

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく
耐性GISTの治療薬開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 西田 俊朗

平成27 (2015) 年 3月

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく
耐性GISTの治療薬開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 西田 俊朗

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）		
網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究	-----	3
西田俊朗		
II. 委託業務成果報告（業務項目）		
1. 網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究 前臨床研究	-----	11
分担：西田俊朗、土井俊彦、佐藤暁洋、野村尚吾、内藤陽一 （資料）資料名：前臨床研究成果の投稿中論文		
2. 網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究 KIT・PDGFRA遺伝子解析システムの確立	-----	16
分担：今野弘之、小松嘉人		
3. 網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究 臨床試験運営方法の確立	-----	17
分担：山田康秀		
4. 網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究 臨床試験での遺伝子解析体制の構築	-----	18
分担：土原一哉		
5. 網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究 KIT・PDGFRA遺伝子解析体制の構築	-----	19
分担：仲哲治		
6. 網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究 KIT・PDGFRA遺伝子解析体制の構築	-----	23
分担：廣田誠一		
III. 学会等発表実績	-----	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	33

I . 総括研究報告

研究要旨

研究全体を、前臨床研究、臨床研究ネットワーク造り、臨床研究整備、KIT・PDGFRA 遺伝子解析研究に分かれて行った。

前臨床研究：フォンレックリングハウゼン病タイプ I（Neurofibromatosis type I: NF1）に対する前向き並びに後ろ向きの疫学調査と、NF1 遺伝子に異常を持つ腫瘍へのMEK阻害剤の有用性を、細胞株を用い検討した。

95 例の成人 NF1 患者の CT スクリーニングで 6 例 GIST（6.3%；CI：2.35-13.24）を認め、NF1 患者の生涯 GIST 罹患リスクは 6%以上で、通常人に比し NF1 患者の GIST 発生頻度は 200 倍以上のリスクがあることが推測された。日本とフランスで行われた疫学調査から初発 GIST 手術症例中 NF1-GIST 症例の割合は 1.1~1.4%と推計された。

GIST-T1 細胞株と MPNST 細胞株（JCRB3015 と sNF96.2）を用いて、NF1 機能が失活化した腫瘍で有効な阻害剤を *in vitro* で検索した。NF1 機能が失活化した腫瘍の細胞増殖を抑制するのは、RAS 関連阻害剤と MEK1 と MEK2 を同時に阻害する薬剤のみであることが示された。以上より、進行・再発 NF1-GIST は *KIT* や *PDGFRA* 遺伝子変異を持たず、NF1-GIST に対し標準治療薬イマチニブは治療効果を持たず、行・再発 NF1-GIST に対する標準治療薬は無い状態である。NF1-GIST では *KIT* 下流の RAS-MEK 系の活性化が認められ、*NF1*、*RAS*、*BRAF* に変異がある腫瘍に関して、MEK1・MEK2 阻害剤の POC 試験として医師主導臨床試験を行うことが望まれる。

KIT・*PDGFRA* 遺伝子解析体制の構築：アーカイブ組織や多施設レジストリー研究から集積される手術検体を用い、*KIT*・*PDGFRA* 遺伝子変異解析を行い、1. 各施設で GIST の病理診断は十分なレベル実施されており、パラフィンブロックを集めることで *KIT*・*PDGFRA* 遺伝子変異解析が十分可能な事が示された。

臨床研究整備：臨床研究ネットワーク造りと臨床研究整備の部門では、ネットワーク造りと病病関連がそれほど進んでいない為、日本レックリングハウゼン学会の協力の下、来年度前半にはネットワークと患者集積整備を行う。

まとめ：今後、実際に則して臨床研究を行う遺伝子解析組織やネットワーク形成を整備していく予定である。

分担研究者氏名及び所属施設

西田俊朗 国立がん研究センター東病院
 土井俊彦 国立がん研究センター東病院
 佐藤晁洋 国立がん研究センター東病院
 野村尚吾 国立がん研究センター東病院
 内藤陽一 国立がん研究センター東病院
 土原一哉 国立がん研究センター・
 早期・探索臨床研究センター
 山田康秀 国立がん研究センター中央病院
 今野弘之 浜松医科大学 外科学第二
 小松嘉人 北海道大学病院腫瘍センター
 仲 哲治 医薬基盤研究所
 廣田誠一 兵庫医科大学付属病院

A. 研究目的

研究は、前臨床研究、臨床研究ネットワーク造り、臨床研究整備、KIT・PDGFRA 遺伝子解析研究に分かれて行った。

前臨床研究に於いては、以下の問題点を事前に明らかにすべく、①. フォンレックリングハウゼン病タイプ I（Neurofibromatosis type I: NF1）に対する疫学調査と、②. NF1 遺伝子に異常を持つ腫瘍へのMEK阻害剤の有用性を検討した。特に①に於いては、NF1 に消化管間質腫瘍（Gastrointestinal Stromal Tumor: GIST）など幾つかの腫瘍が合併する頻度が高いが、その疫学的頻度を調査すると共に、NF1 合併 GIST（NF1-GIST）の臨床病理学的特徴と、GIST の標

準治療薬であるイマチニブやスニチニブの有効性をretrospective cohort analysisで解析した。

臨床研究整備と臨床研究ネットワーク造りではNF1患者の多い皮膚科も含め、GIST登録事業参加施設を中心にネットワークへの参加施設拡大を行う。また、GIST研究会と稀少腫瘍研究会のGIST登録事業の基幹参加施設は14都道府県17施設であり、GIST登録事業参加施設を中心にネットワークの施設拡大を行う。

B. 研究方法

研究1：NF1患者のCTスクリーニング研究

NF1患者にどの程度の頻度でGIST(NF1-GIST)合併が合併するかは、30歳以上のインフォームドコンセントが得られた成人NF1患者に腹部造影CT検査をすることで、潜在的なGISTを含めGISTの発生頻度を明らかにした。

