

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03131

研究課題名(和文) 肥満細胞腫のチロシンキナーゼ阻害剤耐性化における多様性の解析と個別化治療の構築

研究課題名(英文) Analysis of diversity in tyrosine kinase inhibitor resistance in mast cell tumors toward establishment of individualized therapy

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から、肥満細胞腫のTK阻害剤耐性化には、TK阻害剤暴露によるKIT変異の蓄積が重要であり、これによりKITにTK阻害剤耐性の二次変異が生じることが示された。また、腫瘍組織において予め超微量のTK阻害剤耐性クローンが存在している場合があることも示された。一方、犬の肥満細胞腫では様々な変異KITが検出されるが、変異の部位や種類からのみではTK阻害剤耐性を生じるか否かは予想できなかった。したがって、TK阻害剤耐性の克服に向けた個別化治療を構築する上では、次世代シーケンス解析など高精度で広範な遺伝子解析を用いた検査と検出された変異KIT蛋白の機能的特徴付けが重要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、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メカニズムの一端を明らかにした。また、この知見は耐性の克服に向けた新たな個別化治療の構築につながると考えられる。人においても同様の腫瘍が主に小児において発生し(人では肥満細胞症という)、チロシンキナーゼ阻害剤が奏功する場合がある。しかしながら、犬や猫の肥満細胞腫と同様に最終的に耐性が生じることが問題となっている。本研究から得られた成果は、小児肥満細胞症におけるチロシンキナーゼ阻害剤耐性の克服戦略の開発にも貢献する可能性が高く、社会的に重要な意義を持つ成果と考える。

研究成果の概要(英文)：This study indicates that accumulation of KIT mutations due to TK inhibitor exposure is important for TK inhibitor resistance in mast cell tumors, which results in TK inhibitor-resistant secondary mutations in KIT. In addition, it was shown that ultra-trace amounts of TK inhibitor-resistant clones may pre-exist in tumor tissues. On the other hand, although various mutations of KIT are detected in canine mast cell tumors, it was not possible to predict whether or not TK inhibitor resistance would occur based solely on the site and type of mutation. Therefore, it was considered that development of highly accurate and extensive genetic analysis system, such as next-generation sequencing analysis, for detection of KIT mutation and further functional characterization the mutant KIT proteins are important in order to establish individualized therapies to overcome TK inhibitor resistance.

研究分野：獣医臨床病理学

キーワード：肥満細胞腫 チロシンキナーゼ阻害剤 耐性化 個別化治療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥満細胞を起源とする悪性腫瘍(肥満細胞腫)は犬および猫において発生頻度が高く、獣医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それぞれ約30%と70%の症例でKIT遺伝子に機能獲得性異が認められる。申請者は、KIT遺伝子に変異を有する肥満細胞腫ではKITを標的とするチロシンキナーゼ(TK)阻害剤イマチニブが著効することを見出し、TK阻害剤を用いた個別化分子標的療法の有益性を明らかにした。一方、イマチニブあるいは同様のTK阻害剤であるトセラニブによる治療では、治療経過とともに腫瘍細胞が耐性を獲得し、腫瘍の再燃により最終的に死亡する。申請者らは、この耐性化には1)KIT遺伝子二次変異の出現、2)KITの側副シグナルの活性化、3)KITの過剰発現、4)これらとは異なる未知の分子機構の誘導、5)耐性素因を持つ超微量集団の拡大、が単独あるいは複合して関与する可能性を見出した。さらに、異なる細胞株で、それぞれ異なった耐性機構が誘導されることを明らかにした。このことは、症例ごとに異なる耐性機構を利用している可能性を示唆するものであり、TK阻害剤耐性化を理解するための重要な基盤と考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、肥満細胞腫におけるTK阻害剤耐性化機構の多様性について、腫瘍細胞の形質の変化と腫瘍内のheterogeneityの観点から解明すること、また、腫瘍の多様な耐性機構に対応した個別化耐性克服治療法を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 犬の肥満細胞腫細胞株のクローン化とKIT遺伝子の変異獲得の解析

犬の肥満細胞腫細胞株VI-MC細胞を限界希釈によりクローン化し、2クローンのVI-MC亜株を作製した。これらの細胞の増殖過程におけるKIT遺伝子の変異獲得状況について次世代シーケンサーを用いてディープシーケンス解析した。また、これらの細胞株をTK阻害剤(トセラニブ)存在下で培養を行い、同様にKIT遺伝子の変異獲得状況について解析した。

#### 2) 犬の肥満細胞腫におけるKIT遺伝子腫瘍内Heterogeneityの解析

トセラニブ未治療の犬の肥満細胞腫の腫瘍組織における超微量のKIT変異の探索と変異KITの性状解析を行った。約160検体の腫瘍組織を収集し、MiSeqを用いたKIT遺伝子のディープシーケンス解析を行った。この解析におけるdepths of coverageは超微量クローンが検出できるよう、少なくとも8000reads/baseの検出感度が得られる条件で解析した。

3)TK阻害剤未治療の犬の肥満細胞腫より同定した新規KIT変異ならびにこれまで報告された犬の肥満細胞腫のKIT変異で性状解析が行われていない変異に注目して、KITリン酸化に及ぼす影響とチロシンキナーゼ阻害剤トセラニブの影響を検討した。解析の対象とした変異は33種類で、HEK293細胞を用いてこれらの変異を有する組換えKIT蛋白を作製し、リン酸化の状態を評価した。

### 4. 研究成果

(1)クローン化した2株のVI-MC亜株(cVI-MC1およびcVI-MC2)について、まず、それらの増殖過程におけるKIT遺伝子の変異獲得状況について次世代シーケンサーを用いてディープシーケンス解析した。その結果、クローン化VI-MCでは増殖過程においてKITに新たな変異が蓄積することが明らかになった(Table 1)。次いで、これらの細胞株をTK阻害剤(トセラニブ)存在下で培養を継続し、それぞれのトセラニブ耐性細胞株を作製した(trVI-MC1およびtrVI-MC2; Fig. 1)。trVI-MC1およびtrVI-MC2のKIT遺伝子をディープシーケンス解析した結果、これらの細胞のKIT遺伝子には新たな変異が生

Table 1. Allele frequency (%) of mutations identified by next-generation sequencing.

Mutation			Parental VI-MC	Cloned VI-MC cells			
				Toceranib-sensitive		Toceranib-resistant	
Nucleotide	Amino acid	Exon	VI-MC	cVI-MC1	cVI-MC2	trVI-MC1	trVI-MC2
c.1349A>T	p.Glu450Val	8	22.3	23.5	20.9	38.3	14.9
c.1523A>T	p.Asn508Ile	9	80.9	79.4	81.0	85.0	85.8
c.2037T>A	p.Asn679Lys	14	-	-	-	-	36.7
c.2456A>T	p.Asp819Val	17	-	-	-	36.8	-
c.2456A>G	p.Asp819Gly	17	-	-	-	-	26.3
c.2418G>T	p.Lys806Asn	17	-	0.7	-	-	-
c.2513A>G	p.Glu838Gly	18	1.9	2.5	-	1.9	-
c.2515A>G	p.Ser839Gly	18	-	2.9	-	-	-
c.2579A>G	p.Glu860Gly	18	2.4	3.7	2.0	2.7	2.0
c.2579A>T	p.Glu860Val	18	-	1.8	-	-	-

-, not identified.

じていた (Table 1) さらに、同定された変異の中で、trVI-MC1 で認められた c.2456A>T (p.Asp819Val) と trVI-MC2 に認められた c.2456A>G (p.Asp819Gly) についてはトセラニブ抵抗性が生じる変異であり (Fig. 2) cVI-MC1 および cVI-MC2 で特定された変異と trVI-MC1 および trVI-MC2 の他の変異についてはトセラニブ感受性の変異であった。これらの結果は、肥満細胞腫の TK 阻害剤耐性化には、TK 阻害剤暴露による KIT 変異の蓄積が重要であり、これにより KIT に TK 阻害剤耐性の二次変異が生じる可能性が示された。このように TK 阻害剤に暴露されることで生じる腫瘍細胞の形質の変化は TK 阻害剤耐性化の大きな要因であると考えられた。ただし、この結果は腫瘍組織における腫瘍細胞のクローン進化によって TK 阻害剤耐性素因を持つ超微量なクローンが pre-exist することを否定できるものではなかった。

(2) 上述のように、株化細胞を用いた解析では、TK 阻害剤耐性化を引き起こす変異は TK 阻害剤暴露によりトリガーされることが示され、それが重要なメカニズムであることは確かと考えられる。一方で、自然発生し、進行した腫瘍内には高度に Heterogeneity が形成される。そこでトセラニブ未治療の犬の肥満細胞腫の臨床サンプルを用いて KIT 遺伝子をディープシーケンス解析し、トセラニブ耐性素因を持つ超微量集団が腫瘍組織内に存在するのか、またそのような集団がトセラニブ耐性化の要因となるのかを検討することとした。この解析における depths of coverage は超微量クローンが検出できるよう、少なくとも 8000reads/base の検出感度が得られる条件で解析した。その結果、KIT exon 2, 5, 6, 7, 9, 11, 17, and 21 に 34 種類の変異が特定された。これらの中には従来からトセラニブ感受性として知られる ITD 変異の他、17 種類の non-ITD が含まれていた。さらにこの 17 種類の中には、前年度に培養細胞株においてトセラニブ耐性化にかかわる変異として同定された c.2456A>T 変異が含まれていた。この変異はトセラニブ感受性 KIT c.1523A>T 変異を有するトセラニブ感受性肥満細胞腫細胞株がトセラニブ耐性を獲得するプロセスで生じる KIT の二次変異として同定された変異である。このことから、トセラニブ未治療の犬の肥満細胞腫の腫瘍組織において、予めトセラニブ耐性クローンが存在していることが示唆された。さらに、この変異は腫瘍サンプル中の allele frequency が 0.78% ときわめて微量であり、腫瘍組織中のトセラニブ耐性素因を持つ超微量クローンがトセラニブによる治療過程で選択的に増加することで最終的に腫瘍組織が耐性を獲得する可能性を示すものであった。一方、他の 16 種類の変異についてはこれまでトセラニブに対する感受性を解析した報告がなく、腫瘍のドライバーあるいは耐性化としての役割は不明であった。

(3) これまで一部の KIT 遺伝子の変異については characterize されており、TK 阻害剤感受性のドライバー変異であることや、(1) で確認したように TK 阻害剤抵抗性のドライバー変異であることが示された。しかしながら、(2) で同定した変異だけでなく、

これまで報告されている多くの変異についてドライバーか否か、また TK 阻害剤感受性が抵抗性かについて検討されていない。そこで、(2) で同定した変異の内、比較的 allele frequency の高い変異とこれまで報告された犬の肥満細胞腫の KIT 変異で characterize されていない変異に注目して、KIT リン酸化に及ぼす影響とチロシンキナーゼ阻害剤トセラニブの影響を検討した。解析の対象とした変異は 33 種類で、HEK293 細胞を用いてこれらの変異を有する組換え KIT 蛋白を作製し、リン酸化の状態を評価した (Fig. 3)。その結果、21 種類の変異で KIT の恒常的なリン酸化が認められ、10 種類では統計学的有意差はなかったもののリン酸化が亢進する傾向がみられた。また、2 種類の変異については KIT のリン酸化に影響しないことが示された。このよう

