

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17390

研究課題名（和文）小胞体ストレス誘導を標的としたATL発症予防薬の開発

研究課題名（英文）Development of prophylactic agents for ATL development by targeting ER stress induction

研究代表者

池辺 詠美（Ikebe, Emi）

国立感染症研究所・次世代生物学的製剤研究センター・主任研究官

研究者番号：80593813

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ATLの発症予防・治療法の開発を目指し、MK-2048の抗HTLV-1効果について検討した結果、MK-2048がHTLV-1感染細胞特異的に小胞体ストレス性アポトーシスを誘導し、ATL発症のリスクファクターとされるプロウイルス量の上昇を抑えることが明らかとなった。さらに小胞体ストレス誘導能を有するリード化合物の中から、より低濃度で抗HTLV-1効果を示す化合物を見いだした。これらの結果から、MK-2048が既存の治療薬とは異なる機序でHTLV-1感染細胞を特異的に排除する新規抗HTLV-1薬候補となること、小胞体ストレス応答がHTLV-1感染症の新たな標的となりうることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、HTLV-1感染細胞の小胞体ストレス応答異常に着目し、MK-2048が小胞体ストレス性アポトーシスを誘導して抗HTLV-1作用を示すこと、小胞体ストレス応答がHTLV-1感染症の新たな標的となりうることを明らかにした。

小胞体ストレス応答は多くの癌で薬剤耐性化と関連することが示されており、治療標的として着目されているが、ATLにおいても標的となりうることは今回初めて明らかにされた。既存の治療薬とは異なる作用機序となる小胞体ストレス誘導を標的とした治療薬の開発は、再発・難治のATLの予後改善に貢献でき、社会的意義もあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The anti-HTLV-1 effect of MK-2048 was investigated, and it was found that MK-2048 induces ER (endoplasmic reticulum) stress apoptosis specifically in HTLV-1-infected cells in a concentration range that does not affect normal cells, and suppresses the increase in HTLV-1 provirus load, which are considered a risk factor for the development of ATL. Furthermore, among the lead compounds with the ability to induce ER stress, we found a compound that shows anti-HTLV-1 effect at a lower concentration.

These results indicate that MK-2048 is a novel anti-HTLV-1 drug candidate that specifically eliminates HTLV-1-infected cells through a mechanism different from existing therapeutic agents and that the ER stress response may be a new target for HTLV-1 infection.

研究分野：血液腫瘍内科学

キーワード：HTLV-1 ATL 小胞体ストレス 小胞体ストレス応答 成人T細胞白血病

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)は、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)感染が起因の極めて難治性の白血病/リンパ腫であるが、有効な治療法が確立されていない現状において発症予防薬の開発は急務である。我々は、HIV-1インテグラーゼ阻害剤MK-2048のHTLV-1感染細胞に対する特異的かつ強力な増殖抑制効果と、それがHTLV-1感染細胞における小胞体ストレス抵抗因子GRP78の発現低下を標的とした小胞体ストレス誘導によることが示唆される結果をHTLV-1感染細胞株を用いたIn vitro試験により見出した。そこで、HTLV-1感染細胞は小胞体ストレスに対して脆弱であり、小胞体ストレス応答がHTLV-1感染症の標的になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

先行研究により、MK-2048がIn vitroにてHTLV-1感染細胞株に対して小胞体ストレス性アポトーシスを誘導することを示している。そこで本研究では、HTLV-1感染キャリアや、ATL患者の臨床検体を用いてMK-2048の抗HTLV-1薬としての有効性を明らかにすることで、小胞体ストレス応答がATL発症予防の標的となる可能性を示し、ATL発症予防、およびATL治療薬の開発へと繋げる事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) HTLV-1感染細胞特異的な小胞体ストレス応答の活性化およびアポトーシス誘導の解析

感染細胞と非感染細胞が混在しているHTLV-1キャリアの末梢血より分離した単核細胞(PBMC)を用いて、MK-2048が感染細胞特異的に小胞体ストレス応答経路を活性化するのか免疫染色にて視覚的にとらえる。また、MK-2048が感染細胞特異的にアポトーシスを誘導するのかフローサイトメーターにて感染細胞と非感染細胞に分離してアポトーシスマーカーを測定する。

