

犬の組織球性肉腫細胞における

PTPN11/SHP2 変異に関する研究

(Studies of *PTPN11*/SHP2 mutations in canine histiocytic sarcoma cells)

谷 浩由輝

犬の組織球性肉腫細胞における

PTPN11/*SHP2* 変異に関する研究

(Studies of *PTPN11*/*SHP2* mutations in canine histiocytic sarcoma cells)

谷 浩由輝

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 28 年入学

(指導教授又は指導教員：盆子原 誠)

令和 2 年 3 月

目次

第1章	序論	2
	表および図	7
第2章	HS細胞株における <i>PTPN11</i> /SHP2 の発現および変異の解析	11
	材料と方法	14
	結果	19
	考察	22
	小括	25
	表および図	26
第3章	犬の変異 SHP2 活性化機構の検討	34
	材料と方法	36
	結果	41
	考察	43
	小括	47
	表および図	48
第4章	HS細胞に対する SHP2 阻害剤 SHP099 の抗腫瘍効果の検討	54
	材料と方法	57
	結果	62
	考察	65
	小括	68
	図	69
第5章	総括	73
	謝辞	79
	参考文献	80

第 1 章

序論

犬の組織球性肉腫 (HS) は致死性の悪性腫瘍であり、進行性で転移率が高いことから CCNU や ACNU などの抗癌剤がしばしば治療に用いられる (Table 1)。しかしながら、HS の抗癌剤に対する反応性は高くはなく (奏効率, 29-58%)、また肉眼病変を有する症例で抗癌剤による治療を行った例では中央生存期間が 3-6 カ月と短い (Table 1)。このため、HS に対する新たな治療法が必要とされている。

Src homology two domain-containing phosphatase 2 (SHP2) は *PTPN11* にコードされる非受容体型チロシンキナーゼフォスファターゼである [Qu, et al. 2010]。SHP2 はリン酸化した様々なチロシンキナーゼ受容体 (RTK) と直接的あるいはアダプター蛋白を介して間接的に結合することで様々な下流シグナル伝達系を活性化する [Rehman, et al. 2018; Pandey, et al. 2017]。犬では *PTPN11* の塩基配列が決定されていないため正確な部位は特定できないが、近年、一部の HS 症例は腫瘍細胞の *PTPN11*/SHP2 に p.Glu76Lys および p.Gly503Val と推定される変異を持つことが示されている [Thaiwong, et al. 2017; Takada, et al. 2019]。

SHP2 は 2 つの src homology 2 ドメイン (N-SH2 および C-SH2)、protein tyrosine phosphatase (PTP) ドメインおよびリン酸化部位を含む C 末端テール領域から構成されている [Hof, et al. 1998] (Figure 1)。定常状態の SHP2 は N-SH2 ドメインが PTP ドメインに結合した自己抑制構造である”閉構造”であり、非活性の状態である。RTK からの刺激によって、SHP2 の構造は PTP ドメインから N-SH2 ドメインが解離した”開構造”に変化し、活性

化することが知られている [Rehman, et al. 2018] (Figure 1)。HS の SHP2 変異部位として推定された Glu76 および Gly503 アミノ酸残基はそれぞれ N-SH2 および PTP ドメインに存在し、これらのアミノ酸残基は N-SH2/PTP ドメインにおけるドメイン間結合部に位置している。このドメイン間結合部のアミノ酸残基は人の小児白血病、骨髄球性白血病、肺がんなど様々な腫瘍で変異のホットスポットとして報告されている [Rehman, et al. 2018; Huang, et al. 2014] (Figure 2)。ドメイン間結合部に変異を有する SHP2 は開構造に変化し、恒常的に活性化して異常な細胞増殖を引き起こすため (Figure 1)、変異 SHP2 は様々な腫瘍において新規の治療標的として注目されている [Huang, et al. 2014]。このため、変異 SHP2 は HS においても腫瘍細胞の増殖に重要な役割を果たすと考えられ、HS の治療標的分子となる可能性が考えられる。

SHP099 (6-(4-amino-4-methylpiperidin-1-yl)-3-(2,3-dichlorophenyl)pyrazin-2-amine) は人の野生型 SHP2 の結晶構造解析に基づいて開発された新規ピラジン系化合物であり、高い細胞膜透過性と経口での高い生体内利用能を有している [Fortanet, et al. 2016]。この化合物は SHP2 を構成する 3 つのドメイン間のポケットに結合し、その構造を開構造から閉構造に変化させることで SHP2 の活性を抑制するアロステリック阻害剤である [Fortanet, et al. 2016]。SHP2 は EGFR、FLT-3 および KIT などの RTK に変異を有する腫瘍細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たしており、SHP099 はこれらの変異を有する腫瘍株化細胞の増殖を抑制することが示されている [Chen, et al. 2016]。さらに、SHP099 は

野生型の SHP2 ばかりでなく変異型 SHP2 を有する人の白血病由来株化細胞の増殖を抑制することも報告されている [Sun, et al. 2018]。このため、SHP099 は変異 SHP2 を標的とした新規治療薬としても注目されている。

HS では *PTPN11*/SHP2 に変異を有する症例が存在し、その変異部位は SHP2 の活性制御に重要なアミノ酸残基に位置すると考えられる。しかしながら、これまで犬における *PTPN11* の全長配列/SHP2 の全長アミノ酸配列は同定されていないため、変異の正確な場所は明らかでない。また、犬の SHP2 変異が立体構造や活性におよぼす影響あるいは HS 細胞の増殖にどのような役割を担っているのかも分かっていない。このため、HS に対する変異 SHP2 の治療標的としての有用性は不明である。これらを明らかにするためには、犬の *PTPN11* の全長配列を明らかにし、さらに SHP2 変異の機能的役割を細胞レベルで解明する必要がある。また、SHP099 の HS に対する治療薬としての可能性を明らかにするために、SHP2 変異を有する HS 株化細胞を用いて SHP2 阻害剤である SHP099 の効果と作用機序を検討する必要がある。

そこで、本研究では HS 細胞における SHP2 変異の治療標的としての有用性と SHP099 の治療薬としての可能性を明らかにするため、まず第 2 章で犬の *PTPN11* 翻訳領域 (CDS) の全長配列を同定し、HS 株化細胞における *PTPN11*/SHP2 の発現および変異の有無を解析した。次いで第 3 章では、*in silico* および犬 SHP2 組換え蛋白を用いて、変異 SHP2 の活性化機構を解析した。さらに第 4 章では、HS 株化細胞の増殖におよぼす SHP099 の影

響を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

表および図

Table 1. 過去に報告されたHSに対する抗がん剤治療の効果

治療対象	抗がん剤	症例数 (n =)	奏効率	中央生存期間 (日)	引用文献
肉眼病変	CCNU	56	46% (CR, n = 5; PR, n = 21)	106	Skorupski, et al.(2007)
		19	29% (CR, n = 3; PR, n = 3)	131	Rassnick, et al. (2010)
肉眼病変/非肉眼病変	Vinorelbine	9	N.E. (CR, n = 1; PR, n = 1)	N.E.	Woude, et al. (2015)
	CCNU	37	44% (CR, n = 1; PR, n = 3)	237 (肉眼病変, 131/ 非肉眼病変, 374)	Marlowe, et al. (2018)
	CCNUとdoxorubicin	17	58% (CR, n = 2; PR, n = 5)	185	Cannon, et al. (2015)
	ACNU	11	N.E. (臨床症状の消失, n = 2)	肉眼病変, 120 / 非肉眼病変, 400	Tani, et al. (2019)
	Epirubicin	29	57% (CR, n = 4; PR, n = 9)	N.E.	Mason, et al. (2018)
	CCNUを含むプロトコール	19, 関節由来	56% (CR, n = 2; PR, n = 3)	関節発生, 391	Klahn, et al. (2011)
		31, 非関節由来	35% (CR, n = 2; PR, n = 6)	非関節発生, 128	
非肉眼病変	CCNU	16	N.E.	568	Skorupski, et al. (2009)
	CCNUを含むプロトコール	12	N.E.	219	Moore, et al. (2017)

CR, 完全寛解; PR, 部分寛解; N.E., 評価なし

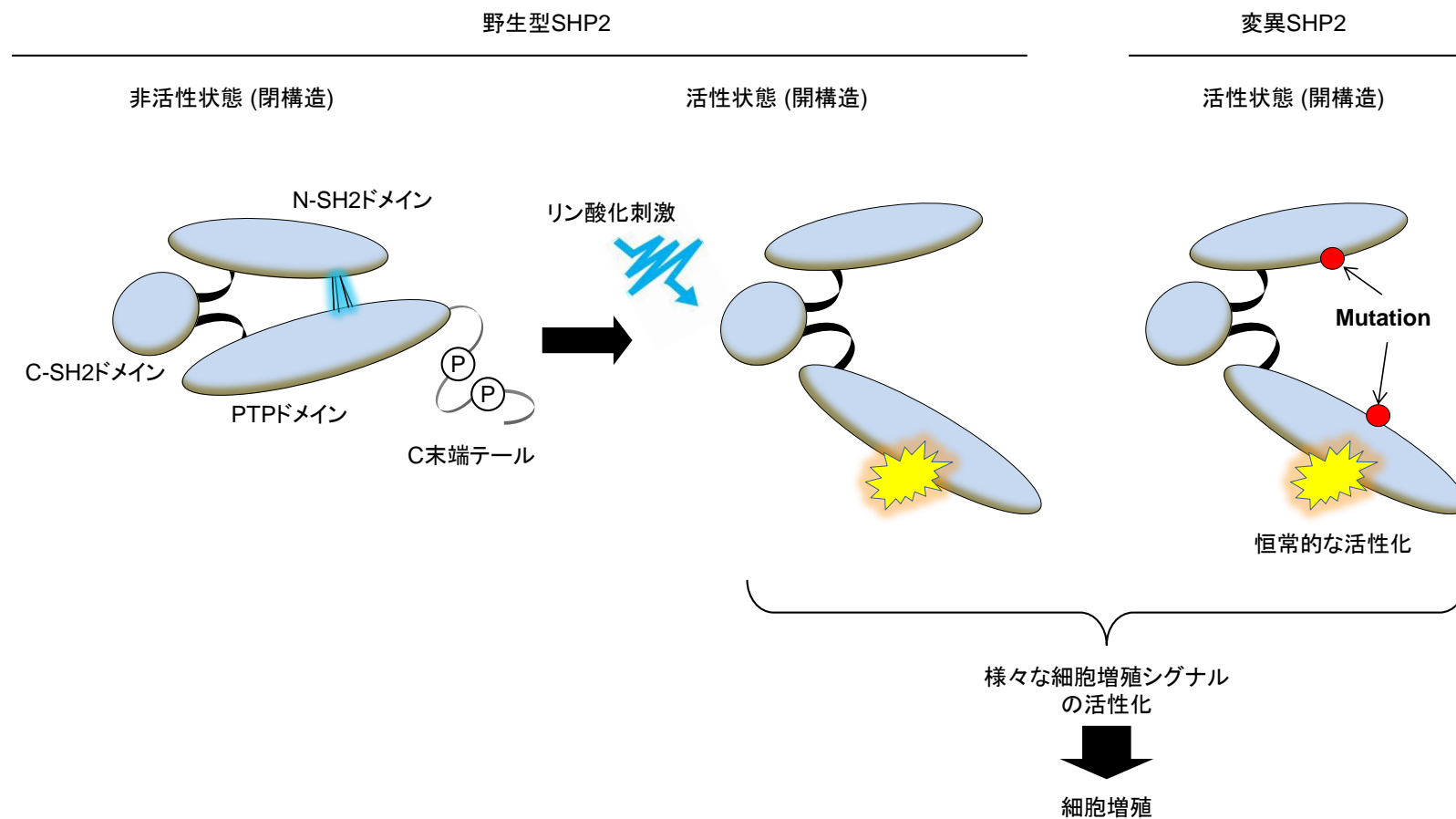


Figure 1. 野生型および変異型SHP2の活性化機構

SHP2は2つのsrc homology 2 ドメイン (N-SH2およびC-SH2)、protein tyrosine phosphatase (PTP) ドメインおよびリン酸化部位を含むC末端テール領域から構成されている。定常状態の野生型SHP2は、N-SH2/PTPドメイン間が結合した閉構造を示しており、非活性な状態である。リン酸化チロシンキナーゼ受容体からの直接的あるいは器質蛋白を介した間接的な刺激によりドメイン間結合が消失して、SHP2は活性化状態である開構造に変化する。活性化したSHP2は様々な細胞増殖シグナル伝達の活性化を引き起こし、細胞増殖を誘導する。一方、ドメイン間結合部のアミノ酸に変異を有する変異型SHP2では、定常状態においても開構造を呈し、恒常的な活性化を認める。

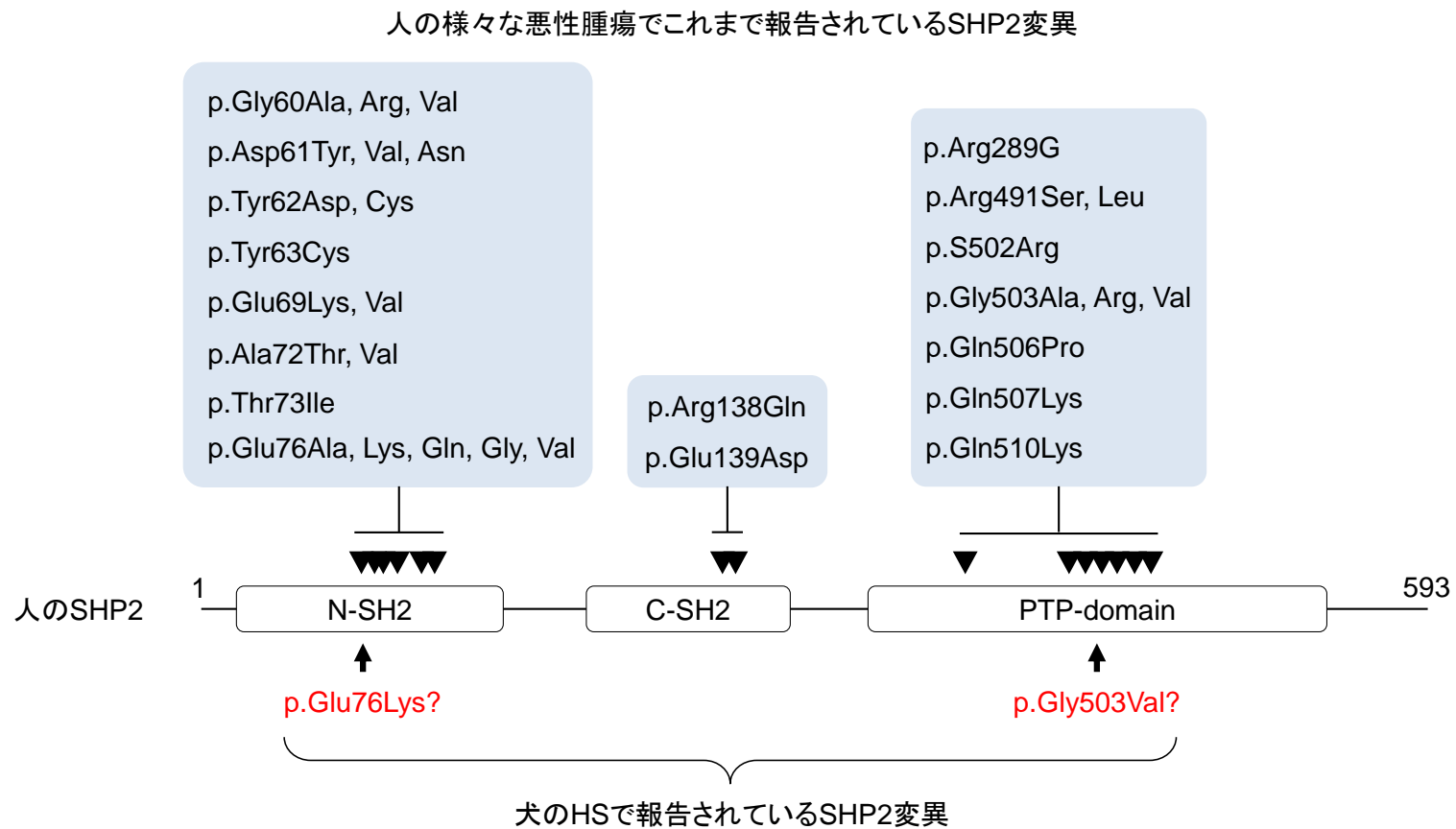


Figure 2. 犬組織球性肉腫 (HS) および人の悪性腫瘍で報告されているSHP2変異
 HSおよび人の悪性腫瘍でこれまで報告されているSHP2変異を示した。人のSHP2は3つのドメイン構造 (N-SH2、C-SH2およびPTPドメイン) を有しており、それぞれのドメインにおいて変異が報告されている。人では様々な悪性腫瘍においてSHP2に多様な変異が報告されている。HSではこれまで報告された変異の場所が人SHP2のアミノ酸残基に相当するのかわかりませんが、76および503アミノ酸残基は人のSHP2変異のホットスポットであることが知られている。

