

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07311

研究課題名(和文) がん特異的融合キナーゼタンパク質の安定化機構の解明とこれを標的とした治療薬開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-tumor drugs targeting the stability of oncogenic fusion kinase proteins

研究代表者

柴田 識人 (Shibata, Norihito)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・室長

研究者番号：30391973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、様々ながんで融合タンパク質が報告されており、一部はがん化に関与している。本研究ではこうしたがん特異的融合タンパク質の少なくとも一部が脱ユビキチン化によってがん細胞内で安定に発現できること、がん特異的融合キナーゼタンパク質であるBCR-ABLの安定発現に脱ユビキチン化酵素USP25が関わること、さらにUSP25の発現抑制または薬物による酵素活性阻害によりBCR-ABLタンパク質発現の低下やBCR-ABL依存的ながん細胞の増殖を抑制させることを明らかにした。以上の結果より脱ユビキチン化酵素ががん特異的融合タンパク質に起因するがんの有望な創薬標的になり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脱ユビキチン化酵素ががん特異的融合タンパク質を安定化している可能性を提起した。これはがん細胞ではその増殖に必要なタンパク質を安定発現させる機構が存在していることを明らかにした点で学術的な意義が大きい。また脱ユビキチン化酵素ががん特異的融合タンパク質の創薬標的になり得ることを示したことから、標的タンパク質自体の酵素活性阻害ではなく分解を誘導する医薬品開発の可能性を提示することになり、他の様々な標的タンパク質に対する分子標的治療薬の開発にも適用できる波及効果の高い創薬コンセプトであると言える。

研究成果の概要(英文)：Recently, fusion genes resulting from chromosomal rearrangements are found in a variety of tumor cells. Some of the products of such fusion genes are known to be driver oncogenic fusion proteins. In this study, we found that at least some of these oncogenic fusion proteins can be stably expressed in tumor cells by deubiquitylation. We also found that the deubiquitylating enzyme USP25 is involved in the stable expression of BCR-ABL, an oncogenic fusion kinase protein. In addition, it has been shown that deletion of USP25 expression or pharmacological inhibition of its activity leads to a decrease in BCR-ABL protein expression and suppression of the proliferation of BCR-ABL-positive cells. These results indicate that deubiquitylating enzyme would be a promising therapeutic target for the tumor caused by the oncogenic fusion proteins.

研究分野：生化学

キーワード：脱ユビキチン化酵素 がん特異的融合タンパク質 タンパク質分解

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、異なるタンパク質が融合した融合タンパク質によるがん化は、白血病のみならず様々な固形がんでも明らかとなり、広く様々ながんで見られることが分かってきた。本研究開始時点で約300種類のがん特異的融合タンパク質が報告されている。これらの融合タンパク質が全てがん化を引き起こすかは不明であるが、このうち約1/3はABL, ALK, RETなどのキナーゼタンパク質を融合パートナーとしたがん特異的融合キナーゼタンパク質であり、そのキナーゼ活性が亢進し、がん化に繋がっている可能性がある。それゆえ、このキナーゼ活性阻害を標的とした医薬品開発が盛んに行われてきた。これまでに、イマチニブ、クリゾチニブ、バンデタニブといった、がん特異的融合キナーゼタンパク質のキナーゼ活性を選択的に阻害する分子標的治療薬が数多く開発され、臨床で優れた治療効果を示している。こうした背景のもと、がんの原因となるがん特異的融合タンパク質の有無を調べ、発見された融合タンパク質に合わせてその阻害剤を投与する、がんの個別化医療が今後主流になっていくことが想定される。しかしキナーゼ阻害剤による治療を長期間にわたり続けていると、キナーゼ部位の変異等により、阻害剤に耐性を持つようながんが出現することがあり、これが大きな問題となっている。従って、がん特異的融合キナーゼタンパク質自体が持つキナーゼ活性を阻害するのではなく、新しい作用機序を持つ医薬品を開発することが望まれている。

