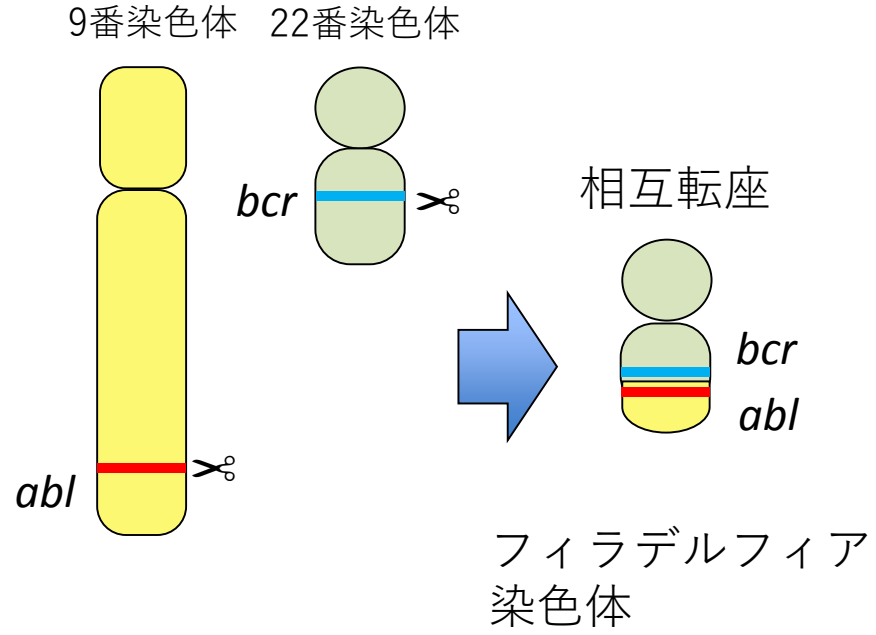


ファーマラボEXPO アカデミックフォーラム
2019.7.5 15:15~ ACA-3会場

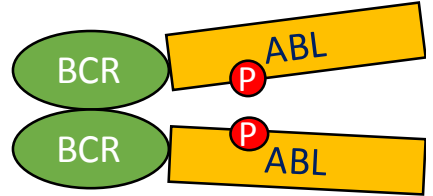
BCR-ABL PHドメインを標的とした 新規慢性骨髄性白血病治療薬の創製

同志社大学 生命医科学部 高橋 美帆

慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia : CML)



BCR-ABLタンパク質



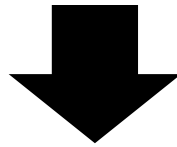
BCR領域のCoiled-coilドメインを介して多量体を形成
↓
ABLチロシンキナーゼドメインのトランス自己リン酸化が生じ恒常的に活性化、白血球が異常増殖する。

既存の CML 治療薬とその問題点

ABL のチロシンキナーゼドメインを標的とした TKIs (tyrosine kinase inhibitors) が CML 治療の第一選択薬である。

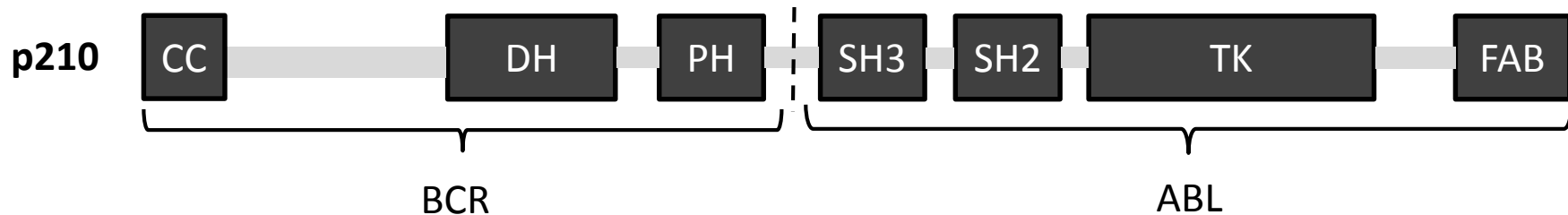
TKIs の問題点

- (i) TKIs 耐性体が存在する。
- (ii) CML 幹細胞に対して治療効果を示さない。



p210 BCR-ABL の他の機能領域を標的とした新たな治療薬の開発が望まれている。

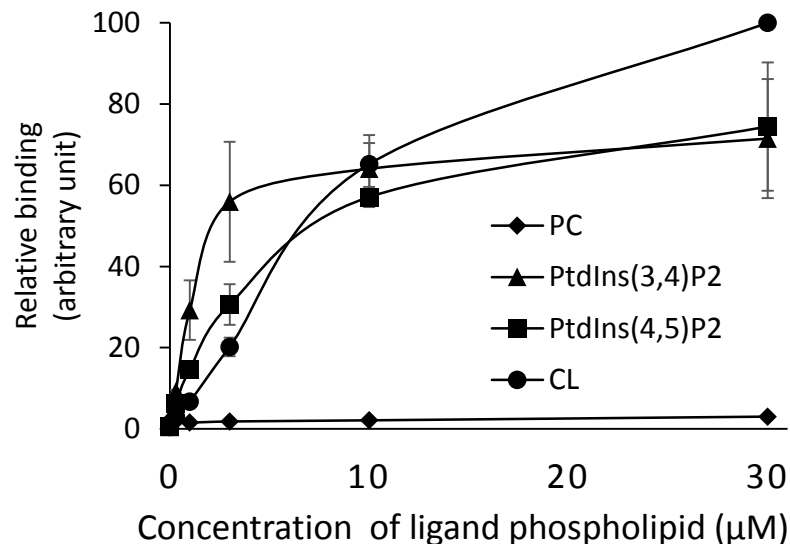
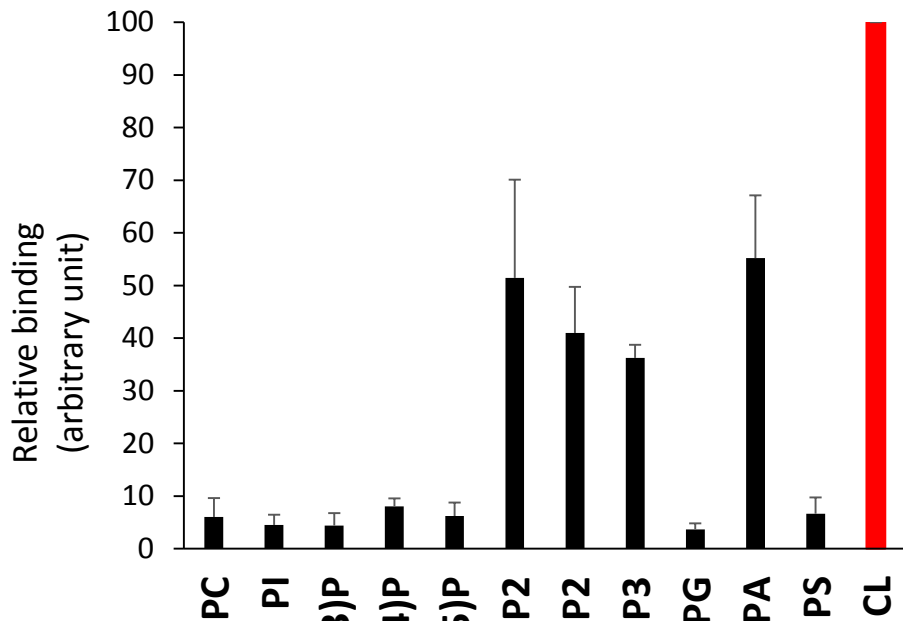
p210 BCR-ABL における他のドメインの病理的機能



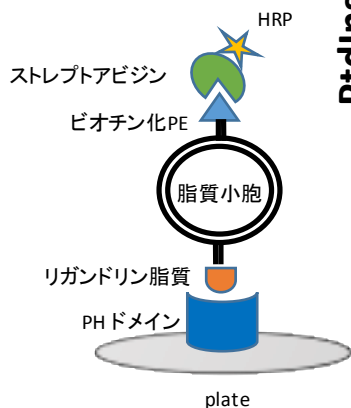
ドメイン	CML における機能
CC	BCR-ABL の多量体化を担い、BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性化に必須。
DH	CML 細胞の運動性を決定。下流因子の活性化により CML 細胞の自然免疫回避にも働く。
PH	モノホスホイノシタイドを認識しうるとされているが、その機能は不明。
SH3	本来ならば ABL チロシンキナーゼの自己活性抑制領域として機能するが、CC ドメイン支配的なキナーゼの活性化により十分に機能していない。
SH2	ABL と同様に、BCR-ABL においてもチロシンキナーゼの自己活性化領域として機能する。
FAB	BCR-ABL の F-actin への結合を担う。CML 発症に役割をもつとされている。

p210BCR-ABL PH ドメインのリガンド特性

脂質小胞濃度依存性の検討

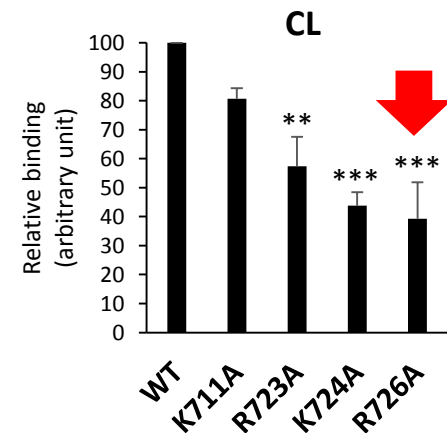
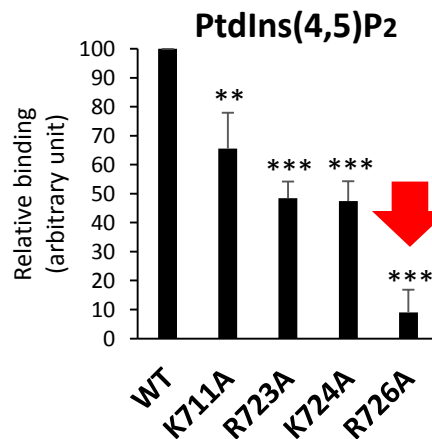
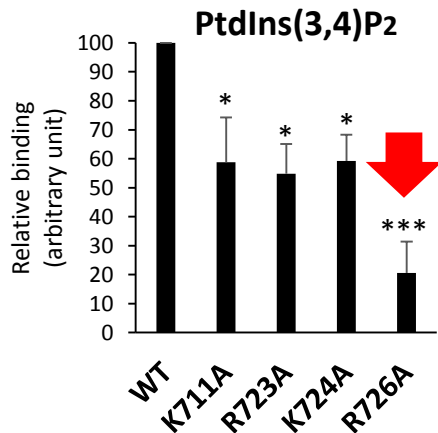
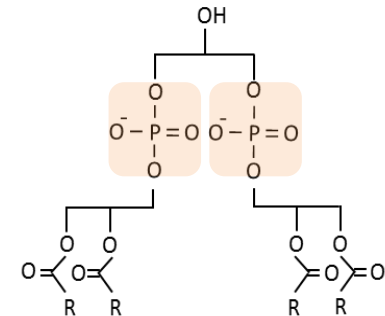
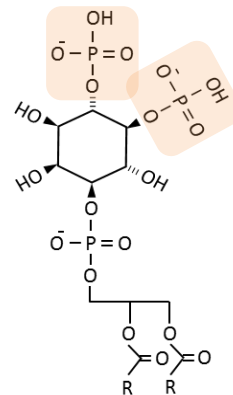
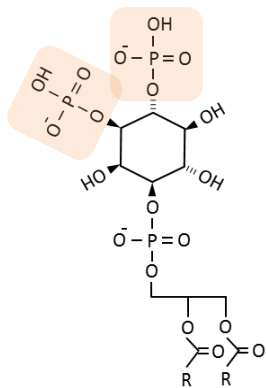


Ligand phospholipid	K _d value (μM)
PtdIns(3,4)P ₂	1.46 ± 0.25
PtdIns(4,5)P ₂	5.33 ± 0.32
CL	15.3 ± 3.1