研究2：NF1-GISTの疫学調査研究

一般の散発性GIST中、どの程度の頻度でNF1-GISTの含まれているかを全国32病院にアンケートをすることで明らかにした。更に、このアンケートを基にNF1-GISTの予後を解析、イマチニブやスニチニブに対する感受性も明らかにした。

研究3：培養細胞を用いたNF1関連腫瘍に有効な阻害薬の*in vitro*開発研究

GIST-T1細胞株、MPNST細胞株(JCRB3015とsNF96.2)を用いて、i. NF1のノックダウンがイマチニブ感受性に与える影響、ii. NF1が機能しない腫瘍で腫瘍細胞増殖に対し抑制効果を持つ薬剤の*in vitro*でのスクリーニング解析と検討を行った。

研究4. アーカイブ組織を使ったKIT・PDGFRA遺伝子解析

研究参加病院からの手術または生検の各種

検体を用い、HE染色および免疫染色(KIT, CD34, DOG1, SDHB, p16, Ki-67等)を行い、同時に*c-kit*遺伝子のエクソン9, 11, 13, 17と*PDGFRA*遺伝子のエクソン12, 14, 18の変異解析を行った。

<倫理面への配慮>

疫学調査に当たっては、厚生労働省が定める臨床研究に関する倫理指針および疫学研究に関する倫理指針に従い、調査実施前に関係機関の倫理審査委員会の承認を事前に得た。また、前向きの研究実施時には、研究の趣旨および研究方法の説明、研究性成果により予測されるメリット・デメリット、結果公表に際しての匿名性の保持、同意撤回の権利等を説明文書に明記し、口頭でも説明、本人同意の下に実施した。更に、遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して、IC下に連結可能匿名化後に解析を行った。

培養細胞を用いた*in vitro*の研究に当たっては、細胞株の検証を行った後、施設IRB承認(大阪大学医学部附属病院並びに独立行政法人医薬基盤研究所)後に研究を行った。

C. 結果

研究1：NF1患者のCTスクリーニング研究

大阪大学附属病院に通院中の臨床的に診断された成人NF1患者158人に造影腹部CTスクリーニング研究の説明をし、同意の得られた95名に造影腹部CTを施行した。対象患者は平均年齢45歳、男性35人、女性60人のNF1患者である。

その結果、GISTを6例に(6.3%; CI: 2.35-13.24)、子宮筋腫6例、胆石4例、副腎腫瘍3例、骨盤内線維腫3例、縦隔腫瘍1例、腎動脈瘤1例が発見された。GISTは全例小腸

GISTで、5症例で多発性であり、全例KIT・PDGFRA遺伝子変異を認めず、mitosisは低く、周囲の正常小腸壁内のカハール介在細胞の過形成を認めた。これ等の結果より、NF1患者の生涯GIST罹患リスクは6%以上で、通常のGISTの頻度と比較すると、NF1患者は正常一般人に比較し200倍以上GISTを発生するリスクが高いことが推測された。

研究2：NF1-GISTの疫学調査研究

疫学調査に協力可能な32病院にアンケートを送り2001年から2010年までの初発GIST手術症例数とその中に占めるNF1-GIST症例数を明らかにした。

1314例の初発GIST症例のケースが匿名化の下集められた。その内に23の初発NF1-GIST(1.75%；CI=1.17-2.61%)手術症例が含まれていた。23例中に5例CTスクリーニング研究で見つかった無症状のNF1-GIST症例が含まれていたため、これらを除くとNF1-GISTのGIST手術症例中に占める割合は1.38% (CI=0.87-2.16%)と推計された。本データは、共同研究者であるフランスのJean-Yves Blay教授の協力の下、フランスで行われているNetSARC (netsarc.org)のデータと比較されたが、NetSARCのデータでは、1528 GISTs手術症例中に18例のNF1-GIST症例(1.1%；CI=0.75-1.85%)が見つかっており、両者のデータから、初発GIST手術症例中のNF1-GIST症例の割合は1.1~1.4%と推計された。

次に、NF1-GISTと通常のGISTとの臨床病理学的特徴の比較を行った。その結果、NF1-GISTの特徴は、i. 小腸GISTであること、ii. 多発GISTであること、iii. 若年発症であること、iv. 腫瘍にKIT・PDGFRA遺伝子変異を認めないこと、v. Mitosis (/50HPF)やKi67 indexが通常GISTに比較し低いこと、が明らかとなっ

た。

イマチニブやスニチニブの投与を受けた進行・再発NF1-GIST症例6例を集めその効果を評価した。その結果、イマチニブに対しては全例治療効果を認めなかった。VEGFRA阻害剤でもあるスニチニブ対しては、投与された5例中4例がStable Disease (SD)ではあるが6月以上の病変安定を示し、VEGFRA阻害剤にはある程度の効果が期待できることが示唆された。

次に、各種変異を持つGISTを集めて細胞膜表面ならびに細胞内のキナーゼ活性化状態を調べた。その結果、KIT変異GISTでは変異KITとRAS-MEK系とPI3K-mTOR系、p32 MAPK系及びSTAT3系のキナーゼの様々なレベルの活性化を認めた。また、PDGFRA変異GISTでは変異PDGFRAとRAS-MEK系とPI3K-mTOR系、p32 MAPK系及びSTAT3系の様々なレベルの活性化を認めた。一方、NF1-GISTではKITもPDGFRAも殆ど活性化を持たず、細胞内は主にRAS-MEK系が活性化していた。

研究3：培養細胞を用いたin vitroのNF1関連腫瘍に有効な阻害薬の開発

以上から進行・再発NF1-GISTにはKIT阻害剤は無効で、シグナル伝達系の活性化状況からはRAS-MEK系の阻害剤が有用である可能性が示唆された。

実際に、KIT変異GISTでNF1の発現をノックダウンするとイマチニブの治療効果が低下すること示された。

次に、GIST-T1細胞株とMPNST細胞株(JCRB3015とsNF96.2)を用いて、NF1機能が失活化した腫瘍で有効な阻害剤をin vitroで検索した。その結果、NF1機能が失活化した腫瘍で細胞増殖を抑制するのは、RAS関連阻害剤とMEK1とMEK2を同時に阻害する薬剤であることが示された。mTORやPI3K阻害剤は有効では

