

タンパク質の発現を制御する技術と医薬品開発への応用

内藤幹彦

Technologies regulating protein expression and their application to drug development

Mikihiko Naito

It has been almost two decades since the first molecular target drug imatinib was approved for treatment of chronic myelogenous leukemia (CML). Imatinib is a potent inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase, an oncogenic driver protein that causes CML. Thus, understanding the disease mechanism and development of a potent inhibitor against the disease causative protein is a powerful strategy for novel drug development. This strategy works well especially if the target protein has enzymatic activity closely related to the disease mechanism. However, there are many proteins without enzymatic activity, and they are often called “undruggable proteins”, which account for more than 70% of the total proteins expressed in the cells. These include scaffold proteins and transcription factors. To target undruggable proteins, it is effective to suppress the expression of target proteins. There are two approaches to downregulate the expression of target proteins: inhibiting *de novo* synthesis and facilitating degradation. To inhibit the protein synthesis, genome editing technologies such as CRISPR/CAS9 can be employed to destroy the genes encoding the target proteins at DNA level, and RNA interference mediated by antisense oligonucleotides to suppress the expression at RNA level. To induce the degradation of target proteins selectively, PROTAC/SNIPER technology is recently established. PROTACs and SNIPERs are chimeric small molecules, where a target ligand is linked to a ligand for an E3 ubiquitin ligase, and they induce ubiquitylation and proteasomal degradation of the target proteins in the cells. Since any intracellular protein can be rationally targeted by substituting target ligands, PROTAC/SNIPER technology attracts attention as a platform for novel drug development.

Keywords: SNIPER, PROTAC, protein degradation, RNA interference, CRISPR/CAS9

1. はじめに

疾患のメカニズムを明らかにし、疾患原因となっている分子に直接的に作用する薬剤を開発するというストラテジーは、現代の主要な創薬手法の一つとなっている。薬剤開発の初期段階からターゲットとする分子が明らかになため、分子標的薬と言われる事も多い。薬剤のターゲット分子が細胞外に分泌されるタンパク質や細胞膜上に存在するタンパク質の場合、抗体や組換えタンパク質

等の分子量の大きな高分子薬が有効であり、ターゲット分子に対して高い特異性を発揮する。これに対して細胞内のタンパク質を標的とする場合は、細胞透過性の問題もあって低分子薬が主流である。

低分子の分子標的薬で最初の成功例は、慢性骨髄性白血病の治療薬として2001年に認可されたABLキナーゼ阻害剤イマチニブである。イマチニブの成功以来数多くの選択的キナーゼ阻害剤が様々ながんに対する治療薬として承認され、がんの治療成績向上に大きく貢献してきた。現在でもキナーゼ阻害剤開発は活発に行われており、臨床開発中のがん分子標的薬の約半数はキナーゼ阻害剤である。またプロテアーゼ阻害剤であるハーボニーがC型慢性肝炎の特効薬となるなど、酵素阻害剤の開発は分子標的薬の開発において最も成功確率の高い標準的な創薬手法となってきた。

To whom correspondence should be addressed:

Mikihiko Naito; Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan; Tel: +81-44-270-6533; Fax: +81-44-270-6539; E-mail: miki-naito@nihs.go.jp

しかし細胞内には明確な酵素活性を持たないタンパク質 (Scaffoldタンパク質, 転写因子等) も多く存在する。これらのタンパク質に対して阻害剤を開発する事は一般に難しく, 細胞が発現する全タンパク質のうち約70%はアンドラッグアブルな標的と言われている。このようなアンドラッグアブルな標的をドラッグアブルにする技術として, タンパク質の発現そのものを制御する技術に近年注目が集まっている。

2. タンパク質の生合成を制御する技術と医薬品への応用

ゲノムDNAにコードされた遺伝情報は, mRNAに転写され, タンパク質に翻訳される。また生成したタンパク質はそれぞれに固有のメカニズムで分解される (図1)。DNAレベルで遺伝子を破壊してタンパク



図1 タンパク質の発現を制御する技術

質の発現を阻止する技術は1990年頃に確立し, 以来多くのノックアウトマウスが作成されてきた。最近ではCRISPR/CAS9等のゲノム編集技術が開発され, 効率良くゲノムDNAの編集ができるようになった¹⁾。ゲノム編集技術は, 変異によって機能を失った遺伝子を正常型に戻すなど遺伝子治療の技術として有望だが, 遺伝子の一部を欠失させる等により目的の遺伝子を破壊する技術としても利用できる。例えば, HIVが細胞内に侵入する際に必要な受容体CCR5の遺伝子を破壊したリンパ球を作成してヒトに投与すれば, HIVに感染しても後天性免疫不全症候群 (AIDS) を発症しない事が期待され, 実際にそのような臨床研究が行われている。DNAレベルでの遺伝子破壊は, コードされたタンパク質の発現を完全に阻止することができるという点で優れているが, すべての細胞で望んだ通りのゲノム編集ができるわけではないため, 臨床応用にはクリアすべき課題も多い。

mRNAレベルでは, RNA干渉を利用してmRNAを分解する核酸医薬品の開発が進んでいる。RNA干渉は, 短鎖のsiRNAが相補的なmRNAに結合するとmRNAが切断されて遺伝子発現が抑制される現象であり, 1998年に線虫で初めて報告された。現在では哺乳類を含む多くの生物種でこの現象が認められる事がわかっている²⁾。生体内で代謝されにくい合成オリゴヌクレオチドが医薬品として開発されており, 相補的な配列を持つ

mRNAに結合するとmRNAが分解されタンパク質の発現が阻害される。日本ではまだ未承認であるが, ApoB-100 mRNAを分解するアンチセンス核酸が家族性高コレステロール血症治療薬として米国で, TTR mRNAを分解するアンチセンス核酸が遺伝性ATTRアミロイドシスの治療薬として欧州及び米国で承認されている。核酸医薬品は, その配列を変えることによって標的とするmRNAを自在に選ぶことができるため, 医薬品開発のプラットフォーム技術として非常に優れている。しかし, 細胞内への導入方法が課題となっており, DDS技術の進展が強く望まれている。最近, ミツバチのロイヤルゼリーに含まれるタンパク質MRJP-3がRNAと複合体を形成し, 個体あるいは世代を超えたRNA情報の伝播に関わっている事が報告された³⁾。MRJP-3をお手本としたDDS技術の開発が期待される。

3. 選択的タンパク質分解技術と医薬品への応用

上で述べた2つの方法はタンパク質の生合成を阻害する技術であるが, 最近になってタンパク質を選択的に分解する技術が開発され, 医薬品開発への応用が急速に進んでいる。細胞内のタンパク質は主に2つの経路 (ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系) で分解される。このうちユビキチン・プロテアソーム系は選択的なタンパク質分解機構であり, 細胞内で不要になったタンパク質等はユビキチン化を受けプロテアソームで分解される。ユビキチンは76アミノ酸からなる小さな球状のタンパク質であり, E1, E2, E3とクラス分けされた一連のユビキチン連結系酵素の働きによって, ユビキチンのC末端が標的タンパク質もしくはユビキチンのリジン (K) 残基に結合する。4個以上のユビキチンが数珠のように連結したタンパク質は, プロテアソームによって認識され分解される。このユビキチン化反応は細胞内で厳密に制御された機構であり, 分解されるタンパク質は主にE3ユビキチンリガーゼによって認識されユビキチン化を受ける⁴⁾。細胞には約600種類のユビキチンリガーゼがあると想定されている。

最近開発されたプロテインノックダウン技術は, ユビキチン・プロテアソーム系を利用して標的タンパク質を選択的に分解する技術であり, 分解を誘導する化合物を医薬品として開発できることから低分子創薬の新しい技術として注目されている。タンパク質分解を誘導する化合物には主に2つのタイプがある。一つはE3ユビキチンリガーゼに作用してその基質特異性を変化させるE3モジュレーターであり, Thalidomide, Indisulamがこのタイプに属する。Thalidomide及びその誘導体 (Lenalidomide, Pomalidomide) はユビキチンリガーゼ

