

犬の扁平上皮癌細胞の  
増殖機構とその抑制に関する研究

(Studies on growth mechanisms and their suppression  
in canine squamous cell carcinoma cells)

宮 本 良

犬の扁平上皮癌細胞の  
増殖機構とその抑制に関する研究

(Studies on growth mechanisms and their suppression  
in canine squamous cell carcinoma cells)

宮 本 良

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科  
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 SCC 株化細胞における survivin 阻害剤、EGFR 阻害剤および マルチキナーゼ阻害剤感受性の解析	6
	材料と方法	9
	結果	12
	考察	14
	小括	18
	表および図	19
第3章	犬の SCC 株化細胞における survivin 阻害剤の作用機序の解析	25
	実験 1. 細胞の抑制機構の解析	
	材料と方法	28
	結果	31
	実験 2. 細胞死経路の解析	
	材料と方法	33
	結果	37
	考察	41
	小括	45
	表および図	46
第4章	犬の SCC 株化細胞における afatinib の標的分子の解析	56
	実験 1. Afatinib の主要な標的分子の解析	
	材料と方法	59
	結果	62
	実験 2. リン酸化蛋白質の網羅的解析による標的分子の探索	
	材料と方法	65
	結果	67
	考察	68
	小括	71
	表および図	72

第5章	犬 SCC 株化細胞移植マウスモデルにおける afatinib の効果	77
	材料と方法	79
	結果	82
	考察	84
	小括	86
	表および図	87
第6章	総括	92
謝辞		99
参考文献		100

# 第 1 章

## 序論

犬の扁平上皮癌 (SCC) は、皮膚、口腔、鼻腔、扁桃および肺などの全身のあらゆる上皮から発生し、強い局所浸潤性を特徴とする悪性腫瘍である [1]。一般的に犬の SCC の転移率は低いが、所属リンパ節や肺への転移が 3%-36% [2] で見られ、扁桃に発生した SCC についてはこのような転移が 73% [3] と高率に認められる。SCC の治療は外科的切除あるいは外科的切除と放射線治療を組み合わせた局所療法が主軸である。一方、局所療法が不適合あるいは局所療法の効果が不十分、または腫瘍が既に転移している場合は、化学療法が治療の選択肢となる。しかしながら、犬の SCC は化学療法に抵抗性であり、ほとんどの場合効果が得られない。このため、犬の SCC では新たな内科的治療戦略の開発が必要であり、それには犬 SCC の生存および増殖に必要な分子機構を明らかにし、それを標的とした治療戦略を確立することが重要である。これまでの研究から、犬の SCC ではアポトーシス関連分子である survivin やチロシンキナーゼである EGFR が過剰発現していることが報告されており [4, 5]、これらは SCC の増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。このため、これらの分子機構は犬の SCC の新たな治療戦略として有望と考えられる。

Survivin はアポトーシス阻害蛋白質 (IAP) ファミリーに属する分子であり、主に細胞分裂の促進およびアポトーシスの阻害の 2 つの機能を有している [6]。

また、*survivin* は骨髄および生殖器を除き正常組織ではほとんど発現しておらず、多くの癌細胞で高い発現がみられる [6]。Survivin 阻害剤である YM155 は、*survivin* の転写を抑制することでその発現を強く阻害し、癌細胞のアポトーシスを誘導する [7]。近年、YM155 を用いた人の癌患者の第 I 相および第 II 相試験において、*survivin* を高発現している様々な悪性腫瘍に対する有効性が示されている [7]。このことから、YM155 を用いた *survivin* の阻害は犬の SCC において新たな治療戦略となる可能性が考えられる。

一方、EGFR は ErbB ファミリーに属するレセプター型チロシンキナーゼであり、主に上皮細胞に発現している [8]。EGFR はホモダイマーあるいは他の ErbB ファミリーとのヘテロダイマーを形成することにより自己リン酸化し、その下流シグナル経路を活性化する [8]。これにより、上皮細胞の増殖および分化を促進する。これまでの研究で、EGFR は多くの人の SCC において過剰発現が認められており、このような SCC では増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになっている [8]。また、まれではあるが EGFR のチロシンキナーゼドメインにおける機能獲得性変異が人の SCC 患者の 1%-7% [8] で認められることがある。このような SCC 患者では、EGFR の恒常的なリン酸化により、腫瘍が無秩序に増殖する。現在、人の SCC における EGFR を標的とした治療法は確立していな

いが、人の肺腺癌では同様の変異が 10%-30% [9] の症例で認められており、このような患者に対しては EGFR 阻害剤である afatinib および osimertinib を用いた治療法が確立している。EGFR に変異を持つ肺腺癌では、afatinib および osimertinib は EGFR の ATP 結合部位を不可逆的に阻害することでリン酸化を抑制し、著しい抗腫瘍効果を示す [10]。これらのことから、YM155 を用いた survivin の阻害と同様に afatinib および osimertinib による EGFR の阻害も犬の SCC において新たな治療戦略となる可能性がある。

YM155 や EGFR 阻害剤など、腫瘍の特定の増殖機構を選択的に阻害する抗腫瘍薬は分子標的薬と呼ばれ、これまで多くの薬剤が開発されている。分子標的薬はほとんどが人用の癌治療薬であり、動物の癌治療薬として開発された分子標的薬はきわめて少ない。現在、利用が可能な動物の腫瘍に対する分子標的薬は、主に幹細胞因子受容体 KIT を阻害する masitinib とマルチキナーゼ阻害剤である toceranib のみである。特に toceranib はマルチキナーゼ阻害薬であり、KIT、VEGFR2、PDGFR $\alpha/\beta$  および FLT3 などを標的とすることから、犬における様々な腫瘍で用いられ、肥満細胞腫をはじめいくつかの腫瘍で効果が報告されている [11]。犬の SCC が toceranib の標的分子を有するか否かは明らかになっていないが、toceranib が動物用として認可されていること、マルチキナーゼ阻害剤で



あることを考慮すると、犬の SCC 細胞に対する toceranib の増殖抑制効果の有無を解析し、増殖抑制効果を有するならその標的分子を同定することは重要である。

そこで本研究では、犬の SCC に対する分子標的薬を用いた新たな治療戦略を確立するため、第 2 章で、YM155、afatinib、osimertinib および toceranib に対する犬の SCC 株化細胞の感受性を評価した。次いで第 3 章および第 4 章では、それぞれ YM155 と afatinib に注目して作用機序を解析した。さらに第 5 章では afatinib の効果を *in vivo* で評価した。

## 第 2 章

犬の SCC 株化細胞における  
survivin 阻害剤、EGFR 阻害剤および  
マルチキナーゼ阻害剤感受性の解析

犬の SCC は全身の扁平上皮から発生する、局所浸潤性が強い悪性腫瘍である [1]。治療は外科的切除と放射線治療を組み合わせた局所療法が主軸である。一方、局所療法で制御が困難な場合は、化学療法が治療の選択肢となる。しかしながら、犬の SCC は化学療法に抵抗性であり、ほとんどの場合効果が得られない。このため、犬の SCC では新たな内科的治療戦略の開発が必要であり、それには犬 SCC の生存および増殖に必要な分子機構を明らかにし、それを標的とした治療戦略を確立することが重要である。これまでの研究から犬の SCC では survivin や EGFR の過剰発現が報告されており [4, 5]、これらは SCC の増殖に密接に関連していると考えられる。このため、これらの分子機構は犬の SCC の新たな治療標的として有望と考えられる。

Survivin は細胞分裂の促進とアポトーシスの抑制を担う分子であり、多くの癌細胞で強く発現している [7]。近年、survivin 阻害剤である YM155 は人の癌患者の第 I 相および第 II 相の臨床試験において survivin が高発現している様々な悪性腫瘍で有効性が示されている [7]。このことから、YM155 を用いた survivin の阻害は犬の SCC において新たな治療戦略となる可能性が考えられる。

EGFR は受容体型チロシンキナーゼであり、上皮細胞の増殖を促進する機能を有している。EGFR は多くの人の SCC において過剰発現しており、腫瘍の増

殖に重要な役割を果たしている [8]。また、まれではあるが人の SCC では EGFR に機能獲得性変異を持つことがあり、このような SCC 患者では、EGFR が恒常的にリン酸化し、これにより腫瘍が無秩序に増殖する [8]。現在、人の SCC における EGFR を標的とした治療法は開発されていないが、人の肺腺癌では同様の変異が多く見られ、このような患者では EGFR 阻害剤である afatinib および osimertinib が著しい抗腫瘍効果を示す [10]。このことから、YM155 を用いた survivin の阻害と同様に、afatinib および osimertinib による EGFR の阻害も犬の SCC の新たな治療戦略となる可能性が考えられる。

YM155 や EGFR 阻害剤などの分子標的薬は、ほとんどが人の癌治療薬として開発されており、動物の癌治療薬として認可された分子標的薬は masitinib と toceranib のみである。マルチキナーゼ阻害剤である toceranib は、いくつかの犬の腫瘍で効果が報告されている [11]。これらを考慮すると、犬の SCC 細胞に対する toceranib の増殖抑制効果の有無を明らかにすることは重要である。

そこで第 2 章では、犬の SCC 細胞において survivin および EGFR が治療標的となるかを検討するため、YM155、afatinib および osimertinib に対する犬 SCC 株化細胞の感受性を評価した。さらに、toceranib に対する犬 SCC 株化細胞の感受性についても検討した。

## 材料と方法

### 株化細胞

本研究では7種類の犬 SCC 株化細胞 (HAPPY, SQ4, SYRUP, CSCC-R, KUCKY, SCC 2/88 および POCO)、3種類の犬非腫瘍性上皮株化細胞 (CPEK および COPK, 扁平上皮; MDCK, 腎上皮) および2種類の犬肥満細胞腫株化細胞 (VI-MC および CoMS) を用いた (Table 1)。VI-MC および CoMS を除いた全ての細胞は10% 非働化牛胎仔血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、50 U/ml ペニシリン (Thermo Fisher Scientific) および 50 g/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Thermo Fisher Scientific) (cDMEM) で培養した。VI-MC および CoMS は cDMEM と同じ添加物を入れた RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) (cRPMI) で培養した。全ての細胞は 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の湿潤環境下にて培養した。

### 化合物

YM155 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)、afatinib (Selleck Chemicals, Houston, TX)、osimertinib (Selleck Chemicals) および toceranib (Medkoo Biosciences,

Morrisville, NC) を 10 mM になるように 100% DMSO で溶解し、使用時まで-30 °C にて保存した。

### 細胞増殖抑制試験

cDMEM で懸濁した 10 種類の株化細胞 (HAPPY, SQ4, SYRUP, CSCC-R1, KUCKY, SCC 2/88, POCO, CPEK, COPK および MDCK) を 96 ウェルプレートにそれぞれ  $1.0 \times 10^3$  個/ウェルで播種し、24 時間培養した。その後、各ウェルに YM155 ( $0-10^4$  nM)、afatinib ( $0-10^3$  nM)、osimertinib ( $0-10^3$  nM) あるいは toceranib ( $0-10 \mu\text{M}$ ) を添加し (DMSO 最終濃度 0.1%)、48 時間後に WST-1 cell proliferation assay kit (Takara, Tokyo, JPN) を用いて細胞生存率を評価した。Toceranib を用いた細胞増殖抑制試験では、toceranib 高感受性の株化細胞 VI-MC [12] および CoMS (投稿準備中) をポジティブコントロールとして用いた。これらの株化細胞については、cRPMI で懸濁した細胞をそれぞれ  $1.0 \times 10^4$  個/ウェルで 96 ウェルプレートに播種した後に toceranib を添加し ( $0-10 \mu\text{M}$ , DMSO 最終濃度 0.1%)、48 時間後に同様に細胞生存率を評価した。各阻害剤の細胞増殖抑制試験において、0.1% 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た。各株化細胞に対する阻害剤の 50%増殖抑制濃度 (IC50) は

GraphPad Prism software program (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて算出した。

## 結果

### 犬の SCC 細胞に対する YM155 の増殖抑制効果

YM155 は HAPPY および SQ4 細胞に対して著しい増殖抑制効果を示し (Fig. 1-1A)、IC<sub>50</sub> はそれぞれ 4.3 nM および 4.8 nM だった (Fig. 1-1B)。一方、他の株化細胞は YM155 に対する感受性が低く (Fig. 1-1A)、HAPPY および SQ4 細胞に比べて 10 倍以上高い IC<sub>50</sub> を示した (Fig. 1-1B)。

### 犬の SCC 細胞に対する afatinib および osimertinib の増殖抑制効果

Afatinib は POCO および CSCC-R1 細胞に対して著しい増殖抑制効果を示した (Fig. 1-2A)。POCO および CSCC-R1 細胞に対する afatinib の IC<sub>50</sub> はそれぞれ 4.2 nM および 4.8 nM であった (Fig. 1-2B)。一方、他の株化細胞の afatinib に対する感受性は低く (Fig. 1-2A)、POCO および CSCC-R1 細胞に比べて 80 倍以上高い IC<sub>50</sub> を示した (Fig. 1-2B)。Osimertinib は SQ4、SYRUP、SCC 2/88、CPEK、COPK および MDCK 細胞に比べて、POCO、CSCC-R1、KUCKY および HAPPY 細胞に対してより増殖を抑制する傾向が見られ (Fig. 1-3A;B, IC<sub>50</sub>, 85-870 nM)、それらの中では POCO の感受性が最も高かった (IC<sub>50</sub>, 85 nM)。



## 犬の SCC 細胞に対する toceranib の増殖抑制効果

Toceranib に対する犬の SCC 株化細胞の感受性はコントロール細胞である VI-MC および CoMS と比べて明らかに低く (Fig. 1-4A)、これらの細胞に比べて 100 倍以上高い IC50 (1.7-5.2  $\mu$ M) であった (Fig. 1-4B)。

## 考察

犬の SCC 株化細胞は株化細胞により YM155、afatinib、osimertinib および toceranib に対して異なる感受性を示し、特定の株化細胞では YM155 あるいは afatinib が標的とする分子機構が生存・増殖に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。解析に用いた株化細胞には口腔、鼻腔、口唇および扁桃の扁平上皮癌に由来する細胞が含まれるが、これらの由来と各阻害剤に対する感受性との間には関連が見られなかった。このため、犬の SCC 株化細胞における阻害剤感受性の違いは SCC の発生部位ではなく、各 SCC 株化細胞が持つ増殖機構の相違によって生じると考えられた。

YM155 は HAPPY および SQ4 細胞に対して IC50 が約 4 nM と強力に増殖を抑制し、これらの細胞では survivin が増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。人の癌患者において YM155 を最大耐用量で投与した時の血中到達濃度 (Cmax) は 13-35 nM [14] であり、HAPPY および SQ4 細胞に対する IC50 の約 3 倍以上である。さらに YM155 は犬の組織球性肉腫細胞マウス移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示すことが報告されており、そのモデルで用いた CHS-4 細胞に対する YM155 の IC50 は 7.2 nM である [15]。また、YM155 は種々の人悪性腫瘍のマウス移植モデルに対しても抗腫瘍効果を示しており、これらに用

いた株化細胞に対する YM155 の IC50 は 2.9-8.7 nM (乳癌, 2.9 nM; 肺癌, 5.1, 6.8 nM; 悪性黒色腫, 6.3 nM; 移行上皮癌, 8.7 nM) である [16]。HAPPY および SQ4 細胞に対する YM155 の増殖抑制効果は、これら既報の増殖抑制効果と同等かあるいはそれ以上であることから、YM155 は HAPPY および SQ4 細胞に対して強力な抗腫瘍効果を有する可能性が考えられた。

Afatinib は POCO および CSCC-R1 細胞に対して IC50 が 4-5 nM と他の株化細胞 (IC50 > 380 nM) に比べて著しい増殖抑制効果を示した。人の固形癌患者において、afatinib を標準用量 (40-50 mg/body, 1 日 1 回) で投与した時の afatinib の Cmax はおよそ 50-85 nM であり [17]、POCO および CSCC-R1 細胞における afatinib の IC50 は、それと比較して明らかに低い濃度であった。また、afatinib は EGFR 変異型の人肺癌株化細胞に対して数 nM の濃度で増殖抑制効果を示すことが報告されている [18]。Afatinib の POCO および CSCC-R1 細胞に対する増殖抑制効果は EGFR 変異型の株化細胞と同等であることから、afatinib の標的分子が POCO と CSCC-R1 の増殖に決定的な役割を果たしていると考えられた。一方、人の肺癌患者において osimertinib を標準用量 (80 mg/body, 1 日 1 回) で投与した時の Cmax は約 70-400 nM であり [19]、これは POCO、CSCC-R1、KUCKY および HAPPY 細胞における osimertinib の IC50 (85-870 nM) と同等か

高い濃度である。また、osimertinib はEGFR 変異型の人肺癌株化細胞に対して、約 20 nM 以下の濃度で増殖抑制効果を示すことが報告されている [18]。さらに、POCO および CSCC-R1 における afatinib の IC50 が Cmax の 1/10 以下であることを考えると、osimertinib の犬 SCC 細胞に対する増殖抑制効果は afatinib と比べて低いと考えられる。Afatinib および osimertinib はいずれも EGFR を標的とするが、osimertinib は特定の変異型 EGFR (EGFR T790M) に選択性が高く、afatinib は ErbB ファミリー (EGFR, HER2, HER3 および HER4) 分子全般を標的とする [20]。さらに、afatinib は off-target として他のいくつかのキナーゼを抑制することが知られている [21]。Afatinib および osimertinib の標的の違いを考慮すると、POCO および CSCC-R1 細胞の増殖機構には T790M EGFR 以外の EGFR や他の ErbB ファミリー分子、あるいは afatinib の off-target のいずれかのシグナル活性が関連している可能性が考えられた。

Toceranib に対する犬の SCC 株化細胞の感受性は低く、それらの IC50 (1.7-5.2  $\mu$ M) は固形癌罹患犬に toceranib を標準用量 (2.4-2.9 mg/kg, 2 日に 1 回) で投与した時の Cmax (0.25-0.30  $\mu$ M) [22] と比べて約 10 倍高い濃度であった。このことから、toceranib の犬の SCC 細胞に対する増殖抑制効果は低いと考えられた。これまで toceranib は SCC を含むいくつかの犬の固形癌に対して抗腫瘍効果を

示すことが報告されており [11]、このような症例では **toceranib** の標的分子である **KIT**、**VEGFR2**、**PDGFR $\alpha$ / $\beta$** および **FLT3** などが増殖機構に関与していると考えられる。しかしながら、**toceranib** が奏功した例はきわめて少なく、また 7 種の犬の **SCC** 株化細胞は全て **toceranib** 非感受性であることから、**toceranib** の標的分子が犬の **SCC** の増殖の鍵であることはまれと考えられた。

本実験の結果から、犬の **SCC** の増殖には **survivin** あるいは **EGFR T790M** 以外の **afatinib** の標的分子が重要な役割を果たしており、これらは犬 **SCC** の新規治療標的となる可能性が考えられた。一方、犬の **SCC** における **YM155** および **afatinib** の作用機構は不明であり、犬の **SCC** に対する新たな治療戦略を確立する上では、これらの分子機構を解明することが必要と考えられた。

## 小括

犬の SCC 細胞において survivin および EGFR が治療標的となるかを検討するため、YM155、afatinib および osimertinib に対する 7 種類の犬の SCC 株化細胞の感受性を評価した。さらに toceranib に対する犬 SCC 株化細胞の感受性についても検討した。YM155 は HAPPY および SQ4 細胞に対して、afatinib は POCO および CSCC-R1 細胞に対して著しい増殖抑制効果を示した。一方、osimertinib および toceranib ではこのような増殖抑制効果はみられなかった。このことから、犬の SCC の増殖機構には survivin あるいは afatinib の標的分子が重要な役割を果たしており、これらは犬 SCC の有望な治療標的となる可能性が考えられた。

