

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16325

研究課題名(和文)スニチニブを基盤とする分子標的薬複合体の開発

研究課題名(英文)Development of sunitinib-based molecular targeted drug conjugates

研究代表者

堂浦 智裕(Doura, Tomohiro)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：00745226

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)：チロシンキナーゼ阻害剤は標的分子への選択性が高い分子標的薬として知られるが、受容体チロシンキナーゼにはほぼ共通するATP結合部位に結合するため、チロシンキナーゼ間での選択性はあまり高くない。そのためリガンドとタンパク質の選択性を高める観点から化学遺伝学(ケモジェネティクス)に着目し、野生型受容体のみ阻害し、変異型受容体は阻害しないリガンドの開発研究を実施した。その結果、複数のGタンパク質共役型受容体(GPCR)に対して上記のリガンドを見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リガンドの標的タンパク質への選択性を高めることは、細胞や生物個体のような多様なタンパク質が存在する環境中で特定タンパク質の機能を制御することを可能にするため、脳機能のような複雑な生命機能の解明につながる。また、リガンドの標的タンパク質への選択性の向上は薬の薬物標的への選択性の向上につながるため、創薬の観点からも重要な知見であると言える。

研究成果の概要(英文)：Although tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are known as a class of molecular targeted drugs, the subtype selectivity of TKIs are not very high because TKIs bind to the ATP binding sites which are common structures among receptor tyrosine kinases. In order to improve the selectivity of ligands to the target proteins, I performed the development of ligands which inhibit wild type receptors but not inhibit mutant receptors based on chemogenetics. As the results, I succeeded to discover the chemogenetic ligands for several G protein coupled receptors (GPCRs).

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケモジェネティクス リガンド 受容体 GPCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当時は、抗体-薬物複合体 (ADCs) やペプチド-薬物複合体 (PDCs) のような標的指向性分子と薬物分子を組み合わせた中分子キメラ分子の研究が進展していたが、これらの機能を保持しつつより化学合成が容易なキメラ分子として小分子-薬物複合体 (SMDCs) を考え、それを実現するための小分子標的指向性リガンドとして受容体チロシンキナーゼを標的とするスニチニブのようなチロシンキナーゼ阻害剤 (TKIs) に着目した。しかしながら、TKIs は受容体チロシンキナーゼに共通する ATP 結合部位に結合するため、サブタイプ間での選択性には乏しいものが多い。そのため、TKIs のような小分子リガンドの標的タンパク質への選択性を向上させることに主眼を置いた研究に注力することにした。

2. 研究の目的

「リガンドの標的タンパク質への選択性の向上」はケミカルバイオロジーや創薬における主要な課題の一つである。リガンドの標的タンパク質への選択性を高めることにより、細胞や生物個体のような多様なタンパク質が存在する環境中で特定タンパク質の機能を制御することが可能になるため、脳機能のような複雑な生命機能の解明につながる。そのため、脳機能に関連する受容体の精密制御を可能にする標的指向性の高いリガンドの開発を目指した。

3. 研究の方法

目的を達成するため、リガンドの構造だけでなく標的タンパク質の構造も作り変えることが可能なケモジェネティクスに着目した。ケモジェネティクスでは、リガンドの構造に合わせてタンパク質の構造に遺伝学的に変異を加えることにより、リガンドとタンパク質の結合性を自在に制御することが可能である。初めに、小脳運動学習に重要な代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ 1 (mGlu1) に着目し、mGlu1 選択的なアロステリック阻害剤である FITM との結合性について詳細に検討した。

mGlu1 と FITM の複合体に関する構造情報に基づいて mGlu1 の変異体ライブラリーの作製と FITM の誘導体化を実施した。mGlu1 は Gq タンパク質共役型の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であるため、受容体の活性化に伴い細胞内 Ca²⁺濃度が上昇する。そのため、細胞内 Ca²⁺濃度の変化を測定することにより FITM 誘導体による変異型 mGlu1 の阻害効果を測定した。また、FITM に蛍光色素 Cy3 を修飾した蛍光プローブ FITM-Cy3 を合成し、共焦点蛍光顕微鏡を用いた蛍光イメージングより FITM 誘導体の変異型 mGlu1 に対する結合評価を実施した。

mGlu1 に関するケモジェネティック制御に成功したため、この研究を通して見出したケモジェネティック制御法の適応拡大を目指し、mGlu1 が属する class C ではなく GPCR の最大ファミリーである class A に属するドーパミン D1 受容体 (DRD1) に対して同様の実験を実施した。

4. 研究成果

細胞内 Ca²⁺濃度変化測定に基づくスクリーニングの結果、野生型 mGlu1 を阻害する一方で変異型 mGlu1 を阻害しない FITM 誘導体を発見した。この FITM 誘導体は変異型 mGlu1 に結合できないものと考えていたが、蛍光プローブ FITM-Cy3 との競合結合実験より、この FITM 誘導体は変異型受容体に結合することが明らかとなった。また、FITM 誘導体の存在は変異型 mGlu1 のグルタミン酸応答性に変化を及ぼさなかった。すなわち、この FITM 誘導体は野生型 mGlu1 には阻害剤として働くネガティブアロステリックモジュレーター (NAM)、変異型 mGlu1 には阻害や活性化を誘起しないサイレントアロステリックモジュレーター (SAM) として機能するケモジェネティックリガンドであることが判明した。

