

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08297

研究課題名(和文) 特異的抗体を用いた新規標的タンパク質分解誘導薬によるメラノーマ治療薬の開発に挑む

研究課題名(英文) Optimizing targeted protein degradation for the therapeutic applications against melanoma

研究代表者

矢澤 重信 (Yazawa, Shigenobu)

岐阜大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30392153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ユビキチン-プロテアソーム系を利用したプロテインノックダウン法による標的タンパク質分解誘導化合物(PROTAC)という新しいタイプの創薬手法が注目を集めている。本研究では、メラノーマに対する新規な治療法を開発するために、PROTAC法の有効性を評価するための研究を行った。メラノーマ発症に關与する変異型Nrasを認識するscFvとE3ユビキチンリガーゼであるSPOPのC末ドメインを融合させた融合タンパク質(scFv-SPOP)を発現させたところ細胞増殖の抑制が認められた。本研究結果から、PROTAC法はメラノーマ治療に対する有望なアプローチ法であることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欧米では15人に1人が生涯にわたってメラノーマを発症すると報告されている。中でも転移性のメラノーマは極めて致死率が高く、深刻な疾患である。オゾン層の破壊による紫外線被曝量の増加によって、メラノーマの生涯発症率はさらに増加することが懸念されており、一刻も早く有効な治療法が確立されることが望まれている。近年、PROTAC法とよばれる細胞内の特定のタンパク質を破壊する手法が考案され、さまざまな疾患への応用研究が進められている。本研究は、メラノーマ治療に対するPROTAC法の有効性を検討する目的で行い、メラノーマ患者の約20%で認められる変異型Nrasを標的としたタンパク質分解系の有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the effectiveness of the proteolysis-targeting chimera (PROTAC) approach in achieving targeted protein degradation in melanoma cells for therapeutic applications. Given the frequent implication of Nras gene mutations in melanoma progression, targeted abrogation of mutated Nras represents a promising strategy for eradicating melanomas driven by this mutation. Here, we employed the PROTAC approach by overexpressing a fusion protein comprising a C-terminal fragment of the E3 ubiquitin ligase, SPOP, and a single-chain variable fragment (scFv) antibody against mutant Nras. We assessed the impact of this fusion protein on melanoma cells dependent on mutated Nras. Our findings suggest that this approach has significant potential to suppress melanoma growth, offering a novel therapeutic avenue against malignant melanomas.

研究分野：分子生物学

キーワード：メラノーマ PROTAC 標的タンパク質分解 抗がん剤 Nras ユビキチン E3ユビキチンリガーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

メラノーマは皮膚の悪性黒色腫であり、特に欧米において発症率が高いことが知られている。近年、オゾン層の破壊による紫外線暴露の増加などによって、白人を中心とした欧米諸国ではメラノーマ発症率が増加傾向にある。特に、オーストラリアやニュージーランドでは成人の60人につき1人が生涯にわたりメラノーマに罹患する状況で、大きな社会問題となっている。メラノーマ発症の初期段階では主に外科的切除が行われ、予後は比較的良好である。一方、メラノーマの転移が認められる場合は、治療が困難であり極めて高い致死率となる。近年では、免疫チェックポイント阻害剤や、BRAF や MEK 阻害剤のような分子標的療法が開発され、一定の有効性を示しているが、全ての患者がこれらの治療法に反応するわけではなく、治療抵抗性を示す症例も数多く存在する。そのため、より効果的な治療法の開発が強く求められている。

