



Newsletter

2022
summer
特別号

自治医科大学 地域医療オープン・ラボ

急性骨髄性白血病の予後不良因子 FLT3-ITD タンパク質の発現・精製に成功

生理学講座生物物理学部門の山本 直樹 助教、柴山 修哉 教授、および分子病態治療研究センター 幹細胞制御研究部の古川 雄祐 教授、菊池 次郎 准教授は、急性骨髄性白血病の予後不良因子FLT3-ITD タンパク質の発現および精製に成功し、迅速な薬剤スクリーニングに応用できることを示しました。今回、その研究成果がPLOS ONE 誌 (17(5): e0261699 (2022)) に掲載されましたので、山本 助教に研究の背景と詳細について伺いました。

論文題目: Fast in-vitro screening of FLT3-ITD inhibitors using silkworm-baculovirus protein expression system (カイコバキュロウィルスタンパク質発現系を用いたFLT3-ITD 阻害剤の迅速なスクリーニング法)

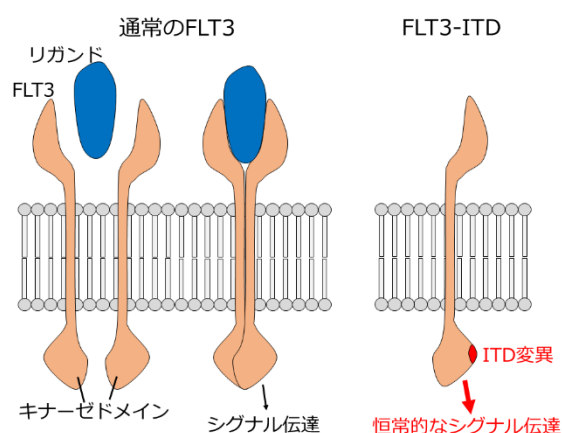
論文著者: Naoki Yamamoto, Jiro Kikuchi, Yusuke Furukawa, Naoya Shibayama

掲載雑誌: PLOS ONE 17(5): e0261699 (2022)

URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0261699>

Q1. FLT3-ITD とは？

この論文で着目している FLT3 は、13 番染色体に由来する受容体チロシンキナーゼの一種で、血液細胞の分化・増殖に関与しています。また、ITD は遺伝子内縦列重複の略語で、一部のアミノ酸配列がその前後に重複して挿入される遺伝子変異です。この ITD 変異が FLT3 のチロシンキナーゼ活性を持つ細胞内ドメイン部分に生じたのが、FLT3-ITD です (図)。通常 FLT3 は細胞外受容体にリガンドが結合して2量体化し、細胞内キナーゼドメインの自己リン酸化が引き起こされ、さらに下流へとシグナルが伝達されます (図左)。しかし、FLT3-ITD はリガンドが結合しなくても細胞内ドメインが常にキナーゼ活性を持ち、シグナルが伝達され続ける結果として血液細胞の異常な分化、および異常増殖が引き起こされます (図右)。FLT3-ITD は急性骨髄性白血病で頻繁に見られる変異で、この変異が存在すると予後が悪いことが知られています。



Q2. FLT3-ITD 阻害剤開発の現状は？

このように FLT3-ITD は急性骨髄性白血病の予後を決定づける重要な因子であり、その機能を阻害する薬剤の開発は重要な課題です。現状ではミドスタウリンやギリテリチニブなどいくつかの阻害剤が臨床応用されていますが、依然として新規薬剤発見のための研究開発は盛んに行われています。これまで、ある薬剤が FLT3-ITD の阻害に有効かどうかは、ITD 変異を導入した細胞を用いて評価されてきました。しかし、それには細胞の生死を確認する必要があるために数日を要し、また仮に有効であったとしても本当に FLT3-ITD に作用しているかを判断するのは簡単ではないという点が課題でした。