## 表および図

Table 1 本実験で用いた犬の株化細胞

細胞	由来	種類	提供元
HAPPY	口腔	扁平上皮癌	小野先生、日本動物高度医療センター
SQ4	鼻腔	扁平上皮癌	本研究室にて樹立
SYRUP	口腔	扁平上皮癌	本研究室にて樹立
CSCC-R1	口腔	扁平上皮癌	遠藤先生、萩原先生、石井先生、酪農学園大学
KUCKY	鼻鏡	扁平上皮癌	小野先生、日本動物高度医療センター
SCC 2/88	口唇	扁平上皮癌	CELLnTEC
POCO	扁桃	扁平上皮癌	本研究室にて樹立
CPEK	皮膚	非腫瘍性扁平上皮	CELLnTEC
COPK	口唇	非腫瘍性扁平上皮	CELLnTEC
MDCK	腎臓	非腫瘍性腎上皮	理研バイオリソース研究センター
VI-MC	消化管	肥満細胞腫	中川先生、東京大学
CoMS	口腔	肥満細胞腫	藤永先生、北海道大学



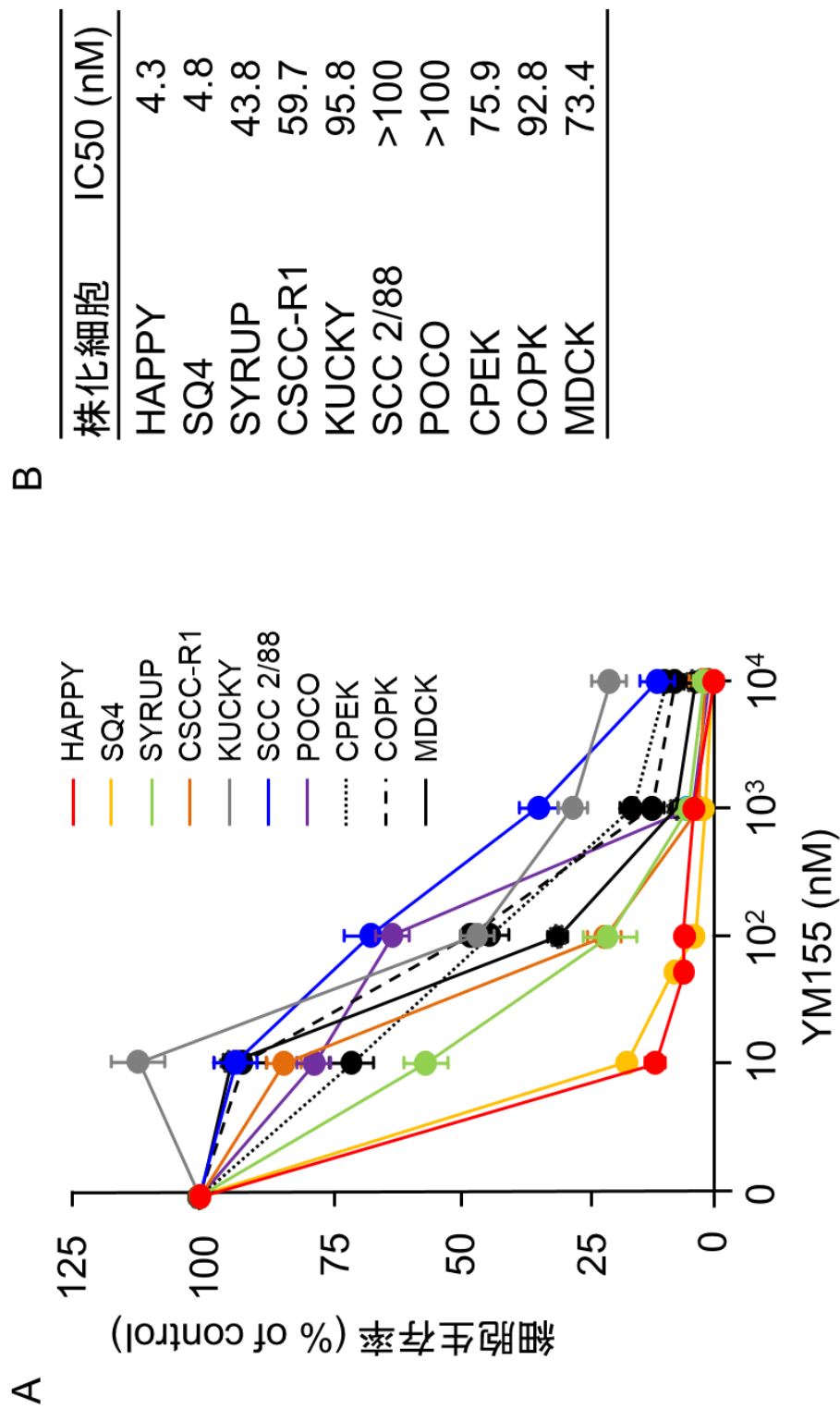


Fig. 1-1 犬扁平上皮癌 (SCC) 細胞に対する YM155 の増殖抑制効果  
 (A) 7 種類の SCC 細胞 (HAPPY、SQ4、SYRUP、CSCC-R1、KUCKY、SCC 2/88 および POCO)、3 種類の非腫瘍性上皮株化細胞 (CPEK、COPK および MDCK) に対する YM155 の細胞増殖抑制効果を示した (mean  $\pm$  SD; n=3)。 (B) 各株化細胞に対する YM155 の 50% 増殖抑制濃度 (IC50) を示した。

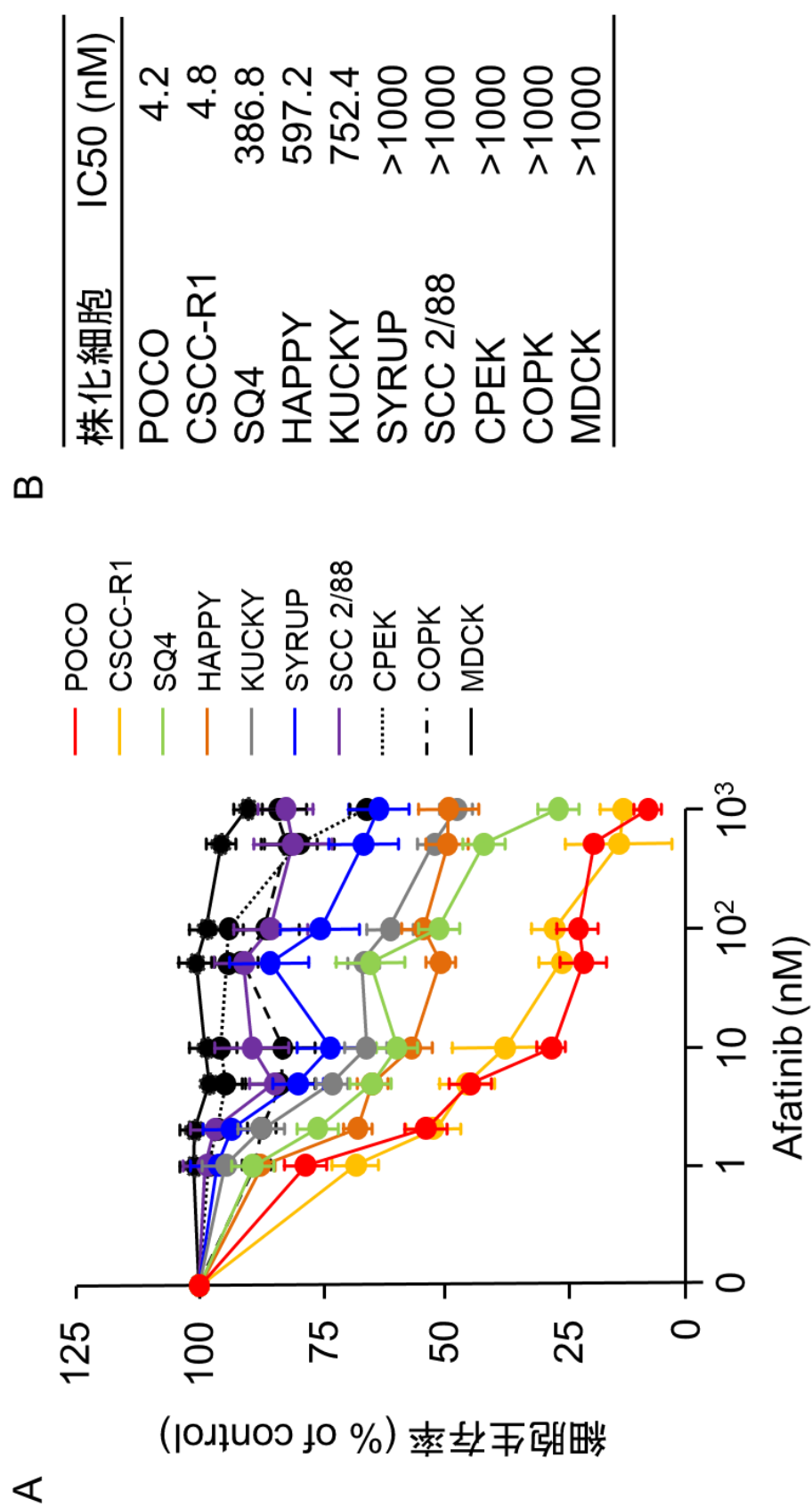


Fig. 1-2 犬扁平上皮癌 (SCC) 細胞に対する afatinib の増殖抑制効果  
 (A) 7 種類の SCC 細胞 (HAPPY、SQ4、SYRUP、CSCC-R1、KUCKY、SCC 2/88 および POCO)、3 種類の非腫瘍性上皮株化細胞 (CPEK、COPK および MDCK) に対する afatinib の細胞増殖抑制効果を示した (mean  $\pm$  SD; n=3)。 (B) 各株化細胞に対する afatinib の 50% 増殖抑制濃度 (IC50) を示した。

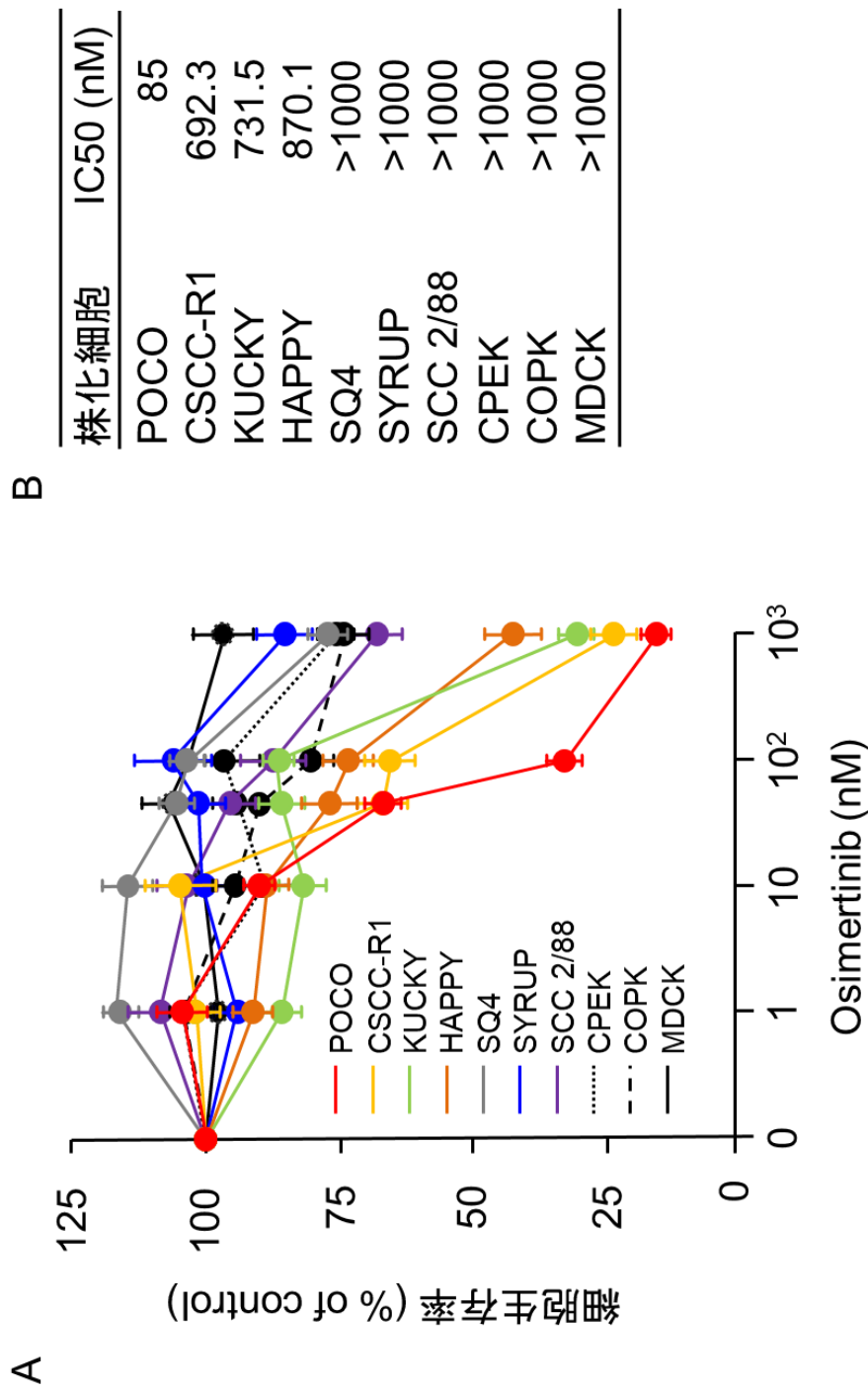


Fig. 1-3 犬扁平上皮癌 (SCC) 細胞に対する osimertinib の増殖抑制効果  
 (A) 7 種類の SCC 細胞 (HAPPY、SQ4、SYRUP、CSCC-R1、KUCKY、SCC 2/88 および POCO)、3 種類の非腫瘍性上皮株化細胞 (CPEK、COPK および MDCK) に対する osimertinib の細胞増殖抑制効果を示した (mean  $\pm$  SD; n=3)。 (B) 各株化細胞に対する osimertinib の 50% 増殖抑制濃度 (IC50) を示した。

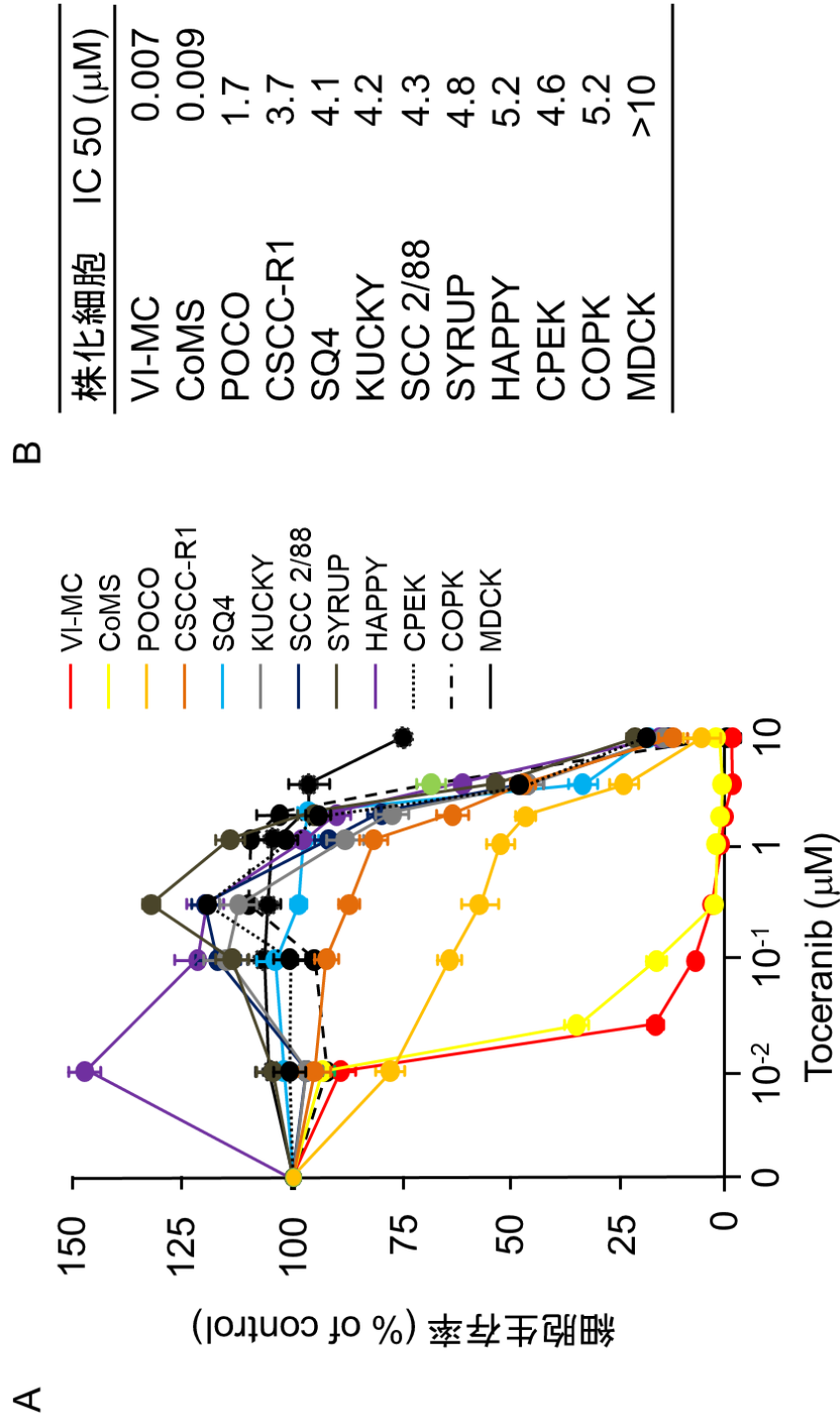


Fig. 1-4 犬扁平上皮癌 (SCC) 細胞に対する toceranib の増殖抑制効果  
 (A) 7 種類の SCC 細胞 (HAPPY、SQ4、SYRUP、CSCC-R1、KUCKY、SCC 2/88 および POCO)、3 種類の非腫瘍性上皮株化細胞 (CPEK、COPK および MDCK) および 2 種類の肥満細胞腫株化細胞 (VI-MC および CoMS) に対する toceranib の増殖抑制効果を示した (mean ± SD; n=3)。 (B) 各株化細胞に対する toceranib の 50% 増殖抑制濃度 (IC50) を示した。

## 第 3 章

### 犬の SCC 株化細胞における survivin 阻害剤の作用機序の解析

第2章の結果から、YM155はSCC株化細胞の中でHAPPYおよびSQ4細胞に対して選択的に増殖を抑制することが明らかとなった。このことから、HAPPYおよびSQ4細胞ではsurvivinが増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、YM155によるsurvivinの抑制をSCCの新たな治療戦略として考慮する上では、これらの細胞におけるYM155の選択的な細胞傷害機構を解明する必要がある。

YM155は癌細胞におけるsurvivinの転写を抑制し、mRNAの発現を低下させることでsurvivin蛋白質の発現を阻害する [7]。これにより、survivinが抑制していたアポトーシスのエフェクター (CASP3 および PARP) が活性化し、癌細胞にアポトーシスが誘導される [7]。また、survivinはオートファジー誘導因子であるbeclin1 (BECN1) も抑制しているが、近年一部の癌細胞において、YM155はsurvivinの発現を阻害することでBECN1の発現を促進し、癌細胞にオートファジー細胞死を誘導することも報告されている [23]。これらのことから、YM155はHAPPYおよびSQ4細胞においてsurvivinの発現を抑制することで、アポトーシスあるいはオートファジー細胞死を誘導し、その結果細胞の増殖が抑制されたと考えられた。

そこで本章では、犬のSCC細胞におけるYM155の作用機序を明らかにす

るため、実験 1 として、7 種類の犬 SCC 株化細胞における survivin の発現レベルを検討した。また、YM155 による HAPPY および SQ4 細胞での survivin 発現レベルの変化を解析した。次いで実験 2 として、HAPPY および SQ4 細胞における YM155 の細胞死誘導経路を検討した。

