

犬の肥満細胞腫におけるイマチニブ耐性化
に関する研究

(Studies on the development of resistance to imatinib in canine mast cell tumor)

小林 正人

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：鷺巣月美)

平成 28 年 3 月

目次

第1章	序論	1
第2章	イマチニブに対して耐性を獲得した犬の肥満細胞種の症例における <i>KIT</i> の解析	5
	材料と方法	7
	結果	9
	考察	10
	小括	12
	表および図	13
第3章	イマチニブ耐性肥満細胞腫株化細胞の作製と性状解析	18
	材料と方法	20
	結果	24
	考察	26
	小括	29
	表および図	30
第4章	CoMS における耐性化機構の解析	36
	材料と方法	38
	結果	41
	考察	43
	小括	45
	図	46
第5章	VI-MC における耐性化機構の解析	52
	材料と方法	55
	結果	58
	考察	60
	小括	62
	図	63
第6章	総括	69
	謝辞	74
	参考文献	75

第 1 章

緒言

肥満細胞腫は犬の皮膚腫瘍の約 20%を占める発生頻度の高い悪性腫瘍である[1]。平均発症年齢は 8.2-10.5 歳であり、好発犬種はボクサー、ボストンテリア、ブルテリアそしてラブラドルレトリバーである[2-5]。治療には外科的切除、放射線治療、化学療法があるが、単独ではなく複数の治療法を組み合わせることもある。特に臨床ステージあるいは組織学的グレードが高い症例に対しては化学療法が用いられる[1]。化学療法では、主にビンブラスチンとロムスチンが用いられ、ビンブラスチンとステロイドを用いた化学療法は奏効率が 47%で奏効期間中央値は 154 日[6]、ロムスチンを用いた治療では奏効率が 42%で奏効期間中央値が 77 日と報告されている。近年、これらの化学療法剤に加えて、膜型チロシンキナーゼ KIT を標的としたキナーゼ阻害剤イマチニブが肥満細胞腫の新たな治療薬として用いられるようになった[11,12,15]。

KIT は *KIT* にコードされる III 型の膜型チロシンキナーゼであり、幹細胞因子 (SCF) のレセプターである。KIT は SCF が結合すると 2 量体化し、これにより、ATP が KIT に結合してチロシン残基がリン酸化する[9]。その結果、下流の細胞内シグナル伝達系の活性化が起こり核内に増殖シグナルが伝達される。近年、犬の肥満細胞腫の約 26%で *KIT* に体細胞突然変異が見られることが報告されている[8]。変異は主に *KIT* の第 5 イムノグロブリン様領域をコードする *KIT* の Exon 8 や Exon 9 または膜近傍領域をコードする *KIT* の Exon 11 に発生している[8,10-12]。これらの領域は *KIT* の 2 量体形成に抑制的に作用する部位であるため、この領域に変異を持つ *KIT* は SCF の結合無しに 2 量体が形成される。その結果、このような変異を持つ *KIT* は恒常的にリン酸化し、肥満細胞の無秩序な増殖が引き起こされる[8,10-14]。

イマチニブは *KIT*、*PDGFR* や *BCR-ABL* など特定のキナーゼの ATP 結合部位に結合し、それらのキナーゼを選択的に阻害する分子標的薬である。イマチニブは犬の肥満細胞腫では *KIT* を標的として効果を現す。*KIT* に変異を持つ犬の肥満細胞腫では、恒常的にリン酸

化した KIT の増殖シグナルに依存して腫瘍細胞が生存・増殖するため、イマチニブは強力な抗腫瘍効果を現す[11,12,15]。このことから、現在、イマチニブは *KIT* に変異を持つ犬の肥満細胞腫の治療薬として広く使用され始めている。一方、イマチニブによる治療では、治療初期に著しい腫瘍の退縮が見られるが、その効果は永続的ではなく最終的にはほとんどの症例において腫瘍はイマチニブに対する耐性を獲得することも明らかになってきた [11,12,15]。

このように、肥満細胞腫におけるイマチニブ耐性獲得は新たな問題となっているが、耐性獲得機構については全く分かっていない。イマチニブは *KIT* の ATP 結合部位に結合してその活性を抑制することから、腫瘍細胞のイマチニブ耐性化における原因として、*KIT* の質的な変化によるイマチニブの *KIT* 親和性の低下が考えられる。犬の肥満細胞腫と同様に、イマチニブは人の消化管間質腫瘍 (*GIST*) において *KIT* に変異を持つ症例で効果を現すが[16-18]、ほとんどの症例で最終的にイマチニブに対する耐性がみられるようになる。多くの場合 (70-80%)、このイマチニブ耐性化は、もともと *KIT* にある変異 (一次変異) に加えて新たな変異 (二次変異) が生じることで *KIT* の構造が変化し、その結果生じることが報告されている。したがって、犬の肥満細胞腫において、このような遺伝子レベルでの変化に基づく *KIT* のイマチニブ感受性の低下は、イマチニブ耐性化の重要な分子機構となっている可能性が考えられる。また、腫瘍細胞のイマチニブ耐性化には、*KIT* の量的な増加に伴うイマチニブの相対的な不足や細胞内シグナル伝達系の変化、あるいは薬剤排泄機構の活性化による細胞内イマチニブ濃度の低下など、他の分子機構も関与していることが考えられる。

そこで、本研究では犬の肥満細胞腫のイマチニブ耐性機構を解明するため、まず第 2 章でイマチニブ耐性を示した肥満細胞腫の症例を対象に *KIT* の解析を行い、二次変異の有無を検討した。次いで第 3 章で、犬のイマチニブ感受性肥満細胞腫株化細胞からイマチニ

ブ耐性株を作製し性状解析を行った。さらに、第4章および第5章において、第3章で作製した耐性株を用いてイマチニブ耐性化機構を解析した。

第2章

イマチニブに対して耐性を獲得した
犬の肥満細胞腫の症例における *KIT* の解析

犬の肥満細胞腫において、*KIT* に変異が認められる症例ではイマチニブが奏功することが報告されている[10-12]。しかしながら、最終的にほとんどの症例においてイマチニブに対する耐性がみられるようになる。

イマチニブは人の *GIST* や慢性骨髄性白血病 (*CML*) においても抗腫瘍効果を示すが、犬の肥満細胞腫と同様に最終的に多くの症例がイマチニブ耐性を獲得することが知られている。これらの腫瘍では、イマチニブはそれぞれ変異 *KIT* および *BCR-ABL* に作用して抗腫瘍効果を現わすが、治療の経過とともに標的分子の遺伝子に二次変異が生じ、これら標的分子の立体構造の変化が起こる。その結果、これらの分子に対するイマチニブの親和性が低下し、抗腫瘍活性が失われる[23-26]。*GIST* や *CML* ではこのような標的分子の変化がイマチニブ耐性化の主要なメカニズムと考えられていることから、犬の肥満細胞腫においてもこのような *KIT* の変化が存在することが考えられる。しかしながら、犬におけるイマチニブ耐性肥満細胞腫における *KIT* 二次変異の有無については不明である。

そこで第 2 章では、犬の肥満細胞腫のイマチニブ耐性化における *KIT* 二次変異の役割を明らかにするため、イマチニブに対して耐性を獲得した症例の治療前および耐性獲得後の *KIT* の塩基配列の解析を行った。

材料と方法

症例

日本獣医生命科学大学附属動物医療センターまたは日本動物高度医療センターに来院した犬の肥満細胞腫の症例の中で、1) *KIT* に変異を持つ、2) イマチニブによる治療が行われた、3) イマチニブが奏効した、そして4) イマチニブによる治療過程でイマチニブ耐性が生じた6症例を (Table 2-1) を本研究で用いた。症例の臨床ステージは WHO 分類[27]に基づき評価した。6症例中2症例は Patnaik 分類[28]により組織学的グレードを評価した。治療の評価には RECIST の基準[29]を用いた。

腫瘍サンプルの採取

イマチニブ治療前およびイマチニブ耐性獲得後の腫瘍サンプルを針吸引生検あるいは外科的切除により採取した。

腫瘍サンプルからの Total RNA の抽出

採取した腫瘍サンプルに RNA-STAT60 (Tel-Test B, Friendswood, TX) を加え溶解した後、クロロホルムを加え室温で3分静置した。次いで、この溶液を4°Cで遠心し、水層とフェノール層に分画した。水層を回収して等量のイソプロパノールを加え Total RNA を沈殿させた後、上清を除去し蒸留水で溶解した。

KIT 塩基配列の解析

腫瘍組織から抽出した total RNA を鋳型とし、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。次にこの cDNA を用いて、

KIT の CDS を PCR により増幅した。この PCR では、CDS を 8 つの領域に分け、それぞれの領域を増幅する 8 組のプライマー (プライマー番号 1-8) (Table 2-3) を用いた。各プライマー組は、増幅領域の辺縁がそれぞれ重複するよう設計した。増幅した PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動した後、予測されたサイズの PCR 産物をゲルから切り出し、gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。精製したサンプルを用いてダイレクトシーケンス法により PCR 産物の塩基配列を決定した。各 PCR 産物の塩基配列を組み合わせ、*KIT* の CDS の全長配列を決定し、遺伝子解析ソフト DNASTAR (DNASTAR, Madison, Wis) を用いて解析した。

結果

症例の臨床ステージおよび組織学的グレード

症例の臨床ステージおよび組織学的グレードを Table 2-1 に示した。臨床ステージは、ステージ I が 1 症例、ステージ III が 2 症例、ステージ IV が 3 症例であった。組織学的グレードの評価は 2 症例 (症例 2 および症例 6) で行い、いずれもグレード II であった。

イマチニブに対する腫瘍の反応と奏効期間および生存期間

イマチニブに対する腫瘍の最大反応、奏効期間および生存期間を Table. 2-2 に示した。イマチニブに対する腫瘍の最大反応は、6 症例中 3 症例が PR で、3 症例が CR であった。奏効期間は 9-292 日 (中央値: 50.5 日) であり、生存期間は 68-592 日 (中央値: 200 日) であった。

KIT の二次変異

症例の腫瘍において検出された *KIT* 変異を Table. 2-2 に示した。また、変異の部位を Fig. 2-1 に図示した。イマチニブ投与前の腫瘍では、第 5 イムノグロブリン様領域をコードする Exon 8 (c.1250_1261dup, 1 症例) および Exon 9 (c.1523A>T, 1 症例) あるいは膜近傍領域をコードする Exon 11 (c.1713_1772+9dup, c.1710_1766dup, c.1722_1760dup, c.1716_1765dup, 各 1 症例の 4 症例) に変異が認められた。イマチニブ耐性獲得後の腫瘍では 6 症例中 1 症例 (症例 5) でイマチニブ投与前の腫瘍で見られた変異 (c.1722_1760dup) に加えて、*KIT* の活性化ループ領域をコードする Exon 17 に二次変異 (c.1523A>T) が検出された。他の 5 症例では二次変異は見られず、イマチニブ投与前の腫瘍で見られた変異のみが検出された。

考察

イマチニブに対して耐性を獲得した犬の肥満細胞腫において、腫瘍細胞に *KIT* の二次変異が存在する割合は、6 症例中 1 症例と少ないことが示された。このことから、犬の肥満細胞腫では、*KIT* の二次変異がイマチニブ耐性化の主な分子機構ではないことが示唆された。

腫瘍細胞のイマチニブ耐性化機構については、*GIST* や *CML* において頻度は低いながら *KIT* 二次変異以外のメカニズムが存在することが知られている[22,35]。*GIST* や *CML* では、標的分子の *KIT* や *BCR-ABL* が過剰発現することによりイマチニブが十分な効果を現すことができなくなり耐性が生じる場合がある。また、*GIST* では、*KIT* に代わって *SRC* シグナル経路が活性化したり、*CML* では *BCR-ABL* の下流のキナーゼである *RAS* が変異により活性化するなどして腫瘍細胞がイマチニブ耐性を獲得することが知られている[20,21]。さらに、イマチニブは薬剤排泄ポンプである P 糖蛋白 (*ABCB1*) の基質になることが知られており、その発現の増加により腫瘍細胞の細胞内イマチニブ濃度が減少することが示唆されている[19]。本章の結果とこれらの報告を合わせて考えると、犬の肥満細胞腫では、*KIT* の過剰発現、増殖シグナル経路の変化や再活性化、あるいは薬剤排泄機構の亢進といった二次変異以外の分子機構がイマチニブ耐性化に重要な役割を果たしていると考えられた。

一方、1 症例において *KIT* の活性化ループ領域をコードする *KIT* Exon 17 に二次変異 (c.2463T>A, p.Asn821Lys) が認められた。人のイマチニブ耐性 *GIST* においても、このアミノ酸残基に相当するアミノ酸 (Asn822) に同様の変異 (p.Asn822Lys) が報告されている[30,31]。また、この変異 (p.Asn822Lys) を導入した *KIT* のリン酸化は、イマチニブでは抑制できないことが示されており[32]、p.Asn822Lys はイマチニブ耐性化の原因と考えられている。これらのことから、*KIT* に二次変異が同定された症例では、この変異がイマチニブ

耐性に関与していると考えられた。犬の肥満細胞腫においても頻度は高くはないが *KIT* の二次変異がイマチニブ耐性化の原因となる場合があると考えられた。

今回解析した犬の肥満細胞腫 6 症例では、イマチニブの奏功期間は 9 日から 292 日と大きく異なり、症例によってイマチニブに対する耐性の生じやすさに相違があることが示された。この相違については、症例の臨床ステージ、一次変異の種類、二次変異の有無との間に明らかな関連は見られなかった。組織学的グレードについては、2 症例でしか評価されていないため、この相違が組織グレードに関連しているか否かは不明であった。一方、奏功期間が比較的短かった症例 (9-24 日) は最大反応が部分寛解であり、長かった症例 (77-292 日) は完全寛解であったことから、奏功期間の相違は初期の治療に対する反応の程度の差による結果なのかもしれない。あるいは、6 症例中 5 症例では *KIT* 二次変異以外の様々な分子機構がイマチニブ耐性に関与している可能性があることから、症例に生じたイマチニブ耐性化機構の違いが、奏功期間の相違に関連していた可能性も考えられる。

以上のことから、犬の肥満細胞腫において *KIT* の二次変異はイマチニブ耐性化に関与している場合があると考えられた。しかしながら、多くの症例では *KIT* の二次変異とは異なる分子機構を介してイマチニブ耐性を獲得していると考えられた。

小括

犬の肥満細胞腫のイマチニブ耐性化における *KIT* 二次変異の役割を明らかにするため、イマチニブに対して耐性を獲得した症例の治療前および耐性獲得後の *KIT* の塩基配列の解析を行った。6 症例中 1 症例で *KIT* の活性化ループ領域をコードする Exon 17 に c.2463T>A の二次変異が同定された。この変異と同様の変異は人のイマチニブ耐性 GIST において報告されており、またイマチニブ抵抗性の *KIT* リン酸化を引き起こすことが知られている。このことから、この症例で見られた *KIT* 二次変異はイマチニブ耐性化に関与していると考えられた。一方、5 症例では *KIT* に二次変異は同定されなかった。

以上より、一部の症例では *KIT* の二次変異がイマチニブ耐性化に関与している場合があると考えられた。しかしながら、多くの症例では *KIT* の二次変異とは異なる分子機構を介してイマチニブ耐性を獲得していると考えられた。

表および図

Table 2-1 症例

症例	犬種	年齢(歳)	性別	発生部位	ステージ ^a	グレード ^b
1	雑種	15	M	皮膚	IV	—
2	フレンチブルドック	2	M	皮膚	III	II
3	バーニーズマウンテンドッグ	4	F	腸管	IV	—
4	マルチーズ	10	M	皮膚	III	—
5	ゴールデンレトリバー	11	M	皮膚	IV	—
6	チワワ	12	M	皮膚	I	II

—, 解析していない; M, male; F, female.

