

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390094

研究課題名(和文) 多様なレセプターチロシンキナーゼ遺伝子変異の消化管間質腫瘍の病態への影響

研究課題名(英文) Influence of various types of receptor tyrosine kinase gene mutations in pathogenesis of GISTs

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：c-kit遺伝子のキナーゼドメインIIの遺伝子改変ホモマウスから樹立した培養マスト細胞とホモマウス由来の不死化培養マスト細胞ではシグナル系の活性化パターンが異なっており、c-kit遺伝子の新たな付加変異が不死化の原因であることを明らかにした。

ヒトGIST多発家系に新たにみられた生殖系列のc-kit遺伝子の傍細胞膜領域の変異が、imatinibやnilotinibにより効果的に抑制される機能獲得性変異であることを示した。また、散発性GISTにみられた新規の細胞外領域のc-kit遺伝子変異が、一般的な細胞外領域の変異に比べimatinibやnilotinibへの感受性が高いことを示した。

研究成果の概要(英文)：Signal transduction system activated in immortalized mast cell line which is derived from cultured mast cells of knock-in mice with germline homozygous mutation at kinase domain II was different from that in cultured mast cells of knock-in mice with germline homozygous mutation. The immortalized mast cell line had an additional mutation in the c-kit gene.

Activation of newly found juxtamembrane domain germline c-kit gene gain-of-function mutation in familial GISTs was effectively inhibited by imatinib and nilotinib. We also found that activation of newly found extracellular domain c-kit gene mutation in sporadic GISTs is effectively inhibited by imatinib and nilotinib, compared to that of conventional extracellular domain c-kit gene mutation.

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：c-kit遺伝子 キナーゼドメインII 遺伝子改変マウス シグナル系 imatinib nilotinib GIST多発家系 細胞外領域

1. 研究開始当初の背景

我々は、消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor; GIST) が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 cell of Cajal; ICC) に由来し、c-kit 遺伝子または PDGFR α 遺伝子の機能獲得性突然変異が GIST の発牛原因であることや、germline の c-kit 遺伝子の機能獲得性突然変異が ICC の過形成を基盤とした GIST の多発家系を引き起こすことを明らかにしてきた。c-kit・PDGFR α 遺伝子の機能獲得性変異には細胞外領域や傍細胞膜領域、キナーゼドメイン I・II の様々なタイプが存在し、各々の変異は生物学的特性が異なると考えられ、また GIST やマスト細胞性腫瘍などで見られる変異タイプには特異性がある。

2. 研究の目的

本研究では、各種の c-kit, PDGFR α 遺伝子の変異を導入した培養細胞や最近開発した c-kit 遺伝子改変マウスを用いて、各々の c-kit, PDGFR α 遺伝子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を明らかにする。また、ICC の過形成から GIST 発牛に至るメカニズム、GIST の分子標的薬 imatinib に対する耐性メカニズム、imatinib 以外の分子標的薬 (sunitinib・nilotinib など) の抗腫瘍効果についても検討する。

3. 研究の方法

我々が既に作成している c-kit 遺伝子のキナーゼドメイン II に germline の突然変異を持つノックインマウスから、培養マスト細胞を樹立し、長期間にわたって培養可能となったマスト細胞株と IL-3 依存性に増殖するホモマウス個体・ヘテロマウス個体・野生型マウス個体のマスト細胞との間で代表的な下流のシグナル伝達系の活性化状態を Western blot 法にて検討した。

また、長期間にわたって培養可能となったマスト細胞株の不死化の原因について、c-kit 遺伝子のシークエンスを含めて検討した。

さらに、c-kit 遺伝子の傍細胞膜領域に新規の生殖系列の変異を持つヒト GIST 多発家系について解析し、その変異が機能獲得性の変化であるのか、分子標的薬にどのように反応するかなどを検討した。

c-kit 遺伝子の細胞外領域に新規の変異を持つ散発性 GIST についても解析し、その変異が機能獲得性の変化であるのか、分子標的薬にどのように反応するかなどを検討した。

4. 研究成果

c-kit 遺伝子のキナーゼドメイン II の遺伝子改変マウスのホモ接合体から樹立した、不死化培養マスト細胞における細胞内シグナル伝達系の活性化パターンと、IL-3依存性に増殖するホモマウス個体・ヘテロマウス個体・野生型マウス個体のマスト細胞の細胞内シグナル伝達系の活性化パターンを比較したところ

、IL-3依存性に増殖するホモマウス個体・ヘテロマウス個体・野生型マウス個体のマスト細胞の間でKIT下流の細胞内シグナル伝達系の活性化パターンに大きな違いは見られなかったが、長期間にわたって培養可能となったマスト細胞株では活性化パターンが異なっていた。

c-kit 遺伝子のキナーゼドメイン II の遺伝子改変マウスのホモ接合体から樹立した不死化培養マスト細胞の不死化の原因について解析し、もともと見られるキナーゼドメイン II の突然変異に加えて、新たな変異の付加が明らかとなった。この変異がKIT下流の細胞内シグナル伝達系の活性化パターンを変化させ、細胞不死化をもたらしているものと考えられた。

