

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0184

研究課題名（和文）大規模臨床検体を用いたGIST分子標的薬耐性バイオマーカーの網羅的解析と臨床応用（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Clinical application of biomarker associated with resistance of molecular target therapy for GIST based on comprehensive molecular analysis in a large scale of clinical samples(Fostering Joint International Research)

研究代表者

岩槻 政晃（Iwatsuki, Masaaki）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：50452777

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,600,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：消化管間質性腫瘍(GIST)は稀な疾患であるが、再発をきたす悪性疾患である。腫瘍径や核分裂像などに規定される再発高リスク群はイマチニブによる術後補助療法が推奨されているが、分子生物学的バイオマーカーは存在しない。

GIST細胞株でイマチニブ耐性株を樹立後、網羅的解析にてFBXW7を同定した。日米共同で約300例のGIST臨床検体を集積し、FBXW7の発現を確認した。FBXW7低発現は予後不良であり、とくに高リスク群ではFBXW7低発現が予後を占う因子であった。本研究はGISTにおいてFBXW7が再発予測因子であるとともにイマチニブによる補助療法の耐性のバイオマーカーになりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管間質性腫瘍(GIST)は稀少腫瘍であるが、再発をきたす悪性疾患である。現在は腫瘍径などで規定されるリスク分類に従い、イマチニブによる術後補助療法が推奨されているが、様々な有害事象や高額な薬剤でもあるため、適切な患者選択が必要である。

本研究ではがん抑制遺伝子であるFBXW7に着目した。稀少腫瘍のため日米共同で約300例のGIST検体を集積し、FBXW7の発現を確認した。とくに高リスク群ではFBXW7低発現が予後を占う因子であった。GISTにおいてFBXW7が再発予測因子であるとともにイマチニブによる補助療法の耐性のバイオマーカーになり、既存のリスク分類を凌駕する因子であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are rare tumor of the gastrointestinal tract. Although the factors responsible for the malignant and aggressive clinical behavior of GISTs, including tumor size, mitotic index, tumor location, and tumor rupture have been investigated for years, molecular biomarker remain unknown.

We established imatinib-resistant GIST cell and picked up FBXW7 gene by comprehensive molecular analysis. We collected clinical samples by Japan-US collaborative study and examine FBXW7 expression of by immunohistochemical study in 139 high-risk GIST compared with 166 non high-risk GIST. The low FBXW7 group in high-risk GIST showed a significantly poorer prognosis. In 75 cases of high-risk GIST treated with imatinib as adjuvant therapy, the low FBXW7 group showed poorer prognosis. Our study suggests that FBXW7 is a potential prognostic factor of recurrence in high-risk GIST. FBXW7 expression may help identify patients benefitting from adjuvant therapy more precisely.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：GIST 再発高リスク群 イマチニブ耐性

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor ; GIST) は年間 10 万人に 2 人程度の発症率といわれており、比較的稀な疾患である。約 90% の GIST で c-kit 遺伝子変異が認められ、化学療法や放射線療法に抵抗性が高く、とくに切除不能・再発の症例は、予後不良である。切除不能・再発 GIST に対してはチロシキナーゼ阻害剤であるイマチニブの投与が行われる。その治療効果は高いものの、近年、イマチニブの一次耐性、二次耐性の獲得が臨床、問題となっている。また、術後再発の高リスク症例に対しては、イマチニブ 3 年間の術後補助療法が推奨され、さらには拡大手術が必要あるいは手術リスクの高い GIST に対するイマチニブによる術前化学療法も検討されている現状で、その効果を予測するバイオマーカーは存在しないことは重要な課題である。したがって、イマチニブの感受性を治療前に予測することは臨床的に極めて重要となる。

実臨床で用いられている再発予測の因子は、腫瘍径、核分裂像、腫瘍破裂、原発臓器などの臨床病理学的因子である。GIST の分子生物学的特徴が明らかにされているにもかかわらず、再発予測や分子標的薬の感受性予測する molecular biomarker は存在しない。また、一般的ながんと比較し、希少腫瘍でもあるため、臨床検体での検証が難しいという現状が、molecular biomarker の確立の支障になっている可能性もある。

