

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591937

研究課題名(和文) 消化管間質腫瘍に対する新規治療標的の同定

研究課題名(英文) Novel therapeutic targets of gastrointestinal stromal tumors

研究代表者

菊池 寛利 (Kikuchi, Hirotoishi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：70397389

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)：消化管間質腫瘍(GIST)に対してイマチニブ等の分子標的薬が有効であるが、薬物治療単独でのGIST治癒は困難である。本研究では、GISTにおける遺伝子発現変化を解析することにより、GISTに幹細胞様の集団が存在することおよびその特徴を同定した。また、胃GISTに比べ予後が不良とされる小腸GISTに特徴的な遺伝子発現変化を同定し、SLIT2タンパクの発現低下がGISTの予後不良と関係することを発見した。これらの研究結果から、今後GISTの新規マーカー同定や新規分子標的治療の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Gastrointestinal stromal tumors (GIST) can be treated with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as imatinib, however; it is difficult to cure them with TKIs alone. In the present study, we have identified characteristics of cancer stem cell-like populations in GIST using cDNA macroarray analyses. In addition, we sought to address mechanisms underlying the clinically malignant phenotype of intestinal GIST and found that expression levels of SLIT2 protein were lower in intestinal GIST compared with gastric GIST. These results suggest that there remain important mechanisms underlying GIST malignant transformation that can be novel molecular markers as well as therapeutic targets of GIST.

研究分野：消化器外科学

キーワード：消化管間質腫瘍 マイクロアレイ 癌幹細胞 遺伝子発現 SLIT2

1. 研究開始当初の背景

消化管間質腫瘍(Gastrointestinal stromal tumor: GIST)は、消化管のペースメーカーであるカハールの介在細胞由来の間葉系腫瘍であり、*c-kit* 遺伝子の機能獲得性変異がその発生原因である。分子標的治療薬イマチニブが GIST に有効であるが、二次耐性獲得による病巣再燃の問題がある。イマチニブ耐性 GIST に対してスニチニブが有効であるが、やはり耐性獲得の問題がある。

研究開始当初の GIST 臨床および基礎研究における背景、問題点を以下に記す。

1. イマチニブやスニチニブに対する耐性機構として、*c-kit*, PDGFRA 遺伝子のチロシンキナーゼ領域に生じる二次変異が原因とされる。同変異に影響されず有効に KIT や PDGFRα 受容体を阻害可能な薬剤が開発されれば、二次耐性は克服できるかもしれないが、一方で KIT や PDGFRα 非依存性の新規治療標的の可能性が示唆される。*c-kit*, PDGFRA 遺伝子変異以外の GIST 悪性化に關与する因子は、新規治療標的となる可能性がある。

2. 完全切除が可能であった高リスク GIST に対する術後補助療法としてのイマチニブ投与の有効性が大規模臨床試験(SSGXVIII)で証明された。さらに、3 年以上のイマチニブ内服による術後補助療法の効果を検討する臨床試験も進行中である。今後より多くの GIST 患者がイマチニブ内服を行うことになるが、長期に渡る術後補助療法を開始するにあたり、真に同治療が有効である患者の選択は重要な課題である。現在のリスク評価は腫瘍径と核分裂像のみに基づいており、高リスクでも術後長期に渡り再発を認めない症例が存在する。このため、より生物学的な悪性化機序に基づくバイオマーカーを用いたリスク評価の構築が必要とされている。

3. 長期イマチニブ投与にて病勢コントロールされている GIST 患者のイマチニブ投与を中止すると、再燃することが証明された(ASCO2010)。すなわち、イマチニブ投与中も長期に渡り、viable な GIST 細胞が dormant な状態で存在し続ける。この細胞集団の特性を解析することは、新規治療標的の発見およびイマチニブとの combination により GIST 根治を目指すことを可能とする。

