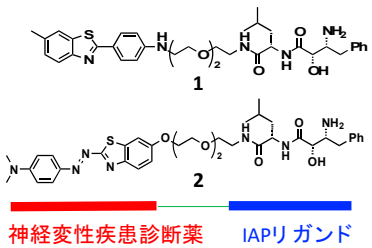
| 3　ケミカルノックダウンを利用した神経変性疾患治療薬 | 石川　稔 |
|---|---|

【目的】神経変性疾患は、異常凝集した疾患原因タンパク質が脳内に蓄積して、神経細胞が障害を受けることにより発症すると考えられている。一方、標的タンパク質分解薬 PROTAC（proteolysis targeting chimera）は、ユビキチンリガーゼリガンドと標的タンパク質リガンドを、リンカーを介して連結した分子である。PROTAC は、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質を物理的に近接させることにより、標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームで分解させる。我々は、PROTAC の低分子化に成功したノウハウを活用し、異常凝集したタンパク質に特異的に結合する神経変性疾患診断薬と IAP リガンドを連結した低分子が、神経変性疾患の一種であるハンチントン病の原因タンパク質およびその可溶性凝集体量を減少させることを見出した。しかしながらこの化合物の、神経細胞に対する保護作用や動物モデルによる有効性評価には至っていない。そこで本研究では、この低分子の活性増強、薬物動態改善を指向した構造展開を実施し、動物モデルで有効性を示す化合物の創製を目指す。

【方法】異常凝集したタンパク質に特異的に結合する神経変性疾患診断薬と、ユビキチンリガーゼリガンドや疎水性タグをそれぞれ連結した分子を合成した。神経変性タンパク質が発現している細胞に上記合成化合物を処理し、ウェスタンブロット法などにより標的タンパク質の存在量を、蛍光顕微鏡により可溶性凝集体量を評価した。更に、プロテアソーム依存的に標的タンパク質が減少していることを、プロテアソーム阻害薬の併用処理実験により確認した。

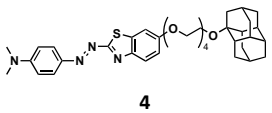
【結果】神経変性疾患診断薬とユビキチンリガーゼリガンドを連結した低分子 PROTAC1、2 が、ハンチントン病原因タンパク質の他に、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の原因タンパク質である変異 atrophin-1 や、脊髄小脳失調症の原因タンパク質である変異 ataxin-7、変異 ataxin-3 も分解誘導できることが明らかになった。経口薬・中枢薬にとって重要な物理化学的性質として、分子量や、水素結合の受容体数・供与体数が知られている。このことから、PROTAC1、2 の分子量を削減、また水素結合の受容体数・供与体数を削減することで、薬物動態改善や、それに伴う分解活性向上を期待した。そして、アダマンチル基などの疎水性タグと標的タンパク質リガンドを連結させた分子が、変性タンパク質の構造的特徴である疎水性部分構造を標的タンパク質表面に担持することにより、標的タンパク質を品質管理機構に認識・分解させる疎水性タグ法に着目した。そして、PROTAC2 の IAP リガンドを、アダマンチル基などの疎水性タグに変換した連結低分子 3、4 などを合成した。疎水性タグ連結低分子 3 が生細胞において、ハンチントン病原因タンパク質の存在量を減少させ、可溶性凝集体量も減少させることが明らかになった。更に、最も強い活性を有する疎水性タグ連結低分子 4 は、血液脳関門を透過する標準化合物よりも、血液脳関門の透過性が高い可能性が、IAM カラムを用いた *in vitro* 予備実験により示唆された。