^a WHOステージングに基づく。

^b Patnaik 分類に基づく。

Table. 2-2 各症例における最大反応、奏効期間、生存期間および*KIT*変異

症例	最大反応	奏効期間(日)	生存期間(日)	一次変異	二次変異
1	PR	17	68	c.1523A>T	Non
2	PR	24	97	c.1713_1772+9dup	Non
3	PR	9	72	c.1250_1261dup	Non
4	CR	77	319	c.1710_1766dup	Non
5	CR	266	475	c.1722_1760dup	c.2463T>A
6	CR	292	592	c.1716_1765dup	Non

CR, 完全寛解; PR, 部分寛解; Non, 変異なし

Table. 2-3 PCRおよびシーケンス解析に用いたプライマー塩基配列

プライマー番号	上流プライマー	下流プライマー
1	5'-CTATCGCAGCCACCGGAT-3'	5'-GTGCAAGCAGAGCCGATGATACT-3'
2	5'-GCTGGTCCGCTGCCCTCTGA-3'	5'-GGCGTAACACATGAACACTCCA-3'
3	5'-AAAGGAGAACAGCCAGCAGACTAA-3'	5'-GACATCGGAATTGGACACTTGAAA-3'
4	5'-TTATCCCAAGTCTGACAATGAAA-3'	5'-AGGCACTATAATCGATGGAAGTCT-3'
5	5'-AACTCGTCTCTGTCACCGTCTGGA-3'	5'-TGGCACCTTGGTTGAGCATCTTA-3'
6	5'-TGGGGCCATGACTGTTGC-3'	5'-TTGGCCACCTGGTAAGAAAAAG-3'
7	5'-CCAACC AAGCAGACAAA-3'	5'-GCTCCACAGAAAAAATCCATAGG-3'
8	5'-GCTCGGCTA CCTGTGAAGTGGATG-3'	5'-TGTC CGCTA C CCTGGAATAG-3'

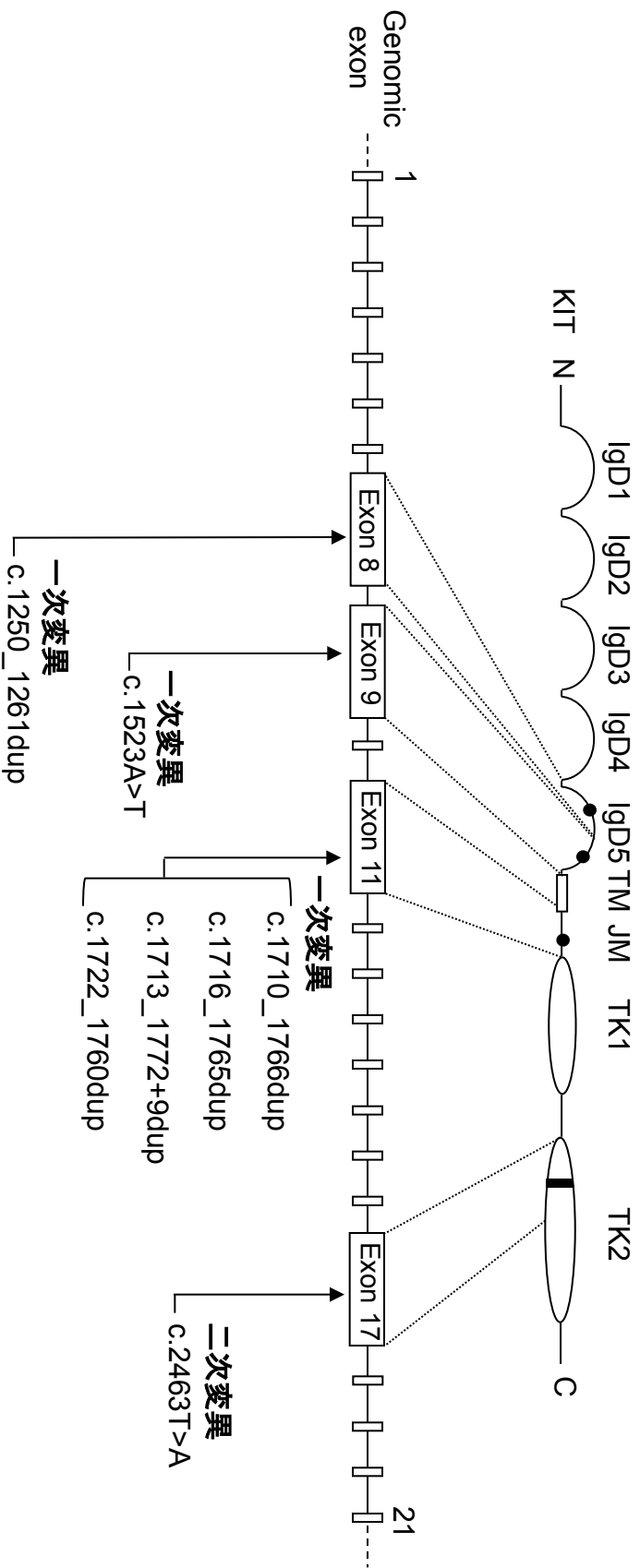


Fig. 2-1 症例の腫瘍で検出された*KIT*変異の発現部位

*KIT*の構造を上記、*KIT*のExonを下に示した。5番目のイムノグロブリン様ドメイン (IgD) をコードするExon 8、9、膜近傍領域をコードするExon 11に一次変異が認められた。二次変異は活性化ループ領域をコードするExon 17に認められた。変異の発現部位を矢印 (*KIT*) および黒丸 (*KIT*) で示した。TM, 膜貫通領域; JM, 膜近傍領域; TK1, ATP結合領域; TK2, 活性化ループ領域

第3章

イマチニブ耐性肥満細胞腫株化細胞の作製と性状解析

第2章の結果から、犬の肥満細胞腫のイマチニブ耐性化には *KIT* の二次変異に依存しない分子機構が重要な役割を果たしていると考えられた。このような耐性機構として、*KIT* の量的な増加に伴うイマチニブの相対的な不足や細胞内シグナル伝達系の変化、あるいは薬剤排泄機構の活性化による細胞内イマチニブ濃度の低下など、他の分子機構が関与している可能性が考えられる。

犬の肥満細胞腫において、このようなイマチニブに対する腫瘍の変化を明らかにするためには、イマチニブに対する腫瘍細胞レベルでの遺伝子および蛋白の変化を調べることが必須であり、そのためには培養細胞系を用いて解析する必要がある。そこで本章では、*KIT* にイマチニブ感受性の変異を持つ犬の肥満細胞腫株化細胞 CoMS および VI-MC にイマチニブを低濃度から段階的に曝露し、イマチニブ耐性細胞株を作製した。これらイマチニブ耐性細胞株を用いて、まず *KIT* の発現とリン酸化レベルの変化ならびに *KIT* 塩基配列の変化について検討した。次いで、薬剤排泄能の変化について検討した。

材料と方法

株化細胞

実験には北海道大学の外科学教室より分与された CoMS と東京大学外科学教室より分与された VI-MC を用いた。CoMS および VI-MC は 10% 非動化牛胎子血清 (FCS; Nippon Bio-supply Center)、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含む RPMI Medium 1640 培地 (RPMI 培地; Invitrogen) で培養した。CoMS は皮膚型肥満細胞腫由来の株化細胞で *KIT* の Exon 11 に重複配列挿入変異 (c.1720_1772+1dup) を、VI-MC は犬の内臓型肥満細胞腫由来の株化細胞で *KIT* の Exon 9 に点変異 (c.1523A>T) を有する。

イマチニブ耐性肥満細胞腫株化細胞の樹立

CoMS を 0.02 μM のイマチニブ (Glivec; Novartis, Basel, Switzerland) を含む RPMI 培地で培養し、安定した増殖を示すまで培養を継続した。その後、徐々に培地中のイマチニブ濃度を増やしながら培養を続け、イマチニブ 1 μM で安定した増殖を示す細胞を得た。この細胞を rCoMS1 とした。VI-MC は 0.2 μM のイマチニブ存在下で培養を開始し、CoMS と同様の方法で培養を続けた。これにより、イマチニブ 1 μM で安定増殖が可能な細胞を得た。この細胞を rVI-MC1 とした。さらに、rVI-MC1 の培地中のイマチニブ濃度を徐々に増やし、10 μM のイマチニブ存在下で安定増殖が可能な細胞を得た。この細胞を rVI-MC10 とした。

細胞増殖抑制試験

RPMI 培地で懸濁した各株化細胞を 96 ウェルプレートに $1-2 \times 10^4$ 個/well になるよう播種した。次いで、最終濃度が 0 (DMSO のみ) から $10^2 \mu\text{M}$ の濃度になるようイマチニブを各ウェルに添加した。イマチニブ添加後、CoMS および rCoMS1 は 24 時間培養し、VI-MC、

rVI-MC1 および rVI-MC10 は 48 時間培養した。培養後、WST-1 cell proliferation assay kit (Takara, Tokyo, Japan) を用いて生存細胞数を評価した。DMSO のみを添加した条件での細胞生存率を 100 として細胞増殖抑制曲線を作成し、GraphPad Prism software program (GraphPad Software) を用いて各株化細胞に対するイマチニブの IC50 を算出した。

蛋白質抽出

CoMS および rCoMS1 を 6 ウェルプレートに 5×10^5 個/well なるように播種し、イマチニブを 0 (DMSO のみ) から 10 μ M を含む FCS 非添加の RPMI 培地で 4 時間培養した。V-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 は 6 ウェルプレートに 5×10^5 個/well なるように播種し、FCS 非添加の RPMI 培地で 24 時間前培養を行った。その後、イマチニブを 0 (DMSO のみ) から 10 μ M になるよう各ウェルに添加し、さらに 24 時間培養した。培養後、各細胞を回収し PBS で 2 回洗浄した。洗浄後の細胞の沈査に細胞溶解緩衝液 (20 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 % Triton X-100、2.5 mM Sodium pyrophosphate、1 mM β -Glycerophosphate、1 mM Sodium orthovanadate、1 μ g/ml Leupeptin、1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride、20 mM N-ethylmaleimide) を加えて 20 分間氷上で静置し、細胞を溶解した。

ウエスタンプロットティング

各株化細胞から抽出した蛋白質溶解液に泳動用緩衝液 (150 mM Dithiothreitol, 6 % SDS, 187.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 30 % Glycerol, 0.03 % Bromophenol blue) を加えて 95°C で 5 分間煮沸した後、10 % アクリルアミドゲルで電気泳動した。次いで、分離した蛋白質を親水処理した Immun-Blot PVDF メンブレン (Bio-Rad) に転写した。転写したメンブレンを Blocking One-P (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) あるいは 5 % スキムミルクに浸漬した後に、室温で 20

分あるいは 60 分間攪拌してブロッキングした。一次抗体にはウサギ抗ヒト phospho-c-kit (Tyr703) モノクローナル抗体 (Cell Signaling, Danvers, MA)、ヤギ抗ヒト c-kit ポリクローナル抗体 (Santa Cruz, Dallas, TX) またはヤギ抗ヒト GAPDH ポリクローナル抗体 (Santa Cruz) を用い、メンブレンと室温で 60 分間反応させた。その後、二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (Life Technologies) または、ビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG (Life Technologies) と 30 分間反応させた。さらに、Horseradish Peroxidase 標識ストレプトアビジン (Vector) を 30 分間反応させ、標的蛋白のバンドを可視化した。各バンドのシグナル強度は Multi Gauge Ver 3.2 software (Fujifilm) を用いて数値化した。

KIT 塩基配列の解析

第 2 章と同様の方法で解析した。各株化細胞から抽出した total RNA を鋳型とし、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。この cDNA を用いて、KIT の CDS の全長配列を解析した。

色素排泄試験

各株化細胞における P 糖蛋白 (ABCB1) の薬剤排泄能は、Rhodamine123 (Rh123 ; Invitrogen) を用いた色素排泄試験で評価した。各株化細胞を 200 ng/ml の Rh123 を含む RPMI 培地で懸濁し、6 ウェルプレートに 5×10^6 個/well になるように播種した。これらの細胞を 40 分間培養した後、PBS で 2 回洗浄した。Rh123 の排泄の競合阻害剤には Cyclosporine A (CsA ; Wako, Tokyo, Japan) を用いた。Rh123 を反応させた細胞を、CsA が 2 μ M になるよう添加した RPMI 培地あるいは添加していない RPMI 培地に懸濁し、40 分間培養した。その後、フローサイトメトリーにて細胞内に残存した Rh123 の蛍光強度を測定した。陽性コントロールとして Rh123 と CsA のいずれも培地に加えていない細胞を用いた。また、陰性

コントロールとして Rh123 と CsA を培地に加えた細胞を用いた。

薬剤排泄関連遺伝子の発現解析

各株化細胞における薬剤排泄関連遺伝子 ABCB1、ABCC1 および ABCG2 の mRNA の発現を RT-PCR により評価した。各株化細胞から、第 2 章で述べた方法により total RNA を抽出し、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いた逆転写反応により cDNA を作製した。次に、作製した cDNA と各遺伝子を増幅するプライマー (Table 3-1) を用いて PCR で 22 サイクル増幅した。増幅産物を 1.2%アガロースゲルで電気泳動した。

結果

株化細胞に対するイマチニブの細胞増殖抑制効果

イマチニブによる細胞増殖抑制試験の結果を Fig 3-1 に示した。CoMS はイマチニブに感受性を示したが ($IC_{50} = 0.0038 \pm 0.022 \mu\text{M}$)、rCoMS1 は CoMS と比較してイマチニブに対して強い抵抗性を示した ($IC_{50} = 9.0 \pm 2.73 \mu\text{M}$) (Fig 3-1A)。また、VI-MC はイマチニブに感受性を示したが ($IC_{50} = 0.27 \pm 0.021 \mu\text{M}$)、rVI-MC1 は VI-MC と比較してイマチニブに対して抵抗性を示した ($IC_{50} = 1.86 \pm 0.29 \mu\text{M}$)。さらに、rVI-MC10 は rVI-MC1 より強力なイマチニブ抵抗性を示した ($IC_{50} = 12.24 \pm 1.2 \mu\text{M}$) (Fig 3-1B)。

各株化細胞のリン酸化 KIT および KIT におよぼすイマチニブの影響

Fig. 3-2 にウエスタンブロットによるリン酸化 KIT および KIT の解析結果を示した。イマチニブ非存在下 ($0 \mu\text{M}$) では、CoMS に比べ rCoMS1 で KIT の発現が著しく増加しており、これに伴いリン酸化 KIT も著しく増加していた (Fig. 3-2A)。イマチニブは用量依存性に CoMS のリン酸化 KIT を抑制し、 $0.1 \mu\text{M}$ 以上でその抑制は顕著であった。rCoMS1 においてもイマチニブ用量依存性にリン酸化 KIT が減少する傾向が見られたが、抑制の程度はわずかであり、 $10 \mu\text{M}$ でも高いレベルのリン酸化 KIT を維持していた。VI-MC では、イマチニブは用量依存性に KIT のリン酸化を抑制し、 $1 \mu\text{M}$ 以上でその抑制は顕著であった (Fig. 3-2B)。rVI-MC1 および rVI-MC10 においてもイマチニブ用量依存性にリン酸化 KIT が減少する傾向が見られたが、その程度は VI-MC に比べて明らかに弱く、 $1 \mu\text{M}$ のイマチニブでは KIT のリン酸化が十分に抑制されなかった (Fig. 3-2B)。

KIT 二次変異の同定

株化細胞で認められた *KIT* 変異を Fig 3-3A に示し、変異の挿入部位を Fig 3-3B に示した。CoMS および rCoMS1 の *KIT* 塩基配列に相違は見られず、いずれも *KIT* の膜近傍領域をコードする Exon 11 に既知の重複配列挿入変異 (c.1720_1772+1dup) が検出されたのみであった。一方、VI-MC では *KIT* の第 5 イムノグロブリン様領域をコードする Exon 9 に既知のヘテロ点変異 (c.1523A>T) が検出されたのみであったが、rVI-MC1 および rVI-MC10 ではこの点変異に加え、活性化ループ領域をコードする Exon 17 にヘテロの二次変異 (c.2443G>C) が検出された。

薬剤排泄能の変化

CoMS および rCoMS1 には Rh123 の排泄能は認められなかった (Fig 3-4 A)。一方、VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 は、いずれも Rh123 の排泄能を有していたが、rVI-MC10 については VI-MC および rVI-MC1 に比べて高い Rh123 の排泄能を持つことが示された (Fig 3-4 A)。VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 における薬剤排泄関連遺伝子 ABCB1、ABCC1、ABCG2 の mRNA の発現を解析したところ、rVI-MC10 では ABCB1 と ABCC1 の発現が VI-MC および rVI-MC1 に比べて増加していた (Fig 3-4 B)。

考察

犬の肥満細胞腫株化細胞 CoMS および VI-MC を 1 μM のイマチニブに長期間曝露し、これらの株化細胞からそれぞれイマチニブ耐性株である rCoMS1 および rVI-MC1 を作製した。CoMS はイマチニブ 1 μM の曝露により、イマチニブに対する強力な耐性を獲得した (rCoMS1; IC50 約 9 μM)。一方、rVI-MC1 では暴露濃度と同程度の濃度のイマチニブに対しては耐性を示したが (rVI-MC1; IC50 約 2 μM)、それ以上の濃度のイマチニブに対しては感受性を維持していた。人の CML の治療におけるイマチニブの血中濃度範囲が約 1-10 μM であることが報告されていることから[33,34]、VI-MC に対してはより高濃度のイマチニブ (10 μM) を曝露し、イマチニブ 10 μM で生存できる細胞株 rVI-MC10 (IC50 約 12 μM) を作製した。

rCoMS1 では CoMS に比べて KIT の発現レベルが著しく増加しており、これに伴い KIT のリン酸化レベルの増加も見られた。また、rCoMS1 のリン酸化 KIT はイマチニブによりやや減少したが、10 μM イマチニブ存在下でも高いリン酸化レベルを維持していた。一方、rCoMS1 には KIT の二次変異の挿入や薬剤排泄能の亢進は認められなかった。これらのことから rCoMS1 におけるイマチニブ耐性化には、二次変異による KIT の質的变化や細胞内イマチニブ濃度の低下ではなく、KIT の発現量の増加が重要な役割を果たしていると考えられた。このようなイマチニブによる KIT 発現量の増加は、人のイマチニブ耐性 GIST でも見られ、イマチニブ耐性化の一因と考えられている[22]。また、人の CML でも同様にイマチニブが BCR-ABL の過剰な発現を引き起こし、その結果イマチニブに対して抵抗性を持つことが知られている[35]。これらイマチニブ標的分子の反応性の増加は、主に遺伝子増幅や転写活性の増加により生じることが報告されている。今回の結果とこれらの報告を考慮すると、rCoMS1 ではイマチニブの作用により KIT の発現制御に関わる分子機構が活性化し、その結

