

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15329

研究課題名（和文）GISTにおける脱リン酸化酵素活性およびKIT転写活性に着目した新規治療法の探索

研究課題名（英文）Identification of new therapeutic target in GIST focusing on KIT transcriptional activity.

研究代表者

大久保 武人（Ohkubo, Taketo）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：90732884

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）：最近いわゆるwild-type GISTにおいてNTRK融合遺伝子が同定されたことから本研究ではGISTにおけるtrkの発現と、KCTD12にコードされるpfetinとKITの発現について調べた。Pan-trkの免疫染色では139例中25例に陽性となり、これらはすべてNTRK2にコードされるtrkBの発現であり、trkB陽性例は十二指腸由来のGIST全例および小腸由来のGISTの半数に認められた。小腸由来のGISTでtrkB陽性例は陰性例に比べ予後不良であった。CAGE解析ではGISTはpfetinをコードするKCTD12およびNTRK2のプロモーター活性によって3つのグループに分類された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

十二指腸由来のGISTの全例および小腸由来のGISTの半数以上にpan-trk(trkB)タンパク質の過剰発現を認め、統計学的有意差を生じるまでには至らなかったが、trkB陽性の小腸GISTは陰性GISTと比べて予後不良となる傾向が示された。また、CAGE解析の結果からは、KCTD12とNTRK2の遺伝子発現の観点から3つに分類される可能性が示唆された。本研究からは予後不良とされる十二指腸由来のGISTの悪性度獲得にpan-trk(trkB)の発現が関与している可能性が示唆され、過剰発現を来しているtrkBタンパク質を標的とした新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, the neurotrophic tyrosine receptor kinase (NTRK) fusion was reported in a small subset of wild-type gastrointestinal stromal tumors (GIST). We examined trk IHC and NTRK gene expressions in GIST. Pan-trk immunohistochemistry (IHC) was positive in 25 (all 16 duodenal and 9 out of 16 small intestinal GISTs) of 139 cases. All of these cases showed only trkB expression. Small intestinal GISTs with trkB expression showed adverse clinical outcomes compared with those without. Cap analysis of gene expression (CAGE) analysis showed that increased number of genes whose promoters were activated in trkB positive GISTs. The genetic analysis did not show amplification of NTRK2. Furthermore, imbalanced expression of NTRK2, which suggests the presence of NTRK2 fusion, was not observed in trkB positive GISTs. TrkB expression was found in and restricted to duodenal GISTs and more than half of small intestinal GISTs, and probably contributing to acquire aggressive phenotype in this subset.

研究分野：骨軟部腫瘍病理

キーワード：CAGE NTRK GIST pfetin KIT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Gastrointestinal stromal tumor (GIST)は消化管に発生する最も頻度の高い肉腫であり、消化管の中では胃が約 55%と最も多いが、小腸や直腸・食道にも発生する。腫瘍発生の原因としては、*KIT* 変異が 75-80%にみられ、次いで *PDGFRA* 変異が 10%程度にみられるとされている。これらの腫瘍には Imatinib といったチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) が予後の改善に有効であるが、TKI に抵抗性を示す症例や、driver 変異を欠くいわゆる wild-type GIST に対しては新規治療法の探索が必要とされている。また、研究代表者らは、GIST の新規予後因子として pferitin を同定し、また GIST の driver 変異である *KIT* 自体の発現量と pferitin の発現の有無が逆相関する可能性や pferitin が直接的あるいは間接的に *KIT* の遺伝子発現を調節している可能性を見出した。また最近になって、wild-type GIST の一部に *NTRK* 融合遺伝子が同定され、新規の TKI が有効となる可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

上記の背景から、CAGE 解析を用いた遺伝子発現制御機構を調べることにより、GIST における *KIT* と *KCTD12* (pferitin をコードする遺伝子) の発現の関係を調べる。また、GIST における *NTRK* 融合遺伝子の有無やその頻度を調べるとともに、*NTRK* 発現の臨床病理学的意義を探索する。