## 実験 1. Survivin 発現抑制機構の解析

### 材料と方法

#### 株化細胞

7種類の犬 SCC 株化細胞 (HAPPY, SQ4, SYRUP, CSCC-R1, KUCKY, SCC 2/88 および POCO) を用いた。これらの細胞は第2章と同様の条件で培養した。

#### 半定量的 reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)

HAPPY および SQ4 細胞における *survivin* mRNA の発現におよぼす YM155 の影響を RT-PCR で評価した。HAPPY および SQ4 細胞を YM155 (2.5 nM) を含む cDMEM で0、24、48 および 72 時間培養した後、RNA-STAT-60 (TEL-TEST B, Friendwood, TX) を用いてこれらの細胞から total RNA を抽出した。次いで、SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) を用いて total RNA から cDNA を作製した。*Survivin* を増幅するプライマー組 (5' プライマー:

5'-GCTTCATCCACTGTCCCACT-3'; 3' プライマー

5'-TTGTTGGTTTCCTTTGC-3') (232 bp) および *GAPDH* を増幅するプライマー

組 (5' プライマー: 5'-ACTTGTCATCAACGGGAAGT-3'; 3' プライマー

5'-CAATCTTGAGGGAGTTGTCA-3') (242 bp) はそれぞれの犬の塩基配列



(*survivin*, GenBank NM\_001003348; *GAPDH*, NM\_001003142) を基に作製した。これらのプライマー組と Tks Gflex DNA polymerase (Takara, Tokyo, JPN) を用いて、cDNA を PCR で 27 サイクル増幅した。*Survivin* および *GAPDH* のアニーリング反応は、それぞれ 58 °C および 60 °C で行った。PCR 産物を 1.2% アガロースゲルで電気泳動し、LAS-500 (Fujifilm, Tokyo, JPN) によりゲルを撮影した。バンドのシグナル強度は ImageQuant TL software (Fujifilm) を用いて半定量し、*survivin* の mRNA 発現レベルは *GAPDH* の mRNA 発現レベルにより標準化した。

#### ウェスタンブロッティング

HAPPY、SQ4、SYRUP、CSCC-R1、KUCKY、SCC 2/88 および POCO 細胞を cell lysis buffer (#9803, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) で溶解し、細胞溶解物中の蛋白質を、15% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。HAPPY および SQ4 細胞については、YM155 (2.5 nM) を含む cDMEM で 0、24、48 および 72 時間培養した細胞も用意し、cell lysis buffer で溶解した後に細胞溶解物中の蛋白質を同様の電気泳動により分離した。ターボブロッティングシステム (BIO-RAD, Hercules, CA) を用いて分離した蛋白質をポリビニリデンジフルオリドメンブレン (BIO-RAD) に転写した。メンブレン

を 5% スキムミルクでブロッキングした後、ウサギ抗ヒト survivin ポリクローナル抗体 (1:2000, Novus, Littleton, CO) あるいはマウス抗ウサギ GAPDH モノクローナル抗体 (1:5000, Abcam, Cambridge, UK) と室温で 2 時間反応させた。抗 survivin 抗体は過去の報告で犬との交差性が確認されているものを用いた [15]。これらの抗体を反応させた後、メンブレンを西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:10000, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) あるいは HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (1:10000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) と室温で 1 時間反応させた。これらの抗体と反応した蛋白を ECL Prime (GE Healthcare) 発光させた後、メンブレンを LAS-500 (Fujifilm) で撮影した。バンドのシグナル強度は ImageQuant TL software (Fujifilm) を用いて半定量し、survivin の発現レベルは GAPDH の発現レベルにより標準化した。

## 結果

### 犬の SCC 株化細胞における survivin 蛋白質の発現

7種類の SCC 株化細胞における survivin の発現レベルを Fig. 2-1 に示した。SCC 株化細胞のうち HAPPY および SQ4 細胞において、高い survivin の発現が認められた (Fig. 2-1A)。一方、他の SCC 株化細胞では、survivin の発現はほとんど認められないか、認められてもわずかであった (Fig. 2-1A)。Fig. 2-1B に半定量した survivin のシグナル強度を示した。Survivin のシグナル強度は GAPDH のシグナル強度により標準化した。HAPPY および SQ4 細胞における survivin 発現レベルは他の SCC 細胞に比べて有意に高かった ( $P < 0.01$  vs. SYRUP, CSCC-R1, KUCKY, SCC 2/88 および POCO)。

### YM155 による HAPPY 細胞の survivin mRNA の発現抑制

Fig. 2-2 に YM155 添加後の HAPPY および SQ4 細胞における survivin mRNA の経時的な発現の変化を示した。HAPPY 細胞では、YM155 添加後 48 時間で survivin mRNA の発現が減少し、72 時間でほとんど検出されなくなった (Fig. 2-2A)。SQ4 細胞では YM155 添加後に survivin mRNA 発現の減少は認められず、

添加後 72 時間でも高い発現レベルを維持していた (Fig. 2-2A)。Fig. 2-2B にこれらのシグナル強度を半定量した結果を示した。HAPPY 細胞における *survivin* mRNA の発現は、YM155 無添加 (0 時間) と比べて添加後 48 および 72 時間で有意 ( $P < 0.05$ ) に減少した。一方、SQ4 細胞では、YM155 添加による有意な *survivin* mRNA の発現の変化は認められなかった。

#### YM155 による HAPPY および SQ4 細胞の *survivin* 発現の抑制

HAPPY および SQ4 細胞における *survivin* の発現におよぼす YM155 の影響をウェスタンブロッティングで解析した (Fig. 2-3)。YM155 の添加により HAPPY の *survivin* は 24 時間以降に著しく減少した。一方、SQ4 細胞では 24 時間から減少し、48 時間以降に著しく減少した (Fig. 2-3A)。Fig. 2-3B に *survivin* のシグナル強度を半定量した結果を示した。HAPPY および SQ4 細胞のいずれも、YM155 無添加 (0 時間) と比べて添加後 24 時間以降に *survivin* の発現が有意 ( $P < 0.05$ ) に減少した。

## 実験 2. 細胞死経路の解析

### 材料と方法

#### 株化細胞

実験には 3 種類の犬 SCC 株化細胞 (HAPPY, SQ4 および CSCC-R1)、人悪性黒色腫株化細胞 (A375, American Type Culture Collection, Manassas, Va) および犬悪性黒色腫株化細胞 (CMM-1, 東京大学中川先生から分与) を用いた。犬 SCC 株化細胞と同様に、A375 と CMM-1 細胞も培地に cDMEM を用い、第 2 章と同様の条件で培養した。

#### 化合物

実験には YM155 (Cayman Chemical)、トポイソメラーゼ阻害剤 doxorubicin (化学療法基盤支援活動, Tokyo, JPN)、PARP 阻害剤 olaparib (化学療法基盤支援活動)、チロシンキナーゼ阻害剤 bosutinib (Selleck, Houston, TX) および汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK (Calbiochem, San Diego, CA)、リソソーム阻害剤クロロキン (CQ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いた。YM155、doxorubicin、olaparib、bosutinib および Z-VAD-FMK は 10 mM になるように、100% DMSO で溶解し、CQ は 50 mM になるように Phosphate buffered salts solution で溶解した。これらの

化合物は、使用するまで-30 °Cで保存した。

### アポトーシスの検出

アポトーシスの検出には annexin V/propidium iodide (PI) の 2 重染色を用いた。YM155 (0, 2.5 および 5.0 nM, DMSO 最終濃度 0.1%) を含む cDMEM で HAPPY、SQ4 および CSCC-R1 細胞を 48 時間培養した。また、各細胞を 0.1% DMSO のみ含む cDMEM で 48 時間培養し、control として用いた。MEBCYTO apoptosis kit (MBL, Nagano, JPN) を用いて、これらの細胞をフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識 annexin V および PI で染色し、フローサイトメーター (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) でアポトーシスを検出した。

### 細胞増殖抑制試験

cDMEM で懸濁した HAPPY および SQ4 細胞をそれぞれ 96 ウェルプレートに  $1.0 \times 10^3$  個/ウェルで播種し、24 時間培養した。その後、YM155 による増殖抑制試験では、各ウェルに YM155 (2.5 nM, DMSO 最終濃度 0.1%) を添加し、0、24、48 および 72 時間培養した。また、YM155 と各種阻害剤を組み合わせた増殖抑制試験では、各ウェルに YM155 (10 nM) と Z-VAD-FMK (10  $\mu$ M)、olaparib (100 nM)

あるいは CQ (10  $\mu$ M) 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 kit (Takara) を用いて細胞生存率を評価した。細胞生存率は 0.1% DMSO のみを添加した条件における生存率を 100%として算出した。

### ウェスタンブロッティング

HAPPY および SQ4 細胞を 2.5 nM の YM155 で 0、24、48、72 時間処理した後、cell lysis buffer (#9803, Cell Signaling Technology) で溶解した。細胞溶解物中の蛋白質を 10 あるいは 15% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離し、実験 1 と同様の手順でウェスタンブロッティングを行った。この解析では、一次抗体としてマウス抗ウサギ GAPDH モノクローナル抗体 (1:5000, Abcam)、マウス抗ヒト PARP モノクローナル抗体 (1:1000, BD Bioscience)、ウサギ抗ヒト CASP3 ポリクローナル抗体 (1:1000, Abcam)、ウサギ抗ヒト BECN1 ポリクローナル抗体 (1:1000, Novus) あるいはウサギ抗ヒト LC3 ポリクローナル抗体 (1:1000, MBL) を用い、二次抗体には HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:10000, GE Healthcare) あるいは HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (1:10000, Jackson ImmunoResearch) を用いた。活性型 PARP および CASP3 検出のポジティ

ブコントロールとして、それぞれ doxorubicin で処理 (1 nM, 0.1% DMSO, 48 時間) した A375 細胞 [24] および bosutinib で処理 (1  $\mu$ M, 0.1% DMSO, 48 時間) した CMM-1 細胞 [25] を用い、同様のウェスタンブロッティングを行った。

### 統計解析

統計解析は、Excel (Microsoft) において unpaired two-tailed Student's *t* 検定を用いて行い、 $P < 0.05$  を有意な差とした。



## 結果

### YM155 による SCC 細胞の増殖抑制と PARP の活性化

HAPPY および SQ4 細胞の増殖とアポトーシス関連蛋白質におよぼす YM155 の影響を Fig. 2-4 に示した。HAPPY および SQ4 細胞のいずれも YM155 添加 48 時間以降に細胞生存率の有意 ( $P < 0.05$  vs. 0 h) な減少がみられた (Fig. 2-4A)。PARP は両細胞で発現していたが、HAPPY では YM155 添加 48 時間から活性化し、SQ4 では YM155 添加 72 時間で活性型 PARP が検出された (Fig. 2-4B)。CASP3 はいずれの細胞においても検出されなかった (Fig. 2-4B)。

### YM155 による HAPPY 細胞のアポトーシス誘導

Fig. 2-5 に YM155 で処理した HAPPY および SQ4 細胞におけるアポトーシス解析の結果を示した。ネガティブコントロールとして、YM155 非感受性の SCC 株化細胞 CSCC-R1 細胞を用いた。YM155 存在下で培養した HAPPY 細胞では、YM155 非存在下で培養した control と比べてアポトーシス細胞 (annexin V 陽性 /PI 陰性) の割合が著しく増加した (2.5 nM, 75.0%; 5.0 nM, 78.8%)。一方、YM155 存在下で培養した SQ4 では、control と比べてアポトーシスした細胞はわずかで

あった (2.5 nM, 17.3%; 5.0 nM, 14.5%)。YM155 の濃度に関わらず、CSCC-R1 細胞においてアポトーシス細胞の割合に変化は認められなかった。

#### YM155 誘導性細胞死に対するアポトーシス阻害剤の影響

HAPPY および SQ4 細胞における YM155 誘導性の細胞死に対する PARP 阻害剤 olaparib と汎 caspase 阻害剤 Z-VAD-FMK の影響を Fig. 2-6 に示した。YM155 により HAPPY および SQ4 細胞の生存率はいずれも約 15%に低下し、olaparib はこれらの細胞死を有意 ( $P < 0.05$ ) に阻害した。Olaparib による細胞死の阻害効果は SQ4 細胞に比べて HAPPY 細胞で強くみられ、HAPPY 細胞では生存率が約 80%に増加したのに対して SQ4 細胞では約 50%であった。Z-VAD-FMK による YM155 誘導性細胞死の阻害は認められなかった。

#### YM155 による HAPPY および SQ4 細胞のオートファジー誘導

HAPPY および SQ4 細胞のオートファジー関連蛋白質 LC3-I/II の発現におよぼす YM155 の影響を Fig. 2-7 に示した。オートファゴソームの増加に伴い、LC3 は I から II へ転換し、LC3-II の発現が増加する。このことから、LC3-II/LC3-I 比の増加ならびに LC3-II の発現の増加はオートファジーの指標とされている

[26]。そこで本解析では、これらを指標としてオートファジーを評価した。LC3-I と LC3-II については、リソソーム内で分解されるためにオートファジーの誘導だけでなくリソソーム機構の破綻も増加の原因となる [26]。このため本解析では、リソソーム阻害剤 CQ 存在下での YM155 の影響を評価した。LC3-I は SQ4 細胞のみで検出され、CQ の有無に関わらずその発現に対する YM155 の影響はほとんど見られなかった (Fig. 2-7A)。LC3-II は両株化細胞において検出され、HAPPY 細胞では CQ の有無に関わらず YM155 添加 24 時間から増加した。この増加は CQ 存在下においてより明らかであった (Fig. 2-7A)。SQ4 では、LC3-II は CQ 非存在下において YM155 添加 72 時間で増加し、CQ 存在下では添加後 48 時間から増加した (Fig. 2-7A)。Fig. 2-7B に CQ 存在下における HAPPY および SQ4 細胞の LC3-II のシグナル強度を半定量し GAPDH で標準化した結果を示した。また、LC3-I が検出された SQ4 については、LC3-I に対する LC3-II の比を算出した結果も示した。LC3-II は HAPPY および SQ4 細胞において、YM155 無添加 (0 時間) と比べてそれぞれ添加 24 時間および 48 時間以降で有意 ( $P < 0.05$ ) に増加した。SQ4 細胞の LC3-II/LC3-I 比は、YM155 無添加 (0 時間) と比べて添加 48 時間以降に有意 ( $P < 0.05$ ) に増加した。

## YM155 誘導性細胞死に対するリソソーム阻害剤の影響

HAPPY および SQ4 細胞における YM155 誘導性の細胞死に対する CQ の影響を Fig. 2-8 に示した。YM155 により HAPPY および SQ4 細胞の生存率は著しく低下したが (約 15%)、CQ は YM155 の作用をほぼ完全に阻害し、いずれの細胞も生存率は約 100% と有意 ( $P < 0.05$ ) に増加した。

## YM155 による BECN1 の発現の変化

HAPPY および SQ4 細胞における BECN1 の発現におよぼす YM155 の影響を Fig. 2-9 に示した。HAPPY 細胞では、YM155 添加 48 および 72 時間で BECN1 の発現が減少した (Fig. 2-9A)。SQ4 細胞では YM155 による BECN1 発現の減少はみられず、YM155 添加 72 時間でも無添加 (0 時間) と同程度の発現レベルを維持していた (Fig. 2-9A)。Fig. 2-9B にこれら BECN1 のシグナル強度を半定量した結果を示した。HAPPY 細胞の BECN1 の発現は、YM155 無添加 (0 時間) と比べて添加 48 および 72 時間で有意 ( $P < 0.05$ ) に減少した。一方、SQ4 細胞では YM155 添加による BECN1 の発現の有意な変化は認められなかった。

## 考察

YM155 は *survivin* の発現レベルが高い HAPPY および SQ4 細胞において増殖を抑制することが示された。これらの細胞では YM155 による *survivin* の抑制機構に相違が見られ、HAPPY 細胞では転写抑制により、SQ4 細胞では転写後の過程を抑制することにより発現を抑制することが示された。また、YM155 による細胞死の過程にも違いがあり、いずれの細胞においてもオートファジーとそれに続き PARP 依存性アポトーシスが生じるが、HAPPY 細胞では PARP 依存性アポトーシスが細胞死の主な経路であるのに対して SQ4 細胞では PARP に依存しない細胞死も生じていると考えられた。

YM155 は HAPPY 細胞では *survivin* の転写を抑制し、SQ4 細胞では転写後の過程を抑制したことから、同じ SCC の細胞であっても YM155 は異なる分子機構で *survivin* を抑制することが明らかとなった。YM155 は SP1 あるいは ILF3/p54 複合体を阻害することで *survivin* の転写を抑制することから、HAPPY 細胞ではこれらの転写因子が抑制され *survivin* mRNA の発現抑制が生じたと考えられた。一方、*survivin* の主な転写因子は SP1 あるいは ILF3/p54 複合体であるが、他に NF- $\kappa$ B や HIF-1 など多数の分子が *survivin* の転写因子として報告されている [27]。

YM155 は SP1 あるいは ILF3/p54 複合体を選択的に阻害する [4] ことから、SQ4 細胞では NF- $\kappa$ B や HIF-1 などの転写因子が *survivin* の転写を制御しており、その結果 *survivin* の転写が維持された可能性が考えられた。SQ4 細胞については *survivin* の発現は蛋白質レベル減少することが示されたが、その機序は今のところ明らかではない。近年、人の胃癌細胞において *survivin* は cIAP1 と結合し、ユビキチン化を回避していることが示されている [28]。また、YM155 は cIAP1 をユビキチン・プロテアソーム介在性に分解することで *survivin* のユビキチン化を誘導することが示されている [28]。これらを考慮すると、YM155 は SQ4 細胞において cIAP1 の分解を介して *survivin* の分解を促進したのかもしれない。

HAPPY および SQ4 細胞では YM155 による *survivin* の抑制機構に違いが見られたが、細胞死に至るプロセスは類似しており、いずれもオートファジーとそれに続く PARP 依存性アポトーシスが生じていた。これらの細胞では PARP 依存性アポトーシスが生じるまでの時間に違いが見られたが (HAPPY 48 時間 vs. SQ4 72 時間)、いずれの細胞においても YM155 によって *survivin* の著しい減少とそれに伴うオートファジーの誘導が見られ、さらにその 24 時間後に PARP の活性化が見られた。これらのことから、*survivin* の発現レベルが高い SCC 細胞では *survivin* がオートファジーの抑制に重要な役割を果たしており、それがアポ

トーシスの抑止に作用していると考えられた。

HAPPY および SQ4 細胞では YM155 により類似した細胞死経路を辿るが、明らかに異なる点も見られた。HAPPY 細胞では PARP 阻害剤により細胞死がほとんど抑制されたことから、PARP 依存性のアポトーシスが YM155 による細胞死の中心的な分子機構と考えられる。一方、SQ4 細胞では PARP 阻害剤では細胞死が十分には抑制されなかったことから、PARP 依存性アポトーシスとは異なる細胞死経路も誘導されたと考えられた。この点について、YM155 による SQ4 の細胞死が汎 caspase 阻害剤では抑制されず、CQ ではほぼ完全に抑制されたこと、また PARP が活性化する前にすでに細胞死が生じていたことを考慮すると、一部の SQ4 細胞ではオートファジー細胞死が誘導されたと考えられた。

CQ は HAPPY および SQ4 細胞のいずれにおいても YM155 が誘導する細胞死を抑制したが、このことは両細胞においてオートファジーが最初に誘導され、それが PARP 依存性アポトーシスの引き金となっていることを示唆している。これまでオートファジーがアポトーシスの引き金となることは知られているが、それは caspase の活性化を介したアポトーシスであり、HAPPY および SQ4 細胞で見られた caspase の活性化を介さない PARP 依存性アポトーシスについては報告がない。このことから、SCC 細胞ではオートファジー介在性のアポトーシス