この結果は解析対象となる受容体の細胞種選択的な解析を可能にする方法論の開発につながる。現在、mGlu1 変異体のノックインマウスおよび小脳特異的な mGlu1 変異体のコンディショナルノックインマウスを作製しており、小脳運動学習における mGlu1 の詳細な機能解析につなげる方針である。

また、class C の mGlu1 で成功した受容体への変異導入法を class A の DRD1 に適応した結果、DRD1 においても野生型 DRD1 を阻害する一方で変異型 DRD1 を阻害しないリガンドを発見することに成功した。この結果は、本研究で開発した GPCR ケモジェネティック制御法が class A と class C の GPCR に広く適用可能であることを示唆していると考えている。

GPCR を対象としたケモジェネティック制御法として DREADD が広く知られている。DREADD は

受容体への変異導入によって内在リガンド応答性を喪失させると共に、人工リガンドとの結合性を高め、人工リガンドによってのみ変異型受容体が活性化される受容体制御法である。この性質から、DREADD は変異型受容体を発現させた細胞への「分子スイッチ」として機能するが、内在リガンド応答性を喪失しているため、対象とする受容体の機能解析には適していない。一方、本研究で開発した GPCR のケモジェネティック制御法では変異型受容体が内在リガンドによる応答性を保持するように設計している。これにより、変異導入による受容体機能の喪失を防止しており、対象とする受容体の生命機能における機能解析を可能にしている。そのため、本研究により開発された GPCR のケモジェネティック制御法は次世代のケモジェネティクスの形を示唆していると言える。

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 Ojima Kento, Shiraiwa Kazuki, Soga Kyohei, Doura Tomohiro, Takato Mikiko, Komatsu Kazuhiro, Yuzaki Michisuke, Hamachi Itaru, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 12
2. 論文標題 Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-21082-x	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 Senoo Akinobu, Yamada Yutaro, Ojima Kento, Doura Tomohiro, Hamachi Itaru, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 9
2. 論文標題 Orthogonal Activation of Metabotropic Glutamate Receptor Using Coordination Chemogenetics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Chemistry	6. 最初と最後の頁 825669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fchem.2021.825669	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 Ojima Kento, Kakegawa Wataru, Yamasaki Tokiwa, Miura Yuta, Itoh Masayuki, Michibata Yukiko, Kubota Ryou, Doura Tomohiro, Miura Eriko, Nonaka Hiroshi, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Yuzaki Michisuke, Hamachi Itaru, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 -
2. 論文標題 Coordination chemogenetics for activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.10.01.462737	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13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堂浦 智裕、長谷川 寛太、清中 茂樹
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体のin vivo活性制御を指向した新たな化学遺伝学的手法の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川 寛太、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体の細胞外ループに注目した新たな化学遺伝学手法の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堂浦 智裕、長谷川 寛太、清中 茂樹
2. 発表標題 細胞外ループ工学によるGPCR化学遺伝学(3): アロステリックサイトに着目した代謝型グルタミン酸受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 佑真、杓野 拓光、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 細胞外ループ工学によるGPCR化学遺伝学(2): ECL3に着目したアデノシン受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柏 俊太郎、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 細胞外ループ工学によるGPCR化学遺伝学(1): ECL2に着目したヒスタミン受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堂浦 智裕、長谷川 寛太、清中 茂樹
2. 発表標題 GPCRの新たな化学遺伝学(1)細胞外ループ工学の提唱
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川 寛太、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 GPCRの新たな化学遺伝学(2)Bump x Bump法によるグルタミン酸受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 妹尾 暁暢、山田 裕太郎、小島 憲人、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 配位ケモジェネティクス法によるGPCR型グルタミン酸受容体の直交的活性制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴畑 祐貴、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 Extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC) [3]: アロステリックサイトに着目した代謝型グルタミン酸受容体1の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 佑真、杓野 拓光、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 Extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC) [2]: - 相互作用に基づく変異アデノシンA2A受容体の選択的阻害
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏 俊太郎、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 Extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC) [1]: ECL2に着目したドーパミンD1受容体の活性制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 佑真、杓野 拓光、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 結合速度論に着目したアデノシンA2A 受容体のケモジェネティクス制御
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

1. 発表者名 柏 俊太郎、堂浦 智裕、清中 茂樹
2. 発表標題 立体障害に基づくドーパミン受容体のケモジェネティクス制御
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0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 変異型Gタンパク質共役型受容体	発明者 清中 茂樹、堂浦 智裕、長谷川 寛太、柏俊太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-028956	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 変異型Gタンパク質共役型受容体	発明者 清中茂樹、堂浦智裕、長谷川寛太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-033798	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	清中 茂樹 (Kiyonaka Shigeki)		

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
---------	---------