

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) がん特異的な蛋白質分解医薬品の開発
(英語) Development of cancer-specific protein degradation drugs

研究開発実施期間：2018年9月5日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 内藤幹彦
(英語) Mikihiko Naito

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・部長
(英語) Chief, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

がん細胞で特異的にプロテインノックダウン活性を示すタンパク質分解医薬品を開発するために、がんタンパク質 X に着目して研究を進めた。

まずがんタンパク質 X に結合する蛍光プローブを合成し、蛍光偏光法および TR-FRET 法を利用して蛍光プローブとがんタンパク質 X との結合親和性を測定した。次に化合物による競合阻害実験により各種化合物のがんタンパク質 X との結合親和性を測定するアッセイ系を構築した。蛍光偏光法および TR-FRET 法共に試験化合物の結合親和性を算出する事ができたが、蛍光偏光法ではアッセイに必要ながんタンパク質 X の量が多かったため、主に TR-FRET 法を利用してアッセイを行った。

がんタンパク質 X の構造情報等を参考に新規化合物を 100 種類以上合成し、がんタンパク質 X 等に対する結合親和性を上記のアッセイ系で評価した。その結果、新規化合物 A、B、C はがんタンパク質 X に対する高い結合親和性と特異性を示す事がわかった。また化合物 C を基にした化合物 D は、がんタンパク質 X に対する選択的な結合活性を保持していることが確認された。

がんタンパク質 X を発現する細胞を 100 nM の化合物 D で 6 時間処理すると、標的タンパク質 Y、Z をほぼ完全に分解した。一方がんタンパク質 X を発現していない細胞では、10～1000 nM の化合物 D で処理しても標的タンパク質 Y、Z の分解はほとんど認められなかった。これらの結果から化合物 D はがんタン

パク質 X 陽性細胞で特異的に標的タンパク質 Y, Z の分解活性を示すことが明らかになった。

標的タンパク質 Y, Z の分解におけるがんタンパク質 X の役割を明確に比較するために、がんタンパク質 X を発現していない細胞にがんタンパク質 X をコードする遺伝子を導入した細胞を作成して化合物 D の標的タンパク質 Y, Z 分解活性を調べた結果、X 遺伝子導入細胞でのみ標的タンパク質 Y, Z の強い分解活性が認められた。また化合物 D は X 遺伝子導入細胞に対して選択的な増殖阻害活性を示した。

さらに化合物 D の誘導体を各種合成し、化合物 D よりも優れた分解活性を示す化合物 E を得た。化合物 D, E による標的タンパク質 Y, Z の分解メカニズムを解析した結果、化合物 D, E は標的タンパク質 Y, Z とがんタンパク質 X との複合体を特異的に形成する事が明らかになった。

今回開発した化合物 D, E のようなタンパク質分解医薬品は、従来の医薬品にない各種の特徴をもっている。以下、現在の創薬技術で主流となっている阻害剤等との比較でタンパク質分解医薬品の特徴を示す。

阻害剤との比較

阻害剤開発は、現在でも低分子創薬の有力な手法となっている。しかし、酵素活性のあるタンパク質に対して阻害剤を開発する事は比較的容易にできるが、酵素活性のないタンパク質を標的に有効な阻害剤を開発する事は難しい。プロテインノックダウン法による標的タンパク質の分解技術では、化合物に阻害活性は必要なく、標的タンパク質に結合するリガンドを利用して標的タンパク質を分解する化合物を開発する事ができる。従って阻害剤開発が難しい標的タンパク質に対しても、これを分解する医薬品を開発する事ができると考えられている。

抗体医薬品との比較

抗体医薬品は、細胞外タンパク質及び細胞膜表面のタンパク質を標的とするが、細胞内タンパク質を標的とする事はできない。一方プロテインノックダウン法では細胞内のユビキチン・プロテアソーム系を利用して標的タンパク質の分解を誘導するため、細胞外のタンパク質を標的とする事はできない。この様に、抗体医薬品とプロテインノックダウン法は対象とする標的タンパク質の存在部位が相補的であり、共に創薬技術として重要である。

核酸医薬品との比較

タンパク質の発現量を制御する技術として RNA 干渉法を利用した核酸医薬品の開発が進んでいる。アンチセンスオリゴ核酸等の核酸医薬品は、その配列を変えることによって様々な標的タンパク質の発現を抑制できる事から、医薬品開発の新しいプラットフォーム技術として大きな期待を集めているが、細胞内への透過性や標的組織への送達の点で化合物と比べて劣る。このため現状では筋肉内への局所投与や核酸医薬品を取り込みやすい肝細胞等を標的とした開発が中心となっている。またその作用機序はタンパク質の合成阻害であるため、標的タンパク質が減少するまでに数日程度の時間がかかることが多い。これに対してプロテインノックダウン法で活性を示すのは化合物であり、標的組織・細胞への到達は核酸医薬品よりも格段に優れている。またタンパク質の分解を誘導するため、短時間（数時間）で標的タンパク質の量を減少させる事ができる。また既に経口投与でも有効な化合物の開発も報告される等、医薬品開発技術として核酸医薬品よりも優れた点も多い。プロテインノックダウンによるタンパク質分解技術は核酸医薬品と相補的な技術であり、両者とも阻害剤開発等が難しい標的タンパク質に対する創薬の新しいプラットフォーム技術になると考えられる。