NRAS は低分子量 GTPase ファミリー分子の1つであり、メラノサイトの細胞増殖や生存シグナルの伝達に関与している。NRAS 遺伝子の変異はメラノーマ患者の約20%に認められ、遺伝子変異によって生じた恒常的活性化型 NRAS タンパク質は細胞の生存や異常増殖を促すことによって腫瘍の悪性化に大きく寄与していると考えられている。とりわけ、NRAS 変異は進行性の早いメラノーマで頻繁に認められ難治性の原因となっている。近年、メラノーマ治療のための創薬研究が進歩し、BRAF 阻害剤や MEK 阻害剤など RAS/RAF/MEK/ERK 経路を阻害する薬剤が開発され、既に臨床の場で使用され一定の効果が認められている。一方、NRAS 遺伝子変異をもったメラノーマに対しては、これらの阻害剤が効果が限定的であり、恒常的活性化型 NRAS そのものを阻害する薬剤の開発が期待されている。

一般的に、RAS ファミリー分子に対する阻害薬を創出することは困難である。RAS ファミリー分子は広範な細胞活動に関与しているので、野生型 RAS の GTPase そのものを阻害してしまうとさまざまな副作用が生じることが予想される。そのため、変異型 RAS のみを選択的に阻害する阻害剤を開発することが必要とされる。さらに、RAS は薬剤とタンパク質との強力な結合に必要な疎水性ポケットが分子表面上に存在しないことから、低分子有機化合物を使った創薬が難しい“Undruggable”な創薬標的分子であると認識されている。そこで、近年では低分子有機化合物による創薬に加え、さまざまなモダリティーを駆使して RAS ファミリー分子に対する創薬が試みられている。

近年、ユビキチン-プロテアソーム系を利用したプロテインノックダウン法による標的タンパク質分解誘導薬(PROTAC)という新しいタイプの創薬研究が注目を集めている。PROTAC 法では標的タンパク質とユビキチンリガーゼ複合体を Molecular Glue (モレキュラーグルー：分子糊)と呼ばれる化合物によって人為的に結合させることによって標的タンパク質のユビキチン化を誘導し、プロテアソームによって標的タンパク質を分解・除去する。これによって標的タンパク質の機能を阻害することが可能になる。PROTAC 法の最大の利点は Undruggable な創薬標的タンパク質に対しても応用が可能な点である。そこで、本研究では、メラノーマ細胞における PROTAC 法によるタンパク質ノックダウンの有効性を検証することを目的に研究を行った。また、メラノーマの代表的なドライバー変異の1つである NRAS に注目し、変異型 NRAS を特異的に認識する単鎖可変領域フラグメント(scFv)と E3 ユビキチンリガーゼの融合タンパク質をメラノーマ細胞に発現させることによって NRAS タンパク質を PROTAC 法によってプロテインノックダウンすることによって阻害することを試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では、メラノーマに対する新規な治療法を開発するために、メラノーマ細胞における PROTAC 法の有効性を評価するための研究を行った。現状の PROTAC 法の問題点は、標的タンパク質とユビキチンリガーゼ複合体を結合させる役割を担う Molecular Glue となる適切な化合物を見出すことが困難なことである。これに対する解決策として、本研究では単鎖可変領域フラグメント(scFv)またはナノボディと E3 ユビキチンリガーゼの複合体結合ドメインを融合させたタンパク質を Molecular Glue として用いることを考え、その有効性について評価を行った。最終的には、本研究で得られた成果に基づき、メラノーマの増殖や生存に重要な働きをしている MITF や NRAS、SLUG などのタンパク質を標的とした治療薬を開発することを目標とする。

