

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580395

研究課題名（和文）小動物の悪性腫瘍における受容体型チロシンキナーゼ異常の解析と分子標的療法の確立

研究課題名（英文）Analysis of aberrantly activated receptor tyrosine kinase and development of molecular targeting therapy in small animals with malignancies.

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

研究成果の概要（和文）：猫および犬の肥満細胞腫における KIT の変異と変異 KIT のリン酸化におよぼすイマチニブの影響を invitro および臨床例を用いて評価した。猫と犬の肥満細胞腫において c-kit エクソン 8 と 9 の変異を同定した。これらの変異は KIT の恒常的はリン酸化を引き起こし、イマチニブはそのリン酸化を抑制した。肥満細胞腫の猫および犬にイマチニブを投与したところ、これらの c-kit に変異を持つ症例で良好な反応が見られた。c-kit エクソン 8 と 9 に変異を持つ肥満細胞腫の症例において、イマチニブは有益な治療法となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The mutation status of KIT and effects of imatinib on the mutant KIT were investigated in vitro and in clinical cases of cats and dogs with mast cell tumors (MCTs). Mutations in c-kit exon 8 and 9 were identified in tumor cells from cats and dogs with MCTs. These mutations caused constitutive phosphorylation of KIT. Imatinib suppressed the phosphorylation of the mutant KIT. A beneficial response to imatinib was observed in cats and dogs that had a mutation in c-kit exon 8 or 9. MCTs with mutations in c-kit exon 8 and 9 are potentially sensitive to imatinib in dogs and cats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：c-kit、猫、肥満細胞腫、チロシンキナーゼ、分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

細胞におけるチロシンキナーゼ活性の調節機構は適切な細胞増殖を制御する上できわめて重要であり、また、その破綻は細胞の腫瘍性増殖を引き起こす原因となる。一方、異常なチロシンキナーゼに対して、メシル酸イマチニブなどの低分子チロシンキナーゼ

阻害剤はチロシンキナーゼの ATP 結合ポケットに入り込み、リン酸化を阻害し細胞死を引き起こすことが知られている。動物の悪性腫瘍においてチロシンキナーゼの異常を同定することは、低分子チロシンキナーゼ阻害剤を用いた新たな治療法の確立につながると思われる。

2. 研究の目的

本研究は猫および犬の肥満細胞腫の腫瘍細胞を用いて、KIT のチロシンキナーゼ活性の異常を引き起こす新たな変異を同定することを目的とした。さらに、猫と犬の肥満細胞腫の臨床例において、低分子チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブを用いた分子標的療法の効果の評価することとした。

3. 研究の方法

肥満細胞腫と診断された猫および犬の腫瘍細胞から抽出した RNA を用いて c-kit 遺伝子全長配列の解析を行った。また、DNA のみ得られた症例については、人で c-kit 遺伝子変異多発部位とされている Exon 8、9、11、13、および 17 について塩基配列を解析し。同定した変異 c-kit については 293 細胞に導入し、KIT リン酸化の状態を調べた。さらに、このリン酸化におよぼすイマチニブの影響を検討した。次いで、肥満細胞腫と診断された猫および犬にイマチニブを投与し、臨床的なイマチニブ効果を評価した。

4. 研究成果

猫の肥満細胞腫における c-kit の変異保有率は 67.7%であった (表 1)。c-kit の変異は

表1

Mutation	No. of cats examined	No. of positive cats (%)
Exon 6	17	1 (5.9)
c.957_966delinsT		1
Exon 8	62	28* (45.2)
c.1244_1255dup		25
c.1256_1264delinsTCA		1
c.1256_1262delinsT		2
Exon 9	62	15* (24.2)
c.1430G>T		12
c.1517_1518delinsTT		3
Exon 11	62	1 (1.6)
c.1661_1663delinsGCAAGTGCACCC		1
Exon 13	62	0 (0)
Exon 17	62	0 (0)
Other exons	17	0 (0)

* Three cats possessed mutations in exon 8 (c.1244_1255dup) and exon 9 (c.1430G>T, two cats; c.1517_1518delinsTT, one cat) simultaneously.