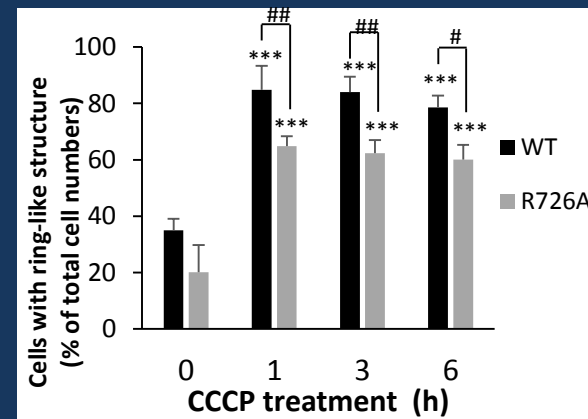
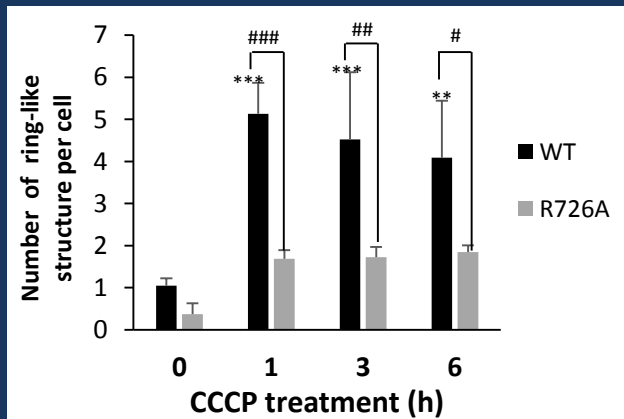
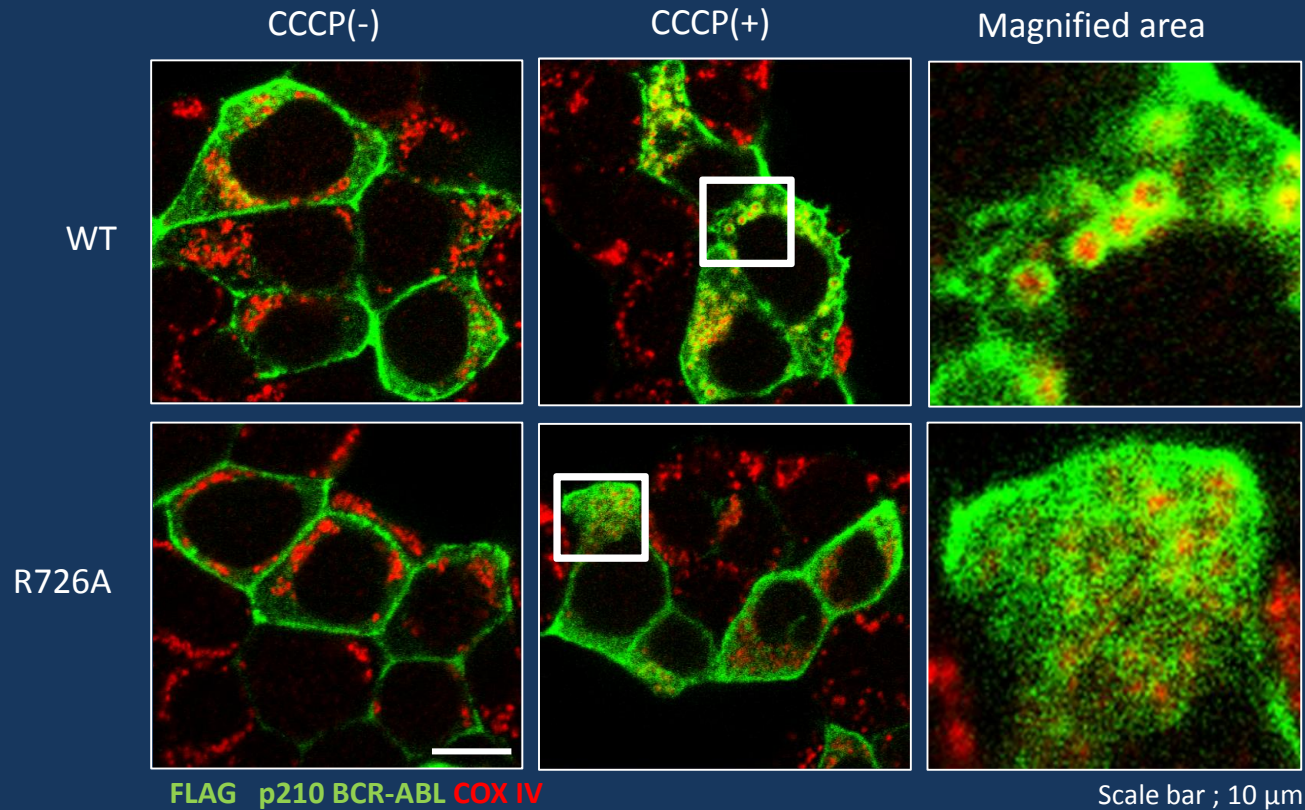
アラニン置換体を用いた p210 BCR-ABL PH ドメインの リガンド認識の結合様式の解明

<i>Consensus motif</i>		<i>K</i>		<i>X_n</i>		<i>(K/R) X R</i>														
AKT	13	H	K	R	G	E	Y	I	K	T	-	-	-	W	-	R	P	R	Y	26
PLC1delta	29	L	K	V	K	S	-	-	S	S	-	-	-	W	R	R	E	R	F	41
★ BCR-ABL	710	L	K	D	S	F	M	V	E	L	V	E	G	A	R	K	L	R	H	727

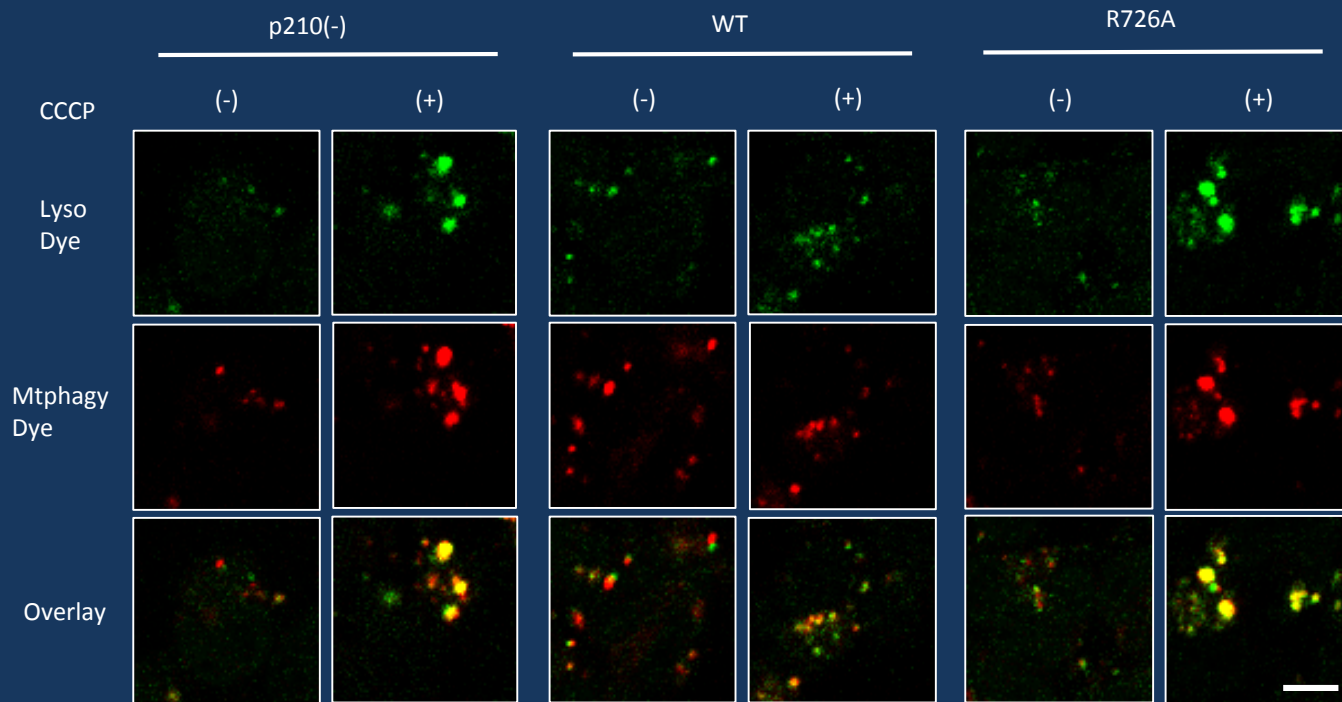


(Mean ± SD, n=3; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WT, Tukey ANOVA)