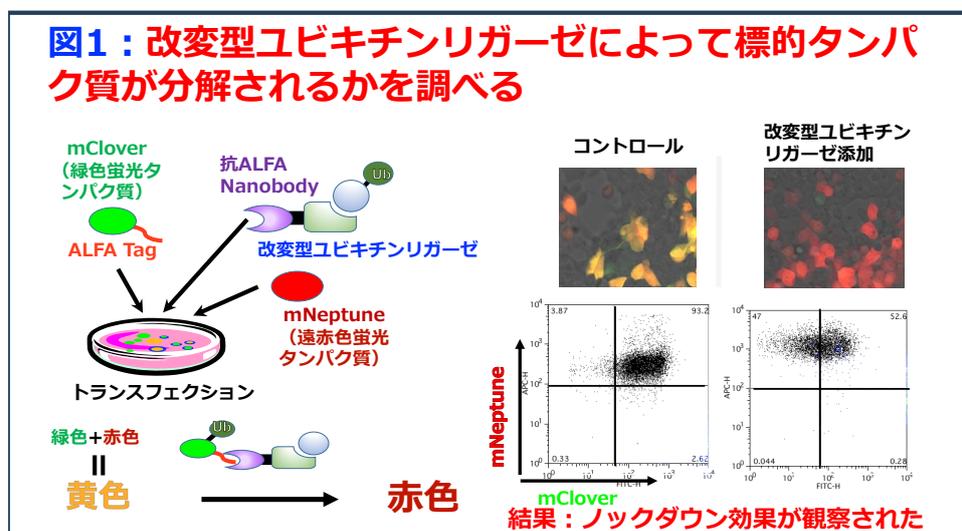
## 3. 研究の方法

上記のような最終目標を達成するための足掛かりとして、本研究では以下の実験を行っ

### 3-1 mClover3-ALFA を強制発現させた 293T 細胞の取得と抗 ALFA ナノボディと VHL 融合タンパク質発現コンストラクトの作成

標的タンパク質をプロテアソーム系で分解させるためには、PROTAC 法によって標的タンパク質とユビキチン酵素複合体とを結合させユビキチン化させる必要がある。そこで、標的タンパク質とユビキチン酵素複合体とを結合させるための Molecular Glue として標的タンパク質を特異的に認識するナノボディと E3 ユビキチンリガーゼのユビキチン化酵素複合体結合部位を繋げた融合タンパク質を用いるというアイデアを着想するに至った。このような手法の有効性を検証するために、標的タンパク質として C 末端に ALFA タグを付加した mClover3 緑色蛍光タンパク質(mClover3-ALFA)を 293T 細胞に強制発現させ (293T/mClover3-ALFA 細胞)、緑色蛍光強度の変化をフローサイトメーターで測定することによってタンパク質のノックダウン効率を定量化することができるアッセイ系を構築した (図 1)。293T/mClover3-ALFA 細胞に対し、内部標準として mNeptune2 遠赤色蛍光タンパク質を発現させるとともに、Molecular Glue として ALFA タグを特異的に認識するこの結果よ C 末側のユビキチン化酵素複合体との結合部位を融合させたタンパク質を強制発現させた。その後、Molecular Glue を発現させた場合と発現させなかった場合との間

で mClover3 の緑色蛍光強度をフローサイトメーターを用いて比較した。

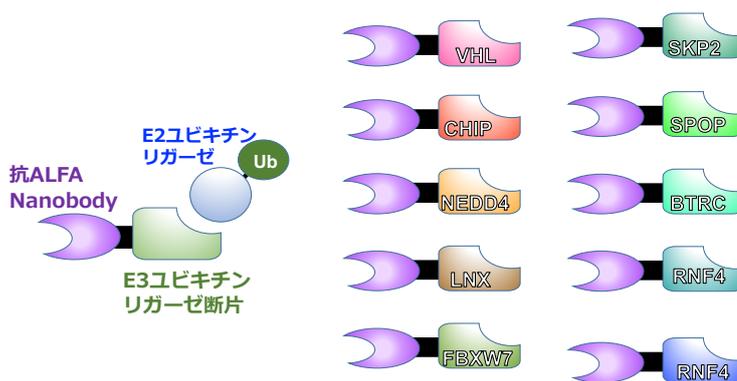


### 3-2 NeonGreen-ALFA を発現させた B16 メラノーマ細胞の取得と抗 ALFA ナノボディと各種 E3 ユビキチンリガーゼとの融合タンパク質発現コンストラクトの作成

ヒトゲノム上には 600 種類以上の E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子が存在すると推定されており、それぞれの E3 ユビキチンリガーゼのユビキチン化能は細胞種毎に異なることがわかっている。そこで、メラノーマ細胞において効果的にタンパク質をノックダウンさせることができる E3 ユビキチンリガーゼを選択するために、代表的な 10 種の E3 ユビキチンリガーゼについて、それぞれ ALFA タグを特異的に認識するナノボディ (ALFA-Nb) との融合タンパク質をテトラサイクリン誘導的に発現させるベクターを作製した (図 2)。これらのベクターを、予め mNeonGreen-ALFA を強制発現させた