なく、MEK1 単独の阻害剤は、下流の feed-back inhibition を抑えるので、逆に細胞増殖を促進することが示された。

以上より、細胞株実験からは NF1 が失活化した腫瘍に対しては MEK1・MEK2 阻害剤が有効であることが示唆された。

研究4. アーカイブ組織を使った KIT・PDGFRA 遺伝子解析

これまで検索した手術または生検の各種検体においては、概ね GIST の病理診断が各施設で適切に行われているものと考えられた。また、遺伝子変異検索の結果も概ね、これまでの報告に矛盾しない頻度で認められた。

D. 考察

以上の結果と文献的考察から以下の様に NF1 に合併する GIST の特徴をまとめることができる。

1. NF1-GIST の頻度と特徴

NF1 患者は、一般人に比し 200 倍以上 GIST を発症しやすく、疫学的調査研究から見ても生涯罹患リスクは 6~7%以上あると見込まれる。比較的無症状で経過するものが多いためか、その手術症例数は全 GIST の 2%以下と考えられる。

NF1-GIST の特徴は、以下の様にまとめられる。即ち、1. 小腸の多発 GIST、2. 若年発症である、3. KIT・PDGFRA 遺伝子変異を認めない、4. GIST の標準治療薬イマチニブが効かない、5. Mitosis (/50HPF) が低く臨床病理学的に indolent GIST が多い、ことである。

2. 進行・再発 NF1-GIST に有効な薬剤

我々のデータも含め幾つかの retrospective analysis から、進行・再発 NF1-GIST には標準治療薬であるイマチニブの効果は期待できない。逆に、NF1-GIST では RAS-MEK 系が活性化しており、他の NF1 関連腫瘍である MPNST 腫瘍細胞でも MEK1・MEK2 阻害剤の有効性が *in vitro*

や動物実験での *in vivo* データから示唆されており、進行・再発 NF1-GIST に対する MEK1・MEK2 阻害剤の臨床試験が望まれる。

3. 今後の展開

上記の様に、進行・再発 NF1-GIST に対する標準治療薬は無い状態で、同じ GIST であっても KIT や PDGFRA 遺伝子変異が無く、その下流の NF1、RAS、BRAF に変異があり RAS-MEK 系の活性化が認められる腫瘍に関して、MEK1・MEK2 阻害剤の医師主導臨床試験による POC 試験が望まれる。

この様な臨床試験実施のため、臨床研究整備と臨床研究ネットワーク造りでは NF1 患者の多い皮膚科も含め、GIST 登録事業参加施設を中心にネットワークへの参加施設拡大を行う。また、GIST 研究会と稀少腫瘍研究会の GIST 登録事業の基幹参加施設は 14 都道府県 17 施設であり、GIST 登録事業参加施設を中心にネットワークの施設拡大を行う。

E. 結論

NF1 の患者は GIST を発症しやすく、その NF1-GIST は薬物治療が必要になった時、KIT 阻害剤であり GIST の標準治療薬であるイマチニブは無効である。進行・再発 NF1-GIST に対しては新規の薬剤開発が必要で、その増殖の裏内である MEK1・MEK2 阻害剤が有用と考えられる。

また、病理診断と遺伝子解析に関しては、研究グループの研究者の施設での GIST の病理診断はほぼ十分なレベルで行われている。遺伝子変異の検索に各施設での偏りはない。来年度は、実際臨床試験を行うための臨床と遺伝子解析ネットワークの稼働を来年度は行う必要がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 西田俊朗、。レックリングハウゼン病に伴う消化管間質腫瘍(GIST)に対する臨床試験の提案. 第6回日本レックリングハウゼン病学会 2014年, 東京
- 2) 西田俊朗、。稀少がんの臨床研究—消化管間質腫瘍(GIST)。第114回日本外科学会定期学術集会 2014年4月, 京都
- 3) 西田俊朗、。高リスクGISTに対する完全切除後の治療に関するレジストリ研究—病理診断の重要性。第52回日本癌治療学会学術集会。2014年8月, 横浜
- 4) 西田俊朗、。GISTのイマチニブ獲得耐性機構。第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月, 横浜

2. 論文発表

1. Wada N, Kurokawa Y, Nishida T, Yanagimoto, Y, Takahashi T, Nakajima K, Shuji Takiguchi S, 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* 2014;109(2):67-70
2. Nishida T, Doi T, Naito Y. Tyrosine kinase inhibitors in treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumours. *Expert Opin Pharma* 2014;15(14):1979-89.
3. Yamamoto K, Tsujinaka T, Takahashi T, Sato S, Nishiguchi Y, Nakashima Y, Muguruma K, Hirota S, Nishida T. Impact of the Japanese Gastric Cancer Screening System on Treatment Outcomes in Gastric Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): An Analysis Based on the GIST Registry. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(1):232-9.
4. Nishida T, Matsushima T, Tsujimoto M, Takahashi T, Kawasaki Y, Nakayama S, Omori T, Yamamura M, Cho H, Hirota S, Ueshima S, Ishihara H. Cyclin-dependent kinase activity correlates with the prognosis of patients with gas-trointestinal stromal tumours. *Ann Surg Oncol* 2015 accepted
5. Komatsu Y, Doi T, Sawaki A, Kanda T, Yamada Y, Kuss I, Demetri GD, Nishida T. Regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumors following imatinib and sunitinib treatment: a subgroup analysis evaluating Japanese patients in the phase III GRID trial. *Inter J Clinical Oncol*. 2015 accepted
6. Joensuu H, Rutkowski P, Nishida T, Steigen S.E, Brabec P, Plank L, Nilsson B, Braconi C, Bordoni A, Magnusson M.K, Sufliarsky J, Federico M, Jonasson J.G, Hostein I, Binguier P-P, Emile J-F. KIT And PDGFRA Mutations And the Risk of Gastrointestinal Stromal Tumor Recurrence. *J Clin Oncol* 2015:
7. Ito T, Yamamura M, Hirai T, Ishikawa T, Kanda T, Nakai T, Ohkouchi M, Hashikura Y, Isozaki K, Hirota S. Gastrointestinal stromal tumors with exon 8 *c-kit* gene mutation might occur at extragastric sites and have metastasis-prone nature. *Int J Clin Exp Pathol*. 7:8024-8031, 2014.
8. Oji Y, Tatsumi N, Fukuda M, Nakatsuka S, Aoyagi S, Hirata E, Nanchi I, Fujiki F, Nakajima H, Yamamoto Y, Shibata S, Nakamura M, Hasegawa K, Takagi S, Fukuda

