

TSUBAME 共同利用 令和4年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 新規 BRCAness 誘導阻害剤開発に向けた理論研究
英文: Theoretical study for the development of novel BRCAness inhibitor

利用課題責任者

小関 準

所属

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院医学系研究科

邦文抄録(300 字程度)

近年、合成致死の原理を利用した PARP 阻害剤による BRCA 変異陽性がんの治療法が再脚光を浴びている。PARP 阻害剤の有効性は様々な癌腫においても確認されているため、幅広くリバース・イノベーションを起こしうる可能性がある。そこで、未だ詳細が明らかではない「BRCAness」に関わる分子を標的とした、革新的な新規誘導阻害剤の研究開発を行うことを目的とし、研究を推進した。CRISPR スクリーニングから得られた創薬標的候補(38 遺伝子)について創薬標的としてのランク付けを行い、ランクが高いものから順にタンパク質の構造学および熱力学的解析を実施した。機能阻害剤となるリード化合物探索を行った。

英文抄録(100 words 程度)

Recently, PARP inhibitors based on the principle of synthetic lethality have received renewed attention as a treatment for BRCA mutation-positive cancers, and their efficacy has been confirmed in a variety of carcinomas, leading to broad reverse innovation. 38 genes obtained by CRISPR screening are drug discovery targets, ranked from highest to lowest in terms of protein structure and molecular biology. Protein structures and thermodynamic analyses were performed to find candidate compounds for functional inhibitors.

Keywords: PARP inhibitor, BRCAness, in silico drug design, thermodynamical analysis, structural analysis

背景と目的

近年、合成致死の原理を利用した PARP 阻害剤による BRCA 変異陽性がんの治療法が、再注目されてきている。国内だけではなく海外の臨床試験からも、様々ながん種において有効性が確認されてきている。2016 年に行われた転移性前立腺がん患者の大規模解析において、PARP 阻害剤の標的となりうる DNA 修復不全“BRCAness”に関わる候補として 15 個の遺伝子に変異が同定された。しかしながら BRCA 変異陽性でも全く効果を認めない症例の存在や PARP 阻害剤に対する有意なレスポンスが認められない変異患者の存在が報告されている。そこでこれらの問題点を解決するために、CRISPR スクリーニングから得られた“BRCAness”に関わる分子を標的とした、革新的な新規誘導阻害剤の開発を目指した。

本プロジェクトでは、実験的に“BRCAness”に関わる遺伝子を抽出することで従来の問題克服を試み、

AlphaFold2 により得られたタンパク質構造の構造学的解析および熱力学的解析からタンパク質内の有効標的部位の同定と機能阻害のための候補化合物探索を実施した。その結果、複数の標的に対するリード化合物を同定することができた。

概要

Domain-focused CRISPR スクリーニングから得られた合成致死性を示す機能的ドメイン近傍のタンパク質構造を予測し、当該領域に対して独自の *in silico* 創薬デザイン戦略を適用することで、ドメイン活性特異的な新規阻害剤を設計した。申請者は AlphaFold2 を用いて予測した様々な候補タンパク質の構造学的解析と、分子動力学シミュレーションによる熱力学的解析を実施することで、独自の指標によって創薬標的の可能性をランク付けした。その結果を用いて、可能性の高いタンパク質から順に阻害剤候補化合物の探索を実施し

た。

結果および考察

CRISPR スクリーニングから得られた共通トップヒットのうち、親株と耐性株に共通する 2 つのタンパク質、および親株のみでのヒットと耐性化株のみでのヒットした計 38 遺伝子について、インシリコ創薬標的に適しているかどうかを検討した。その結果、親株と耐性株の共通ヒットと親株のみでのヒット因子についてはインシリコ設計が容易ではないことが判明した。具体的には有効な阻害部位を絞り込むことが困難、もしくは特定の 2 次構造を有していないためコンピュータ設計が容易ではないことが想定された。また特定の 2 次構造を有してはいるものの、標的部位の候補の絞り込みが困難であるため、Domain focused CIRPSR screening 等の標的部

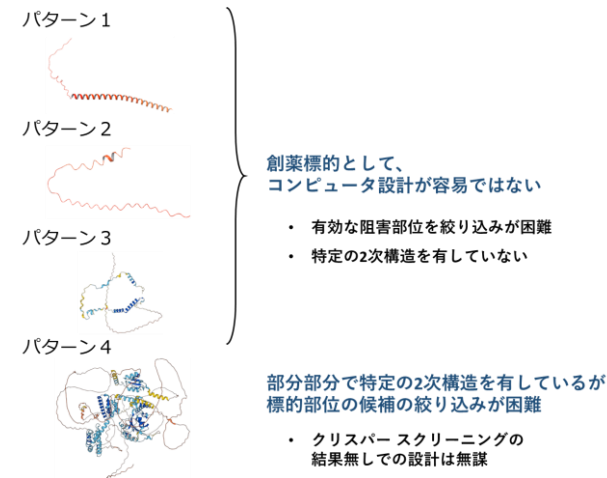


図 1 CRISPRスクリーニングから得られた候補分子のタンパク質構造パターン

そこで耐性株に特異的なヒット遺伝子群にフォーカスし詳細な解析を進めることとした。まず、mkDSSP を用いてタンパク質全体に有する特定を有している割合、部分構造が集中しているのか否か、標的部位の同定もしくは推定できるかを指標として 6 つにランク付けした。下記が創薬標的としてのランキングで用いた指標の詳細である(図 2)。