第 2 章

HS 株化細胞における *PTPN11*/SHP2 の 発現および変異の解析

犬の HS 症例における SHP2 の変異について、Thaiwong ら (2018) および Takada ら (2019) は p.Glu76Lys と p.Gly503Val と報告しており、人における SHP2 の活性化制御に重要なアミノ酸残基 Glu76 および Gly503 に相当する部位の変異であることを指摘している。また、SHP2 変異を有する HS 組織の免疫染色においてリン酸化 ERK あるいはリン酸化 AKT が検出されることから、これらの変異は HS の増殖において重要な役割を果たしていると推測している。しかしながら、これまで犬の *PTPN11* の全長配列は同定されておらず、これらの報告では人 *PTPN11* の exon 3 と exon 13 に類似した犬の genome DNA 部分配列の解析に基づいて変異部位を推定しているだけである。このため、犬の SHP2 変異の正確な位置は決定しているとは言えない。また、犬の SHP2 の全長アミノ酸配列も不明なため、これらの変異が SHP2 の立体構造や活性にどのような影響をおよぼすのかも明らかになっていない。さらに、HS における SHP2 変異と下流シグナル伝達系との機能的な関連性についても不明である。

このように、HS では SHP2 に変異を有する症例が存在するが、変異の正確な場所、立体構造や活性におよぼす影響、さらに HS 細胞の増殖における役割は明らかにされておらず、そのため変異 SHP2 の治療標的としての有用性も不明なままである。これらを明らかにするためには、犬の *PTPN11* の全長配列を明らかにし、さらに SHP2 変異の機能的役割を細胞レベルで解明する必要がある。特に SHP2 変異の機能を明らかにするためには SHP2 変異を有する HS 株化細胞が必要不可欠であるが、一般に利用できる HS 細胞株は

SHP 変異の不明な DH82 のみであり [Wellman, et al. 1988]、それが SHP2 変異の機能を解明する上で大きな障壁となっていた。一方、本学獣医臨床病理学教室ではこれまでに 9 株の HS 細胞株を樹立しており [Azakami, et al. 2006]、これらの株化細胞が SHP2 変異を保有していれば HS における SHP2 変異の役割を明らかにする上で画期的な進展が期待できる。

そこで第 2 章では、まず犬の *PTPN11* 翻訳領域 (CDS) の全長配列を決定することとした。次いで、HS 細胞株における SHP2 の発現およびリン酸化状態と *PTPN11*/SHP2 変異について解析した。

材料と方法

株化細胞

9 種類の HS 細胞株 (CHS-1、CHS-2、CHS-3、CHS-4、CHS-5、CHS-6、CHS-7、MHT-2 および ROMA) および犬扁平上皮由来の細胞株 CPEK (CELLnTEC, Bern, Switzerland) を解析に用いた (Table 2)。すべての株化細胞は 10%非動化牛胎子血清 (Merck, Darmstadt, Germany)、50 U/ml ペニシリンおよび 50 µg/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) (cDMEM) を用いて 37°C、5%CO₂ 湿潤環境下で培養した。

犬 *PTPN11* CDS の全長配列の解析

本学獣医臨床病理学教室が保有する健常犬全身組織 cDNA ライブラリーに含まれる心筋由来 cDNA を実験に使用した。人の *PTPN11* cDNA 全長塩基配列 (GenBank accession number, NM_002834.5) に基づき、*PTPN11* の開始コドンを含む 673 bp の領域 (fragment A) および終止コドンを含む 420 bp の領域 (fragment B) を PCR 増幅するプライマーを作製した (Table 3)。犬心筋の cDNA を鋳型にして、これらのプライマーと PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa-Bio, Shiga, Japan) を用いて fragment A および fragment B をそれぞれ PCR 増幅した。35 サイクルの PCR 増幅の後、PCR 産物を 1.2%アガ

ロースゲルで電気泳動し、増幅産物の確認を行った。目的のサイズ (fragment A, 約 670 bp; fragment B, 約 420 bp) のバンドを切り出し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。次いで、fragment A と B の間の領域 (fragment C) を PCR 増幅するため、fragment A と B にそれぞれに上流プライマーおよび下流プライマーを設計した (Table 3)。犬の心筋由来 cDNA を鋳型にして、fragment C を増幅するプライマーと PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いて PCR 増幅を行い、ダイレクトシーケンス法により増幅産物の塩基配列を決定した。これら fragment A、B および C の塩基配列をアッセンブルし、開始コドンと終止コドンを含む一つの塩基配列を得た。この塩基配列と予測アミノ酸配列を人およびマウスの *PTPN11* cDNA の全長塩基配列 (それぞれ NM_002834.5 と NM_001109992.1) および SHP2 のアミノ酸配列と比較し、相同性を解析した。また、この塩基配列を *Canis lupus familiaris* breed boxer chromosome 26, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence (NC_006608.3) とアッセンブルし、exon-intron 境界部の位置を決定した。これらの解析には DNASTAR Lasergene 10 (DNASTAR, Madison, USA) を使用した。

SHP2 およびリン酸化 SHP2 の検出

CHS-1、CHS-2、CHS-3、CHS-4、CHS-6 および ROMA における SHP2 およびリン酸化 SHP2 の発現をウェスタンブロット法で検出した。cDMEM で懸濁した HS 株化細胞を 5×10^4 個/ウェルとなるよう 6 ウェルプレートに播種し、12 時間培養した。その後、細

胞溶解緩衝液 (#9803, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) を用いて細胞を溶解し、それぞれの細胞溶解液を 12% ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。次いで、分離した蛋白をポリフッ化ビニリデンメンブレン (Bio-Rad, Irvine, USA) に転写し、このメンブレンを 5% スキムミルク (非リン酸化蛋白の検出) あるいは Blocking One-P (Nacalai Tesque) (リン酸化蛋白の検出) でブロッキング処理した。一次抗体としてマウス抗ヒト SHP2 (monoclonal, Biosciences, Franklin Lakes, USA, Clone 79, Cat. No. 610622)、ウサギ抗ヒト phospho-SHP2 (Tyr542) (polyclonal, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. PA5-17721)、ウサギ抗ヒト phospho-SHP2 (Tyr580) (polyclonal, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 44-558G) またはウサギ抗マウス glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (monoclonal, abcam, Cambridge, UK, clone 6C5, Cat. No. ab8245) を用い、室温で 1 時間あるいは 4℃ で 12 時間メンブレンと反応させた。その後、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA) あるいは HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG (GE Healthcare, Chicago, USA) を室温で 1 時間メンブレンと反応させた。一次および二次抗体の反応を促進させるため、それぞれの反応を Can Get Signal immunostain Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO, Osaka, Japan) の中で行った。メンブレン上の HRP 標識二次抗体を ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で発光させた後、LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いてシグナルを検出した。さらに検出したシグナルの強度を ImageQuant TL software (Fujifilm) を用い

て数値化し、半定量解析を行った。

HS 株化細胞の *PTPN11* cDNA および genome DNA 塩基配列の解析

9 株の HS 細胞、CPEK および健常犬末梢血液由来単核球細胞 (PBMC) から抽出した total RNA を鋳型として、Super Script III (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。同定した犬 *PTPN11* cDNA の塩基配列を基に、5' UTR および 3' UTR にそれぞれ上流プライマーおよび下流プライマーを設計した (Table 4)。各細胞の cDNA を鋳型にして、これらのプライマーと PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa-Bio) を用いて犬 *PTPN11* CDS を含む領域を PCR で増幅した。PCR 産物を 1.2% アガロースゲルで電気泳動し、増幅産物の確認 (約 2800 bp) を行った。次いで、このバンドを切り出し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列の解析を行った。株化細胞および PBMC の genome DNA については、DNeasy tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて各細胞から抽出した。犬 *PTPN11* exon 3 および 13 を増幅するため、それぞれの exon の上流および下流の intron にプライマーを設計した (Table 4)。各細胞の genome DNA を鋳型にして、これらのプライマーと PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、増幅産物の確認 (exon 3, 約 570 bp; exon 13, 約 700 bp) を行った。次いで、これらのバンドを切り出し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列の解析を行った。

統計解析

統計解析は one-way ANOVA with post-hoc Tukey tests あるいは unpaired two-tailed Student's t tests を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意な差とした。

結果

犬 *PTPN11* CDS の全長配列の同定

Figure 3 に犬の心筋から得られた 3158 bp の cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列の解析結果を示した。この cDNA の塩基配列は人およびマウスの *PTPN11* と同じ 1782 bp の CDS を含んでおり、それぞれの塩基配列と 93%および 87%の相同性を示した。また、この塩基配列を犬の genome DNA (NC_006608.3) の配列と比較した結果、人およびマウスの *PTPN11* と同じ 16 個の exon から構成され、exon-intron 境界部の位置も一致していた。さらに、この cDNA の塩基配列から予測したアミノ酸配列は人およびマウス SHP2 のアミノ酸配列と比較して共に 99%の相同性が認められ、N-SH2 ドメインおよび C-SH2 ドメインはいずれも人とマウスで 100%一致していた。また、PTP ドメインおよび C 末端テール部位におけるアミノ酸配列は、人およびマウスと 99%一致していた。C 末端テール部位における SHP2 のリン酸化部位 (Tyr542 および Tyr580) についても犬、マウスおよび人で共通していた。これらの結果から、犬の心筋から得られた cDNA の塩基配列は、人およびマウス *PTPN11* の犬相同分子の塩基配列であり、犬 *PTPN11* として NCBI に登録した (GenBank accession number, MK_372881.1)。

HS 株化細胞における SHP2 の発現およびリン酸化状態

HS 株化細胞における SHP2 およびリン酸化 SHP2 (pSHP2 Tyr542 および Tyr580) のウェスタンブロット解析の結果を Figure 4 に示した。解析に用いたすべての HS 株化細胞で SHP2 の発現が認められた。これらの SHP2 の発現レベルは CHS-2 および CHS-4 と比較して CHS-1、CHS-6 および ROMA で低く、CHS-3 ではわずかであった (Figure 4 A)。

pSHP2 Tyr542 は CHS-2 および CHS-4 ではわずかに検出され、その他の株化細胞ではほとんど検出されなかった (Figure 4 A)。pSHP2 Tyr580 は CHS-1 を除くすべての株化細胞で検出され、特に CHS-2 および CHS-4 において高い発現レベルが認められた (Figure 4 A)。

Figure 4 A における SHP2 およびリン酸化 SHP2 のシグナルを半定量し、GAPDH で標準化した結果を Figure 4 B に示した。SHP2 の発現は CHS-2 および CHS-4 と比較して CHS-1、CHS-3、CHS-6 および ROMA で有意に低かった ($P < 0.05$)。pSHP2 Tyr542 および pSHP2 Tyr580 の発現は、いずれも CHS-1、CHS-3 および CHS-6 で低く、CHS-1 の pSHP2 Tyr542 を除き CHS-2、CHS-4 および ROMA との間に有意差 ($P < 0.05$) が認められた。CHS-1 の pSHP2 Tyr542 については、CHS-4 との間にのみ有意差 ($P < 0.05$) が認められた。pSHP2 Tyr580 については、発現レベルを SHP2 で標準化した場合、HS 株化細胞間での有意差は認められなかった (Figure 4 C)。

HS 株化細胞における *PTPN11* 変異の同定

Table 5 に HS 株化細胞の *PTPN11* 塩基配列の解析結果を示した。各株化細胞の *PTPN11* の塩基配列を犬 *PTPN11* CDS の全長配列 (MK372881.1) と比較した結果、CHS-1、CHS-3、CHS-6 および ROMA において、変異 (それぞれ c.215C>G, p.Ala72Gly; c.226G>C, p.Glu76Gln; c.227A>C, p.Glu76Ala; および c.1508G>T, p.Gly503Val) が認められた。また、HS 株化細胞間において *PTPN11* mRNA の発現状態に差は認められなかった (data not shown)。同様の遺伝子変異はそれぞれの株化細胞の genome DNA においても認められ、CHS-3 はホモ接合性、CHS-1、CHS-6 および ROMA では、ヘテロ接合性の変異であった (Figure 5)。

考察

今回解析したすべての HS 株化細胞 (CHS-1、CHS-3、CHS-6、CHS-2、CHS-4 および ROMA) において SHP2 の発現が認められた。さらに、新たに同定した犬の *PTPN11* CDS の全長配列に基づいて解析した結果、4 株の HS 細胞株では SHP2 に変異を有することが明らかになった (CHS-1, p.Ala72Gly; CHS-3, p.Glu76Gln; CHS-6, p.Glu76Ala; ROMA, p.Gly503Val)。ROMA で認められた変異は過去に HS で報告されている PTP ドメインの変異と同一であったが、CHS-1、CHS-3 および CHS-6 で認められた変異は HS でこれまで知られていない N-SH2 ドメインの新たな変異であった。

HS 株化細胞で認められた SHP2 の変異は SHP2 の Ala72、Glu76 および Gly503 を置換する変異であるが、これらのアミノ酸残基は人の SHP2 において活性制御に重要なドメイン間結合部のアミノ酸残基 Ala72、Glu76 および Gly503 に相当した。人の SHP2 では、N-SH2 ドメインの Ala72 および Glu76 はそれぞれ PTP ドメインの Gly503/Gln506 および Arg265/Ser502 と結合し、PTP ドメインの Gly503 は N-SH2 ドメインの Ala72 および PTP ドメインの Gln506 と結合することで立体構造が非活性な閉構造に維持されている [Hof, et al. 1998; Bocchinfuso, et al. 2007]。このため、これらのアミノ酸残基が変異すると SHP2 の活性化に異常が生じることが知られており、人の白血病では p.Ala72Val、p.Glu76Lys、p.Glu76Gln、p.Glu76Ala および p.Gly503Val などの変異によって SHP2 が恒常

的に活性化することが報告されている [Niihori, et al. 2005]。これらのことから、HS 株化細胞で認められた変異は SHP2 活性の異常を引き起こす可能性が高く、CHS-1、CHS-3、CHS-6、ROMA では細胞の増殖と密接にかかわっていると考えられた。

SHP2 は全ての HS 株化細胞で発現が認められたが、SHP2 変異を有する HS 株化細胞では SHP2 の発現レベルが低いことが示された。今のところ変異を有する株化細胞において SHP の発現レベルが低い理由は明らかではないが、変異を有する株化細胞において共通して SHP2 の発現レベルが低いことを考慮すると、変異による蛋白の安定性や修飾の変化など SHP2 の蛋白寿命を低下させる何らかの要因が関与しているのかもしれない。このように SHP2 は変異により発現レベルが低下する可能性が考えられるが、それが細胞の異常な増殖における変異 SHP2 の役割が小さいことを意味しているわけではない。例えば、人の悪性リンパ腫では p.Lys265Pro を有する MYD88 が細胞増殖に重要な役割を果たすことがあるが、この変異蛋白は発現がわずかであっても細胞増殖に決定的な役割を果たすことが示されている [Choi, et al. 2013]。HS 細胞の増殖における変異 SHP2 の重要性については、発現レベルではなく機能の観点から解析することが必要と考えられた。