I, Hoshikawa T, Murakami Y, Mori M, Inoue M, Naka T, Tomonaga T, Shimizu Y, Nakagawa M, Hasegawa J, Nezu R, Inohara H, Izumoto S, Nonomura N, Yoshimine T, Okumura M, Morii E, Maeda H, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor - associated antigen overexpressed in various types of cancers. Int J Oncol. 2014;44(5):1461-9.

9. 西田俊朗、佐藤暁洋、土井俊彦。稀少がんでの臨床研究—消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal Stromal Tumor: GIST) 日外会誌 臨時増刊号 2014 年 115 増刊号 49-50
10. 西田俊朗。GIST のイマチニブ耐性機序とその克服。がん分子標的治療 2014 年 12 (2) : 144-148
11. 西田俊朗。第1土曜特集(3000号記念) GIST (消化管間質腫瘍) 医学のあゆみ 2014 年 249 (5) : 471。
12. 西田俊朗、内藤陽一、佐々木政興、野村尚吾、佐藤暁洋、土井俊彦。 レックリングハウゼン病に伴う消化管間質腫瘍 (GIST) に対する臨床試験。日本レックリングハウゼン病学会雑誌 2015 年 (in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

委託業務成果報告（業務項目）

網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究
前臨床研究

業務分担者	西田 俊朗	独立行政法人	国立がん研究センター東病院
	土井 俊彦	独立行政法人	国立がん研究センター東病院
	佐藤 暁洋	独立行政法人	国立がん研究センター東病院
	野村 尚吾	独立行政法人	国立がん研究センター東病院
	内藤 陽一	独立行政法人	国立がん研究センター東病院

研究要旨

本前臨床研究では、フォンレックリングハウゼン病タイプ I (Neurofibromatosis type I: NF1) に対する前向き並びに後ろ向きの疫学調査と、NF1遺伝子に異常を持つ腫瘍へのMEK阻害剤の有用性を、細胞株を用い検討した。

研究1：NF1患者のCTスクリーニング研究：95例の成人NF1患者のCTスクリーニングで6例GIST (6.3%; CI: 2.35-13.24) を認め、NF1患者の生涯GIST罹患リスクは6%以上で、通常人に比しNF1患者のGIST発生頻度は200倍以上のリスクがあることが推測された。

NF1-GISTの疫学調査研究：日本とフランスで行われた疫学調査から初発GIST手術症例中NF1-GIST症例の割合は1.1~1.4%と推計された。更にNF1-GISTの特徴は、1. 小腸の多発GISTであること、2. 若年発症であること、3. *KIT*・*PDGFRA*遺伝子変異を認めないこと、4. GISTの標準治療薬イマチニブが効かないこと、5. Mitosis (/50HPF)が低く臨床病理学的にindolent GISTが多いこと、であった。

研究3：NF1関連腫瘍に有効な阻害薬の開発：GIST-T1細胞株とMPNST細胞株 (JCRB3015とsNF96.2) を用いて、NF1機能が失活化した腫瘍で有効な阻害剤を*in vitro*で検索した。NF1機能が失活化した腫瘍の細胞増殖を抑制するのは、RAS関連阻害剤とMEK1とMEK2を同時に阻害する薬剤のみであることが示された。

まとめ：進行・再発NF1-GISTは*KIT*や*PDGFRA*遺伝子変異を持たず、NF1-GISTに対し標準治療薬イマチニブは治療効果を持たず、行・再発NF1-GISTに対する標準治療薬は無い状態である。NF1-GISTではKIT下流のRAS-MEK系の活性化が認められ、*NF1*、*RAS*、*BRAF*に変異がある腫瘍に関して、MEK1・MEK2阻害剤のPOC試験として医師主導臨床試験を行うことが望まれる。

A. 研究目的

前臨床研究に於いては、以下の問題点を事前に明らかにすべく、①. フォンレックリングハウゼン病タイプ I

(Neurofibromatosis type I: NF1) に対する疫学調査と、②. NF1遺伝子に異常を持つ腫瘍へのMEK阻害剤の有用性を検討した。特に①に於いては、NF1に消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal Stromal Tumor: GIST) など幾つかの腫瘍が合併する頻度が高いが、その疫学的頻度を調査すると共に、NF1合併GIST (NF1-GIST) の臨床病理学的特徴と、GISTの標準治療薬

であるイマチニブやスニチニブの有効性をretrospective cohort analysisで解析した。

B. 研究方法

研究1：NF1患者のCTスクリーニング研究

NF1患者にどの程度の頻度でGIST (NF1-GIST) 合併が合併するかは、30歳以上のインフォームドコンセントが得られた成人NF1患者に腹部造影CT検査をすることで、潜在的なGISTを含めGISTの発生頻度を明らかにした。

研究2：NF1-GISTの疫学調査研究

一般の散発性 GIST 中、どの程度の頻度で NF1-GIST の含まれているかを全国 32 病院にアンケートをすることで明らかにした。更に、このアンケートを基に NF1-GIST の予後を解析、イマチニブやスニチニブに対する感受性も明らかにした。

