

# 必要な時だけ標的タンパク質を壊すがん治療

## —薬剤投与によるマウス内在性 PD-1 の分解—

### 概要

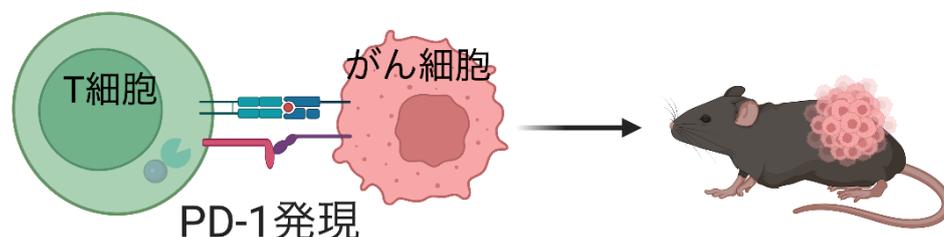
京都大学大学院医学研究科 成瀬智恵 准教授、浅野雅秀 同教授、筑波大学トランスボーダー医学研究センター 杉山文博 教授、岐阜大学 医学部附属病院 宮崎龍彦 教授らの共同研究グループは、特定のタンパク質を必要な時だけ除去する SMASh デグロンシステム (注1) を用いて、マウスの 内在性 (注2) PD-1 の分解およびがん細胞の増殖抑制に成功しました。

免疫機能のブレーキの役割を持つ PD-1 タンパク質の機能を阻害することで、免疫細胞によるがん細胞の傷害活性を高めるがん免疫療法は、高い治療効果が認められますが、PD-1 の機能を長く阻害しすぎてしまうことが原因で自己免疫疾患を発症する例があります。そこで研究グループは、免疫細胞上の PD-1 を短い時間だけ分解できるようながん治療モデルを構築しました。本研究は、必要な時だけ特定のタンパク質を分解して減らすことのできるデグロンシステムによって、マウス生体内の内在性タンパク質を機能阻害できることを示した最初の例であり、様々な生物現象や病気の治療法の研究などに応用することが期待できます。

本成果は、2022 年 6 月 17 日 (現地時刻) に英国の国際学術誌「NAR Cancer」にオンライン掲載されました。

### SMAShデグロンシステムによるタンパク質分解

#### 野生型またはPD-1-SMAShノックインマウス



#### ASV/GRVを投与したPD-1-SMAShノックインマウス

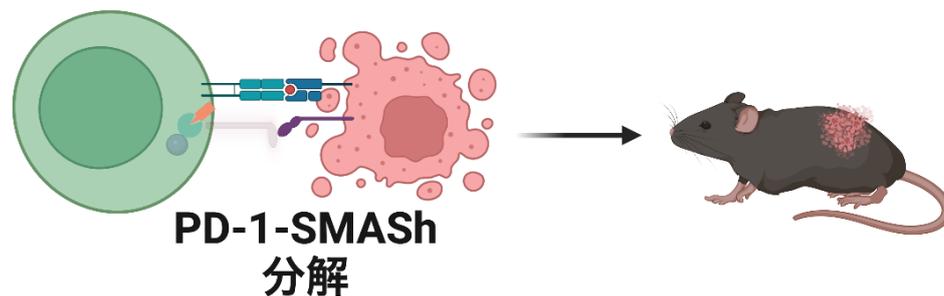


図 SMASh デグロンシステムを免疫細胞に組み込み、PD-1 を薬剤 (ASV/GRV) で分解できるようにしたマウスでは、移植されたがん細胞の増殖が抑制されました。

## 1. 背景

がんの治療に関する研究は近年大きく進歩しており、特に、元来生物に備わる免疫力を最大限に利用してがんを排除しようとする免疫療法が注目されています。免疫機能のブレーキの役割を持つ PD-1 の機能を阻害することで、免疫細胞によるがん細胞の傷害活性を高めるがん免疫療法は、高い治療効果が認められますが、自己免疫疾患を発症する例があります。そこで、免疫細胞上の PD-1 を必要な期間だけ分解できるようなシステムを構築すれば、この問題を解決できる新しい治療法開発につながるのではないかと考えました。

