

学位申請論文

胃・腸 gastrointestinal stromal tumor の悪性度に関連する 遺伝子の網羅的解析

獨協医科大学 第一外科学

円谷美也子

要 旨 Gastrointestinal stromal tumor (GIST) は、消化管に発生する間葉系腫瘍である。その診断基準は確立されつつあるものの、悪性度評価や治療方針は確立されていない。このGISTに対し、高い抗腫瘍効果を示すメチル酸イマチニブの治療効果に大きく影響されるといわれているc-kit遺伝子変異の解析は、治療効果の指標となっても悪性度評価の指標とならない。悪性度評価として現在広く用いられているFletcher CDらが提唱したリスク分類¹⁾があるが、これには遺伝子学的所見は反映されていない。今回我々はGIST悪性度に関連する遺伝子を網羅的に解析した。方法は、Ki-67免疫染色とマイクロアレイによる遺伝子解析を行った。腫瘍径、Fletcherのリスク分類、原発部位およびKi-67陽性率と遺伝子発現の関連を検討した。結果として、腫瘍径に比例して高発現する遺伝子を5つ、Fletcherのhigh risk群で高発現となり、low risk群で低発現となる遺伝子を1つ、胃で高発現となり、胃以外で低発現となる遺伝子を1つ、Ki-67高陽性率のもので高発現、低陽性率のもので低発現となる遺伝子を2つ検出した。これらの検出された遺伝子が、今後GISTの新しい悪性度評価の指標となることが期待された。

Key Words : GIST, 悪性度評価, Ki-67, 遺伝子解析

緒 言

Gastrointestinal stromal tumor「以下GIST」は、消化管に発生する間葉系腫瘍であり、消化管腫瘍の約1%を占める。

GISTはKIT遺伝子変異をほとんどの場合で伴っており、メチル酸イマチニブ「以下イマチニブ」のターゲットでもあるが²⁾、その変異部位によりイマチニブの治療効果は異なる。このGIST特有のKIT遺伝子は診断の重要な指標として用いられているが、GISTの悪性度評価として広く用いられているのは腫瘍径、腫瘍細胞の分裂像・細胞密度などの組織学的因子であり、遺伝子異常による悪性度評価はない。今回我々は、今後新たな悪性度の指標と成りうる遺伝子を検討した。

方 法

2005年7月から2008年7月までの間にGISTと診断された再発2例を含む15例(表1)を対象とした。外科的切除により摘出した検体を病理組織学的に評価し、FletcherのGIST悪性度分類(表2, 文献1)に従って病変を4群に分類した。

1. c-kit遺伝子解析

15例のうち、緊急手術症例2例を除く13例においてc-kit exon 9, 11, 13, 17変異の有無を検索した。腫瘍病変より、フェノールクロロホルム法でDNAを抽出し、表3に示すprimerを用いてPCR反応を行った。塩基配列はsequence法で確認した。

2. 免疫染色

上述の15病変についてパラフィン包埋切片を用意した。TUNEL染色にはApoptag[®] Plus Peroxidase in site (CHEMICON)を使用した。Ki-67発現は抗ヒトKi-67マウスモノクローナル抗体(Dako)を使用し、Streptavidin Biotin法ペルオキシダーゼ染色で検出した。

平成19年10月31日受付, 平成19年11月29日受理
別刷請求先: 円谷美也子

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 第一外科学

表1 対象症例

| 症例 | 年齢 | 性別 | 腫瘍径 | 原発巣 |
|----|----|----|----------------|------|
| 1 | 74 | 女 | 0.5 × 0.7 cm | 胃 |
| 2 | 59 | 女 | 2 × 1.6 cm | 胃 |
| 3 | 55 | 女 | 2.5 × 2.0 cm | 胃 |
| 4 | 64 | 女 | 3.5 × 2.3 cm | 十二指腸 |
| 5 | 44 | 男 | 4.5 × 3.0 cm | 小腸 |
| 6 | 25 | 女 | 4.5 × 4.0 cm | 胃 |
| 7 | 68 | 女 | 5.0 × 4.0 cm | 腹腔 |
| 8 | 69 | 男 | 5.5 cm | 胃 |
| 9 | 49 | 男 | 5.8 × 4.0 cm | 胃 |
| 10 | 51 | 女 | 6 × 8 cm | 胃 |
| 11 | 80 | 女 | 7.5 × 4.0 cm | 小腸 |
| 12 | 58 | 男 | 15 × 15 cm | 胃 |
| 13 | 70 | 男 | 16 × 16 cm | 直腸 |
| 14 | 71 | 男 | 8 × 8.5 cm | 転移 |
| 15 | 52 | 男 | multiple (rec) | 転移 |