B16 メラノーマ細胞にトランスフェクションし、mNeonGreen-ALFA タンパク質の蛍光強度をフローサイトメーターによって測定することによってプロテインノックダウン効率について比較検討を行った。

**図2：より高いノックダウン効率を示す改変型ユビキチンリガーゼをスクリーニングする**



### 3-3 NRAS 依存性メラノーマ細胞に対する NRAS タンパク質ノックダウン効果の解析

Proof-of-concept 実験としてメラノサイトのがん化に関与する活性変異型 NRAS を認識する単鎖可変領域フラグメント (scFv) 抗体と SPOP の C 末ドメインを融合させた融合タンパク質 (scFv-SPOP) を発現させるためのベクターを作製し、このベクターを活性変異型 NRAS 依存的に増殖するヒトメラノーマ細胞株 WM3060、C8161、SK-Mel-2、および活性変異型 Braf 依存的に増殖するヒトメラノーマ細胞株 SK-Mel-28、A2058 にトランスフェクションし scFv-SPOP を強制発現させ、細胞増殖に与える影響について MTT アッセイによって解析を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1 ナノボディと E3 ユビキチンリガーゼの融合タンパク質は Molecular Glue として機能する。

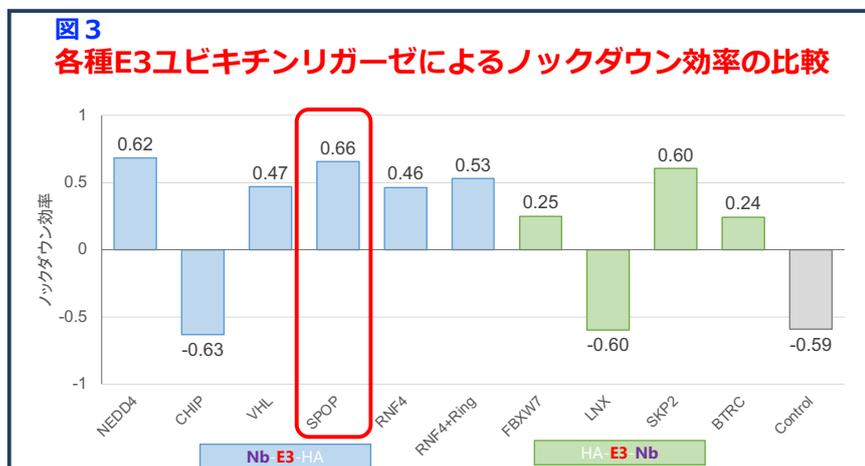
PROTAC 法では、特異的かつ人為的に標的タンパク質をとユビキチン酵素複合体とを結合させることによって、標的タンパク質をユビキチン化させプロテアソーム系によって分解させる。このためには、両者を結合させ、効率的にユビキチン化を誘導する事ができる Molecular Glue が必要である。本研究では、ALFA タグを特異的に認識しかつ細胞質可溶性を有するナノボディ (NbALFA) と E3 ユビキチンリガーゼ VHL の C 末側ドメインの融合タンパク質 (NbALFA-VHL) を Molecular Glue として使用し、そのタンパク質ノックダウン誘導能について ALFA タグを付加した mClover の蛍光強度を指標に評価した。その結果、図 1 に示したように、mClover3-ALFA を強制発させた 293T 細胞に対し ALFA-Nb-VHL を強制発現させたところ、mClover の蛍光強度が低下することが認められ、ALFA-Nb-VHL によって標的タンパク質の発現をノックダウンすることがで

