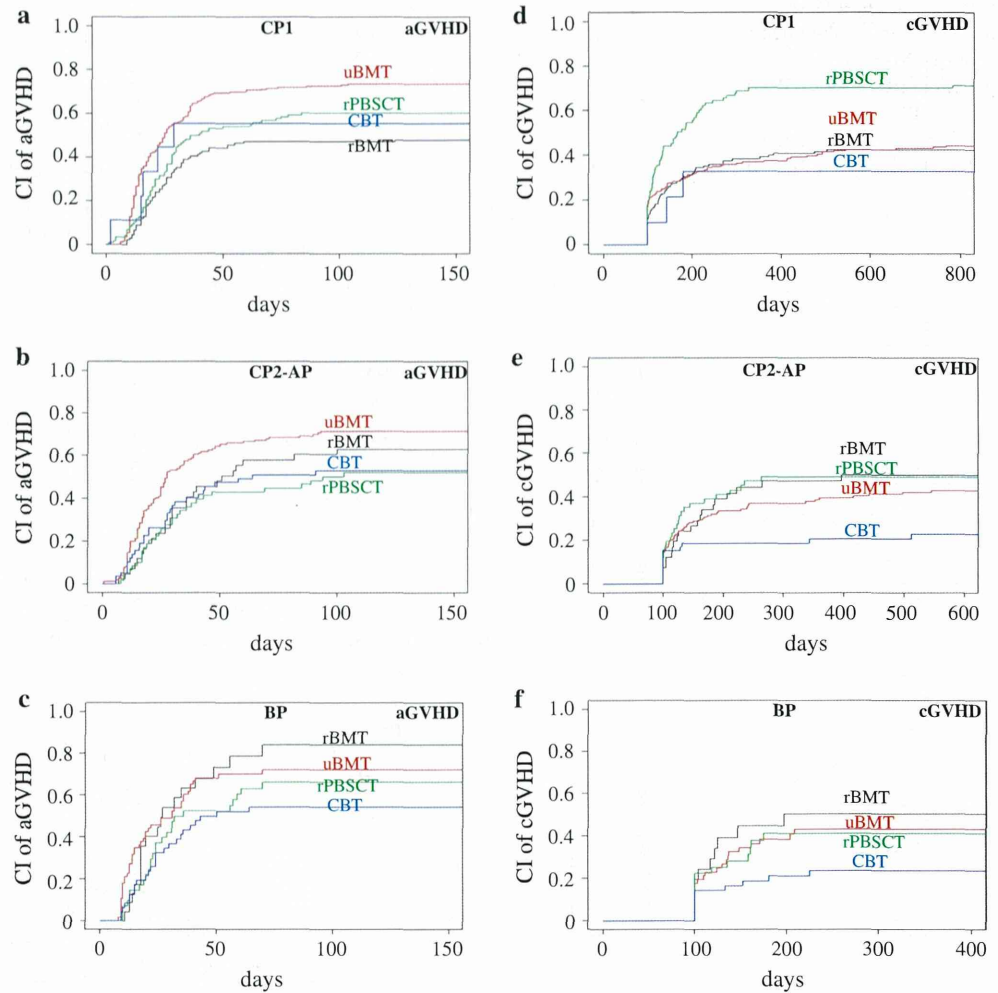


**Fig. 4** The cumulative incidence of acute GVHD at all grades for patients in CP1 (a), CP2-AP (b) and BC (c); and chronic GVHD at all grades for patients in CP1 (d), CP2-AP (e) and BC (f)



significant factor associated with acute GVHD (>grade II) in CP1 (data not shown). Despite the study in the era of TKI, half of patients were in CP1, and 61 % of patients underwent allo-HSCT without use of pre-transplant TKI in this study. We should interpret these findings with utmost caution. We assume that most patients had already initiated the conventional treatment but could not reach a new, but expensive IM treatment before allo-HSCT, as a reason for these findings. Moreover, the findings that the number of patients in CP1 underwent allo-HSCT was 447 in the early period of IM from 2000 to 2004 and only 84 from 2005 to 2009 might support our assumption. Deininger et al. reported an effect of pre-transplant IM in their study that included 70 cases of CML and 21 cases of Ph (+) acute lymphoid leukemia. These investigators compared the outcomes with historical controls identified in the EBMT database [21], and observed a trend towards higher relapse mortality and significantly less chronic GVHD in patients with pre-transplant IM (OR = 0.44,  $P = 0.027$ ). Thus, the clinical impact of pre-transplant IM is still a contentious

issue; additional studies evaluating the long-term use of IM with a larger number of patients might permit a more refined analysis of the effect of pre-transplant IM.

Although data on clinical outcomes after CBT are conflicting, CBT has apparent advantages over uBMT, including no risk to the donor and ease of availability. Previous reports, mostly from pediatric studies, have shown that, despite higher HLA mismatch, CBT carries a lower risk of acute GVHD and chronic GVHD in comparison with uBMT [22–24]. A recent Japanese retrospective analysis assessing 86 patients, including pediatric patients, disclosed the transplant outcomes of CBT: 2-year OS was 53 %; for patients in CP, AP and BC, the OS rates were 71, 59 and 32 %, respectively [25]. Although our small population with only 10 cases of CBT in CP1 may prohibit drawing meaningful conclusions, a trend of higher relapse and lower TRM, OS and LFS in CP1 was similar to results obtained by previous study groups. Nevertheless, in CP2-AP and BC, transplant outcomes after CBT were comparable to those of other GS,

suggesting CBT as an acceptable alternative option in advanced phases of CML.

As with all retrospective studies, this study had several limitations. Reported data from transplant centers were often incomplete: data on pre-transplant IM, duration from diagnosis to transplantation, and conditioning regimen could not be fully retrieved. The reasons for which patients in CP1 with IM proceeded with transplantation (planned, or IM resistance) or the reasons for delay in proceeding with transplantation in BC were unknown. Information on post-transplant use of TKIs as maintenance therapy or data on the presence of *BCR/ABL* mutations was also unavailable in our cohort. Moreover, the selection of GS would often be governed by several unmeasured factors, but our data nonetheless provide a clinical basis for current selection of GS for the treatment of CML in the era of TKIs.

