

論文の内容の要旨

東京大学農学部獣医学専攻

平成 21 年度博士課程入学

氏 名 鈴木 日吉

指導教員名 辻本 元 教授

論文題目

Basic studies on the molecular-targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors in canine lymphoid neoplasms

(犬のリンパ系腫瘍におけるチロシンキナーゼ阻害薬を用いた分子標的療法に関する基盤的研究)

チロシンキナーゼ (Tyrosine kinase, TK) は細胞の活性化や増殖を制御するシグナル伝達分子であり、医学領域では、TK 遺伝子の変異、タンパク発現量、およびその活性の変化が悪性腫瘍の発生に関与していることが知られている。これら所見をもとにして開発された TK 阻害薬が臨床応用されており、腫瘍細胞の増殖を特異的に抑制する分子標的抗腫瘍薬として成果を挙げている。また、リンパ球の活性化や増殖を制御するシグナル伝達系にも TK が関与しており、人の一部のリンパ系腫瘍において ALK 等の TK の恒常的活性化が認められることから、TK 阻害薬の臨床応用も検討されている。一方、獣医学領域では、犬のリンパ系腫瘍細胞株において受容体型 TK の FLT3 を恒常的に活性化させる変異が見い出されているが、リンパ系腫瘍の病態における TK の関与や TK 阻害薬の臨床応用は検討されていない。本研究では、犬のリンパ系腫瘍における TK 阻害薬の抗腫瘍効果の検討するため、各種 TK 阻害薬の犬のリンパ系腫瘍細胞株に対する効果を解析し、増殖抑制効果を示した TK 阻害薬が作用する分子に関してその遺伝子塩基配列、タンパク発現量、および TK 活性を検討した。

第 1 章 犬のリンパ系腫瘍細胞株におけるチロシンキナーゼ阻害薬の増殖抑制効果

犬のリンパ系腫瘍細胞株の一つである GL-1 では TK の一分子である FLT3 に変異が認められ、TK 阻害薬 lestaurtinib に高い感受性を示すことが報告された。しかし、これまでに犬のリンパ系腫瘍における TK 阻害薬の増殖抑制効果を包括的に検討した研究は行われていない。そこで、本章では 10 種類の TK 阻害薬 (axitinib, bosutinib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, masutinib, sorafenib, sunitinib, vatalanib) に関して、6 種類の犬のリンパ系腫瘍細胞株 (CL-1, CLBL-1, EMA, GL-1, Nody-1, UL-1) を用い、これら薬剤に対する感受性を比較検討した。CLBL-1 および EMA

における dasatinib の 50%増殖阻害濃度(50% inhibitory concentration, IC50)は、他 4 種の細胞株における IC50 よりも 40~1,000 倍低かった。また、GL-1 における sorafenib および sunitinib の IC50 は他 5 種の細胞株における値よりもそれぞれ 60~300 倍および 40~200 倍低かった。他 7 種の TK 阻害薬に関しては、犬のリンパ系腫瘍細胞株間で IC50 の有意な差は認められなかった。

sorafenib と sunitinib は変異のある FLT3 に対し親和性が高く、GL-1 が他 5 種の細胞株より sorafenib や sunitinib に高感受性だったことは、異常に活性化した FLT3 の GL-1 の生存や増殖への関与を示唆した過去の報告を支持する。他 4 種の細胞株より dasatinib に対する感受性が高かった CLBL-1 と EMA では、dasatinib が作用する何らかの異常に活性化した TK がその生存や増殖に関与していることが示唆された。

第 2 章 犬の SRC のアミノ酸置換がもたらす dasatinib の SRC 活性阻害作用に対する影響

異常に活性化した TK の特定は、犬のリンパ系腫瘍に対する TK 阻害薬の臨床応用の検討で重要である。dasatinib は *bcr-abl* 遺伝子変異に特異的な TK 阻害薬として開発されたが、SRC ファミリーキナーゼを含む広範な TK の活性化を阻害する。作用分子の遺伝子塩基配列の変異によるアミノ酸置換は TK 阻害薬の親和性が変化する原因になるため、本章では dasatinib の増殖抑制効果の原因分子として、CLBL-1 と EMA で遺伝子塩基配列の変異が認められた *src* 遺伝子に着目した。CLBL-1 と EMA の *src* 遺伝子の塩基配列を健常犬のものと比較した結果、これら 2 細胞株では同じ部位において 2 アミノ酸残基のまったく同じ置換が認められた。これら細胞株の SRC タンパクの発現量を抗ヒト SRC 抗体による Western blotting で比較したところ、その発現量は他の細胞株とほぼ同様であった。次に、抗ヒト SRC 抗体を用いた免疫沈降により SRC タンパクを単離し、そのペプチド中のチロシン残基のリン酸化能を *in vitro* で測定することによって SRC の TK 活性を測定した。これら細胞株で認められたアミノ酸置換のある SRC と健常犬の SRC を His 融合タンパクとして強制発現させた人腎上皮細胞由来細胞株 HEK293T に dasatinib を添加して培養し、これら SRC が TK 活性を失う dasatinib の濃度を比較した。その結果、HEK293T で強制発現させたアミノ酸置換のある SRC は正常な SRC と比べて約 1/5 の濃度の dasatinib で TK 活性が抑制された。このことから、このアミノ酸置換は SRC の dasatinib に対する感受性を上げることが示唆された。また、CLBL-1 と EMA と同じ遺伝子変異は、犬のリンパ腫 32 症例中 3 症例、健常犬 7 頭中 1 頭で認められた。