の誘導には、必ずしも caspase の活性化が必要ではないと考えられた。

BECN1 は survivin が抑制している最も一般的なオートファジー誘導因子であるが、HAPPY および SQ4 細胞では YM155 による発現の増加は見られず、HAPPY 細胞ではむしろ減少した。BECN1 は survivin と複合体を形成して、アポトーシスを抑制することがあり、この複合体が減少するとアポトーシスが誘導される [29]。これらのことから、HAPPY 細胞において BECN1 は PARP 依存性アポトーシスの抑制因子として作用しているのかもしれない。

以上から、survivin の発現レベルが高い犬の SCC において YM155 は survivin を抑制することにより PARP 依存性アポトーシスおよびオートファジー細胞死の 2 つの細胞死を誘導することを明らかにした。これらの最終的な細胞死経路および survivin の抑制機序に関わらず、YM155 による survivin の阻害は survivin の発現レベルが高い犬の SCC における新たな治療戦略となる可能性が考えられた。



## 小括

犬の SCC 株化細胞における YM155 の作用機構を明らかにするため、7 種類の犬 SCC 株化細胞における survivin の発現レベルを検討した。次いで、YM155 による HAPPY および SQ4 細胞での survivin 発現レベルの変化と細胞死誘導経路について検討した。Survivin は YM155 感受性の HAPPY および SQ4 細胞において発現レベルが高く、YM155 はこれらの survivin の発現を抑制した。HAPPY および SQ4 では survivin の抑制機構が異なり、YM155 は HAPPY では survivin の転写抑制により、SQ4 では転写後の過程を抑制することにより抑制した。さらに、これらの細胞では誘導される細胞死の経路にも相違が見られた。いずれの細胞においてもオートファジーとそれに続き PARP 依存性アポトーシスが生じるが、HAPPY 細胞では PARP 依存性アポトーシスが細胞死の主な経路であるのに対して SQ4 細胞ではこれに加えてオートファジー細胞死も誘導されることが示唆された。これらのことから、YM155 は survivin の発現レベルが高い犬の SCC において新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

## 表および図

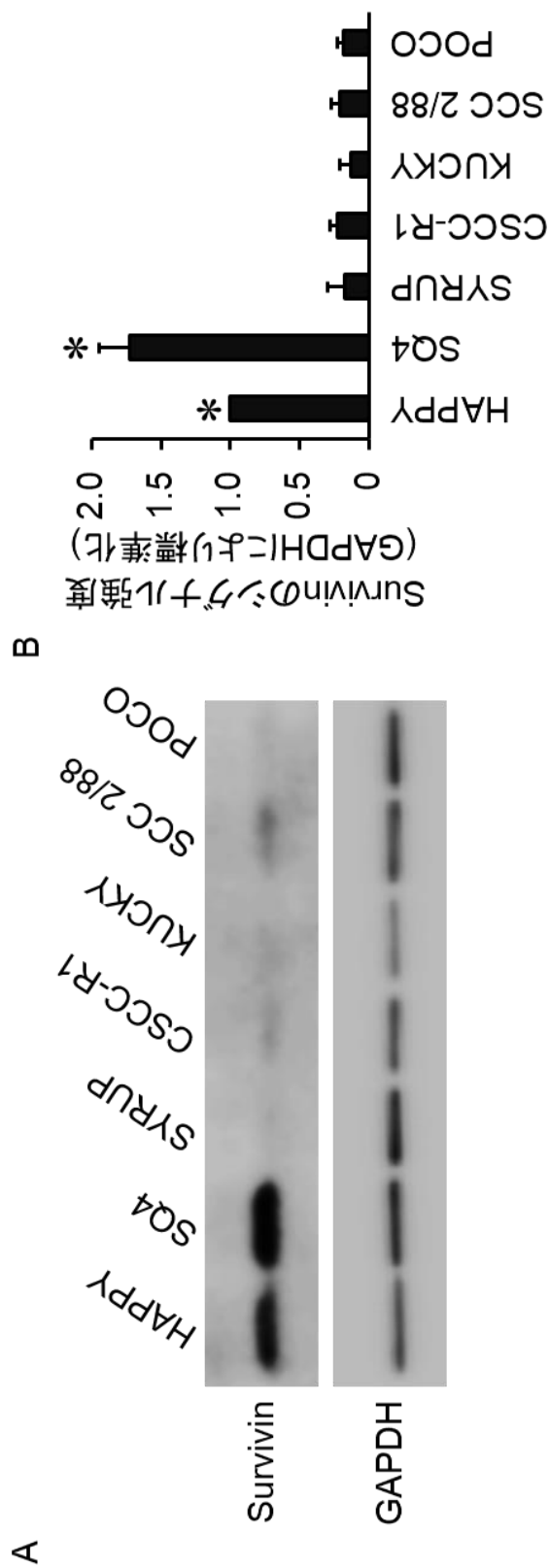


Fig. 2-1 犬の SCC 株化細胞における survivin 蛋白質の発現

(A) 7 種類の SCC 株化細胞における survivin および GAPDH の発現をウェスタンブロットティングで解析した。写真は独立した 3 回の実験の中から代表的な結果を示した。(B) Survivin のシグナル強度を半定量した結果を示した。Survivin のシグナル強度は GAPDH のシグナル強度により標準化した (mean  $\pm$  SD; n = 3)。HAPPY 細胞の survivin シグナル強度を 1.0 とした。HAPPY および SQ4 における survivin の発現は他の SCC 株化細胞と比較して有意に高かった (\* $P < 0.01$  vs. SYRUP, CSCC-R1, KUCKY, SCC 2/88 および POCO)。

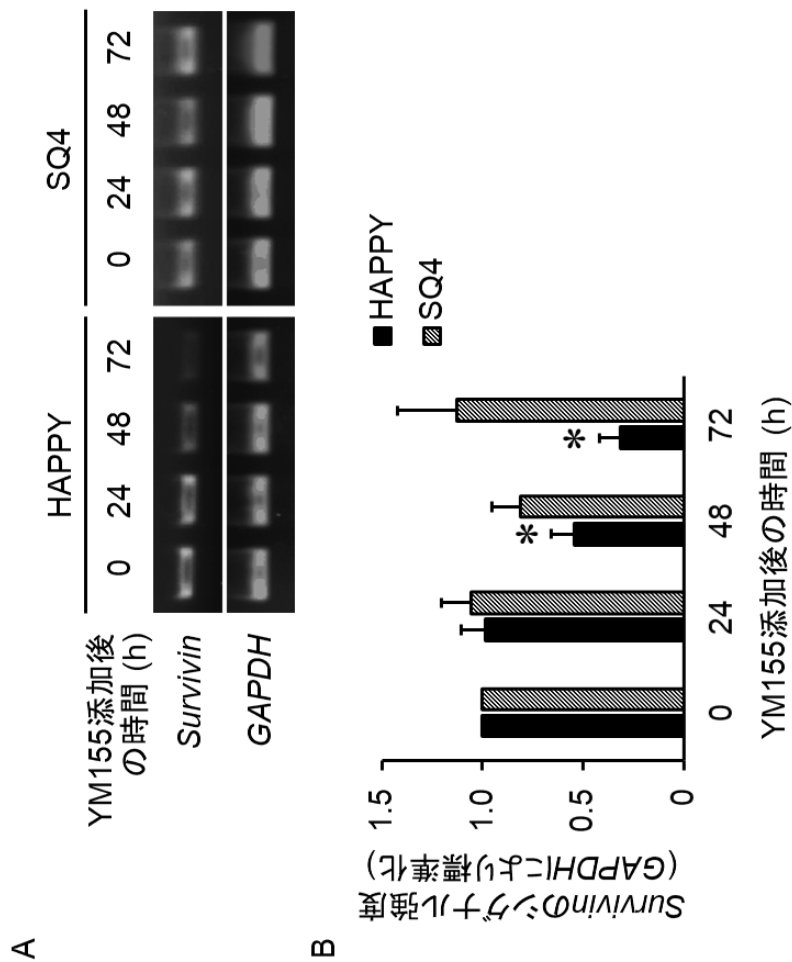


Fig. 2-2 YM155 による HAPPY 細胞の *survivin* mRNA の発現抑制

(A) YM155 (2.5 nM) 存在下の cDMEM で 0-72 時間培養した HAPPY および SQ4 細胞における *survivin* および内部標準 *GAPDH* の mRNA の発現を RT-PCR で解析した。写真は独立した 4 回の実験の中から代表的な結果を示した。(B) *Survivin* mRNA のシグナル強度を半定量した結果を示した。*Survivin* のシグナル強度は *GAPDH* のシグナル強度により標準化した (mean  $\pm$  SD; n = 4)。YM155 無添加 (0 時間) における *survivin* のシグナル強度を 1.0 とし、各時間のシグナル強度と比較した (\* $P < 0.05$ )。

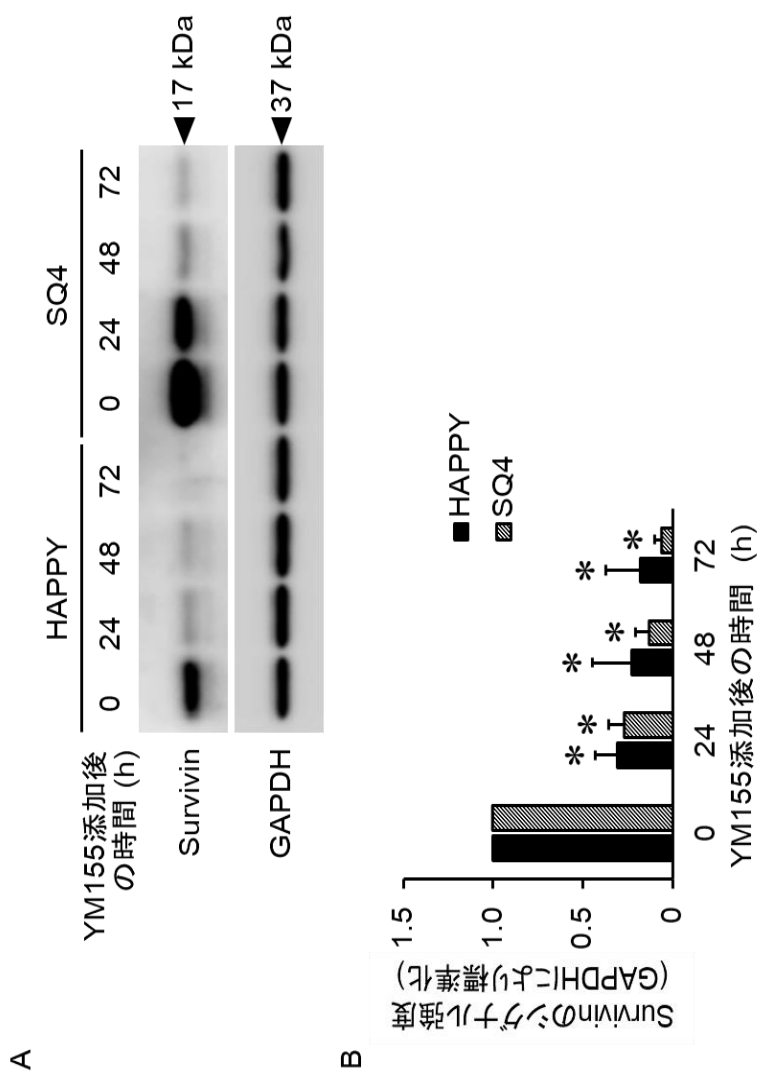


Fig. 2-3 YM155 による HAPPY および SQ4 細胞の survivin 発現の抑制

(A) YM155 (2.5 nM) 存在下の cDMEM で 0-72 時間培養した HAPPY および SQ4 細胞の survivin (17 kDa) および内部標準である GAPDH (37 kDa) の発現をウェスタンブロッティングで解析した。写真は独立した 3 回の実験の中から代表的な結果を示した。(B) Survivin のシグナル強度を半定量した結果を示した。Survivin のシグナル強度は GAPDH のシグナル強度により標準化した (mean ± SD; n = 3)。YM155 無添加 (0 時間) の survivin シグナル強度を 1.0 とし、各時間のシグナル強度と比較した (\* $P < 0.05$ )。

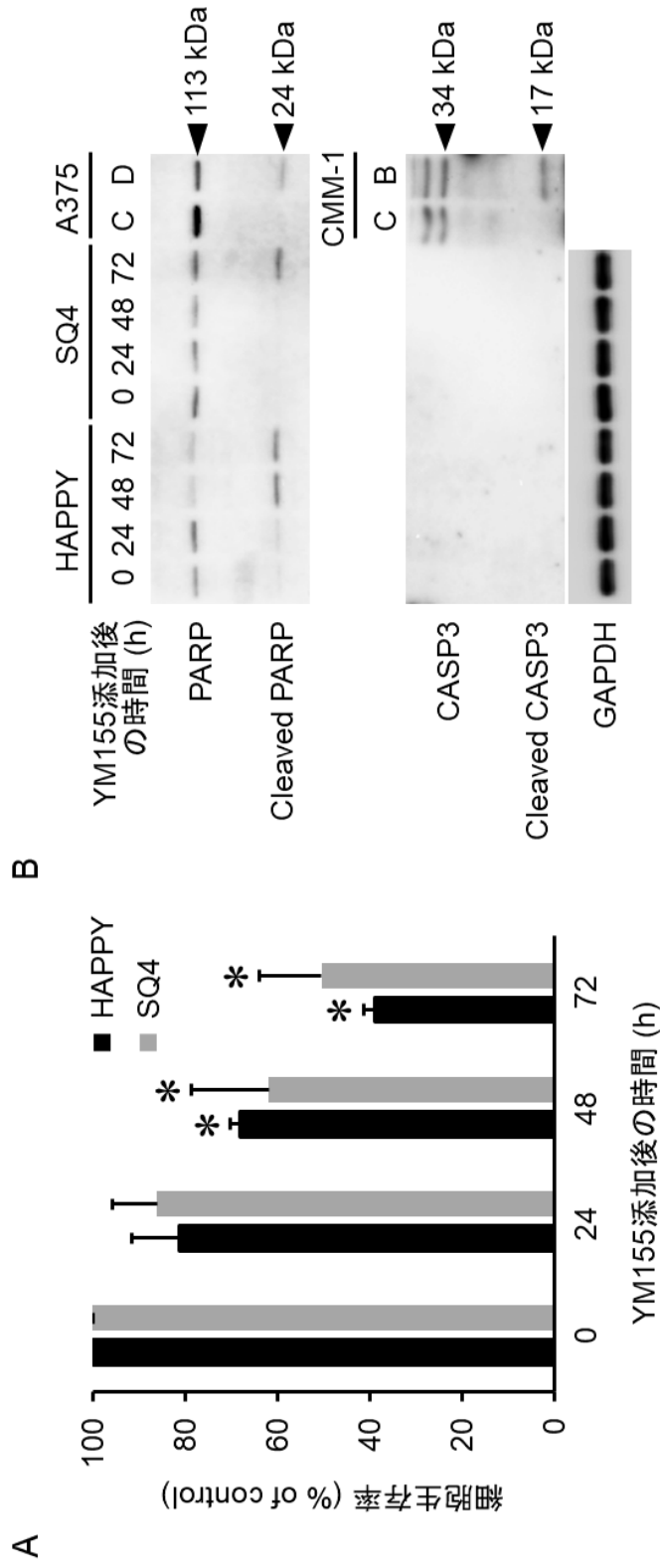


Fig. 2-4 YM155 による細胞増殖の抑制と PARP の活性化

YM155 (2.5 nM) を添加した cDMEM で 0-72 時間培養した HAPPY および SQ4 細胞における増殖率およびアポトーシス関連蛋白質の変化を示した。(A) YM155 添加 48 時間以降に HAPPY および SQ4 細胞の増殖率はいずれも有意に減少した (mean ± SD; n = 3) (\* $P < 0.05$  vs. 0 h)。(B) 両細胞における PARP および CASP3 の発現をウェスタンブロッティングで解析した。写真は独立した 3 回の実験の中から代表的な結果を示した。内部標準として GAPDH を用いた。活性型の PARP (24 kDa) および CASP3 (17 kDa) 検出のポジティブコントロールとして、それぞれ doxorubicin で処理 (1 nM, 0.1% DMSO, 48 時間) した A375 細胞および bosutinib で処理 (1  $\mu$ M, 0.1% DMSO, 48 時間) した CMM-1 細胞を用いた。0.1% DMSO のみを添加した cDMEM で 48 時間培養したこれらの細胞をネガティブコントロールとして用いた。C, control; D, doxorubicin; B, bosutinib

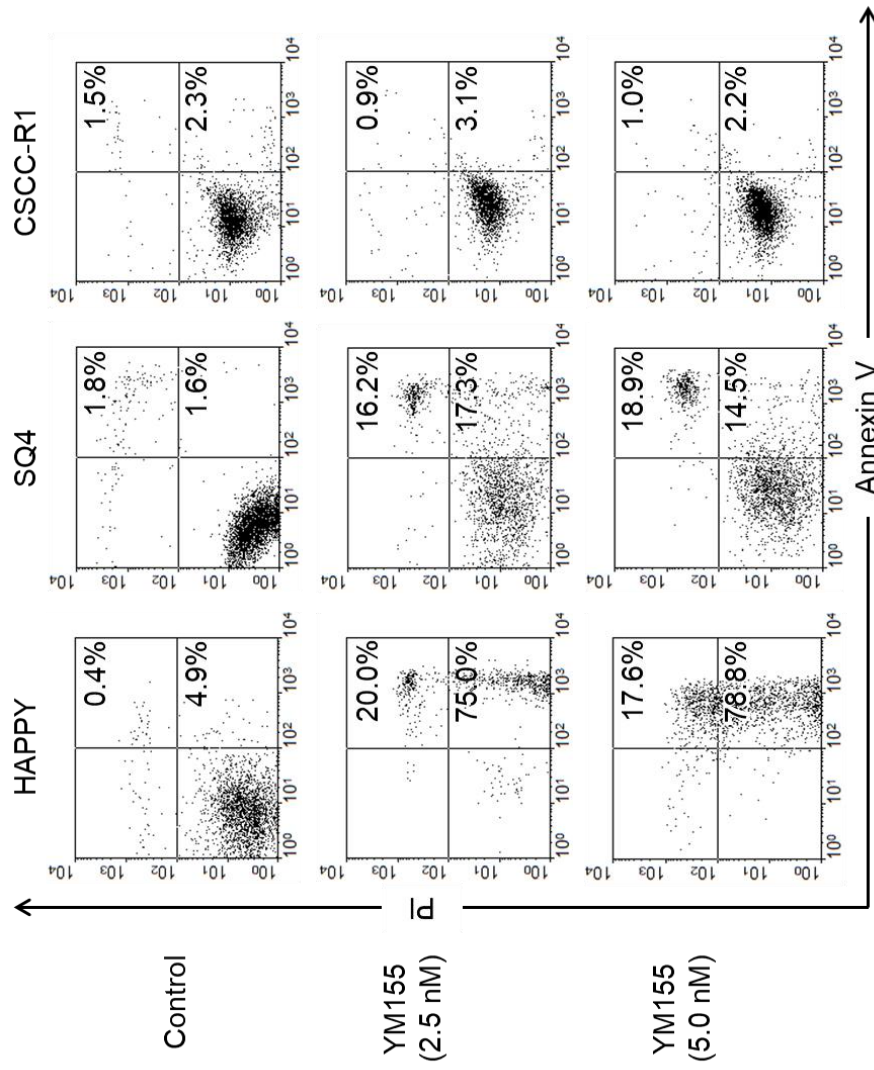


Fig. 2-5 YM155 による HAPPY 細胞選択的なアポトーシスの誘導

0 (control)、2.5 および 5.0 nM の YM155 を含む cDMEM で 48 時間培養した HAPPY、SQ4 および CSCC-R1 細胞を annexin V/propidium iodide (PI) で二重染色し、フローサイトメトリーで解析した。Annexin V 陽性/PI 陰性 (右下の区画、アポトーシス細胞) の割合および annexin V 陽性/PI 陽性 (右上の区画、ネクローシスあるいはそれ以外の死細胞) の割合をそれぞれ該当する区画に示した (mean; n = 3)。

