

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460485

研究課題名(和文) 病理診断学とGISTモデルマウスの融合によるGISTのエピゲノム治療の開発

研究課題名(英文) Histological analysis of global DNA methylation in GISTs to overcome their imatinib resistance: integration of diagnostic pathology with GIST model mice towards the development of epigenetic therapy

研究代表者

松田 育雄 (MATSUDA, Ikuo)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50335452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Gastrointestinal stromal tumor (GIST)にはイマチニブが著効する。イマチニブ耐性GISTは低リスクのイマチニブ非投与GISTと比較して5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmc)が減少し、これは高リスクのイマチニブ非投与GISTでも同様であった。一方、イマチニブ耐性GISTはイマチニブ非投与GISTと異なり、腫瘍内外の血管内皮にPD-L1が発現誘導された。エピゲノム変化(5hmc減少)よりも、血管内皮でのPD-L1発現がGISTのイマチニブ耐性を特徴づけることが明らかとなった。PD-L1免疫療法によるGISTのimatinib耐性克服の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A tyrosine kinase inhibitor imatinib is known to be effective for gastrointestinal stromal tumors (GISTs), a hallmark of which is a constitutive activation of KIT tyrosine kinase by c-kit gene mutation. In order to overcome imatinib resistance in GISTs, imatinib-resistant GISTs were compared with imatinib-naive GISTs as follows in the present investigation. 5-hydroxymethylcytosine was immunohistochemically shown to be globally decreased in imatinib-resistant GISTs as well as in high-risk imatinib-naive GISTs, compared with low-risk imatinib-naive GISTs. On the other hand, in contrast to imatinib-naive GISTs, endothelial induction of PD-L1 was observed in both in and outside of imatinib-resistant GISTs. Imatinib-resistance of GISTs seems to be rather associated with endothelial expression of PD-L1 than global epigenetic change such as decrease in 5hmc. This may be a rationale for PD-L1 therapy in order to overcome imatinib resistance of GISTs.

研究分野：病理診断学、分子生物学・生化学、臨床腫瘍学

キーワード：GIST イマチニブ 耐性 エピゲノム 5-メチルシトシン 5-ヒドロキシメチルシトシン PD-L1 血管内皮

1. 研究開始当初の背景

(1) Gastrointestinal stromal tumor (GIST) は消化管蠕動運動に関連する Cajal の介在細胞由来と考えられる腫瘍である。その大部分に受容体型チロシンキナーゼ KIT をコードする *c-kit* 遺伝子の恒常活性化型変異が見られる(文献①)。ヒトの *c-kit* 遺伝子変異をノックインしたマウスには GIST が形成されることを、我々を含むグループが示した(文献②)。またこのノックインマウスに生じた GIST はチロシンキナーゼ阻害薬である imatinib 投与により腫瘍径が縮小した。以上から *c-kit* 遺伝子変異は GIST の driver 変異と考えられる。このため、切除不能・転移 GIST には imatinib が著効する。しかし、一部の GIST 症例は imatinib 投与に対し、抵抗性・耐性を示す。このような「imatinib 耐性 GIST」の多くには *c-kit* 遺伝子に 2 次変異が生じていることが知られている。Imatinib 耐性 GIST を克服するための現在の戦略は second line (sunitinib) あるいは third line (regorafenib) のキナーゼ阻害薬を投与することである。しかし、チロシンキナーゼ阻害薬投与の先駆けである慢性骨髄性白血病に対する imatinib 投与の例から考えて、imatinib 耐性 GIST に対する現在の戦略も早晚耐性を生じると予想される。

(2) Imatinib 耐性 GIST を克服できる可能性のある新しい治療 modality としてエピゲノムを標的とした治療を考えた。エピゲノムとは遺伝子配列変化を伴わない遺伝子発現制御の総称であり、ゲノム DNA のメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化などが含まれる。ゲノム DNA のメチル化としてはシトシンのメチル化である 5-methylcytosine (5mc) がグローバルに認められる。特に遺伝子プロモーター領域の CpG island のメチル化は遺伝子発現を抑制する。5mc は TET 蛋白 (ten-eleven translocation) により 5-hydroxymethylcytosine (5hmc) に変換され

た後に脱メチル化される。つまりシトシンのメチル化は可逆的である。プロモーター領域のメチル化は癌抑制遺伝子の発現抑制などを介して、腫瘍化に寄与する。このため DNA メチル化阻害薬は骨髄異形成症候群の治療薬として奏功する。