KIT の第 5 イムノグロブリン様領域をコードするエクソン 8 (45.2%) と 9 (24.2%) に多くみられた。エクソン 8 の変異の多くは ITD 変異であり、エクソン 9 の変異には 1 アミノ酸置換を生じる点変異と欠失挿入変異であった。エクソン 6 および 11 の変異の保有率はわずかであった。犬の肥満細胞腫については、新たな 2 種類の変異 (エクソン 8 および 9) を同定した。

猫のエクソン 8 あるいは 9 に変異を持つ 5 種類の変異 c-kit 遺伝子については、293 細胞に遺伝子導入し、これらの変異がおよぼす KIT のリン酸化状態への影響を調べた。図 1 に示すように、いずれの変異もリガンドである幹細胞因子 (SCF) の有無に関わらず KIT のリン酸化が見られた。さらにこれらのリン酸化はイマチニブによって抑制された (図 2)。

したがって、これらの変異は恒常的な KIT のリン酸化を引き起こす機能獲得性の変異であることが示され、イマチニブはこれらのリン酸化を抑制できると考えられた。犬の肥満細胞腫で見られた c-kit エクソン 8 および 9 の変異も機能獲得性変異であることが示され、イマチニブは 293 細胞に発現したこれらの変異 KIT のリン酸化も抑制した。

図1

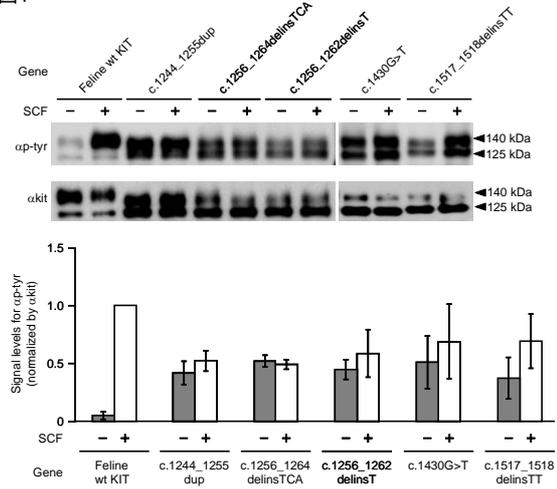
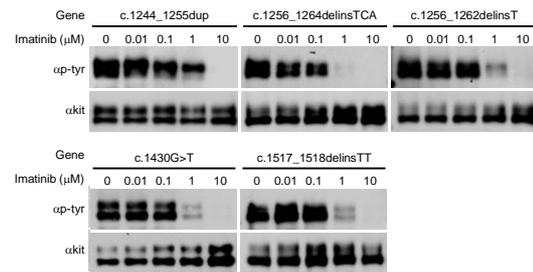


図2



次いで、肥満細胞腫の猫 10 症例にイマチニブを投与し、腫瘍の反応を評価した (表 2)。肥満細胞腫の猫 10 症例中 8 症例で c-kit エクソン 8 あるいは 9 の変異がみられ、この 8 症例中 7 症例でイマチニブに対する明らかな反応が認められた。1 症例は明らかな反応はみられなかったが、腫瘍サイズの増加も認められなかった。一方、変異がみられなかった 2 症例の内、1 症例で明らかな腫瘍の縮小がみられた。この症例の c-kit の全長塩基配列を解析したが変異は認められなかった。この症例にはイマチニブに感受性を持つ他の分子メカニズムが存在すると考えられた。犬の肥満細胞腫では、c-kit エクソン 8 および 9 に変異を有する症例でイマチニブの効果が見られ、これらの変異を持つ腫瘍細胞はイマチニブに対して感受性を持つと考えられた。

以上のことから、KIT の第 5 イムノグロブリン様領域の変異は猫の肥満細胞腫で多くみられる変異であり、イマチニブに対して感受性を持つと考えられた。また、犬の肥満細胞腫

胞腫においても c kit エクソン 8 および 9 に変異を有する症例ではイマチニブを用いた分子標的療法が応用できるのではないかと考えられた。

表2

Case No.	Affected region / mastocytoma	Mutation	Best response / time to response (wks)	Treatment period (wks) / status at the end of treatment
1	Skin (S) / -	Exon 8 (c.1244_1255dup)	PR / 3	3 / PR
2	Skin (M), spleen, liver / +	Exon 8 (c.1244_1255dup)	PR / 3	32 / PD
3	Skin (M) / -	Exon 8 (c.1244_1255dup)	PR / 3	18 / PR
4	Spleen, liver / +	Exon 8 (c.1244_1255dup)	CR / 2	2 / CR
5	Spleen, liver / +	Exon 8 (c.1244_1255dup)	SD	13 / SD
6	Skin (M) / -	Exon 9 (c.1430G>T)	PR / 2	11 / PD
7	Skin (S) / -	Exon 9 (c.1430G>T)	PR / 2	9 / PR
8	Skin (S) / -	Exon 9 (c.1517_1518delinsTT)	PR / 3	12 / PR
9	Skin (M), spleen, liver / +	None	PR / 3	14 / PR
10	Skin (S) / +	None	SD	4 / SD

(S), solitary lesion; (M), multiple lesions; SPN, splenectomy; CR, complete remission; PR, partial remission; SD, stable disease; PD, progressive disease.