果、KIT の発現量が増加しイマチニブ耐性が生じたと考えられた。

rVI-MC1 および rVI-MC10 では、いずれも VI-MC では認められなかった *KIT* exon 17 に二次変異 (c.2443G>C, p.Asp815His) が認められた。人の *KIT* の同様の部位 (Asn816) における変異は、イマチニブ耐性 GIST (p.Asp816His) や人のイマチニブ耐性肥満細胞症 (p.Asp816Val) においても報告されている[36]。この部位に変異を持つ *KIT* は活性型構造となることが知られているが[32]、イマチニブはこの構造の *KIT* に対してきわめて結合性が低いいため、この部位の変異はイマチニブ耐性化の原因と考えられている。さらに、第 2 章で示した *KIT* exon 17 に二次変異を持つ症例では、この変異部位ときわめて近い場所 (Asn821) に二次変異が生じている。これらのことと rVI-MC1 および rVI-MC10 における *KIT* のリン酸化が 1 μ M のイマチニブで抑制されなかったことを合せて考えると、rVI-MC1 および rVI-MC10 のいずれにおいてもこの *KIT* exon 17 の二次変異がイマチニブ耐性化と密接に関連していると考えられた。

rVI-MC1 および rVI-MC10 はいずれも *KIT* に同じ二次変異を持つにもかかわらず、rVI-MC10 のみ 10 μ M のイマチニブ存在下で増殖が可能であった。このことから、rVI-MC10 は高濃度のイマチニブ存在下では、*KIT* の二次変異とは別の分子機構を介して増殖を維持していると考えられる。これについては、rVI-MC10 では ABCB1 および ABCC1 の発現増加と色素排泄能の亢進が認められたため、薬剤排泄機構の関与を考慮する必要がある。しかしながら、10 μ M のイマチニブ存在下において rVI-MC10 のリン酸化 *KIT* は著しく減少していることから、イマチニブは *KIT* のリン酸化を抑えるだけの細胞内濃度を維持していたと考えられる。したがって、rVI-MC10 では薬剤排泄能は亢進しているが、細胞内イマチニブ濃度を十分に低下させるだけの活性ではないと考えられる。これらのことから、rVI-MC10 では *KIT* 下流のキナーゼの活性化や他のキナーゼ経路の活性化など、薬剤排泄機構の活性化とは異なるメカニズムでイマチニブに対する耐性を獲得していることが示唆された。

以上から、CoMS では KIT が過剰に発現することで、また VI-MC では *KIT* に二次変異が発生することで、それぞれイマチニブに対する耐性を獲得していると考えられた。さらに VI-MC では、高濃度のイマチニブに対しては *KIT* 二次変異とは異なる他の分子機構が生じ耐性を獲得すると推測された。

小括

犬の肥満細胞腫におけるイマチニブ耐性化機構を解明するため、イマチニブに感受性を示す犬の肥満細胞腫株化細胞 CoMS および VI-MC にイマチニブを暴露し、それぞれのイマチニブ耐性株 rCoMS1 (IC50 約 9 μ M) および rVI-MC1 (IC50 約 2 μ M) と rVI-MC10 (IC50 約 12 μ M) を作製した。これらの株化細胞を用いて KIT の発現とリン酸化レベルの変化、KIT 塩基配列の変化、薬剤排泄能の変化について検討した。

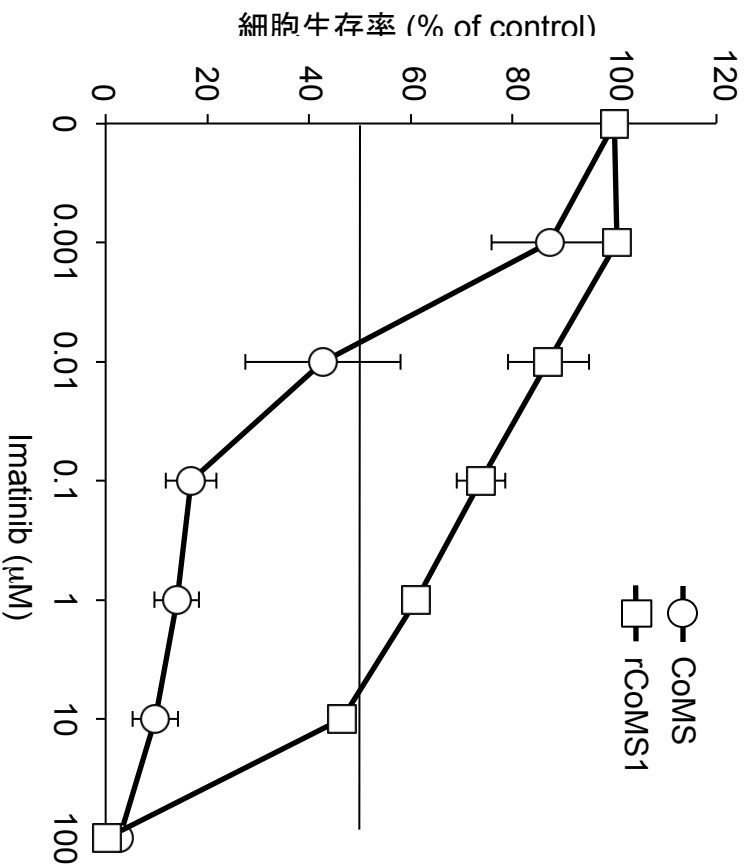
rCoMS1 では CoMS に比べて KIT の発現レベルが著しく増加しており、これに伴い KIT のリン酸化レベルの増加が見られた。また、rCoMS1 のリン酸化 KIT はイマチニブによりやや減少したが、10 μ M イマチニブ存在下でも高いリン酸化レベルを維持していた。これらのことから、rCoMS1 のイマチニブ耐性化には KIT の過剰発現が重要な役割を果たしていると考えられた。

rVI-MC1 および rVI-MC10 では *KIT* に二次変異 (c.1523A>T, p.Asp815His) が同定された。VI-MC における KIT のリン酸化は 1 μ M のイマチニブで抑制されたが、rVI-MC1 および rVI-MC10 の KIT のリン酸化は抑制されなかった。このことから、rVI-MC1 および rVI-MC10 で同定された二次変異は、VI-MC のイマチニブ耐性化と密接に関連していると考えられた。一方、rVI-MC10 は rVI-MC1 と比べより高濃度のイマチニブに対しても耐性を示すことから、rVI-MC10 には二次変異以外のイマチニブ耐性機構が存在すると考えられた。

以上から、CoMS では KIT が過剰に発現することで、また VI-MC では KIT に二次変異が発生することで、それぞれイマチニブに対する耐性を獲得していると考えられた。さらに VI-MC では、高濃度のイマチニブに対しては *KIT* 二次変異とは異なる他の分子機構が生じ耐性を獲得すると推測された。

表および図

A



B

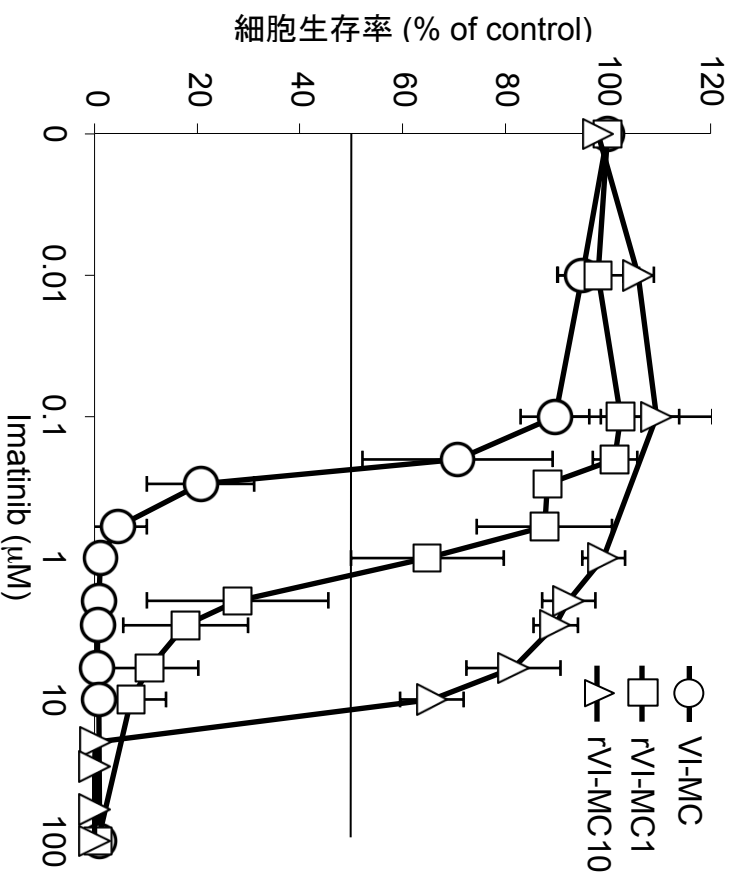


Fig. 3-1 イマチニブによる細胞増殖抑制試験

(A) CoMSおよびrCoMS1、(B) VI-MC、rVI-MC1およびrVI-MC10の結果を示した。rCoMS1はCoMSに比べて強いイマチニブ抵抗性を示した(A, 上段)。rVI-MC1はVI-MCに比べて明らかなイマチニブ抵抗性を示し、rVI-MC10はさらに強い抵抗性を示した(B, 上段)。(A)および(B)の下段には各グラフから算出したIC₅₀を示した。

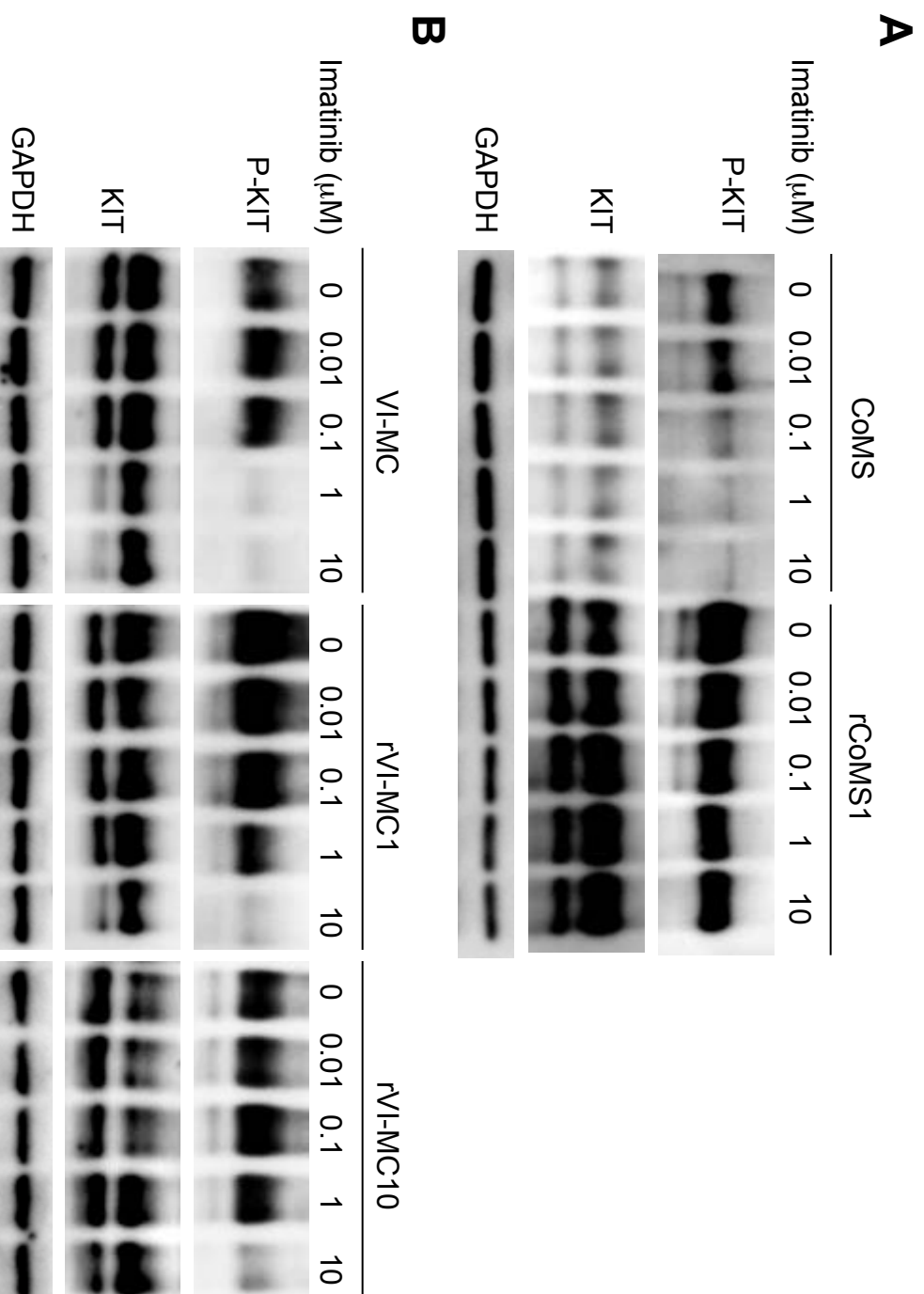


Fig. 3-2 各株化細胞のリソ酸化KITおよびKITにおよぼすイマチニブの影響
 イマチニブ曝露後の各株化細胞におけるリソ酸化KIT (P-KIT) およびKITの発現をウエスタンブロットで検討した。(A) イマチニブ非存在下 (0 μM) では、CoMSに比べrCoMS1でKITおよびP-KITの発現が著しく増加した。イマチニブは用量依存性にCoMSのP-KITを抑制し、0.1 μM 以上でその抑制は顕著であった。rCoMS1ではP-KITの抑制はわずかであり、10 μM でも高いレベルのP-KITを維持していた。(B) rVI-MCではイマチニブは用量依存性にP-KITを抑制し、1 μM 以上でその抑制は顕著であったが、rVI-MC1およびrVI-MC10では1 μM のイマチニブではP-KITは十分に抑制されなかった。

A

細胞株	KIT変異
CoMS	c.1720_1772+1dup
rCoMS1A	c.1720_1772+1dup
VI-MC	c.1523A>T
rVI-MC1	c.1523A>T, c.2443G>C
rVI-MC10	c.1523A>T, c.2443G>C

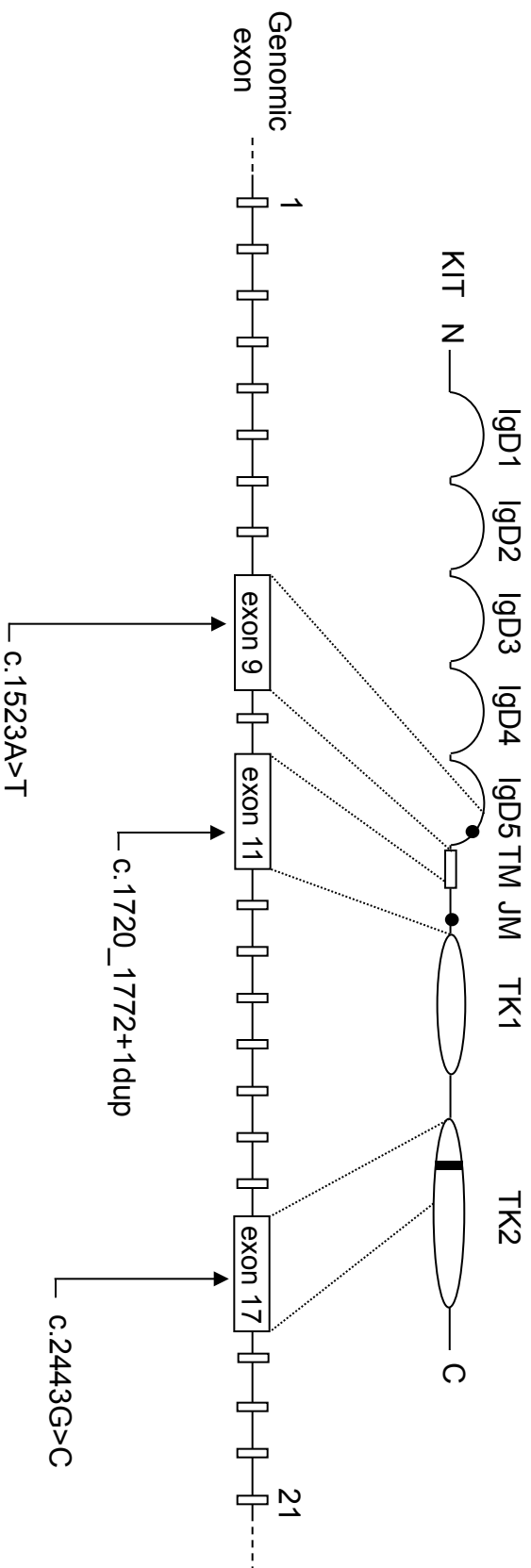
B

Fig. 3-3 肥満細胞腫株化細胞で検出されたKIT変異とその発生部位

(A) 各株化細胞で認められたKITの変異を示した。(B) KITの構造を上に、KITのExonを下に示した。5番目のイムノグロブリン様領域(IgD)をコードするExon 9、膜近傍領域をコードするExon 11、ならびに活性化ループ領域をコードするExon 17で変異が認められた。変異の発生部位を矢印、黒丸および黒線で示した。TM, 膜貫通領域; JM, 膜近傍領域; TK1, ATP結合領域; TK2, 活性化ループ領域

