

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(革新的中分子創薬技術の開発)
事後報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 選択的オートファジーにもとづく中分子創薬技術
(英語) Middle-molecule-mediated control of selective autophagy

研究開発実施期間: 平成30年6月4日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 有本博一
(英語) Hirokazu Arimoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東北大学・大学院生命科学研究科・教授
(英語) Tohoku University, Graduate School of Life Sciences, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

デグレーダー技術は創薬分野において高い関心を集めるニューモダリティで、中分子化合物を利用する革新的手法である。既存のデグレーダーは、疾患関連物質を認識する標的化リガンドと細胞内分解に関わるユビキチンリガーゼに結合する分解タグを連結したキメラ型分子が多い。PROTACはその代表例である。デグレーダーは細胞内の疾患原因タンパク質を低減することにより、基礎医学研究で日常的に使用されるRNAiなどのノックダウン技術と類似した効果をしめす。このため基礎研究で効果が実証された創薬標的に対して直裁的な医薬品開発を可能とする。一部のPROTACについて現在臨床試験が実施されている。これまでのところ良好な途中結果が発表されているため、今後もデグレーダーに対する関心は高まることが期待される。

本研究開発の開始時点では、既存デグレーダーの全てがユビキチン-プロテアソーム系にもとづいた分解機構を基盤としていた。プロテアソームは、内部に筒状の空洞を持つタンパク質複合体であり、この空洞に取り込まれるためには、可溶性タンパク質など立体的に小さいことが必要である。タンパク質の凝集体や細胞小器官などは、そのままプロテアソーム分解されることはなく、またタンパク質以外の生体高分子（例えば核酸）は基質とならない。プロテアソーム分解の対象とならない基質の分解を主に担当しているのはオートファジーである。主たる機構であるマクロオートファジーでは、細胞質に生成する隔離膜が周囲の物質を包み込む形でオートファゴソーム内に隔離し、リソソームとの融合を経て分解する。オートファゴソームの直径は約 $1\mu\text{m}$ 程度あるため、ミトコンドリアなど細胞小器官など立体的に大きな基質を取り込むことが可能である。リソソームはタンパク質以外の生体高分子の加水分解も担うことができる。

ユビキチン-プロテアソーム系と相補的なオートファジーをデグレーダー設計に活用できれば、既存の技術と一線を画す新技術となる。研究開発代表者は、これまで選択的オートファジーにおける選択性を制御する低分子の研究に取り組んできた。本研究では、これらの研究成果の基盤のうえに立って、オートファジー基盤のデグレーダー開発に取り組んだ。本研究期間において論文発表したAUTAC技術（2019年）は、世界で初めてオートファジーを用いたデグレーダーとして高い注目を集めている。例えば、社会的関心を反映する指標Altmetricsは141（2021年5月現在）、研究分野における被引用数の高さを示すFWCIのスコアは7.33（2021年5月現在）である。FWCIの結果は、研究分野の平均的論文の733%の頻度で引用されていることを意味し、データベースScopusではTop 2%の数値である。以下には本研究開発で行なった主たる結果を記述する。

タンパク質分解剤（デグレーダー）を開発するには、分解を目指す疾患原因物質と細胞内分解システムを近接化させることが早道である。例えば、PROTACsは疾患原因物質に結合する「標的化リガンド」とユビキチンリガーゼに結合する「分解タグ」を連結したキメラ型中分子である。オートファジー機構にもとづくデグレーダー(AUTAC)も基本的には同様の分子設計が応用できると考えた。研究開発代表者は、化学者でありながら長年オートファジーの選択性発現機構を研究してきた。2013年には、A群レンサ球菌のオートファジーによる排除を精査したところ、細菌の周囲にcGMP修飾(S-グアニル化)が集積することを見出した(伊藤、斎藤らMolecular Cell, 2013)。タンパク質のcGMP修飾がオートファジー系を細菌周囲にリクルートする鍵と気づいたことが、本開発の出発点である。様々な標的化リガンドとグアニン誘導体(分解タグ)を組み合わせてキメラ分子を合成し、AUTAC技術として確立した。

分解タグの原型であるcGMP誘導体では、標的分解にかなりの薬剤濃度を必要とし、効率ではないため構造活性相関研究を実施して、ドラッグライクな構造を有する分解タグを複数見出した。2019年のAUTAC論文発表では、第一世代の分解タグ(FBnG) ($10\mu\text{M}$ 以上の濃度で有効)を用いた。多検体同時観察が可能となる蛍光顕微鏡設備を導入して化合物スクリーニングの効率向上を行なった結果、最終的にはFBnGタグの100倍以上の活性をもつ次世代AUTAC各種を創製することができた。

