

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15257

研究課題名（和文）膜透過性E3リガーゼリガンドの開発とナノ粒子型分解誘導剤への応用

研究課題名（英文）Development of cell-penetrating E3 ligase ligand and its application to nanoparticle-based degraders.

研究代表者

横尾 英知（Yokoo, Hidetomo）

国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・研究員

研究者番号：80881424

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）：PROTACは、標的タンパク質リガンドとユビキチンリガーゼ(E3)リガンドをリンカーを介して結合したキメラ分子であり、標的タンパク質のユビキチン化、プロテアソームによる分解を導く。こうしたタンパク質分解誘導剤は新たな創薬モダリティとして期待される。しかし、細胞膜透過性が低く、その向上のための技術が求められる。そこで本研究では、PROTAC開発において共通性の高いE3リガンド部位に着目し、細胞膜透過性E3リガンドを開発した。さらに、新規膜透過性ペプチドの開発や核酸と粒子を形成する非天然アミノ酸含有ペプチド、および複数のPROTACの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた知見は、タンパク質分解医薬品の分子設計や高活性な医薬品候補化合物の開発に有用となり、創薬分野へ貢献する。加えて、タンパク質分解医薬品の開発効率化に資する品質、有効性、安全性の確保を目指したレギュラトリーサイエンス分野においても貢献する。

研究成果の概要（英文）：PROTAC is a chimeric molecule containing a target protein-ligand and a ubiquitin ligase (E3) ligand linked via a linker, leading to ubiquitination of the target protein and degradation by the proteasome. Such targeted protein degradation is expected to be a new drug modality. However, due to the low cell membrane permeability of PROTAC, a technology to improve its cell membrane permeability is required. In this research, the development of a cell membrane-permeable E3 ligand is important because the E3 ligand is a highly common moiety in PROTACs. In addition, novel membrane-permeable peptides, peptides with non-proteinogenic amino acids that could form particles with nucleic acids, and some PROTACs have been developed.

研究分野：創薬化学

キーワード：タンパク質分解剤 PROTAC ユビキチンリガーゼ ナノ粒子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) や Specific and nongenetic IAP-dependent protein eraser (SNIPER) は標的タンパク質リガンドとユビキチンリガーゼ (E3) リガンドをリンカーを介して結合したキメラ分子であり、E3 を標的タンパク質へ近づけてユビキチン化およびプロテアソームによる分解を導く。これらのタンパク質分解医薬品は新たな創薬手法として期待されている。しかし、PROTAC や SNIPER は分子量が 1000 程度と大きく、細胞内送達に適した物性を有しておらず、その低い細胞膜透過性は適用範囲を狭める一因となる。そこで本研究では、PROTAC 開発において共通性が高い部位である E3 リガンドに着目し、膜透過性を付与した膜透過性 E3 リガンドの開発することとした。特に、細胞膜透過性ペプチドの開発やその導入による膜透過性の付与することとした。さらにドラッグデリバリーシステム (DDS) においてしばしば用いられるナノ粒子をに着目し、ナノ粒子を用いた細胞内送達を目指した研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、PROTAC 開発において共通性の高い E3 リガンド部位に着目し、膜透過性を付与した細胞膜透過性の E3 リガンドを開発する。また、PROTAC の検討の際に有用となるモデル PROTAC の開発や膜透過性ペプチドの開発を行う。

3. 研究の方法

① モデル PROTAC の開発

未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) が融合した ALK 融合タンパク質は、がん化経路を活性化するため創薬標的として着目されている。例えば、ヌクレオホスミン (NPM) -ALK は、最初の ALK 融合タンパク質として報告された。もう一つの ALK 融合タンパク質である棘皮動物微小管関連タンパク質様 4 (EML4) -ALK は、非小細胞肺癌 (Non-Small Cell Lung Cancer ; NSCLC) 患者の 3%~5% に認められる。そこで ALK を標的とした様々な阻害薬が開発されてきた。近年、FMS 様チロシンキナーゼ 3 (FLT3) の阻害剤であるギルテリチニブが ALK 融合タンパク質を阻害することが報告された。そこで、ギルテリチニブを基に ALK 融合タンパク質を標的とした PROTAC の開発を行った。具体的には、アポトーシス阻害タンパク質 (IAP)、セレブロン (CRBN)、von Hippel-Lindau (VHL) の 3 種類の E3 リガンドをポリエチレングリコール (PEG) を介して結合した PROTAC を設計し、化合物は液相法により合成し、得られた化合物の NPM-ALK および EML4-ALK に対する分解活性を SU-DHL-1 細胞および NCI-H2228 細胞を用いて検討した。

