

標的蛋白質を特異性高く、ある期間 だけマウス体内で分解、消失させる

理化学研究所 生命医科学研究センター
免疫転写制御研究チーム
チームディレクター 谷内 一郎

2025年6月3日

背景

- 生物学では研究対象のタンパク質を欠損、分解、阻害した影響を観察することで、その機能を明らかにする機能喪失実験系が有用

様々なレベルでの機能阻害

mRNAの分解・翻訳の阻害
RNAi

転写

DNAの改変

遺伝子ノックアウト

細胞腫特異的なノックアウト

翻訳

タンパク質レベルでの阻害

小分子阻害薬
中和・阻害抗体

翻訳後修飾

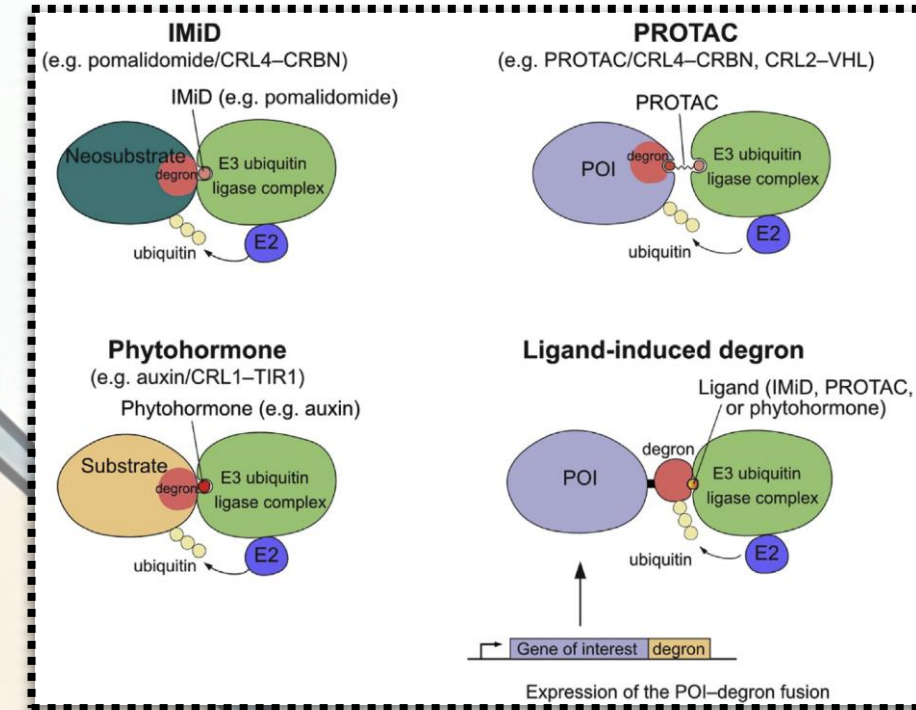
分解

タンパク質の分解

標的タンパク質分解技術

標的タンパク質分解技術

* ほとんどは生体外での応用にとどまる



Kanemaki MT. Curr Opin Cell Biol. 2022.

従来の機能喪失実験系とその問題点

マウス生体内での機能喪失実験系はゲノムDNAの改変に基づくものが多く機能喪失は不可逆的であり、またDNA改変からタンパク質の機能喪失までのタイムラグがある。

- ➡急速、一過性の機能喪失系の構築が必要
- ➡標的タンパク質分解系が有効

標的タンパク質分解技術にはいろいろな方法があるが、細胞株での実施に限られており、マウス生体内に応用する技術開発には至っていない。

マウス生体内標的タンパク質分解技術の開発の概要

マウス以外の生物由来のユビキチンリガーゼ複合体
構成分子を細胞種特異的に発現コントロール

異種由来セレブロン
(OsTIR1または
hCRBN)

