

学位論文審査の結果の要旨

氏名	永沼 美弥子	
学位の種類	博士（理学）	
学位記番号	甲 第1991号	
学位授与の日付	令和6年3月25日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当	
学位論文題目	Structural Optimization of Decoy Oligonucleotide-Based PROTAC That Degrades the Estrogen Receptor	
主研究指導教員	出水 庸介	
論文審査委員	(主査) 有田 恭平	教授
	(副査) 片岡 浩介	准教授
	(副査) 寺山 慧	准教授
	(副査) 和田 章	大学院客員准教授

論文内容の要旨

PROTAC (Proteolysis-Targeting Chimera) 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 (Protein of Interest : POI) 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り、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 (Ubiquitin-Proteasome System : UPS) を利用することで、標的タンパク質の分解を誘導する新規モダリティである。これまでに 3,000 以上の PROTAC が報告され、その中でも、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。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。一方で、最適なり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。

現在、約1,600種類のヒトTFsが報告されており、そのうち90%以上のDNA結合領域の配列が明らかとなっている。そこで永沼氏は、TFsのDNA結合領域に結合可能なデコイ核酸を標的リガンドとして活用できると考え、TFsの一つであるエストロゲン受容体 α (ER α) をモデルとしたデコイ核酸型PROTAC (以下、天然型PROTAC) を設計・合成した。この天然型PROTACは、ER α とエストロゲン応答配列の共結晶X線構造を参考にして設計されたデコイ核酸とE3リガンドを連結させたものである。各種評価の結果、天然型PROTACはUPSを介してER α の分解を誘導できることを明らかとした。

ほぼ同時期に、他の研究グループも同様のコンセプトでデコイ核酸型PROTACを報告し、新たな分解誘導剤としての有用性が示された。しかしながら一方で、核酸をリ

ガンドとして利用しているため、生体内での安定性が乏しく、細胞膜透過性も低い(トランスフェクション試薬が必須)という課題があった。これに対し、永沼氏は天然型PROTACのデコイ核酸の修飾を検討し、ヌクレアーゼ耐性の向上と細胞膜透過性の改善を目指した。具体的には、核酸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)化を施したPS化PROTAC、デコイ核酸の高次構造安定化を目的としたヘアピン型PROTAC、そしてこれら2つの修飾を組み合わせたPSヘアピン型PROTACを設計・合成した。

新たに合成されたPROTACの高次構造、ER α 結合活性、ヌクレアーゼ耐性の評価の結果、ヘアピン型PROTACは、高次構造の安定化、ER α への結合活性の向上、天然型PROTACと比較してヌクレアーゼ耐性の向上を達成した。一方で、PS化PROTACとPSヘアピン型PROTACは、高次構造が不安定なものの、ER α への結合活性の向上とヌクレアーゼ耐性の大幅な向上を示した。特に、天然型PROTACに比べてER α 分解活性が約100倍向上した。しかしながら、PS化PROTACのデコイ配列をスクランブル化した場合、非特異的な結合と分解が生じることが示唆された。一方で、ヘアピン型PROTACは天然型PROTACと同等のER α 分解活性を示し、スクランブル体では分解活性が見られなかったことから標的特異性を示した。また、ヌクレアーゼ耐性が向上したヘアピン型PROTACは、天然型PROTACよりも長時間にわたるER α 分解活性を示した。最後に、ヘアピン型PROTACのエストロゲンシグナル伝達への影響をレポーター遺伝アッセイと細胞増殖抑制アッセイで評価した結果、ER α 依存性の転写活性化を有意に阻害し、ER α 陽性乳がん細胞株のMCF-7細胞の増殖を抑制した。

最後に、予備的なデータではあったが、デコイ核酸型PROTACのもう一つの課題である低い細胞膜透過性に対しては、トランスフェクション試薬を必要としない新規のデコイ核酸型PROTACの開発が検討されていた。ヘテロ二重鎖核酸(HDO)と細胞膜透過性ペプチドを結合させた新しいタイプのPROTACは、トランスフェクション試薬無しに細胞内に導入され、ER α 分解活性を示すことが示された。