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6件)

Mutations in the fifth immunoglobulin-like domain of kit are common and potentially sensitive to imatinib mesylate in feline mast cell tumors. Isotani M, Yamada O, Lachowicz J.L, Tamura K, Yagihara H, Fujino Y, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. British Journal of Haematology. 148(1):144-153. 2010.

Establishment and Characterization of Canine Rhabdomyosarcoma Cell Line, CMS-C. Azakami D, Shibutani H, Dohi M, Takasaki M, Ishioka K, Mori A, Momota Y, Bonkobara M, Washizu T, Michishita M, Hatakeyama H, Ogasawara S, Sako T. Journal of Veterinary Medical Science. 73(8):1105-1108. 2011.

Reconstruction of stratum corneum in organotypically cultured canine keratinocyte-derived CPEK cells. Yagihara H, Okumura T, Shiomi E, Shinozaki N, Kuroki S, Sasaki Y, Ito K, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Veterinary Research Communications. 35(7):433-437. 2011.

Imatinib elicited a favorable response in a dog with a mast cell tumor carrying a c kit c.1523A>T mutation via suppression of constitutive KIT activation. Yamada O, Kobayashi M, Sugisaki O, Ishii N, Ito K, Kuroki S, Sasaki Y, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Veterinary Immunology and Immunopathology. 142:101-106. 2011.

Canine intestinal mast cell tumor with c kit exon 8 mutation responsive to imatinib therapy. Kobayashi M, Sugisaki O, Ishii N, Yamada O, Ito K, Kuroki S, Sasaki Y, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Veterinary Journal. 2011 in press. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.10.027

Establishment of a PCR analysis method for canine BRCA2. Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Okuda K, Taoda T, Chikazawa S, Shimamura A, Omi T, Bonkobara M, Orino K, Watanabe K.

BMC Res Notes. in press. doi:10.1186/1756-0500-5-173

[学会発表](計9件)

腫瘍の遺伝子検査 ~ 犬と猫の肥満細胞腫 ~ 益子原誠
日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会, 2012年

猫の肥満細胞腫の現状と分子標的療法 益子原誠
West Japan Veterinary Forum, 2011年

犬の腫瘍の新しい診断・治療戦略 ~ 肥満細胞腫 益子原誠
予防動物医学研究会シンポジウム, 2011年

犬と猫の肥満細胞腫に対する分子標的療法の展開 ~ c kit 変異とイマチニブの効果 ~ 益子原誠
日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会/日本獣医皮膚科学会, 2011年

イマチニブが奏功した c kit エクソン 8 に重複配列挿入変異を有する腸管型肥満細胞腫の犬の1例
小林正人・杉崎修、小堤友香梨・田中優・守谷友加里・石井典子・伊藤慶太・益子原誠・小野憲一郎・鷲巣月美
日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会/日本獣医皮膚科学会, 2011年

イマチニブが奏功した c kit エクソン 9 に点変異を有する肥満細胞腫の犬の1例
小林正人・杉崎修、小堤友香梨・田中優・守谷友加里・石井典子・山田理・磯谷真由・伊藤慶太・益子原誠・小野憲一郎・鷲巣月美
第150回日本獣医学会, 2010年

犬の悪性黒色腫株化細胞に対する分子標的薬の増殖抑制効果に関する研究
岩田泰介・黒木哲也・森光平・小澤佑太・手塚雅典・中川朋子・廣井輝代・伊藤慶太・益子原誠・小野憲一郎・鷲巣月美

第 150 回日本獣医学会, 2010 年

猫の肥満細胞腫における新規 c kit 遺伝子変異の同定とイマチニブによる KIT リン酸化抑制の検討

石井典子・杉崎修・小林正人・山田理・西上達也・吉田俊一・磯谷真弓・伊藤慶太・盆子原誠・小野憲一郎・鷲巢月美

第 150 回日本獣医学会, 2010 年

イマチニブが奏功した c kit エクソン 9 に点変異を有する肥満細胞腫の犬の 1 例

杉崎修・小林正人・小堤友香梨・田中優・守谷友加里・石井典子・山田理・磯谷真由・伊藤慶太・盆子原誠・小野憲一郎・鷲巢月美

日本獣医臨床病理学会, 大阪シンポジウム, 2010 年

〔図書〕(計 1 件)

予防動物医学研究会 編 犬と猫の早期疾病診断学

盆子原誠 他多数 チクサン出版社, 2011 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jspvm.com/department/center/index.html>

日本獣医生命科学大学「動物疾病制御研究拠点形成プロジェクト」で分子標的薬の薬効評価システムの開発として紹介

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

なし()

研究者番号:

(3) 連携研究者

新井敏郎 (TOSHIRO ARAI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号: 70184257

小野憲一郎 (KENICHIRO ONO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・客員教授

研究者番号: 50111480