

様式第 1 号

論文内容要旨

**Structural Optimization of Decoy Oligonucleotide-Based PROTAC  
That Degrades the Estrogen Receptor**

学位申請者氏名：永沼 美弥子

研究指導教員：出水 庸介

## 1. 序

様々な疾患の発症に関与する標的タンパク質の解明に伴い、それらを標的とした分子標的薬、抗体医薬品、中分子医薬品（核酸医薬品、ペプチド医薬品）等の多様な創薬モダリティ\*が開発されてきた。ここ 20 年の間に、ケミカルプロテインノックダウン法を利用した創薬研究が国内外で盛んに行われている。その代表例である PROTAC（Proteolysis-Targeting Chimera）<sup>1</sup>は、ユビキチンリガーゼ（E3 リガーゼ）リガンドと標的タンパク質（POI : Protein of interest）リガンドを適切なリンカーを介して連結したキメラ分子である。PROTAC は、生体内のタンパク質分解機構であるユビキチン-プロテアソームシステム\*（UPS）を利用し、標的タンパク質と E3 リガーゼを近接させる分子メディエーターとして作用することで、POI をポリユビキチン化し、プロテアソームによって強制的に分解を誘導することが可能である（Figure 1）。PROTAC は、がん疾患をはじめとする既存の医薬品では治療が困難な疾病に対する革新的な創薬モダリティとして期待されており、現在までに、標的タンパク質に対する低分子リガンドを利用した PROTAC を中心に開発が進められている。E3 リガーゼリガンドは、IAP リガンド LCL161、VHL リガンド VH032、CRBN リガンド Pomalidomide（POM）等が汎用されている。これまでに報告されている

3,000 以上の PROTAC の中で、がん疾患治療薬としてキナーゼを標的タンパク質としたものが最も多く報告されている<sup>2</sup>。その理由の一つとして、キナーゼに対する阻害剤開発が進んでおり、PROTAC の分子設計が比較的容易であることが挙げられる。キナーゼ以外では、核内受容体、転写制御因子、制御タンパク質の他、様々な種類の標的タンパク質に対して PROTAC が開発されてい

る。しかしながら一方で、最適ナリガンドが存在しない転写因子（TFs）などの一部のタンパク質に対しての低分子型 PROTAC の開発は難航している。

本研究では、汎用性のある TFs 標的 PROTAC 開発を目的として、標的リガンドにドコイ核酸\*（DNA）を活用することを考案した（Figure 2）。現在までに約 1,600 種類のヒト TFs が報告されており、そのうちおよそ 96% の DNA 結合領域の配列が明らかとなっている<sup>3</sup>。そこで、TFs の DNA 結合領域に結合可能なドコイ核酸を標的リガンドとして活用できれば、既知の TFs に結合する DNA 配列をベースとした PROTAC 設計が可能になると考えた。本研究では、Proof of Concept（POC）検証として、TFs の一つであ

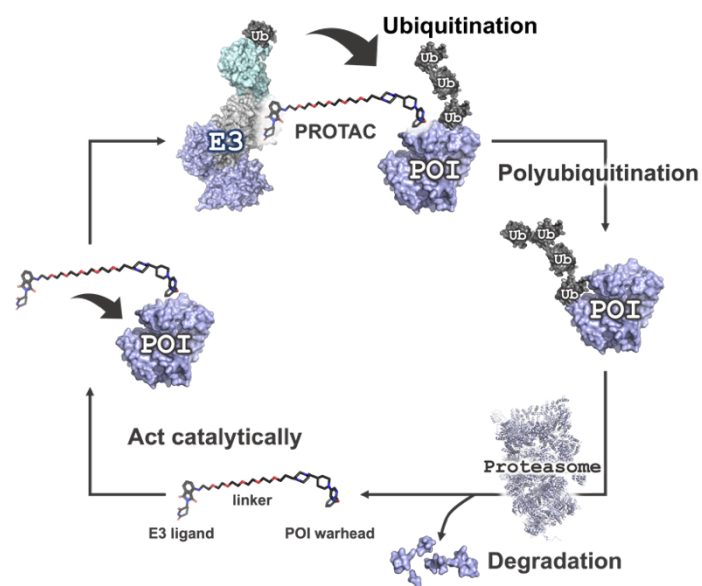


Figure 1. PROTAC の分解機構

るエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) を標的タンパク質のモデルとしたデコイ核酸型 PROTAC を設計・合成し、各種評価を行った (Figure 2)。

