

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04601

研究課題名(和文) 肥満細胞腫におけるチロシンキナーゼ阻害剤耐性化機構の解明と克服戦略の構築

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms and therapeutic approach for resistance of tyrosine kinase inhibitors in mast cell tumour

研究代表者

盆子原 誠 (BONKOBARA, MAKOTO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：50343611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満細胞腫におけるTKI耐性化の分子機構の解明とそれに基づいた耐性克服法の基盤を確立することを目的とした。犬のKIT変異陽性の肥満細胞腫株化細胞からイマチニブ耐性細胞株を作製し、それらの耐性化メカニズムを解析した。その結果、肥満細胞腫のイマチニブ耐性化機構には多様性があり、二次変異によるKITの再活性化、KIT非依存性のERK活性化、KIT蛋白寿命の延長によるKIT過剰発現が独立して、あるいは複合的に関与することが示唆された。イマチニブ耐性肥満細胞腫では、耐性化を引き起こす分子機構を個別に特定することが重要であり、それぞれのメカニズムに対応した治療戦略を構築することが必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the resistance mechanisms and overcoming strategies in tyrosine kinase inhibitor-resistant mast cell tumor. Using imatinib-sensitive canine neoplastic mast cell lines carrying a KIT activating mutation, imatinib-resistant sublines were established by culturing in increasing concentrations of imatinib. From the genetic and protein analysis of the imatinib-resistant sublines, it was considered that the mechanisms including 1) reactivation of ERK by emergence of second mutation in KIT gene, 2) KIT/SFK-independent activation of ERK, 3) overexpression of KIT via prolongation of its life span, or 4) combination of these mechanisms underlay the imatinib resistance in the mast cell lines. Identification of mechanism for imatinib-resistance in individual cases could be important for development of overcoming strategies in tyrosine kinase inhibitor-resistant mast cell tumor.

研究分野：獣医臨床病理学

キーワード：肥満細胞腫 犬 チロシンキナーゼ阻害剤 耐性 KIT

1. 研究開始当初の背景

肥満細胞腫は犬の皮膚腫瘍では最も発生頻度が高く、猫の皮膚腫瘍では2番目に多いことから、小動物臨床においてきわめて重要な悪性腫瘍である。犬および猫の肥満細胞腫では、KIT 遺伝子変異に基づく KIT 蛋白の異常が腫瘍の発生・増殖に重要な役割を果たしている。犬および猫の肥満細胞腫では、それぞれおよそ 30%と 70%の症例で KIT に変異が見られる。変異を有する KIT はリガンドである幹細胞因子 (SCF) の結合無しに恒常的なチロシン残基のリン酸化がおり、無秩序な細胞増殖が起こる。このような発見を背景に、近年肥満細胞腫に対してチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) であるイマチニブ、トセラニブ、マシチニブによる分子標的療法が用いられるようになり、それらの強力な抗腫瘍効果が多数報告されている。

一方、TKI で肥満細胞腫が根治に至る例はほとんど見られない。ほとんどの症例において、著しい腫瘍の縮小が見られたのち数ヶ月~1年後には TKI 抵抗性が生じ、最終的には制御不能・死の転帰を辿る。このように TKI に対する肥満細胞腫の耐性化は臨床きわめて重要な問題であるが、その分子機構については明らかにされておらず、そのため具体的な耐性克服のための方法が確立していない。

2. 研究の目的

肥満細胞腫における TKI 耐性化の分子機構を解明し、それに基づいた耐性克服法の基盤を確立することを目的とした。本研究において、申請者は TKI の中でも KIT に対する選択性が最も高いイマチニブに注目した。イマチニブ感受性の犬肥満細胞腫株化細胞からイマチニブ耐性細胞株を作出し、イマチニブ耐性化メカニズムを検討することとした。

3. 研究の方法

a. イマチニブ耐性犬肥満細胞腫株化細胞の樹立

犬の KIT 変異陽性の肥満細胞腫株化細胞 2 種類 (VI-MC および CoMS) を用いた。VI-MC および CoMS はそれぞれ KIT に c.1523A>T と c.1720_1772+1dup を有する細胞株であった。これらの細胞に、イマチニブを低濃度 (0.2 μM) から徐々に暴露し、1~10 μM イマチニブ存在下で生存可能な株化細胞を作出した。

b. KIT 遺伝子の解析

耐性獲得前後における KIT 遺伝子の発現レベルならびに塩基配列の変化を解析した。

c. KIT 蛋白の解析

耐性獲得前後における KIT 蛋白の発現ならびにリン酸化レベル変化を解析した。さらに KIT の細胞膜/細胞質発現レベル、KIT ユビキチン化レベル、KIT 蛋白寿命の変化についても解析した。

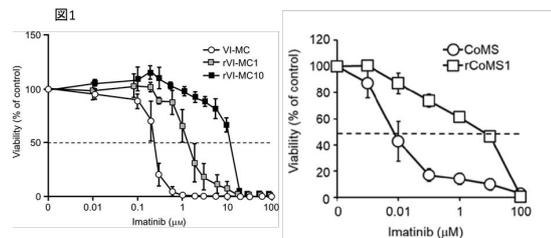
d. KIT 下流シグナルの解析

耐性獲得前後における KIT 下流シグナルについて、RRK、AKT、STAT3 の発現レベルとリン酸化レベルの変化について解析した。

4. 研究成果

a. 犬のイマチニブ耐性肥満細胞腫株化細胞の作製と性状解析

VI-MC および CoMS にイマチニブを暴露し、それぞれのイマチニブ耐性株 rVI-MC1 (IC50 約 2 μM) および rVI-MC10 (IC50 約 12 μM) と rCoMS1 (IC50 約 9 μM) を作製した (図 1)。

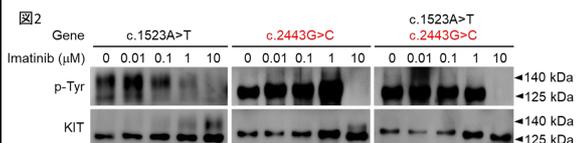


rVI-MC1 および rVI-MC10 では KIT に二次変異 (c.1523A>T, p.Asp815His) が同定された。VI-MC における KIT のリン酸化は 1 μM のイマチニブで抑制されたが、rVI-MC1 および rVI-MC10 の KIT のリン酸化は抑制されなかった。このことから、rVI-MC1 および rVI-MC10 で同定された二次変異は、VI-MC のイマチニブ耐性化と密接に関連していると考えられた。一方、rVI-MC10 は rVI-MC1 と比べより高濃度のイマチニブに対しても耐性を示すことから、rVI-MC10 には二次変異以外のイマチニブ耐性機構が存在すると考えられた。

rCoMS1 では CoMS に比べて KIT の発現レベルが著しく増加しており、これに伴い KIT のリン酸化レベルの増加が見られた。また、rCoMS1 のリン酸化 KIT はイマチニブによりやや減少したが、10 μM イマチニブ存在下でも高いリン酸化レベルを維持していた。これらのことから、rCoMS1 のイマチニブ耐性化には KIT の過剰発現が重要な役割を果たしていると考えられた。

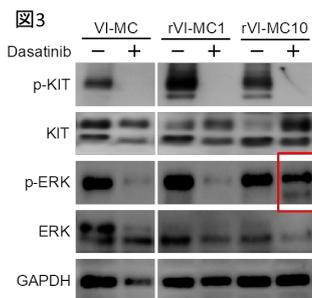
b. VI-MC における耐性機構の解析

rVI-MC1 および rVI-MC10 で同定された KIT 二次変異のイマチニブ耐性化における役割を明らかにすることを目的として 293 細胞を用いた KIT 組み換え蛋白の解析を行った。その結果、この二次変異は SCF 非存在性の KIT リン酸化を引き起こすことが示された。また、この二次変異を持つ KIT のイマチニブ感受性は、一次変異のみを持つ KIT に比べて低いことも示された (図 2)。したがって、rVI-MC1 および rVI-MC10 で生じた KIT の二次変異は、



KIT のイマチニブ感受性を低下させる機能獲得性の変異であり、VI-MC におけるイマチニブ耐性化の原因の一つであることが明らかとなった。

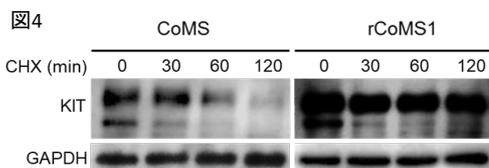
VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 を用いたシグナル伝達経路の解析では、全ての細胞株で ERK のリン酸化が見られた。VI-MC と rVI-MC1 の ERK リン酸化は高濃度のイマチニブによって抑制されたが、rVI-MC10 では抑制されなかった。したがって、rVI-MC10 は高濃度のイマチニブ存在下においても ERK のリン酸化が維持されることで細胞増殖が保たれていると考えられた(図 3)。さらに、rVI-MC10 の ERK のリン酸化は、SFK/KIT 阻害剤では抑制されず、MEK 阻害剤で抑制されたことから、この ERK のリン酸化は、SFK の活性化や ERK の自律的な活性化により生じたものではないと考えられた。



以上のことから、rVI-MC1 および rVI-MC10 において同定された KIT の二次変異は、VI-MC のイマチニブ耐性化の一因であることが明らかとなった。さらに、高濃度のイマチニブに暴露された VI-MC では、KIT および SFK とは異なる経路によって ERK が活性化し、イマチニブに対する耐性を獲得すると考えられた。

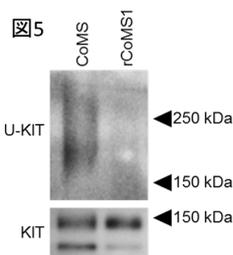
c CoMS における耐性機構の解析

rCoMS1 で認められた KIT 過剰発現の分子機構とそのイマチニブ耐性化における役割を明らかにすることを目的として KIT 分解能の解析を行った。その結果、rCoMS1 で見られた KIT の過剰発現は KIT の分解遅延によって KIT が蓄積した結果であることが明らかとなった(図 4)。さらに、この反応はイマチニブの



有無に伴って可逆性に起こることから、rCoMS1 における KIT の過剰発現は、イマチニブに対する反応性の変化であり、KIT の細胞内動態の変化により生じると考えられた。

CoMS および rCoMS1 における KIT のユビキチン化の解析において、CoMS では KIT がユビキチン化しているのに対して、rCoMS1 では明らかに KIT のユビキチン化が減少していた(図 5)。さらに、KIT の過剰



発現は細胞表面で認められたことから、rCoMS1 で認められた KIT の可逆性の過剰発現はイマチニブにより KIT ユビキチン化を可逆的に抑制し、その結果、細胞膜上で KIT が増加したと考えられた。

rCoMS1 における KIT リン酸化の解析とイマチニブの細胞増殖抑制試験により、CoMS ではイマチニブによる明らかな KIT リン酸化の抑制と細胞増殖の抑制が見られたが、rCoMS1 ではいずれの抑制も見られなかった。このことから、KIT の過剰発現は、CoMS のイマチニブ耐性化において中心的な役割を果たすことが明らかとなった。

以上から、rCoMS1 ではイマチニブによって KIT のユビキチン化が抑制され、その結果、KIT の分解が遅延し細胞膜上に KIT を過剰に発現していることが示された。さらに、この KIT の過剰発現が CoMS のイマチニブ耐性化の主な原因であることが明らかとなった。

本研究から、肥満細胞腫のイマチニブ耐性化機構には多様性があり、二次変異による KIT の再活性化、KIT 非依存性の ERK 活性化、KIT 蛋白寿命の延長による KIT 過剰発現が独立して、あるいは複合的に関与することが示唆された。これらのことから、イマチニブ耐性肥満細胞腫では、耐性化を引き起こす分子機構を個別に特定することが重要であることが示された。また、分子構造の異なる化合物の使用やユビキチン化を促進する化合物の使用など、それぞれのメカニズムに適切な治療戦略を構築することが重要と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

Ito K, Miyamoto R, Tani H, Kurita S, Kobayashi M, **Tamura K**, **Bonkobara M**. Effect of dasatinib in a xenograft mouse model of canine histiocytic sarcoma and in vitro expression status of its potential target EPHA2. *J Vet Pharmacol Ther.* 2017. 41:e45-e48.

Yoshimura H, Matsuda Y, Yamamoto M, **Michishita M**, Takahashi K, Sasaki N, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Arai T, Ishiwata T. Reduced expression of the H19 long non-coding RNA inhibits pancreatic cancer metastasis. *Lab Invest.* 2018. in press.

Ochiai K, Oda H, Shono S, Kato Y, Sugihara S, Nakazawa S, **Azakami D**, **Michishita M**, Onozawa E, **Bonkobara M**, Sako T, Shun-Ai L, Ueki H, Watanabe M, Omi T. Properties of the feline tumour suppressor reduced expression in immortalized cells (REIC/Dkk-3). *Vet Comp Oncol.* 2017. 15:1181-1186.

Kobayashi M, Kuroki S, Kurita S, Miyamoto R, Tani H, **Tamura K**, **Bonkobara M**. A decrease in ubiquitination and resulting prolonged life-span of KIT underlies the KIT

- overexpression-mediated imatinib resistance of KIT mutation-driven canine mast cell tumor cells. *Oncol Rep.* 2017. 38:2543-2550.
- Michishita M**, Katori Y, Sasaki H, Obara RD, Furumoto R, Kato M, Nakahira R, Yoshimura H, Soeta S, Ishiwata T, Takahashi K. Cutaneous Angiolymphoid Hyperplasia in a Dog. *J Comp Pathol.* 2017. 157:57-60.
- Tanaka Y, Sato Y, **Sasaki T**. Feline coronavirus replication is affected by both cyclophilin A and cyclophilin B. *J Gen Virol.* 2017. 98(2):190-200.
- Kato Y, Ochiai K, Kawakami S, Nakao N, **Azakami D**, **Bonkobara M**, **Michishita M**, Morimatsu M, Watanabe M, Omi T. Canine REIC/Dkk-3 interacts with SGTA and restores androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer cell lines. *BMC Vet Res.* 2017. 13:170.
- Azakami D**, Nakahira R, Kato Y, **Michishita M**, Kobayashi M, Onozawa E, **Bonkobara M**, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M, Ishioka K, Sako T, Ochiai K, Omi T. The canine prostate cancer cell line CHP-1 shows over-expression of the co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein α . *Vet Comp Oncol.* 2017. 15:557-562.
- Nakano Y, Kobayashi M, **Bonkobara M**, Takanosu M. Identification of a secondary mutation in the KIT kinase domain correlated with imatinib-resistance in a canine mast cell tumor. *Vet Immunol Immunopathol.* 2017. 188:84-88.
- Kobayashi M, Saito A, Tanaka Y, **Michishita M**, Kobayashi M, Irimajiri M, Kaneda T, Ochiai K, **Bonkobara M**, Takahashi K, Hori T, Kawakami E. MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. *J Vet Med Sci.* 2017. 79:719-725.
- Nakahira R, **Michishita M**, Kato M, Okuno Y, Hatakeyama H, Yoshimura H, **Azakami D**, Ochiai K, **Bonkobara M**, Takahashi K. Oncocytic carcinoma of the salivary gland in a dog. *J Vet Diagn Invest.* 2017. 29:105-108.
- Kuroki S, Kobayashi M, Tani H, Miyamoto R, Kurita S, **Tamura K**, Ono K, Washizu T, **Bonkobara M**. Selective growth inhibition by suppression of F1Fo ATPase in canine malignant melanoma cell lines. *J Vet Pharmacol Ther.* 2017. 40:101-104.
- Michishita M**, Takagi M, Kishimoto TE, Nakahira R, Nogami T, Yoshimura H, Hatakeyama H, **Azakami D**, Ochiai K, Takahashi K. Pancreatic neuroendocrine carcinoma with exocrine differentiation in a young cat. *J Vet Diagn Invest.* 2017. 29:325-330.
- Omi T, Nakazawa S, Udagawa C, Tada N, Ochiai K, Chong YH, Kato Y, Mitsui H, Gin A, Oda H, **Azakami D**, **Tamura K**, Sako T, Inagaki T, Sakamoto A, Tsutsui T, **Bonkobara M**, Tsuchida S, Ikemoto S. Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System. *PLoS One.* 2016. 11:e0165000.
- Bonkobara M**. Recent developments in veterinary diagnostics: Current status and future potential. *Vet J.* 2016. 215:1-2.
- Tanaka Y, Amano A, Morisaki M, Sato Y, **Sasaki T**. Cellular peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 facilitates replication of feline coronavirus. *Antiviral Res.* 2016. 126:1-7.
- Takeuchi Y, **Bonkobara M**. Receptor tyrosine kinase KIT: Prognostic and therapeutic involvement in canine mast cell tumours. *Vet J.* 2016. 210:5-6.
- Nakahira R, Yoshida R, **Michishita M**, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K. Effect of Gonadectomy on the Androgen-Dependent Behavior of Ganglion Cell-Like Cells in Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Comp Med.* 2016. 66:25-29.
- Kobayashi M, Kuroki S, Tanaka Y, Moriya Y, Kozutumi Y, Uehara Y, Ono K, **Tamura K**, Washizu T, **Bonkobara M**. Molecular changes associated with the development of resistance to imatinib in an imatinib-sensitive canine neoplastic mast cell line carrying a KIT c.1523A>T mutation. *Eur J Haematol.* 2015. 95(6):524-531.
- Kato Y, Ochiai K, **Michishita M**, **Azakami D**, Nakahira R, Morimatsu M, Ishiguro-Oonuma T, Yoshikawa Y, Kobayashi M, **Bonkobara M**, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M, Omi T. Molecular cloning of canine co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein α (SGTA) and investigation of its ability to suppress androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer. *Vet J.* 2015. 206:143-148.
- Bonkobara M**. Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. *Vet J.* 2015. 205(2):180-188.
- Sasaki T**, Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Matsuo M, Lu YJ, Tanaka Y, Hiramatsu K. Complete Genome Sequence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus schleiferi* Strain TSCC54 of Canine Origin. *Genome Announc.* 2015. 3(5) pii: e01268-15.
- Ochiai K, Ishiguro-Oonuma T, Yoshikawa Y, Udagawa C, Kato Y, Watanabe M, **Bonkobara M**, Morimatsu M, Omi T. Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. *Biomed Res.* 2015. 36:155-158.