In conclusion, this retrospective study evaluated the results of allo-HSCT for CML patients according to disease status and GS. For patients in CP1, rBMT may be the preferred option for better survival, whereas rPBSCT carries a higher risk for chronic GVHD, which could be a major drawback for patients in CP1. In advanced phases, GS had no significant impact on survival, suggesting that CBT is a reasonable alternative therapy when there is no related or unrelated donor available, or when a transplant is needed urgently. In the era of the new-generation TKIs, indications for allo-HSCT and selection of GS for advanced CML need further evaluation.

**Acknowledgments** We thank all of the physicians and nurses who cared for patients in this study. We also thank all the data managers and officers of the JSHCT, JMDP, and JCBBN.

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Cortes J, H Kantarjian. How I treat newly diagnosed chronic phase CML. *Blood*. 2012;120:1390–7.
- Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27:6041–51.
- Hehlmann R, Berger U, Pfirrmann M, et al. Drug treatment is superior to allografting as first line therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;109:4686–92.
- Saussele S, Lauseker M, Gratwohl A, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV. *Blood*. 2010;115:1880–5.
- Radich J. Stem cell transplant for chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Semin Hematol*. 2010;47:354–61.
- Venepalli N, Rezvani K, Mielke S, et al. Role of allo-SCT for CML in 2010. *Bone Marrow Transpl*. 2010;45:1579–86.
- Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2012;367:2075–88.
- O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*. 2009;16:401–12.
- Atsuta Y, Suzuki R, Yoshimi A, et al. Unification of hematopoietic stem cell transplantation registries in Japan and establishment of the TRUMP System. *Int J Hematol*. 2007;86:269–74.
- Przepiora D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transpl*. 1995;15:825–8.
- Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, et al. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol*. 1991;28:250–9.
- Kanda J. Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2013;98:300–8.
- Gratwohl A, Brand R, Apperley J, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*. 2006;91:513–21.
- Khoury HJ, Kukreja M, Goldman JM, et al. Prognostic factors for outcomes in allogeneic transplantation for CML in the imatinib era: a CIBMTR analysis. *Bone Marrow Transpl*. 2012;47:810–6.
- Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*. 2000;95:3702–9.
- Oehler VG, Radich JP, Storer B, et al. Randomized trial of allogeneic related bone marrow transplantation versus peripheral blood stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2005;11:85–92.
- Lee SJ, Kukreja M, Wang T, et al. Impact of prior imatinib mesylate on the outcome of hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008;112:3500–7.
- Oehler VG, Gooley T, Snyder DS, et al. The effects of imatinib mesylate treatment before allogeneic transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;109:1782–9.
- Perz JB, Khorashad JS, Marin D, et al. Imatinib preceding allogeneic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2006;91:1145–6.
- Giralt SA, Arora M, Goldman JM, et al. Chronic Leukemia Working Committee, Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Impact of imatinib therapy on the use of allogeneic haematopoietic progenitor cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2007;137:461–7.
- Deininger M, Schleuning M, Greinix H, et al. The effect of prior exposure to imatinib on transplant-related mortality. *Haematologica*. 2006;91:452–9.
- Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*. 1997;337:373–81.
- Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*. 1998;339:1565–77.
- Sanz GF, Saavedra S, Jimenez C, et al. Unrelated donor cord blood transplantation in adults with chronic myelogenous leukemia: results in nine patients from a single institution. *Bone Marrow Transpl*. 2001;27:693–701.
- Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, et al. Unrelated cord blood transplantation in CML: Japan Cord Blood Bank Network analysis. *Bone Marrow Transpl*. 2008;42:241–51.

# トランスレーショナルリサーチの重要性

長村 文孝

東京大学医科学研究所先端医療研究センター先端医療開発推進分野教授

key words アカデミア発 橋渡し研究加速ネットワークプログラム NIH 基礎研究 開発型

## 医薬品開発の動向

2004年に米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration ; FDA) は “Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products” を発出した。この中で、図1に示すように医薬品開発への投資額は製薬企業および政府の開発機関である米国立衛生研究所 (National Institute of Health ; NIH) とともに年々増加しているにもかかわらず、図2に示すようにFDAで承認申請が受理される (承認ではない) 数が医薬品・生物製剤ともに減少していた。先の白書はこれに対して非常な危機感を示し、規制当局の側から開発を促進する対応策を打ち出していく意図が込められていた。

一方、このころより、製薬業界では「2010年問題」への対応が大きな問題となっていた。これは、売り上げの上位に位置する医薬品の多くが特許切れを迎えるが、それにとって

代わる大型の新薬開発が進んでいないため、経営上大きな危機を迎えるというものであった。表1は2002年と2012年の医薬品の世界売り上げトップ10を示したものである。2002年は、2位に赤血球造血刺激因子でバイオ製剤であるエリスロポエチン製剤が入っているが、その他は化合物の薬物作用を探求するスクリーニング等により開発された医薬品であった。また、その多くは「2010年問題」に含まれる特許切れを迎えていた。2012年になるとトップ10の医薬品は全て入れ替わっているが、特に注目する点として、6品目が特定の作用機序に関与する分子をターゲットとした分子標的療法薬であり、そのうち5品目が抗体であったことが挙げられる。ヒュミラ®とレミケード®の作用機序は関節リウマチ等の原因であるTNF $\alpha$ の過剰生産に対して抗体でTNF $\alpha$ を阻害することであり、エンブレル®はTNFが結合する受容体とヒト免疫グロブリンのFc部分から構成されており、TNF

が細胞表面の受容体と結合することを阻害する。リツキサン®はB細胞性リンパ腫ではリンパ腫細胞表面にCD20が発現していること、ハーセプチン®は乳がん等でHER2が過剰発現している場合が多いことに注目し、悪性細胞で発現している分子に抗体が結合し障害を与えることが作用機序である。固形がんでは血管新生による腫瘍の増殖が認められるが、アバスタチン®は血管新生を促進する分子であるVEGFの作用を阻止する抗体として開発された。いずれも基礎研究での発見に注目し、医薬品として抗体あるいは受容体制剤として開発されている。