SHP2 変異を有する HS 株化細胞ではリン酸化 SHP2 の発現レベルが低いあるいは低い傾向を示し、さらに SHP2 のリン酸化の程度、すなわち SHP2 に対するリン酸化 SHP2 の割合は各株化細胞間で明らかな差は認められなかった。これらの結果は、いずれの変異も SHP2 のリン酸化を促進する要因ではないことを示している。SHP2 はリン酸化部位を有

し様々な状況でそのリン酸化が見られるが、SHP2 の機能におけるリン酸化の役割については十分解明されていない。SHP2 のリン酸化は FGF や PDGF による ERK の活性化を媒介する上で重要であるが、EGFR や IGF による ERK の活性化には必要でないことが知られている [Araki, et al. 2003]。また、別の報告では SHP2 のシグナル伝達にリン酸化の有無は影響しないことも報告されている [O'Reilly, et al. 1998]。HS 株化細胞におけるリン酸化 SHP2 の意義については今後検討する必要があるが、これらの報告を考慮すると変異 SHP2 のリン酸化は HS 株化細胞の増殖において不可欠な要素ではないのかもしれない。

本章では、6 株の HS 株化細胞すべてにおいて SHP2 を発現することが示された。また、犬の *PTPNI/CDS* の全長塩基配列が明らかとなり、これに基づき 4 株の HS 株化細胞で SHP2 の変異が同定された。これらの変異は SHP2 の活性制御に重要なアミノ酸残基に生じていることから、変異を有する HS 細胞では変異 SHP2 が細胞の増殖と密接に関連すると考えられた。

小括

HS 株化細胞における *PTPN11*/SHP2 の発現および変異の有無を明らかにすること
を目的とした。そこで、まず健常犬の心筋由来の cDNA から人およびマウスの *PTPN11*
/SHP2 の相同分子の全長配列を同定した (GenBank accession number, MK_372881.1)。次い
で、ウェスタンブロットにより HS 株化細胞における *PTPN11*/SHP2 の発現を解析したとこ
ろ、解析した全ての HS 細胞株において SHP2 の発現が認められた。さらに、新規に同定
した犬 *PTPN11*/SHP2 の塩基配列に基づいて 9 株の HS 細胞株の *PTPN11*/SHP2 を解析した
ところ、9 株中 4 株で変異 (p.Ala72Gly, CHS-1; p.Glu76Gln, CHS-3; p.Glu76Ala, CHS-6;
p.Gly503Val, ROMA) が認められた。HS 株化細胞で認められたこれらの変異は SHP2 の活
性制御に重要な N-SH2/PTP ドメイン間結合部に生じていることから、変異を有する HS 細
胞では変異 SHP2 が細胞の増殖と密接に関連すると考えられた。

表および図

Table 2. 細胞株

細胞株	細胞の由来	犬種	部位
CHS-1	組織球性肉腫	マルチーズ	皮膚
CHS-3	組織球性肉腫	バーニーズマウンテンドック	皮膚
CHS-6	組織球性肉腫	バーニーズマウンテンドック	リンパ節
CHS-2	組織球性肉腫	シェットランドシープドック	皮膚
CHS-4	組織球性肉腫	フラットコーテッドレトリバー	関節
ROMA	組織球性肉腫	雑種	胸水
MHT-2	組織球性肉腫	バーニーズマウンテンドック	皮膚
CHS-5	組織球性肉腫	ゴールデンレトリバー	関節
CHS-7	組織球性肉腫	フラットコーテッドレトリバー	関節
CPEK	口唇扁平上皮	ビーグル	皮膚

Table 3. 犬の*PTPN11* cDNA全長増幅に用いたプライマー

増幅領域	上流プライマー	下流プライマー	アニーリング温度 (°C)	増幅産物 (bp)
Fragment A	5'-GGAGGAGGAGGAGCGAACC-3'	5'-TCATCACCAGTGCGGACAGAG-3'	58	673
Fragment B	5'-TTTTTCCCCTCCTCACTATTCCTC-3'	5'-GTTTTCCTGTGGCACTGATTCTGA-3'	58	420
Fragment C	5'-CGGAGGGCGGGAGGAACA-3'	5'-AACTGCAGAGAAAAGCCCAACCAT-3'	58	2768

Table 4. HS株化細胞の*PTPN11* 塩基配列の解析に用いたプライマー

増幅領域	上流プライマー	下流プライマー	アニーリング温度 (°C)	増幅産物 (bp)
<i>PTPN11</i> CDS	5'-CGGAGGGCGGGAGGAACA-3'	5'-AACTGCAGAGAAAAGCCCAACCAT-3'	58	2768
<i>PTPN11</i> genomic exon 3	5'-CCGAAGGCAGACACCCAACC-3'	5'-GTAAAGCCAAAGCCCCGTAATG-3'	55	570
<i>PTPN11</i> genomic exon 13	5'-GGTCCCG CTGCTGTGGTCTT-3'	5'-CCTGGGATGTTGTCTGGGAAAAT-3'	58	705

Table 5. HS細胞株における*PTPN11* (SHP2) 変異

細胞株	<i>PTPN11</i> (exon)	SHP2 (domain)	変異の接合状態
CHS-1	c.215C>G (3)	p.Ala72Gly (N-SH2)	ヘテロ接合型
CHS-3	c.226G>C (3)	p.Glu76Gln (N-SH2)	ホモ接合型
CHS-6	c.227A>C (3)	p.Glu76Ala (N-SH2)	ヘテロ接合型
ROMA	c.1750G>T (13)	p.Gly503Val (PTP)	ヘテロ接合型
CHS-2	WT	WT	—
CHS-4	WT	WT	—
CHS-5	WT	WT	—
CHS-7	WT	WT	—
MHT-2	WT	WT	—

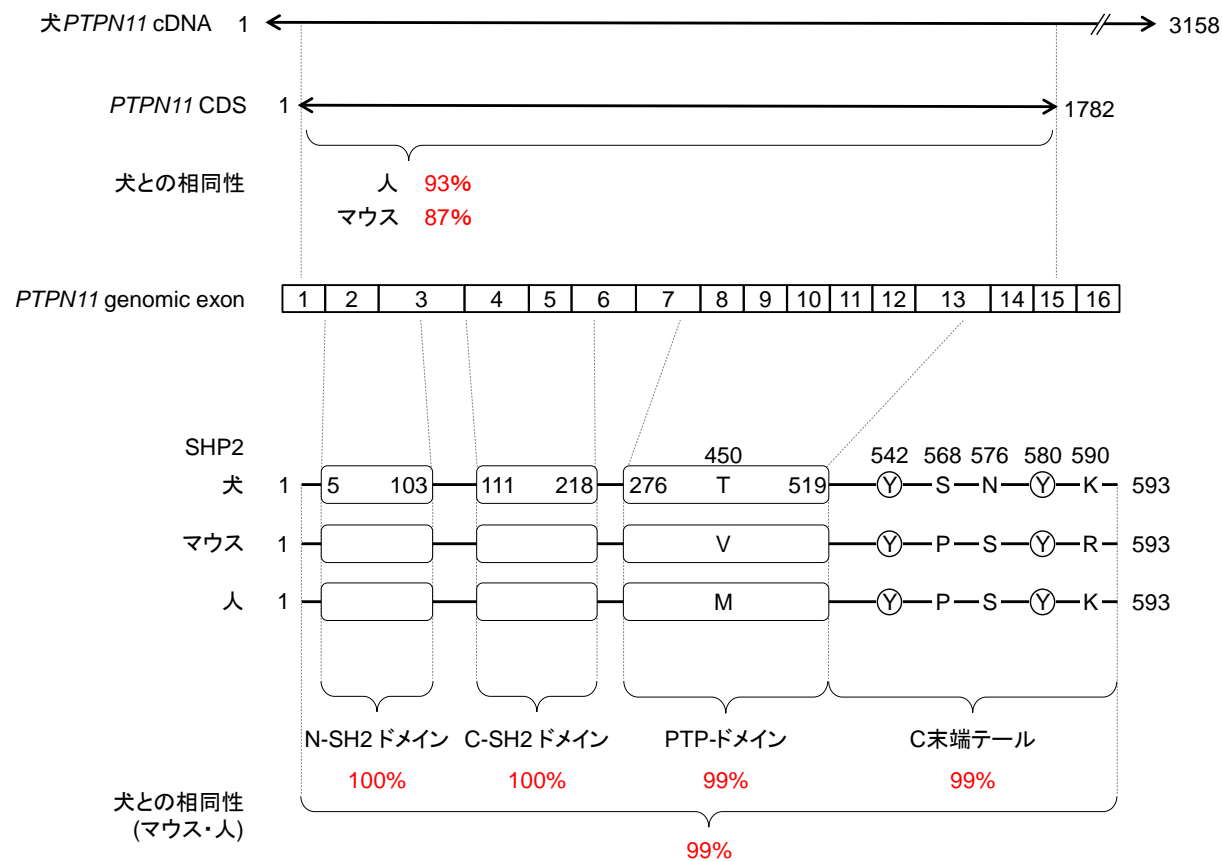


Figure 3. 犬心筋由来cDNAから得られた塩基配列および予測アミノ酸配列の解析結果
人およびマウスにおけるPTPN11の塩基配列とSHP2のアミノ酸配列との相同性を解析した結果をそれぞれ示した。犬心筋由来cDNA (3158 bp) から得られたCDS (1782 bp) は、人およびマウスのPTPN11 CDSとそれぞれ93および87%の相同性を示し、exon-intron境界部はこれらの配列で一致していた。SHP2はN-SH (5-103アミノ酸残基)、C-SH (111-218アミノ酸残基) およびPTPドメイン (276-519アミノ酸残基) の3つのドメインとC末端テールから構成される。犬SHP2の配列を人およびマウスの配列と比較すると、すべての領域で99%以上の相同性が認められた。C末端テール上に存在するSHP2のリン酸化部位 (542および580アミノ酸残基) は犬、人およびマウスで一致していた。また、これらのSHP2配列において異なるアミノ酸残基を配列上に示した (アミノ酸残基450、568、576および590)。

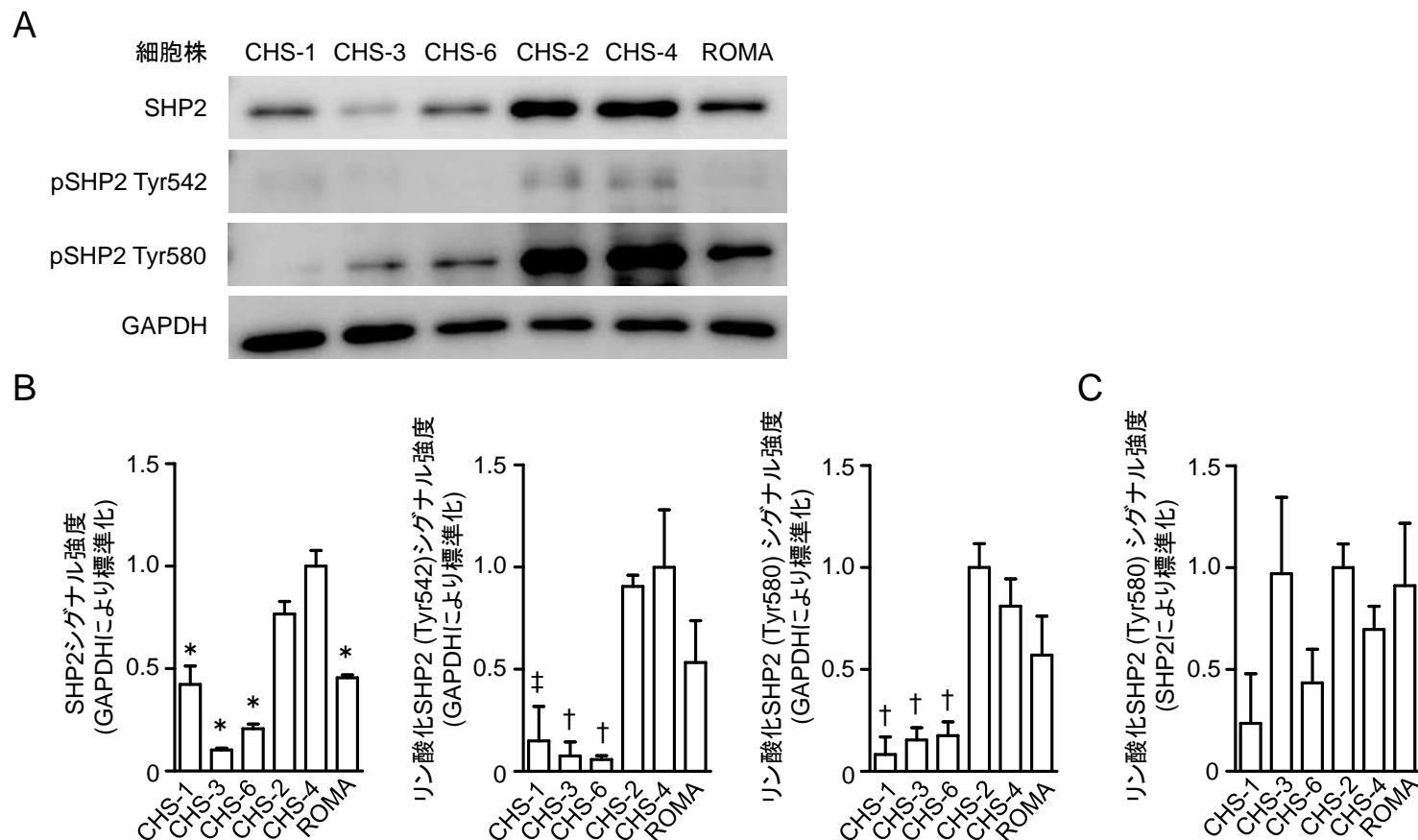
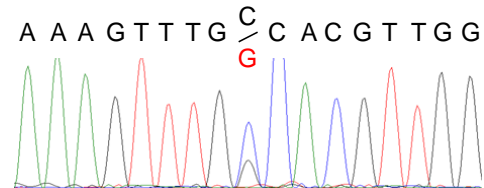


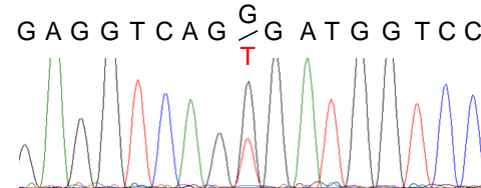
Figure 4. HS細胞株におけるSHP2の発現およびリン酸化状態

(A) SHP2、リン酸化SHP2 (pSHP2 Tyr542およびTyr580) および内因性コントロール (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) の発現状態をウェスタンブロットで検出した。(B) SHP2、pSHP2 Tyr542およびpSHP2 Tyr580のシグナル強度を半定量化し、それぞれの株化細胞のGAPDHの発現で標準化した。標準化したSHP2とpSHP2 Tyr542およびpSHP2 Tyr580のシグナル強度はそれぞれCHS-4およびCHS-2の値を1.0として示した (n = 3)。有意差検定にはone-way ANOVA with a post post-hoc Tukey testを用いた (* $P < 0.05$ vs CHS-2およびCHS-4; † $P < 0.05$ vs CHS-2, CHS-4およびROMA; ‡ $P < 0.05$ vs CHS-4)。(C) pSHP2 Tyr580のシグナル強度を半定量化し、SHP2の発現で標準化した。標準化したpSHP2 Tyr580のシグナル強度はCHS-2の値を1.0として示した (n = 3)。

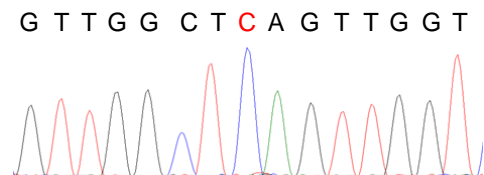
CHS-1 (c.215C>G, p.Ala72Gly)



ROMA (c.1508G>T, p.Gly503Val)



CHS-3 (c.226G>C, p.Glu76Gln)



CHS-6 (c.227A>C, p.Glu76Ala)

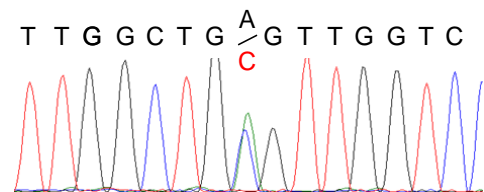


Figure 5. HS細胞株のgenome DNAにおける*PTPN11*変異

*PTPN11*変異が認められたHS株化細胞のgenome DNAにおけるダイレクトシーケンスの結果を示した。*PTPN11* exon 3における変異がCHS-1 (c.215C>G, p.Ala72Gly)、CHS-3 (c.226G>C, p.Glu76Gln) およびCHS-6 (c.227A>C, p.Glu76Ala) で、*PTPN11* exon 13における変異はROMA (c.1508G>T, p.Gly503Val) で認められた。

第 3 章

犬の変異 SHP2 活性化機構の検討

第2章の結果から、4種類のHS株化細胞はSHP2変異 (p.Ala72Gly, CHS-1; p.Glu76Gln, CHS-3; p.Glu76Ala, CHS-6; p.Gly503Val, ROMA) を有することが明らかになった。これらの変異はSHP2が閉構造を維持する上で重要なドメイン間結合部のアミノ酸残基に認められたことから、変異を有する株化細胞ではSHP2の活性化制御異常が生じている可能性が考えられた。

ドメイン間結合部に変異を有するSHP2は、立体構造が開構造に変化することで恒常的に活性化することが報告されている [Bocchinfuso, et al. 2007]。このような変異SHP2は細胞増殖シグナルの活性化を介して腫瘍細胞の異常増殖を引き起こすことから、HSにおいて腫瘍細胞の生存・増殖にきわめて重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、犬においてSHP2の構造および活性におよぼす変異の影響は不明であり、これがHS細胞における変異SHP2の機能的な役割の解明を困難にしている。したがって、HS細胞の増殖におけるSHP2変異の役割を明らかにするためには、HS株化細胞で認められた変異SHP2の活性化機構を解明する必要がある。

そこで本章では、HS細胞株で認められた4種類のSHP2変異 (p.Ala72Gly、p.Glu76Gln、p.Glu76Ala および p.Gly503Val) について、SHP2の構造および活性におよぼす影響を解析した。

材料と方法

細胞

本実験には HEK293T 細胞を用いた。HEK293T 細胞は 10% 非動化牛胎子血清 (Merck)、50 U/ml ペニシリンおよび 50 µg/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (cDMEM; Nacalai Tesque) を用いて 37°C、湿潤環境下で培養した。

SHP099

SHP2 のアロステリック阻害薬である SHP099 は Selleck (Selleck Chemicals, Houston, USA) より購入し、蒸留水で 50 mM の濃度に溶解した後、使用まで -30°C で凍結保存した。

犬 SHP2 の分子内アミノ酸相互作用の *in silico* 解析

The University of California, San Francisco (UCSF), Chimera software (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (UCSF-chimera) を用いて犬 SHP2 の分子内アミノ酸相互作用を *in silico* で解析した。この解析では、SHP2 の立体構造を構成する 3 つのドメイン (N-SH2、C-SH2 および PTP ドメイン) のドメイン間結合を評価した。犬 SHP2 の解析を行

うため、まず人 SHP2 の N-SH2、C-SH2 および PTP ドメインの蛋白構造データを Protein Data Bank より入手した (<http://www.rcsb.org/>; Protein Data Bank ID: 4DGP)。次いで、このデータにおける 450 番目のメチオニン (PTP ドメイン) をスレオニンに置換することで犬野生型 SHP2 の蛋白構造モデルを作成した。この犬野生型 SHP2 の蛋白構造モデルのアミノ酸配列を DunBrack Rotamer library のアルゴリズムに基づいて p.Ala72Gly、p.Glu76Gln、p.Glu76Ala あるいは p.Gly503Val に置換することでそれぞれの犬変異型 SHP2 モデルを作成した。これらの犬 SHP2 の蛋白構造モデルを用いて、分子内アミノ酸間の結合におけるファンデルワールス力を基にした **contact** (引き合う力) および **clash** (反発する力) の変化を解析し可視化した。

Histidine (His)-SUMO タグ付加組換え犬 SHP2 発現プラスミドベクターの作製

犬 SHP2 発現ベクターの作製手順を Figure 6 に示した。第 2 章と同様に、犬の PBMC の total RNA を鋳型にして、Super Script III (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型にして、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa-Bio) と *bsmbI* 認識部位を 5' 末端に付加した上流および下流プライマー (Table 6) を用いて、犬 *PTPN11* の Kozak 配列から終止コドンを含む領域を増幅した。*bsmbI* (New England Biolabs, Ipswich, USA) により pM-SUMOstar プラスミドベクター (LifeSensors) を線状化した後、In-Fusion HD Enzyme Premix を用いてこの増幅産物をベクターの *bsmbI* サイトに組み込ん

だ。これを N 末端 His-SUMO タグ付加野生型犬 SHP2 発現ベクターとした。次いで、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa-Bio) と変異導入プライマー (Table 1) を用いて、犬野生型 SHP2 発現ベクターに変異 (c.215C>G, p.Ala72Gly、c.227A>C, p.Glu76Ala、c.226G>C, p.Glu76Gln あるいは c.1508G>T, p.Gly503Val) を挿入した。

遺伝子導入および組換え SHP2 蛋白の作製

cDMEM に懸濁した HEK293T 細胞 (3 x 10⁶ 個/12 ml) を 15 cm 細胞培養用ディッシュに播種し、37°C、5%CO₂ 湿潤環境下で 12 時間培養した。その後、犬野生型あるいは変異型 SHP2 発現ベクター 6 µg および Polyethylenimine (PEI) 18 µg を含む 600 µL の Opti-MEM 培地 (Thermo Fisher Scientific) を培養上清に添加した。これらの細胞を 72 時間培養した後、ProteoGuard EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail (TaKaRa-Bio) を含む PTP cell lysis buffer (25 mM HEPES, 5% Glycerose, 0.02% Brig-35, 1mM DTT, pH7.5) を用いて細胞を溶解した。Capturem His-Tagged Purification Maxiprep Kit (TaKaRa-Bio) を用いて細胞溶解液から His-SUMO タグ付加組換え SHP2 蛋白を回収し、蛋白濃度をブラッドフォード法で測定した。これらの組換え蛋白を SUMOstar Protease (LifeSancers, Malvern, USA) で処理した後、Capturem His-Tagged Purification Miniprep Column (TaKaRa-Bio) に通すことで切断された His-SUMO タグを除去した。フロースルーサンプルを精製組換え SHP2 蛋白とし、第 2 章と同様のウェスタンブロット法でサンプル中の SHP2 を確認した。

SHP2 活性の測定

SHP2 活性は p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP) Phosphatase Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, USA) を用いて測定した。組換え犬 SHP2 蛋白 (野生型、p.Ala72Gly, p.Glu76Gln, p.Glu76Ala あるいは p.Gly503Val) 10 µg に PTP buffer (25 mM HEPES, 5% Glycero, 0.02% Brig-35, 1mM DTT, pH7.5) 50 µL を加えた後、96 ウェルプレートに分注した。これにフォスファターゼ発色基質である pNPP を加えて 37°C で 30 分間反応させた後、吸光度 (OD 値) を 405 nm で測定した。また、SHP099 による組換え SHP2 活性の阻害実験として、SHP099 (0-10 µM) を加えた PTP buffer を用いて SHP2 活性を同様に測定した。SHP2 の活性 (pmol/min/µg) は下記の式を用いて算出した。

$$\text{Phosphatase activity (pmol/min/}\mu\text{g)} = \frac{(\text{Sample volume in liter}) \times \text{OD (405 nm)} \times 10^{12}}{(K^*) \times (\text{Pathlength of light in cm}) \times (\text{Time in minutes}) \times (\mu\text{g enzyme})}$$

* K , extinction coefficient for pNPP at $A_{405} = 1.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

pNPP Phosphatase Assay の検出限界は人組換え活性化 SHP2 を用いて決定した。様々な濃度 (0-16 µg) の Recombinant Human Active SHP2 Protein (R&D systems, Minneapolis, USA, Cat. No. 1894-SH) の活性を同様の方法で測定し、得られた OD 値を基に検量線を作成した。これを

決定係数 (R^2) を用いて評価し、 $R^2 \geq 0.99$ および $P < 0.002$ を満たす範囲の下限の OD 値を本測定を検出限界とした。

統計解析

統計解析は one-way ANOVA with post-hoc Tukey tests あるいは unpaired two-tailed Student's t tests を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意な差とした。

結果

Ala72、Glu76 および Gly503 変異による SHP2 の分子内アミノ酸相互作用の変化

Ala72、Glu76 および Gly503 変異による SHP2 の分子内アミノ酸の contact および clash を *in silico* 解析した結果を Figure 7 に示した。分子内アミノ酸相互作用は変異の種類によって様々な変化が認められた。これらの変異による contact および clash の数の変化を Figure 7A に示した。野生型の Ala72 (N-SH2 ドメイン) は PTP ドメインの Gly503/Gln506 との間に contact を有しており、clash は認められなかった。変異型の Gly72 ではこれらの相互作用に変化は認められなかった。野生型の Glu76 (N-SH2 ドメイン) で認められた PTP ドメインの Arg265/Ser502 との間の contact は、変異によって減少 (Gln76) および消失 (Ala76) した。これらの 76 アミノ酸残基において clash は認められなかった。野生型の Gly503 (PTP ドメイン) は N-SH2 ドメインの Ala72 および PTP ドメインの Gln506 との間に contact を有しており、clash は認められなかった。変異型の Val503 では、Ala72/Gln506 との間の contact および clash の両方が野生型に比べて増加した。これらの検出された contact および clash を比較すると contact の方がより増加していた。これらの変異による contact/clash の変化に基づき予測される SHP2 の構造を UCSF-Chimera で可視化した。Glu76 変異では SHP2 は開構造に変化する可能性が示された (Figure 7 B)。一方、Ala72 および Gly503 変異 SHP2 は閉構造である可能性が示された (それぞれ Figure 7 C および D)。

変異による SHP2 活性の変化

犬組換え SHP2 のフォスファターゼ活性を Figure 8 に示した。p.Ala72Gly、p.Glu76Ala および p.Glu76Gln SHP2 において恒常的な活性が認められ、野生型および p.Gly503Val SHP2 の活性は検出限界以下であった (Figure 8 A)。p.Glu76Gln SHP2 の活性は p.Ala72Gly および p.Glu76Ala SHP2 と比較して有意に ($P < 0.05$) 低いことが示された (Figure 8 A)。SHP099 による組換え SHP2 活性の阻害実験の結果を Figure 8 B に示した。変異 SHP2 (p.Ala72Gly、p.Glu76Ala および p.Glu76Gln SHP2) の活性は 1 μ M 以上の SHP099 で有意に ($P < 0.05$) 阻害された。p.Ala72Gly SHP2 では 10 μ M の SHP099 存在下で 50%程度の活性を維持していたが、p.Glu76Ala SHP2 および p.Glu76Gln は、それぞれ 6 および 4 μ M 以上の SHP099 において検出限界以下に活性が低下した。

考察

今回の解析から、犬における SHP2 変異はすべてが SHP2 の恒常的な活性化を引き起こすわけではなく、変異の場所や種類により構造と活性に対して異なる影響をおよぼすことが明らかとなった。解析した変異の中でも、p.Ala72Gly、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala は SHP2 の恒常的な活性化を引き起こすことから、HS の増殖において重要な役割を果たしていると考えられた。

第 2 章で述べたように、N-SH2 ドメインの Glu76 アミノ酸は SHP2 の活性制御に重要なドメイン間結合部に位置しており、SHP2 の立体構造を非活性な閉構造に維持する上で重要な役割を果たしている。実際、犬の SHP2 の *in silico* 解析において p.Glu76Gln および p.Glu76Ala はいずれも SHP2 を開構造に変化させることが示された。このことから、犬の SHP2 におけるこれらの変異は SHP2 に構造の変化をもたらすことで SHP2 の恒常的な活性化を引き起こしたと考えられた。

p.Ala72Gly を有する犬の SHP2 は恒常的に活性がすることが示されたが、Glu76 の変異と異なり *in silico* 解析では閉構造であることが示された。SHP2 の活性化には N-SH2 と PTP ドメインの解離による開構造への変化が必要であることから、p.Ala72Gly SHP2 が閉構造のままであったとは考えにくい。近年、活性化変異 p.Ala72Val を有する人の SHP2 を用いた結晶構造解析で、SHP2 はかならずしも完全な開構造でなくとも N-SH2 と PTP の

ドメイン間の距離が部分的に広がることで活性をあらわすことが示されている

[Bocchinfuso, et al. 2007]。この報告では、変異による Ala72 と Gln506 の間のファンデルワールス力に変化は認められないが、Ala72-Gln506 間の水素結合の消失とそれに連鎖した N-SH2 と PTP 間全体の水素結合の消失が起こり、その結果 PTP ドメインに構造異常が生じることが示されている。また、この変化により SHP2 は不完全な開構造であるが活性を持つことも示されている。この報告と変異により置換したアミノ酸の種類が異なるが、変異した残基が同一であること、いずれも非極性疎水性アミノ酸であることを考慮すると、p.Ala72Gly SHP2 においても同様の現象が生じている可能性が考えられる。このような構造変化はファンデルワールス力に基づく *in silico* 解析では捉えることができないため、今回の *in silico* 解析では p.Ala72Val SHP2 は閉構造となったのかもしれない。

p.Ala72Gly、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala SHP2 と異なり、p.Gly503Val SHP2 は *in silico* 解析および組換え蛋白を用いた解析のいずれにおいても非活性であることが示された。まれではあるが、これと同じ変異が人の白血病で同定されており、機能獲得性変異として報告されている [Niihori, et al. 2005]。このように、p.Gly503Val SHP2 は犬と人において活性状態が異なるが、この報告では p.Gly503Val SHP2 の活性は野生型と比較して約 1.4 倍程度と決して高い活性ではない。これに対して機能獲得性変異としてよく知られている p.Glu76Ala SHP2 では野生型と比較して約 5-10 倍の活性が認められる。これらのことから、p.Gly503Val は SHP2 を活性化しないか、したとしてもきわめて低いレベルであり、

Ala72 や Glu76 の変異と比較するとその影響は大きくないと考えられる。一方、この変異については SHP2 の機能喪失性変異として HS 細胞の増殖制御に関与する可能性は否定できない。これまで腫瘍の増殖において SHP2 の機能喪失性変異による制御が報告された例はないが、p.Gly503Val により SHP2 の活性がほぼ完全に抑制されたこと、またシグナル伝達分子の機能喪失性変異は様々な腫瘍において増殖に関与していることを合わせて考えると、p.Gly503Val SHP2 は何らかの制御因子として HS の増殖に関わっているかもしれない。

p.Ala72Gly、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala SHP2 はいずれも恒常的に活性化し、その活性は SHP099 により抑制された。しかしながら、変異によって感受性に相違がみられ、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala SHP2 は p.Ala72Gly SHP2 に比べて SHP099 に対して明らかに高い感受性を示した。SHP099 は SHP2 のドメイン間ポケットに選択的に結合し、SHP2 閉構造に維持することで活性を抑制するアロステリック阻害剤である [Fortanet, et al. 2016]。この SHP099 の作用機序を考えると、p.Ala72Gly SHP2 と p.Glu76Gln/p.Glu76Ala SHP2 の感受性の差には立体構造の相違が関与していると考えられた (Figure 9) [Sun, et al. 20018]。また、同じ Glu76 変異を有する SHP2 でも p.Glu76Ala と p.Glu76Gln SHP2 を比べると、p.Glu76Gln SHP2 の活性は SHP099 よってより強く抑制された。p.Glu76Ala と p.Glu76Gln はいずれも SHP2 を活性化するが、そのレベルは p.Glu76Gln の方が低い。メカニズムについては不明であるが、この SHP2 活性化の強さの違いが SHP099 に対する感受