② 膜透過性ペプチドの開発

代表的な疎水性細胞膜透過性ペプチド (CPP) である TP10 を基に、側鎖に疎水性のステープル構造を導入した CPP を設計・合成した。得られたペプチドの二次構造解析には、円二色性 (CD) スペクトルを測定した。また得られた CPP を細胞内への化合物のデリバリーキャリアとして検討した。モデルカーゴ分子は、小分子として蛍光物質である 5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF)、核酸としてプラスミド DNA (pDNA) を選択した。小分子の細胞内送達能の評価には、細胞内の蛍光強度を指標に、フローサイトメトリーにより小分子の細胞内取り込み効率を評価した。pDNA の細胞内送達効率の評価では、蛍光標識した pDNA を作成し、得られた pDNA とペプチドとの複合体を形成し、細胞へ添加した際の細胞内の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。さらに、ルシフェラーゼを発現する pDNA を用いて、トランスフェクション効率を評価した。こうした評価には、HEK293 細胞を用いて行った。また、pDNA およびペプチド会合体の物理化学的特性を、ゼータ電位測定、動的光散乱測定、ゲルシフトアッセイにて評価した。

③ 膜透過性 E3 リガンドペプチドの開発

PROTAC に汎用される E3 リガンドとして VHL リガンドが知られている。PROTAC には小分子リガンドが用いられることが多いものの、VHL に対するペプチドリガンドを用いて開発された報告がある。しかし、その膜透過性が低いため PROTAC の部分構造として利用された例は限られている。一方、ペプチド型 PROTAC はリガンドにペプチドを適用していることから、標的としうるタンパク質の増加が期待されている。そこで、VHL リガンドペプチドの細胞膜透過性の向上のため、オリゴアルギニン等の CPP を導入することとし、膜透過性の向上を目指した分子を設計した。そこで、E3 リガンドペプチドに導入するモデル標的タンパク質リガンドとして、蛍光物質を導入したペプチドを設計、合成し、フローサイトメトリーによりその細胞内取り込み効率を評価した。

4. 研究成果

① モデル PROTAC の開発

ギルテリチニブを基に、3種類のE3リガンド(IAP、CRBN、VHL)と異なる長さのPEGリンカーを組み合わせたPROTAC群を設計・合成した(図1)。これらのPROTACの標的選択性とタンパク質分解効果を、ALK融合タンパク質を発現する細胞株を用いた*in vitro*実験、具体的にはウェスタンブロットによる評価を行った。その結果から、PEGリンカーの長さで分解活性に大きく相関していることが明らかになった。具体的には、IAPをリクルートするPROTACがEML4-ALKに対する分解活性を示し、その分解活性はより短いリンカーを有するほど高い活性を示し、リンカーを導入していないPROTAC(IAP(ALK)-1)が最も高い活性を示した(図2)。一方、NPM-ALKに対する分解活性は示さないことを明らかとした。CRBNをリクルートするCRBN(ALK)は、EML4-ALKおよびNPM-ALKの両タンパク質に対して高い分解活性を示し、特に、PEGリンカーを含まないCRBN(ALK)-3が最も分解活性を示した。CRBN(ALK)のリンカー長に対する依存性はIAP(ALK)と類似しているものの、標的タンパク質に対する分解活性が異なることから、リクルートするE3の種類により分解活性が大きく変化することを見出した。阻害剤の共添加時のCRBN(ALK)-3とIAP(ALK)-3による分解活性を見ることで、ALK融合タンパク質の分解はユビキチン-プロテアソームシステムを介することを確認した。

これらの結果は、ALK融合タンパク質を標的とする効果的なPROTACの開発に有用となる。特に、IAP系ALK分解剤の初めての報告となり、E3の選択がPROTACの標的選択性と治療効果に重要な影響を与えることが示された。