タンパク質の発現量は生合成と分解のバランスによって決まるが、がん特異的融合キナーゼタンパク質の生合成を抑制する、あるいは分解を促進することができれば、上記のキナーゼ阻害剤と同様な治療効果を期待できる。生合成はRNA干渉やアンチセンス核酸によって抑制することができ、これを利用したタンパク質の生合成抑制は培養細胞レベルでは既に確立された技術となっている。しかし核酸はそのままでは細胞への透過性が悪いこと、全身投与ではほとんどが肝臓に取り込まれてしまう等の問題があり、医薬品として開発するためにはDrug Delivery System技術の進歩が必要であると考えられている。一方でタンパク質の分解については、がん細胞において分子シャペロンHSP90による安定化機構を阻害することが有効であるという報告もあるが、標的タンパク質に対する特異性に乏しいため、医薬品としては副作用が懸念される。従って標的タンパク質のタンパク質発現量を調節するに対する特異性の高い薬剤の開発が望まれてきた。

がん特異的融合キナーゼタンパク質のような異常なタンパク質は、タンパク質の品質管理機構によるユビキチン/プロテアソーム系を介した分解制御を受ける可能性が高く、正常細胞では安定には発現できないものが多いと考えられる。しかしがん細胞では、増殖に必要な異常タンパク質を安定に発現するために、何らかの機構を獲得していることが予想される。本研究を開始するにあたり、この安定化機構について独自に検討し、がん特異的融合キナーゼタンパク質であるBCR-ABL、EML4-ALK、CCDC6-RETといったがん特異的融合タンパク質が脱ユビキチン化酵素(DUB)によって安定化されている可能性を見出していた。すなわち、タンパク質品質管理機構によって付加されたポリユビキチン鎖をDUBが外すことで、がん特異的融合キナーゼタンパク質は分解を免れていると考えられた。従って、このDUBががん特異的融合キナーゼタンパク質に対する有望な創薬標的になる可能性があった。なおキナーゼ活性を持たないがん特異的融合タンパク質についてもDUBによる安定化機構の可能性およびその創薬標的としての可能性が十分に想定させる。キナーゼ活性を持たないがん特異的融合タンパク質は創薬標的とすべき酵素活性が見出せないの、従来の創薬研究ではなかなか開発対象にしにくいという課題があったが、上述したDUBを標的として創薬コンセプトは現状の課題を打破する可能性を秘めている。

2. 研究の目的

細胞には約100種類のDUBが存在するが、各がん特異的融合タンパク質の安定化に寄与する責任DUBを同定し、このDUB活性を阻害する事ができれば、これらの融合タンパク質の分解を促し、これをdriver oncoproteinとするがん細胞を特異的かつ効果的に増殖抑制することができると期待される。本研究では、

- (1) 脱ユビキチン化によって安定化されるがん特異的融合タンパク質の探索
- (2) がん特異的融合タンパク質を安定化させる責任DUBの同定
- (3) 責任DUBに対する阻害剤の開発とその効果の検討

これら課題を検討することで、がん特異的融合タンパク質の安定化機構を阻害するという創薬コンセプトを確立し、実際にDUBを標的としたがん特異的融合タンパク質分解促進薬を開発することが目的である。

3. 研究の方法

上記研究目的で挙げた各検討課題について、以下の方法にて実行した。

- (1) 脱ユビキチン化によって安定化されるがん特異的融合タンパク質の探索

内在的ながん特異的融合タンパク質を発現している培養細胞とウェスタンブロット法で検出可能な抗体が入手できるものとして、キナーゼ融合タイプではBCR-ABL, EML4-ALK, CCDC6-RET, SLC34A2-ROS, FGFR3-TACC3を、また非キナーゼ融合タイプではSS18-SSX1, EWS-

FLI1を研究対象とした。具体的には各培養細胞に非特異的脱コピキチン化酵素阻害剤であるPR619を作用させ、がん特異的融合タンパク質のタンパク質発現量への影響をウェスタンブロット法で検出した。

(2) がん特異的融合タンパク質を安定化させる責任DUBの同定

PR619処理でタンパク質発現量が低下したがん特異的融合タンパク質について、その発現培養細胞にDUBのsiRNAライブラリーを用いて、各DUBの発現量をノックダウンさせた。その際に対象となるがん特異的融合タンパク質の発現量をウェスタンブロット法で検討し、タンパク質発現量を低下させるような責任DUBを探索した。候補となる責任DUBについては、さらに複数のsiRNAを用いて対象となるがん特異的融合タンパク質への影響を検証した。

(3) 責任DUBに対する阻害剤の開発とその効果の検討

責任DUBが判明したがん特異的融合タンパク質について、まずそのDUBを阻害させることで対象となるがん特異的融合タンパク質が発現する培養細胞の細胞増殖への影響を検討し、阻害剤開発の意義を検証した。意義が確定したDUBについて、その阻害剤による効果を検討した。まずは文献情報などからそのDUBに対する阻害剤に関する報告を収集し、特異性の高い阻害剤については入手し、がん特異的融合タンパク質の発現量に対する効果を検討した。またそのDUBの酵素活性を測定するアッセイ系を構築し、この系を利用することで、公的機関で公開されている化合物ライブラリーの中からこのDUBの酵素活性を阻害する薬剤のスクリーニングを実施した。

4. 研究成果

(1) 脱コピキチン化によって安定化されるがん特異的融合タンパク質の探索

研究対象としたがん特異的融合タンパク質のうち、BCR-ABL, EML4-ALK, CCDC6-RET, SLC34A2-ROS, SS18-SSX1, EWS-FLI1については、PR619の濃度依存的にタンパク質発現量が低下した。すなわち、これらががん特異的融合タンパク質は脱コピキチン化によってタンパク質が安定化している可能性が示唆された。

(2) がん特異的融合タンパク質を安定化させる責任DUBの同定

DUBに対するsiRNAライブラリーを利用したスクリーニングを実施した結果、USP25という脱コピキチン化酵素をK562細胞にてノックダウンすると、内在的に発現しているBCR-ABLのタンパク質発現量が低下した。さらにUSP25に対する複数のsiRNAによる検証、およびBCR-ABLを内在的に発現する複数の培養細胞(KU812, SK-9細胞)におけるsiRNAによるUSP25のノックダウン実験を行ったが、いずれにおいてもBCR-ABLのタンパク質発現量は低下した。またUSP25に構造的に相同性の高いUSP28, USP37についてsiRNAによるノックダウンを行なったがBCR-ABLのタンパク質発現量に影響を与えなかったことから、本現象はUSP25に特異性の高いものであると考えられた。なおsiRNAによりUSP25をノックダウンさせてもBCR-ABLのmRNA量には影響を与えないこと、さらに融合元であるBCRおよびABLのタンパク質発現には影響を与えなかったことから、USP25はBCR-ABLという融合タンパク質を特異的に標的の候補とすると考えられた。さらにsiRNAによりUSP25をノックダウンさせた細胞に、そのsiRNAに耐性のある野生型のUSP25を一過性に強制発現させると、BCR-ABLタンパク質の発現量の低下が回復した。なおこの際にUSP25の酵素活性を欠失させた変異体(C178S)を一過性に強制発現させた場合には、BCR-ABLタンパク質の発現量の低下が回復しなかった。最後にコピキチン化されたBCR-ABLを解析したところ、siRNAによりUSP25をノックダウンさせることで、コピキチン化されたBCR-ABLが増加することが分かった。以上の結果から、USP25がBCR-ABLの安定化に寄与する責任DUBであると結論づけた。