ヒトGIST多発家系に新たにみられたc-kit 遺伝子の生殖系列での傍細胞膜領域の変異が機能獲得性変化であることを明らかにし、その変異の活性がimatinibやnilotinibにより効果的に抑制されることを示した。この研究は、この家系の患者に発生するGISTに分子標的薬が使用可能かどうかについての情報を与えることになり、実臨床にも貢献するものと考えられた。

c-kit 遺伝子の細胞外領域に新規の変異を持つ散発性 GIST について、これまでに報告されている細胞外領域の変異に比べて imatinib や nilotinib への感受性が高いことを示した。この成果も実臨床に貢献するものと考えられた。

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 47 件)

1. Yanagimoto Y, Takahashi T, Muguruma K, Toyokawa T, Kusanagi H, Omori T, Masuzawa T, Tanaka K, Hirota S, Nishida T. Re-appraisal of risk classifications for primary gastrointestinal stromal tumors (GIST) after complete resection: indications for adjuvant therapy. Gastric cancer. In press, 査読有, DOI: 10.1007/s10120-014-0386-7
2. Yamashita D, Usami Y, Toyosawa S, Hirota S, Imai Y. A case of diffuse infiltrating gastrointestinal stromal tumor of sigmoid

- colon with perforation. *Pathol Int.* 64:34–38, 2014. 査読有, DOI: 10.1111/pin.12124
3. Yamanoi K, Higuchi K, Kishimoto H, Nishida Y, Nakamura M, Sudoh M, Hirota S. Multiple gastrointestinal stromal tumors with novel germline *c-kit* gene mutation, K642T, at exon 13. *Human Pathol.* 45:884-888, 2014. 査読有, DOI: 10.1016/j.humpath.2013.11.009
 4. Wada N, Kurokawa Y, Nishida T, Takahashi T, Toyokawa T, Kusanagi H, Hirota S, Tsujinaka T, Mori M, Doki Y. Subgroups of patients with very large gastrointestinal stromal tumors with distinct prognoses: a multicenter study. *J Surg Oncol.* 109:67-70, 2014. 査読有, DOI: 10.1002/jso.23471
 5. Kanda T, Nishida T, Wada N, Kobayashi O, Yamamoto M, Sawaki A, Boku N, Koseki M, Doi T, Toh Y, Kakeji Y, Sugiyama T, Komatsu Y, Kikuchi S, Ogoshi K, Katai H, Miyachi K, Hirota S, Ohtsu A. Adjuvant therapy with imatinib mesylate after resection of primary high-risk gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients. *Int J Clin Oncol.* 18:38-45, 2013. 査読有, DOI: 10.1007/s10147-011-0339-7
 6. Okamura T, Kanda T, Hirota S, Nishimura A, Kawahara M, Nikkuni K. Imatinib therapy for a patient with metastasis of colonic gastrointestinal stromal tumor: Report of a case. *Clin J Gastroenterol.* 6:116-121, 2013. 査読有, DOI: 10.1007/s12328-013-0365-2
 7. Liu N-N, Ohkouchi M, Hashikura Y, Kajimoto N, Matsuda I, Isozaki K, Toh Y, Takahashi T, Nishida T, Hirota S. Extracellular domain *c-kit* mutation with duplication of Ser501Ala502 found in gastrointestinal stromal tumors is more imatinib- and nilotinib-sensitive than that with duplication of Ala502Tyr503. *Lab Invest.* 93:502-507, 2013. 査読有, DOI: 10.1038/labinvest.2013.43
 8. Miyazaki Y, Nakajima K, Kurokawa Y, Takahashi T, Takiguchi S, Miyata H, Yamasaki M, Hirota S, Nishida T, Mori M, Doki Y. Clinical significance of surgery for gastric submucosal tumors with size enlargement during watchful waiting period. *Eur J Cancer.* 49:2681-2688, 2013. 査読有, DOI: 10.1016/j.ejca.2013.04.006
 9. Nakai M, Hashikura Y, Ohkouchi M, Yamamura M, Akiyama T, Shiba K, Kajimoto N, Tsukamoto Y, Hao H, Isozaki K, Hirai T, Hirota S. Characterization of novel germline *c-kit* gene mutation, KIT-Tyr553Cys, observed in a family with multiple gastrointestinal stromal tumors. *Lab Invest.* 92:451-457, 2012. 査読有, DOI: 10.1038/labinvest.2011.165
 10. Hirano H, Yoshida T, Yoshimura H, Fukuoka M, Ohmura N, Nishizawa Y, Tachibana S, Hirota S, Zozumi M, Nishigami T. Extra-gastrointestinal stromal tumor of the pelvic cavity: case report. *Med*