従来型プロテインノックダウン化合物との比較

これまでに開発されてきたプロテインノックダウン化合物は、すべての細胞で標的タンパク質の分解を誘導できるが、特定の細胞でのみ標的タンパク質の分解を誘導することはできない。今回開発した化合物D、Eは、がんタンパク質Xを発現する細胞で特異的に標的タンパク質Y、Zの分解活性を示す次世代型のプロテインノックダウン化合物である。がん細胞特異的に標的タンパク質を分解するプロテインノックダウン化合物の開発はこれまで報告がなく、世界で初めての独創的な研究成果であると考えられる。

To develop novel compounds that can induce protein degradation selectively in cancer cells, we focused on the cancer protein X. In the beginning, we developed a fluorescent probe that can bind to the cancer protein X, and the probe was applied to fluorescent depolarization assay and time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET) assay to measure the binding affinity. Then, the fluorescent probe was competed with test compounds to examine if the test compounds can interact with the cancer protein X. We compared the two assays and found that fluorescent depolarization assay requires much more recombinant protein X than the TR-FRET assay. Therefore, we decided to measure the binding affinity of many test compounds by TR-FRET assay.

We synthesized more than 100 compounds potentially interact with the cancer protein X, and the binding affinity to the cancer protein X was measured by TR-FRET assay. We found novel compounds A, B, C showed higher binding affinity and selectivity to the cancer protein X, and the compound D derived from compound C maintained the potent binding affinity and selectivity.

When cancer cells expressing the protein X were treated with 100 nM compound D for 6 h, proteins Y and Z were degraded almost completely. However, compound D at 10 to 1000 nM did not induce the degradation of the proteins Y and Z in the cells that do not express the cancer protein X. These results indicate that the compound D induces the degradation of proteins Y and Z selectively in cancer cells expressing protein X. In order to clarify the role of cancer protein X in the degradation of proteins Y and Z more directly, we generated congenic cell lines by transducing the gene encoding protein X into the cells that do not express endogenous protein X, and examined the ability of compound D to induce degradation of proteins Y and Z. The results showed that compound D induced degradation of the proteins Y and Z, and inhibited cell growth only in the cells exogenously expressing protein X, suggesting the essential role of protein X in the compound D-induced protein degradation and growth inhibition. We further derivatized compound D and obtained compound E with better activity. Mechanistic analysis demonstrated that compounds D and E formed complexes composed of protein X and Y or Z in the cells.

Compounds that can induce protein degradation have unique features different from classical drugs such as small molecule inhibitors and antibodies. For example, it is generally hard to develop potent inhibitors against non-enzymatic proteins such as scaffold proteins and transcription factors. However, protein knockdown technologies could be successfully applied to such undruggable proteins to induce degradation. When compared with antibodies, antibodies can target extracellular and cell surface proteins whereas intracellular proteins can be degraded by protein knockdown technologies, therefore, localization of the target proteins is compensatory with these modalities. Downregulation of target protein can be attained by RNA interference, and many oligonucleotide drugs are under clinical development. This technology inhibits de novo synthesis of the proteins and requires longer time to downregulate the protein

reveals as compared with the protein knockdown technology. Combination of RNA interference and protein knockdown could potentially downregulate the proteins of interest, and therefore both technologies need further investigation. Finally, this study demonstrated for the first time that protein degradation can be selectively induced in cancer cells, which would be promising to develop novel drugs with better efficacy and lower adverse effects.

III 事後評価総合所見

課題リーダーらは、生存に必要なタンパク質の分解をがん細胞特異的に促進する化合物を提案、設計しており、ACT-MS ではその化合物の構成部分のうち、がんタンパク質 X への結合パートの特異性を高めることを課題としていました。がんタンパク質 X との結合特異性が著しく高まった新規分子が取得されたことから計画はほぼ達成されたこと、セットアップ企業が合成展開を担当するなど積極的役割を担ったことなどは高く評価されます。

一方で、抗がん活性は *in vitro* での証明にとどまった点は惜しまれます。今後は、*in vivo* モデルでの抗がん活性を示すこと、構造最適化が求められます。その方策は示されておりませんが、それらが達成された際には他にも応用・発展性の高い新規なプラットフォームであり、セットアップ企業との連携のもと、実用化に向けた課題を解決し、開発が進展されることを期待します。