ハンチントン病原因タンパク質分解 PROTAC を起点とした研究成果




ハンチントン病原因タンパク質
を分解するPROTAC

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症原因タンパク質、
脊髄小脳失調症の原因タンパク質も分解




in vitro予備試験で
血液脳関門を透過

ハンチントン病原因タンパク質
を分解する疎水性タグ連結分子

# 3. ケミカルノックダウンを利用した神経変性疾患治療薬

石川　稔

東北大学 大学院生命科学研究科 活性分子動態分野

Key words：PROTAC，疎水性タグ，創薬化学，神経変性疾患，ポリグルタミン病

## 緒　言

神経変性疾患は、異常凝集した疾患原因タンパク質が脳内に蓄積して、神経細胞が障害を受けることにより発症すると考えられている。疾患原因タンパク質は共通して、クロスβシート構造を多く有する構造へ変性し易く、これが容易に凝集して毒性の高い可溶性凝集体を経て、不溶性凝集体を形成する。神経変性疾患に対する低分子創薬は進んでいないのが現状である。この一因として、タンパク質本来の機能が神経変性疾患を引き起こすのではなく、凝集体による細胞障害が疾患原因であるのに対し、低分子創薬の主流はタンパク質の機能制御であることが挙げられる。

細胞内のタンパク質は、ユビキチン–プロテアソーム系（図 1a）と呼ばれるタンパク質分解経路により分解される。ユビキチンリガーゼ（E3）は、不要となった細胞内の基質タンパク質に特異的に結合し、ユビキチンを連続的に付与する。ヒトのユビキチンリガーゼは 600 種類以上あり、それぞれのユビキチンリガーゼが、基質となるタンパク質を特異的にユビキチン化する。加水分解酵素を含む複合体プロテアソームは、ポリユビキチン鎖を認識し、ユビキチン化されたタンパク質を加水分解する。

標的タンパク質分解薬 PROTAC（proteolysis targeting chimera）は、ユビキチンリガーゼリガンドと標的タンパク質リガンドを、リンカーを介して連結した分子である（図 1b）［1］。PROTAC は、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質を物理的に近接させることにより、ユビキチンリガーゼの基質タンパク質ではない標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームで分解させる。疾患関連タンパク質の存在量を減少させる PROTAC は、タンパク質の機能を制御する従来の低分子創薬手法と異なることから、創薬ニューモダリティをして脚光を浴びている。

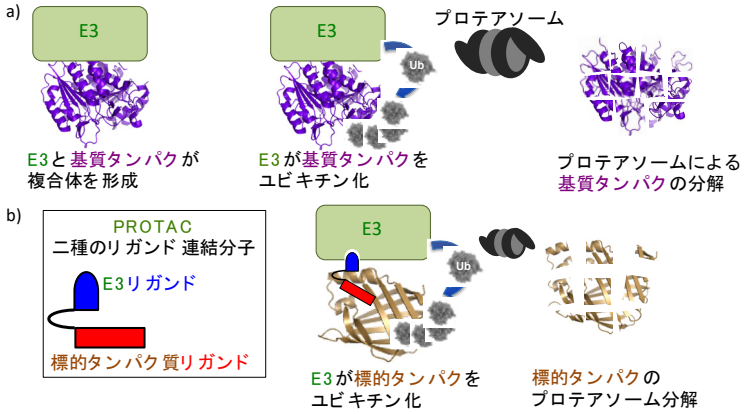



図 1. ユビキチンプロテアソーム系と標的タンパク質分解薬 PROTAC

a) 細胞内の基質タンパク質は、酵素ユビキチンリガーゼ（E3）によってユビキチン化修飾を受け、プロテアソームによって分解される。

b) 二種のリガンド連結分子PROTACは、E3と標的タンパク質を物理的に近接させ、標的タンパク質のユビキチン化・プロテアソーム分解に導く。

我々は、ユビキチンリガーゼの一種 IAP（inhibitor of apoptosis protein）に対する低分子リガンドと標的タンパク質リガンドを連結させた低分子により、PROTAC の低分子化に初めて成功した（図 2a）［2］。更に、神経変性タンパク質の異常凝集構造（連続したクロスβシート構造）に特異的に結合する神経変性疾患診断薬と、IAP リガンドを連結した低分子 PROTAC1、2 が、神経変性疾患の一種であるハンチントン病の原因となる凝集性タンパク質（変異ハンチンチン）の存在量および可溶性凝集体量を減少させることも見出した（図 2b）［3］。しかしながら、PROTAC の神経細胞に対する保護作用や、動物モデルによる有効性評価には至っていない。さらに、我々が見出した低分子 PROTAC は分子量が大きく、中枢薬らしい構造とは言えない。そこで本研究では、この低分子の他の神経変性疾患原因タンパク質に対する有効性や、化合物の分解活性増強、薬物動態改善を指向した構造展開を実施し、動物モデルで有効性を示す化合物の創製を目指した。

