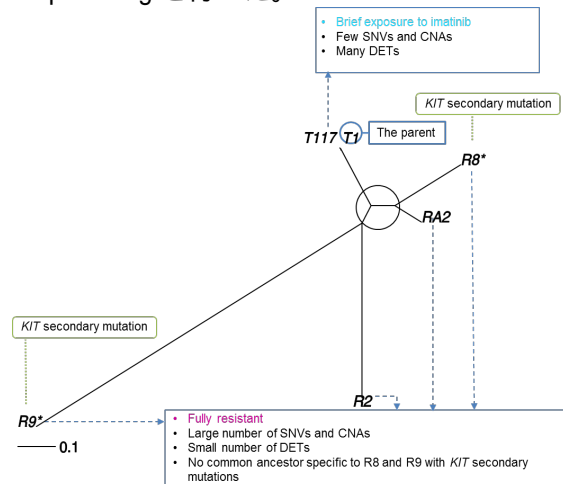
4. 研究成果

平成 26 年度 ~ 27 年度にかけて以下の研究を次世代シーケンサー (NGS) と mRNA アレイ解析を用いて行った。

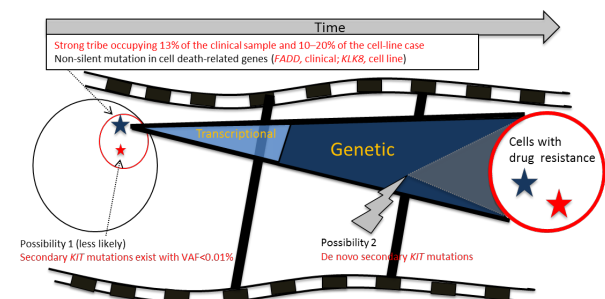
1. GIST T1 細胞株と GIST T1 株から誘導された耐性細胞株の解析

GIST T1 親株と本細胞株を徐々に低濃度から高濃度のイマチニブ環境下で培養し、イマチニブ治療後イマチニブ耐性 (二次遺伝子変異出現) 前の細胞 (persistent cells) とイマチニブに 100 倍以上抵抗性になった耐性株 (resistant cells: 細胞株で

は R2, RA2, R8, R9 が樹立され、R8, R9 は KIT 二次遺伝子変異があり、R2, RA2 は二次遺伝子変異が無い) を作成した。それぞれに通常の NGS 解析並びに mRNA アレイ解析と 299 候補 SNV に対して Ultra-deep sequencing を行った。



その結果、親株に比し persistent cells では遺伝子変異は殆ど無く、トランスクリプトームで大きな変化を示した。特に、イマチニブ投与後には薬剤代謝やアポトーシスに関連する遺伝子の発現が強くなっていた。一方、耐性株では遺伝子変異が培養時間依存性に多くなっていたが、トランスクリプトームの変化は殆ど無かった。更に、耐性後に主流となった SNV や indel の多くは、頻度は低いながら治療中、治療前の細胞にも確認でき、trace-back できることが確認された。KIT の二次遺伝子変異を持つ細胞株を中心に Ultra-deep sequencing を行った。しかし、イマチニブ耐性後に確認された KIT 二次遺伝子変異は、親株や persistent cells には確認できなかった。従って、耐性変異の出現時期は高い精度では特定できないものの、イマチニブ処理前に耐性変異を持つ細胞が、この細胞株の系で存在する確率は非常に低いと考えられた。SNV を用い分子進化図を書くと 4 つの耐性株は、ある時点で一気に分枝し、その後遺伝子変化的にすべて異なる方向に分かれていた。



2. 臨床検体での解析

イマチニブ治療前と耐性後の凍結検体のある2症例でNGSエクソノーム解析を行った。耐性株で認められるSNVs/indelsで、両症例共通のものはKIT二次遺伝子変異のV654Aしかなく、上記細胞株と共通して見られた遺伝子変異や発現変化も認められなかった。

以上より、耐性細胞が治療前に存在する確率は低く、イマチニブ処理時に解毒やアポトーシス関連遺伝子の発現があり、イマチニブ治療下でも生き残った細胞から二次遺伝子変異を伴う或いは伴わない耐性株が発生していると考えられた。耐性を起こしやすい特定の細胞集団が治療前からあるとは考えられなかった。

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12件)