研究 3 : 培養細胞を用いた NF1 関連腫瘍に有効な阻害薬の *in vitro* 開発研究

GIST-T1 細胞株、MPNST 細胞株 (JCRB3015 と sNF96.2) を用いて、 i. NF1 のノックダウンがイマチニブ感受性に与える影響、 ii. NF1 が機能しない腫瘍で腫瘍細胞増殖に対し抑制効果を持つ薬剤の *in vitro* でのスクリーニング解析と検討を行った。

<倫理面への配慮>

疫学調査に当たっては、厚生労働省が定める臨床研究に関する倫理指針および疫学研究に関する倫理指針に従い、調査実施前に関係機関の倫理審査委員会の承認を事前に得た。また、前向きの研究実施時には、研究の趣旨および研究方法の説明、研究性成果により予測されるメリット・デメリット、結果公表に際しての匿名性の保持、同意撤回の権利等を説明文書に明記し、口頭でも説明、本人同意の下に実施した。更に、遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して、IC 下に連結可能匿名化後に解析を行った。

培養細胞を用いた *in vitro* の研究に当たっては、細胞株の検証を行った後、施設 IRB 承認 (大阪大学医学部附属病院並びに独立行政法人医薬基盤研究所) 後に研究を行った。

C. 結果

研究 1 : NF1 患者の CT スクリーニング研究

大阪大学附属病院に通院中の臨床的に診断された成人 NF1 患者 158 人に造影腹部 CT スクリーニング研究の説明をし、同意の得られた 95 名に造影腹部 CT を施行した。対象患者は平均年齢 45 歳、男性 35 人、女性 60 人の NF1 患者である。

その結果、GIST を 6 例に (6.3%; CI: 2.35-13.24)、子宮筋腫 6 例、胆石 4 例、副腎腫瘍 3 例、骨盤内線維腫 3 例、縦隔腫瘍 1 例、腎動脈瘤 1 例が発見された。GIST は全例小腸 GIST で、5 症例で多発性であり、全例 *KIT*・*PDGFR* 遺伝子変異を認めず、mitosis は低く、周囲の正常小腸壁内のカハール介在細胞の過形成を認めた。これ等の結果より、NF1 患者の生涯 GIST 罹患リスクは 6% 以上で、通常の GIST の頻度と比較すると、NF1 患者は正常一般人に比較し 200 倍以上 GIST を発生するリスクが高いことが推測された。

研究 2 : NF1-GIST の疫学調査研究

疫学調査に協力可能な 32 病院にアンケートを送り 2001 年から 2010 年までの初発 GIST 手術症例数とその中に占める NF1-GIST 症例数を明らかにした。

1314 例の初発 GIST 症例のケースが匿名化の下集められた。その内に 23 の初発 NF1-GIST (1.75%; CI=1.17-2.61%) 手術症例が含まれていた。23 例中に 5 例 CT スクリーニング研究で見つかった無症状の NF1-GIST 症例が含まれていたため、これらを除くと NF1-GIST の GIST 手術症例中に占める割合は 1.38% (CI=0.87-2.16%) と推計された。本データは、共同研究者であるフランスの Jean-Yves Blay 教授の協力の下、フランスで行われている NetSARC

(netsarc.org) のデータと比較されたが、NetSARC のデータでは、1528 GISTs 手術症例中に 18 例の NF1-GIST 症例 (1.1%; CI=0.75-1.85%) が見つかり、両者のデータから、初発 GIST 手術症例中の NF1-GIST 症例の割合は 1.1~1.4% と推計された。

次に、NF1-GIST と通常の GIST との臨床病理学的特徴の比較を行った。その結果、NF1-GIST の特徴は、i. 小腸 GIST であること、ii. 多発 GIST であること、iii. 若年発症であること、iv. 腫瘍に *KIT*・*PDGFRA* 遺伝子変異を認めないこと、v. Mitosis (/50HPF) や Ki67 index が通常 GIST に比較し低いこと、が明らかとなった。

イマチニブやスニチニブの投与を受けた進行・再発 NF1-GIST 症例 6 例を集めその効果を評価した。その結果、イマチニブに対しては全例治療効果を認めなかった。VEGFRA 阻害剤でもあるスニチニブに対しては、投与された 5 例中 4 例が Stable Disease (SD) ではあるが 6 月以上の病変安定を示し、VEGFRA 阻害剤にはある程度の効果が期待できることが示唆された。

次に、各種変異を持つ GIST を集めて細胞膜表面ならびに細胞内のキナーゼ活性化状態を調べた。その結果、*KIT* 変異 GIST では変異 *KIT* と RAS-MEK 系と PI3K-mTOR 系、p32 MAPK 系及び STAT3 系のキナーゼの様々なレベルの活性化を認めた。また、*PDGFRA* 変異 GIST では変異 *PDGFRA* と RAS-MEK 系と PI3K-mTOR 系、p32 MAPK 系及び STAT3 系の様々なレベルの活性化を認めた。一方、NF1-GIST では *KIT* も *PDGFRA* も殆ど活性化を持たず、細胞内は主に RAS-MEK 系が活性化していた。

Fig. 1. Activities of key kinases and mutational sensitivity of GIST

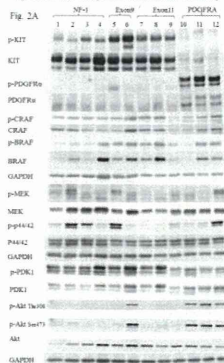


Fig. 2B. Neurofibromin

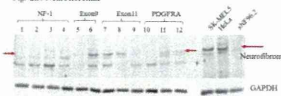
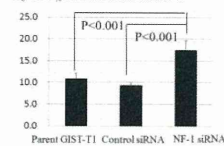


Fig. 2C. IC₅₀ after neurofibromin knockdown



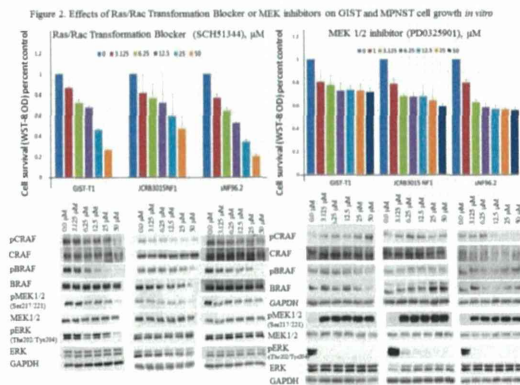
研究 3 : 培養細胞を用いた *in vitro* の NF1 関連腫瘍に有効な阻害薬の開発

以上から進行・再発 NF1-GIST には *KIT* 阻害剤は無効で、シグナル伝達系の活性化状況からは RAS-MEK 系の阻害剤が有用である可能性が示唆された。

実際に、*KIT* 変異 GIST で NF1 の発現をノックダウンするとイマチニブの治療効果が低下すること示された。

次に、GIST-T1 細胞株と MPNST 細胞株 (JCRB3015 と sNF96.2) を用いて、NF1 機能が失活化した腫瘍で有効な阻害剤を *in vitro* で検索した。その結果、NF1 機能が失活化した腫瘍で細胞増殖を抑制するのは、RAS 関連阻害剤と MEK1 と MEK2 を同時に阻害する薬剤であることが示された。mTOR や PI3K 阻害剤は有効ではなく、MEK1 単独の阻害剤は、下流の feed-back inhibition を抑えるので、逆に細胞増殖を促進することが示された。

以上より、細胞株実験からは NF1 が失活化した腫瘍に対しては MEK1・MEK2 阻害剤が有効であることが示唆された。



D. 考察

以上の結果と文献的考察から以下の様にNF1に合併するGISTの特徴をまとめることができる。

1. NF1-GISTの頻度と特徴

NF1患者は、一般人に比し200倍以上GISTを発症しやすく、疫学的調査研究から見ても生涯罹患リスクは6~7%以上あると見込まれる。比較的無症状で経過するものが多いためか、その手術症例数は全GISTの2%以下と考えられる。

NF1-GISTの特徴は、以下の様にまとめられる。

即ち、1. 小腸の多発GIST、2. 若年発症である、3. *KIT*・*PDGFRA* 遺伝子変異を認めない、4. GISTの標準治療薬イマチニブが効かない、5. Mitosis (/50HPF)が低く臨床病理学的にindolent GISTが多い、ことである。

2. 進行・再発NF1-GISTに有効な薬剤

我々のデータも含め幾つかの retrospective analysis から、進行・再発NF1-GISTには標準治療薬であるイマチニブの効果は期待できない。逆に、NF1-GISTではRAS-MEK系が活性化しており、他のNF1関連腫瘍であるMPNST腫瘍細胞でもMEK1・MEK2阻害剤の有効性が*in vitro*や動物実験での*in vivo*データから示唆されており、進行・再発NF1-GISTに対するMEK1・MEK2阻害剤の臨床試験が望まれる。

3. 今後の展開

上記の様に、進行・再発NF1-GISTに対する標準治療薬は無い状態で、同じGISTであっても*KIT*や*PDGFRA*遺伝子変異が無く、その下流の*NF1*、*RAS*、*BRAF*に変異がありRAS-MEK系の活性化が認められる腫瘍に関して、MEK1・MEK2阻害剤の医師主導臨床試験によるPOC試験が望まれる。

E. 結論

NF1の患者はGISTを発症しやすく、そのNF1-GISTは薬物治療が必要になった時、KIT阻害剤でありGISTの標準治療薬であるイマチニブは無効である。進行・再発NF1-GISTに対しては新規の薬剤開発が必要で、その増殖の裏面であるMEK1・MEK2阻害剤が有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 西田俊朗、内藤陽一、佐々木政興、野村尚吾、佐藤暁洋、井俊彦。レッキングハウゼン病に伴う消化管間質腫瘍(GIST)に対する臨床試験の提案。第6回日本レッキングハウゼン病学会 2014年、東京
- 2) 西田俊朗、佐藤暁洋、土井俊彦。稀少がんの臨床研究—消化管間質腫瘍(GIST)。第114回日本外科学会定期学術集会 2014年4月、京都
- 3) 西田俊朗、長晴彦、尾阪将人、小松嘉人、黒川幸典、土井俊彦、平井敏弘、北川雄光、馬場秀夫、山田康秀、杉山敏郎、掛地吉弘、羽藤慎二、平島詳典、廣田誠一。高リスクGISTに対する完全切除後の治療に関するレジストリ研究—病理診断の重要性。第52回日本癌治療学会学術集会。2014年8月、横浜

4) 西田俊朗、高橋剛、土原一哉。GISTのイマチニブ獲得耐性機構。第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月, 横浜

2. 論文発表

1. Wada N, Kurokawa Y, Nishida T, Yanagimoto, Y, Takahashi T, Nakajima K, Shuji Takiguchi S, 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* 2014;109(2):67-70
2. Nishida T, Doi T, Naito Y. Tyrosine kinase inhibitors in treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumours. *Expert Opin Pharma* 2014;15(14):1979-89.
3. Yamamoto K, Tsujinaka T, Takahashi T, Sato S, Nishiguchi Y, Nakashima Y, Muguruma K, Hirota S, Nishida T. Impact of the Japanese Gastric Cancer Screening System on Treatment Outcomes in Gastric Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): An Analysis Based on the GIST Registry. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(1):232-9.
4. Nishida T, Matsushima T, Tsujimoto M, Takahashi T, Kawasaki Y, Nakayama S, Omori T, Yamamura M, Cho H, Hirota S, Ueshima S, Ishihara H. Cyclin-dependent kinase activity correlates with the prognosis of patients with gas-trointestinal stromal tumours. *Ann Surg Oncol* 2015 accepted
5. Komatsu Y, Doi T, Sawaki A, Kanda T, Yamada Y, Kuss I, Demetri GD, Nishida T. Regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumors following imatinib and sunitinib treatment: a subgroup analysis evaluating Japanese patients in the phase III GRID trial. *Inter J Clinical Oncol*. 2015 accepted
6. Joensuu H, Rutkowski P, Nishida T, Steigen S. E, Brabec P, Plank L, Nilsson B, Braconi C, Bordoni A, Magnusson M. K, Sufliarsky J, Federico M, Jonasson J. G, Hostein I, Bringuier P-P, Emile J-F. KIT And PDGFRA Mutations And the Risk of Gastrointestinal Stromal Tumor Recurrence. *J Clin Oncol* 2015:
7. 西田俊朗、佐藤暁洋、土井俊彦。稀少がんでの臨床研究—消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal Stromal Tumor: GIST)。日外会誌 臨時増刊号 2014年 115 増刊号 49-50。
8. 西田俊朗。GIST のイマチニブ耐性機序とその克服。がん分子標的治療 2014年 12(2):144-148。
9. 西田俊朗。第1土曜特集(3000号記念) GIST (消化管間質腫瘍) 医学のあゆみ 2014年 249(5):471。
10. 西田俊朗、内藤陽一、佐々木政興、野村尚吾、佐藤暁洋、土井俊彦。レックリングハウゼン病に伴う消化管間質腫瘍 (GIST) に対する臨床試験。日本レックリングハウゼン病学会雑誌 2015年 (in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

委託業務成果報告（業務項目）

網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究
臨床研究ネットワーク造り

業務分担者	今野弘之	浜松医科大学 外科学第二
	小松嘉人	北海道大学病院腫瘍センター・臨床腫瘍学・消化器癌

研究要旨

標準治療を終えた耐性 GIST を対象として、次世代シーケンサーと BEAMing 技法を用い網羅的遺伝子解析を行い、遺伝子変異に基づき耐性 GIST に対する治療薬開発を行う。同時に、治療薬に必要なコンパニオン診断薬の開発も目指す。

A. 研究目的

GIST を対象として第1-2相臨床試験を活用した希少がんでの薬剤開発モデルの作成を行う。標準治療を終えた GIST に対し検体を採取し、①次世代シーケンサー（NGS）と BEAMing 技法を用い網羅的低侵襲的にドライバー遺伝子を検索する手法を確立、バイオマーカーに基づき耐性 GIST に対する治療薬開発を行う。②同時に、治療薬に必要な NGS 或いは multiplex 診断薬を含めたコンパニオン診断薬の開発も目指す。

B. 研究方法

GIST 研究会と稀少腫瘍研究会のGIST登録事業の基幹参加施設は14 都道府県17 施設である。GIST 登録事業参加施設を中心にネットワークの施設拡大を行う。一方、標準治療耐性の通常型GIST で治験参加可能の症例は、進行再発GIST の20%と見積られる。計約60 人の患者のNGS 解析とBEAMing スクリーニングを行う。

<倫理面への配慮>

NGSやBEAMによる遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して連結可能匿名化後に行う。

C. 結果**C. 研究結果**

本年度の研究成果は得られていない。

D. 考察

本年度の研究成果は得られていない。
来年度以降も研究を継続する。

E. 結論

本年度の研究成果は得られていない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

国内外学会でGIST研究に関する発表を行った。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究要旨

希少がんの医薬品開発にはcommon cancerとは異なる開発モデルが必要と考えられる。本研究では耐性GISTでの薬剤開発を行うことにより、希少がんに対する医薬品開発モデルの作成を目標とする。そのために、標準治療抵抗性GISTに対する医薬品開発を行うことが具体的な本研究の目的である。

A. 研究目的

希少がんの医薬品開発には common cancer とは異なる開発モデルが必要と考えられる。本研究では、耐性 GIST に対する薬剤開発を行うことにより、希少がんに対する医薬品開発モデルを作成することを目的とする。

B. 研究方法

本研究の研究計画書・説明同意文書の作成、SOP作成、医師主導治験で提供されるMEK阻害剤（X）の治験薬概要書の入手、国立がん研究センター中央病院における倫理審査委員会（以下IRB）審査、検体の収集及び遺伝子解析体制の整備と構築を行う。また、通常型のKIT・PDGFRA遺伝子変異を伴い標準治療を終えたGIST患者には、第I/II相試験に参加できる企業主導治験の誘致を行い研究計画書・説明同意文書の作成、SOPの作成を行う。イマチニブ不応・不耐GISTに対するレゴラフェニブの第II相試験を開始する予定である。

<倫理面への配慮>

本臨床試験は参加施設のIRBの承認を必須とし、対象患者からは文書で同意を取得する。

C. 結果

現在、稀少腫瘍研究会のGIST登録事業の基幹参加施設は14都道府県17施設で、進行再発のwild type GIST症例は9例である。Wild type GISTは全GISTの7%程度で、NF1、BRAF、RAS変異は各々1~2%程度と推測されるため、約500例の進行再発GISTのKIT・PDGFRA遺伝子スクリーニングが必要と見積られる。

D. 考察

国立がん研究センター東病院と中央病院ではIRB承認の下、それぞれABC studyとTOP GEAR研究で、進行・再発がん患者のがん固有遺伝子プロファイリングがNGSを用いて行われている。GISTには、これらの遺伝子解析パネルに無いGISTドライバー遺伝子（例えばSDH遺伝子群）があるた

め、新たにGIST Panelを作成し、網羅的遺伝子解析システムの構築に関わる研究開発を行うことが望まれる。

E. 結論

NF1患者の多い皮膚科も含め、GIST登録事業参加施設を中心にネットワークへの参加施設拡大を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Komatsu Y, Doi T, Sawaki A, Kanda T, Yamada Y, Kuss I, Demetri GD, Nishida T Regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumors following imatinib and sunitinib treatment: a subgroup analysis evaluating Japanese patients in the phase III GRID trial. Int J Clin Oncol 2015, epub