2. 研究の目的

GIST の新規バイオマーカーおよび新規治療標的の同定を目的とする。

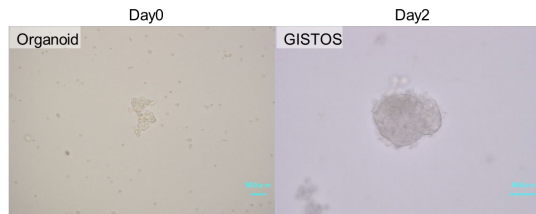
3. 研究の方法

固形癌における癌幹細胞と同様に GIST にも stem cell が存在するとの仮説に基づき、GIST 臨床検体から GIST originated spheroids (GISTOS) を作成し、マイクロアレイを用いて GIST における stem cell 特異的に発現している新規治療標的となり得る

分子を同定する。この新規分子が GIST のバイオマーカーとなり得るか臨床検体を用いて解析を行い、新規治療標的となり得るかを *in vivo* 治療実験にて検討する。さらにこの GISTOS モデルを用いて、*c-kit*, PDGFRA 遺伝子変異非依存性のイマチニブ耐性に關与する分子を同定し、イマチニブと同時に投与することにより GIST を薬物療法で根治可能であるか検討する。

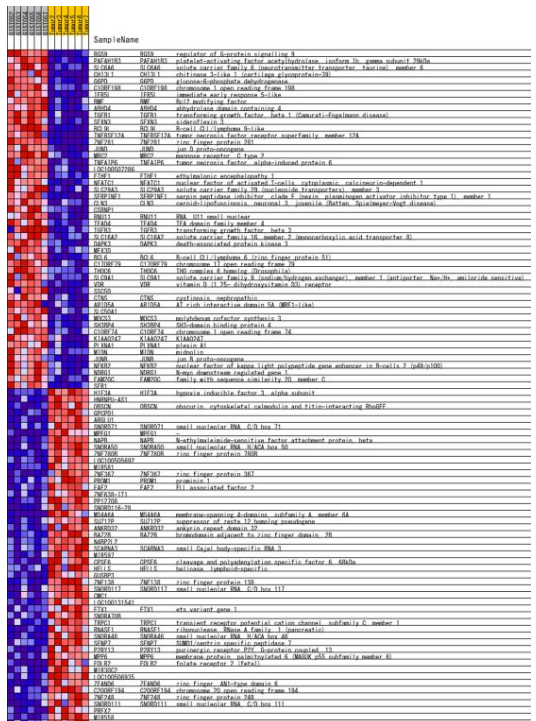
4. 研究成果

外科手術にて切除した胃 GIST 臨床検体 7 例から、cancer tissue originated spheroids (CTOS) 作成方法を用いて、GISTOS を作成した。具体的には、GIST 組織をミンスした後 Liberase DH にて酵素処理し、金属フィルターにて濾過し、organoids を作成した。これを StemPro(+ supplements)培養液中で培養することにより、GISTOS を得た。

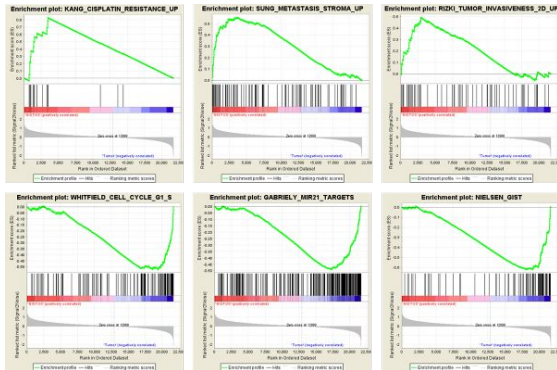


得られた GISTOS をウシ血清存在下で培養することにより、分化した GIST 細胞を得た。この細胞から DNA を抽出し、元の腫瘍と同じ *c-kit* 遺伝子変異を有することを確認した。GISTOS をヌードマウスの皮下へ移植し、GIST 皮下腫瘍の形成を試みたが、残念ながら固形腫瘍形成は得られなかった。

GISTOS(stem cell +++) と元の臨床 GIST(stem cell +/-)から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析したところ、クラスタリングで GISTOS と臨床 GIST の 2 群に分かれた。



