

論文の内容の要旨

論文題目 Identification of Ki23819, a highly potent inhibitor of kinase activity of mutant FLT3 receptor tyrosine kinase.

和訳 新規 FLT3 阻害剤 Ki23819 の抗白血病活性の解析

指導教官 小川 誠司 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 3 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 米野 由希子

FLT3 は造血細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼである。急性骨髄性白血病 (AML) 症例の 9 割以上に FLT3 の発現を認めるが、その約 30% に、FLT3 の恒常活性化型変異体である internal tandem duplication (ITD) が認められる。FLT3-ITD 陽性 AML では、陰性例に比べ有意に予後が悪いとされている。このため、分子標的治療薬としての FLT3 阻害剤は、有望な白血病治療薬となることが期待されており、海外では臨床試験が進行している。しかし臨床試験において、既存の FLT3 阻害剤「単独」での抗白血病活性は充分と言えず、他剤との併用療法の確立、更なる新薬の開発が望まれている。

今回我々は、新規 FLT3 阻害剤として「Ki23819」を同定し、その *in vitro* 活性の解析をおこなった。Ki23819 は、ATP 類似のキノリン母核とウレア構造とを組み合わせ、独自の構造を有している。

まず FLT3-ITD 恒常的リン酸化に対する抑制効果を検討した。FLT3-ITD 陽性ヒト白血病細胞株である MOLM13 および MV4-11 を Ki23819 に 1 時間曝露したところ、IC50 が、MOLM13 では 3 nM、MV4-11 では 1 nM という、極めて低い濃度で自己リン酸化が抑制された。次に、FLT3 の kinase domain を用いて *in vitro* kinase assay を行った。FLT3 自己リン酸化は IC50 10.2 nM で抑制され、Ki23819 は FLT3 の kinase domain に直接作用することが示された。

続いて細胞増殖への影響を、5 種類の細胞株で評価した。72 時間の曝露により、MOLM13 と MV4-11 の増殖は IC50 が 1nM 以下という低濃度で抑制された。一方 wild type の FLT のみを発現する THP-1、また FLT3 を発現しない HL-60 と K562 では増殖抑制が見られなかった。この細胞増殖抑制効果を既存の FLT3 阻害剤 SU11248 と比較した。MOLM13・MV4-11 の両細胞で、Ki23819 の増殖抑制効果は SU11248 よりも約 10 倍強力であった。

Annexin V と PI を用いアポトーシスアッセイを行った。MOLM13 について 0, 3, 10 nM の各濃度で、48 時間および 60 時間の曝露後解析をおこなったところ、早期アポトーシスおよび細胞死を呈する細胞が濃度依存性、時間依存性に増加した。MV4-11 でも同様の結果が得られた。この結果から、Ki23819 による増殖抑制はアポトーシスによることが示された。

以上の効果について、細胞の違いを除いて評価するため、IL-3 依存性細胞株 32D に、wild type FLT3、FLT3-ITD、empty vector を transfection し、stable clone を各 2 クローンずつ樹立した。ITD クローンのみが IL-3 非依存性を獲得した。これらの細胞で、まず Ki23819 の FLT3 自己リン酸化抑制を評価した。ITD クローンではリガンド非存在下で自己リン酸化が効果的に抑制され、IC50 は 3nM であった。一方リガンドで活性化された wild type FLT3 のリン酸化抑制にはより高濃度を必要とし、IC50 は 30nM であった。次に、ITD クローン 2 クローンに対し、IL-3 非存在下で 72 時間曝露したところ、

両者で差はあるものの増殖抑制効果が確認された。Ki23819 による FLT3 の下流シグナルに対する影響を調べるため、まず ERK、STAT5、Akt の活性化状態を各クローンについて評価した。ERK、STAT5 は ITD クローンのみで恒常的に活性化されていた。Akt はいずれのクローンでも活性化していた。そこで、ITD 下流で恒常的に活性化した ERK・STAT5 に対する、Ki23819 の影響を評価した。1 時間の曝露により、両者とも IC50 3nM でリン酸化が抑制された。一方 parent の 32D 細胞では、IL-3 により活性化された両分子に対して Ki23819 はリン酸化を抑制しなかった。従って、FLT3 下流分子の抑制は、これらに対する直接の効果ではなく、FLT3 のリン酸化抑制を介するものと考えられた。

以上をまとめると、Ki23819 は、FLT3-ITD 陽性白血病細胞株および 32D FLT3-ITD クローンにおいて、FLT3 の恒常的リン酸化・細胞増殖・FLT3 下流シグナルを IC50 1 ~3 nM で抑制し、強力な FLT3 阻害活性を示した。また、既存の FLT3 阻害剤 SU11248 よりも低濃度で FLT3-ITD 陽性細胞株の増殖を抑制した。FLT3 自己リン酸化抑制効果は wild type FLT3 および FLT3-ITD の両者において見られたが、FLT3-ITD に対する効果がより強力であった。これらの結果から、Ki23819 は、wild type FLT3 及び FLT3-ITD の両者を抑制する、有望な FLT3 阻害剤であることが示された。