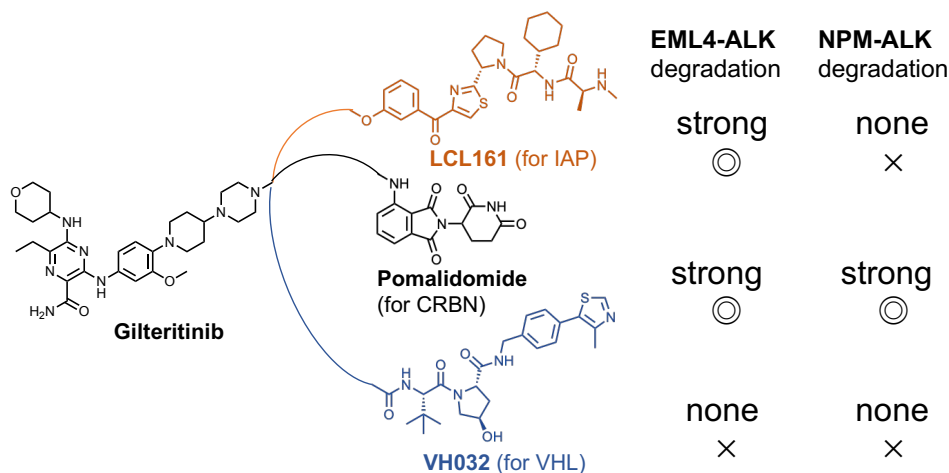


図1 リクルートするE3と分解標的タンパク質

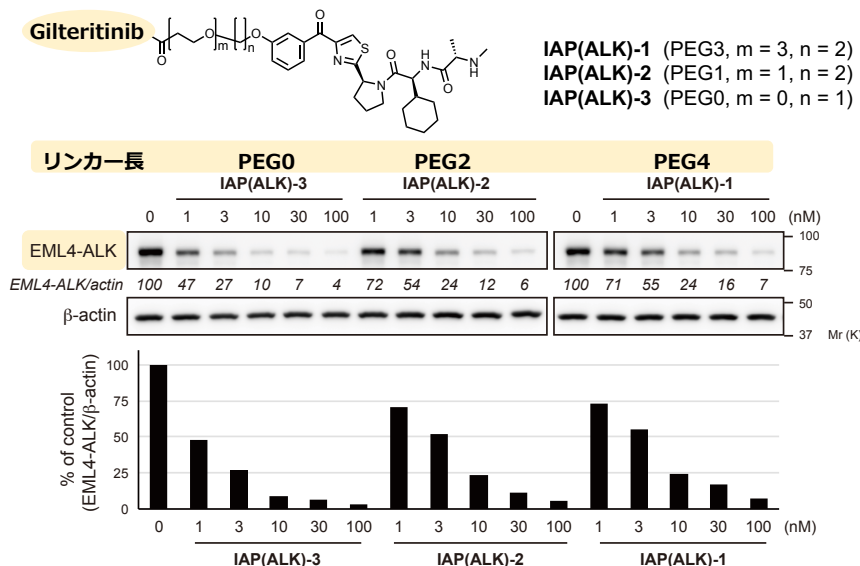


図2 IAP(ALK)の分解活性

② 膜透過性ペプチドの開発

TP10を基に、側鎖に炭素鎖ステーブル構造を導入にしたペプチド群を設計、合成した(図3)。合成により得られた、全てのペプチドが α -ヘリックス構造を形成し、特にF-2が最も安定した α -ヘリックス構造を示した。小分子の細胞内送達効率は、合成したペプチド群の中でC末端側にステーブル構造を導入したF-3が最も高い細胞内取り込み効率を示した。そこで、F-3の細胞内取り込み経路を評価したところ、エンドサイトーシス阻害剤や4°C条件下で抑制されたことから、エンドサイトーシス経路により取り込まれていることが示唆された。pDNAの細胞内送達

効率の評価においては、F-4 が最も高い細胞内取り込み効率を示した。そこで、ペプチド/pDNA 会合体の物性を評価した結果、全てのペプチドが同様の粒子サイズとゼータ電位を示した。続いて、各会合体の安定性を評価したところ、F-4 が形成する会合体が最も安定であることが明らかとなった。一方、F-3/pDNA 会合体を添加した条件では pDNA の取り込み効率は低く、高い F-3 の取り込み効率を示す結果となった。これは、F-3 が形成するペプチド/pDNA 会合体は他のペプチドが形成する会合体に比べて不安定であり、F-3/pDNA の会合体から乖離した F-3 単体が細胞内に到達していることが示唆された。これらの結果から、疎水性 CPP へのステーブル構造の導入位置を制御することで、小分子や核酸など異なる分子の送達機能を調整できることが明らかとなった。本研究で開発された疎水性 CPP は高い膜透過性を示すペプチドとして期待される。

- F-1 : CF-XAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH₂
 F-2 : CF-XAS₅*YLLS₅*KINLKALAALAKKIL-NH₂
 F-3 : CF-XAGYLLGKINLKALAAS₅*AKKS₅*L-NH₂
 F-4 : CF-XAGYS₅*LGKS₅*NLKALAALAKKIL-NH₂