トランスレーショナルリサーチ (Translational Research ; TR) は、基礎研究の成果を初期臨床試験の段階まで臨床応用することが1つの定義である。抗体薬や受容体薬の開発は基礎研究の成果を基になされており、TRの代表といえる。新たな医薬品開発の方策としてTRは重要視されるようになり、各国の医薬品開発

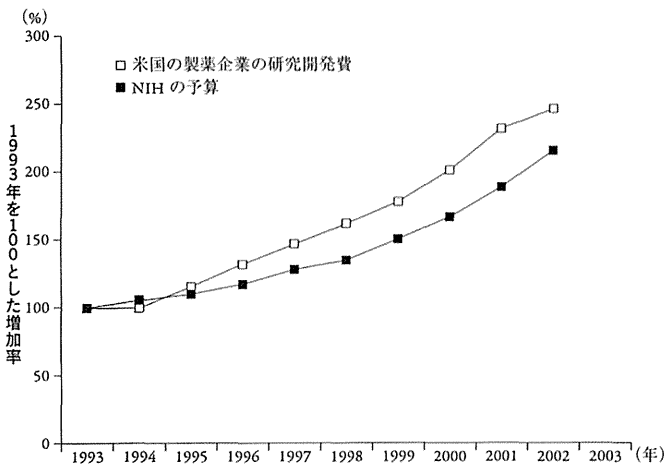


図1 米国における製薬企業の開発費と NIH 予算の増加状況

出所：FDA：Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products, 2004

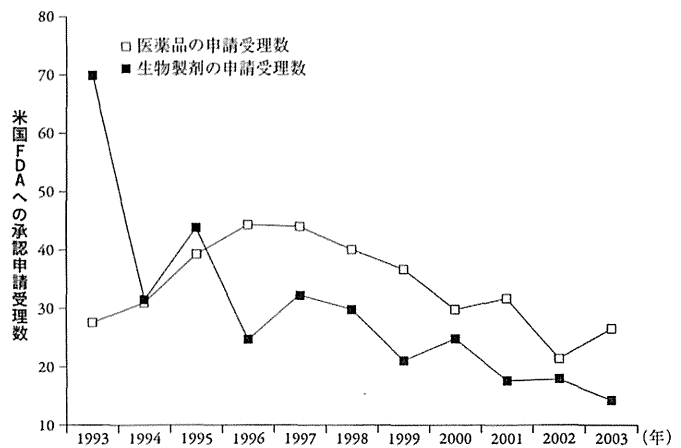


図2 米国FDAでの医薬品・生物製剤の承認申請受理数

出所：FDA：Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products, 2004

競争の大きな柱に成長している。本稿では、このように大きな役割を果たすようになったTRの意義と今後の課題について述べる。

### 基礎研究と臨床をつなぐ トランスレーショナルリ サーチの意義

TRは、欧米では“From bench to bedside”とも呼ばれ、日本でも基礎研究と臨床をつなぐ「橋渡し研究」とも呼ばれる。従来の医薬品開発では、有効性分を含んでいそうな材料の探索、そこからの化合物の収集、そして新規化合物の薬効を見極めるスクリーニングを経て候補物を選択することが主流であった。一方、近年ではヒトゲノム解析計画により人間の設計図とも呼べる全ゲノム配列が明らかとなり、また、疾患の発症機序や病態の特徴に関するメカニズムが分子生物学的に急速に明らかとなってきている。このような知見を基にして治療手段を考案し、臨床開発を進めるのがTRである。そのため、開発のアプローチは抗体に留まらず、核酸医薬、再生・細胞療法、

表1 医薬品世界売り上げランキング

順位	2002年			2012年		
	商品名	薬効	売上	商品名	薬効	売上
1	リビトール	高脂血症薬	8,507	ヒュミラ	TNFα 抗体	9,603
2	エボジェン/プロクリット/エスポー	エリスロポエチン	6,675	レミケード	TNFα 抗体	9,071
3	ゾコール/リボバス	高脂血症薬	5,580	エンブレル	TNF受容体	8,476
4	タケブロン/プレバシッド	抗潰瘍薬	4,695	アドエア/セレタイド	吸入喘息薬	8,216
5	プリロセック/オメプラール	抗潰瘍薬	4,687	クレストール	高脂血症薬	7,430
6	ノルバスク/アムロジン	降圧薬/Ca拮抗薬	4,174	リツキサソ	抗CD20抗体	7,227
7	メバロチン/プラバコール	高脂血症薬	3,755	ランタス	インスリン製剤	6,555
8	ジプレキサ	統合失調症薬	3,689	ハーセプチン	抗HER2抗体	6,444
9	パキシル/セロクサット	抗うつ薬 (SSRI)	3,297	アバスタチン	抗VEGF抗体	6,307
10	セレブレックス	抗炎症薬 (Cox2阻害)	3,150	ジャスビア	糖尿病薬	6,208

売上は単位百万ドル。△は分子標的薬を示す。

出所：セジテム・ストラテジックデータ(株)ユート・ブレン事業部

遺伝子治療等多岐にわたる。また、化合物の選択も、鍵となる重要な分子に作用する候補分子としてスクリーニングを行ったり、立体構造と親和性から候補物質のスクリーニングを行ったりするなど変化している。

### 1. 基礎研究を担うアカデミア

TRの基となる基礎研究の主体は、実際には大学等のアカデミアである。製薬企業側からも「産業側は自社シーズ主体に創薬研究を行い製品を作り出すといういわゆる『自前主義』のビジネスモデルは既に断念し、オープンイノベーションの旗印の

表2 米国FDAで承認された医薬品の発明元(1998年から2007年)

	製薬企業	バイオベンチャー	アカデミア
全医薬品(252品目)	58%	18%	24%
優先審査*(123品目)	46%	23%	30%
科学的新規性の高い医薬品(118品目)	44%	25%	31%

\*priority review: 既存の治療に対して大きな優越性を示す場合か、十分な治療法のない疾患あるいは進行度に対する薬剤が指定される。通常は10か月以内の審査期間が6か月以内に短縮される。