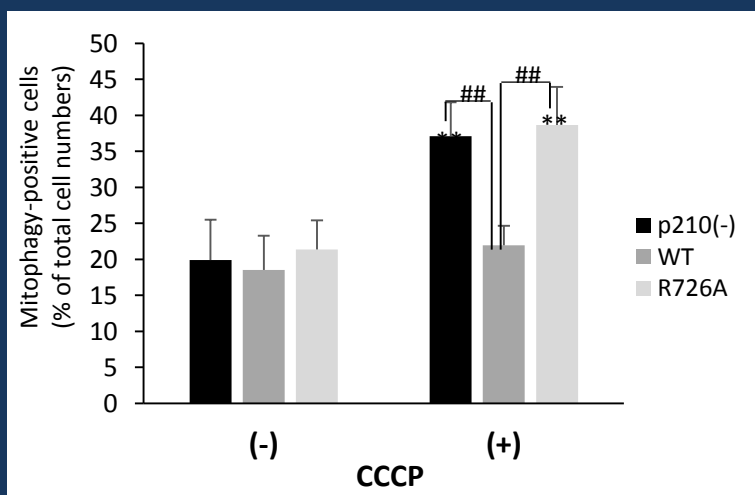
p210BCR-ABL は PH ドメイン依存的に障害ミトコンドリアへと移行する



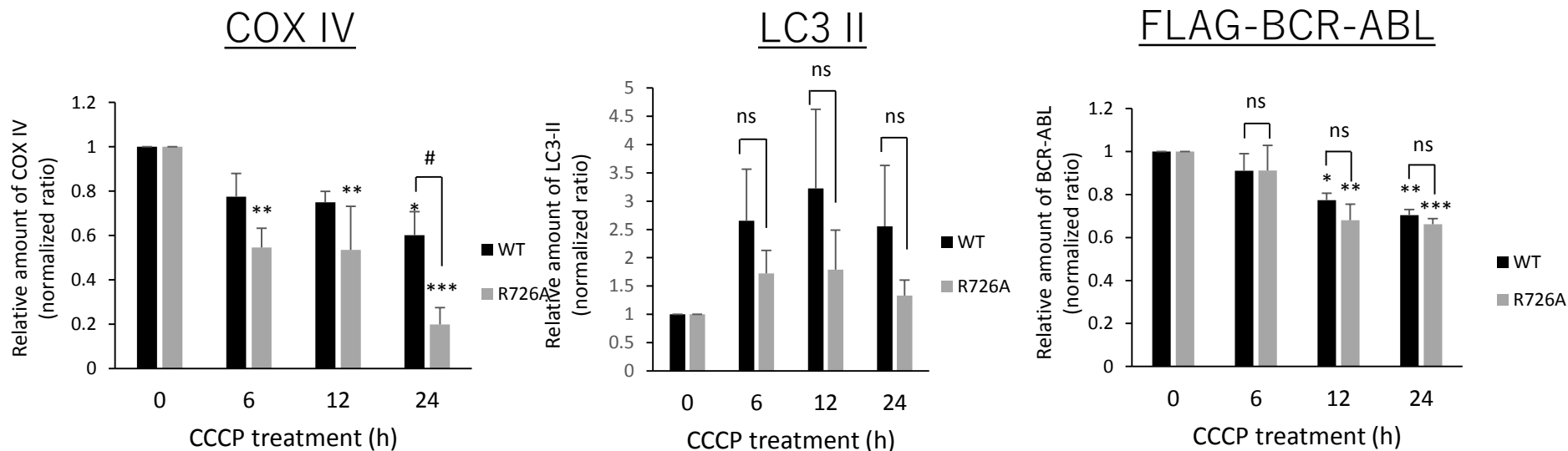
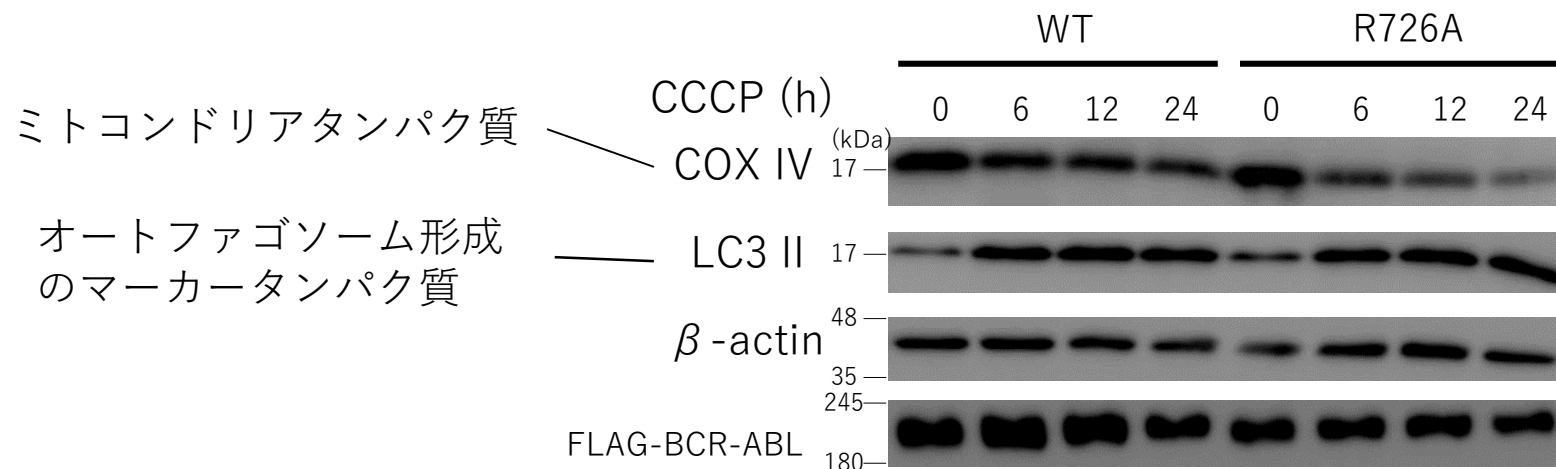
p210 BCR-ABL は PH ドメイン依存的にミトファジーを抑制する①



