

犬の組織球性肉腫株化細胞に対するダサチニブの
増殖抑制効果に関する研究

(Studies on growth inhibitory effects of dasatinib
against canine histiocytic sarcoma cell lines)

伊藤 慶太

犬の組織球性肉腫株化細胞に対するダサチニブの
増殖抑制効果に関する研究

(Studies on growth inhibitory effects of dasatinib
against canine histiocytic sarcoma cell lines)

伊藤 慶太

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
(指導教授：鷺巣月美)

平成 26 年 3 月

目次

第1章	序論	1
第2章	HS 細胞の生存・増殖に必要な分子機構の網羅的探索	4
	材料と方法	6
	結果	8
	考察	9
	小括	12
	表および図	13
第3章	HS 細胞におけるダサチニブの標的分子の解析	25
	実験 1. ダサチニブの既知標的分子の解析	
	材料と方法	28
	結果	35
	実験 2. リン酸化蛋白質の網羅的解析によるダサチニブの新規標的分子の検索	
	材料と方法	37
	結果	39
	考察	40
	小括	43
	表および図	45
第4章	犬 HS 移植マウスモデルにおけるダサチニブの効果	58
	材料と方法	60
	結果	62
	考察	63
	小括	65
	図	66
第5章	総括	71
	謝辞	77
	参考文献	78

第 1 章

序論

犬の組織球性肉腫 (HS)はマクロファージや樹状細胞を含む組織球系細胞に由来し、進行性で転移率が高く、致死性の腫瘍である [1]。バーニーズ・マウンテン・ドッグ、フラットコートド・レトリバー、ロットワイラーおよびゴールデン・レトリバーでの発生率が高いと報告されているが [2]、特にバーニーズ・マウンテン・ドッグやフラットコートド・レトリバーの遺伝的因子が HS の発生や増殖の一因となる可能性が示唆されている [1, 3, 4-6]。

HS の治療では、局所に発生した病変に対して外科的治療が適用される [2, 3]。また、術後の補助的治療として、あるいは外科的治療が適用できない症例に対しては化学療法が単独もしくは放射線治療と併用して用いられている [2, 7-9]。肉眼病変を有する HS 症例に対してロムスチン (CCNU)を用いた治療では全奏効率が 46%と有効性は認められるが、中央生存期間は3ヶ月から6ヶ月と短い [10]。

多くの腫瘍では、その生存・増殖に、増殖シグナル伝達機構、細胞周期関連分子、アポトーシス関連分子、血管新生あるいはDNA複製・修復機構などの異常が複雑に関与している。このように多様な分子機構の異常により増殖する腫瘍では、単一の異常な分子機構を阻害しても強力な抗腫瘍効果を得ることは難しいが、近年、腫瘍によっては単一の分子の異常に基づく異常なシグナル経路に強く依存して生存・増殖するものがあることが明らかになってきた。このような腫瘍に対しては、単一の異常分子を選択的に阻害し下流のシグナル経路を抑制することで著しい抗腫瘍効果が得られる。この異常な分子を選択的に阻害する化合物を分子標的薬といい、近年、人医療および獣医療において使用されるようになってきた。分子標的薬の多くはキナーゼを標的とした阻害剤である。このような分子標

的薬は遺伝子変異などにより異常に活性化したキナーゼの ATP 結合部に結合し、その分子のリン酸化シグナルを抑制することで抗腫瘍効果を示す。これまでに、人では Bcr-Abl を有する慢性骨髄性白血病 [11]、EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞性肺癌 [12]および ALK 融合遺伝子を有する進行性肺癌 [13]などの多くの悪性腫瘍、犬および猫では KIT 遺伝子変異を有する肥満細胞腫で分子標的薬の有効性が示されている [14-17]。

これらのことから、既存の治療法では十分な効果が得られない HS に対して分子標的薬による新たな治療法の可能性を模索する価値があると考えた。HS に対する分子標的薬を用いた治療法を確立するためには、HS の生存・増殖に必要な不可欠な分子機構を特定する必要がある。これまで HS では癌抑制遺伝子の発現異常や転写制御に関わる分子の異常が腫瘍の増殖に関与していることが報告されているが [18, 19]、HS 細胞の生存・増殖に中心的役割を果たしている分子機構は特定されていないため、分子標的薬を用いた治療戦略は確立されていない。

そこで本研究では、HS に対して分子標的薬を用いた治療法を確立するために、まず第 2 章で、細胞内シグナル伝達に関わる分子を阻害する化合物を用いて HS 細胞の生存・増殖に必要な分子機構を検索した。次いで第 3 章では、HS 細胞の増殖を抑制する化合物について、標的分子の遺伝子異常の有無とそれらの下流のシグナル経路の活性化状態を評価した。また、この化合物の新たな標的分子を検索した。さらに第 4 章では犬 HS 移植マウスモデルを作製し、*in vitro* で HS 株化細胞の増殖を抑制した化合物の *in vivo* における効果を検討した。

第 2 章

HS 細胞の生存・増殖に必要な分子機構の網羅的探索

犬の組織球性肉腫（HS）は進行性で致死的な腫瘍である。治療には外科手術、放射線治療および CCNU などを用いた化学療法が行われているが、現在のところ、これらの治療法では十分な効果は得られておらず、短期間で死に至ることが多い [10]。以上のことから、HS に対する新たな治療法が求められている。

分子標的薬は、腫瘍の生存・増殖に必要な分子機構を阻害することで抗腫瘍効果を示す。このため HS に対する分子標的薬を用いた治療法を確立するためには、このような分子機構を特定する必要がある。これまで HS においても生存・増殖に関わる分子機構の解析が行われ、ゲノム DNA の増幅異常により癌抑制遺伝子 CDKN2 A/B、PB1 および PTEN の欠失が起こり、p53 経路および RB 経路に異常が発生すること [18]、また、転写制御や DNA の構造維持に関わる HMGB1 分子および RAGE 分子の発現異常が HS の増殖に関与していることが報告されている [19]。しかしながら、HS の生存・増殖に決定的な役割を果たしている分子機構は特定されておらず、このため分子標的薬を用いた治療法は確立されていない。

そこで本章では、HS 細胞がどのような分子機構に依存して生存・増殖しているかを調べるため、細胞内シグナル伝達に関わる分子を阻害する 219 種類の化合物（化合物ライブラリー）を用いて 2 種類の HS 株化細胞に対する細胞増殖抑制試験を行った。次いで、細胞増殖抑制を示した化合物を用いて 6 種類の HS 株化細胞に対する細胞増殖抑制効果を検討した。

材料と方法

化合物

細胞増殖抑制試験には、文部科学省・化学療法基盤情報支援班より分与された 219 種類の化合物ライブラリーを用いた (Table 2-1)。ライブラリーに含まれる各化合物は 100 μ M になるように 50%メタノールで溶解し、使用時まで-30 $^{\circ}$ Cにて保存した。ダサチニブは LC Laboratories より購入し、10 mM になるように 100%の dimethyl sulfoxide (DMSO)で溶解し、使用時まで-30 $^{\circ}$ Cにて保存した。

株化細胞

本研究室で樹立した HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5 および CHS-7) [20]、今回新たに樹立した HS 株化細胞 (MHT-2)および犬正常腎上皮株化細胞 (MDCK; Madin-Darby canine kidney)を用いた。これらの細胞は 10% 非働化牛胎仔血清 (FCS; Nippon Bio-supply Center、Tokyo、Japan)、50 U/ml のペニシリンおよび 50 μ g/ml のストレプトマイシン (Invitrogen)を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) (cDMEM)で、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂の湿潤環境下で培養した。

化合物を用いた細胞増殖抑制試験

cDMEM で懸濁した CHS-1 および MHT-2 細胞を、96 ウェルプレート上に 5,000 個/ウェルで播種し、24 時間培養した。次いで、219 種類の化合物をそれぞれ 1 ウェルに 100 nM

となるように添加し、72 時間培養後に WST-1 cell proliferation assay kit (Takara)を用いて生存細胞数を評価した。化合物の代わりに 50%メタノールのみを添加した条件での細胞生存率を 100%とした際に、60%以上の細胞増殖抑制を示すものを候補化合物とした。次いで、MDCK 細胞を 96 ウェルプレート上に 200 個/ウェルで播種し、各ウェルに候補化合物を同様に添加した。これにより 60%以上の細胞増殖抑制効果を示す化合物を候補化合物から除外した。

HS 株化細胞に対するダサチニブの細胞増殖抑制効果の検討

cDMEM で懸濁した 6 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7 および MHT-2)を 96 ウェルプレート上にそれぞれ 5,000 個/ウェルで播種し、24 時間培養した。また、cDMEM で懸濁した MDCK 細胞を 200 個/ウェルで播種し、同様に培養した。次いで、ダサチニブを $0-10^5$ nM の濃度になるように各ウェルに添加し、72 時間培養後に WST-1 cell proliferation assay kit (Takara)を用いて生存細胞数を評価した。DMSO のみを添加した条件での細胞生存率を 100%として細胞増殖抑制曲線を作成し、GraphPad Prism software program (GraphPad Software)を用いて各株化細胞に対するダサチニブの 50%細胞増殖抑制濃度 (IC50)を算出した。

結果

細胞増殖抑制効果を示す化合物の同定

Fig. 2-1 に、CHS-1 細胞および MHT-2 細胞に対する 219 種類の化合物の細胞増殖抑制効果を示した。219 種類の化合物のうち、14 種類の化合物 (化合物番号 12、58、66、77、86、87、116、153、172、187、212、214、216 および 217) が CHS-1 細胞または MHT-2 細胞、あるいはその両方に対して 60%以上の細胞増殖抑制効果を示した。HS 株化細胞に対して細胞増殖抑制効果を示した 14 種類の化合物のうち、化合物番号 77 (ダサチニブ)を除く 13 種類の化合物は MDCK 細胞に対して 60%以上の細胞増殖抑制効果を示した (Fig. 2-2)。さらに、ダサチニブの細胞増殖抑制効果は MHT-2 細胞に対してはわずかであったが、CHS-1 細胞に対しては明らかな細胞増殖抑制効果を示した (Fig 2-1)。

HS 株化細胞に対するダサチニブの細胞増殖抑制効果

ダサチニブは CHS-5、MHT-2 および MDCK 細胞に比べ、CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7 細胞に対してより強力な細胞増殖抑制効果を示した (Fig.2-3-A)。ダサチニブによる明らかな細胞増殖抑制がみられた HS 株化細胞の IC₅₀ は 5.4-54.5 nM であったが、CHS-5、MHT-2 および MDCK 細胞の IC₅₀ は約 1,000 nM あるいはそれ以上であった (Fig. 2-3-B)。

考察

細胞増殖抑制試験に用いた 219 種類の化合物のうち、14 種類の化合物が CHS-1 細胞または MHT-2 細胞、あるいはその両方に対して細胞増殖抑制効果を示した。これらの化合物のうち、ダサチニブ以外の 13 種類の化合物は MDCK 細胞に対しても細胞増殖抑制効果を示したことから、これら 13 種類の化合物による HS 株化細胞の細胞増殖抑制効果は非特異的な細胞毒性によると考えられた。一方、ダサチニブは MHT-2 細胞および MDCK 細胞に対して細胞増殖抑制効果を示さなかったが、CHS-1 細胞に対して明らかな細胞増殖抑制効果を示したことから、CHS-1 細胞に対して選択的に作用したと考えられた。

ダサチニブはチロシンキナーゼ阻害剤であり、活性化したキナーゼの ATP 結合部において、ATP と競合拮抗することで阻害作用を示す。主に Src family kinase (Src、Lck、Yes および Fyn) および Bcr-Abl を標的とするが、Kit、PDGFR β および EphA2 などの他のキナーゼも標的としている [21]。ダサチニブは人において慢性期、移行期および急性期のイマチニブ抵抗性慢性骨髄性白血病 (CML)、Bcr-Abl を発現している初発の慢性期 CML、および Bcr-Abl を発現している再発または難治性の急性リンパ芽球性白血病 (ALL) に対する有効な治療薬として知られている [22-24]。

ダサチニブは 6 種類の HS 株化細胞のうち CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7 細胞に対して明らかな細胞増殖抑制効果を示し、その IC₅₀ は 5.4-54.5 nM であった。人の CML および ALL 患者において、ダサチニブを標準用量 (70-90 mg/body、1 日 2 回) で投与した時のダサチニブの最高血中濃度 (C_{max}) はおよそ 100-200 nM であり [25]、これら 4 種類の

HS 株化細胞で示された IC50 はそれに比べてはるかに低い濃度であった。また、ダサチニブは Bcr-Abl を発現している人の CML 細胞の増殖を数 nM の濃度で抑制し [26]、さらに、活性化した Src family kinase に依存して増殖する人の前立腺癌細胞 [27]および移行上皮癌細胞 [28]に対しても 100 nM 以下の濃度で細胞増殖抑制効果を示すことが報告されている。このように、ダサチニブが腫瘍細胞の増殖に必要な特定のキナーゼを選択的に阻害して細胞増殖抑制効果を現す場合、数 nM から 100 nM 程度の濃度で効果が得られている。したがって、4 種類の HS 株化細胞で認められた細胞増殖抑制効果は、ダサチニブがこれらの細胞の増殖に不可欠なキナーゼを選択的に阻害した結果と考えられる。一方、CHS-5 および MHT-2 細胞に対するダサチニブの IC50 は約 1,000 nM あるいはそれ以上であることから、他の 4 種類の HS 株化細胞とは異なった分子機構に依存して増殖している可能性が考えられた。以上のことから、HS 細胞の中にはダサチニブが標的とするキナーゼに強く依存して増殖しているものがあり、このような HS 細胞に対しては、ダサチニブが強い細胞増殖抑制効果を現すと考えられた。

細胞増殖抑制試験に用いた 219 種類の化合物の中には、ダサチニブの標的である Bcr-Abl、Src family kinase、Kit、PDGFR を阻害する化合物が 15 種類含まれていた。この 15 種類の化合物のうち化合物番号 12 を除く 14 種類の化合物は、それぞれの標的分子の酵素活性あるいは標的分子を発現している細胞の増殖を 100 nM 程度で抑制するが、CHS-1 細胞の増殖は抑制しなかった。化合物番号 12 については CHS-1 細胞の増殖を抑制したが、MDCK 細胞の増殖も抑制したことから、この化合物による細胞増殖抑制効果は非特異的な細胞毒性によると考えられた。これらのことから、CHS-1 細胞に対するダサチニブの細胞増殖抑

制効果は、Bcr-Abl、Src family kinase、Kit および PDGFR の阻害により得られた可能性は低いと考えられた。一方、化合物ライブラリーにはダサチニブの他の標的である EphA2 を阻害する化合物は含まれていない。このことから、ダサチニブは EphA2 あるいは標的として同定されていない分子を阻害することにより CHS-1 細胞の増殖を抑制したと推測された。

本実験の結果より、HS 細胞の中にはダサチニブが標的とするキナーゼに依存して増殖するものが存在し、そのような HS 細胞ではダサチニブによる選択的な細胞増殖抑制効果が得られると考えられた。

小括

2 種類の HS 株化細胞 (CHS-1 および MHT-2) に対して、219 種類の化合物 (化合物ライブラリー) を用いた細胞増殖抑制試験を行い、HS 株化細胞に対して細胞増殖抑制効果を示す化合物を検索したところ、ダサチニブは CHS-1 細胞に対して細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。次いで、6 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7 および MHT-2) に対するダサチニブの細胞増殖抑制効果を評価したところ、4 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7) で明らかな細胞増殖抑制効果が見られ、これらの細胞に対するダサチニブの IC₅₀ は 5.4-54.5 nM であった。CHS-1 細胞の増殖は Bcr-Abl、Src family kinase、Kit および PDGFR を阻害する化合物で抑制されなかったことから、ダサチニブは EphA2 あるいは標的として同定されていないキナーゼを抑制することで効果を現したと推測された。

以上の結果から、HS 細胞の中にはダサチニブが標的とするキナーゼに依存して増殖しているものがあり、このような細胞に対してダサチニブは細胞増殖抑制効果を示すと考えられた。

表および図

Table 2-1 細胞増殖抑制試験に用いた化合物

番号	カテゴリー 標的	化合物名
Receptor kinase		
1	EGFR	AG1478
2	HER2	AG825
3	EGFR, topoII	Genistein
4	EGFR	BPIQ-II
5	EGFR	AG490
6	EGFR/Her2	lapatinib
7	EGFR	gefitinib
8	EGFR	erlotinib
9	PDGFR	AG1296
10	PDGFR	SU11652
11	PDGFR	PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor V
12	PDGFR	PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor IV
13	VEGFR	VEGFR receptor tyrosine kinase inhibitor II
14	VEGFR	VEGF receptor 2 kinase inhibitor I
15	VEGFR	SU1498
16	FGFR	SU4984
17	FGFR	SU5402
18	IGF-IR	AG1024
19	IGF-IR	AGL2263
20	TrkA	TrkA inhibitor
21	Flt-3	Flt-3 Inhibitor
22	Fms	cFMS Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor
23	Met	SU11274
24	TGF- β RI	SB431542
25	TGF- β RI	TGF- β RI kinase inhibitor II
Fusion kinase		
26	Bcr-abl	AG957
27	Bcr-Abl	nilotinib
28	Bcr-Abl/Kit	imatinib mesylate
29	EML4-ALK	crizotinib
Multiple kinase		
30	Multi-kinases	sorafenib
31	Multi-kinases	sunitinib malate
32	Multi-kinases	pazopanib
Chemokine receptor		
33	CCR2	RS 102895
34	CCR3	SB 328437
35	CXCR2	SB 225002
36	CXCR4	AMD3100 octahydrochloride

次のページに続く

Table 2-1

番号	カテゴリー 標的	化合物名
PI3K-AKT pathway		
37	PI3K	LY-294002
38	PI3K	Wortmannin
39	AKT	AKT inhibitor
40	AKT	NL-71-101
41	AKT	Akt Inhibitor IV
42	AKT	Akt Inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2
43	AKT	Akt Inhibitor XI
MAPK pathway		
44	Raf	RAF1 kinase inhibitor I
45	Raf	ZM 336372
46	MEK	PD98059
47	MEK	U-0126
48	MEK	MEK inhibitor I
49	Tpl2	Tpl2 kinase inhibitor
50	MAPK	ERK inhibitor II
51	JNK	SP600125
52	JNK	JNK inhibitor VIII
53	p38 (MAPK)	PD169316
54	p38 (MAPK)	SB203580
55	p38	SB202190
56	p38	SB239063
JAK-STAT pathway		
57	Jak-2	AG490
58	Jak-2	Cucurbitacin I
59	Jak	JAK Inhibitor I
60	Jak	JAK3 Inhibitor VI
61	STAT3	WP1066
62	STAT3	5,15-DPP
mTOR pathway		
63	mTOR	temsirolimus
64	mTOR	everolimus
65	mTOR	Torkinib
66	p70 S6K	Rapamycin
67	eEF2	TX-1918
Rho-ROCK pathway		
68	Rho/SRF	CCG-1423
69	ROCK	HA1077
70	ROCK	H-1152
71	ROCK	Y-27632