出所:文献2)より

下、アカデミアを含め広く外部に創薬シーズを求めべく産学連携を進めている」とされている<sup>1)</sup>。1998年から2007年に米国FDAで承認申請が受理された医薬品252品目の開発元を特許の帰属先から解析した研究では、表2に示すように申請が受理された医薬品、優先審査に指定された医薬品、科学的に新規性が高い医薬品で分類してみると、ベンチャー企業発医薬品では18%、23%、25%、アカデミア発では24%、30%、31%であり、医療上必要性あるいは科学的新規性の高い医薬品でベンチャー企業発とアカデミア発が増えている<sup>2)</sup>。ただし、ベンチャー企業発の医薬品の元々の開発主体はアカデミアであったことが多く、実際にはアカデミアの研究に基づく医薬品がこの数値よりも多いことが推測される。また、この論文での承認申請は2007年までであり、その後アカデミアでの基礎研究が基となっている医薬品の候補は増えていると推定され、アカデミアの基礎研究が医薬品開発の大きな柱と言える。また、表1の分子標的薬6剤のうち、5剤がベンチャー企業で開発され、大手製薬企業に特許権が譲渡されたか、あるいはベンチャー企業が買収されて市販化されたという事実もある。また、収益の面からも、分子標的薬、特に抗体は薬価が非常に高いこともあ

り、表1に示されるように売上額も高くなり製薬企業にとっては大きな収益の柱となっている。

このように、医薬品開発は従来型が低分子化合物を中心とし患者数が多い疾患を対象とした自社開発から、アカデミアが開発主体でアンメット・メディカル・ニーズを対象としたTRに移ってきている。それゆえ、市場規模も大きく何より健康に直結した医薬品開発の国際競争においてTRの促進は国家的課題となってきた。

## 2. 臨床からの橋渡し事例

一方、新たな医薬品開発だけではなく、ある医薬品の有効性および副作用について個人差が生じる原因の追究は長年の課題であった。これについては、多くの臨床情報、すなわち患者のゲノム情報あるいは悪性腫瘍であれば腫瘍細胞の遺伝子変異を基にした研究が精力的に行われてきた。

患者側の遺伝子多型の差が臨床に用いられている代表例としては、抗がん剤のイリノテカンではUGT1A1の遺伝子多型が代謝に影響し副作用に関連していること<sup>3)</sup>、C型肝炎ウイルス感染者でのペグインターフェロンとリバビリンの併用療法でインターフェロンの関連遺伝子であるIL28B遺伝子のSNP(遺伝子多型)が

有効性に関連していることが判明し、前者は保険適用となり添付文書にも記載され、後者は先進医療として認められている<sup>4)</sup>。腫瘍細胞の例としては、セツキシマブでは血管新生に関連するEGFR陽性が適応であるが、KRASに変異が存在すると有効性を認めないことが明らかとなっている<sup>5)</sup>。

このような研究には多くの患者の情報を基に、ゲノム解析というバイオロジー、すなわち基礎研究に立ち返って初めてなされることができ、このような研究を特にがんの領域ではTRに含めたり、あるいは「バックTR」「リバースTR」と呼ばれることもある。単に基礎から臨床への一方通行ではなく、パーソナライズド・メディスン(個別医療)実現のための双方向性と捉えられており治験段階からの検討と合わせ積極的に推進されている。

## トランスレーショナルリサーチの状況と課題

### 1. 知的財産の扱い

日本で産学の連携が促進されるようになったのは1990年代後半に入ってからである。そのため、特許権確保の意識が研究者の間では希薄であった。このような産業界との連携が不十分であったこと、あるいは特許権を取得しなかったことから、日本のアカデミアで発見したことが日本国内ではなく海外企業によって医薬品開発に結びついた例は多い。

最近では特許出願後に論文発表で公表することが一般的になりつつあるが、研究者に対する知財に関する教育機会の不足もあり十分に浸透しているとは言い難い。また、関連特

許まで取得する「強い特許」となるための特許戦略や出願における権利範囲は科学的論理とは異なるため弁理士の能力に依存するが、バイオに精通した弁理士はまだ少ない。アカデミアにおいて特許を管理する部署も十分に機能していないケースもあるため、製薬企業からすると開発には不十分であると判断されるケースも多い。

最近、ALK融合遺伝子を有する非小細胞性肺癌に対するクリゾチニブは、その有効性とともにも標的分子の論文発表から承認まで約4年という開発期間の短さが注目を集めた。これは論文に注目した海外企業が早期に治験を開始し承認に至った例である。一方、国内での産学間での連携強化と迅速な開発が、海外との開発競争において未だ十分ではない警鐘ともいえる。

## 2. 開発にかかるコストと人材不足

先に述べたように、TRの特徴の1つは低分子化合物だけではなく、多くの新しい概念の治療方法が存在することである。企業側からすると新たな製造設備の建設等のコスト、非臨床試験ならびに臨床試験での評価方法・実施方法等未知の領域が多いという理由から、開発に躊躇するケースが多い。また、前述したように特許権が不十分であり他者との競合に耐えられそうにないと判断されることがある。そのため、開発に関心を示す企業が現れないことが多い。その場合、開発するに十分な知財権があれば、医師主導治験を含む臨床試験を研究者が実施し、有効性・安全性に関するデータを取得して再度企業にアプローチすることができる。

このように自ら開発を主体的に行う場合には、表3にまとめた、シーズ(研究開発する対象)としての初期の臨床試験の段階までにわたって多くの事項を行う必要がある。これは製薬企業の果たしている資金確保、各種専門家の確保、プロジェクトマネジメントを含む開発戦略の策定等の役割を研究者が行う必要があることを意味する。被験物確保の点からは、近年、再生医療あるいは免疫担当細胞を用いたがん免疫療法開発が盛んであるが、多くの場合、患者由来細胞を原料としており、ヒトに投与することのできる品質を確保できる細胞調製施設(Cell Processing Center; CPCあるいはCell Processing Facility; CPF)をアカデミアで保有・運営する必要がある。このような施設は建設、維持に多額の費用が必要であり、ヒトに投与するに足る品質を有する被験物の製造と管理をアカデミアが担う必要があることもTRの実施が困難であった一因であった。生物統計家、データ解析、プロジェクトマネジメント等の専門家の不足は海外と比して著しく、養成が急務となっている。

