

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)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医学専攻博士課程平成 22 年入学

伊藤慶太

(指導教授：鷺巣月美)

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。