

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)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医学専攻博士課程平成 24 年度入学

小林 正人

(指導教授：鷺巣月美)

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 (IC<sub>50</sub> 約 9μM) および rVI-MC1 (IC<sub>50</sub> 約 2 μM) と rVI-MC10 (IC<sub>50</sub> 約 12μM) 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。