### 「日本版NIH構想」への期待

このような開発環境を研究者個人で整えるのは困難であり、日本のアカデミアとしても組織として整える必要があった。そこで、文部科学省では、TRの支援の拠点形成のために平成19(2007)年度に橋渡し研究支援プログラムを開始し、次いで平成24(2012)年度からの橋渡し研究加速ネットワークプログラムでは開始時に全国で7拠点を選定してい

表3 開発型トランスレーショナルリサーチで考慮する事項

#### 基礎研究段階

- 動物実験を含めた研究倫理
- 知的財産確保と強化
- 研究資金の確保

#### 非臨床試験段階

- 治験申請に必要な非臨床試験のデザインと実施
- Good Laboratory Practice (医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準) 遵守が必要な非臨床試験の選定と委託
- 適切な動物実験施設
- 被験物製造(細胞調製施設等)
- 規制対応

#### 臨床試験段階

- 製造設備の維持・管理(細胞調製施設等)
- Good Manufacturing Practice (医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準)準拠被験物の委託製造あるいは製造
- 特殊検査の対応
- 標準業務手順書の作成・文書管理
- 実施計画書・説明同意文書等の作成
- データマネジメント
- モニタリング・監査等の質の保証業務
- 補償・賠償への対応
- 規制対応

#### 全段階を通じて

- 研究、非臨床試験、臨床試験実施に必要な費用の確保
- 利益相反管理
- 連携・導出企業の選定
- プロジェクトマネジメント

る<sup>6)</sup>。このプログラムでは、拠点外のアカデミアも含めたシーズの知財獲得から医師主導治験の実施までを支援することのできる支援体制を構築するために、専門的に業務を遂行できる人材の養成・確保、教育体制の整備、細胞調製施設を含めた施設整備等が求められている。このプログラムにより拠点整備は進行しているが、いわゆる「日本版NIH構想」において、厚生労働省の早期・探索的臨床試験拠点整備事業および臨床研究中核病院整備事業が平成27(2015)年度に一体運用される計画となっており、省庁の垣根を越えた支援が期待されている。また、橋渡



し研究加速ネットワークプログラムの予算は、平成25(2013)年度が約30億円で平成26(2014)年度は約65億円と異例ともいえる増額となっており国の期待もうかがうことができる。

米国ではNIHは世界最大の基礎研究所というだけでなく、研究所病院を有するTR開発施設であり、また、研究費の配分あるいは医療開発の実務支援を一元的に行う国策としての医薬品開発の事実上の司令塔となっている。NIHが臨床研究に費やす予算は年間約300億ドルであり、約80%が競争的資金として分配され、約10%がNIHの施設に分配されている<sup>7)</sup>。NIHのアカデミアのTR拠点への支援としては、National Center for Advancing Translational Sciencesを創設し、Clinical and Translational Science Awards (CTSA)を設け

ていることが挙げられる。CTSAでは米国の62の施設が拠点として選定され、総額4.6億ドルが各センターに配分され、各センターには年間約400万ドルから約2,300万ドルが支出されている<sup>8)</sup>。その他、NIHは、低分子化合物や抗体の治験用製造施設を関連企業として有しており、また、他のアカデミア向けに細胞調製を行う拠点の指定による治験での被験物提供体制を整えており、TRの問題の1つである被験物の確保を容易にしている。また、NIH発のシーズの開発やライセンスアウト、NIHから研究費を配分された試験の実施に必要な資料整備等の支援を行っており、治験実施施設支援の役割も果たしている。

日本においても急速にTR推進のための環境が整備されつつある。しかし米国と比するとその規模と体制

においてまだ格段の差が存在する。医薬品開発の大きな柱であるTRを国際競争力のあるものにするためには「日本版NIH構想」のもと戦略的かつ継続的な支援が必要である。

#### 文献

- 1) Inagaki O: Expectation for the Drug Development Activity in Academia. YAKUGAKU ZASSHI 133 (2): 213-219, 2013
- 2) Kneller R: The importance of new companies for drug discovery: origins of a decade of new drugs. Nat Rev Drug Discov 9: 867-882, 2010
- 3) カンプト添付文書
- 4) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/sensiniryoku/kikan02.html>
- 5) アービタックス添付文書
- 6) <http://www.tr.mext.go.jp/>
- 7) <http://www.nih.gov/about/budget.htm>
- 8) <http://www.ncats.nih.gov/research/cts/ctsa/ctsa.html>

ながむら ふみたか  
〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1  
nagamura@ims.u-tokyo.ac.jp

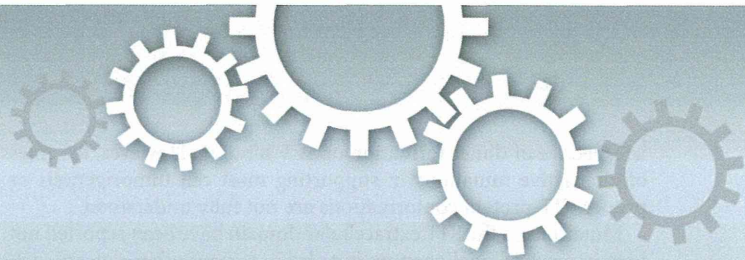
## MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

# 電子辞書DF-X11001 PASORAMA+

●電子辞書 2014年  
価格: 本体76,000円+税  
[JAN4950096164505]

SIIの電子辞書「DAYFILER」シリーズの医学モデル。パソコンで電子辞書が引けるPASORAMA+、タッチ操作が可能なWVGA・静電式カラータッチパネル液晶、無線LANなどの機能に、ショートカットキー設定機能を加え、単語帳機能・検索履歴機能の容量もアップグレード。収録コンテンツは「医学書院 医学大辞典」「ステッドマン医学大辞典」「治療薬マニュアル」などの医学系はもちろん、国語系、英語系も充実。



## OPEN

## SUBJECT AREAS:

HAEMATOLOGICAL  
CANCEREXTRACELLULAR SIGNALLING  
MOLECULESReceived  
15 January 2015Accepted  
19 March 2015Published  
12 May 2015

