

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09932

研究課題名(和文)ATLにおける慢性活性化T細胞受容体経路を標的とした創薬基盤の構築

研究課題名(英文)Targeting chronic active TCR pathway for developing new treatment for patients with ATL

研究代表者

吉満 誠 (Yoshimitsu, Makoto)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：70404530

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):成人T細胞白血病リンパ腫47例についてエクソーム解析を行った。RLTPRの反復性遺伝子変異を検出し、機能獲得型変異であること、NFκB活性化に中心的な役割を果たすCARD11と直接結合すること、またRLTPRがHTLV-1由来蛋白であるTaxと直接相互作用があることを観察できた。またCARD11機能獲得型変異マウスは悪性リンパ腫は起こさなかったものの、活性化T細胞分画、制御性T細胞分画、成熟B細胞分画の増加を認めた。CARD11のSH3/GUKドメインの会合阻害剤の探索のため、CARD11の結晶構造解析を創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)構造解析領域の支援のもと進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)は既存の治療法では満足いく治療成績が得られていない。そこで最近明らかになった遺伝子変異情報を元にした治療法の開発を目指すための基盤研究を行った。追加で行った遺伝子変異解析ではATLにおいて腫瘍維持に作用している可能性のある新しい遺伝子変異を同定できた。一方約3割のATL症例で有するCARD11の変異について、CARD11の会合阻害剤の開発を目指した。CARD11の結晶構造解析を行うことで創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の支援のとも、活性化の中心であるSH3ドメインとGUKドメインの会合阻害剤の同定を目指す。

研究成果の概要(英文): Exome analysis using 47 patients's sample with adult T cell leukemia/lymphoma was performed and identified novel recurrent mutation, RLTPR Q575E. RLTPR Q575E is found to activate NFκB pathway and co-precipitated with CARD11, a central molecule in NFκB activation. RLTPR is also found to directly interact with Tax, a HTLV-1 derived oncogene. CARD11 gain-of-function knock-in mouse did not form lymphoma even after 3-year observation period but showed increased levels of activated T lymphocytes, regulatory T cells, mature B lymphocytes. Aiming at developing novel CARD11 inhibitor, crystal structure analysis of CARD11 is under investigation. This project is supported by Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research (Basis for Supporting Innovative Drug Discovery and Life Science Research (BINDS)) from AMED.

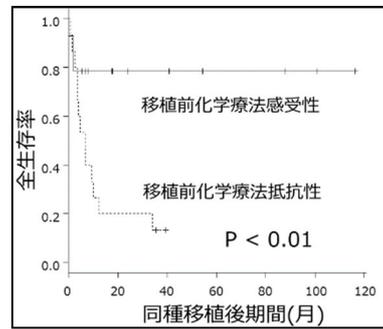
研究分野：血液内科学

キーワード：成人T細胞白血病・リンパ腫 機能獲得型変異 CARD11 結晶構造 RLTPR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

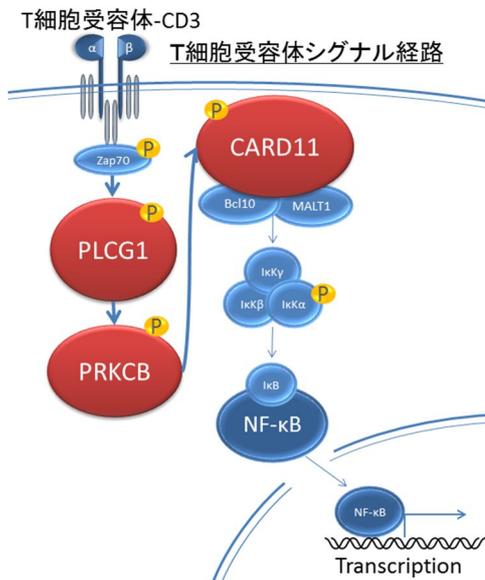
1. 研究開始当初の背景

(1) 成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)に対する治療は多剤併用化学療法、同種造血幹細胞移植により一定の予後改善効果を得られているものの、化学療法抵抗性患者においては同種造血幹細胞移植まで辿りつけないか、たどりついて長期生存を望めるものは限定的である(右図)。従って新規治療法開発の必要性については論を待たない。



(2) ATL患者426例のゲノム解析により、T細胞受容体-NFκB経路や免疫逃避経路関連遺伝子の変異が報告され(Kataoka et al. Nature Genetics 2015)。当講座においても全エクソーム解析(25例)で、20例においてCARD11、PRKCB、PLCG1というT細胞受容体シグナル経路のいずれかに機能獲得型変異を有することを見出した。

(3) 分担研究者の原らはB細胞リンパ腫においてCARD11の機能獲得型変異がNFκBの活性化をきたす機序として、CARD11のSH3ドメインとGUKドメインのシス型・トランス型の会合が必須であることを報告した。



(4) CARD11はPRKCBやPLCG1の下流に位置しており(左図)、PRKCBやPLCG1の機能獲得型変異を有する場合、最終的にはCARD11の会合による活性化が必要となることが予想される。ATLにおいても同様現象が起きていることが確認できれば、SH3ドメインとGUKドメインの会合阻害はATL患者にとって有望な創薬標的となりうると考えた。

以上のことから本研究ではATLにおけるT細胞受容体経路活性化の意義を明らかにし、本経路を標的とした創薬基盤構築を目指すことを目指し立案された。

2. 研究の目的

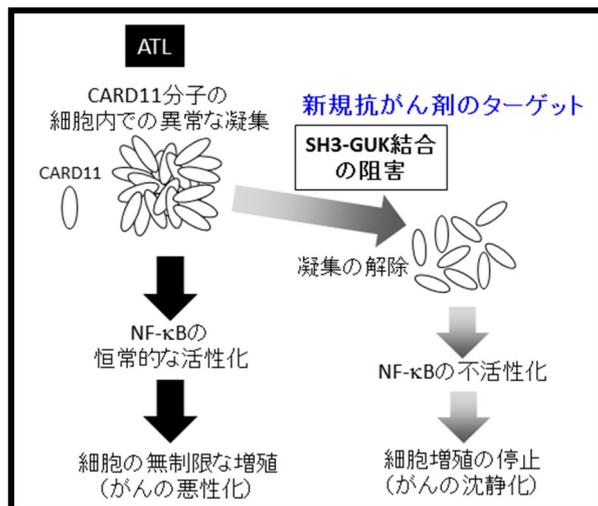
以下の4つの柱を中心に明らかにしていくことを当初目的とした。

(1) ATL患者細胞を用いた全エクソームを行い、遺伝子変異と臨床症状・治療経過をデータベース化する。

(2) T細胞受容体経路シグナル分子の変異が最終的にCARD11のSH3/GUKドメインの会合を誘導し、NFκBの活性化を起こすことを確認する。

(3) ゲノム編集によるCARD11機能獲得型変異マウスを作出する(ATLマウスの作出)。

(4) CARD11のSH3/GUKドメインの会合阻害剤の探索を行う(右図)。



3. 研究の方法

(1) ATL細胞遺伝子異常と臨床症状・治療経過のデータベース化

アグレッシブATL患者細胞のエクソーム解析を行う。臨床データと変異遺伝子情報が紐づけされたデータベースを構築する。新規変異の同定を目指す。

(2) T細胞受容体経路シグナル分子の変異によるNFκB活性化の確認

同定されたCARD11の変異によるNFκBの活性化をリポーターアッセイを用いて評価する。

(3) CARD11機能獲得型変異を有するマウスの形質評価

ゲノム編集技術を用い、CARD11 D230N、S615F変異を有するマウスの作出を行い、作出さ

れたマウス表現形質、リンパ腫発症の有無について評価する。

(4) CARD11 の SH3/GUK ドメインの会合阻害剤の探索

CH3/GUK 会合阻害剤探索のため、Fluoppi (fluorescent based technology detecting protein-protein interactions) システムを用いて CARD11 SH3-GUK ドメインの蛋白会合検出系を樹立する。

4. 研究成果

(1) ATL 細胞遺伝子異常と臨床症状・治療経過のデータベース化

合計 47 例のアグレッシブ ATL 症例のエクソーム解析を行った。見出された変異 (CARD11 21.3%, PLCG1 19.1%, PRKCB 19.1%, CCR4 17.0%, VAV1 17.0%, STAT3 12.8%, TP53 10.6%, POT1 8.5%, CSNK1A1 4.3%, CSNK2B 4.3%, EP300 4.3%, GAT3 4.3%, HLA-B 4.3%, IDH2 4.3%, TBL1XR1 4.3%, IKBKB 2.1%, IRFBP2 2.1%, IRF4 2.1%, RELA 2.1%) については既報と類似のプロファイルであり、北米からのプロファイルとは異なっていた。

