

論文の内容の要旨

造血器腫瘍関連転写因子 RUNX1 を標的とした阻害剤の開発 (Targeting the transcription factor RUNX1 for leukemia therapy)

米澤 大志

【研究背景】

転写因子 RUNX1 (Runt-related transcription factor1) は、共役因子 CBFβ と協調し造血細胞の発生及び分化を制御している。また RUNX1 の機能破綻は造血器腫瘍の原因となる。一方で、多くの造血器腫瘍細胞は、RUNX1 の活性に依存しており、RUNX1 の機能阻害は造血器腫瘍細胞株の細胞死を誘導し、造血器腫瘍モデルマウスの、生存期間を延長する (Goyama. S., et al., *J Clin Invest.* 2013)。以上の点より RUNX1 阻害剤は、多くの造血腫瘍の治療薬として期待される。しかし、

RUNX1 を直接標的とした治療薬の開発は困難を極め、未だ臨床応用には至っていない (図 1 A)。そこで RUNX1 の様な “undruggable” な分子を標的とする手法として、ユビキチン-プロテアソーム系を用いたタンパク質分解誘導療法が注目されている (Ito. T.H., et al., *Science.* 2010)。また、RUNX1 はユビキチン化修飾を受け分解される事が示唆されているが、詳細な修飾機構は不明であった (図 1 B)。

【研究目的】

転写因子 RUNX1 を標的とした造血器腫瘍の治療薬開発を最終目的とし、以下3つのテーマで研究を行った。

1. RUNX1 のユビキチン化修飾機構の解明
2. RUNX1 のユビキチン化修飾機構を利用した治療応用
3. RUNX1-CBFβ 結合阻害剤の開発

【研究成果】

1. RUNX1 のユビキチン化修飾機構の解明

(A) 新規 RUNX1 ユビキチン化 E3 リガーゼの同定

基質タンパク質のユビキチン化には、基質と E3 リガーゼの結合が重要である。そこで、タンパク質間の相互作用能を検討するアッセイ系 “AlphaScreen” (Takahashi. H., et al., *BMC plant biology.* 2009) 及びコムギ無細胞タンパク質合成系

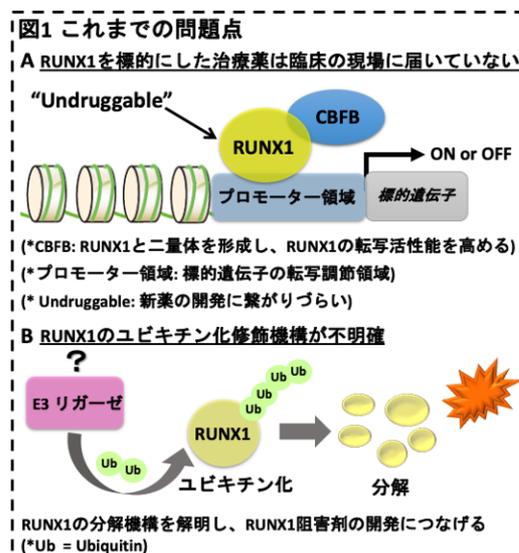
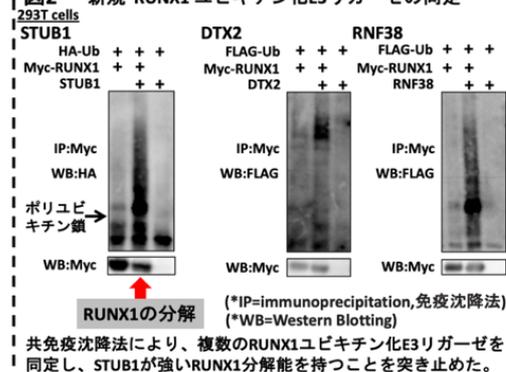


図2 新規 RUNX1 ユビキチン化E3リガーゼの同定

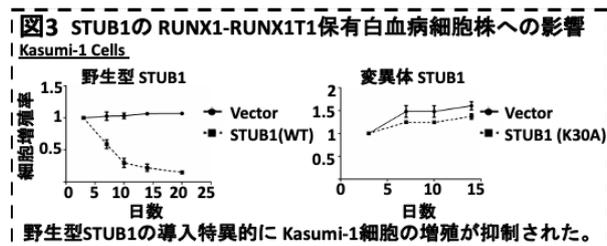


を用いて、287種類のE3リガーゼとRUNX1との結合能を評価した。スクリーニングより候補となったE3リガーゼに関して、RUNX1に対するユビキチン化能を細胞系で評価した。その結果、RUNX1のユビキチン化を誘導するE3リガーゼとして、STUB1、DTX2及びRNF38の同定に成功した。このうち、STUB1がRUNX1の分解を誘導する事を突き止めた(図2)。

(B) RUNX1 ユビキチン化 E3 リガーゼの機能解析

(B-1): E3 リガーゼ STUB1 による RUNX1 への作用

E3リガーゼSTUB1がRUNX1の分解を強く誘導することから(図2)、造血器腫瘍の原因融合遺伝子の一つであるRUNX1-RUNX1T1(AML1-ETO)への影響も検証した。RUNX1-RUNX1T1保有細胞株(Kasumi-1)



