

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「がん関連遺伝子産物の転写後発現調節を標的とした治療法の開発」
(プロテインノックダウン法によるがん関連遺伝子産物の分解)
2. 研究開発代表者： 学校法人昭和薬科大学 薬学部 教授 伊東進
3. 研究開発の成果

本研究課題では、下記①から⑤の項目について研究を実施、以下の通りの成果を得た。

① SNIPER (YAP) の合成と活性評価

理化学研究所ケミカルバイオロジー研究グループの支援を受け、YAP に結合する低分子化合物のスクリーニングを行った結果、4 種類 (化合物 A~D) が YAP と実際結合した。同時に YAP によって誘導されるルシフェラーゼレポーターを用いて、化合物 D が既知 YAP 阻害剤である Verteporfin に比較して 50-100 倍低濃度で活性を阻害した。

② Smad に結合するリガンド探索

①と同様に、Smad3 及び Smad4 に結合する低分子化合物のスクリーニングを行った結果、Smad3 に結合する化合物を 3 種類 (化合物 E~G)、Smad4 に結合する化合物を 6 種類 (化合物 H~I) 見つけた。

③ SNIPER (ER) の in vivo POC の取得

培養細胞を用いた実験において、これまでより 10 分の 1 以下の濃度で活性を示す改良型 SNIPER(ER)をマウスに腹腔内投与したところ、マウス卵巣におけるエストロゲン受容体の発現量減少が確認された。またヌードマウスにヒト乳がん MCF-7 細胞を移植した Xenograft モデルにおいても、改良型 SNIPER(ER)の投与によって、乳がん細胞内のエストロゲン受容体の減少を確認した。

④ 細胞内局在をコントロールした標的タンパク質での SNIPER 活性評価

SNIPER(CRABP)による細胞内局在シグナルを付加された CRABP2 タンパク質の分解を調べ、SNIPER(CRABP)-4 は、細胞質、核、細胞膜近傍の CRABP2 タンパク質を分解できるが、ミトコンドリアに局在する CRABP2 タンパク質を分解できなかった。一方、SNIPER(CRABP)-11 はミトコンドリアを含め解析した全ての細胞で CRABP2 タンパク質を分解できた。これら CRABP2 タンパク質の分解機構を解析した結果、いずれもプロテアソームによる分解である事がわかった。しかし、ユビキチン化を触媒するリガーゼは CRABP2 タンパク質の局在部位によって異なった。

⑤ 他のがん関連遺伝子産物を標的とする SNIPER 開発

インシリコ解析により見出した、Ras タンパク質表面のくぼみに結合する可能性のあるリガンド候補化合物と Ras との結合活性を SPR 法によって検証した。その結果、一次スクリーニングで約 30 化合物が Ras と結合し、さらにこれらの化合物について用量依存性等を検討し、6 化合物を新規 Ras リガンドとして選別した。イマチニブ等の ABL チロシンキナーゼ阻害剤を導入した SNIPER(ABL)を各種合成し、それらのプロテインノックダウン活性を評価した。その結果、これらの SNIPER(ABL)が BCR-ABL タンパク質を減少させた。