

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860049

研究課題名(和文) 微小管制御タンパク質を標的とした分解誘導薬剤の開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Development of novel small molecules degrading microtubule-associated proteins

研究代表者

大岡 伸通 (Ohoka, Nobumichi)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・室長

研究者番号：80568519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：私達は細胞内の標的タンパク質を選択的に分解する化合物であるSNIPERの開発を行っている。本研究では、微小管制御タンパク質であるTACC3を標的としたSNIPER(TACC3)をデザインし合成した。SNIPER(TACC3)は細胞内でTACC3のユビキチン化とプロテアソームによる分解を誘導すること、SNIPER(TACC3)は正常細胞と比較してTACC3を高発現している癌細胞に対して選択的にアポトーシスやパラトーシス様の細胞死を誘導することを明らかにした。また、SNIPER(TACC3)とプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブを併用すると様々な癌細胞株で相乗的な細胞死が誘導されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have developed SNIPER compounds that induce selective degradation of target proteins. In this study, we designed and synthesized SNIPER(TACC3)s, which target the spindle regulatory protein TACC3. SNIPER(TACC3)s induce ubiquitylation and proteasomal degradation of TACC3 in cells. Mechanistic analysis indicated that APC/CCDH1 mediates the SNIPER(TACC3)-induced degradation of TACC3. SNIPER(TACC3) selectively induced apoptosis in cancer cells expressing a larger amount of TACC3 than normal cells. SNIPER(TACC3) also induced paraptosis-like cell death selectively in cancer cells. Mechanistic analysis suggests that accumulation of ubiquitylated protein aggregates that requires XIAP induces ER-stress responses involving XBP-1 and ER-derived vacuolization in cancer cells. Importantly, inhibition of proteasome enhanced SNIPER(TACC3)-induced vacuolization, and combination treatment of SNIPER(TACC3) and bortezomib exhibited a synergistic anticancer activity in several cancer cell lines.

研究分野：生物系薬学

キーワード：TACC3 SNIPER ユビキチン プロテアソーム がん 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

キナーゼ阻害剤などのように病原性タンパク質の機能を選択的に阻害する分子標的治療薬が現在でも数多く開発されている。一方で、低分子化合物により病原性タンパク質を選択的に分解することができれば、これまでにない革新的な薬剤を創製できると考えられるが、そのような技術はほとんど研究されていない。私達は、設計合成したハイブリッド化合物 SNIPER (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser) により、細胞内の狙ったタンパク質をユビキチン・プロテアソーム系により選択的に分解するシステムの開発を行っている。SNIPER は、ユビキチンリガーゼ cIAP1 に対するリガンドであるメチルベスタチン (MeBS) と標的分子に対するリガンドをリンカーで繋いだ構造をしており、cIAP1 と標的タンパク質を架橋することで、標的タンパク質を特異的に分解することができると考えられる。

細胞分裂時に微小管が重合し形成される紡錘体を標的とする薬剤として、ピンカアルカロイドなどの微小管阻害剤が現在様々な癌治療に使われている。しかし、これらの薬剤は微小管に直接結合することから、静止期細胞の微小管機能を阻害し、重篤な副作用を生じることが知られている。そこで近年では、Aurora kinases や Polo-like kinases のような mitotic kinases やモータータンパクである Eg5 などの、分裂時の微小管の作用を制御するタンパク質を標的とする分子標的治療薬の開発が行われている。TACC3 も同様に分裂期の微小管制御因子であり、様々な癌細胞で高発現していることが知られている。また、p53 欠損マウスに自然発症する胸腺リンパ腫は、TACC3 を欠損させることにより正常組織への影響なく腫瘍の退縮が生じることが報告されていることから、TACC3 が癌治療の有望な標的分子であることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、微小管制御タンパク質 TACC3 を標的とした SNIPER を新たに設計合成し、SNIPER を基にした創薬技術が微小管局在タンパク質に対しても適用可能であるか検証すると共に、その分解誘導メカニズムや細胞生物学的アウトプットを解析する。この研究はモデル研究であり、微小管制御タンパク質の選択的分解を機序とした新たな分子標的治療薬の開発の基礎を創り上げることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) SNIPER(TACC3)の合成とTACC3タンパク質分解活性の検証

合成化合物 KHS101 やその誘導体が TACC3 に直接結合し、その活性を阻害することが報告されている。誘導体の一つである KHS108 は、構造活性相関から TACC3 との結合を損なわないと予測される側鎖を含むので、その側鎖に MeBS をポリエチレングリコール (PEG) リンカーで接合した化合物 SNIPER(TACC3)を設計し合成した。PEG リンカーにおいて長さの異なる 2 種類 (SNIPER(TACC3)-1, SNIPER(TACC3)-2) を作製した。これらの SNIPER(TACC3)を細胞に処理し、ウエスタンブロットにより標的である TACC3 タンパク質を分解することができるか検証を行った。