2. 学会発表

西田俊朗、長晴彦、尾阪将人、小松嘉人、黒川幸典、土井俊彦、平井敏弘、北川雄光 馬場秀夫、山田康秀、杉山敏郎、掛地吉弘、羽藤慎二、平島詳典、廣田誠一。高リスクGISTに対する完全切除後の治療に関するレジストリ研究－病理診断の重要性。第52回日本癌治療学会学術集会。2014年8月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし

委託業務成果報告（業務項目）

網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発に関する研究
臨床試験での遺伝子解析体制の構築

業務分担者 土原一哉

国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター トランスレーショナルリサーチ分野長

研究要旨

次世代シーケンサーを利用して取得されるGIST関連遺伝子データを一元的に管理できるデータベースの構築とダミーデータを用いた試用を実施し臨床試験実施に備えた。

A. 研究目的

GISTの網羅的ドライバー遺伝子変異検索に用いる次世代シーケンサー(NGS)を利用したがん関連遺伝子データの管理体制の設計および構築を行う。

B. 研究方法

NGSを利用して取得したGIST細胞株ゲノムデータから体細胞変異検出法の検討を行う。品質管理されたGIST関連遺伝子検索パネルより取得されるデータを一元的に管理するデータベースを試用する。

<倫理面への配慮>

データベース試用には患者個人情報を含まないダミーデータを用いる。

C. 結果

GIST由来細胞株5株の全エクソンシーケンサーデータ及び任意の遺伝子を選択したシーケンサーデータから、今後本研究で使用を予定している品質管理されたがん関連遺伝子パネルに搭載される遺伝子変異が検出可能なことを確認した。検出される遺伝子変異情報を匿名下に臨床情報と統合し、閲覧可能なデータベースの試用版を設計した。ダミーデータを用い、各被験者の情報が安全に保護されるとともに研究全体の進捗状況が研究事務局で一元的にリアルタイムで確認できる体制を構築した。

D. 考察

NGSを利用したがん関連遺伝子の網羅的解析結果をバイオマーカーとして多施設共同で研究者主導治験を実施する際には解析結果の品質管理が重要である。また治療対象患者の動向を的確に追跡、判断できる情報インフラを構築することも今後一層必要になる。

E. 結論

網羅的ドライバー遺伝子変異検索に基づく耐性GISTの治療薬開発のための臨床試験実施に必要な遺伝子データ管理体制が構築された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Komatsu Y, Doi T, Sawaki A, Kanda T, Yamada Y, Kuss I, Demetri GD, Nishida T Regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumors following imatinib and sunitinib treatment: a subgroup analysis evaluating Japanese patients in the phase III GRID trial. Int J Clin Oncol 2015, epub

2. 学会発表

1. 論文発表
該当なし。
2. 学会発表
該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし

研究要旨

本研究では、希少がんでの薬剤開発のモデルとして、標準治療抵抗性 GIST を対象として、次世代シーケンサー (NGS) と BEAMing 技法を用い網羅的遺伝子解析を行い、遺伝子変異に基づく耐性 GIST に対する治療薬開発を行う。また、同時に治療薬の適応症の選択に必要な遺伝子診断技術の開発も目指す。平成 26 年度は、進行再発 GIST で標準治療に抵抗性となった GIST 患者、wild type GIST 患者を選別スクリーニングする臨床研究ネットワークシステムを構築した。さらに、上記選別スクリーニングに関連し、参加施設から GIST の検体を匿名化の後集積、HE と免疫染色 (KIT、DOG1、SDHB、IGF2R、Neurofibromin 等) と云う病理診断、並びに、KIT・PDGFRA 遺伝子解析を行い中央病理遺伝子判定する GIST 病理・遺伝子診断ネットワークの構築の作成を行った。

われわれは、GIST 細胞株を用い、イマチニブを添加することでイマチニブ耐性細胞株を樹立した。親株との比較によりイマチニブ耐性株にのみ存在する 19 遺伝子の遺伝子変異を発見した。耐性臨床検体を用いた解析を追加し遺伝子の絞り込みを行う予定である。

また、大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会により承認を得て、同院において切除された進行再発 GIST で標準治療に抵抗性となった GIST 標本 25 検体、wild type GIST 患者 4 検体を集積し、臨床病理学的解析を行った。治療前後の 3 組の検体さらには耐性病変の 23 検体から genomic DNA を抽出した。現在次世代シーケンサーを用いて耐性遺伝子変異の解析を実施中である。

本研究により標準治療抵抗性 GIST の遺伝子変異に基づく耐性機構の解明につながる可能性があり、医療の質の向上に寄与できることが期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、希少がんでの薬剤開発のモデルとして、標準治療抵抗性 GIST を対象として、次世代シーケンサー (NGS) と BEAMing 技法を用い網羅的遺伝子解析を行い、遺伝子変異に基づく耐性 GIST に対する治療薬開発を行うことである。

B. 研究方法

(1) 免疫組織化学染色による GIST 診断のバイオマーカーの開発

タンパクの網羅的発現解析を行い (iTRAQ 法)、新たな標的分子を発見する。

(2) GIST における分子標的治療薬耐性に関与する遺伝子 2 次変異の検索

①GIST 細胞株を用い、イマチニブを添加するこ

とでイマチニブ耐性細胞株を誘導する。耐性株の誘導過程ならびに耐性株と親株をもちいてエキソーム解析を行い耐性に関わる遺伝子変異の同定を行う。

②大阪大学医学部附属病院での手術検体を用いて初発・耐性の比較を含めた耐性病変から genomic DNA を抽出しエキソーム解析を行い、耐性に関わる遺伝子変異を発見する。

③①②それぞれで発見した遺伝子変異について親株に遺伝子導入を行うことで耐性に関連するかどうかの機能解析、さらにその治療法の選択につなげる。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセント

本研究は大阪大学医学部医学倫理委員会、及び医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて承