

犬の肥満細胞腫における *KIT* 変異と
トセラニブ感受性に関する研究

(Studies on *KIT* mutations and toceranib susceptibility in canine mast cell tumor)

栗田 晟那

犬の肥満細胞腫における *KIT* 変異と
トセラニブ感受性に関する研究

(Studies on *KIT* mutations and toceranib susceptibility in canine mast cell tumor)

栗田 晟那

日本獣医生命科学大学大学院生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 28 年入学

(指導教授：盆子原 誠)

令和 2 年 3 月

目次

第1章	序論	1
第2章	犬の肥満細胞腫の症例における <i>KIT</i> 遺伝子変異の探索と <i>KIT</i> リン酸化制御の解析	5
	実験1. 材料と方法	8
	実験1. 結果	12
	実験2. 材料と方法	15
	実験2. 結果	19
	考察	22
	小括	30
	表および図	31
第3章	トセラニブ抵抗性犬肥満細胞腫細胞株の作出と <i>KIT</i> 変異発生プロセスの解析	38
	材料と方法	42
	結果	47
	考察	52
	小括	55
	表および図	56
第4章	犬肥満細胞腫株化細胞のトセラニブ抵抗性におよぼす SHP2 阻害の影響	62
	材料と方法	66
	結果	69
	考察	71
	小括	74
	表および図	75
第5章	総括	78
	謝辞	84
	参考文献	85

第 1 章

序論

犬の肥満細胞腫における治療の主軸は徹底した局所治療である。しかしながら局所治療が不十分な症例や腫瘍が転移している症例に対しては化学療法が行われる[1]。近年、肥満細胞腫に対する新たな化学療法薬としてトセラニブが用いられるようになった。トセラニブは KIT、PDGFR、VEGFR などの分子を標的とするマルチキナーゼ阻害剤であり、変異により恒常的に活性化した KIT を抑制することで効果をあらわすと考えられている[2]。実際、トセラニブは野生型の *KIT* を有する肥満細胞腫と比べて、*KIT* エクソン 11 の重複配列挿入変異 (ITD 変異) を持つ肥満細胞腫でより高い腫瘍縮小効果 (それぞれ 31.1% および 60.0% の反応率) を示すことが報告されている[3]。しかしながら、必ずしも *KIT* の変異の有無とトセラニブの効果の有無が一致するわけではなく、野生型 *KIT* を有する症例でもトセラニブが奏功する場合や変異型 *KIT* を有する症例においてトセラニブが奏効しない場合もある。さらに、近年の Weishaar(2018)らの研究では、犬の肥満細胞腫において *KIT* エクソン 11 の ITD 変異の有無ではトセラニブの有益性を予測できないことが示唆されている[4]。このように *KIT* 変異の有無ではトセラニブの効果が十分予測できないことから、肥満細胞腫に対するトセラニブの個別化治療は実現しておらず、効率的な治療を行う上

で大きな障壁となっている。

犬の肥満細胞腫においてトセラニブの個別化治療が確立できない理由として、*KIT* 変異とトセラニブの反応性の関連を解析する際にエクソン 11 の ITD 変異以外の変異が考慮されていない[3,4]ことが大きい。これは、これまで肥満細胞腫における緻密な *KIT* 変異の解析が行われておらず、肥満細胞腫における *KIT* 変異パターンの全体像が不明なこと、さらに個別の変異 *KIT* の特徴が分からないことに起因している。

そこで本研究では、トセラニブによる個別化治療の分子基盤を構築するため、まず第 2 章で犬の肥満細胞腫 164 症例のゲノム DNA を NGS 解析し、*KIT* 変異の網羅的探索を行った。また NGS 解析で認められた変異および既知の変異を含む組み換え *KIT* 蛋白を作製し、変異の性状解析を行った。第 2 章の解析において様々な特性を持つ変異 *KIT* が同定されたが、その中にトセラニブ抵抗性を示す変異が複数検出された。このような変異はトセラニブによる治療を個別化する上できわめて重要であることから、第 3 章では、トセラニブ抵抗性の *KIT* 変異に注目し、肥満細胞腫細胞のトセラニブ耐性の獲得過程における変異の発生プロセスについて検討することとした。この解析では、トセラニブ感受

性の犬の肥満細胞腫細胞株 VI-MC から抵抗性細胞株を作出し、抵抗性獲得過程における *KIT* の変異の変遷を NGS で解析した。第 4 章では、トセラニブ耐性肥満細胞腫の克服戦略を構築するため、*KIT* シグナルの下流に存在する *SHP2* に着目し、トセラニブ抵抗性肥満細胞腫細胞株の増殖におよぼす *SHP2* 阻害剤の影響について検討した。

第2章

犬の肥満細胞腫の症例における

KIT 遺伝子変異の探索と *KIT* リン酸化制御の解析

犬の肥満細胞腫においてトセラニブの個別化治療が確立できない大きな理由として、*KIT* 変異とトセラニブの反応性の関連性を解析する際に発生頻度の高いエクソン 11 の ITD 変異のみが解析されており、他の領域における変異が考慮されていないことがあげられる。これは、これまで肥満細胞腫における *KIT* 変異の網羅的な解析が行われていないことから、エクソン 11 の ITD 以外に同定された変異の数が少なく、肥満細胞腫における *KIT* 変異パターンの全体像が不明であることが大きな要因である。さらに、トセラニブの個別化治療を確立する上では、*KIT* 変異の場所と種類の違いによるトセラニブ感受性の相違についても明らかにする必要がある。犬の肥満細胞腫と同様に、人の消化管間質腫瘍 (GIST) では変異 *KIT* を標的としたキナーゼ阻害剤による治療が行われるが、変異の部位と種類により効果に差がみられる。例えばキナーゼ阻害剤イマチニブの GIST における奏功率は、*KIT* エクソン 11 変異例では 83.5% であるが、エクソン 9 変異例では 47.8% である [5]。また人の肥満細胞症では *KIT* 変異の多くが p.Asp816Val (エクソン 17) であるが [6,7]、この変異はイマチニブ抵抗性であり、このような症例は予めイマチニブ不適応と判断されている [8,9]。このように、肥満細胞腫に対するトセラニブの個別化治療を確立する上では、*KIT* 変

異の種類と各変異の特性を解明することが必要であるが、犬の肥満細胞腫ではこれらについてほとんど研究されていない。

そこで本章では、まず犬の肥満細胞腫における *KIT* 変異を網羅的に探索することを目的とし、臨床例の腫瘍サンプルを用いて *KIT* 遺伝子の全エクソンを NGS 解析した。次いで、NGS 解析で認められた変異の中で比較的頻度の高い変異と文献上で報告されている既知の *KIT* 変異について組み換え蛋白を製作し、変異 *KIT* のリン酸化レベルとトセラニブ抵抗性について解析した。

実験 1 肥満細胞腫の腫瘍組織を用いた *KIT* ゲノム DNA の NGS 解析

材料と方法

ゲノム DNA サンプル

株式会社ケーナインラボより供与された犬の肥満細胞腫 164 症例の腫瘍組織ゲノム DNA をサンプルとして用いた。サンプルに用いた腫瘍の診断は、128 例が病理組織、36 例が細胞診で行われた。また、健常犬 16 頭の末梢血単核細胞からゲノム DNA を抽出し、本実験におけるコントロールとして用いた。

NGS ライブラリの作製

NCBI に登録されている犬のゲノム塩基配列 (NW_003726083) に基づき、犬の *KIT* ゲノム DNA の全エクソンをカバーするよう DNASTAR Lasergene (DnaStar, Madison, WI) を用いてプライマーセット 7 組を設計した (Table 2-1)。PCR には Primestart GXL DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用い、各プライマーセットとゲノム DNA 200 ng を用いて 35 サイク

ル増幅した。増幅したサンプルを 0.3%アガロースゲルで電気泳動し、目的サイズのバンドの出現を確認した。この PCR 産物を MinElute96 UF PCR Purification(Qiagen, Hilden, Germany)にて精製した後、NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて核酸の濃度を測定した。組織学的グレードごとに、各 PCR 産物を等量混合し、一つのサンプルとした。サンプル中の PCR 産物のタグメンテーションおよびインデックス配列の付与のため、それぞれ 40-50 ng の PCR 産物を用いて、Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA)による PCR を 15 - 17 サイクル行った。さらに NucleoMag NGS clean-up and Size Select (Macherey-Nagel, Düren, Germany)を用いて、250-900 bp の PCR 産物を濃縮した。健常犬のサンプルも症例サンプルと同様の手順で作製した。腫瘍サンプルについては、組織学的グレードごとにサンプル中に含まれる PCR 産物の濃度が等しくなるように調整し、これを最終的な NGS ライブラリとした。

NGS およびデータ解析

4 nM に調整された NGS ライブラリから 5 μ l を Miseq Reagent Kit

v3 (Illumina) にロードし、Miseq (Illumina)を用いて NGS ライブラリの NGS 解析を行った。NGS 解析により得られたリードファイルは FASTX Toolkit program (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)を用いてフィルタリングした (フィルタリング条件: Quality Value >20, Read Length >250 bp)。次に BMap (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) を用いてリードのソーティングおよび欠落したペアリードの検証を行った。その後 CLC Genomics Workbench software version 7.5 (CLC Bio, Arhus, Denmark) を用いて各リードのマッピングおよびバリエーションコールを行った。リファレンス配列には、NCBI に登録されている犬の *KIT* ゲノム DNA (NW_003726083) および *KIT* cDNA (NM_001003181) を用いた。また健常犬の *KIT* ゲノム DNA を用いた NGS 解析から、変異が偽陽性としてコールされない条件を検討し (変異頻度が 0.3% 以上かつ変異を含むリード数が 30 本以上)、これを解析における変異の検出限界に設定した。さらに ITD 変異を解析するために、フィルタリング後のリードファイルを Pindel (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>) を用いて解析した。ショートリードを用いた NGS における ITD 変異解析では、ITD の配列を部分的に含むリードが多数存在するため、正確な変異頻度が算出されない。

このため、コールされた ITD 変異を直接リードファイルから検索し、当該エクソンにおける平均 coverage を ITD 変異の完全長を含んだリード数で割ること
でおおよそその変異頻度を算出した。

KIT変異の確認

NGS 解析で得られた変異について、変異頻度が高いもの（エクソン 11
の変異を除く）は、個々の症例のゲノム DNA を PCR-ダイレクトシーケンス
法により解析し、*KIT* 変異の存在を確かめた。さらに PCR -ダイレクトシーク
エンス法で認められた変異については PCR 産物をクローニングし、この変異を
確認した。

結果

病理組織学的グレード

サンプル 164 症例の病理組織学的グレード (Patnaik らの分類[10]) は、グレード I が 16 症例、グレード II が 88 症例、グレード III が 24 症例、グレード不明が 36 症例であった。

Depth of coverage

NGS 解析による *KIT* の全エクソンを通じた平均 depth of coverage はそれぞれ、健常犬サンプルが 7668 リード/塩基、グレード I サンプルが 9754 リード/塩基、グレード II サンプルが 10989 リード/塩基、グレード III サンプルが 9725 リード/塩基、グレード不明サンプルが 10663 リード/塩基であった。

NGS 解析による *KIT* 変異の検出

NGS 解析により認められた *KIT* 変異を Table 2-2 に示した。エクソン 11 の変異を除き頻度が高い変異 (c.884C>A、c.1133G>A、c.1160G>T、

c.1228G>T、c.1523A>T、c.2456A>T) については、個々の症例のゲノム DNA の PCR 産物をダイレクトシーケンスおよびクローニングにより変異の存在を確認した。NGS で検出された変異は 35 種類あり、KIT のイムノグロブリン様領域に 12 種類、膜近傍領域に 20 種類、キナーゼ領域に 2 種類、C 末端領域に 1 種類認められた。これらの中で ITD 変異は 18 種類あり、すべて膜近傍領域をコードするエクソン 11 にみられた。エクソン 11 の ITD 変異は過去に多数報告されており、今回同定された ITD 変異はこれらの変異と同一の変異ではないが類似した変異であった。このため、エクソン 11 の ITD 変異を除くと、NGS で同定された変異 17 種類中、第 5 イムノグロブリン様領域をコードするエクソン 9 の c.1523A>T を除く 16 種類の変異が新規の変異であった。またイムノグロブリン様領域、膜近傍領域、キナーゼ領域、C 末端領域における変異頻度はそれぞれ 0.38%-5.23%、0.44%-21.17%、0.42%-0.78%、0.62%であった。

各組織学的グレードにおける *KIT* の変異パターン

組織学的グレードごとに NGS 解析で得られた *KIT* 変異の種類数を Table 2-3 に示した。組織学的グレード I でみられた変異は 3 種類あり、イムノ

グロブリン様領域で2種類とC末端領域で1種類であった。組織学的グレードIIでみられた変異は12種類あり、イムノグロブリン様領域で6種類と膜近傍領域で6種類であった。膜近傍領域の変異は5種類がITDで、1種類が1アミノ酸置換であった。組織学的グレードIIIでみられた変異は9種類あり、イムノグロブリン様領域で1種類と膜近傍領域で6種類であった。膜近傍領域の変異は全てITDだった。

実験2 変異 KIT のリン酸化とトセラニブ感受性の解析

材料と方法

細胞株

実験には日本獣医生命科学大学 獣医衛生学教室 田中良和先生より分与された HEK293 細胞（ヒト胎児腎細胞由来細胞）を用いた。HEK293 細胞は 50 U/ml ペニシリン（Thermo Fisher）、50 µg/ml ストレプトマイシン（Thermo Fisher）および 10%非動化ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（Nacalai tesque, Kyoto, Japan）（cDMEM）を用いて 37°C、5% CO₂ 湿潤環境で培養した。

野生型および変異型 KIT 組み換え蛋白の作製

変異 KIT 組み換え蛋白発現ベクターの作製には、獣医臨床病理学教室で保有している健常犬の野生型 *KIT* cDNA の全長が組み込まれた pcDNA3.1 哺乳類細胞発現ベクターを用いた。症例のゲノム DNA のダイレクトシーケンス

およびクローニングで確認した *KIT* 変異 6 種と文献で報告がある *KIT* 変異 33 種について、site-directed mutagenesis kit (PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit, Takara Bio)を用いて、それぞれの変異を組み込んだ変異 *KIT* 発現ベクターを製作した (Table 2-4)。野生型 *KIT* および変異 *KIT* 発現ベクターを Polyethyleneimine MAX (Polysciences, Warrington, PA)を用いて HEK293 細胞に導入した。遺伝子導入後 8 時間で無血清培地に交換し、16 時間培養した。またリガンド存在下の野生型 *KIT* サンプルでは、培養後に 100 ng/ μ l の Stem Cell Factor (SCF, R&D Systemes, Minneapolis, MN) を 20 分暴露した。トセラニブによる変異 *KIT* のリン酸化の阻害効果を検討する実験では、無血清培地で培養後、0-0.5 μ M のトセラニブ (Medkoo Biosciences, Morrisville, NC) を添加し 90 分培養した。これらの HEK293 細胞を cell lysis buffer (#9803, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)で溶解した後、SDS-PAGE サンプルバッファーを加え 95°Cで 5 分間煮沸し、-30°Cで使用まで保存した。

野生型 *KIT* および変異型 *KIT* におけるリン酸化状態の解析

野生型 *KIT* および変異型 *KIT* のリン酸化状態はウェスタンブロッテ

ィングで解析した。サンプルバッファーを加えた細胞溶解物蛋白を 7.5%ポリア
クリルアミドゲルで分離した。泳動後の蛋白を PVDF メンブレン (Immun-Blot
PVDF Membranes; BIO-RAD, Hercules, CA) に転写した後、5%スキムミルク
(非リン酸化蛋白の検出) あるいは Blocking-One P (Nacalai tesque) (リン酸
化蛋白の検出) でブロッキングした。このメンブレンを一次抗体および二次抗体
と反応させた。一次抗体として polyclonal rabbit anti-human CD117 antibody
(A4502; Dako, Glostrup, Denmark) あるいは monoclonal rabbit anti-human
phospho-c-Kit (Tyr703) antibody (3073S; Cell Signaling Technology) を用いた。
二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG whole
antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いた。このメンブレンを ECL
Prime (GE Healthcare) で処理した後、および LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo,
Japan) でバンドの検出を行った。検出されたバンドは ImageQuant TL
software(Fujifilm) を用いて半定量化した。半定量解析で得られたシグナルレベ
ルをそれぞれの KIT の発現レベルに応じてノーマライズした。この実験は独立
して 3 回行った。

統計学的解析

統計学的解析は Student's t 検定（両側検定）で行い、 $P < 0.05$ を有意な差とした。

結果

各種変異 KIT におけるリン酸化レベルの相違

SCF 非存在下および存在下の野生型 KIT と SCF 非存在下の変異 KIT のリン酸化レベルを Figure 2-1 に示した。SCF 非存在下の野生型 KIT と比較して、多くの変異 KIT において恒常的なリン酸化がみられ、SCF で刺激した野生型 KIT 以上に強いリン酸化を示す変異 KIT もみられた (#11、#12、#15、#16、#19、#35)。一方、リン酸化レベルが SCF 非存在下の野生型 KIT と同程度かあるいはわずかに増加している変異 KIT (#3、#23、#26、#27、#29、#30、#31、#36) も認められた。また、KIT のリン酸化がほとんどみられない変異も認められた (#28)。さらに、4 種類の変異 KIT (#4、#9、#13、#35) については、KIT の発現が認められなかった。KIT のリン酸化レベルは膜近傍領域の N 末端側あるいは活性化ループ領域に変異を持つ KIT で高い傾向がみられた。一部の変異 KIT (#4、#9、#13、#34) については、変異 KIT の発現がみられなかった。EGFR では点突然変異の導入によって水素結合が極端に減少し、蛋白の安定性が極端に低下する可能性があることが知られている [11]。発現がみられなかった変異 KIT

は同様に、安定性が低下し早期に分解された可能性が考えられた。

変異 KIT のリン酸化におよぼすトセラニブの影響

Figure 2-1 で解析した変異 KIT の中から、SCF 非存在下の野生型 KIT に比べて 2 倍以上のリン酸化の増強を示す変異 KIT (#1、#2、#5、#6、#7、#8、#10、#11、#12、#14、#15、#16、#17、#18、#19、#20、#21、#22、#24、#25、#27、#32、#33、#35) に注目し、これらのリン酸化におよぼすトセラニブの影響を検討した (Figure 2-2)。変異 KIT のトセラニブ感受性は変異により異なり、トセラニブ 0.1 μ M からリン酸化が有意に ($P < 0.05$) 抑制される変異 KIT (#2、#7、#15、#18、#20、#24)、0.5 μ M のトセラニブでリン酸化が有意に ($P < 0.05$) 抑制される変異 KIT (#8、#10、#14、#19、#22)、さらに 0.5 μ M のトセラニブでもリン酸化が抑制されない変異 KIT (#1、#5、#6、#11、#12、#16、#17、#21、#25、#27、#32、#33、#35) が存在した (Figure 2-2A)。また、有意差は認められなかったが、#1、#5、#11、#12、#17、#21 ではトセラニブによりリン酸化が抑制される傾向がみられた。膜貫通領域の C 末端側および活性化ループ領域の変異はリン酸化が抑制されにくい傾向がみられた。Figure 2-2B に Figure

2-2A の解析に用いたウエスタンブロッティングの結果の中で、トセラニブ 0.1 μM からリン酸化が抑制される変異 KIT と 0.5 μM のトセラニブでもリン酸化が抑制されない変異 KIT の典型的な結果を示した。

考察

網羅的な *KIT* の変異解析により肥満細胞腫の腫瘍サンプルから 35 種の変異が検出され、エクソン 11 の ITD 変異を除き 16 種類の新たな変異を発見した。変異の頻度については、これまでの報告[12]と同様にエクソン 11 の ITD 変異が多くみられたが、NGS 解析において頻度の低い多様な変異が *KIT* の広範な領域に生じていることが明らかとなった。今回、腫瘍サンプルをプールした上で解析しており、全ての変異を個体ごとに解析していないため、これら低頻度の変異が特定の個体の腫瘍において高い割合で存在しているのか、あるいは多くの個体の腫瘍にわずかに含まれる微量クローンが保有する変異なのかを明らかにすることはできなかった。しかしながら、犬の肥満細胞腫においてきわめて多様な *KIT* 変異が存在することは明らかであり、また変異により様々な程度で *KIT* のリン酸化が亢進、あるいは逆にリン酸化が抑制される場合があることが示された。さらにトセラニブに感受性を有する変異ばかりでなく、トセラニブ抵抗性が生じる変異が存在することも明らかとなった。これらのことから、犬の肥満細胞腫に対するトセラニブの個別化治療を確立する上では、*KIT* エクソン 11

の ITD 変異のみに注目した評価では不十分であり、包括的な変異検索と各変異の特性を踏まえた治療選択を考慮する必要があると考えられた。

組織学的グレードの観点から肥満細胞腫の *KIT* 変異の状況を分析したところ、各組織学的グレードにおける *KIT* の変異パターンに相違がみられ (Table 2-3)、グレードにより *KIT* 変異の多様性に違いがあることが示された。グレード III の腫瘍では *KIT* 変異の多様性が少なく、変異のほとんどが膜近傍領域の ITD 変異であった。一方、グレード II の腫瘍では膜近傍領域の ITD 変異もみられたが、イムノグロブリン様領域において多様な変異がみられ、また膜近傍領域においても 1 アミノ酸変異が存在した。グレード I の腫瘍については変異の多様性が少なかったが、*KIT* の変異自体が少なかった (Table 2-1)。実験 2 において、膜近傍領域の変異はより強い *KIT* のリン酸化を引き起こす傾向が示されたが、これを考慮すると、グレード III において *KIT* 変異に多様性が少なく膜近傍領域の ITD 変異に偏っていることは、このグレードの腫瘍の悪性度が高い (すなわち増殖速度が速い) ことと関連しているのかもしれない。また、グレード II の腫瘍には挙動が比較的緩やかなものからグレード III に近い増殖速度の速いものまで様々なものが存在する [9] が、これもその背景に *KIT* 変異の多様

性の相違が関与しているのかもしれない。

NGS 解析において多くの新規変異が同定されたが、その頻度は様々であり、トセラニブによる治療の個別化を考える上では同定された変異の中でも比較的頻度の高い変異について注目する必要がある。このため、変異 KIT のリン酸化とトセラニブ感受性については、NGS 解析で同定された変異の中で、c.884C>A、c.1133G>A、c.1160G>T、c.1228G>T、c.1523A>T、c.2456A>T について解析した。また、これまでに報告された *KIT* 変異のほとんどはサンガーシーケンスにより同定されていることから比較的頻度の高い変異と考えられる。そこで、過去の報告された *KIT* 変異についても同様に解析を行った。この解析から、膜近傍領域の N 末端側と活性化ループ領域に変異を持つ *KIT* において特に強くリン酸化する傾向がみられ、変異の部位が *KIT* のリン酸化レベルに影響をおよぼすことが示唆された。*KIT* を含む多くの受容体型チロシンキナーゼでは膜近傍領域の N 末端側に塩基性残基が多く存在し、この塩基性残基を多く含む領域は蛋白-脂質相互作用を介して生理活性の発現に重要な役割を担っている[13]。また、*KIT* の活性化ループ領域の変異はキナーゼドメインの不活性化構造の不安定化や未熟な糖鎖修飾を引き起こすことが知られており[14]、このよう

な KIT は他の部位の変異に比べて強力な細胞増殖と抗アポトーシス活性が有することが知られている [15]。膜近傍領域の N 末端側と活性化ループ領域に変異を持つ KIT において強く自己リン酸化する傾向がみられた背景にはこのような KIT の構造特性が関与していると考えられた。

KIT の変異はイムノグロブリン様領域においても様々な変異が認められ、高い頻度で検出される変異も存在していた。*KIT* の第 5 イムノグロブリン様領域（主にエクソン 8 と 9 にコードされる）は二量体化に際して相互作用する部位であり、人においてこの領域の変異は *KIT* の恒常的なリン酸化を引き起こすことが知られている [16,17]。今回この領域でみられた変異も恒常的に活性化しており、*KIT* の二量体化の制御に影響が生じた結果と考えられた。一方、第 1 から第 4 イムノグロブリン様領域については、変異の報告が少なく、またリガンドとの結合以外の機能的な役割についてはあまり分かっていない。今回、これらの領域においても変異が認められ、それらは *KIT* の恒常的なリン酸化を引き起こすことが示された。今のところ、第 1 から第 4 イムノグロブリン様領域に生じた変異が *KIT* の恒常的なリン酸化を生じる機序は不明であるが、近年、ヒトのグリオーマにおいて膜型チロシンキナーゼ *PDGFR* α の p.Tyr228Cys 変異

(第 3 イムノグロブリン様領域) に生じた変異が細胞の腫瘍化に強く関連していることが報告された[18]。この報告では、p.Tyr228Cys 変異は糖鎖修飾異常を引き起こし、変異型 PDGFR α は細胞質内のゴルジ装置に過剰にアンカーされることで二量体を形成し、リガンド非依存性に自己リン酸化することが示されている。KIT は PDGFR α と同じ III 型チロシンキナーゼに属しており蛋白の性質が類似している[16]ため、PDGFR α と同様の機序でイムノグロブリン領域における変異が自己リン酸化を引き起こした可能性があると考えられた。

変異 KIT のトセラニブ感受性は変異により相違がみられ、高い感受性を示す変異から感受性のない変異まで様々であった。また、変異の発生領域によってトセラニブ感受性に差が生じる傾向がみられた。犬の肥満細胞腫で膜近傍領域 (エクソン 11) や第 4-5 イムノグロブリン領域 (エクソン 8-9) に変異を有する腫瘍はイマチニブ感受性であることが報告されているが[19-21]、これらの領域に変異を有する KIT は多くの場合 0.1-0.5 μ M のトセラニブでリン酸化が抑制されたことを考慮すると、KIT のこれらの領域に変異を持つ肥満細胞腫はトセラニブに対しても感受性を持つのではないかと考えられた。一方、一部の変異 KIT (イムノグロブリン様領域, #6; 膜近傍領域, #16、#25、#27; キナー

ゼ領域活性化ループ, #33、#35) は KIT の恒常的なリン酸化を引き起こすがトセラニブによるリン酸化の抑制はみられなかった。人の GIST において、イムノグロブリン様領域あるいは膜近傍領域の特定の部位に変異を持つ KIT を発現する腫瘍では、KIT の ATP ポケットとイマチニブの結合親和性が低下しており [22, 23]、イマチニブに対して低感受性あるいは抵抗性であることが知られている [24-26]。今回トセラニブによるリン酸化の抑制がみられなかった変異 KIT においても ATP ポケットとトセラニブの結合親和性が低下している可能性があり、このような KIT 変異をもつ症例に対してはトセラニブの使用の可否について今後検討する必要がある。

トセラニブでリン酸化が抑制されなかった変異 KIT の中で、#35: c.2456A>T (p.(Asp819Val)) の変異が認められた Asp819 は人の KIT Asp820 に相当するアミノ酸残基である。人の GIST では、イマチニブによって治療初期に著しい腫瘍の縮小がみられるが、ほとんどの症例において腫瘍がイマチニブ抵抗性となり再増大する [27-29]。この主なメカニズムとして、治療開始時には変異のなかった KIT Asp820 に新たな変異が生じ (二次変異)、これにより KIT のリン酸化がイマチニブでは抑制されなくなることが知られている [9,30,31]。こ

のような二次変異を保有する腫瘍細胞は、腫瘍細胞がイマチニブなどのキナーゼ阻害剤に暴露され続けることで *de novo* に生じる場合や腫瘍組織の中に予め存在する超微量のクローンに由来する場合がありますと考えられているが[32]、そのメカニズムについてははっきりとした結論は得られていない。今回 NGS で発見した c.2456A>T (p.(Asp819Val)) は変異頻度が 0.78% と低く、さらに組換え蛋白によりトセラニブ抵抗性の KIT リン酸化を引き起こすことが示されていることから、この変異を有する腫瘍細胞はトセラニブ存在下で選択的に増殖し、最終的に腫瘍がトセラニブ抵抗性を獲得する要因になると考えられる。トセラニブによる肥満細胞腫の治療では、このような微量なトセラニブ抵抗性クローンの存在を考慮する必要があると考えられた。

結論として、犬の肥満細胞腫における *KIT* 変異はきわめて多様であり、変異により異なる特性を有することが明らかとなった。したがって、犬の肥満細胞腫におけるトセラニブの治療効果・効率を最大化するためには、*KIT* エクソン 11 の ITD に基づく個別化では不十分であり、各変異の特性を踏まえたアプローチが必要と考えられた。さらに、腫瘍組織の中にはトセラニブ抵抗性の変異 *KIT* を有する微量の腫瘍細胞が存在することから、それらのトセラニブ耐性化

における役割を解明し、それに基づく治療戦略の構築が重要と考えられた。

小括

犬の肥満細胞腫における *KIT* 変異の網羅的探索を行うため、犬の肥満細胞腫 164 症例におけるゲノム DNA を用いて *KIT* の全エクソンを NGS 解析した。35 種類の新規変異が同定され、イムノグロブリン様領域に 12 種類、膜近傍領域に 20 種類、キナーゼ領域に 2 種類、C 末端領域に 1 種類認められた。さらに本研究で同定された変異のうち比較的頻度の高い変異とこれまでに報告されている変異について組み換え *KIT* 蛋白を作製し、それぞれの変異 *KIT* のリン酸化レベルとトセラニブ感受性について解析した。その結果、犬の肥満細胞腫では *KIT* の広範な領域に多様な変異が存在していることが明らかとなり、変異によって異なる特性を有することが明らかとなった。また、これらの中には *KIT* にトセラニブ抵抗性を与える変異が低頻度ではあるが複数存在し、トセラニブ抵抗性のマイナークローンを有する症例が存在すると考えられた。これらのことから、犬の肥満細胞腫におけるトセラニブの治療を個別化の上では、各変異の特性を踏まえたアプローチが必要と考えられた。

表および図

Table 2-1. PCRに用いたプライマーおよび解析症例数

増幅領域	5'プライマー	3'プライマー	解析症例数 (全グレード合計)	増幅産物サイズ (bp)
エクソン1	5'-tggggcggftacttacacattttg-3'	5'-gtttctgataggatggtttggggcctatgagtg-3'	76	4590
エクソン2	5'-cccaattcccagagcatgcta-3'	5'-ccgacacigacttattaacctgattttgctgggatg-3'	107	13558
エクソン2-5	5'-ggcgccccctgacccctgctt-3'	5'-cattatfttggcactactcgggtga-3'	91	13495
エクソン6-7	5'-aattatcactatgccctttccaaccagagca-3'	5'-agaccocaaagccccctaacctgagca-3'	110	13831
エクソン8	5'-gtcggggcccaagagtgaggggagaaagagaacc-3'	5'-tccactaaaacgccgcctgaaaacaacaatcc-3'	115	11338
エクソン9-17	5'-gcaggattcccagagccccgcagtagattg-3'	5'-tttggattcggaccatgagtaaggaggata-3'	112	9192
エクソン17-21	5'-tcatgaaagtgtgggggaataaggaatcggagag-3'	5'-ttcccccaagcaagagacagagagc-3'	115	9060

Table 2-2. NGS解析で検出されたKIT変異

エクソン	核酸	アミノ酸	領域	頻度(%)	組織学的 グレード ^a
2	c.178T>C	p.Cys60Arg	第1イムノグロブリン様領域	0.38	II
2	c.254T>A	p.Ile85Asn	第1イムノグロブリン様領域	1.79	—
5	c.884C>A	p.Ala295Asp	第3イムノグロブリン様領域	2.46	—
6	c.959C>T	p.Pro320Leu	第4イムノグロブリン様領域	0.42	I
6	c.1123A>G	p.Arg375Gly	第4イムノグロブリン様領域	0.44	I
7	c.1133G>A	p.Ser378Asn	第4イムノグロブリン様領域	5.23	III
7	c.1160G>T	p.Gly387Val	第4イムノグロブリン様領域	3.67	II
7	c.1187A>G	p.Gln396Arg	第4イムノグロブリン様領域	1.94	II
7	c.1228G>T	p.Val410Phe	第4イムノグロブリン様領域	2.55	II
9	c.1436G>T	p.Ser479Ile	第5イムノグロブリン様領域	0.59	II
9	c.1436G>T	p.Ser479Ile	第5イムノグロブリン様領域	2.76	—
9	c.1523A>T	p.Asn508Ile	第5イムノグロブリン様領域	3.05	II
9	c.1523A>T	p.Asn508Ile	第5イムノグロブリン様領域	2.82	—
9	c.1524_1525insTTT	p.Phe509_Ala510insPhe	第5イムノグロブリン様領域	2.51	—
11	c.1673T>C	p.Val558Ala	膜近傍領域	1.75	II
11*	c.1711_1767dup	p.Asp571_Ser589dup	膜近傍領域	2.87	III
11*	c.1711_1712insACCCAACACA GCTTCCTTACGATCACA GGGAAA	p.Asp571_Pro572insProThrGlnLeuPro TyrAspHisLysTrpGluAsn	膜近傍領域	4.92	II
11*	c.1712_1713ins1712_1771+3	p.Asp571delinsGluProAsnThrAlaSerLeu ArgSerGlnMetGlyValSerGlnLysGlnAla GluLeuTrpSer	膜近傍領域	0.43	III
11*	c.1712_1771+3dup	p.Gly591_Lys592insHisProThrGlnLeu ProTyrAspHisLysTrpGluPheProArgAsn ArgLeuSerPheGlyArg	膜近傍領域	1.11	III
11*	c.1712_1753dup	p.Pro584_Arg585insAsnProThrGlnLeu ProTyrAspHisLysTrpGluPhePro	膜近傍領域	0.44	III
11*	c.1712_1768dup	p.Ser589_Phe590insTyrProThrGlnLeuP roTyrAspHisLysTrpGluPheProArgAsn ArgLeuSer	膜近傍領域	1.96	—
11*	c.1712_1713insCCCAACACAG CTTCCTTACGATCACA AAATGGAAAC	p.Asp581_Pro582insProThrGlnLeuPro TyrAspHisLysTrpGluThr	膜近傍領域	1.02	—
11*	c.1713_1751dup	p.Phe583_Pro584insProGlnHisSerPheLeu ThrIleThrAsnGlySerPhe	膜近傍領域	0.96	—
11*	c.1714_1771+2dup	p.Pro572_Gly591dup	膜近傍領域	0.56	III
11*	c.1714_1715ins1711_1767	p.Asp571_Pro572insArgProAsnThrAla SerLeuArgSerGlnMetGlyValSerGlnLys GlnAlaGlu	膜近傍領域	2.79	III
11*	c.1714_1715insCAACACAGCT TCCTTATGATCACA AAATGGGAGTTCC CAGAAAACAGGCT GAGCT	p.Thr573fs	膜近傍領域	10.50	—
11*	c.1717_1764dup	p.Thr573_Leu585dup	膜近傍領域	3.80	II
11*	c.1717_1718insCACAGCTTCCT TATGATCACA AAATGGGAGTT TCCCAGAAAACAGGCT GAGCT	p.Thr573_Gln574insGlnLeuProTyrAsp HisLysTrpGluPheProArgAsnArgLeuSe rPheGlyPro	膜近傍領域	21.17	II
11*	c.1717_1718insCACAGCTTCCT TATGATCACA AAATGGGAGTT TCCCAGAAAACAGGCT GAGCT	p.Thr573_Gln574insGlnLeuProTyrAsp HisLysTrpGluPheProArgAsnArgLeuSe rPheGlyPro	膜近傍領域	9.34	III
11*	c.1718_1719insCACAGCTTCCT TATGATCACA AAATGGGAGTT TCCCAGAAAACAGGCT GAGCT	p.Gln574fs	膜近傍領域	6.86	II
11*	c.1719_1720insCAGCTTCCTTA TGATCACA AAATGGGAGTTTC CCAGAAAACAGGCT GAGCTTGGT	p.Thr573_Gln574insGlnLeuProTyrAsp HisLysTrpGluPheProArgAsnArgLeuSe rPheGly	膜近傍領域	10.29	—
11	c.1724T>C	p.Leu575Pro	膜近傍領域	1.92	—
11*	c.1725_1726insCCTTATGATCA CAAATGGGAGTTCC CAGAAAACAGGCT GAGCTTGGTCA G	p.Leu575_Pro576insProTyrAspHisLys TrpGluPheProArgAsnArgLeuSerPheGly Gln	膜近傍領域	9.73	III
11*	c.1734_1735ins1720_1771+2	p.Asp578_His579insGlnLeuProTyrAsp HisLysTrpGluPheProArgAsnArgLeuSe rPheGly	膜近傍領域	4.24	II
17	c.2367C>A	p.His789Gln	キナーゼ領域	0.42	—
17	c.2456A>T	p.Asp819Val	キナーゼ領域	0.78	—
21	c.2851G>T	p.Asp951Tyr	C末端領域	0.62	I

—, グレード不明

^aPatnaik分類に基づく。

*ITD変異

Table 2-3. 各組織学的グレードにおけるKITの変異の種類の数

	解析症例数	イムノグロブリン様領域	膜近傍領域		C末端領域
			ITD	ITD以外	
グレード I	16	2	-		1
グレード II	88	6	5	1	-
グレード III	24	1	8	0	-

一, 検出されず

Table 2-4. 変異KIT発現ベクター

変異#	エクソン	核酸	アミノ酸	領域	参考文献
1	5	c.763_765delCAG	p.Gln255del	第3イムノグロブリン様領域	[33]
2	5	c.884C>A	p.Ala295Asp	第4イムノグロブリン様領域	
3	6-7	c.935_1240del	p.Asp312_Thr414delinsAla	第4イムノグロブリン様領域	[33]
4	7	c.1133G>A	p.Ser378Asn	第4イムノグロブリン様領域	
5	7	c.1160G>T	p.Gly387Val	第4イムノグロブリン様領域	
6	7	c.1228G>T	p.Val410Phe	第4イムノグロブリン様領域	
7	8	c.1250_1261dup	p.Glu417_Thr420dup{Glu417Gln}	第4-5イムノグロブリン様領域	[33]
8	8	c.1289A>G	p.Gln430Arg	第4-5イムノグロブリン様領域	[34]
9	9	c.1436G>T	p.Ser479Ile	第5イムノグロブリン様領域	[34]
10	11	c.1657_1671del	p.Glu553_Lys557del	膜近傍領域	[34]
11	11	c.1663_1671del	p.Gln555_Lys557del	膜近傍領域	[35]
12	11	c.1663_1710del	p.Gln555_Ile570del	膜近傍領域	[36]
13	11	c.1665_1671delinsTCAT	p.Gln555_Lys557delinsHisHis	膜近傍領域	[36]
14	11	c.1666T>C	p.Trp556Arg	膜近傍領域	[37]
15	11	c.1666_1671del	p.Trp556_Lys557del	膜近傍領域	[34,38]
16	11	c.1664_1669del	p.Trp556_Lys557delinsGln	膜近傍領域	[38]
17	11	c.1667_1672del	p.Trp556_Val558delinsPhe	膜近傍領域	[38]
18	11	c.1670_1673delinsG	p.Lys557_Val558delinsSer	膜近傍領域	[34]
19	11	c.1670_1677delinsAG	p.Lys557_Val559delinsArg	膜近傍領域	[34]
20	11	c.1672_1674del	p.Val558del	膜近傍領域	[33]
21	11	c.1672_1677del	p.Val558_Val559del	膜近傍領域	[36]
22	11	c.1676T>A	p.Val559Asp	膜近傍領域	[35]
23	11	c.1711_1716dup	p.Asp571_Pro572dup	膜近傍領域	[36]
24	11	c.1717_1737del	p.Thr573_His579del	膜近傍領域	[36]
25	11	c.1721A>G	p.Gln574Arg	膜近傍領域	[39]
26	11	c.1724T>C	p.Leu575Pro	膜近傍領域	[33,38,40,41]
27	11	c.1739A>G	p.Lys580Arg	膜近傍領域	[39]
28	11	c.1753A>G	p.Arg585Gly	膜近傍領域	[39]
29	12	c.1858G>T	p.Ala620Ser	キナーゼ領域	[39]
30	15	c.2140_2142del	p.Ser714del	キナーゼ挿入領域	[33]
31	15	c.2171A>G	p.Lys724Arg	キナーゼ挿入領域	[39]
32	17	c.2443G>A	p.Asp815Asn	活性化ループ領域	[41]
33	17	c.2444A>T	p.Asp815Val	活性化ループ領域	[41]
34	17	c.2450A>G	p.Lys817Arg	活性化ループ領域	[41]
35	17	c.2456A>T	p.Asp819Val	活性化ループ領域	
36	18	c.2504T>C	p.Met835Thr	キナーゼ領域	[39]

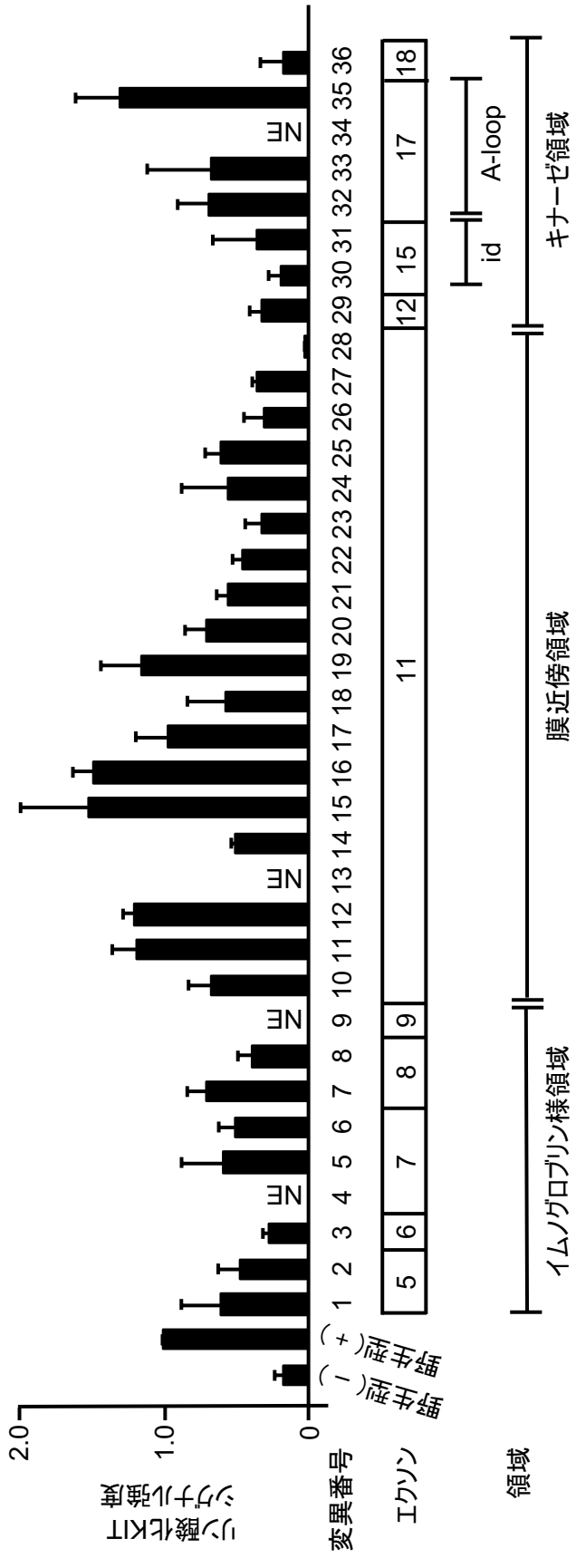
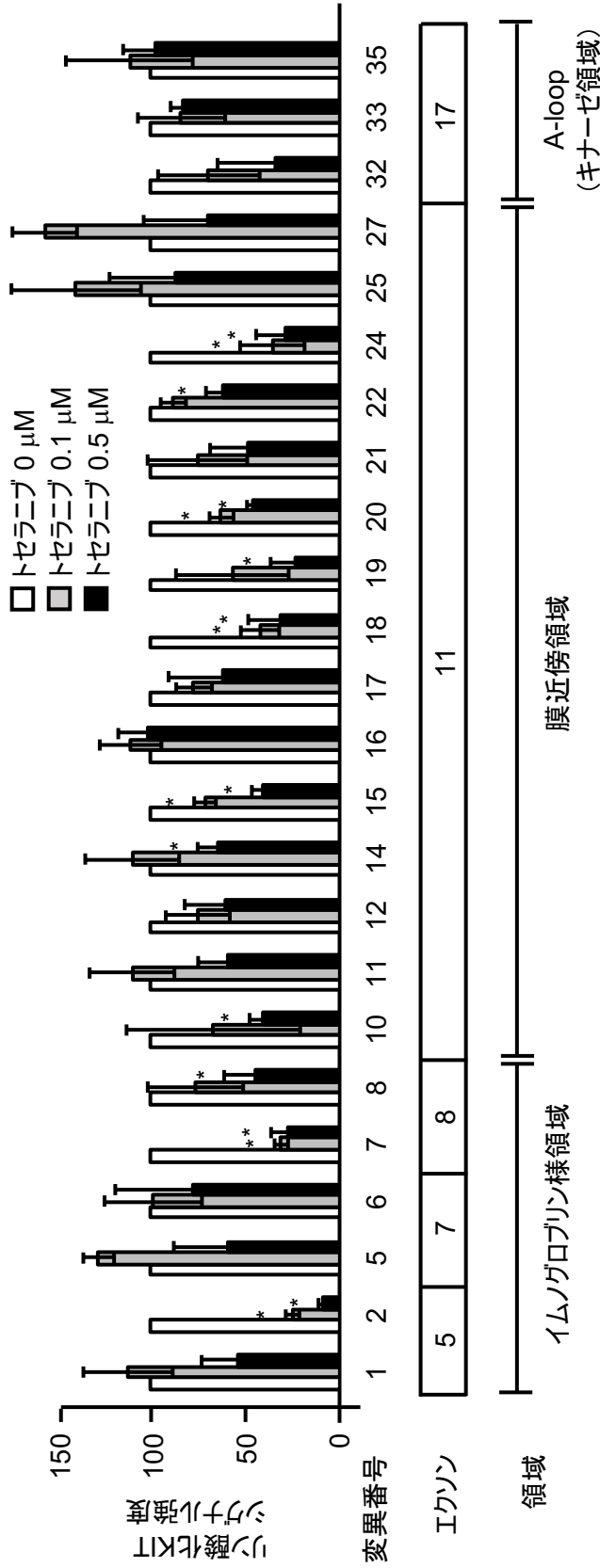