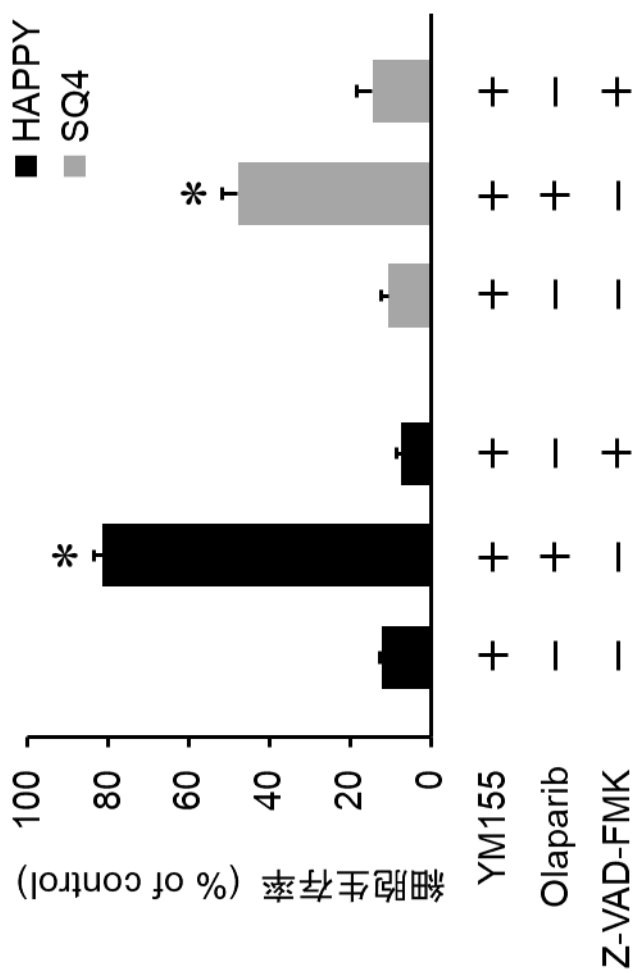


Fig. 2-6 YM155 誘導性細胞死に対するアポトーシス阻害剤の影響

PARP 阻害剤 olaparib (100 nM) あるいは汎 caspase 阻害剤 Z-VAD-FMK (10 μM) 存在下の cDMEM に YM155 (10 nM) を添加 (DMSO 最終濃度 0.1%) した後、48 時間培養した HAPPY および SQ4 細胞における生存率を算出した (mean ± SD; n = 3)。YM155 単独で処理 (10 nM, 48 時間) した HAPPY および SQ4 細胞の生存率を各条件における生存率と比較した。0.1% DMSO のみを添加した条件での細胞生存率を 100% とした。HAPPY および SQ4 細胞のいずれにおいても、olaparib は YM155 による増殖抑制を有意に阻害した (\* $P < 0.05$  vs. YM155 単独処理)。



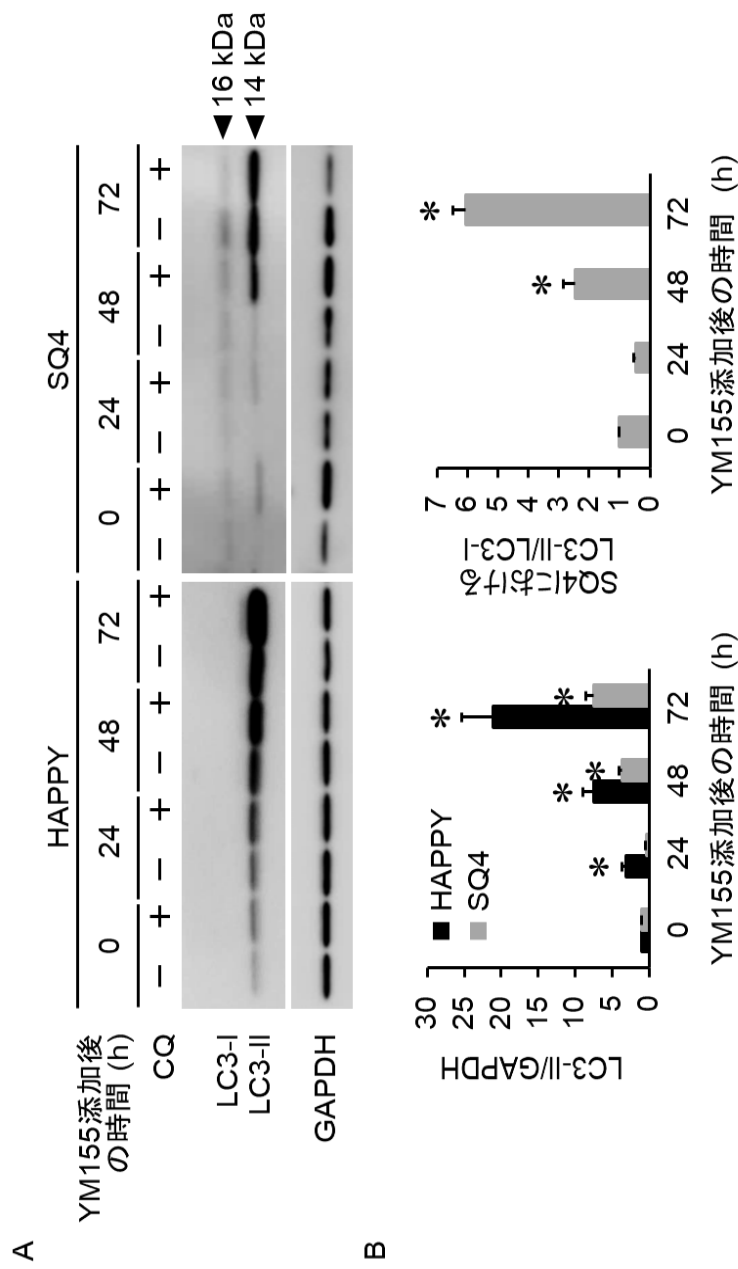


Fig. 2-7 YM155 による HAPPY および SQ4 のオートファジー誘導

(A) YM155 (2.5 nM) をリソソーム阻害剤 CQ (10  $\mu$ M) 存在下あるいは非存在下の cDMEM に添加した後、0-72 時間培養した HAPPY および SQ4 細胞の LC3-I (16 kDa) および LC3-II (14 kDa) の発現の変化をウェスタンブロッティングで解析した。写真は独立した 3 回の実験の中から代表的な結果を示した。内部標準として GAPDH を用いた。(B) CQ 存在下における HAPPY および SQ4 細胞の LC3-II のシグナル強度を半定量し、GAPDH により標準化した (mean  $\pm$  SD; n = 3)。SQ4 細胞では LC3-I に対する LC3-II の比も算出した (mean  $\pm$  SD; n = 3)。YM155 無添加 (0 時間) における LC3-II/GAPDH および LC3-II/LC3-I をそれぞれ 1.0 とし、各時間と比較した (\* $P$  < 0.05 vs. 0 h)。

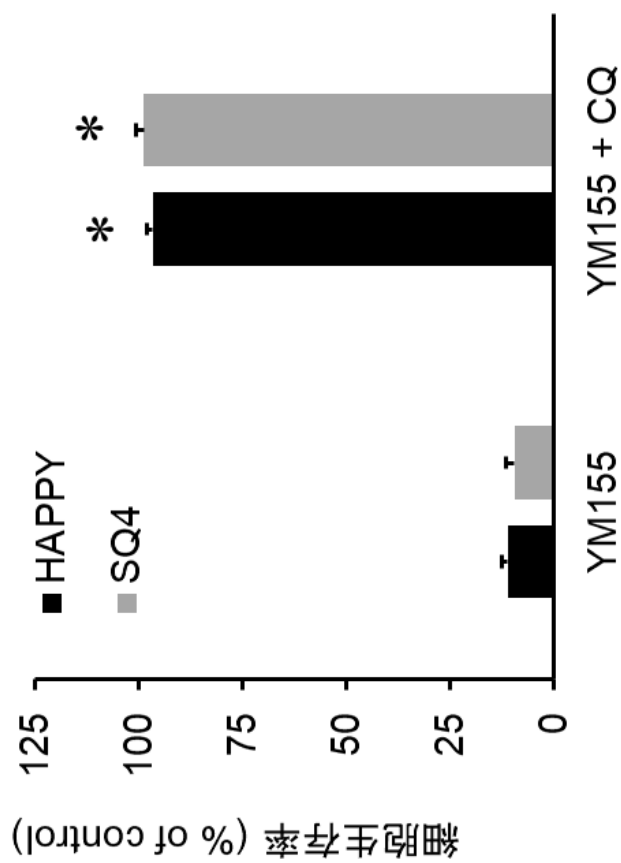


Fig. 2-8 YM155 誘導性細胞死に対するリゾソーム阻害剤の影響

リゾソーム阻害剤 CQ (10  $\mu$ M) 存在下あるいは非存在下の cDMEM に YM155 (10 nM) を添加し、48 時間培養した HAPPY および SQ4 細胞の生存率を評価した (mean  $\pm$  SD; n = 3)。YM155 による HAPPY および SQ4 の増殖抑制はいずれも、CQ により有意に抑制された (\* $P$  < 0.05 vs. YM155)。

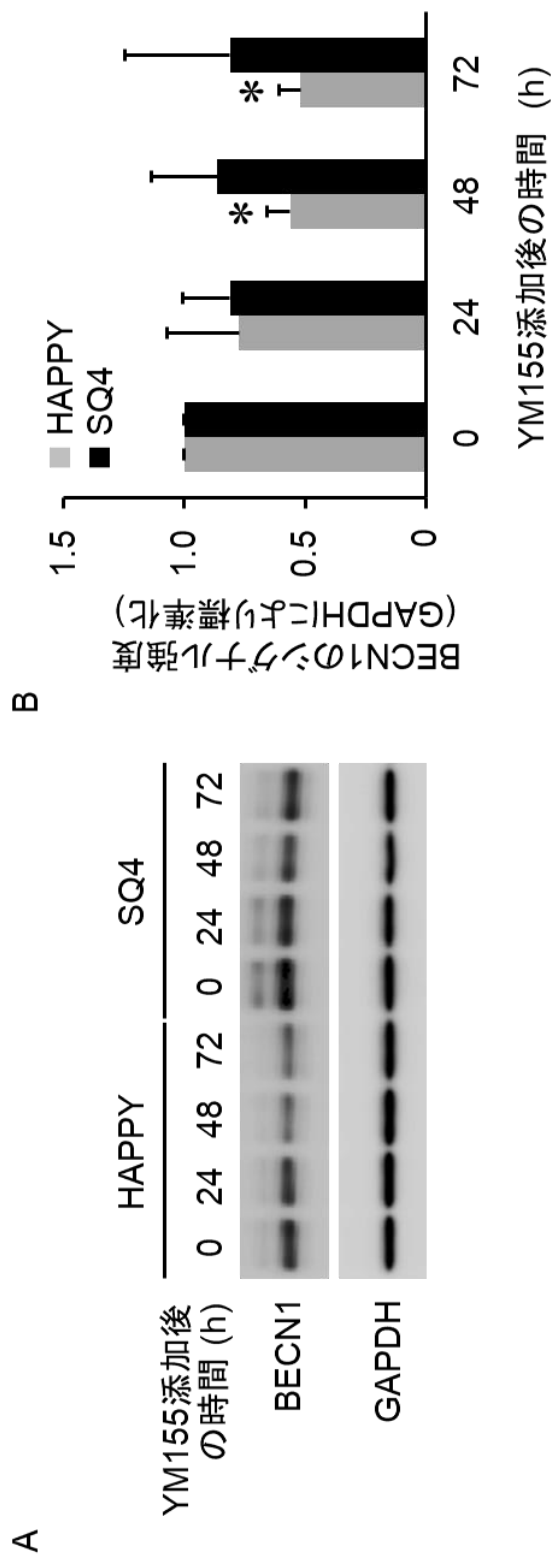


Fig. 2-9 YM155 による BECN1 の発現の変化

(A) YM155 (2.5 nM) を添加した cDMEM で 0-72 時間培養した HAPPY および SQ4 細胞における BECN1 の発現をウェスタンブロットティングで解析した。写真は独立した 3 回の実験の中から代表的な結果を示した。内部標準として GAPDH を用いた。(B) BECN1 のシグナル強度を半定量した結果を示した (mean ± SD; n = 3)。BECN1 のシグナル強度は GAPDH のシグナル強度により標準化した。YM155 無添加 (0 時間) の BECN1 のシグナル強度を 1.0 とし、各時間のシグナル強度と比較した (\* $P < 0.05$ )。

## 第 4 章

犬の SCC 株化細胞における  
afatinib の標的分子の解析

第2章の結果から、afatinibはPOCOおよびCSCC-R1細胞に選択的に強い増殖抑制効果を示すことが明らかになった。AfatinibはErbBファミリー分子のATP結合部位を不可逆的に阻害することによりこれらの分子の活性化を抑制し、その結果、細胞増殖に関わる下流シグナル伝達分子 (AKT, ERK 1/2 あるいは STAT3) の活性化を抑制することが知られている。また、afatinibはErbBファミリー分子で保存されているATP結合部位のシステイン残基 (EGFR, Cys797; HER2, Cys805; HER4, Cys803) と共有結合しATPの結合を阻害するため [30]、off-targetとして同様のシステイン残基を持ついくつかのキナーゼ (BLK, BTK, TXK) の活性も抑制することがある [31]。これらのことから、POCOおよびCSCC-R1細胞ではErbBファミリー分子あるいはafatinibのoff-targetとなる分子が増殖に決定的な役割を果たしており、その背景にはこれらの分子の活性化変異や過剰発現などの異常が存在すると考えられる。

犬のSCCに対するafatinibを用いた治療戦略を構築する上では、afatinib感受性細胞における標的分子を特定し、特定した分子の細胞増殖における役割を明らかにすることが重要である。そこで本章では、実験1として、afatinibの主な標的であるErbBファミリーの蛋白質に注目し、犬のSCC株化細胞における発現とリン酸化の状態を解析した。また、POCOおよびCSCC-R1細胞において

afatinib の既知の標的分子の塩基配列を解析した。さらに、POCO 細胞においてリン酸化シグナルが検出された分子と下流シグナル伝達分子のリン酸化について afatinib の影響を検討した。実験 2 では、ErbB ファミリー分子だけでなく、既知あるいは未知の off-target を含めて包括的に標的分子を探索するため、POCO 細胞を用いてリン酸化蛋白質の網羅的解析を行った。

## 実験 1. Afatinib の主要な標的分子の解析

### 材料と方法

#### 株化細胞

7 種類の犬 SCC 株化細胞 (POCO, CSCC-R1, KUCKY, HAPPY, SYRUP, SCC 2/88 および SQ4) および 3 種類の犬非腫瘍性上皮株化細胞 (CPEK および COPK, 扁平上皮; MDCK, 腎上皮) を用いた。これらの細胞は第 2 章と同様の条件で培養した。

#### ダイレクトシーケンス法を用いた塩基配列の解析

POCO および CSCC-R1 細胞から抽出した cDNA を用いて、*EGFR*、*HER2*、*HER3* および *BTK* の変異の有無をダイレクトシーケンス法により解析した。第 3 章と同様の手順で POCO および CSCC-R1 細胞から total RNA を抽出し、cDNA を作製した。各分子を増幅するプライマー組 (Table 4-1) は、NCBI に登録されているそれぞれの犬の塩基配列 (*EGFR*, XM\_014120756; *HER2*, NM\_001003217 および AB008451; *HER3*, XM\_538226; *BTK*, XM\_549139) を基に作製した。これらのプライマー組と Tks Gflex DNA polymerase (Takara, Tokyo, JPN) を用いて、cDNA を polymerase chain reaction (PCR) で 35 サイクル増幅した。増幅産物の精

製には QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた。PCR に用いたプライマーと PCR 産物を用いてサンガーシーケンスを行い、各分子の cDNA 塩基配列を決定した。これらの塩基配列を、NCBI の犬の各分子の塩基配列と比較することで変異の有無を評価した。

### ウェスタンブロッティング

POCO、CSCC-R1、KUCKY、HAPPY、SYRUP、SCC 2/88、SQ4、CPEK、COPK および MDCK 細胞を第 3 章と同様の手順で溶解した。また afatinib (1, 2, 4, 8, 10, 16, 20 nM, 0.1% DMSO)、osimertinib (5, 10, 20, 40 nM, 0.1% DMSO) あるいは 0.1% DMSO のみ含む cDMEM でそれぞれ 6 時間培養した POCO 細胞も同様に溶解した。細胞溶解物中の蛋白質を 8 あるいは 12% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離し、第 3 章と同様の手順でウェスタンブロッティングを行った。この解析では、一次抗体としてウサギ抗ヒト EGFR ポリクローナル抗体 (1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、マウス抗ヒト phospho-EGFR モノクローナル抗体 (Tyr1068) (1:1000, Cell Signaling Technology)、ウサギ抗ヒト phospho-EGFR (Tyr845) ポリクローナル抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology)、ウサギ抗ヒト HER2 ポリクローナル抗体 (1:500,



LifeSpan BioSciences, Seattle, WA)、ウサギ抗ヒト phospho-HER2 (Tyr1248) ポリクローナル抗体 (1:1000, LifeSpan BioSciences)、ウサギ抗ヒト phospho-HER2 (Tyr877) ポリクローナル抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology)、ヤギ抗ヒト HER3 ポリクローナル抗体 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、ウサギ抗ヒト phospho-HER3 (Tyr1222, Tyr1289) ポリクローナル抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology)、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 (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204) ポリクローナル抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology)、ウサギ抗マウス phospho-Stat3 (Tyr705) ポリクローナル抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) あるいはマウス抗ウサギ GAPDH モノクローナル抗体 (1:5000, Abcam, Cambridge, UK) を用いた。二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:10000, GE Healthcare, Buckinghamshire, England)、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (1:10000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) あるいは HRP 標識ロバ抗ヤギ IgG (1:10000, R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いた。

## 結果

### 犬の SCC 株化細胞における ErbB ファミリーの発現と EGFR、HER2 および HER3 のリン酸化

7 種類の犬の SCC 株化細胞 (POCO, CSCC-R1, KUCKY, HAPPY, SYRUP, SCC 2/88 および SQ4) および 3 種類の非腫瘍性上皮株化細胞 (CPEK, COPK および MDCK) における EGFR、HER2、HER3 および HER4 の発現と EGFR、HER2 および HER3 のリン酸化状態をウェスタンブロッティングで解析した (Fig. 3-1)。EGFR、HER2、HER3 および HER4 の発現は種々の株化細胞で認められたが、afatinib に感受性を持つ POCO および CSCC-R1 細胞で選択的に強く発現する分子は認められなかった。また、POCO および CSCC-R1 で発現が見られなかった HER4 を除き、各分子のリン酸化状態を評価したところ、POCO および CSCC-R1 細胞において選択的にリン酸化が増強している分子は認められなかった。

### POCO 細胞のリン酸化 EGFR、HER2、AKT、ERK 1/2 および STST3 におよぼす

#### EGFR 阻害剤の影響

Afatinib に対して最も高い感受性を示した POCO 細胞を用いて、EGFR、HER2

および下流シグナル伝達分子 AKT、ERK 1/2 および STAT3 のリン酸化におよぼす afatinib の影響を検討した (Fig. 3-2)。この解析では、POCO 細胞でリン酸化シグナルが他の分子に比べて強く検出されたリン酸化 EGFR (pEGFR Tyr1068) とリン酸化 HER2 (pHER2 Tyr877) (Fig. 3-1) について評価した。また比較のため、POCO 細胞において中等度の増殖抑制効果を示した osimertinib についても同様に解析した。実験で用いた afatinib および osimertinib の濃度範囲は、それぞれ EGFR のリン酸化を抑制する濃度 (afatinib, 4 nM; osimertinib, 11 nM) [32, 33] を参考に決定した。Afatinib は EGFR のリン酸化を 1-4 nM では抑制せず、8 nM から徐々にリン酸化を抑制し、20 nM で著しく抑制した。一方、afatinib は HER2 のリン酸化を抑制しなかった。下流シグナル伝達分子において afatinib は AKT のリン酸化レベルを 1 nM から抑制し、この抑制状態を 20 nM まで維持した。一方、afatinib は他の下流シグナル伝達分子である ERK 1/2 および STAT3 のリン酸化を抑制しなかった。Osimertinib は 10 nM ではいずれの分子のリン酸化も抑制せず、20 nM から HER2、AKT、ERK 1/2 のリン酸化をわずかに抑制した。

