

研究テーマ番号	IPSN214009																
研究・発明のタイトル	新規な慢性骨髄性白血病（CML）治療薬の開発																
研究分野	医薬																
1) 研究・発明の概要	1) 慢性骨髄性白血病（CML）は、造血幹細胞の腫瘍化に伴う白血球の異常増殖を主症状とする骨髄増殖性疾患で、10 万人に 1～1.5 人の割合で発症する。CML 患者の 95%以上に、22 番染色体と 9 番染色体間で転座が起こるフィラデルフィア（Ph）染色体という異常染色体が見つかる。CML は、この染色体上にある BCR-ABL 遺伝子が発症原因で、同遺伝子からは 3 種のタンパク質(p190,p210,p230) が産生する（図 1）。ABL は非受容体型チロシンキナーゼで通常厳密な活性調節を受けているが、BCR-ABL は BCR 領域の coiled-coil ドメインを介して多量体化するため、常時活性化した ABL により CML が発症する。これまでに ABL のキナーゼドメインを標的としたチロシンキナーゼ阻害剤が CML 治療薬として使用されてきたが、いずれの薬剤も薬剤耐性が出現するため、異なる作用機構を有する治療薬の開発が望まれていた。P210^{BCR-ABL} の BCR 領域には、cardiolipin(CL)等の酸性リン脂質に強く結合する PH ドメイン(p210 PH)が存在する。p210 PH は、CL 依存的な異常ミトコンドリアの分解を抑制して活性酸素種の過剰産生を引き起こし、癌細胞の増殖シグナルを活性化するとともに CML の悪性化や薬剤耐性を増大させる。今回、発明者らは、p210 PH の CL 結合部位に結合し、異常ミトコンドリアの蓄積を阻害する p210 PH 結合ペプチドを見出した。薬剤耐性を回避できる新規な CML 治療薬として臨床応用が期待される。 図 1. 図 2. (A) (B) <table border="1"> <thead> <tr> <th>名称</th><th>配列</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>YDD</td><td>YDDFEQR (配列番号2)</td></tr> <tr> <td>DDD</td><td>DDDFEQR (配列番号3)</td></tr> <tr> <td>FYD</td><td>FYDDEQN (配列番号4)</td></tr> <tr> <td>FQD</td><td>FQDDEQN (配列番号5)</td></tr> <tr> <td>HFD</td><td>HFDDEQN (配列番号6)</td></tr> <tr> <td>WDD</td><td>WDDDEQN (配列番号1)</td></tr> <tr> <td>WWD</td><td>WWDDEQN (配列番号7)</td></tr> </tbody> </table> (C)	名称	配列	YDD	YDDFEQR (配列番号2)	DDD	DDDFEQR (配列番号3)	FYD	FYDDEQN (配列番号4)	FQD	FQDDEQN (配列番号5)	HFD	HFDDEQN (配列番号6)	WDD	WDDDEQN (配列番号1)	WWD	WWDDEQN (配列番号7)
名称	配列																
YDD	YDDFEQR (配列番号2)																
DDD	DDDFEQR (配列番号3)																
FYD	FYDDEQN (配列番号4)																
FQD	FQDDEQN (配列番号5)																
HFD	HFDDEQN (配列番号6)																
WDD	WDDDEQN (配列番号1)																
WWD	WWDDEQN (配列番号7)																
2) 成果概要	2) 【取得ペプチドの p210 PH への結合活性の検討】 図 2B に示す 7 種のペプチド配列を基に、図 2A に示すような同一ペプチド																

ド配列からなる 4 量体を合成し、p210 PH あるいはその変異体である R726A との結合を ELISA 法で調べた。その結果、いずれの化合物も濃度依存的に p210 に結合したものの、変異体 R726A との結合は減弱した (図 2C)。以上から、以降の実験では、高い結合能を持つ WDD-tet (結合定数 $0.34 \mu\text{g/ml}$) を使用した。

【p210 PH と小胞との結合に対する WDD-tet の阻害効果】

上記の結果から、WDD-tet は p210 PH の CL 結合部位に存在する R726 に特異的に結合することが示されたが、WDD-tet が実際に p210 PH と CL を含有する小胞との結合を阻害するかを ELISA 法で調べた。実験には、CL: phosphatidylcholine (PC) のモル比が生理的状态に近い小胞 (CL(+))SUV と PC のみからなる小胞 (CL(-))SUV を用いた。その結果、WDD-tet は CL(+))SUV に対してのみ p210 PH との結合を阻害し、CL(-))SUV には阻害効果を認めなかった (図 3)。以上から、WDD-tet が p210 PH と CL の結合に競合的に働くことがわかった。

図 3.

