

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金 (次世代がん医療創生研究事業) 成果報告書

### I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 補助事業課題名： (日本語) プロテインノックダウン法の特性を活かした新しいがん分子標的薬の開発  
(英語) Development of new molecular target drug with application of protein knockdown technology
- 補助事業担当者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部 室長 大岡伸通  
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Health Sciences, Section Chief of the Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, Nobumichi Ohoka
- 実施期間： 平成28年9月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) プロテインノックダウン法の開発と各種 SNIPER 化合物の開発  
分担課題名： (英語) Development of protein knockdown technology and SNIPER compounds
- 補助事業担当者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部 室長 大岡伸通  
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Health Sciences, Section Chief of the Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, Nobumichi Ohoka
- 分担研究 (日本語) SNIPER 化合物の設計と合成  
分担課題名： (英語) Design and synthesis of SNIPER compounds
- 補助事業分担者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 部長 出水庸介  
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Health Sciences, Head of the Division of Organic Chemistry, Yosuke Demizu

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 和文

私達は細胞内の標的としたタンパク質に IAP ユビキチンリガーゼを選択的にリクルートして分解するハイブリッド化合物 SNIPER の開発研究を行っており、最近開発した ER $\alpha$  を標的とする SNIPER は、培養細胞において低濃度で ER $\alpha$  を効果的に分解し、マウス *in vivo* においてもノックダウン活性を示すことを明らかにしている。本研究では、以下に示す新しい SNIPER の開発を検討した。

#### 1. キナーゼ阻害剤耐性 BCR-ABL を標的とした SNIPER(ABL)の開発

がんの治療においてイマチニブやクリゾチニブなどのキナーゼ阻害剤が著しい治療効果を発揮している。一方で、キナーゼドメインの変異等による耐性がんの出現が大きな問題となっている。キナーゼ阻害剤耐性変異タンパク質を分解する SNIPER を開発するために、(1) アロステリック阻害剤を標的リガンドに利用した SNIPER の開発及び、(2) キナーゼドメインとは別のドメインに結合する新規リガンドの探索を検討した。(1) BCR-ABL に対するアロステリック阻害剤を利用して SNIPER(ABL) を合成した。K562 等の培養細胞において、まず野生型 BCR-ABL に対するノックダウン活性を評価し、ノックダウン活性を示すことを明らかにした。(2) BCR-ABL の SH2 ドメイン、SH3 ドメイン、oligo ドメインのリコンビナントタンパク質を調整し、これらタンパク質に結合するリガンドを理化学研究所の化合物アレイを利用して探索し、ヒット化合物として 44 化合物を得た。

#### 2. Ras を標的とした SNIPER(Ras)の開発

がんの生存に重要であるが、酵素活性もしくは適切なポケットがないことから阻害剤の開発が困難なタンパク質 (undruggable タンパク質) が多数存在する。Undruggable タンパク質である Ras に対する SNIPER を開発するために、K-Ras (G12C) 変異体の Cys 残基に共有結合する阻害剤を組み込んだ SNIPER(Ras) を合成し、そのプロテインノックダウン活性を K-Ras (G12C) 変異型がん細胞 (UM-UC-3、MIA-Paca-2 等) で調べたが、残念ながらノックダウン活性は見られなかった。一方で、構造情報を基にしたインシリコスクリーニングで、Ras タンパク質表面の溝に結合する候補化合物を約 300 個見出している。樹立した SPR アッセイ法によりインシリコスクリーニングで見つかった候補化合物と Ras タンパク質が実際に結合するか確認し、結合の強い化合物を 6 種選定した。

#### 3. BET ファミリーを標的とした SNIPER(BRD)の開発

有望な阻害剤を標的リガンドとして導入することにより効果的な抗がん活性を示す SNIPER を開発することを目的として、BET 阻害剤を組み込んだ SNIPER(BRD) をデザインし合成した。各種がん細胞株で BET ファミリータンパク質に対する SNIPER(BRD) のプロテインノックダウン活性を評価し、この SNIPER が BET ファミリータンパク質の中で BRD4 に対して選択的にノックダウン活性を示すことを明らかにした。

### 英文

Selective degradation of oncogenic proteins via small molecules is a novel approach that may have utility in anticancer drug development. We have developed hybrid small-molecule SNIPERs that recruit IAP ubiquitin ligases to specifically degrade targeted proteins in cells. Additionally, we recently developed a SNIPER against ER $\alpha$  that has a potent and an *in vivo* protein knockdown activity. In this study, we develop new SNIPER compounds as shown below.