(3) 責任DUBに対する阻害剤の開発と効果を検討

BCR-ABLを内在的に発現する培養細胞(K562, KU812, SK-9細胞)においてsiRNAによるUSP25のノックダウン実験を行うと、各培養細胞の細胞増殖が低下することが分かった。またsiRNAによりUSP25をノックダウンさせた細胞でUSP25の回復実験を行うと、野生型のUSP25であれば細胞増殖は回復したが、酵素活性を欠失させた変異体のUSP25であれば細胞増殖は回復しなかった。以上よりUSP25の酵素活性阻害はBCR-ABL依存的に増殖するがん細胞の増殖抑制に効果的であると考えられ、USP25に対する阻害剤を開発する意義が示された。

次にUSP25に対する阻害剤について情報を収集したところ、USP25とUSP28に特異的な阻害剤としてAZ-1, AZ-2が報告されていた(*ACS Chem. Biol.* 2017;12:3113-3125)。そこでこれら化合物のBCR-ABLに対する効果を調べるべくBCR-ABLを内在的に発現する培養細胞(K562, KU812, SK-9細胞)に作用させてところ、想定通り、いずれの培養細胞でもBCR-ABLのタンパク質レベルでの安定性を低下させる効果を見出した。

さらにUSP25に特異的な阻害剤を開発する目的で、USP25の酵素活性を簡便に測定するアッセイ系を構築し、この系を利用することで、公的機関で公開されている化合物ライブラリーの中からUSP25の酵素活性を阻害する薬剤のスクリーニングを実施した。その結果、化学療法剤として知られている既知薬剤がUSP25の酵素活性を阻害することが分かった。K562細胞に作用

させると BCR-ABL のタンパク質レベルの低下が確認された。

(4) 本研究成果の総括と今後の展望

これまでの研究により、がん細胞内にて driver oncoprotein として働くがん特異的融合タンパク質が脱ユビキチン化酵素によって安定化を受けていること、またその責任 DUB が有望な創薬標的になり得るという新たな創薬コンセプトを提示することができた。現状での問題点としては、以下の点が挙げられる。

BCR-ABL の責任 DUB が USP25 であることを示したのみで、他のがん特異的融合タンパク質では責任 DUB を提示できていない。

USP25 に阻害効果のある薬剤として、既報の AZ-1, AZ-2 および既知化学療法剤について BCR-ABL のタンパク質レベル低下作用を確認しているが、USP25 特異的ではないので、細胞増殖への効果を議論することができない。