今回、我々はデグロンシステムに注目しました。デグロンシステムは、細胞が本来持つタンパク質分解システムであり、これまでも植物のオーキシンを添加するオーキシンドグロン (AID) システム (注 3) など、デグロンシステムを利用した様々なタンパク質分解法が世界的に開発され、培養細胞や体外での研究に広く用いられています。しかしながら、動物生体の内在性タンパク質に応用した例は未だありませんでした。また、医療応用を考えると、タンパク質分解の際に添加する薬剤は医療用に認可されたものが望ましいと考えました。

## 2. 研究手法・成果

マウスの PD-1 にタンパク質を分解するための目印である SMASh タグを融合させるため、遺伝子組換え技術を用いて SMASh タグ遺伝子をマウス PD-1 遺伝子の後ろに挿入しました。SMASh タグを融合したタンパク質は C 型肝炎の治療薬であるアスナプレビル (ASV) やグラゾプレビル (GRV) の投与により分解されます。PD-1-SMASh ノックインマウス (注 4) の免疫細胞を培養して、ASV や GRV を加えると、がん免疫において重要な役割をしている CD8 陽性 T 細胞で PD-1 が減少しました。また、MC-38 大腸がん細胞株を移植し、ノックインマウスに薬剤を投与したところ、野生型マウスや薬剤を投与しないノックインマウスと比べて、がん細胞の増殖が抑制されました。さらに、ノックインマウスの骨髄細胞を移植して、免疫細胞をノックインマウスのものに置き換えた野生型マウスでもがん細胞の増殖が抑制されました。

## 3. 波及効果、今後の予定

本研究は、必要な時だけ特定のタンパク質を分解して減らすことのできるデグロンシステムによって、マウス生体内の内在性タンパク質を機能阻害できることを示した最初の例であり、様々な生物現象や病気の治療法の研究などに応用することが期待できます。

残念ながら、本研究のノックインマウスは、1 年齢以上の高齢になると一部の個体で軽い自己免疫疾患を発症してしまいました。これは、SMASh デグロンシステムが薬剤投与なしでも PD-1 の分解を促進しており、ノックインマウスでは野生型よりも PD-1 の発現量が低下してしまっているためと考えられました。そこで、薬剤投与なしで分解が起こらないシステムの開発を現在進めています。

## 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (18K19269, 20H03171)、文部科学省先端モデル動物支援プラットフォーム (Ab200012, Ab210007) の支援を受けて行われました。