〔学会発表〕(計 4 件)

谷 浩由輝、山本 仁美、栗田 晟那、宮本 良、小野憲一朗、**田村 恭一**、**盆子原 誠**
 犬の悪性黒色腫 4 例に対するボルテゾミブの効果に関する検討
 日本獣医臨床病理学会・年次大会 2016 年

宮本拓弥、藤原万里子、山本華以、山下諒、**田村恭一**、**盆子原誠**
担がん犬における末梢血中骨髓由来免疫抑制細胞の量的解析
日本獣医臨床病理学会・年次大会 2016 年

盆子原誠

犬の肥満細胞腫におけるチロシンキナーゼ阻害剤耐性化機構
日本獣医内科アカデミー(招待講演)2018 年

飯島 しずか、谷 浩由輝、栗田 晟那、宮本 良、澤田 治美、安田 暁子、**盆子原 誠**、**田村 恭一**

ACNU により治療した組織球性肉腫の犬の 5 例
日本獣医臨床病理学会年次大会 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nvlu.ac.jp/research/005.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盆子原誠(MAKOTO BONKOBARA)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：50343611

(2) 研究分担者

皆上大吾(DAIGO AZAKAMI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：80453934

道下正貴(MASAKI MICHISHITA)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：50434147

佐々木崇(TAKASHI SASAKI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：50723897

(3) 連携研究者

田村恭一(KYOICHI TAMURA)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
研究者番号：00722282

(4) 研究協力者

有泉清志(KIYOSHI ARIIZUMI)
テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター・医学部・教授

安田暁子(AKIKO YASUDA)
日本獣医生命科学大学・動物医療センター・講師

嶋原果映(KAE SHIGIHARA)
日本獣医生命科学大学・動物医療センター・助教