

平成 27 年 10 月 13 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380173

研究課題名(和文) 小動物の悪性腫瘍における癌遺伝子依存性の解析と分子標的療法の基盤構築

研究課題名(英文) Analysis of oncogene addiction and development of molecular-targeted therapy for small animal tumours

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・准教授

研究者番号：50343611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：犬および猫の悪性腫瘍細胞における癌遺伝子依存性の解明と分子標的療法の基盤構築を目的とした。In vitroおよびin vivoの解析から、犬の組織球性肉腫(HS)の株化細胞はダサチニブに強い感受性を示すことが明らかとなった。キノーム解析の結果、HS細胞株では14-3-3 protein gammaが恒常的にリン酸化しており、ダサチニブはこれを抑制することが示された。14-3-3 protein gammaはキナーゼ活性を持たないことから、ダサチニブはその上流のJNK経路のキナーゼに作用したと考えられた。ダサチニブはHSの新たな治療薬となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To establish foundation of molecular-targeted therapy for small animal tumours, we sought canine tumour-derived cell lines that have "oncogene addiction" and analysed signalling pathway(s) on which they depend. A kinase inhibitor, dasatinib, was found to have potent growth inhibitory activity against some histiocytic sarcoma (HS) lines in vitro and in vivo. We then performed kinome analysis using HS lines and found that 14-3-3 protein gamma is constitutively activated in some HS lines that are sensitive to dasatinib. Because 14-3-3 protein gamma does not have kinase activity, it was considered that dasatinib targeted kinase in upper JNK pathway. From these findings, dasatinib could be a potential therapeutic drug for certain HS cases whose tumour cells have constitutively phosphorylated 14-3-3 protein gamma.

研究分野：獣医臨床病理学

キーワード：犬 組織球性肉腫 oncogene addiction キナーゼ ダサチニブ

1. 研究開始当初の背景

細胞が腫瘍化し、さらに悪化する過程には腫瘍関連遺伝子の変異や発現の変化に基づいた多くの異常がかかっている。通常、腫瘍細胞の生存・増殖にはそれらの要素が複雑に関連しており、一つの異常な経路を遮断しても腫瘍細胞を死滅させるあるいは効果的に減少させることは困難である。しかしながら、oncogene addiction を有している腫瘍では、依存している oncogene の発現や機能を選択的に抑制する治療、すなわち分子標的療法が細胞死を誘導する上できわめて効果的と考えられている。

犬および猫の悪性腫瘍である肥満細胞腫には、幹細胞因子のレセプターである KIT の driver mutation に強く依存して増殖する oncogene addiction の強いタイプが存在する。これまで申請者は、そのような症例では KIT を阻害する分子標的薬イマチニブを用いた分子標的療法が臨床的に著しい抗腫瘍効果を現わすことを明らかにした。したがって、oncogene addiction を有している腫瘍と依存している異常なシグナル経路を見出すことで、その経路を標的とした分子標的療法の適応が可能となる。さらに、その異常な経路をバイオマーカーとして適応症例を選別し分子標的療法を実施する“個別化治療”を小動物医療において提唱することにつながると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、まず oncogene addiction を有する犬の悪性腫瘍由来腫瘍細胞株を特定し、次いで質量解析と抗体アレイを中心とする包括的なキナーゼ動態の解析により、腫瘍細胞が依存しているシグナル経路を明らかにすることを目的とした。さらに特定したシグナル経路については、addiction を引き起こすメカニズムを解明し、当該分子機構を標的とした個別化分子標的療法の確立を試みることにした。

3. 研究の方法

a. 分子標的薬/シズ化合物を用いた腫瘍細胞株のスクリーニング

日本獣医生命科学大学獣医臨床病理学教室で保有している 30 種類以上の犬および猫の悪性腫瘍株化細胞を用いた。スクリーニングには 15 種類の製剤化された分子標的薬を含む 400 種類の化合物ライブラリーを用いた。

b. シグナル伝達経路の解析

上記のスクリーニングから犬の組織球性肉腫の株化細胞はマルチキナーゼ阻害剤であるダサチニブに強い感受性を示したことから、犬の組織球性肉腫株化細胞に注目してシグナル伝達経路の解析を行った。まず、ダサチニブの標的キナーゼである Src family kinase (Src, Lck, Yes および Fyn)、Bcr-Abl、Kit、PDGFRβ および EphA2 について qPCR、シ

ーケンス解析、ゲノム遺伝子増幅の解析、およびウエスタンブロット解析を行い、遺伝子および蛋白レベルでの標的分子探索を行った。また、細胞内シグナル伝達経路の最下流に位置する JAK-STAT 経路、AKT 経路、PI3K 経路の異常の有無についてウエスタンブロットングを用いた解析を行った。次いで、犬の組織球性肉腫細胞株より抽出したタンパクの Phos-Tag-二次元電気泳動解析と質量解析を行った。

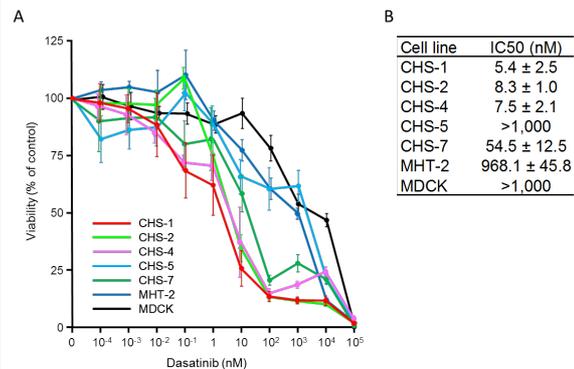
c. in vivo での薬効評価

ダサチニブに高い感受性を示す犬の組織球性肉腫株化細胞 CHS-1 細胞を用いて犬 HS 移植マウスモデルを作製し、ダサチニブの効果を検討した。ダサチニブの投与による腫瘍サイズの変化を調べるとともに、腫瘍組織における Ki-67 指数とアポトーシス指数を評価した。

4. 研究成果

日本獣医生命科学大学獣医臨床病理学教室で保有している犬および猫の悪性腫瘍株化細胞を用いて 400 種類の化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、犬の組織球性肉腫細胞株の中には、ダサチニブが著しい増殖抑制効果を現わす細胞株 (CHS-1、CHS-2、CHS-4) が存在することが明らかとなった (図 1)。

図 1



そこで、ダサチニブの標的分子の mRNA の発現量、遺伝子増幅の有無、変異の有無、さらに細胞内シグナル伝達経路の最下流に位置する JAK-STAT 経路、AKT 経路、PI3K 経路の活性について、ダサチニブ感受性および非感受性細胞株の相違を検索したが、明らかな相違は見られなかった。

次いで、ダサチニブ感受性の異なる犬の組織球性肉腫細胞株 (高感受性株, CHS-1; 低感受性株, MHT-2) より抽出したタンパクを用いて Phos-Tag 二次元電気泳動解析/質量解析によるリン酸化蛋白質の網羅的解析を行った。その結果、図 2A に示すような高感受性株と低感受性株で明らかにリン酸化レベルの異なる蛋白質が検出された。さらにこの蛋白質のリン酸化レベルは、ダサチニブを添加することで明らかに抑制された (図 2B)。こ

図 2A

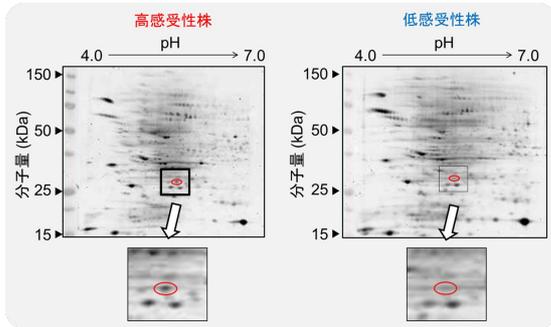
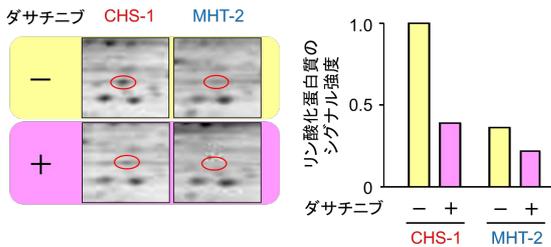


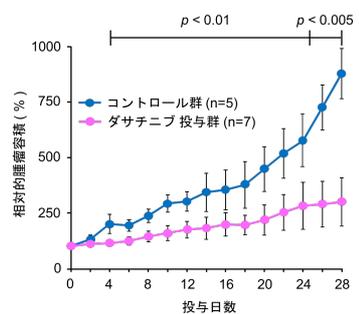
図 2B



この分子は 14-3-3 protein gamma であることが明らかとなった。このことから、ダサチニブに感受性を示す犬の組織球性肉腫細胞株では、14-3-3 protein gamma が恒常的にリン酸化しており、このリン酸化はダサチニブにより抑制されると考えられた。リン酸化した 14-3-3 protein gamma は、DNA 損傷チェックポイント機構における ATR-Chk1-Cdc25A 経路に作用して細胞周期を促進させることから、CHS-1 細胞の増殖には 14-3-3 protein gamma の恒常的なリン酸化が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、14-3-3 protein gamma はキナーゼ活性を持たずダサチニブの標的にはならないことから、ダサチニブはその上流の JNK 経路のキナーゼに作用することで 14-3-3 protein gamma のリン酸化を抑制し、CHS-1 細胞の増殖を抑制したと考えられた。

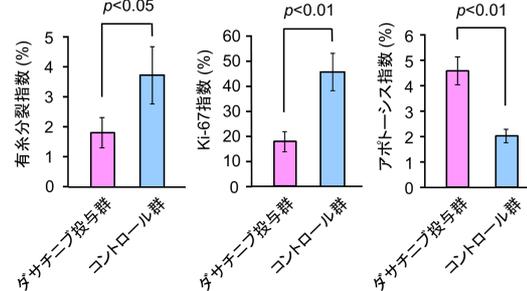
以上の結果に基づき、in vivo におけるダサチニブの作用について解析を行った。本実験には、14-3-3 protein gamma が恒常的にリン酸化している CHS-1 細胞を用いた。CHS-1 細胞を用いた犬 HS 移植マウスモデルを作製し、ダサチニブの効果を検討した結果、ダサチニブは in vivo において CHS-1 細胞に対して増殖抑制効果を示すことが明らかとなった(図 3)。また、ダサチニブ投与群の腫瘍組

図 3



織では、コントロール群の腫瘍組織に比べて有糸分裂指数および Ki-67 指数が有意に低く、アポトーシス指数が有意に高かったことから(図 4)、ダサチニブによる移植腫瘍の増殖

図 4



抑制は細胞分裂の抑制と細胞死の促進により引き起こされたと考えられた。今回の結果から、ダサチニブは CHS-1 細胞に対して in vivo で増殖抑制効果を示すことが明らかとなり、HS 症例において腫瘍細胞の 14-3-3 protein gamma が恒常的にリン酸化している場合には、ダサチニブの効果が期待できると考えられた。

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 18 件)

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. In press.

Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice.

Bonkobara M.

Vet J. 2015. In press.

Ito K, Kobayashi M, Kuroki S, Sasaki Y, Iwata T, Mori K, Kuroki T, Ozawa Y, Tetsuka M, Nakagawa T, Hiroi T, Yamamoto H, Ono K, Washizu T, **Bonkobara M.**

The proteasome inhibitor bortezomib inhibits the growth of canine malignant melanoma cells in vitro and in vivo. Vet J. 2013. 198(3):577-82.

Nozawa S, Oda H, Akiyama R, Ueda K, Saeki K, Shono S, Maruyama N, Murata A, **Tazaki H.** Mori A, Momota Y, Azakami D, Sako T, Ishioka K.

Decreased gene expressions of insulin signal molecules in canine hyperadrenocorticism. J Vet Med Sci. 2014. 76:1177-82.

Ochiai K, Hayama S, Nakiri S, Nakanishi S, Ishii

N, Uno T, Kato T, Konno F, Kawamoto Y, Tsuchida S, **Omi T.**
Low blood cell counts in wild Japanese monkeys after the Fukushima Daiichi nuclear disaster. Sci Rep. 2014. 4:5793.

Sugiyama S, Chong YH, Shito M, Kasuga M, Kawakami T, Udagawa C, Aoki H, **Bonkobara M.** Tsuchida S, Sakamoto A, Okuda H, Nagai A, **Omi T.**
Analysis of mitochondrial DNA HVR1 haplotype of pure-bred domestic dogs in Japan. Leg Med (Tokyo). 2013. 15:303-9.

Udagawa C, Tada N, Asano J, Ishioka K, Ochiai K, **Bonkobara M.** Tsuchida S, **Omi T.**
The genetic association study between polymorphisms in uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 and metabolic data in dogs. BMC Res Notes. 2014. 7:904.

Tomura S, Uchida M, Yonezawa T, Kobayashi M, **Bonkobara M.** Arai S, Miyazaki T, Tamahara S, Matsuki N.
Molecular cloning and gene expression of canine apoptosis inhibitor of macrophage. J Vet Med Sci. 2014. 76:1641-5.

Kobayashi M, Kuroki S, Ito K, Yasuda A, Sawada H, Ono K, Washizu T, **Bonkobara M.**
Imatinib-associated tumour response in a dog with a non-resectable gastrointestinal stromal tumour harbouring a c-kit exon 11 deletion mutation. Vet J. 2013. 198:271-4.

Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Takahashi M, Nakagawa T, Takeuchi A, **Bonkobara M.** Kobayashi T, Ohno K, Uchida K, Asano K, Nishimura R, Nakayama H, Sugano S, Ohashi Y, Tsujimoto H.
Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. Vet J. 2013. 196:492-8.

Ito K, Kuroki S, Kobayashi M, Ono K, Washizu T, **Bonkobara M.**
Identification of dasatinib as an in vitro potent growth inhibitor of canine histiocytic sarcoma cells. Vet J. 2013. 196:536-40.

Hayama S, Nakiri S, Nakanishi S, Ishii N, Uno T, Kato T, Konno F, Kawamoto Y, Tsuchida S, Ochiai K, **Omi T.**
Concentration of radiocesium in the wild Japanese monkey (*Macaca fuscata*) over the first 15 months after the Fukushima Daiichi nuclear

disaster. PLoS One. 2013. 8:e68530.

Ochiai K, Watanabe M, Azakami D, Michishita M, Yoshikawa Y, Udagawa C, Methenukul P, Chahomchuen T, Aoki H, Kumon H, Morimatsu M, **Omi T.**
Molecular cloning and tumour suppressor function analysis of canine REIC/Dkk-3 in mammary gland tumours. Vet J. 2013. 197:769-75.

Takahashi F, Mochizuki M, Sato T, Katayama K, Kenyon PR, Morris ST, Kemp PD, Ozawa T, Ueda F, **Tazaki H.**
Semiquantitative multi-analysis of plasma obtained from Romney lambs (*Ovis aries*) by inductively coupled plasma mass spectrometry, and the classification according to feed type. Anim Sci J. 2013. 84:496-501.

Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Okuda K, Taoda T, Chikazawa S, Shimamura A, **Omi T.** **Bonkobara M.** Orino K, Watanabe K.
Establishment of a PCR analysis method for canine BRCA2. BMC Res Notes. 2012. 5:173.

Kobayashi M, Sugisaki O, Ishii N, Yamada O, Ito K, Kuroki S, Sasaki Y, Ono K, Washizu T, **Bonkobara M.**
Canine intestinal mast cell tumor with c-kit exon 8 mutation responsive to imatinib therapy. Vet J. 2012. 193:264-7.

Chung JS, **Tomihari M.** Tamura K, Kojima T, Cruz PD Jr, Ariizumi K.
The DC-HIL ligand syndecan-4 is a negative regulator of T-cell allo-reactivity responsible for graft-versus-host disease. Immunology. 2013. 183:173-182.

Katayama K, Sato T, Arai T, Amao H, Ohta Y, Ozawa T, Kenyon PR, Hickson RE, **Tazaki H.**
Non-targeted analyses of animal plasma: betaine and choline represent the nutritional and metabolic status. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2013. 97:119-125.

〔学会発表〕(計 13件)

盆子原誠

獣医療における分子標的薬の展望
獣医内科アカデミー(招待講演)2015.

小林正人、黒木詩織、伊藤慶太、安田暁子、澤田治美、小野憲一郎、鷺巣月美、**盆子原誠**
イマチニブが奏功した犬の消化管間質腫瘍の1症例
獣医臨床病理学会 2013.

盆子原誠

イマチニブの登場と肥満細胞腫の治療
獣医内科アカデミー（招待講演）2014.

Makoto BONKOBARA

Molecular targeted therapy with imatinib in
canine and feline mast cell tumors.
2012 RIVM International Symposium.韓国.
2012.

Makoto BONKOBARA

Molecular basis of imatinib therapy in mast cell
tumors.
WSAVA FASAVA 2013. ニュージーランド.
2013.

Makoto BONKOBARA

Molecular-targeting therapy with imatinib in
mast cell tumors.
WSAVA FASAVA 2013. ニュージーランド.
2013.

Keita ITO, Shiori KUROKI, Masato
KOBAYASHI, Jason Wilson, Tsukimi
WASHIZU, **Makoto BONKOBARA**.

In vitro Screening of Compounds led to the
Identification of Dasatinib as a Potent Growth
Inhibitor for Canine Histiocytic Sarcoma Cells.
WSAVA FASAVA 2013. ニュージーランド.
2013.

Toshinori OMI, Masayuki SHITOH, Chihiro
UDAGAWA Naomi DADA, Yong Hwa CHONG,
Kazuhiko OCHIAI Atushi SAKAMOTO Shuichi
TSUCHIDA, Shinichi HAYAMA

Development of Y-chromosomal microsatellite
markers in Japanese macaque (*Macaca fuscata*)
population of Fukushima. オーストラリア
2012.

伊藤慶太、池谷早代、竹下恭平、黒木詩織、
小林正人、**盆子原誠**、鷲巣月美
犬組織球性肉腫に対するダサチニブの増殖
抑制効果に関する研究
第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012.

手塚雅典、中川朋子、廣井輝代、山本仁美、
小澤佑太、伊藤慶太、黒木詩織、小林正人、
盆子原誠、鷲巣月美
犬の悪性黒色腫細胞に対する Bortezomib の
増殖抑制効果に関する研究
第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012.

田中優、小堤友香梨、守谷友加里、上原裕司、
小林正人、杉崎修、伊藤慶太、黒木詩織、**盆子原誠**、鷲巣月美
犬のイマチニブ耐性肥満細胞腫細胞株の樹
立と耐性化機構の解析
第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012.

落合和彦、塩入弓絵、染田沙織、大澤有加、
宇田川智野、森松正美、吉川泰永、**盆子原誠**、
土田修一、**近江俊徳**

イヌ乳腺腫瘍関連遺伝子 BRCA2 の BRC
repeat 3 に存在する SNPs の頻度および機能に
及ぼす影響の検討
第 155 回日本獣医学会学術集会. 2012.

宇田川智野、多田尚美、青木博史、**盆子原誠**、
土田修一、落合和彦、石岡克己、鄭英和、**近江俊徳**

イヌ UCP2 および UCP3 : SNP ディスカバリ
ーと 2 犬種の SNP ジェノタイピング
第 155 回日本獣医学会学術集会. 2012.

〔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：
出願年月日：
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・准教授
研究者番号：50343611

(2) 研究分担者

田崎弘之 (HIROYUKI TAZAKI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：80231405

近江俊徳 (TOSHINORI OMI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：40296091

富張瑞樹 (MIZUKI TOMIHARI)
帯広畜産大学・畜産学部・講師
研究者番号： 00552754

(3)連携研究者

島田隆 (TAKASHI SHIMADA)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号： 20125074