#### POCO および CSCC-R1 における afatinib 標的分子の塩基配列の解析

POCO および CSCC-R1 細胞において、afatinib の既知の標的分子である *EGFR*、

*HER2*、*HER3*、*BLK*、*BTK* および *TXK* の mRNA の発現を確認したところ、いずれの細胞においても *EGFR*、*HER2*、*HER3* および *BTK* のみが発現していたため (data not shown)、これらの分子の cDNA について塩基配列の解析を行った。この解析では各分子の CDS の 5'側および 3'側の PCR 増幅が困難であったため、*EGFR*、*HER2*、*HER3* および *BTK* について、それぞれ 5'側約 200、80、270 および 140 bp、3'側約 300、90、60 および 70 bp を除く範囲の塩基配列を解析した (それぞれ exon 2-25、exon 4-26、exon 4-26 および exon 2-17 に相当する領域)。その結果、いずれの分子の塩基配列においても変異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標的分子の探索

### 材料と方法

#### 株化細胞

犬の SCC 株化細胞である POCO を用いた。培養は第 2 章と同様の条件で行った。

#### 抗体マイクロアレイを用いた網羅的リン酸化蛋白質の検索

cDMEM で懸濁した POCO 細胞を 20 枚の 150 mm シャーレにそれぞれ  $1.0 \times 10^6$  個ずつ播種し、24 時間培養した。これらのうちシャーレ 10 枚の POCO 細胞を afatinib で処理 (2.5 nM, DMSO 最終濃度 0.1%, 12 時間) した。残りのシャーレ 10 枚の POCO 細胞を DMSO のみで処理 (DMSO 最終濃度 0.1%, 12 時間) し、control に用いた。これらの細胞をトリプシンで処理して回収した後、遠心 (1,500 rpm, 5 min) し上清を除去した。上清を除去した後のペレットを Kinexus lysis buffer (Kinexus, Bioinformatics, British Columbia, Canada) で溶解し、875 種類のリン酸化抗体および 451 種類の pan 抗体を用いたマイクロアレイ解析に供した (KAM1325, Kinexus, Bioinformatics)。各リン酸化蛋白質のシグナル強度は ImaGene 9.0 (BioDiscovery, El Segundo, CA) を用いて半定量した。Afatinib 処理に

よるシグナル強度の減少率は計算式: 減少率 (%) = (afatinib 処理後のシグナル強度/control のシグナル強度 × 100) - 100 を用いて算出した。

## 結果

### Afatinib 感受性に関連したリン酸化蛋白質およびそれらのシグナル経路

POCO 細胞において afatinib によりリン酸化が 30%以上抑制された蛋白質とその蛋白質が主に関与するシグナル経路を Table 2 に示した。この解析では POCO および CSCC-R1 細胞選択的に増殖を抑制する濃度の afatinib (5 nM) (第 2 章, Fig. 1-2) を用いた。Afatinib は DLK のリン酸化を最も強く抑制し (56%)、次いで p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$  MAPK、CLK1、SHIP1、Akt1 および Chk1 などのリン酸化を抑制した (~45%)。特に強くリン酸化が抑制された DLK とそれに次いでリン酸化が抑制された p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$  MAPK はいずれも MAPK 経路に属する分子であった。また、リン酸化が 30%以上抑制された蛋白質 13 種類の中には、SHIP1 および Akt1 といった PI3K/AKT 経路に関与する分子や CLK1、Chk1、MCM2、CDK13 および CDK10 といった CDK 経路に関与する分子も見られたが、MAPK 経路に属する分子が最も多く見られた。Afatinib の既知の標的分子 (EGFR, HER2, HER3, HER4, BLK, BTK および TXK) のリン酸化の抑制は見られなかった (data not shown)。

## 考察

ErbB ファミリー分子の発現とリン酸化および塩基配列の解析から、これらの分子が POCO あるいは CSCC-R1 細胞において afatinib の標的である可能性は低いと考えられた。また、網羅的リン酸化蛋白質の解析では、ErbB ファミリー分子ばかりでなく、BLK、BTK および TXK についても標的としての可能性は低いと考えられた。一方で、afatinib は POCO 細胞において主に MAPK 経路の活性化に関連する分子群のリン酸化を強く抑制することが示された。今回、この抑制の起点となる afatinib の直接の標的分子 (分子群) を同定することはできなかったが、MAPK 経路の活性化が POCO 細胞の増殖に決定的な役割を果たしており、afatinib によるその抑制が POCO 細胞の細胞死を誘導したと考えられた。

MAPK 経路は MAPKKK、MAPKK、MAPK の順に次々とリン酸化するカスケード経路であるが、afatinib がリン酸化を強く抑制した DLK は MAPKKK に属し、MAPK 経路の最上流に位置する分子である。DLK は癌性ストレスや炎症性サイトカインなどの非キナーゼによりリン酸化する分子であり、DLK を制御する上流のキナーゼは報告されていない。また、ErbB ファミリー分子同様に ATP 結合部位にシステイン残基を有することが示されている [34]。このことから、afatinib



は DLK を標的として作用し、その結果、下流に存在する p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$  MAPK のリン酸化を抑制した可能性が考えられた。Afatinib は POCO 細胞に対して強力な細胞死を誘導するが、p38 MAPK は細胞の増殖およびアポトーシス抑制に作用することが知られている [35]。今後、詳細なメカニズムについて検討する必要があるが、afatinib は DLK の抑制を介して p38 MAPK を抑制し、その結果として細胞増殖の抑制あるいは細胞死が誘導されたのかもしれない。

POCO 細胞において afatinib は MAPK 経路の他にも、PI3K/AKT 経路を抑制したが、一般的にこの経路は受容体により直接的あるいは他の経路により間接的に活性化することが知られている。今回の解析では受容体のリン酸化の抑制は見られず、また MAPK 経路は PI3K/AKT の経路も活性化する [35] ことを考えると、PI3K/AKT 経路の抑制は MAPK 経路の抑制に伴う二次的な影響である可能性が高い。また afatinib は CDK 経路におけるいくつかの分子のリン酸化も抑制した。CDK 経路は MAPK 経路や PI3K/AKT 経路を含む他の経路により間接的に活性化されることが知られており、特定の受容体型キナーゼによる直接的活性化についての報告はない。これらのことから、CDK 経路の活性化の抑制は MAPK 経路あるいは PI3K/AKT 経路の活性化が抑制された影響を受けている可能性が考えられた。

以上から、特定の犬の SCC では細胞増殖に MAPK 経路が重要な役割を果たしており、そのような SCC では afatinib を用いた MAPK 経路の抑制が新たな治療アプローチとなる可能性が考えられた。

## 小括

Afatinib 感受性細胞における標的分子を明らかにするため、犬の SCC 株化細胞を用いて ErbB ファミリー蛋白の発現とリン酸化の状態、既知の afatinib 標的分子の塩基配列、細胞内シグナル伝達分子のリン酸化について解析した。また、POCO 細胞を用いたリン酸化蛋白質の網羅的解析も行った。既知の afatinib 標的分子の蛋白および遺伝子解析からは afatinib 感受性細胞における標的分子を特定することができなかった。一方、POCO 細胞を用いたリン酸化蛋白質の網羅的解析から、afatinib は主に MAPK 経路の活性化を抑制することが示された。以上から、特定の犬の SCC では細胞増殖に MAPK 経路が重要な役割を果たしており、そのような SCC では afatinib を用いた MAPK 経路の抑制が新たな治療アプローチとなる可能性が考えられた。

## 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およびPCR条件

プライマー名	上流プライマー (5'-3')	下流プライマー (5'-3')	アニーリング	
			温度 (°C)	サイズ (bp)
EGFR #1	AGTAAACCGGCTCACCCAGTT	AGTGGCACCAAAAGCTGTATT	55	769
EGFR #2	AATCATCTGTGCCAGCAGTG	ATCTAGAGGTAGGGTATGCGT	53	529
EGFR #4	ACCACCTACCAAAATGGACGT	AGCAATGGATGGGATCTTGGG	55	1125
EGFR #5	ATTGTGCTCCTCAGAAGGCTG	ATAGTCCAGGAGGCCAAGAAA	65	880
EGFR #6	AAAGATCAAAGGTGCTGGGC	TGGCAAATGCATCCTCTCATC	65	832
EGFR #7	GGCAAAGTGCCTATCAAAGTGG	CTACCCTCAGGTAGTCTGCAT	65	973
HER2 #1	GCTCCTTCTCGCCCTCCTG	GAGGGCCAGCTGGTTGTTCTTATG	55	514
HER2 #2	CTGGCCGTGCTGGACAAATGGA	TCAAACACTCTGAGCTGCTCA	55	863
HER2 #3	CTGCCCTGGCCCTGCCTTCACTTCAA	GTTGGCTTTGGGAGATGTGTTTTTC	57	1538
HER2 #4	AGTGCGAAACATCCAGGAGTTT	TCCTCAGCTCTGTCTCTTTCA	65	1090
HER2 #5	AGTCTACAAGGGCATCTGGAT	ATAGCTCCACACATCACTCTG	60	526
HER2 #6	TTAGACCATGTCCGAGAACAC	TAGTGAACGGTAGAAGGTGCT	65	606
HER2 #7	CCAGCGCTTTGTGGTCATTCA	GTAGGGGTCCCTTCAAAGGTG	65	792
HER3 #1	CTGAGCGTGACCGGCGA	CCTCACGATGTCCCTCCAGT	57	399
HER3 #2	ACTATAACACCAAATCCAGCC	AGGTTGCCCAGGATCTTGGT	65	718
HER3 #3	CTTTCCAGCTGGAACCCAAT	TCCTCGATGACTTTAATGCAG	65	1432
HER3 #4	CACTGATCAGCAAACCCCATC	ACTCCATAACTCCAGACGTC	65	793
HER3 #5	CTGCATTAAGTCATCGAGGA	CCCACATCCATGTACTCATA	65	1458
HER3 #6	TATGAGTACATGGATGTGGG	AGCCTGCTATGCCAGTAATC	60	335
BTK #1	AGTGATACTGGAGAGCATCT	TTAATGAGCTCAGGAATGGT	62	1071
BTK #2	TGATACGCCATTATGTTGTG	GGATGTTGCTCAGAAAGAAAT	62	966

Table 3-2 Afatinib感受性に関連したリン酸化蛋白質およびそれらのシグナル経路

蛋白質	リン酸化部位	Controlのシグナル強度	Afatinib添加後のシグナル強度	減少率 (%)	シグナル経路
DLK	S269	7815	3404	-56	MAPK
P38β MAPK	Pan-specific	2507	1337	-46	MAPK
CLK1	S337	4421	2383	-46	CDK
SHIP1	Pan-specific	3927	2142	-45	PI3K/AKT
Akt1	Y326	2151	1198	-44	PI3K/AKT
Chk1	S317	15176	8767	-42	CDK
P38α MAPK	Pan-specific	1511	896	-40	MAPK
P38β MAPK	Pan-specific	5374	3334	-37	MAPK
P38δ MAPK	Pan-specific	3830	2412	-37	MAPK
MCM2	S40+S41	2488	1593	-35	CDK
CDK13	Pan-specific	1933	1268	-34	CDK
P38β MAPK	T180+Y182	11410	7528	-34	MAPK
SHIP1	Y187	6794	4490	-33	PI3K/AKT
CDK10	Pan-specific	28224	19080	-32	CDK

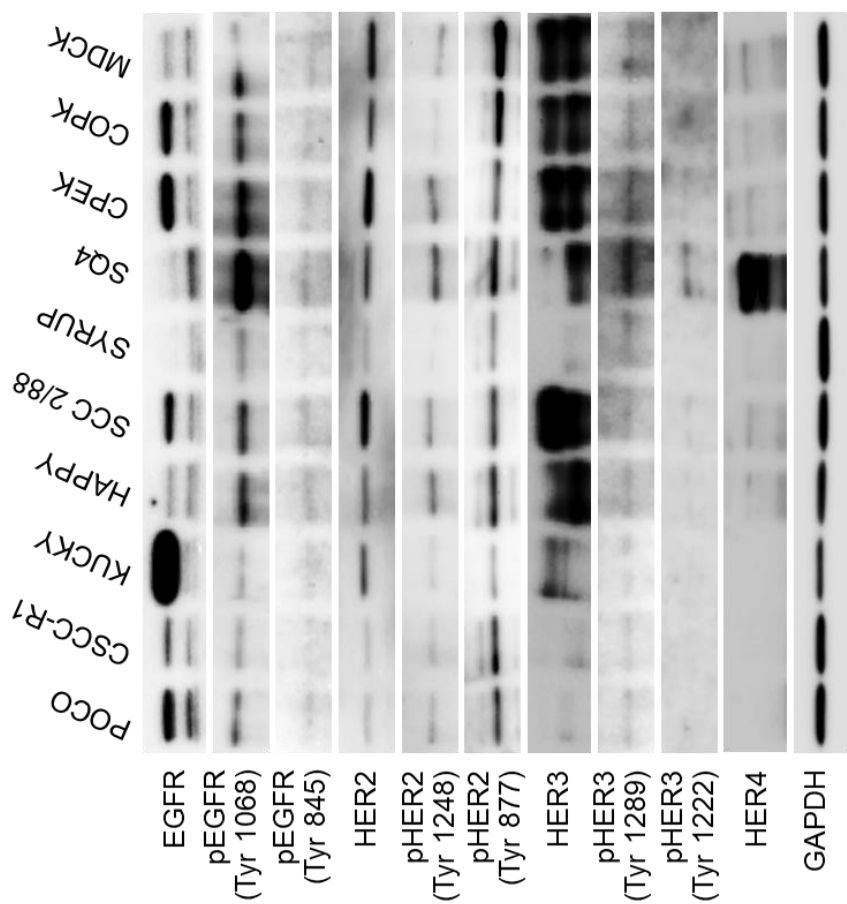


Fig. 3-1 犬の SCC 株化細胞における ErbB ファミリー の発現と EGFR、HER2 および HER3 のリン酸化

7 種類の SCC 株化細胞 (POCO, CSCC-R1, KUCKY, HAPPY, SCC 2/88, SYRUP および SQ4) および 3 種類の非腫瘍性上皮株化細胞 (CPEK, COPK および MDCK) における ErbB ファミリー の発現およびリン酸化 EGFR、HER2 および HER3 をウェスタンブロットティングで解析した。独立した 3 回の実験の中から代表的な結果を示した。内部標準として GAPDH を用いた。

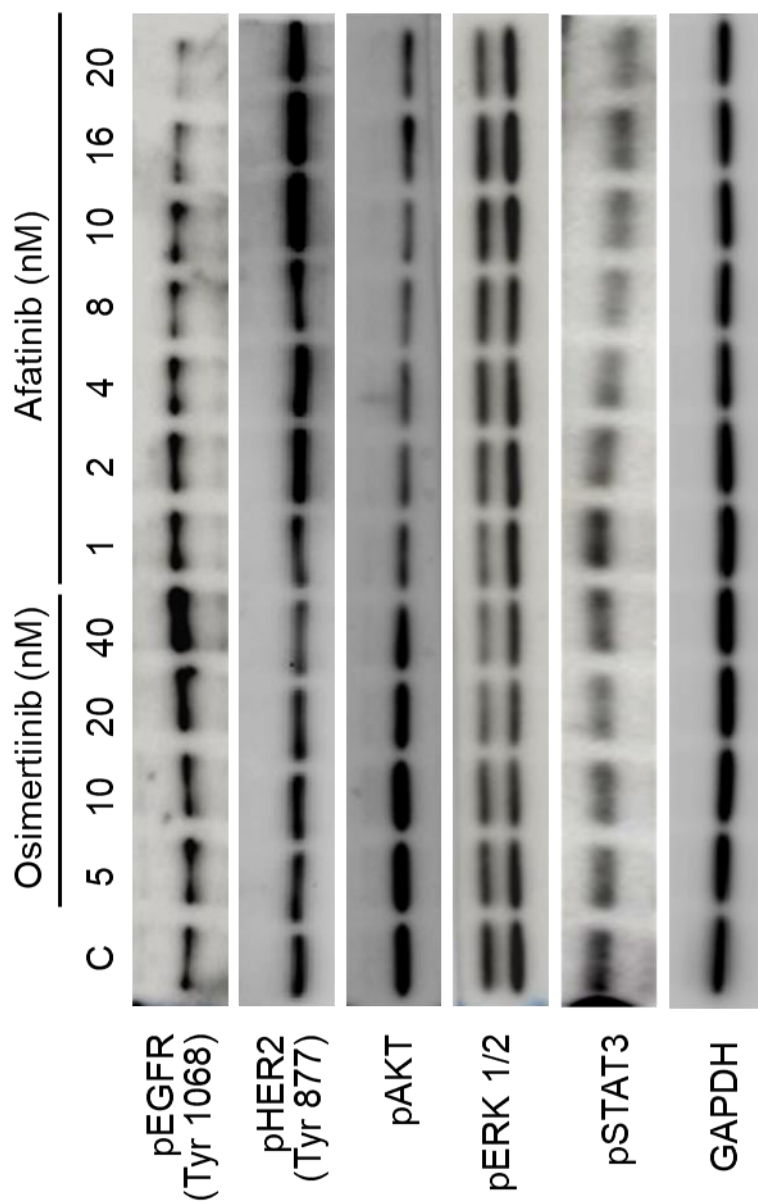


Fig. 3-2 POCO 細胞の EGFR、HER2、AKT、ERK1/2 および STAT3 のリン酸化に EGFR 阻害剤がおよぼす影響

Afatinib に対して最も高い感受性を持つ POCO 細胞を afatinib (1-20 nM, DMSO 最終濃度 0.1%) あるいは osimertinib (5-40 nM, DMSO 最終濃度 0.1%) を含む cDMEM でそれぞれ 6 時間培養した後、Fig. 3-1 で最も強くリン酸化が検出された EGFR (Tyr1068) および HER2 (Tyr877) と下流シグナル分子 AKT、ERK 1/2 および STAT3 のリン酸化をウェスタブロットで評価した。独立した 3 回の実験の中から代表的な結果を示した。0.1% DMSO のみ含む cDMEM で 6 時間培養した POCO 細胞を vehicle (control, C) として用いた。内部標準として GAPDH を用いた。



## 第 5 章

### 犬 SCC 株化細胞移植マウスモデルにおける afatinib の効果

第2章の結果から、YM155はHAPPYおよびSQ4細胞に対して、afatinibはPOCOおよびCSCC-R1細胞に対して *in vitro* で強い増殖抑制効果を有することが示された。しかし、生体内の腫瘍組織では、微少環境が腫瘍の薬剤感受性に大きく影響している為、*in vitro* における阻害剤の増殖抑制効果と臨床における抗腫瘍効果が必ずしも一致するわけではない。したがって、犬のSCCに対する新たな治療薬としてこれらの阻害剤の可能性を考える上では、*in vivo* での増殖抑制効果を評価する必要がある。

一方、YM155およびafatinibの効果を全て *in vivo* で解析するためには、多数のマウスを用いなければならず、また多大な時間も必要となる。このため、本章ではこれらの阻害剤の中でより抗腫瘍効果が期待できる阻害剤に注目して *in vivo* で解析することとした。そこでこの解析では、各阻害剤のSCC細胞に対するIC50をそれぞれの人のCmaxと比較し、Cmaxに対してより低いIC50を示すafatinibを用いた。