Scale bar ; 5 μ m



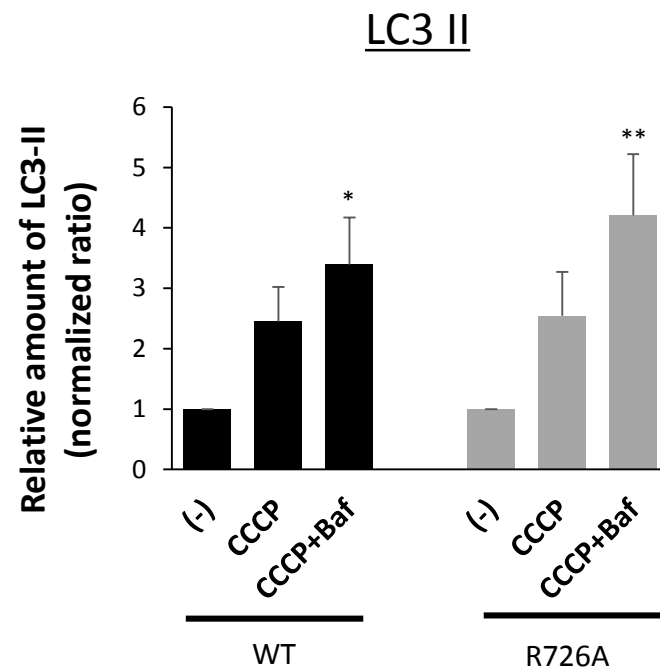
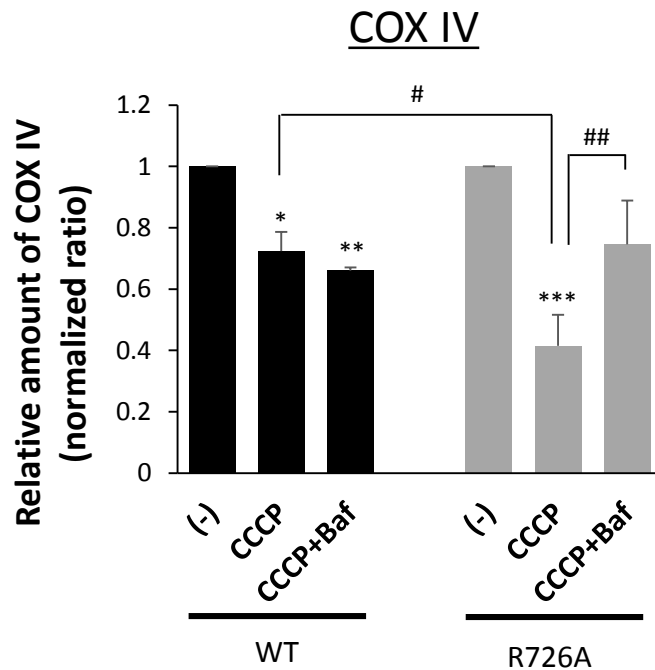
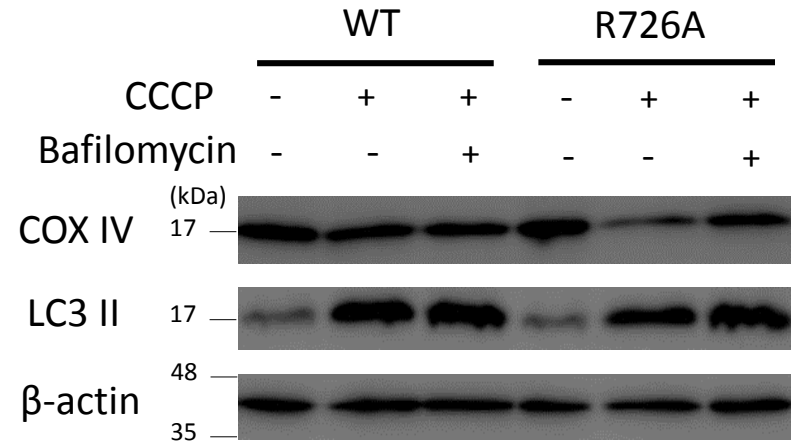
p210 BCR-ABL は PH ドメイン依存的にミトファジーを抑制する ②



(Mean \pm SD, $n=3$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs time 0, # $p<0.05$, ns means not significant, Tukey ANOVA)

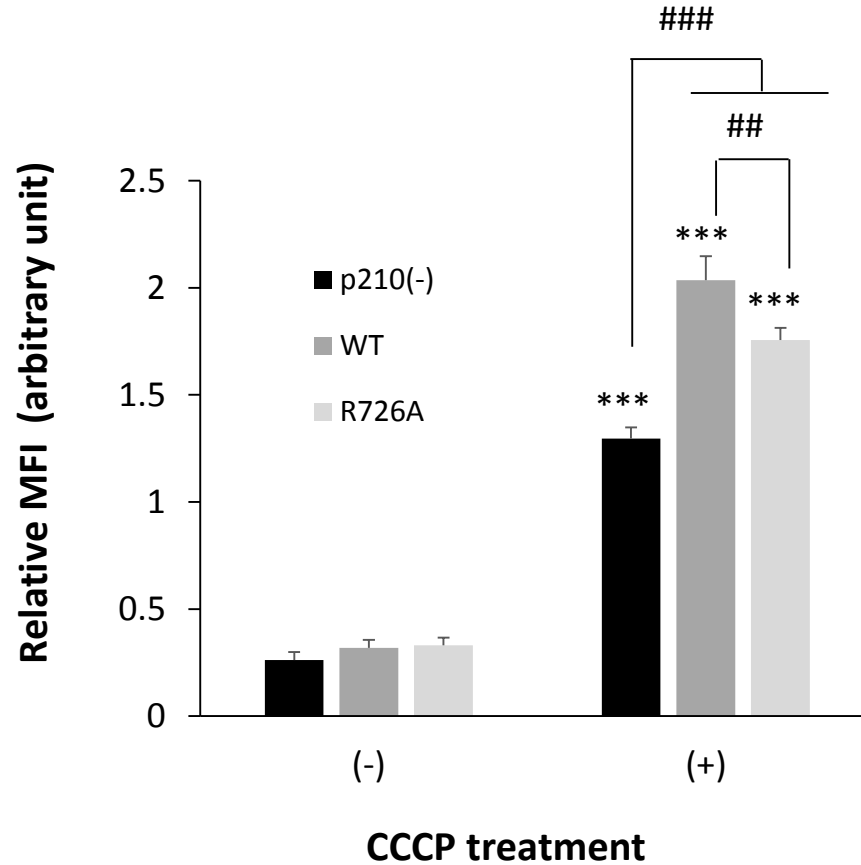
p210 BCR-ABL は PH ドメイン依存的にミトファジーを抑制する ③

Bafilomycin はオートファゴソームとリソソームの融合阻害に働く。



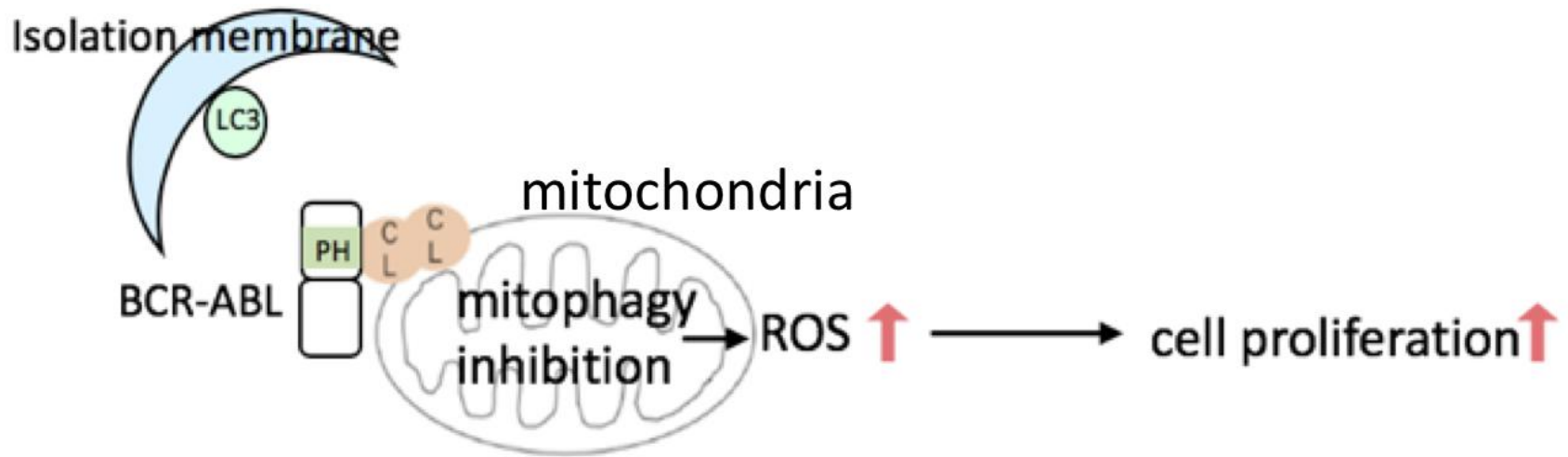
(Mean \pm SD, $n=3$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs time 0, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, Tukey ANOVA)

p210 BCR-ABL は PH ドメインを介して CCCP により誘導される ROS 産生を増強する



(Mean \pm SD, $n=3$; *** $p<0.001$ vs CCCP (-), ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, Tukey ANOVA)

