

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19590410

研究課題名 (和文) 消化管間質腫瘍の分子標的薬に対する耐性機序の解明

研究課題名 (英文) A study of secondary resistance mechanism for molecular target drugs in 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)：転移性または切除不能の Gastrointestinal stromal tumor (GIST) に対して用いられる分子標的薬イマチニブに対する二次耐性病変に、もともとの *c-kit* 遺伝子変異に加えてもう 1 か所の *c-kit* 遺伝子変異付加がみられることをまず報告した。多数の二次耐性病変の解析を行い、*c-kit* 遺伝子の付加変異は二次耐性病変の 70-80%にみられることが明らかとなり、部位は exon 13 と exon 17 に同程度にみられることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We first reported that an imatinib-secondary resistant lesion had secondary *c-kit* gene mutation in addition to primary *c-kit* gene mutation. Through analysis of many imatinib-secondary resistant lesions, 70 to 80 % of them were proved to have secondary *c-kit* gene mutations in addition to primary *c-kit* gene mutations. Most of the secondary *c-kit* gene mutations were present at exon 13 or exon 17.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

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。*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 にも存在し、GIST 全体の約 90%にみられることが明らかになった。GIST にみられるキナーゼドメイン II の突然変異はマスト細胞性腫瘍でみられるキナーゼドメイン II の機能獲得性突然変異の部位とは異なっていた。さらに我々はヒト消化管に ICC の過形成を基盤として GIST が多発する家系を見つけ、その原因が germline の c-kit 遺伝子の機能獲得性突然変異が原因であることを明らかにした。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。現在、GIST の原因である恒常的に活性化した KIT や PDGFR α をターゲットとして、転移や再発を来した GIST 症例に選択的チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブが使われ、著効を示すことが明らかとなっているが、多くの症例で数年のうちに耐性クローンが出現することがわかりつつある。

2. 研究の目的

本研究では、GIST におけるイマチニブ二次耐性の機序における c-kit 遺伝子の突然変異の付加の頻度やその生物学特性を明らかにする。

3. 研究の方法

多くのイマチニブ二次耐性 GIST の遺伝子検索を行うことにより、どのようなタイプの変異がどれくらいの頻度で出現するのかを明らかにした。イマチニブ二次耐性の GIST にみられる c-kit 遺伝子突然変異を、in vitro mutagenesis 法により対応するマウスの c-kit 遺伝子に導入し、これをマウス pro B 細胞株 Ba/F3 細胞に導入した。様々なイマチニブ濃度のもとで培養し、その耐性の程度を明らかにした。また、変異型 KIT のリン酸化の程度について、KIT の免疫沈降・ウェスタンブロットを行って調べた。

4. 研究成果

転移性または切除不能の GIST) に対して用いられる分子標的薬イマチニブに対する二次耐性病変に、もともとの c-kit 遺伝子変異に加えてもう 1 か所の c-kit 遺伝子変異付加がみられることをまず報告した。多数の二次耐性病変の解析を行い、c-kit 遺伝子の付加変異は二次耐性病変の 70-80%にみられることが明らかとなり、部位は exon 13 と exon 17 に同程度に局在することを明らかにした。また、耐性型変異である exon 13 の Val654Ala 変異を導入された Ba/F3 細胞を用いた in vitro の実験により、KIT のリン酸化抑制と細胞増殖抑制はイマチニブ 10 μ M でようやく認められることを示した。

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 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, Fujiwaraa 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, Hagiyaama 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3件)

1. Hirota S: A mouse model of human GIST, 2008 Korean GIST Multidisciplinary Symposium, Seoul, Korea, 2008.11.29
2. 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
3. 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

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