The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Combination of pimitespib (TAS-116) with sunitinib is an effective therapy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors
Author(s)	寺西, 立冴
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92867
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨

Synopsis of Thesis

氏　名 Name	寺西立冴
論文題名 Title	Combination of pimitespib (TAS-116) with sunitinib is an effective therapy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (ピミテスピブ及びスニチニブの併用療法はイマチニブ耐性消化管間質腫瘍に対して有用である)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

KITチロシンキナーゼの機能獲得型遺伝子変異が原因である消化管間質腫瘍(GIST)に対して、イマチニブ（IM)は高い臨床効果を示す。しかしながら、KIT遺伝子の2次変異に伴うIM耐性の出現が課題である。IM耐性GISTに対しては、マルチキナーゼ阻害剤が標準治療として確立されているものの、その無増悪生存期間は6カ月程度と満足のできる成績ではない。近年、Heat Shock Protein 90(HSP90)阻害剤であるピミテスピブ（PIM)単剤でのGISTに対する有効性が確認され、臨床応用された。本研究は、IM耐性GISTに対して、マルチキナーゼ阻害剤スニチニブ（SU)にPIMを併用投与することで、より効果的な抗腫瘍効果を得ることができるか、更にそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

KIT exon11変異を有するIM感受性GIST細胞株T1、T1のIM耐性化細胞でありKITの2次遺伝子変異(KIT exon11+17)を有するR8、及びKITの二次遺伝子変異(KIT exon11+13)を有する430/654を用いて検討を行った。

① SU+PIM併用療法における細胞増殖抑制効果及びKITシグナル経路への効果の検討

SU単剤及び、SU＋PIM併用投与後にProliferation assayを行ったところ、併用療法においては、PIMの濃度依存的に増殖抑制効果の増強を認めた。さらにKIT経路への効果を、Western Blotting(WB)にて検討した。その結果、SUに併用するPIMの濃度依存的にKIT、リン酸化KIT、及び下流経路であるAKT、ERKの抑制を認めた。さらに、Caspase3/7活性をLuminescence assayを用いて評価し、SU、PIM単剤と比較して、併用投与下で強い活性増強を認め、アポトーシスが強く誘導されていることを確認した。

② SU+PIM併用療法におけるKITへの作用メカニズムについての検討

GIST細胞のKITおよびリン酸化KITとゴルジ体、小胞体の細胞内免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。GIST細胞において、KITの小胞体、ゴルジ体での局在を確認する一方で、リン酸化KITは、ゴルジ体のみに存在していることを確認した。T1及びR8細胞において、SU単剤では、コントロール群と比較して、ゴルジ体上のKIT発現は変わらないものの、リン酸化KITの発現が低下していることを確認した。SU+PIM併用群では、KITの発現低下ならびにリン酸化KITの発現が更に強く減少した。以上の結果から、PIMはゴルジ体におけるKITの安定に関与しており、PIM投与によりゴルジ体に局在するKITが分解され、SU併用投与下では、リン酸化KITを介したGIST増殖シグナルがより強く抑制され、増殖抑制効果を認めることが示唆された。

③ SU+PIM併用療法における血管新生関連タンパクについての検討

血管新生関連タンパクのHIF1α及びProtein Kinase D2(PKD2)はHSP90のクライアント蛋白である。*In vitro*条件下で、PIM及びSU投与によりこれらタンパクの発現変化をWBにて検討した。SUはHIF1αの発現を抑制した一方で、PIMは濃度依存的にPKD2及びHIF1αの発現を抑制し、下流分子であるVEGFの発現抑制を確認した。

④ 動物モデルを用いたSU+PIM併用療法の抗腫瘍効果についての検討

イマチニブ耐性GIST細胞株の皮下移植による異種移植マウスを作成し、SUならびにSU+PIMの治療効果について検討した。SU+PIM併用群で最も強い抗腫瘍効果を示した。治療後の腫瘍は、WBでは、SU+PIM投与群は、KITのリン酸化及びAKT/p44/42MAPKのリン酸化の抑制を認め、*in vitro*と同様の結果を得た。また、SU+PIM投与群でKi-67の発現が著明に低下し、TUNEL染色によってアポトーシスへの誘導を確認した。また、CD31免疫染色を用いてmicro vessel density(MVD)を測定した所、PIM投与においてMVDが低下し、新生血管の発現抑制が示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

イマチニブ耐性GISTに対してスニチニブ及びピミテスピブの併用投与は、ゴルジ体のリン酸化KITの発現を強く抑制し、KIT経路を抑制することにより、強い抗腫瘍効果を認めることを明らかにした。更に、ピミテスピブはPKD2及びHIF1αの発現を抑制し、スニチニブとの併用療法で血管新生を強く抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名） 寺西 立冴

		（職）	氏　名	
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	土岐祐一郎	署　名
	副　査	大阪大学教授	畠山 昌則	署　名
	副　査	大阪大学教授	谷内田 真一	署　名

論文審査の結果の要旨

消化管間質腫瘍(GIST)に対するイマチニブ(IM)治療は高い臨床効果を示す一方で、耐性の出現が問題とされ新規治療法の開発が課題である。本研究は、IM耐性GISTに対し、Heat Shock Protein (HSP)90阻害薬であるピミテスピブ(PIM)とマルチキナーゼ阻害剤であるスニチニブ(SU)の併用効果および作用機序を明らかにすることを目的としたものである。IM耐性GIST細胞株および皮下腫瘍モデルマウスに対し、PIM/SUの治療効果と作用機序を検討した。PIM/SUの併用治療によりIM耐性GIST細胞株の増殖抑制効果を認めた。KITおよびリン酸化KITの発現低下とともに、下流のAKT、ERKのシグナルを抑制し、アポトーシスを誘導した。皮下腫瘍モデルマウスにおいて、併用治療は抗腫瘍効果を認めた。また、腫瘍血管の減少と血管新生シグナル経路（PKD2/HIF1/VEGF）の抑制を認めた。これらの結果より、IM耐性GISTに対し、PIMとSUの併用治療はKITシグナルと血管新生シグナルに対して複合的に働くことで、併用効果を示した。本研究は、イマチニブ耐性GISTにおける臨床応用が期待される研究成果であり、学位の授与に値すると考えられる。