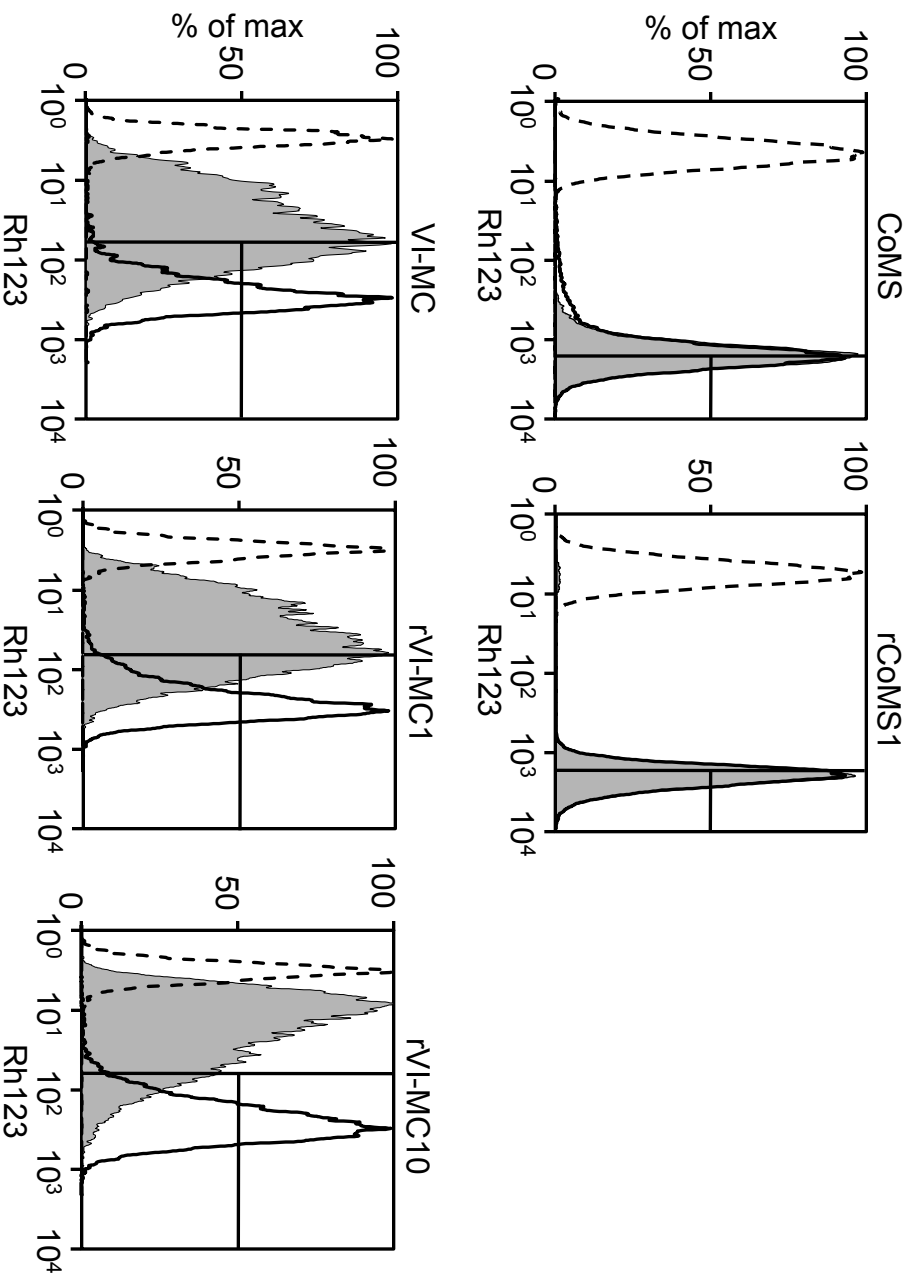
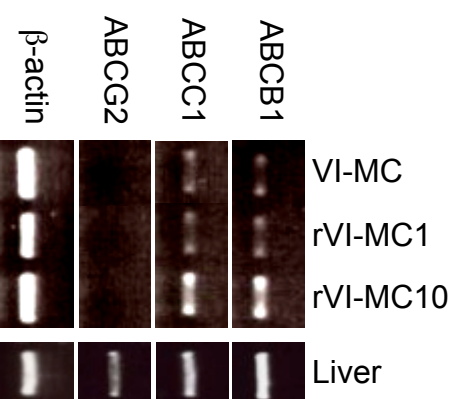
A**B**

Fig. 3-4 各細胞株における薬剤排泄機構の検討

(A) 各株化細胞における色素排泄試験を行った。色素としてRhodamin123 (Rh123) を、阻害剤としてCyclosporineA (CsA) を用いた。点線は薬剤を加えていない細胞、灰色線はRh123を加えた細胞、黒線はRh123とCsAを加えた細胞を示した。VI-MC、rVI-MC1およびrVI-MC10のいずれにおいてもRh123の排泄活性が見られたが、rVI-MC10はVI-MCおよびrVI-MC1と比較して強いRh123の排泄活性を示した。(B) VI-MC、rVI-MC1およびrVI-MC10における薬剤排泄関連遺伝子(ABCB1、ABCC1、ABCG2)のmRNA発現レベルをRT-PCRで評価した。rVI-MC10においてABCB1およびABCC1の発現の増強が認められた。

Table. 3-1 PCRに用いたプライマーの塩基配列

プライマー名	上流プライマー	下流プライマー
ABCB1	5'-TGGCAGCAGGAAGACAGATACTCA-3'	5'-CAATAAGAAAGCGGCACCAATAGA-3'
ABCG2	5'-TCTTCGGCTTCCAACAACACTATGAC-3'	5'-GTAACCCACTGACCGCAAGAACC-3'
ABCC1	5'-GGGGCCAGAAAGCAGCGAGTGAG-3'	5'-CCTGCCCCGTTTGAGCCTTGTCTG-3'
β-actin	5'-CTGGCCGGGACCCTGACTGACTGCTACC-3'	5'-GCCGTTCCGGAGGGGCCGATGAT-3'

第 4 章

CoMS における耐性化機構の解析

第3章より、CoMSではイマチニブがKITの過剰な発現を誘導し、それによりイマチニブに対する耐性を獲得する可能性が示唆された。このようなKITの過剰な発現を引き起こす分子機構として、転写活性の増加や遺伝子増幅に伴うKITの発現量の増加が考えられる。実際に人のCMLやGISTでは、イマチニブの投与によりKITやBCR-ABLの遺伝子増幅あるいは転写活性の増加が起こり、その結果KITやBCR-ABLが過剰発現し耐性を獲得することが知られている[22,35]。一方、KITを含む膜型チロシンキナーゼは、細胞膜に一定期間存在した後にユビキチン化されエンドソームに取り込まれて分解されるが[37]、この経路に何らかの障害が生じると、細胞におけるKITの発現量が増加する可能性があると考えられる。

このように、rCoMS1ではKITの発現増加、KITの分解過程の障害、あるいはその両方のメカニズムを介してKITが過剰に発現し、これによってイマチニブに対する耐性を獲得していると考えられる。そこで、本章ではCoMSおよびrCoMS1におけるKITの発現レベルならびにKITの分解過程の相違を解析し、KIT過剰発現の分子機構とイマチニブ耐性化における役割を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

株化細胞

実験には CoMS および rCoMS1 を用いた。CoMS は 10%FCS、1%Penicillin-Streptomycin-Glutamine を含む RPMI 培地で培養した。rCoMS1 はイマチニブ 1 μ M を含む RPMI 培地を用いて同様の培養条件で培養した。また、イマチニブ無添加の RPMI 培地で 14 日間培養した rCoMS1 を rCoMS1-condition A とした。

KIT mRNA の発現解析

CoMS、rCoMS1、rCoMS1-condition A および rCoMS1-condition A の培地にイマチニブ (1 μ M) を加え 48 時間経過した rCoMS1-condition A (rCoMS1-condition A [IM+48h]) から、第 3 章と同様の方法で cDNA を作製した。この cDNA とプライマー 2 (Table. 1) を用いて PCR で 22 サイクル増幅した。増幅産物は 1.2 %アガロースゲルを用いて電気泳動し KIT の mRNA の発現量を評価した。各株化細胞における KIT mRNA 発現レベルは β -actin の mRNA 発現レベルにより標準化し、CoMS における KIT mRNA 発現を 1.0 として比較した。

蛋白合成阻害

CoMS、rCoMS1、rCoMS1-condition A および rCoMS1-condition A(IM+48h) を 6 ウェルプレートに 5×10^5 個/well で播種した後、蛋白合成阻害剤 Cycloheximide (CHX, sigma) を 50 mg/ml になるよう各ウェルに添加した。これらの細胞を 30、60 および 120 分培養した。

細胞のイマチニブ処理

rCoMS1、rCoMS1-condition A および rCoMS1-condition A(IM+IM48h)を 5×10^5 個/well とするよう 6 ウェルプレートに播種した。rCoMS1-condition A および rCoMS1-condition

A(IM+IM48h) については、最終濃度が 0 (DMSO のみ) から 10 μ M になるようにイマチニブを添加した培地で 4 時間培養した。また、rCoMS1 および rCoMS1-condition A については、最終濃度が 0 あるいは 1 μ M になるようイマチニブを培地に添加し、rCoMS1 は 0、7、14 および 21 日、rCoMS1-condition A は 0、6、24、48 および 72 時間培養した。

KIT およびリン酸化 KIT の解析

蛋白合成阻害およびイマチニブ処理を行った細胞から、3 章と同様の方法で蛋白を抽出した。この抽出蛋白を用いて KIT あるいはリン酸化 KIT またはその両方の解析を行った。これらの解析は第 3 章と同様のウエスタンブロッティングにより行った。

KIT ユビキチン化の解析

KIT ユビキチン化の解析では、CoMS、rCoMS1、rCoMS1-condition A および rCoMS1-condition A(IM+48h) から免疫沈降により精製した KIT を用いた。これらの細胞を PBS で 2 回洗浄した後、細胞溶解緩衝液を加えて氷上で 5 分間静置した。その後、29G 注射針付きシリンジで数回吸引して細胞を粉砕した。この細胞溶解液を遠心した後、可溶性蛋白質を含む上清を回収した。抽出した蛋白質溶解液にウサギ抗ヒト c-kit ポリクローナル抗体 (Dako) 5 μ g を加え 4 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後、Protein G Agarose (50%スラリー ; Invitrogen) 20 μ l を加え、さらに 4 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。その後、細胞溶解緩衝液で洗浄し、泳動用緩衝液を加えて 95 $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸した。これにより Protein G Agarose から遊離した蛋白を KIT として使用した。精製した KIT のユビキチン発現を第三章と同様のウエスタンブロッティングにより解析した。一次抗体にヤギ抗ヒト c-kit ポリクローナル抗体 (Santa Cruz) またはウサギ抗マウス Ubiquitin ポリクローナル抗体 (Abcam) を用いた。二次抗体にビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (Life Technologies) または、ビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG

(Life Technologies) を用いた。

フローサイトメトリー解析

CoMS および rCoMS1 に 4%パラホルムアルデヒドを加え室温で 20 分間静置した。遠心により上清を除去した後、PBS で 2 回洗浄した。その後、PBS で希釈した PE 標識ラット抗 c-kit (clone ACK45; BD Pharmingen, San Diego, CA) を加えて室温で 60 分間静置した。この反応液を遠心して上清を除去した後、PBS で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を PBS に浮遊させ、フローサイトメトリーにて細胞表面の KIT を解析した。アイソタイプコントロールには、PE 標識ラット IgG₂κ (BD Pharmingen) を用いた。また、上記の操作で PBS の代わりに Permeabilization Buffer (eBioscience) を用いて細胞膜透過処理を行い、同様に KIT の解析を行った。

細胞増殖抑制試験

各株化細胞を 96 ウェルプレートに 2×10^4 個/well で播種し、第 3 章と同様の方法で解析した。

結果

KIT の過剰発現機構の解析

CoMS および rCoMS1 における *KIT* mRNA の発現レベルを Fig 4-1A に示した。これらの細胞において、*KIT* mRNA の発現に差は認められなかった。Fig 4-1B に CHX 処理による rCoMS1 および rCoMS1 の *KIT* 発現レベルの変化を示した。CoMS では CHX 処理後 60 分で明らかに *KIT* の発現が減少し、120 分ではほとんど消失していた。一方、rCoMS1 では CHX 処理後 120 分で *KIT* の発現はわずかに減少したのみであり、CoMS に比べて *KIT* の分解が遅延していた。

rCoMS1 の *KIT* 発現レベルにおよぼすイマチニブの影響

rCoMS1 をイマチニブ非存在下で培養すると、経時的に *KIT* の発現が減少し、14 日以降は CoMS と同じ発現程度となった (Fig. 4-2A 左)。また、rCoMS1 をイマチニブ非存在下で 14 日培養した後 (rCoMS1-condition A) にイマチニブを加えると、イマチニブ添加後 24 時間から明らかな *KIT* の発現の増加が見られ、その後経時的に増加した (Fig. 4-2A 右)。Fig 4-2B に CHX 処理による rCoMS1-condition A およびイマチニブ添加後 48 時間の rCoMS1-condition A (rCoMS1-condition A [IM+48h]) の *KIT* 発現レベルの変化を示した。rCoMS1-condition A では、CHX 処理後 60 分以降に *KIT* の発現が減少したが、rCoMS1-condition A (IM+48h) では *KIT* の発現の減少は認められなかった (Fig 4-2B)。rCoMS1-condition A および rCoMS1-condition A (IM+48h) における *KIT* mRNA 発現レベルに差は認められなかった (Fig 4-2C)。

KIT 分解機構の解析

Fig 4-3A に CoMS、rCoMS1、rCoMS1-condition A および rCoMS1-condition A (rCoMS1-condition A [IM+48h]) における KIT のユビキチン化状態を示した。CoMS および rCoMS1-condition A と比べ、rCoMS1 および rCoMS1-condition A(IM+48h) では明らかに KIT のユビキチン化が減少していた。さらに、ユビキチン化の変化に伴う KIT の発現レベルと局在の変化を調べるため、CoMS と rCoMS1 を用いて KIT のフローサイトメトリー解析を行った (Fig 4-3B)。CoMS に比べ、rCoMS1 では KIT の発現が増加しており、そのほとんどは細胞膜に局在することが示された。

rCoMS1-condition A および rCoMS1-condition A(IM+48h) のイマチニブ感受性の解析

rCoMS1-condition A と rCoMS1-condition A (IM+48h) のリン酸化 KIT に対するイマチニブの影響を検討したところ (Fig 4-5A)、rCoMS1-condition A の KIT のリン酸化はイマチニブ用量依存性に抑制され、0.1 μM 以上でその抑制は顕著であった。一方、rCoMS1-condition A (IM+48h) ではリン酸化 KIT の抑制はほとんど見られず、高いレベルのリン酸化を維持していた。イマチニブを用いた rCoMS1-condition A と rCoMS1-condition A (IM+48h) の増殖抑制試験の結果を(Fig 4-5B) に示した。rCoMS1-condition A の増殖はイマチニブにより抑制され、CoMS と同程度のイマチニブ感受性が認められた (IC₅₀: rCoMS1-condition A, $0.043 \pm 0.023 \mu\text{M}$; CoMS, $0.038 \pm 0.022 \mu\text{M}$)。一方、これに比べて rCoMS1-condition A (IM+48h) は明らかにイマチニブ抵抗性を示し、rCoMS1 と同程度の感受性であった(IC₅₀: rCoMS1-condition A [IM+48h], $9.45 \pm 2.85 \mu\text{M}$, rCoMS1, $9.00 \pm 2.73 \mu\text{M}$)。

考察

CoMS と rCoMS1 における *KIT* mRNA の発現量に差は認められず、なかったが、CHX で蛋白合成を阻害すると rCoMS1 では *KIT* の分解遅延が起こることが示された。このことから、rCoMS1 で見られた *KIT* の過剰発現は、遺伝子増幅や転写活性の亢進に基づく *KIT* mRNA の増加によるのではなく、*KIT* の分解遅延によって細胞内あるいは細胞膜上に *KIT* が蓄積した結果であることが明らかとなった。また、この rCoMS1 における *KIT* の分解遅延とそれによる過剰発現は、イマチニブの有無に伴って可逆性に起こることが示された。さらに、この可逆性の変化には *KIT* mRNA の発現量の変化を伴わないことも示された。したがって、rCoMS1 における *KIT* の過剰発現は、イマチニブに対する反応性の変化であり、*KIT* の細胞内動態の変化により生じることが明らかとなった。

rCoMS1 ではイマチニブによって *KIT* の分解遅延が生じていることが示されたが、このような *KIT* の分解過程に障害をもたらす変化には、*KIT* のユビキチン化の減少や脂質ラフトの異常によるエンドソームへの取り込みの減少、あるいはエンドソームやリソソームの機能異常といった分子機構が考えられる。rCoMS1 ではイマチニブを除去した後 7-14 日で *KIT* の減少が見られ、再度イマチニブを加えた後 24-48 時間で速やかに増加した。このような短時間での可逆性の変化は、脂質ラフトの異常やエンドソーム・リソソームの機能障害といった変化で起こるとは考えにくく、*KIT* ユビキチン化の酵素反応が可逆的に抑制された結果と考えられた。そこで、CoMS における *KIT* のユビキチン化を解析したところ、*KIT* の発現が少ない CoMS と rCoMS1-condition A では *KIT* がユビキチン化しているのに対して、*KIT* が過剰に発現している rCoMS1 と rCoMS1-condition A(IM+48h)では明らかに *KIT* のユビキチン化が減少していた。さらに、CoMS に比べて rCoMS1 では *KIT* の細胞表面での発現が増加していた。これらのことから考えられる rCoMS1 における *KIT* の過剰発現メカニズ

ムを Fig. 4-4 に示した。KIT は通常細胞膜で 2 量体を形成して活性化した後、ユビキチンの修飾を受ける。その後、ユビキチン化 KIT のみがエンドサイトーシスにより細胞内に移行してリソソームで分解される[37]。イマチニブは CoMS の KIT ユビキチン化を可逆的に抑制し、その結果、エンドサイトーシスを介した KIT 取り込みとそれに続くリソソームでの分解が減少し、細胞膜上の KIT が増加したと考えられた。

rCoMS1 における KIT の過剰発現がイマチニブに対する反応性の変化であることは明らかとなったが、この KIT の過剰発現が CoMS のイマチニブ耐性化の主因であるかどうかは確かでない。そこで、イマチニブを除去し KIT の発現が低下した rCoMS1-condition A とその後にイマチニブを添加し KIT が過剰に発現した rCoMS1-condition A(IM+ 48 h) を用いてイマチニブに対する感受性を比較したところ、rCoMS1-condition A では明らかな KIT リン酸化の抑制と細胞増殖の抑制が見られたが、rCoMS1-condition A(IM+ 48 h) ではいずれの抑制も見られなかった。このことから、KIT の過剰発現は、CoMS のイマチニブ耐性化において中心的な役割を果たすことが明らかとなった。

以上から、rCoMS1 ではイマチニブにより KIT のユビキチン化が抑制され、その結果、KIT の分解が遅延し細胞膜上に KIT を過剰に発現していることが示された。さらに、この KIT の過剰発現が CoMS のイマチニブ耐性化の主な原因であることが明らかとなった。