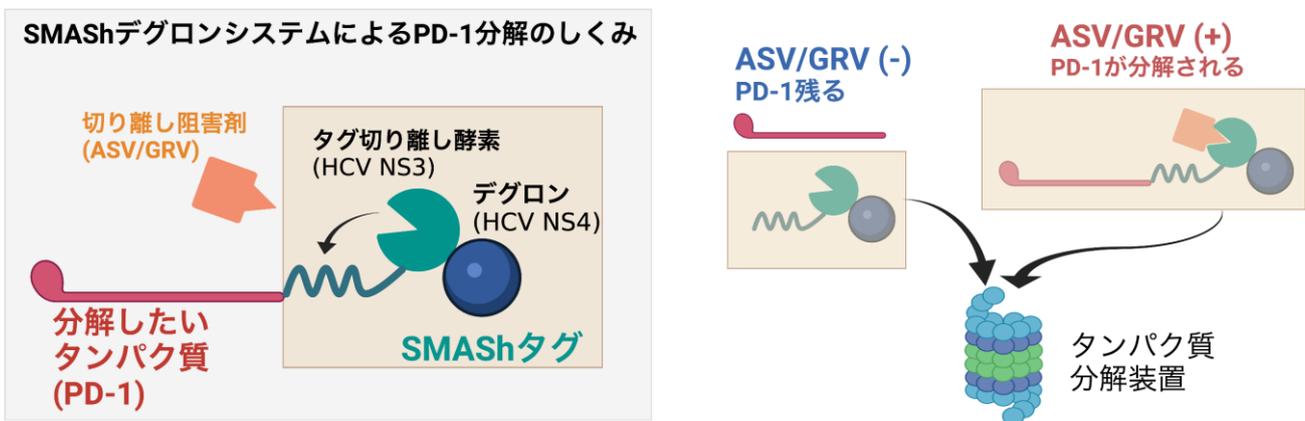
### <用語解説>

(注 1) SMASh デグロンシステム (Small Molecule-Assisted Shutoff の略。"smash"は英語で「粉々に壊す」という意味。)

スタンフォード大・Lin 博士らが開発したタンパク質分解システム。分解したいタンパク質（本研究では PD-1）に融合させる部品を「SMASH タグ」と呼んでいる。

左図：SMASH タグはタンパク質分解酵素 HCV NS3 と、HCV NS3 が分解するアミノ酸配列、およびデグロン（細胞のタンパク質分解システムに「このタンパク質を分解してください」と知らせる構造）HCV NS4 から構成される。

右図：HCV NS3 の機能がアスナプレビル（ASV）やグラゾプレビル（GRV）によって阻害され、SMASH タグが PD-1 から切り離されなくなると、PD-1 は SMASH タグと共に分解される（赤字）。薬剤がない時には、SMASH タグが PD-1 から切り離されるので、PD-1 は分解されない（青字）。ASV や GRV を加えることで PD-1 が一時的に分解されるようになって、薬剤を除去すれば再び PD-1 は発現する。



**(注2) 内在性** 遺伝子組換え技術によって、外部から導入された遺伝子から発現するタンパク質等を外来性と呼ぶのに対して、生物の染色体に本来存在している遺伝子から発現するタンパク質を内在性と呼ぶ。生体内でのデグロンシステムの使用例は、これまで外来性タンパク質の分解に限られていた。

### (注3) オーキシンドグロン (AID) システム

国立遺伝学研究所・鐘巻博士らが開発した植物由来のタンパク質分解システム。タンパク質分解の目印をつける酵素 TIR1 を動物細胞に導入し、植物ホルモンであるオーキシンを加えることで、動物細胞での標的タンパク質分解が可能。

**(注4) ノックインマウス** 遺伝子組換え技術によって特定の遺伝子が破壊されたマウスを「ノックアウト (knock-out) マウス」と呼ぶのに対して、特定の遺伝子や特定の染色体領域に外来性の遺伝子が挿入 (in) されたマウスを、ノックアウト (out) と対比して「ノックイン (knock-in) マウス」と呼ぶ。

### <論文タイトルと著者>

タイトル：A degron system targeting endogenous PD-1 inhibits the growth of tumor cells in mice.

(デグロンシステムによるマウス内在性 PD-1 の分解はがん細胞の増殖を抑制する)

著者： Chie Naruse, Kazushi Sugihara, Tatsuhiko Miyazaki, Xuchi Pan, Fumihiro Sugiyama, Masahide Asano (成瀬智恵、杉原一司、宮崎龍彦、パンシュチ、杉山文博、浅野雅秀)

掲載誌：NAR Cancer DOI : 10.1093/narcan/zcac019

< 参考図表 >

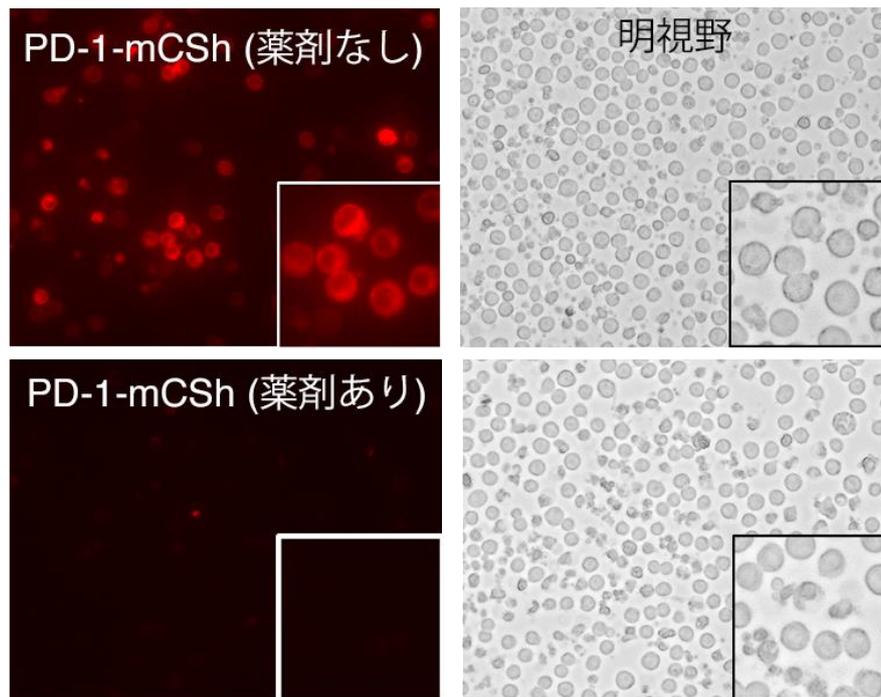


図1 PD-1-mCherry-SMASH 融合タンパク質を強制発現させた Jurkat ヒト T 細胞株での mCherry (PD-1 と共に発現するようにした蛍光タンパク質) の発現変化。薬剤を加えると mCherry の発現は低下した。右下の枠内は拡大図。

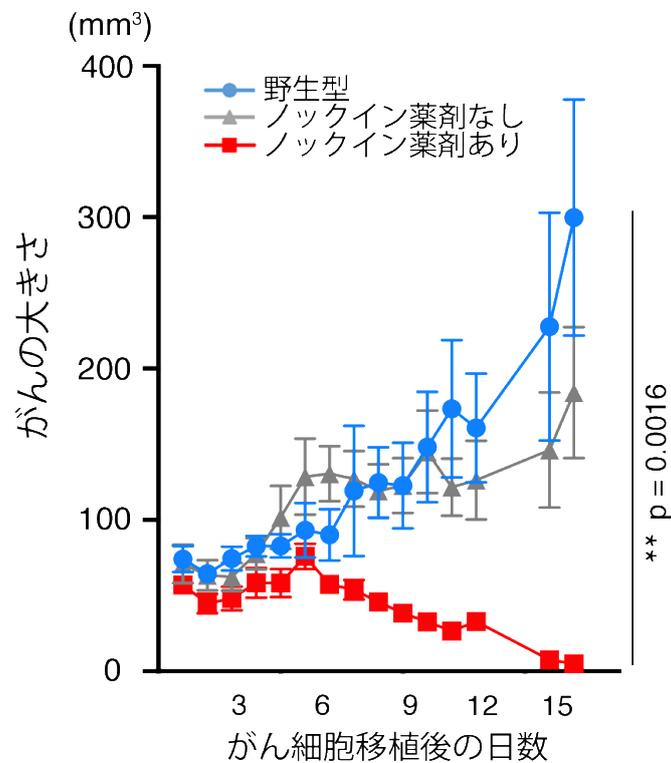


図2 ノックインまたは野生型骨髄細胞を移植した野生型マウスに MC-38 大腸がん細胞株を移植した。ノックイン血液細胞を持つマウスに薬剤を投与すると、薬剤投与なしや野生型血液細胞を持つマウスに比べてがん細胞の増殖が抑制された。