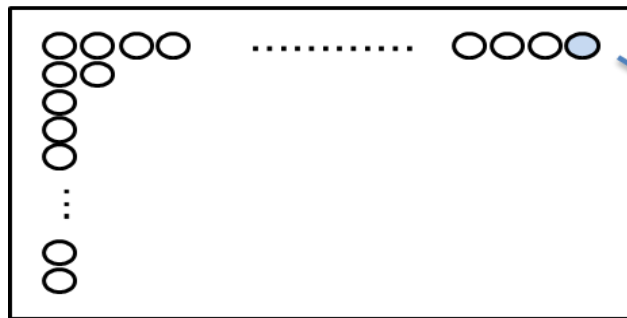
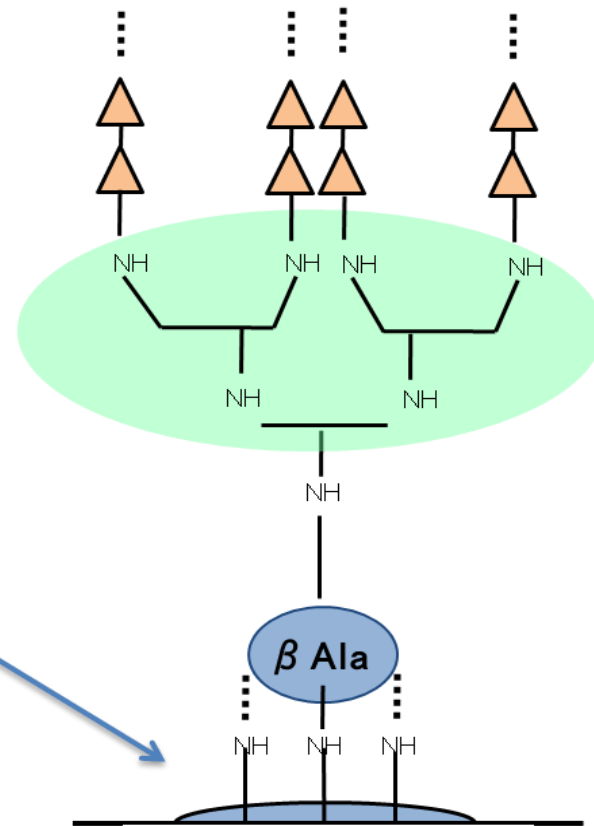
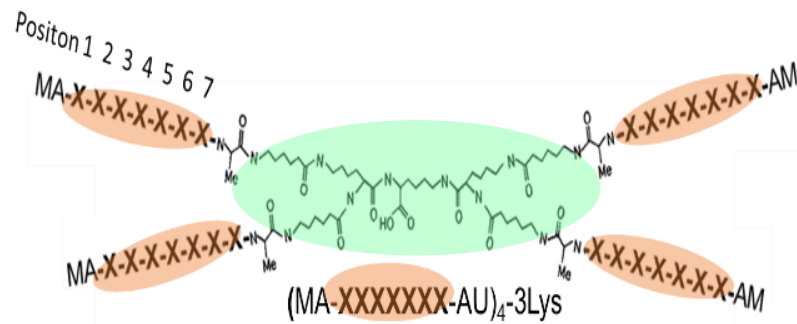
p210 BCR-ABL PHドメインの病理的機能に関するモデル



Shimasaki K, Watanabe-Takahashi M, et.al.,
Genes Cells 23(1):22-34, 2018

p210 BCR-ABL PH ドメイン制御分子の取得

X : Cys を除く 19 種アミノ酸の mixture



セルロース膜

p210 BCR-ABL PH ドメイン制御分子の取得

(MA-XXXXXXX-AU)₄-3Lys

1st **Z**₁**X**₂**X**₃**X**₄**X**₅**X**₆**X**₇ 19*7 = 133

2nd **Z**₁**X**₂**X**₃**D**₄**X**₅**X**₆**X**₇ 19*6 = 114

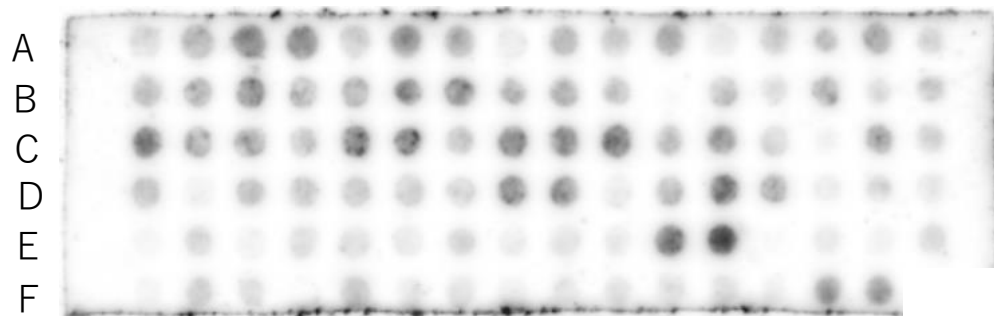
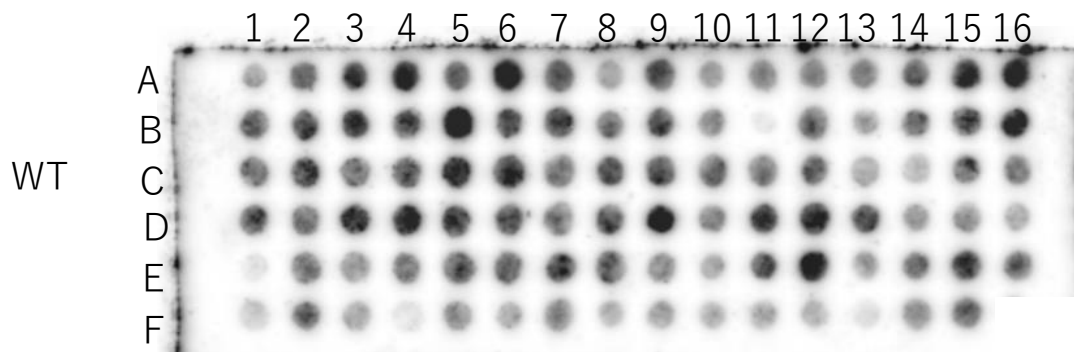
⋮