性の差に起因するのかもしれない。今のところ承認薬とはなっていないが、SHP099 は SHP2 を標的とした癌治療薬として開発された化合物である [Chen, et al. 2016]。本章の実験で、SHP099 は p.Ala72Gly、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala SHP2 の活性を抑制したことから、SHP099 はこれらの変異を持つ HS において新たな治療薬になる可能性があると考えられた。

以上の結果から、SHP2 p.Ala72Gly、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala SHP2 は恒常的な活性化を引き起こす機能獲得性変異であることが明らかとなった。SHP2 p.Gly503Val については、SHP2 の活性化におよぼす機能的役割は明らかでなかった (Figure 9)。これらのことから、活性化変異である SHP2 Ala72/Glu76 変異は HS の治療標的となる可能性があり、これらの変異を有する HS に対して SHP099 は有望な治療薬である可能性が考えられた。

小括

犬の変異 SHP2 の活性化機構を明らかにするために、*in silico* および組換え蛋白を用いた解析を行った。*In silico* 解析では、p.Ala72Gly および p.Gly503Val SHP2 は閉構造であり、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala SHP2 は開構造となることが示された。組換え蛋白を用いて活性を評価したところ、SHP2 p.Ala72Gly、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala は SHP2 の恒常的な活性化を引き起こす機能獲得性変異であり、SHP099 はこれらの変異 SHP2 活性を阻害することが明らかとなった。一方、SHP2 p.Gly503Val については活性化がみられなかった。以上の結果、犬における SHP2 変異はすべてが SHP2 の恒常的な活性化を引き起こすわけではなく、変異の場所や種類により構造と活性に対して異なる影響をおよぼすことが明らかとなった。また、SHP2 の Ala72/Glu76 変異は HS の治療標的となる可能性が考えられた。

表および図

Table 6. 野生型および変異型SHP2発現プラスミドベクターの作製に用いたプライマー

プライマー	SHP2の表現型	上流プライマー	下流プライマー
クローニング 変異導入	野生型	5'-CACAGAGAACAGATTGGAGGTAGGAACATGACATCGCGGA-3'	5'-GGTACCGCGGCCGCTCTAGTCATCTGAAACTTTTCTGCT-3'
	p.Ala72Gly	5'-AAGTTTGGCACGTTGGCTGAGTTGGTC-3'	5'-CAACGTGCCAAACTTTTCCCCTCCATA-3'
	p.Glu76Gln	5'-TTGGCTCAGTTGGTCCAGTATTATATG-3'	5'-GACCAACTGAGCCAACGTGGCAAACCTT-3'
	p.Glu76Ala	5'-TTGGCTGCGTTGGTCCAGTATTATATG-3'	5'-GACCAACGCAGCCAACGTGGCAAACCTT-3'
	p.Gly503Val	5'-AGGTCAGTGATGGTCCAGACAGAAGCA-3'	5'-GACCATCACTGACCTCTGAGACCGCAC-3'

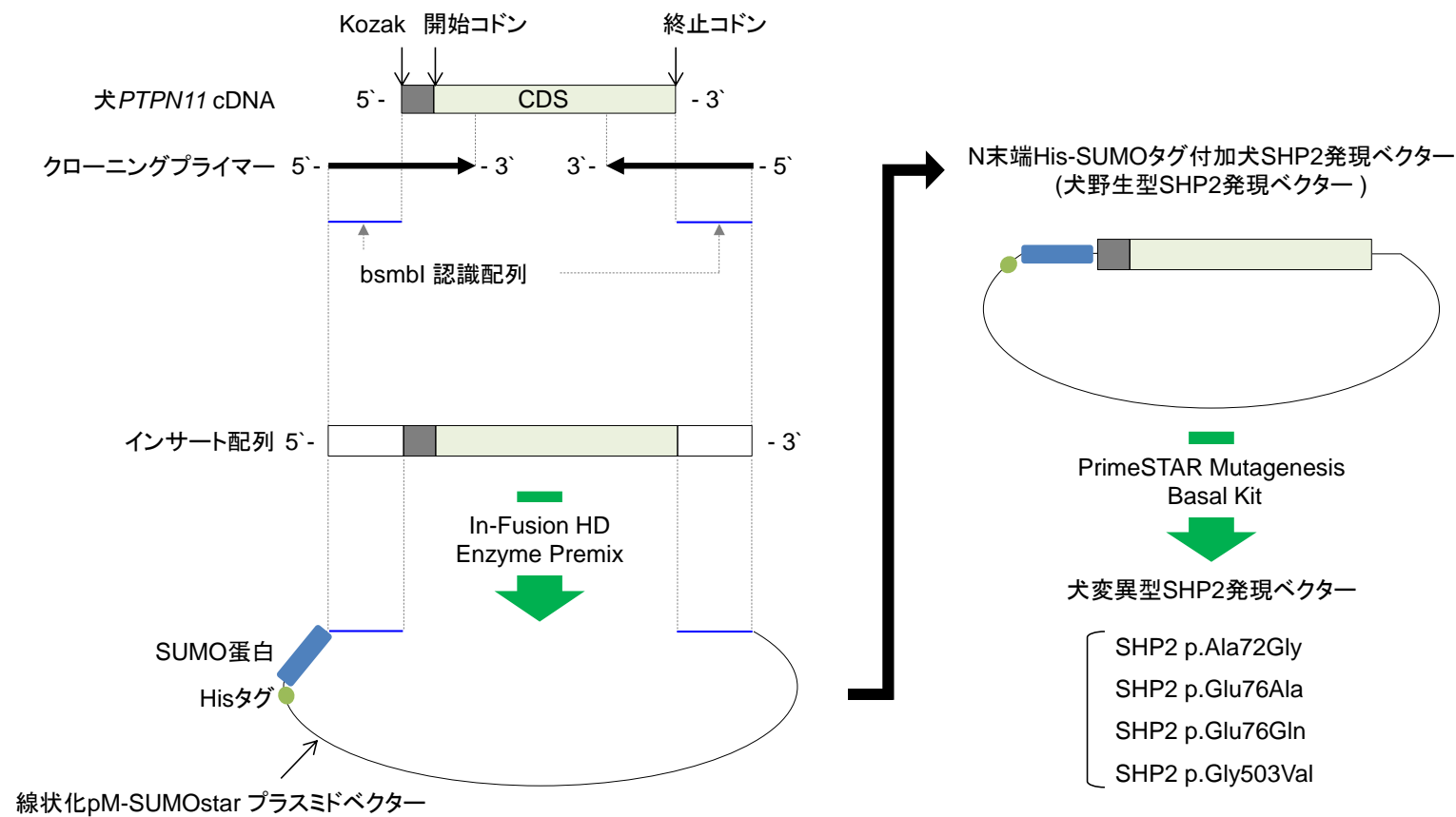
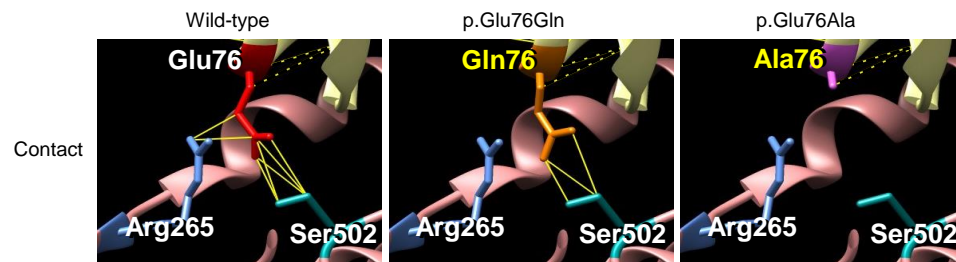


Figure 6. Histidine (His)-SUMOタグ付加組換え犬野生型および変異型SHP2発現プラスミドベクターの作製
PBMC cDNAを鋳型にして、犬PTPN11 cDNA (GenBank accession number, MK372881.1) におけるKozak配列およびCDS領域をbsmbl認識配列を5'末端に付加したクローニングプライマーを用いてPCR増幅した。増幅したインサート配列をIn-Fusion HD Enzyme Premixを用いてベクターに組み込むことでN末端His-SUMOタグ付加犬SHP2発現ベクター(犬野生型SHP2発現ベクター)を作製した。さらに、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kitを用いてそれぞれの変異を導入し、犬変異型SHP2発現ベクターを作製した。

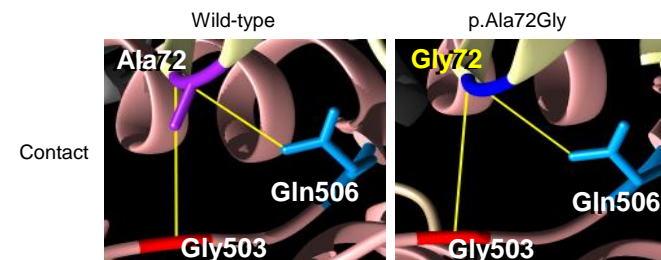
A

アミノ酸残基 (SHP2の表現型)	相互作用を有する アミノ酸残基	相互作用	
		Contact	Clash
Ala72 (野生型)	Gly503	1	0
	Gln506	1	0
Gly72 (p.Ala72Gly)	Gly503	1	0
	Gln506	1	0
Glu76 (野生型)	Arg265	2	0
	Ser502	5	0
Gln76 (p.Glu76Gln)	Arg265	0	0
	Ser502	3	0
Ala76 (p.Glu76Ala)	Arg265	0	0
	Ser502	0	0
Gly503 (野生型)	Ala72	1	0
	Gln506	3	0
Val503 (p.Gly503Val)	Ala72	13	7
	Gln506	10	3

C



B



D

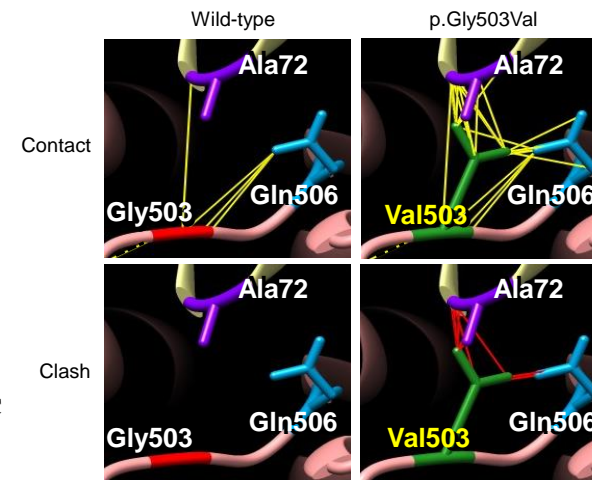
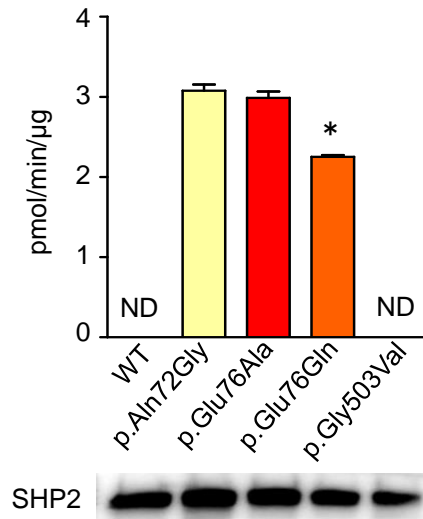


Figure 7. 野生型および変異型SHP2におけるアミノ酸間相互作用に関する*in silico*解析
野生型あるいは変異型SHP2の72、76および503アミノ酸残基における側鎖間のcontactおよびclashについての*in silico*解析結果を示した。(A) SHP2変異によるSHP2分子内のアミノ酸相互作用の変化を示した。(B、CおよびD) UCSF-Chimeraを用いて72アミノ酸残基 (A; 野生型およびp.Ala72Gly SHP2)、76アミノ酸残基 (B; 野生型、p.Glu76Glnおよびp.Glu76Ala SHP2) および503アミノ酸残基 (C; 野生型およびp.Gly503Val SHP2) におけるそれぞれのアミノ酸間相互作用の変化を示した。黄色および赤色の線はそれぞれアミノ酸側鎖間のcontact (negative cut off value value, -0.4 Å; allowance value value, 0.0 Å)およびclash (cut off value value, 0.6 Å; allowance value value, 0.4 Å)を示している。また、黄色の破線はドメイン内のアミノ酸側鎖における相互作用のcontactを示している (BおよびC)。それぞれの変異において、これらのドメイン内のcontactの変化は認められなかった。

A



B

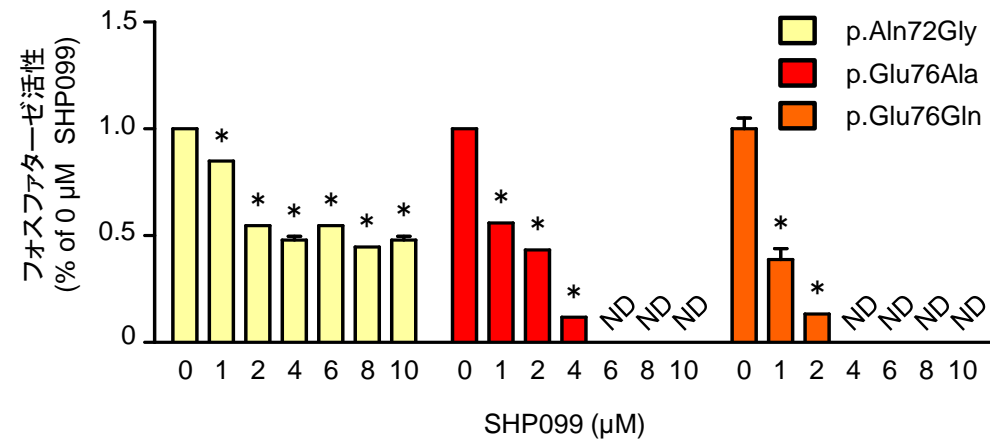


Figure 8.犬組換えSHP2蛋白のフォスファターゼ活性

犬野生型および変異型組換えSHP2蛋白を用いてフォスファターゼ活性を測定した結果を示した。(A) SHP2 p.Aln72Gly (黄色)、p.Glu76Ala (赤色) およびp.Glu76Gln (オレンジ) では恒常的なフォスファターゼ活性が認められた。p.Glu76Glnの活性はp.Aln72Glyおよびp.Glu76Alaと比較して有意に ($P < 0.05$) 低いことが明らかとなった。一方、野生型およびp.Gly503Valでは恒常的な活性は認められなかった。これらのSHP2蛋白をウェスタンブロットにより確認した。有意差検定にはunpaired two-tailed Student's t testsを用いた (* $P < 0.05$ vs p.Aln72Glyおよびp.Glu76Ala) (B) 犬変異SHP2の活性をSHP2阻害剤であるSHP099を用いて確認した。すべてのSHP2活性はSHP099 1 μM 以上の濃度で有意に ($P < 0.05$) 抑制された。p.Aln72GlyではSHP099 10 μM においても50%程度の活性を維持していたが、p.Glu76Glnおよびp.Glu76Alaでは検出限界以下まで活性が低下した。SHP099 0 μM におけるそれぞれの組換えSHP2の活性を1.0として標準化した。また、人組換えSHP2を用いた検量線($r^2 \geq 0.99$ および $P = < 0.002$)に基づいて設定した検出限界の下限值を0とした。有意差検定にはone-way ANOVA with a post post-hoc Tukey testを用いた (* $P < 0.05$ vs 0 μM SHP099)

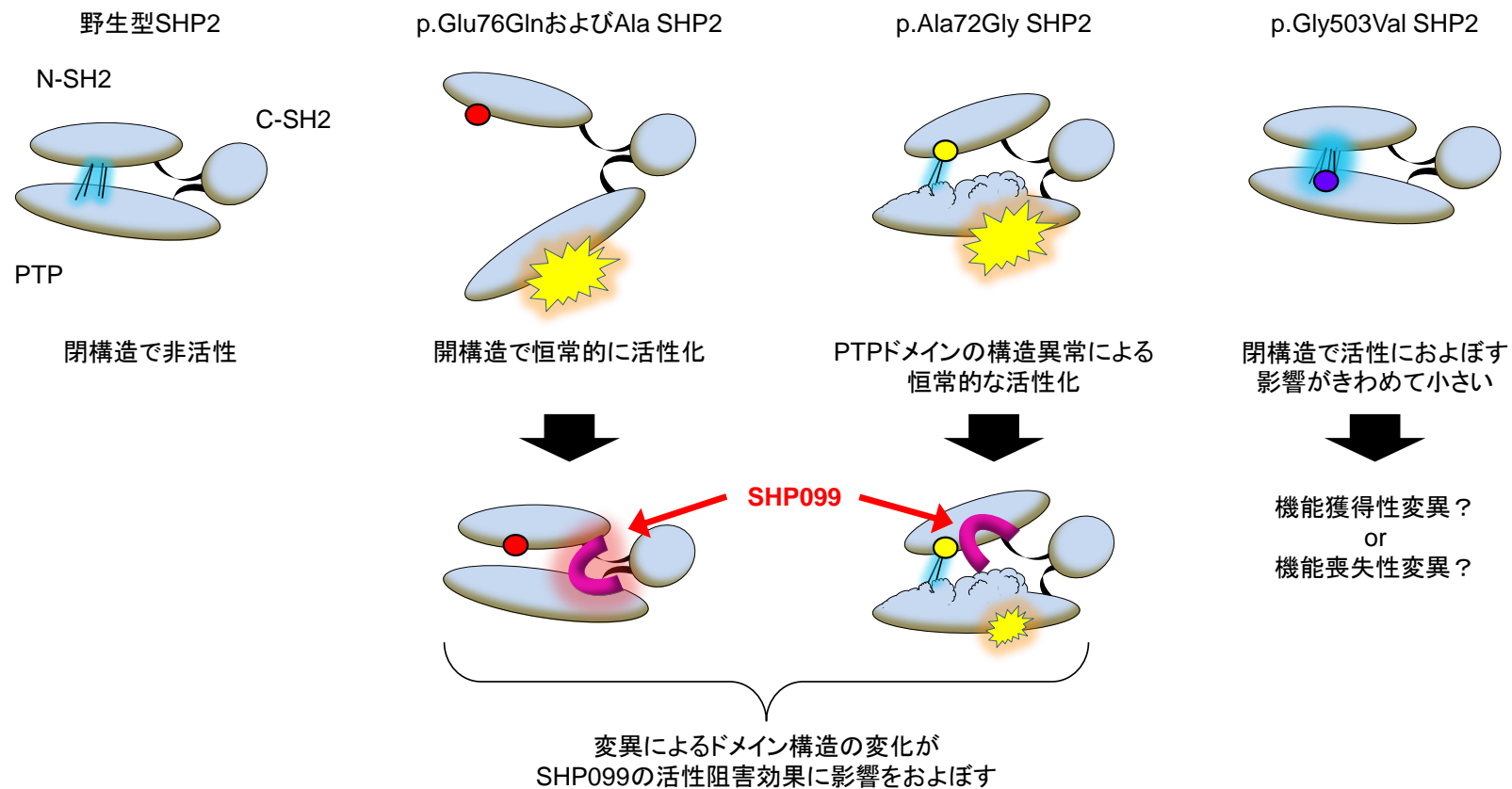


Figure 9. HS株化細胞で認められた変異SHP2の活性におよぼす影響とそれに対するSHP099の阻害効果
 野生型SHP2は定常時で非活性な閉構造であるが、Ala72/Glu76変異SHP2は恒常的な活性を有する。Glu76変異SHP2は開構造であるが、Ala72変異SHP2では*in silico*解析で捉えきれないPTPドメインの構造異常を引き起こす可能性がある。SHP099はこれらのAla72/Glu76変異SHP2の活性を阻害したが、Ala72変異では変異による構造異常によってSHP099に対する親和性が低下した可能性が示唆された。一方、p.Gly503Val SHP2は非活性な閉構造であり、活性におよぼす影響がきわめて小さいため、機能喪失性変異である可能性も考えられた。

第 4 章

HS 細胞に対する SHP2 阻害剤 SHP099 の 抗腫瘍効果の検討

これまでの研究から p.Ala72Gly、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala は SHP2 の機能獲得性変異であり、HS 細胞の増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。また、これらの変異を有する SHP2 の活性は SHP099 により抑制されることが示された。

SHP099 は SHP2 に高い選択性を有し、SHP2 を開構造から閉構造に変化させることで活性を抑制するアロステリック阻害剤である。この阻害剤はもともと変異 SHP2 ではなく野生型 SHP2 を標的として開発された阻害剤である [Fortanet, et al. 2016]。

EGFR、FLT-3 および KIT などのチロシンキナーゼ受容体 (RTK) に変異を有する腫瘍細胞では、RTK のシグナル伝達に SHP2 が重要な役割を果たしている [Köthe, et al. 2013; Unni, et al. 2018]。このため、SHP099 はこれらの腫瘍における RTK-SHP2 シグナルの遮断を目的として開発された。しかしながら、近年、SHP099 は野生型の SHP2 ばかりでなく変異型 SHP2 の活性も抑制することが明らかになり [Pádua, et al. 2018]、さらに SHP099 は SHP2 p.Glu69Lys を有する人の白血病由来株化細胞の増殖を抑制することも報告されている [Sun, et al. 2018]。

これらのことから、SHP099 は HS に対する新たな治療薬となる可能性が考えられるが、Ala72/Glu76 変異 SHP2 の治療標的としての有益性を明らかにするためには組換え蛋白の解析だけでは不十分であり、細胞レベルでの評価が必要である。また、組換え蛋白では非活性であった p.Gly503Val SHP2 についても、SHP099 のおよぼす影響について細胞レベルで確認する必要がある。

そこで本章では、HS 株化細胞の増殖におよぼす SHP099 の影響について検討した。また、SHP099 による SHP2 の下流シグナル伝達経路のリン酸化状態の変化についても解析した。さらに、CHS-6 を用いて HS ノードマウスモデルを作製し、SHP099 の治療薬としての有用性を検討した。

材料と方法

株化細胞

SHP2 に変異を有する 4 株の HS 細胞株 (CHS-1, p.Ala72Gly; CHS-3, p.Glu76Gln; CHS-6, p.Glu76Ala; ROMA, p.Gly503Val)、SHP2 が野生型の HS 細胞株 2 株 (CHS-2 および CHS-4) および犬正常皮膚由来細胞株 CPEK を用いた。これらの株化細胞は 10% 非動化牛胎子血清 (Merck)、50 U/ml ペニシリンおよび 50 μ g/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (cDMEM ; Nacalai Tesque) を用いて 37°C、5%CO₂ 湿潤環境下で培養した。

供試動物

6 週齢の雌のヌードマウス (CrJ:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, Charles river, Wilmington, USA) 16 匹を供試した。

細胞増殖抑制試験

cDMEM に懸濁した各株化細胞を $4-5 \times 10^3$ 個/ウェルとなるように 96 ウェル細胞培養プレートに播種し、37°C、5%CO₂ 湿潤環境下で 15 時間培養した。次いで、各ウェルの培地を 0-10 μ M の SHP099 を含む cDMEM (0.01% V/V の蒸留水あるいは HSP099 を溶

解した蒸留水を含む) に交換し、72 時間培養した。その後、細胞生存率を WST-1 cell proliferation assay kit (TaKaRa-Bio) を用いて測定した。それぞれの株化細胞における SHP099 の 50%阻害濃度 (IC50) は GraphPad Prism software program version 5.01 (GraphPad, California, USA) を用いて算出した。

SHP2 下流シグナル伝達経路の解析

cDMEM に懸濁した 6 株の HS 細胞株 (CHS-1、CHS-2、CHS-3、CHS-4、CHS-6 および ROMA) を 5×10^4 個/ウェルとなるように 6 ウェルプレートに播種し、12 時間培養した。その後、培地を $1 \mu\text{M}$ の SHP099 (0.01% V/V) を含む cDMEM あるいは含まない cDMEM に交換し、24 時間培養した。これらの細胞を細胞溶解緩衝液で溶解した後、細胞溶解液を用いて第 2 章と同様の手順でウエスタンブロット解析を行った。この解析では、一次抗体にはウサギ抗マウス AKT (polyclonal, Cell Signaling, Cat. No. 9272)、ウサギ抗マウス phospho-AKT (Ser473) (polyclonal, Cell Signaling, Cat. No. 9271)、ウサギ抗ラット p44/42MAPK (ERK1/2) (polyclonal, Cell Signaling, Cat. No. 9102)、ウサギ抗ヒト phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (polyclonal, Cell Signaling, Cat. No. 9101)、ウサギ抗ヒト STAT3 α (monoclonal, Cell Signaling, Clone D1A5, Cat. No. 8768)、ウサギ抗マウス phospho-STAT3 (Tyr705) (polyclonal, Cell Signaling, Cat. No. 9131) またはウサギ抗マウス glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (monoclonal, abcam, clone 6C5, Cat. No. ab8245) を用いた。また、二次抗体には horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス

IgG (Jackson Immuno Research Laboratories) あるいは HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG (GE Healthcare) を用いた。一次および二次抗体の反応を促進させるため、それぞれの反応を Can Get Signal immunostain Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO, Osaka, Japan) の中で行った。メンブレン上の HRP 標識二次抗体を ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で発光させた後、LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いてシグナルを検出した。さらに検出したシグナルの強度を ImageQuant TL software (Fujifilm) を用いて数値化し、半定量解析を行った。

CHS-6 移植ヌードマウスモデル作製と SHP099 の抗腫瘍効果の検討

ヌードマウスを用いた実験は、日本獣医生命科学大学の実験動物委員会の承認 (承認番号 2019K-59) を得て行った。ヌードマウスへの腫瘍細胞の生着を促進するため、腫瘍細胞の接種前後にすべてのマウス ($n = 16$) に対して NK 細胞活性を抑制する処置を行った。この処置として、0.2 mg の抗アシアロ GM1 抗体 (Wako, Cat. No. 014-09801) を含む PBS 100 μ L を腫瘍細胞移植の前日、当日および移植から実験終了まで週 2 回マウスに腹腔内投与 (各 1 日 1 回投与) した。移植する腫瘍細胞には CHS-6 を用い、PBS 100 μ L に懸濁した 1.5×10^7 個の CHS-6 をすべてのヌードマウスの体幹皮下に接種した。腫瘍体積が 50 mm^3 に達した時点から、これらのヌードマウスを SHP099 投与群 ($n = 6$) およびコントロール群 ($n = 10$) に分けて飼育した。SHP099 投与群では、2 mg の SHP099 (Selleck)を含む

蒸留水 100 μ L を 1 日 1 回胃ゾンデで経口投与した (SHP099, 100 mg/kg)。コントロール群は蒸留水 100 μ L のみを同様に投与した。投与開始日を 1 日とし、21 日まで投与を行った。移植 CHS-6 に対する SHP099 の効果は腫瘍の大きさで評価した。腫瘍の大きさはノギスを用いて 1 日 1 回計測した。腫瘍体積は計算式： $V = L \times W \times H \times 0.5236$ (V, 腫瘍容積; L, 長径; W, 短径; H, 高さ) により算出した。投与開始から 21 日目にすべてのヌードマウスを安楽殺し、腫瘍の摘出および剖検を行った。

摘出腫瘍組織の評価

摘出した腫瘍を 10%緩衝ホルマリンで固定した。固定組織をパラフィン包埋した後、4 μ m 厚の組織切片を作製した。この組織切片を用いてヘマトキシリンエオジン (HE) 染色あるいは Ki-67 の免疫組織化学染色を行い、それぞれ病理学的評価と Ki-67 指数の評価を行った。Ki-67 の免疫組織化学染色には、マウス抗ヒト Ki-67 抗体 (monoclonal, Dako, Santa Clara, USA, clone MIB-1) および Dako EnVision HRP Kit (Dako) を用いた。Ki-67 指数は PathoCount (MITANI, Fukui, Japan) を用いて 1 つの切片上の独立した 3 視野における 400 倍 1 視野あたりの Ki-67 陽性腫瘍細胞数を検出し、同一視野中の全ての腫瘍細胞数に占める割合 (%) で表した。

統計処理

統計解析は unpaired two-tailed Student's t tests を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意な差とした。

結果

SHP099 による CHS-3 および CHS-6 選択的な細胞増殖抑制

SHP099 による HS 株化細胞および CPEK の細胞生存率の変化を Figure 10 に示した。SHP2 p.Glu76Gln および p.Glu76Ala を有する HS 株化細胞 (それぞれ CHS-3 および CHS-6) は、他の細胞株と比較して SHP099 に対して強い感受性を示した (Figure 10 A)。これらの CHS-3 および CHS-6 における SHP099 の IC₅₀ はそれぞれ 1.9 ± 0.4 および $0.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$ であった (Figure 10 B)。これに対して、その他の細胞株は $10 \mu\text{M}$ の SHP099 濃度においても 50%以上の細胞が生存していた (Figure 10 A)。これらの細胞株における SHP099 の IC₅₀ は SHP2 p.Ala72Gly を有する CHS-1 で $7.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$ であり、SHP2 p.Gly503Val および SHP2 野生型の細胞株では $10 \mu\text{M}$ 以上であった (Figure 10 B)。

SHP2 下流シグナル伝達経路におよぼす SHP099 の影響

HS 株化細胞の SHP2 下流シグナル伝達経路の発現およびリン酸化状態におよぼす SHP099 の影響を Figure 11 に示した。すべての HS 株化細胞で ERK、AKT および STAT3 の発現および AKT の恒常的なリン酸化が認められた (Figure 11 A)。恒常的な ERK のリン酸化は、CHS-4 および ROMA を除く HS 株化細胞で認められた (Figure 11 A)。一方、STAT3 のリン酸化はすべての HS 株化細胞で認められなかった。SHP099 ($1 \mu\text{M}$) は CHS-6 の ERK のリン酸化を抑制したが、その他の HS 株化細胞では ERK のリン酸化の抑制は認

められなかった (Figure 11 A)。SHP099 による AKT のリン酸化の抑制はすべての HS 株化細胞で認められなかった。Figure 11 A のリン酸化 ERK およびリン酸化 AKT を半定量した結果を Figure 11 B に示した。CHS-6 における ERK のリン酸化は SHP099 によって有意 ($P < 0.05$) に抑制されたが、その他の HS 株化細胞における ERK のリン酸化状態に有意な変化は認められなかった。また、すべての HS 株化細胞において SHP099 による AKT のリン酸化状態の有意な変化は認められなかった。

CHS-6 移植ヌードマウスモデルにおける SHP099 の腫瘍縮小効果

CHS-6 移植ヌードマウスに対する SHP099 の効果を Figure 12 に示した。SHP099 投与群の移植腫瘍の体積は、コントロール群あるいは SHP099 投与群の投与 1 日目と比較して、投与 2 日目以降に有意な ($P < 0.05$) 縮小が認められた (Figure 12 A)。摘出した移植腫瘍組織を HE 染色した結果を Figure 12 B に示した。コントロール群では腫瘍細胞が腫瘍内に充実性に存在し、腫瘍細胞の周囲筋組織への浸潤が認められた。一方、SHP099 投与群では腫瘍の多くを線維性結合組織が占めており、腫瘍細胞が占める割合は少なかった。摘出した移植腫瘍組織を Ki-67 染色した結果を Figure 12 C および D に示した。コントロール群と比較して、SHP099 投与群では Ki-67 陽性細胞の数が著しく減少しており (Figure 12 C)、SHP099 投与群の Ki-67 指数はコントロール群と比較して有意に ($P < 0.05$) 低下した (Figure 12 D)。投与期間中、SHP099 投与群およびコントロール群においてマウスの体重に