Correspondence and requests for materials should be addressed to (akane@cc.tuat.ac.jp) or (hiro@cc.tuat.ac.jp)

# A point mutation in the extracellular domain of KIT promotes tumorigenesis of mast cells via ligand-independent auto-dimerization

Yosuke Amagai<sup>1,2</sup>, Akira Matsuda<sup>3</sup>, Kyungsook Jung<sup>4,5</sup>, Kumiko Oida<sup>1</sup>, Hyosun Jang<sup>1</sup>, Saori Ishizaka<sup>1</sup>, Hiroshi Matsuda<sup>1,3\*</sup> & Akane Tanaka<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Cooperative Major in Advanced Health Science, Graduate School of Bio-Applications and System Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Laboratory Animal Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, <sup>3</sup>Laboratories of Veterinary Molecular Pathology and Therapeutics, <sup>4</sup>Comparative Animal Medicine, Division of Animal Life Science, Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan, <sup>5</sup>Eco-friendly Material Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeonbuk, Korea.

Mutations in the juxtamembrane and tyrosine kinase domains of the KIT receptor have been implicated in several cancers and are known to promote tumorigenesis. However, the pathophysiological manifestations of mutations in the extracellular domain remain unknown. In this study, we examined the impact of a mutation in the extracellular domain of KIT on mast cell tumorigenesis. A KIT mutant with an Asn508Ile variation (N508I) in the extracellular domain derived from a canine mast cell tumor was introduced into IC-2 cells. The IC-2<sup>N508I</sup> cells proliferated in a cytokine-independent manner and showed KIT auto-phosphorylation. Subcutaneous injection of IC-2<sup>N508I</sup> cells into the dorsal area of immunodeficient BALB/c-*nu/nu* mice resulted in the formation of solid tumors, but tumor progression was abrogated by treatment with a tyrosine kinase inhibitor (STI571). In addition, the N508I mutant KIT protein dimerized in the absence of the natural ligand, stem cell factor. Structure modeling indicates that the increased hydrophobicity of the mutant led to the stabilization of KIT dimers. These results suggest that this extracellular domain mutation confers a ligand-independent tumorigenic phenotype to mast cells by KIT auto-dimerization that is STI571-sensitive. This is the first report demonstrating the tumorigenic potential of a mutation in the extracellular domain of KIT.

**K**IT is a type-III receptor tyrosine kinase encoded by the *c-kit* gene that plays important roles in the maintenance and proliferation of melanocytes, interstitial cells of Cajal, and hematopoietic cells such as stem cells, hematopoietic progenitors, and mast cells<sup>1–3</sup>. Binding to the stem cell factor (SCF) leads to KIT dimerization, resulting in the phosphorylation of tyrosine residues and activation of downstream signaling molecules<sup>4–6</sup>. Mutations in KIT, especially in the juxtamembrane or tyrosine kinase domains, have been detected in a wide variety of tumors including leukemia, gastrointestinal stromal tumors (GISTs), melanomas, and mast cell malignancies<sup>7–10</sup>. These mutations have been shown to result in KIT autophosphorylation, even in the absence of SCF binding<sup>11–13</sup>. Specifically, insightful studies by Kitamura *et al.*<sup>12,13</sup>, in which the roles of mutations in the juxtamembrane and tyrosine kinase domains in the tumorigenesis of mast cells were investigated, revealed a critical role for these mutations in promoting mast cells tumorigenesis, both *in vitro* and *in vivo*. For their analyses, they utilized the interleukin 3 (IL-3)-dependent IC-2 mast cell line<sup>14</sup>, which was derived from bone marrow-derived cultured mast cells<sup>13</sup>. Because of their origin, IC-2 cells possess characteristics similar to normal mast cells and differentiate in response to several stimulators, including IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor<sup>15</sup>. A distinctive feature of IC-2 cells is that they lack KIT expression, enabling researchers to compare the functions of wild-type and mutant KIT proteins in cells with a mast cell phenotype. Thus, IC-2 cells are useful for investigating the effects of KIT mutations on mast cell tumorigenesis or phenotypic alterations. Kitamura *et al.*<sup>12</sup> performed crosslinking experiments to explore the activation mechanism of KIT mutants. They found that a mutation in the KIT juxtamembrane domain causes autophosphorylation and homodimerization even in the absence of SCF, while a mutation in the tyrosine kinase domain leads to autophosphorylation





irrespective of dimer formation or SCF binding. However, the roles of alternative mutations in supporting mast cell tumorigenesis or proper KIT protein conformations are not fully understood.

Mutations in the KIT extracellular domain have been reported not only in mast cell malignancies, but also in various other cancers such as acute myeloid leukemia (AML) and GIST<sup>16–21</sup>. Those studies revealed that mutations in the extracellular domain cause KIT autophosphorylation, although it is unclear whether these mutations directly promote tumorigenesis *in vivo*. Interestingly, most mutations in the KIT extracellular domain exist in the fifth immunoglobulin-like (Ig-like) domain, which is encoded by sequences in exon 8 and 9<sup>16–21</sup>. Most mutations reported in other type III receptor tyrosine kinases, such as platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  or colony-stimulating-factor 1 receptor, have also been identified in the Ig-like domains close to the cell membrane<sup>22,23</sup>. Thus, it is possible that KIT mutations in the fifth Ig-like domain may play a key role in the regulation of KIT conformation, thus determining its phosphorylation status. A molecular-level approach will aid in the understanding of this possibility and in the development of novel selective inhibitors.