複合体CRL4^{CRBN}の基質認識サブユニットCRBNに結合し、CRBNの本来の基質とは異なるタンパク質（ネオ基質：Ikarosファミリーの転写因子等）をユビキチン化して分解する⁵⁾。またIndisulamはCRL4^{DCAF15}の基質認識サブユニットDCAF15に結合し、スプライシング制御因子RBM39/CAPER α の分解を誘導する⁶⁾。これらのE3モジュレーターはE3リガーゼとネオ基質の間にあって両者の結合を強くするため、分子糊（molecular glue）と呼ばれることもある。Lenalidomide, Pomalidomideは既に多発性骨髄腫などの治療薬として承認されており、タンパク質分解を誘導する化合物が医薬品になることは明らかである。E3モジュレーターは化合物の側鎖を修飾する事によって基質特異性に変化をもたらす事ができるが、特定のタンパク質を狙って分解する化合物を開発する事は難しい。

もう一つのタイプは、E3ユビキチンリガーゼに結合するリガンドと標的タンパク質に結合するリガンドをリンカーで繋いだキメラ型の化合物で、現在までにCRL2^{VHL}, CRL4^{CRBN}, IAP, MDM2等のE3ユビキチンリガーゼを利用して標的タンパク質を分解するPROTAC (Proteolysis-Targeting Chimera), SNIPER (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser) 等のキメラ化合物が報告されている^{7,8)}。細胞内で標的タンパク質とE3ユビキチンリガーゼを結合させるという点では上記のE3モジュレーターと同様であるが、標的リガンドを置換する事によって任意のタンパク質を分解するキメラ化合物を合理的に設計できることから、創薬の新しいプラットフォーム技術になると考えられている。

4. 国衛研で開発したSNIPER

少し手前味噌になるかもしれないが、国衛研で開発したSNIPERについて概説する。IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) ファミリータンパク質による細胞死制御機構を研究していた我々は、低分子化合物メチルベスタチン (MeBS) がIAPファミリータンパク質のcIAP1を特異的に減少させる事を発見した。詳しい解析の結果、MeBSはcIAP1のBIR3ドメインと相互作用し、cIAP1のRING依存的な自己ユビキチン化を活性化してプロテアソームによる分解を誘導する事を明らかにした⁹⁾ (図2)。またMeBSの構造活性相関解析から、MeBSのメチルエステルを、ベンジルエステルやオクチルエステルなど比較的大きな残基に置換してもこの活性は保持されているが、ベスタチン骨格を修飾するとcIAP1との相互作用が失われ、cIAP1分解誘導活性もなくなることがわかった。従ってMeBSはベスタチン骨格側でBIR3ドメインと相互作用し、メチル基はcIAP1から離

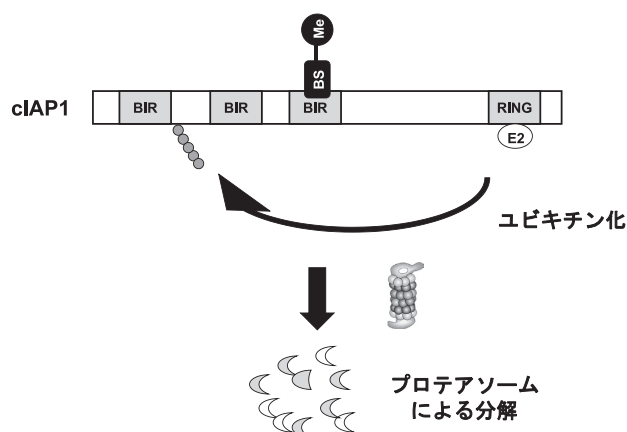


図2 MeBSによるcIAP1の分解機構

れていると推測された。これらの知見を基に、MeBSのメチル基を標的タンパク質に結合するリガンドと置き換えれば、標的タンパク質をcIAP1によってユビキチン化し、プロテアソームで分解できるのではないかと考えた (図3)。

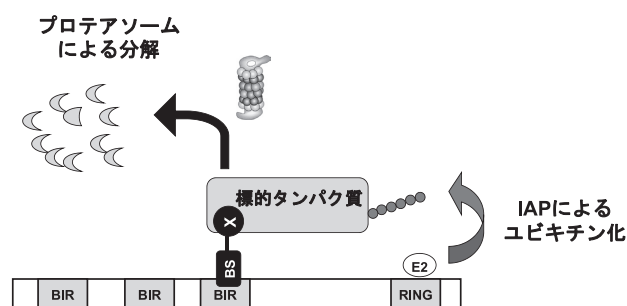


図3 SNIPERによる標的タンパク質分解機構

このアイデアを基にして、ベスタチンをcIAP1リガンドとして利用した各種SNIPERを合成した。東大分生研との共同研究で最初に開発したSNIPER (CRABP) はATRA (all-trans retinoic acid) を標的リガンドとして導入した化合物で、ATRA結合タンパク質であるCRABP2 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2) を減少させる活性を示した¹⁰⁾。また国衛研有機化学部と共同で4-Hydroxytamoxifenを標的リガンドとしてエストロゲン受容体を分解するSNIPER (ER) を開発し¹¹⁾、武田薬品工業と共同でKHS-108をリガンドとしてTACC3を分解するSNIPER (TACC3) を開発した¹²⁾。その後、親和性の高いIAPリガンドをSNIPERに導入する事によって、in vivo xenograftモデルで標的タンパク質の分解と抗がん活性を示すSNIPER (ER) など多数のSNIPER化合物を開発し (図4)、プロテインノックダウン技術の確立に大きく貢献した¹³⁻¹⁶⁾。

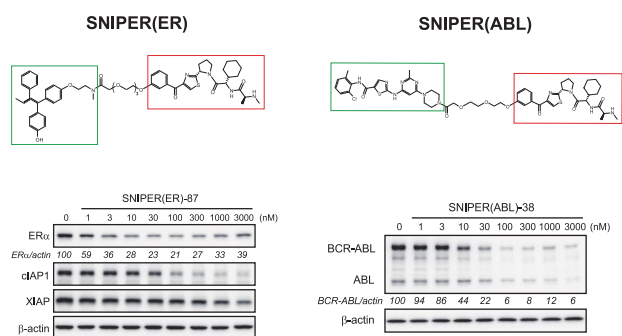


図4 SNIPERによるエストロゲン受容体, BCR-ABLの分解

5. おわりに

PROTAC, SNIPER等のキメラ化合物による選択的タンパク質分解技術を使って創薬を目指すバイオベンチャーがここ数年国内外で次々と設立され, メガファーマと連携して活発に創薬研究を展開している。中でもARVINAS社が開発した2つのPROTACは昨年Investigational New Drugsの承認を受け, 臨床開発が本格的に始まろうとしている。近い将来, プロテインノックダウン技術を基にして開発された医薬品が承認され, 医療現場で患者さんの治療に役立つことを期待したい。