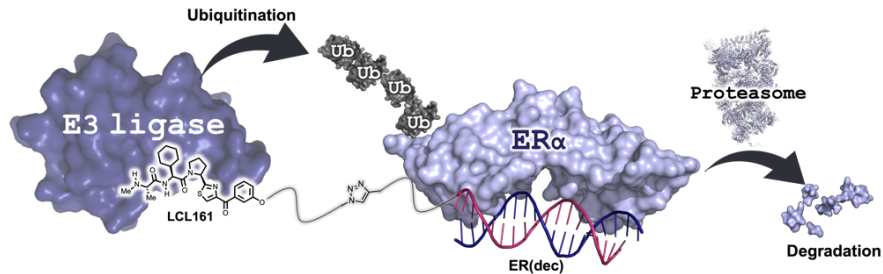


Figure 2. デコイ核酸を標的リガンドに用いた新規 PROTAC の開発

## 2. 実験方法

1) デコイ核酸型 PROTAC の設計: ER $\alpha$  とエストロゲン応答配列 (DNA) の共結晶 X 線構造<sup>4</sup>を参考に、21 塩基の配列末端をアルキン修飾したデコイ核酸 (ER(dec)) を設計した。また E3 リガンドには、PROTAC に汎用される LCL161 (IAP)、VH032 (VHL)、POM (CRBN) を選択した。LCL161 の水酸基、VH032 ヒドロキシプロリンの N 末端フラグメントのアミノ基、POM のフタルイミドのアミノ基のそれぞれ適切な位置に、アジド化した PEG3 リンカーを導入した分子 (LCL-PEG3-N<sub>3</sub>、VH-PEG3-N<sub>3</sub>、POM-PEG3-N<sub>3</sub>) を設計した。目的とする PROTAC (LCL-ER(dec)、VH-ER(dec)、POM-ER(dec)) は、ER(dec) と E3 リガンドをクリック反応で連結することで合成するルートを設定した (Figure 3)。さらに、ヌクレアーゼ耐性および疎水性の向上による細胞膜透過性の向上を期待して LCL-ER(dec) のリン酸骨格の酸素を硫黄に置換するホスホロチオエート (PS) 化した LCL-ER(dec)-allS、デコイ核酸の高次構造安定化とそれに伴うタンパク質への結合力向上を期待してヘアピン構造を導入した LCL-ER(dec)-H46、2 つの修飾を組み合わせた LCL-ER(dec)-H46-allS を設計し、クリック反応によって連結した PROTAC を設計した。

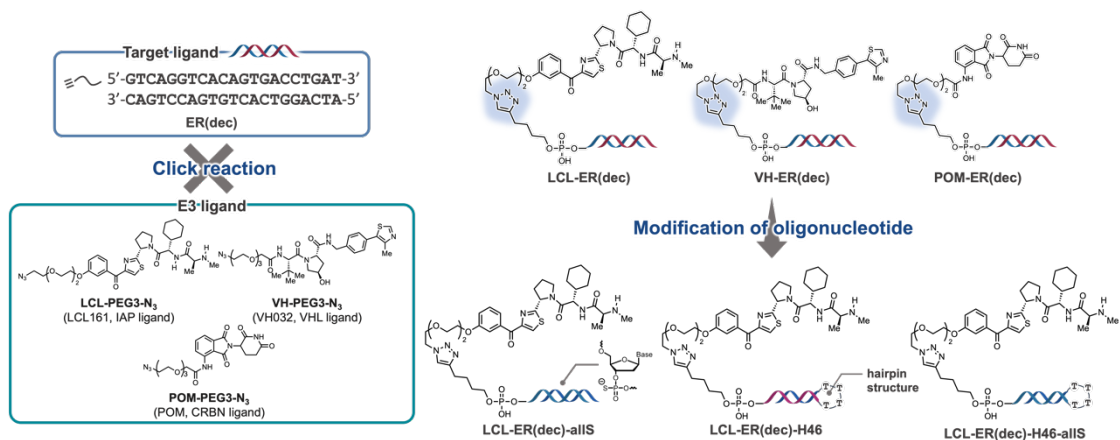


Figure 3. デコイ核酸型 PROTAC の分子設計と合成方法

2) ER $\alpha$  結合活性評価 : 全長の ER $\alpha$  タンパク質と蛍光 (FAM) 標識化した **FAM-ER(dec)** を TE buffer (25 mM NaCl) 中で混合したところに各 PROTAC を競合させ、蛍光偏光法により半数阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出することで結合活性を評価した。

3) ER $\alpha$  分解活性評価 : 乳がん細胞株 MCF-7 細胞を用いたウェスタンブロットにより分解活性を評価した。6 well plate に 2.0-3.0 $\times 10^5$  cells/well の密度で細胞を播種し、24 時間培養後、化合物を Lipofectamine RNAiMAX または Lipofectamine 2000 によりトランスフェクション後、24 時間インキュベートし、タンパク質の発現量を定量した。また、ER $\alpha$  分解メカニズムを解析するため、次の 3 種類の条件でウェスタンブロットを行った。(a) ER $\alpha$  に結合しないスクランブル配列を含む 3 種類の **LCL-Scrb1-3** を合成し ER $\alpha$  分解活性を評価した。(b) IAP に結合力しない LCL161 誘導体 (**NMeLCL**) からなる **NMeLCL-ER(dec)** を合成し ER $\alpha$  分解活性を評価した。(c) プロテアソーム阻害剤 MG132 または、E1 阻害剤 MLN7243 をそれぞれ共添加し、**LCL-ER(dec)** の ER $\alpha$  分解活性を評価した。

4) デオキシ核酸型 PROTAC の高次構造解析 : 融解温度 ( $T_m$ ) 測定により PROTAC の高次構造安定性を評価した。1  $\mu$ M の PROTAC を 25 mM の NaCl を含む TE buffer に溶かし、温度変化測定 (JASCO V-730) を用いて 35-85 $^{\circ}$ C における吸光度を測定することで  $T_m$  値を算出した。

