

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20707

研究課題名（和文）ペプチド性リガンドを用いた新規BCR-ABL分解誘導剤の開発

研究課題名（英文）Development of a novel BCR-ABL degrader using peptide ligands

研究代表者

佐藤 和佳（Sato, Waka）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任研究員

研究者番号：80967274

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、慢性骨髄性白血病（CML）の原因分子であるBCR-ABLを分解するSNIPER/PROTACの開発を目的とする。当初の狙いは多価型ペプチドライブラリースクリーニング法を用いてBCR-ABLに結合する多価型ペプチドリガンドを取得することであったが、細胞膜透過性の低下が懸念されたため、低分子の新規リガンド探索も並行して試みた。その結果、キナーゼ阻害剤（TKI）とは異なる部位に結合するリガンド候補化合物を複数種同定し、これを組み込んだSNIPER/PROTACがTKI耐性変異型BCR-ABLの分解を顕著に誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにCML治療薬として多くのTKIが開発されてきたが、キナーゼドメインの遺伝子変異による薬剤耐性株の出現が問題になっており、新たな作用機序をもつ治療薬の開発が望まれている。本研究で開発したSNIPER/PROTACはTKI耐性変異型BCR-ABLの分解を誘導したことから、これらキメラ化合物はTKI耐性を克服することが期待できる。今後同様にしてTKIとは異なる部位に結合する多価型ペプチドを取得し、これを導入することでより効率よくBCR-ABLの分解を誘導するSNIPER/PROTACを開発できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop SNIPERs/PROTACs that induce degradation of BCR-ABL, a causative factor of chronic myeloid leukemia (CML). Initially, we tried to obtain multivalent peptide ligand that binds to BCR-ABL by using a multivalent peptide library screening. However, due to concern about cell membrane permeability, we also attempted to discover new low-molecular-weight ligands in parallel. As a result, we identified multiple candidate compounds that bind to different sites than tyrosine kinase inhibitors (TKIs), and develop SNIPERs/PROTACs using these compounds, which prominently induced the degradation of TKI-resistant BCR-ABL mutant.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質分解 SNIPER PROTAC 多価型ペプチドライブラリー法 BCR-ABL

1. 研究開始当初の背景

近年、標的タンパク質を特異的に分解する Targeted Protein Degradation (TPD)技術が開発され、新たな創薬技術として注目されている。TPD の代表的な化合物である SNIPER/PROTAC は、標的タンパク質特異的に結合するリガンドと、ユビキチンリガーゼ(E3)を結合させたキメラ化合物である。この分子は標的タンパク質に E3 をリクルートすることにより、標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームでの分解を誘導する。細胞内のさまざまなタンパク質を分解する化合物を開発可能であるが、新規 SNIPER/PROTAC の開発には標的タンパク質特異的に結合するリガンドが必要であり、新規リガンド探索は容易ではない。近年開発された DNA-encoded chemical library (DEL)を利用したリガンド探索法は短期間で数億の化合物ライブラリーからリガンド探索ができる画期的な方法であるが、現在は誰もがすぐに利用できる技術ではない。

2. 研究の目的

本研究では、多価型ペプチドライブラリースクリーニング法を用いて新たな標的タンパク質結合リガンドを探索し、これを SNIPER/PROTAC に組み込んだ新規キメラ化合物を開発することを計画した。多価型ペプチドは重合するタンパク質に高い親和性で結合するという特徴を示すので、Proof of concept 研究として、慢性骨髄性白血病の原因因子であり、細胞内で三量体を形成する BCR-ABL に結合する多価型ペプチドリガンドを開発し、BCR-ABL を分解する SNIPER/PROTAC を開発することを当初の目的としていた。しかしながら、BCR-ABL 結合リガンドの取得にあたって、リガンドの分子量が大きいことによる細胞膜透過性の低下が懸念されたため、低分子の新規 BCR-ABL 結合リガンドを取得することも本計画と並行して試みた。

また、これまでに我々が開発した BCR-ABL を分解誘導する SNIPER(ABL)は、BCR-ABL の分解を顕著に誘導し、CML 細胞の増殖を強力に抑制する。しかしながら、これら SNIPER(ABL)は BCR-ABL 結合リガンドに既存の CML 治療薬であるキナーゼ阻害剤 (TKI) を用いており、キナーゼドメインの遺伝子変異により TKI 耐性を獲得した BCR-ABL を分解誘導することができなかった。そのため、本研究では、多価型ペプチドライブラリー法、低分子化合物ライブラリーどちらも用いて、TKI とは異なる部位で BCR-ABL に結合するリガンドを探索し、これを分解する SNIPER/PROTAC 化合物を開発することとした。

3. 研究の方法

(1) 多価型ペプチドを組み込んだ SNIPER/PROTAC の分子設計

これまでに、多価型ペプチドを組み込んで SNIPER/PROTAC を開発した例がなかったため、まずは分子設計を行った。共同研究者である同志社大学 西川喜代孝教授はこれまでに BCR-ABL の PH ドメイン特異的に結合する多価型ペプチドを複数種開発していたため、これらの多価型ペプチドの構造をベースとして、主に SNIPER/PROTAC で利用されている E3 リガーゼ IAP, VHL, CRBN それぞれの E3 リガンドを結合させた分子設計をおこなった。