新規反復性変異として RLTPR Q575E を 47 例中 4 例に見出した。本変異は TCR 刺激下で NF κ B の活性化を促し、IL2 の mRNA の発現上昇を認めた。また変異を有するときのみ CARD11 との直接結合を示した。HTLV-1 由来蛋白である Tax との直接結合を示した。ただし Tax と RLTPR の直接結合の生理的意義については明らかにできなかった。

(2) T 細胞受容体経路シグナル分子の変異による NF κ B 活性化の確認

同定された CARD11 の変異による NF κ B の活性化をリポーターアッセイを用いて評価した。すでに gain-of-function として報告されている CARD11 D230N、D357G、D401N、S615F、E626K に加えて、新たに CARD11 G126D、M639K も gain-of-function 変異であることを見出した。

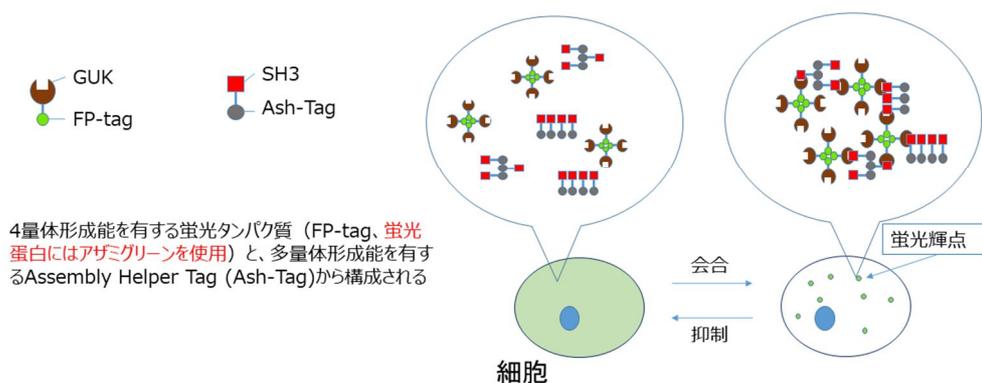
(3) CARD11 機能獲得型変異を有するマウスの形質評価

ゲノム編集技術を用い、CARD11 D230N、S615F 変異を有するマウスの作出を行い、作出されたマウス表現形質、リンパ腫発症の有無について評価した。3 年経過時点で、いずれのマウスについてもリンパ腫形成は認めなかった。D230N 導入マウスにおいては活性化 T 細胞の増加、成熟 B 細胞の増加、制御性 T 細胞の増加を認めた。今後はさらなる機能解析を行う。

(4) CARD11 の SH3/GUK ドメインの会合阻害剤の探索

CH3/GUK 会合阻害剤探索のため、Fluoppi システムを用いて CARD11 SH3-GUK ドメインの蛋白会合検出系を樹立した。

Fluoppiシステムを利用してSH3/GUKの会合を検出する



この樹立した系を用いて、SH3/GUK 会合阻害剤のスクリーニングを行ったが、陽性コントロールを適切におくことができず、ハイスループットスクリーニングによる SH3/GUK 会合阻害剤の同定には至らなかった。そこで PROTAC 技術を用いた CARD11 degrader の開発へ方針転換した。CARD11 degrader 作成には CARD11 結合コンパウンドの同定が必要である。CARD11 結合コンパウンドを in silico で同定するために、CARD11 の結晶構造解析が必要であるが明らかとなっていない。そこで創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム: BINDS の支援のもと CARD11 結晶構造解析を進めている (課題番号【1006】課題名 CARD11 を標的とした新規化合物同定を目指した X 線結晶構造解析)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内田友一郎
2. 発表標題 A Novel Recurrent Gain-of-Function Mutation of Rltpr Q575E in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma. Yuichiro Uchida, Makoto Yoshimitsu, Yuhei Kamada, Naosuke Arima, Kenji Ishitsuka
3. 学会等名 American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原 博満 (Hara Hiromitsu) (20392079)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究協力者	内田 友一郎 (Uchida Yuichiro)	鹿児島大学・医歯学域医学系・大学院生 (17701)	