7th **A**₁**B**₂**C**₃**D**₄**E**₅**Z**₆**G**₇ 19*1 = 19

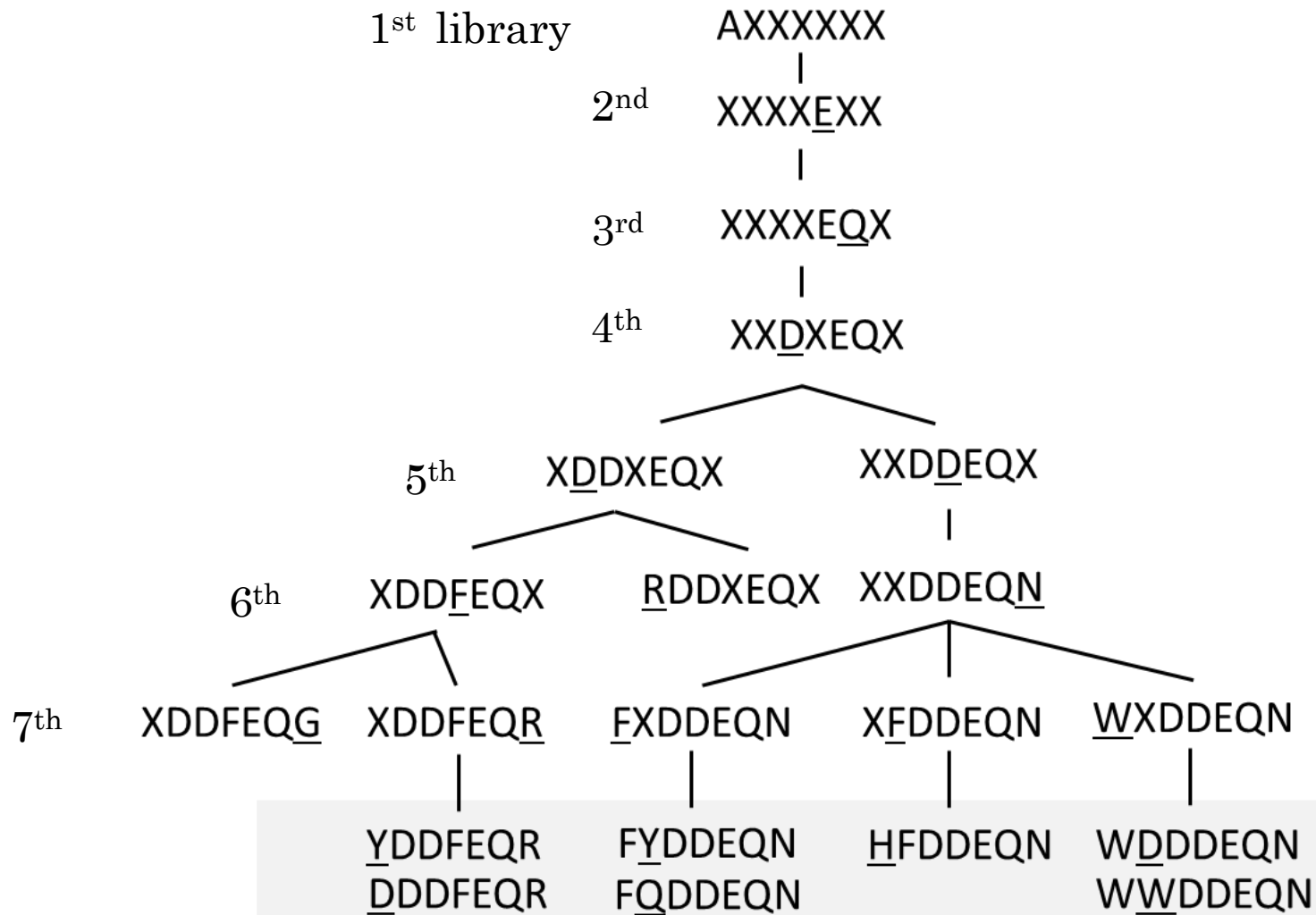
A₁**B**₂**C**₃**D**₄**E**₅**F**₆**G**₇

R726A

Z; システインを除く19のアミノ酸
 X; システインを除く19のアミノ酸の混合

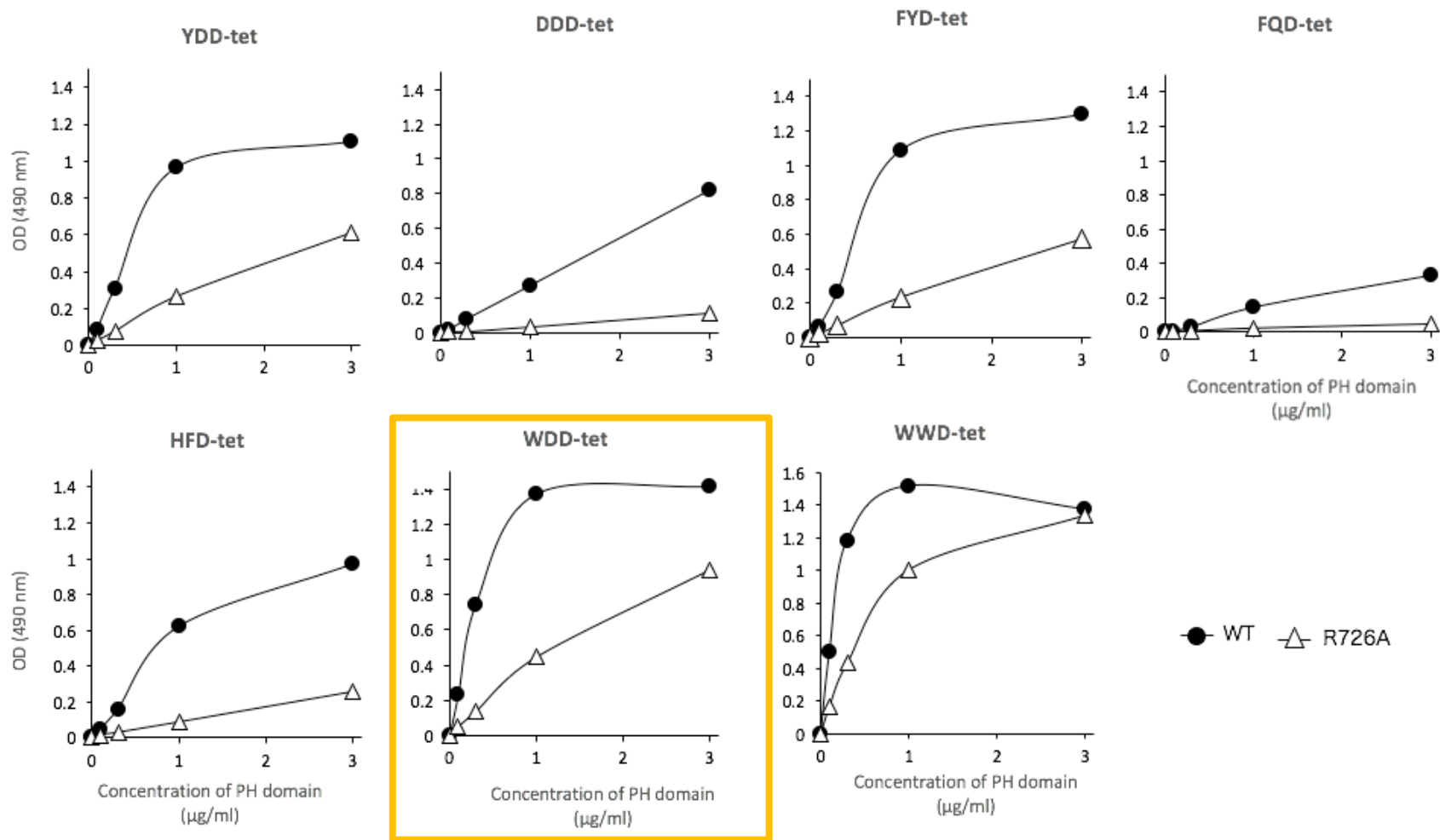


p210 BCR-ABL PH ドメイン制御分子の取得

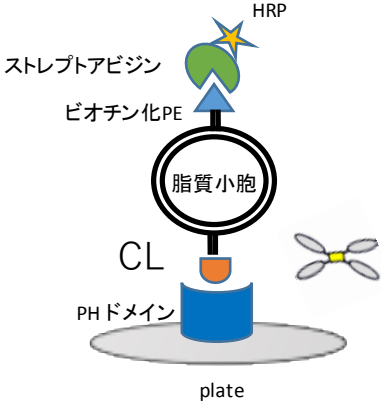
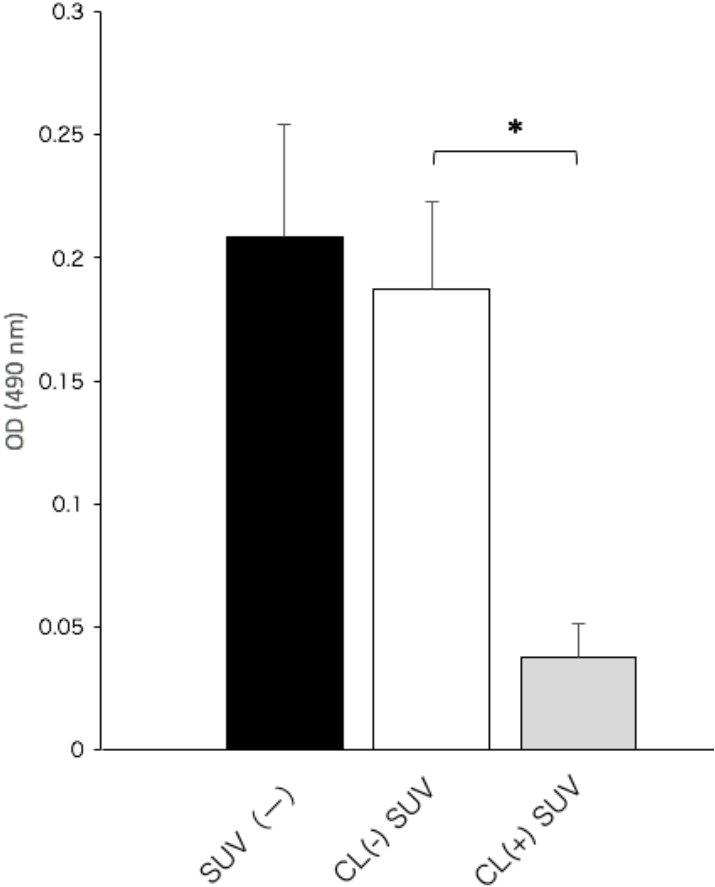


(特願2018-210822)

