

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（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、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、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。

<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 (大阪大学医学部付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

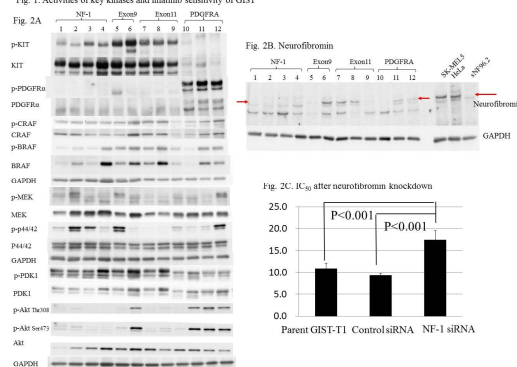
(netsarc.org) のデータと比較されたが、NetSARC のデータでは、1528 GISTs 手術症例中に 18 例の NF1-GIST 症例 (1.1%; CI=0.75-1.85%) が見つかっており、両者のデータから、初発 GIST 手術症例中の NF1-GIST 症例の割合は 1.1~1.4% と推計された。

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、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。VEGFR 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、VEGFR 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 imatinib sensitivity of GIST



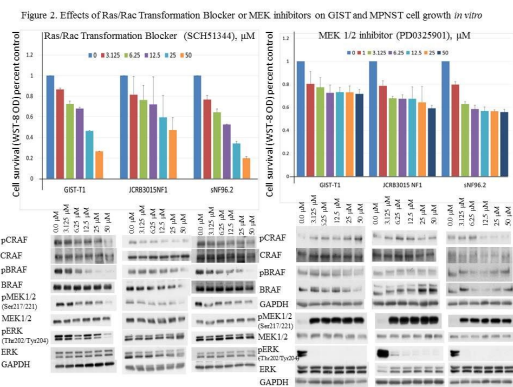
研究3：培養細胞を用いた *in vitro* の NF1 関連腫瘍に有効な阻害薬の開発

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

以上の結果と文獻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、佐藤晁洋、井俊彦。レッキングハウズ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ズ病学会2014年、東京
- 2) 西田俊朗、佐藤晁洋、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構とその克服。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、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。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 で治験参加可能な症例は、進行再発 GIST の 20% と見積もられる。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

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
臨床研究整備

業務分担者 山田康秀 独立行政法人 国立がん研究センター中央病院消化管内科

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Ⅰ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スデータ及び任意の遺伝子を選択したシーケンスデータから、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

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。

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。

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

認された研究計画書、「個人情報保護法」、「臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）」に準じて実施した。対象患者に対し、大阪大学医学部附属病院の共同研究者である医師が説明資料に従い研究について説明し、十分の理解を得た上で、文書に同意を得た。

個人情報保護

大阪大学医学部附属病院においては消化器外科 高橋剛助教を個人情報管理者とし連結可能匿名化することで個人情報の管理を行った。医薬基盤研究所には大阪大学医学部附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供され、提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データとした。

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

GIST 細胞株 (GIST-T1) に対してイマチニブを添加することで、IC50 値が 100 倍を示す耐性株 (GIST-T1R2, R8, R9) を作成した。エキソーム解析を行い親株と比較し、これら耐性株が共通に獲得した遺伝子変異を 19 か所検出した。

大阪大学医学部附属病院において、切除されたイマチニブ耐性 GIST 腫瘍サンプル 25 検体 (初発、耐性がそろったものを 3 組含む) から genomic DNA を抽出した。現在、これらから耐性に関わる遺伝子変異の同定中である。その結果を踏まえ、 と対比し今後の方向性を決定する。

E. 結論

細胞株を用いた耐性誘導実験の中で、耐性株には、親株に認めなかった遺伝子変異を確認することができた。現在、臨床検体を用いてさら

なる検討中である。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Ito T, Serada S, Naka T, Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano H. Clinico-Pathological Significance of Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients with Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2015;44(1):93-98.
2. Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T. Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology*. 2014 In Press.
3. Kawabata A, Serada S, Naka T, Mori Y. Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *J Gen Virol* 2014 Dec;95(Pt 12):2769-77.
4. Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, Miyoshi E. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. *J Proteome Res* 2014 Nov 7;13(11):4869-77.
5. Morimoto A, Serada S, Enomoto T, Kim A, Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Fujimoto M,

- Kimura T, **Naka T**. Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner. *Oncotarget*. 2014 Sep 15;5(17):7776-87.
6. Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, **Naka T**. Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modifying the Melanoma Microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Jul;27(4):630-9.
7. 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.
8. Yang L, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Kudo A, **Naka T**, Katayama I. Histamine Contributes to Tissue Remodeling via Periostin Expression. *J Invest Dermatol*. 2014 Aug;134(8):2105-13.
9. Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, **Naka T**. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. *Int J Cancer*. 2014;134(8):1796-809.
10. Sadaoka T, Serada S, Kato J, Hayashi M, Gomi Y, **Naka T**, Yamanishi K, Mori Y. Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. *J Virol*. 2014 Jan;88(1):188-201.
11. Ota M, Serada S, **Naka T**, Mori Y. MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment. *Microbiol Immunol*. 2014 Feb;58(2):119-25.