5) 分解酵素耐性評価 : 1  $\mu$ M の PROTAC、および 0.125 units/ $\mu$ L の Exonuclease III からなる溶液を、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。その後、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (dPAGE) を行った。

6) 細胞内導入効率評価 : MCF-7 細胞を 7.5 $\times 10^4$  cells/well の密度で 24 well plate に播種し、24 時間培養後、化合物を添加し 6 時間インキュベーションした後に、培地を除去し、PBS で細胞表面を洗浄し、トリプシンを用いて細胞を剥離した。得られた細胞懸濁液をフローサイトメーターに注入し、細胞内の蛍光強度を測定した。

7) ER $\alpha$  シグナル伝達への影響評価 : ER $\alpha$  転写阻害活性は、MCF-7 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) を用いて評価した。細胞を 24 well plate に 2.0 $\times 10^4$  cells/well の密度で播種し、24 時間培養した。その後、Lipofectamine LTX を用いて、エストロゲン応答配列 (ERE) の 3 タンデムコピーを含む firefly luciferase reporter plasmid および対照となる Renilla luciferase plasmid-SV40 をトランスフェクションし、24 時間培養した。17 $\beta$ -estradiol (E2) の存在下で、化合物をトランスフェクションし、24 時間インキュベート後、発光量を定量した。細胞増殖抑制活性は、ER $\alpha$  陽性乳がん細胞株の MCF-7 細胞を 96 well plate に 3.0-5.0 $\times 10^3$  cells/well の密度で播種し、24 時間培養した。10  $\mu$ M の化合物をトランスフェクション後、72 時間インキュベート後、WST-8 キットを用いて吸光度を測定した。

### 3. 研究結果

#### 1) デオイ核酸型 PROTAC の合成<sup>1),5)</sup>

ER $\alpha$  リガンド **ER(dec)** は、ホスホロアミダイト法による固相法を用いた自動合成機で合成した。また、E3 リガンド **LCL-PEG3-N<sub>3</sub>** は、LCL161 誘導体を既存のルートに従って全 12 工程で合成した後、ヒドロキシ基に PEG3 リンカーを導入することで合成した。**VH-PEG3-N<sub>3</sub>** についても上記の合成ルートを用いて合成した。**POM-PEG3-N<sub>3</sub>** は市販の試薬を用いた。両リガンドを銅触媒 (CuIP(OEt)<sub>3</sub>) およびトリエチルアミン存在下、クリック反応により連結し、**LCL-ER(dec)**、**VH-ER(dec)**、**POM-ER(dec)** の 3 種類のキメラ分子を合成した。核酸部位を修飾した PROTAC である、**LCL-ER(dec)-allS**、**LCL-ER(dec)-H46**、**LCL-ER(dec)-H46-allS** も同様にクリック反応で合成した。得られた PROTAC は逆相 HPLC で精製し、MALDI TOF MS または dPAGE で目的物の同定を行った。

#### 2) ER $\alpha$ 結合活性評価<sup>5)</sup>

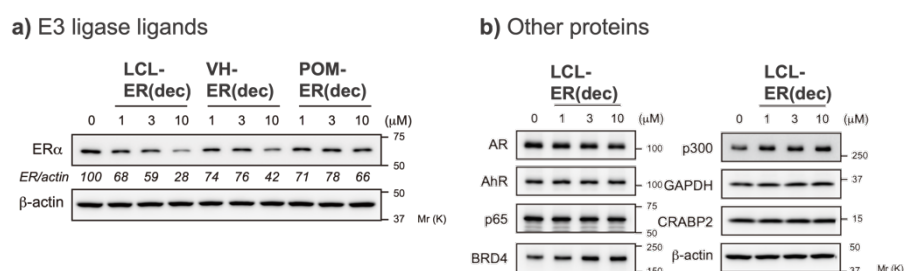
合成した PROTAC の ER $\alpha$  結合活性を競合的蛍光偏光アッセイにより評価した (Table 1)。その結果、デオイ核酸 **ER(dec)** は IC<sub>50</sub> = 39.4 nM で ER $\alpha$  に結合し (Entry 1)、**ER(dec)** に各 E3 リガンドを導入した PROTAC も同等の ER $\alpha$  結合活性を示した (Entries 2-4)。このことから、デオイ核酸の PROTAC 化 (E3 リガーゼリガンドとの連結) は ER $\alpha$  結合活性に対し顕著な影響を与えないことが示唆された。

Table 1. ER $\alpha$  結合活性評価 (IC<sub>50</sub>)

Entry	Compound	IC <sub>50</sub> (nM)
1	<b>ER(dec)</b>	39.4 ± 12.0
2	<b>LCL-ER(dec)</b>	31.2 ± 5.37
3	<b>VH-ER(dec)</b>	43.7 ± 7.26
4	<b>POM-ER(dec)</b>	52.6 ± 16.9
5	<b>LCL-Scrb11</b>	> 3000
6	<b>LCL-Scrb12</b>	> 3000
7	<b>LCL-Scrb13</b>	> 3000