発現OFF

発現ON

マウスがもともと発現している
ユビキチンリガーゼ
複合体構成分子

標的タンパク質の遺伝子にデグロン配列を挿入

- ・核内タンパク質
- ・細胞膜タンパク質

マウスゲノム

転写翻訳

標的
タンパク

CRISPR/Cas9

デグロン配列

デグロン配列

標的
タンパク

生体内標的タンパク質分解システムの構築

OsTIR1/5-Ph-IAA/mAID系及びhCRBN/ポマリドミド/S4D系

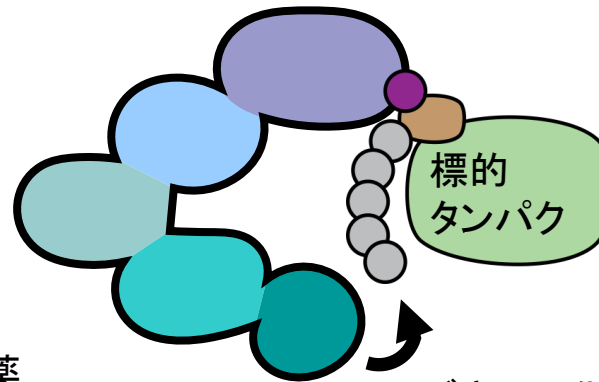


ユビキチンリガーゼ
複合体

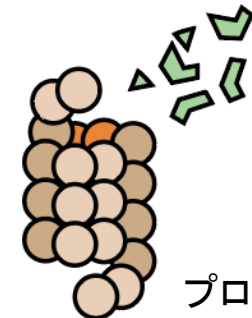
デグロン配列
(mAIDまたはS4D)

標的
タンパク

デグロンシステム作動薬
(リガンド)



ユビキチン化



プロテアソームによる
標的タンパク質分解

① ユビキチンリガーゼ複合体のin vivo再構成

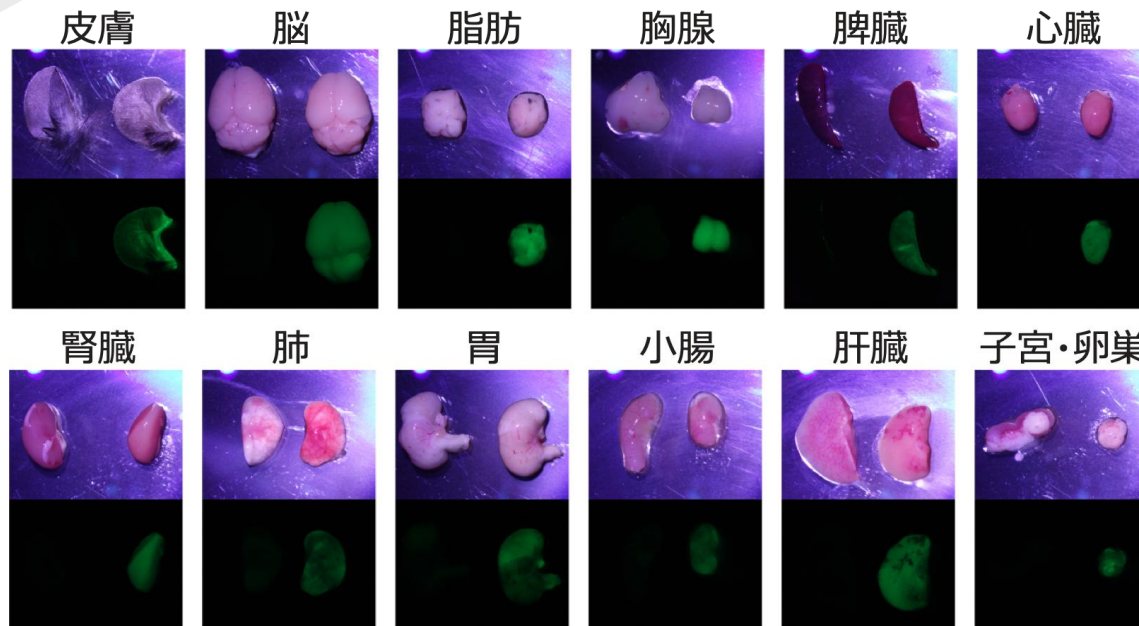
マウス以外の生物由来のユビキチンリガーゼ複合体
構成分子を細胞種特異的に発現コントロール

異種由来セレブロン
(OsTIR1または
hCRBN)