(2) BCR-ABL 結合性低分子リガンドの探索

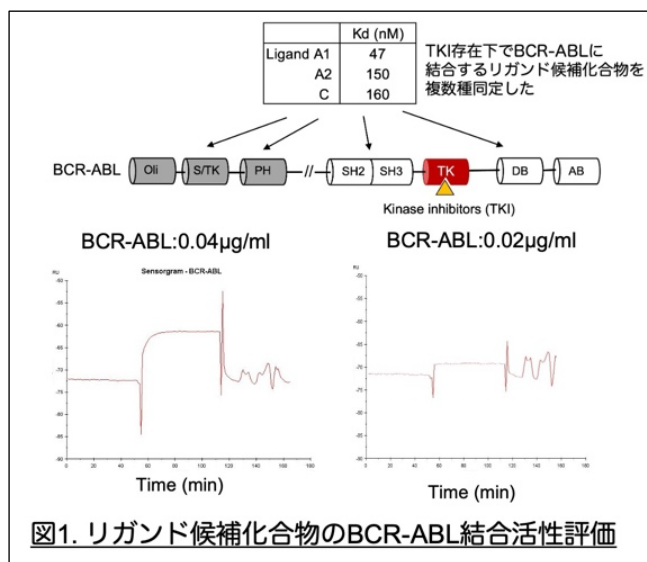
次に、既存の低分子ライブラリーを用いて、TKI 存在下で BCR-ABL に結合する低分子リガンド候補化合物を探索した。得られた候補化合物の BCR-ABL 結合活性は、ビオチン標識した化合物を作製し、BCR-ABL リコンビナントタンパクを用いて SPR 法により解析した。

(2) 低分子リガンドを組み込んだ SNIPER/PROTAC の BCR-ABL 分解活性評価

(1)で同定したリガンド候補化合物を組み込んだ SNIPER/PROTAC(以降 Chimera-X とする)をそれぞれ合成し、CML 細胞である K562 細胞、KBM5 細胞および TKI 耐性型変異である T315I 変異型 BCR-ABL を発現する KBM5/STIR 細胞を用いて、これら Chimera-X の BCR-ABL の分解誘導活性を、ウエスタンブロッティングにより評価した。このとき、これまでに開発された SNIPER(ABL)-39 と分解活性を比較した。

4. 研究成果

(1) 分子設計を行った結果、これまでに開発された PH ドメインに結合する多価型ペプチドは分子量が大きいため、細胞膜透過性が乏しいため、これに加えて E3 リガーゼのリガンドを結合さ



せると、化合物の分子量がさらに大きくなってしまふことが懸念された。そのため、まずは TKI とは異なる部位に結合する SNIPER/PROTAC が、狙い通りに TKI 耐性変異型 BCR-ABL の分解を誘導するかどうかを証明するため、低分子ライブラリーを用いた BCR-ABL リガンド候補化合物の取得を推進することとした。

(2) 低分子ライブラリーによる探索により、TKI 存在下において BCR-ABL に強力に結合する BCR-ABL 結合リガンド候補化合物を複数種同定した。さらに、ビオチン標識リガンド、精製 BCR-ABL を用いて SPR により解析したところ、BCR-ABL 量依存的に測定値が増加したことから、これらビオチン化リガンドが BCR-ABL に直接結合することが確認できた(図 1)。

(3) (1) で同定したリガンド候補化合物を組み込んだ SNIPER/PROTAC を、終濃度 10 μ M で添加し、6 時間培養したときの細胞内 BCR-ABL 量をウエスタンブロッティングにより評価したところ、K562 細胞、KBM5 細胞においては、SNIPER(ABL)-39 と同様に Chimera-X は BCR-ABL の分解を誘導することが示された。さらに興味深いことに、KBM5/STIR 細胞においては、SNIPER(ABL)-39 は TKI 耐性変異型 BCR-ABL に結合できないため、BCR-ABL の分解を全く誘導しなかったのに対して、Chimera-X は TKI 耐性変異型 BCR-ABL の分解を顕著に誘導することを見出した。したがって、本研究で開発したキメラ化合物は CML 治療で課題であった TKI 耐性を克服することが期待できる。

現在、これらキメラ化合物の BCR-ABL 結合部位を探索中である。今後、同様にして TKI とは異なる部位に結合する多価型ペプチドを取得し、これを導入することでより効率よく BCR-ABL の分解を誘導する SNIPER/PROTAC を開発できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sato Waka, Naito Mikihiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Inducing Protein Degradation to Overcome Resistance to Kinase Inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 557 ~ 558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.2c00223	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 和佳, 芳賀 和美, 伊藤 貴人, 黒原 崇, 辻 徹一郎, 出水 庸介, 内藤 幹彦
2. 発表標題 キナーゼ阻害剤耐性を克服する新規BCR-ABL分解誘導剤の開発
3. 学会等名 第27回がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 和佳, 遠藤 侑希, 王 佑香梨, 芳賀 和美, 伊藤 貴人, 黒原 崇, 辻 徹一郎, 出水 庸介, 内藤 幹彦
2. 発表標題 キナーゼ阻害剤耐性を克服する新規BCR-ABL分解誘導剤の開発
3. 学会等名 学術変革(A)タンパク質寿命 第1回班会議
4. 発表年 2024年

〔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
---------	---------