(2) プロウイルス量上昇抑制効果の解析

プロウイルス量の上昇はATL発症のリスクファクターとなる。HTLV-1キャリアPBMCを用いてMK-2048添加前後のプロウイルス量を測定し、プロウイルス量上昇の抑制能について検討する。同時に総細胞の生存率を測定し、安全性についても評価する。

(3) ATL臨床検体におけるMK-2048の有効性及び安全性の評価

ATL患者由来PBMCに対してMK-2048を作用させ、定期的に細胞生存率を測定し、MK-2048の増殖抑制効果を検討する。さらに、健康人T細胞に対する影響を同様の方法で評価し安全性について検討する。

(4) 小胞体ストレス誘導を標的とした抗HTLV-1薬の探索

小胞体ストレスは主にPERK、IRE1、ATF6の3つの経路によって活性化されるが、MK-2048はその中でも特にPERK-ATF4-CHOP経路を活性化していることが先行研究から示唆された。そこで、小胞体ストレスを誘導するリード化合物の中から特にPERK-ATF4-CHOP経路を活性化する化合物に絞って、MK-2048より低濃度で抗HTLV-1作用を示す化合物を探索する。

4. 研究成果

(1) HTLV-1感染細胞特異的な小胞体ストレス応答の活性化およびアポトーシス誘導の解析

感染細胞と非感染細胞が混在しているHTLV-1キャリアPBMCに25 μ MのMK-2048を作用させ、免疫染色にて小胞体ストレス応答のマーカーであるCHOPの発現レベルを感染細胞(CD4⁺,CADM1⁺)と非感染細胞(CD4⁺,CADM1⁻)で比較したところ、感染細胞でのみ、強いCHOPの発現が認められ(図1)、MK-2048の感染細胞特異的な小胞体ストレス誘導作用が明らかとなった。

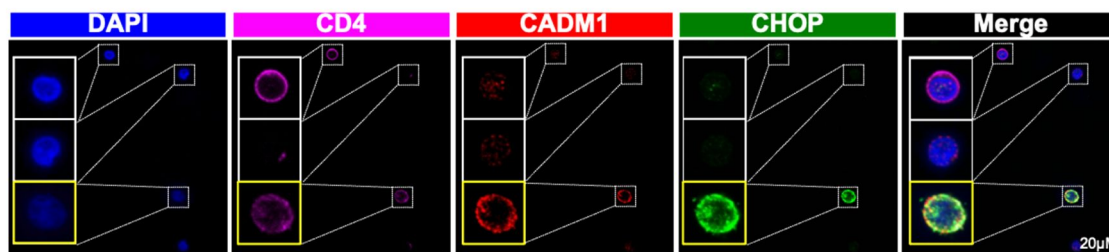


図1. MK-2048によるHTLV-1キャリアPBMCにおけるHTLV-1感染細胞特異的な小胞体ストレス誘導

また、HTLV-1キャリアPBMCに25 μ MのMK-2048を16時間作用させ、フローサイトメーターにて感染細胞(DAPI⁻,CD14⁻,CD4⁺,CADM1⁺)と非感染細胞(DAPI⁻,CD14⁻,CD4⁺,CADM1⁻)のアポトーシス細胞(Annexin V⁺)の割合を比較すると、非感染細胞中のアポトーシス細胞はわずか0.5%であ

ったのに対し、感染細胞では 10.6%と有意 ($P < 0.005$) にアポトーシスが誘導されており (図 2A, B) HTLV-1 キャリア PBMC において、MK-2048 が小胞体ストレス性アポトーシスを介して HTLV-1 感染細胞を選択的に排除することが示された。

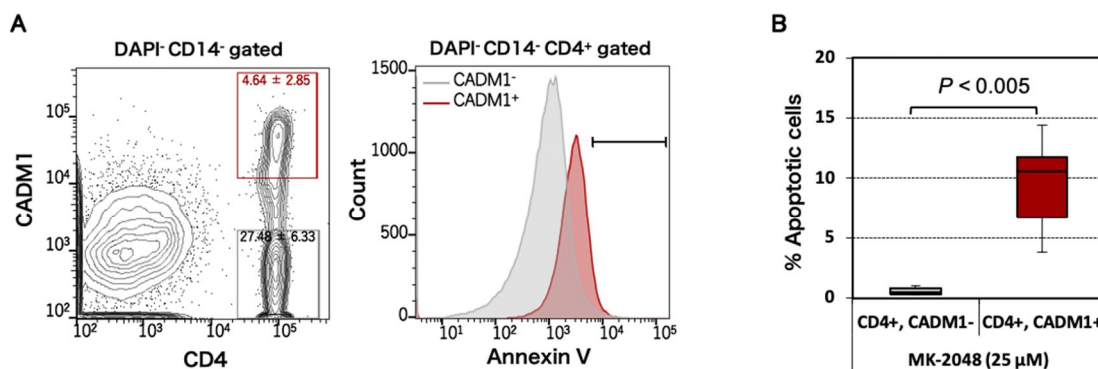


図2. MK-2048によるHTLV-1キャリアPBMCにおけるHTLV-1感染細胞特異的なアポトーシス誘導

(2) プロウイルス量上昇抑制効果の解析

4例のHTLV-1キャリアPBMCにMK-2048を4日間作用させ、HTLV-1プロウイルス量と細胞数を測定し添加前と比較した。その結果、4例全てのHTLV-1キャリアPBMCにおいて、MK-2048の用量依存的なプロウイルス量の減少が認められた (図 3A)。一方で、MK-2048はPBMCの総数には影響を与えず (図 3B) MK-2048がHTLV-1感染細胞を選択的に排除することが示された。

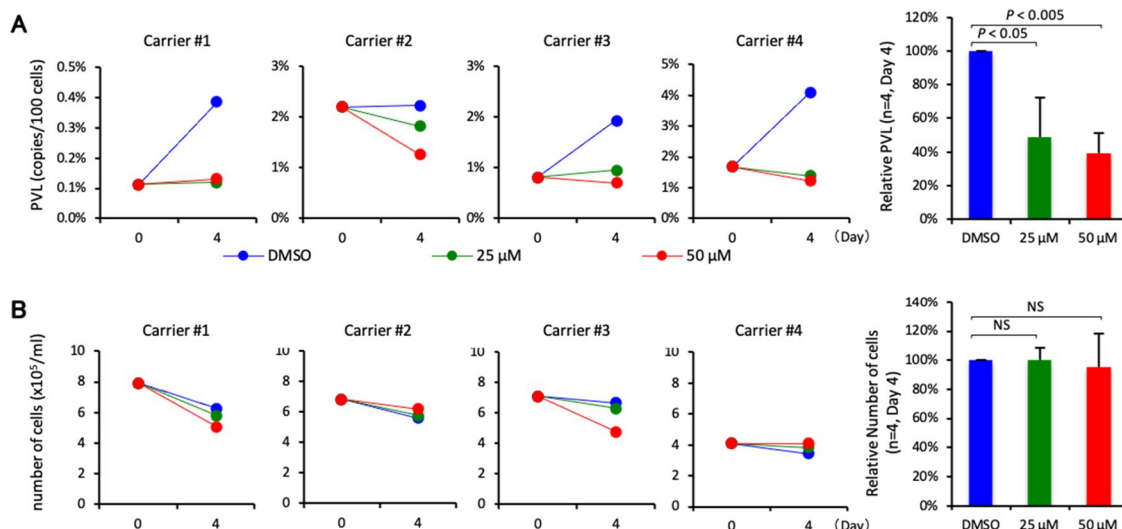


図3. MK-2048によるHTLV-1キャリアPBMCにおけるプロウイルス量上昇の抑制効果

(3) ATL臨床検体におけるMK-2048の有効性及び安全性の評価

健康人CD4⁺T細胞、及び病型の異なるATL患者由来PBMCに対して、異なる濃度のMK-2048を添加して4日間培養し非添加コントロールに対する細胞生存率を比較した。MK-2048は健康人CD4⁺T細胞には影響を示さない濃度域において、ATL患者由来PBMCの増殖を抑制した (図 4)。