次のページに続く

Table 2-1

番号	カテゴリー 標的	化合物名
SRC family kinase		
72	Lck	Damnacanthal
73	Src	PP1 analog
74	Src, Fyn, Lck	PP-H
75	Fyn	SU6656
76	Lck	PP2
77	Bcr-Abl/Src	dasatinib
Glycogen synthase kinase		
78	GSK	GSK-3 inhibitor IX
79	GSK	1-Azakenpaullone
80	GSK	indirubin-3'-monoxime
81	GSK-3	GSK-3 inhibitor II
Burton's tyrosine kinase		
82	BTK	LFM-A13
83	BTK	Terreic acid
Spleen tyrosine kinase		
84	Syk	Syk inhibitor
IL-1 receptor-associated kinase		
85	IRAK	IRAK-1/4 inhibitor
Heat shock protein		
86	HSP90	Radicicol
87	HSP90	17-AAG
Cyclooxygenase		
88	COX-1	Sulindac sulfide
89	COX-1	Valeryl salicylate
90	COX-2	NS-398
91	COX	Sodium salicylate
Nitric oxide synthase		
92	iNOS	1400W, HCl
93	iNOS	AMT, HCl
94	NOS	Aminoguanidine, HCl
95	NOS	L-NMMA
Protein phosphatase		
96	PP2A	Cantharidin
97	PP2A	Cytostatin
98	PP2B/cyclophilin	Cyclosporin A
99	PP2B/FKBP	FK-506
Cell cycle related molecule		
100	CDC2	Kenpaullone
101	Cdc25	NSC95397

次のページに続く

Table 2-1

番号	カテゴリー 標的	化合物名
102	Cdc25A	SC- $\alpha\alpha\sigma 9$
103	CDK2	Purvalanol A
104	CDK4	3-ATA
105	CDKs	Olomoucine
106	CDK	Kenpaullone
107	CDK	purvalanol A
108	CDK	Olomoucine
109	CDK	Alsterpaullone, 2-cyanoethyl
110	CDK	Cdk1/2 inhibitor III
111	CDK	Cdk2/9 inhibitor
112	CDK	NU6102
113	CDK	Cdk4 inhibitor
114	CDK	NSC625987
Chromatin/chromosome modification		
115	HDAC	Scriptaid
116	HDAC	Trichostatin A
117	HDAC	vorinostat
118	HAT	Anacardic acid
119	telomerase	MST-312
120	telomerase	β -Rubromycin
Mitosis related molecule		
121	Aurora	Aurora kinase/cdk inhibitor
122	Aurora	Aurora kinase inhibitor II
123	Aurora	Aurora kinase inhibitor III
124	kinesin Eg5	HR22C16
125	kinesin Eg5	Monastrol
DNA replication and repair related molecule		
126	Chk 1, 2	Debromohymenialdisine (DBH)
127	Chk	SB218078
128	Chk	isogranulatimide
129	Chk	Chk2 inhibitor
130	Chk	Chk2 inhibitor II
131	ATM	ATM/ATR kinase inhibitor
132	ATM	ATM kinase inhibitor
133	CK	TBB
134	CK	Ellagic acid
135	CK	DMAT
136	CK	D4476
137	PARP	NU1025
138	PARP-1	Benzamide

次のページに続く

Table 2-1

番号	カテゴリー 標的	化合物名
139	pan-PARP	PJ-34
140	PARP-1/2-selective	Olaparib
141	p53	Pifithrin-a (cyclic)
142	p53 activator	PRIMA-1
143	Mdm2	Nutlin-3
144	Mdm2	MDM2 inhibitor
145	DNA-PK	IC60211
	NF-κB pathway	
146	IKK	BMS-345541
147	IKK	IKK-2 inhibitor VI
148	NF-κB	N-Acetyl-L-cysteine
	Peroxisome proliferator-activated receptor	
149	PPAR-a	MK886
150	PPAR-a activator	Clofibrate
151	PPAR-g	BADGE
152	PPAR-g activator	Troglitazone
	Hypoxia-inducible factor	
153	HIF	Chetomin
154	HIF-1a hydroxylase	Dimethyloxalylglycine
	Notch pathway	
155	Notch	DAPT
	Hedgehog pathway	
156	Hedgehog	AY9944
157	Hedgehog	cyclopamine
158	Hedgehog	Jervine
	Wnt pathway	
159	Wnt	IWP-2
160	Wnt	IWR-1-endo
161	Wnt	FH535
	Apoptosis related molecule	
162	FAS	C75
163	FAS	Ceruleinin
164	calpain	E-64d
165	calpain, cathepsin B, L	ALLN
166	cathepsin B	CA-074
167	cathepsin D	Pepstatin A
168	cathepsin G	Z-GLF-CMK
169	caspase	Z-VAD-FMK
170	Bcl-2	HA 14-1
171	Bcl-XL	BH3I-1

次のページに続く

Table 2-1

番号	カテゴリー 標的	化合物名
Protein metabolism		
172	protein synthesis	Cycloheximide
173	aromatase	Aminoglutethimide
174	aromatase	Formestane
175	proteasome	Lactacystin
176	methionine aminopeptidase	Fumagillin
177	aminopeptidase A	Amastatin
178	aminopeptidase M	Actinonin
Lipid metabolism		
179	DAG acyltransferase (DGAT)	Xanthohumol
180	PDE	IBMX
181	PDE (cAMP)	Ro-20-1724
182	PDE (cGMP)	Zaprinast
183	cyclicphosphodiesterase	Theophylline
184	PKA	H-89, HCl
185	PKA	4-cyano-3-methylisoquinoline
186	PKC, PKA	H-7
187	PKC, PKA, PKG, MLCK	Staurosporine
188	PKC	Bisindolymaleimide I, HCl
189	PKC	Go7874
190	PKG	KT5823
191	PKG	Rp-8-CPT-cGMPS
192	PKR	PKR inhibitor
193	MLCK	ML-7
194	DAG lipase	RHC80267
195	PC-PLC	D609
Suger metabolism		
196	glycosylation	Tunicamycin
197	glucosidase I, II	Deoxynojirimycin
198	a-mannosidase	Swainsonine
199	AMPK	compound C
Ion transportation		
200	Na channel	Amiloride
201	Na channel	Lidocaine
202	Na ionophore	Monensin
203	K channel	Glibenclamide
204	K channel	Dequalinium
205	K channel opener	Diazoxide
206	Ca channel	Diltiazem
207	Ca channel	Nifedipine

次のページに続く

Table 2-1

番号	カテゴリー 標的	化合物名
208	Ca channel, MDR	Verapamil
209	MDR	PGP-4008
210	Cl channel	N-phenylanthranilic acid
211	Cl channel	DIDS
212	Na/K ATPase	Ouabain
213	Na/K/Mg ATPase	Sanguinarine
214	Ca-ATPase	Thapsigargin
215	Ca-ATPase	t-Butylhydroquinone (BHQ)
216	V-ATPase	Bafilomycin A1
217	K ionophore	Valinomycin
218	Ca ionophore	A23187
219	Ca ionophore	Ionomycin

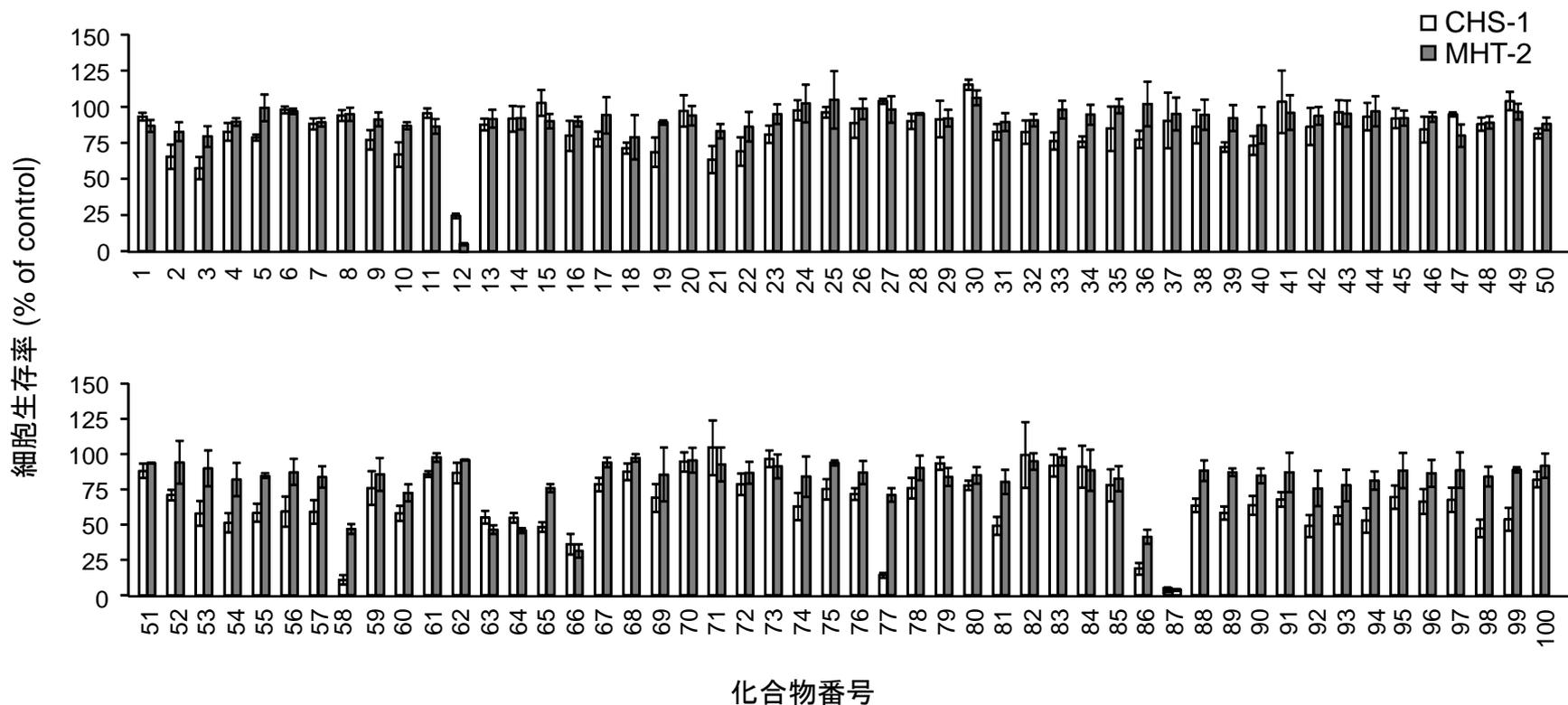


Figure 2-1. HS株化細胞に対する化合物の細胞増殖抑制効果
 CHS-1およびMHT-2細胞に対する219種類の化合物の細胞増殖抑制効果を示した (mean \pm SD; n=3)。化合物番号12、58、66、77、86、87、116、153、172、187、212、214、216および217は、CHS-1またはMHT-2細胞、あるいはその両方に対して60%以上の細胞増殖抑制効果を示した。

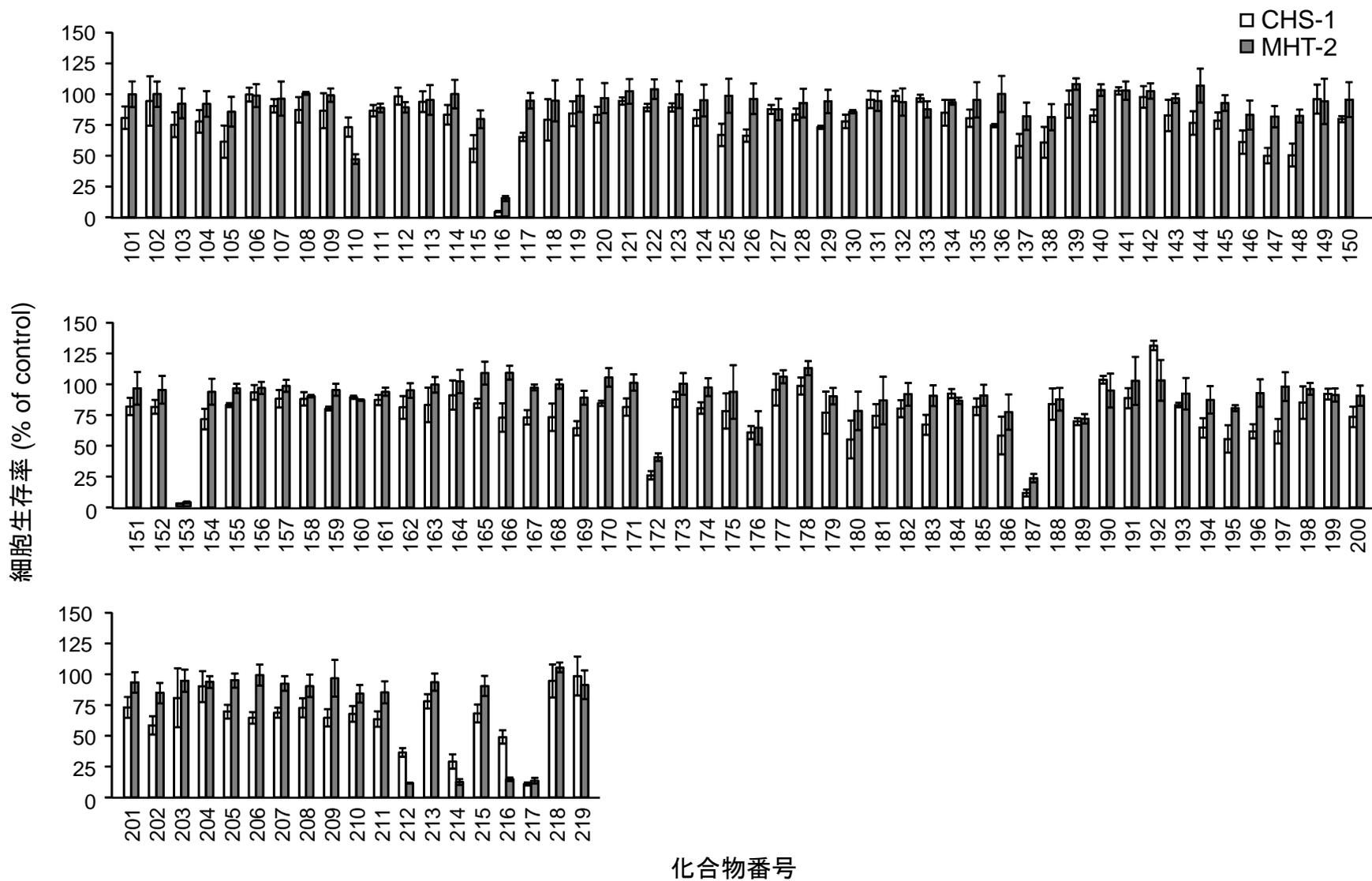


Figure 2-1. (続き)

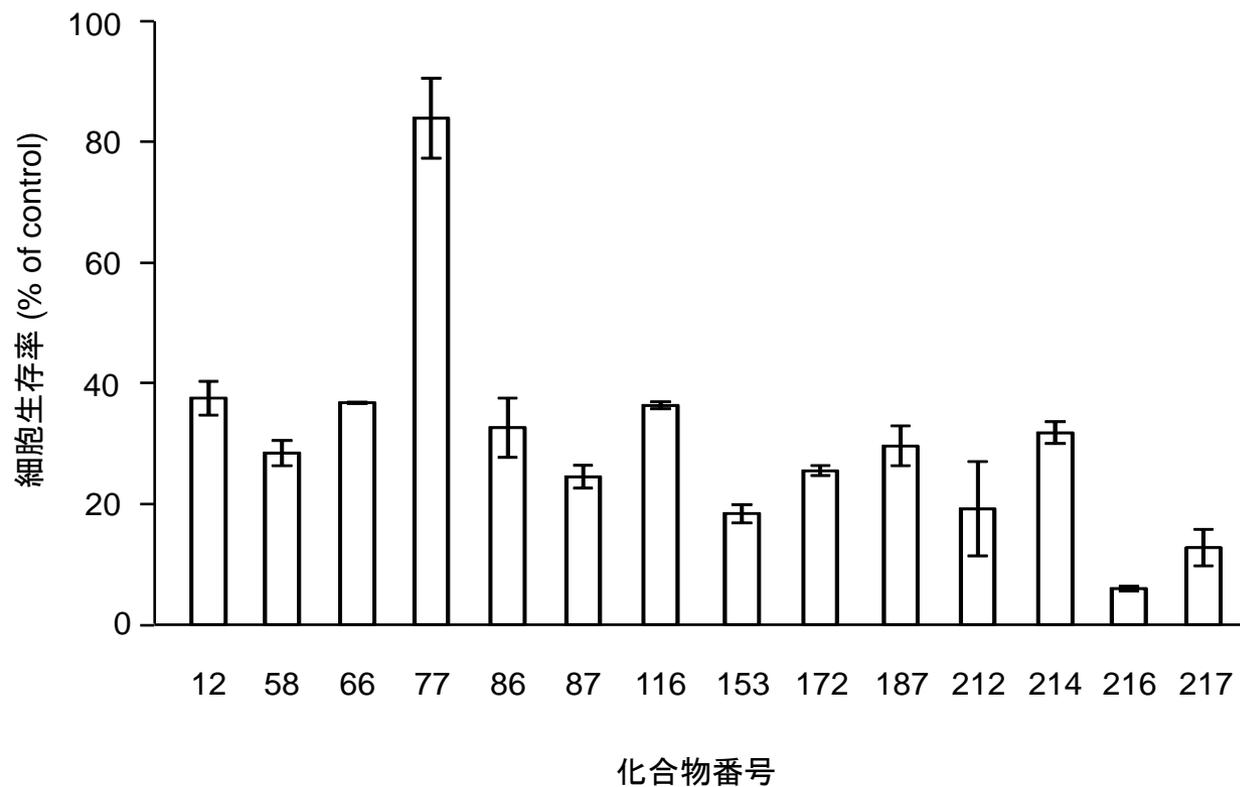
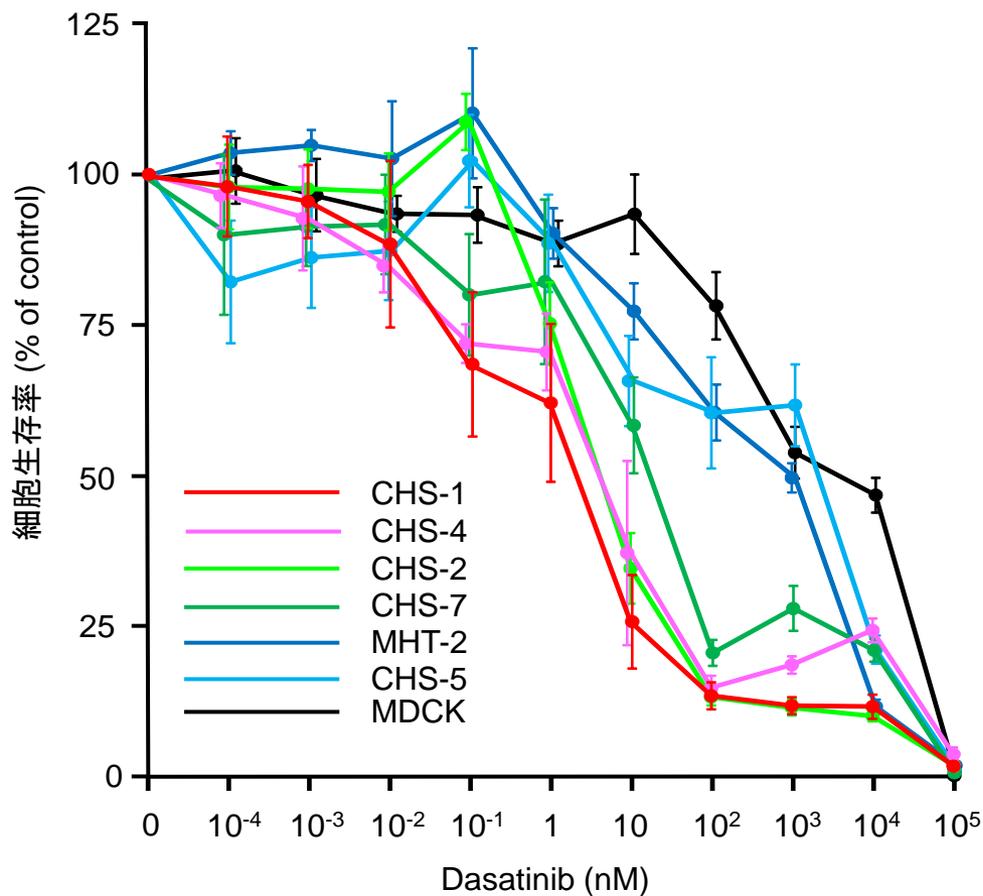


Figure 2-2. MDCK細胞に対する候補化合物の細胞増殖抑制効果
MDCK細胞に対する15種類の候補化合物の細胞増殖抑制効果を示した (mean±SD; n=3)。化合物番号77 (ダサチニブ) を除く全ての化合物がMDCK細胞に対して60%以上の細胞増殖抑制効果を示した。

A



B

Cell line	IC50 (nM)
CHS-1	5.4 ± 2.5
CHS-4	7.5 ± 2.1
CHS-2	8.3 ± 1.0
CHS-7	54.5 ± 12.5
MHT-2	968.1 ± 45.8
CHS-5	>1,000
MDCK	>1,000

Figure 2-3. HS株化細胞およびMDCK細胞に対するダサチニブの細胞増殖抑制効果

(A) ダサチニブはCHS-1、CHS-2、CHS-4およびCHS-7細胞に対して強い増殖抑制効果を示した (mean ± SD; n=3)。

(B) 各株化細胞に対するダサチニブのIC50を示した (±SD; n=3)。

第 3 章

HS 細胞におけるダサチニブの標的分子の解析

第 2 章の結果から、ダサチニブは CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7 細胞において、EphA2 あるいは標的として同定されていないキナーゼのリン酸化を抑制することで増殖を抑制すると考えられた。

人の膵臓癌細胞では遺伝子増幅により EphA2 が過剰発現しており、それらが自己リン酸化することにより下流シグナル伝達経路が恒常的に活性化し腫瘍の増殖を促進することが知られている [29]。このように、EphA2 の異常は腫瘍の増殖に重要な役割を果たしていることがある。また、ダサチニブは膵臓癌細胞において、EphA2 のリン酸化を抑制することで下流のシグナル伝達経路の活性化を抑え、腫瘍細胞の増殖を抑制することが報告されている [29]。このことから、HS 細胞においても EphA2 の発現の異常が増殖に関与しており、ダサチニブはそのリン酸化を抑制することで増殖抑制効果を示した可能性が考えられる。

ダサチニブはいくつかのキナーゼの ATP 結合部に結合するが、これはダサチニブがこれらのキナーゼに共通した ATP 結合部の構造を認識して結合するためである [30]。このため、既知の標的と類似した ATP 結合部の構造を持つキナーゼに対しても同様に作用すると考えられる。したがって HS 株化細胞におけるダサチニブの細胞増殖抑制作用は、ダサチニブが既知の標的とは異なるキナーゼのリン酸化を抑制したことによる可能性も考慮する必要がある。

そこで本章では、HS 細胞におけるダサチニブの標的分子を明らかにするため、実験 1 として、ダサチニブの増殖抑制効果が見られた 4 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7) と見られなかった 2 種類の HS 株化細胞 (MHT-2 および CHS-5) を用いて EphA2 遺伝子の発現量、ゲノム領域における遺伝子増幅の有無および変異の有無を解析し

た。また、Abl、Bcr、Src family kinase、Kit および PDGFR についても同様の解析を行った。

さらに、これらの分子の下流シグナル伝達経路の活性化状態についても評価した。次いで、

実験2として、CHS-1細胞およびMHT-2細胞を用いてリン酸化蛋白質の網羅的解析を行い、

CHS-1細胞におけるダサチニブの新たな標的分子を検索した。

実験 1. ダサチニブの既知標的分子の解析

材料と方法

株化細胞

6 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7 および MHT-2)、および犬正常腎上皮株化細胞 (MDCK; Madin-Darby canine kidney)を用いた。これらの細胞は 10% 非働化牛胎仔血清 (FCS; Nippon Bio-supply Center, Tokyo, Japan)、50 U/ml のペニシリンおよび 50 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシン (Invitrogen)を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) (cDMEM)で、37°C、5% CO₂ の湿潤環境下で培養した。

末梢血単核球の分離

臨床的に健康なビーグル犬から、抗凝固剤としてヘパリンを使用して末梢血を採取し、Histopaque-1077 (Sigma Ardrich)を用いた比重遠心法 (1500 rpm、22°C、30 分)により末梢血単核球 (PBMC)を分離・回収した。

HS 株化細胞、MDCK 細胞および犬の脾臓組織からの Total RNA の抽出

6 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7 および MHT-2)、MDCK 細胞および犬の脾臓組織を RNA-STAT-60 (TEL-TEST B、Friendwood、TX)で溶解した後、クロロホルムを添加し混和した。次いで、室温で 3 分間放置した後に遠心し、水層とフェ

ノール層に分離した。水層を回収し、そこに含まれる Total RNA をイソプロパノールで沈殿させた後、蒸留で溶解した。

HS 株化細胞、MDCK 細胞および犬の PBMC からの DNA 抽出

6 種類の HS 株化細胞および MDCK 細胞からの Total RNA 抽出後に、フェノール層に残存した DNA を Back extraction 法により抽出した。水層を除去したフェノール層に、最初に加えた RNA-STAT-60 と等量の Back extraction buffer (4 M Guanidine Thiocyanate、50 mM Sodium Citrate、1 M Tris)を加え、転倒混和した。混和したサンプルを室温で 10 分間放置した後に遠心し、水層とフェノール層に分離した。次いで、水層を回収し、そこに含まれる DNA をイソプロパノールで沈殿させ、8 mM の水酸化ナトリウム水溶液に溶解した。溶解した DNA をさらにエタノールで沈殿させた後、蒸留水で再溶解した。犬の PBMC からの DNA 抽出には、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN、Valencia、CA)を用い、最終的に 400 μ l のバッファで DNA を溶出し、エタノールで沈殿させた後、蒸留水で溶解した。

Reverse transcription-polymerase chain reaction

6 種類の HS 株化細胞、MDCK 細胞および犬の脾臓組織における EphA2、Abl、Bcr、Fyn、Kit、Lck、PDGFR α 、PDGFR β 、Src および Yes の mRNA の発現を Reverse transcription-polymerase chain reaction 法により評価した。PCR に用いたプライマーの配列、アニーリング温度および予測される増幅産物のサイズは Table 3-1 に示した。6 種類の HS 株化細胞、MDCK 細胞および犬の脾臓組織から抽出した Total RNA 1 μ g を鋳型とし、Oligo-dT プライ

マー (Invitrogen, Carlsbad, CA) と Super Script III reversecriptase (Invitrogen) を用いて、42°C で 30 分間逆転写反応を行い、cDNA を作製した。次に、作製した cDNA を鋳型として、目的遺伝子の cDNA 配列の一部を増幅するプライマー組と Taq DNA Polymerase (Invitrogen) を用いて PCR を 30 サイクル行った。増幅産物は 1% アガロースゲルを用いて電気泳動し、各分子の mRNA の発現を評価した。

Realtime polymerase chain reaction

EphA2 および Bcr の 6 種類の HS 株化細胞における mRNA の発現量およびゲノム遺伝子量は Realtime polymerase chain reaction を用いて評価した。HS 株化細胞、MDCK 細胞および犬の脾臓組織における EphA2 および Bcr の mRNA の発現量は、 β -actin を内因性コントロールとし、相対定量で評価した。標準曲線の作成には、犬の脾臓組織の cDNA を鋳型とし、EphA2、Bcr および β -actin それぞれを PCR で増幅した産物を組み込んだプラスミドを用いた。プライマー組は Table 3-1 に示す EphA2 #5、Bcr #11 および β -actin を用い、PCR 反応は Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) を用いて、40 サイクルで行った。プラスミドは TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) と One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen) を用いて作製し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) により抽出した後、蒸留水で溶解した。標準曲線から算出した EphA2 および Bcr の mRNA の発現量は、同様に算出した β -actin の発現量により標準化し、犬脾臓組織の mRNA 量を 1.0 として比較した。ゲノム DNA 上の EphA2 あるいは Bcr を含む領域が遺伝子増幅を起こしているか検討するために、HS 株化細胞および犬の PBMC 由来のゲノム

DNA における EphA2 および Bcr のゲノム遺伝子量を、GAPDH を内因性コントロールとして同様の方法で相対定量により評価した。各サンプルのゲノム遺伝子量は GAPDH のゲノム遺伝子量により標準化し、犬 PBMC のゲノム遺伝子量を 1.0 として比較した。

ダイレクトシーケンス法を用いた塩基配列の解析

CHS-1 細胞における EphA2、Abl、Bcr、Src および Yes の cDNA の変異の有無はダイレクトシーケンス法により解析した。CHS-1 細胞および犬の脾臓組織から作製した cDNA を鋳型として、Abl、EphA2 および Src それぞれの全長を増幅するプライマー組と Taq DNA Polymerase (Invitrogen)用いて PCR を 30 サイクル行った。また、Bcr および Yes については 5'領域以外を増幅するプライマー組を用いて同様に PCR を行った。増幅産物の精製には QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いた。PCR に用いたプライマーと PCR 産物を用いてシーケンスを行い、CHS-1 細胞および犬の脾臓組織における各分子の cDNA の塩基配列を決定した。CHS-1 細胞から得られた各分子の塩基配列を犬の脾臓組織の cDNA の塩基配列と比較して変異の有無を検討した。

5' Rapid amplification of cDNA ends

Bcr および Yes における cDNA の 5'領域の塩基配列を決定するために 5' Rapid amplification of cDNA ends を用いた。Bcr の塩基配列の決定では、まず犬の脾臓組織から抽出した Total RNA 1 µg を鋳型とし、Bcr #5 の下流プライマー (Table 3-1)と Super Script III reversecriptase (Invitrogen)を用いて、cDNA を合成した。次に、dCTP (Invitrogen)と Terminal deoxynucleotidyl

transferase (TdT、Invitrogen)を用いて dC-Tailing を行い、この cDNA を鋳型として、上流プライマーに Abridged Ancher Primer (5'-GCCACGCGTTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3')、下流プライマーに 3' Bcr #4 (5'-TGGTAGGGCTGGGGGACACG-3')を用いて、PCR を行った。さらに、この PCR 産物を鋳型として上流プライマー AUAP (5'-GGCCACGCGTTCGACTAGTAC-3')、下流プライマーに 3' Bcr #2 (5'-CCGTGGGCGTTGATGAGGTTGTCC-3')を用いて、nested PCR を行い、得られた PCR 産物を精製し、3' Bcr #2 と PCR 産物を用いたダイレクトシーケンス法により犬の脾臓組織における Bcr の塩基配列を決定した。CHS-1 細胞の塩基配列の決定には、犬の脾臓組織の Bcr の塩基配列に基づいて設計したプライマー組を用いて PCR を行い、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定した。また、犬の脾臓組織における Yes の塩基配列の決定には、Yes #3 の下流プライマー (Table 3-1)を用いて、同様に cDNA を合成し、dC-Tailing を行った後に Abridged Ancher Primer と 3' Yes #2 (5'-GAGGTTT CAACGTTGGACACA-3')を用いて PCR を行った。この PCR 産物を鋳型として AUAP と 3' Yes #1 (5'-CCATTCTTTCCTGTAGCGATTGAT-3')を用いて nested PCR を行い、3' Yes #1 と PCR 産物を用いたダイレクトシーケンス法によって、犬の脾臓組織における Yes の cDNA 塩基配列を決定した。CHS-1 細胞における Yes の塩基配列の決定には、犬の脾臓組織の塩基配列から設計したプライマー組を用いて、PCR を行い、ダイレクトシーケンス法によって、塩基配列を決定した。ついで、CHS-1 細胞から得られた Bcr および Yes の塩基配列を犬の脾臓組織の塩基配列と比較して、変異の有無を検討した。

HS 株化細胞および MDCK 細胞からの蛋白質抽出

6 種類の HS 株化細胞および MDCK 細胞を、セミコンフレントになるように cDMEM 中で 24 時間培養した。培養上清を除去した後に、PBS で 3 回洗浄し、細胞溶解緩衝液 (20 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1% Triton X-100、2.5 mM Sodium pyrophosphate、1 mM β -Glycerophosphate、1 mM Sodium orthovanadate、1 μ g/ml Leupeptin、1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride)を加えて 5 分間氷上で静置した。その後、セルスクレイパーで細胞を搔爬して細胞溶解液を回収し、細胞溶解液を 29G 注射針付きシリンジで数回吸引して懸濁した。この細胞溶解液を遠心した後、可溶性蛋白質を含む上清を回収した。回収した蛋白質の濃度は DC protein Assay Reagent Package (Bio-Rad)を用いて測定し、使用まで -80°C にて保存した。

AKT、ERK 1/2 および STAT3 のリン酸化シグナルの検出

6 種類の HS 株化細胞および MDCK 細胞から抽出した蛋白質溶解液を 1 ウェルあたり 5 μ g になるように 8 あるいは 10% のアクリルアミドゲルで電気泳動した。ついで、分離した蛋白質を親水処理した Immun-Blot PVDF メンブレン (Bio-Rad) に転写した。転写したメンブレンを Blocking One-P (Nacalai Tesque、Tokyo、Japan) に浸漬し、室温で 20 分間攪拌してブロッキングした。一次抗体にウサギ抗マウス phospho-Akt (Ser473) ポリクローナル抗体 (1:1000、Cell Signaling Technology)、ウサギ抗ヒト phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr 202/Tyr204) ポリクローナル抗体 (1:1000、Cell Signaling Technology) あるいはウサギ抗マウス phospho-Stat3 (Tyr705) ポリクローナル抗体 (1:1000、Cell Signaling Technology) を用いて

室温で 1 時間反応させた後、二次抗体にビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:5000、Zymed) を用いて 30 分間反応させた。その後、Horseradish Peroxidase 標識ストレプトアビジン (1:5000、Vector)を 30 分間反応させた。反応後のメンブレンは ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare UK Ltd、Buckinghamshire、England)を用いて発光させ、LAS-4000 (Fujifilm)で撮影した。Total AKT、Total ERK 1/2、Total STAT3 および GAPDH の検出では、同様の方法で分離した蛋白質をメンブレンに転写し、メンブレンを 5% スキムミルクに浸漬した後に、室温で 60 分間攪拌してブロッキングした。一次抗体にウサギ抗マウス Akt ポリクローナル抗体 (1:1000、Cell Signaling Technology)、ウサギ抗ラット p44/42 MAPK (ERK 1/2)ポリクローナル抗体 (1:1000、Cell Signaling Technology)、ウサギ抗マウス Stat3 ポリクローナル抗体 (1:1000、Santa Cruz)あるいはヤギ抗ヒト GAPDH ポリクローナル抗体 (1:200、Santa Cruz)を用い、二次抗体は Total AKT、Total ERK 1/2 および Total STAT3 ではビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG を、GAPDH ではビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG を用いた。各蛋白質の検出は同様の方法で行った。各バンドのシグナル強度は Multi Gauge Ver 3.2 software (Fujifilm)を用いて数値化した。リン酸化 AKT のシグナル強度は Total AKT のシグナル強度により標準化し、リン酸化 ERK1/2 のシグナル強度は Total ERK1/2 のシグナル強度により標準化した。リン酸化シグナル強度の比較は MDCK 細胞の値を 1.0 として行った。