Figure 2-1. 変異KITのリン酸化シグナル強度
 遺伝子導入により作製した組み換え変異KITのリン酸化シグナルをウェスタブロットテイングで検出した(mean ± SD; n = 3)。
 SCF存在下における野生型KITのリン酸化レベルを1.0とした場合に対する各変異KITのリン酸化レベルを表した。
 野生型(-); 野生型KIT/SCF刺激なし, 野生型(+); 野生型KIT/SCF刺激あり, id; キナーゼ挿入領域, A-loop; 活性化ループ領域, NE; KIT発現なし

A



B

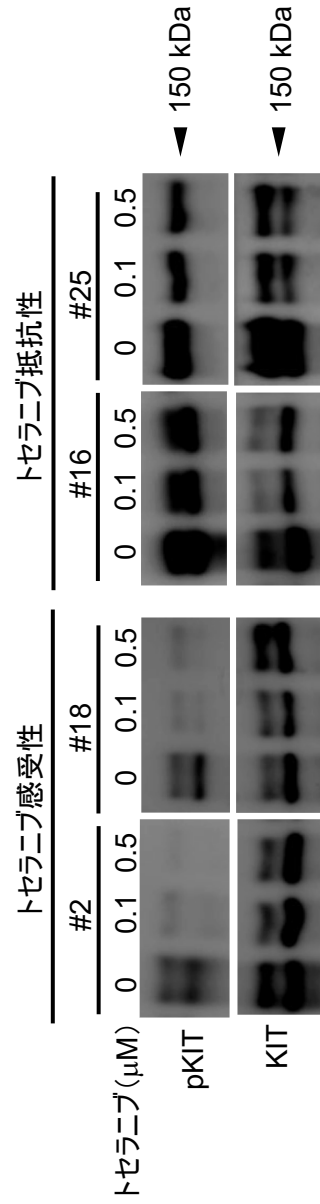


Figure 2-2. 変異KITに対するトセラニブのリン酸化の阻害活性
 (A) SCF非存在下の野生型KITの2倍以上のリン酸化シグナルを示した変異KITについて、トセラニブ0.1 μM あるいは0.5 μM を暴露し、トセラニブによる阻害活性の変化をウェスタンブロットティングにより検出した。(B) ウェスタンブロットティングで検出されたシグナルを半定量解析した (mean \pm SD; n = 3)。トセラニブ非暴露時のリン酸化シグナルを100とした場合に対するリン酸化シグナルを表している (* P <0.05)。A-loop; 活性化ループ領域

第3章

トセラニブ抵抗性犬肥満細胞腫細胞株の作出と

*KIT*変異発生プロセスの解析

第2章の結果から、犬の肥満細胞腫における *KIT* の変異はエクソン 11 の ITD 変異が最も多いが、それとは異なる頻度の低い変異が多種類存在することが示された。これらの変異には *KIT* を恒常的にリン酸化するものとそうでないものが含まれており、また *KIT* を恒常的にリン酸化する変異であってもリン酸化に対するトセラニブの阻害活性に違いがあることが明らかとなった。このように *KIT* は変異の種類により異なる特徴を有することが示され、これらの知見はトセラニブによる個別化治療を確立するための重要な基盤になると考えられた。

このような犬の肥満細胞腫の腫瘍組織から同定した多様な変異の中でも、とくにトセラニブ抵抗性の *KIT* のリン酸化を引き起こす変異はトセラニブによる治療を複雑かつ難しくする可能性が高く、治療の個別化の観点からきわめて重要な変異と考えられる。第2章で同定された c.2456A>T などのトセラニブ抵抗性の活性化変異を有する *KIT* は腫瘍組織内にわずかしか存在しなかったが、このような変異 *KIT* を持つ腫瘍細胞は、トセラニブ存在下においてトセラニブ感受性の腫瘍組織の中から選択的に増殖する可能性がある。一般的にトセラニブが奏功する肥満細胞腫の症例では治療初期に著しい腫瘍の縮小がみられ

る[42]が、治療の経過とともに腫瘍細胞がトセラニブ抵抗性を獲得し腫瘍の再増大が生じる[39]。このトセラニブ耐性化の背景には、このような変異 *KIT* の存在が考えられる。実際、人の CML では腫瘍組織中にイマチニブ抵抗性の変異 *KIT* を持つ腫瘍細胞があらかじめ超微量存在しており、それらの腫瘍細胞がイマチニブ存在下で選択的に増殖し腫瘍の耐性化を引き起こすことが示されている[43]。

一方、犬の肥満細胞腫や人の GIST では、*KIT* 変異を有するイマチニブ感受性の腫瘍細胞にイマチニブを暴露し続けると、もともと *KIT* にある変異（一次変異）に加えて新たなイマチニブ抵抗性の変異（二次変異）が生じ、これにより腫瘍細胞が耐性化することも報告されている[24,44-46]。このため、c.2456A>T などの *KIT* にトセラニブ抵抗性が生じる変異は、トセラニブ未治療症例で問題となるばかりでなく、トセラニブの治療過程において腫瘍細胞に *de novo* で生じ治療を困難にする可能性が考えられる。

トセラニブによる治療成績を向上するためには、耐性化の予測とそれを踏まえた個別化治療戦略を確立することが重要であり、このためにはトセラニブ抵抗性に関連した *KIT* 変異の発生プロセスを理解することが不可欠である。

そこで本章では、KIT に活性化変異を持つトセラニブ感受性の犬の肥満細胞腫細胞株 VI-MC をクローン化し、その増殖過程とトセラニブ抵抗性の獲得過程における *KIT*変異の発生プロセスについて検討した。

材料と方法

細胞株

実験には東京大学獣医外科学教室から分与された犬の腸管型肥満細胞腫細胞株で *KIT* のエクソン 9 (第 5 イムノグロブリン様領域) に活性化変異 c.1523A>T(p.(Asn508Ile)) を有する VI-MC を用いた。VI-MC の培養には 50 U/ml ペニシリン (Thermo Fisher)、50 µg/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher) および 10% 非動化ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地 (Thermo Fisher) を用い、37°C、5%CO₂ 湿潤環境下で培養した。HEK293 細胞は第 2 章の実験 2 と同様の条件で培養した。

VI-MC のクローニングとトセラニブ抵抗性細胞株の作出

VI-MC を 96 穴丸底プレートに 1 個/ウェルとなるように VI-MC を播種した。その後、各ウェル中の細胞を顕微鏡で観察し、1 ウェルに 1 細胞が存在するウェルを特定した。これらの中から細胞の増殖がみられた 2 つのウェルを選択した。さらにこれらの細胞を 2 ヶ月間培養し、安定した増殖を確認した後、

それぞれを cVI-MC1 および cVI-MC2 とした。トセラニブ抵抗性細胞株を作出するため、cVI-MC1 および cVI-MC2 にトセラニブ (Medkoo Biosciences) を 0.1 から 0.3 μ M まで 16 週間かけて漸増しながら暴露した。0.3 μ M トセラニブ存在下で安定増殖できる cVI-MC1 および cVI-MC2 をそれぞれ trVI-MC1 および trVI-MC2 とした。

細胞増殖抑制試験

VI-MC、cVI-MC1、cVI-MC2、trVI-MC1 および trVI-MC2 をそれぞれ cRPMI に懸濁し、96 ウェルプレートに 1×10^4 /well となるように播種した。次いで、最終濃度が 0-10 μ M になるようトセラニブを添加し (DMSO 最終濃度 0.1%)、48 時間培養した。培養後、WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara Bio) を用いて各ウェル中の細胞生存率を評価した。また、GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いて、それぞれの細胞株におけるトセラニブの 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を計算した。この実験は細胞株ごとに独立して 3 回行った。

KITゲノム DNA の NGS 解析

VI-MC、cVI-MC1、cVI-MC2、trVI-MC1 および trVI-MC2 より DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA 20 ng と第 2 章で用いた 2 つのプライマー組 (エクソン 9 からエクソン 17、エクソン 17 からエクソン 21 を増幅) (第 2 章、Table 2-1) を用いて *KIT* ゲノム DNA のエクソン 8-21 の領域を PCR で増幅した。この PCR 産物を用いて第 2 章と同様の手順で NGS 解析を行った。

KIT cDNA の塩基配列の解析

VI-MC、cVI-MC1、cVI-MC2、trVI-MC1 および trVI-MC2 より抽出した total RNA を鋳型として、SuperScript III reverse transcriptase (Thermo Fisher) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。次にこの cDNA 鋳型として、PrimeSTAR DXL DNA polymerase (Takara Bio) と *KIT* cDNA を増幅するプライマーセット (5'プライマー [エクソン 8 上流], 5' - GAAAGTAAT ATCAGATATGTGAG - 3'; 3' プライマー [エクソン 17-18]), 5' - GTAGC CGAGCGTTTCCTTTG - 3') を用いて PCR を 35 サイクル行った。次いで増幅産物を第 2 章の実験 2 と同様の手順でクローニングし、得られたプラスミド

ベクターを QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) を用いて抽出した。その後、細胞株ごとに 20 個の独立した *KIT* cDNA クローンのエクソン 8、9、14 および 17 に相当する領域の塩基配列をダイレクトシーケンスで解析した。

変異 KIT のリン酸化レベルの解析

第 2 章の実験 2 と同様の手順で、c.1523A>T、c.1523A>T+c.1349A>T、c.1523A>T+c.2037T>A、c.1523A>T+c.2456A>T、c.1523A>T+c.2456A>G 変異を持つ *KIT* 発現ベクターを作製した。次いで、Polyethyleneimine MAX (Polysciences) を用いてこれらの発現ベクターを HEK293 細胞に導入した。これらの細胞を 8 時間培養した後、さらに FCS 非添加培地で 16 時間培養した。変異 *KIT* のリン酸化状態を解析する実験では、FCS 非添加培地で培養した後に、100 ng/ μ l の犬組み換え SCF を添加し (SCF 非添加サンプルでは添加せずに) 20 分培養した。また、トセラニブによるリン酸化阻害の実験では、FCS 非添加培地で培養後に 0-10 μ M (DMSO 最終濃度 0.1%) のトセラニブを添加し、90 分培養を行った。これらの HEK293 細胞を cell lysis buffer (#9803, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) で溶解した後、SDS-PAGE サンプルバッファーを加

え 95°Cで 5 分間煮沸し、-30°Cで使用まで保存した。変異 KIT のリン酸化の検出は第 2 章の実験 2 と同様の手順でウェスタンブロッティングにより行った。この実験は独立して 3 回行った。

統計学的解析

統計学的解析は Student's t 検定（両側検定）で行い、 $P < 0.05$ を有意な差とした。

結果

トセラニブ抵抗性 VI-MC の作出

cVI-MC1 および cVI-MC2 への持続的なトセラニブの暴露により作出した trVI-MC1 および trVI-MC2 は、それぞれ 0.3 μ M トセラニブ存在下において安定した増殖を示した。VI-MC、cVI-MC1、cVI-MC2、trVI-MC1 および trVI-MC2 の増殖に与えるトセラニブの影響を Figure 3-1 に示した。トセラニブは VI-MC、cVI-MC1、cVI-MC2 に対して明らかな細胞増殖抑制効果を示し (Figure 3-1A)、IC50 はそれぞれ 0.03 μ M、0.02 μ M および 0.03 μ M であった (Figure 3-1B)。一方、trVI-MC1 および trVI-MC2 はトセラニブに対する感受性が低く (Figure 3-1A)、IC50 はいずれも 2 μ M 以上 (Figure 3-1B) と、VI-MC、cVI-MC1、cVI-MC2 と比較し 60 倍以上高い値を示した。

VI-MC のトセラニブ抵抗性獲得過程における *KIT* 遺伝子の変化

VI-MC、cVI-MC1、cVI-MC2、trVI-MC1 および trVI-MC2 の *KIT* ゲノム DNA の塩基配列の NGS による解析結果を Table 3-1 に示した。この実験

では、VI-MC の活性化変異が存在する c.1523A>T 周辺および人の GIST で二次変異が高頻度にみられる領域に着目し、それらの領域を含む *KIT* のエクソン 8-21 を解析した。各細胞株における depth of coverage はそれぞれ 8185、10852、11236、10229、8073 リード/塩基であった。VI-MC およびクローン化されたすべての細胞株において、*KIT* のエクソン 9 に c.1523A>T 変異が 80%程度の頻度で認められた。また、14.9%-38.3%の頻度で *KIT* のエクソン 8 に c.1349A>T 変異が認められた。trVI-MC1 および trVI-MC2 では、トセラニブ感受性細胞株と異なり、*KIT* のエクソン 14 およびエクソン 17 に新たな変異が認められた。trVI-MC1 ではエクソン 17 の c.2456A>T 変異が 36.8%の頻度で認められ、trVI-MC2 では *KIT* のエクソン 14 において c.2037T>A 変異が 36.7%、エクソン 17 の c.2456A>G 変異が 26.3%の頻度で認められた。また、これらの変異とは別に、複数の頻度の低い変異がすべての細胞株において 0.7-3.7%の頻度で認められた。これら低頻度の変異の中で、c.2579A>G 変異（エクソン 18）はすべての細胞株に認められ、c.2513A>G 変異（エクソン 18）は VI-MC、cVI-MC1 および trVI-MC1 にのみ認められた。また c.2418G>T 変異（エクソン 17）、c.2515A>G 変異（エクソン 18）および c.2570A>T 変異（エクソン 18）は cVI-MC1 にのみ認

められた。NGS 解析により認められたこれらの変異はすべてミスセンス変異であった。

KIT cDNA の変異パターン

NGS 解析により VI-MC および派生細胞株の *KIT* ゲノム DNA に遺伝子変異の多様性が認められたため、各細胞株における *KIT* cDNA の変異パターンを解析した (Table 3-2)。VI-MC およびすべての派生細胞株の *KIT* cDNA において、c.1523A>T 変異が 40%-80% の頻度で認められた。c.1523A>T 変異を持たない *KIT* cDNA はみられなかったことから、c.1523A>T は一次変異であり、その他の変異は二次変異であると考えられた。二次変異 (c.1349A>T) を 1 つ持つ *KIT* cDNA は、trVI-MC1 を除くすべての細胞株で 10%-25% の頻度で認められた。c.1349A>T と異なる二次変異を 1 つまたは 2 つ持つ *KIT* cDNA は trVI-MC1 および trVI-MC2 にのみみられ、それらの頻度は 5%-30% であった。すべての細胞株において野生型の *KIT* cDNA はみられなかった。