第 2 章 犬のリンパ系腫瘍細胞株における LYN の dasatinib に対する感受性の評価

CLBL-1 は犬で最も多いびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫から樹立された細胞株である。人医学領域ではこのタイプのリンパ腫では LYN の活性化がその生存に必須であることが知られている。dasatinib は LYN の活性化も阻害するため、CLBL-1 の dasatinib に対する高感受性の原因分

子として、本章では LYN に着目した。上記 6 種類のリンパ系腫瘍細胞株および健常犬における *lyn* 遺伝子の塩基配列を解析するとともに、抗ヒト LYN 抗体を用いた Western blotting で LYN の発現量を細胞株間で比較した。LYN を発現している 4 種の細胞株 (GL-1, CLBL-1, EMA, Nody-1) から LYN を抗ヒト LYN 抗体による免疫沈降で単離し、前章と同様の方法でそれらの TK 活性を測定した。また、これら細胞株に dasatinib を添加して培養した後、抗ヒト LYN 抗体を用いた免疫沈降で LYN を単離して、TK 活性を測定することによって dasatinib に対する感受性を検討した。用いた細胞株ではアミノ酸配列に置換をもたらす *lyn* 遺伝子塩基配列の変異は認められなかったが、CLBL-1 における LYN の発現量は他の細胞株より多く、その TK 活性は他の細胞株に比べて有意に強かった。また、CLBL-1 の LYN の TK 活性は、他の細胞株に比べて 1/10 以下の濃度の dasatinib により抑制され、dasatinib に対する感受性が高いことが示された。CLBL-1 の *lyn* 遺伝子塩基配列に変異はなく、LYN の活性化が他の細胞株に比べて低濃度の dasatinib で阻害される原因として、LYN の発現量が多く、TK 活性が強いことが考えられた。CLBL-1 の LYN の TK 活性を 50% 抑制する dasatinib の濃度が第 1 章で認められた増殖抑制を引き起こす dasatinib の IC50 と同程度であったことから、dasatinib の CLBL-1 における増殖抑制効果は LYN の活性化の阻害によるものであることが示唆された。

第 3 章 犬のリンパ系腫瘍細胞株における dasatinib による LCK の活性化阻害

LCK は T リンパ球において T 細胞受容体のシグナル伝達系に関与し、B リンパ球における LYN に相当する機能を持つ TK である。dasatinib は LCK の活性化も阻害するため、本章では、T 細胞の免疫学的表現型を示す EMA の dasatinib に対する高感受性の原因分子として LCK に着目した。上述した 6 種類のリンパ系腫瘍細胞株と健常犬の *lck* 遺伝子塩基配列を解析し、抗ヒト LCK 抗体による Western blotting で LCK の発現量を細胞株間で比較した。LCK を発現する 5 種の細胞株 (CL-1, GL-1, UL-1, EMA, Nody-1) における LCK を抗ヒト LCK 抗体による免疫沈降で単離し、第 2 章と同様の方法で TK 活性を測定して細胞株間で比較した。これら細胞株に dasatinib を添加して培養した後、抗ヒト LCK 抗体を用いた免疫沈降により LCK を単離して、TK 活性を測定することによってその活性を 50% 抑制する dasatinib の濃度を細胞株間で比較した。EMA では *lck* 遺伝子塩基配列に変異は認められなかったが、他の細胞株より LCK の発現量が多く、TK 活性は有意に高かった。EMA の LCK の TK 活性は他の細胞株に比べて 1/20 以下の濃度の dasatinib により抑制された。EMA では *lck* 遺伝子塩基配列に変異はなく、LCK の TK 活性が他の細胞株より低濃度の dasatinib で抑制される原因として、LCK の発現量が多く、TK 活性が強いことが考えられた。EMA における LCK の TK 活性が 50% 抑制される dasatinib の濃度が第 1 章の増殖に関する dasatinib の IC50 よりも低く、EMA における dasatinib の増殖抑制効果は LCK の活性化の阻害によることが示唆された。

本研究を通して、犬のリンパ系腫瘍において活性化が認められる TK 分子が同定され、さらにそれらの活性および細胞増殖を阻害する TK 阻害薬を明らかにすることができた。これら研究成果は、将来における犬のリンパ腫の分指標的治療の基盤を提供するものであり、獣医臨床腫瘍学および比較腫瘍学の発展に寄与するものと考えられる。