結果

HS 株化細胞、MDCK 細胞および犬の脾臓組織におけるダサチニブの標的分子 mRNA の発現

Fig. 3-1 に、6 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7 および MHT-2)、MDCK 細胞および犬脾臓組織における、EphA2、Abl、Bcr、Fyn、Kit、Lck、PDGFR α 、PDGFR β 、Src、Yes の mRNA の発現を示した。EphA2 および Bcr の mRNA はダサチニブに感受性を示した 4 種類の HS 株化細胞のうち CHS-1、CHS-2 および CHS-7 細胞で発現しており、CHS-4 細胞およびダサチニブに感受性を示さなかった MHT-2 および CHS-5 細胞では殆ど発現が認められなかった。Abl、Src および Yes の mRNA は全ての HS 株化細胞で発現が認められた。Fyn、Lck および PDGFR α の mRNA は HS 株化細胞間において、ダサチニブの感受性とは関係なく様々な程度で発現が見られており、Kit および PDGFR α は HS 株化細胞においてはほとんど発現が認められなかった。

HS 株化細胞、MDCK 細胞および犬の脾臓組織における EphA2 および Bcr mRNA の発現量とゲノム遺伝子量の比較

EphA2 および Bcr の mRNA はダサチニブに感受性を示した HS 株化細胞において発現する傾向があったため、これらの mRNA の発現量の定量的解析を行った。Fig. 3-2 に、6 種類の HS 株化細胞、MDCK 細胞および犬の脾臓組織における EphA2 および Bcr の mRNA の発現量を示した。HS 株化細胞における EphA2 および Bcr の mRNA 発現量は HS 株化細

胞間で差が認められたが、MDCK 細胞あるいは犬の脾臓組織の mRNA に比べて明らかな発現の増加は認められなかった。また、Fig. 3-3 に、6 種類の HS 株化細胞および犬 PBMC における EphA2 および Bcr のゲノム遺伝子量を示した。HS 株化細胞における EphA2 および Bcr のゲノム遺伝子量は、犬の PBMC のそれと比較して遺伝子増幅の存在を示唆する明らかな増加は認められなかった。

CHS-1 細胞における EphA2、Abl、Bcr、Src および Yes の遺伝子変異

CHS-1 細胞において、EphA2、Abl、Bcr、Src および Yes の cDNA に変異は認められなかった。

HS 株化細胞および MDCK 細胞における AKT、ERK 1/2 および STAT3 のリン酸化の比較

Fig. 3-4 に 6 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7 および MHT-2) および MDCK 細胞におけるリン酸化 AKT、Total AKT、リン酸化 ERK1/2、Total ERK1/2、リン酸化 STAT3、Total STAT3 および GAPDH のウエスタンブロッティングの結果を示した。AKT のリン酸化は CHS-4 細胞でわずかに認められ、MHT-2 細胞においては明らかに亢進していた。また、ERK1/2 のリン酸化は MDCK 細胞で明らかに亢進しているが、HS 株化細胞ではわずかであった。一方、STAT3 のリン酸化は全ての株化細胞で殆ど検出されなかった。ウエスタンブロッティングで検出された AKT および ERK1/2 のシグナルを半定量した結果を Fig.3-5 に示した。ダサチニブに感受性を示した CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7 細胞において、AKT および ERK1/2 のリン酸化シグナルの亢進は認められなかった。

実験 2. リン酸化蛋白質の網羅的解析によるダサチニブの新規標的分子の検索

材料と方法

株化細胞

2 種類の HS 株化細胞 (CHS-1 および MHT-2)を用いた。これらの細胞は 10% 非働化牛胎仔血清 (FCS; Nippon Bio-supply Center, Tokyo, Japan)、50 U/ml のペニシリンおよび 50 µg/ml のストレプトマイシン(Invitrogen)を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) (cDMEM)で、37°C、5% CO₂ の湿潤環境下で培養した。

CHS-1 および MHT-2 細胞からの蛋白質抽出

cDMEM で懸濁した CHS-1 および MHT-2 細胞を、それぞれ 100 mm シャーレに 9×10^5 個となるように播種し、24 時間培養した。次いで、各シャーレに DMSO のみ (最終濃度: 0.1%) あるいはダサチニブを 0.1 nM の濃度になるように添加し、72 時間培養した。培養上清を除去した後に PBS で 3 回洗浄し、10% Trichloroacetic acid を加え、30 分間氷上で静置した。その後、10% Trichloroacetic acid を除去し、セルスクレイパーで細胞を搔爬して細胞浮遊液を回収した。これらの細胞を PBS で洗浄した後に、細胞溶解緩衝液 (2 M Thiourea、7 M Urea、3% CHAPS、1% Triton X-100)を加え、氷上で 30 分間静置した。この細胞溶解液を遠心した後、可溶性蛋白質を含む上清を回収した。蛋白溶解液中の蛋白質の濃度は 2-D Quant Kit (GE

Healthcare)を用いて測定した。

二次元電気泳動およびリン酸化蛋白質の検出

CHS-1 細胞および MHT-2 細胞から抽出した蛋白質溶液をそれぞれ等量の膨潤用緩衝液 (8 M Urea、2% CHAPS、4% IPG buffer (pH 4-7、GE Healthcare)、36 mM dithiothreitol) と混和した。ついで、それぞれの混和溶液を各サンプルの総蛋白質量が 300 μ g となるように二次元電気泳動用の固定化 pH 勾配 (IPG)ゲルストリップ (Immobiline DryStrip pH 4-7、7 cm、GE Healthcare)に浸透させた。これらの IPG ゲルストリップを用いて一次元目の等電点電気泳動を行った。泳動後の IPG ゲルストリップは SDS 平衡化緩衝液 (50 mM Tris-Cl pH 8.8、6 M Urea、30% Glycerol、2% Sodium Dodecyl Sulfate、65 mM dithiothreitol)中で 15 分間緩やかに振盪させて平衡化した。平衡化を終えた IPG ゲルストリップをアクリルアミドゲル (マルチゲル II ミニ、12.5%均一ゲル、Cosmo Bio)上に設置し、二次元目の電気泳動を行った。電気泳動後のアクリルアミドゲルを用いてリン酸化蛋白質を検出した。リン酸化蛋白質の染色には Pro-Q diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen)を用い、染色されたリン酸化蛋白質のシグナルは Molecular imager FX Pro (Bio-Rad)で検出した。検出されたシグナルの強度は Multi Gauge Ver 3.2 software (Fujifilm)を用いて半定量した。

蛋白質の同定とアミノ酸配列の解析

ダサチニブ非存在下で培養した CHS-1 細胞の蛋白質溶液を用いて二次元電気泳動 (一次元目: pH 4-7 IPG ゲルストリップ、二次元目: 12.5%アクリルアミドゲル)を行った。銀染色

MS キット (Wako)を用いて電気泳動後のアクリルアミドゲルを染色し、展開された蛋白質を染色した。このアクリルアミドゲルから単一のスポットを切り出し、MALDI-TOF/MS および MS/MS による質量解析を行った。この分析から得られたペプチド断片のアミノ酸配列を NCBI データベースとデータベース検索エンジン Mascot (Matrix Science)により解析し、アクリルアミドゲルのスポットに含まれる蛋白質を同定した。また、同定した蛋白質の全アミノ酸配列は NCBI データベースと蛋白質解析ソフト (Lasergene Protean)を用いて解析した。

結果

ダサチニブ感受性に関連したリン酸化蛋白質の検出

Fig. 3-6 に、ダサチニブ非存在下で培養した CHS-1 および MHT-2 細胞のリン酸化蛋白質の解析結果を示した。CHS-1 および MHT-2 細胞のリン酸化蛋白質のシグナルを比較したところ、CHS-1 細胞のみで強いシグナルが検出できるスポットが特定された。ダサチニブ添加によるこれらのリン酸化蛋白質シグナルの変化を Fig. 3-7 に示した。Fig. 3-6 で CHS-1 細胞にのみ認められたスポットのシグナルはダサチニブ添加によって著しく減弱した (Fig. 3-7-A)。また、このスポットのシグナルを半定量した解析において (Fig. 3-7-B)、CHS-1 細胞におけるシグナル強度は、ダサチニブ添加により 50%以上抑制されることが示された。一方、ダサチニブ非存在下で培養した MHT-2 細胞におけるスポットのシグナル強度は

CHS-1 細胞のそれと比べて明らかに低く、またダサチニブによる抑制はわずかであった。

質量解析による 14-3-3 protein gamma の同定

CHS-1 細胞で特定したスポットの質量解析およびデータベース検索を行った結果、このスポットの蛋白質はマウスおよび人の 14-3-3 protein gamma に類似する蛋白質であることが示された。Fig. 3-8 に、同定した蛋白質のアミノ酸配列とマウスおよび人の 14-3-3 protein gamma のアミノ酸配列を示した。同定した蛋白質のアミノ酸配列はマウスおよび人のアミノ酸配列と 97.2%の相同性があり、14-3-3 protein gamma の二量体界面部位およびペプチド結合部位に相当するアミノ酸の配列は 100%一致していた。これらアミノ酸配列の解析により、CHS-1 細胞のみで強いシグナルが検出されたスポットの蛋白質は 14-3-3 protein gamma と同定された。

考察

CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7 細胞のいずれにおいても EphA2、Abl、Bcr、Src family kinase、Kit および PDGFR の mRNA 発現量の明らかな増加は認められず、EphA2 および Bcr の遺伝子増幅は認められなかった。また、CHS-1 細胞においては EphA2、Abl、Bcr、Src および Yes に変異は認められなかった。さらに、下流シグナル伝達分子である AKT、ERK1/2 および STAT3 のリン酸化の亢進はこれらの HS 株化細胞においては認められな

った。したがって、EphA2、Abl、Bcr、Src family kinase、Kit および PDGFR は HS 細胞の増殖に中心的役割を果たしているとは考えられず、ダサチニブによる細胞増殖抑制はこれらの分子に対する作用を介したのではないと考えられた。

一方、リン酸化蛋白質の網羅的解析から、CHS-1 細胞では 14-3-3 protein gamma が恒常的にリン酸化していることが示された。さらにこの 14-3-3 protein gamma のリン酸化は、ダサチニブの添加により明らかに抑制された。

14-3-3 protein family は正常組織の細胞質内に豊富に存在する二量体蛋白質であり、リン酸化セリン/スレオニンモチーフを有する様々なシグナル伝達分子に結合するアダプター蛋白質として細胞周期やアポトーシスなどの多様なシグナル伝達を調節することが知られている [31-33]。また、14-3-3 protein family は細胞内シグナル伝達分子である JNK (C-Jun N-terminal kinase)によってリン酸化され、アダプター機能を失うことが知られている [34]。近年、14-3-3 protein family のアイソタイプの 1 つである 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 経路に強く関与していることが報告された [35, 36] (Fig. 3-9)。この経路では、Cdc25A の活性化とそれに続く Cyclin/CDK 複合体の活性化により細胞周期が進行するが、14-3-3 protein gamma は Cdc25A と結合することで、そのユビキチン化による分解を誘導する。これにより Cyclin/CDK 複合体の活性化が起こらず、細胞周期は停止する [36]。一方、14-3-3 protein gamma がリン酸化すると、Cdc25A との結合が離れ、Cdc25A の分解が起こらないため、細胞周期は進行する [34]。このことから、CHS-1 細胞の増殖には 14-3-3 protein gamma の恒常的なリン酸化による細胞周期の促進が重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、14-3-3 protein gamma はそれ

自身キナーゼ活性を持たないため、直接ダサチニブの標的とならない。したがって、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、その結果、細胞周期が停止し、細胞増殖が抑制されたと考えられた。

小括

HS 細胞におけるダサチニブの標的分子を明らかにするため、ダサチニブに感受性を示した CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7 細胞と感受性を示さなかった MHT-2 および CHS-5 細胞を用いて EphA2、Abl、Bcr、Src family kinase、Kit および PDGFR 遺伝子の発現量、ゲノム領域における遺伝子増幅の有無および変異の有無を解析した。さらに、これらの分子の下流シグナル伝達経路の活性化について評価した。次いで、CHS-1 細胞および MHT-2 細胞を用いてリン酸化蛋白質の網羅的解析を行い、CHS-1 細胞におけるダサチニブの新たな標的分子を検索した。

ダサチニブに感受性を示した HS 株化細胞のいずれにおいても EphA2、Abl、Bcr、Src family kinase、Kit および PDGFR 遺伝子の発現量の増加および EphA2 および Bcr の遺伝子増幅は認められず、CHS-1 細胞においては EphA2、Abl、Bcr、Src および Yes の変異は認められなかった。さらに、これらの HS 株化細胞においては下流のシグナル伝達分子である AKT、ERK1/2 および STAT3 のリン酸化は認められなかった。これらのことから、ダサチニブは既知の標的分子に作用して HS 細胞の増殖を抑制したのではなく、標的として同定されていないキナーゼのリン酸化を抑制したことで HS 細胞の増殖を抑制したと考えられた。一方、CHS-1 細胞におけるリン酸化蛋白質の網羅的解析から、14-3-3 protein gamma が恒常的にリン酸化していることが示され、さらに、このリン酸化はダサチニブにより抑制されることが明らかとなった。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進行させることか

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た。しかしながら、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。

表および図

Table 3-1. PCRおよびシーケンス解析に使用したプライマーの塩基配列ならびにPCRの条件

プライマー名	上流プライマー	下流プライマー	アニーリング	
			温度 (°C)	サイズ (bp)
Abl #1	5'-CCTTCCAAGCCACTGACCATTCT-3'	5'-ACCATTCCCCATTGTGATTGTAT-3'	62	426
Abl #2	5'-TGGCCCCAGTGAAAATGA-3'	5'-ACAGTCGAGTGATGATGAACCAA-3'	60	447
Abl #3	5'-GGTCCGGGAAAGCGAGAGCAGTC-3'	5'-AATCCAACAGGTTCCCATAGGTCA-3'	60	527
Abl #4	5'-ACGAGGGTGTATGGAAGAAAT-3'	5'-GAGTGGGCTGTGTAGGTAT-3'	60	421
Abl #5	5'-TTGCTGCCCGAAACTGCCTGGTAG-3'	5'-AGTGGGGTCTTTATGTTCTGC-3'	60	545
Abl #6	5'-CTGACCGGCCCTCCTTTGCTGAA-3'	5'-CGCTGCTGGGCTTTGGGGACTT-3'	71	552
Abl #7	5'-AGAAGAAGAAAACGGCCCCAACAC-3'	5'-TGCCTCCTCAGTCTTTTTTCACCAG-3'	71	563
Abl #8	5'-CCACAGGGAGGCAGTTCG-3'	5'-GGGGCGGTGGGACAGGTTT-3'	65	481
Abl #9	5'-AGCAGAGGAGGGCCAGGGATGTC-3'	5'-CACGGGTTGATATGAGAGGGATGA-3'	71	469
Abl #10	5'-GCCCCCTTCCACGCTGTCATCC-3'	5'-CCCGGCCAACGTCCCAACTCT-3'	65	551
Bcr #5	5'-GCGGAGGCGGCTACACG-3'	5'-GAGGAGGAGGGCGAGTCATC-3'	67	445
Bcr #6	5'-CCCCCGACGCCGCAGTG-3'	5'-TCGCTAGCCAGGATTCCAGACAGG-3'	66	410
Bcr #7	5'-GACTCGCCCTCCTCCTCAC-3'	5'-GTCCTGGTCCTTAGCATCCTTGTTG-3'	67	530
Bcr #8	5'-CCATGGAAACGGCGGAGAAGT-3'	5'-CCAGCACCAGGGGGATGTTG-3'	66	504
Bcr #9	5'-ACACCCCGCCGGCAATCCAT-3'	5'-CTCAGCACGCTCATAGTCAG-3'	62	492
Bcr #10	5'-AGTCGCTGCTCCTGCTCAT-3'	5'-TCCTGTCTGTGCTTTTCGCCATCTT-3'	65	525
Bcr #11	5'-GGTGGACTCCTTTGGTTATTTTG-3'	5'-AGACACGCGGTAGATGCCCACTTC-3'	65	475
Bcr #12	5'-AGTCAAGTTCACCAGCAGGGAGTT-3'	5'-AAGGAAGAGGAAGGTCAGCAGGTT-3'	62	457
Bcr #13	5'-TCCGCGAACTACCAGAGC-3'	5'-GGATAGCCCGTGTTGCCAGGAG-3'	54	488
c-kit ICD3	5'-ACCCGGAGTTTCTTATGTTGT-3'	5'-AGGGTAGGGGCTGCTTCC-3'	54.4	439
EphA2 #1	5'-CCAACCTCCATTAAGGACCC-3'	5'-ATGGTGTCGATCTTGGTGAACCTGG-3'	54	575
EphA2 #2	5'-ATGTACTCCGTGTGCAATGTGGT-3'	5'-GGAGCCCGCGATGGTCT-3'	62	459
EphA2 #3	5'-AAGCGCCAGTTCACCAAGAT-3'	5'-GCACGGGGCACTCCAAACAG-3'	62	481
EphA2 #4	5'-ATCGGTCAGTGCCTGTG-3'	5'-AGCTCCGACACCCCGTT-3'	62	494
EphA2 #5	5'-CCTGGAGCCGCACATGAACTACAC-3'	5'-GCCAGCACCAGAAGCAGGACGAT-3'	65	453
EphA2 #6	5'-CTTGGCAGTGATTGGCGGTGTG-3'	5'-CGTTCTCCATGTACTCGGTGAT-3'	62	488
EphA2 #7	5'-TTCAGCCACCACAACATCATCC-3'	5'-GCCGTACGTCATCACCTCCACAT-3'	65	435

Table 3-1. (続き)