KIT のリン酸化におよぼす *KIT* 変異の影響

p.(Asn508Ile)、 p.(Asn508Ile) + p.(Glu450Val)、 p.(Asn508Ile) + p.(Asn679Lys)、 p.(Asn508Ile) + p.(Asp819Val)、 p.(Asn508Ile) + p.(Asp819Gly) 変異が KIT のリン酸化に与える影響を解析するため、HEK293 細胞に発現させた変異 KIT のリン酸化シグナルをウェスタンブロッティングにより検出した (Figure 3-2A)。野生型 KIT のリン酸化レベルは SCF 非存在下では弱く、SCF 存在下では増強された。一方、すべての変異 KIT において SCF の有無にかかわらず強いリン酸化が認められた。KIT のリン酸化レベルを KIT の発現量でノーマライズし、リン酸化シグナルを半定量解析した結果を Figure 3-2B に示した。SCF の有無にかかわらず、すべての変異 KIT において SCF 非存在下の野生型 KIT と比べてリン酸化レベルが有意に ($P < 0.05$) 増加した。

二次変異によるリン酸化 KIT のトセラニブ感受性の低下

一次変異を有する KIT p.(Asn508Ile) のトセラニブの感受性に二次変異 p.(Glu450Val)、 p.(Asn679Lys)、 p.(Asp819Val)、 および p.(Asp819Gly) が与える影響を Figure 3-3 に示した。一次変異 p.(Asn508Ile) 変異のみを有する KIT のリン酸化はトセラニブ濃度依存性に減少し、トセラニブ 0.1 μM 以上で有意に

($P < 0.05$) 抑制された。一次変異に加えて二次変異 p.(Glu450Val)、p.(Asn679Lys)あるいは p.(Asp819Gly)を持つ KIT のリン酸化は、一次変異のみを有する KIT と同様にトセラニブ濃度依存性に減少したが、トセラニブ 0.1 μM では有意な減少はみられなかった。一次変異に加えて二次変異 p.(Asp819Val)を持つ KIT のリン酸化については、トセラニブによる抑制はほとんどみられなかった。二次変異を有する KIT の中で、p.(Asp819Val)および p.(Asp819Gly)の変異を有する KIT は強いトセラニブ抵抗性を示し、1 μM 以上のトセラニブにおいても強いリン酸化シグナルが認められた。一方、p.(Glu450Val)および p.(Asn679Lys)の変異を有する KIT はこれらと比べてトセラニブ抵抗性が低く、トセラニブ 1 μM 存在下において KIT のリン酸化が有意に減少した。p.(Glu450Val)変異を有する KIT は p.(Asn679Lys)よりトセラニブ感受性が高く、1 μM トセラニブにおいて 3-4 倍 KIT のリン酸化が抑制された。

考察

VI-MC およびクローン化した VI-MC を用いた *KIT* 遺伝子の NGS 解析により、VI-MC は増殖に伴うクローン進化の過程で様々な *KIT* の二次変異が加わったサブクローンを生じることが示された。一方、トセラニブ抵抗性細胞株 trVI-MC1 および trVI-MC2 は、約 30% のアレル頻度で VI-MC、cVI-MC1 および cVI-MC2 では検出されない *KIT* 二次変異 (c.2037T>A, p.(Asn679Lys); c.2456A>T, p.(Asp819Val); c.2456A>G, p.(Asp819Gly)) を持つことが示された。また、これらの二次変異はすべて一次変異 p.(Asn508Ile) を持つ *KIT* のトセラニブ感受性を低下させることが明らかとなった。Asn679 (人の *KIT* における Asn680) および Asp819 (人の *KIT* における Asp820) はそれぞれ *KIT* の ATP 結合領域 および活性化ループ領域に相当し、人の *GIST* においてイマチニブ抵抗性を生じる二次変異がしばしば発生するアミノ酸残基として知られている [26,31,47]。これらのことから、p.(Asn679Lys)、p.(Asp819Val)、p.(Asp819Gly) 変異は VI-MC にトセラニブ抵抗性を与える *KIT* の二次変異であり、これらの変異を有する VI-MC クローンはトセラニブ暴露後に *de novo* で生じたと考えられた。

今回同定されたトセラニブ抵抗性の *KIT* 二次変異の中で、p.(Asp819Val)は第2章で同定されたトセラニブ抵抗性変異と同一の変異であった。第2章では、p.(Asp819Val)はトセラニブ未治療の腫瘍組織で検出されたことから、この二次変異は腫瘍細胞の経時的なクローン進化の過程で生じると考えられた。一方、本章ではこの変異はVI-MCがトセラニブ非存在下で増殖する過程においては検出されず、トセラニブの存在下で増殖した場合においてのみ検出された。これらのことから、肥満細胞腫のトセラニブ耐性化には、*KIT*の二次変異を有する微量クローンが予め腫瘍組織内に存在し、トセラニブにより選択的に増殖する場合と、腫瘍細胞がトセラニブに適応する過程で生じる遺伝的变化によって新たに *KIT* に二次変異が生じ、それを持つクローンが増殖する場合のいずれのメカニズムも存在するのではないかと考えられた。

VI-MC およびその派生細胞株では、トセラニブ抵抗性の有無にかかわらず *KIT* の二次変異 p.(Glu450Val) (エクソン 8, c.1349A>T) がおよそ 20% と高い頻度で存在していた。しかしながら、この変異を有する *KIT* は他の二次変異を有する *KIT* と比較してトセラニブに対する抵抗性が低く、またトセラニブ抵抗性獲得後の細胞 (trVI-MC1 および trVI-MC2) における p.(Glu450Val) 変異

の頻度の明らかな増加はみられなかった。さらに *KIT* cDNA の発現パターンから、トセラニブ抵抗性獲得後の細胞において p.(Glu450Val)変異を持つ *KIT* の割合は増加しておらず、むしろ感受性細胞株と比較し減少していた。これらのことから、p.(Glu450Val)変異は、*KIT* のトセラニブ感受性についていくらかの関与はしているものの、VI-MC のトセラニブ抵抗性獲得における主要な役割は担ってはいないと考えられた。

結論として、トセラニブ抵抗性細胞株に生じた *KIT* の二次変異は、トセラニブ耐性化に重要な役割を果たしていると考えられた。またそのような二次変異を持つ腫瘍細胞はトセラニブの暴露によって *de novo* に生じることから、トセラニブ抵抗性クローンの出現を踏まえた治療戦略の構築が重要と考えられた。

小括

網羅的 *KIT* 変異解析により、トセラニブ抵抗性を示す変異が同定されたが、そのような変異はトセラニブによる治療を複雑かつ困難にする可能性が高く、トセラニブの治療を個別化する上できわめて重要である。そこでトセラニブ抵抗性 *KIT* 変異の発生プロセスを明らかにするため、クローン化した肥満細胞腫細胞株からトセラニブ抵抗性細胞株を作出し、*KIT* の NGS 解析を行った。

トセラニブ抵抗性細胞株は、一次変異 (c.1523A>T, p.(Asp508Ile)) に加えて複数の二次変異 (c.2037T>A, p.(Asn679Lys); c.2456A>T, p.(Asp819Val); c.2456A>G, p.(Asp819Gly)) を獲得し、さらにこれらの変異を導入した組み換え *KIT* 蛋白はトセラニブ抵抗性を示した。一方、これら二次変異はトセラニブ感受性細胞株では検出されなかった。したがって、肥満細胞腫のトセラニブ耐性化には *KIT* の二次変異が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、第 2 章の結果を考慮すると、*KIT* の二次変異は、二次変異を有するマイナークローンがトセラニブ存在下で選択的に増殖する場合と、トセラニブの持続的な暴露によって *de novo* に生じる場合があると考えられた。

表および図

Table 3-1. NGS解析で認められたKIT変異と頻度と頻度(%)

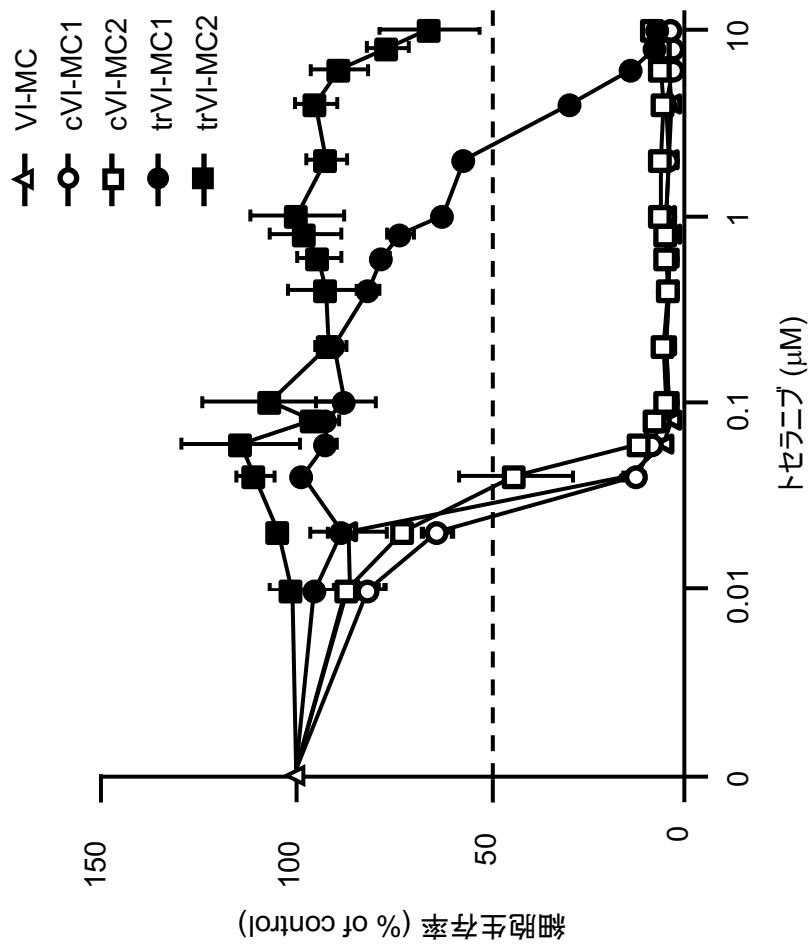
核酸	変異	アミノ酸	エクソン	VI-MC	クローン化VI-MC細胞株			
					トセラニブ感受性		トセラニブ抵抗性	
					cVI-MC1	cVI-MC2	trVI-MC1	trVI-MC2
c.1349A>T		p.(Glu450Val)	8	22.3	23.5	20.9	38.3	14.9
c.1523A>T		p.(Asn508Ile)	9	80.9	79.4	81.0	85.0	85.8
c.2037T>A		p.(Asn679Lys)	14	-	-	-	-	36.7
c.2456A>T		p.(Asp819Val)	17	-	-	-	36.8	-
c.2456A>G		p.(Asp819Gly)	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	-	-	-

-, 検出されず

Table 3-2. *KIT* cDNA 20クローンにおける変異クローンの数と頻度 (%)

変異	VI-MC	クローン化VI-MC細胞株			
		トセラニブ感受性		トセラニブ抵抗性	
		cVI-MC1	cVI-MC2	trVI-MC1	trVI-MC2
c.1523A>T	15 (75)	16 (80)	15 (75)	13 (65)	8 (40)
c.1523A>T plus c.1349A>T	5 (25)	4 (20)	5 (25)	-	2 (10)
c.1523A>T plus c.2037T>A	-	-	-	-	1 (25)
c.1523A>T plus c.2456A>T	-	-	-	1 (5)	-
c.1523A>T plus c.1349A>T plus c.2037T>A	-	-	-	-	1 (5)
c.1523A>T plus c.1349A>T plus c.2456A>T	-	-	-	6 (30)	-
c.1523A>T plus c.2037T>A plus c.2456A>G	-	-	-	-	4 (20)
野生型	-	-	-	-	-

-, 検出されず

A**B**

細胞株	IC50 (μM)
VI-MC	0.03
cVI-MC1	0.02
cVI-MC2	0.03
trVI-MC1	>2
trVI-MC2	>2

Figure 3-1. トセラニブの細胞増殖抑制効果
 VI-MCおよびその派生細胞株におけるトセラニブの細胞増殖抑制効果を評価した。
 (A) VI-MC、cVI-MC1、cVI-MC2、trVI-MC1およびtrVI-MC2をそれぞれ0-10 μMトセラニブに暴露した。
 細胞生存率はそれぞれの細胞株におけるトセラニブ0 μM (0.1% DMSO) と比較した (mean ± SD, n = 3)。
 (B) それぞれの細胞株におけるトセラニブの50%阻害濃度を算出した。

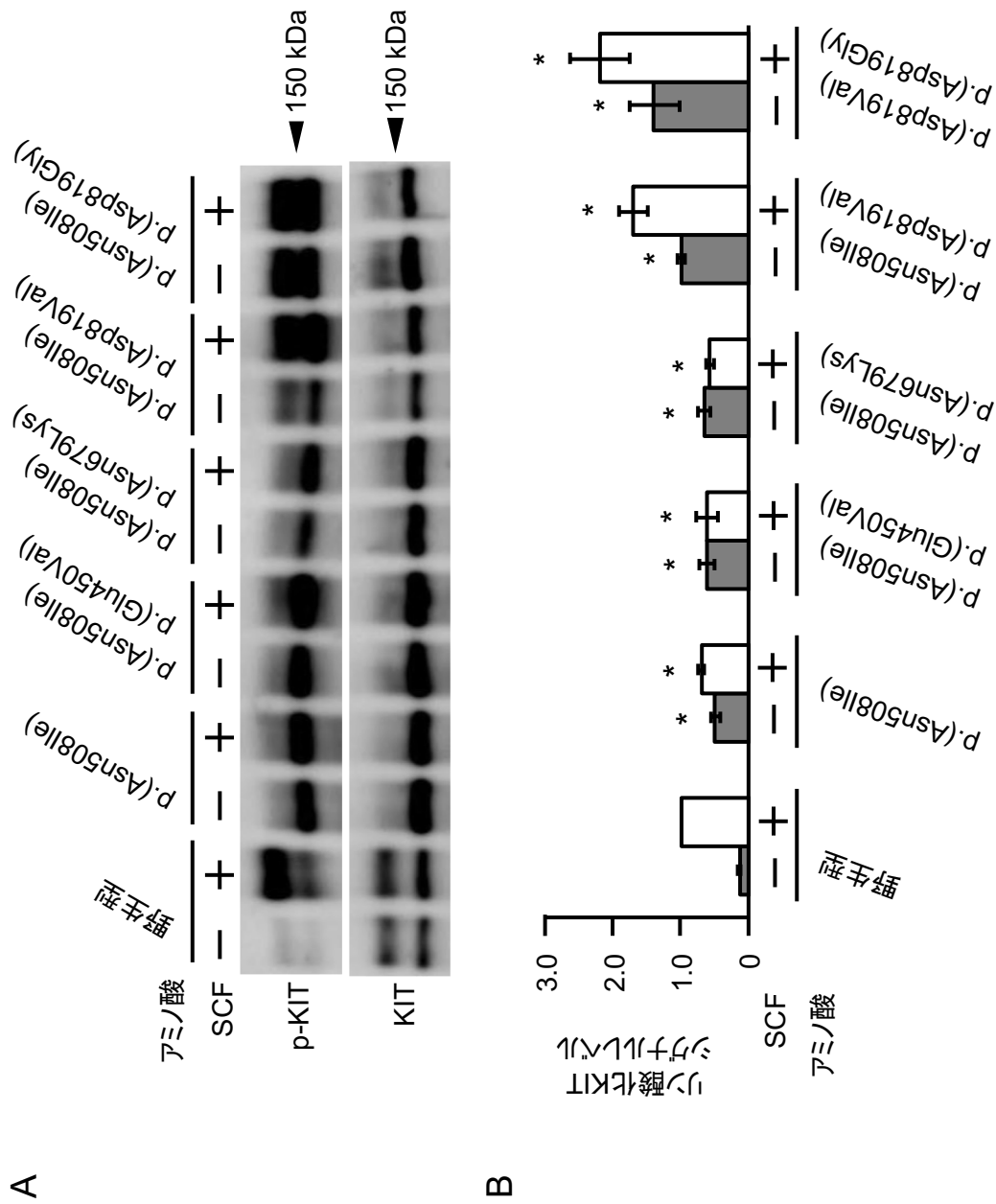


Figure 3-2. 変異KITのリン酸化状態の解析
 HEK293細胞に発現させた野生型および変異KITのリン酸化レベルをウェスタンブロットティングで検出した。
 (A) SCF存在下あるいは非存在下における野生型および変異KITのリン酸化レベルをウェスタンブロットティングで検出した。
 (B) 検出されたバンドのシグナルレベルを半定量解析した。SCF存在下の野生型KITのリン酸化シグナルを1.0とした場合に
 対する各変異KITのリン酸化レベルを表した (mean \pm SD, n = 3)。*SCF非存在下の野生型KITに対する有意差 ($P < 0.05$)