そこで本章では、POCO細胞を用いて犬SCC移植マウスモデルを作製し、afatinibの効果を解析した。この解析では、POCO細胞に対してafatinibに次いで増殖抑制効果を示したEGFR阻害剤であるosimertinibを比較に用いた。

## 材料と方法

### 供試動物

ヌードマウス (BALB/c nu/nu, CLEA Japan, Tokyo, JPN) (4 週齢, 雌)、16 匹を供試した。

### 株化細胞

犬の SCC 株化細胞である POCO を用いた。培養は第 2 章と同様の条件で行った。

### 犬 SCC マウスモデルの作製と EGFR 阻害剤の腫瘍増殖抑制効果の評価

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承認 (承認番号 2019K-59) を得て行った。POCO 細胞を phosphate buffered salts solution で  $2.5 \times 10^7$  個/mL になるように懸濁し、この懸濁液 100  $\mu$ L ( $2.5 \times 10^6$  個) をヌードマウスの側腹部皮下に移植した ( $n = 16$ )。移植した細胞の腫瘍容積が 100 mm<sup>3</sup> に達したところで、マウスを無作為に control 群 ( $n = 5$ )、afatinib 投与群 ( $n = 6$ ) および osimertinib 投与群 ( $n = 5$ ) に分けた。Afatinib 投与群に対し

では、afatinib (20 mg, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, DE) を蒸留水で 5.0 mg/mL となるように溶解し、1日1回、0.5 mg/mouse (約 20 mg/kg) で連日経口投与した。

Osimertinib 投与群に対しては、osimertinib (Selleck Chemicals, Houston, TX) を DMSO、ポリエチレングリコール (PEG) および蒸留水を用いて 2.5 mg/mL となるように osimertinib 溶液 (1% DMSO, 30% PEG) を調整し、1日1回、0.25 mg/mouse (10 mg/kg) で連日経口投与した。control 群に対しては、蒸留水を 100  $\mu$ L/mouse で連日経口投与した。投与開始日を 0 日として、20 日間 afatinib、osimertinib あるいは蒸留水をマウスに投与した。移植 SCC 細胞に対する afatinib および osimertinib 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連日計測した。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 20 日目に安楽殺し、腫瘍を摘出した。

### 毒性の評価

EGFR 阻害剤の毒性はマウスの体重の変化により評価した。蒸留水、afatinib あるいは osimertinib 投与 0、5、10、15 および 20 日目に各マウスの体重を測定した。マウスの体重の変化は、それぞれの投与群における 0 日目からの体重の

変動率を評価した。

### 腫瘍の有糸分裂指数および Ki-67 指数の評価

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  $\mu\text{m}$  厚の切片を作製した。切片を用いてヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を行い、この標本を用いて有糸分裂指数を評価した。またマウス抗ヒト Ki-67 モノクローナル抗体 (1:100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) および ENVISION/HRP (DAB) kit (Agilent Technologies) を用いた免疫組織化学染色も行い、この標本を用いて Ki-67 指数を評価した。有糸分裂指数および Ki-67 指数は、それぞれ 1 つの標本上の独立した 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および Ki-67 陽性細胞数を数え、同一視野中の全ての腫瘍細胞数に占める割合 (%) で表した。

### 統計解析

統計解析は、Excel (Microsoft) において unpaired two-tailed Student's  $t$  検定を用いて行い、 $P < 0.05$  を有意な差とした。

## 結果

### POCO 細胞移植マウスにおける afatinib および osimertinib の腫瘍増殖抑制効果

Fig. 4-1 に afatinib 投与群、osimertinib 投与群および control 群における腫瘍容積の変化を示した。Afatinib 投与群の腫瘍容積は 0 日目に比べて 6 日目以降に有意 ( $P < 0.05$ ) に減少し、7 日目以降に control 群および osimertinib 投与群と比べて有意 ( $P < 0.01$ ) に減少した。Osimertinib 投与群では control 群と比較して腫瘍容積の有意な減少が認められなかった。実験期間中に腫瘍の過度な増大が見られた control 群のマウス 1 匹は安楽殺した (投与開始 18 日目)。Fig. 4-2 に、各投与群のマウスに形成された腫瘍の 0 日目、10 日目および 20 日目における外観を示した。各投与群のマウスにおける体重については、投与期間中の明らかな減少は認められなかった。

### Afatinib による移植 POCO 細胞の減少および有糸分裂の抑制

Control 群、afatinib 投与群および osimertinib 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の結果を Fig. 4-3 に示した。Control 群および osimertinib 投与群では様々な分化段階の腫瘍細胞が混在して見られ、これらが腫瘍組織の大部分を占めていた。また、腫瘍組織には線維芽細胞や炎

症細胞など他の細胞はほとんど見られなかった。一方、afatinib 投与群では線維芽細胞に置換された領域が腫瘍組織の大部分を占めており、腫瘍細胞が占める領域はわずかであった。Afatinib 投与群では有糸分裂像および Ki-67 陽性細胞が control 群および osimertinib 投与群に比べてわずかであった。一方、osimertinib 投与群ではこれらは control 群と同程度に見られた。Fig. 4-4 に control 群、afatinib 投与群および osimertinib 投与群における有糸分裂指数および Ki-67 指数を示した。Afatinib 投与群における有糸分裂指数および Ki-67 指数はいずれも、control 群および osimertinib 投与群に比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に低かった。一方 osimertinib 投与群では、これらの指数の明らかな低下が認められなかった。

## 考察

Afatinibは*in vitro*だけでなく*in vivo*においてPOCO細胞に対して著しい抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。一方、osimertinibは*in vivo*での抗腫瘍効果はほとんど見られなかった。Osimertinibは*in vitro*でafatinibに次いでPOCO細胞に増殖抑制効果を示していたが、その効果は突出しているわけではなく、osimertinib感受性の肺癌細胞と比べるとPOCO細胞のosimertinib感受性は低い。したがって、第2章で考察したようにPOCO細胞の増殖にosimertinibの標的分子が関与している可能性は低く、その結果*in vivo*で効果がみられなかったと考えられた。

マウスの摘出組織を用いた有糸分裂指数とKi-67指数の解析から、afatinibはPOCO細胞に対して分裂を抑制する作用があることが示唆された。第4章の結果から、afatinibは主にMAPK経路を抑制し、二次的にPI3K/AKT経路およびCDK経路を抑制することが示唆されているが、CDK経路は細胞周期を促進する上で重要な経路である。また、人のSCC細胞ではafatinibはMAPK経路およびAKT/mTOR経路の抑制を介して、腫瘍細胞をG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期に停止させる [36] ことが知られている。これらのことから、POCO細胞ではafatinibは細胞周期に作用し細胞分裂が減少したのかもしれない。



以上のことから、afatinibは特定のSCC細胞に対して*in vivo*で効果を現すことが明らかとなった。第4章でafatinibがSCC細胞のMAPK経路を抑制したことを考慮すると、腫瘍細胞においてMAPK経路が活性化しているSCC症例ではafatinibの臨床試験に進む価値があると考えられた。

## 小括

犬の SCC に対する afatinib の *in vivo* における効果を解析するため、POCO 細胞移植マウスを用いて afatinib の効果を解析した。また、本解析では EGFR 阻害剤である osimertinib を比較に用いた。Afatinib は *in vivo* において POCO 細胞に対して著しい抗腫瘍効果を示し、osimertinib では抗腫瘍効果がほとんど見られなかった。これらのことから、afatinib は特定の SCC 細胞に対して *in vivo* で効果を現すことが示唆された。第 4 章で afatinib が SCC 細胞の MAPK 経路を抑制したことを考慮すると、腫瘍細胞において MAPK 経路が活性化している SCC 症例では afatinib の臨床試験に進む価値があると考えられた。

## 表および図

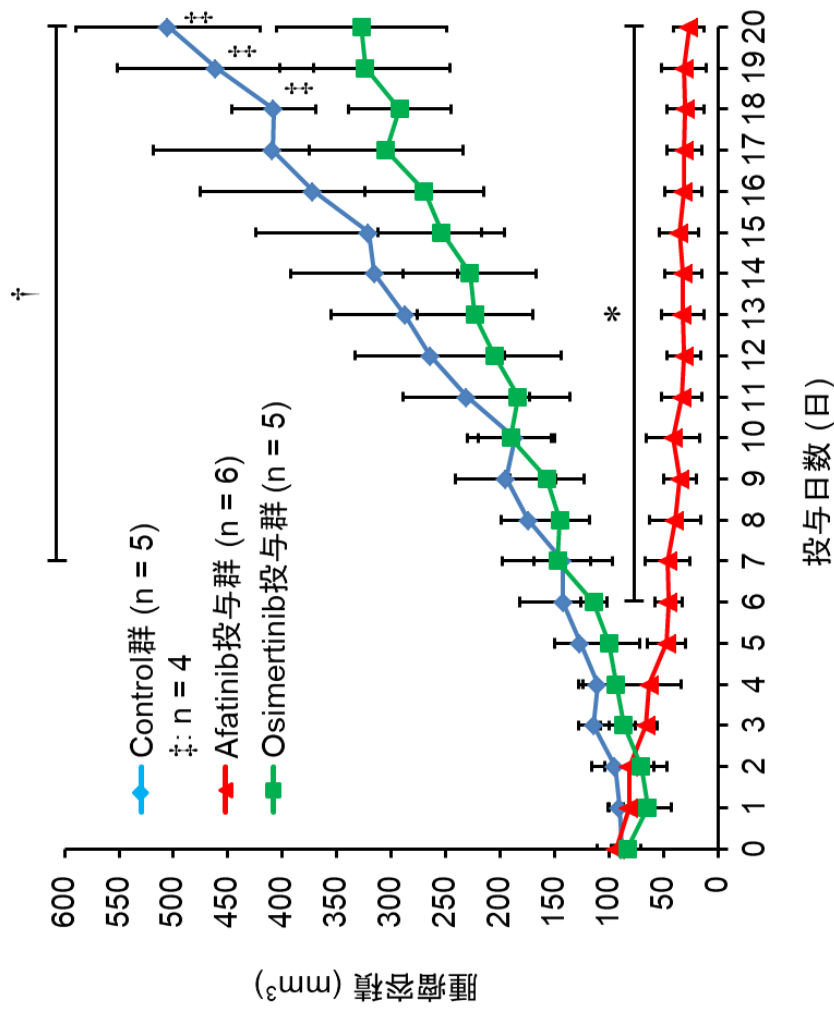


Fig. 4-1 Control 群、afatinib 投与群および osimertinib 投与群における腫瘍容積の変化  
 各阻害剤あるいは蒸留水の投与期間中の腫瘍容積の変化を示した。移植 POCO 細胞の腫瘍容積が 100 mm<sup>3</sup> に達した後、蒸留水、afatinib あるいは osimertinib を 20 日間、1 日 1 回連日経口投与した (afatinib 投与群, n = 6, osimertinib 投与群, n = 5, control 群, n = 5)。腫瘍容積は  $V = (L \times W^2)/2$  (V, 腫瘍容積; L, 長径; W, 短径) により算出した (mean  $\pm$  SD)。Afatinib 投与群では、投与 6 日から腫瘍容積の有意な縮小 (\* $P < 0.05$  vs. afatinib 投与 0 日目) が認められ、7 日目から control 群および osimertinib 投与群と比べて腫瘍容積の有意 ( $P < 0.01$ ) な縮小が認められた。18 日目に、control 群のマウス 1 匹で腫瘍容積の過度な増大が見られた為、安楽殺した。

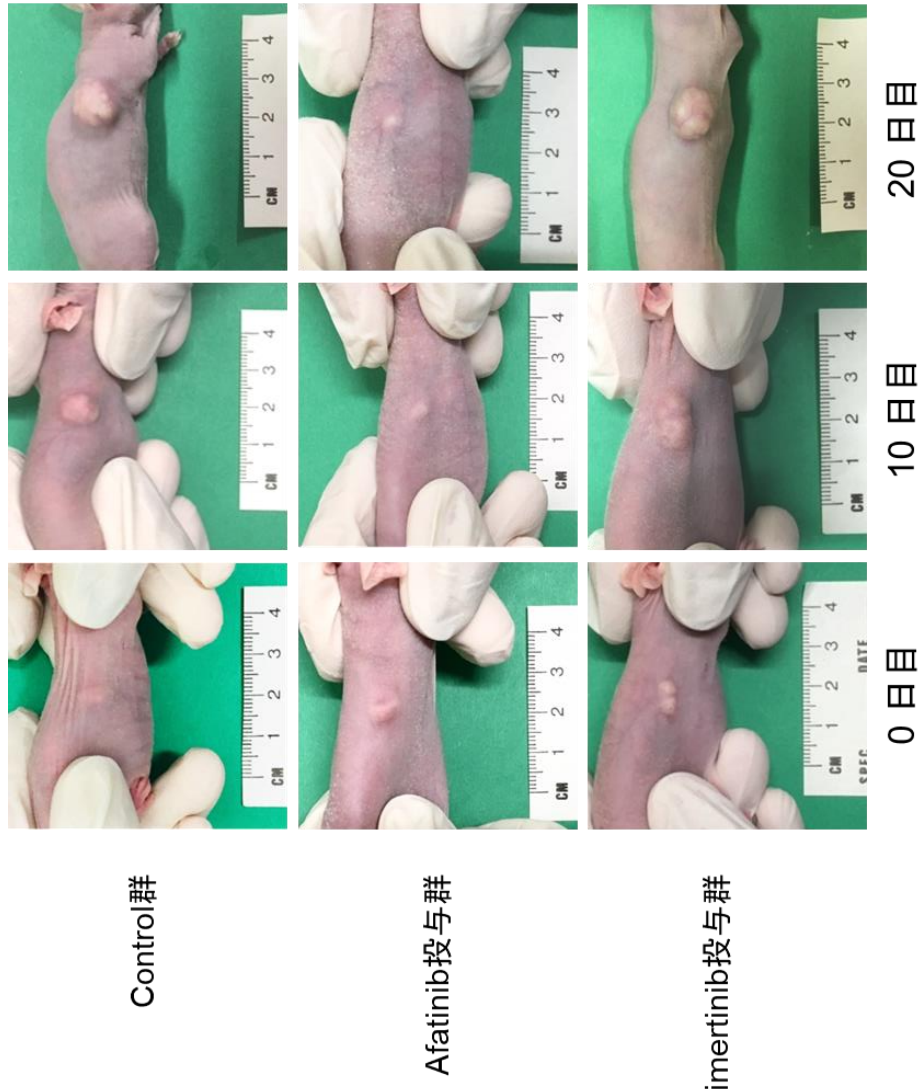


Fig. 4-2 Control 群、afatinib 投与群および osimertinib 投与群における腫瘍の外観の変化

POCO 細胞移植マウス (control 群, n = 5; afatinib 投与群, n = 6; osimertinib 投与群, n = 5) における腫瘍の外観の変化を示した。蒸留水を投与したマウスを control 群とした。各阻害剤あるいは蒸留水の投与開始日を 0 日目とし 20 日間投与した。0、10 および 20 日目に各腫瘍の外観を撮影した。

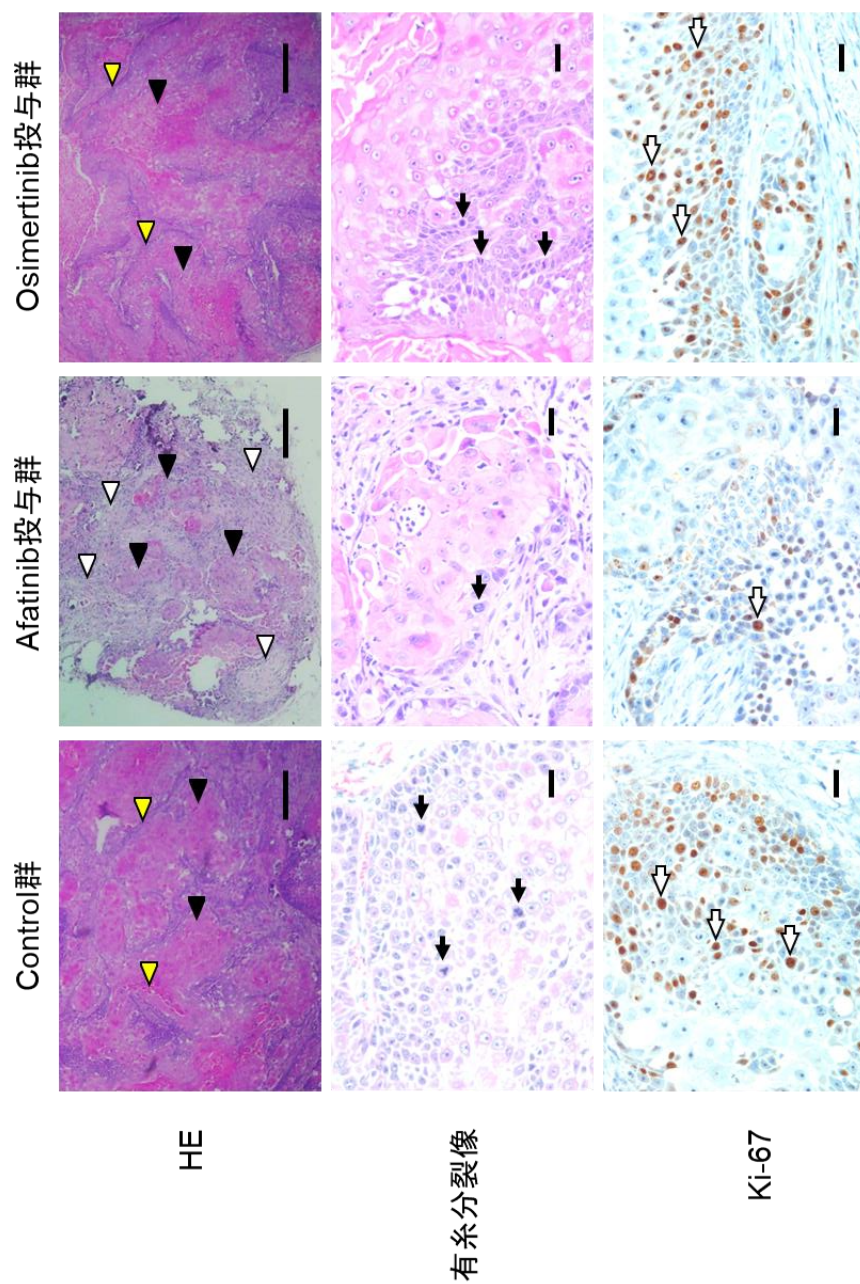


Fig. 4-3 摘出腫瘍組織における HE 染色および Ki-67 の免疫組織化学染色

Control 群、afatinib 投与群および osimertinib 投与群のマウスから摘出した腫瘍組織の切片を作製し、HE 染色標本にて腫瘍細胞の割合を評価した（黒矢頭は高分化な腫瘍細胞、黄色矢頭は低分化な腫瘍細胞、白矢頭は線維芽細胞を示す）。また HE 染色標本では有糸分裂像の割合も評価した（黒矢印は有糸分裂像を示す）。さらに抗 Ki-67 抗体を用いた免疫組織化学染色標本にて Ki-67 陽性細胞の割合を評価した（白矢印は Ki-67 陽性細胞を示す）。各写真は評価に用いた代表的な視野を示した。Bar = 50  $\mu$ m。