引用文献

- 1) Komor A.C., Badran A.H., and Liu D.R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell*. (2017) 168, 20-36. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.044
- 2) Dorsett Y., and Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*. (2004) 3, 318-329. doi: 10.1038/nrd1345
- 3) Maori E., Navarro I.C., Boncristiani H., Seilly D.J., Rudolph K.L.M., Sapetschnig A., Lin C.C., Ladbury J.E., Evans J.D., Heeney J.L., and Miska E.A. A Secreted RNA Binding Protein Forms RNA-Stabilizing Granules in the Honeybee Royal Jelly. *Molecular cell*. (2019) 74, 598-608 e596. doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.010
- 4) Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews. Molecular cell biology*. (2005) 6, 79-87. doi: 10.1038/nrm1552
- 5) Kronke J., Fink E.C., Hollenbach P.W., MacBeth K.J., Hurst S.N., Udeshi N.D., Chamberlain P.P., Mani D.R., Man H.W., Gandhi A.K., Svinkina T., Schneider R.K., McConkey M., Jaras M., Griffiths E., Wetzler M., Bullinger L., Cathers B.E., Carr S.A., Chopra R., and Ebert B.L. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1α in del (5q) MDS. *Nature*. (2015) 523, 183-188. doi: 10.1038/nature14610
- 6) Uehara T., Minoshima Y., Sagane K., Sugi N.H., Mitsuhashi K.O., Yamamoto N., Kamiyama H., Takahashi K., Kotake Y., Uesugi M., Yokoi A., Inoue A., Yoshida T., Mabuchi M., Tanaka A., and Owa T. Selective degradation of splicing factor CAPERα by anticancer sulfonamides. *Nature chemical biology*. (2017) 13, 675-680. doi: 10.1038/nchembio.2363
- 7) Burslem G.M., and Crews C.M. Small-Molecule Modulation of Protein Homeostasis. *Chemical reviews*. (2017) 117, 11269-11301. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00077
- 8) Naito M., Ohoka N., and Shibata N. SNIPERs—Hijacking IAP activity to induce protein degradation. *Drug Discovery Today: Technologies*. (2019), in press. doi: 10.1016/j.ddtec.2018.12.002
- 9) Sekine K., Takubo K., Kikuchi R., Nishimoto M., Kitagawa M., Abe F., Nishikawa K., Tsuruo T., and Naito M. Small Molecules Destabilize cIAP1 by Activating Auto-ubiquitylation. *The Journal of biological chemistry*. (2008) 283, 8961-8968. doi: 10.1074/jbc.M709525200
- 10) Itoh Y., Ishikawa M., Naito M., and Hashimoto Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J Am Chem Soc*. (2010) 132, 5820-5826. doi: 10.1021/ja100691p
- 11) Okuhira K., Demizu Y., Hattori T., Ohoka N., Shibata N., Nishimaki-Mogami T., Okuda H., Kurihara M., and Naito M. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor-α and necrotic cell death in breast cancer cells. *Cancer science*. (2013) 104, 1492-1498. doi: 10.1111/cas.12272
- 12) Ohoka N., Nagai K., Hattori T., Okuhira K., Shibata N., Cho N., and Naito M. Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell death & disease*. (2014) 5, e1513. doi: 10.1038/cddis.2014.471
- 13) Ohoka N., Okuhira K., Ito M., Nagai K., Shibata

- N., Hattori T., Ujikawa O., Shimokawa K., Sano O., Koyama R., Fujita H., Teratani M., Matsumoto H., Imaeda Y., Nara H., Cho N., and Naito M. In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs). *The Journal of biological chemistry*. (2017) 292, 4556-4570. doi: 10.1074/jbc.M116.768853
- 14) Shibata N., Nagai K., Morita Y., Ujikawa O., Ohoka N., Hattori T., Koyama R., Sano O., Imaeda Y., Nara H., Cho N., and Naito M. Development of Protein Degradation Inducers of Androgen Receptor by Conjugation of Androgen Receptor Ligands and Inhibitor of Apoptosis Protein Ligands. *Journal of medicinal chemistry*. (2018) 61, 543-575. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00168
- 15) Ohoka N., Morita Y., Nagai K., Shimokawa K., Ujikawa O., Fujimori I., Ito M., Hayase Y., Okuhira K., Shibata N., Hattori T., Sameshima T., Sano O., Koyama R., Imaeda Y., Nara H., Cho N., and Naito M. Derivatization of inhibitor of apoptosis protein (IAP) ligands yields improved inducers of estrogen receptor alpha degradation. *The Journal of biological chemistry*. (2018) 293, 6776-6790. doi: 10.1074/jbc.RA117.001091
- 16) Shibata N., Shimokawa K., Nagai K., Ohoka N., Hattori T., Miyamoto N., Ujikawa O., Sameshima T., Nara H., Cho N., and Naito M. Pharmacological difference between degrader and inhibitor against oncogenic BCR-ABL kinase. *Scientific reports*. (2018) 8, 13549. doi: 10.1038/s41598-018-31913-5