3. 研究の方法

GIST 凍結検体 10 例より RNA を抽出し、CAGE 解析による遺伝子発現解析を行い、pferitin 発現の有無および *trk* 発現の有無によるクラスター解析を行った。また、GIST のホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE) 139 例に対して pan-*trk* (*trkA*, *trkB*, *trkC* の C 末端の共通領域を認識する抗体) の免疫染色を行い、陽性例に *trkA*, *trkB*, *trkC* の免疫染色を行い、どの *trk* タンパク質が発現しているのかを調べた。さらに、pan-*trk* 免疫染色陽性例については、FFPE 検体より RNA を抽出し、NanoString を用いた遺伝子不均衡発現解析を行い、*NTRK* 融合遺伝子形成の有無を推察した。タンパク質過剰発現機構を調べるために FFPE 検体から DNA も抽出し、*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* の遺伝子増幅の有無も調べた。

4. 研究成果

Pan-*trk* の免疫染色の結果、GIST 139 例中 25 例に発現を認め、それはすべて十二指腸あるいは小腸発生の GIST であり、全例に *trkB* の発現のみを認めた (下図 1)。さらに、十二指腸由来の GIST は 16 例全例が *trkB* 陽性であり、小腸由来の GIST も半数以上が *trkB* 陽性であった。Pan-*trk* (*trkB*) 陽性の GIST は陰性の GIST に比べて予後不良であったが、有意差を生じるまでには至らなかった。また、pan-*trk* (*trkB*) 陽性の GIST では、*NTRK* 融合遺伝子の存在を示唆するような遺伝子発現不均衡発現はみられず、また *trkB* の過剰発現に結びつくような *NTRK2* の遺伝子増幅は観察されなかった。CAGE 解析では、GIST は pferitin をコードする *KCTD12* および *trkB* をコードする *NTRK2* のプロモーター活性によって 3 つのグループに分類されることがわかった (下図 1)。一方、当初予想された *KCTD12* と *KIT* の間の遺伝子発現・プロモーター活性には明らかな相関・逆相関はみられなかった。また、CAGE 解析の結果からは、pan-*trk* 陽性 GIST の方が陰性 GIST よりも活性化されているプロモーター数が多かった (図 2)。

以上より、予後不良とされる十二指腸由来の GIST の悪性度獲得に pan-*trk* (*trkB*) の発現が関与

している可能性が示唆された。

図 1 : 十二指腸発生の GIST16 例全例に *NTRK2* にコードされる *trkB* のタンパク質発現を認めた。また、GIST 凍結検体を用いた CAGE 解析 (遺伝子発現解析) の結果、GIST は *trkB* と *pfetin* の発現の状態によって遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが分かった。