プライマー名	上流プライマー	下流プライマー	アニーリング	
			温度 (°C)	サイズ (bp)
EphA2 #8	5'-TTTCCTACCGCAAGTTCACCTCAG-3'	5'-GGCAGCCGCACCCCAATC-3'	65	490
EphA2 #9	5'-ACTTCCTGGCGGCTGGCTACACTG-3'	5'-AGGGGATGCTGGGAACACG-3'	65	436
Fyn #2	5'-ACAGACCCCACTCCTCAGCACTAC-3'	5'-TGGTTTCACTTTCACGGATAA-3'	62	448
Lck #5	5'-AGGCTGGTCCGGCTCTATGC-3'	5'-GGGCGCTCCTTCCAACACA-3'	65	548
PDGFR α #5	5'-TCGATGACCACCACGGCTCTA-3'	5'-TCAATGACCCTCCAACGAA-3'	62	427
PDGFR β #6	5'-CGCAGGCCACGATGAAAGT-3'	5'-GGTAGCTGAAGCCCACGAGA-3'	60	552
Src #1	5'-AGTGACGGGGTGGCCTTCCTGTG-3'	5'-GATGCTGAGCTTGCTGGCGTGGTA-3'	60	474
Src #2	5'-CGAGACCGGCCTGTTCCCTG-3'	5'-AGCCCGCCCTTCTCTTCCACGAT-3'	60	491
Src #3	5'-TTAAAAATGACGCCACTGC-3'	5'-GATTCCGAAACTCCACACG-3'	60	453
Src #4	5'-AATACCTGGAGGGCAACAACCTC-3'	5'-ACCAGGCCCAACAATCGCTCCAG-3'	60	507
Yes #2	5'-GGTGCATCTTCCTCATTTTCA-3'	5'-GAGGTTTTCACAGTTGGACACA-3'	66	565
Yes #3	5'-GAATCCTGGAAATCAACGAG-3'	5'-AAACGACAGCATATAGTGAACAA-3'	62	500
Yes #4	5'-TGTGTCCAACCTGTGAAACCTC-3'	5'-TGCTAAACCAAAGTCTGCTATT-3'	62	494
Yes #5	5'-GAGATCTTCGGGCTGCTAA-3'	5'-TCTTCTTTTGATTCCCGTATGTAA-3'	62	539
β -actin	5'-CTGGCCGGGACCTGACTGACTACC-3'	5'-GCGTTCGGAGGGGCGATGAT-3'	62	464

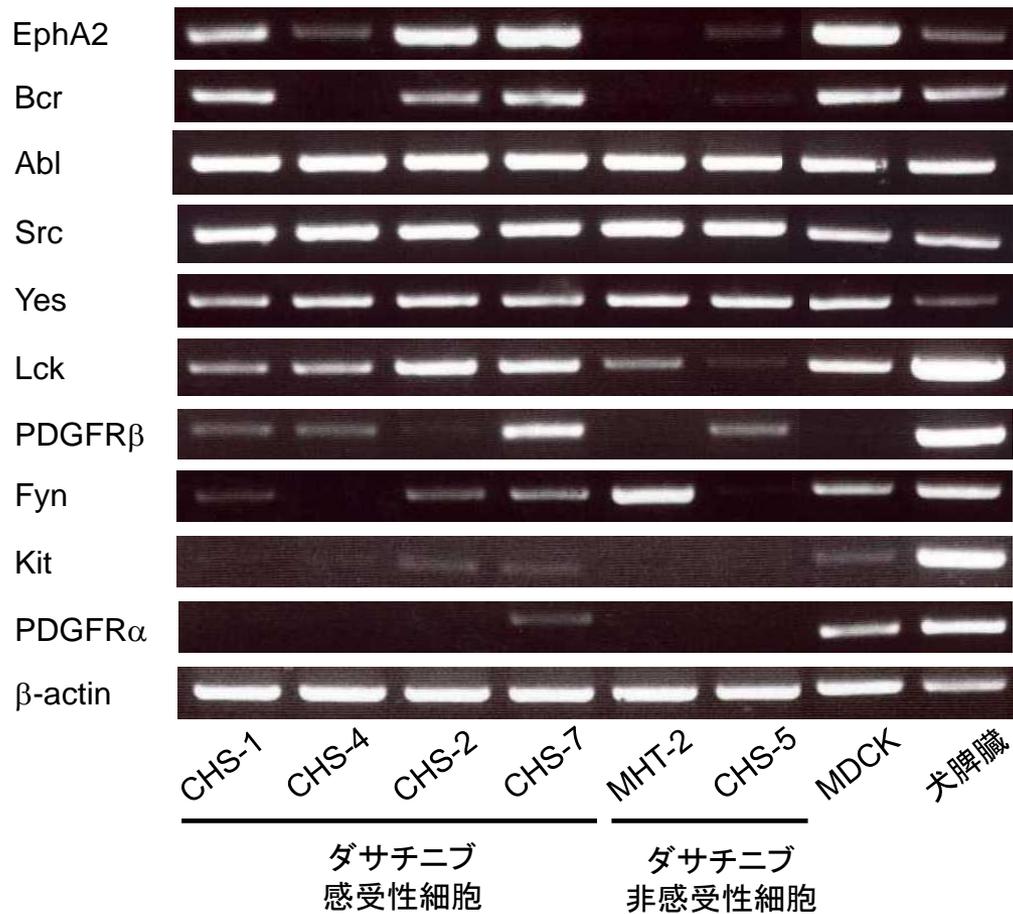


Figure 3-1. HS株化細胞、MDCK細胞および犬脾臓組織におけるダサチニブの標的分子のmRNAの発現
 6種類のHS株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7およびMHT-2)、MDCK細胞および犬脾臓組織
 におけるダサチニブの標的分子のmRNAの発現を示した。EphA2およびBcrのmRNAの発現はCHS-1、CHS-2
 およびCHS-7細胞で認められ、CHS-4、MHT-2およびCHS-5細胞ではほとんど認められなかった。Abl、Src
 およびYesのmRNAはHS株化細胞ではほぼ同程度の発現が認められた。Fyn、Lck、PDGFRαのmRNAはHS株化
 細胞間において様々な程度で発現しており、KitおよびPDGFRβのmRNAはHS株化細胞ではほとんど発現して
 いなかった。

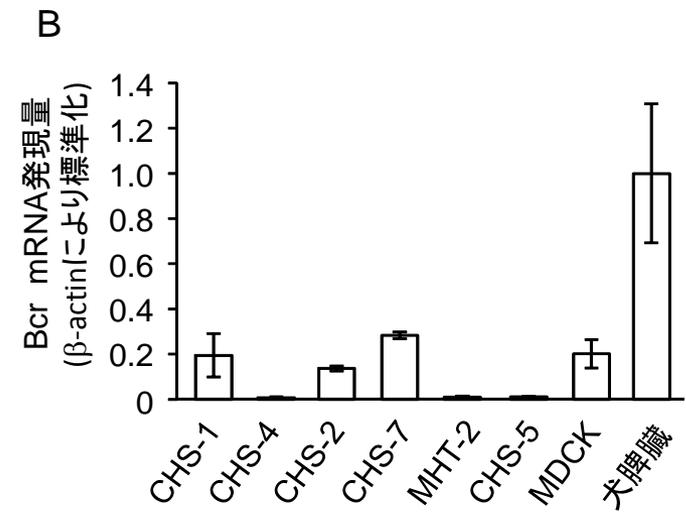
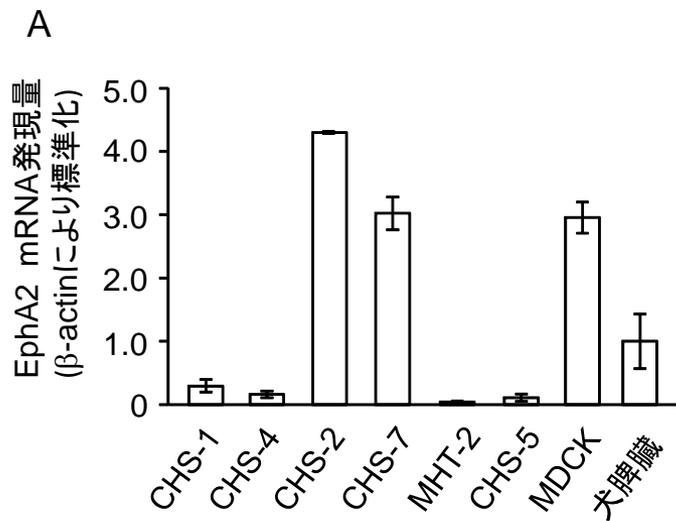


Figure 3-2. HS株化細胞、MDCK細胞および犬の脾臓組織におけるEphA2およびBcrのmRNA発現量の比較
 6種類のHS株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7およびMHT-2)、MDCK細胞および犬脾臓組織における
 EphA2 (A)およびBcr (B)のmRNA発現量を示した (mean ± SD; n=3)。各サンプルのmRNA発現量はβ-actinのmRNA発現量
 により標準化し、犬の脾臓組織のmRNAの発現量を1.0とした。HS株化細胞におけるEphA2およびBcrのmRNA発現量は
 MDCK細胞あるいは犬の脾臓組織 mRNAに比べて明らかな発現の増加は認められなかった。

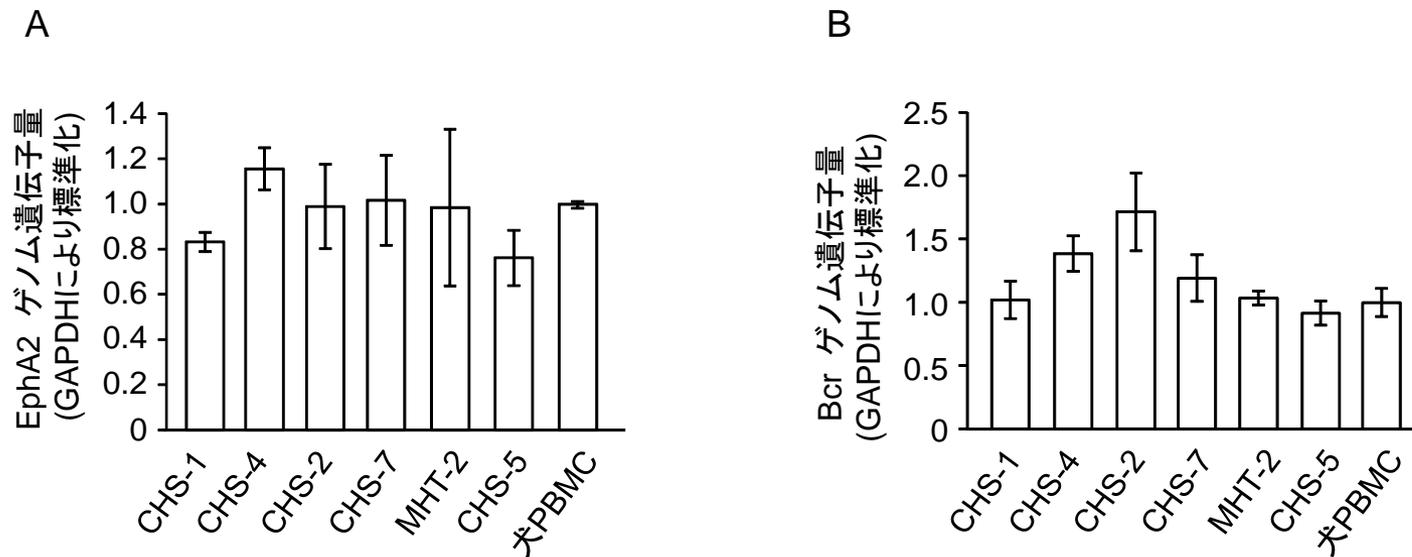


Figure 3-3. HS株化細胞および犬のPBMCにおけるEphA2およびBcrの遺伝子増幅の評価
 6種類のHS株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7およびMHT-2) および犬のPBMCにおけるEphA2 (A)
 およびBcr (B)のゲノム遺伝子量を示した (mean \pm SD; n=3)。各サンプルのゲノム遺伝子量はGAPDHのゲノム遺伝
 子量により標準化し、犬PBMCのゲノム遺伝子量を1.0とした。HS株化細胞におけるEphA2およびBcrのゲノム遺伝
 子量は犬のPBMCのゲノム遺伝子量と比較して明らかな増加は認められなかった。

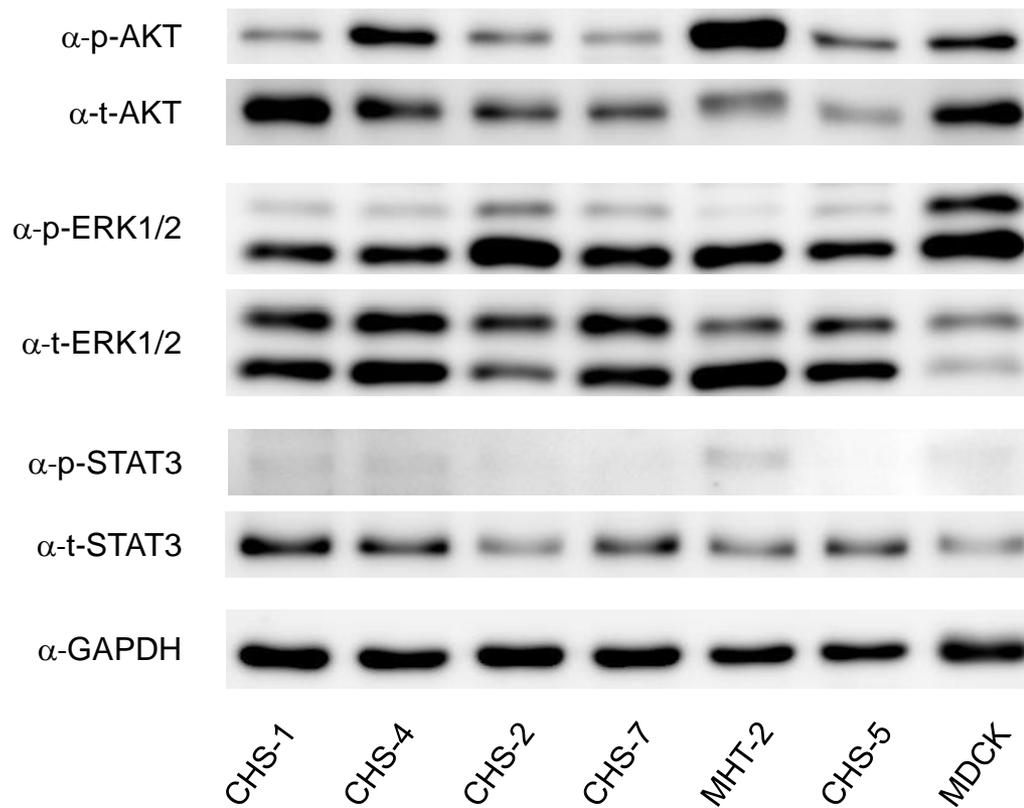


Figure 3-4. HS株化細胞およびMDCK細胞におけるAKT、ERK1/2およびSTAT3のリン酸化の比較
 AKTのリン酸化はCHS-4細胞でわずかに認められ、MHT-2細胞では明らかであった。また、ERK1/2のリン酸化はMDCK細胞で認められたが、それと比較するとHS株化細胞ではわずかであった。STAT3のリン酸化はいずれの細胞においてもほとんど認められなかった。

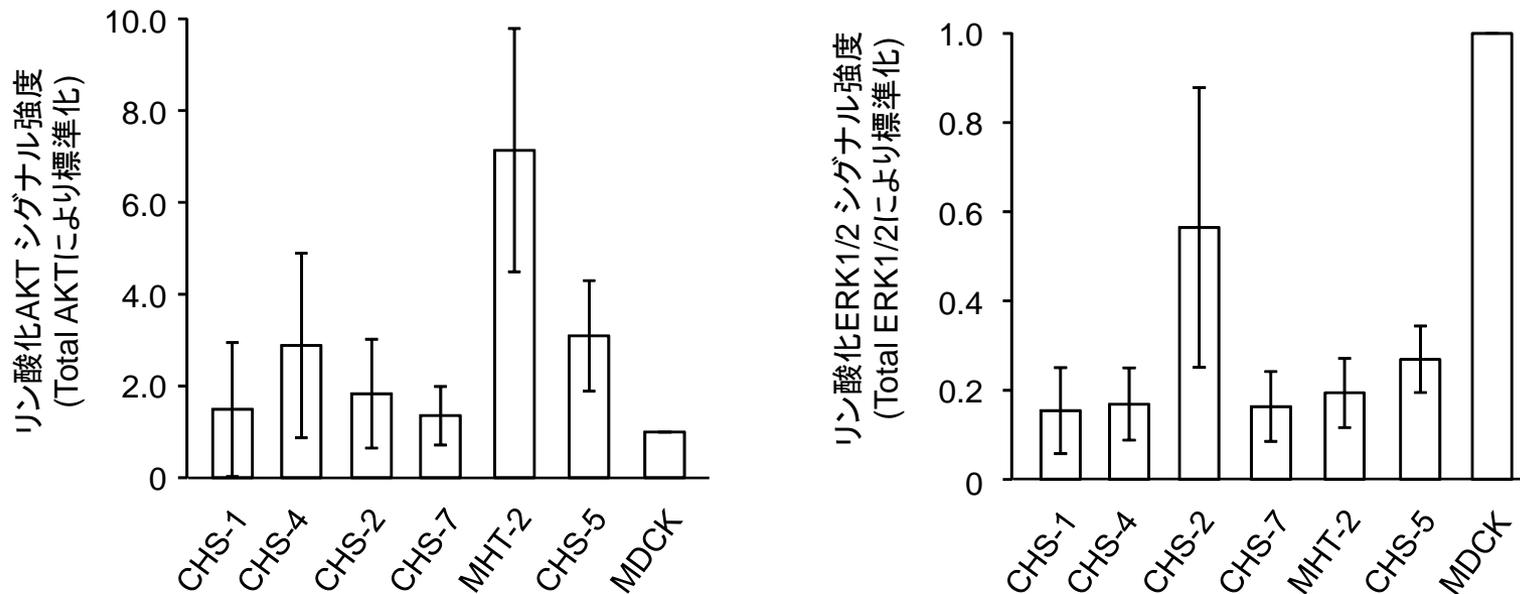


Figure 3-5. HS細胞およびMDCK細胞におけるAKT、ERK1/2のリン酸化シグナル強度の比較
 6種類のHS株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7およびMHT-2)およびMDCK細胞におけるAKT (A) およびERK1/2 (B)の半定量化したシグナル強度を示した (mean \pm SD; n=3)。リン酸化AKTのシグナル強度はTotal AKTのシグナル強度で標準化し、リン酸化ERK1/2のシグナル強度はTotal ERK1/2のシグナル強度で標準化した。シグナル強度はMDCK細胞のシグナル強度を1.0とした (mean \pm SD; n=3)。ダサチニブに感受性を示したHS株化細胞におけるAKTおよびERK1/2のリン酸化の亢進は認められなかった。