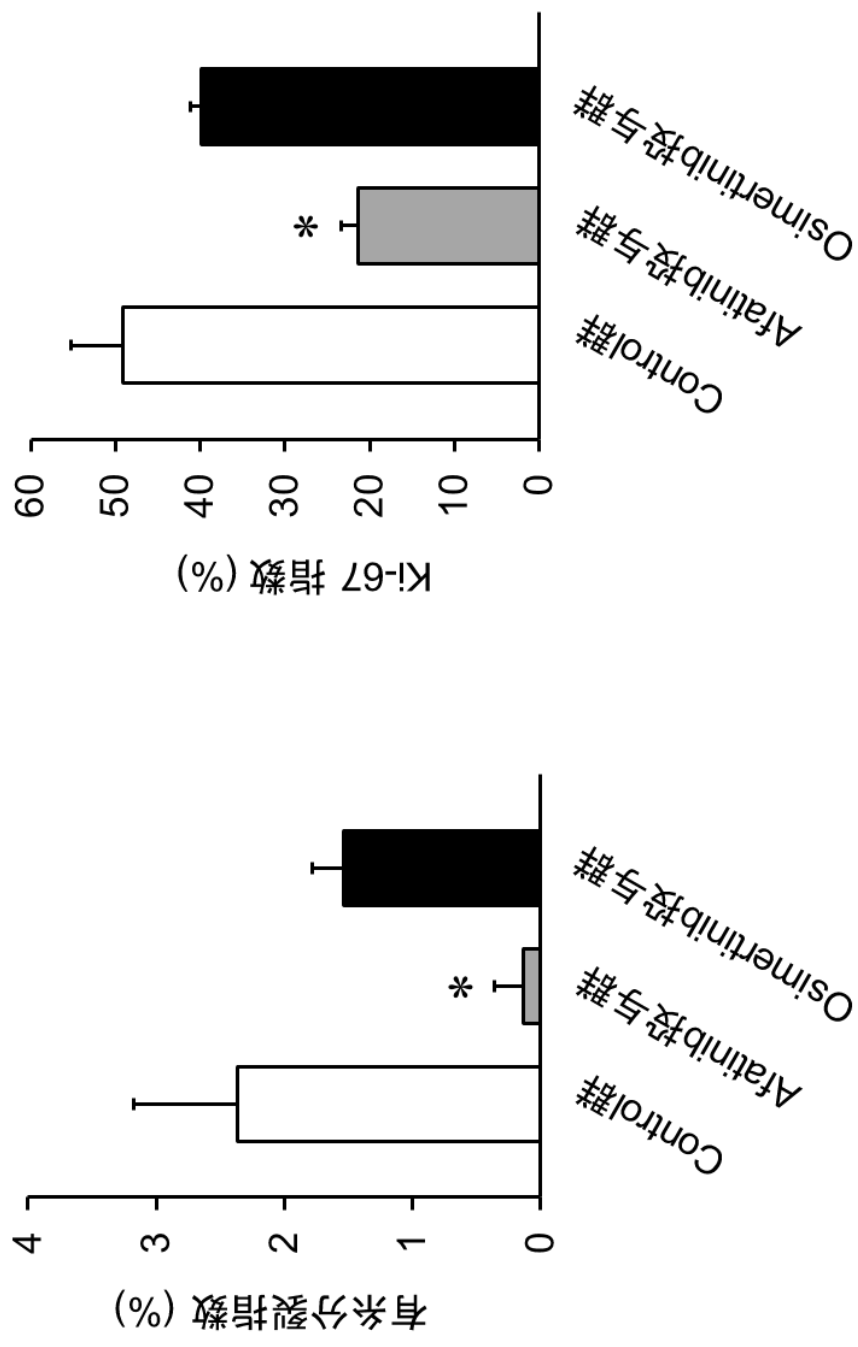


Fig. 4-4 摘出腫瘍組織における有糸分裂指数および Ki-67 指数の比較

Control 群、afatinib 投与群および osimertinib 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および Ki-67 指数を比較した。これらの指数は、HE 染色および Ki-67 の免疫組織化学染色の切片上で、それぞれ有糸分裂像および Ki-67 陽性細胞を数え、同一視野中の全ての腫瘍細胞数に占める割合 (%) で示した (mean ± SD; n = 3)。Afatinib 投与群の有糸分裂指数および Ki-67 指数は、control 群と比べて有意に低かった (\* $P < 0.05$ )。

## 第 6 章

### 総括



犬の SCC は全身のあらゆる上皮から発生し、強い局所浸潤性を特徴とする悪性腫瘍である。犬の SCC の治療は外科的切除と放射線治療を組み合わせた局所療法が主軸である。一方、局所療法により制御が困難な場合は化学療法が治療の選択肢となる。しかしながら、犬の SCC は化学療法に抵抗性でありほとんどの場合効果が得られない。このため、犬の SCC の新たな内科的治療戦略の開発が必要である。そのためには SCC の増殖に必要な分子機構を明らかにし、それを標的とした新たな治療戦略の確立が重要である。これまでの研究から、犬の SCC では survivin や EGFR の過剰発現が報告されており、これらは SCC の増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。このため、これらの分子機構は犬の SCC の新たな治療戦略として有望と考えられる。

Survivin は IAP ファミリーに属する分子であり、主に細胞分裂の促進およびアポトーシスの阻害の 2 つの機能を有している。また、survivin は骨髄と生殖器を除き正常組織ではほとんど発現しておらず、多くの癌細胞で高い発現がみられる。近年、survivin 阻害剤である YM155 を用いた人の癌患者の第 I 相および第 II 相試験において、survivin を高発現している様々な悪性腫瘍に対する有効性が示されている。このことから、YM155 を用いた survivin の阻害は犬の SCC にお

いて新たな治療戦略となる可能性が考えられる。

一方、EGFR は主に上皮細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼであり、上皮細胞の増殖および分化を促進する。EGFR は多くの人の SCC において過剰発現が認められており、このような SCC では増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また、まれではあるが EGFR の機能獲得性変異が人の SCC 患者で認められることがある。このような SCC 患者では、EGFR の恒常的なリン酸化により、腫瘍が無秩序に増殖する。現在、人の SCC における EGFR を標的とした治療法は確立していないが、人の肺腺癌では同様の変異が多くの症例で認められており、このような患者に対しては EGFR 阻害剤である afatinib および osimertinib が著しい抗腫瘍効果を示す。これらのことから、YM155 を用いた survivin の阻害と同様に afatinib および osimertinib による EGFR の阻害も犬の SCC において新たな治療戦略となる可能性がある。

YM155 や EGFR 阻害剤などの分子標的薬はほとんどが人用の癌治療薬であり、動物の腫瘍に対する分子標的薬はきわめて少ない。現在、利用が可能な動物の腫瘍に対する分子標的薬は masitinib と toceranib のみである。これらの中でマル

チキナーゼ阻害剤である toceranib は、いくつかの犬の腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。これらのことを考慮すると、犬の SCC 細胞に対して toceranib が増殖抑制効果を有するか否か、また有するならばその標的分子を明らかにすることは重要である。

そこで本研究では、犬の SCC に対する分子標的薬を用いた新たな治療戦略を確立するため、第 2 章で、YM155、afatinib、osimertinib および toceranib に対する犬の SCC 株化細胞の感受性を評価した。次いで第 3 章および第 4 章では、それぞれ YM155 と afatinib に注目して作用機序を解析した。さらに第 5 章では afatinib の効果を *in vivo* で評価した。

## 1. 犬の SCC 株化細胞における survivin 阻害剤、EGFR 阻害剤およびマルチキナーゼ阻害剤感受性の解析

犬の SCC 細胞において survivin および EGFR が治療標的となるかを検討するため、YM155、afatinib および osimertinib に対する 7 種類の犬の SCC 株化細胞の感受性を評価した。さらに toceranib に対する犬 SCC 株化細胞の感受性についても検討した。YM155 は HAPPY および SQ4 細胞に対して、afatinib は POCO およ

び CSCC-R1 細胞に対して著しい増殖抑制効果を示した。一方、osimertinib および toceranib ではこのような増殖抑制効果はみられなかった。このことから、犬の SCC の増殖機構には survivin あるいは afatinib の標的分子が重要な役割を果たしており、これらは犬 SCC の有望な治療標的となる可能性が考えられた。

## 2. 犬の SCC 株化細胞における survivin 阻害剤の作用機序の解析

犬の SCC 株化細胞における YM155 の作用機構を明らかにするため、7 種類の犬 SCC 株化細胞における survivin の発現レベルを検討した。次いで、YM155 による HAPPY および SQ4 細胞での survivin 発現レベルの変化と細胞死誘導経路について検討した。Survivin は YM155 感受性の HAPPY および SQ4 細胞において発現レベルが高く、YM155 はこれらの survivin の発現を抑制した。HAPPY および SQ4 細胞では survivin の抑制機構が異なり、YM155 は HAPPY 細胞では survivin の転写抑制により、SQ4 細胞では転写後の過程を抑制することにより抑制した。さらに、これらの細胞では誘導される細胞死の経路にも相違が見られた。いずれの細胞においてもオートファジーとそれに続き PARP 依存性アポトーシスが生じるが、HAPPY 細胞では PARP 依存性アポトーシスが細胞死の主な経路であるのに対して SQ4 細胞ではこれに加えてオートファジー細胞死も誘導

されることが示唆された。これらのことから、YM155 は survivin の発現レベルが高い犬の SCC において新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

### 3. 犬の SCC 株化細胞における afatinib の標的分子の解析

Afatinib 感受性細胞における標的分子を明らかにするため、犬の SCC 株化細胞を用いて ErbB ファミリー蛋白の発現とリン酸化の状態、既知の afatinib 標的分子の塩基配列、細胞内シグナル伝達分子のリン酸化について解析した。また、POCO 細胞を用いたリン酸化蛋白質の網羅的解析も行った。既知の afatinib 標的分子の蛋白および遺伝子解析からは afatinib 感受性細胞における標的分子を特定することができなかった。一方、POCO 細胞を用いたリン酸化蛋白質の網羅的解析から、afatinib は主に MAPK 経路の活性化を抑制することが示された。以上から、特定の犬の SCC では細胞増殖に MAPK 経路が重要な役割を果たしており、そのような SCC では afatinib を用いた MAPK 経路の抑制が新たな治療アプローチとなる可能性が考えられた。

### 4. 犬 SCC 株化細胞移植マウスモデルにおける afatinib の効果

犬の SCC に対する afatinib の *in vivo* における効果を解析するため、POCO 細胞移植マウスを用いて afatinib の効果を解析した。また、本解析では EGFR 阻害剤である osimertinib を比較に用いた。Afatinib は *in vivo* において POCO 細胞に対して著しい抗腫瘍効果を示し、osimertinib では抗腫瘍効果がほとんど見られなかった。これらのことから、afatinib は特定の SCC 細胞に対して *in vivo* で効果を現すことが示唆された。第 4 章で afatinib が POCO 細胞の MAPK 経路を抑制したことを考慮すると、腫瘍細胞において MAPK 経路が活性化している SCC 症例では afatinib の臨床試験に進む価値があると考えられた。

以上のことから、特定の犬の SCC では survivin の発現あるいは MAPK 経路のリン酸化が増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。YM155 あるいは afatinib はこのような犬の SCC の新たな治療戦略として有望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の盆子原誠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  
室の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協力頂いた、池田知世、石阪萌恵、齋間保乃  
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栗田晟那氏、谷浩由輝氏に深く  
感謝いたします。アニマルウェルネスセンターの小林正人氏に深く感謝いたし  
ます。本学獣医衛生学教室の田中良和教授、佐藤由佳元助教に深く感謝いたし  
ます。本学獣医病理学教室の道下正貴准教授に深く感謝いたします。本学動物  
附属医療センターの鳴原果映助教に深く感謝いたします。東京大学獣医外科学  
研究室の中川孝之准教授、遠藤能史先生に深く感謝いたします。酪農学園大学  
ウイルス学教室の萩原克郎教授に深く感謝いたします。日本動物高度医療セン  
ターの小野憲一郎腫瘍科長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母親に心より感謝いたします。

## 参考文献



1. Webb, J.L., Burns, R.E., Brown, H.M., Leroy B.E., Kosarek, C.E., 2009. Squamous cell carcinoma. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians* 31, E9.
2. Grier, C.K., Mayer, M.N., 2007. Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. *The Canadian Veterinary Journal* 48, 1189-1191.
3. Murphy S, Hayes A, Adams V, Maglennon G, Neath P, Ladlow J, Brearley MJ. Role of carboplatin in multi-modality treatment of canine tonsillar squamous cell carcinoma – a case series of five dogs. *The Journal of Small Animal Practice* 47, 216-220.
4. Kavya, N., Rao, S., Sathyanarayana, M.L., Narayanaswamy, H.D., Byregowda, S.M., Ranganath, L., Kamaran, A., Purushotham, K.M., Kishore, T.K., 2017. Survivin expression in canine spontaneous cutaneous and subcutaneous tumors and its prognostic importance. *Veterinary World* 10, 1286-1291.
5. Auler, P.A., Gamba, C.O., Horta, R.S., Lavallo, G.E., Cassali, G.D., 2014. Metastatic well differentiated squamous cell carcinoma in the prepuce of a dog: a report of clinicopathological, immunophenotypic and therapeutic approach. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66, 1317-1322.
6. Chen, X., Duan, N., Zhang, C., Zhang, W., 2016. Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cancer* 7, 314-323.
7. Rauch, A., Hennig, D., Schäfer, C., Wirth, M., Marx, C., Heinzl, T., Schneider, G., Krämer, O.H., 2014. Survivin and YM155: How faithful is the liaison? *Biochimica et Biophysica Acta* 1845, 202-220.
8. Pastore, S., Lulli, D., Girolomoni, G., 2014. Epidermal growth factor receptor signalling in keratinocyte biology: implications for skin toxicity of tyrosine kinase inhibitors. *Archives of Toxicology* 88, 1189-1203.
9. Maiti, G., Mondal, P., Mukherjee, N., Ghosh, A., Ghosh, S., Dey, S., Chakrabarty, J., Roy, A., Biswas, J., Roychoudhury, S., et al., 2013. Overexpression of EGFR in

head and neck squamous cell carcinoma is associated with inactivation of SH3GL2 and CDC25A genes. *PLoS One* 8, e63440.

10. Sousa, A., Silveira, C., Janeiro, A., Malveiro, S., Oliveira, A., Felizardo, M., Nogueira, F., Teixeira, E., Martins, J., Carmo-Fonseca, M., 2019. Detection of rare and novel EGFR mutations in NSCLC patients: Implications for treatment-decision. *Lung Cancer* 139, 35-40.
11. London, C., Mathie, T., Stingle, N., Clifford, C., Haney, S., Klein, M., Beaver, L., Vickery, K., Vail, D., Hershey, B, et al., 2012. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 10, 194-205.
12. Kurita, S., Miyamoto, R., Tani, H., Kobayashi, M., Sasaki, T., Tamura, K., Bonkobara, M., 2019. Genetic alterations of KIT during clonal expansion and subsequent acquisition of resistance to toceranib in a canine mast cell tumor cell line. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 42, 673-681.
13. Kobayashi, M., Kuroki, S., Kurita, S., Miyamoto, R., Tani, H., Tamura, K., Bonkobara, M., 2017. A decrease in ubiquitination and resulting prolonged life-span of KIT underlies the KIT overexpression-mediated imatinib resistance of KIT mutation-driven canine mast cell tumor cells. *Oncology reports* 38, 2543-2550.
14. Tolcher, A., Mita, A., Lewis, L., Garrett, C., Till, E., Daud, A., Patnaik, A., Papadopoulos, K., Takimoto, C., Bartels, P., et al., 2008. Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 5198-5203.
15. Yamazaki, H., Takagi, S., Hosoya, K., Okumura, M., 2015. Influence of a survivin suppressor YM155 on the chemoresistance of canine histiocytic sarcoma cells. *The Veterinary Journal* 205, 375-380.
16. Nakahara, T., Kita, A., Yamanaka, K., Mori, M., Amino, N., Takeuchi, M.,

- Tominaga, F., Kinoyama, I., Matsuhisa, A., Kudou, M., et al., 2011. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Science* 102, 614-621.
17. Wind, S., Schnell, D., Ebner, T., Freiwald, M., Stopfer, P., 2017. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of afatinib. *Clinical Pharmacokinetics* 56, 235-250.
18. Cross, D., Ashton, SE., Ghiorghiu, S., Eberlein, C., Nebhan, C., Spitzler, P., Orme, J., Finlay, M., Ward, R., Mellor, M., et al., 2014. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discovery* 4, 1046-1061.
19. Uemura, T., Oguri, T., Okayama, M., Furuta, H., Kanemitsu, Y., Takakuwa, O., Ohkubo, H., Takemura, M., Maeno K., Ito, Y., et al., 2017. Dramatic intracranial response to osimertinib in a poor performance status patient with lung adenocarcinoma harboring the epidermal growth factor receptor T790M mutation: A case report. *Molecular and Clinical Oncology* 6, 525-528.
20. Yonesaka, K., Kudo, K., Nishida, S., Takahama, T., Iwasa, T., Yoshida, T., Tanaka, K., Takeda, M., Kaneda, H., Okamoto, I., et al., 2015. The pan-HER family tyrosine kinase inhibitor afatinib overcomes HER3 ligand heregulin-mediated resistance to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 6, 33602-33611.
21. Duong-Ly, K., Devarajan, K., Liang, S., Horiuchi, K., Wang, Y., Ma, H., Peterson, J., 2016. Kinase inhibitor profiling reveals unexpected opportunities to inhibit disease-associated mutant kinases. *Cell Reports* 14, 772-781.
22. Bernabe, L., Portela, R., Nguyen, S., Kisseberth, W., Pennell, M., Yancey, M., London, C., 2013. Evaluation of the adverse event profile and pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. *BMC Veterinary Research* 9, 190.

23. Wang, Y., Zhang, W., He, K., Liu, B., Zhang, L., Zhang, W., Kulkarni, A., Zhao, Y., Sun, Z., 2014. Induction of autophagy-dependent cell death by the survivin suppressant YM155 in salivary adenoid cystic carcinoma. *Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death* 19, 748-758.
24. Zhang, D., Shi, Z., Li, M., Mi, J., 2014. Hypoxia-induced miR-424 decreases tumor sensitivity to chemotherapy by inhibiting apoptosis. *Cell Death & Disease* 5, e1301.
25. Noguchi, S., Shibutani, S., Fukushima, K., Mori, T., Igase, M., Mizuno, T., 2018. Bosutinib, an SRC inhibitor, induces caspase-independent cell death associated with permeabilization of lysosomal membranes in melanoma cells. *Veterinary and Comparative Oncology* 16, 69-76.
26. Klionsky, D., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M., Abeliovich, H., Acevedo A. A., Adachi, H., Adams, C., Adams, P., Adeli, K., et al., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1-222.
27. Li, F., Aljahdali, I., Ling, X., 2019. Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of study? *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 38, 368.
28. Jung, S., Park, Y., Hong, S., Moon, J., Shin, J., Lee, H., Ha, S., Lee, D., Kim, J., Kim, S., et al., 2015. Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) stability contributes to YM155 resistance in human gastric cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 290, 9974-9985.
29. Niu, T., Cheng, Y., Ren, X., Yang, J., 2010. Interaction of Beclin 1 with survivin regulates sensitivity of human glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 584, 3519-3524.
30. Solca, F., Dahl, G., Zoepfel, A., Bader, G., Sanderson, M., Klein, C., Kraemer, O., Himmelsbach, F., Haaksma, E., Adolf, G., 2012. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *The*

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 343, 342-350.

31. Duong-Ly, K., Devarajan, K., Liang, S., Horiuchi, K., Wang, Y., Ma, H., Peterson, J., 2016. Kinase inhibitor profiling reveals unexpected opportunities to inhibit disease-associated mutant kinases. *Clinical Reports* 14, 772-781.
32. Tu, Y., Wang, C., Yang, Z., Zhao, B., Lai, L., Yang, Q., Zheng, P., Zhu, W., 2018. Discovery of novel quinazoline derivatives bearing semicarbazone moiety as potent EGFR kinase inhibitors. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16, 462-478.
33. Wang, S., Cang, S., Liu, D., 2016. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology* 9, 34.
34. Liu, Q., Sabnis, Y., Zhao, Z., Zhang, T., Buhrlage, S., Jones, L., Gray, N., 2013. Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome. *Chemistry & Biology* 20, 146-159.
35. Koul, H., Pal, M., Koul, S., 2013. Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes & Cancer* 4, 342-359.
36. Wong, C., Ma, B., Hui, C., Tao, Q., Chan, A., Preclinical evaluation of afatinib (BIBW2992) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). 2015. *American Journal of Cancer Research* 5, 3588-3599.