従って、今後は他のがん特異的融合タンパク質のタンパク質発現量に影響を与える責任 DUB の同定や、より特異性の高い USP25 阻害剤の開発が必要である。こうした研究を通じて、「がん特異的融合タンパク質が脱ユビキチン化によりがん細胞内で安定に発現できること、およびそれゆえこの DUB が創薬標的になりえる」という新たな創薬コンセプトをより盤石なものにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Shibata Norihito, Cho Nobuo, Koyama Hiroo, Naito Mikiyoko | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Development of a degrader against oncogenic fusion protein FGFR3-TACC3 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 128584 ~ 128584 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128584 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yokoo Hidetomo, Shibata Norihito, Endo Akinori, Ito Takahito, Yanase Yuta, Murakami Yuki, Fujii Kiyonaga, Hamamura Kengo, Saeki Yasushi, Naito Mikiyoko, Aritake Kosuke, Demizu Yosuke | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Discovery of a Highly Potent and Selective Degradator Targeting Hematopoietic Prostaglandin D Synthase via In Silico Design | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry | 6. 最初と最後の頁 15868 ~ 15882 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c01206 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tsukumo Yoshinori, Tsuji Genichiro, Yokoo Hidetomo, Shibata Norihito, Ohoka Nobumichi, Demizu Yosuke, Naito Mikiyoko | 4. 巻 2365 |
| 2. 論文標題 Protocols for Synthesis of and the Methods to Evaluate the Anticancer Effects | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 331 ~ 347 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1665-9_18 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yokoo Hidetomo, Shibata Norihito, Naganuma Miyako, Murakami Yuki, Fujii Kiyonaga, Ito Takahito, Aritake Kosuke, Naito Mikiyoko, Demizu Yosuke | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Development of a Hematopoietic Prostaglandin D Synthase-Degradation Inducer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 236 ~ 241 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.0c00605 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 柴田識人, 内藤幹彦 | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 脱ユビキチン化酵素阻害によるプロテインノックダウン | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 実験医学 | 6. 最初と最後の頁 2337 ~ 2341 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Shibata Norihito, Ohoka Nobumichi, Tsuji Genichiro, Demizu Yosuke, Miyawaza Keiji, Ui-Tei Kumiko, Akiyama Tetsu, Naito Mikihiro | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Deubiquitylase USP25 prevents degradation of BCR-ABL protein and ensures proliferation of Ph-positive leukemia cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 3867 ~ 3878 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-1253-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Shibata Norihito, Ohoka Nobumichi, Hattori Takayuki, Naito Mikihiro. | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Development of a Potent Protein Degradator against Oncogenic BCR-ABL Protein | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 165 ~ 172 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00703 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴田識人, 横尾英知, 遠藤彬則, 伊藤貴仁, 柳瀬雄太, 村上優貴, 藤井清永, 近藤一成, 佐伯泰, 内藤幹彦, 有竹浩介, 出水 庸介 |
| 2. 発表標題 造器型プロスタグランジンD合成酵素選択的タンパク質分解誘導剤の開発 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴田識人, 横尾英知, 遠藤彬則, 伊藤貴仁, 柳瀬雄太, 村上優貴, 藤井清永, 近藤一成, 佐伯泰, 内藤幹彦, 有竹浩介, 出水 庸介 |
| 2. 発表標題 造血器型プロスタグランジンD合成酵素を標的とした選択的タンパク質分解誘導剤の開発 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 柴田識人, 内藤幹彦 |
| 2. 発表標題 脱ユビキチン化によるがん特異的融合タンパク質の安定化 |
| 3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴田識人, 大岡伸通, 辻巖一郎, 出水庸介, 内藤幹彦 |
| 2. 発表標題 発がん因子BCR-ABLの脱ユビキチン化は慢性骨髄性白血病細胞の増殖に必要である |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 柴田識人, 大岡伸通, 築茂由則, 内藤幹彦 |
| 2. 発表標題 脱ユビキチン化によるがん特異的融合タンパク質の安定化 |
| 3. 学会等名 新学術領域「ケモユビキチン」第三回班会議 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴田識人, 大岡伸通, 内藤幹彦 |
| 2. 発表標題 脱ユビキチン化による発がん因子BCR-ABLの安定化は慢性骨髄性白血病細胞の増殖を促進する |
| 3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴田識人, 大岡伸通, 内藤幹彦 |
| 2. 発表標題 脱ユビキチン化による発がん因子BCR-ABLのタンパク質安定化 |
| 3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴田識人, 大岡伸通, 内藤幹彦 |
| 2. 発表標題 発がん因子BCR-ABLの分解を誘導する2つのアプローチ |
| 3. 学会等名 第19回 日本蛋白質科学会年会, 第71回 日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shibata Norihito, Ohoka Nobumichi, Naito Mikihiko |
| 2. 発表標題 A novel strategy for destabilization of oncogenic fusion protein BCR-ABL to inhibit growth of CML. |
| 3. 学会等名 5th International Symposium for Medicinal Sciences, 139th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 柴田 識人 |
| 2. 発表標題 発がん因子BCR-ABLの蛋白質分解 |
| 3. 学会等名 第2回ユビキチン研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴田識人, 大岡伸通, 服部隆行, 内藤幹彦 |
| 2. 発表標題 発がん因子BCR-ABLのタンパク質分解誘導剤とキナーゼ阻害剤の薬理学的相違 |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---------------------------------|---|---------------|
| 産業財産権の名称 新規化合物及び医薬組成物 | 発明者 出水庸介, 柴田識人, 内藤幹彦, 有竹浩介, 横尾英知 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-115706 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|