Q3. この論文の新規な点は？

そこでFLT3-ITD に対して直接有効である薬剤の開発を効率よく行うには、FLT3-ITD を単離する必要があります。しかし、ITD 変異は本来存在しないアミノ酸配列が無理矢理挿入される変異であることから、FLT3-ITD は非常に不安定であり、これまで精製に成功した例はありませんでした。そこで私たちは、カイコバキュロウィルスタンパク質発現系を用いることによって、実際に報告されているFLT3-ITD の一つに着目し、そのチロシンキナーゼ活性を持つ細胞内ドメイン部分(以後、これを単にFLT3-ITD と呼びます)の発現および精製に成功しました。また、精製したFLT3-ITD を用いて、キナーゼ活性評価キットにより1時間以内に薬剤の評価を行えることを実証しました。これらの2点が、本論文の新規な点です。

Q4. この論文発表に至った研究のターニングポイントは？

FLT3 は哺乳類で広く発現しているタンパク質であり、大腸菌のような単細胞生物による発現系では精製が困難でした。そこで着目したのがカイコバキュロウィルスタンパク質発現系です。カイコは絹糸を作る昆虫として有名ですが、多細胞生物でありヒトのタンパク質を発現精製するのに適しています。本研究では Systemex 社が提供しているカイコバキュロウィルス発現サービス、ProCube™ を利用しました。大腸菌、および Sf9 (培養用昆虫細胞) でさえも目的タンパク質が不溶性画分に移行してしまい、精製が困難でしたが、遺伝子組み換え用バキュロウィルスに感染させたカイコ蛹を用いることでFLT3-ITD を高純度に精製することに成功しました。これが研究のターニングポイントでした。詳細を調べたわけではないのですが、やはり多細胞生物ならではのタンパク質翻訳系が重要であるということだと思えます。

Q5. 研究を行うにあたって苦労した点は？

このように論文の内容としては、FLT3-ITD を精製し、迅速な薬剤スクリーニング系を確立したという至ってシンプルなものですが、また、企業さんのタンパク質発現サービスを用いているのでそんなに苦労しなくてもできそうと思われるかもしれませんが(筆者も、何も知らずにこの論文を見たら、おそらくそう思うと想像します)。しかし、この論文発表に至るまで大腸菌や Sf9 を用いた長期にわたる発現精製の試みがなされており、その結果がこの論文の下地になっています。実際、プロジェクトが立ち上がってから論文発表までかれこれ10年ほど経過しました。様々な方の努力があって最終的にこの論文を発表することができました。

Q6. 今後の研究の展開は？

これまで精製に成功していなかったことから見取れるように、FLT3-ITD のタンパク質立体構造はまだ明らかになっていません。立体構造が明らかになれば、なぜFLT3-ITD がリガンド結合無しでもチロシンキナーゼ活性を持続するのか、またどのような薬剤を設計すればチロシンキナーゼ活性を効果的に抑制できるか、といったことにつながる知見を得ることができます。従って、精製したFLT3-ITD を用いて、X線結晶構造解析、あるいは最近注目を集めているクライオ電子顕微鏡法により立体構造を明らかにすることが今後の研究課題の一つです。またITD 変異には様々な種類があり、それぞれが異なった立体構造を持っていると予想されます。今後テーラーメイド医療のような個々の遺伝子変異をターゲットにした治療が盛んになっていくと予想される中、個々のITD 変異体の詳細な立体構造の違いを明らかにする研究は重要になっていくと考えられます。本研究結果がこのような研究に少しでも役に立てばと思います。

最後になりますが、本研究結果は、本学生理学講座生物物理学部門の旧スタッフ、ならびに関連する研究機関の方々のご尽力、および Systemex 社の ProCube™ サービスご担当の方々の多大なるご協力のお陰です。この場をお借りして、これらの方々に深く御礼申し上げます。

【発行】

自治医科大学大学院医学研究科広報委員会
自治医科大学地域医療オープン・ラボ