G-2. 学会発表

1. 第73回日本癌学会（パシフィコ横浜）
2014年9月25日（木）SOCS-1 induces apoptosis of ovarian cancer cell lines via JAK/STAT3 dependent and independent pathways. Nakagawa S, Serada S, Morimoto A, Takada T, Kimura T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Kimura T, **Naka T**.
2. 第73回日本癌学会（パシフィコ横浜）2014年9月25日（木）The effect of cell cycle by gene therapy for gastric cancer using SOCS-1 in vitro. Nakatsuka R, Takahashi T, Serada S, Fujimoto M, Miyazaki Y, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, **Naka T**.
3. The 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR Annual Meeting 2014) San Diego, USA" April 5-9 Quantitative proteomic analysis of cell-surface membrane proteins: biomarker discovery in esophageal squamous cancer. Harada E, Serada S, Takahashi T, Fujimoto M, **Naka T**.
4. The 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR Annual Meeting 2014) San Diego, USA" April 5-9 CpG oligodeoxynucleotide enhances the efficacy of anticancer monoclonal antibody in an in vivo xenograft model

using human endometrial cancer cell.
Hiramatsu K, Serada S, Kobiyama K,
Morimoto A, Fujimoto M, Ishii K, Naka T.

5. The 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR Annual Meeting 2014) San Diego, USA" April 5-9 Gene therapy for peritoneal dissemination model of gastric cancer using SOCS-1 by Adenoviral Vector. Nakatsuka R, Takahashi T, Serada S, Fujimoto F, Souma Y, Miyazaki Y, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Doki Y, Naka T.
6. The 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR Annual Meeting 2014) San Diego, USA" April 5-9 Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 suppresses a proliferation of malignant melanoma cells via the suppression of JAK/STAT and the activation of p53 signaling pathways. Tagami N, Serada S, Fujimoto F, Tanemura A, Katayama I, Naka T.

H. 知的財産権の出願・登録状況

名称 : 食道がんのマーカールおよびその利用

発明者 : 仲哲治、世良田聡、藤本穰、豊浦雅義、庄屋雄二

出願人 : 独立行政法人
医薬基盤研究所

出願日 : 2013年12月27日

出願番号 : 特願 2013-272085

国際出願番号 : PCT/JP2014/006455

出願日 : 2014年12月25日

名称 : 悪性腫瘍の治療薬

発明者 : 仲哲治、世良田聡、藤本穰、豊浦雅義、庄屋雄二

出願人 : 独立行政法人
医薬基盤研究所

出願日 : 2013年12月27日

出願番号 : 特願 2013-272084

国際出願番号 : PCT/JP2014/006456

出願日 : 2014年12月25日

I. 研究協力者

藤本 穰 医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト

世良田 聡 医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト

高橋 剛 大阪大学医学部附属病院
消化器外科

研究要旨

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, pftin, 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。

各施設から提供されたパラフィンブロックを用い、中央判定として上記病理遺伝子診断を行った。研究グループの GIST 診断は十分なレベルで診断されており、中央での *KIT*・*PDGFRA* 遺伝子変異の検索も可能であることが確認できた。

A. 研究目的

別に行われている GIST 登録事業では、一般病院で GIST と判定された症例の約 5% が中央判定では非 GIST と最終診断されている。同じく GIST 登録事業では、一般病院で再発高リスク GIST と判定された症例の約 15% が中央判定では再発非高リスク GIST と診断されている。これらの事実は、高価な分子標的薬が使用される GIST の領域において、無駄な分子標的薬治療が行われ、医療費が無駄に使用されている可能性を示唆している。GIST の確定診断・リスク評価の適切な遂行が GIST 診療領域では重要であり、それが適切に行われているかを検証し、また、本研究の精度の向上に寄与することが本研究の目的である。

B. 研究方法

手術または生検の各種検体において、HE 染色および免疫染色（KIT, CD34, DOG1, SDHB, pftin, Ki-67 等）を行い、GIST の病理診断が各施設で適切に行われているかどうかについて検討した。また、上記各種検体について、パラフィンブロックから DNA を抽出し、*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 の変異解析を行い、GIST の確定診断の確認をするとともに、GIST の発生に関与する他の遺伝子の検索体制の整備や、GIST と鑑別すべき非 GIST 症例における遺伝子変異検索体制の整備を行った。

< 倫理面への配慮 >

GIST およびそれに関連した疾患における遺伝子変異の解析については、当施設での倫理委員会で承認されており、また、検体は匿名化されており、個人情報の漏洩の心配はない。

C. 結果**C. 研究結果**

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

研究グループの研究者は GIST に関する知識や経験が豊富であり、それらの施設での GIST の病理診断は十分なレベルで行われているものと評価される。遺伝子変異の検索からは各施設での GIST 症例に大きな偏りはないものと思われた。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

劉寧寧, 井出良浩, 梶本仙子, 木村尚美, 松田育雄, 廣田誠一: KIT-Dup-Ser501Ala502 変異を持つ GIST の臨床病理学的特徴と変異分子の生物学的特徴の検討. 第 103 回病理学会総会(示説), 2014 年 4 月 24 日

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