明らかな差は認められなかった(Figure 12 E)。投与期間終了後のマウスの剖検において、

SHP099 投与群およびコントロール群ともに明らかな転移は認められなかった。

考察

SHP099 は SHP2 に Glu76 変異 (p.Glu76Gln, p.Glu76Ala) を有する HS 株化細胞に対して *in vitro* で著しい増殖抑制効果を示し、Ala72 (p.Ala72Gly) あるいは Gly503 (p.Gly503Val) 変異を有する HS 株化細胞ではその効果が弱いことが示された。さらに、SHP099 は p.Glu76Ala SHP2 を有する HS 株化細胞を用いた移植マウスモデルにおいても強い抗腫瘍活性を持つことが明らかとなった。

SHP2 Glu76 変異と Ala72 変異はともに機能獲得性変異であるが、細胞レベルでは明らかに SHP099 感受性に差がみられた。第 3 章において、これらの変異を発現した組換え蛋白ではいずれも SHP099 により活性が抑制されが、SHP099 は Ala72 変異に比べて Glu76 変異を有する SHP の活性をより強く抑制することが示されている。そのメカニズムとして、Glu76 に変異を持つ SHP2 が完全な開構造であるのに対して、Ala72 に変異を持つ SHP2 は SHP099 の結合親和性が低い不完全な開構造でことが示唆されている。HS 株化細胞における SHP099 感受性の相違には、このような SHP2 の変異部位による立体構造の差が関連している可能性が高く、その結果 Ala72 変異 SHP2 を有する CHS-1 では SHP099 の増殖抑制効果が低かったと考えられた。

これまでの研究において、HS 細胞の増殖における p.Gly503Val SHP2 の機能的な役割は明らかにできなかったが、変異による恒常的な活性化がみられないこと、また

ROMA は SHP099 でほとんど細胞増殖抑制がみられなかったことを考慮すると、p.Gly503Val SHP2 が活性化を介してこの細胞の増殖に積極的な役割を果たしているとは考えにくい。しかしながら、第3章で議論したように機能喪失性変異として機能している可能性は否定できず、この場合は今回の SHP099 による細胞増殖抑制試験では確認することができない。今後、HS 細胞の生存・増殖における p.Gly503Val SHP2 の役割を解明するためには、変異による SHP2 の下流分子群や相互作用する分子群の変化について包括的に解析する必要があると考えられた。

SHP2 は RAS-ERK、PI3K-AKT および JAK-STAT 経路を含む様々な細胞内シグナル伝達経路を活性化することが報告されており、特に腫瘍細胞の生存および増殖には RAS-ERK 経路の活性化が重要とされている [Chan, et al. 2007; Matozaki, et al. 2009]。SHP099 は CHS-6 (p.Glu76Ala) の増殖を抑制すると同時に ERK リン酸化をほぼ完全に抑制したことから、この細胞では恒常的に活性化した SHP2 による ERK の活性化が増殖に重要な役割を果たしており、SHP099 はこの経路を遮断したことで CHS-6 の増殖を抑制したと考えられた。一方、SHP099 に対して同様に感受性を有する CHS-3 (p.Glu76Gln) では ERK、AKT、STAT3 のリン酸化に変化は認められなかった。SHP2 は NF- κ B、JNK、Wnt/ β -catenin、Hippo および RhoA などの様々な下流シグナル伝達経路を活性化する場合もあることから [Coulombe, et al. 2015]、CHS-3 ではこれらの下流シグナル伝達経路を利用し細胞増殖を行っている可能性が示唆された。

SHP099 は p.Glu76Ala SHP2 を有する CHS-6 に対して *in vivo* で著しく腫瘍を縮小させるとから、このような変異を持つ HS 症例において有益な治療薬となる可能性が高い。また、同一アミノ酸残基に変異を持つ p.Glu76Gln SHP2 についても、SHP099 により活性が阻害されること、またこの変異 SHP2 を持つ CHS-3 は *in vitro* で CHS-6 と同程度の SHP099 感受性を持つことから、SHP099 は p.Glu76Gln SHP2 を有する HS 症例においても有望な治療薬となる可能性が考えられる。

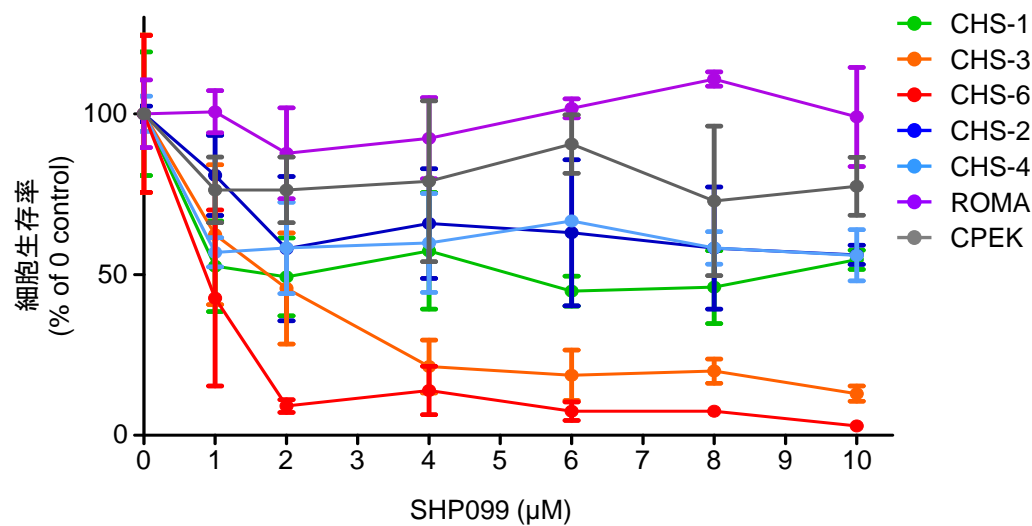
以上より、p.Glu76Ala および p.Glu76Gln SHP2 は HS における重要な治療標的分子であり、SHP099 はこのような変異 SHP2 を有する HS に対して有望な治療薬シーズと考えられた。

小括

HS に対する SHP099 の治療薬としての可能性を検討するため、まず HS 細胞株の SHP099 に対する感受性を *in vitro* で解析した。次いで、Glu76 変異を有する CHS-6 を用いて移植マウスモデルでの SHP099 の効果を検討した。*In vitro* で解析では、SHP099 は Glu76 変異を有する HS 株化細胞 (CHS-3, p.Glu76Gln; CHS-6, p.Glu76Ala) に対して著しい増殖抑制効果を示し、SHP2 が野生型の HS 株化細胞、Ala72 (p.Ala72Gly) あるいは Gly503 (p.Gly503Val) 変異を有する HS 株化細胞ではその効果が弱いことが示された。CHS-6 を用いた移植マウスモデルでは、SHP099 は CHS-6 に対して強い抗腫瘍活性を持つことが明らかとなった。以上より、p.Glu76Ala および p.Glu76Gln SHP2 は HS における重要な治療標的分子であり、SHP099 はこのような変異 SHP2 を有する HS に対して有望な治療薬シーズと考えられた。



A



B

細胞株 (SHP2)	IC50 (μM)
CHS-1 (p.Ala72Gly)	7.5 ± 1.5
CHS-3 (p.Glu76Gln)	1.9 ± 0.4
CHS-6 (p.Glu76Ala)	0.9 ± 0.1
CHS-2 (野生型)	> 10
CHS-4 (野生型)	> 10
ROMA (p.Ala72Gly)	> 10
CPEK (野生型)	> 10

Figure 10. HS株化細胞およびCPEKに対するSHP099の細胞増殖抑制

HS株化細胞およびCPEKに対するSHP099を用いた細胞増殖抑制試験の結果を示した。(A) CHS-3およびCHS-6では、その他の株化細胞と比較してSHP099に対する感受性が認められた (mean ± SD, n = 3)。(B) SHP099に対する各株化細胞の50%阻害濃度 (IC50; mean ± SEM, n = 3) を示した。

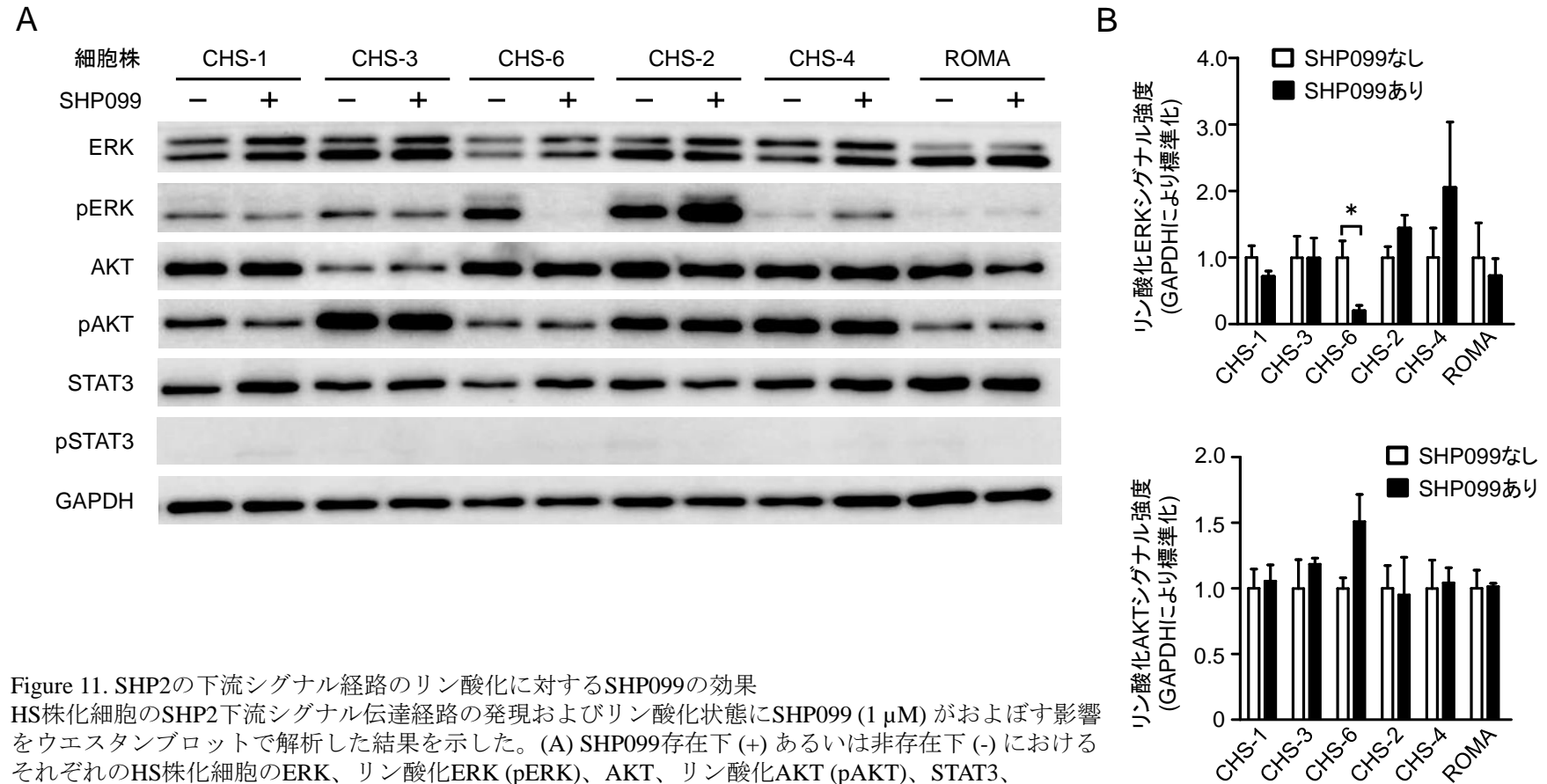


Figure 11. SHP2の下流シグナル経路のリン酸化に対するSHP099の効果

HS株化細胞のSHP2下流シグナル伝達経路の発現およびリン酸化状態にSHP099 (1 μ M) がおよぼす影響をウェスタンブロットで解析した結果を示した。(A) SHP099存在下 (+) あるいは非存在下 (-) におけるそれぞれのHS株化細胞のERK、リン酸化ERK (pERK)、AKT、リン酸化AKT (pAKT)、STAT3、リン酸化STAT3 (pSTAT3) およびGAPDHの発現状態をウェスタンブロット法で解析した結果を示した。(B) pERKおよびpAKTの発現状態をGAPDHで標準化し、半定量した結果を示した。これらのリン酸化蛋白の発現レベルをそれぞれのSHP099非存在下におけるHS株化細胞の発現レベルを1.0として標準化した (mean \pm SD, n = 3)。*SHP099 1 μ M存在下あるいは非存在下における各細胞間に有意差を表した ($P < 0.05$; unpaired two-tailed Student's *t* tests)。

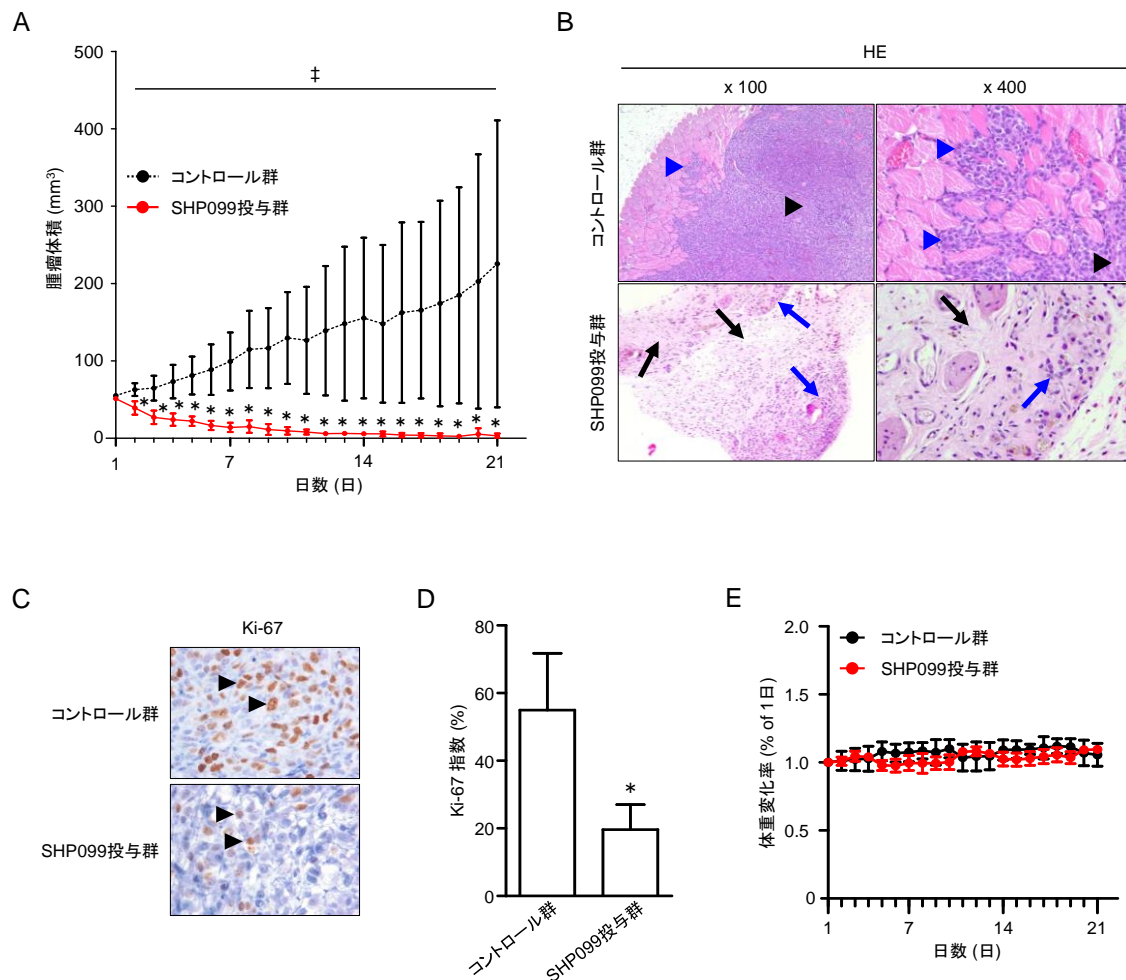


Figure 12. CHS-6移植ヌードマウスモデルを用いたSHP099の抗腫瘍効果

CHS-6移植ヌードマウスモデルを用いてSHP099の抗腫瘍効果を検討した結果を示した。CHS-6をヌードマウスに皮下接種した後に、腫瘍体積が50 mm³に達した時点を1日とし、SHP099投与群 (n = 6) およびコントロール群 (n = 10) に振り分けた。(A) SHP099による移植腫瘍体積の変化を示した。SHP099投与群ではコントロール群あるいはSHP099投与群の投与1日目と比較して有意な (それぞれ $P < 0.05$ あるいは $*P < 0.05$) 腫瘍の縮小効果が投与2日目以降に認められた ($*P < 0.05$; unpaired two-tailed Student's *t* tests)。(B) 摘出した腫瘍組織をヘマトキシリンエオジン (HE) 染色した結果を示した。コントロール群では、腫瘍組織内において腫瘍細胞が充実に認められ (黒矢頭)、周囲の筋肉内への腫瘍細胞の浸潤像が認められた (青矢頭)。SHP099投与群では、腫瘍が線維性結合組織に置換 (青矢印) されており、一部に腫瘍細胞が認められた (黒矢印)。(CおよびD) 摘出した腫瘍組織をKi-67染色した結果を示した。SHP099投与群では、コントロール群と比較してKi-67陽性細胞 (黒矢頭) が減少していた (C, x 1000倍)。Ki-67陽性細胞数の腫瘍細胞数に対する割合 (Ki-67指数) を1スライドあたりx 400倍3視野において算出した (D)。SHP099投与群では、コントロール群と比較して有意に ($P < 0.05$) Ki-67指数が低下していた ($*P < 0.05$; unpaired two-tailed Student's *t* tests)。(E) SHP099投与群およびコントロール群におけるマウスの体重変化を示した。試験期間中、両群においてマウスの体重に明らかな変化は認められず、また明らかな副作用は認められなかった。