小括

rCoMS1 で認められた KIT 過剰発現の分子機構とイマチニブ耐性化における役割を明らかにすることを目的とした。

KIT 分解能の解析により、rCoMS1 で見られた KIT の過剰発現は KIT の分解遅延によって KIT が蓄積した結果であることが明らかとなった。さらに、この反応はイマチニブの有無に伴って可逆性に起こることから、rCoMS1 における KIT の過剰発現は、イマチニブに対する反応性の変化であり、KIT の細胞内動態の変化により生じると考えられた。

rCoMS1 における KIT のユビキチン化の解析において、KIT の発現が少ない細胞では KIT がユビキチン化しているのに対して、KIT が過剰に発現している細胞では KIT のユビキチン化が明らかに減少していた。さらに、KIT の過剰発現は細胞表面で認められたことから、rCoMS1 で認められた KIT の可逆性の過剰発現はイマチニブにより KIT ユビキチン化を可逆的に抑制し、その結果、細胞膜上で KIT が増加したと考えられた。

rCoMS1 における KIT リン酸化の解析とイマチニブの細胞増殖抑制試験により、KIT 発現がわずかである細胞ではイマチニブによる明らかな KIT リン酸化の抑制と細胞増殖の抑制が見られたが、KIT 発現が過剰に増加した細胞ではいずれの抑制も見られなかった。このことから、KIT の過剰発現は、CoMS のイマチニブ耐性化において中心的な役割を果たすことが明らかとなった。

以上から、rCoMS1 ではイマチニブによって KIT のユビキチン化が抑制され、その結果、KIT の分解が遅延し細胞膜上に KIT を過剰に発現していることが示された。さらに、この KIT の過剰発現が CoMS のイマチニブ耐性化の主な原因であることが明らかとなった。

表および図

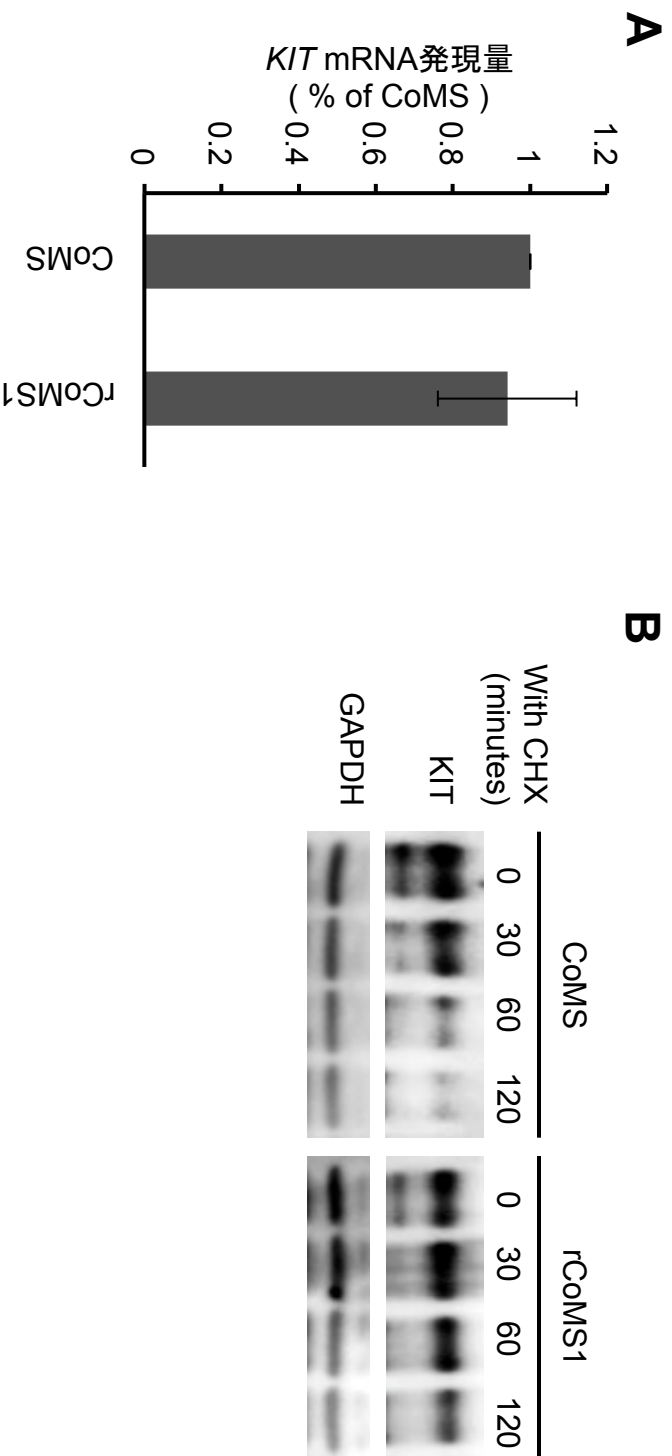


Fig. 4-1 KIT過剰発現機構の解析

(A) CoMSおよびrCoMS1におけるKITのmRNA発現量を解析した。独立して3回行ない各サンプルのmRNA発現量はβ-actinのmRNA発現量により標準化してCoMSのKITのmRNAの発現量を1.0とした。CoMSおよびrCoMS1のKIT mRNA発現量に差は認められなかった。(B) CoMSおよびrCoMS1におけるKIT分解能を解析した。蛋白合成阻害剤 cycloheximide (CHX) を50 mg/ml加え培養を行いKIT発現の経時的変化をウエスタンブロットイングにより解析した。CoMSでは培養60分でKITの減少が認められたが、rCoMS1では培養60分でKITの減少は見られなかった。

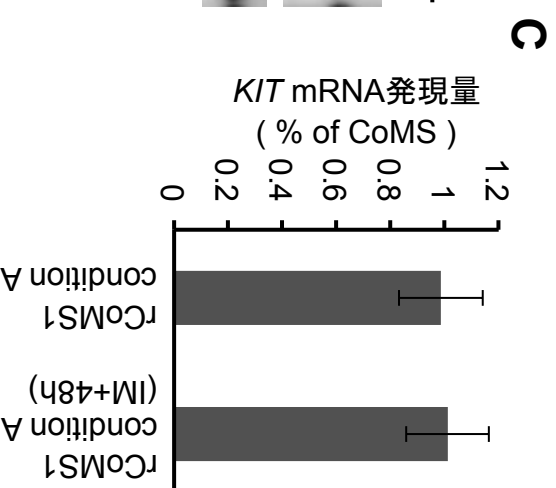
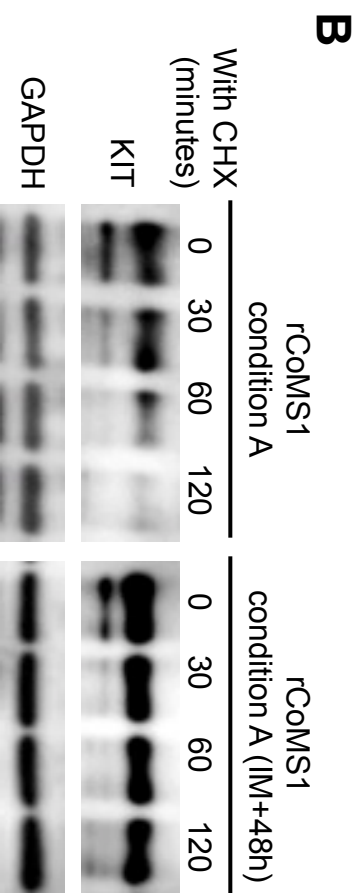
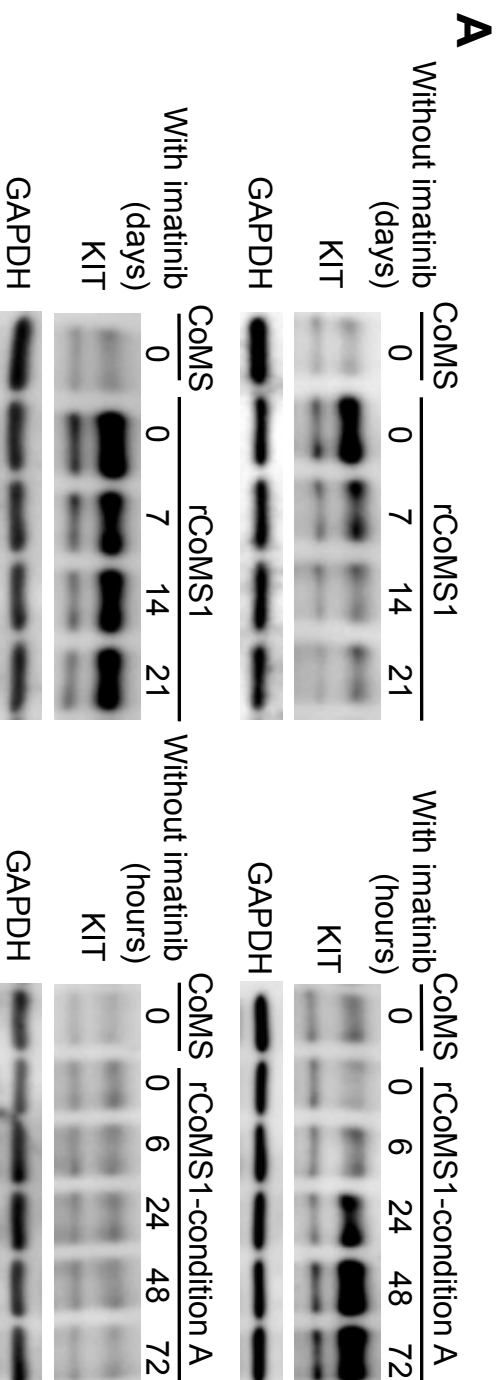


Fig. 4-2 イマチニブによるKIT発現、KIT分解能の変化およびKIT mRNA発現
 (A) 各株化細胞をイマチニブ非存在下 (0 μ M) または存在下 (1 μ M) で培養を行い、KIT発現の経時的変化をウエスタンブロットにより解析した。(B) 各株化細胞におけるKIT分解能を解析した。rCoMS1-condition Aでは培養60分でKIT発現低下が認められたがrCoMS1-condition A (IM+48h)では培養60分でKITの減少は見られなかった(C) 各株化細胞におけるKITのmRNA発現量を解析した。rCoMS1-condition AおよびrCoMS1-condition A (IM+48h)ではKIT mRNA発現量に差は認められなかった

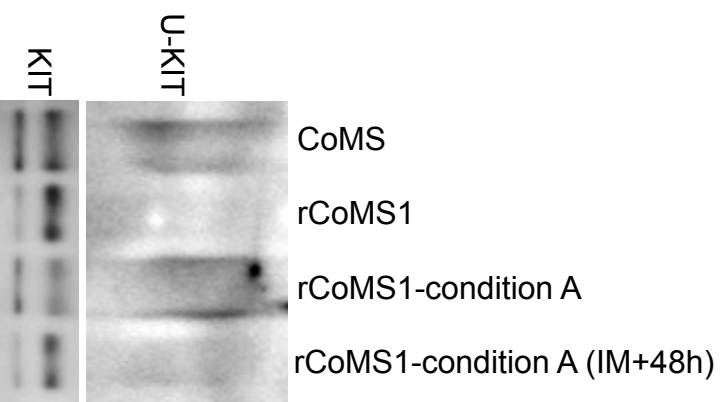
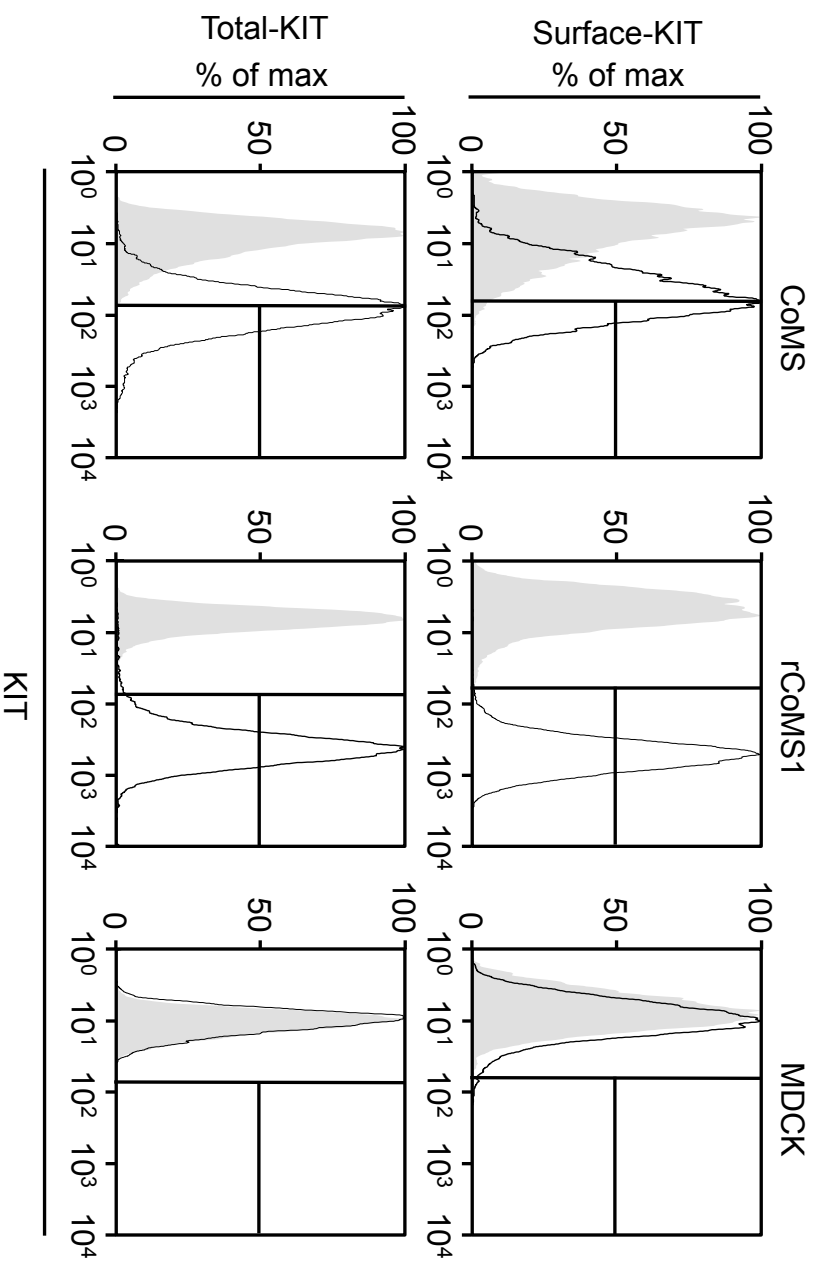
A**B**

Fig. 4-3 ユビキチン化KITとKIT発現部位の解析

(A) 各株化細胞からKITを免疫沈降により精製してKITのユビキチン化(U-KIT)をウエスタンブロット法により解析した。rCoMS1およびrCoMS1-condition A(IM+48h)でU-KITの減少が認められた。(B) 細胞膜上に発現したKITまたは細胞膜上および細胞内に発現したKITをフローサイトメトリーにより解析した。無色のピークは抗KIT抗体で染色した細胞で、灰色のピークはアイソタイプコントロール抗体で染色した細胞を示している。また、ネガティブコントロールとしてMDCKを用いた。rCoMS1において細胞膜上でKITの発現増加が認められた。

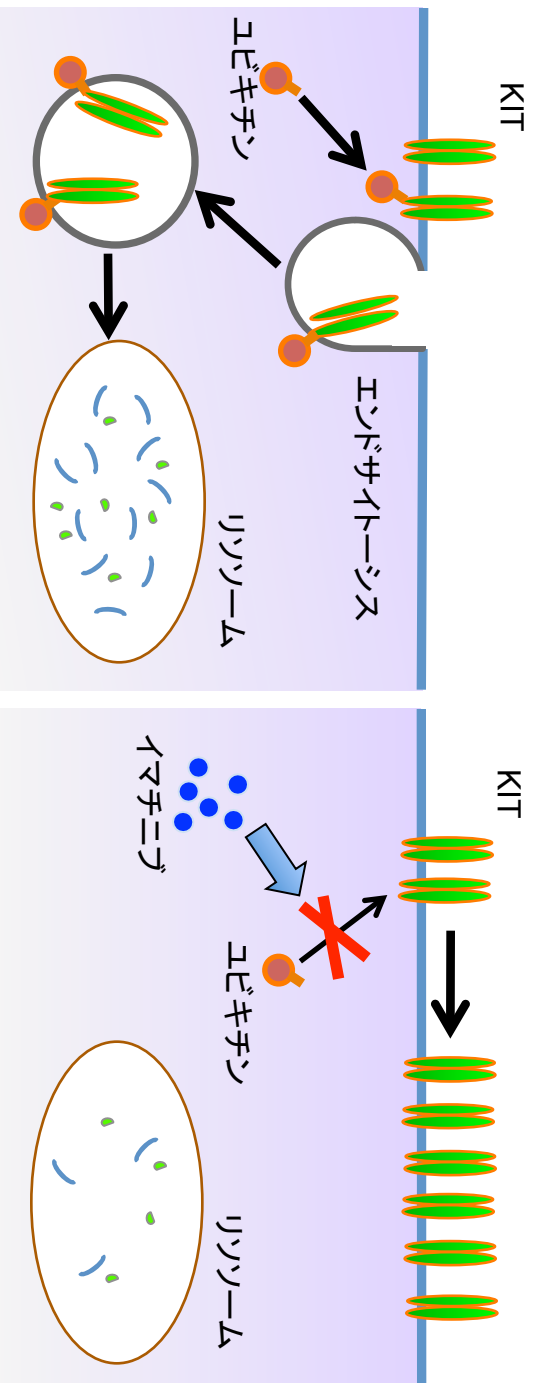


Fig. 4-4 KIT過剰発現メカニズム
細胞膜に発現したKITは2量体を形成して活性化した後ユビキチンの修飾を受ける。その後、ユビキチン化KITがエンドサイトーシスにより細胞内に移行してリソソームで分解される。一方、イマチニブに反応してKITのユビキチン化が減少する為、KITはエンドサイトーシスされず細胞膜にとどまる。その結果、リソソームで分解されず細胞膜上でKITの発現が増加する。