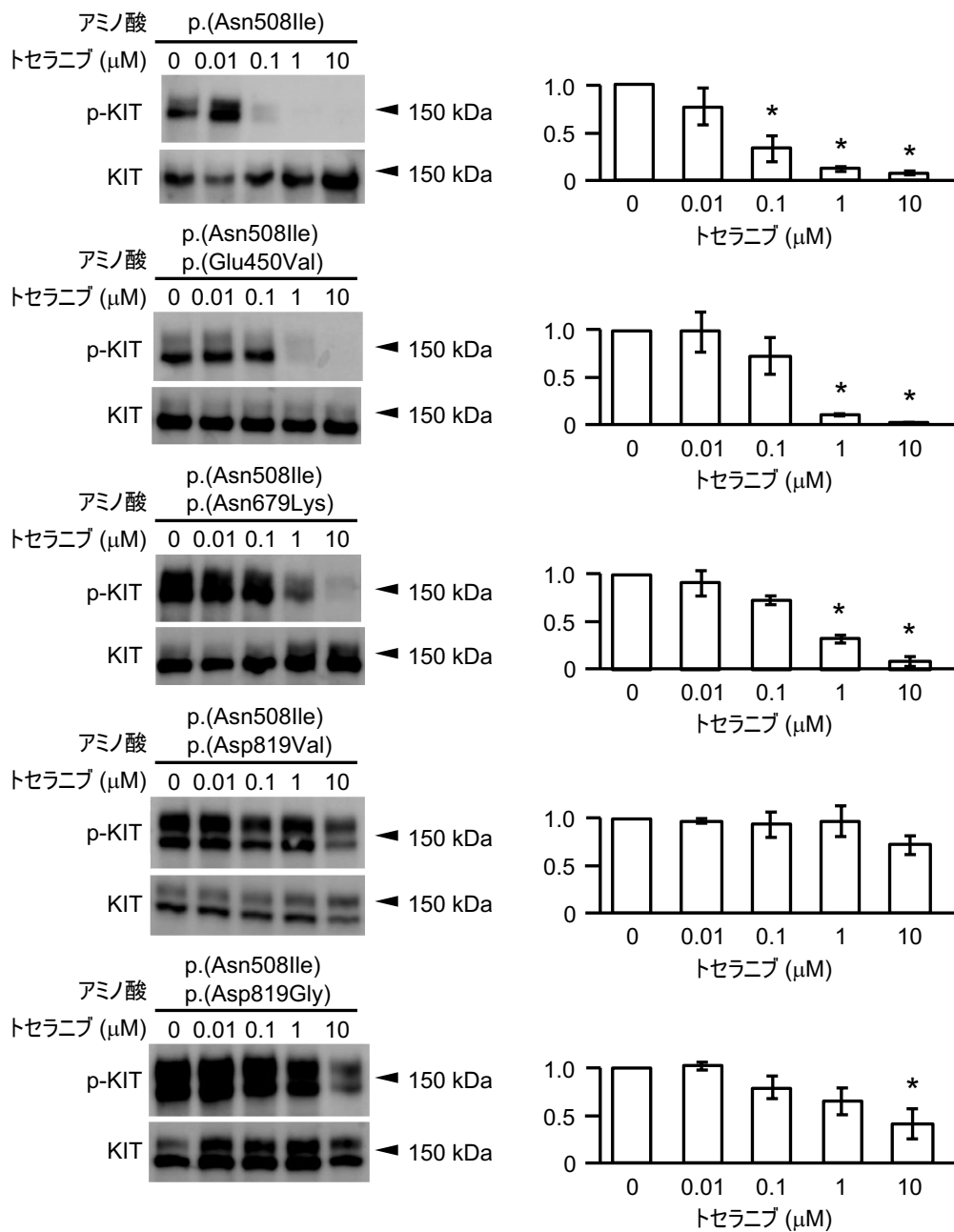


Figure 3-3 各変異KITに対するトセラニブのリン酸化阻害活性

(左)p.(Asn508Ile)変異単独、あるいはp.(Asn508Ile)と二次変異を有する変異KITに0-10 μMトセラニブを暴露し、KITのリン酸化レベルをウェスタンブロッティングで解析した。(右) 検出されたバンドのシグナルレベルを半定量解析した。グラフは、それぞれの変異KITにおいて、トセラニブ0 μMのリン酸化シグナルを1.0とした場合に対する各KITのリン酸化レベルを表している (mean ± SD, n = 3)。*トセラニブ0 μM (DMSOのみ) に対する有意差 ($P < 0.05$)

第 4 章

犬の肥満細胞腫株化細胞のトセラニブ抵抗性におよぼす

SHP2 阻害の影響

これまでの結果から、肥満細胞腫のトセラニブ抵抗性獲得機構には、

1)腫瘍組織に予め存在するトセラニブ抵抗性変異 KIT を有する微量の腫瘍細胞が増殖し耐性化する場合と、2) トセラニブの暴露によって *de novo* に生じたトセラニブ抵抗性変異 KIT を持つ腫瘍細胞が増殖し耐性化する場合があることが示唆された。このようにトセラニブ抵抗性変異 KIT を持つ腫瘍細胞の発生機構には相違があると考えられるが、発生機構にかかわらず *KIT* の二次変異が肥満細胞腫のトセラニブ耐性化に重要な役割を果たしていることは明らかである。

このため、犬の肥満細胞腫に対するトセラニブの治療では、このようなトセラニブ抵抗性変異 KIT を持つ腫瘍細胞に対する対応策を確立することがきわめて重要である。

第3章の結果から、二次変異を有する KIT ではトセラニブ存在下においても KIT が強くリン酸化していることが示され、これにより異常な増殖シグナルが下流に伝達されていると考えられる。これは二次変異により KIT の構造が変化しトセラニブが ATP 結合部位へアクセスできなくなったことが要因と考えられる。人のキナーゼ阻害剤耐性腫瘍では、これと同様のメカニズムが耐性化の一因として知られており [48,49]、これに対してキナーゼ阻害剤の分子構造を

改変し、ATP 結合部位へのアクセスを可能にすることで二次変異に対応している [49]。しかしながら、動物医療においてこのような薬剤開発を行うことは容易ではなく、これに代わる新たな耐性克服のアプローチを見出す必要がある。

リン酸化した KIT は種々の下流シグナル伝達分子を介して増殖シグナルを核に伝達するが、このシグナル伝達分子の最上流で KIT のリン酸化により直接制御を受ける分子としてチロシンホスファターゼ Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2 (SHP2) が知られている。SHP2 は様々な受容体型チロシンキナーゼのアダプター分子として機能するが、KIT のリン酸化を受けて活性化し、下流のシグナル経路を活性化することが示されている [50-52]。このため、二次変異を持つリン酸化 KIT のシグナルを遮断する上では、SHP2 は理想的な標的分子である。

SHP099 は近年開発された SHP2 のアロステリック阻害剤であり、SHP2 と結合することでその活性化を強力に阻害する [53]。SHP099 は今のところ医薬品としての承認は受けていないが、経口のバイオアベイラビリティが高いことから様々な受容体型チロシンキナーゼ異常に基づく疾患の治療薬として期待されている。

そこで第 4 章では、まずトセラニブ抵抗性肥満細胞腫細胞株を用いて細胞増殖におよぼす SHP099 影響を検討した。また、比較のためこの解析では他のキナーゼ阻害剤に対して抵抗性を獲得した肥満細胞腫についても SHP099 の影響を検討した。次いで、トセラニブ抵抗性細胞株を用いてトセラニブ感受性に与える SHP099 の影響について検討した。

材料・方法

細胞株

実験には第3章で用いた肥満細胞腫細胞株 VI-MC (*KIT* エクソン 9 c.1523A>T) とその派生細胞株、皮膚肥満細胞腫由来細胞株 CoMS (北海道大学外科学教室より分与; *KIT* のエクソン 11 c.1720_1772+1dup) とその派生細胞株、皮膚肥満細胞腫由来細胞株 CM-MC (東京大学外科学教室より分与: *KIT* のエクソン 11 c.1718_1771dup) とその派生細胞株および組織球性肉腫細胞株 CHS-2 を用いた。VI-MC の派生細胞株として、第3章で作出した cVI-MC1、cVI-MC2、trVI-MC1 および trVI-MC2 と *KIT* エクソン 17 に二次変異 c.2443G>C を有するイマチニブ抵抗性細胞株 irVI-MC[45]を用いた。また、CoMS の派生細胞株として *KIT* の過剰発現によりイマチニブ抵抗性を獲得した irCoMS を、CM-MC の派生細胞株として *KIT* エクソン 18 に二次変異 c.2482G>C を有するイマチニブ抵抗性細胞株 irCM-MC を用いた。肥満細胞腫細胞株は cRPMI を用いて第3章と同様の条件で、CHS-2 は cDMEM を用いて第2章 実験2の HEK293細胞と同様の条件で培養した。

SHP099

SHP2のアロステリック阻害薬である SHP099 は Selleck (Selleck Chemicals, Houston, TX) より購入し、蒸留水で 50 mM の濃度に溶解した後、使用まで -30°C で凍結保存した。

細胞増殖抑制試験

VI-MC、trVI-MC1、trVI-MC2、irVI-MC、CoMS、irCoMS、CM-MC および irCM-MC を cRPMI に、CHS-2 を cDMEM に懸濁した後、96 ウェルプレートに播種した。細胞は VI-MC、trVI-MC1、trVI-MC2、irVI-MC、CM-MC、irCM-MC が $1 \times 10^4/\text{well}$ 、CoMS および rCoMS が $2 \times 10^4/\text{well}$ 、CHS-2 が $5 \times 10^3/\text{well}$ となるように播種した。その後、CHS-2 以外については、最終濃度が 0-10 μM になるように SHP099 を直ちに添加し (DMSO 最終濃度 0.1%)、CHS-2 については播種後 48 時間培養した後に SHP099 を添加した。SHP099 を添加した後、48 時間培養した。CHS-2 は培養後、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で細胞を洗浄し、新しい培地に交換した。その後、全ての細胞について第 3 章と同様の

手順でウェル中の生存細胞生存率を評価した。SHP099 がトセラニブ感受性に与える影響を解析する実験では、まず cVI-MC1、cVI-MC2、trVI-MC1、trVI-MC2 をそれぞれ cRPMI に懸濁し、96 ウェルプレートに 4×10^4 /well となるように播種した。その後、細胞株ごとに 0-10 μM のトセラニブを添加した。さらに trVI-MC1 および trVI-MC2 では、0、1、5、10 μM になるよう SHP099 も添加し (DMSO 最終濃度 0.1%)、48 時間培養した。培養後、第 3 章と同様の手順でウェル中の生存細胞生存率を評価した。それぞれの細胞株における IC50 は GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いて算出した。

結果

肥満細胞腫株化細胞に対する SHP099 の細胞増殖抑制効果

VI-MC、trVI-MC1、trVI-MC2、irVI-MC、CoMS、irCoMS、CM-MC、irCM-MC および CHS-2 の細胞増殖に対する SHP099 影響を Figure 4-1 に示した。SHP099 による細胞増殖抑制試験では種々の肥満細胞腫細胞株に加えて、SHP099 に対して感受性を持たない CHS-2[49]を陰性コントロールとして用いた。SHP099 は VI-MC の増殖を強く抑制し、その IC₅₀ は 1.44 μ M であった。一方、irCoMS では CHS-2 と同様にほとんど増殖抑制がみられなかった。他の細胞株では SHP099 による細胞増殖抑制はみられたが、VI-MC と比べて効果は低く、10 μ M の SHP099 でも ~30%-60%の細胞が残存した。

トセラニブ抵抗性肥満細胞腫株化細胞のトセラニブ感受性におよぼす SHP099 の影響

trVI-MC1 および trVI-MC2 のトセラニブ感受性におよぼす SHP099 の影響を Figure 4-2 に示した。trVI-MC1 (Figure 4-2A, 上パネル) および trVI-

MC2 (Figure 4-2B, 上パネル)のいずれにおいても SHP099 非存在下 (SHP099, 0 μ M) ではトセラニブに対して抵抗性を示した。これらの株化細胞はいずれも SHP099 の濃度依存性にトセラニブ感受性が増加し、SHP099 の濃度が 5 μ M 以上になると、それぞれトセラニブ感受性細胞株である cVI-MC1 および cVI-MC2 と同程度かより強いトセラニブ感受性がみられた。各細胞株におけるトセラニブの IC50 については各グラフの下に示した。

考察

トセラニブ抵抗性肥満細胞腫株化細胞に対して SHP099 は単独では強い増殖抑制効果を示さなかったが、トセラニブと組み合わせることでトセラニブ感受性を著しく増強させることが明らかとなった。

SHP099 を単独で用いた場合、VI-MC では強い増殖抑制がみられ、その IC50 は 1.44 μM と SHP099 感受性細胞として知られる KBM-7 や UKE1 など人の株化細胞における SHP099 の IC50 ($\sim 1\text{-}2 \mu\text{M}$) と同程度であった[53]。一方、トセラニブおよびイマチニブ抵抗性肥満細胞腫株化細胞では、SHP099 による増殖抑制はみられるものの、その効果は明らかに低かった。この感受性の相違が生じる明らかなメカニズムは不明である。しかしながら、1) 第 2 章 Figure 2-2B、第 3 章 Figure 3-2 および Figure 3-3 においてトセラニブ抵抗性の二次変異を持つ KIT は一次変異のみ持つ KIT に比べてリン酸化レベルが高いこと、また 2) 同様の傾向はイマチニブ抵抗性の二次変異を持つ KIT でもみられる[45,46]こと、さらに 3) この解析で最も低い感受性を示した irCoMS は KIT の過剰発現によりきわめて強い KIT のリン酸化が生じている[54]ことを考慮する

と、著しいリン酸化 KIT の存在下で活性化している SHP2 は SHP099 では十分に抑制されず、その結果として強い細胞増殖抑制効果が得られなかった可能性が考えられた。