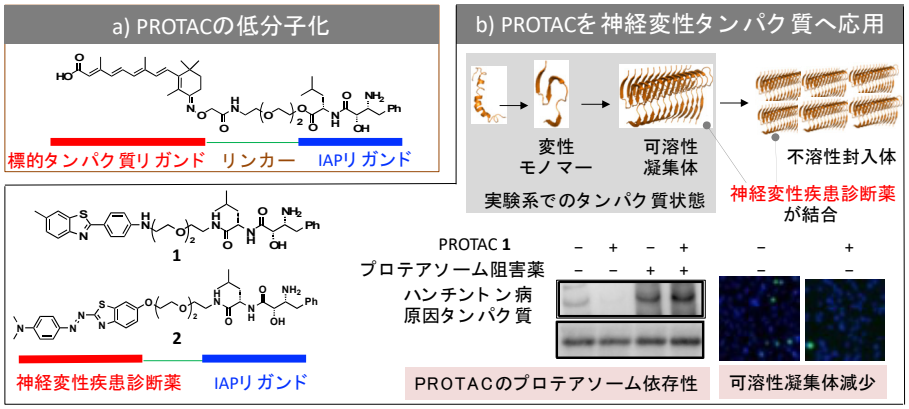



図 2.　これまでの PROTAC 研究

a)　PROTACの低分子化。

b)　神経変性疾患診断薬とIAPリガンド連結低分子によって、ハンチントン病の原因となる凝集性タンパク質を分解誘導できることを示した。

## 方　法

**1. ハンチントン病以外の神経変性疾患の原因タンパク質に対する有効性評価**

変異 ataxin-3、変異 ataxin-7、変異 atrophin-1 をそれぞれ発現する細胞を、Coriell Institute for medical research から入手した。これらの細胞に PROTAC1、2 を処理した。24～48 時間後に細胞を破砕し、ポリグルタミン抗体を用いたウェスタンブロット法により、神経変性タンパク質の存在量を評価した。

**2. 疎水性タグ連結分子による神経変性タンパク質分解**

疎水性タグと神経変性疾患診断薬を連結した分子を、図 4 に示した経路で合成した。

子宮頸がん由来 HeLa 細胞に、GFP を融合したグルタミンが 145 残基連なったハンチントン病原因タンパク質である変異ハンチンチン（145QmHtt-exon1-EGFP）を遺伝子導入した。遺伝子導入の 24 時間後、生細胞に化合物を処理した。化合物処理の 24 時間後、細胞を破砕し、ポリグルタミン抗体を用いたウェスタンブロット法により、変異ハンチンチン量を評価した。また化合物のスクリーニングにおいては、ポリグルタミン抗体を用いたウェスタンブロット法の代わりに、EGFP の蛍光強度を総タンパク数（BCA 法）により補正した値により、変異ハンチンチン量を評価した。

145QmHtt-exon1-EGFP を遺伝子導入すると、可溶性凝集体が蛍光顕微鏡で輝点として観測される。この輝点の数をカウントし、核染色面積で細胞数を補正した値を、相対凝集体量として評価した。

**3. 血液脳関門（BBB）透過の外挿評価**

各化合物における IAM（Immobilized Artificial Membrane）カラムの保持時間を測定した。文献に従い、$k_{IAM}$（＝IAM カラム保時時間／IAM カラムのホールドアップタイム）／（分子量）$^4$を算出した。