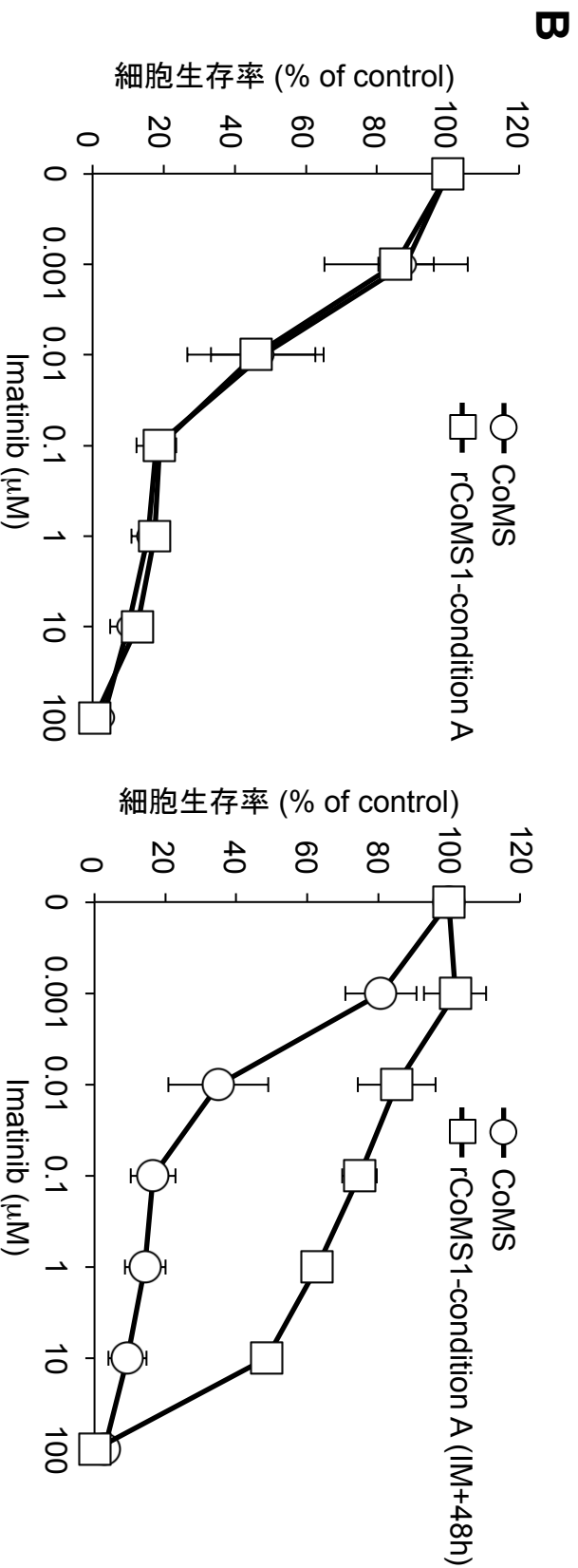
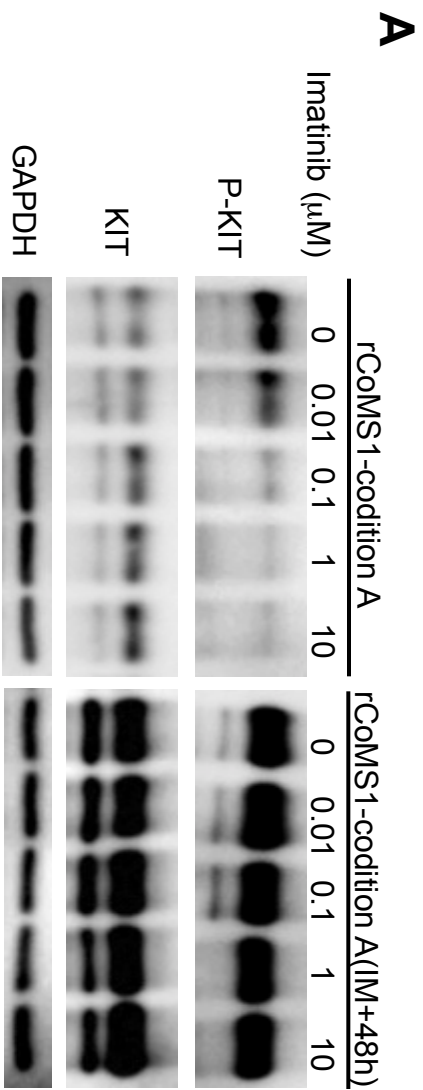


Fig. 4-5 イマチニブによるKITリン酸化に及ぼす影響と細胞増殖抑制試験

(A) rCoMS1-condition AおよびrCoMS1-condition A (IM+48h) のリン酸化KIT (P-KIT) に及ぼすイマチニブの影響をウエスタンブロット法により解析した。イマチニブは用量依存性にrCoMS1-condition AのP-KITを抑制し、0.1 μM 以上でその抑制は顕著であった。rCoMS1-condition A (IM+48h) ではP-KITの抑制はわずかであり、10 μM でも高いレベルのP-KITを維持していた。(B) イマチニブによる細胞増殖抑制試験を行った。rCoMS1-condition AはCoMSと同様のイマチニブ感受性を示したが、rCoMS1-condition A (IM+48h) はCoMSと比べイマチニブに抵抗性を示した。

第 5 章

VI-MC におけるイマチニブ耐性化機構の解析

第3章において、rVI-MC1 および rVI-MC10 で *KIT* に二次変異が同定され、この二次変異は VI-MC のイマチニブ耐性化と密接に関連していると考えられた。しかしながら、第3章では VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 における *KIT* のリン酸化状態とイマチニブの影響を解析しているのみであり、必ずしもこの二次変異がイマチニブ耐性化の原因と特定できたわけではない。VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 における *KIT* の一次および二次変異はヘテロ変異であるため、細胞に発現している *KIT* には野生型と変異型が混在していると考えられる。また、VI-MC は SCF を分泌することから[44]、これらの細胞ではオートクライン・パラクラインによる *KIT* リン酸化の制御も受けると考えられる。このため、同定した *KIT* の二次変異がイマチニブ耐性化の原因であるか否かを明らかにする上では、SCF 非産生性で *KIT* を発現していない細胞に *KIT* 組み換え蛋白を発現させ、この細胞を用いて *KIT* のリン酸化におよぼす二次変異の影響とイマチニブに対する反応を調べる必要がある。

一方、rVI-MC10 では、*KIT* の二次変異に依存しないイマチニブ耐性機構が存在することが示され、*KIT* 下流のキナーゼの再活性化や他のキナーゼ経路の活性化などにより耐性を獲得している可能性が考えられた。*KIT* をはじめ多くの細胞増殖にかかわるキナーゼのシグナルは、主に ERK、STAT3 あるいは AKT、またはそれらのいくつかを介して伝達されることから[45]、rVI-MC10 ではこれらを介したシグナル伝達経路に何らかの変化が生じていることが考えられる。

そこで本章では、rVI-MC1 および rVI-MC10 で同定された *KIT* 二次変異のイマチニブ耐性化における役割と rVI-MC10 におけるイマチニブ耐性化機構を明らかにするため、まず、*KIT* に一次変異あるいは二次変異またはその両方を組み込んだ組み換え蛋白を 293 細胞に発現させ、*KIT* のリン酸化におよぼす二次変異の影響とイマチニブに対する反応を検討した。次いで、VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 における ERK、STAT3 および AKT のリン酸化状態を評価し、増殖シグナル伝達経路の変化について解析した。

材料と方法

細胞

実験には 293 細胞を用いた。293 細胞は 10%非動化牛胎子血清 (FCS; Nippon Bio-supply Center)、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Invitrogen) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM 培地; Invitrogen) で、37°C、5 %CO₂ の湿潤環境下で培養した。

Hemagglutinin (HA) タグ付加 KIT (KIT-HA) 発現ベクターの作製

まず健常犬の末梢血単核球から抽出した total RNA を鋳型として *KIT* の CDS の全長配列を RT-PCR により増幅した。得られた *KIT* の増幅産物を pc.2.1R TOPO ベクターに組み込んだ後、このベクターを鋳型として *Kpn I* (Takara)を含む上流プライマーと HA と *Not I* (Takara) の配列を含む下流プライマーを用いて *KIT* の CDS の全長配列を PCR 増幅した。得られた増幅産物を *Kpn I* および *Not I* で切断し、pcDNA3.1 (+) ベクターの *Kpn I* および *Not I* サイトに組み込んだ。これを野生型 KIT-HA 発現ベクターとした。さらに、KOD-plus mutagenesis kit (Takara) を用いて、c.1523A>T、c.2443G>C あるいはその両方の変異を野生型 KIT-HA 発現ベクターに組み込み、変異型 KIT-HA 発現ベクターとした。

遺伝子導入

Poly-L-Lysine (Sigma) で処理した 6 ウェルプレートに 293 細胞を 5×10^5 個/well になるように播種し、DMEM 培地で 12 時間培養した。その後、野生型 KIT-HA あるいは変異型 KIT-HA 発現ベクター 1 μ g と FuGene6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 3 μ l を FCS 無添加の DMEM 97 μ l に加えて混合した後、この混合溶液を培地に添加することで 293 細胞に KIT-HA 発現ベクターを導入した。

KIT-HA の精製

KIT-HA 発現ベクターを導入した 293 細胞を DMEM 培地で 12 時間培養した後、上清を除去し FCS 無添加の DMEM 培地を加えた。さらに、12 時間培養した後、犬組み換え SCF (R&D system, Minneapolis, MN) (100 ng/ml) あるいはイマチニブ (0.01、0.1、1 あるいは 10 μ M) を添加した。SCF を添加した 10 分後あるいはイマチニブを添加した 90 分後に細胞を PBS で 2 回洗浄し、細胞溶解緩衝液を各ウェルに加えて 5 分間氷上で静置した。その後、セルスクレーパーで細胞を搔爬し、細胞溶解液とともに回収した。回収したサンプルを 29G 注射針付きシリンジで数回吸引して細胞を破砕した。この細胞溶解液を遠心した後、可溶性蛋白質を含む上清を回収した。その後、回収した細胞溶解液にマウス抗 HA モノクローナル抗体 (Clone HA-7; Sigma-Aldrich) 0.8 μ g を加え 4°C で 60 分間静置した後、Protein G Agarose (50%スラリー ; Invitrogen) 20 μ l を加え、さらに 4°C で 2 時間静置した。その後、Protein G Agarose を細胞溶解緩衝液で洗浄し、泳動用緩衝液を加えて 95°C で 5 分間煮沸した。これにより Protein G Agarose から遊離した蛋白質を KIT-HA として使用した。

ウエスタンブロットティング

V-MC、rVI-MC1 あるいは rVI-MC10 を 6 ウェルプレートに 5×10^5 個/well なるように播種し FCS 非添加の RPMI 培地で 24 時間培養した。その後、ダサチニブ (LC Laboratories, Woburn, MA) (10 μ M)、イマチニブ(10 μ M) あるいは U0126 (Sigma-Aldrich) (5 μ M) を各ウェルに添加し、24 時間培養した。その後、細胞を溶解・回収し、遠心分離により可溶性蛋白質画分を得た。ここに泳動用緩衝液を加え 95°C で 5 分間煮沸し、ウエスタンブロットティングによる解析に用いた。ウエスタンブロットティングは第 3 章と同様の方法で行った。1 次抗体には P-Tyr 検出キット (Clone 2C8、3B12、9H8、16F4; Calbiochem)、ヤギ抗ヒト KIT 抗

リクローナル抗体 (Invitrogen)、ウサギ抗ヒト phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) ポリクローナル抗体 (Cell Signaling)、ウサギ抗ラット p44/42 MAPK (ERK1/2) ポリクローナル抗体 (Cell Signaling)、ウサギ抗マウス phospho-AKT (Ser473) ポリクローナル抗体 (Cell Signaling)、ウサギ抗マウス AKT ポリクローナル抗体 (Cell Signaling)、ウサギ抗マウス phospho-STAT3 (Tyr705) ポリクローナル抗体 (Cell Signaling)、ウサギ抗マウス STAT3 ポリクローナル抗体 (Cell Signaling) または、ヤギ抗ヒト GAPDH ポリクローナル抗体 (Santa Cruz) を用いた。二次抗体にはビオチン標識ウサギ抗マウス IgG (Invitrogen) または、ビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (Life Technologies) または、ビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG (Life Technologies) を用いた。

結果

KIT-HA のリン酸化におよぼす KIT 変異の影響

KIT-HA のリン酸化におよぼす KIT 変異の影響を Fig. 5-1 に示した。野生型 KIT-HA は SCF 存在下でのみでリン酸化した。一方、KIT に一次変異のみ (c.1523A>T)、二次変異のみ (c.2443G>C) またそれら両方 (c.1523A>T、c.2443G>C) を持つ変異型の KIT-HA は、いずれも SCF の有無にかかわらずリン酸化しており、SCF によるリン酸化の制御は見られなかった。

変異型 KIT-HA のリン酸化におよぼすイマチニブの影響

KIT に一次変異 (c.1523A>T) のみを持つ変異型 KIT-HA のリン酸化は、イマチニブ濃度依存性に抑制され、とくに 1 μ M 以上で顕著であった (Fig. 5-2A)。一方、KIT に二次変異 (c.2443G>C) のみを持つ KIT-HA と一次変異と二次変異を同時に持つ KIT-HA のリン酸化は、いずれもイマチニブ 1 μ M ではほとんど抑制されず、10 μ M で抑制された (Fig. 5-2A)。Fig. 5-2B にこれらのバンドの濃さを数値化しグラフにしたものを示した。一次変異のみを持つ変異型 KIT-HA では、0.1 μ M 以上のイマチニブで有意なリン酸化の抑制が見られた ($P < 0.05$ あるいは $P < 0.01$ vs. 0 μ M)。一方、二次変異のみ持つ KIT-HA と一次変異と二次変異を同時に持つ KIT-HA は、いずれも 10 μ M のイマチニブでのみ有意な ($P < 0.05$ vs. 0 μ M) リン酸化の抑制が見られた。

ERK、AKT および STAT3 のリン酸化におよぼすイマチニブの影響

VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 における ERK、AKT および STAT3 のリン酸化におよぼすイマチニブの影響をウェスタンブロッティングにより検討した (Fig. 5-3)。ERK は

VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 のいずれにおいてもリン酸化していたが、これらの細胞株では AKT および STAT3 のリン酸化は見られなかった。ERK のリン酸化は、VI-MC では 1 μ M 以上のイマチニブで、rVI-MC1 では 10 μ M のイマチニブで抑制された。一方、rVI-MC10 では、10 μ M のイマチニブでも ERK のリン酸化は抑制されなかった。

KIT および ERK のリン酸化および SFK/KIT 阻害剤ダサチニブの影響

SFK は ERK のリン酸化を起こすキナーゼであることから、ERK および KIT のリン酸化に対する SFK 阻害剤ダサチニブの影響を調べた。ダサチニブ存在下および非存在下における VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 の KIT および ERK のリン酸化状態の変化を Fig. 5-4 に示した。ダサチニブは全ての細胞株における KIT のリン酸化を抑制した。一方、ERK のリン酸化は VI-MC および rVI-MC1 のみで抑制され、rVI-MC10 における ERK のリン酸化は抑制されなかった。

rVI-MC10 の ERK リン酸化におよぼす MEK 阻害剤 U01265 の影響

MEK は ERK 経路において ERK を直接活性化するキナーゼであることから、ERK のリン酸化におよぼす MEK 阻害剤 U01265 の影響を検討した (Fig. 5-5)。また、その上流の KIT シグナルを遮断するためイマチニブと組み合わせて用いた。rVI-MC10 において、ERK はイマチニブの有無にかかわらずリン酸化していたが、U0126 はいずれの条件においても ERK のリン酸化を抑制した。

考察

293細胞を用いたKIT組み換え蛋白の解析から、二次変異 (c.2443G>C) は単独でも、あるいは一次変異 (c.1523A>T) と同時に存在してもSCF非存在性のKITリン酸化を引き起こすことが示された。二次変異のみを持つKITは一次変異のみを持つKITに比べてイマチニブ感受性が低く、また、一次変異を持つKITに二次変異を付加するとKITのイマチニブ感受性が低下することが示された。これらのことから、rVI-MC1およびrVI-MC10で生じたKITの二次変異は、KITのイマチニブ感受性を低下させる機能獲得性の変異であり、VI-MCにおけるイマチニブ耐性化の原因の一つであることが明らかとなった。

KITの二次変異はVI-MCのイマチニブ耐性化の一因であるが、第3章で示されたようにrVI-MC10にはそれとは異なる耐性機構が存在すると考えられる。そこで、VI-MC、rVI-MC1、およびrVI-MC10におけるKITの下流シグナル伝達分子ERK、AKTおよびSTAT3の活性化状態を比較した。その結果、いずれの細胞株でもKITはERKを介して増殖シグナルを伝達していると考えられ、VI-MCおよびrVI-MC1ではイマチニブによってこのERKが抑制されることが示された。一方、rVI-MC10におけるERKのリン酸化は、KITのリン酸化を抑制する濃度のイマチニブ (10 μ M) でも抑制されなかった。したがってrVI-MC10では、ERKを活性化する何らかのキナーゼが代償的に活性化することでERKのリン酸化が維持される、あるいはERK自体が恒常的にリン酸化することによりイマチニブ存在下での細胞増殖が保たれていると考えられた。

ERKは様々なキナーゼにより活性化するが、その一つとしてSrc family kinase (SFK) が知られている[42]。また、人のGIST株化細胞およびGISTのマウスモデルでは、イマチニブはFyn、Src、Lyn といったSFKのリン酸化を誘導することが報告されている[40,41]。これらのことから、rVI-MC10ではイマチニブによるSFKの活性化を介してERKが活性化している

可能性が考えられた。そこで、SFK/KITの阻害剤であるダサチニブ影響を検討したが、ダサチニブはKITのリン酸化のみ抑制しERKのリン酸化は抑制しなかった。従って、rVI-MC10におけるERKの活性化は、SFKの活性化を介したものではないと考えられた。一方、ランダム変異導入によるERKの機能解析により、特定の遺伝子変異が挿入されたERKでは自律的にリン酸化することが知られている[43]。しかしながら rVI-MC10において、ERKを直接活性化するキナーゼMEKをU0126で阻害すると、ERKのリン酸化は明らかに減少した。このことから、rVI-MC10におけるERKのリン酸化は、ERKの自律的なリン酸化が原因ではないと考えられた。

以上のことから、rVI-MC1およびrVI-MC10において同定されたKITの二次変異は、VI-MCのイマチニブ耐性化の一因であることが明らかとなった。さらに、この二次変異を持つKITのリン酸化は高濃度のイマチニブでは抑制されるが、そのような濃度のイマチニブに暴露されたVI-MCでは、KITおよびSFKとは異なる経路によってERKが活性化し、イマチニブに対する耐性を獲得すると考えられた。

小括

rVI-MC1 および rVI-MC10 で同定された *KIT* 二次変異のイマチニブ耐性化における役割と rVI-MC10 のイマチニブ耐性化機構を明らかにすることを目的とした。

293 細胞を用いた *KIT* 組み換え蛋白の解析から、この二次変異は SCF 非存在性の *KIT* リン酸化を引き起こすことが示された。また、この二次変異を持つ *KIT* のイマチニブ感受性は、一次変異のみを持つ *KIT* に比べて低いことも示された。したがって、rVI-MC1 および rVI-MC10 で生じた *KIT* の二次変異は、*KIT* のイマチニブ感受性を低下させる機能獲得性の変異であり、VI-MC におけるイマチニブ耐性化の原因の一つであることが明らかとなった。

VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 を用いたシグナル伝達経路の解析では、全ての細胞株で ERK のリン酸化が見られた。VI-MC と rVI-MC1 の ERK リン酸化は高濃度のイマチニブによって抑制されたが、rVI-MC10 では抑制されなかった。したがって、rVI-MC10 は高濃度のイマチニブ存在下においても ERK のリン酸化が維持されることで細胞増殖が保たれていると考えられた。さらに、rVI-MC10 の ERK のリン酸化は、SFK/*KIT* 阻害剤では抑制されず、MEK 阻害剤で抑制されたことから、この ERK のリン酸化は、SFK の活性化や ERK の自律的な活性化により生じたものではないと考えられた。

以上のことから、rVI-MC1 および rVI-MC10 において同定された *KIT* の二次変異は、VI-MC のイマチニブ耐性化の一因であることが明らかとなった。さらに、高濃度のイマチニブに暴露された VI-MC では、*KIT* および SFK とは異なる経路によって ERK が活性化し、イマチニブに対する耐性を獲得すると考えられた。

表および図

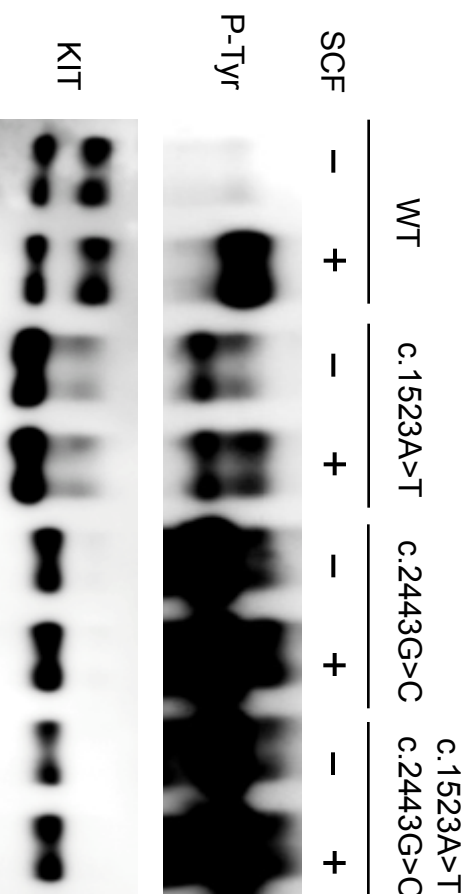
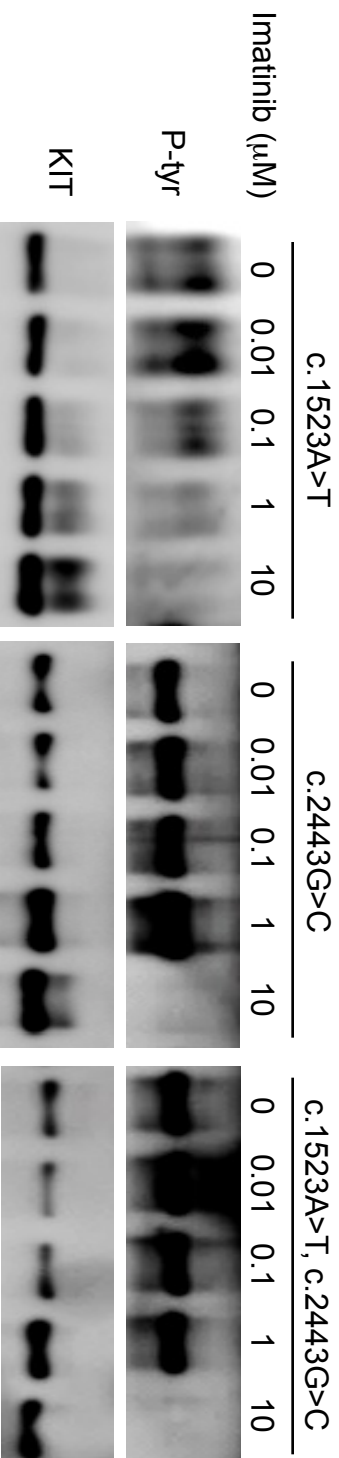
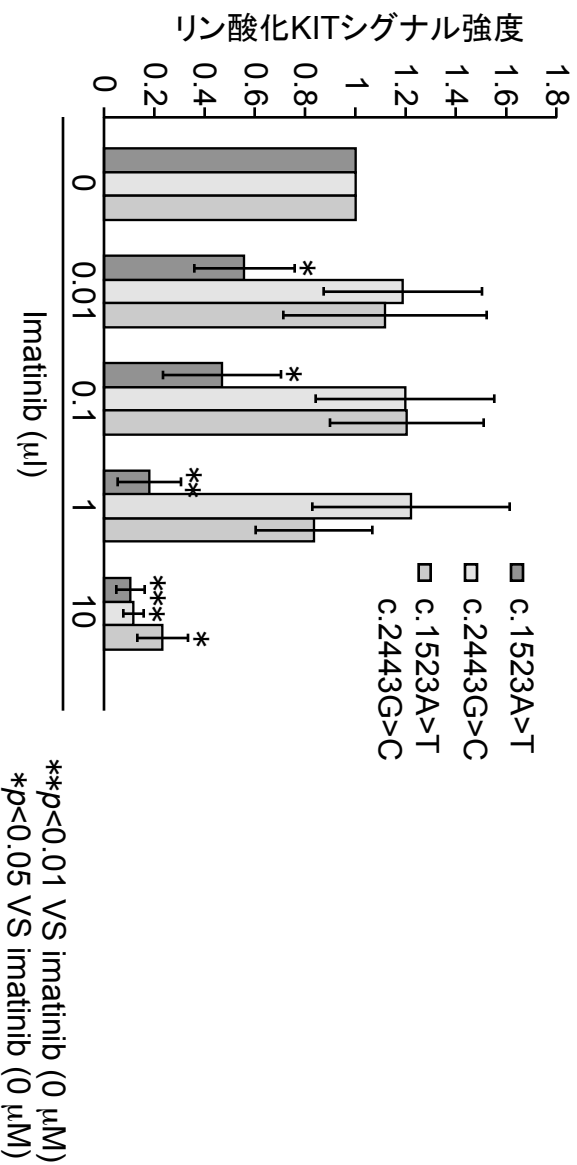


Fig. 5-1 KITリノ酸化の解析
 KIT-HAのリノ酸化におよぼすKIT変異の影響を示した。野生型KIT-HAはSCF存在下でのみでリノ酸化 (P-Tyr) した。一方、KITに一次変異のみ (c.1523A>T)、二次変異のみ (c.2443G>C) またそれら両方 (c.1523A>T、c.2443G>C) を持つ変異型のKIT-HAは、いずれもSCFの有無にかかわらずP-Tyrが認められた。

A**B**

** $p < 0.01$ VS imatinib (0 μM)
 * $p < 0.05$ VS imatinib (0 μM)

Fig. 5-2 変異型KIT-HAのリン酸化に及ぼすイマチニブの影響

(A) 変異型KIT-HAのリン酸化にイマチニブが及ぼす影響を示した。(B) バンドの濃さを数値化しグラフにした。*KIT*に一次変異 (c.1523A>T) のみを持つ変異型KIT-HAでは、0.1 μM 以上のイマチニブで有意なリン酸化の抑制が見られた ($P < 0.05$ あるいは $P < 0.01$ vs. 0 μM)。 *KIT*に二次変異 (c.2443G>C) を持つKIT-HAと一次変異と二次変異を同時に持つKIT-HAは、いずれも10 μM のイマチニブでのみ有意な ($P < 0.05$ vs. 0 μM) リン酸化の抑制が見られた。

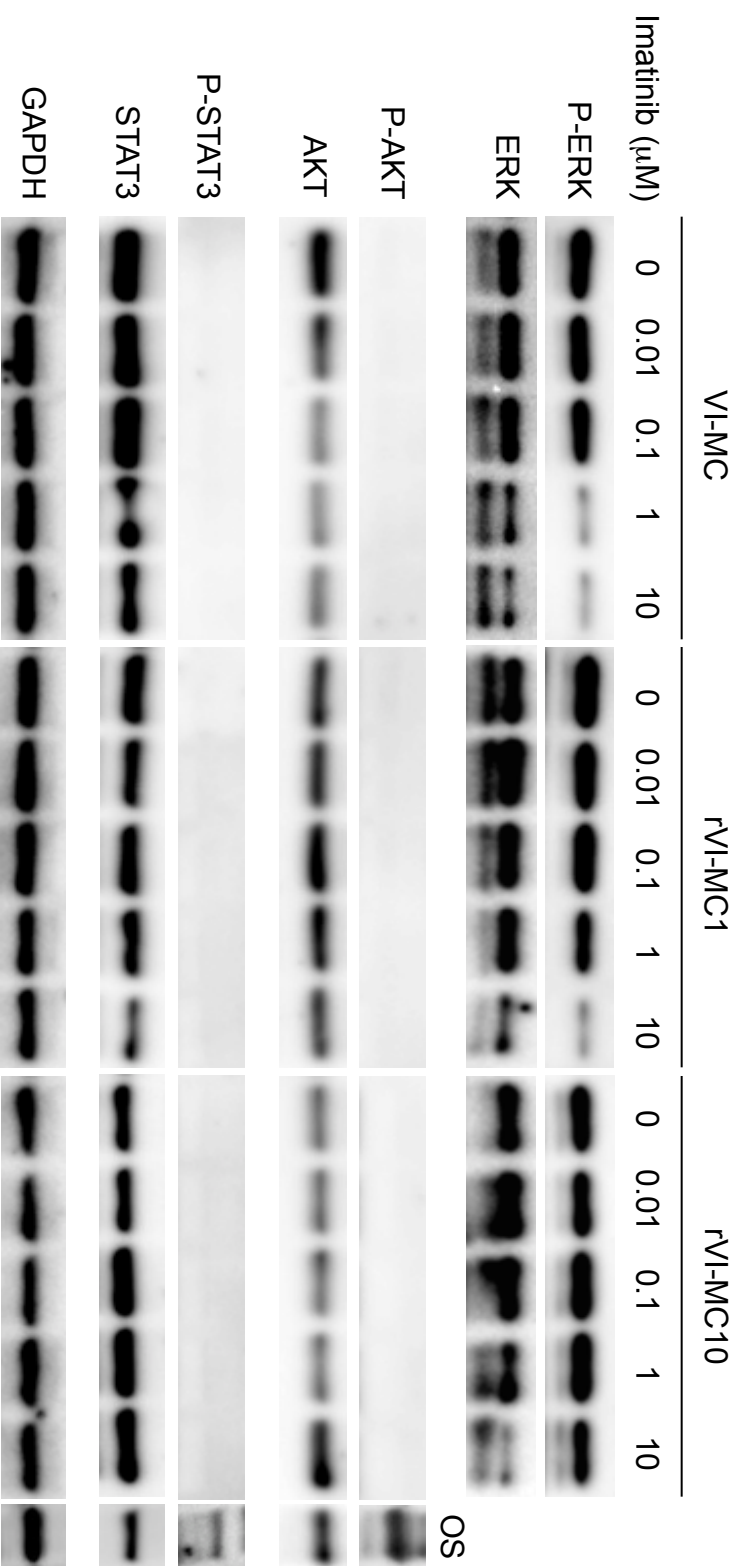


Fig. 5-3 KITの下流キナーゼにおけるイマチニブの影響

VI-MC、rVI-MC1およびrVI-MC10のKIT下流キナーゼのリン酸化 (P-ERK、P-AKTおよびP-STAT3) におよぼすイマチニブの影響をウエスタンブロット法により検討した。VI-MC、rVI-MC1およびrVI-MC10においてP-ERKが認められたが、P-AKTおよびP-STAT3は認められなかった。P-ERKは、VI-MCでは1 μM以上のイマチニブで、rVI-MC1では10 μMのイマチニブで抑制された。rVI-MC10では、10 μMのイマチニブでもP-ERKは抑制されなかった。犬の骨肉腫株化細胞 (OS) をP-AKTおよびP-STAT3のコントロールとして用いた。

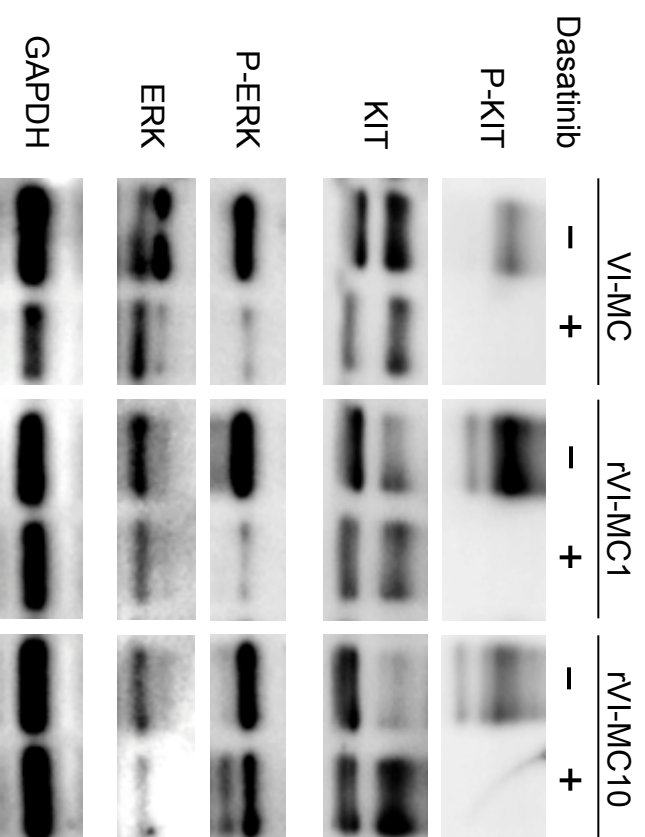


Fig. 5-4 VI-MC、rVI-MC1およびrVI-MC10のKITおよびERKのリン酸化に及ぼすSFK/KIT阻害剤ダサチニブの影響
 ダサチニブ存在下および非存在下におけるVI-MC、rVI-MC1およびrVI-MC10のP-KITおよびP-ERKの変化を示し
 た。ダサチニブは全ての細胞株におけるP-KITを抑制した。一方、ダサチニブはVI-MCおよびrVI-MC1のP-ERKは
 抑制したが、rVI-MC10におけるP-ERKは抑制しなかった。

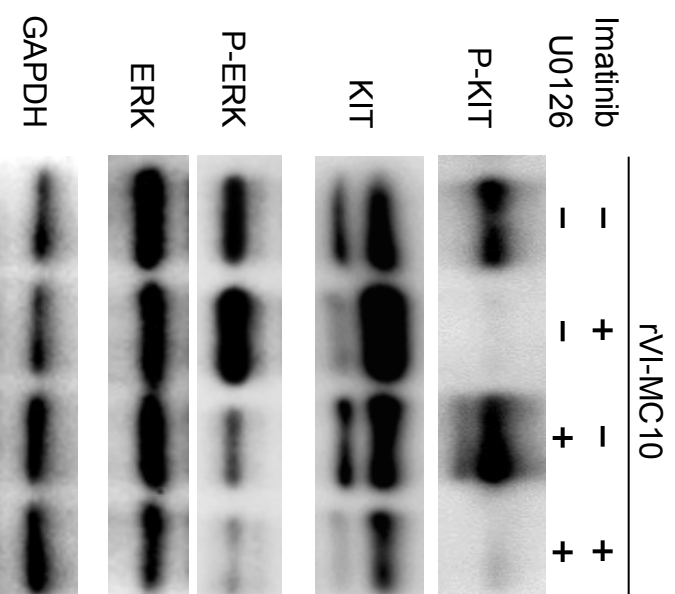


Fig. 5-5 rVI-MC10のERKリン酸化におよぼすMEK阻害剤U01265の影響
 rVI-MC10におけるERKのリン酸化 (P-ERK) に及ぼすMEK阻害U01265の影響を検討した。また、上流のKITシグナルを遮断するためイマチニブと組み合わせて用いた。イマチニブの有無にかかわらずP-ERKが認められたが、U01265はいずれの条件においてもP-ERKを抑制した。

