

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)

学位論文の内容の要旨

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

谷 浩由輝

(指導教授又は指導教員：盆子原 誠)

犬の組織球性肉腫 (HS) では、腫瘍細胞が src homology two domain-containing phosphatase 2 (SHP2; *PTPN11* 遺伝子産物) に変異を有することが示されている。しかしながら、犬の *PTPN11* の塩基配列は決定されていないため、変異の正確な場所については明らかでない。また、SHP2 変異の HS 細胞の増殖における機能的な役割に関しても分かっていない。SHP099 は SHP2 を閉構造に維持することで SHP2 の活性を阻害するアロステリック阻害剤である。本研究の目的は、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ことである。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、ウエスタンブロッティングを用いて HS 株化細胞における *PTPN11*/SHP2 の発現を解析したところ、解析したすべての 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。犬の変異 SHP2 の活性化機構を明らかにするために、組換え蛋白および *in silico* による解析を行った。組換え蛋白を用いて変異 SHP2 のフォスファターゼ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。*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。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/CPEK および SHP2 p.Ala72Gly/p.Gly503Val 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。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。