

令和元年5月10日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05090

研究課題名(和文)人為的ユビキチン化修飾による細胞機能の制御

研究課題名(英文) Manipulation of cellular function by forced ubiquitylation

研究代表者

内藤 幹彦 (NAITO, MIKIHICO)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発したプロテインノックダウン技術を基盤として、各種の標的タンパク質(エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、BCR-ABL、BRD4、Hisタグタンパク質等)を特異的にユビキチン化してプロテアソームで分解するSNIPER化合物を開発した。また標的タンパク質として細胞質だけでなく核や膜結合タンパク質等の分解を誘導できる事を明らかにすると共に、SNIPERによる標的タンパク質及びIAPの分解機構を明らかにした。さらにSNIPERは薬剤除去後も長時間にわたって優れた抗がん活性を示す等、阻害剤と異なる薬理学的性質を示す事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SNIPER技術は研究代表者らが開発した独自技術であり、細胞内で標的タンパク質のユビキチン修飾が引き起こす直接的な影響を解析する事ができる。本研究で開発したSNIPER化合物を利用して学術的にも有意義な新しい知見が得られる可能性がある。またこの技術では任意の標的タンパク質を特異的に分解するSNIPER化合物を合理的に開発する事ができ、従来技術では阻害剤を開発する事が難しい標的タンパク質を狙って分解するSNIPERを開発する事も期待される。新しい創薬技術としても有望であり、社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Based on our protein knockdown technology, we developed a number of Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Erasers (SNIPERs) that can induce the ubiquitylation and proteasomal degradation of estrogen receptor-alpha, androgen receptor, BCR-ABL, BRD4 and His-tagged proteins etc. We demonstrated that SNIPERs can target cytosolic, nuclear and membrane-anchored proteins for degradation, and clarified the degradation mechanism of target proteins and IAPs. We also showed that SNIPER against BCR-ABL protein can exhibit a potent anti-cancer effect even after the drug removal, which contrasts a kinase inhibitor whose anti-cancer effect diminished immediately after the drug removal. Protein degradation by SNIPERs can show pharmacologically different effects as compared with functional inhibitors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ユビキチン プロテアソーム タンパク質分解 プロテインノックダウン SNIPER エストロゲン受容体 アンドロゲン受容体 BCR-ABL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のコビキチン化修飾はプロテアソームでの分解シグナルとなる事はよく知られている。この反応では、プロテアソームはコビキチンが4個以上連結したポリコビキチン鎖を認識し、元のタンパク質のコビキチン化修飾部位はそれほど重要ではないと考えられている。近年、コビキチン化修飾はタンパク質分解以外にも増殖因子受容体の内在化など多くの細胞機能を制御することが明らかになってきた。しかし、タンパク質を人為的にコビキチン化修飾することによってこれらの細胞機能変化を再現できるかどうかについてはほとんど検討が行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発した SNIPER システムを応用して、多種多様なタンパク質を人為的にコビキチン化修飾する SNIPER 化合物を開発し、これらの SNIPER が引き起こす標的タンパク質及び細胞機能の変化を調べ、コビキチン化修飾が直接的にもたらす細胞への影響を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

エストロゲン受容体を標的とする SNIPER(ER)をベースに、IAP に対する結合親和性の高い各種 IAP アンタゴニストを導入した新規 SNIPER(ER)を合成し、その標的タンパク質分解活性及び抗がん活性等を調べる。またアンドロゲン受容体、BCR-ABL、BRD4、His タグタンパク質等を標的として分解する各種 SNIPER 化合物を合成し、標的タンパク質の分解活性及び各種がん細胞に対する抗がん活性等を解析する。SNIPER(ABL) と ABL 阻害剤の抗がん活性を比較し、BCR-ABL タンパク質の分解がもたらす薬理学的効果と BCR-ABL のキナーゼ活性阻害による薬理学的効果の違いを検討する。

4. 研究成果

(1) エストロゲン受容体を標的とする SNIPER(ER)の開発

IAP リガンドとして LCL161 誘導体を利用した SNIPER(ER)-87 は、エストロゲン受容体を分解し乳がん細胞に対する選択的な抗がん活性を示す。今回新たに親和性の高い各種 IAP アンタゴニストを導入した SNIPER(ER)を各種合成し、そのプロテインノックダウン活性を調べた。その結果、SNIPER(ER)-105、SNIPER(ER)-110、SNIPER(ER)-126 等の SNIPER 化合物が SNIPER(ER)-87 よりも優れたプロテインノックダウン活性を示す事がわかった(図1)。これらの SNIPER(ER)はエストロゲン受容体の分解だけでなく、IAP の分解活性も SNIPER(ER)-87 より強かった。また MCF-7 乳がん細胞に対して細胞死を誘導する活性が強く、in vivo Xenograft モデルにおいても SNIPER(ER)-87 より強い抗がん活性を示した。

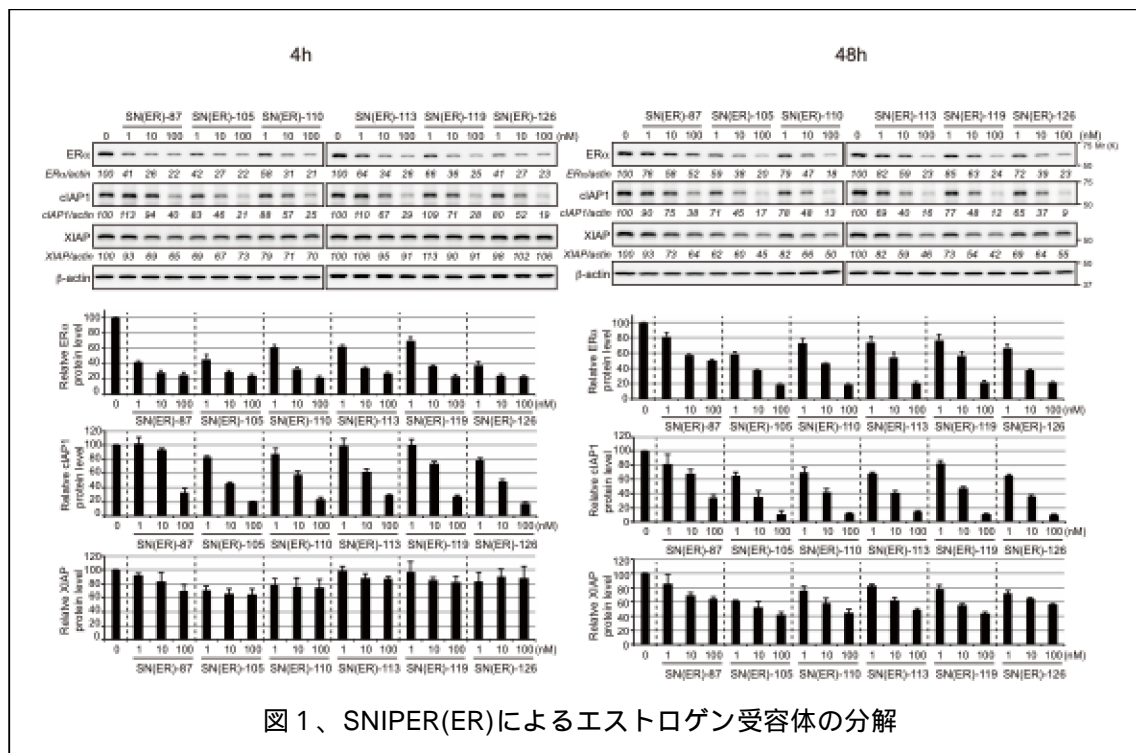


図1、SNIPER(ER)によるエストロゲン受容体の分解

(2) アンドロゲン受容体を標的とする SNIPER(AR)の開発

各種 IAP アンタゴニスト及び各種 AR アンタゴニストの組合せで、アンドロゲン受容体を標的とする SNIPER(AR)化合物を各種合成した。これらの SNIPER(AR)の中で SNIPER(AR)-51 は前立腺が

んに発現するアンドロゲン受容体を最も効率良く分解し(図2)、アンドロゲン依存的に増殖する前立腺がん細胞に対して選択的な抗がん活性を示した。

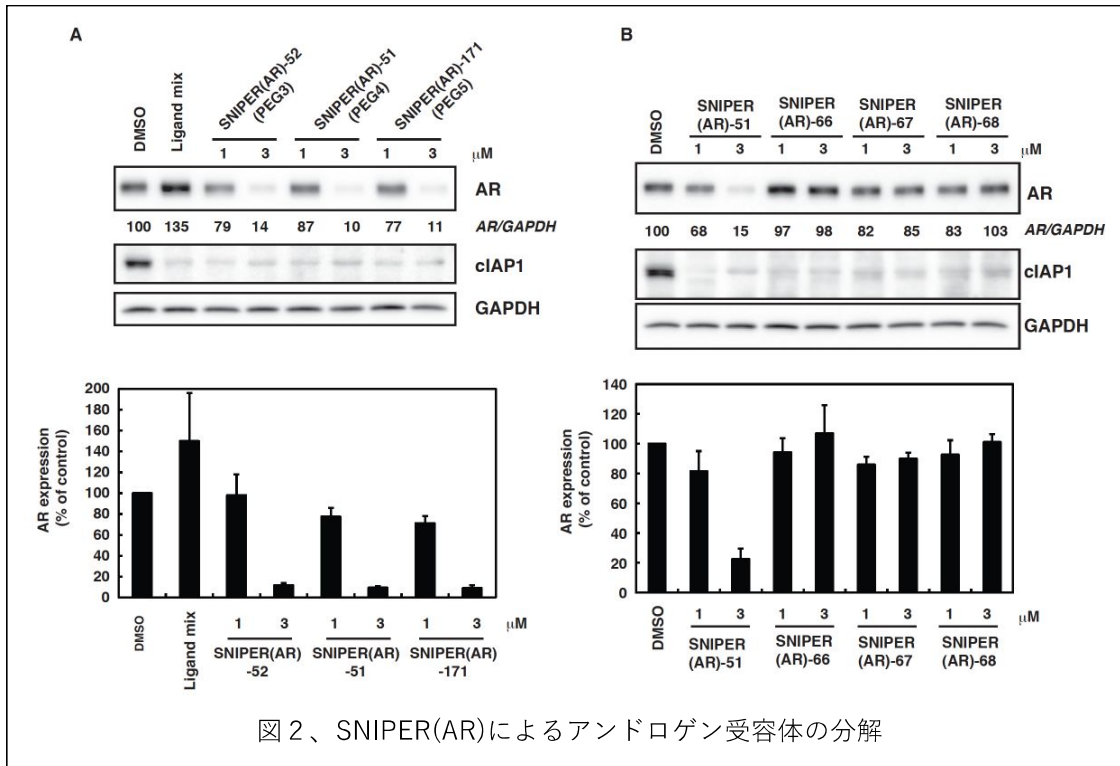


図2、SNIPER(AR)によるアンドロゲン受容体の分解

(3) BCR-ABL を標的とする SNIPER(ABL)の開発

各種 IAP アンタゴニスト及び各種 ABL 阻害剤の組合せで、BCR-ABL を標的とする SNIPER(ABL) 化合物を各種合成した。これらの SNIPER(ABL)の中で SNIPER(ABL)-39 は慢性骨髄性白血病(CML)に発現する融合キナーゼ BCR-ABL を最も効率良く分解し(図3) CML に対して選択的な抗がん活性を示した。キナーゼ阻害剤 Dasatinib 及び SNIPER(ABL)-39 を短時間処理後に薬剤を除去して CML 細胞を培養すると、Dasatinib で処理した CML 細胞は速やかに再増殖したが、SNIPER(ABL)-39 で処理した細胞では薬剤除去後も長期間にわたって CML 細胞の増殖を阻害し、多くの CML 細胞はアポトーシスを起こして死滅した。これらの結果から、標的タンパク質を分解する SNIPER には、標的タンパク質の活性を阻害する阻害剤とは異なる薬理活性を示す事が明らかになった。

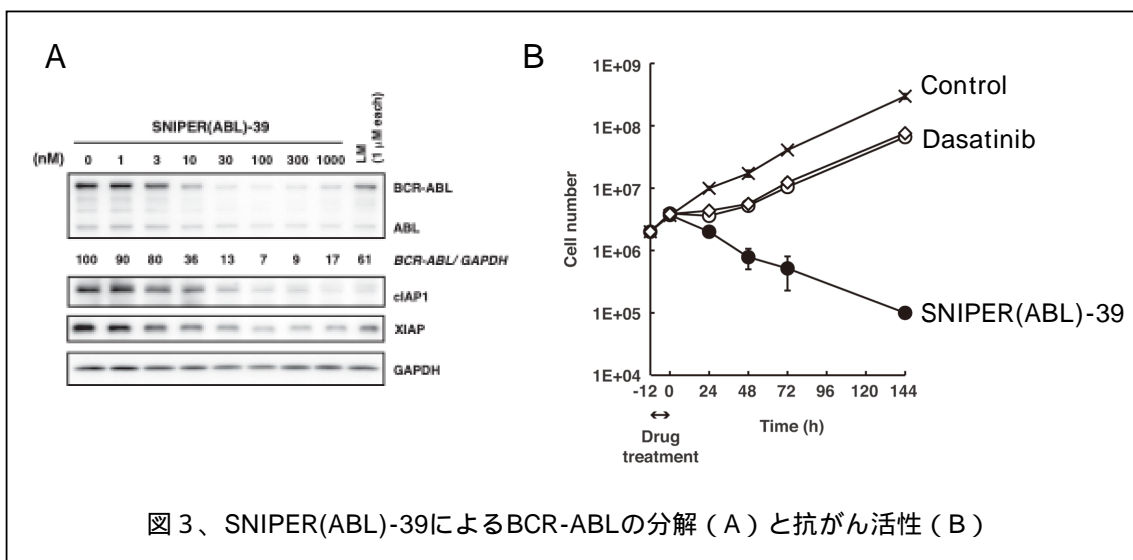


図3、SNIPER(ABL)-39によるBCR-ABLの分解(A)と抗がん活性(B)

(4) His タグタンパク質を標的とする SNIPER(ABL)の開発

His タグを認識するモチーフとして Ni-NTA を導入した SNIPER(His)を合成した。SNIPER(His)は親水性が高く細胞内への取り込み効率が悪かったが、膜透過性ペプチド等を利用して細胞内に導入することによって、His タグタンパク質の分解を引き起こす事ができた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1. Shibata N., Ohoka N., Hattori T., and Naito M. Development of a Potent Protein Degradator against Oncogenic BCR-ABL Protein. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. (2019) 67, 165-172. doi: 10.1248/cpb.c18-00703
2. Naito M., Ohoka N., Shibata N. SNIPERs-Hijacking IAP activity to induce protein degradation. *Drug Discovery Today: Technology* (2019) in press. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.12.002>.
3. Ohoka N., Ujikawa O., Shimokawa K., Sameshima T., Shibata N., Hattori T., Nara H., Cho N., and Naito M. Different Degradation Mechanisms of Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) by the Specific and Nongenetic IAP-Dependent Protein Eraser (SNIPER). *Chemical & pharmaceutical bulletin*. (2019) 67, 203-209. doi: 10.1248/cpb.c18-00567
4. Shibata N., Shimokawa K., Nagai K., Ohoka N., Hattori T., Miyamoto N., Ujikawa O., Sameshima T., Nara H., Cho N., and Naito M. Pharmacological difference between degrader and inhibitor against oncogenic BCR-ABL kinase. *Scientific reports*. (2018) 8, 13549. doi: 10.1038/s41598-018-31913-5
5. Shibata N., Nagai K., Morita Y., Ujikawa O., Ohoka N., Hattori T., Koyama R., Sano O., Imaeda Y., Nara H., Cho N., and Naito M. Development of Protein Degradation Inducers of Androgen Receptor by Conjugation of Androgen Receptor Ligands and Inhibitor of Apoptosis Protein Ligands. *Journal of medicinal chemistry*. (2018) 61, 543-575. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00168
6. Okitsu K., Hattori T., Misawa T., Shoda T., Kurihara M., Naito M., and Demizu Y. Development of a Small Hybrid Molecule That Mediates Degradation of His-Tag Fused Proteins. *Journal of medicinal chemistry*. (2018) 61, 576-582. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00413
7. Ohoka N., Morita Y., Nagai K., Shimokawa K., Ujikawa O., Fujimori I., Ito M., Hayase Y., Okuhira K., Shibata N., Hattori T., Sameshima T., Sano O., Koyama R., Imaeda Y., Nara H., Cho N., and Naito M. Derivatization of inhibitor of apoptosis protein (IAP) ligands yields improved inducers of estrogen receptor alpha degradation. *J Biol Chem*. (2018) 293, 6776-6790. doi: 10.1074/jbc.RA117.001091