## 結果および考察

### 1. ハンチントン病原因タンパク質以外の神経変性タンパク質に対する有効性［4］

ハンチントン病の他にも、ポリグルタミンが異常に伸長した変異タンパク質が原因となる遺伝性神経変性疾患が知られており、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症は変異 atrophin-1 が、脊髄小脳失調症は変異 ataxin-7、変異 ataxin-3 が、疾患の原因とされている。そこでこれらに対する一般性を確認すべく、変異 atrophin-1、変異 ataxin-7、変異 ataxin-3 をそれぞれ発現する細胞に PROTAC1､2 を処理したところ､分解誘導濃度は標的タンパク質によって異なるものの、これらタンパク質を分解誘導できることが明らかになった（図 3a）。メカニズムを解析したところ、PROTAC 処理後 12 時間後に標的タンパク質減少が確認され、時間依存的にタンパク質減少活性が強くなることが明らかになった（図 3b）。更に、IAP リガンドや、PROTAC1 に利用した神経変性疾患診断薬 BTA の単独処理、またそれらの併用処理では標的タンパク質減少が認められなかったことから、PROTAC の連結構造が重要であることが示唆された。PROTAC とプロテアソーム阻害薬 epoxomicin の併用処理で標的タンパク質減少活性がキャンセルされたことから、標的タンパク質はプロテアソームによって分解されていることも確認された。以上の結果より、ハンチントン病原因タンパク質を分解誘導した PROTAC1、2 は、他の神経変性タンパク質（変異 atrophin-1、変異 ataxin-7、変異 ataxin-3）も分解誘導できることが示され、本法の一般性も示すことができた。PROTAC1、2 の神経変性タンパク質リガンドは、神経変性タンパク質に共通する連続するクロスβシート構造に結合する化合物であることから、他の様々な神経変性タンパク質も減少できることが期待される。

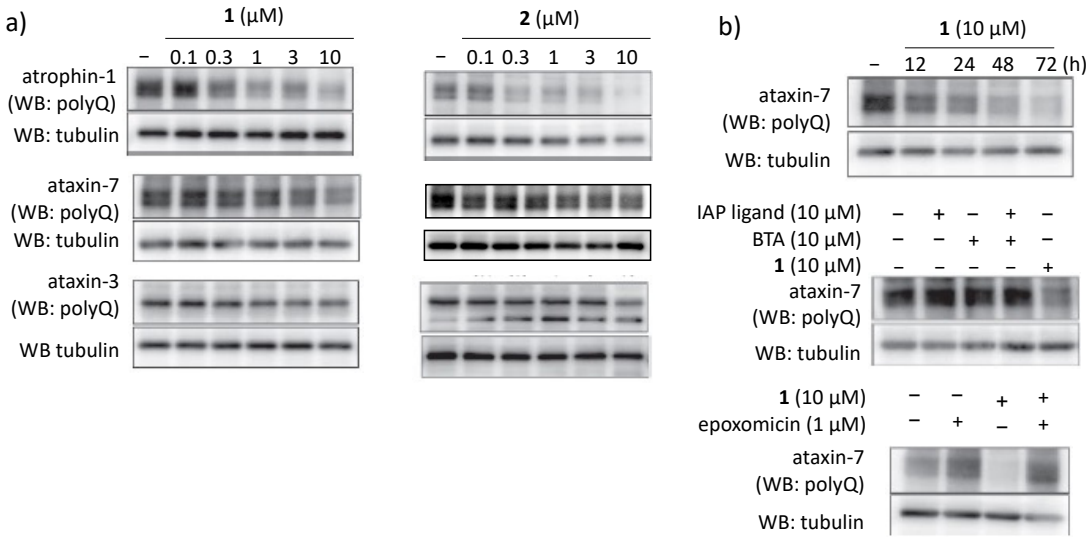



図 3. 種々の神経変性タンパク質に対する PROTAC の効果

a） 変異atrophin-1、変異ataxin-7、変異ataxin-3に対するPROTAC1、2の分解活性。

b） PROTACの作用メカニズム解析。

### 2. 疎水性タグ法を利用した神経変性タンパク質の分解誘導

細胞内には、変性タンパク質を分解するタンパク質の品質管理機構が存在する。すなわち変性タンパク質は、正しく折り畳まれたタンパク質では内側に存在するはずの疎水性アミノ酸側鎖が、外側（水との境界面）に露出している構造的特徴を有する。この疎水性アミノ酸側鎖を熱ショックタンパク質 70 などが認識し、これらと相互作用するユビキチンリガーゼによって変性タンパク質はユビキチン修飾を受け、分解される。疎水性タグ法とは、アダマンチル基などの疎水性タグと標的タンパク質リガンドを連結させた分子が、変性タンパク質の構造的特徴である疎水性部分構造を標的タンパク質表面に担持することにより、標的タンパク質を品質管理機構に認識・分解させる方法である。

経口薬・中枢薬にとって重要な物理化学的性質として、分子量や、水素結合の受容体数・供与体数が知られている。このことから、PROTAC1、2 の分子量を削減、また水素結合の受容体数・供与体数を削減することで、薬物動態改善や、それに伴う分解活性向上が期待される。PROTAC1、2 の IAP リガンドを疎水性タグ（アダマンチル基）で代替できれば、分子量を削減でき、また水素結合の受容体数・供与体数も削減できる。そこで、神経変性疾患診断薬とアダマンチル基を、リンカーを介して連結させた化合物 3（図 5）を設計、合成した。図 4 には、疎水性タグ連結分子で最も活性の強かったジアマンタン類縁体 4 の合成経路を示した。

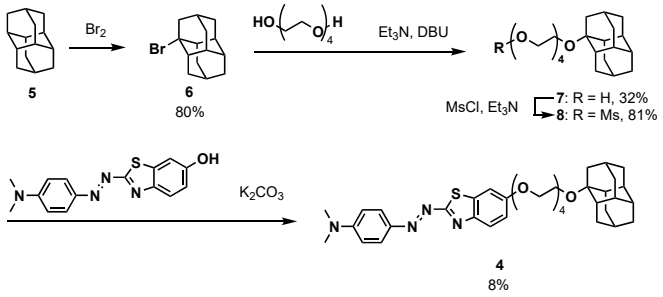



図 4. 疎水性タグ連結分子の合成経路

変異ハンチンチンなどを遺伝子導入した生細胞に 3 を処理したところ、変異ハンチンチンがプロテアソームで分解されることが明らかになった（図 5bc）。更に 3 が、野生型ハンチンチンを減少させないこと（図 5b）、蛍光顕微鏡で輝点として観測される可溶性凝集体を減少させることも明らかになった（図 5d）。疎水性タグ部分を改変した類縁体を 4 種合成した結果、アダマンチル基をジアマンタン構造に変換した 4 が、アダマンタン化合物 3 と比較して、同等以上のハンチントン病原因タンパク質分解誘導活性を示した。