- Mol Morphol. 45:173-177, 2012. 査読有,
DOI: 10.1007/s00795-011-0568-x
11. Murayama Y, Yamamoto M, Iwasaki R, Miyazaki T, Saji Y, Doi Y, Fukuda H, Hirota S, Hiratsuka M. Greater omentum gastrointestinal stromal tumor with *PDGFRA*-mutation and hemoperitoneum. World J Gastroint Oncol. 4:119-124, 2012. 査読有, DOI: 10.4251/wjgo.v4.i5.119
 12. Kanda T, Ishikawa T, Hirota S, Yajima K, Kosugi S, Ohashi M, Suzuki S, Mashima Y, Ajioka Y, Hatakeyama K. Prospective observational study of imatinib therapy in Japanese patients with advanced gastrointestinal stromal tumors: long-term follow-up and second malignancy. Jpn J Clin Oncol. 42:578-585, 2012. 査読有, DOI: 10.1093/jjco/hys056
 13. Hamada S, Masago K, Mio T, Hirota S, Mishima M. Good clinical response to imatinib mesylate in atypical thymic carcinoid with KIT overexpression. J Clin Oncol. 29:e9-10, 2011. 査読有, DOI: 10.1200/JCO.2010.30.2455
 14. Tatsuda K, Kanda T, Ishikawa T, Hirota S, Nishikura K, Yajima K, Kosugi S, Hatakeyama K. Secondary resistance to imatinib mesylate 70 months after initiation of therapy in a patient with a metastatic gastric gastrointestinal stromal tumor. Clin J Gastroenterol. 4:218-222, 2011. 査読有, DOI: 10.1007/s12328-011-0234-9
 15. Kuroda N, Tanida N, Hirota S, Daum O, Hes O, Michal M, Lee G-H. Familial gastrointestinal stromal tumor with germ line mutation of the juxtamembrane domain of the KIT gene observed in relatively young women. Ann Diag Pathol. 15:358-361, 2011. 査読有, DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2010.05.003
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. 廣田誠一 : GIST の起源と病態の解明 . シンポジウム 1 (腫瘍病理学の真髄) . 第 103 回病理学会総会 (広島) , 2014 年 4 月 24 日
 2. 劉寧寧 , 井出良浩 , 梶本仙子 , 木村尚美 , 松田育雄 , 廣田誠一 : KIT-Dup-Ser501Ala502 変異を持つ GIST の臨床病理学的特徴と変異分子の生物学的特徴の検討 . 第 103 回病理学会総会 (示説) (広島) , 2014 年 4 月 24 日
 3. 伊藤周明 , 小賀厚徳 , 飯田武 , 近藤智子 , 廣田誠一 , 伊藤浩史 : 初診時同時多発肝転移が見られ、約 9 年の経過の後死亡した胃原発 GIST の一部検例 . 第 103 回病理学会総会 (示説) (広島) , 2014 年 4 月 26 日
 4. 神田達夫 , 石川卓 , 廣田誠一 : 転移・再発性 GIST におけるイマチニブ治療と二次耐性 - 分子標的治療のモデル疾患として . 第 54 回日本臨床細胞学会 , シンポジウム , (東京) 2013 年 5 月 31-6 月 2 日
 5. 佐藤元 , 榎本利香 , 織田みほ , 岡村義弘 , 鳥居良貴 , 中井真由美 , 松田育雄 , 塚本吉胤 , 廣田誠一 : 類上皮型 gastrointestinal stromal tumor (GIST) の細胞像 . 第 54 回日本臨床細胞学会総会 , 一般口演 , (東京) 2013 年 5 月 31-6 月 2 日
 6. 松田育雄 , 廣田誠一 : GIST におけるグ

- ローバルな DNA メチル化の解析，第 102 回日本病理学会総会（札幌），2013 年 6 月 8 日
7. 松田育雄，廣田誠一：GIST における転写因子 ETV1 の発現について .第 101 回日本病理学会総会，(示説)(東京)，2012 年 4 月 26 日
 8. 山ノ井一裕，岸本浩史，西田保則，中村将人，須藤素弘，廣田誠一，樋口佳代子：Germline に新たな c-kit 遺伝子変異が認められた多発 GIST の一例 .第 101 回日本病理学会総会，(示説)(東京)，2012 年 4 月 26 日
 9. 廣田誠一：病理学と GIST 研究 .病理学入門シリーズ 1 (癌病理学) 第 101 回日本病理学会総会，(口演)(東京)，2012 年 4 月 26 日
 10. 廣田誠一：GIST の分子標的治療と病理診断 .系統的・剖検病理診断講習 (分子標的療法と病理診断) 第 101 回日本病理学会総会，(口演)(東京)，2012 年 4 月 28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

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

(2) 研究分担者

塚本 吉胤 (TSUKAMOTO, YOSHITANE)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70461085