(3) 稀少例である、*c-kit* 遺伝子に変異のない若年型 GIST の一部は、TCA 回路の酵素である succinate dehydrogenase B (SDHB) の発現が消失する。この結果、蓄積した succinate は α -ketoglutarate 依存性酵素である TET を阻害する。TET は 5mc を 5hmc とする酵素で、シトシンの脱メチル化へ導く。従って SDHB 発現消失型 GIST では、グローバルに 5mc の残存及び 5hmc の減少・消失が予想される。当研究室の SDHB 消失型 GIST 症例で検討すると、5mc 及び 5hmc の免疫染色により、5mc の残存及び 5hmc の減少・消失(5hmc(-))が確認された。グローバルな DNA メチル化の変化が *c-kit* 遺伝子変異を有する GIST の imatinib 耐性に寄与する可能性はないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) Imatinib 未投与の(imatinib-naïve)GIST と比較して、imatinib 耐性 GIST ではグローバルな DNA メチル化の変化が関与するか、免疫組織学的に検討する。

(2) GIST ノックインマウスに DNA メチル化阻害薬を投与し腫瘍が縮小するか調べる。

(3) (1)(2)で予想通りの結果が得られない場合、得られた imatinib 耐性 GIST のエピゲノム変化の特徴から類推して、耐性 GIST の新たな治療標的を探索する。

3. 研究の方法

(1) Imatinib-naïve 及び imatinib 耐性 GIST におけるグローバルな DNA メチル化の免疫組織学的評価

Imatinib-naïve GIST 症例は主に兵庫医科大学に蓄積された症例から選んだ。Imatinib 耐性 GIST は主として他施設から *c-kit* 遺伝

子検索のため兵庫医科大学に寄与された症例を用いた。グローバルなメチル化は、上記 GIST 症例のホルマリン固定・パラフィン包埋病理組織検体 (FFPE 検体) を用いて 5mc 及び 5hmc に対する特異的抗体による免疫染色を施行し、5mc 及び 5hmc の陽性細胞率により評価した。抗 5mc 抗体は Merck Millipore より、また抗 5hmc 抗体は Active Motif より入手した。免疫染色は自動免疫染色装置 (Leica) により施行した。5mc 及び 5hmc の陽性細胞率は、50%以下を score 1、50%以上を score 2 とし、scoring した (下記「4. 研究成果 (1)」参照)。陽性細胞率の比較の統計学的検定はカイ 2 乗検定にて p 値を評価した ($p < 0.05$ を有意)。GIST の遺伝子検索に関しては、兵庫医科大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会に承認を受けている。

(2) GIST ノックインモデルマウスへの DNA メチル化阻害薬の経口投与

DNA メチル化阻害薬として、経口投与可能な zebularine (Selleck 社より入手) を利用した。経口投与方法は、Ishikawa et al. と同様に行った。個体あたり約 15mg の zebularine (約 40mg/ml) を 5 日間、当研究室で樹立された GIST ノックインモデルマウスの成獣オス (ヘテロマウス) に経口投与 (oral gavage) 後 sacrifice し、盲腸にできた GIST から FFPE 標本を作製した。

(3) PD-L1 免疫染色

抗 PD-L1 抗体 (SP142, Spring Bioscience より入手) を用いて、自動免疫染色装置 (Leica) を用いて施行した。

4. 研究成果

(1) 5mc, 5hmc 免疫染色による imatinib-naïve GIST と imatinib 耐性 GIST のグローバルなメチル化状態の比較

Imatinib-naïve GIST は、腫瘍径・核分裂数などを考慮した modified Fletcher 分類により low risk と high risk 症例を区別した。それらと imatinib 耐性 GIST を含め、3 者間

で 5mc, 5hmc 免疫染色のパターンを比較することで、「low risk と high risk の間でグローバルなメチル化の変化があるか」、「imatinib-naïve GIST から imatinib 耐性が生じるとグローバルなメチル化に変化が起きるか」を評価した。

5mc, 5hmc のパターンの scoring は、以下の通りとした。背景の炎症細胞 (リンパ球) が 5mc (+), 5hmc (+) を示し、内在性コントロールとなる。GIST 腫瘍細胞の陽性率が 50%未満のものを score 1 (図 1), 50%以上のものを score 2 (図 2) とした。代表例を以下に示す。

図1 5mc score 1 (5hmcも類似像)