SHP099 はトセラニブ抵抗性肥満細胞腫株化細胞に対して単独では強い増殖抑制効果を持たないが、SHP099 が存在することでこれらの細胞はトセラニブに対する感受性が回復した。とくに 5 μ M SHP099 存在下では、トセラニブ感受性細胞株と同程度までトセラニブ感受性が回復した点は重要である。

SHP099 の人および犬における血中到達濃度は公表されていないが、マウスで薬物動態を解析した研究では、最大血中濃度は 10-30 μ M に達している [53]。これを考慮すると、犬において血中濃度 5 μ M は到達可能な濃度と考えられ、SHP099 はトセラニブ抵抗性を獲得した肥満細胞腫だけでなく、すでに微量のトセラニブ抵抗性クローンが存在する肥満細胞腫においても耐性化に対する新たな対応策になる可能性が考えられた。

SHP099 は直接 KIT には作用せず、またトセラニブが SHP2 に直接働きかけるとの報告もない。このことから、SHP099 とトセラニブの併存による細胞増殖抑制の増強は相乗的に生じる効果とは考えにくい。二次変異を有する

KIT においてトセラニブは十分ではないがリン酸化を抑制すること、また SHP099 は単独でトセラニブ抵抗性細胞株に対して強くはないが増殖抑制効果を示すことを合わせて考えると、SHP099 とトセラニブは相加的に作用し、その結果として細胞死に至るだけの KIT-SHP2 シグナルの低下が生じたと考えられた。

結論として、トセラニブ抵抗性の肥満細胞腫細胞では SHP099 単剤による増殖抑制効果は十分に得られないが、トセラニブとの併用によって KIT-SHP2 シグナルが抑制され効果が生じること考えられた。このことから、SHP099 はトセラニブ抵抗性を獲得した肥満細胞腫、またすでに微量のトセラニブ抵抗性クローンが存在する肥満細胞腫のいずれにおいても新たな治療アプローチとなる可能性が示唆された。

小括

第 2 章および第 3 章の結果から、トセラニブ抵抗性の二次変異を持つ KIT が肥満細胞腫のトセラニブ耐性化に重要な役割を果たしていることが示された。そこで第 4 章では、二次変異を有するトセラニブ耐性肥満細胞腫の克服戦略の構築を目的とした。KIT の下流シグナルを調節する SHP2 に着目し、トセラニブ抵抗性肥満細胞腫株化細胞の増殖におよぼす SHP2 阻害剤 (SHP099) の影響を検討した。その結果、トセラニブ抵抗性肥満細胞腫株化細胞において、SHP099 単独では十分な増殖抑制効果が得られなかったが、トセラニブとの併用によって KIT-SHP2 シグナルが抑制され増殖が抑制されることが示された。SHP099 はトセラニブ耐性を獲得した肥満細胞腫、またすでに微量のトセラニブ抵抗性クローンが存在する肥満細胞腫のいずれにおいても新たな治療アプローチとなる可能性が示唆された

表および図

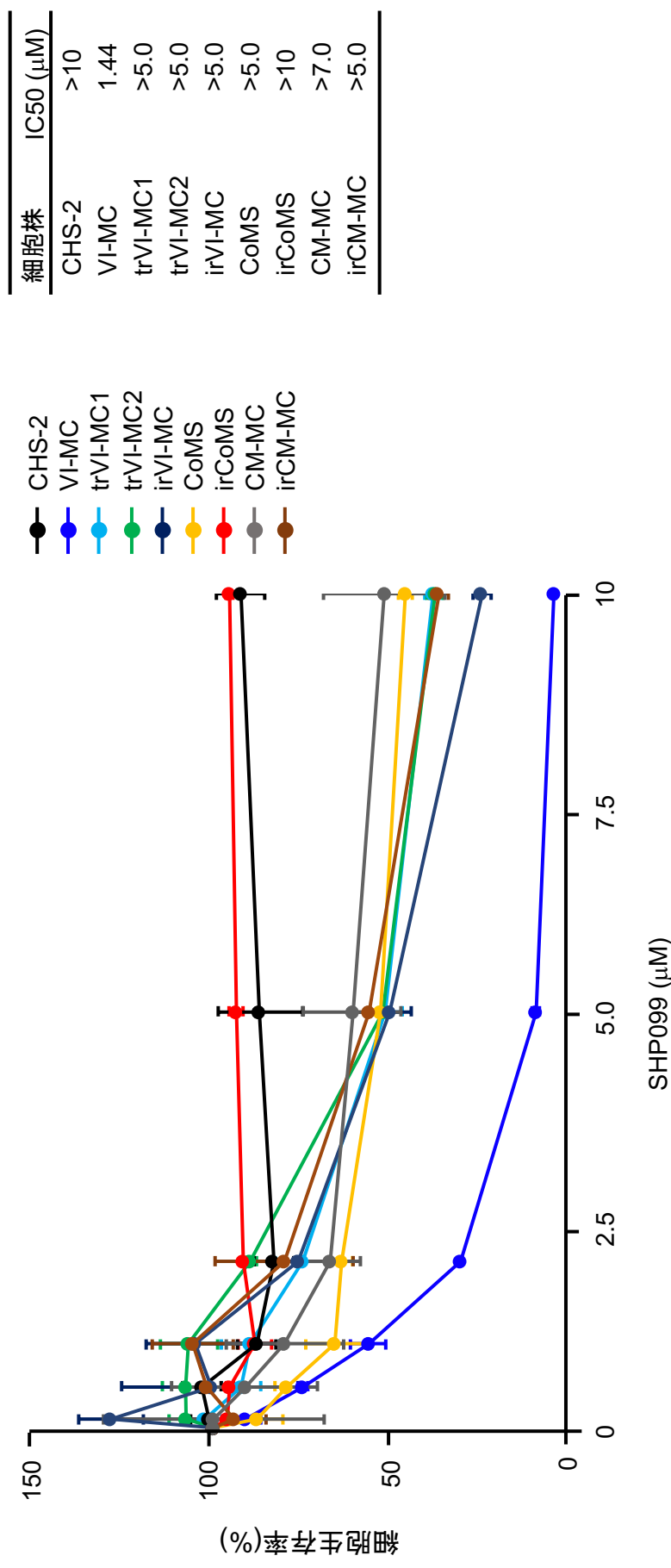
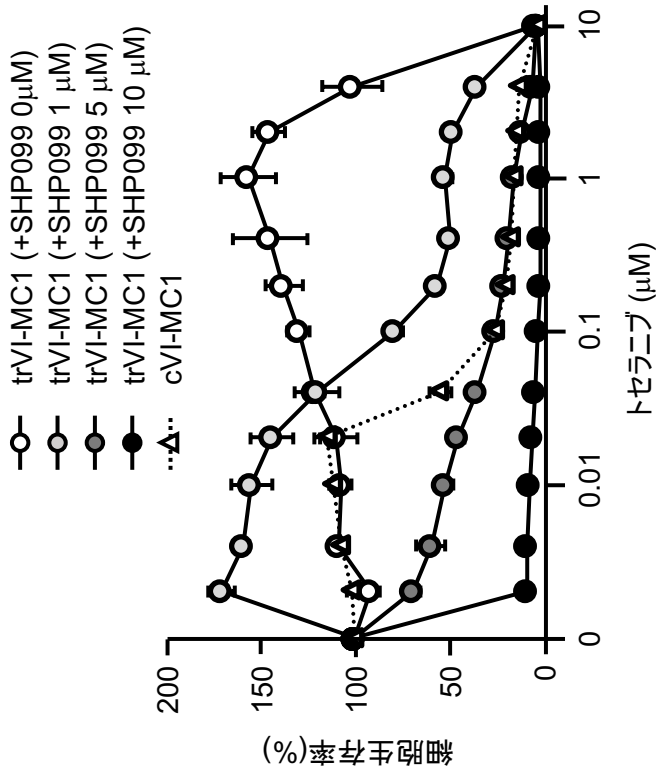


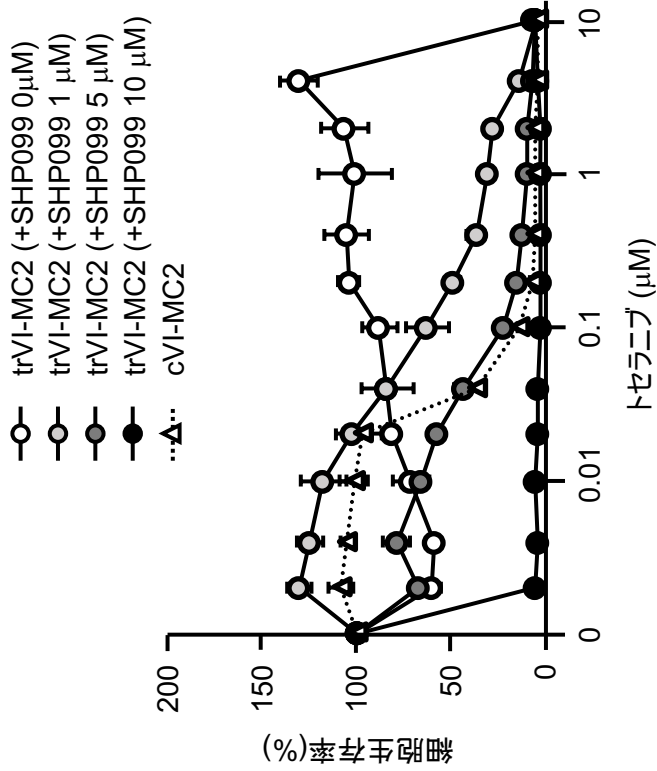
Figure 4-1. 肥満細胞腫細胞株に対するSHP099の細胞増殖抑制効果
 VI-MC、trVI-MC1、trVI-MC2、irVI-MC、CoMS、irCoMS、CM-MC、irCM-MCおよびCHS-2におけるSHP099の細胞増殖抑制効果を示した (mean ± SD, n = 3)。VI-MCはSHP099により強く増殖が抑制され、そのIC50は1.44 μMであった。一方、irCoMSはSHP099に明らかな抵抗性を示した。他の細胞株ではSHP099による細胞増殖抑制は見られたが、VI-MCと比べて感受性は低かった。

A



細胞株 (条件)	IC50 (μM)
trVI-MC1 (+SHP099 0 μM)	>5.00
trVI-MC1 (+SHP099 1 μM)	1.79
trVI-MC1 (+SHP099 5 μM)	0.03
trVI-MC1 (+SHP099 10 μM)	<0.01
cVI-MC1	0.07

B



細胞株 (条件)	IC50 (μM)
trVI-MC2 (+SHP099 0 μM)	>5.00
trVI-MC2 (+SHP099 1 μM)	0.26
trVI-MC2 (+SHP099 5 μM)	0.04
trVI-MC2 (+SHP099 10 μM)	<0.01
cVI-MC2	0.04

Figure 4-2. SHP099によるトセラニブ感受性の変化

(A)cVI-MC1およびtrVI-MC1、(B)cVI-MC2およびtrVI-MC2におけるトセラニブの細胞増殖抑制効果を示した (mean ± SD, n = 3)。trVI-MC1およびtrVI-MC2におけるトセラニブのIC50は、SHP099非存在下ではいずれも>5 μMだった。次いでSHP099存在下におけるトセラニブの増殖抑制効果を解析すると、SHP099の濃度依存性にトセラニブの感受性が増加した。trVI-MC1およびtrVI-MC2はいずれも、5 μM SHP099存在下において、それぞれのトセラニブ感受性細胞株 (cVI-MC1、cVI-MC2) を上回るトセラニブ感受性を示した。

第 5 章

総括

犬の肥満細胞腫の治療ではキナーゼ阻害剤トセラニブがしばしば用いられ、特定の症例において著しい効果が見られる。トセラニブは KIT、PDGFR、VEGFR などの分子を標的とするマルチキナーゼ阻害剤であり、肥満細胞腫では変異により恒常的に活性化した KIT を抑制することで効果をあらわすと考えられている。しかしながら、必ずしも *KIT* の変異の有無とセラニブの効果の有無が一致するわけではなく、このため肥満細胞腫に対するトセラニブの個別化治療は実現していない。この理由として、トセラニブの効果と *KIT* 変異の関連を評価する際に、犬の肥満細胞腫で発生頻度の高い *KIT* エクソン 11 の ITD 変異のみが解析され、他の変異が考慮されていないことがあげられる。これまで犬の肥満細胞腫においてエクソン 11 の ITD 変異以外にいくつかの *KIT* 変異が報告されているが、その数は多くはなく、また変異が *KIT* の機能へおよぼす影響についても十分に解析されていない。したがって、犬の肥満細胞腫に対するトセラニブの個別化治療を確立するためには、犬の肥満細胞腫における詳細な *KIT* 変異パターンの解析と各変異が *KIT* の機能へおよぼす影響を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、まず第 2 章で犬の肥満細胞腫 164 症例のゲノム

DNA を NGS 解析し、*KIT* 変異の網羅的探索を行った。また NGS 解析で認められた変異およびいくつかの既知の変異について組み換え *KIT* 蛋白を作製し、各変異 *KIT* の性状解析を行った。第 2 章の解析において様々な特性を持つ変異 *KIT* が同定されたが、その中にトセラニブ抵抗性を示す変異が複数検出された。そこで第 3 章では、肥満細胞腫細胞株を用いてトセラニブ耐性の獲得過程における *KIT* 変異の発生プロセスを解析した。第 4 章では、トセラニブ耐性肥満細胞腫の克服戦略を構築するため、*KIT* シグナルの下流に存在する SHP2 に着目し、トセラニブ耐性肥満細胞腫細胞株の増殖におよぼす SHP2 阻害剤の影響について検討した。

1. 犬の肥満細胞腫の症例における *KIT* 遺伝子変異の探索と *KIT* リン酸化制御の解析

犬の肥満細胞腫における *KIT* 変異の網羅的探索を行うため、犬の肥満細胞腫 164 症例におけるゲノム DNA を用いて *KIT* の全エクソンを NGS 解析した。その結果、35 種類の新規変異が同定され、イムノグロブリン様領域に 12 種類、膜近傍領域に 20 種類、キナーゼ領域に 2 種類、C 末端領域に 1 種類認め

られた。さらに本研究で同定された変異のうち比較的頻度の高い変異とこれまでに報告されている変異について組み換え KIT 蛋白を作製し、それぞれの変異 KIT のリン酸化レベルとトセラニブ感受性について解析した。その結果、犬の肥満細胞腫では *KIT* の広範な領域に多様な変異が存在していることが明らかとなり、変異によって異なる特性を有することが明らかとなった。また、これらの中には KIT にトセラニブ抵抗性を与える変異が低頻度ではあるが複数存在し、トセラニブ抵抗性のマイナークローンを有する症例が存在すると考えられた。これらのことから、犬の肥満細胞腫におけるトセラニブの治療を個別化する上では、各変異の特性を踏まえたアプローチが必要と考えられた。

2. トセラニブ抵抗性犬肥満細胞腫細胞株の作出と *KIT* 変異発生プロセスの解析

網羅的 *KIT* 変異解析により、トセラニブ抵抗性を示す変異が同定されたが、そのような変異はトセラニブによる治療を複雑かつ困難にする可能性が高く、トセラニブの治療を個別化する上できわめて重要である。そこでトセラニブ抵抗性 *KIT* 変異の発生プロセスを明らかにするため、クローン化した肥満細

胞腫細胞株からトセラニブ抵抗性細胞株を作出し、*KIT* の NGS 解析を行った。

トセラニブ抵抗性細胞株は、一次変異 (c.1523A>T, p.(Asp508Ile)) に加えて複数の二次変異 (c.2037T>A, p.(Asn679Lys); c.2456A>T, p.(Asp819Val); c.2456A>G, p.(Asp819Gly)) を獲得し、さらにこれらの変異を導入した組み換え *KIT* 蛋白はトセラニブ抵抗性を示した。一方、これら二次変異はトセラニブ感受性細胞株では検出されなかった。したがって、肥満細胞腫のトセラニブ耐性化には *KIT* の二次変異が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、第 2 章の結果を考慮すると、*KIT* の二次変異は、二次変異を有するマイナークローンがトセラニブ存在下で選択的に増殖する場合と、トセラニブの持続的な暴露によって *de novo* に生じる場合があると考えられた。

3. 犬の肥満細胞腫株化細胞のトセラニブ抵抗性におよぼす SHP2 阻害剤の効果の解析

第 2 章および第 3 章の結果から、トセラニブ抵抗性の二次変異を持つ *KIT* が肥満細胞腫のトセラニブ耐性化に重要な役割を果たしていることが示された。そこで第 4 章では、二次変異を有するトセラニブ耐性肥満細胞腫の克服

戦略の構築を目的とした。KIT の下流シグナルを調節する SHP2 に着目し、トセラニブ耐性肥満細胞腫株化細胞の増殖におよぼす SHP2 阻害剤 (SHP099) の影響を検討した。その結果、トセラニブ耐性肥満細胞腫株化細胞において、SHP099 単独では十分な増殖抑制効果が得られなかったが、トセラニブとの併用によって KIT-SHP2 シグナルが抑制され増殖が抑制されることが示された。SHP099 はトセラニブ耐性を獲得した肥満細胞腫、またすでに微量のトセラニブ耐性クローンが存在する肥満細胞腫のいずれにおいても新たな治療アプローチとなる可能性が示唆された。

本研究より、犬の肥満細胞腫におけるトセラニブの治療を個別化する上では、各変異の特性を踏まえたアプローチが必要と考えられた。とくにトセラニブ抵抗性の *KIT* 二次変異を持つ腫瘍細胞は腫瘍組織に予め微量存在する場合とトセラニブの暴露によって *de novo* に生じる場合があることが示され、これらトセラニブ抵抗性クロンの検出とそれ踏まえた治療戦略の構築が重要と考えられた。また、トセラニブ抵抗性クローンに対してはトセラニブと SHP2 を組み合わせた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、始終御指導、御教授を賜った日本獣医生命科学大学獣
医臨床病理学教室 盆子原 誠教授に心から感謝の意を表します。

また本研究に際し御親切な御指導を賜った田村 恭一助教に深謝致し
ます。さらに、研究の遂行にあたりご助力いただいた札幌医科大学医学部 佐々
木 崇講師に深謝いたします。研究をサポートしてくださった今井 貴昌先生、池
田 紘子先生、ならびに本学獣医臨床病理学教室各位に深謝いたします。株式会
社ケーナインラボ 植松 洋介先生に深謝いたします。本学大学院獣医生命科学
研究科博士課程獣医学専攻の宮本 良氏、谷 浩由輝氏の両氏に深く感謝いたし
ます。アニマルウェルネスセンター 小林 正人先生に深謝いたします。

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

参考文献

1. Garrett DL. (2014). Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis, *Vet Med (Auckl)*, 4(5), 49-58.
2. Liao AT, Chien MB, Shenoy N, Mendel DB, McMahon G, Cherrington J M, London CA. (2002). Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors, *Blood*, 100(8), 2969.
3. 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. (2009). 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*, 15(11), 3856-3865.
4. Weishaar KM, Ehrhart EJ, Avery AC, Charles JB, Elmslie RE, Vail DM, London CA, Clifford CA, Eickhoff JC, Thamm DH. (2018). c-Kit Mutation and Localization Status as Response Predictors in Mast Cell Tumors in Dogs Treated with Prednisone and Toceranib or Vinblastine, *J Vet Intern Med*, 32(1), 394-405.
5. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Josephson H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kieser B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. (2003). Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor, *J Clin Oncol*, 21(23), 4342-4349.
6. Chatterjee A, Ghosh J, Kapur R. (2015). Mastocytosis: a mutated KIT receptor induced myeloproliferative disorder, *Oncotarget*, 6(21), 18250-18264.
7. Agarwal S, Kazi JU, Mohlin S, Pahlman S, Rönstrand. (2015). The activation loop tyrosine 823 is essential for the transforming capacity of the c-Kit oncogenic mutant D816V, *Oncogene*, 34(35), 4581-4590.
8. von Bubnoff N, Gorantla SH, Kancha RK, Lordick F, Peschel C, Duyster J. (2005). The systemic mastocytosis-specific activating cKit mutation D

- 816V can be inhibited by the tyrosine kinase inhibitor AMN107, *Leukemia*, 19(9), 1670-1671.
9. Growney JD, Clark JJ, Adelsperger J, Stone R, Fabbro D, Griffin JD, and Gilliland DG. (2005). Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412, *Blood*, 106(2), 721-724.
 10. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs, *Vet Pathol*, 21(5),469-474.
 11. Doss CG, Rajith B, Garwasis N, Mathew PR, Raju AS1, Apoorva K, William D, Sadhana NR, Himani T, Dike IP. (2012). Screening of mutations affecting protein stability and dynamics of FGFR1-A simulation analysis, *Appl Transl Genom*, 3(1), 37-43.
 12. Bonkobara M. (2015). Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice, *Vet J*, 205(2), 180-188.
 13. Hedger G, Sansom MS, Koldsø H. (2015). The juxtamembrane regions of human receptor tyrosine kinases exhibit conserved interaction sites with anionic lipids, *Sci Rep*, 5, 9198.
 14. DiNitto JP, Deshmukh GD, Zhang Y, Jacques SL, Coli R, Worrall JW, Diehl W, English JM, Wu JC. (2010). Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance, *J Biochem*, 147(4), 601-609.
 15. Jiang H, Shao W, Wang Y, Xu R, Zhou L, Mu X. (2018). Molecular mechanism of D816X mutation-induced c-Kit activation and -mediated inhibitor resistance in gastrointestinal stromal tumor, *J Mol Graph Model*, 84, 189-196.
 16. Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. (2013). The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases, *Int J Biol Sci*, 9(5), 435-443.
 17. Amagai Y, Matsuda A2, Jung K, Oida K, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H, Tanaka A. (2015). A point mutation in the extracellular domain of

- KIT promotes tumorigenesis of mast cells via ligand-independent auto-dimerization, *Sci Rep*, 5, 9775.
18. Ip CKM, Ng PKS, Jeong KJ, Shao SH, Ju Z, Leonard PG, Hua X, Vellano CP, Woessner R, Sahni N, Scott KL, Mills GB. (2018). Neomorphic PDGFRA extracellular domain driver mutations are resistant to PDGFRA targeted therapies, *Nat Commun*, 9(1), 4583.
 19. 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. (2008). Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs, *J Vet Intern Med*, 22(4), 985-988.
 20. Kobayashi M, Sugisaki O, Ishii N, Yamada O, Ito K, Kuroki S, Sasaki Y, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. (2012). Canine intestinal mast cell tumor with c-kit exon 8 mutation responsive to imatinib therapy, *Vet J*, 193(1), 264-267.
 21. Yamada O, Kobayashi M, Sugisaki O, Ishii N, Ito K, Kuroki S, Sasaki Y, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. (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, *Vet Immunol Immunopathol*, 142(1-2), 101-106.
 22. Gounder MM, Maki RG. (2011). Molecular basis for primary and secondary tyrosine kinase inhibitor resistance in gastrointestinal stromal tumor, *Cancer Chemother Pharmacol*, 67, 25-43.
 23. Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC. (2009). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors, *Clin Cancer Res*, 15(24), 7510-7518.
 24. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Hom G, Koryotowski B, Levrisha MA, Jeffrey PD, Desantis D, Singer S, Brennan MF, Maki RG, DeMatteo RP. (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation, *Clin Cancer Res*, 11(11), 4182-4190.

25. Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC. (2009). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors, *Clin Cancer Res*, 15(24), 7510-7518.
26. Wang WL, Conley A, Reynoso D, Nolden L, Lazar AJ, George S, Trent J C. (2011). Mechanisms of resistance to imatinib and sunitinib in gastro intestinal stromal tumor, *Cancer Chemother Pharmacol*, 67, 15-24.
27. van Oosterom AT, Judson IR, Verweij J, Stroobants S, Dumez H, Donato di Paola E, Sciot R, Van Glabbeke M, Dimitrijevic S, Nielsen OS. (2002). Update of phase I study of imatinib (STI571) in advanced soft tissue sarcomas and gastrointestinal stromal tumors: a report of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, *Eur J Cancer*, 38(5), S83-S87.
28. Demetri GD. (2002). Targeting the molecular pathophysiology of gastrointestinal stromal tumors with imatinib. Mechanisms, successes, and challenges to rational drug development, *Hematol Oncol Clin North Am*, 16(5), 1115-1124.
29. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, Issels R, van Oosterom A, Hogendoorn PC, Van Glabbeke M, Bertulli R, Judson I. (2004). Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomised trial, *Lancet*, 364(9440), 1127-1134.
30. Nishida T, Kanda T, Nishitani A, Takahashi T, Nakajima K, Ishikawa T, Hirota S. (2008). Secondary mutations in the kinase domain of the KIT gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor, *Cancer Sci*, 99(4), 799-804.
31. Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von Mehren M, Fletcher CD, Sandau K, McDougall K, Ou WB, Chen CJ, Fletcher JA. (2006). Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors, *J Clin Oncol*, 24(29), 4764-4774.
32. Friedman R. (2016). Drug resistance in cancer: molecular evolution and compensatory proliferation, *Oncotarget*, 7(11), 11746-11755.

33. 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. (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study, *Vet J*, 196(3), 492-498.
34. Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmérini F, Leventhal PS, Guéry S, Moussy A, Kinet JP, Hermine O, Dubreuil P. (2008). Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors, *Mol Cancer Res*, 6(7), 1137-1145.
35. Nakano Y, Kobayashi T, Oshima F, Fukazawa E, Yamagami T, Shiraishi Y, Takanosu M. (2014). Imatinib responsiveness in canine mast cell tumors carrying novel mutations of c-KIT exon 11, *J Vet Med Sci*, 76(4), 545-548.
36. Takanosu M, Amano S, Kagawa Y. (2016). Analysis of c-KIT exon 11 mutations in canine gastrointestinal stromal tumours, *Vet J*, 207, 118-123.
37. Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH. (1999). Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms, *J Invest Dermatol*, 112(2), 165-170.
38. Gregory-Bryson E, Bartlett E, Kiupel M, Hayes S, Yuzbasiyan-Gurkan V. (2010). Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11, *BMC Cancer*, 10, 559.
39. Halsey CH, Gustafson DL, Rose BJ, Wolf-Ringwall A, Burnett RC, Duval DL, Avery AC, Thamm DH. (2014). Development of an in vitro model of acquired resistance to toceranib phosphate (Palladia®) in canine mast cell tumor, *BMC Vet Res*, 10, 105.
40. Chu PY, Pan SL, Liu CH, Lee J, Yeh LS, Liao AT. (2013). KIT gene exon 11 mutations in canine malignant melanoma, *Vet J*, 196(2), 226-230.

41. Usher SG, Radford AD, Villiers EJ, Blackwood L. (2009). RAS, FLT3, and C-KIT mutations in immunophenotyped canine leukemias, *Exp Hematol*, 37(1), 65-77.
42. London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, Rosenberg M, Downing S, Post G, Boucher J, Shenoy N, Mendel DB, McMahon G, Cherrington JM. (2003). Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies, *Clin Cancer Res*, 9(7), 2755-2768.
43. Bhang HE, Ruddy DA, Krishnamurthy Radhakrishna V, Caushi JX, Zhao R, Hims MM, Singh AP, Kao I, Rakiec D, Shaw P, Balak M, Raza A, Ackley E, Keen N, Schlabach MR, Palmer M, Leary RJ, Chiang DY, Sellers WR, Michor F, Cooke VG, Korn JM, Stegmeier F. (2015). Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding, *Nat Med*, 21(5), 440-448.
44. Zhou Y, Chen J, Weng X, Lin G, Huang Z, Shui H. (2018). Establishment of a GIST-T1 gastrointestinal stromal tumour cell line resistant to imatinib mesylate, *Oncol Lett*, 15(5), 7589-7594.
45. Kobayashi M, Kuroki S, Tanaka Y, Moriya Y, Kozutumi Y, Uehara Y, Ono K, Tamura K, Washizu T, Bonkobara M. (2015). 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*, 95(6), 524-531.
46. Nakano Y, Kobayashi M, Bonkobara M, Takanosu M. (2017). Identification of a secondary mutation in the KIT kinase domain correlated with imatinib-resistance in a canine mast cell tumor, *Vet Immunol Immunopathol*, 188, 84-88.
47. Lennartsson J, Rönstrand L. (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications, *Physiol Rev*, 92(4), 1619-1649.
48. McLean SR, Gana-Weisz M, Hartzoulakis B, Frow R, Whelan J, Selwood D, Boshoff C. (2005). Imatinib binding and cKIT inhibition is abrogated by the cKIT kinase domain I missense mutation Val654Ala, *Mol Cancer Ther*, 4(12), 2008-2015.

49. Jiang T, Zhou C. (2014). Clinical activity of the mutant-selective EGFR inhibitor AZD9291 in patients with EGFR inhibitor-resistant non-small cell lung cancer, *Transl Lung Cancer Res*, 3(6), 370-372.
50. Qu CK. (2000). The SHP-2 tyrosine phosphatase: Signaling mechanisms and biological functions, *Cell Res*, 10(4), 279-288.
51. Rehman AU, Rahman MU, Khan MT, Saud S, Liu H, Song D, Sultana P, Wadood A, Chen HF. (2018). The Landscape of Protein Tyrosine Phosphatase (Shp2) and Cancer, *Curr Pharm Des*, 24(32), 3767-3777.
52. Ruchi Pandey, Mallika Saxena, Reuben Kapur (2017). Role of SHP2 in hematopoiesis and leukemogenesis, *Curr Opin Hematol*, 24(4), 307-313.
53. Chen YN, LaMarche MJ, Chan HM, Fekkes P, Garcia-Fortanet J, Acker MG, Antonakos B, Chen CH, Chen Z, Cooke VG, Dobson JR, Deng Z, Fei F, Firestone B, Fodor M, Fridrich C, Gao H, Grunenfelder D, Hao HX, Jacob J, Ho S, Hsiao K, Kang ZB, Karki R, Kato M, Larrow J, La Bonte LR, Lenoir F, Liu G, Liu S, Majumdar D, Meyer MJ, Palermo M, Perez L, Pu M, Price E, Quinn C, Shakya S, Shultz MD, Slisz J, Venkatesan K, Wang P, Warmuth M, Williams S, Yang G, Yuan J, Zhang JH, Zhu P, Ramsey T, Keen NJ, Sellers WR, Stams T, Fortin PD. (2016). Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases, *Nature*, 535(7610), 148-152.
54. Kobayashi M, Kuroki S, Kurita S, Miyamoto R, Tani H, Tamura K, Bonkobara M. (2017). A decrease in ubiquitination and resulting prolonged lifespan of KIT underlies the KIT overexpression-mediated imatinib resistance of KIT mutation-driven canine mast cell tumor cells, *Oncol Rep*, 38(4), 2543-2550.