

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590912

研究課題名(和文) 温度感受性遺伝子導入動物カハール細胞を用いた消化管間質腫瘍の悪性化機序

研究課題名(英文) Oncogenic mechanism of gastro-intestinal stromal tumore using temperature-sensitive transformed Cajal cells

研究代表者

杉山 敏郎 (Sugiyama, Toshiro)

富山大学・富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：00196768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：温度感受性増殖特性を示すSV40抗原遺伝子導入動物を用いて、GISTが発生する胃、盲腸カハール介在細胞を抗体ソーティング法により分離した。c-kit遺伝子エクソン11変異遺伝子導入すると培養条件を37℃に戻しても細胞は死滅せず継代して増殖できた。変異遺伝子導入GIST細胞をmicroアレイを用いて細胞内情報分子を検討した。胃由来c-kit遺伝子変異導入細胞では8遺伝子の増幅および7遺伝子の低下、回盲部由来c-kit遺伝子変異導入細胞では11遺伝子の増幅および8遺伝子の低下を認め、遺伝子発現プロファイルは全く異なっていた。これらは悪性度に関連する分子の可能性が高く、次研究に発展できる。

研究成果の概要(英文)：Gastric Cajal cells and cecal Cajal cells were isolated from the stomach as well as the cecum of SV40 transformed rat with cell sorting method. The human c-kit gene with mutated c-kit exon 11 were transfected into gastric Cajal cells and cecal Cajal cells. Both cells had been continuously survived and cultured in 37℃. The mRNAs of transformed gastric or cecal were investigated with micro array assay, which were identified the proliferative or the apoptotic mRNAs associated with proliferation and apoptosis. In transformed gastric Cajal cells (low malignancy), 8 genes were up-regulated and 7 genes were suppressed. In transformed cecal Cajal cells (high malignancy), 11 genes were up-regulated and 8 genes were suppressed. Those profiles were completely different between the transformed gastric Cajal cells and cecal Cajal cells. Those might be candidate genes associated with the different malignant potential between gastric GIST and cecal GIST.

研究分野：消化器内科学、腫瘍内科学

キーワード：GIST c-kit stomach intestine

## 1. 研究開始当初の背景

消化管粘膜下腫瘍は全消化管、特に胃に高頻度に見いだされ、かつては病理学的に良性の平滑筋腫がその大部分を占めるため、出血等の臨床症状が出現するまでは経過観察の対象とされていた。近年、3 cm以上の消化管粘膜下腫瘍の70-80%は消化管間質腫瘍(GIST)と診断されることが判明した。これは国際的なGIST診断基準の変更によるところが大きい。すなわち、近年、GIST発生の分子機構の解明が進展し、多くのGISTではc-kit遺伝子(受容体型チロシンキナーゼ遺伝子)の特定の部位に変異があり、そのために本来の生理的リガンドであるStem Cell Factor(SCF)の結合なしにKIT蛋白(受容体型チロシンキナーゼ)の二量体が形成され、チロシンリン酸化が起こり、制御からはずれた増殖シグナル亢進、抗アポトーシスが主たる腫瘍増殖機序であることが推定されるようになった。これらの知見に基づいて消化管粘膜下腫瘍の診断基準が提唱され、病理学的所見にかかわらず、KIT蛋白が陽性であれば基本的にはGISTと診断される。しかし、その悪性度は消化管の発生部位によって著しく異なる。また、c-kit遺伝子変異は限定しており、細胞膜直下のエクソン11変異が最も頻度が高く、次いで細胞外のエクソン9、そしてキナーゼ部分のエクソン17、エクソン18に集中している。他方、KIT蛋白のチロシンキナーゼ活性を抑制する分子標的治療薬が開発され、本腫瘍に著しい効果を示すため、c-kit遺伝子変異のみがGIST腫瘍化の機序と推定されてきた。しかし、ノックインマウスを用いた報告(J Pathol 214,302,2008)ではc-kit遺伝子変異を導入してもヒトで頻度の高い胃、小腸にはGISTの起源であるカハール介在細胞の過形成のみが発生し、その中でわずかに盲腸部にのみ腫瘍形成が見られた。同様にc-kit遺伝子の異なる部位に変異を導入したノックインマウスを用いた報告でも全く同様の結果であり、c-kit遺伝子変異導入のみで移植可能腫瘍性GISTが生じさせることができない。他方、これまでのノックインマウスを用いた検討では、その解析に多大な労力と時間を要し、また、c-kit遺伝子変異部位を変化させるごとに、新たなノックインマウスを作成しなければならず、解析に非常に時間がかかる。

このような手法を選択せざるを得ない最大の問題点は、

1) 継代可能なGIST細胞株が存在しないこと、

2) 消化管各臓器由来のカハール介在細胞の継代培養が困難なこと、に由来する。

## 2. 研究の目的

消化管間質腫瘍(GIST)発症の分子機構の解明からKIT蛋白を介した脱制御が主たる腫瘍化機序と推定されている。しかし変異c-kit遺伝子ノックインマウスの報告ではGIST起源カハール介在細胞の過形成は多発するが、腫瘍は盲腸部に限局、最も頻度の高い胃には発生しない。この知見はc-kit遺伝子変異のみが増殖機序ではないこと、発生臓器特異性があることを予測させる。