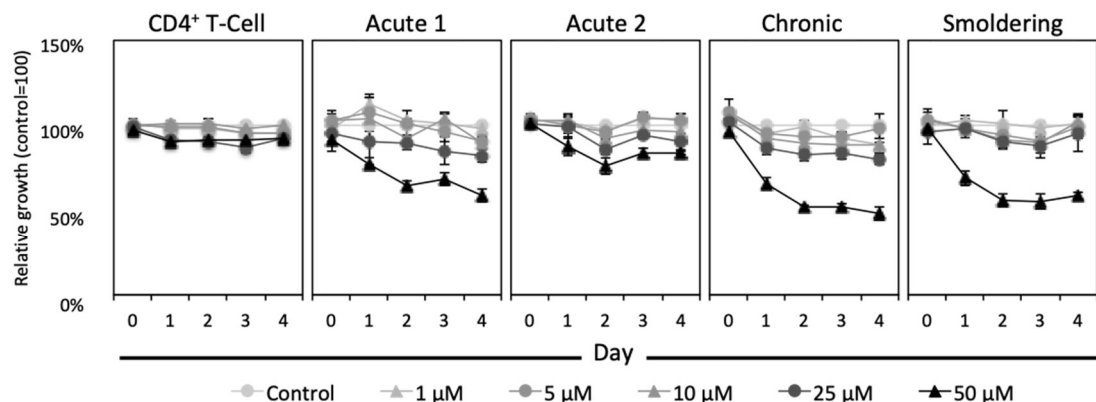


図4. MK-2048のATL患者PBMCに対する増殖抑制効果

(4) 小胞体ストレス誘導を標的とした抗 HTLV-1 薬の探索

小胞体ストレスを誘導するリード化合物の中から、特に PERK-ATF4-CHOP 経路を活性化する化合物に絞って MK-2048 より低濃度で抗 HTLV-1 作用を示す化合物を探索したところ、化合物 A は nM オーダーで HTLV-1 感染細胞株の増殖を抑制し (図 5A) PERK 下流の eIF2α のリン酸化、及び ATF4 を活性化するとともに、アポトーシスのマーカーである PARP の切断を誘導した (図 5B)。

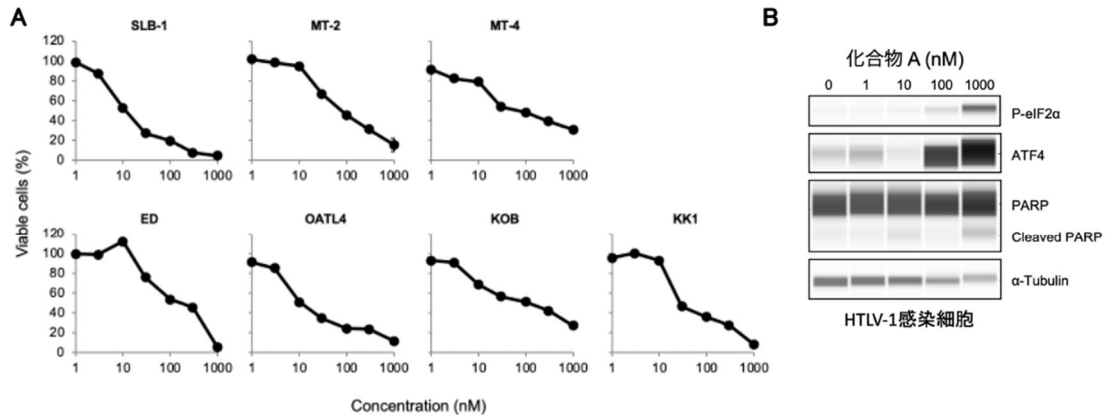


図5. 化合物AのHTLV-1感染細胞株における抗HTLV-1効果の検討

これらの結果から、HTLV-1 感染細胞は GRP78 の発現低下により小胞体ストレスに対して脆弱になっており、小胞体ストレス応答、特に PERK-ATF4-CHOP 経路は ATL 発症予防の標的となる可能性が示された。