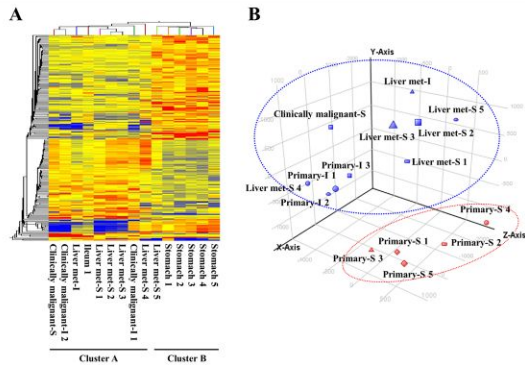
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) にて、GISTOS に特徴的に発現している遺伝子群として TUMOR INVASIVENESS UP や CISPLATIN RESISTANCE UP など、発現が低下している遺伝子群として、CELL CYCLE G1 S や MIR21 TARGET などが同定された。



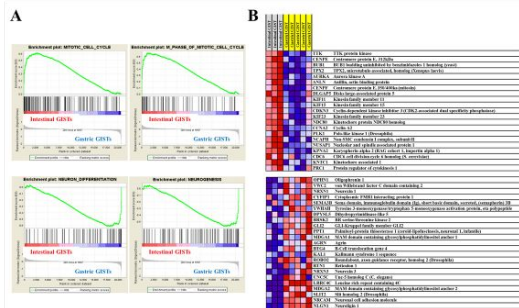
以上より、GIST において stem cell の性質を有した集団が存在することが示唆された。今後の解析により、GIST の新規マーカーや治療標的の同定が期待される。

また、胃 GIST 原発巣と小腸 GIST 原発巣および GIST 肝転移巣のマイクロアレイ解析を行い、以下の知見を得た。

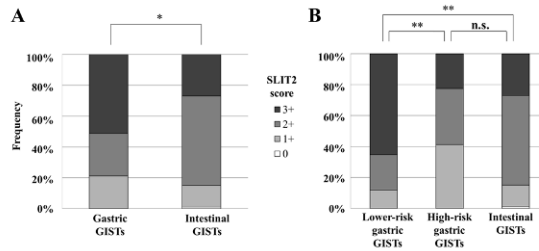
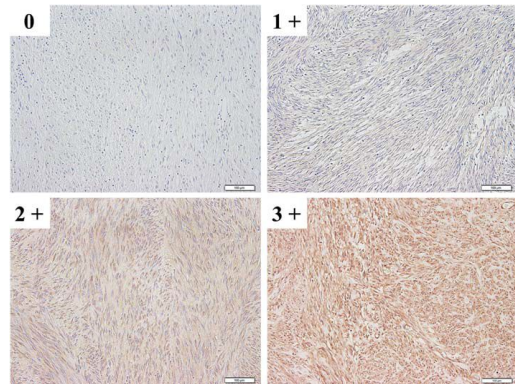
- (1) クラスタリング解析にて、小腸 GIST は生物学的高悪性の肝転移 GIST に類似した遺伝子発現プロファイルを示し、胃 GIST と区別された。



- (2) GSEA では、小腸 GIST で細胞周期関連遺伝子群の発現が高く、高い細胞増殖活性が示唆された。



- (3) 免疫組織学的検討で、胃 GIST に比べ小腸 GIST で SLIT2 タンパク発現低下を認め、低リスク胃 GIST に比べ、高リスク胃 GIST で SLIT2 タンパク発現低下を認めた。



GIST リスク分類において、同等の核分裂数を有していても胃より小腸 GIST でリスクが高いことが知られている。このことは細胞増殖活性以外の要因も小腸 GIST の高悪性度に寄与することを示している。本研究により、SLIT2 発現低下が小腸 GIST の生物学的高悪性度へ寄与している可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Hara R, Kikuchi H, Setoguchi T, Miyazaki S, Yamamoto M, Hiramatsu Y, Kamiya K, Ohta M, Baba S, Konno H. Microarray analysis reveals distinct gene set profiles for gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors. Anticancer Research 査読有、35(6):3289-98,2015. <http://ar.iiarjournals.org/content/35/6/3289.long>
2. Kikuchi H, Miyazaki S, Setoguchi T, Hiramatsu Y, Ohta M, Kamiya K, Sakaguchi T, Konno H. Rapid relapse after resection of a sunitinib-resistant gastrointestinal stromal tumor harboring a secondary mutation in exon 13 of the c-KIT gene. Anticancer Research 査読有、32(9):4105-9,2012. <http://ar.iiarjournals.org/content/32/9/4105.long>
3. 菊池寛利、太田学、今野弘之、進行・再発 GIST に対する集学的治療の現状、日本消化器病学会雑誌、査読無、109:24-32, 2012. https://www.jstage.jst.go.jp/article/niss-hoshi/109/12/109_2031/_article/

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 菊池寛利、再発・転移 GIST に対する外科的介入の位置付け．第 87 回日本胃癌学会総会、2015 年 3 月 5 日、リーガロイヤルホテル広島（広島県広島市）
2. 菊池寛利、当科における壁内発育型 GIST に対する腹腔鏡下胃部分切除術の工夫．第 75 回日本臨床外科学会総会、2014 年 11 月 22 日、ホテルハマツ（福島県郡山市）
3. 菊池寛利、肝転移 GIST に対する治療戦略．JDDW2014、2014 年 10 月 26 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）
4. 菊池寛利、Alteration of the micro RNA expression in metastatic liver gastrointestinal stromal tumor. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
5. 菊池寛利、進行 GIST に対する術前イマチニブ療法 of 検討．第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014 年 8 月 29 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
6. Kikuchi H, cDNA and miRNA microarray analysis comparing gastric and metastatic liver gastrointestinal stromal tumors. AACR 105th Annual Meeting、2014 年 4 月 8 日、San Diego CA, USA.
7. 菊池寛利、消化管間質腫瘍における肝転移機構の探索．第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 4 日、京都国際会議場（京都府京都市）
8. 菊池寛利、イマチニブ耐性 GIST に対する治療戦略．第 86 回日本胃癌学会総会、2014 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
9. 菊池寛利、GIST 同時性肝転移症例に対する治療戦略．第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月 25 日、京都国際会議場（京都府京都市）
10. 菊池寛利、スニチニブ投与中に外科的介入を行った再発 GIST 症例の検討．JDDW2013、2013 年 10 月 12 日、品川プリンスホテル（東京都品川区）
11. 菊池寛利、Differential gene expressions in gastric, intestinal and metastatic liver gastrointestinal stromal tumors. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
12. 菊池寛利、遺伝子診断に基づいた進行再発 GIST に対する集学的治療．第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 12 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）
13. Kikuchi H, Differential gene expressions in primary gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors and metastatic liver tumors. AACR 104rd Annual Meeting、2013 年 4 月 7 日、Washington DC, USA.
14. 菊池寛利、進行胃 GIST に対する集学的治療．第 85 回日本胃癌学会総会、2013 年 3 月 1 日、リーガロイヤルホテル（大阪府大阪市）
15. 菊池寛利、消化管間質腫瘍における悪性化関連バイオマーカーの探索．第 23 回日本消化器癌発生学会総会、2012 年 11 月 16 日、ルネッサンスリゾートナルト（徳島県鳴門市）
16. 菊池寛利、分子標的薬時代における転移・再発 GIST に対する治療戦略．JDDW2012、2012 年 10 月、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）
17. 菊池寛利、分子標的治療後に外科的切除を行った再発 GIST の検討．第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 7 月 20 日、富山国際会議場（富山県富山市）
18. 菊池寛利、消化管悪性腫瘍の肝転移機構および新規分子標的の探索．第 21 回日本がん転移学会学術集会、2012 年 7 月 12 日、オリエントホテル広島（広島県広島市）
19. Kikuchi H, Surgical intervention for metastatic GISTs in the era of TKIs. 10th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society、2012 年 6 月 14 日、Seoul, Korea
20. 菊池寛利、GIST 治療個別化へ向けたバイオマーカーの探索．第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 13 日、幕張メッセ（千葉県幕張市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 寛利 (KIKUCHI, Hirotooshi)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：70397389

(2)研究分担者

今野 弘之 (KONNO, Hiroyuki)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00138033

(3)連携研究者

北川 雅敏 (KITAGAWA, Masatoshi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50294971