### (2) SNIPER(TACC3)による TACC3 分解誘導機構の解析

活性の見られた SNIPER(TACC3)に関して、分解誘導メカニズムの解析を行った。具体的には、ユビキチン・プロテアソーム系を介しているか、プロテアソーム阻害剤を用いた回復実験及びユビキチン化アッセイにより検証した。また、siRNA を用いたノックダウン実験により、どのユビキチンリガーゼによるユビキチン化を介した分解であるか解析した。さらに、Thermal shift assay により SNIPER(TACC3)とそのユビキチンリガーゼの結合様式を解析した。

### (3) 生物学的アウトプット (抗がん活性) の検証

様々なヒト癌細胞株や正常線維芽細胞株に SNIPER(TACC3)を処理したときに、どの細胞に細胞死が見られるか調べた。また、その細胞死の種類や特徴を形態学的、生化学的な解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) SNIPER(TACC3)の合成と標的タンパク質 TACC3 分解活性の検証

TACC3 に直接結合し、その活性を阻害することが報告されている合成化合物 KHS108 に、ユビキチンリガーゼ cIAP1 に対するリガンドである MeBS をポリエチレングリコールリンカーで接合したハイブリッド化合物を SNIPER(TACC3)として合成した。様々ながん細胞株に SNIPER(TACC3)を処理すると、TACC3 タンパク質の発現量が低下した。リンカー長の異なる SNIPER(TACC3)-1 及び SNIPER(TACC3)-2 のどちらにおいても TACC3 の減少が見られた。

### (2) SNIPER(TACC3)による TACC3 分解誘導機構の解析

リガンドである MeBS と KHS108 を混ぜて細胞に処理しても TACC3 の減少が見られないことから、両化合物をリンカーで繋いだ SNIPER の構造が重要であることが示唆され

た。また、プロテアソーム阻害剤処理及びユビキチン化アッセイにより、SNIPER(TACC3)による TACC3 の発現低下はユビキチン・プロテアソーム系による分解により起こることが明らかになった。

ユビキチンリガーゼに対する siRNA を用いた解析により、SNIPER(TACC3)による TACC3 の分解は予想に反して cIAP1 依存的には起こっておらず、別のユビキチンリガーゼ複合体 APC/C<sup>CDH1</sup> 依存的に起こっていることがわかった。Thermal shift assay により、SNIPER(TACC3)はその化合物構造全体で APC/C<sup>CDH1</sup> に結合し、TACC3 と APC/C<sup>CDH1</sup> の結合を増強していること、さらに SNIPER(TACC3)は APC/C<sup>CDH1</sup> の基質タンパク質である CDC20 や Cyclin B の分解には影響を与えず、TACC3 を特異的に分解することを明らかにした。

### (3) 生物学的アウトプット (抗がん活性) の検証

様々ながん細胞株、正常線維芽細胞株における TACC3 の発現及び、SNIPER(TACC3)を処理したときの細胞増殖能を調べたところ、SNIPER(TACC3)は正常細胞と比較して、TACC3 が高発現しているがん細胞に対してのみ、選択的な細胞死を誘導することが明らかになった。また SNIPER(TACC3)によるがん細胞死は、caspase の活性化や annexin V 陽性細胞の出現から、一部はアポトーシスであることが示された。さらに、APC/C<sup>CDH1</sup> を siRNA でノックダウンし TACC3 の分解を抑制すると、SNIPER(TACC3)によるがん細胞死も抑制されることから、TACC3 の分解依存的な抗がん活性であることが示唆された。

細胞形態学的解析や生化学的解析により、SNIPER(TACC3)はアポトーシスと並行して、小胞体の空胞化を伴うパラトーシス様の細胞死をがん細胞特異的に誘導することを明らかにした。詳細な分子メカニズム解析により、SNIPER(TACC3)によるパラトーシスは、XIAP 依存的な TACC3 とは異なるタンパク質のユビキチン化凝集体形成により小胞体ストレスが生じ、小胞体ストレス応答因子 XBP-1 を介した小胞体の空胞化により起こることを明らかにした。さらに、プロテアソームを阻害すると、SNIPER(TACC3)による小胞体の空胞化が増強されることを見出し、プロテアソーム阻害剤である Bortezomib と SNIPER(TACC3)を併用すると、いくつかのがん細胞株において相乗的な細胞死を誘導することを明らかにした。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計6件)

Ohoka N, Nagai K, Shibata N, Hattori T, Nara H, Cho N, Naito M.

SNIPER(TACC3) induces cytoplasmic vacuolization and sensitizes cancer cells to Bortezomib. *Cancer Sci.*, 108: 1032-1041, 2017 査読有. DOI: 10.1111/cas.13198.

Ohoka N, Okuhira K, Ito M, Nagai K, Shibata N, Hattori T, Ujikawa O, Shimokawa K, Sano O, Koyama R, Fujita H, Teratani M, Matsumoto H, Imaeda Y, Nara H, Cho N, Naito M. In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs). *J Biol Chem.*, 292: 4556-4570, 2017 査読有. DOI: 10.1074/jbc.M116.768853.

Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Kurihara M, Naito M. Molecular Design, Synthesis, and Evaluation of SNIPER(ER) That Induces Proteasomal Degradation of ER $\alpha$ . *Methods Mol Biol.*, 1366: 549-560, 2016 査読有. DOI: 10.1007/978-1-4939-3127-9\_42.

Ohoka N, Shibata N, Hattori T, Naito M. Protein Knockdown Technology: Application of Ubiquitin Ligase to Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets.*, 16: 136-146, 2016 査読有. DOI: 10.2174/1568009616666151112122502.

Misawa T, Yorioka M, Demizu Y, Noguchi-Yachide T, Ohoka N, Kurashima-Kinoshita M, Motoyoshi H, Nojiri H, Kittaka A, Makishima M, Naito M, Kurihara M. Effects of alkyl side chains and terminal hydrophilicity on vitamin D receptor (VDR) agonistic activity based on the diphenylpentane skeleton. *Bioorg Med Chem Lett.*, 25: 5362-5366, 2015 査読有. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.09.030.

Ohoka N, Nagai K, Hattori T, Okuhira K, Shibata N, Cho N, Naito M. Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Dis.*, 5: e1513, 2014 査読有. DOI: 10.1038/cddis.2014.471.

#### [学会発表](計12件)

大岡伸通, 鈴木孝昌, 橋井則貴, 出水庸介, 栗原正明, 石井明子, 内藤幹彦: 分子標的薬オプターゲット効果の新しい評価法開発. 日本薬学会第137年会, 2017年3月24日~2017年3月27日(仙台)

大岡伸通, 奥平桂一郎, 永井克典, 伊東昌宏, 柴田識人, 服部隆行, 宇治川治, 佐

野修, 小山亮吉, 今枝泰宏, 奈良洋, 長展生, 内藤幹彦: 低分子化合物 SNIPER による細胞内ユビキチン化機構の制御と創薬への応用. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日~2016 年 12 月 2 日 (横浜)

大岡伸通, 柴田識人, 服部隆行, 内藤幹彦: 低分子化合物 SNIPER による in vivo プロテインノックダウンと抗腫瘍活性評価. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日~2016 年 10 月 8 日 (横浜)

大岡伸通, 奥平桂一郎, 服部隆行, 内藤幹彦: 低分子化合物 SNIPER による in vivo プロテインノックダウン. 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016 年 5 月 30 日~2016 年 6 月 1 日 (大分)

大岡伸通, 伊東昌宏, 奥平桂一郎, 永井克典, 柴田識人, 服部隆行, 長展生, 内藤幹彦: ユビキチン・プロテアソーム経路を利用したプロテインノックダウン化合物の開発. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日~2016 年 3 月 29 日 (横浜)

大岡伸通, 永井克典, 柴田識人, 服部隆行, 長展生, 内藤幹彦: ユビキチン化誘導剤によるユビキチン関連死の解明. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年 12 月 1 日~2015 年 12 月 4 日 (神戸)

大岡伸通, 柴田識人, 服部隆行, 内藤幹彦: Ubiquitin-related cancer cell death induced by small molecules degrading TACC3 protein. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日~2015 年 10 月 10 日 (名古屋)

大岡伸通, 服部隆行, 内藤幹彦: TACC3 分解誘導剤によるがん細胞死のユビキチン関連死. 第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2015 年 6 月 10 日~2015 年 6 月 12 日 (松山)

大岡伸通, 永井克典, 服部隆行, 奥平桂一郎, 柴田識人, 長展生, 内藤幹彦: ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤の開発と抗がん活性評価. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25 日~2015 年 3 月 28 日 (神戸)

大岡伸通, 永井克典, 奥平桂一郎, 柴田識人, 服部隆行, 長展生, 内藤幹彦: SNIPER(TACC3) degrades TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway and induces apoptosis in cancer cells expressing a large amount of TACC3. 26th

EORTC-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2014 年 11 月 18 日~2014 年 11 月 21 日 (Barcelona, Spain)

大岡伸通, 永井克典, 奥平桂一郎, 柴田識人, 服部隆行, 長展生, 内藤幹彦: ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤による癌細胞死の誘導. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日~2014 年 11 月 27 日 (横浜)

大岡伸通, 奥平桂一郎, 柴田識人, 服部隆行, 内藤幹彦: ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤による癌細胞死の誘導. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日~2014 年 9 月 27 日 (横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 複素環化合物  
発明者: 内藤幹彦, 大岡伸通, 柴田識人, 奥平桂一郎, 他 12 名  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-196803 号  
出願年月日: 2016 年 10 月 4 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大岡 伸通 (Nobumichi Ohoka)  
国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・室長  
研究者番号: 80568519

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

内藤 幹彦 (Mikihiko Naito)  
国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・部長  
研究者番号: 00198011