

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（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
 佐藤堯洋 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、.フォンレックリングハウゼン病タイプ（Neurofibromatosis type I: NF1）に対する疫学調査と、.NF1 遺伝子に異常を持つ腫瘍へのMEK阻害剤の有用性を検討した。特に 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、NF1 のノックダウンがイマチニブ感受性に与える影響、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、. 小腸GISTであること、. 多発GISTであること、. 若年発症であること、. 腫瘍にKIT・PDGFRA遺伝子変異を認めないこと、. 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。

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。

このよう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。レックリグハゲ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回日本レックリグハゲン病学会 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, Bringuier 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