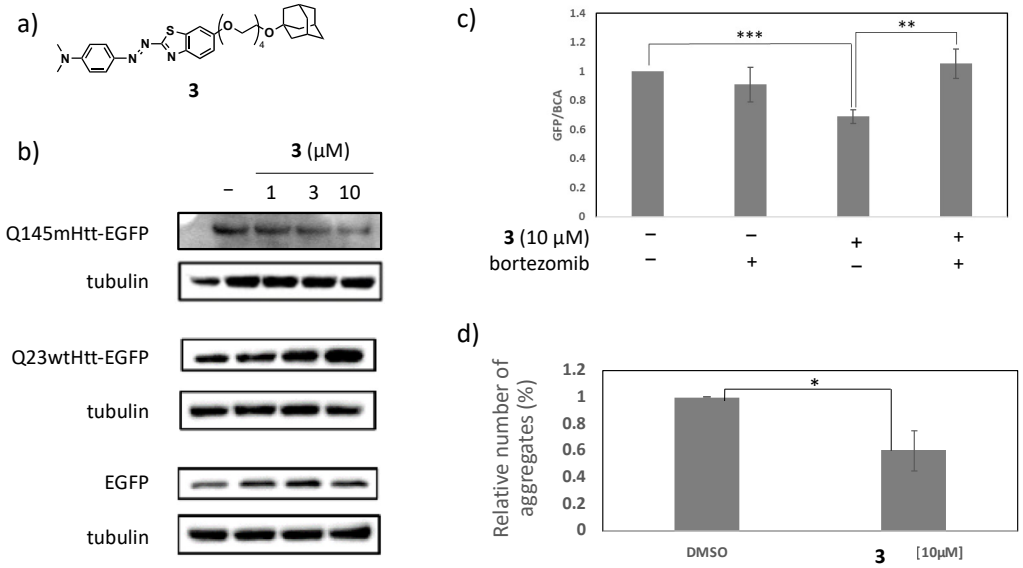



図 5. 疎水性タグ連結分子 3 によるハンチントン病原因タンパク質分解作用

a） 疎水性タグ連結分子3の構造。

b） 疎水性タグ連結分子3は、野生型ハンチンチン（wtHtt）やEGFPを減少させず、変異ハンチンチン（mHtt）を特異的に減少させた。

c） プロテアソーム阻害薬bortezomibを用いた3のプロテアソーム分解の確認。**p＜0.01、***p＜0.001（t検定）。

d） 疎水性タグ連結分子3の可溶性凝集体減少作用。*p＜0.01（t検定）。

連結分子の中枢移行性を、IAM（Immobilized Artificial Membrane）カラムを用いて評価した。IAM カラムは、細胞膜の主要構成成分であるフォスファチジルコリン類縁体を担持したカラムであり、細胞膜の表面を模倣している。この IAM カラムの保持時間を分子量で補正した値が、血液脳関門（BBB）透過性と相関するとの論文［5］を参考に、PROTAC や疎水性タグ連結分子を、IAM カラムを用いて評価した（表 1）。その結果、PROTAC1、2 よりも疎水性タグ連結分子 3、4 の BBB 透過性が優れている可能性が、本 *in vitro* 予備評価により示唆された。更に、ジアマンタン化合物 4 は、BBB 透過性を有する標準物質プロゲステロンよりも、BBB 透過性が高い可能性が示唆された。以上のことから、ハンチントン病原因タンパク質をプロテアソームで分解誘導し、BBB 透過性が期待される低分子を創出することができた。

表 1. 連結分子の BBB 透過性に対する *in vitro* 予備評価

| 化合物 | 分子量 | 水素結合受容体・供与体 | $k_{IAM}/MW^4$ |
|---|---|---|---|
| **1** | 662 | 7・5 | 0.54 |
| **2** | 720 | 8・4 | 0.41 |
| **3** | 609 | 6・0 | 1.8 |
| **4** | 661 | 6・0 | 4.2 |
| progesterone | 314 | 2・0 | 3.0 |

progesteroneはBBB透過性を有する標準化合物として評価した。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学定量生命科学研究所の橋本祐一名誉教授、東北大学大学院生命科学研究科の友重秀介助教と佐藤伸一助教（兼担）である。

## 文　献


1) Lai AC, Crews CM. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. Nat Rev Drug Discov. 2017 Feb;16(2):101-114. Epub 2016 Nov 25. PMID: 27885283 doi: 10.1038/nrd.2016.211.

2) Itoh Y, Ishikawa M, Naito M, Hashimoto Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. J Am Chem Soc. 2010 Apr 28;132(16):5820-6. PMID: 20369832. doi: 10.1021/ja100691p.

3) Tomoshige S, Nomura S, Ohgane K, Hashimoto Y, Ishikawa M. Discovery of Small Molecules that Induce the Degradation of Huntingtin. Angew Chem Int Ed Engl. 2017 Sep 11;56(38):11530-11533. Epub 2017 Aug 9. PMID: 28703441 doi: 10.1002/anie.201706529.

4) Yamashita H, Tomoshige S, Nomura S, Ohgane K, Hashimoto Y, Ishikawa M. Application of protein knockdown strategy targeting ß-sheet structure to multiple disease-associated polyglutamine proteins. Bioorg Med Chem. 2020 Jan 1;28(1):115175. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31767406 doi: 10.1016/j.bmc.2019.115175.

5) Yoon CH, Kim SJ, Shin BS, Lee KC, Yoo SD. Rapid screening of blood-brain barrier penetration of drugs using the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography. J Biomol Screen. 2006 Feb;11(1):13-20. Epub 2005 Nov 28. PMID: 16314407 doi: 10.1177/1087057105281656.