

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 米野 由希子

本研究は急性骨髄性白血病症例の約 30%で検出される恒常活性化型変異体 FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3)、“FLT3-ITD (internal tandem duplication)”をターゲットとした新規分子標的治療薬 Ki32819 の、*in vitro* における抗白血病活性を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. FLT3-ITD はリガンド非依存性に、恒常的にリン酸化されているが、これに対する Ki23819 の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。また、FLT3 の kinase domain を用いた *in vitro* kinase assay では、FLT3 自己リン酸化が 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。
2. 5 種類のヒト白血病細胞株に対する細胞増殖効果を評価した。72 時間の曝露により、FLT3-ITD を発現する 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 と比較したところ、MOLM13・MV4-11 の両細胞に対する Ki23819 の増殖抑制効果は SU11248 よりも約 10 倍強力であった。
3. Annexin V と PI を用いたフローサイトメトリーで、アポトーシスアッセイを行った。MOLM13 および MV4-11 を Ki23819 に曝露したところ、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。この結果から、2. で示された 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。
4. 以上の効果について、細胞の違いを除いて評価するため、マウス 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。ITD クローンではリガンド非依存性自己リン酸化が効果的に抑制された (IC₅₀ 3nM)。一方リガンド刺激で活性化された wild type FLT3 のリン酸化抑制にはより高濃度を必要とした (IC₅₀ 30nM)。ITD クローンの IL-3 非存在性増殖に対しても抑制効果が確認された。

5. FLT3 の下流シグナルとして ERK、STAT5、Akt の活性化状態を上記の各クローンについて評価したところ、ERK と STAT5 が ITD クローンのみで恒常的に活性化されていた。そこで、FLT3-ITD の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、本論文は、Ki23819 が wild type FLT3 及び FLT3-ITD の両者を抑制する、有望な FLT3 阻害剤であることを示した。本研究は、現在も治療が困難である急性骨髄性白血病に対する、新規の治療薬の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。