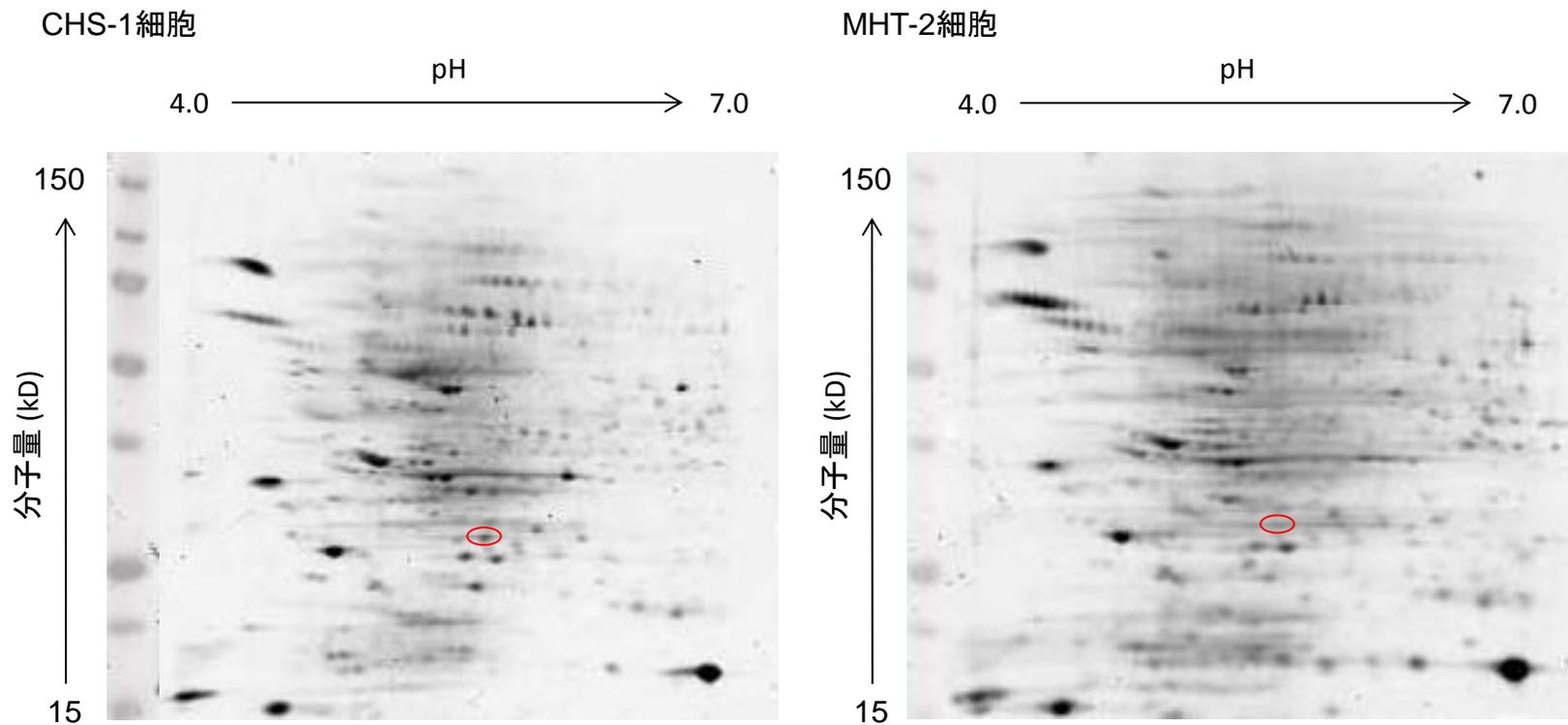


Figure 3-6. CHS-1細胞およびMHT-2細胞におけるリン酸化蛋白質の検出

CHS-1細胞およびMHT-2細胞から抽出した蛋白質を用いて二次元電気泳動を行い、リン酸化蛋白質を検出した。赤枠で示したスポットにおいて、CHS-1細胞では明らかなリン酸化蛋白質のシグナルが検出されたが(左図)、MHT-2細胞ではわずかであった(右図)。

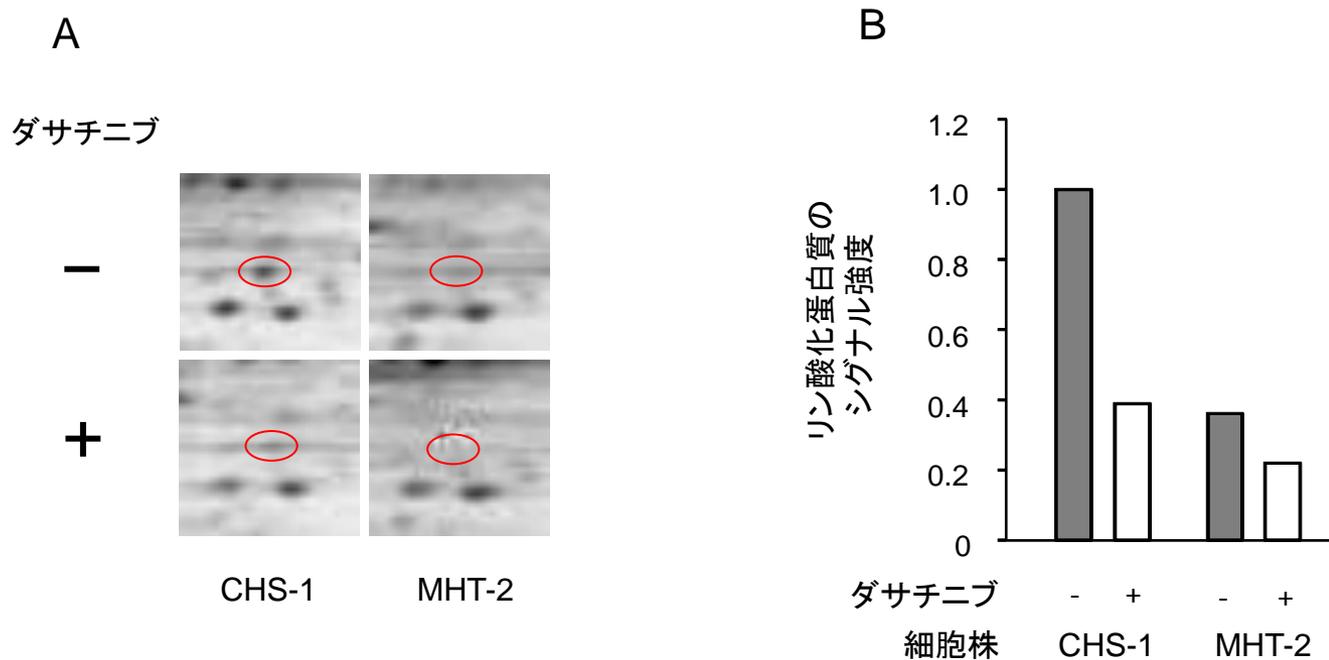


Figure 3-7. CHS-1およびMHT-2細胞におけるリン酸化蛋白質シグナルの変化

(A) Figure. 3-6 で示したCHS-1およびMHT-2のスポットの強拡大を上段に、ダサチニブ0.1 nMを加えた後の変化を下段に示した。CHS-1細胞の赤枠で示したスポットのリン酸化蛋白質のシグナルはダサチニブの添加により消失した。一方、MHT-2細胞ではダサチニブの有無にかかわらずリン酸化蛋白質のシグナルはほとんど検出されなかった。(B) 各スポットのリン酸化蛋白質のシグナル強度を数値化しグラフで示した。シグナル強度はCHS-1細胞のシグナル強度を1.0として表した。CHS-1細胞におけるリン酸化蛋白質のシグナルはダサチニブの添加により著しく抑制された。

犬 MVDREQLVQKXR~~LA~~EQ~~A~~ERYDDMAAAPIRXVT~~EL~~NEPLSNEERNLLSVAYK~~NV~~VGAR~~R~~SSW~~R~~VISSIEQK
 マウス MVDREQLVQKAR~~LA~~EQ~~A~~ERYDDMAAAMKNVTELNEPLSNEERNLLSVAYK~~NV~~VGAR~~R~~SSW~~R~~VISSIEQK
 人 MVDREQLVQKAR~~LA~~EQ~~A~~ERYDDMAAAMKNVTELNEPLSNEERNLLSVAYK~~NV~~VGAR~~R~~SSW~~R~~VISSIEQK

犬 TSADGNEKKIEMV~~R~~AYREKIEK~~E~~LEAVCQDVLSLLDNYLIKNCSETQYESKVFYLK~~M~~KG~~D~~YYRYLAEVATG
 マウス TSADGNEKKIEMV~~R~~AYREKIEK~~E~~LEAVCQDVLSLLDNYLIKNCSETQYESKVFYLK~~M~~KG~~D~~YYRYLAEVATG
 人 TSADGNEKKIEMV~~R~~AYREKIEK~~E~~LEAVCQDVLSLLDNYLIKNCSETQYESKVFYLK~~M~~KG~~D~~YYRYLAEVATG

犬 EK~~R~~ATV~~V~~ESSEKAYSEAHEISKEHM~~Q~~PTHPIRLGLALNYSVFYYEIQNAPEQACHLAKTAFDDAIAELDTLN
 マウス EK~~R~~ATV~~V~~ESSEKAYSEAHEISKEHM~~Q~~PTHPIRLGLALNYSVFYYEIQNAPEQACHLAKTAFDDAIAELDTLN
 人 EK~~R~~ATV~~V~~ESSEKAYSEAHEISKEHM~~Q~~PTHPIRLGLALNYSVFYYEIQNAPEQACHLAKTAFDDAIAELDTLN

犬 EDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDQQDDDGGEGNN
 マウス EDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDQQDDDGGEGNN
 人 EDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDQQDDDGGEGNN

Figure 3-8. 14-3-3 protein gammaのアミノ酸配列の比較

NCBIデータベース上の犬で予測される14-3-3 ptotein gammaのアミノ酸配列 (XP_005621043)をマウス (NP_061359)および人 (NP_036611) の14-3-3 ptotein gammaのアミノ酸配列と比較した。異なるアミノ酸配列を示す部分を青で示した。二量体界面部位にあたるアミノ酸を赤で、またペプチド結合部位にあたるアミノ酸をピンクで示した。犬の14-3-3 protein gammaのアミノ酸配列のマウスおよび人のアミノ酸配列に対する相同性は97.2%であった。また、二量体界面部位およびペプチド結合部位にあたるアミノ酸の相同性は100%であった。

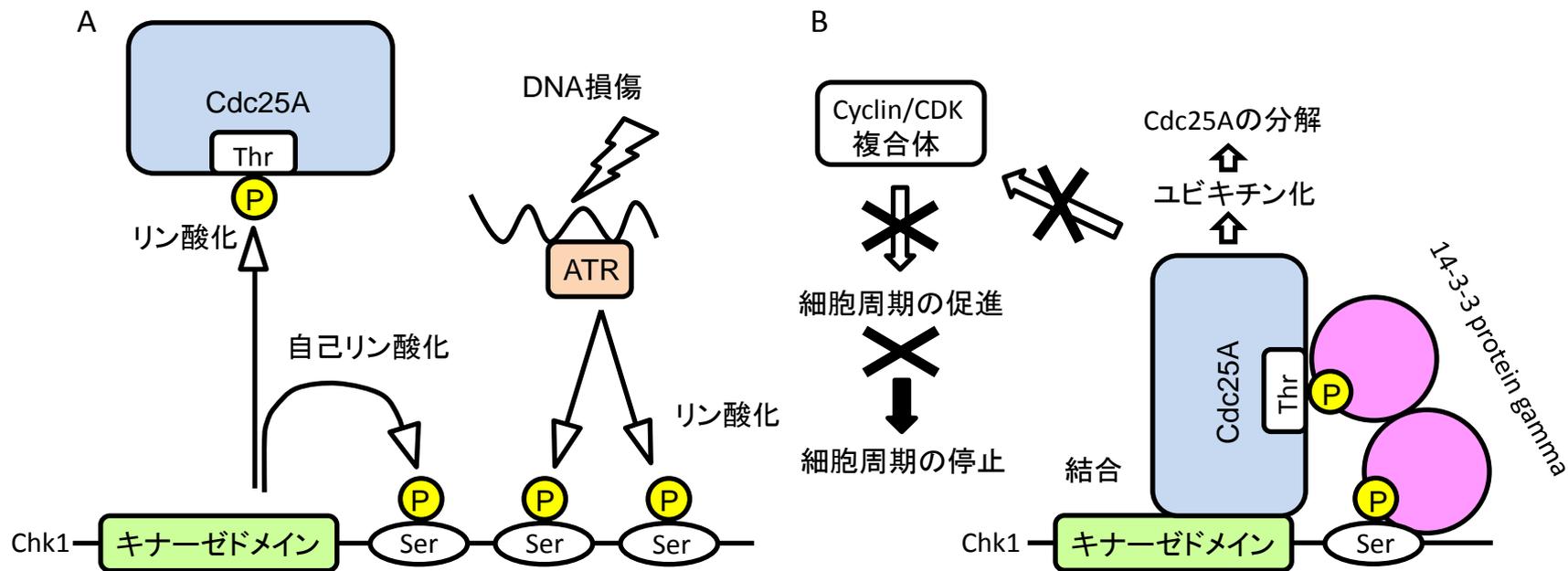


Figure 3-9. DNA 損傷チェックポイントにおける14-3-3 protein gammaを介したATR-Chk1-Cdc25A経路の調節機構

(A)DNAに損傷が生じると、DNA修復制御分子であるATRキナーゼが活性化し、チェックポイントキナーゼ Chk1をリン酸化する。このリン酸化により活性化したChk1は自己のセリン残基と細胞周期調節蛋白質Cdc 25Aをリン酸化する。(B)14-3-3 protein gammaはChk1とCdc25Aのリン酸化部位に結合し、この二分子を架橋する。これにより、Cdc25Aはユビキチン化されプロテアソームで分解される。Cdc25Aは細胞周期促進分子であるCyclin/CDK複合体の活性化に必要であるため、Cdc25Aが分解されると細胞周期は停止する。[35,36]より一部改変して引用。

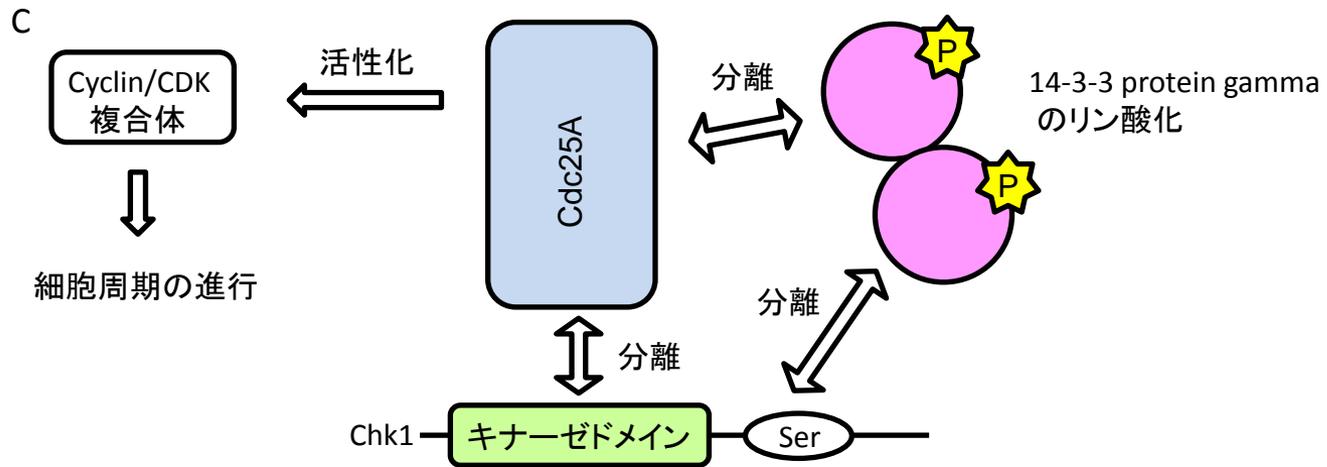


Figure 3-9. (続き)

(C)14-3-3 protein gammaがリン酸化すると、Chk1とCdc25Aの複合体から分離しChk1とCdc25Aの結合は解離する。これにより、Cdc25Aはユビキチン化しなくなるため分解されなくなる。その結果、Cdc25AがCyclin/CDK複合体を活性化し細胞周期が進行する。

第4章

犬 HS 移植マウスモデルにおけるダサチニブの効果

ダサチニブは *in vitro* において 6 種類の HS 株化細胞のうち CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7 細胞の増殖を抑制することが示された。さらに CHS-1 細胞では恒常的な 14-3-3 protein gamma のリン酸化の抑制とそれによる細胞周期の停止を介して増殖を抑制することが示唆された。

In vitro で培養した腫瘍細胞と異なり、*in vivo* で形成された腫瘍は微小環境の作用により薬物の影響を受けにくくなることがある [37]。このため、*in vitro* で示された腫瘍細胞に対するダサチニブの効果が、*in vivo* において必ずしも再現されるわけではない。したがって、ダサチニブの臨床応用を考慮する上で、ダサチニブが *in vivo* においても HS 細胞に対して増殖抑制効果を示すか否かを検討する必要がある。

そこで本章では、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。

材料と方法

供試動物

ヌードマウス (BALB/c nu/nu、CLEA Japan)、5 週齢、雌、12 匹を供試した。

株化細胞

ヌードマウスには CHS-1 細胞を移植した。CHS-1 細胞は 10% 非働化牛胎仔血清 (FCS; Nippon Bio-supply Center, Tokyo, Japan)、50 U/ml のペニシリンおよび 50 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシン (Invitrogen) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) (cDMEM) で、37°C、5% CO₂ の湿潤環境下で培養した。

犬 HS 移植マウスモデルの作製とダサチニブによる腫瘍増殖抑制効果の検討

ヌードマウスを用いた *in vivo* の実験は、日本獣医生命科学大学の実験動物委員会の認可 (承認番号 13-19) を得て行った。CHS-1 細胞を PBS で 5×10^7 個/mL になるように懸濁し、この懸濁液 200 μL (1×10^7 個) をヌードマウスの側腹部皮下に移植した (n=12)。移植した細胞の腫瘍容積が 100-200 mm^3 に達したところで、マウスをダサチニブ投与群 (n=7) とコントロール群 (n=5) に分けた。ダサチニブ投与群に対しては、80 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.1) を用いて 2 mg/mL となるようにダサチニブ溶液 (5% DMSO) を調製し、この溶液を 1 日 1 回、100 $\mu\text{L}/\text{mouse}$ (10 mg/kg) で連日経口投与した。コントロール群に対しては 5% DMSO 溶液を 100 $\mu\text{L}/\text{mouse}$ で同様に投与した。投与開始日を 0 日とし、28 日間これらの薬剤を