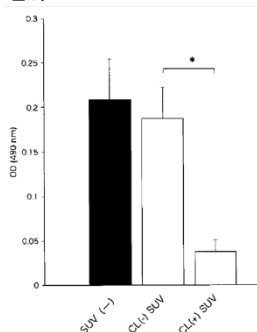
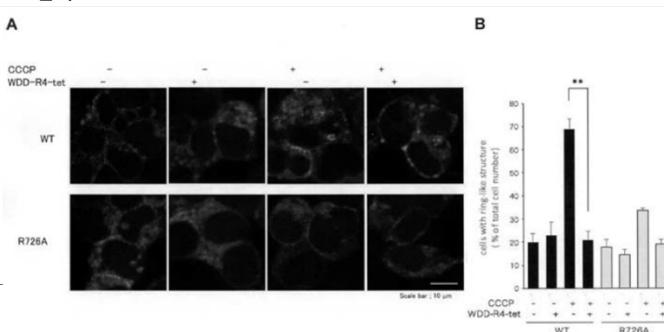


図 4.



【p210 PH のミトコンドリア移行に対する WDD-tet の阻害効果】

ミトコンドリア障害に伴う p210 PH のミトコンドリア移行を WDD-tet が抑制するかを調べた。蛍光標識 mito7 (ミトコンドリアマーカー) と、野生型もしくは R726A 変異 p210^{BCR-ABL} を HEK293 細胞に同時発現させた後、脱共役剤 CCCP によりミトコンドリアに刺激を与えて p210 PH のミトコンドリア移行を促した。この実験条件下において、WDD-R4-tet ([MA-WDDDEQN-ARRRRU]4-3Lys : WDD-tet C 末端に Arg を 4 個連結させて細胞透過性を高めた WDD-tet 誘導体) を添加したところ、野生型 p210^{BCR-ABL} を用いた場合にのみミトコンドリア周囲に BCR-ABL が集積したが、この BCR-ABL の集積を WDD-R4-tet は顕著に抑制した (図 4A)。抑制率を図 4B に示す。以上から、p210^{BCR-ABL} の PH ドメインに WDD-R4-tet が結合することで、CL を介した BCR-ABL のミトコンドリアへの集積を阻害することが示唆された。

【p210^{BCR-ABL} 安定発現 Ba/F3 細胞に対するイマチニブと WDD-R4-tet の併用効果】

マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 は IL-3 依存的な増殖能を示し、IL-3 非存在下

3) 適用分野・目標 4) 今後の研究予定	では増殖できない。ところが、Ba/F3 細胞に p210^{BCR-ABL} を安定発現させた p210-Ba/F3 細胞は、IL-3 非依存的な増殖能を示す。この p210-Ba/F3 細胞の増殖に及ぼす WDD-R4-tet の効果を調べたところ、イマチニブは濃度依存的に p210-Ba/F3 細胞の増殖を抑制したが、WDD-R4-tet は細胞増殖に影響を及ぼさなかった。一方、両剤を併用した場合、イマチニブによる増殖抑制効果が WDD-R4-tet により増強した (図 5A)。特に培養 2 日後では有意にこの作用が観察された (図 5B)。イマチニブは p210-Ba/F3 細胞の増殖を阻害するとともに、細胞のエネルギー代謝を解糖系から酸化的代謝へシフトさせる。この代謝シフトはミトコンドリア障害を誘導するが、p210^{BCR-ABL} はこのミトコンドリア障害を抑制することで細胞増殖を維持していると考えられる。また、WDD-R4-tet はこのミトコンドリア障害の抑制を解除することで、イマチニブによる増殖抑制効果を増強したと考えられた。以上から、WDD-R4-tet には他薬剤との相乗効果が期待される。 3) WDD-R4-tet は、既存の治療薬とは作用機序の異なる新規な CML 治療薬として使用することが期待される。 4) 本剤の治療薬としての安定性、安全性の検証など
希望する提携の種類	本件に係る医薬の研究開発に関心のある企業との共同研究を希望する。
特許出願の有無	出願済み (特開 2020-075917)
関連特許出願の有無	有：本シーズの創製には当研究室オリジナルのペプチドライブラリと特許第 5718574 号「ペプチドのスクリーニング方法」を用いている。本特許はペプチド医薬の基盤技術として汎用性が高く、これまでに多様な疾患に対して医薬品候補ペプチドを創製している。企業が見出した創薬標的に対するヒット／リードペプチド創製について共同研究やライセンスアウトも可能である。
発表の有無	無
共同研究の有無	有

註：本資料は知的財産戦略ネットワーク（株）が全ての権利を有しており、本目的外の使用を禁ずる。