

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08736

研究課題名(和文) PROTAC技術を用いた成人T細胞白血病・リンパ腫に対する新規創薬基盤の樹立

研究課題名(英文) Establishment of a novel drug discovery platform for adult T-cell leukemia/lymphoma using PROTAC technology

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)へ標的蛋白質分解誘導化合物(PROTAC)を用いた新規治療薬開発を目指した。ATLの多くの例でCARD11の機能獲得型変異を認めることから、CARD11を標的とした。CARD11と結合する物質の探索のため、X線結晶構造解析を進めた。CARD11全長では結晶が得られず、C末端のSH3-GUKドメインの部分結晶構造化について、検討を行った。さらにSH3ドメインのみの結晶化についても並行して行った。様々な条件での結晶化を試みたが、SH3-GUKドメインのSH3とGUKの間にある特定の配列で切断していることが判明した。変異導入による切断点の削除を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PROTAC技術を用いてATLへの新規治療薬の開発を目指した初の研究である。標的蛋白として多数例で機能獲得型変異を有しているCARD11を標的とした。これまでCARD11の蛋白構造は解かれておらず、その解析を試みた。創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の支援を受けることもできた。適切な支援のもとに検討されたため、X線結晶構造解析でのCARD11の構造解析が困難であることが明らかとなった。Cryo電顕などを用いた取り組みも必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a novel therapeutic agent for adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL) using a targeted proteolysis-inducing compound (PROTAC), targeting CARD11, since many cases of ATL show gain-of-function mutations in CARD11. Since crystals of the full length of CARD11 could not be obtained, partial crystallization of the SH3-GUK domain of the C terminal was investigated. In addition, crystallization of only the SH3 domain was performed in parallel. Crystallization under various conditions was attempted, but it was found that the SH3-GUK domain is truncated at a specific sequence between SH3 and GUK. We are aiming to remove the cleavage site by introducing mutations.

研究分野：血液内科学

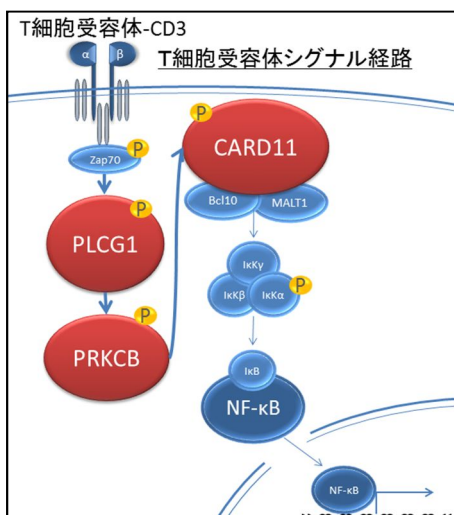
キーワード：成人T細胞白血病リンパ腫 CARD11 PROTAC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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後の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、化学療法のみでは大部分が早期に再発する。また発症年齢の高齢化もあり、分子標的治療のような比較的低侵襲な新規治療法開発の必要性については論を待たない。

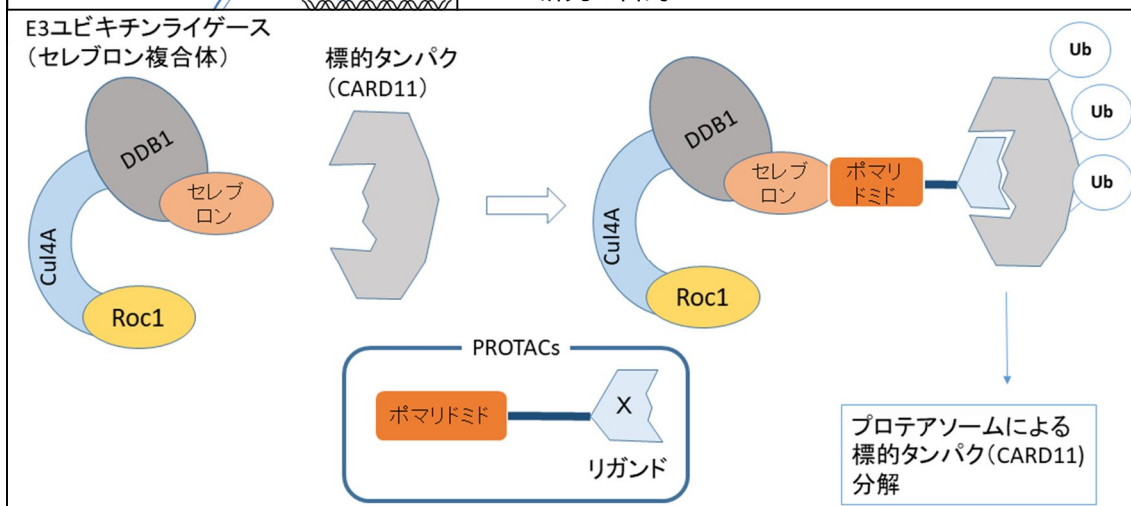
ATL網羅的ゲノム解析により、T細胞受容体-NF- κ B経路や免疫逃避経路関連遺伝子の変異が報告され(Kataoka et al. Nature Genetics 2015)、当講座においても全エクソーム解析(47例)で、34例においてPLCG1, PRKCB, CARD11というT細胞受容体シグナル経路のいずれかに機能獲得型変異を有することを見出した(Uchida Y et al. European Journal of Haematology 2021;106:221-229)。



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。従ってCARD11はATLにおいて多くの症例をカバーしうる創薬標的分子となる可能性がある。ところがCARD11は足場蛋白であり、伝統的な低分子医薬または抗体医薬でアプローチでは創薬は困難である。

タンパク質分解誘導キメラ(Proteolysis Targeting Chimeras: PROTACs)はE3ユビキチンライゲースを標的タンパク質に誘導しプロテアソームを介して分解する技術である(下図)。E3ユビキチンライゲースであるセレブロン複合体はレナリドミドと結合することが知られており、すでに他のPROTAC開発に応用されている。

2. 研究の目的



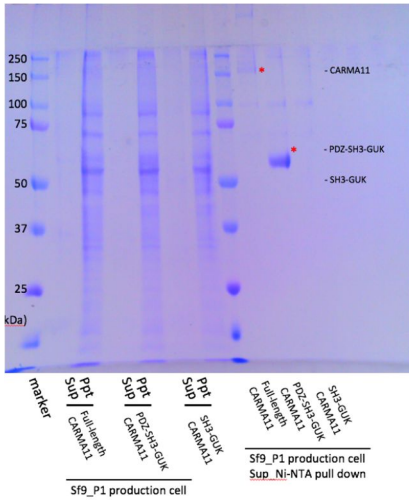
本研究ではCARD11に結合するリガンドとレナリドミドを結合させ、CARD11特異的PROTACを用いた新規ATL創薬を目指す。そのためにまずCARD11の結晶構造を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の支援を申請し、『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(課題番号【1006】)』の課題のもとCARD11(CARMA1)のX線結晶構造解析を進める。

- (1) 大腸菌発現系、(2) バキュロウイルス発現系、(3) CARD11全長、CARD11ドメイン毎の発現での結晶化を目指す。

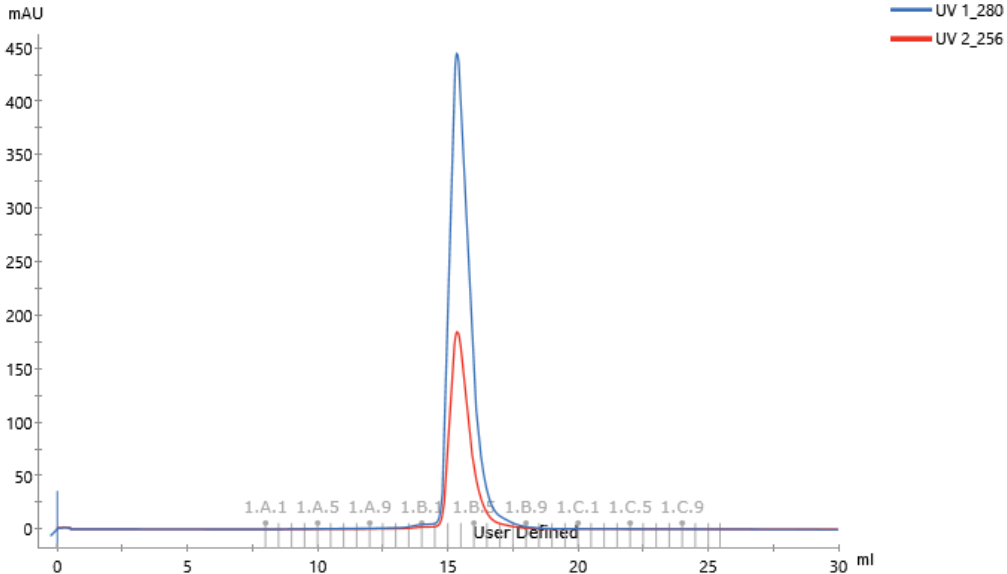
4. 研究成果



(1) 大腸菌発現系では封入体を形成した。
 (2) バキュロウイルス発現系で CARD11 全長と PDZ-SH3-GUK(PSG ドメイン)の上清中への発現を確認できた (左図)。バッファーの至適 pH の確認を行い、pH7.0 が最も安定であることを確認した。また 53 度付近で変性することを確認した。発現させた蛋白を Ni-NTA 樹脂に His タグ蛋白を結合させ、目的の蛋白を抽出した。その後酵素を使用し、目的蛋白質から His タグを除去し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより生成を行ったが、ピークがテーリングしており、左右非対称のピークとなったため、不純物を取り除くため、イオン交換クロマトグラフィーによる精製を追加した。イオン交換クロマトグラフィーから各フラクションをキャピラリー電気泳動を行ったが、単一のバンドは得られなかった。抽出した蛋白が切断されている可能性について検討するため、N 末端アミノ酸配列解析を行った

ところ、SH3 ドメインと GUK ドメインの間の R/ALRNTL の部分で切断されていることが判明した。そこで本部位をコードするコドンに変異をいれ、イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを実施し (下図) 結晶化スクリーニングに進んだが結晶は確認できなかった。

peak1_PSGmut_sup200inc_200318_001



そこで Alphafold2 を用いて CARD11 について蛋白質立体構造予測を行うこととした。CARD11 について Alphafold2 で計算された予想構造は Uniprot にも掲載されているが、それでは PSG ドメインは 627 番目 ~ C 末端までの領域と予想されていた。これまで PSG 領域を 902 番目 ~ C 末端や 1007 番目 ~ C 末端として発現コンストラクトを作製してきたが、これらは正確に PSG ドメインの全体像ではなかった可能性が示唆された。今後は 627 番目 ~ C 末端の部分の発現コンストラクトを用いることで、PSG ドメインの結晶化を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	石塚 賢治 (Ishitsuka Kenji) (10441742)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

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