第6章

総括

肥満細胞腫は犬の皮膚腫瘍の約 20%を占める発生頻度の高い悪性腫瘍である。臨床ステージあるいは組織学的グレードが高い症例には、しばしばビンブラスチンやロムスチンを中心とした化学療法が行われる。近年、これらの化学療法剤に加えて、膜型チロシンキナーゼ KIT を標的としたキナーゼ阻害剤イマチニブが新たな治療薬として用いられるようになった。

KIT は *KIT* にコードされる III 型の膜型チロシンキナーゼで、SCF のレセプターである。KIT は SCF が結合すると 2 量体化し、これにより、ATP が KIT に結合してチロシン残基がリン酸化する。その結果、下流の細胞内シグナル伝達系の活性化が起こり核内に増殖シグナルが伝達される。犬の肥満細胞腫では、約 26%の症例で腫瘍の *KIT* に体細胞突然変異が見られる。*KIT* に変異を持つ肥満細胞腫の症例では、KIT が恒常的にリン酸化しており、腫瘍細胞はこの KIT の増殖シグナルに依存して増殖する。

イマチニブは KIT の ATP 結合部位に結合し、KIT のリン酸化を阻害する分子標的薬である。このため、*KIT* に変異を持つ犬の肥満細胞腫では、イマチニブの強力な抗腫瘍効果が見られる。一方、イマチニブによる治療では、治療初期に著しい腫瘍の退縮が見られるが、最終的にほとんどの症例において腫瘍がイマチニブに対して耐性を獲得する。このイマチニブ耐性化機構については、KIT における二次変異の発生、KIT の過剰発現あるいは薬剤排泄機構の活性化などのメカニズムが想定されるが、これまで解析された報告はなく不明である。

そこで、本研究では犬の肥満細胞腫のイマチニブ耐性機構を解明するため、まずイマチニブ耐性を示した肥満細胞腫の症例を対象に *KIT* の解析を行い、二次変異の有無を検討した。次いで、犬のイマチニブ感受性肥満細胞腫株化細胞からイマチニブ耐性株を作製し性状解析を行った。さらに、作製した耐性株を用いてイマチニブ耐性化機構を解析した。

1. イマチニブ耐性を獲得した犬の肥満細胞腫の症例における *KIT* 遺伝子の解析

犬の肥満細胞腫のイマチニブ耐性化における *KIT* 二次変異の役割を明らかにするため、イマチニブに対して耐性を獲得した症例の治療前および耐性獲得後の *KIT* の塩基配列の解析を行った。6 症例中 1 症例で *KIT* の活性化ループ領域をコードする Exon 17 に c.2463T>A の二次変異が同定された。この変異と同様の変異は人のイマチニブ耐性 GIST において報告されており、またイマチニブ抵抗性の *KIT* リン酸化を引き起こすことが知られている。このことから、この症例で見られた *KIT* 二次変異はイマチニブ耐性化に関与していると考えられた。一方、5 症例では *KIT* に二次変異は同定されなかった。

以上より、一部の症例では *KIT* の二次変異がイマチニブ耐性化に関与しているが、*KIT* の二次変異とは異なる分子機構を介してイマチニブ耐性を獲得している症例も存在すると考えられた。

2. 犬のイマチニブ耐性肥満細胞腫株化細胞の作製と性状解析

犬の肥満細胞腫におけるイマチニブ耐性化機構を解明するため、イマチニブに感受性を示す犬の肥満細胞腫株化細胞 CoMS および VI-MC をイマチニブに暴露し、それぞれのイマチニブ耐性株 rCoMS1 (IC50 約 9 μ M) および rVI-MC1 (IC50 約 2 μ M) と rVI-MC10 (IC50 約 12 μ M) を作製した。これらの株化細胞を用いて *KIT* の発現とリン酸化レベルの変化、*KIT* 塩基配列の変化、薬剤排泄能の変化について検討した。

rCoMS1 では CoMS に比べて *KIT* の発現レベルが著しく増加しており、これに伴い *KIT* のリン酸化レベルの増加が見られた。また、rCoMS1 のリン酸化 *KIT* はイマチニブによりやや減少したが、10 μ M イマチニブ存在下でも高いリン酸化レベルを維持していた。これらのことから、rCoMS1 のイマチニブ耐性化には *KIT* の過剰発現が重要な役割を果たしていると考えられた。

rVI-MC1 および rVI-MC10 では *KIT* に二次変異 (c.1523A>T, p.Asp815His) が同定された。VI-MC における *KIT* のリン酸化は 1 μ M のイマチニブで抑制されたが、rVI-MC1 および rVI-MC10 の *KIT* のリン酸化は抑制されなかった。このことから、rVI-MC1 および rVI-MC10 で同定された二次変異は、VI-MC のイマチニブ耐性化と密接に関連していると考えられた。一方、rVI-MC10 は rVI-MC1 と比べより高濃度のイマチニブに対しても耐性を示すことから、rVI-MC10 には二次変異以外のイマチニブ耐性機構が存在すると考えられた。

以上から、CoMS では *KIT* が過剰に発現することで、また VI-MC では *KIT* に二次変異が発生することで、それぞれイマチニブに対する耐性を獲得していると考えられた。さらに VI-MC では、高濃度のイマチニブに対しては *KIT* 二次変異とは異なる他の分子機構が生じ耐性を獲得すると推測された。

3. CoMS における耐性機構の解析

rCoMS1 で認められた *KIT* 過剰発現の分子機構とそのイマチニブ耐性化における役割を明らかにすることを目的とした。

KIT 分解能の解析により、rCoMS1 で見られた *KIT* の過剰発現は *KIT* の分解遅延によって *KIT* が蓄積した結果であることが明らかとなった。さらに、この反応はイマチニブの有無に伴って可逆性に起こることから、rCoMS1 における *KIT* の過剰発現は、イマチニブに対する反応性の変化であり、*KIT* の細胞内動態の変化により生じると考えられた。

rCoMS1 における *KIT* のユビキチン化の解析において、*KIT* の発現が少ない細胞では *KIT* がユビキチン化しているのに対して、*KIT* が過剰に発現している細胞では明らかに *KIT* のユビキチン化が減少していた。さらに、*KIT* の過剰発現は細胞表面で認められたことから、rCoMS1 で認められた *KIT* の可逆性の過剰発現はイマチニブにより *KIT* ユビキチン化を可逆的に抑制し、その結果、細胞膜上で *KIT* が増加したと考えられた。

rCoMS1 における KIT リン酸化の解析とイマチニブの細胞増殖抑制試験により、KIT 発現がわずかである細胞ではイマチニブによる明らかな KIT リン酸化の抑制と細胞増殖の抑制が見られたが、KIT 発現が過剰に増加した細胞ではいずれの抑制も見られなかった。このことから、KIT の過剰発現は、CoMS のイマチニブ耐性化において中心的な役割を果たすことが明らかとなった。

以上から、rCoMS1 ではイマチニブによって KIT のユビキチン化が抑制され、その結果、KIT の分解が遅延し細胞膜上に KIT を過剰に発現していることが示された。さらに、この KIT の過剰発現が CoMS のイマチニブ耐性化の主な原因であることが明らかとなった。

4. VI-MC における耐性機構の解析

rVI-MC1 および rVI-MC10 で同定された *KIT* 二次変異のイマチニブ耐性化における役割と rVI-MC10 のイマチニブ耐性化機構を明らかにすることを目的とした。

293 細胞を用いた KIT 組み換え蛋白の解析から、この二次変異は SCF 非存在性の KIT リン酸化を引き起こすことが示された。また、この二次変異を持つ KIT のイマチニブ感受性は、一次変異のみを持つ KIT に比べて低いことも示された。したがって、rVI-MC1 および rVI-MC10 で生じた *KIT* の二次変異は、KIT のイマチニブ感受性を低下させる機能獲得性の変異であり、VI-MC におけるイマチニブ耐性化の原因の一つであることが明らかとなった。

VI-MC、rVI-MC1 および rVI-MC10 を用いたシグナル伝達経路の解析では、全ての細胞株で ERK のリン酸化が見られた。VI-MC と rVI-MC1 の ERK リン酸化は高濃度のイマチニブによって抑制されたが、rVI-MC10 では抑制されなかった。したがって、rVI-MC10 は高濃度のイマチニブ存在下においても ERK のリン酸化が維持されることで細胞増殖が保たれていると考えられた。さらに、rVI-MC10 の ERK のリン酸化は、SFK/KIT 阻害剤では抑制されず、

MEK阻害剤で抑制されたことから、このERKのリン酸化は、SFKの活性化やERKの自律的な活性化により生じたものではないと考えられた。

以上のことから、rVI-MC1およびrVI-MC10において同定されたKITの二次変異は、VI-MCのイマチニブ耐性化の一因であることが明らかとなった。さらに、高濃度のイマチニブに暴露されたVI-MCでは、KITおよびSFKとは異なる経路によってERKが活性化し、イマチニブに対する耐性を獲得すると考えられた。

本研究より、イマチニブに対して耐性を獲得した犬の肥満細胞腫において、KITに二次変異を持つ症例の割合は少ないことが示唆された。株化細胞を用いた解析から、KITに二次変異を持たない症例では、イマチニブがKITのユビキチン化を抑制することでKITが過剰発現し、その結果イマチニブに対して耐性を獲得している場合があると考えられた。一方、KITに二次変異を持つ症例では、KITの構造変化によってイマチニブ耐性が生じることが示された。また、二次変異に加えてKIT/SFK非依存性のERK活性化が起こり、イマチニブに対してより強い耐性を獲得することもあると考えられた。

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 鷲巢月美教授に心から感謝の意を表します。

また、始終御指導、御教授を頂いた日本獣医生命科学大学獣医臨床病理学教室 盆子原誠教授および入交眞巳講師、田村恭一助教、日本動物高度医療センター 小野憲一郎東京大学名誉教授に深謝致します。

さらに、研究の遂行にあたりご協力頂いた、杉崎修、小堤友香梨、田中優、守谷友加里、上原裕司、石毛奏絵、谷本三峰、佐野文郁、林麻央の各氏をはじめとする本学獣医臨床病理学教室各位に深謝いたします。本学大学院獣医生命科学研究科博士課程獣医学専攻の黒木詩織氏、株式会社ケーナインラボの伊藤慶太氏に深く感謝いたします。

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

参考文献

1. Welle MM, Bley CR, Howard J, Rüfenacht S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol*. 2008;19:321-39.
2. Bostock DE, Crocker J, Harris K, Smith P. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer*. 1989;59:915-8.
3. Cook JE. Canine mast cell diseases. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1969;32:267-83.
4. Head KW, West GB. Pathological and pharmacological examination of a canine tumour of the adrenal medulla. *J Comp Pathol*. 1958;68:167-73.
5. Nielsen SW, Cole CR. Canine mastocytoma; a report of one hundred cases. *Am J Vet Res*. 1958;19:417-32.
6. Thamm DH, Mauldin EA, Vail DM. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor--41 cases (1992-1997). *J Vet Intern Med*. 1999;13:491-7.
7. Rassnick KM, Moore AS, Williams LE, London CA, Kintzer PP, Engler SJ, Cotter SM. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). *J Vet Intern Med*. 1999;13:601-5.
8. Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmérini F, Leventhal PS, Guéry S, Moussy A, Kinet JP, Hermine O, Dubreuil P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res*. 2008;6:1137-45.
9. Roskoski R Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337:1-13.
10. Isotani M, Ishida N, Tominaga M, Tamura K, Yagihara H, Ochi S, Kato R, Kobayashi T, Fujita M, Fujino Y, Setoguchi A, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med*. 2008;22:985-8.
11. Kobayashi M, Sugisaki O, Ishii N, Yamada O, Ito K, Kuroki S, Sasaki Y, Ono K, Washizu T,

- Bonkobara M. Canine intestinal mast cell tumor with c-kit exon 8 mutation responsive to imatinib therapy. *Vet J.* 2012;193:264-7.
12. Yamada O, Kobayashi M, Sugisaki O, Ishii N, Ito K, Kuroki S, Sasaki Y, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. 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.* 2011 Jul;142:101-6.
 13. London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC, Geissler EN. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol.* 1999;27:689-97.
 14. Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol.* 1999;112:165-70.
 15. Nakano Y, Kobayashi T, Oshima F, Fukazawa E, Yamagami T, Shiraishi Y, Takanosu M. Imatinib responsiveness in canine mast cell tumors carrying novel mutations of c-KIT exon 11. *J Vet Med Sci.* 2014;76:545-8.
 16. 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. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet.* 2004;364:1127-34.
 17. Demetri GD. Targeting the molecular pathophysiology of gastrointestinal stromal tumors with imatinib. Mechanisms, successes, and challenges to rational drug development. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002;16:1115-24. Review.
 18. van Oosterom AT, Judson IR, Verweij J, Stroobants S, Dumez H, Donato di Paola E, Sciot R,

- Van Glabbeke M, Dimitrijevic S, Nielsen OS; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. 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*. 2002;38:S83-7.
19. Théou N, Gil S, Devocelle A, Julié C, Lavergne-Slove A, Beauchet A, Callard P, Farinotti R, Le Cesne A, Lemoine A, Faivre-Bonhomme L, Emile JF. Multidrug resistance proteins in gastrointestinal stromal tumors: site-dependent expression and initial response to imatinib. *Clin Cancer Res*. 2005;11:7593-8.
20. Agaram NP, Wong GC, Guo T, Maki RG, Singer S, Dematteo RP, Besmer P, Antonescu CR. Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47:853-9.
21. Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, Wisner L, Iorio M, Shakalya K, Garewal H, Nagle R, Bearss D. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 2007;26:3909-19.
22. Tabone S, Théou N, Wozniak A, Saffroy R, Deville L, Julié C, Callard P, Lavergne-Slove A, Debiec-Rychter M, Lemoine A, Emile JF. KIT overexpression and amplification in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Biochim Biophys Acta*. 2005;1741:165-72.
23. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Hom G, Koryotowski B, Leversha MA, Jeffrey PD, Desantis D, Singer S, Brennan MF, Maki RG, DeMatteo RP. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res*. 2005;11:4182-90.
24. Din OS, Woll PJ. Treatment of gastrointestinal stromal tumor: focus on imatinib mesylate. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4:149-62.

25. Wang CM, Huang K, Zhou Y, Du CY, Ye YW, Fu H, Zhou XY, Shi YQ. Molecular mechanisms of secondary imatinib resistance in patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136:1065-71.
26. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110:2242-9.
27. [ES Jaffe](#) Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid tissues 4th Edition IARC Press 2001.
28. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol*. 1984;21:469-74.
29. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45:228-47.
30. 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. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24:4764-74.
31. Liegl B, Kepten I, Le C, Zhu M, Demetri GD, Heinrich MC, Fletcher CD, Corless CL, Fletcher JA. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol*. 2008;216:64
32. Gajiwala KS, Wu JC, Christensen J, Deshmukh GD, Diehl W, DiNitto JP, English JM, Greig MJ, He YA, Jacques SL, Lunney EA, McTigue M, Molina D, Quenzer T, Wells PA, Yu X,

- Zhang Y, Zou A, Emmett MR, Marshall AG, Zhang HM, Demetri GD. KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:1542-7.
33. Demetri, G.D., Wang, Y., Wehrle, E., Racine, A., Nikolova, Z., Blanke, C.D., Joensuu, H. & von Mehren, M. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;19:3141-7.
34. Peng, B., Hayes, M., Resta, D., Racine-Poon, A., Druker, B.J., Talpaz, M., Sawyers, C.L., Rosamilia, M., Ford, J., Lloyd, P. & Capdeville, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22:935-42.
35. Gadzicki D1, von Neuhoff N, Steinemann D, Just M, Büsche G, Kreipe H, Wilkens L, Schlegelberger B. BCR-ABL gene amplification and overexpression in a patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *Cancer Genet Cytogenet*.159:164-7.
36. Vega-Ruiz, A., Cortes, J.E., Sever, M., Manshouri, T., Quintás-Cardama, A., Luthra, R., Kantarjian, H.M. & Verstovsek, S. Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis. *Leukemia Research*. 2009;33:1481-4.
37. Goh LK, Sorkin A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a017459.
38. Weisberg E, Ray A, Nelson E, Adamia S, Barrett R, Sattler M, Zhang C, Daley JF, Frank D, Fox E, Griffin JD. Reversible resistance induced by FLT3 inhibition: a novel resistance mechanism in mutant FLT3-expressing cells. *PLoS One*. 2011;6:e25351.

39. Rossi F, Yozgat Y, de Stanchina E, Veach D, Clarkson B, Manova K, Giancotti FG, Antonescu CR, Besmer P. Imatinib upregulates compensatory integrin signaling in a mouse model of gastrointestinal stromal tumor and is more effective when combined with dasatinib. *Mol Cancer Res* 2010;8:1271-1283.
40. Takahashi T, Serada S, Ako M, Fujimoto M, Miyazaki Y, Nakatsuka R, Ikezoe T, Yokoyama A, Taguchi T, Shimada K, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Naka T, Nishida T. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. *Int J Cancer* 2013;133:2737-2743.
41. Hentschel J1, Rubio I, Eberhart M, Hipler C, Schiefner J, Schubert K, Loncarevic IF, Wittig U, Baniahmad A, von Eggeling F. BCR-ABL- and Ras-independent activation of Raf as a novel mechanism of Imatinib resistance in CML. *Int J Oncol.* 2011;39:585-91.
42. Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Pontén E, Carlberg M, Rönstrand L. Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncoge* 1999;18:5546-5553.
43. Goetz EM, Ghandi M, Treacy DJ, Wagle N1, Garraway LA. ERK mutations confer resistance to mitogen-activated protein kinase pathway inhibitors. *Cancer Res.* 2014;74:7079-89.
44. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Nakagawa T, Ohno K, Sasaki N, Sugano S, Tsujimoto H. Aberrant autophosphorylation of c-Kit receptor in canine mast cell tumor cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;137:208-16.

45. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther.* 2002;1:1115-24.