

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 竹内 由則

論文題目

Studies on molecular-targeted therapy in canine mast cell tumor

(イヌの肥満細胞腫における分子標的治療に関する研究)

肥満細胞腫 (Mast cell tumor, MCT)は、発生頻度の高いイヌの皮膚腫瘍の一つである。本腫瘍はきわめて多様な臨床的挙動を取り、標準的な治療法として外科的摘出、放射線照射、化学療法およびその併用療法が用いられている。近年、イヌ MCT の 15~40%が *KIT* 遺伝子に変異を有することが明らかにされた。*KIT* 遺伝子は *c-Kit* 受容体をコードしており、このような *KIT* 遺伝子変異は、リガンドである Stem cell factor (SCF) との結合を必要としない *c-Kit* のリン酸化を引き起こす。イヌの MCT 症例に対し、この異常リン酸化 *c-Kit* の分子標的治療薬であるチロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosine kinase inhibitor, TKI) の有効性が報告されるようになった。本研究では、イヌ MCT における分子標的治療を進展させるために、本疾患の分子基盤を明らかにする一連の解析を行った。

第 1 章: イヌ MCT 細胞株における *KIT* 遺伝子変異および *c-Kit* リン酸化の解析

複数のイヌ MCT 細胞株について、*KIT* 遺伝子変異、*c-Kit* のリン酸化について解析した。細胞株として HRMC、VIMC1、CoMS1 および CMMC1 を用いた。HRMC は野生型 *c-Kit* を発現していた。VIMC1 と CoMS1 からは全く同じ配列の *KIT* が得られ、これらは細胞外領域に 1 アミノ酸置換を有していた。CMMC1 からは 3 種の *KIT* 配列が得られ、それぞれ、細胞外領域の 1 アミノ酸欠失 (配列 A)、細胞外領域の 1 アミノ酸置換、および膜近傍領域の Internal tandem duplication (ITD) (配列 B)、およびナンセンス変異を有していた (配列 C)。4 つの細胞株において *c-Kit* は SCF 非存在下でリン酸化されていることが示された。HRMC 細胞においては SCF の発現を認めたため、この株について SCF 自己分泌機構について解析した。その結果、HRMC 細胞では細胞内自己分泌機構の存在が示唆された。以上の結果より、HRMC では SCF 自己分泌機構により、また、VIMC1、CoMS1、および CMMC1 では *c-Kit* の構造的変異により、*c-Kit* のリン酸化が引き起こされているものと考えられた。

第 2 章: イヌ MCT 細胞株に対する TKI の効果に関する解析

イヌ MCT 細胞株に対する 4 種の TKI による増殖阻害効果を検討した。細胞株として HRMC、VIMC1、CMMC1 を使用し、TKI として Axitinib、Imatinib、Masitinib、Vatalanib の 4 剤を用いた。これら 4 剤の HRMC 細胞に対する IC₅₀ 値は、VIMC1、CMMC1 と比べると明らかに高く、その増殖阻害には高い薬物濃度が必要であった。HRMC および CMMC1 においては、*c-Kit* リン酸化を抑制する濃度で細胞増殖も抑制された。これに対し、VIMC1

の c-Kit リン酸化を抑制するには、その増殖を抑制するよりもはるかに高い濃度が必要であった。以上の結果より、*KIT* 遺伝子変異のない細胞株 (HRMC) は *KIT* 遺伝子変異を有する細胞に比べて TKI に対する感受性が低いことが明らかにされた。また、VIMC1 においては、TKI は c-Kit 以外の標的に作用することによって増殖を抑制している可能性が高いことが示唆された。

第 3 章: イヌ MCT に対する新規治療標的に関する探索的研究

新たな治療標的分子を見出すため、イヌ MCT 細胞株 (HRMC、VIMC1、CMMC1) についてさまざまなキナーゼの mRNA 発現およびリン酸化の状態、さらに多数の特異的阻害剤による阻害効果を解析した。HRMC、VIMC1 および CMMC1 においては、それぞれ 11、7、7 種類のチロシンキナーゼの mRNA が発現していた。また、HRMC、VIMC1、および CMMC1 においては、それぞれ 12、8、7 種類のキナーゼのリン酸化が認められた。さらに 95 種類の阻害剤のうち、HRMC、VIMC1 および CMMC1 に対して、それぞれ 10、9、17 種類の阻害剤が阻害効果を示した。これら 3 つの細胞株で共通してその阻害効果が認められた分子および共通してリン酸化されていた分子はイヌ MCT に対する有力な治療標的となるものと考えられた。

第 4 章: イヌ MCT 症例における *KIT* 遺伝子変異および c-Kit リン酸化の解析

イヌ MCT 症例において *KIT* の全塩基配列を解析した研究は少ない。本章では 33 頭のイヌから得られた MCT 臨床検体について *KIT* 塩基配列および c-Kit のリン酸化を解析した。33 頭の症例のうち、9 頭で *KIT* 配列の変化が認められた。検出された *KIT* 遺伝子変異としては、Exon2 におけるナンセンス変異、Exon6 および 7 の完全欠失、Exon11 における ITD、1 アミノ酸置換、1 アミノ酸欠失があった。また、13 検体で c-Kit タンパクが検出され、このうち 12 検体でそのリン酸化が確認された。この 12 検体には *KIT* 変異が認められる場合と認められない場合があった。今回 Exon2, 6, 7 においてはこれまでに知られていない変異が同定され、イヌ MCT では *KIT* のさまざまなドメインに変異が存在することが明らかになった。また、*KIT* 変異が存在しない MCT においても c-Kit が活性化している可能性が示された。

本研究における一連の成果は、イヌの MCT においては複雑な分子病態が存在することを明らかにしたものであり、有効な分子標的治療の発展に寄与する基盤を提供するものと考えている。さらに、これらをもとにして研究を進展させることにより、イヌの MCT に対するテーラーメイド型治療が実現できるものと考えられる。

本申請論文を審査した結果、博士 (獣医学) の学位を授与するに値すると判断した。