

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15251

研究課題名（和文）がん免疫の活性化を誘導する新規PROTACの創製

研究課題名（英文）Development of novel PROTACs that activates antitumor immunity

研究代表者

鍛代 悠一（Kitai, Yuichi）

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90756165

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの我々の研究結果から topotecan および SN-38 は RPL15 に結合することが判明しているため、E3 ユビキチンリガーゼに結合する低分子である Pomalidomide と SN-38 をリンカーにより結合させることで RPL15 をユビキチン化依存的に分解する SN38-PROTAC を作成した。SN38-PROTAC は SN-38 よりも 100 倍以上細胞毒性が低い。がん細胞からの DAMP 放出を介して樹状細胞の cGAS-STING シグナルを活性化する機能を SN-38 と同様に保持している。また担がんマウスモデルにおいて SN38-PROTAC は抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を増強させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は RPL15 に対する特異的な阻害剤である SN38-PROTAC を初めて開発したこと、SN38-PROTAC が抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を改善できる可能性があることを示したという2点において、学術的および社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Damage-associated molecular patterns (DAMPs) are secreted from the damaged or dying cells and activate innate immune signaling via pattern-recognition receptors such as Toll-like receptors and cGAS. Our previous studies showed that topotecan and SN-38, a topoisomerase I (TOP1) inhibitor, binds to ribosomal protein RPL15 and induces the secretion of immunostimulatory DNA as DAMP from cancer cells which activate cGAS-STING signaling in dendritic cells. Here, we synthesized SN-38-conjugated pomalidomide (SN38-PROTAC) and showed that SN38-PROTAC selectively degraded RPL15 protein dependent on ubiquitin-proteasome pathway but not TOP1. SN38-PROTAC treatment induced DAMP secretion from cancer cells which activated cGAS-STING signaling in dendritic cells, but cytotoxicity of SN38-PROTAC was 100-fold lower than SN-38 in MCF7 cells. SN38-PROTAC acts as an enhancer for anti-PD-1 therapy in tumor-bearing mouse model.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 DAMP PROTAC

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫応答は細菌由来リポ多糖やウイルス由来 DNA など病原体固有の分子パターンを認識することで活性化することが知られているが、近年の報告から宿主細胞由来の内因性分子によっても活性化され、自己免疫疾患やがんに対する免疫を誘導することが明らかになっている。がん免疫はがん細胞の排除を促進するが、その活性化にはがん細胞由来の抗原による獲得免疫の誘導だけではなく、細胞傷害に伴う内因性分子 (DAMPs) の放出による自然免疫の誘導が重要であることが示唆されている。特にがん細胞由来の DNA は STING を介した自然免疫シグナルを活性化させ、がん免疫を促進することが知られている。

申請者はこれまでの研究から抗がん剤である topotecan が STING 依存的ながん免疫を活性化させる DAMPs のがん細胞からの放出を誘導することを明らかにした (Kitai et al., J Immunol., 2017)。さらに topotecan による DAMPs の放出は既知の標的である Topoisomerase I (TOP1) には依存せず、新規標的タンパクである RPL15 の阻害によって誘導されること、RNAi による RPL15 の阻害は抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を増強させることを担がんマウスモデルにおいて明らかにした (Yamada & Kitai et al., J Immunol., 2022)。これらの結果から TOP1 を阻害しない RPL15 特異的な阻害剤は免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果を改善し、さらに topotecan よりも正常細胞に対して低い毒性を持つと推測されるが、RPL15 特異的な阻害剤は開発されていない。そこで我々は Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) と呼ばれる手法を用いて RPL15 特異的な阻害剤が開発できるのではないかと考えた。

PROTAC はユビキチンリガーゼと結合する Pomalidomide などの化合物と標的タンパクと結合する化合物をリンカーで結合させた化合物を用いて標的タンパクをユビキチンリガーゼヘリクルートして分解させる手法である。従来の低分子薬とは異なり、転写因子やアダプタータンパク質などの酵素活性を持たないタンパク質でも分解を介して阻害できるという特長を持つ。

(Nalawansa & Crews, Cell Chem Biol., 2020) そのため我々は topotecan の類似体である SN-38 と Pomalidomide を結合させることにより、RPL15 の分解とがん免疫の活性化を誘導する新規 PROTAC を創出し、その評価を行うことを研究目的とした。