下記の指標をもとに、コンピュータ設計での妥当性を決定

	タンパク質骨格の8割以上が特定の2次構造を有する (α-helix, β-sheet 等)	2次構造の部分集合が集まっている	標的部位の同定が可能
LANK-A	↑ 有している	↑ 集まっている	同定可能
LANK-B			標的候補を5つ以下に絞れる
LANK-C		↓ 集まっていない	標的候補を5つ以下に絞れない
LANK-D	↓ 有していない	↓ 集まっていない	標的候補を5つ以下に絞れない
LANK-E			
LANK-F			

LANK-A: 創薬標的としての可能性がある
 LANK-B: 簡単ではないが可能性がある
 LANK-C: 可能性がないわけではない
 LANK-D: 難しいが可能性がないわけではない
 LANK-E: 直接標的とするのは困難
 LANK-F: 非常に困難

図 2 in silico 創薬標的としてのランク付け

標的部位の同定のために、α-ヘリックスやβ-シート等の特定の 2 次構造を有している中で、構造に柔軟性を有している箇所の有無を判定した。これは柔軟性があることで標的タンパク質の界面が結合対象タンパク質に対して Fit できる可能性を有するためである。一方で、変性領域部位に関しては、PPI 結合に関与する可能性はあるが、コンピュータ上で取り扱う上で計算時間が発散するため(現在の計算限界)、インシリコ設計では除外している。この指標をもとにして、RANK-A に 1 分子、RANK-B に 9 分子抽出することができた。特に創薬標的としての可能性が高いタンパク質の例として、低分子化合物による阻害が見込めそうなもの(図 3 左)や、タンパク質の構造的柔軟性と表面構造からタンパク質間相互作用阻害が見込めそうなもの(図 3 右)のようなものがピックアップされた。現在までに複数のタンパク質に対する阻害剤候補化合物の抽出に成功している(図 4)。現在もなお、順次可能性が高そうなタンパク質に対して引き続きスクリーニングを実施している。

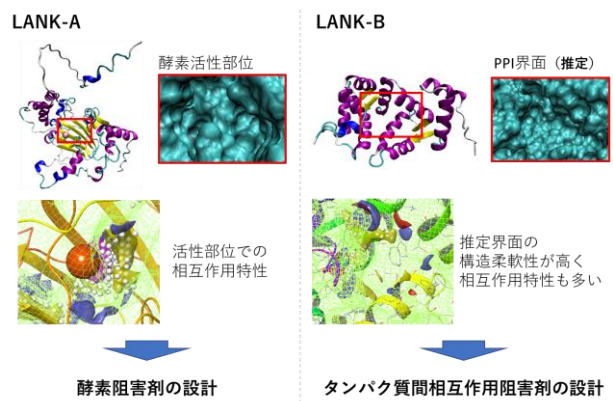


図 3 創薬標的としての可能性が高いタンパク質の例

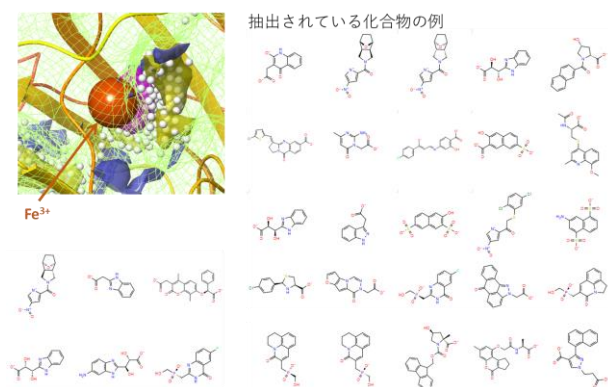


図 4 *in silico* 手法で抽出したリード化合物候補

まとめ、今後の課題

CRISPR スクリーニングから得られた創薬標的候補 (38 遺伝子) について創薬標的のランク付けを行い、可能性が高いものから構造学・熱力学的解析を実施することで、機能阻害剤となるリード化合物探索を行った。Domain-focused CRISPR screening と *in silico* drug screening の統合解析から得られた候補化合物の検証を引き続き行い、PARP 阻害剤耐性細胞に対して強い BRCAness 誘導効果を示す化合物を *in vitro*、*in vivo* の両面から選定する。さらに、その機序の解明に向け、Frataxin complex に関しては代謝、JMJD6/BRD2 についてはエピゲノムの変化を阻害剤およびノックアウト細胞株を用いて詳細に検証する。特に、「PARP 阻害剤耐性細胞は Frataxin の働きによって TCA 回路からエネルギーを得ることができ、それにより活性酸素種による DNA 損傷を抑止している」可能性や「PARP 阻害剤耐性細胞では DNA 修復反応に重要なクロマチンリモデリングが JMJD6/BRD2 を介して活性化している」可能性等の仮説について解析を進める。また、今回の *in silico* 解析では酵素阻害剤や PPI の設計のみ可能となっており、degrader については検討できていない。そのため、今後創薬標的について degrader の設計が可能かどうかを関連ベンチャー企業等との連携の上で検討を進めていく予定である。