#### 3) ER $\alpha$ 分解活性評価と ER $\alpha$ 分解メカニズム解析<sup>5)</sup>

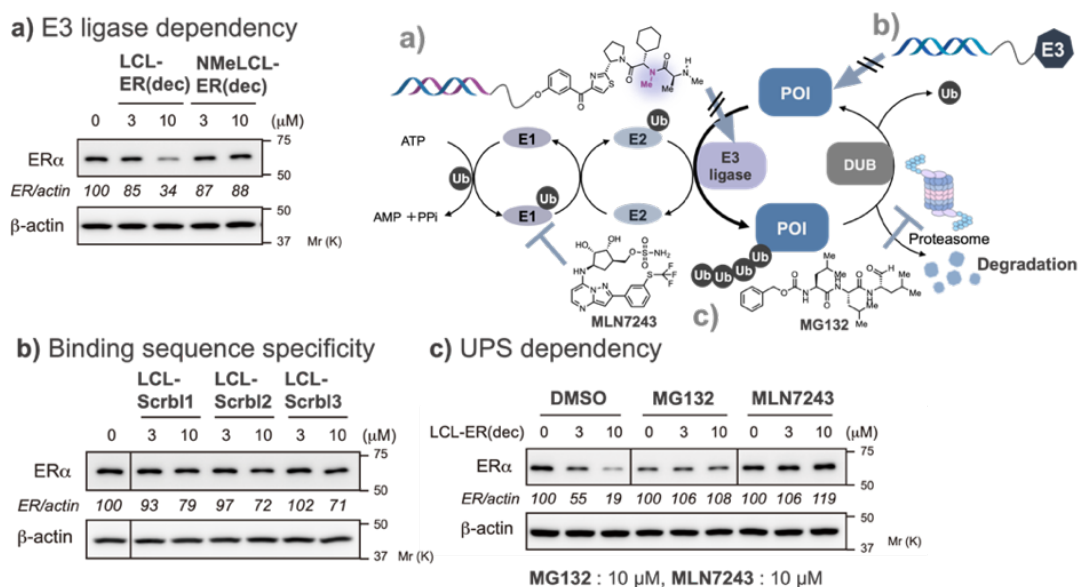
3 種類の PROTAC の ER $\alpha$  分解活性をウェスタンブロットにより評価した結果、**LCL-ER(dec)** が最も高い ER $\alpha$  分解活性を示した (Figure 4a)。そこで、**LCL-ER(dec)** について TFs を含むいくつかのタンパク質 (AR、AhR、p65、BRD4、p300、GAPDH、CRABP2、 $\beta$ -actin) への影響を評価した結果、これらのタンパク質は分解されていなかったことから、**LCL-ER(dec)** は ER $\alpha$  を選択的に分解することが明らかとなった (Figure 4b)。最も ER $\alpha$  分解活性の高かった LCL 体について、リンカー長を検討するため、新たに PEG2 および PEG4 リンカー体を合成した。それぞれの ER $\alpha$  結合活性を評価した結果、いずれも IC<sub>50</sub> が 30-50 nM ほどで ER $\alpha$  に結合し、リンカー長の変化による顕著な結合活性の差は見られなかった。一方で、ER $\alpha$  分解活性を評価した結果、PEG3 リンカー体の **LCL-ER(dec)** が最も高い ER $\alpha$  分解活性を示した。



**Figure 4.** a) 各 PROTAC の ERα 分解活性、b) 他のタンパク質への影響について評価したウェスタンブロット (Naganuma, M. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **13**, 134-139 (2022)). 一部改)

続いて、ERα 分解メカニズムを解析するため、2.実験方法の 3) (a) - (c) で示した条件でウェスタンブロットを行った。その結果、(a) より、IAP へ結合しない NMeLCL をリガンドに用いた NMeLCL-ER(dec) では ERα が分解されなかったことから、LCL-ER(dec) は E3 リガーゼ依存的に ERα を分解していることが示唆された (Figure 5a)。

(b) の結果より、LCL-Scrb1-3 はいずれも ERα に結合せず (Table 1, Entries 5-7)、ERα 分解活性を示さなかったことから、LCL-ER(dec) は ERα 結合配列特異的に分解誘導していることが示唆された (Figure 5b)。(c) プロテアソーム阻害剤 MG132 または、E1 阻害剤 MLN7243 をそれぞれ LCL-ER(dec) と共添加しウェスタンブロットを行った結果、阻害剤共添加時には ERα のタンパク質レベルが減少しなかった。このことから LCL-ER(dec) は、期待通り、UPS を介して ERα を分解していることが示唆された (Figure 5c)。



**Figure 5.** a) E3 依存的な ERα 分解、b) ERα 結合配列依存的な ERα 分解、c) UPS 依存的な ERα 分解について評価したウェスタンブロット (Naganuma, M. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **13**, 134-139 (2022)). 一部改)

#### 4) LCL-ER(dec)の分子の安定性向上を目指したデコイ核酸の修飾と高次構造解析<sup>1)</sup>

LCL-ER(dec)を含むこれまでに報告されているデコイ核酸型 PROTAC は、TFs の分解を可能にし、TFs 分解誘導剤としての有用性が期待できる一方で、①生体内での安定性の乏しさ、および②低い細胞膜透過性の2点について課題がある。そこで、①の課題に対してデコイ核酸の修飾を検討した。

合成した LCL-ER(dec)、LCL-ER(dec)-allS、LCL-ER(dec)-H46 および LCL-ER(dec)-H46-allS の融解温度 ( $T_m$  値) を測定した。LCL-ER(dec)、LCL-ER(dec)-allS、LCL-ER(dec)-H46、LCL-ER(dec)-H46-allS の  $T_m$  値はそれぞれ 64.7、53.0、71.5、59.9°C であった。ヘアピン型 LCL-ER(dec)-H46 は、特に高次構造の安定性を高めるように設計されているため、LCL-ER(dec) に比べて比較的高い  $T_m$  値を示したと考えられる。一方で、PS 化 LCL-ER(dec)-allS および LCL-ER(dec)-H46-allS の  $T_m$  値は LCL-ER(dec) よりも低かった。すなわち、LCL-ER(dec) から LCL-ER(dec)-allS へと二本鎖の安定性が徐々に低下していることを示しており、モノチオエート鎖におけるこれまでの知見と一致する結果が得られた<sup>5)</sup>。

#### 5) 修飾 PROTAC の酵素耐性評価<sup>1)</sup>

各 PROTAC の二本鎖核酸の両末端を標的とし、末端から分解する酵素である Exonuclease III に対する分解耐性を dPAGE によって分析した。その結果、未修飾の LCL-ER(dec) は Exonuclease III によって完全に分解されたが、ヘアピン型 LCL-ER(dec)-H46 は LCL-ER(dec) と比較して分解が抑制された。一方で、PS 化 LCL-ER(dec)-allS および LCL-ER(dec)-H46-allS はともに Exonuclease III への耐性を獲得した (Figure 6)。

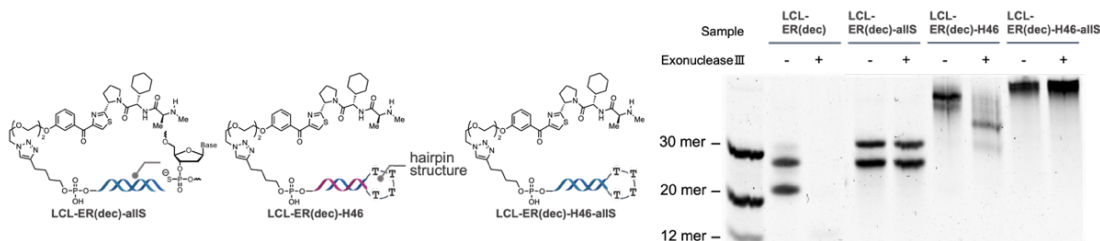


Figure 6. 修飾 PROTAC の構造と Exonuclease III に対する酵素耐性評価 (Naganuma, M. et al. *Bioconjug. Chem* **34**, 1780-1788 (2023). 一部改)

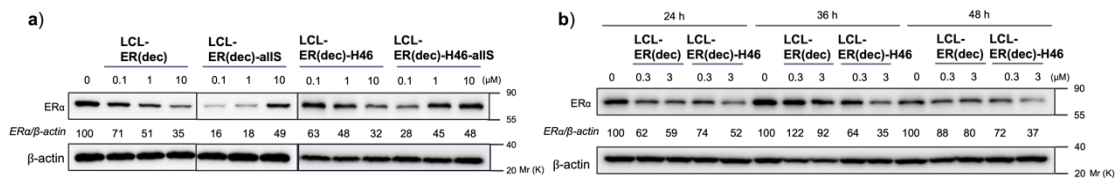
#### 6) 核酸の細胞内取り込み評価<sup>1)</sup>

各 PROTAC の細胞内取り込み量を蛍光標識 (FAM) 化したデコイ核酸を用いてフローサイトメトリーで評価した。その結果、ヘアピン型 FAM-ER(dec)-H46 は FAM-ER(dec) と同等の取り込みを示したのに対し、PS 化 FAM-ER(dec)-allS は、取り込み量が約 19 倍増加した。

#### 7) 修飾 PROTAC の ER $\alpha$ 分解活性評価<sup>1)</sup>

ER $\alpha$  に対する分解活性をウェスタンブロットによって評価した結果、PS 化 LCL-

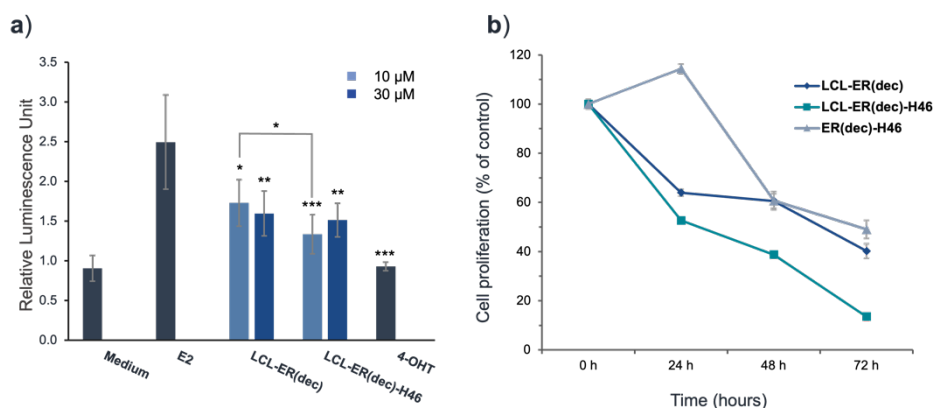
**ER(dec)-allS** および **LCL-ER(dec)-H46-allS** は **LCL-ER(dec)** と比較して ER $\alpha$  分解活性が 100 倍ほど向上した (**Figure 7a**)。しかしながら、**ER(dec)-allS** の配列をスクランブル化した PROTAC においても ER $\alpha$  の減少が確認されたことから、非特異的な分解が生じていることが示唆された。一方で、ヘアピン型 **LCL-ER(dec)-H46** は **LCL-ER(dec)** と同等の ER $\alpha$  分解活性を示し、スクランブル体では分解活性を示さなかった (**Figure 7a**)。そこで、**LCL-ER(dec)-H46** について ER $\alpha$  分解活性の持続性を評価するために、時間経過実験を行った。その結果、未修飾の **LCL-ER(dec)** はトランスフェクション後 36 時間で ER $\alpha$  分解活性を失ったが、**LCL-ER(dec)-H46** は 48 時間後も継続して ER $\alpha$  分解活性を示した (**Figure 7b**)。これらの結果は、**LCL-ER(dec)-H46** が **LCL-ER(dec)** と比較して分解酵素に対してより安定であり、持続的な ER $\alpha$  分解活性を示すことを示唆している。



