

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) がん特異的融合タンパク質の安定化機構を標的とした新規抗がん薬の開発
(英語) Development of novel anti-tumor drugs targeting the stability of oncogenic fusion proteins
- 補助事業担当者
所属 役職 氏名 : (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部第三室 主任研究官 柴田識人
(英語) Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, Section 3,
National Institute of Health Sciences,
Senior Researcher,
Norihito Shibata
- 実施期間 : 平成 28 年 9 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

慢性骨髄性白血病の原因となる BCR-ABL のように、がんを引き起こすような、異なるタンパク質が融合した融合タンパク質は、これまで主に白血病で報告されてきた。しかし近年、非小細胞肺癌で見つかった EML4-ALK のように、固形がんにもがん化の原因となる融合タンパク質が多数存在する事が明らかとなり、がん特異的融合タンパク質はがん治療薬開発の新たな創薬標的として注目されている。

中でも、キナーゼ活性の亢進ががん化の原因である BCR-ABL や EML4-ALK には、各タイプチニブやクリゾチニブといった選択的なキナーゼ阻害剤が既に開発され、臨床現場で優れた抗がん活性を示している。しかし長期治療の過程で、キナーゼ部位が変異して阻害剤に耐性となるがんが出現する事があり、これが大きな問題となっている。従って新たな作用機序を持つ医薬品の開発が望まれている。

この問題を解決するため、私は BCR-ABL や EML4-ALK といった融合タンパク質の性質を検討した。その結果、がん細胞内ではこれらの融合タンパク質が安定に発現する分子機構を持っている事を見出した。さらに検討を進めた結果、BCR-ABL の発現安定化に寄与するタンパク質 X を同定した。タンパク質 X はある酵素活性を持っているが、この酵素活性のない変異型タンパク質 X は BCR-ABL の発現を安定化できなかったことから、タンパク質 X を阻害する薬剤は BCR-ABL を分解し、慢性骨髄性白血病を治療できると考えられる。またタンパク質 X はその酵素活性を共有する複数のタンパク質とファミリーを形成していることから、他のがん特異的融合タンパク質もこの一群のタンパク質ファミリーに属するタンパク質による安定化機構を持っている可能性が推測される。本事業では、下記3点について研究を行った。

(1) BCR-ABL

タンパク質 X に対する阻害剤を探索するため、まずタンパク質 X の酵素活性を測定するアッセイ系を構築した。次に FDA で承認された既存薬ライブラリーを入手し、これらを利用して、このタンパク質 X の酵素活性を阻害する化合物を複数見出した。BCR-ABL を発現する培養細胞にこれらヒット化合物を作用させたところ、細胞レベルにおいても BCR-ABL の発現を低下させる候補化合物を見出した。

(2) EML4-ALK

タンパク質 X が属するファミリータンパク質に対する RNAi ライブラリーを入手し、EML4-ALK 発現細胞にこれら RNAi を作用させたところ、EML4-ALK のタンパク質発現を低下させるタンパク質 Y 候補タンパク質を複数見出した。

(3) 他のがん特異的融合タンパク質

BCR-ABL や EML4-ALK 以外にも同様な安定化機構を持つものがないか検討した。これまでに論文などで報告のあった複数の他のがん特異的融合タンパク質に対して、特異的抗体及び発現細胞を入手し、融合タンパク質の検出系を構築した。タンパク質 X が属するファミリータンパク質群の酵素活性を非特異的に阻害する化合物が市販されているので、この阻害剤を入手し、これらががん特異的融合タンパク質の発現に対する影響を検討したが、発現が低下するようものは見られなかった。

英文

Chromosomal translocation occurs in some cancer cells, which results in the expression of aberrant oncogenic fusion proteins that include BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia (CML). These oncogenic fusion proteins were mainly reported in haematological malignancies, and rare bone and soft-tissue tumors. However, the oncogenic fusion proteins have recently been found in common solid tumors, such as EML4-ALK in non-small-cell lung cancer (NSCLC). Therefore, they are attractive targets for development of novel anti-tumor drug.

BCR-ABL and EML4-ALK have a constitutively active protein tyrosine kinase, leading to tumors. Several small molecule selective tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as imatinib and crizotinib have been developed for CML and NSCLC treatment. The TKIs exhibit remarkable therapeutic effects, though emergence of drug resistance hampers the therapy during long-term treatment. Therefore, novel drug candidates with different mechanisms of action are required.

To solve the problem, I investigated the molecular events that underlie the pathogenesis in BCR-ABL or EML4-ALK expressing cells, and found that BCR-ABL and EML4-ALK are escaped from protein degradation in the cells. I also identified protein X that associates with the protein stability of BCR-ABL. The protein X is an enzyme. The enzyme-inactivated mutant protein X lost to stabilize BCR-ABL, suggesting that an inhibitor for protein X could induce to degrade BCR-ABL protein and be a potential therapy for CML. Since protein X belongs to a protein family that shares same enzymatic activity, another oncogenic fusion protein might be escaped from protein degradation by same mechanism. In the study, I found the followings:

(1) BCR-ABL

To search an inhibitor for protein X, we developed an in vitro assay that measures the enzymatic activity of protein X. Then I obtained FDA-approved drug library, and found several drugs can inhibit the enzymatic activity of protein X. A BCR-ABL expressing CML cell was treated with the drugs, and some of the candidate drugs reduced BCR-ABL expression in the CML cell.

(2) EML4-ALK

I obtained RNAi library for the protein family. The RNAi library was transfected in an EML4-ALK expressing NSCLC cell, and knockdown of some proteins reduced EML4-ALK protein expression, suggesting that such proteins would be candidate protein that is responsible for the protein stability of EML4-ALK.

(3) Other oncogenic fusion proteins

To investigate whether other oncogenic fusion proteins are escape from the protein degradation by same mechanism, I selected some oncogenic fusion proteins that have already reported. I obtained a selective antibody and culture cell for the fusion protein in order to detect the expression of the fusion protein. I also obtained a non-selective inhibitor for the enzymatic activity of the protein family. Unfortunately, the inhibitor did not alter the protein expression of the oncogenic fusion 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 0 件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

第2回 AMED がん若手研究者ワークショップ「がん特異的融合タンパク質の安定化機構の解明」、
ポスター発表、柴田識人、内藤幹彦、東京、2016年11月29日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし