

ケミカルノックダウン技術 CANDDY を用いたアンドラッグブル ターゲット分解による創薬戦略

宮本悦子*・今西 哲・黄 麗娟

要旨：がん遺伝子パネルの保険収載により、本格的にプレジジョン医療の時代が到来したが、有効な分子標的薬が存在しない変異は未だに数多く残されている。疾患関連タンパク質の 75%程度は阻害剤の設計が困難なアンドラッグブルターゲットであると考えられている。アンドラッグブルターゲットを攻略できる戦略として、標的タンパク質を分解に導くタンパク質分解技術が注目されている。しかし、技術上の困難から、真にアンドラッグブルなタンパク質の分解には未だ成功していない。我々は、独自に開発したケミカルノックダウン技術 CANDDY を用いて、代表的なアンドラッグブルターゲット KRAS 変異体の分解に成功した。本稿では、KRAS 分解剤を例に、CANDDY を用いた新しい創薬戦略を紹介したい。

KEYWORDS: ケミカルノックダウン技術、KRAS、アンドラッグブルターゲット

1. 序論

2019 年 6 月にがん遺伝子パネル検査が保険適応となり、プレジジョン医療の時代が本格的に幕を開けた。これにより、個々の患者のがんに存在する変異を明らかにし、最適な治療を選択することが可能となった。しかし同時に、有効な治療戦略の存在しない遺伝子変異を持つ患者には、従来の治療法を踏襲するしかないという現実が浮き彫りとなっている。何より大きな問題は、有効な治療薬が存在する患者の方が少ないということである。現在、臨床で使用される分子標的薬のほとんどは、タンパク質の機能を阻害する『阻害剤』である。一般に阻害剤には、標的タンパク質の機能ドメインまたは制御ドメインに強く結合して占有することが求められる。そのためには、標的タンパク質に阻害剤が結合できるポケットが存在する必要がある。しかし、現在知られている疾患関連タンパク質のおよそ 75%には適切なポケットが存在せず、阻害剤の設計は困難だと考えられている。このようなタンパク質は“アンドラッグブルターゲット”と呼ばれている¹⁻³⁾。

我々は阻害剤に変わる新たな創薬戦略として、独自に CANDDY (Chemical knockdown with Affinity aNd

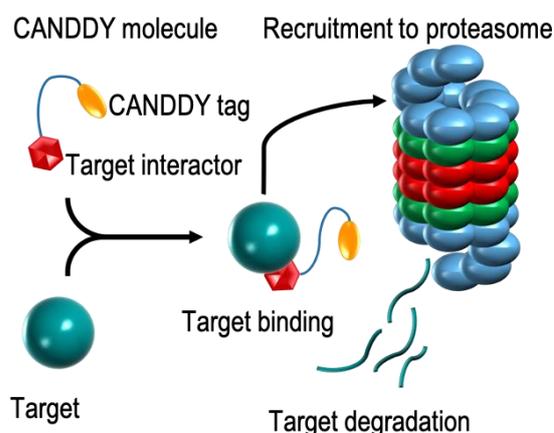


図 1. CANDDY の概要 CANDDY は、標的を直接プロテアソーム依存的分解に誘導する。

Degradation Dynamics) と名付けたケミカルノックダウン技術を開発してきた⁴⁾。もともと細胞には、ユビキチン-プロテアソーム系と呼ばれるタンパク質を分解するシステムが備わっている^{5,6)}。不要になったタンパク質にはユビキチンが鎖状に結合する(ユビキチン化)。ユビキチン化されたタンパク質は選択的にプロテアソームにリクルートされ、プロテアソームのプロテアーゼ活性によって分解される。CANDDY は『標的に結合する化合物』と『プロ

『テアソーム結合タグ』をリンカーでつないだ CANDDY 分子を用いて、標的タンパク質を直接プロテアソームに誘導する(図1)。標的タンパク質はユビキチン化されないままに、プロテアソームで分解される。CANDDY 分子は標的に結合するだけでよく、阻害活性は不要である。類似の技術として PROTAC が知られている⁵⁻⁸⁾。PROTAC は『標的に結合する化合物』と『ユビキチン化酵素親和性タグ』をリンカーでつないで作成される。標的タンパク質は、選択的にユビキチン化され、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。PROTAC も、CANDDY と同様に阻害活性は不要である。そのためアンドラッグブルターゲットを攻略できる戦略として期待が寄せられている。しかしユビキチン化依存的な PROTAC をアンドラッグブルターゲットに適応するには、課題が残されている⁹⁾。ヒトゲノムにはユビキチン化酵素と推定される遺伝子がおおよそ 600 種類見出されているが、現在 PROTAC に使用可能なユビキチン化酵素親和性分子は 10 種類程度しかない。そのため、PROTAC で分解できる標的の種類には大きな制限があると考えられる。また、ユビキチン化は分解以外のシグナルにもなりうるため、不適切なユビキチン化が想定外の結果をもたらすリスクがある⁹⁾。一方、プロテアソームはほとんどのタンパク質を分解できるため、CANDDY は原理上、標的を選ばずに適応でき、想定外の副作用が生じるリスクも小さい。

本稿では CANDDY を用いて、代表的なアンドラッグブルターゲット KRAS 変異体の分解を試みた成果を報告したい。野生型 KRAS は細胞増殖を正に制御する因子で、正常な生体機能の維持のために重要な役割を担っている。しかし変異によって持続的に活性化されると、細胞のがん化を引き起こしてしまう¹⁰⁻¹³⁾。特に KRAS G12C 変異体や G12D 変異体、G12V 変異体は、肺癌や膵臓癌、大腸癌で非常に高頻度に検出されることから、これらの癌の治療標的として注目されてきた¹³⁾。およそ 40 年に及ぶ研究の結果、最近になって KRAS G12C 変異体に選択的な阻害剤 Sotorasib が FDA により承認された¹⁴⁾が、その他の変異体の阻害剤は開発途上である。KRAS の制御に関わるタンパク質との相互作用を阻害する薬剤の開発なども試みられている¹¹⁾が、臨床応用に達したものは未だ無い。そこで我々は CANDDY を応用して KRAS G12D 変異体、G12V 変異体の分解剤を設計し、その抗がん作用について検討を行った。

2. CANDDY による KRAS 分解剤の創製

CANDDY の新規性を確立するには、ユビキチン化不要なプロテアソームによる直接的分解誘導というコンセプトの実証が欠かせない。そこで最初に、KRAS 分解剤の作用機序や、標的への選択性を無細胞実験系と、細胞実験系によって検証した。さらにはがん細胞株を用いて、KRAS 分解剤の抗がん活性を *in vitro* と *in vivo* で評価した。

2.1 KRAS 分解剤の作用機序

標的結合部位には既報の RAS-SOS inhibitor を用いた¹¹⁾。RAS はグアニンヌクレオチドと結合するが、GTP 結合型が活性型、GDP 結合型が不活性化型である¹⁵⁾。不活性化 RAS から GDP を抜き取り、GTP に交換するのが SOS1 というタンパク質である。RAS-SOS inhibitor は RAS と SOS1 のインタラクションを阻害し RAS の活性化を妨げるが、RAS への親和性、阻害活性は共に弱い¹¹⁾。分解誘導タグは、プロテアソーム阻害剤 MLN-2238 の主要な阻害活性部位を取り除いて作成した(図2a)。RAS-SOS inhibitor と分解誘導タグをアルキル鎖で結合し、RAS 分解剤 TUS-007 を作成した(図2b)。

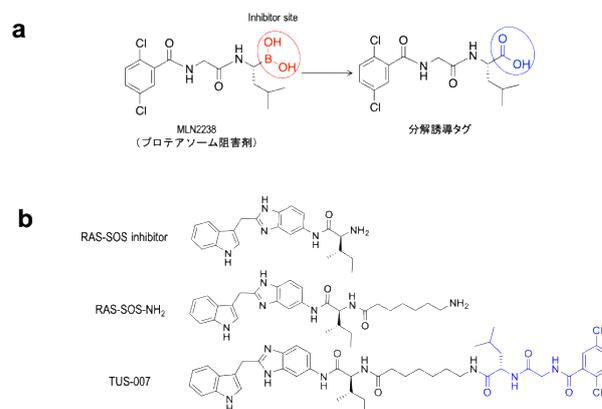


図2. 分解誘導タグと TUS-007 の構造

a. 分解誘導タグは MLN2238 の阻害活性部位を除去して作成した。b. RAS-SOS-NH₂ と TUS-007 の構造。

CANDDY は標的タンパク質を、直接プロテアソーム依存的分解へと導く。そこで、TUS-007 にプロテアソーム阻害活性が残存していないかを検討した。プロテアソームには3つの活性サブユニット(β1、β2、β5)が存在するが、TUS-007 はいずれのサブユニットに対しても阻害活性を示さなかった(Data not shown)。また、熱シフトアッセイという手法を用いて、TUS-007 の標的への親和性を評価した。タンパク質はリガンドと結合すると、結合の強さに応じて熱ストレスに耐性となる。熱シフトアッセイ

は熱ストレス耐性を指標に、化合物とタンパク質の親和性を評価する。驚くべきことに、KRAS G12D 変異体、KRAS G12V 変異体のいずれに対しても、TUS-007 は RAS-SOS inhibitor よりも高い親和性を示した (図 3a)。

CANDDY はそのメカニズム上、標的・プロテアソーム・分解剤の 3 つからなるシンプルな系で分解活性を評価することが可能である。精製 KRAS G12D 変異体・26S プロテアソーム・TUS-007 を混合して 37°C でインキュベートしたところ、KRAS G12D 変異体が減少することが確認された (図 3b)。この減少は、プロテアソーム阻害剤の存在によって抑制された。RAS-SOS inhibitor や、分解誘導タグを持たない合成中間体 (RAS-SOS-NH₂) では減少は見られず、TUS-007 が分解誘導タグ依存的に標的を分解することが示された。

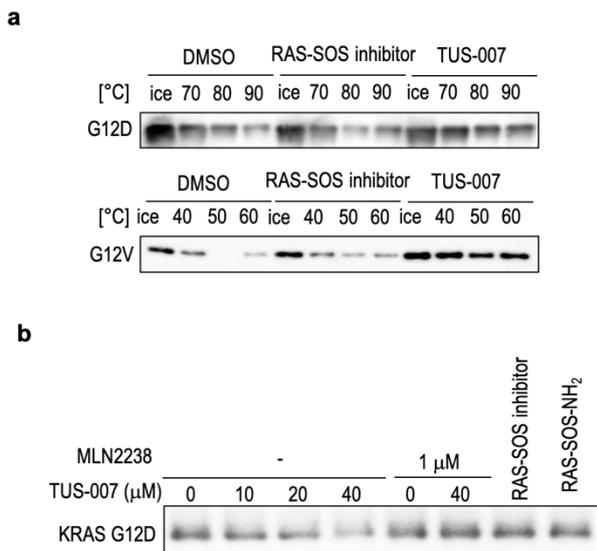


図 3. TUS-007 の標的親和性と分解誘導

a. TUS-007 は RAS-SOS inhibitor よりも高い標的親和性を示した。b. TUS-007 による標的分解は、プロテアソーム依存性である。

さらに、TUS-007 による KRAS G12D 変異体の分解メカニズムを探るため、HeLa 細胞に GFP 融合 KRAS G12D を強制発現させて FACS による解析を行った。TUS-007 は単独で GFP シグナルを低下させたが、プロテアソーム阻害剤との共処理では GFP シグナルの低下が抑制された (図 4)。一方、ユビキチン化酵素阻害剤や分子シャペロン阻害剤は、TUS-007 による GFP シグナルの低下に影響しなかった (図 4)。このことから、TUS-007 によるプロテアソーム依存的分解はユビキチン化を必要としないことが証明された。

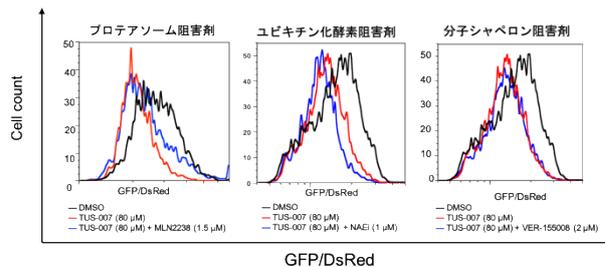


図 4. TUS-007 の作用機序 TUS-007 による標的の分解はプロテアソームに依存するが、ユビキチン化酵素や分子シャペロンは必要ない。

2.2 KRAS 分解剤の標的選択性

KRAS は配列相同性から HRAS、NRAS と RAS ファミリーを形成している。これら全てを阻害する pan-RAS 阻害剤の開発が試みられたこともあるが、動物実験で強い毒性が見られ頓挫した¹⁶⁾。RAS-SOS inhibitor は KRAS G12D 変異体、G12V 変異体以外に、野生型 KRAS、野生型 HRAS に結合できることが報告されている¹¹⁾。このような背景を考えると、TUS-007 の標的選択性を明らかにしておく必要がある。そこで、RAS-less MEF という特殊な細胞を用いて、TUS-007 の標的選択性を評価した。RAS-less MEF は遺伝子操作によって RAS ファミリーを欠失させたマウスの胎仔線維芽細胞に由来する。内在の RAS ファミリーの代わりに、ヒトの野生型または変異型 RAS を 1 種類だけ発現させて株化された、数種類の細胞からなるコレクションである。これらの細胞は発現している RAS に依存して増殖するため、増殖抑制を指標に、RAS 標的薬の標的選択性を評価できる。TUS-007 は KRAS G12D、KRAS G12V、野生型 KRAS、野生型 HRAS を発現する RAS-less MEF の増殖を抑制した (図 5)。実際、これらの細胞から抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、それぞれの RAS が分解されていることも裏付けられた (図 5)。一方、KRAS

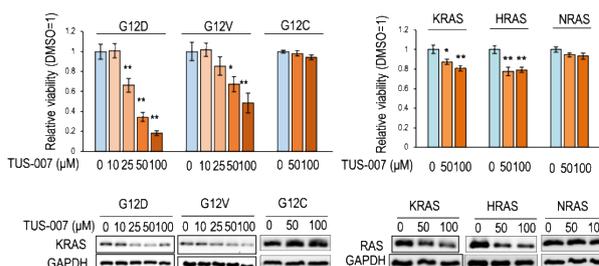


図 5. TUS-007 の標的選択性 TUS-007 は pan-RAS 分解剤ではない。

G12C 変異体または、野生型 NRAS を発現している RAS-less MEF では、増殖に影響はなく、RAS タンパク質の分解も検出されなかった (図 5)。このことから、TUS-007 は pan-RAS 分解剤ではないことが確認され、強い毒性は回避できると考えられた。TUS-007 の標的選択性は、RAS-SOS inhibitor の標的選択性を反映していると考えられる。

2.3 KRAS G12V 陽性大腸癌への TUS-007 の効果

KRAS G12V 変異は大腸癌患者の半数程度にみとめられ、予後不良とも関連している¹³⁾。そこで、大腸癌細胞を用いて、TUS-007 の抗がん活性の評価を行った。TUS-007 は大腸癌細胞株 SW620-Luc で KRAS G12V を分解し (図 6a)、また濃度依存的にアポトーシスを誘導していた (図 6b)。合成中間体 RAS-SOS-NH₂ はアポトーシスを誘導せず、SW620-Luc におけるアポトーシス誘導には KRAS G12V の分解が必要であることが示唆された。さらに、SW620-Luc をヌードマウスの皮下に移植し TUS-007 を腹腔内投与したところ、腫瘍の成長が有意に抑制でき (図 6c)、腫瘍内の KRAS G12V が分解されていることも確認できた (図 6d)。

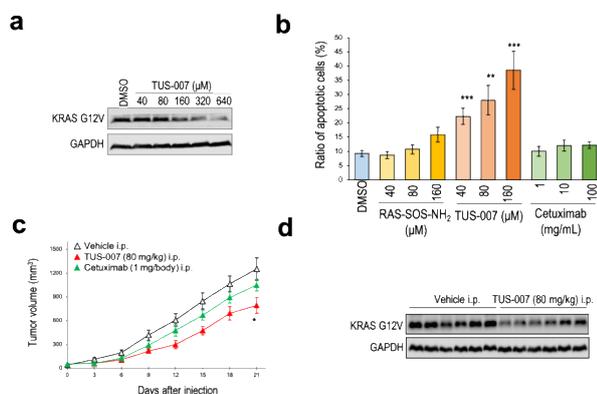


図 6. TUS-007 の大腸癌への効果 a. SW620-Luc における KRAS G12V の分解誘導。 b. SW620-Luc におけるアポトーシス誘導。 c. 皮下移植した SW620-Luc の腫瘍体積。 d. 皮下移植した SW620-Luc における KRAS G12V の分解誘導。

2.4 KRAS G12D 陽性膵臓癌への TUS-007 の効果

KRAS の変異は膵臓癌患者の 90%にみとめられ、KRAS G12D 変異が最も高頻度で予後不良とも関連している¹³⁾。そこで膵臓癌細胞を用いて、TUS-007 の抗がん活性の評価を行った。TUS-007 は膵臓癌細胞株 SW1990 で KRAS G12D を分解した (図 7a)。また TUS-007 によるアポトーシス誘導はプロテアソーム阻害剤によって抑制されたが、ユビキチン化阻害剤では抑制されなかった (図 7b)。このことから、SW1990 のアポトーシス誘導は、ユビキチン化

非依存的な標的分解によることが示唆された。SW1990 をヌードマウスの皮下に移植し TUS-007 を経口投与したところ、腫瘍の成長が有意に抑制でき (図 7c)、腫瘍内の KRAS G12D が分解されていることも確認できた (図 7d)。加えて、腫瘍内で KRAS の下流シグナルの活性化が抑制されていることも確認できた (図 7d)。

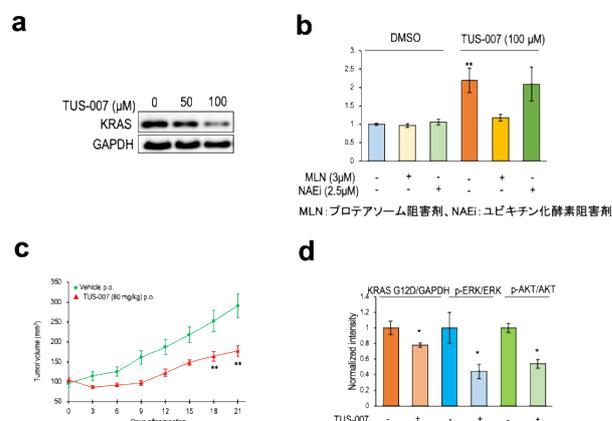


図 7. TUS-007 の膵臓癌への効果 a. SW1990 における KRAS G12D の分解誘導。 b. SW1990 におけるアポトーシス誘導。 c. 皮下移植した SW1990 の腫瘍体積。 d. 皮下移植した SW1990 における KRAS G12D の分解誘導と RAS シグナルの抑制。

2.5 同所移植した膵臓癌への TUS-007 の効果

上記のように TUS-007 は皮下移植した腫瘍の成長を抑制できたが、体内で実際に患部に到達できるかは明らかではない。そこで、膵臓癌細胞をヌードマウスの膵臓に移植し、TUS-007 の経口投与で膵臓癌の発育を抑制できるか検討した。移植には SW1990 にルシフェラーゼを導入した SW1990-Luc を使用し、ルシフェラーゼによる化学発光強度に基づく in vivo 生体イメージングによって腫瘍の成長を評価した。TUS-007 の経口投与は、同所移植した腫瘍の成長も抑制し (図 8a、b)、腫瘍内の TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞を増加させた (図 8c)。また、腫瘍内の KRAS G12D 分解も確認された (図 8d)。このことから、TUS-007 は膵臓に到達して抗がん作用を発揮できることが証明された。

3. 結語

本稿では、KRAS 分解剤を例に、我々が独自に開発したケミカルノックダウン技術 CANDDY を紹介した。KRAS G12D 変異体や G12V 変異体は、代表的なアンドラッグターゲットであるが、TUS-

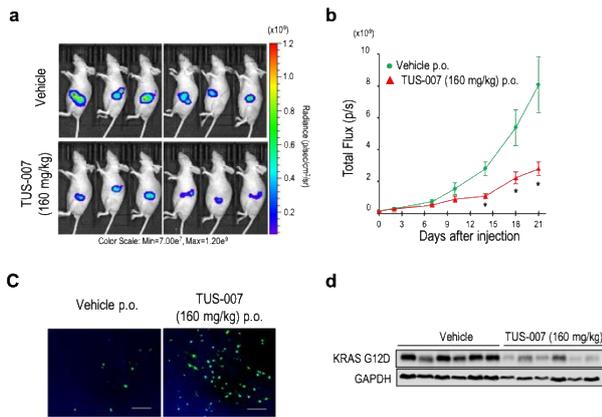


図 8. 同所移植した膵臓癌への効果 a. SW1990-Luc 腫瘍の生体内イメージング。b. 腫瘍の化学発光強度。c. 腫瘍内のアポトーシス細胞。d. 腫瘍における KRAS G12D の分解。

007 はこれらを分解することに成功した。驚いたことに、TUS-007 は標的結合部位に用いた RAS-SOS inhibitor よりも高い標的親和性を示した。RAS に限らず、アンドラッグターゲットには高親和性の化合物が少ない。CANDDY を用いることで、阻害効果は低いが高親和性が向上することがあるならば、これまで薬になることがなかったような低親和性の化合物も、分解剤のパーツとして使用できる可能性がある。真にアンドラッグターゲットを攻略できる創薬技術の確立を目指して、CANDDY をさらに進化させて行きたい。

謝辞

本稿に示した研究は、文部科学省新産業創出プログラム START (START プログラム: 962238) の支援を受けて実施した。また一部は (株) FuturedMe との共同研究として実施した。特に、同社の石坂正道博士、山口知宏博士、岩崎陽一氏には多大な協力を頂いた。ここに謝意を表したい。末尾ではあるが、本稿執筆の機会を頂いた『日本女性科学者の会』の諸先生方に深謝する。

参考文献

- 1) Khan, I., Rhett, J. M. & O'Bryan, J. P. Therapeutic targeting of RAS: New Hope for drugging the “undruggable”. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1867**, 118570 (2020).
- 2) Fujimori, S., et al. Next-generation sequencing coupled with a cell-free display technology for high-throughput production

of reliable interactome data. *Sci. Rep.* **2**, 691 (2012).