1. Nishida T, Blay JY, Hirota S, Kitagawa Y, Kang YK. The standard diagnosis, treatment and follow-up of gastrointestinal stromal tumors based on guidelines. *Gastric Cancer* 査読有、2016; 19:3-14
2. Nishida T, Matsushima T, Tsujimoto M, Takahashi T, Kawasaki Y, Nakayama S, Omori T, Yamamura M, Cho H, Hirota S, Ueshima S, Ishihara H. Cyclin-dependent kinase activity correlates with the prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumours. *Ann Surg Oncol* 査読有、2015; 22(11):3565-73
3. Barrios CH, Blackstein ME, Blay JY, Casali PG, Chacon M, Gu J, Kang YK, Nishida T, Purkayastha D, Woodman RC, Reichardt P. The GOLD ReGISTry: a Global, Prospective, Observational Registry Collecting Longitudinal Data on Patients with Advanced and Localised Gastrointestinal Stromal Tumours. 査読有、*Eur J Cancer*. 2015;51(16):2423-33.
4. Isosaka M, Niinuma T, Nojima M, Kai M, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Nishida T, Kanda T, Taguchi T, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Suzuki H, Shinomura Y. A Screen for Epigenetically Silenced microRNA Genes in Gastrointestinal Stromal Tumors. *PLoS One*. 査読有、2015;10(7):e0133754. doi: 10.1371/journal.pone.0133754.
5. Nishida T, Tsujimoto M, Takahashi T, Hirota S, Blay J-V, Wataya-Kaneda M. Gastrointestinal stromal tumors in

- Japanese patients with neurofibromatosis type 1. *J Gastroenterol* 査読有、2015; 51(6):571-8.
6. Maki RG, Blay JY, Demetri GD, Fletcher JA, Joensuu H, Martín-Broto J, Nishida T, Reichardt P, Schöffski P, Trent JC. Key issues in the clinical management of GIST: an expert discussion. *Oncologist* 2015;20(7):823-30.
 8. Joensuu H, Martín-Broto J, Nishida T, Reichardt P, Schöffski P, Maki RG. Follow-up strategies for patients with gastrointestinal stromal tumor treated with or without adjuvant imatinib after surgery. *Eur J Cancer* 査読有、2015; 51(12):1611-7.
 9. Joensuu H, Rutkowski P, Nishida T, Steigen S.E, Brabec P, Plank L, Nilsson B, Braconi C, Bordoni A, Magnusson M.K, Sufliarsky J, Federico M, Jonasson J.G, Hostein I, Bringuier P-P, Emile J-F. KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence. *J Clin Oncol* 査読有、2015;33(6):634-42.
 10. Nishida T, Doi T. Pazopanib both for GIST and soft-tissue sarcoma. *Lancet Oncol* 査読有、2016: accepted
 10. 西田俊朗、GISTにおけるKIT阻害薬に対する耐性機構、医学のあゆみ、252、2015、803-808
 11. 西田俊朗、塚崎邦弘、ABL/KIT/PDGFR阻害薬～イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ～、日本臨床、査読有、73、2015、250-255
 12. 西田俊朗、木下敬弘、芝崎秀儒、家族性消化管間質腫瘍(Familial Gastrointestinal stromal tumor)、日本臨床73、2015、103-107

[学会発表](計4件)

1. European Cancer Congress(18th ECCO and 40th ESMO Annual meeting)Nishida Toshiro, Takahashi Tsuyoshi, Katsuya Tsuchihara, Mamoru Kato. Genomic and transcriptomic changes in gastrointestinal stromal tumors with acquired resistance to imatinib, 2015年9月25日～2015年9月29日、オーストリア
2. Seoul International Symposium of Surgical Oncology 2015, Toshiro Nishida. Multidisciplinary treatment for primary GIST, 2015年2月27日～2015年2月28日、韓国
3. 第73回日本癌学会学術総会、Toshiro Nishida, Tsuyoshi Takahashi, Kazuya Tsuchihara, The mechanism of acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor(GIST)2014年9月25日～2014年9月27日横浜
4. 第52回日本癌治療学会学術集会、西田俊

朗、長晴彦、尾阪将人、小松嘉人、黒川幸典、土井俊彦、平井敏弘、北側雄光、高リスク GIST に対する完全切除後の治療に関するレジストリ研究、2014 年 8 月 28 日～2014 年 8 月 30 日横浜

〔図書〕(計 1 件)

1. 西田俊朗 他、総合医学者、消化器外科学レビュー2015-16、2015、169-173

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

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)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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

西田 俊朗 (NISHIDA Toshirou)

国立研究開発法人 国立がん研究センタ

ー 東病院 病院長

研究者番号: 40263264

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

高橋 剛 (TAKAHASHI Tsuyoshi)

大阪大学 医学系研究科 助教

研究者番号: 50452389