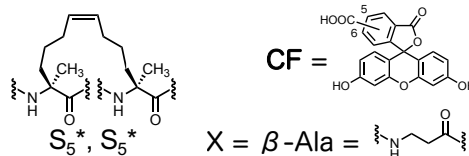


図 3 CPP の設計

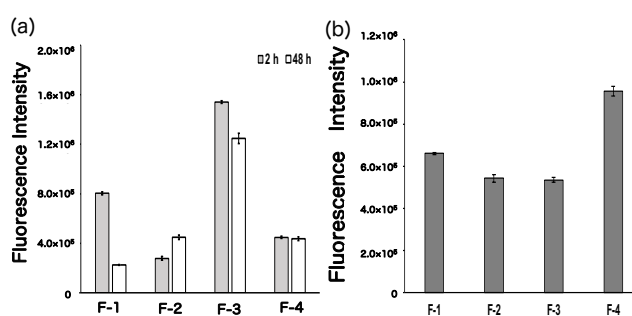


図 4 (a)小分子の取り込み効率 (b)核酸の取り込み効率

③膜透過性 E3 リガンドペプチドの開発

E3 リガンドである VHL リガンドペプチドへオリゴアルギニンを導入したペプチドが高い膜透過性を示すことを明らかとした。さらに、エンドサイトーシス脱出配列の導入や炭素鎖の導入により、VHL リガンドペプチドの膜透過性向上を目指した設計を行った。PROTAC には、小分子リガンドが用いられることが多く、ペプチド型 PROTAC の開発においても用いられているため、E3 リガンドペプチドに導入するモデル標的タンパク質リガンドとして、蛍光物質 CF を導入したペプチドを種々設計、合成した。得られたペプチド群の細胞内到達効率を比較した結果、VHL リガンドペプチドへオリゴアルギニンを導入することで、膜透過性が向上し、さらに炭素鎖 C6 を導入したペプチドが高い取り込み効率を示し、膜透過性 E3 リガンドの開発に成功した。

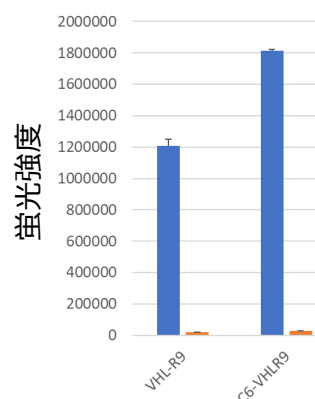


図 5 膜透過性の検討

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 0件）

1. 著者名 Yokoo Hidetomo, Naito Mikihiro, Demizu Yosuke	4. 巻 18
2. 論文標題 Investigating the cell permeability of proteolysis-targeting chimeras (PROTACs)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Discovery	6. 最初と最後の頁 357 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17460441.2023.2187047	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, Naganuma Miyako, Oba Makoto, Demizu Yosuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Recent Advances in PROTAC Technology Toward New Therapeutic Modalities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry & Biodiversity	6. 最初と最後の頁 e202200828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbdv.202200828	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, Misawa Takashi, Kato Takuma, Tanaka Masakazu, Demizu Yosuke, Oba Makoto	4. 巻 72
2. 論文標題 Development of delivery carriers for plasmid DNA by conjugation of a helical template to oligoarginine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116997 ~ 116997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116997	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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野元春, 横尾英知, 大庭誠, 三澤隆史, 出水庸介
2. 発表標題 両親媒性ステーブルペプチドを利用した核酸の細胞内輸送
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野元春, 横尾英知, 大庭誠, 三澤隆史, 出水庸介
2. 発表標題 両親媒性ステーブルペプチドを利用した核酸の細胞内輸送
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 若手研究者が拓くニューモグリティ創薬研究～革新的医薬品の創出に向けて～
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横尾英知, 内田智士, 大庭誠
2. 発表標題 膜透過性ペプチドを用いたsiRNAおよびmRNAの細胞内デリバリーキャリアの開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横尾英知, 三澤隆史, 加藤巧馬, 田中正一, 出水庸介, 大庭誠
2. 発表標題 Intracellular plasmid dna delivery using helical template conjugated oligoarginine
3. 学会等名 第59 回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横尾英知, 内田智士, 大庭誠
2. 発表標題 膜透過性ペプチド型ユビキチンリガーゼリガンドの開発とタンパク質分解誘導剤への展開
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横尾英知, 内田智士, 大庭誠
2. 発表標題 核酸デリバリーに基づくナノ粒子型タンパク質分解誘導剤の新展開
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第21回シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横尾英知, 内田智士, 大庭誠
2. 発表標題 核酸デリバリーに基づくナノ粒子型タンパク質分解誘導剤の新展開
3. 学会等名 第20回夏期セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横尾英知, 内田智士, 大庭誠
2. 発表標題 siRNAの細胞内デリバリーキャリアとなる両親媒性ヘリカルペプチドの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横尾英知, 大庭誠
2. 発表標題 ナノ粒子型タンパク質分解誘導剤の基盤となる核酸キャリアの開発
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大庭誠, 渋谷美佳, 山端優仁, 横尾英知, 内田智士, 田中正一
2. 発表標題 細胞内siRNAデリバリーのための両親媒性ヘリカルペプチドの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第16回年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 H. Yokoo	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Wiley-VCH	5. 総ページ数 18
3. 書名 Peptide and Protein Delivery, Chapter 13 Cell-Penetrating Peptides. Design, Development and Applications	

〔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