Fig. 1

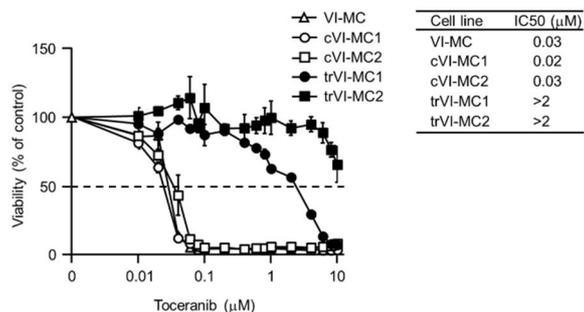


Fig. 2

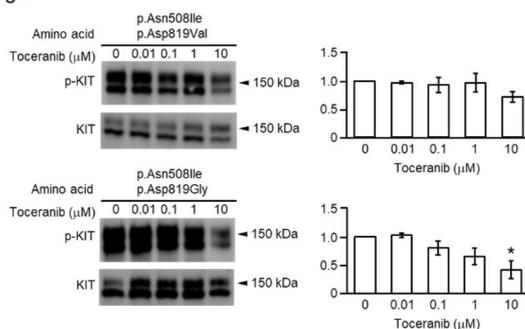
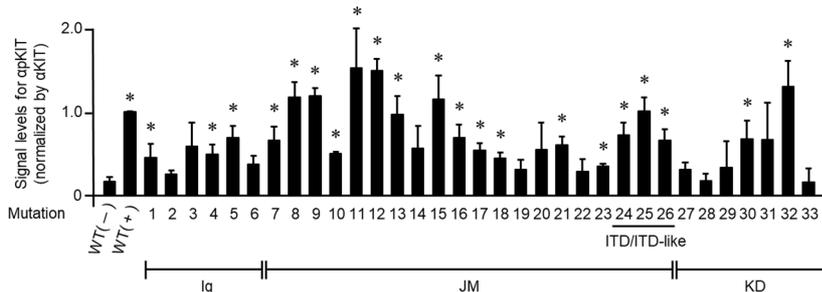


Fig. 3

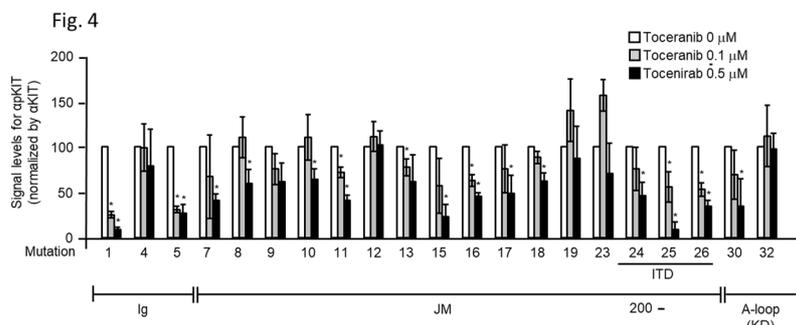


また、2 種類の変異については KIT のリン酸化に影響しないことが示された。このよう

に、必ずしも KIT に見られる全ての変異が機能獲得性の変異ではなく、KIT の機能的変化に与える影響は変異により異なることが示された。KIT に恒常的リン酸化を引き起こした変異 21 種類については、組換え KIT 蛋白を用いて、リン酸化におよぼすトセラニブの影響を検討した

(Fig. 4)。21 種類の変異 KIT の内、15 種類はトセラニブによりリン酸化の抑制がみられた。一方、6 種類ではリン酸化の抑制は認められず、トセラニブ抵抗性の変異であることが示された。この 6 種類の変異の同定は、トセラニブ未治療の犬の肥満細胞腫の腫瘍組織において、予めトセラニブ耐性クローンが存在していることを示すものであった。このように、犬の肥満細胞腫ではドライバーとなっている変異 KIT が常にトセラニブの治療標的とはならず、一部の症例ではトセラニブが不適応となることを示唆している。