マウスに投与した。移植 CHS-1 細胞に対するダサチニブの効果は腫瘍の大きさの変化で評価した。腫瘍の大きさはノギスを用いて隔日計測した。腫瘍容積は計算式、 $V = (L \times W^2) / 2$ (V: 腫瘍容積、L: 長径、W: 短径)により算出した。マウスは投与開始から 28 日目に安楽殺し、腫瘍を摘出した。同時に剖検を行い、主要臓器 (肺、心臓、肝臓、脾臓および腎臓)を摘出し、病理組織学的評価を行った。

摘出腫瘍における細胞増殖およびアポトーシスの評価

摘出した腫瘍を 10%緩衝ホルマリンにより固定し、パラフィン包埋後、5 μm 厚の切片を作製した。この切片を用いて細胞増殖およびアポトーシスを評価した。細胞増殖の評価には有糸分裂指数および Ki-67 指数を用いた。有糸分裂指数は HE 染色した標本を用いて評価した。Ki-67 指数の評価には、マウス抗ヒト Ki-67 抗体 (1:100、Dako)および Dako EnVision HRP Kit を用いた免疫組織化学染色を行い、陰性コントロールとしてアイソタイプの適合したマウス IgG 抗体を用いた。アポトーシスの評価にはアポトーシス指数を用いた。アポトーシス指数の評価は In situ Apoptosis Detection Kit (Takara)を用いた Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色により行った。有糸分裂指数、Ki-67 指数およびアポトーシス指数は、一つの切片上の独立した 3 つの視野において、400 倍 1 視野あたりの有糸分裂細胞数、Ki-67 陽性細胞数および TUNEL 陽性細胞数を数え、同一視野中の全ての細胞数に占める割合(%)で表した。

統計処理

統計処理は Student の t 検定法を用い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

結果

移植 CHS-1 細胞に対するダサチニブの増殖抑制効果

Fig. 4-1 に、マウスに形成された腫瘍の外観の変化を示した。コントロール群における腫瘍は投与開始から 14 日間で明らかに増大し、その後 28 日まで増大を続けた。これに対し、ダサチニブ投与群では、投与期間中の腫瘍の増大はわずかであった。投与期間中の腫瘍容積の変化を Fig. 4-2 に示した。ダサチニブ投与群ではコントロール群に対して投与開始 4 日目以降に有意な腫瘍容積の増加抑制が認められ ($p < 0.01$)、その抑制は 26 日目以降より顕著となった ($p < 0.005$)。

マウスより摘出した主要臓器には肉眼的および病理組織学的に転移およびダサチニブに由来すると思われる変化は認められなかった。実験期間中、腫瘍の過度な増大によりコントロール群のマウス 2 匹が死亡した (投与開始 24 日目および 26 日目)。

ダサチニブによる移植 CHS-1 細胞の有糸分裂の抑制とアポトーシスの促進

Fig. 4-3 に、コントロール群およびダサチニブ投与群のマウスから摘出した腫瘍組織の HE 染色、Ki-67 の免疫組織化学染色および TUNEL 染色の結果を示した。コントロール群

に比べて、ダサチニブ投与群では有糸分裂像および Ki-67 陽性細胞は少なく、TUNEL 陽性細胞数は多く見られた。Fig. 4-4 に両群の摘出腫瘍組織における有糸分裂指数、Ki-67 指数およびアポトーシス指数を示した。コントロール群に比べて、ダサチニブ投与群における有糸分裂指数および Ki-67 指数は有意に低く（有糸分裂指数: $p < 0.05$ 、Ki-67 指数: $p < 0.01$ ）、アポトーシス指数は有意に高かった ($p < 0.01$)。

考察

犬 HS 移植マウスモデルを用いた実験から、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。ダサチニブ投与群の腫瘍組織では、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、ダサチニブによる移植腫瘍の増殖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。

第 2 章の結果から、ダサチニブは CHS-1 細胞において 14-3-3 protein gamma のリン酸化を抑制することにより細胞周期の進行を抑制することが示唆された。このことから、ダサチニブ投与群の移植腫瘍組織における有糸分裂の抑制は、ダサチニブが移植 CHS-1 細胞に作用し 14-3-3 protein gamma の恒常的なリン酸化を抑制したことによると考えられた。また、ダサチニブ投与群の移植腫瘍組織ではアポトーシスの割合の増加が認められたが、今のところ、CHS-1 細胞におけるダサチニブのアポトーシス誘導機構は不明である。しかしなが

ら、細胞周期の G2 期から M 期への移行が持続的に抑制されるとアポトーシスが誘導されることが報告されており [38]、移植腫瘍組織におけるアポトーシスの増加にはこのような分子機構が関連している可能性が考えられた。

今回の結果から、ダサチニブは 14-3-3 protein gamma が恒常的にリン酸化している 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った。このことから、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。

小括

HS に対するダサチニブの *in vivo* における効果を明らかにするため、CHS-1 細胞移植マウスモデルを用いてダサチニブの効果を検討した。

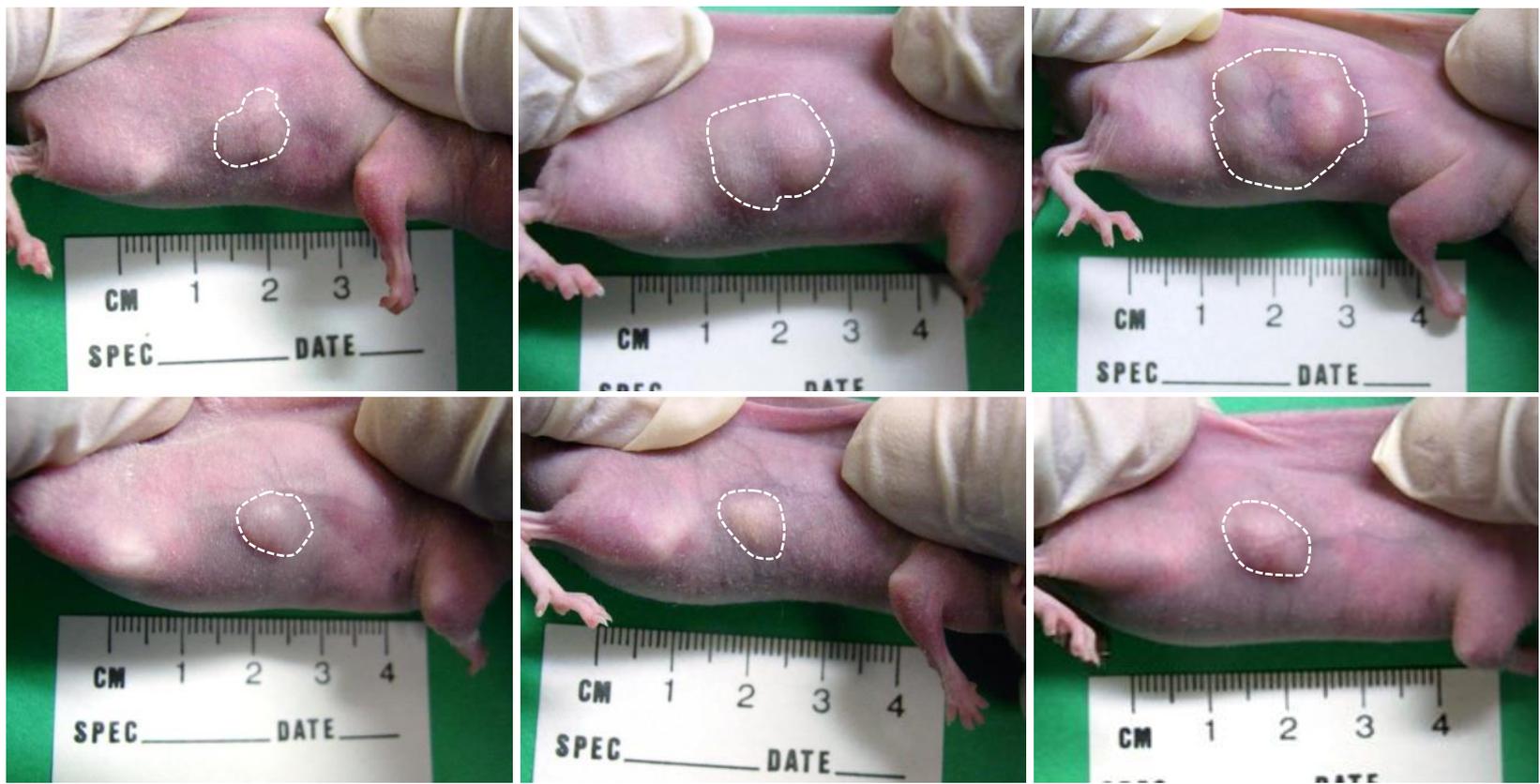
ダサチニブは CHS-1 細胞移植マウスモデルにおいて腫瘍の増殖を抑制することが明らかとなった。ダサチニブ投与群は、コントロール群に比べ移植腫瘍における有糸分裂指数および Ki-67 指数が低く、アポトーシス指数が高かったことから、ダサチニブによる移植腫瘍の増殖抑制は細胞分裂の抑制と細胞死の促進により引き起こされたと考えられた。

CHS-1 細胞におけるダサチニブのアポトーシス誘導機構については不明であるが、ダサチニブは CHS-1 細胞において 14-3-3 protein gamma の恒常的なリン酸化を抑制することにより細胞周期の進行を抑制することが示唆されており、移植腫瘍における細胞分裂の抑制は、ダサチニブが 14-3-3 protein gamma のリン酸化を抑制したためと考えられた。

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。



コントロール群



ダサチニブ投与群

0日目

14日目

28日目

Figure 4-1. コントロール群およびダサチニブ投与群における腫瘍の外観の変化
CHS-1細胞移植マウスモデルにおける腫瘍の外観の変化を示した。投与期間中、コントロール群では投与開始から14日目に腫瘍の明らかな増大が認められ、28日目ではさらに増大していた。一方、ダサチニブ投与群の腫瘍はわずかに増大したのみであった。

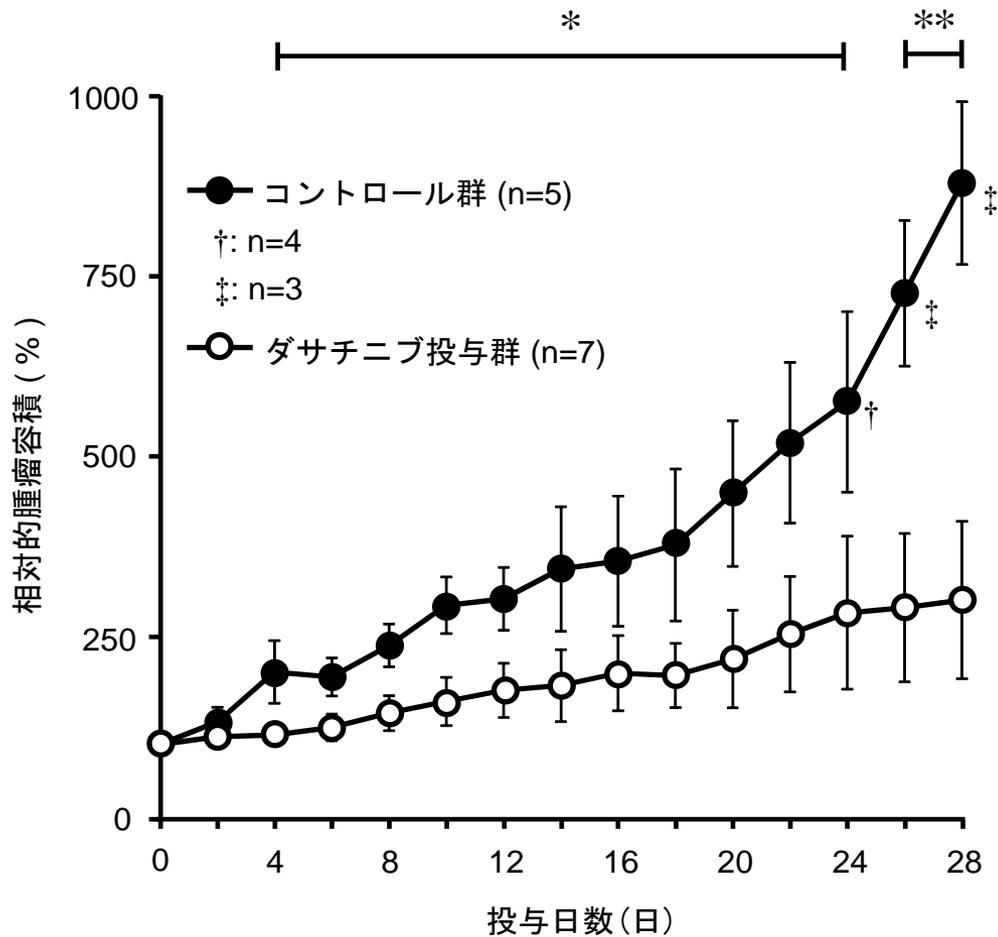


Figure 4-2. コントロール群およびダサチニブ投与群における腫瘍容積の変化

投与開始日から28日目までの腫瘍容積の変化を示した。腫瘍容積は投与開始日の腫瘍容積を100%としたときの相対値 (%)で示した (mean±SD)。ダサチニブ投与群ではコントロール群に対して投与開始4日目以降に有意な腫瘍容積の増加抑制が認められ (*: $p < 0.01$ vs コントロール群)、26日目以降より顕著となった (**: $p < 0.005$ vs コントロール群)。コントロール群では、投与開始から24日目と26日目にそれぞれ1匹が死亡した。

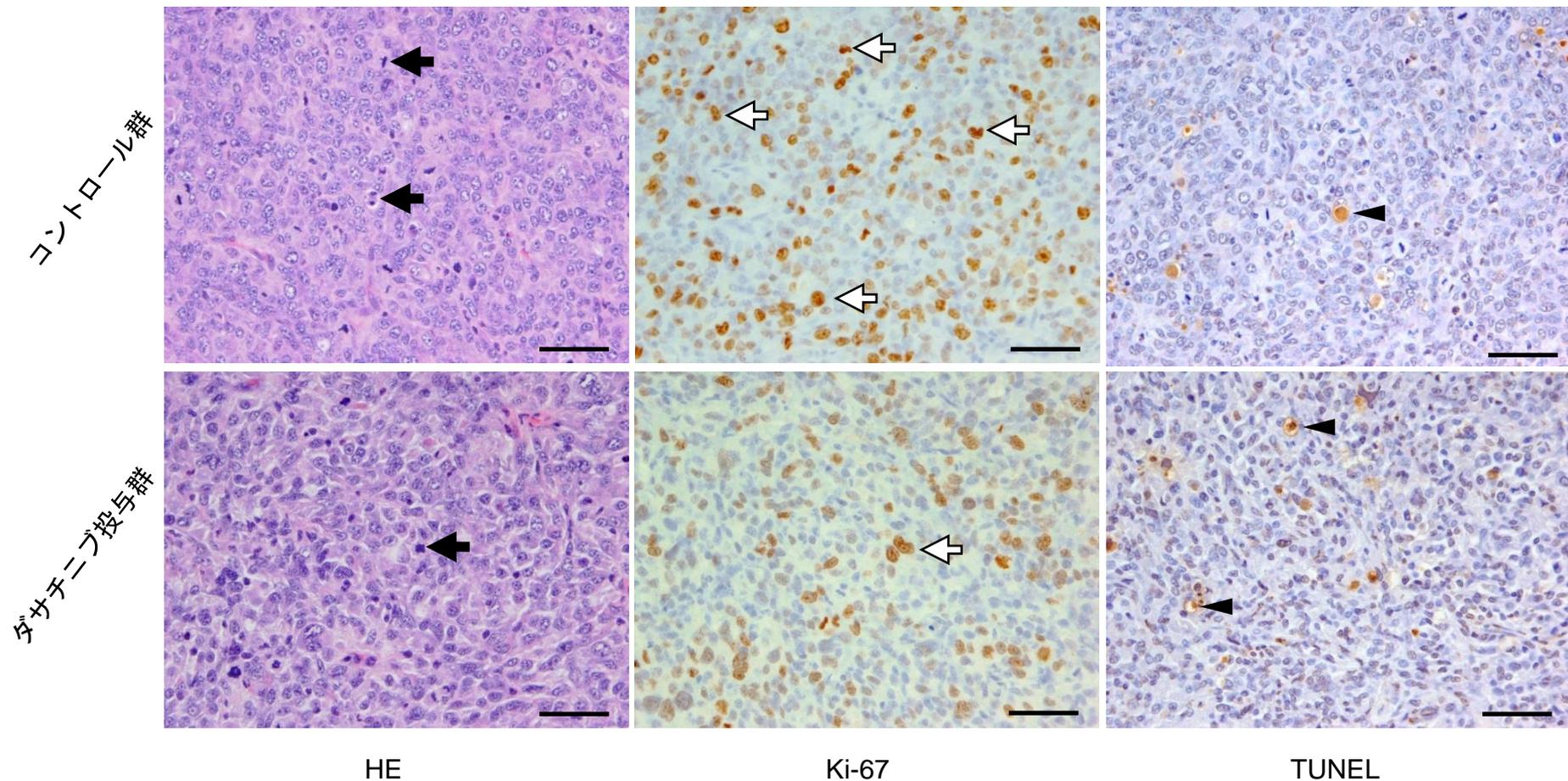


Figure 4-3. 摘出腫瘍組織のHE染色、Ki-67の免疫組織化学染色およびTUNEL染色

コントロール群およびダサチニブ投与群のマウスから摘出した腫瘍の切片を作製し、有糸分裂像、Ki-67陽性細胞およびTUNEL陽性細胞の割合を評価した (黒矢印は有糸分裂像、白矢印はKi-67陽性細胞および黒矢頭はTUNEL陽性細胞を示す)。ダサチニブ投与群における有糸分裂像およびKi-67陽性細胞の割合はコントロール群に比べて低く、TUNEL陽性細胞の割合は高かった。Bar = 20 μ m。