また、MK-2048 の抗 HTLV-1 効果は PERK-ATF4-CHOP 経路をターゲットとするものであると考えられた (図 6)。さらに PERK-ATF4-CHOP 経路の活性化を標的とした化合物 A は、より低濃度で抗 HTLV-1 効果を示すことが明らかとなった。

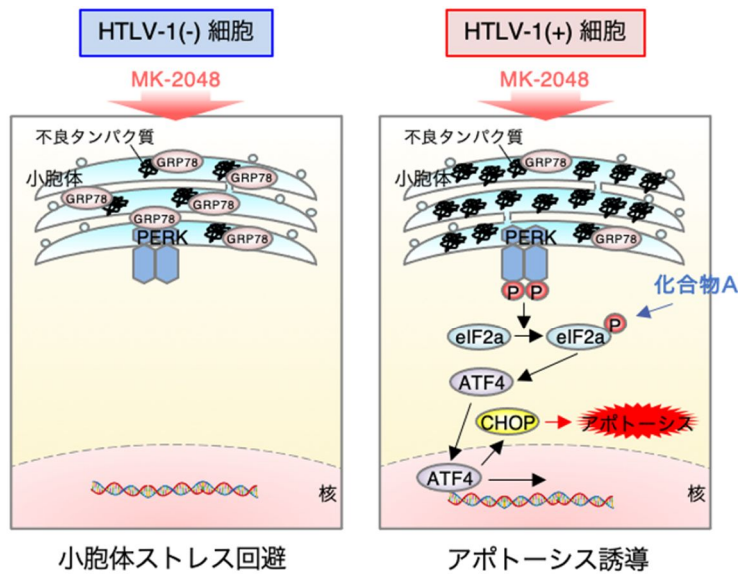


図6. 小胞体ストレス応答を標的とした抗ATL薬の作用機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikebe Emi, Shimosaki Shunsuke, Hasegawa Hiroo, Iha Hidekatsu, Tsukamoto Yoshiyuki, Wang Yu, Sasaki Daisuke, Imaizumi Yoshitaka, Miyazaki Yasushi, Yanagihara Katsunori, Hamaguchi Isao, Morishita Kazuhiro	4. 巻 113
2. 論文標題 TAS 116 (pimipresib), a heat shock protein 90 inhibitor, shows efficacy in preclinical models of adult T cell leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 684 ~ 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikebe Emi, Matsuoka Sahoko, Tezuka Kenta, Kuramitsu Madoka, Okuma Kazu, Nakashima Makoto, Kobayashi Seiichiro, Makiyama Junya, Yamagishi Makoto, Oyadomari Seiichi, Uchimaru Kaoru, Hamaguchi Isao	4. 巻 4
2. 論文標題 Activation of PERK-ATF4-CHOP pathway as a novel therapeutic approach for efficient elimination of HTLV-1?infected cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1845 ~ 1858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019001139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池辺 詠美、松岡 佐保子、手塚 健太、倉光 球、大隈 和、中島 誠、小林 誠一郎、牧山 純也、山岸 誠、親 泊 政一、内丸 薫、浜口 功
2. 発表標題 小胞体ストレス応答を標的とした新規抗HTLV-1薬の開発
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池辺 詠美、松岡 佐保子、中島 誠、村岡 弘美、吉村 千穂子、山岸 誠、内丸 薫、伊波 英克、浜口 功
2. 発表標題 NEDD8活性化酵素はHTLV-1関連疾患の新規治療標的である
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池辺 詠美、松岡 佐保子、中島 誠、村岡 弘美、吉村 千穂子、山岸 誠、内丸 薫、伊波 英克、浜口 功
2. 発表標題 HTLV-1関連疾患に対するNEDD8活性化酵素阻害剤の有効性の検討
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 成人T細胞白血病の予防及び / 又は治療剤	発明者 浜口功、松岡佐保子、池辺詠美、親泊政一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-72569	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

HTLV-1感染細胞を効率的に排除するための新しい治療アプローチ https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/virology/9609-virology-2020-4.html

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------