各候補ペプチドのp210 BCR-ABL PHドメインに対する結合活性



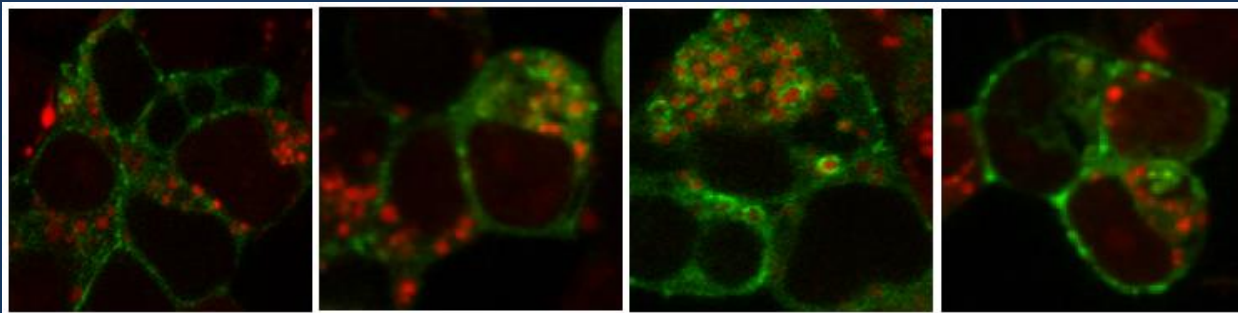
WDD-tetはp210 BCR-ABL PHドメインとCLとの結合に対して競合的に働く



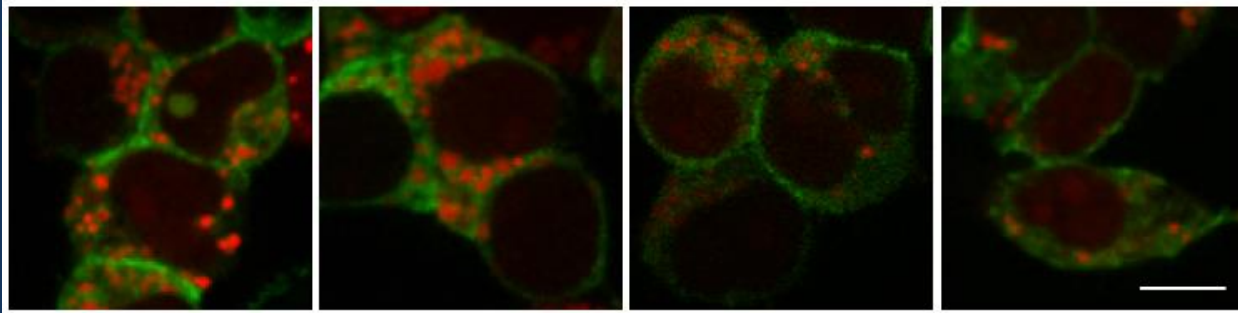
WDD-R4-tetはミトコンドリア障害に伴うp210 BCR-ABL PHドメインのミトコンドリアへの移行を阻害する

CCCP - - + +
WDD-R4-tet - + - +

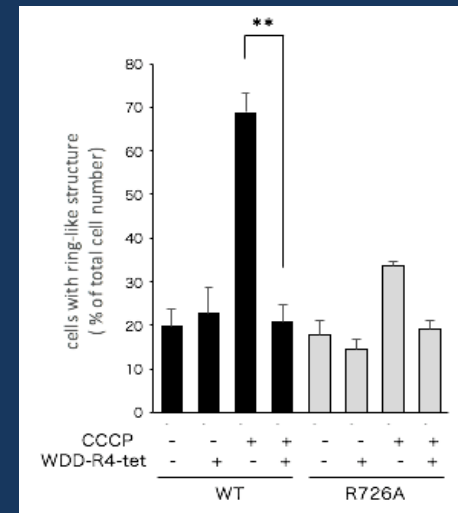
WT



R726A



Scale bar: 10 μm



WDD-R4-tet:
膜透過性を付与するためにC末端に
Arg4個付加したWDD-tet

まとめ