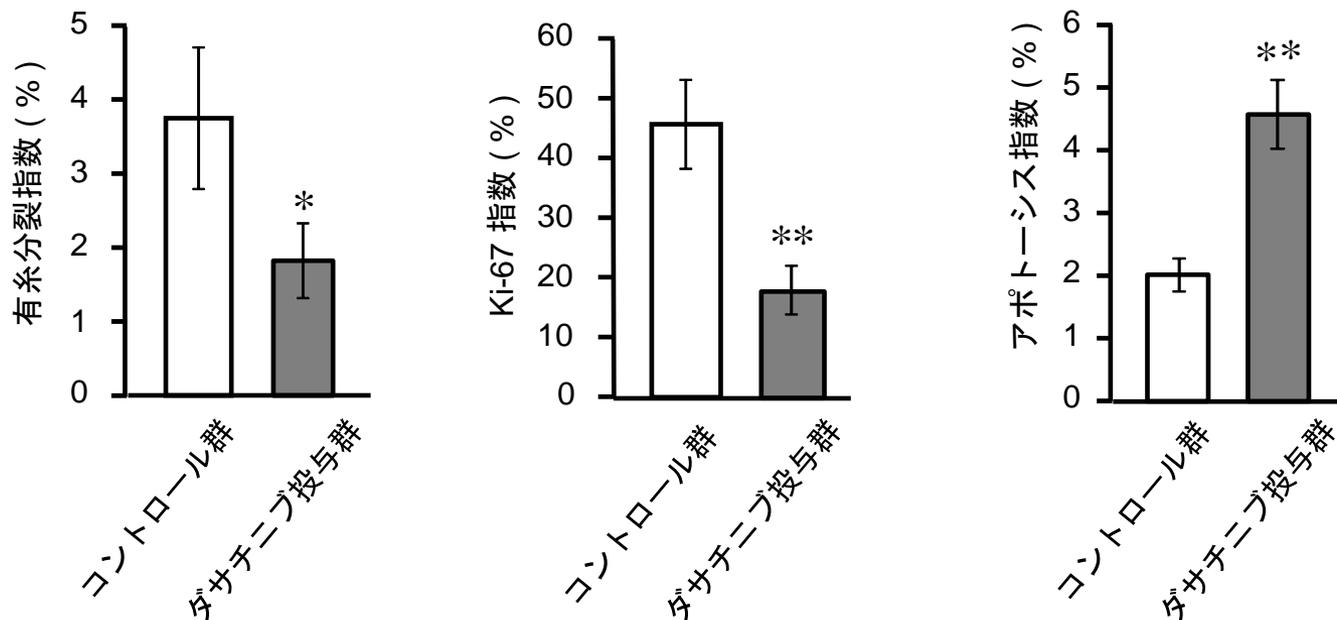


Figure 4-4. 摘出腫瘍組織における有糸分裂指数、Ki-67指数およびアポトーシス指数の比較
 コントロール群およびダサチニブ投与群のマウスから摘出した腫瘍組織における有糸分裂指数、Ki-67指数
 およびアポトーシス指数を示した。これらの指数は、HE染色、Ki-67の免疫組織化学染色およびTUNEL染色
 切片上で、それぞれ有糸分裂像、Ki-67陽性細胞およびTUNEL陽性細胞を数え、同一視野中の全ての細胞数
 に占める割合(%)で示した (mean±SD; n=3)。有糸分裂指数およびKi-67指数はコントロール群に比べてダサチ
 ニブ投与群で有意に低く (*: $p < 0.05$ vs コントロール群)、アポトーシス指数は有意に高かった (**: $p < 0.01$ vs
 コントロール群)。

第 5 章

総括

犬の組織球性肉腫 (HS)はマクロファージや樹状細胞を含む組織球系細胞に由来し、進行性で転移率が高く、致死性の腫瘍である。バーニーズマウンテンドッグ、フラットコーテッドレトリバー、ロットワイラーおよびゴールデンレトリバーでの発生率が高いと報告されているが、特にバーニーズマウンテンドッグやフラットコーテッドレトリバーの遺伝的因子が HS の発生や増殖の一因となる可能性が示唆されている。

HS の治療では、局所に発生した病変に対して外科的治療が適用される。また、術後の補助的治療として、あるいは外科的治療が適用できない症例に対しては化学療法が単独もしくは放射線治療と併用して用いられている。肉眼病変を有する HS 症例に対してロムスチン (CCNU)を用いた治療では全奏効率が 46%と有効性は認められるが、中央生存期間は 3 ヶ月から 6 ヶ月と短い。

多くの腫瘍では、その生存・増殖に、増殖シグナル伝達機構、細胞周期関連分子、アポトーシス関連分子、血管新生あるいは DNA 複製・修復機構などの異常が複雑に関与している。このように多様な分子機構の異常により増殖する腫瘍では、単一の異常な分子機構を阻害しても強力な抗腫瘍効果を得ることは難しいが、近年、腫瘍によっては単一の分子の異常に基づく異常なシグナル経路に強く依存して生存・増殖するものがあることが明らかになってきた。このような腫瘍に対しては、単一の異常分子を選択的に阻害し下流のシグナル経路を抑制することで著しい抗腫瘍効果が得られる。この異常な分子を選択的に阻害する化合物を分子標的薬といい、多くはキナーゼを標的とした阻害剤である。このような分子標的薬は遺伝子変異などにより異常に活性化したキナーゼの ATP 結合部に結合し、その分子のリン酸化シグナルを抑制することで抗腫瘍効果を示す。これまでに、人では

Bcr-Abl を有する慢性骨髄性白血病、EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞性肺癌および ALK 融合遺伝子を有する進行性肺癌などの多くの悪性腫瘍、犬および猫では KIT 遺伝子変異を有する肥満細胞腫で分子標的薬の有効性が示されている。

これらのことから、既存の治療法では十分な効果が得られない HS に対して分子標的薬による新たな治療法の可能性を模索する価値があると考えた。HS に対する分子標的薬を用いた治療法を確立するためには、HS の生存・増殖に必要な不可欠な分子機構を特定する必要があり。これまで HS では癌抑制遺伝子の発現異常や転写制御に関わる分子の異常が腫瘍の増殖に関与していることが報告されているが、HS 細胞の生存・増殖に中心的役割を果たしている分子機構は特定されていないため、分子標的薬を用いた治療戦略は確立されていない。

そこで本研究では、HS に対して分子標的薬を用いた治療法を確立するために、まず、細胞内シグナル伝達に関わる分子を阻害する化合物を用いて HS 細胞の生存・増殖に必要な分子機構を検索した。次いで、HS 細胞の増殖を抑制する化合物について、標的分子の遺伝子異常の有無とそれらの下流のシグナル経路の活性化状態を評価した。また、この化合物の新たな標的分子を検索した。さらに、犬 HS 移植マウスモデルを作製し、*in vitro* で HS 株化細胞の増殖を抑制した化合物の *in vivo* における効果を検討した。

1. HS 細胞の生存・増殖に必要な分子機構の網羅的探索

CHS-1 および MHT-2 に対して、219 種類の化合物ライブラリーを用いた細胞増殖抑制試験を行い、HS 株化細胞に対して細胞増殖抑制効果を示す化合物を検索したところ、ダサ

チニブは CHS-1 細胞に対して細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。次いで、6 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4、CHS-5、CHS-7 および MHT-2) に対するダサチニブの細胞増殖抑制効果を評価したところ、4 種類の HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7) で明らかな細胞増殖抑制効果が見られ、これらの細胞に対するダサチニブの IC50 は 5.4-54.5 nM であった。CHS-1 細胞の増殖は Bcr-Abl、Src family kinase、Kit および PDGFR を阻害する化合物で抑制されなかったことから、ダサチニブは EphA2 あるいは標的として同定されていないキナーゼを抑制することで効果を現したと推測された。

以上の結果から、HS 細胞の中にはダサチニブが標的とするキナーゼに依存して増殖しているものがあり、このような細胞に対してダサチニブは細胞増殖抑制効果を示すと考えられた。

2. HS 細胞におけるダサチニブの標的分子の解析

HS 細胞におけるダサチニブの標的分子を明らかにするため、ダサチニブに感受性を示した CHS-1、CHS-2、CHS-4 および CHS-7 細胞と感受性を示さなかった MHT-2 および CHS-5 細胞を用いて EphA2、Abl、Bcr、Src family kinase、Kit および PDGFR 遺伝子の発現量、ゲノム領域における遺伝子増幅の有無および変異の有無を解析した。さらに、これらの分子の下流シグナル伝達経路の活性化について評価した。次いで、CHS-1 細胞および MHT-2 細胞を用いてリン酸化蛋白質の網羅的解析を行い、CHS-1 細胞におけるダサチニブの新たな標的分子を検索した。

ダサチニブに感受性を示した HS 株化細胞のいずれにおいても EphA2、Abl、Bcr、Src

family kinase、Kit および PDGFR 遺伝子の発現量の増加および EphA2 および Bcr の遺伝子増幅は認められず、CHS-1 細胞においては EphA2、Abl、Bcr、Src および Yes の変異は認められなかった。さらに、これらの HS 株化細胞においては下流のシグナル伝達分子である AKT、ERK1/2 および STAT3 のリン酸化は認められなかった。これらのことから、ダサチニブは既知の標的分子に作用して HS 細胞の増殖を抑制したのではなく、標的として同定されていないキナーゼのリン酸化を抑制したことで HS 細胞の増殖を抑制したと考えられた。一方、CHS-1 細胞におけるリン酸化蛋白質の網羅的解析から、14-3-3 protein gamma が恒常的にリン酸化していることが示され、さらに、このリン酸化はダサチニブにより抑制されることが明らかとなった。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進行させることから、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た。しかしながら、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。

3. 犬 HS 移植マウスモデルにおけるダサチニブの効果

HS に対するダサチニブの in vivo における効果を明らかにするため、CHS-1 細胞移植マウスモデルを用いてダサチニブの効果を検討した。

ダサチニブは CHS-1 細胞移植マウスモデルにおいて腫瘍の増殖を抑制することが明ら

かとなった。ダサチニブ投与群は、コントロール群に比べ移植腫瘍における有糸分裂指数および Ki-67 指数が低く、アポトーシス指数が高かったことから、ダサチニブによる移植腫瘍の増殖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。

CHS-1 細胞におけるダサチニブのアポトーシス誘導機構については不明であるが、ダサチニブは CHS-1 細胞において 14-3-3 protein gamma の恒常的なリン酸化を抑制することにより細胞周期の進行を抑制することが示唆されており、移植腫瘍における細胞分裂の抑制は、ダサチニブが 14-3-3 protein gamma のリン酸化を抑制したためと考えられた。

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。

以上のことから、HS では腫瘍細胞の増殖に 14-3-3 protein gamma の恒常的なリン酸化がきわめて重要な役割を果たしていることがあると考えられた。ダサチニブはこの蛋白質が恒常的にリン酸化している HS 細胞の増殖を *in vitro* および *in vivo* で抑制することから、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、ダサチニブによる治療が有益である可能性が考えられた。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際し御親切な御指導を賜った日本獣医生命科学大学獣医臨床病理学教室 鷺巣月美教授に心から感謝の意を表します。

また、始終御指導、御教授を頂いた日本獣医生命科学大学獣医臨床病理学教室 盆子原誠准教授および入交眞巳講師、日本動物高度医療センター 小野憲一郎東京大学名誉教授に深謝致します。

さらに、研究の遂行にあたりご協力頂いた日本獣医生命科学大学生体分子化学教室 田崎弘之教授、片山欣也准教授および佐藤稲子助教ならびにご協力頂いた田村恭一、池谷早代、竹下恭平、宮本良、杉浦壮大の各氏をはじめとする本学獣医臨床病理学教室各位に深謝いたします。本学大学院獣医生命科学研究科博士課程獣医学専攻の黒木詩織ならびに小林正人の両氏に深く感謝いたします。

最後に、長年にわたる御支援と暖かい励ましを頂いた両親に心より感謝いたします。

参考文献

1. Moore PF, Affolter VK, Vernau W. Canine hemophagocytic histiocytic sarcoma: a proliferative disorder of CD11d+ macrophages. *Vet Pathol.* 2006 Sep;43(5):632-45.
2. Fulmer AK, Mauldin GE. Canine histiocytic neoplasia: an overview. *Can Vet J.* 2007 Oct;48(10):1041-3, 1046-50.
3. Affolter VK, Moore PF. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. *Vet Pathol.* 2002 Jan;39(1):74-83.
4. Moore PF. Characterization of cytoplasmic lysozyme immunoreactivity as a histiocytic marker in normal canine tissues. *Vet Pathol.* 1986 Nov;23(6):763-9.
5. Rosin A, Moore P, Dubielzig R. Malignant histiocytosis in Bernese Mountain dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1986 May 1;188(9):1041-5.
6. Dobson J, Villiers E, Roulois A, Gould S, Mellor P, Hoather T, Watson P. Histiocytic sarcoma of the spleen in flat-coated retrievers with regenerative anaemia and hypoproteinaemia. *Vet Rec.* 2006 Jun 17;158(24):825-9.
7. Fidel J, Schiller I, Hauser B, Jausi Y, Rohrer-Bley C, Roos M, Kaser-Hotz B. Histiocytic sarcomas in flat-coated retrievers: a summary of 37 cases (November 1998-March 2005). *Vet Comp Oncol.* 2006 Jun;4(2):63-74.
8. Vail DM, Kravis LD, Cooley AJ, Chun R, MacEwen EG. Preclinical trial of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes in dogs with spontaneously arising malignant tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;39(5):410-6.

9. Poirier VJ, Hershey AE, Burgess KE, Phillips B, Turek MM, Forrest LJ, Beaver L, Vail DM. Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *J Vet Intern Med.* 2004 Mar-Apr;18(2):219-22.
10. Skorupski KA, Clifford CA, Paoloni MC, Lara-Garcia A, Barber L, Kent MS, LeBlanc AK, Sabhlok A, Mauldin EA, Shofer FS, Couto CG, Sørenmo KU. CCNU for the treatment of dogs with histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med.* 2007 Jan-Feb;21(1):121-6.
11. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR Jr, Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res.* 2010 Oct;34(10):1255-68.
12. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004 May 20;350(21):2129-39.
13. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, Shapiro GI, Costa DB, Ou SH, Butaney M, Salgia R, Maki RG, Varella-Garcia M, Doebele RC, Bang YJ, Kulig K, Selaru P, Tang Y, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Iafrate AJ, Camidge DR. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2011 Oct;12(11):1004-12.
14. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, Powers B, Leventhal PS, Kinet JP, Palmerini F, Dubreuil P, Moussy A, Hermine O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med.* 2008 Nov-Dec;22(6):1301-9.

15. Isotani M, Ishida N, Tominaga M, Tamura K, Yagihara H, Ochi S, Kato R, Kobayashi T, Fujita M, Fujino Y, Setoguchi A, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med.* 2008 Jul-Aug;22(4):985-8.
16. Isotani M, Yamada O, Lachowicz JL, Tamura K, Yagihara H, Fujino Y, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Mutations in the fifth immunoglobulin-like domain of kit are common and potentially sensitive to imatinib mesylate in feline mast cell tumours. *Br J Haematol.* 2010 Jan;148(1):144-53.
17. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, Boucher JF, Rusk AW, Rosenberg MP, Henry CJ, Mitchener KL, Klein MK, Hintermeister JG, Bergman PJ, Couto GC, Mauldin GN, Michels GM. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin Cancer Res.* 2009 Jun 1;15(11):3856-65.
18. Hedan B, Thomas R, Motsinger-Reif A, Abadie J, Andre C, Cullen J, Breen M. Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer.* 2011 May 26;11:201.
19. Sterenczak KA, Kleinschmidt S, Wefstaedt P, Eberle N, Hewicker-Trautwein M, Bullerdiek J, Nolte I, Murua Escobar H. Quantitative PCR and immunohistochemical analyses of HMGB1 and RAGE expression in canine disseminated histiocytic sarcoma (malignant histiocytosis).

Anticancer Res. 2011 May;31(5):1541-8.

20. Azakami D, Bonkobara M, Washizu T, Iida A, Kondo M, Kato R, Niikura Y, Iwaki S, Tamahara S, Matsuki N, Ono K. Establishment and biological characterization of canine histiocytic sarcoma cell lines. *J Vet Med Sci.* 2006 Dec;68(12):1343-6.
21. Steinberg M. Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Ther.* 2007 Nov;29(11):2289-308.
22. Khoury HJ, Guilhot F, Hughes TP, Kim DW, Cortes JE. Dasatinib treatment for Philadelphia chromosome-positive leukemias: practical considerations. *Cancer.* 2009 Apr 1;115(7):1381-94.
23. Aguilera DG, Tsimberidou AM. Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. *Ther Clin Risk Manag.* 2009 Apr;5(2):281-9.
24. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Huguet F, Boqué C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Sztatrowski T, Shapiro D, Baccarani M. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010 Jun 17;362(24):2260-70.
25. Demetri GD, Lo Russo P, MacPherson IR, Wang D, Morgan JA, Brunton VG, Paliwal P, Agrawal S, Voi M, Evans TR. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2009 Oct 1;15(19):6232-40.
26. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a

- novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004 Jul 16;305(5682):399-401.
27. Nam S, Kim D, Cheng JQ, Zhang S, Lee JH, Buettner R, Mirosevich J, Lee FY, Jove R. Action of the Src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9185-9.
28. Levitt JM, Yamashita H, Jian W, Lerner SP, Sonpavde G. Dasatinib is preclinically active against Src-overexpressing human transitional cell carcinoma of the urothelium with activated Src signaling. *Mol Cancer Ther*. 2010 May;9(5):1128-35.
29. Chang Q, Jorgensen C, Pawson T, Hedley DW. Effects of dasatinib on EphA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2008 Oct 7;99(7):1074-82.
30. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Castaneda S, Cornelius LA, Das J, Doweiko AM, Fairchild C, Hunt JT, Inigo I, Johnston K, Kamath A, Kan D, Klei H, Marathe P, Pang S, Peterson R, Pitt S, Schieven GL, Schmidt RJ, Tokarski J, Wen ML, Wityak J, Borzilleri RM. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004 Dec 30;47(27):6658-61.
31. Van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays*. 2001 Oct;23(10):936-46. Review.
32. Xing H, Zhang S, Weinheimer C, Kovacs A, Muslin AJ. 14-3-3 proteins block apoptosis and

- differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J.* 2000 Feb 1;19(3): 349-58.
33. Zhao J, Meyerkord CL, Du Y, Khuri FR, Fu H. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. *Semin Cell Dev Biol.* 2011 Sep;22(7):705-12.
34. Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y. K phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* 2005 Mar;7(3):278-85.
35. Kasahara K, Goto H, Enomoto M, Tomono Y, Kiyono T, Inagaki M. 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J.* 2010 Aug 18;29(16):2802-12.
36. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer.* 2007 Jul;7(7):495-507. Review.
37. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Oct 3;99(19):1441-54.
38. Constantinou AI, Kamath N, Murley JS. Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur J Cancer.* 1998 Nov;34(12):1927-34.