## 2. 研究の目的

PROTAC により RPL15 を特異的に分解する薬剤の開発を行い、RPL15 の分解誘導を *in vitro* 実験により検証し、さらにそのがん免疫の活性化能を担がんマウスモデルを用いた *in vivo* 実験で検証する。

## 3. 研究の方法

(1) Pomalidomide と SN-38 をリンカーを介して結合させた SN38-PROTAC を作成し、セレブロン依存的な RPL15 の分解を誘導できるかをウェスタンブロット法にて検証する。この際に siRNA を用いたセレブロンのノックダウンを組み合わせることにより、セレブロン依存的に RPL15 の分解が誘導されるかを検証する。さらに RPL15 を過剰発現させた HEK293T 細胞に SN38-PROTAC 処理後、免疫沈降を行うことで RPL15 に対するユビキチン化が SN38-PROTAC により誘導されるかを検証する。

(2) がん細胞における RPL15 の分解が DAMP 産生を誘導するかを検証するため、SN38-PROTAC で処理したがん細胞の培養上清とマウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を共培養後、BMDC からの炎症性サイトカインの産生を ELISA 法で定量する。また Cell Titer glo 法により、SN38-PROTAC と SN-38 の細胞毒性を評価する。

(3) *in vivo* における SN38-PROTAC のがん抑制効果を検証するため、C57BL/6 マウスにマウスのメラノーマ由来の B16-F10 細胞を同系移植し、SN38-PROTAC 投与後の腫瘍体積を測定するとともに、腫瘍に浸潤した活性化 CTL (CD3+/CD8+/IFN $\gamma$ +) と制御性 T 細胞 (CD3+/CD4+/Foxp3+) をフローサイトメトリーにより定量することで SN38-PROTAC が *in vivo* において腫瘍抑制効果だけではなく CTL 依存的ながん免疫の活性化誘導するかを検証する。また先行研究より、B16-F10 腫瘍は抗 PD-1 抗体に対して耐性であると報告されているが、SN38-PROTAC を併用することにより B16-F10 腫瘍が抗 PD-1 抗体に感受性になるかも検証する。

## 4. 研究成果

### (1) SN38-PROTAC の作成

まず E3 ユビキチンリガーゼであるセレブロンに結合する Pomalidomide と SN-38 を PEG リンカーを介して結合させた化合物を 12 種作成した。次にこの化合物が RPL15 タンパクの分解を誘導するかをウェスタンブロット法により検証した。その結果、ユビキチン化依存的に RPL15 タンパクの分解を誘導する化合物を 1 種同定した。この化合物を以下、SN38-PROTAC と記述する。なお特許申請準備中のため、構造式は記載しない。(Fig. 1)

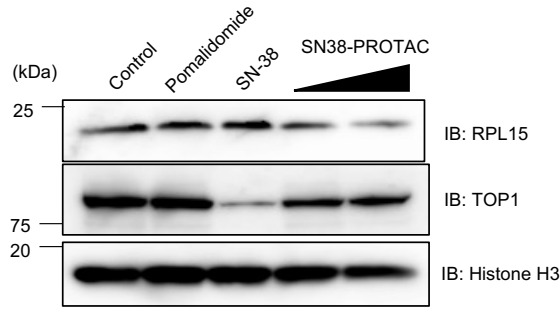


Fig. 1 SN38-PROTACによるRPL15の分解誘導  
MCF7細胞を各種化合物で12時間処理し、  
ウェスタンブロット法にてRPL15タンパクを  
検出した

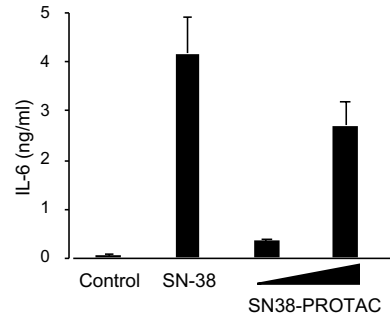


Fig. 2 SN38-PROTACによるDAMP産生の誘導  
MCF7細胞を各種化合物で48時間処理し、そ  
の培養上清とBMDCを48時間共培養した。  
その後、BMDCからのIL-6産生をELISA法で  
定量した

## (2) SN38-PROTACはがん細胞からのDAMP放出を誘導する

SN38-PROTACで処理したMCF7細胞の培養上清を回収し、マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)に添加した結果、IL-6などの炎症性サイトカインの産生が誘導されたため、SN38-PROTACで処理したがん細胞からDAMPが放出されていることが明らかとなった。またRNAiによりセレブロンをノックダウンしたMCF7細胞ではDAMP産生が減弱したことから、SN38-PROTACによるDAMP産生の誘導はセレブロンによるRPL15の分解によって促進されていることが示唆された。(Fig. 2)

## (3) SN38-PROTACはSTING依存的にがんのPD-1抗体への感受性を高める

B16-F10細胞をマウスに同系移植し、SN38-PROTACとPD-1抗体を投与した結果、SN38-PROTACの単独投与では抗腫瘍効果は確認できなかったが、SN38-PROTACとPD-1抗体の併用により抗腫瘍効果が確認された。この結果からPD-1抗体に抵抗性であるB16-F10腫瘍がSN38-PROTAC投与により感受性に変化していることが示唆された。また腫瘍浸潤細胞のフローサイトメトリー解析により、SN38-PROTACとPD-1抗体の併用群ではPD-1抗体単独群と比較して腫瘍に浸潤した活性化CTLが増加し、一方で制御性T細胞の割合が減少していた。このSN38-PROTACによるがん免疫の活性化の促進はSTING欠損マウスでは確認できなかった。またSN38-PROTAC投与によるマウスの体重減少などは見られなかったことから、SN38-PROTACは顕著な毒性を有さないことが推測された。これらの結果から、SN38-PROTACはDAMP産生の誘導とそれによるSTINGシグナルの活性化を介して腫瘍微小環境を変化させ、PD-1抗体への感受性を高めていることが示唆された。

本研究ではRPL15を標的とする新規のSN38-PROTACを創出し、SN38-PROTACががん細胞からのDAMP産生の誘導とがん免疫の活性化をin vivoで発揮することを明らかにした。今後は他の様々ながん種やPD-1抗体以外の免疫チェックポイント阻害剤においてもSN38-PROTACが抗腫瘍効果を増強するかを検証していきたいと考えている。

## 5. 引用文献

Kitai, Y., Kawasaki, T., Sueyoshi, T., Kobiyama, K., Ishii, K. J., Zou, J., Akira, S., Matsuda, T., and Kawai, T. (2017) DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *J Immunol* 198, 1649-1659.

Yamada, S., Kitai, Y.\*, Tadokoro, T., Takahashi, R., Shoji, H., Maemoto, T., Ishiura, M., Muromoto, R., Kashiwakura, J. I., Ishii, K. J., Maenaka, K., Kawai, T., and Matsuda, T.\* (2022) Identification of RPL15 60S Ribosomal Protein as a Novel Topotecan Target Protein That Correlates with DAMP Secretion and Antitumor Immune Activation. *J Immunol* 209, 171-179

Nalawansa, D & Crews, C.M., (2020) PROTACs: An Emerging Therapeutic Modality in Precision Medicine. *Cell Chem Biol.*, 27, 998-1014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Maemoto Taiga, Kitai Yuichi, Takahashi Runa, Shoji Haruka, Yamada Shunsuke, Takei Shiho, Ito Daiki, Muromoto Ryuta, Kashiwakura Jun-ichi, Handa Haruka, Hashimoto Ari, Hashimoto Shigeru, Ose Toyoyuki, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 299
2. 論文標題 A peptide derived from adaptor protein STAP-2 inhibits tumor progression by downregulating epidermal growth factor receptor signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102724 ~ 102724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102724	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 -

1. 著者名 Yamada Shunsuke, Kitai Yuichi, Tadokoro Takashi, Takahashi Runa, Shoji Haruka, Maemoto Taiga, Ishiura Marie, Muromoto Ryuta, Kashiwakura Jun-ichi, Ishii Ken J., Maenaka Katsumi, Kawai Taro, Matsuda Tadashi	4. 巻 209
2. 論文標題 Identification of RPL15 60S Ribosomal Protein as a Novel Topotecan Target Protein That Correlates with DAMP Secretion and Antitumor Immune Activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 171 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100963	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------