デグレーダー開発では、世界中の製薬企業が研究開発しのぎを削っている。既存技術に対するAUTACの特徴を際立たせることが有効な開発戦略と考え、本開発において細胞小器官の分解を意識的に取り上げることにした。生理的条件において、小胞体、リソソームをはじめとして多種の細胞小器官が選択的オートファジーを受けることが知られている。なかでもミトコンドリア分解(マイトファジー)は最も研究が進んでいる分野である。ミトコンドリアはエネルギー産生とともに、細胞死の制御に関わるなど重要な機能を担っている。ミトコンドリアは疾患や老化によって徐々に機能が低下する。このような機能不全ミトコンドリアは、活性酸素を産生して周囲の生体分子の損傷につながる。マイトファジーの活動が低下すると老化や疾患をさらに加速することになる。

機能不全ミトコンドリアは一般的に断片化していることが知られている。上述したようにオートファゴソームの直径は約 $1\mu\text{m}$ 程度であるので、AUTACによって、この小さく断片化したミトコンドリアを優先し

て分解することができると予想された。2019年の論文発表では、ダウン症由来の線維芽細胞を用いた。ダウン症細胞ではミトコンドリアの断片化が報告されていたからである(2017年)。AUTAC4分子で細胞を3日間処理したところ、マイトファジーの促進が観察された。ミトコンドリア断片化の解消、膜電位の回復、ATP産生量の増加が合わせて確認された。本研究開発では、ダウン症以外のヒト疾患由来細胞を用いた研究も実施した。同様の細胞機能改善効果が見られており、学術論文の取りまとめを進めている。

AUTACの作用機序は、本研究開発後半の主な研究課題となった。マクロオートファジーでは100をこえるタンパク質が協働して働くため、どのタンパク質に対してAUTACが働きかけているのか興味を持たれた。このグアニル化タンパク質認識機構をケミカルバイオロジー的手法で解析した。得られた分子機構を応用して、より優れたAUTAC分解タグの合理的設計が可能になると期待される。

本研究開発では、AUTAC技術の確立を目指し、培養細胞など*in vitro*での検討を中心に行なった。これは定められた研究期間とリソースのなかで技術を確立するために避けがたいことであった。研究期間全体を通じて、国内外の多数の製薬企業と活発な意見交換を行なったところ、非常に強い関心があるというレスポンスを得ることができた。一方で、*in vivo*実験におけるデータが欲しいという声も複数寄せられた。そこで、当初計画を一部変更して、頒布できる量のAUTAC化合物サンプルを調製することにした。大量合成法の検討を進め、研究期間内に10グラムをこえる供試サンプルを用意することができた。このサンプルを活用して産業界等における*in vivo*評価を行なっていく予定である。

以上のように、本研究開発においては産業界との意見交換を行いながら、世界初となるオートファジー基盤のデグレーダー技術AUTACを確立し、国際的に高い評価を得ることができた。創薬は学術的な研究だけで進められるものではなく、化合物の物性改善など泥臭い地道な作業が多く必要である。今回の本事業の支援を受けることによって、誘導体の迅速スクリーニングやミトコンドリア機能の詳細解析の基盤が初めて確立された。デグレーダー研究を主に産業界が牽引している現状を踏まえれば、今後はAUTACについても産業界との連携が重要になると考えられ、本事業で合成したAUTAC供試サンプルは連携の強力なツールとなるだろう。

Degrader technology is a new modality that has attracted much interest in the field of drug discovery, and is an innovative method that utilizes medium-sized molecular compounds. PROTAC is a typical example of this type of molecule.

Degraders reduce the levels of disease-causing proteins in cells, similar to knockdown techniques such as RNAi, which are routinely used in basic medical research. Therefore, it enables direct drug development for drug targets that have been proven to be effective in basic research. Some PROTACs are currently undergoing clinical trials. Good results have been reported so far, and interest in Degrader is expected to further increase.

At the beginning of this research and development, all of the existing degraders were based on a degradation mechanism based on the ubiquitin-proteasome system. The proteasome is a protein complex with a cylindrical cavity inside, and it is necessary for a protein to be sterically small, such as a soluble protein, in order to be incorporated into this cavity. Protein aggregates and cellular organelles are not proteasomally degraded as they are, and biopolymers other than proteins (e.g., nucleic acids) are not substrates. Autophagy is mainly responsible for the degradation of substrates that are not subject to proteasomal degradation. In macroautophagy, which is the main mechanism, a sequestered membrane generated in the cytoplasm envelops the surrounding materials and sequesters them in autophagosomes, which are then degraded through fusion with lysosomes. Since autophagosomes have a diameter of about 1 μm , they can take in sterically large substrates such as mitochondria and other cellular organelles. Lysosomes can also be responsible for the hydrolysis of biopolymers other than proteins.

If we can utilize autophagy, which is complementary to the ubiquitin-proteasome system, in the design of degraders, it will be a completely unique technology. The principal investigator previously worked on small molecules that control selectivity in selective autophagy. In this study, we worked on the development of a degrader based on the results of these studies. AUTAC technology (2019), which was published in a paper during this research period, has attracted much attention as the world's first autophagy-based degrader. For example, Altmetrics, an index reflecting social interest, is 141 (as of May 2021), and FWCI, a measure of the number of citations in a research field, has a score of 7.33 (as of May 2021); the FWCI result means that a paper is cited 733% more often than the average paper in a research field, which is the top 2% in the database Scopus. The following is a description of the main results of this research and development.

In order to develop a proteolytic agent (degrader), it is important to bring the disease-relating substances to close proximity to the intracellular degradation system. For example, PROTACs are chimeric medium molecules consisting of a "targeting ligand" that binds to disease-causing substances and a "degradation tag" that binds to ubiquitin ligases. The autophagy-based degrader (AUTAC) can be basically designed in the same way. In 2013, we examined the autophagic elimination of group A Streptococcus bacteria and found that cGMP modification (S-guanylation) accumulated around the bacteria (Ito, Saito et al. *Molecular Cell*, 2013). The starting point of this development was the realization that cGMP modification of proteins is the key to recruiting the autophagy system to the bacterial periphery. Chimeric molecules were synthesized by combining various targeting ligands with guanine derivatives (degradation tags) and established as AUTAC technology.

In the AUTAC publication in 2019, the first generation degradation tag (FBnG) (effective at concentrations above 10 μM) was used. In the 2019 AUTAC paper, we used the first generation degradation tag (FBnG) (effective at concentrations above 10 μM). We improved the efficiency of compound screening by installing a fluorescence microscopy that enables simultaneous observation of multiple samples, and eventually created various next-generation AUTACs that are 100 times more active than FBnG tags *in vitro*.

In the field of degrader development, pharmaceutical companies all over the world are working hard on the development of protein degraders. In this study, we consciously focused on the degradation of cell organelles. Under physiological conditions, various cell organelles including endoplasmic reticulum and lysosomes are known to undergo selective autophagy. Among them, mitochondrial degradation (mitophagy) is the most studied field. Mitochondria play an important role in energy production as well as in the regulation of cell death. Mitochondria gradually lose their function due to disease and aging. These dysfunctional mitochondria produce reactive oxygen species, leading to damage of the surrounding biomolecules. Decreased mitophagy activity can further accelerate aging and disease.

Dysfunctional mitochondria are generally fragmented. As mentioned above, the diameter of autophagosomes is about 1 μm , so it was expected that AUTAC could preferentially degrade these small and fragmented mitochondria. 2019 publication used fibroblasts derived from Down syndrome. In our 2019 publication, we used fibroblasts derived from Down syndrome, because mitochondrial

fragmentation had been reported in Down syndrome cells (2017). When cells were treated with AUTAC4 molecules for 3 days, we observed enhanced mitophagy. Eliminating mitochondrial fragmentation, restoring membrane potential, and increasing ATP production were also observed. In this research, we also conducted a study using cells derived from human diseases other than Down syndrome. The similar improvement in cell function was observed, and the results are being prepared for publication.

The mechanism of action of AUTAC was the main research topic in the latter half of this R&D. Since more than 100 proteins work together in macroautophagy, we are interested in which proteins AUTAC acts on. We analyzed the recognition mechanism of guanylated proteins by chemical biology methods. It is expected that the obtained molecular mechanism can be applied to the rational design of better AUTAC degradation tags.

In this research and development, we mainly conducted in vitro studies such as cultured cells in order to establish AUTAC technology. This was unavoidable in order to establish the technology within the specified research period and resources. Throughout the entire research period, we actively exchanged opinions with many pharmaceutical companies both in Japan and overseas, and we received responses that indicated a very strong interest. On the other hand, we also received several requests for data from in vivo experiments. Therefore, we decided to change the original plan and prepare a large amount of AUTAC compound samples for distribution. We proceeded with the investigation of the large-scale synthesis and were able to prepare more than 10 grams of test AUTAC samples within the period of the research. We plan to use these samples to conduct in vivo evaluations in industry and other fields.

As described above, we have established the world's first autophagy-based degrader technology, AUTAC, while exchanging opinions with industry, and it has been highly recognized internationally. Drug discovery is not something that can be advanced solely in an academic group, but requires a lot of laborious work such as improving the physical properties of compounds. With the support of this project, the foundation for rapid screening of derivatives and detailed analysis of mitochondrial functions has been established for the first time. The AUTAC sample synthesized in this project will be a powerful tool for the collaboration with the industry.