#### 1. Development of SNIPER(ABL) targeting to kinase inhibitor-resistant BCR-ABL

Inhibitors of oncogenic kinases, such as imatinib and crizotinib, have demonstrated a promising therapeutic effect in cancer therapy. However, many patients who receive kinase inhibitors eventually develop a resistance to them, which is commonly attributable to point mutations in the kinase domain of target protein. To develop

SNIPERs that can degrade the mutant proteins resistant to kinase inhibitors, we tried to (1) utilize allosteric inhibitors as a target ligand of SNIPER and (2) identify novel ligands that bind to regions except for the kinase domain. (1) We designed and synthesized SNIPERs against BCR-ABL, SNIPER(ABL)s, with the allosteric inhibitors. By evaluating the knockdown activities, we first found that one of the SNIPER(ABL)s effectively degrade wild type of BCR-ABL in K562 cells etc. (2) We identified 44 hit compounds by a chemical array screening against the SH2 domain, SH3 domain and oligo domain of BCR-ABL.

## 2. Development of SNIPER(Ras) targeting to Ras

There are many oncogenic proteins (undruggable proteins) without enzymatic activity or appropriate pockets, which are not applicable to development of inhibitors. To develop SNIPERs that degrade an undruggable protein Ras, we designed and synthesized SNIPER(Ras) with a covalent inhibitor to the cysteine residue of K-Ras (G12C) and evaluated its knockdown activity using cancer cells with K-Ras(G12C) mutant cancer cells, UM-UC-3 and MIA-Paca-2. However, the SNIPER(Ras) did not degrade K-Ras(G12C) mutant protein in these cells. On the other hand, we have identified about 300 candidate compounds that bind to the pocket in surface of Ras protein by in silicon screening based on the structure information. Among the compounds, we selected 6 compounds that have high binding affinities by our established SPR assay.

## 3. Development of SNIPER(BRD) targeting to BET family

To develop SNIPER with effective anticancer activity by introducing promising inhibitors as a target ligand, we designed and synthesized SNIPER(BRD) with a BET inhibitor and evaluated its knockdown activity using various cancer cell lines. As a result, we revealed that SNIPER(BRD) specifically degrades BRD4 among the BET family proteins.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Ohoka N, Nagai K, Shibata N, Hattori T, Nara H, Cho N, Naito M. SNIPER(TACC3) induces cytoplasmic vacuolization and sensitizes cancer cells to Bortezomib. *Cancer Sci.* 2017, in press. doi: 10.1111/cas.13198.
2. 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, Naito M. *In Vivo* Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs). *J Biol Chem.* 2017, 292(11):4556-4570.
3. Demizu Y, Shibata N, Hattori T, Ohoka N, Motoi H, Misawa T, Shoda T, Naito M, Kurihara M. Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016, 26(20):4865-4869.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 分子標的薬オフターゲット効果の新しい評価法開発, ポスター, 大岡伸通, 鈴木孝昌, 橋井則貴, 出水庸介, 栗原正明, 石井明子, 内藤幹彦, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/26, 国内.

2. 低分子化合物 SNIPER による細胞内ユビキチン化機構の制御と創薬への応用, ポスター, 大岡伸通, 奥平桂一郎, 永井克典, 伊東昌宏, 柴田識人, 服部隆行, 宇治川治, 佐野修, 小山亮吉, 今枝泰宏, 奈良洋, 長展生, 内藤幹彦, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内.
3. 低分子化合物 SNIPER による *in vivo* プロテインノックダウンと抗腫瘍活性評価, ポスター, 大岡伸通, 柴田識人, 服部隆行, 内藤幹彦, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
4. 発がん因子 BCR-ABL を分解する低分子化合物の開発, ポスター, 柴田識人, 大岡伸通, 服部隆行, 内藤幹彦, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

(4) 特許出願

特になし