2. 研究の目的

本研究では基課題により、GIST 耐性細胞株を樹立し、in vitro で microarray 技術を用いてイマチニブ耐性因子を網羅的に解析、同定する。細胞株による機能解析を行ったうえで、日米共同で GIST 臨床検体を集積し、同定した因子の発現を大規模の臨床検体で検証し、臨床的な意義を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) GIST におけるイマチニブ耐性株の樹立：約 6 か月間のイマチニブの GIST 細胞株への持続曝露により、耐性の獲得を IC50 値にて確認する。
- (2) イマチニブ耐性因子の同定：耐性株ならびに親株を microarray へ提出し、イマチニブ耐性にかかわる遺伝子の網羅的な解析を行う。
- (3) 同定された遺伝子の機能解析：GIST 細胞株を用いて、同定された遺伝子の発現調整により、細胞の増殖能、浸潤能、イマチニブ感受性の変化を確認する。
- (4) 同定された遺伝子の検証：日米共同で GIST 検体を集積し、免疫染色により遺伝子発現を検証する。
- (5) 臨床病理学的因子の検証：(4) の発現検証データと臨床病理学的因子の相関を解析し、臨床的意義を検証する。

4. 研究成果

(1) GIST におけるイマチニブ耐性株の樹立

GIST 細胞株 (GIST-T1) へ、イマチニブ持続投与を行い (6 か月間) 耐性株を樹立した。IC50 値は耐性株 54.5nM、親株 3.92nM と約 15 倍に上昇し耐性を確認した (図 1)。

(2) イマチニブ耐性因子の同定

(1) で樹立された耐性株と親株を cDNA microarray を行い、pathway 解析を行った。その結果、PI3k-Akt signaling pathway が強く関与していることを示した (図 2)。そこで、この PI3k-Akt signaling pathway を多角的に制御している FBXW7 遺伝子に着目した (図 3)。FBXW7 遺伝子は様々な oncoprotein のユビキチン分解を担うがん抑制遺伝子として、これまで様々な癌腫でその発現抑制の意義が報告されている。

図1

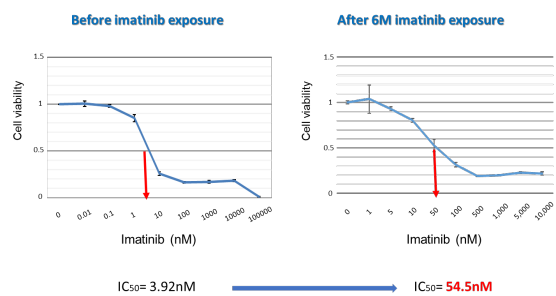


図2

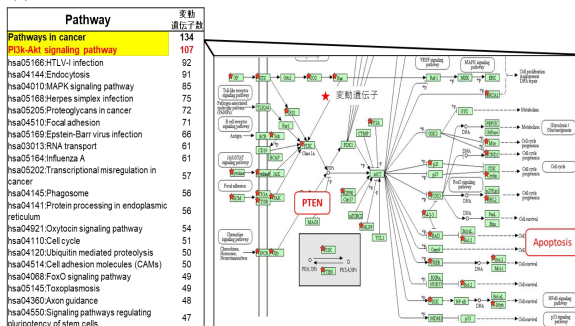
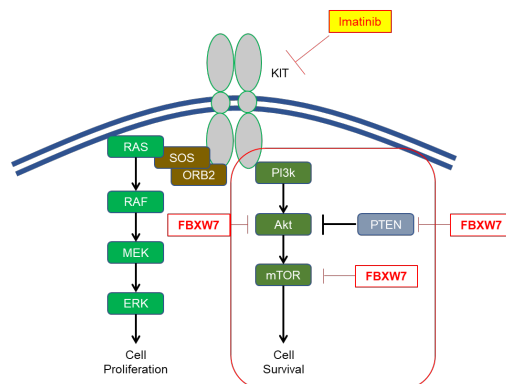


図3



(3) 同定された遺伝子の機能解析：

(2) で同定された FBXW7 遺伝子を GIST 細胞株において発現抑制を行った。siRNA により FBXW7 の発現は抑制され、標的蛋白である Notch1, c-Myc の発現は増加した。その結果、FBXW7 の発現低下により、細胞増殖能、細胞浸潤能は増加した (図 4)。また、FBXW7 の発現抑制により、イマチニブの感受性は低下した (図 5)。

図4

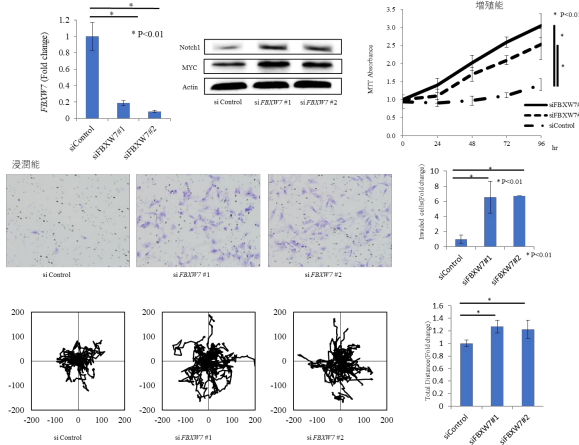
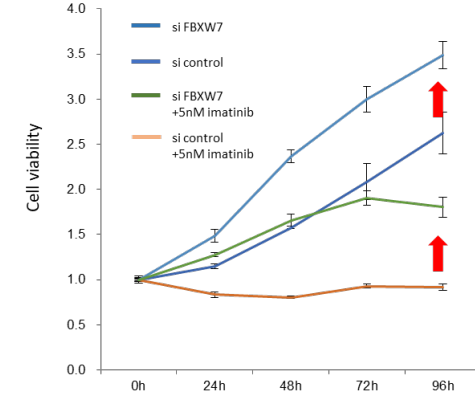


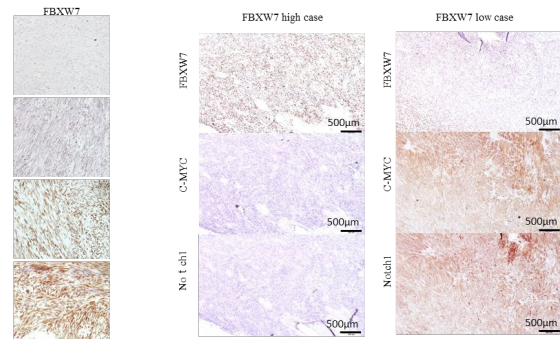
図5



(4) FBXW7 遺伝子の GIST における発現

日米共同で約 300 例の GIST 臨床検体を集積し、FBXW7 の発現を免疫組織学的に検証した。染色強度と染色範囲で高発現、低発現の群に分けた。305 例の GIST 検体のうち、169 例 (55%) が FBXW7 高発現、136 例 (45%) が FBXW7 低発現であった。FBXW7 高発現症例では C-MYC, Notch 1 が低発現、FBXW7 低発現症例では C-MYC, Notch 1 が高発現であった (図 6)。

図6



(5) FBXW7 遺伝子の GIST における発現と臨床病理学的因子の検証

FBXW7 高発現群と低発現群にて無再発生存率を比較すると、305 全症例において FBXW7 低発現群が有意に予後不良であった。また、ハイリスク 124 症例で同様の検討を行うと、FBXW7 低発現群が有意に予後不良であった (図 7)。ハイリスク症例では補助療法としてイマチニブの投与が行われており、イマチニブ投与にもかかわらず FBXW7 低発現群では予後不良であったことから、イマチニブの耐性を示している可能性も示唆された。また、全症例、中・高リスク症例において、それぞれの無再発生存に対する多変量解析を行ったところ、FBXW7 の低発現が独立した危険因子であった (表 1)

図7

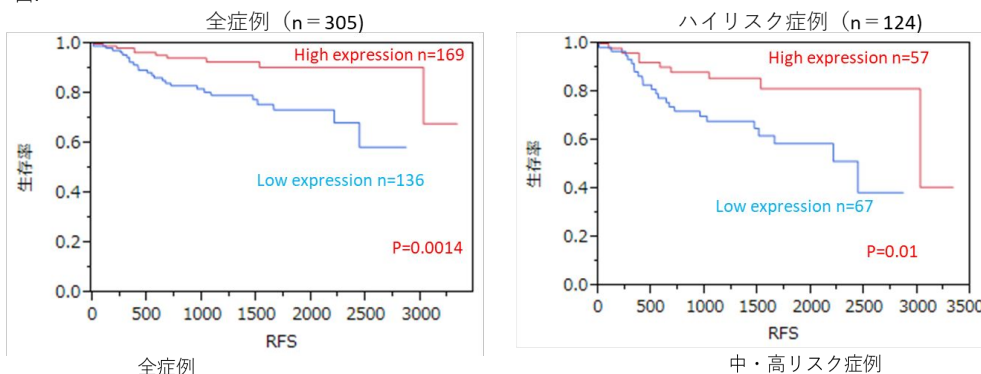


表1

	単変量解析			多変量解析		
	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
年齢 (< 65)	1.71	0.45-6.92	0.43	-	-	-
性別 (Male)	1.54	0.41-6.21	0.52	-	-	-
原発部位 (胃以外)	5.33	1.9-25.7	0.02	2.81	0.73-13.5	0.13
腫瘍径 (> 5 cm)	5.62	1.52-24.4	0.009	1.57	0.39-6.29	0.54
核分裂数 (> 10/50 HPF)	3.31	0.47-15.4	0.19	-	-	-
Modified Fletcher分類 (高リスク)	25.7	4.71-476	<0.0001	10.8	1.56-216	0.01
FBXW7発現 (低発現)	14.8	1.58-26.2	0.0007	6.78	1.16-130.8	0.04

	単変量解析			多変量解析		
	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
年齢 (< 65)	1.89	0.46-9.23	0.38	-	-	-
性別 (Male)	1.13	0.27-4.80	0.86	-	-	-
原発部位 (胃以外)	5.48	1.33-27.1	0.02	3.05	0.74-15.1	0.12
腫瘍径 (> 5 cm)	1.37	0.32-9.39	0.69	-	-	-
核分裂数 (> 10/50 HPF)	1.71	0.24-8.79	0.55	-	-	-
FBXW7発現 (低発現)	7.15	2.08-47.9	0.003	5.41	1.07-5.73	0.04

(6) まとめ

GIST 細胞株を用いて、イマチニブの持続曝露により、イマチニブ耐性 GIST 細胞を樹立した。この耐性株を用いて、イマチニブ耐性に関わる遺伝子の同定を microarray により網羅的な解析を行ったところ、PI3k-Akt signaling pathway がイマチニブ耐性に関与することを同定した。そこで、PI3k-Akt signaling pathway を制御する因子として、様々な oncoprotein のユビキチン分解を担うがん抑制遺伝子として、FBXW7 遺伝子に着目した。FBXW7 遺伝子はこれまで様々な癌腫でその発現抑制の意義が報告されている。

GIST 細胞株において FBXW7 の発現抑制を siRNA により行うと、下流蛋白の C-MYC、Notch1 発現が増加した。その結果、細胞増殖能、細胞浸潤能が有意に増加した。また、FBXW7 の発現抑制により、イマチニブの感受性は低下した。

免疫染色にて FBXW7 低発現症例は有意に腫瘍径が大きく、核分裂数が多く、胃以外の原発、高リスク症例に多かった。無再発生存率において FBXW7 低発現症例は全症例、中・高リスク症例において有意に予後不良であった。また、無再発生存に対する多変量解析を行ったところ、全症例、中・高リスク症例において FBXW7 発現は独立した予後不良因子であった。

以上より、GIST において FBXW7 発現低下は悪性度に関与し、有用な予後予測マーカーである。とくに再発の可能性が高い中・高リスク症例においても予後予測しうることから、日常臨床において、イマチニブによる術後補助化学療法の適応選択において従来のリスク分類に加え有用な指標となりうることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita K, Iwatsuki M, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Nagai Y, Iwagami S, Miyamoto Y, Yoshida N, Komohara Y, Ajani JA, Baba H	4. 巻 23(1)
2. 論文標題 .Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 95 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-019-00999-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Koga Y, Iwatsuki M, Yamashita K, Kiyozumi Y, Kurashige J, Masuda T, Eto K, Iwagami S, Harada K, Ishimoto T, Baba Y, Yoshida N, Miyanari N, Takamori H, Ajani JA, Baba H	4. 巻 22(6)
2. 論文標題 The role of FBXW7, a cell-cycle regulator, as a predictive marker of recurrence of gastrointestinal stromal tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastric Cancer.	6. 最初と最後の頁 1100 ~ 1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-019-00950-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamashita Kohei, Iwatsuki Masaaki, Harada Kazuto, Koga Yuki, Kiyozumi Yuki, Eto Kojiro, Hiyoshi Yukiharu, Ishimoto Takatsugu, Iwagami Shiro, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Komohara Yoshihiro, Ajani Jaffer A., Baba Hideo	4. 巻 121
2. 論文標題 Can PD-L1 expression evaluated by biopsy sample accurately reflect its expression in the whole tumour in gastric cancer?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 278 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0515-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Harada K, Hwang H, Wang X, Abdelhakeem A, Iwatsuki M, Ajani JA. et al.	4. 巻
2. 論文標題 Frequency and Implications of Paratracheal Lymph Node Metastases in Resectable Esophageal or Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Harada Kazuto, Wu Carol C., Wang Xuemei, Mizrak Kaya Dilsa, Amlashi Fatemeh G., Iwatsuki Masaaki, Blum Murphy Mariela A., Maru Dipen M., Weston Brian, Lee Jeffrey H., Rogers Jane E., Thomas Irene, Shanbhag Namita, Bhutani Manoop S., Hofstetter Wayne L., Nguyen Quynh-Nhu, Ajani Jaffer A.	4. 巻
2. 論文標題 Total Lesion Glycolysis Assessment Identifies a Patient Fraction With a High Cure Rate Among Esophageal Adenocarcinoma Patients Treated With Definitive Chemoradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwatsuki Masaaki, Harada Kazuto, Iwagami Shiro, Eto Kojiro, Ishimoto Takatsugu, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Ajani Jaffer A., Baba Hideo	4. 巻 3
2. 論文標題 Neoadjuvant and adjuvant therapy for gastrointestinal stromal tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 43 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Koga Yuki, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Kiyozumi Yuki, Kurashige Junji, Masuda Toshiro, Eto Kojiro, Iwagami Shiro, Harada Kazuto, Ishimoto Takatsugu, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Miyanari Nobutomo, Takamori Hiroshi, Ajani Jaffer A., Baba Hideo	4. 巻 22(6)
2. 論文標題 The role of FBXW7, a cell-cycle regulator, as a predictive marker of recurrence of gastrointestinal stromal tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 1100-1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-019-00950-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kiyozumi Y, Iwatsuki M, Kurashige J, Ogata Y, Yamashita K, Koga Y, Toihata T, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Yanagihara K, Mimori K, Baba H.	4. 巻 143(5)
2. 論文標題 PLOD2 as a potential regulator of peritoneal dissemination in gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Cancer.	6. 最初と最後の頁 1202-1211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31410.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 山下晃平、岩槻政晃、古閑悠輝、清住雄希、江藤弘二郎、日吉幸晴、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 胃癌におけるPD-L1発現のCombined positive scoreによる評価の有用性
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下晃平、岩槻政晃、古閑悠輝、清住雄希、江藤弘二郎、岩上志朗、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 胃癌生検組織におけるPD-L1発現の検討
3. 学会等名 第40回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩槻政晃、原田和人、Jaffer A. Ajani、馬場秀夫
2. 発表標題 食道・食道胃接合部腺癌におけるoligometastasis対するConsolidative Local Therapyの有用性
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田和人、岩槻政晃、馬場秀夫、Jaffer A. Ajani
2. 発表標題 食道胃接合部腺癌に対する放射線化学療法の可能性；PET-CTから根治症例を予測する
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下晃平、岩槻政晃、江藤弘二郎、日吉幸晴、石本崇胤、長井洋平、岩上志朗、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 5-FUが胃癌細胞のPD-L1発現に与える影響の検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩槻政晃、山下晃平、森永剛司、原田和人、江藤弘二郎、長井洋平、岩上志朗、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 胃癌におけるPD-L1発現の空間的・時間的heterogeneityの可能性
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaaki Iwatsuki, Hiroshi Sawayama, Daisuke Kuroda, Yuki Koga, Kohei Yamashita, Kazuto Harada, Shiro Iwagami, Kojiro Eto, Takatsugu Ishimoto, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Jaffer A. Ajani, Hideo Baba
2. 発表標題 Glucose transporter 1 regulates cell glycolysis and proliferation in gastrointestinal stromal tumor and its clinicopathological significance
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Yamashita, Masaaki Iwatsuki, Shiro Iwagami, Kojiro Eto, Yuki Koga, Yuki Kiyozumi, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Hideo Baba
2. 発表標題 Chemotherapy induces alteration of programmed death ligand-1 expression in gastric cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Masaaki Iwatsuki, Kazuto Harada, Xuemei Wang, Manoop S. Bhutani, Brian R. Weston, Jeffrey H. Lee, Quynh-Nhu Nguyen, Wayne L. Hofstetter, Irene Thomas, Jane E. Rogers, Hideo Baba, Jaffer A. Ajani
2 . 発表標題 The prognostic factors associated with long-term survival in the patients with synchronous oligometastatic esophageal adenocarcinoma
3 . 学会等名 2019 ASCO Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Masaaki Iwatsuki, Kazuto Harada, Shiro Iwagami, Kojiro Eto, Brian Badgwell, Naruhiko Ikoma, Kohei Yamashita, Yuki Koga, Takatsugu Ishimoto, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Hideo Baba, Jaffer A. Ajani
2 . 発表標題 The Optimal Selection of Patients with Gastric Cancer for Staging Laparoscopy
3 . 学会等名 13th International Gastric Cancer Congress 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Masaaki Iwatsuki, Hiroshi Sawayama, Daisuke Kuroda, Yuki Koga, Kazuto Harada, Kohei Yamashita, Shiro Iwagami, Kojiro Eto, Takatsugu Ishimoto, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Jaffer A. Ajani and Hideo Baba
2 . 発表標題 Glucose Transporter 1 regulates cell glycolysis and proliferation in Gastrointestinal stromal tumor and its clinicopathological significance
3 . 学会等名 2019 AACR Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yuki Koga, Masaaki Iwatsuki, Hiroshi Sawayama, Tasuku Toihata, Tomoyuki Uchihara, Yoshifumi Baba, Yasuo Sakamoto, Naoya Yoshida and Hideo Baba
2 . 発表標題 The clinicopathological significance of FBXW7 expression in GIST
3 . 学会等名 12th International Gastric Cancer Congress (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 古閑悠輝, 岩槻政晃, 問端輔, 内原智幸, 八木泰佑, 澤山浩, 日吉幸晴, 馬場祥史, 宮本裕士, 吉田直矢, 馬場秀夫
2. 発表標題 GIST における FBXW7、GLUT1 発現と臨床病理学的因子の検討
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古閑悠輝, 岩槻政晃, 問端輔, 内原智幸, 八木泰佑, 澤山浩, 日吉幸晴, 馬場祥史, 宮本裕士, 吉田直矢, 馬場秀夫
2. 発表標題 GIST における FBXW7 発現と臨床病理学的因子の検討
3. 学会等名 第28回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	Jaffer A. Ajani (Jaffer A. Ajani)	MD Anderson cancer center・ Division of Cancer Medicine・Professor	