**Figure 7. a)** 各 PROTAC の 24 時間処理における ER $\alpha$  分解活性、**b)** 24-48 時間処理における **LCL-ER(dec)-H46** の ER $\alpha$  分解活性 (Naganuma, M. *et al. Bioconjug. Chem* **34**, 1780-1788 (2023).)

#### 8) PROTAC の ER $\alpha$ 分解活性評価およびエストロゲンシグナル伝達への影響評価<sup>1)</sup>

エストロゲンシグナル伝達への影響をレポータージーンアッセイおよび細胞増殖抑制アッセイにより評価した。レポータージーンアッセイの結果、ヘアピン型 **LCL-ER(dec)-H46** は **LCL-ER(dec)** と比較して、ER $\alpha$  依存性の転写活性化を有意に阻害した (**Figure 8a**)。また、細胞増殖抑制評価の結果、**LCL-ER(dec)-H46** によって ER $\alpha$  陽性乳がん細胞株である MCF-7 細胞の増殖が抑制された (**Figure 8b**)。



**Figure 8. a)** レポータージーンアッセイによる ER $\alpha$  転写阻害活性評価、**b)** MCF-7 細胞増殖抑制評価 (Naganuma, M. *et al. Bioconjug. Chem* **34**, 1780-1788 (2023).)



#### 4. 討論

本研究でははじめに、TFs のモデルとして選択した ER $\alpha$  に結合するデコイ核酸を標的タンパク質リガンドとして活用した PROTAC として、**LCL-ER(dec)**、**VH-ER(dec)** および **POM-ER(dec)** の設計・合成を行った。デコイ核酸は標的タンパク質であるヒト転写因子の DNA 結合領域の配列を基に設計可能であるため、容易に PROTAC の分子デザインが可能であった。合成したキメラ分子の ER $\alpha$  に対する結合活性および分解活性を評価した結果、デコイ核酸を PROTAC 化しても ER $\alpha$  に結合可能であり、ER $\alpha$  分解活性を有することが明らかとなった。3 種類の E3 リガンドのうち最も活性の高かった **LCL-ER(dec)** についてリンカー長を検討した結果、PEG3 を用いた **LCL-ER(dec)** が最も高い ER $\alpha$  分解活性を示した。そこで、**LCL-ER(dec)** の分解メカニズムを解析したところ、結合配列、E3 リガーゼ、UPS 依存的に ER $\alpha$  を分解していることが示唆された。本研究で開発した **LCL-ER(dec)** が TFs である ER $\alpha$  の分解を可能にしたことから、デコイ核酸は PROTAC の標的リガンドとして利用可能であることが明らかとなった。また、低分子型 PROTAC 同様に E3 リガンドおよびリンカー長によって標的タンパク質に対する分解活性が変動することも明らかとなった。

続いて、開発した **LCL-ER(dec)** を含む、オリゴ核酸を標的リガンドに用いた PROTAC の課題の一つである安定性の低さの改善を目指した分子設計について検討した。具体的には、ヘアピン構造修飾や、PS 化を行った PROTAC として **LCL-ER(dec)-H46**、**LCL-ER(dec)-allS**、**LCL-ER(dec)-H46-allS** を新たに合成した。いずれも天然配列と比較し Exonuclease III に対する分解耐性や ER $\alpha$  結合活性が向上した。結合活性が向上した理由として、ヘアピン型 **LCL-ER(dec)-H46** については  $T_m$  値が向上していることから二本鎖の安定性が向上したことが一因であると考えられる。一方で PS 化した **LCL-ER(dec)-allS**、**LCL-ER(dec)-H46-allS** については、分子全体の疎水性が向上したことから、非特異的な結合が生じた可能性が考えられる。さらに、この疎水性の向上は、細胞内移行率および ER $\alpha$  分解活性向上にも寄与したと考えられる<sup>6,7</sup>。PS 化は一部毒性が報告されているにも関わらず、血清アルブミンやヘパリン結合タンパク質に結合することにより細胞内に輸送されるという利点から上市されている核酸医薬品にも利用されている。また、細胞室内のタンパク質と結合することによって核内への輸送効率が向上することも医薬品として有利に働いている。デコイ核酸における PS 化については、1994 年 Brown らによって、配列非依存的なタンパク質結合について報告されている<sup>8</sup>。一方で、管見の限り、PS 化デコイ核酸のタンパク質発現への影響についての報告はほとんどない。よって本研究で明らかとなった PS 化デコイ核酸による配列非依存的なタンパク質の分解は新たな知見になると考えられる。