表2 GISTにおけるリスク分類

| | 腫瘍径 | 核分裂像 |
|-------------------|----------|------------------|
| Very low risk | < 2 cm | < 5/50 HPF |
| Low risk | 2-5 cm | < 5/50 HPF |
| Intermediate risk | < 5 cm | 6-10/50 HPF |
| | 5-10 cm | < 5/50 HPF |
| High risk | > 5 cm | > 5/50 HPF |
| | > 10 cm | Any mitotic rate |
| | Any size | > 10/50 HPF |

HPF : high power fields

※文献1) より引用

表3 C-kit遺伝子プライマー

| exon | Forward | Reverse |
|------|-----------------------------------|---|
| 9 | 5'-ATG CTC TGC TTC TGT ACT GCC-3' | 5'-AGA GCC TAA ACA TCC CCT TA-3' |
| 11 | 5'-CCA GAG TGC TCT AAT GAC TG-3' | 5'-CTG TTA TGT GTA CCC AAA AAG G-3' |
| 13 | 5'-CAT CAG TTT GCC AGT TGT GC-3' | 5'-ACA CGG CTT TAC CTC CAA TG-3' |
| 17 | 5'-TGT ATT CAC AGA GAC TTG GC-3' | 5'-GGA TTT ACA TTA TGA AAG TCA CAG G-3' |

染色後、高倍率（×400）で10視野の陽性細胞数をカウントし、それぞれの陽性率を算出した。

3. Oligo GEArray

15例のうち、症例1, 2, 14, 15を除いた11例について遺伝子発現解析を行った。

各々の凍結標本からAGPC（Acid Guanidium-Pheno-Chloroform）法を用いてRNAを抽出した。マイクロアレイは、Oligo GEArray[®] PI3K-AKT Signaling Pathway Microarrayキットを用いて行った。Total RNA（2 μg）からTrueLabeling-AMPTM2.0 Linear RNA（Superarray）増幅キットにてcDNAを合成し、次にIVT酵素mixを用いてビオチン標識cRNAを作製した。その後ビオチン標識cRNAと122個のDNA（表4）をスポットしたメンブレンを60℃で一晩ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイズしたメンブレンをCDP-Star substrate溶液に入れ、室温で5分反応させ発光シグナルをCCDカメラシステムにて検出した。結果はGEArray[®]

Expression Analysis Suiteを用いて解析した。腫瘍径最小の症例1における遺伝子発現レベルをコントロールとして、他の検体の発現レベルを数値化し、中央値から高いものを高発現、中央値以下のものを低発現、リスク分類、原発部位、Ki-67陽性率との関係を検討した。

結 果

c-kit遺伝子解析、免疫染色を行った15症例（男性7例、女性8例）の平均年齢は59.3歳（範囲；25-80歳）であった。原発部位は、胃が8例（53.3%）で最も多かった。リスク分類では、very low riskが1例、low riskが4例、intermediate riskが4例、high riskが6例であった（表1）。

1. c-kit遺伝子解析

13例中11例（84.6%）にc-kit exon11の変異を認め、そのうち1例については、exon11に加えexon13の変異も認めた。遺伝子異常を認めなかったものは1例のみ（7.7

表4 解析した122個のRNA

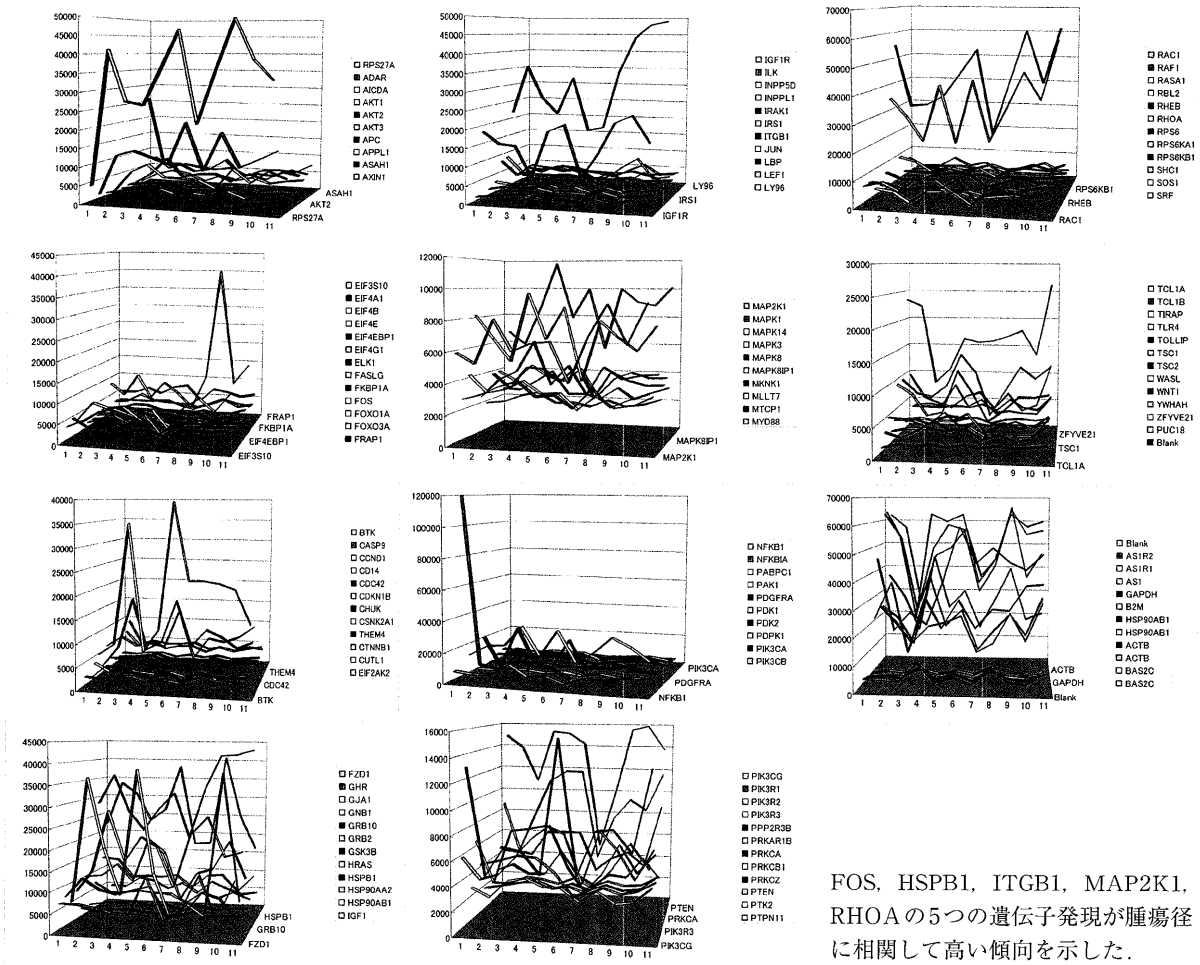
| | | | | | |
|---------|----------|----------|----------|---------|----------|
| RPS27A | CUTL1 | GSK3B | MAPK8 | PRKAR1B | TIRAP |
| ADAR | EIF2AK2 | HRAS | MAPK8IP1 | PRKCA | TLR4 |
| AICDA | EIF3S10 | HSPB1 | MKNK1 | PRKCB1 | TOLLIP |
| AKT1 | EIF4A1 | HSP90AA2 | MLLT7 | PRKCZ | TSC1 |
| AKT2 | EIF4B | HSP90AB1 | MTCP1 | PTEN | TSC2 |
| AKT3 | EIF4E | IGF1 | MYD88 | PTK2 | WASL |
| APC | EIF4EBP1 | IGF1R | NFKB1 | PTPN11 | WNT1 |
| APPL1 | EIF4G1 | ILK | NFKBIA | RAC1 | YWHAH |
| ASAHI | ELK1 | INPP5D | PABPC1 | RAF1 | ZFYVE21 |
| AXIN1 | FASLG | INPPL1 | PAK1 | RASA1 | PUC18 |
| BAD | FKBP1A | IRAK1 | PDGFRA | RBL2 | AS1R2 |
| BTK | FOS | IRS1 | PDK1 | RHEB | AS1R1 |
| CASP9 | FOXO1A | ITGB1 | PDK2 | RHOA | AS1 |
| CCND1 | FOXO3A | JUN | PDPK1 | RPS6 | GAPDH |
| CD14 | FRAP1 | LBP | PIK3CA | RPS6KA1 | B2M |
| CDC42 | FZD1 | LEF1 | PIK3CB | RPS6KB1 | HSP90AB1 |
| CDKN1B | GHR | LY96 | PIK3CG | SHC1 | ACTB |
| CHUK | GJA1 | MAP2K1 | PIK3R1 | SOS1 | |
| CSNK2A1 | GNB1 | MAPK1 | PIK3R2 | SRF | |
| THEM4 | GRB10 | MAPK14 | PIK3R3 | TCL1A | |
| CTNNB1 | GRB2 | MAPK3 | PPP2R3B | TCL1B | |

表5 リスク分類・遺伝子異常・免疫組織染色

| 症例 | 腫瘍径 | 核分裂像 | risk 分類 | 遺伝子異常 | TUNEL | Ki-67 |
|----|----------------|-----------------|--------------|-----------------|-------|--------|
| 1 | 0.5 × 0.7 cm | なし | very low | c-kitexon11 | 1%以下 | 1%以下 |
| 2 | 2 × 1.6cm | 30 - 50/HPF | high | c-kitexon11 | 1%以下 | 6.49% |
| 3 | 2.5 × 2.0 cm | < 5/50HPF | low | なし | 1%以下 | 3.37% |
| 4 | 3.5 × 2.3 cm | 2/50HPF | low | c-kitexon11 | 1%以下 | 1%以下 |
| 5 | 4.5 × 3.0 cm | 乏しい | low | c-kitexon13 | 1%以下 | 1%以下 |
| 6 | 4.5 × 4.0 cm | 5/50HPF | low | c-kitexon11 | 1%以下 | 1%以下 |
| 7 | 5.0 × 4.0 cm | < 10/50HPF | intermediate | c-kitexon11 | 1%以下 | 1%以下 |
| 8 | 5.5 cm | < 5/50HPF | intermediate | c-kitexon11 | 1%以下 | 1.63% |
| 9 | 5.8 × 4.0 cm | 6/50HPF | intermediate | 不明 | 1%以下 | 5.77% |
| 10 | 6 × 8 cm | 10/50HPF | high | c-kitexon11 | 1%以下 | 2.22% |
| 11 | 7.5 × 4.0 cm | 5/50HPF | intermediate | 不明 | 1%以下 | 5.77% |
| 12 | 15 × 15 cm | 100 - 150/50HPF | high | c-kitexon11 | 1%以下 | 10.57% |
| 13 | 16 × 16 cm | | high | c-kitexon11 | 1%以下 | 2.42% |
| 14 | 8 × 8.5 cm | | high | c-kitexon11, 17 | 1%以下 | 3.59% |
| 15 | multiple (rec) | 100 - 150/50HPF | high | c-kitexon11 | 1%以下 | 6.95% |

HPF : high power fields

表6 腫瘍径と遺伝子発現の関連



FOS, HSPB1, ITGB1, MAP2K1, RHOA の5つの遺伝子発現が腫瘍径に相関して高い傾向を示した。

%)であった(表5)。c-kit 遺伝子突然変異の有無は、リスク分類と明らかな相関性は示さなかった。

2. 免疫染色

TUNEL 陽性率は、検索したすべての症例で1%以下でありリスク分類と相関性は認めなかった。

Ki-67 ラベリングインデックスは、low, intermediate risk グループに比し high risk グループで高値を示し、有意に陽性率が高かった (P = 0.0440) (表5)。

3. Oligo GEArray

解析した11例のうち、low risk が4例、intermediate が4例、high risk が3例であった。原発巣は胃が6例 (54.5%)、小腸が3例 (27.2%)、直腸が1例 (9.1%)、腹腔が1例 (9.1%) であった。

11例の解析の結果、122種類全ての遺伝子発現を認めた。この中で腫瘍径に比例して高発現となる遺伝子は、FOS, HSPB1, ITGB1, MAP2K1, RHOA の5つの遺伝子であった(表6)。

Ki-67陽性率は1%以下と1%以上とに分類し、遺伝子発現と対比させると、RPS27A, ADAR, APC, AXIN1, CCND1, CDC42, CDKN1B, CUTL1, EIF4B, FOS, FZD1, HSPB, HSP90AA2, ILK, INPPL1, ITGB1, MAP2K1, MYD88, NFKB1, NFKBIA, PIK3R1, RBL2, RHOA, RPS6KA1, TSC2, YWHAH, ZFYVE21, B2M, HSP90AB1, ACTB の32個の遺伝子がKi-67陽性率1%以上の群で高発現を示した。この中でKi-67陽性率1%以下の群では低発現となる遺伝子はPIK3R1, B2Mの2つのみであった。また、Ki-67陽性率1%以上のもので高発現となる特有の遺伝子はなかった(表7)。

遺伝子発現の結果をリスク分類と対比させると high risk 3例に高発現を示す遺伝子はEIF4A1, HSPB, ITGB, RHOA, WASLの5つであり、この中でlow risk での発現値が低いものはWASLのみであった(表8)。

原発部位に関しては胃で高発現を示す遺伝子はEIF4A, ILK, PDK2, PDK1, PIK3C, RBL2, RHOA, SHC1, ACTBの9つであった(表9)。

考 察

消化管に発生する間葉系腫瘍は広義のGISTと総称され、Rosai Jらにより分類が提唱³⁾され、診断・治療の基準は確立されつつあるものの、まだなお考慮の余地がある。

GIST患者のほとんどがKITあるいはPDGFRA突然変異を有しており、それらの遺伝子異常が腫瘍増大に大きな役割を果たしていると報告されている⁴⁾。近年認可されたイマチニブは、KIT受容体に選択的に結合することでそのチロシンリン酸化を阻害し抗腫瘍効果を発揮すると言われている。しかしながら近年、イマチニブ長期服用による耐性化が問題になり始めている。この原因として挙げられているのが、ABL領域における点突然変異、BCR/ABL遺伝子の増幅、イマチニブ結合部位のアミノ酸変異、 α_1 -acid glycoproteinとの結合などである^{5,6)}。そこで、第二の治療薬としてAMG706, SU11248が現在、臨床開発試験中である。この2種類の薬剤は血管新生に関与する血管内皮増殖因子受容体群、血小板由来増殖因子受容体 β を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮する。SU11248はイマチニブに対し早期耐性が生じやすいGISTに対し、高い奏効率を示すことが報告されている⁷⁾。

ところでexon11 KIT突然変異を持っているGIST患者では、イマチニブ感受性が高いとの報告がある^{8,9)}。今回検索した症例においては、ほぼexon11 KIT突然変異を有しておりイマチニブの高い抗腫瘍効果が期待された¹⁰⁾。しかしながら、KIT遺伝子解析はGISTの診断基準となっても、イマチニブへの感受性の指標とはならないかもしれない。事実、c-kitの遺伝子解析は腫瘍径・腫瘍細胞の分裂像によるリスク分類¹⁾を超える悪性度評価の指標とはならなかった。免疫染色については、TUNEL染色法も悪性度評価には有効ではなかったが、Ki-67染色はhigh riskグループで高い陽性細胞率を示し、従来の報告¹¹⁻¹³⁾と同様に我々の結果からもKi-67の標識率が悪性度の指標として有用であると考えられた。

今回の検討では、腫瘍径に比例して高発現となる遺伝子候補としてFOS, HSPB1, ITGB1, MAP2K1, RHOAの5つの遺伝子が同定された。FOS (V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) は、癌遺伝子に分類される核蛋白質群の1つであり、遺伝子の転写調節に関与する遺伝子である。HSPB1 (Heat shock 27kDa protein 1) は、熱ショック蛋白質の一種、Hsp70の機能抑制を介して、癌細胞の抗癌剤に対するアポトーシス感受性を増強させるといわれている¹⁴⁾。MAP2K1 (Mitogen-activated protein kinase 1) は、転移に関連する遺

伝子でありトレオニンキナーゼやMAP kinase キナーゼなどの活性化を促す遺伝子である。RHOA (Ras homolog gene family, member A) は、これも転移に関連する遺伝子であり細胞性遊走¹⁵⁾・運動性亢進を促す遺伝子である。

一方、Ki-67陽性率の高いもので高発現、陽性率の低いもので低発現となるPIK3R1, B2Mの2つの遺伝子候補を同定することができた。PIK3R1 (Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1) は、細胞増殖、分化、アポトーシス、細胞骨格の再構成などに関わっている遺伝子である。

腫瘍径・分裂像を総合したものがFletcherらのリスク分類である¹⁾が、そのhigh risk群で高発現となり、low risk群で低発現となる遺伝子候補としてWALSが検出された。WALS (Wiskott-Aldrich syndrome-like) は細胞運動に関わる遺伝子であり、今後リスク判定基準の1つとなるかもしれない。

原発部位に関しては胃で高発現となり、その他で低発現となる遺伝子候補としてはSHC1が検出された。SHC1 (Src homology 2 domain containing transforming protein 1) は、細胞増殖などの調節やMAPKの活性化を促す遺伝子である。胃ではPDGFRAの発現が小腸に比較して有意に高いと報告されている¹⁶⁾。今回の検討でも胃・その他消化管のキナーゼ活性が異なっており、発生部位により悪性度の違いや治療法の違いが出るかもしれない。

今回のマイクロアレイによる遺伝子解析と様々な因子を比較検討することで、今後悪性度の指標となる因子が新たに同定されることが期待される。しかし、今回の解析はmRNAにおける検討であり、今後、蛋白量発現等解析して確認する必要がある。

結 論

GISTにおいて、遺伝子解析は診断判定の基準あるいは治療効果の指標にしかならなかったが、遺伝子発現率と他の因子との比較検討により、悪性度の指標となりうる新たな因子を同定し得る可能性が示唆された。

文 献

- 1) Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. : Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors : A consensus approach. *Hum Pathol*, **33** : 459-465, 2002.
- 2) Corless CL, Schroeder A, Griffith D, et al. : PDGFRA Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors : fre-

- quency, spectrum and In vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol*, **23** : 5357-5364, 2005.
- 3) Rosai J. : Gastrointestinal tract. "Stromal tumors." eds by Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*. 8th ed, p645-647, Mosby-Year Book, Inc., Missouri, 1996.
 - 4) Hirota S, Isozaki K, et al. : Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, **279** : 577-580, 1998.
 - 5) 古川雄祐, 西村倫子, 加納康彦 : STI571と他剤の併用化学療法. *血液・腫瘍科*, **45** : 232-239, 2002.
 - 6) 清水孝恒, 木崎昌弘 : Imatinib (STI571) 耐性機構の新たな展開. *血液・腫瘍科*, **49** : 84-88, 2004.
 - 7) 長谷川順一, 高橋剛, 西田俊朗 : GISTに対する薬物治療. *消化器外科*, **29** : 195-205, 2006.
 - 8) Nakatani H, Kobayashi M, et al. : STI571 (Glivec) inhibits the interaction between c-KIT and heat shock protein 90 of the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1. *Cancer Sci*, **96** : 116-119, 2005.
 - 9) Heinrich MC, Corless CL, et al. : Kinase Mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of Clinical Oncology*, **21** : 4342-4349, 2003.
 - 10) Lux ML, Rubin BP, Biase TL, et al. : KIT extracellular and kinase domain mutation in gastrointestinal stromal tumors. *Am. J Pathol*, **156** : 791-795, 2000.
 - 11) Gumurdulu D, Erdogan S, et al. : Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameters. *World Gastroenterol*, **13** : 426-431, 2007.
 - 12) 長谷川匡 : GISTの悪性度の評価. 上西紀夫 (編). *消化器病セミナー 88. 消化管間葉系腫瘍 (GIST) の病態・診断・治療—新しい視点.* へるす出版, 99-105, 2002.
 - 13) Fujimoto Y, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. : Clinicopathologic study of primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the stomach, with special reference to prognostic factors : analysis of results in 140 surgically resected patients. *Gastric Cancer*, **6** : 39-48, 2003.
 - 14) 谷村進, 河野通明 : Heat shock protein 70結合蛋白質 (HspBP1) のアポトーシス誘導促進効果. *日本臨床*, **62** : 1291-1296, 2004.
 - 15) 遠藤剛 : 細胞 : その様式と分子機構. *実験医学*, **24** : 1924-1929, 2006.
 - 16) Haller F, Happel N, Schulten HJ, et al. : Site-dependent differential KIT and PDGFRA expression in gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors. *Modern Pathology*, **20** : 1103-1111, 2007.