

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17013082

研究課題名（和文） GIST 発生における KIT・PDGFR シグナル異常の解析

研究課題名（英文） Analysis of abnormal signaling through KIT and PDGFRA in development of gastrointestinal stromal tumors

研究代表者

廣田 誠一 (HIROTA SEIICHI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：50218856

研究成果の概要（和文）：これまでに報告されているマウスモデルとは異なった変異を持つヒト多発性 GIST 家系のモデルとして、生殖系列に *c-kit* 遺伝子の exon 17 の機能獲得性突然変異を持つノックインマウスを作成した。組織学的な検索により、ヘテロ個体・ホモ個体では胃・大腸等にカハールの介在細胞の過形成がみられ、盲腸に 1 ヶの GIST 相当の腫瘍が発生することが明らかになり、他のタイプのノックインマウスと類似した形質を示した。このノックインマウスのヘテロ個体を用いて、*c-kit* 遺伝子産物 (KIT) の小分子阻害薬であるイマチニブの盲腸 GIST に対する腫瘍増殖抑制効果を検討し、1 週間、2 週間、4 週間投与のいずれの場合にも肉眼的には明らかな腫瘍の縮小は見られず、計測体積の有意な縮小も見られなかったが、KIT のシグナル伝達系は、KIT, Akt, Stat1 のいずれもリン酸化が低下し、Ki-67 の標識率も有意に低下しており、腫瘍縮小には至らないものの腫瘍増殖は抑制されているものと考えられた。類似の *c-kit* 遺伝子産物 (KIT) の小分子阻害薬であるニロチニブの盲腸 GIST に対する様々な効果についても検討し、データの整理中である。

研究成果の概要（英文）：We made a model mouse of human family with multiple gastrointestinal stromal tumors and germline exon 17-type *c-kit* gene mutation. The heterozygous and homozygous model mice had a cecal GIST-like tumor and hyperplasia of interstitial cells of Cajal at stomach and colon. The phenotypes were similar with those observed in previously reported model mice with exon 11 or exon 13 *c-kit* gene mutation. A molecular targeted drug, imatinib, which inhibits constitutively activated mutant KIT was given to the model mice, and we observed inhibition of both tumor growth and KIT activation. We also examined an effect of another molecular targeted drug, nilotinib, which inhibits constitutively activated mutant KIT on tumor growth and KIT activation, and now the manuscript is in preparation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	9,400,000	0	9,400,000
2006 年度	9,400,000	0	9,400,000
2007 年度	9,400,000	0	9,400,000
2008 年度	9,400,000	0	9,400,000
2009 年度	9,400,000	0	9,400,000
総計	47,000,000	0	47,000,000

研究分野：特定領域研究・発癌

科研費の分科・細目：

キーワード：GIST, 遺伝子異常, c-kit, PDGFR

1. 研究開始当初の背景

がん原遺伝子 c-kit は受容体型チロシンキナーゼ (KIT) をコードし、そのリガンドは stem cell factor (SCF) である。我々は、消化管筋層に発生する Gastrointestinal stromal tumor; GIST が KIT をはじめとして共通のマーカーを発現していることから、消化管のペースメーカー細胞であるカハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal; ICC) に由来する腫瘍と考えられることを提唱した。また、同時に GIST の多くに c-kit 遺伝子の傍細胞膜領域の突然変異がみられることを見つけ、この突然変異が、SCF の刺激がなくても KIT を強くリン酸化させる、いわゆる機能獲得性突然変異であり、GIST 発生の原因となっていることを明らかにした。その後 c-kit 遺伝子の機能獲得性突然変異は、傍細胞膜領域のみならず、細胞外領域やキナーゼドメイン I、キナーゼドメイン II にも存在することが示され、c-kit 遺伝子の機能獲得性突然変異は GIST 全体の約 90% にみられることが明らかになった。キナーゼドメイン II の機能獲得性突然変異はマスト細胞性腫瘍でもみられるが、GIST でみられる突然変異の部位はこれとは異なっていた。さらに我々は GIST 症例の収集過程で、ヒト消化管に ICC の過形成を基盤として GIST が多発する家系を見つけた。この家系の患者には腫瘍組織のみならず末梢血白血球にも c-kit 遺伝子の突然変異が存在し、germline の c-kit 遺伝子の機能獲得性突然変異が家族性多発性 GIST の原因であると考えられた。また、c-kit 遺伝子に機能獲得性突然変異を持たない約 10% の GIST の半数に、KIT と同じサブクラスの受容体型チロシンキナーゼである PDGFR α 遺伝子の機能獲得性突然変異がみられることも明らかにした。

2. 研究の目的

マスト細胞性腫瘍にみられるものを含め、色々なタイプの c-kit 遺伝子の機能獲得性突然変異が、どのようなシグナル系を介して腫瘍化に関与するのか、腫瘍化する腫瘍型の違いはどのような機序によるのかについて、遺伝子改変マウスや遺伝子変異導入培養細胞を用いて明らかにする。また、PDGFR α 遺伝子の機能獲得性突然変異についても、遺伝子変異の部位の違いがどのようなシグナル系を介して腫瘍化に働いているのかについて、遺伝子変異導入培養細胞を用いて調べる。

3. 研究の方法

GIST を多発する家系患者に見られる c-kit 遺伝子の exon 17 の機能獲得性突然変異を、マウスの生殖系列に導入してノックインマウスを作成した。この動物の詳細な肉眼的・組織学的に病理学的検索を行った。その後、このノックインマウスに c-kit 遺伝子産物 (KIT) の小分子阻害薬である imatinib および nilotinib を 1 週間、2 週間、4 週間投与し、腫瘍の大きさの変化、組織学的な変化、増殖能の変化、KIT リン酸化の変化、KIT シグナル系のリン酸化の変化などを検討した。

4. 研究成果

作成したノックインマウスの組織学的な検索により、ヘテロ個体・ホモ個体では胃・大腸等にカハールの介在細胞の過形成がみられ、盲腸に 1 々の GIST 相当の腫瘍が発生することが明らかになった。この表現型は c-kit 遺伝子の exon 11 や exon 13 のノックインマウスと類似したものであった。このノックインマウスのヘテロ個体に、イマチニブを 1 週間、2 週間、4 週間投与したところ肉眼的には明らかな腫瘍の縮小は見られず、腫瘍の体積を計測したがやはり有意な縮小は見られなかった。しかし、KIT のリン酸化は低下しており、その下流のシグナル伝達物質である、Akt, Stat1 もリン酸化が低下しており、Ki-67 の標識率も有意に低下していたことから、イマチニブは腫瘍縮小をもたらさないものの腫瘍増殖は抑制していたものと考えられた。類似の c-kit 遺伝子産物 (KIT) の小分子阻害薬であるニロチニブの盲腸 GIST に対する様々な効果についても検討し、データの整理中である。

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 21 件)

1. Sakamoto K, Sakurai S, Kanda T, Sakuma Y, Hishima T, Hironaka M, Bamba T, Keira Y, Takano Y, Niki T, Hasegawa T, Hirota S. Pleomorphic phenotypes of gastrointestinal stromal tumors at metastatic sites with or without imatinib treatment. **Cancer Sci**. In press, 査読有

2. Sato H, Kanda T, Hirota S, Bamba T, Sakamoto K, Kosugi S, Matsuki A, Mashima Y, Watanabe G, Hatakeyama K. Surgical resection of gastrointestinal stromal tumor of esophagus following preoperative imatinib treatment: a case report. **Esophagus** 7:65-69, 2010. 査読有
3. Enomoto T, Kanda T, Yajima K, Hirota S, Matsuki A, Kosugi S-I, Kato T, Ajioka Y, Hatakeyama K. Urgent surgery for intraperitoneal bleeding from GIST during imatinib therapy. **Clin J Gastroenterol.** 3:73-77, 2010. 査読有
4. Hamada S, Itami A, Watanabe G, Nakayama S, Tanaka E, Hojo M, Yoshizawa A, Hirota S, Sakai Y. Intracranial metastasis from an esophageal gastrointestinal stromal tumor. **Intern Med.** 49:781-785, 2010. 査読有
5. Sakurama K, Naomoto Y, Ohara T, Watanabe N, Takaoka M, Nagatsuka H, Tomono Y, Tanida T, Noma K, Tanabe S, Fujiwara Y, Motoki T, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Hirota S, Taguchi T, Tanaka N. Establishment of a lymph node metastasis model from subcutaneous tumors of gastrointestinal stromal tumor model cells. **Oncol Rep.** 21:407-411, 2009. 査読有
6. Sakurama K, Noma K, Takaoka M, Tomono Y, Watanabe N, Hatakeyama S, Ohmori O, Hirota S, Motoki T, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Haisa M, Matsuoka J, Tanaka N, Naomoto Y. Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for Imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. **Mol Cancer Ther.** 8:127-134, 2009. 査読有
7. Nishida T, Takahashi T, Nishitani A, Doi T, Shirao K, Komatsu Y, Nakajima K, Hirota S. Sunitinib-resistant gastrointestinal stromal tumors harbor cis-mutations in the activation loop of the KIT gene. Japanese Study Group on GIST. **Int J Clin Oncol.** 14:143-149, 2009. 査読有
8. Masuzawa N, Kishimoto M, Nishimura A, Ichiba N, Aoki E, Yanagibashi K, Hirota S, Yanagisawa A. Gastric leiomyosarcoma manifesting peculiar findings: radiological-pathological correlation. **Pathol Int.** 59:306-311, 2009. 査読有
9. Kamo N, Naomoto Y, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Hirota S, Fujiwara Y, Noma K, Sakurama K, Takaoka M, Nagatsuka H, Gunduz M, Matsuoka J, Tanaka N. Involvement of focal adhesion kinase in the progression and prognosis of gastrointestinal stromal tumors. **Human Pathol.** 40:1643-1649, 2009. 査読有
10. Ishikawa T, Nakai N, Liu N-N, Shiba K, Isozaki K, Matsuda I, Ito K, Fujimoto J, Hatakeyama K, Kanda T, Hirota S. *In vivo* effect of imatinib on progression of cecal GIST-like tumors in exon 17-type *c-kit* knock-in mice. **Lab Invest.** 89:1161-1168, 2009. 査読有
11. Nishida T, Shirao K, Sawaki A, Koseki M, Okamura T, Ohtsu A, Sugiyama T, Miyakawa K, Hirota S. Efficacy and Safety Profile of Imatinib Mesylate (STI571) in Japanese Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors: a Phase II Study (STI571B1202). **Int J Clin Oncol.** 13:244-251, 2008. 査読有
12. Takahashi T, Naka T, Fujimoto M, Serada S, Horino J, Terabe F, Hirota S, Miyoshi E, Hirai T, Nakajima K, Nishitani A, Souma Y, Sawa Y, Nishida T. Abberant expression of glycosylation in juvenile gastrointestinal stromal tumors. **Proteomics Clin Appl.** 2:1246-1254, 2008. 査読有
13. Nishida T, Kanda T, Nishitani A, Takahashi T, Nakajima K, Ishikawa T, Hirota S. Secondary mutations in the kinase domain of the KIT gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. **Cancer Sci.** 99:799-804, 2008. 査読有
14. Koma Y, Furuno T, Hagiya M, Hamaguchi K, Nakanishi M, Masuda M, Hirota S, Yokozaki H, Ito A. Cell adhesion molecule 1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions. **Gastroenterology.** 134:1544-1554, 2008. 査読有
15. Nakagomi N, Hirota S: Juxtamembrane-type *c-kit* gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation. **Lab Invest.** 87:365-371, 2007. 査読有
16. Sato T, Kanda T, Nishikura K, Hirota S, Hashimoto K, Nakagawa S, Ohashi M, Hatakeyama K. Two cases of

- gastrointestinal stromal tumor of the stomach with lymph node metastasis. **Hapato-Gastroenterol.** 54:1057-1060, 2007. 査読有
17. Kinoshita K, Hirota S, Isozaki K, Nishitani A, Tsutsui S, Watabe K, Tamura S, Ishikawa T, Kanda T, Nishida T, Hayashi N. Characterization of tyrosine kinase I domain c-kit gene mutation Asn655Lys newly found in primary jejunal gastrointestinal stromal tumor. **Am J Gastroenterol.** 102:1134-1136, 2007. 査読有
 18. Itsukuma T, Ishikawa H, Misawa M, Kai S, Fujimori Y, Nakagawa K, Hirota S, Sugihara A, Terada N, Hara H. Familial adenomatous polyposis complicated by chronic myelogenous leukemia: response to imatinib mesylate. **J Gastroenterol.** 42:402-405, 2007. 査読有
 19. Hasegawa J, Kanda T, Hirota S, Fukuda M, Nishitani A, Takahashi T, Kurosaki I, Tsutsui S, Hatakeyama K, Nishida T. Surgical interventions for focal progression of advanced gastrointestinal stromal tumors during imatinib therapy. **Int J Clin Oncol.** 12:212-217, 2007. 査読有
 20. Takahashi T, Nakajima K, Nishitani A, Souma Y, Hirota S, Sawa Y, Nishida T. An enhanced risk-group stratification system for more practical prognostication of clinically malignant gastrointestinal stromal tumors. **Int J Clin Oncol.** 12:369-374, 2007. 査読有
 21. Nakai N, Ishikawa T, Nishitani A, Liu N-N, Shincho M, Hao H, Isozaki K, Kanda T, Nishida T, Fujimoto J, Hirota S. A mouse model of human multiple GIST family with KIT-Asp820Tyr mutation generated by knock-in strategy. **J Pathol.** 214:302-311, 2007. 査読有

[学会発表] (計5件)

1. 廣田誠一: GIST治療における病理診断. (ワークショップ) 第47回日本癌治療学会学術集会, 横浜, 2009.10.23
2. 廣田誠一. GISTの分子標的治療とその基盤. シンポジウム15 (臨床開発研究に関わる分子病理学の展開) 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.2
3. Hirota S: A mouse model of human GIST, 2008 Korean GIST Multidisciplinary Symposium, Seoul, Korea, 2008.11.29
4. Nakai N, Hirota S, et al. A mouse model

- of human multiple GIST family with KIT-Asp820Tyr mutation generated by knock-in strategy. DDW, San Diego, USA, 2008. 5.19
5. 伊藤敬, 中井紀博, 新長真由美, 松田育雄, 塚本吉胤, 羽尾裕之, 廣田誠一: KIT-Asp820Tyr 変異を持つ家族性多発性 GIST 家系のモデルマウスの作成. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 2008. 5.15

[図書] (計1件)

1. Ishikawa T, Kanda T, Shincho M, Hirota S: Gastrointestinal stromal tumors. Research Advance in Pathology 1:11-18, Global Research Network, Kerala, India, 2006.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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