標的への選択性を維持できた **LCL-ER(dec)-H46** については、末端からのヌクレアーゼによる分解を防ぐことにより、長時間の ER $\alpha$  分解活性の維持を達成できたと考えられる。さらに、ER $\alpha$  シグナル伝達への影響を評価した結果、**LCL-ER(dec)** よりも **LCL-ER(dec)-H46** が有意に ER $\alpha$  依存性の転写活性化を抑制したことが示唆された。先行研

究にて、**LCL-ER(dec)**はデコイ核酸である **ER(dec)**と比較して、転写阻害活性が向上しており<sup>5)</sup>、**LCL-ER(dec)-H46** はさらに有意な転写阻害活性を示した。これは **LCL-ER(dec)-H46** が ER $\alpha$  の分解を誘導したことで ER $\alpha$  量の減少により転写活性化が抑制されたためだと考えられる。

デコイ核酸型 PROTAC の汎用性を確認するために、本研究の応用として TFs の一つである Signal transducer and activator of transcription 3 : STAT3 を標的とした PROTAC を共同研究で開発した<sup>2)</sup>。STAT3 は、細胞の生存、細胞増殖、血管新生、転移などのがんの進行における役割を有するタンパク質であり、抗がん剤の標的タンパク質として着目されてきた。しかし、タンパク質表面が浅く平坦な構造をとることから、有効な低分子阻害剤の開発が達成されていない。本研究で見出したデコイ核酸型 PROTAC を応用することで、STAT3 を分解することに成功した。

ここ数年で、複数のグループがデコイ核酸を標的リガンドに利用した PROTAC を報告しており、標的 TFs として NF $\kappa$ B、E2F、LEF1、ERG、cMyc、 $\alpha$ -brachyury、Nrf2 と転写複合体の一つである MafG のヘテロ二量体と、本研究の ER $\alpha$ 、STAT3 を含め 10 種類の TFs 分解が達成されている<sup>9-12)</sup>。このことから、本研究で実証したデコイ核酸を標的リガンドに用いた PROTAC は、TFs の汎用的な分解剤として利用でき、がん等に対する新規治療法として期待できる。しかしながら、現段階ではデコイ核酸型 PROTAC は、細胞内導入効率の向上や標的特異性の向上に関して課題が残されている。現在上市されている核酸医薬品は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) として、脂質ナノ粒子 (LNP)、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc)<sup>13)</sup> が主に利用されている。さらに、ポリイオンコンプレックス (PIC) 型のミセル<sup>14)</sup> や細胞膜透過性ペプチド<sup>15)</sup>、抗体とのコンジュゲート<sup>16)</sup> による核酸医薬送達の研究が盛んに行われており、臨床試験も行われている。今後、核酸型 PROTAC についても、適切な DDS と組み合わせることで薬剤開発が進むと考えられる。

## 5. まとめ

- 1) 3種類の E3 リガーゼリガンドと ER $\alpha$  に結合するデコイ核酸 **ER(dec)** をクリック反応で連結したデコイ核酸型 PROTAC を開発した。
- 2) 合成した PROTAC のうち **LCL-ER(dec)** が最も高い ER $\alpha$  分解活性を示し、メカニズム解析の結果、結合配列および E3 リガーゼ依存的に、UPS を介して ER $\alpha$  を分解していることが示唆された。
- 3) **LCL-ER(dec)** の活性向上を目指し、**ER(dec)** に対しヘアピン化および PS 化修飾した PROTAC として **LCL-ER(dec)-H46**、**LCL-ER(dec)-allS**、**LCL-ER(dec)-H46allS** を開発した。
- 4) **LCL-ER(dec)-H46** は ER $\alpha$  に対する選択性を維持しながら **LCL-ER(dec)** よりも長時間 ER $\alpha$  分解活性を有することが明らかとなった。

## 6. 論文リスト

### 主論文

- 1) Miyako Naganuma, Nobumichi Ohoka, Genichiro Tsuji, Takao Inoue, Mikihiro Naito, Yosuke Demizu; Structural Optimization of Decoy Oligonucleotide-Based PROTAC That Degrades the Estrogen Receptor. *Bioconjug. Chem.* **34**, 1780-1788 (2023).