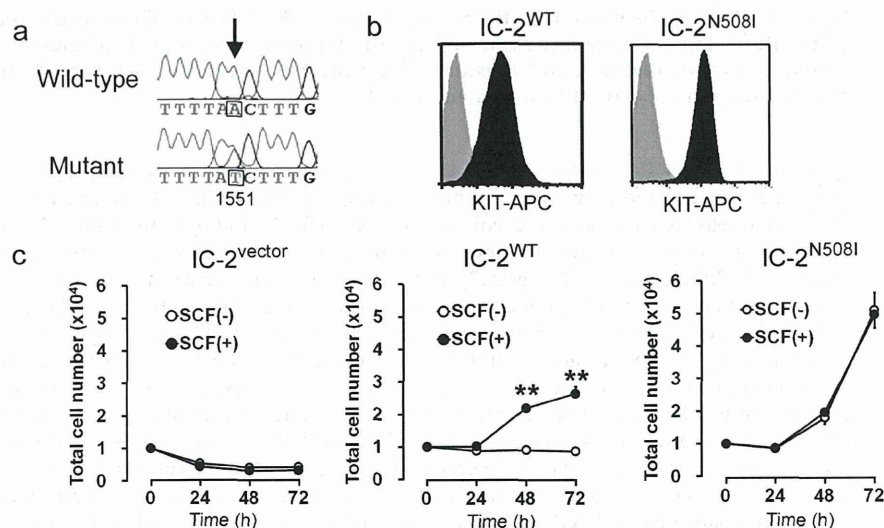
Compared to humans, dogs are more frequently diagnosed with mast cell malignancies<sup>24</sup>. Our group<sup>25</sup> and others<sup>26,27</sup> recently noted that canine mast cell tumors (MCTs), which account for approximately 20% of all cutaneous tumors in dogs, show mutations in the extracellular domain of KIT. We investigated the direct contribution of the extracellular domain mutation to mast cell tumorigenesis using retrovirally transduced IC-2 mast cells as a model. Our results demonstrated that a point mutation in the extracellular domain of KIT leads to the cytokine-independent proliferation of mast cells, both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, we report for the first time that this mutation induces the autophosphorylation of KIT by forming a dimer, due to the enhanced hydrophobicity and activity even in the absence of SCF. These results raise the possibility for a new molecular strategy targeting type-III receptor tyrosine kinases with a mutation in the extracellular domain.

## Results

**Establishment of IC-2 sublines and characterization of their *in vitro* growth properties.** When analyzing *c-kit* sequences in 13 surgically removed canine MCT samples, an 1551 A>T point mutation, resulting in an Asn508Ile amino acid change (N508I), was

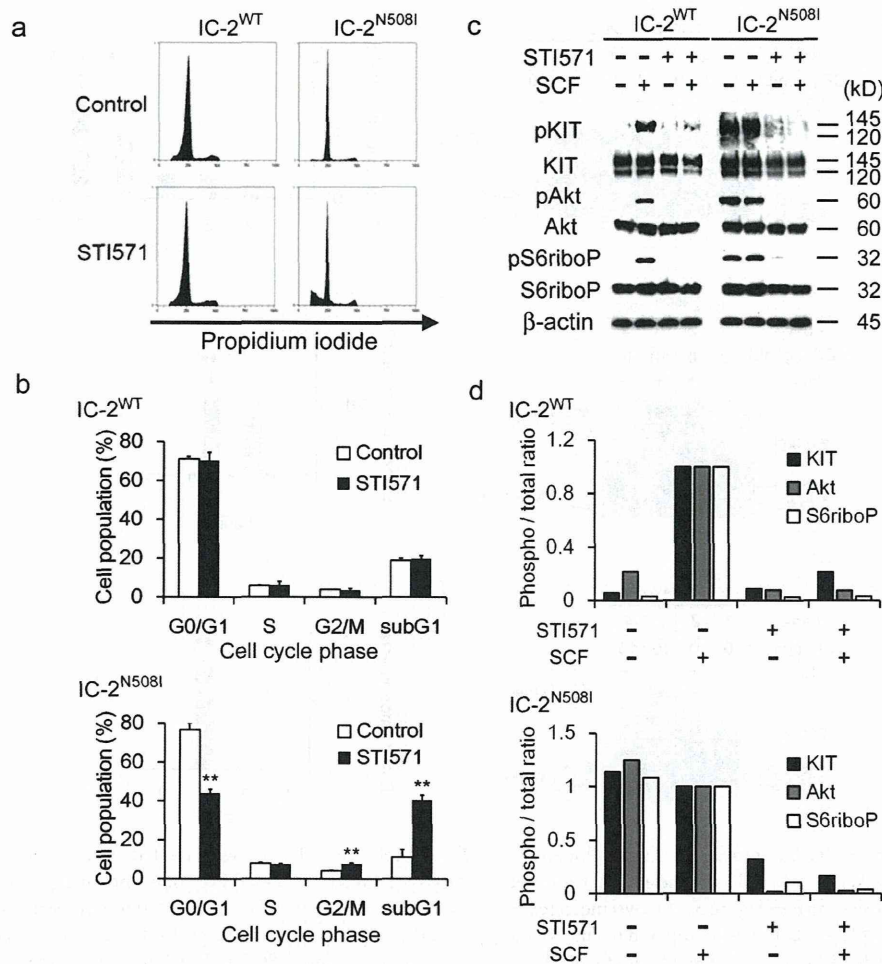
discovered in a single specimen from dogs presented to the Animal Medical Center in Tokyo University of Agriculture and Technology (Fig. 1a). Although the N508I mutation has been reported in dog MCTs by several groups<sup>26,27</sup>, the contribution of this mutation to mast cell tumorigenesis remains unclear. Cells isolated from the tumor included abundant basophilic granules in their cytosol that showed metachromasia by acid toluidine blue staining (Fig. S1a). Cultured primary cells from the tumor showed both morphological and genetic characteristics of mast cells. For example, expression of dog mast cell protease 3 (dMCP-3<sup>28</sup>, Fig. S1b) was observed, as was phosphorylation of KIT receptors (Fig. S1c). In addition, no other mutations in the *c-kit* gene were identified in the tumor, except for 1551 A>T (Fig. S1d). To determine whether the mutation promotes mast cell tumorigenesis, we established an IC-2 mast cell subline expressing the N508I mutant KIT (IC-2<sup>N508I</sup> cells; Fig. 1b), using a procedure reported by Hashimoto *et al.*<sup>13</sup> As controls, wild-type KIT-expressing (IC-2<sup>WT</sup> cells) and mock-transfected (IC-2<sup>vector</sup> cells) sublines were also established. Because the parental IC-2 cells are dependent on IL-3 for growth and do not express KIT receptors<sup>14</sup>, IC-2<sup>vector</sup> cells did not proliferate in the absence of IL-3, regardless of SCF addition (Fig. 1c). Next, the growth of IC-2<sup>WT</sup> and IC-2<sup>N508I</sup> cells was examined under IL-3-free conditions. As shown in Fig. 1c, IC-2<sup>N508I</sup> cells proliferated independently of SCF, while IC-2<sup>WT</sup> cells only grew in the presence of SCF. The doubling time of IC-2<sup>N508I</sup> cells in the absence of SCF was approximately 26.1 h (Fig. 1c).

