

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 谷 浩由輝

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 の抗癌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。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、ウエ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。

以上のように、本論文は犬の組織球性肉腫における増殖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。