第 5 章

総括

犬の組織球性肉腫 (HS) は進行性で転移性の高い悪性腫瘍であり、このため治療においてしばしば抗がん剤が用いられる。しかしながら、HS の抗がん剤に対する反応性は高くはなく、また肉眼病変を有する症例で抗がん剤による治療を行った例では中央生存期間が 3-6 カ月と短い。このため、HS に対する新たな治療法が必要とされている。

Src homology two domain-containing phosphatase 2 (SHP2) は PTPN11 にコードされる非受容体型チロシンキナーゼフォスファターゼである。SHP2 はリン酸化したチロシンキナーゼ受容体 (RTK) と結合することで様々な下流シグナル伝達系を活性化する。近年、一部の HS 症例は腫瘍細胞の PTPN11/SHP2 に p.Glu76Lys および p.Gly503Val と推定される変異を持つことが示されている。SHP2 は 2 つの src homology 2 ドメイン (N-SH2 および C-SH2)、protein tyrosine phosphatase (PTP) ドメインおよびリン酸化部位を含む C 末端テール領域から構成されている。定常状態の SHP2 は N-SH2 ドメインが PTP ドメインに結合した自己抑制構造である”閉構造”をとる。RTK からの刺激を受けた SHP2 は、その構造が”開構造”に変化し、活性化することが知られている。HS の SHP2 変異部位として推定された Glu76 および Gly503 アミノ酸残基はそれぞれ N-SH2 および PTP ドメインに存在し、これらのアミノ酸残基は SHP2 の活性制御に重要なドメイン間結合部に位置している。この部位に変異を有する SHP2 は開構造に変化し、恒常的に活性化して異常な細胞の増殖を引き起こすため、変異 SHP2 は様々な腫瘍において新規の治療標的として注目され

ている。このため、変異 SHP2 は HS においても腫瘍細胞の増殖に重要な役割を果たすと考えられ、HS の治療標的分子となる可能性が考えられる。

SHP099 (6-(4-amino-4-methylpiperidin-1-yl)-3-(2,3-dichlorophenyl)pyrazin-2-amine) は人の野生型 SHP2 の結晶構造解析に基づいて開発された新規ピラジン系化合物であり、高い細胞膜透過性と経口での高い生体内利用率を有している。この化合物は SHP2 を構成する 3 つのドメイン間のポケットに結合し、その構造を開構造から閉構造に変化させることで SHP2 の活性を抑制する作用を持つ。SHP2 は RTK に変異を有する腫瘍細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たしており、SHP099 はこれらの変異を有する腫瘍株化細胞の増殖を抑制する。さらに、SHP099 は変異型 SHP2 を有する人の白血病由来株化細胞の増殖を抑制することから、変異 SHP2 を標的とした新規治療薬としても注目されている。

HS では PTPN11/SHP2 に変異を有する症例が存在し、その変異部位は SHP2 の活性制御に重要なアミノ酸残基に位置すると考えられる。しかしながら、これまで犬における PTPN11 の全長配列/SHP2 の全長アミノ酸配列は同定されていないため、変異の正確な場所は明らかでない。また、犬の SHP2 変異が立体構造や活性におよぼす影響あるいは細胞レベルでの犬の SHP2 変異の機能的な役割についてはまったく分かっていない。これらのことを明らかにすることで、HS 細胞における SHP2 変異の治療標的としての有用性と SHP099 の治療薬としての可能性が明らかになると考えた。

そこで本研究では、まず犬の PTPN11 翻訳領域 (CDS) の全長配列を同定し、HS 株化細胞における PTPN11/SHP2 の発現および変異の有無を解析した。次いで、*in silico* および犬 SHP2 組換え蛋白を用いて変異 SHP2 の活性化機構を解析した。さらに、HS 株化細胞の増殖におよぼす SHP099 の影響を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

1. HS 株化細胞における PTPN11/SHP2 の発現および変異の解析

HS 株化細胞における PTPN11/SHP2 の発現および変異の有無を明らかにすること
を目的とした。そこで、まず健常犬の心筋由来の cDNA から人およびマウスの PTPN11
/SHP2 の相同分子の全長配列を同定した (GenBank accession number, MK372881.1)。次い
で、ウェスタンブロットを用いて HS 株化細胞における PTPN11/SHP2 の発現を解析したと
ころ、解析した全ての HS 細胞株において SHP2 の発現が認められた。さらに、新規に同
定した犬 PTPN11/SHP2 の塩基配列に基づいて 9 株の HS 細胞株の PTPN11/SHP2 を解析し
たところ、9 株中 4 株で変異 (p.Ala72Gly, CHS-1; p.Glu76Gln, CHS-3; p.Glu76Ala, CHS-6;
p.Gly503Val, ROMA) が認められた。HS 株化細胞で認められたこれらの変異は SHP2 の活
性制御に重要な N-SH2/PTP ドメイン間結合部に生じていることから、変異を有する HS 細
胞では変異 SHP2 が細胞の増殖と密接に関連すると考えられた。

2. 犬の変異 SHP2 の活性化機構に関する解析

犬の変異 SHP2 の活性化機構を明らかにするために、換え蛋白ならびに *in silico* による解析を行った。組換え蛋白を用いて SHP2 の活性を評価したところ、SHP2 p.Ala72Gly、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala は SHP2 の恒常的な活性化を引き起こす機能獲得性変異であり、SHP099 はこれらの変異 SHP2 活性を阻害することが明らかとなった。一方、野生型 SH2 および SHP2 p.Gly503Val については活性化がみられなかった。*In silico* 解析では、p.Ala72Gly および p.Gly503Val SHP2 は閉構造であり、p.Glu76Gln および p.Glu76Ala SHP2 は開構造となることが示された。以上の結果、犬における SHP2 変異はすべてが SHP2 の恒常的な活性化を引き起こすわけではなく、変異の場所や種類により構造と活性に対して異なる影響をおよぼすことが明らかとなった。また、SHP2 の Ala72/Glu76 変異は HS の治療標的となる可能性があり、これらの変異を有する HS に対して SHP099 は有望な治療薬となる可能性が考えられた。

3. HS 株化細胞に対する SHP099 の効果に関する検討

HS に対する SHP099 の治療薬としての可能性を検討するため、まず HS 細胞株の SHP099 に対する感受性を *in vitro* で解析した。その結果、SHP099 は Glu76 変異を有する HS 株化細胞 (CHS-3, p.Glu76Gln; CHS-6, p.Glu76Ala) に対して著しい増殖抑制効果を示し、SHP2 が野生型の HS 株化細胞、Ala72 (p.Ala72Gly) あるいは Gly503 (p.Gly503Val) 変異を有する HS 株化細胞ではその効果が弱いことが示された。次いで、Glu76 変異を有す

る CHS-6 を用いて移植マウスモデルでの SHP099 の効果を検討したところ、SHP099 は CHS-6 に対して強い抗腫瘍活性を持つことが明らかとなった。以上より、p.Glu76Ala および p.Glu76Gln SHP2 は HS における重要な治療標的分子であり、SHP099 はこのような変異 SHP2 を有する HS に対して有望な治療薬シーズと考えられた。

本研究より、HS 株化細胞で同定した p.Glu76Gln および p.Glu76Ala は SHP2 の機能獲得性変異であり、これらの変異 SHP2 は HS の治療標的分子と考えられた。さらに、SHP099 はこのような変異 SHP2 を有する HS に対して新たな治療薬となる可能性が考えられた。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際し御親切な御指導を賜った日本獣医生命科学大学獣医臨床病理学教室盆子原誠教授に心から感謝の意を表します。

また、始終御指導、御教授を頂いた日本獣医生命科学大学獣医臨床病理学教室田村恭一助教ならびにアニマルウェルネスセンター小林正人氏に深謝致します。さらに、研究の遂行にあたりご協力頂いた日本獣医生命科学大学獣医保健看護学基礎部門比較遺伝学研究分野落合和彦准教授、日本獣医生命科学大学獣医衛生学研究室田中良和教授、日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室道下正貴准教授、日本獣医生命科学大学比較動物医学研究室中田友明講師、日本獣医生命科学大学獣医繁殖学研究室小林正典講師および東京農工大学獣医臨床腫瘍学研究室皆上大吾准教授ならびにご協力頂いた飯島しずか、高木慎介、風間匠、亀山仁美、小島佳帆、大角なお、熊谷岳の各氏をはじめとする本学獣医臨床病理学教室各位と日本獣医生命科学大学附属動物医療センター長島智和氏に深謝いたします。本学大学院獣医生命科学研究科博士課程獣医学専攻の栗田晟那ならびに宮本良の両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と家族に心より感謝いたします。

参考文献

Araki T, Nawa H, Neel BG. Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. *J Biol Chem*. 2003;278(43):41677-41684.

Azakami D, Bonkobara M, Washizu T, et al. Establishment and biological characterization of canine histiocytic sarcoma cell lines. *J Vet Med Sci*. 2006;68(12):1343-1346.

Bocchinfuso IG, Stella L, Martinelli S, et al. Structural and Functional Effects of Disease-Causing Amino Acid Substitutions Affecting Residues Ala72 and Glu76 of the Protein Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Proteins*. 2007;66(4):963-974.

Cannon C, Borgatti A, Henson M, et al. Evaluation of a combination chemotherapy protocol including lomustine and doxorubicin in canine histiocytic sarcoma. *J Small Anim Pract*. 2015;56(7):425-9.

Chan RJ, Feng GS. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. *Blood*. 2007;109(3):862-867.

Chen YN, LaMarche MJ, Chan HM, et al. Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature*. 2016;535(7610):148-152.

Choi JW, Kim Y, Lee JH, et al. MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2013;44(7):1375-1381.

Coulombe G, Rivard N. New and unexpected biological functions for the src-homology 2 domain-containing phosphatase SHP-2 in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;2(1):11-21.

Fortanet GJ, Chen C, Chen PY, et al. Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. *J Med Chem*. 2016;59(17):7773-7782.

Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, et al. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*. 1998;92(4):441-450.

Huang WQ, Lin Q, Zhuang X, et al. Structure, function, and pathogenesis of SHP2 in developmental

disorders and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2014;14(6):567-588.

Klahn SL, Kitchell BE, Dervisis NG. Evaluation and comparison of outcomes in dogs with periarticular and nonperiarticular histiocytic sarcoma. *J Am Vet Med Assoc*. 2011;239(1):90-96.

Köthe S, Müller JP, Böhmer SA, et al. Features of Ras activation by a mislocalized oncogenic tyrosine kinase: FLT3 ITD signals through K-Ras at the plasma membrane of acute myeloid leukemia cells. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 20):4746-4755.

Marlowe KW, Robat CS, Clarke DL, et al. Primary pulmonary histiocytic sarcoma in dogs: A retrospective analysis of 37 cases (2000-2015). *Vet Comp Oncol*. 2018;16(4):658-63.

Mason SL, Finotello R, Blackwood L. Epirubicin in the treatment of canine histiocytic sarcoma: sequential, alternating and rescue chemotherapy. *Vet Comp Oncol*. 2018;16(1):E30-E7.

Matozaki T, Murata Y, Saito Y, et al.. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Sci*. 2009;100(10):1786-1793.

Moore AS, Taylor DP, Reppas G, et al. Chemotherapy for dogs with lymph node metastasis from histiocytic sarcomas. *Aust Vet J.* 2017;95(1-2):37-40.

Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, et al. Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet.* 2005;50(4):192-202.

O'Reilly AM, Neel BG. Structural determinants of SHP-2 function and specificity in *Xenopus* mesoderm induction. *Mol Cell Biol.* 1998;18(1):161-177.

Pádua RAP, Sun Y, Marko I, et al. Mechanism of activating mutations and allosteric drug inhibition of the phosphatase SHP2. *Nat Commun.* 2018;9(1):4507.

Pandey R, Saxena M, Kapur R. Role of SHP2 in hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr Opin Hematol.* 2017;24(4):307-313.

Qu CK. The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions. *Cell Res.* 2000;10(4):279-288. Rehman AU, Rahman MU, Khan MT, et al. The landscape of protein tyrosine phosphatase (Shp2) and cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(32):3767-3777.

Rassnick KM, Moore AS, Russell NC, et al. Phase II, open-label trial of single-agent CCNU in dogs with previously untreated histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med.* 2010;24(6):1528-31.

Rehman AU, Rahman MU, Khan MT, et al. The landscape of protein tyrosine phosphatase (Shp2) and cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(32):3767-3777.

Skorupski KA, Clifford CA, Paoloni MC, et al. CCNU for the treatment of dogs with histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med.* 2007;21(1):121-126.

Skorupski KA, Rodriguez CO, Krick EL, et al. Long-term survival in dogs with localized histiocytic sarcoma treated with CCNU as an adjuvant to local therapy. *Vet Comp Oncol.* 2009;7(2):139-44.

Sun X, Ren Y, Gunawan S, et al. Selective inhibition of leukemia-associated SHP2E69K mutant by the allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Leukemia.* 2018;32(5):1246-1249.

Takada M1, Smyth LA1, Thaiwong T, et al. Activating Mutations in PTPN11 and KRAS in Canine

Histiocytic Sarcomas. *Genes*. 2019;10(7). pii: E505.

Tani H, Kurita S, Miyamoto R, et al. Nimustine treatment of 11 cases of canine histiocytic sarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. [accepted on Aug 14, 2019]

Thaiwong T, Sirivisoot S, Takada M, et al. Gain-of-function mutation in PTPN11 in histiocytic sarcomas of Bernese Mountain Dogs. *Vet Comp Oncol*. 2018;16(2):220-228.

Unni AM, Harbourne B, Oh MH, et al. Hyperactivation of ERK by multiple mechanisms is toxic to RTK-RAS mutation-driven lung adenocarcinoma cells. *Elife*. 2018;7:pii: e33718.

Wellman ML, Krakowka S, Jacobs RM, et al. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1988;24(3):223-229.

Wouda RM, Miller ME, Chon E, Stein TJ. Clinical effects of vinorelbine administration in the management of various malignant tumor types in dogs: 58 cases (1997-2012). *J Am Vet Med Assoc*. 2015;246(11):1230-7.