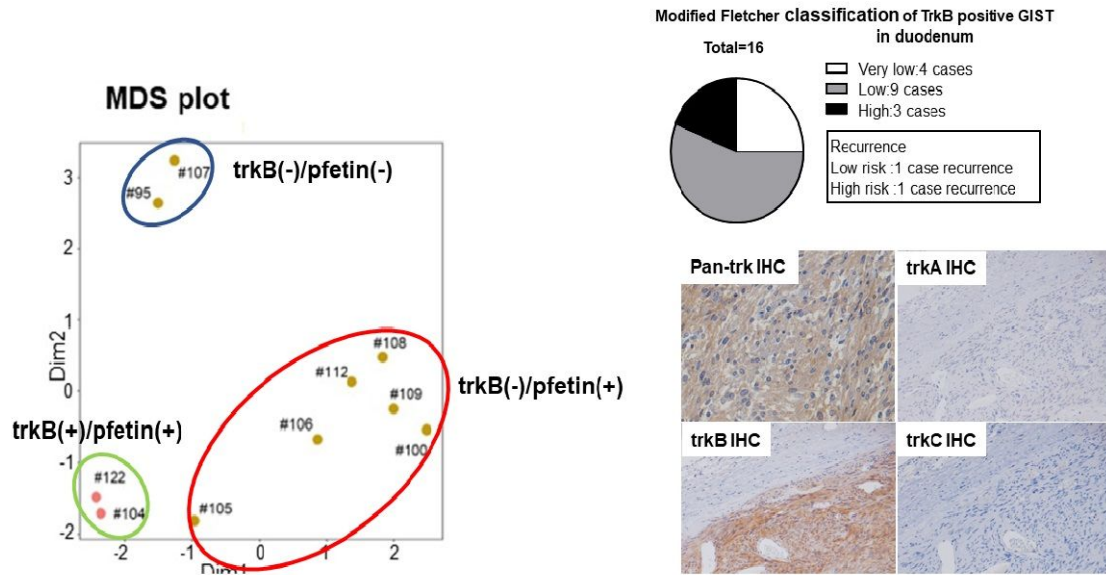
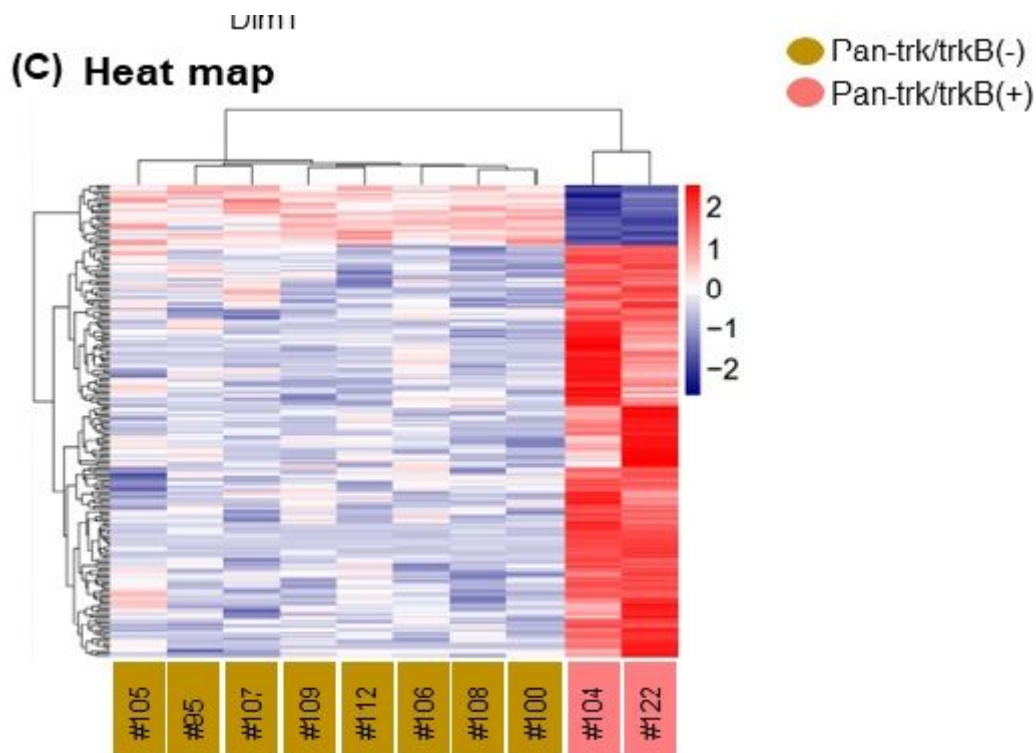


図 2 : Pan-trk 陽性腫瘍の方がプロモーターが活性化されている遺伝子数が多い。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suehara Yoshiyuki, Okubo Taketo, Kurihara Taisei, Hayashi Takuo, Kohsaka Shinji, Kazuno Saiko, Sano Kei, Hasegawa Nobuhiko, Miura Yoshiki, Akaike Keisuke, Kim Youngji, Takamochi Kazuya, Takahashi Fumiyuki, Ueno Takashi, Kaneko Kazuo, Saito Tsuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Protein Expression Profiles Corresponding to Histological Changes with Denosumab Treatment in Giant Cell Tumors of Bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PROTEOMICS Clinical Applications	6. 最初と最後の頁 1800147 ~ 1800147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prca.201800147	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 -

1. 著者名 Hasegawa Nobuhiko, Takeda Nakamura Ikuko, Ueno Toshihide, Kojima Shinya, Kawazu Masahito, Akaike Keisuke, Okubo Taketo, Takagi Tatsuya, Suehara Yoshiyuki, Hayashi Takuo, Saito Tsuyoshi, Kaneko Kazuo, Mano Hiroyuki, Kohsaka Shinji	4. 巻 9
2. 論文標題 Detection of circulating sarcoma tumor cells using a microfluidic chip-type cell sorter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56377-z	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 -