### 参考論文

- 2) Po-Chang Shih, Miyako Naganuma, Genichiro Tsuji, Yosuke Demizu, Mikihiro Naito; Development of decoy oligonucleotide-warheaded chimeric molecules targeting STAT3. *Bioorg. Med. Chem.* **95**, 117507 (2023).
- 3) Haruna Tsujimura, Miyako Naganuma (Co-first), Nobumichi Ohoka, Takao Inoue, Mikihiro Naito, Genichiro Tsuji, Yosuke Demizu; Development of DNA Aptamer-Based PROTACs That Degrade the Estrogen Receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* **14**, 827-832 (2023).
- 4) Po-Chang Shih, Miyako Naganuma, Yosuke Demizu, Mikihiro Naito; Current Status of Oligonucleotide- Based Protein Degraders. *Pharmaceutics* **15**, 765 (2023).
- 5) Miyako Naganuma, Nobumichi Ohoka, Genichiro Tsuji, Haruna Tsujimura, Kenji Matsuno, Takao Inoue, Mikihiro Naito, Yosuke Demizu; Development of Chimeric Molecules That Degrade the Estrogen Receptor Using Decoy Oligonucleotide Ligands. *ACS Med. Chem. Lett.* **13**, 134-139 (2022).
- 6) Hidetomo Yokoo, Miyako Naganuma, Makoto Oba, Yosuke Demizu; Recent Advances in PROTAC Technology Toward New Therapeutic Modalities. *Chem. Biodiversity*, **19**, e202200828 (2022).

## 7. 参考文献

1. K. Li, C. M. Crews, PROTACs: past, present and future. *Chem. Soc. Rev.* **51**, 5214-5236 (2022).
2. S. Zeng *et al.*, Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: Recent progress and future challenges. *Eur. J. Med. Chem.* **210**, 112981 (2021).
3. S. A. Lambert *et al.*, The Human Transcription Factors. *Cell* **172**, 650-665 (2018).
4. J. W. R. Schwabe, L. Chapman, J. T. Finch, D. Rhodes, The Crystal Structure of the Estrogen Receptor DNA-binding Domain Bound to DNA: How Receptors Discriminate between their Response Elements. *Cell* **75**, 567-578 (1993).
5. J. W. Jaroszewski, V. Clausen, J. S. Cohen, O. Dahl, NMR Investigations of Duplex Stability of Phosphorothioate and Phosphorodithioate DNA Analogues Modified in Both Strands. *Nucleic Acids Res.* **24**, 829-834 (1996).
6. R. Crinelli, M. Bianchi, L. Gentilini, M. Magnani, Design and characterization of decoy oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2435-2443 (2002).
7. Comparison of Cellular Binding and Uptake of Antisense Phosphodiester, Phosphorothioate, and Mixed Phosphorothioate and Methylphosphonate Oligonucleotides. *Antisense Res. Dev.* **3**, 53-66

(1993).

8. D. A. Brown *et al.*, Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 26801-26805 (1994).

9. J. Liu *et al.*, TF-PROTACs Enable Targeted Degradation of Transcription Factors. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 8902-8910 (2021).

10. J. Shao *et al.*, Destruction of DNA-Binding Proteins by Programmable Oligonucleotide PROTAC (O'PROTAC): Effective Targeting of LEF1 and ERG. *Advi. Sci. (Weinh)*, e2102555 (2021).

11. K. T. G. Samarasinghe *et al.*, OligoTRAFTACs: A generalizable method for transcription factor degradation. *RSC Chem. Biol.* **3**, 1144-1153 (2022).

12. J. Ji *et al.*, ARE-PROTACs Enable Co-degradation of an Nrf2-MafG Heterodimer. *J. Med. Chem.*, **66**, 6070-6081 (2023).

13. C. I. E. Smith, R. Zain, Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **59**, 605-630 (2019).

14. S. Watanabe *et al.*, In vivo rendezvous of small nucleic acid drugs with charge-matched block cationers to target cancers. *Nat. Commun.* **10**, 1894 (2019).

15. H. Yin *et al.*, A fusion peptide directs enhanced systemic dystrophin exon skipping and functional restoration in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4405-4414 (2009).

16. I. Dovgan, O. Koniev, S. Kolodych, A. Wagner, Antibody-Oligonucleotide Conjugates as Therapeutic, Imaging, and Detection Agents. *Bioconjug. Chem.* **30**, 2483-2501 (2019).

## 8. 用語集

**モダリティ**：様々な創薬基盤技術の方法・手段を示す用語。低分子薬、核酸医薬品、ペプチド医薬品、抗体医薬品、遺伝子治療、細胞治療など多様化している。

**ユビキチン-プロテアソームシステム (UPS)**：ATP のエネルギーを利用して、E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素)、E3 (ユビキチンリガーゼ) の3種類の酵素活性を介して標的タンパク質にユビキチン (76 残基) という小さな標識タンパク質を結合させる。E3 によって Lys がポリユビキチン化され、プロテアソームという巨大なタンパク質によって分解される。

**デコイ核酸**：転写因子を標的にしたオリゴヌクレオチドであり、転写因子の結合部位に対する相補的な塩基配列を基に設計され、目的の転写因子と配列特異的に結合することで、DNA への結合をブロックして機能する。

**クリック反応**：水や酸素存在下でも反応し、その他の官能基とはほとんど反応しないため、生体直交反応としてケミカルバイオロジー分野等で幅広く利用される反応。中でも銅(I)触媒存在下、アルキンとアジド化合物がヒュスゲン環化によって1,2,3-トリアゾールを形成する付加環化反応が代表的な反応として汎用されている。

**ドラッグデリバリーシステム (DDS)** : 治療薬の薬物動態や薬力学を改善し、適切な時間と速度で目的の部位に必要な量を送達するための分子やデバイス。受容体結合リガンドや細胞膜透過性ペプチド、ナノ粒子、マイクロ粒子などの分子に加え、経皮吸収パッチ、吸入器などのデバイスも含まれる。