きる事が確認された。この結果より、ナノボディと E3 ユビキチンリガーゼの融合タンパク質が PROTAC 法における Molecular Glue として有効であることがわかった。

#### 4-2 メラノーマ細胞において効果的にタンパク質をロックダウンさせることができる E3 ユビキチンリガーゼを同定した。

E3 ユビキチンリガーゼは様々なファミリー分子によって構成されている。それぞれのファミリー分子のユビキチン化能は細胞系譜ごとに大きく異なることがわかっている。そこで、メラノーマ細胞で効果的にタンパク質のユビキチン化を誘導することができる E3 ユビキチンリガーゼを同定するための実験を行った。

NbALFA と 10 種類の異なるファミリーに属する E3 ユビキチンリガ



ーゼをそれぞれ結合させた融合タンパク質を発現するベクターを作製し、それらを mNeonGreen-ALFA を強制発現させた B16 メラノーマ細胞にトランスフェクションした。その後、mNeonGreen の蛍光強度の低下をフローサイトメータによって測定し、ロックダウン効率を算出した。その結果、図 3 に示したように、E3 ユビキチンリガーゼとして SPOP の C 末ドメインを用いた場合に高いロックダウン効率を得られることが判明した。したがって、以後は SPOP の C 末ドメインを用いて実験を行なった。

#### 4-3 活性変異型 NRAS を標的とした PROTAC 法によってメラノーマ細胞の増殖を抑制する

PROTAC 法における Molecular Glue として活性変異型 NRAS を特異的に認識する scFv と SPOP との融合タンパク質をヒトメラノーマ細胞で強制発現させた。ヒトメラノーマ細胞として、NRAS 依存的に増殖するヒトメラノーマ細胞株 WM3060、C8161、SK-Mel-2、および活性変異型 Braf 依存的に増殖するヒトメラノーマ細胞株 SK-Mel-28、A2058 を用いて、scFv-SPOP を強制発現させた後の細胞増殖に与える影響について比較検討を行った。その結果、活性型 NRAS 依存的に増殖するヒトメラノーマ細胞株に scFv-SPOP を強制発現させた場合にのみの細胞増殖の抑制が認められ、本アプローチ法の有効性が示唆された。

本研究成果から、PROTAC 法はメラノーマ治療に対する有望なアプローチ法であることが考えられた。また、PROTAC 法を用いることによって活性型 NRAS 変異体のような Undruggable な分子に対しても阻害効果を発揮することができることが判明した。メラノーマに関しては NRAS に加え、MITF や NF1、活性型 BRAF などの分子も創薬標的分子となりうる。これらの分子と特異的に結合するナノボディーや scFv を取得することができれば、本研究で用いたアプローチ法によって Molecular Glue を作製すれば、タンパク質ロックダウンが可能になると思われ、メラノーマに対する創薬について途を拓く事ができると考えられる。また、ナノボディーや scFv を用いることによって、これまで Undruggable な創薬標的と考えられていた分子に対しても阻害効果を発揮する事ができることから、本手法は、メラノーマに対する創薬に限らず、他のさまざまな疾患の治療にも応用が可能であると思われる。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nasrin Morsheda, Ahmed Osama, Han Xujun, Nojebuzzaman Md, Abo Ahmed Ahmed I., Yazawa Shigenobu, Osawa Masatake	4. 巻 36
2. 論文標題 Generation of <i>Pmel</i> dependent conditional and inducible Cre driver mouse line for melanocytic targeted gene manipulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pigment Cell & Melanoma Research	6. 最初と最後の頁 53 ~ 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pcmr.13074	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	大沢 匡毅  (Osawa Masatake)  (10344029)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授    (13701)	

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