8. Shimokawa K., Shibata N., Sameshima T., Miyamoto N., Ujikawa O., Nara H., Ohoka N., Hattori T., Cho N., and Naito M. Targeting the Allosteric Site of Oncoprotein BCR-ABL as an Alternative Strategy for Effective Target Protein Degradation. *ACS medicinal chemistry letters*. (2017) 8, 1042-1047. doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00247
9. Shibata N., Miyamoto N., Nagai K., Shimokawa K., Sameshima T., Ohoka N., Hattori T., Imaeda Y., Nara H., Cho N., and Naito M. Development of protein degradation inducers of oncogenic BCR-ABL protein by conjugation of ABL kinase inhibitors and IAP ligands. *Cancer Sci*. (2017) 108, 1657-1666. doi: 10.1111/cas.13284
10. Okuhira K., Shoda T., Omura R., Ohoka N., Hattori T., Shibata N., Demizu Y., Sugihara R., Ichino A., Kawahara H., Itoh Y., Ishikawa M., Hashimoto Y., Kurihara M., Itoh S., Saito H., and Naito M. Targeted Degradation of Proteins Localized in Subcellular Compartments by Hybrid Small Molecules. *Molecular pharmacology*. (2017) 91, 159-166. doi: 10.1124/mol.116.105569
11. 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., and Naito M. In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs). *J Biol Chem*. (2017) 292, 4556-4570. doi: 10.1074/jbc.M116.768853
12. Ohoka N., Nagai K., Shibata N., Hattori T., Nara H., Cho N., and Naito M. SNIPER(TACC3) induces cytoplasmic vacuolization and sensitizes cancer cells to Bortezomib. *Cancer Sci*. (2017) 108, 1032-1041. doi: 10.1111/cas.13198
13. Ohoka N., Misawa T., Kurihara M., Demizu Y., and Naito M. Development of a peptide-based inducer of protein degradation targeting NOTCH1. *Bioorg Med Chem Lett*. (2017) 27, 4985-4988. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.10.011
14. Hattori T., Okitsu K., Yamazaki N., Ohoka N., Shibata N., Misawa T., Kurihara M., Demizu Y., and Naito M. Simple and efficient knockdown of His-tagged proteins by ternary molecules consisting of a His-tag ligand, a ubiquitin ligase ligand, and a cell-penetrating peptide. *Bioorg Med Chem Lett*. (2017). doi: 10.1016/j.bmcl.2017.08.001
15. Okuhira K., Demizu Y., Hattori T., Ohoka N., Shibata N., Kurihara M., and Naito M. Molecular Design, Synthesis, and Evaluation of SNIPER(ER) That Induces Proteasomal Degradation of ERalpha. *Methods in molecular biology*. (2016) 1366, 549-560. doi:

10.1007/978-1-4939-3127-9_42

16. Ohoka N., Shibata N., Hattori T., and Naito M. Protein Knockdown Technology: Application of Ubiquitin Ligase to Cancer Therapy. *Current cancer drug targets*. (2016) 16, 136-146. doi:
17. Demizu Y., Shibata N., Hattori T., Ohoka N., Motoi H., Misawa T., Shoda T., Naito M., and Kurihara M. Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand. *Bioorg Med Chem Lett*. (2016) 26, 4865-4869. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.09.041
18. Demizu Y., Ohoka N., Nagakubo T., Yamashita H., Misawa T., Okuhira K., Naito M., and Kurihara M. Development of a peptide-based inducer of nuclear receptors degradation. *Bioorg Med Chem Lett*. (2016) 26, 2655-2658. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.04.013

〔学会発表〕(計 22 件)

1. キメラ型タンパク質分解薬 SNIPER の開発. 内藤幹彦、日本薬学会第 139 年会 (2019 年) (招待講演)
2. A novel strategy for destabilization of oncogenic fusion protein BCR-ABL to inhibit the growth of chronic myelogenous leukemia. ポスター、Norihiro Shibata, Nobumichi Ohoka, Mikihiko Naito、日本薬学会第 139 年会 (2019 年)
3. 新しいユビキチンリガーゼを利用して標的タンパク質を分解するキメラ化合物の開発、ポスター、大岡伸通、辻徹一郎、正田卓司、藤里卓磨、栗原正明、出水庸介、内藤幹彦、日本薬学会第 139 年会 (2019 年)
4. Recent Advances in Bifunctional Degradation Molecules (e.g. SNIPER) for Targeted Protein Degradation via the Ubiquitin Proteasome System; Status and Outlook. Mikihiko Naito、EFMC-ISMIC 2018 (2018 年)(招待講演)
5. Inducing target-specific protein degradation by SNIPER compounds recruiting IAP ubiquitin ligases, Mikihiko Naito、第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年)(招待講演)
6. 標的タンパク質を分解する新しい創薬技術、プロテインノックダウン法の開発. 内藤幹彦、第 91 回日本内分泌学会学術総会 (2018 年)(招待講演)
7. IAP による細胞死・細胞周期制御と IAP のユビキチンリガーゼ活性を利用したプロテインノックダウン法の開発. 内藤幹彦、平成 29 年度 日本がん分子標的治療学会 鶴尾隆賞受賞講演 (2018 年)(招待講演)
8. 標的タンパク質を分解するプロテインノックダウン技術の開発と創薬への応用. 内藤幹彦、第 62 回日本薬学会関東支部大会、(2018 年)(招待講演)
9. SNIPER によるプロテインノックダウン技術の開発、内藤幹彦、理研第 4 回 DMP 創薬ワークショップ (2018 年)(招待講演)
10. Development of Protein Knockdown Technology to Induce Selective Degradation of Target Proteins, Mikihiko Naito、薬物動態懇話会第 41 回年会 (2018 年)(招待講演)
11. IAP のユビキチンリガーゼ活性を利用した標的蛋白質分解誘導剤 SNIPER の開発. 内藤幹彦、日経バイオテクプロフェッショナルセミナー 低分子薬の新たなモダリティ: 標的蛋白質分解誘導薬の最前線 (2018 年)(招待講演)
12. Pharmacological difference between degrader and inhibitor against oncogenic BCR-ABL kinases, Norihiro Shibata, Nobumichi Ohoka, Takayuki Hattori, Mikihiko Naito、第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年)
13. Derivatization of IAP ligand to develop SNIPERs with improved protein knockdown and antitumor activity, Nobumichi Ohoka, Norihiro Shibata, Takayuki Hattori, Mikihiko Naito、第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年)
14. IAP を利用したプロテインノックダウン法の開発とがん原性タンパク質の分解, 口頭, 内藤幹彦、大岡伸通、柴田識人、服部隆行、日本薬学会第 138 年会 (2018 年)(招待講演)
15. Protein knockdown by SNIPER compounds recruiting IAP ubiquitin ligases, 口頭, Mikihiko Naito、2017 Chinese Medicinal Chemistry Symposium, CPA-EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (2017 年)(招待講演)。
16. Degradation of target proteins by SNIPER compounds recruiting IAP ubiquitin ligases, Mikihiko Naito, Nobumichi Ohoka, Norihiro Shibata, Takayuki Hattori, EMBO conference Ubiquitin and SUMO (2017 年)
17. Degradation of oncogenic proteins by SNIPER compounds. Mikihiko Naito, Nobumichi Ohoka, Norihiro Shibata, Takayuki Hattori、第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年)
18. プロテインノックダウン法を利用したアンドロゲン受容体タンパク質分解誘導剤の開発、柴田識人、大岡伸通、服部隆行、永井克典、伊東昌宏、奈良洋、長展夫、内藤幹彦、日本薬学会第 137 年会 (2017 年)
19. 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、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, 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年)
20. 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、大岡伸通, 柴田識人, 服部隆行, 内藤幹彦, 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年)
 21. 発がん因子 BCR-ABL を分解する低分子化合物の開発、柴田識人, 大岡伸通, 服部隆行, 内藤幹彦, 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年)
 22. 低分子化合物 SNIPER による *in vivo* プロテインノックダウン、大岡伸通, 奥平桂一郎, 服部隆行, 内藤幹彦, 第 20 回日本がん分子標的治療学会 (2016 年)

〔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、長展生、永井克典、伊東昌宏、宮本直樹、森田陽子、奈良洋、藤森郁男、宇治川治、本間実咲、前崎博信、森下奈央、下川賢一郎

権利者: 国立医薬品食品衛生研究所長

種類: 特許

番号: 特願 2016-196803

出願年: 2016 年

国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: アポトーシス阻害タンパク質リガンド - エストロゲン受容体リガンドハイブリッド化合物並びにそれを利用したエストロゲン受容体分解誘導剤及び乳癌、子宮頸癌又は卵巣癌の予防及び治療剤

発明者: 内藤幹彦、奥平桂一郎、出水庸介、栗原正明

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許

番号: 特許第 5934986 号

取得年: 2016 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/mtgt/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 服部隆行

ローマ字氏名: HATTORI TAKAYUKI

所属研究機関名: 国立医薬品食品衛生研究所

部局名: 遺伝子医薬部

職名: 主任研究官

研究者番号 (8 桁): 50377751

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 出水庸介

ローマ字氏名: DEMIZU YOSUKE

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。