本研究では温度感受性SV40 large T抗原遺伝子導入動物を用いて消化管の各臓器由来の継代可能なカハール介在細胞株を作成、さらに種々の変異c-kit遺伝子の導入により消化管臓器ごとの腫瘍形成能、付加的遺伝子異常の同定、発生臓器の悪性度の細胞生物学的差異に関わる機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では既に確立しているSV40 largeT抗原遺伝子導入動物を用いて、GISTが発生する消化管各臓器(食道、胃、小腸、盲腸、結腸、直腸)からカハール介在細胞を分離培養し、SV40 largeT抗原遺伝子導入細胞のきわだった特徴である温度感受性(33での培養ではSV40 largeT抗原が活性化し、不死化できるが、37では死滅する)を利用して、33で培養可能な消化管各臓器由来カハール介在細胞株を作成する。次いで、我々の臨床検体の解析から知られているc-kit遺伝子エクソン11、エクソン9、エクソン17、エクソン18の遺伝子変異を、各々、あるいは複数箇所に複数の変異を導入した変異c-kit遺伝子を、不死化状態にある消化管各臓器カハール介在細胞株に導入後、37で培養し、SV40 largeT抗原を不活性化させても、なおかつ不死化を維持でき、継代培養が可能な細胞株を選択する。これらの検討により不死化の維持、継代培養に必須なc-kit遺伝子変異、またその変異とカハール介在細胞の由来となる臓器の関連が明らかにできる。

## 4. 研究成果

温度感受性増殖特性を示すSV40 largeT抗原遺伝子導入動物を用いて、GISTが発生する消化管各臓器(食道、胃、小腸、盲腸、結腸、直腸)の中からGISTの起源細胞であるカハール介在細胞を特徴的なKIT陽性、CD34陽性細胞のみを抗体ソーティング法により分離培養した。まず、SV40 largeT抗原遺伝子導入細胞の特徴である温度感受性(33で

の培養では SV40 largeT 抗原が活性化し、不死化できるが、37 °C では死滅する) 胃由来カハール介在細胞株 (臨床的に悪性度が低い) および回盲部由来カハール介在細胞株 (臨床的に悪性度が高い) が樹立された。そこで、これら樹立細胞株に site-directed mutagenesis により作成された c-kit 遺伝子エクソン 11 変異遺伝子および c-kit 遺伝子エクソン 11 変異遺伝子およびエクソン 17 変異遺伝子(kinase activation loop) を導入した。その結果、胃由来カハール介在細胞株および回盲部由来カハール介在細胞株では 37 °C では死滅するが、両細胞株に c-kit 遺伝子エクソン 11 変異遺伝子導入株では培養条件を 37 °C に戻しても細胞は死滅せず、継代して増殖する細胞株を樹立することができた。そこで、由来組織による悪性度の差を詳細に検討するため、c-kit 遺伝子エクソン 11 変異遺伝子を導入した GIST 細胞も mRNA を抽出し、細胞増殖、アポトーシス関連 DNA アレイを用いて、変異 KIT 蛋白に連動する細胞内情報伝達分子 mRNA の増減を両細胞株の変異導入前細胞株と比較検討した。その結果、胃由来 c-kit 遺伝子変異型導入細胞では 8 遺伝子の発現増幅および 7 遺伝子の発現低下、回盲部由来 c-kit 遺伝子変異型導入細胞では 11 遺伝子の発現増幅および 8 遺伝子の発現低下を認め、その遺伝子発現プロファイルは全く異なっていた。これらの中から回盲部由来 c-kit 遺伝子変異型導入細胞で特徴的に発現増幅している増殖に關与すると推定される 3 遺伝子を選択し、蛋白発現と機能機能解析を開始している。これらは当初の悪性度に関連する分子である可能性が高く、次の研究に発展できる。

#### 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 11 件)

- 1) 杉山敏郎、消化管間質腫瘍の分子標的治療、医学と薬学 71, 1775-1785, 2014
- 2) 杉山敏郎、消化管間質腫瘍(胃) 専門医のための消化器病学、東京、医学書院、147-149, 2013
- 3) 杉山敏郎、GIST、消化器病学 -基礎と臨床-、東京、西村書店、767-774, 2013
- 4) 杉山敏郎、胃粘膜下腫瘍(GIST 他) 消化器病診療(第2版) 医学書院、57-60, 2014
- 5) 安藤孝将、杉山敏郎、消化管カルチノイド(消化管 NET)、消化器疾患最新の治療 2015-2016、283-286、東京、南江堂、2015
- 6) 田澤賢一、杉山敏郎、GIST 肝転移の治療、臨床消化器内科 26, 443-449, 2011
- 7) 杉山敏郎、胃粘膜下腫瘍の考え方と対応、日本医事新報 4724, 50, 2014
- 8) Sugiyama T., Progress in New Diagnosis

and Therapeutic Strategy for Gastrointestinal Malignancy: Focus on Molecular Targeted Treatments, Digestion 91; 7-12, 2015

9) Kanda T., Sugiyama T., et al. 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

10) Nakajima T., Sugiyama T., et al. A gastrointestinal stromal tumor of the stomach demonstrating a stepwise progression from low- to high-grade malignancy. Case Rep Gastrointest Med. 606832, 2012

11) Saito S., Sugiyama T. et al. Long-term follow-up outcome of imatinib mesylate treatment for recurrent and unresectable gastrointestinal stromal tumors. Digestion 87:47-52, 2013

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) Saito S., Sugiyama T. et al. Long-term follow-up outcome of imatinib mesylate treatment for recurrent and unresectable gastrointestinal stromal tumors. 第 8 回日本消化管学会コアシンポジウム、2012 年 2 月、仙台市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 敏郎 (SUGIYAMA Toshiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授

研究者番号：00196768

### (2) 研究分担者

小泉 桂一 (KOIZUMI Keiichi)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：10334715

安藤 孝将 (ANDO Takamasa)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教

研究者番号：30600671