**STI571 sensitivity of IC-2<sup>N508I</sup> cells.** STI571 is a well-known competitive inhibitor of adenosine 5'-triphosphate (ATP) that suppresses the activation of several tyrosine kinases, including KIT<sup>29,30</sup>. To determine whether the N508I KIT mutation affects the sensitivity of cells to STI571, a water-soluble tetrazolium salt (WST) assay was performed. The assay showed inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values of  $123.7 \pm 15.3$  nM in IC-2<sup>N508I</sup> cells after STI571 treatment. However, the corresponding IC<sub>50</sub> values for IC-2<sup>WT</sup> cells following STI571 treatment were above the detection limit ( $> 1$   $\mu$ M). Cell cycle analysis was conducted to confirm the inhibitory effect of STI571 on IC-2<sup>N508I</sup> cells. The proportion of sub-G1 (apoptotic) IC-2<sup>N508I</sup> cells was increased upon STI571 treatment; however, these alterations were not observed in IC-2<sup>WT</sup> cells (Figs 2a and b). Western



**Figure 1 | Characterization of IC-2<sup>N508I</sup> cells.** (a) sequence of the *c-kit* gene. The arrow indicates a heterozygous point mutation in codon 508 (1551 A > T) from a clinical sample from a canine diagnosed with MCT. The base number corresponds to GenBank accession no. AF044249. (b) representative flow cytometry analysis data. Cell surface KIT expression in the indicated IC-2 sublines was detected using an anti-KIT-APC antibody (black), and KIT expression in IC-2<sup>vector</sup> cells was used as a negative control (gray). (c) growth curves of IC-2 sublines in the presence or absence of 10 ng/mL SCF. Data represent means  $\pm$  standard deviations (SD) of 3 independent experiments ( $n = 5$  at each time point). \*\*  $p < 0.01$ , compared to SCF (-) cells at each time point.





**Figure 2 | STI571 sensitivity and PI3K signaling activity in IC-2<sup>N508I</sup> cells.** (a, b) representative cell cycle analysis data and distribution of cells in each cell cycle phase as a function of STI571 treatment. Each subline was serum-starved overnight and then cultured with or without 250 nM STI571 for 24 h. After incubation, cells were fixed with 70% ethanol and stained with propidium iodide. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments with duplication. \*\*  $p < 0.01$ , relative to untreated control cells. (c) western blot analysis of each IC-2 subline and (d) quantification of the ratio of phosphorylated/total amounts of each protein. Cells were serum-starved overnight, cultured for 4 h in the presence or absence of 10 ng/mL SCF and/or 250 nM STI571, and expression of the indicated proteins was analyzed in western blots. The phosphorylated/total ratios of cells cultured in the presence of SCF were set to 1.

blots were performed to evaluate these results in terms of differences in effector protein phosphorylation. Because the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathway is activated downstream of KIT activation<sup>31,32</sup>, we assessed the phosphorylation levels of the Akt and S6 ribosomal proteins, which are key signaling molecules in the PI3K pathway. As shown in Figs 2c and d, SCF-dependent activation of these proteins was observed in IC-2<sup>WT</sup> cells. In contrast, phosphorylation of these proteins occurred in IC-2<sup>N508I</sup> cells independently of SCF addition (Figs 2c and d). To study the inhibitory effect of STI571 on the phosphorylation of these proteins, cells were treated with STI571 in the presence or absence of SCF. As shown in Figs 2c and d, phosphorylation of each protein examined was strongly inhibited by STI571 in both IC-2<sup>WT</sup> and IC-2<sup>N508I</sup> cells.

**Dimerization of KIT in IC-2 sublines.** Kitayama *et al.*<sup>12</sup> reported that KIT dimerization, which is necessary for autophosphorylation, occurs in a juxtamembrane domain KIT mutant in the absence of SCF, while a tyrosine kinase domain KIT mutant is activated without dimerization. Dimerization of wild-type KIT was observed in IC-2<sup>WT</sup> cells in the presence of SCF, in a dose-dependent manner. In IC-2<sup>WT</sup> cells, the basal level of KIT dimerization without SCF addition was low, and dose-dependent increase of dimer formation was observed

by SCF supplementation (Figs 3a and b). Clear dimerization was detected in the presence of 10 ng/mL SCF (Figs 3a and b). To determine whether ligand-independent dimerization exists in N508I KIT, we next treated IC-2<sup>N508I</sup> cells with bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS<sub>3</sub>) in the presence or absence of 10 ng/mL SCF and subjected to cell lysates to western blot analysis. SCF-independent dimerization was observed in IC-2<sup>N508I</sup> cells (Figs 3c and d). In contrast, IC-2<sup>N814V</sup> cells, which express a KIT mutant bearing a point mutation in the tyrosine kinase domain, only dimerized in the presence of SCF as previously reported (Figs 3e and f)<sup>12</sup>. While a single band corresponding to KIT dimers was detected in IC-2<sup>N814V</sup> cells only in the presence of SCF (Fig. 3e), multiple bands were observed in IC-2<sup>N508I</sup> cells, both in the presence or absence of SCF (Fig. 3c).

**Tumorigenicity and STI571 sensitivity of IC-2<sup>N508I</sup> cells.** Next we investigated the tumorigenicity of IC-2<sup>N508I</sup> cells *in vivo* by subcutaneously injecting them into the right and left flanks of immunodeficient BALB/c-*nu/nu* mice. Although IC-2<sup>WT</sup> cells were not tumorigenic (data not shown), IC-2<sup>N508I</sup> cells proliferated in mice and formed solid tumors, which were increased in volume at the injection sites (Fig. 4a). KIT phosphorylation and high expression of cell growth marker Ki-67<sup>33</sup> were detected in tumor tissues by