1. 著者名 Sano K, Suehara Y, Okubo T, Sasa K, Kurihara T, Akaike K, Kubota D, Torigoe T, Hasegawa N, Ishii M, Y Nakamura, Kim Y, Takagi T, Kaneko K, Hayashi T, Saito T	4. 巻 -
2. 論文標題 Preoperative denosumab treatment with curettage maybe a risk factor for recurrence of giant cell tumor of bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic 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) なし	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 -

1. 著者名 Suehara Y, Kohsaka S, Yamaguchi S, Hayashi T, Kurihara T, Akaike K, Ueno T, Kojima S, Ikegami M, Mizuno S, Okubo T, Kim Y, Kaneko K, Saito T, Kato S, Mano H	4. 巻 -
2. 論文標題 Assessment of Predictive Biomarkers of the Response to Pazopanib Based on an Integrative Analysis of High-grade Soft-tissue Sarcomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Orthop Relat Res.	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) なし	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 -

1. 著者名 Kurihara T, Suehara Y, Akaike K, Hayashi T, Okubo T, Kim Y, Takagi T, Kaneko K, Yao T, Saito T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Squamous cell carcinoma arising from chronic osteomyelitis massively expanding into the medullary cavity: A case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Pathology Case reports	6. 最初と最後の頁 100289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Saito T, Motoi T, Suehara Y, Takagi T, Okubo T, Kurihara T, Hayashi T, Kudo T, Maruyama Y, Kaneko K, Yao T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Fibrocartilagenous mesenchymoma of the tibia with predominant microcystic features: A case report and literature review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Pathology Case reports	6. 最初と最後の頁 100288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Ishii Midori, Suehara Yoshiyuki, Sano Kei, Kohsaka Shinji, Hayashi Takuo, Kazuno Saiko, Akaike Keisuke, Mukaiharu Kenta, Kim Youngji, Okubo Taketo, Takamochi Kazuya, Takahashi Fumiyuki, Kaneko Kazuo, Saito Tsuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Proteomic signatures corresponding to the SS18/SSX fusion gene in synovial sarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 37509-37519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26493	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 -

1. 著者名 Sano K, Suehara Y*, Tanabe Y, Okubo T, Kim Y, Ishii M, Kawasaki T, Terakado A, Akaike K, Mukaiharu K, Kubota D, Okubo N, Maruyama Y, Saito T, Kaneko K.	4. 巻 27
2. 論文標題 The first study on locomotive syndrome in lower amputees.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Adv Med Med Res.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Akaike Keisuke, Suehara Yoshiyuki, Kohsaka Shinji, Hayashi Takuo, Tanabe Yu, Kazuno Saiko, Mukaihara Kenta, Toda-Ishii Midori, Kurihara Taisei, Kim Youngji, Okubo Taketo, Hayashi Yasuhide, Takamochi Kazuya, Takahashi Fumiyouki, Kaneko Kazuo, Ladanyi Marc, Saito Tsuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 <i>PPP2R1A</i> regulated by PAX3/FOXO1 fusion contributes to the acquisition of aggressive behavior in PAX3/FOXO1-positive alveolar rhabdomyosarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 25206-25215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25392	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 -

1. 著者名 Suehara Yoshiyuki, Akaike Keisuke, Mukaihara Kenta, Kurisaki-Arakawa Aiko, Kubota Daisuke, Okubo Taketo, Mitomi Hiroyuki, Mitani Keiko, Takahashi Michiko, Toda-Ishii Midori, Kim Youngji, Tanabe Yu, Takagi Tatsuya, Hayashi Takuo, Mogushi Kaoru, Kaneko Kazuo, Yao Takashi, Saito Tsuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 <i>KCTD12</i> is negatively regulated by Kit in gastrointestinal stromal tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 27016-27026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25469	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 -

