

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 栗田 晟那

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

そこで本研究では、まず第 2 章で犬の肥満細胞腫 164 症例のゲノム DNA を NGS 解析し、KIT 変異の網羅的探索を行った。また NGS 解析で認められた変異およびいくつかの既知の変異について組み換え KIT 蛋白を作製し、各変異 KIT の性状解析を行った。第 2 章の解析において様々な特性を持つ変異 KIT が同定されたが、その中にトセラニブ抵抗性を示す変異が複数検出された。そこで第 3 章では、肥満細胞腫細胞株を用いてトセラニブ耐性の獲得過程における KIT 変異の発生プロセスを解析した。第 4 章では、トセラニブ耐性肥満細胞腫の克服戦略を構築するため、KIT シグナルの下流に存在する SHP2 に着目し、トセラニブ耐性肥満細胞腫細胞株の増殖におよぼす SHP2 阻害剤の影響について検討した。

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

犬の肥満細胞腫における KIT 変異の網羅的探索を行うため、犬の肥満細胞腫 164 症例におけるゲノム DNA を用いて KIT の全エクソンを NGS 解析した。その結果、35 種類の新規変異が同定され、イムノグロブリン様領域に 12 種類、膜近傍領域に 20 種類、キナーゼ領域に 2 種類、C 末端領域に 1 種類認められた。さらに本研究で同定された変異のうち比較的頻度の高い変異とこれまでに報告されている変異について組み

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

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

網羅的 KIT 変異解析により、トセラニブ抵抗性を示す変異が同定されたが、そのような変異はトセラニブによる治療を複雑かつ困難にする可能性が高く、トセラニブの治療を個別化する上できわめて重要である。そこでトセラニブ抵抗性 KIT 変異の発生プロセスを明らかにするため、クローン化した肥満細胞腫細胞株からトセラニブ抵抗性細胞株を作出し、KIT の NGS 解析を行った。トセラニブ抵抗性細胞株は、一次変異 (c.1523A>T, p.(Asp508Ile)) に加えて複数の二次変異(c.2037T>A, p.(Asn679Lys); c.2456A>T, p.(Asp819Val); c.2456A>G, p.(Asp819Gly))を獲得し、さらにこれらの変異を導入した組み換え KIT 蛋白はトセラニブ抵抗性を示した。一方、これら二次変異はトセラニブ感受性細胞株では検出されなかった。したがって、肥満細胞腫のトセラニブ耐性化には KIT の二次変異が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、第 2 章の結果を考慮すると、KIT の二次変異は、二次変異を有するマイナークローンがトセラニブ存在下で選択的に増殖する場合と、トセラニブの持続的な暴露によって *de novo* に生じる場合があると考えられた。

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

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

本研究より、犬の肥満細胞腫におけるトセラニブの治療を個別化する上では、各変異の特性を踏まえたアプローチが必要と考えられた。とくにトセラニブ抵抗性の KIT

二次変異を持つ腫瘍細胞は腫瘍組織に予め微量存在する場合とトセラニブの暴露によって **de novo** に生じる場合があることが示され、これらトセラニブ抵抗性クローンの検出とそれ踏まえた治療戦略の構築が重要と考えられた。また、トセラニブ抵抗性クローンに対してはトセラニブと **SHP2** を組み合わせた治療が有益である可能性が考えられた。

以上のように、本論文は犬の肥満細胞腫におけるトセラニブ耐性化機構の一端を解明し、さらにそれに立脚した治療戦略の可能性を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。