本研究から、肥満細胞腫の TK 阻害剤耐性化には、TK 阻害剤暴露による TK 阻害剤耐性の二次変異の発生が重要であることが示された。また、腫瘍組織において予め超微量の TK 阻害剤耐性クローンが存在している場合があることも示された。これらを考慮すると、治療の個別化、とくに TK 阻害剤耐性素因の有無を考慮した個別化治療の確立には、多様な変異 KIT 蛋白の特徴付けと、次世代シーケンス解析など高精度で広範な遺伝子解析を用いた検査が重要と考えられた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tani Hiroyuki, Miyamoto Ryo, Nagashima Tomokazu, Michishita Masaki, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Molecular characterization of canine SHP2 mutants and anti tumour effect of SHP2 inhibitor, SHP099, in a xenograft mouse model of canine histiocytic sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tani Hiroyuki, Miyamoto Ryo, Noguchi Syunya, Kurita Sena, Nagashima Tomokazu, Michishita Masaki, Yayoshi Naoko, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 17
2. 論文標題 A canine case of malignant melanoma carrying a KIT c.1725_1733del mutation treated with toceranib: a case report and in vitro analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 147~147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12917-021-02864-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto Ryo, Tani Hiroyuki, Ikeda Tomoyo, Saima Hono, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 135
2. 論文標題 Commitment toward cell death by activation of autophagy with survivin inhibitor YM155 in two canine squamous cell carcinoma cell lines with high expression of survivin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 412 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2020.10.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Shingo, Nakazawa Maho, Uchida Mona, Yoshitake Ryohei, Nakagawa Takayuki, Nishimura Ryohei, Miyamoto Ryo, Bonkobara Makoto, Yonezawa Tomohiro, Momoi Yasuyuki	4. 巻 57
2. 論文標題 Foxp3+ Regulatory T Cells Associated With CCL17/CCR4 Expression in Carcinomas of Dogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 497 ~ 506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985820921535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani Hiroyuki, Kurita Sena, Miyamoto Ryo, Sawada Harumi, Fujiwara-Igarashi Aki, Michishita Masaki, Azakami Daigo, Hasegawa Daisuke, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 56
2. 論文標題 Nimustine Treatment of 11 Cases of Canine Histiocytic Sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Animal Hospital Association	6. 最初と最後の頁 146 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5326/JAAHA-MS-6959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gentilini Fabio, Turba Maria Elena, Dally Claire, Takanosu Masamine, Kurita Sena, Bonkobara Makoto	4. 巻 16
2. 論文標題 The secondary KIT mutation p.Ala510Val in a cutaneous mast cell tumour carrying the activating mutation p.Asn508Ile confers resistance to masitinib in dogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 64-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12917-020-02284-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurita Sena, Miyamoto Ryo, Tani Hiroyuki, Kobayashi Masato, Sasaki Takashi, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 42
2. 論文標題 Genetic alterations of KIT during clonal expansion and subsequent acquisition of resistance to toceranib in a canine mast cell tumor cell line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 673 ~ 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvp.12816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani Hiroyuki, Kurita Sena, Miyamoto Ryo, Ochiai Kazuhiko, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 18
2. 論文標題 Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 161~168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Igase Masaya, Shousu Kazuha, Fujiki Noriyuki, Sakurai Masashi, Bonkobara Makoto, Hwang Chung C., Coffey Matt, Noguchi Shunsuke, Nemoto Yuki, Mizuno Takuya	4. 巻 17
2. 論文標題 Anti tumour activity of oncolytic reovirus against canine histiocytic sarcoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 184 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 浅倉大輝、亀山仁美、田邊優、佐藤志織、菅沼亮太、田中文哉、山下諒、盆子原誠、田村恭一
2. 発表標題 犬骨髄細胞を用いた骨髄由来免疫抑制細胞の分化誘導
3. 学会等名 日本獣医臨床病理学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 盆子原誠
2. 発表標題 分子標的治療薬のレビュー
3. 学会等名 日本獣医がん学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 崇  (Sasaki Takashi)  (50723897)	札幌医科大学・医学部・講師    (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田崎 弘之  (Tazaki Hiroyuki)  (80231405)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授    (32669)	
研究 分 担 者	皆上 大吾  (Azakami Daigo)  (80453934)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授    (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関