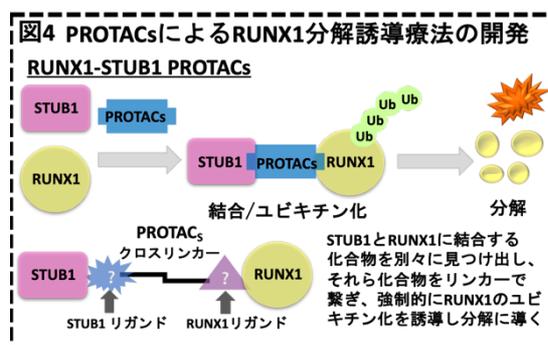
1) に STUB1 を過剰発現すると、RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化及び分解が誘導され、Kasumi-1 細胞の増殖が抑制されることを見出した(図3)。この増殖抑制能は、STUB1 の酵素活性が低い変異体 STUB1 (K30A) では認められなかった(図3)。これらの結果は、STUB1 のユビキチン化能を制御することで、RUNX1 関連造血器腫瘍に対する新しい治療法を開発できる可能性を示唆している(Yonezawa. T., et al., *J Biol Chem.*, 2017)。

(B-2): E3 リガーゼ DTX2 及び RNF38 による RUNX1 への作用

DTX2及びRNF38はRUNX1の分解を誘導しなかったが(図2)、更なる解析を行い、DTX2により誘導されるユビキチン化修飾は競合的にRUNX1自身の活性に重要なアセチル化修飾を阻害し、さらにRUNX1の核外移行を促進し、STUB1と同様にRUNX1関連造血器腫瘍細胞株の増殖が抑制される事を見出した。他方、RNF38はSTUB1等とは逆にユビキチン化を介してRUNX1の安定性を高め、RUNX1の転写活性や分化誘導能を強める事が判明した(Yonezawa. T., et al., *Biochem and Biophys Res Commun.*, 2018)。

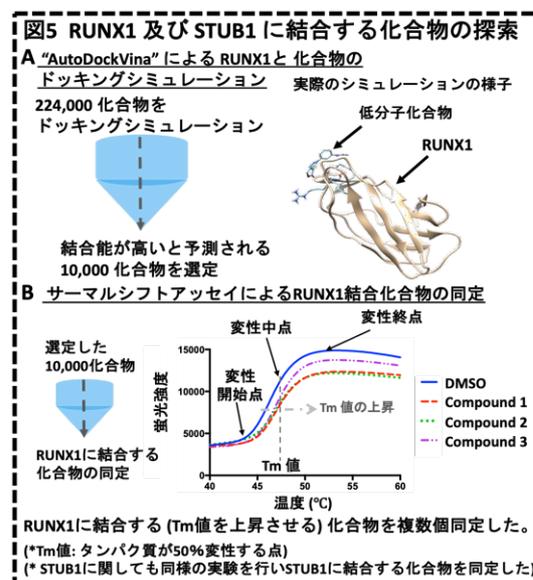
2. RUNX1 のユビキチン化修飾機構を利用した治療応用

(A)(B)の結果を基に、STUB1によるRUNX1の分解を人工的に誘導する化合物 RUNX1-STUB1 PROTACs (Proteolysis Targeting Chimera) の作成に着手している。“PROTACs”とは、標的タンパク質とE3リガーゼを強制的に近接させ分解誘導を促す、本来“undruggable”な分子に対し、治療戦略として期待される分解誘導薬である。



そこで、RUNX1-STUB1 PROTACs の作成にあたり、筆者らは、RUNX1 又は STUB1 各々に結合する化合物の同定を試みた (図 4)。

まず、RUNX1 又は STUB1 に各々結合する化合物を同定すべく、化合物がタンパク質に結合しやすい領域をソフトウェア “MOE” (Molecular Operating Environment) を用いて探索し、タンパク質側のドッキングシミュレーションサイトを選定した。次に、選定したサイトにドッキングシミュレーションソフト “AutoDockVina” を用いて、東京大学創薬機構の約 20 万個の化合物と RUNX1 又は STUB1 とのドッキングシミュレーションを行った (図 5A)。更に、タンパク質とのドッキングスコアが高い化合物上位 1 万個に対して、タンパク質と化合物が結合した際に生じる熱安定性から結合能を評価する “サーマルシフトアッセイ” を用いて、スクリーニングを行った。その結果、RUNX1 又は STUB1 に各々結合する化合物の同定に成功した (図 5B)。現在同定した化合物の物性を詳細に解析し、RUNX1-STUB1 PROTACs 合成に最適な化合物の選定を行っている。

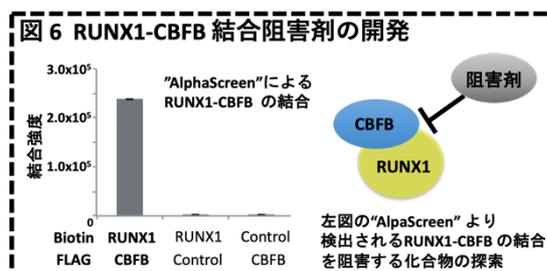


3. RUNX1-CBFB 結合阻害剤の開発

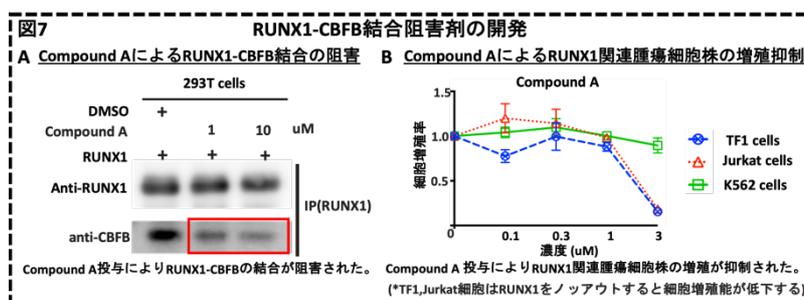
RUNX1 は CBFB と二量体を形成し共役的に機能する事から、RUNX1-CBFB 結合阻害剤の開発は世界中で長年試みられてきた。しかしながらこれまでの RUNX1-CBFB 結合阻害剤で、臨床応用に至る有用な新薬は開発されていない

(Cunningham. L., et al., *PNAS*. 2012)。そこで筆者らは、RUNX1 の E3 リガーゼを同定する際に用いた “AlphaScreen” を利用し、RUNX1-CBFB の結合を阻害する化合物の探索を試みた (図 6)。

まず E3 リガーゼの探索時と同様に、コムギ無細胞系を用いて RUNX1 及び CBFB タンパク質の全長合成を行った。さらに、“AlphaScreen” を用いて、



RUNX1-CBFB の強い結合を検出することに成功した (図 6)。以上の実験系を用いて、



東京大学創薬機構のコアライブラリー (約 1 万化合物) の中から、RUNX1-CBFB の結合を阻害する化合物の探索を行った。また、細胞を用いた共免疫沈降実験を行い、細胞内でも RUNX1-CBFB の結合を阻害する Compound A の同定に成功した (図 7A)。

さらに Compound A は、RUNX1 の転写活性及び下流遺伝子の発現調節を抑制し、RUNX1 関連造血器腫瘍細胞株 (TF1, Jurkat) に対して強い増殖抑制効果を示した (*K562 細胞: RUNX1 非依存性造血器腫瘍細胞株) (図 7B)。また、化合物とタンパク質の直接的な結合能を評価する “MST アッセイ” を用いて、RUNX1 又は CBFB と Compound A の結合能を評価し Compound A は RUNX1 に結合している事を確認した。

【考察】

本研究ではコムギ無細胞タンパク質合成系及び “AlphaScreen” を用いて試験管内で RUNX1 と相互作用する E3 リガーゼの候補を絞り込み、細胞レベルでのアッセイと組み合わせることで、実際に RUNX1 のユビキチン化修飾を行う 3 つの新規 E3 リガーゼを同定した。この様に、タンパク質工学と生化学的実験を組み合わせる手法は、標的分子をユビキチン化する E3 リガーゼの探索に極めて有効な方法と考えられる。また、今回同定した E3 リガーゼ STUB1、RNF38 及び DTX2 による RUNX1 のユビキチン化修飾は、それぞれ RUNX1 の分解、安定化、そして翻訳後修飾競合による活性低下という異なる作用を示した。これらの差異がどのように生じるのかは現時点で不明であり、その解明は今後の大きな課題である。また、RUNX1 のユビキチン化修飾が、RUNX1 の生理機能に及ぼす影響に関しても不明な点が多い。したがって、RUNX1 が制御する造血発生及び分化においてこれらの E3 リガーゼがどのように関わっているかを生理学的観点より解明することも非常に重要である。

さらに本研究では、バーチャルスクリーニングや “AlphaScreen” など多様なアッセイ系を用いて、RUNX1-STUB1 PROTACs 及び RUNX1-CBFB 結合阻害剤の開発にも取り組んだ。バーチャルスクリーニングには東京大学医科学研究所にあるスーパーコンピュータ “Shirokane” を用いることで、通常のパソコンであれば 1 年以上かかるスクリーニングを 2 週間程度で終了させることが出来た。さらに STUB1 は生体内のあらゆる臓器に発現しているので、STUB1 PROTACs を他の標的タンパク質に応用することで、造血系以外のあらゆる疾患の治療薬になる可能性を秘めている。また、過去に報告された RUNX1-CBFB 結合阻害剤は全て CBFB に直接結合するものであった。しかし、今回同定した Compound A は、RUNX1 に直接結合することで RUNX1 の活性を低下させることから、既存の RUNX1-CBFB 結合阻害剤とは異なる薬効を示すことが期待される。以上本研究では、造血器腫瘍関連転写因子 RUNX1 に対するユビキチン化修飾機構を解明し、さらに RUNX1 阻害剤のリード化合物の同定に成功した。