1. 著者名 Tanabe Y, Suehara Y, Kim Y, Nojiri S, Okubo T, Ishii M, Kawasaki T, Matsuoka K, Akaike K, Mukaihara K, Okubo N, Saito T, Kaneko K	4. 巻 25
2. 論文標題 An The development of the short-form "25-question Geriatric Locomotive Function Scale".	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Adv Med Med Res.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Tanabe Yu, Suehara Yoshiyuki, Kohsaka Shinji, Hayashi Takuo, Akaike Keisuke, Mukaihara Kenta, Kurihara Taisei, Kim Youngji, Okubo Taketo, Ishii Midori, Kazuno Saiko, Kaneko Kazuo, Saito Tsuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 IRE1 α -XBP1 inhibitors exerted anti-tumor activities in Ewing's sarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 14428-14443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24467	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Suehara Y, Sasa K, Okubo T, Hayashi T, Sano K, Kurihara T, Akaike K, Ishii M, Kim Y, Kaneko K, Saito T.
2. 発表標題 Comparative analysis of protein profiles of prognosis-associated proteins and KIT-related proteins in gastrointestinal stromal tumor
3. 学会等名 European Society For Medical Oncology; ASIA, Nov 22-24th 2019, Singapore, Singapore (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurihara T, Suehara Y, Sano K, Akaike K, Hayashi T, Kohsaka S, Hasegawa N, Takagi T, Okubo T, Yao T, Kaneko K Saito T
2. 発表標題 NanoString analyses of tyrosine kinase fusion genes in IMT / IPT
3. 学会等名 Connective Tissue Oncology Society, 24th Annual Meeting, November 13-16, 2019, Tokyo, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sasa K, Suehara Y, Okubo T, Hayashi T, Sano K, Kurihara T, Akaike K, Ishii M, Kim Y, Kaneko K, Saito T.
2. 発表標題 Protein expression analysis by regulating c-kit and KCTD12 expression in Gastrointestinal stromal tumor.
3. 学会等名 Connective Tissue Oncology Society, 24th Annual Meeting, November 13-16, 2019, Tokyo, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sano K, Suehara Y, Hayashi T, Kurihara T, Akaike K, Oguchi A, Takagi T, Kim Y, Okubo T, Murakawa Y, Kaneko K, Saito T.
2. 発表標題 High-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage in spindle cell sarcomas.
3. 学会等名 Connective Tissue Oncology Society, 24th Annual Meeting, November 13-16, 2019, Tokyo, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sasa K, Suehara Y, Akaike K, Hayashi T, Taka H, Kim Y, Okubo T Kaneko K, Saito T.
2 . 発表標題 Relationship with adriamycin-resistant osteosarcomas and the pentose phosphate pathway using metabolomic approaches
3 . 学会等名 20th International Symposium on Limb Salvage, 11-13, September 2019, Athens, Greek (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sasa K, Suehara Y, Akaike K, Hayashi T, Taka H, Youngji K, Okubo T, Kaneko K, Saito T
2 . 発表標題 Metabolic fluctuations in adriamycin-resistant osteosarcomas using metabolomic approaches
3 . 学会等名 the 65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society Feb 2 8211;5 2019, Austin, USA (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kurihara T, Suehara Y, Hayashi T, Akaike K, Okubo T, Kim Y, Kaneko K, Saito T.
2 . 発表標題 IRE1 -XBP1 Inhibitor exerts antitumor activity in osteosarcoma.
3 . 学会等名 the 65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society Feb 2 8211;5 2019, Austin, USA (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Suehara Y, Kohsaka S, Kurisaki A, Akaike K, Hayashi T, Mogushi K, Okubo T, Kim Y, Sato S, Kobayashi E, Kaneko K, Mano H, Saito T
2 . 発表標題 Comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions and a de novo alternative transcription initiation site in soft tissue sarcomas.
3 . 学会等名 European Society For Medical Oncology 8211; ASIA, Nov 23-25th 2018, Singapore, Singapore (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurihara T, Suehara Y, Hayashi T, Akaike K, Okubo T, Kim Y, Kaneko K, Saito T.
2. 発表標題 IRE1 -XBP1 Inhibitor exerts antitumor activity in osteosarcoma.
3. 学会等名 Connective Tissue Oncology Society, 23th Annual Meeting, November 14 - 17, 2018, Roma, Italy (国際学会)
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関