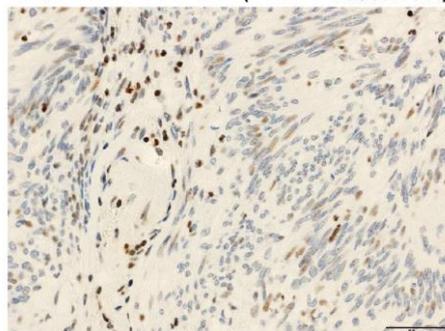
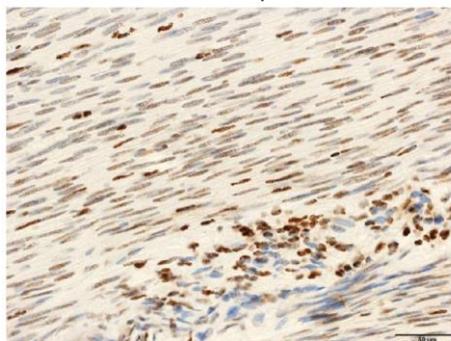


図2 5mc score 2 (5hmcも類似像)



Score 1 (図 1) ではリンパ球だけが「浮き出す」。一方、score 2 では GIST 細胞も陽性となり、リンパ球の陽性像が目立たない (Score 1 と score 2 の鑑別に悩む症例は全体の約 4%)。

表 1, 2 に全体の結果の要約を示した。

表1 5mc免疫染色結果のまとめ

		5mc		
		score 1	score 2	
naïve	low risk	6	14	20
	high risk	5	8	13
耐性		6	9	15

表2 5hmc免疫染色結果のまとめ

		5hmc		
		score 1	score 2	
naïve	low risk	3	17	20
	high risk	10	3	13
耐性		8	7	15

5mc, 5hmc の各々に対し、「low risk と high risk」、「low risk と耐性」、「high risk と耐性」の3通りの比較を行い、カイ2乗検定にて統計学的有意差があるか、検定した。

5mc に関しては、low risk と high risk、low risk と耐性 GIST、及び high risk と耐性 GIST の間で有意差がみられず、score 2 が過半を占めた(図3~図5)。

図3 5mc: low risk vs. high risk (p=0.0612)

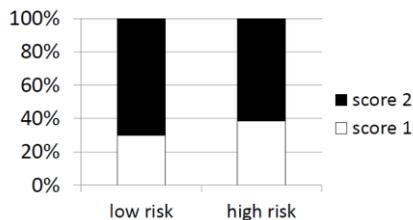


図4 5mc: low risk vs. 耐性(p=0.536)

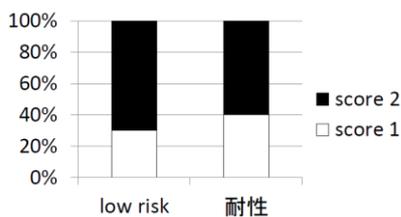
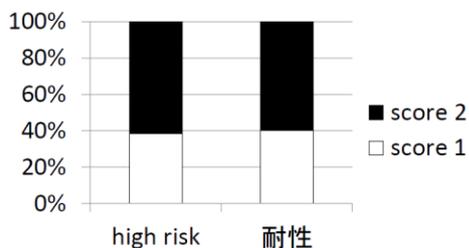


図5 5mc: high risk vs. 耐性 (p=0.932)



それに対し、5hmc に関しては、low risk と high risk、low risk と耐性 GIST の間に有意差が見られ、low risk では score 2 が過半を占めたが、low risk 以外では score 1 が優勢となった(図6,7)。High risk と耐性 GIST

の間では有意差がみられなかった(図8)。

図6 5hmc: low risk vs. high risk (p=0.000373)

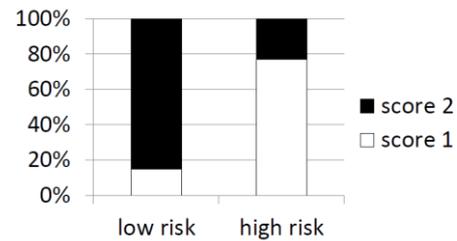


図7 5hmc: low risk vs. 耐性 (p=0.0154)

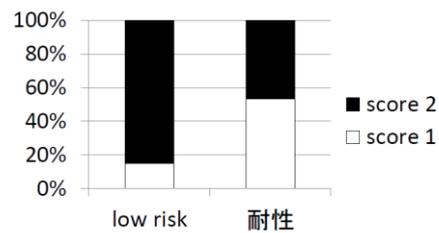
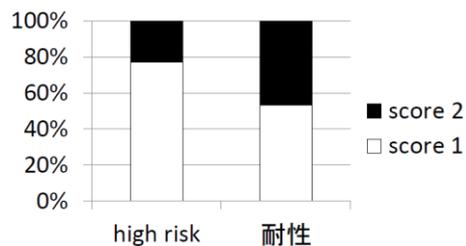


図8 5hmc: high risk vs. 耐性 (p=0.195)



以上から、第1に low risk と high risk では前者が 5hmc(+)、後者が 5hmc(-)が過半であることからグローバルなメチル化の違いが示唆された。悪性腫瘍では一般に 5hmc(-)とされる(文献③)。少なくとも imatinib-naïve の low risk GIST では 5hmc(+)となるので、既報の結論に例外があることを示したことになる。一方、high risk の imatinib-naïve GIST 及び耐性 GIST でみられた「5hmc(-)」という形質は、背景で述べた「c-kit 野生型 GIST (SDHB 発現消失型)」でも見られていた。すなわち、グローバルな DNA メチル化の変化(5hmc(-))は、c-kit 遺伝子変異とは独立に作用して、high risk GIST と関連すると考えられる。

第2に、imatinib-naïve と耐性 GIST の 5mc に有意差がなく、また imatinib を使用される可能性が高い high risk GIST と耐性 GIST

との間に 5hmc の有意差がなかった。これから、グローバルな DNA メチル化は、low risk と high risk の違いには関与するが、GIST の imatinib 耐性化への関与は明確でない。

以上の研究成果(1)の内容は、一部は学会発表し、現在論文投稿準備中である。

(2)GIST ノックインマウスに対する DNA メチル化阻害薬 zebularine の投与

DNA メチル化阻害薬 zebularine を当研究室で樹立した GIST ノックインモデルマウスに投与したが、5mc の有意な減少は検出できなかった (data not shown)。投与方法の最適化など条件検討をすべきか悩んだ。しかし、(1)の結果、「グローバルな DNA メチル化は、GIST の imatinib 耐性化への関与は明確でない」ため、以下の(3)のように方針転換した。その結果、予想外の興味深い結果が得られた。

(3)グローバルなメチル化の変化に伴う遺伝子発現の変化：imatinib 耐性 GIST では腫瘍内外の血管内皮細胞に PD-L1 が発現する

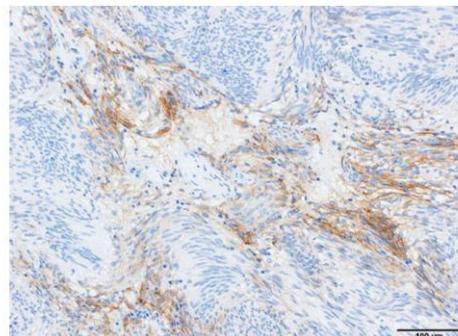
上記のように少なくとも 5hmc のパターンでは、low risk の imatinib-naïve GIST と耐性 GIST の間に有意差がみられた。また約 40% の耐性 GIST 症例で、GIST 特異的転写因子である ETV1 の発現が低下していた(松田育雄、廣田誠一。GIST における転写因子 ETV1 の発現について。2012 年日本病理学会で発表)。以上から、耐性 GIST における「脱分化」的な遺伝子発現の変化が予想された。

DNA メチル化の変化に伴い発現が変化する遺伝子で、かつ抗腫瘍治療標的になりうる分子として、免疫チェックポイント分子 PD-L1 に思い当たった(文献④)。また、imatinib 耐性 GIST は imatinib-naïve GIST と比較して *c-kit* 遺伝子の 2 次変異を含む耐性変異を獲得し mutation load は増加していると予想され、それによる PD-L1 の発現増加も予想された。そこで 27 症例の imatinib-naïve GIST (low risk 15 症例と high risk 12 症例)と 12 症例の imatinib 耐性 GIST を用いて、両者

の PD-L1 免疫染色結果を比較した。

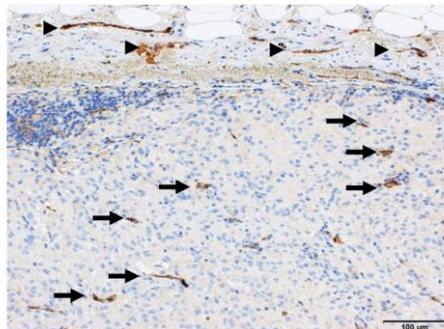
Imatinib-naïve GIST は、主に腫瘍内血管周囲の腫瘍細胞に PD-L1 弱陽性を示した (17/27, 63%) (図 9)。

図 9 Imatinib-naïve GISTにおける腫瘍細胞でのPD-L1発現



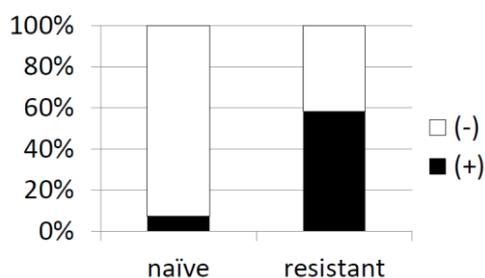
それに対し予想外に、imatinib 耐性 GIST では、腫瘍内血管の血管内皮細胞に PD-L1 陽性所見を認めた (7/12, 58%) (図 10, 矢印)。