本研究により、永沼氏が開発したデコイ核酸型PROTACをベースに、オリゴ核酸の化学的安定性の低さという課題を改善するデコイ核酸の修飾が行われた。PS化PROTACでは非特異的な結合と分解が起こることが明らかになったが、ヘアピン型PROTACは標的への選択性を維持しつつヌクレアーゼ分解耐性を獲得し、長期間のER α 分解活性を維持することに成功した。

本研究の成果は、転写因子を標的とする新たなPROTACを開発する基盤技術として活用でき、アンメットメディカルニーズを満たす医薬品開発においても大きなインパクトを与えるものといえる。

論文審査結果の要旨

本学位論文の審査は、提出された論文の内容、公聴会・審査会での発表、質疑応答に基づき、4名の審査委員（主査：有田恭平、副査：片岡浩介、寺山慧、和田章）により令和5年12月19日に行われた。公聴会・審査会では、専門分野、関連分野（理学）、外国語について、各審査委員と以下の質疑応答が行われた。公聴会は対面と Zoom を用いたハイブリッド形式で、審査会は対面形式で実施された。

【専門分野】有田主査より、合理的なリンカーデザインが可能であるかとの質問に対して、永沼氏は、E3 リガーゼに応じた適切なリンカー長を予測して PROTAC をデザインすることは現在の技術では困難であり、試行錯誤が必要であると回答した。部分的に PS 化修飾されたデコイ核酸配列を用いた PROTAC の選択性に関する質問に対しては、この方法では安定な二重鎖が形成されず ER α 分解活性も不十分だったため、追加検討は行ななかったと回答された。ヘアピン型 PROTAC で ER α 結合活性が向上した理由についての質問では、核酸の高次構造が安定化したためだと説明された。SELEX 法を用いてアプタマー型 PROTAC を開発する可能性については、研究室内で ER α を標的とするアプタマー PROTAC を開発し、論文化していること、この戦略を利用すれば細胞内の様々なタンパク質を標的にすることが可能であると回答された。PROTAC の半減期に関する質問に対しては、少ない投与量で効果的に機能するため、代謝されにくい PROTAC が望ましいが、E3 リガーゼの変異などケースバイケースで考慮する必要があると説明された。また、700 種類の E3 リガーゼを用いることで分解以外の機能を有するキメラ分子の開発の可能性については、現在は難しいが、PROTAC による Ub 化 Lys の位置や数の解析データを蓄積していくことで、将来的に可能になるかもしれないと説明された。

片岡副査より、細胞増殖阻害の実験ではエストロゲン依存的に細胞が増殖するのか、また、増殖カーブでグラフを描いた時にはどうなるのかとの質問があり、培地中（血清中）のエストロゲンで細胞は増殖していること、化合物処理によって生存している細胞をカウントしているが、どのような増殖カーブを描いているかはデータを用意していないためその場では結果について示せないと回答された。PROTAC が細胞中のどこで ER α を分解しているのかとの質問に対して、実験的な証明はないが、評価で使用した MCF7 細胞では細胞質、核内に ER α が存在していること、また、蛍光標識化された化合物が同様の局在を示すと説明された。さらに、他の研究グループによるデコイ核酸型 PROTAC の研究では、複数のオルガネラでの分解が示唆されていると回答された。代表的な E3 リガーゼの細胞内局在、それらの PROTAC について ER α 分解活性が異なった理由についての質問に対し、cIAP、CRBN、VHL は細胞質、核内に存在していること、3 種類の E3 リガンドにより ER α 分解活性に差が見られたのは E3 リガーゼ毎に最適なリンカー長が異なるためだと考えられると回答された。ネガティブコントロールとしてデザインしたスクランブル配列を規則性のある繰返し配列にした理由、それにより完全な 2 本鎖を形成できない可能性があるのではないかととの質問については、先行研究で完全にランダム化した配列を含めて複数のスクランブル配列を検討した結果に基づいてデザインしたこと、CD スペクトルによる 2 本鎖形成は確認しているがそれ以上の詳細な高次構造解析は行っていないと回答された。大腸菌由来の Exonuclease III の使用理由については、今回は汎用性の観点から選択したがセルライゼットで行うと更に良かったと説明された。

寺山副査より、細胞評価での PROTAC 濃度が高い理由について質問があり、低分子 PROTAC と同等の強活性が未だ達成されていない理由として分子構造の最適化、細胞内配送技術が十分ではないことが考えられると説明された。PS 化修飾による特異性の低下に関しては、疎水性の向上による非特異的結合の増加と高次構造の不安定化が原因である可能性があると回答された。また、CPP コンジュゲート型核酸 PROTAC の細胞内取り込みメカニズムについては、今後のエンドサイトーシス阻害剤等の評価を通じて明らかになる予定であると説明された。

和田副査より、PS 化修飾を行った理由、また PS 化により疎水性が向上した理由について質問があり、臨床試験や文献での報告をもとに本修飾を検討したと回答された。しかしながら PS 化が疎水性を向上させる分子レベルのメカニズムについては、詳細な説明がなされなかった。PS 化 PROTAC が高濃度で ER α 分解活性が低下した理由についての質問では、PROTAC でよく見られるフック効果の可能性であると回答された。ER が関与していない細胞での増殖抑制評価について質問され、ER 関与以外の細胞での評価に関してはまだ行っておらず、今後の必要な実験だと回答された。疎水性 CPP の利用理由については、カチオン性 CPP だと核酸との静電的な相互作用で凝集が起こり合成や精製に課題があるため適していないと回答された。特異性を高めるためのアプローチとしては、細胞・組織特異的に発現する受容体リガンドの利用が挙げられると説明された。

【関連分野（理学）】有田主査からユビキチンプロテアソームシステム（UPS）に関する質問に対し、永沼氏は UPS については適切に説明したが、代表的な E3 リガーゼの型に関しては説明できなかった。今後の研究方針に関しては、デコイ核酸型 PROTAC を用いて転写因子を分解する能力に一般性を持たせたいと説明された。片岡副査からの CRBN、VHL、IAP の役割に関する質問に対して、永沼氏は IAP がアポトーシス阻害タンパク質であること、VHL が HIF1 に関与していることを回答したが、それ以上の詳細な情報は提供できなかった。寺山副査より、今後の分子デザインに CPP/HDO の利用を考えた理由について質問があり、研究室内で様々な CPP を開発していること、そこに HDO を組み込むことで細胞内で活性型 PROTAC を生成できる可能性があるため、そのような分子デザインを行ったと説明された。和田副査からの PROTAC の開発動向に関する質問には、20 品目以上が臨床試験中であること、ER、AR がそれぞれ Phase III、II であり承認が近いこと等、適切な説明がなされた。デコイ核酸 PROTAC の開発を進める上での課題点についての質問に対しては、細胞内標的核酸医薬品の共通の問題として、効率的な細胞内導入が挙げられると回答された。一方で DDS 技術の向上により上市されている核酸医薬品も増えてきていることから、それらの技術を応用することで核酸型 PROTAC の開発も進むことが期待されるとの説明があった。核酸分子を医薬品として開発する際にヌクレアーゼ耐性を付与する手法についての質問に対しては、DNA よりも不安定な RNA では、2'-水酸基のフッ素化、メトキシ化が汎用されており、架橋型核酸として LNA の活用も行われていると回答された。

【外国語科目】有田主査より、英文報告書の執筆者確認や他者による校閲がなされていないかとの質問があり、永沼氏より、全て自身で執筆したとの回答があった。また、低分子型 PROTAC、ペプチド型 PROTAC、核酸型 PROTAC の特徴について英語で説明があり、流暢とは言えないものの内容を伝達できるレベルであった。審査員による合議の結果、博士の学位レベルに到達していると判断された。

最終的に審査委員全員で討論を行った結果、専門分野の知識、質疑応答、英語力すべてにおいて合格点に達していることから、総合的に永沼美弥子氏は、博士（理学）の学位を授与されるのに相応しい資質を有していると判断された。