- 3) Scott, D. E., Bayly, A. R., Abell, C. & Skidmore, J. Small molecules, big targets: Drug discovery faces the protein-protein interaction challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 533–550 (2016).
- 4) Imanishi, S., et al. *In vivo* KRAS G12D/V Degradation Mediated by CANDDY Using a Modified Proteasome Inhibitor. *bioRxiv*. 2021.04.23.441075
- 5) Cromm, P. M. & Crews, C. M. Targeted protein degradation: From chemical biology to drug discovery. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1181–1190 (2017).
- 6) Pettersson, M. & Crews, C. M. PROTeolysis TARgeting Chimeras (PROTACs) - Past, present and future. *Drug Discov. Today Technol.* **31**, 15–27 (2019).
- 7) Deshaies, R. J. Multispecific drugs herald a new era of biopharmaceutical innovation. *Nature* **580**, 329–338 (2020).
- 8) Scudellari, M. Protein-slaying drugs could be the next blockbuster therapies. *Nature* **567**, 298–300 (2019).
- 9) Dohlman, H. G. & Campbell, S. L. Regulation of large and small G proteins by ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **294**, 18613–18623 (2019).
- 10) Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K. & McCormick, F. Dragging Ras back in the ring. *Cancer Cell* **25**, 272–281 (2014).
- 11) Sun, Q., et al. Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 6140–6143 (2012).
- 12) Canon, J., et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* **575**, 217–223 (2019).
- 13) Hobbs, G. A., Der, C. J. & Rossman, K. L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 1287–1292 (2016).
- 14) Blair, H. A. Sotorasib: First Approval. *Drugs*. **81**, 1573–1579 (2021).
- 15) Sheridan, C. Grail of RAS cancer drugs within reach. *Nat. Biotechnol.* **38**, 6–8 (2020).
- 16) Welsch, M. E., et al. Multivalent small-molecule pan-RAS inhibitors. *Cell* **168**, 878–889.e29 (2017).

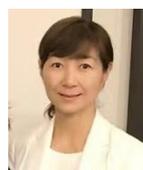
PROFILE



宮本 悦子 Etsuko Miyamoto-Sato
所属 東京理科大学 総合研究院
[学歴] 横浜国立大学大学院 工学研究科 物質工学専攻 博士課程修了 (博士 (工学))
[職歴] 日本 IBM、東芝情報通信研究所を経て、2000 年 4 月から慶應義塾大学助教、講師、准教授。2011 年 4 月から、東京大学医科学研究所インタラクティブ医科学社会連携部門 部門長。2014 年 10 月より東京理科大学にて JST-START 宮本プロジェクトなどを経て、2019 年 4 月より教授。令和 3 年度 内閣府 女性のチャレンジ賞受賞。
[専門] ケミカルバイロジ、ゲノム生物学、進化分子工学



今西 哲 Satoshi Imanishi
所属 東京理科大学 総合研究院
[学歴] 京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻 博士課程修了 (博士 (農学))
[職歴] 国立環境研究所、東京大学などでポスドクを務めた後、2013 年 4 月より東京医科大学 医学総合研究所 助教。2019 年 4 月より東京理科大学講師。
[専門] 腫瘍生物学、毒性学、薬理学



黄 麗娟 Lijuan Huang
所属 東京理科大学 総合研究院
[学歴] 東京大学大学院 医学系研究科 博士課程修了 (博士 (保健学))
[職歴] 2012. 04-2014. 09 東京大学大学院 医学系研究科/医科学研究所 研究員 (育児休業あり)、2014. 10~現在 東京理科大学 研究員・助教・講師
[専門] 看護学・保健学、分子生物学

**Drug-development Strategy for Undruggable Targets
Using a Novel Target Degradation Technology CANDDY**

Etsuko Miyamoto-Sato, Satoshi Imanishi, Lijuan Huang

Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-0022, Japan

Abstract: Although the new era of precision medicine has come in Japan, the disease relating mutations without effective drugs are still remained. It is considered that the inhibitor development is not so easy for 75% of known disease relating proteins so-called “undruggable targets”. The protein degradation technology, which can induce ubiquitination of target protein, is expected to unlock undruggable targets, while it is still difficult because of the technological challenges included in current protein degradation technology. We have succeeded to induce degradation of the true undruggable targets KRAS G12D and G12V using originally developed chemical knockdown technology named CANDDY. In this report, we would outline the novel drug-development strategy for undruggable targets using CANDDY with an example of development of KRAS G12D/V degrader.

Keywords: Chemical knockdown technology, undruggable targets, KRAS