図10 Imatinib耐性GISTにおける血管内皮細胞でのPD-L1発現



Imatinib-naïve GIST 症例では、2/27 (7.4%) で腫瘍内血管内皮細胞に陽性を示すのみであった。さらに、腫瘍内血管内皮細胞が PD-L1 陽性を示す耐性 GIST 7 症例中 6 症例 (86%) で腫瘍周囲の血管の内皮細胞も PD-L1 陽性を示した (図 10, 矢頭)。以上の結果を図にまとめた (図 11)。

図11 Endothelial expression of PD-L1



Imatinib-naïve GIST と比較して、imatinib 耐性 GIST は血管内皮細胞の PD-L1 陽性率が

有意に高かった(カイ2乗検定で $p=0.000496$)。

Imatinib 耐性 GIST での腫瘍内外血管内皮細胞における PD-L1 発現は、腫瘍に浸潤する免疫細胞が、腫瘍の「入り口」である血管内皮細胞による PD-L1/PD-1 結合により抑制される可能性を示唆する。これは imatinib 耐性の新しい機序の提唱だけでなく、抗血管新生療法と PD-L1 免疫療法との組み合わせにより、耐性 GIST 内外の血管を標的とする耐性克服の可能性を示唆する。PD-L1 を含む B7 family の免疫制御分子は、PD-L1 以外に B7-H3 が腫瘍の血管内皮に発現する(文献⑤)。従って、血管を標的とする PD-L1 療法は、GIST の耐性克服のみならず、その他の腫瘍一般に有効な可能性が期待される。

以上の研究成果(3)の内容は現在投稿論文準備中で、投稿直前である。

(4)以上の成果をまとめると、以下のとおりである。

①high risk GIST では、low risk GIST における *c-kit* 遺伝子変異に加え、「5hmc(-)」というエピゲノム変化が起きている。

②*c-kit* 遺伝子野生型 GIST (SDHB 発現消失型 GIST)でも 5hmc(-)であることから、5hmc(-)は *c-kit* 遺伝子変異とは独立と考えられる。

③imatinib 耐性 GIST では imatinib-naïve GIST と異なり、血管内皮細胞において PD-L1 の発現が誘導され、血管を標的とした PD-L1 療法などの免疫療法により、GIST の imatinib 耐性を克服しうる可能性がある。

<引用文献>

① Hirota S, Isozaki K. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int.* 2006 Jan;56(1):1-9.

② Ishikawa T, Nakai N, Liu NN, Shiba K, Isozaki K, Matsuda I, et al. In vivo effect of imatinib on progression of cecal GIST-like tumors in exon 17-type *c-kit* knock-in mice. *Lab Invest.* 2009 Oct;89(10):1161-8.

③ Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci.* 2012 Apr;103(4):670-6.

④ Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature.* 2015 Nov 12;527(7577):249-53.

⑤ Seaman S, Stevens J, Yang MY, et al. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell.* 2007 Jun;11(6):539-54.

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 異なる遺伝子変異を示す孤発性多発胃 GIST の microRNA 発現解析. 木原 多佳子, 土田 泰昭, 梶本 仙子, 井出 良浩, 松田 育雄, 塚本 吉胤, 羽尾 裕之, 児島 正道, 黒田 暢一, 廣田 誠一. 第 104 回日本病理学会総会(2015 年 5 月 2 日、名古屋国際会議場[愛知県・名古屋市])
- ② KIT-Dup-Ser501Ala502 変異を持つ GIST の臨床病理学的特徴と変異分子生物学的検討. 劉 寧寧, 井出 良浩, 梶本 仙子, 木村 尚美, 松田 育雄, 廣田 誠一. 第 103 回日本病理学会総会(2014 年 4 月 24 日、広島国際会議場 ANA クラウンプラザホテル広島[広島県・広島市])
- ③ 類上皮型 gastrointestinal stromal tumor(GIST)の細胞像. 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. 第 54 回日本臨床細胞学会総会(春期大会)(2013 年 6 月 2 日、グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール[東京都・港区])
- ④ GIST におけるグローバルな DNA メチル化の解析. 松田 育雄, 廣田 誠一. 第 102 回日本病理学会総会(2013 年 6 月 8 日、ロイトン札幌[北海道・札幌市])

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 育雄 (MATSUDA, Ikuo)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50335452