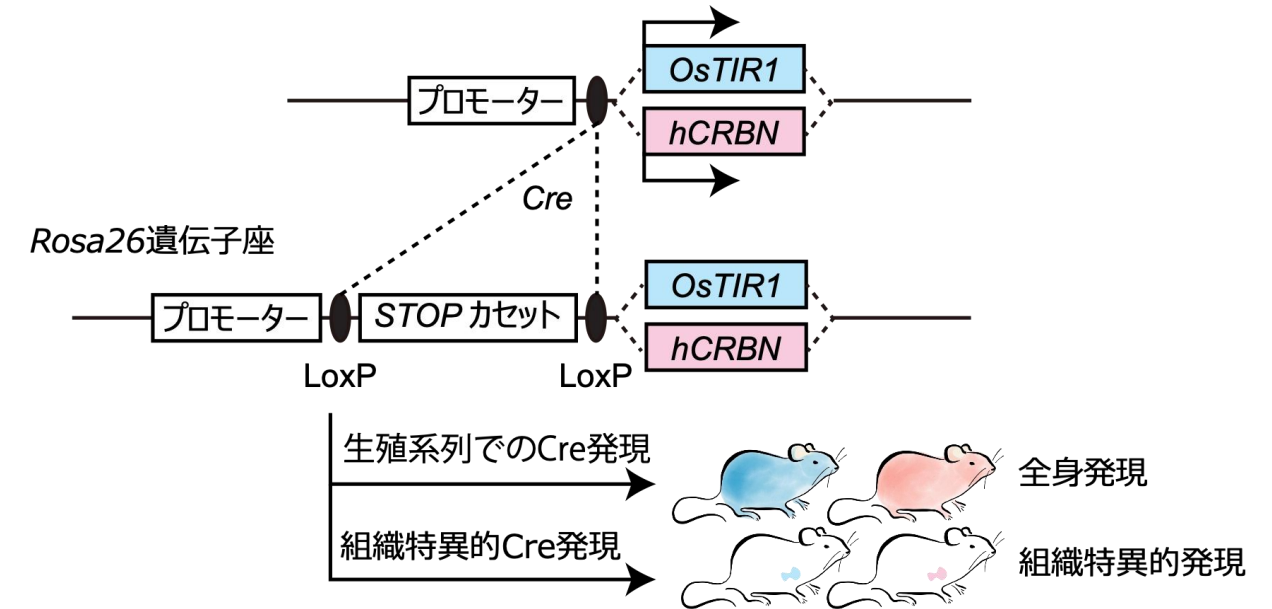
発現OFF

発現ON

マウスがもともと発現している
ユビキチンリガーゼ
複合体構成分子



Rosa26遺伝子座に*OsTIR1*遺伝子もしくは*hCRBN*遺伝子を導入



Cre-LoxPシステムで細胞種特異的に発現
をコントロールすることができる

OsTIR1を全身で発現するマウス系統の
解析結果

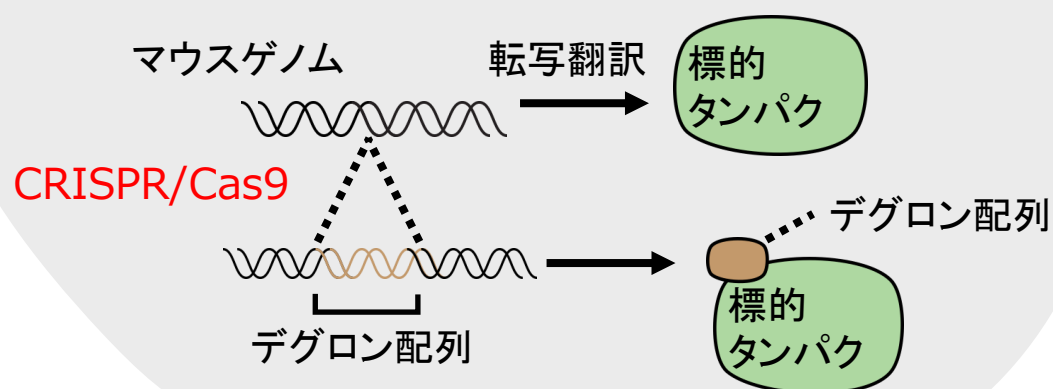
左: 野生型マウス
右: OsTIR1全身発現マウス
(緑色蛍光で発現を確認)

② 標的タンパク質へのデグロン配列の付加

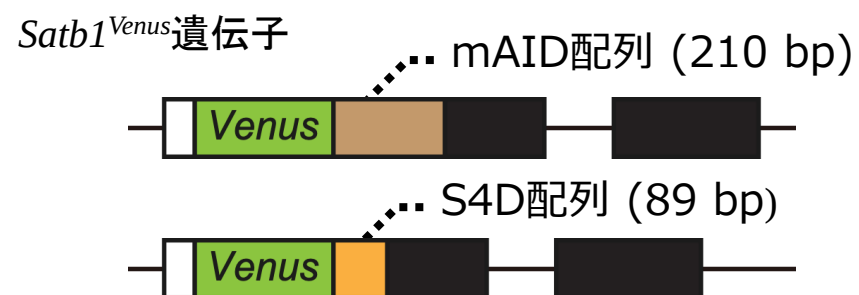
(検出用蛍光タグ配列付加済みの標的タンパク質に挿入)

標的タンパク質の遺伝子にデグロン配列を挿入

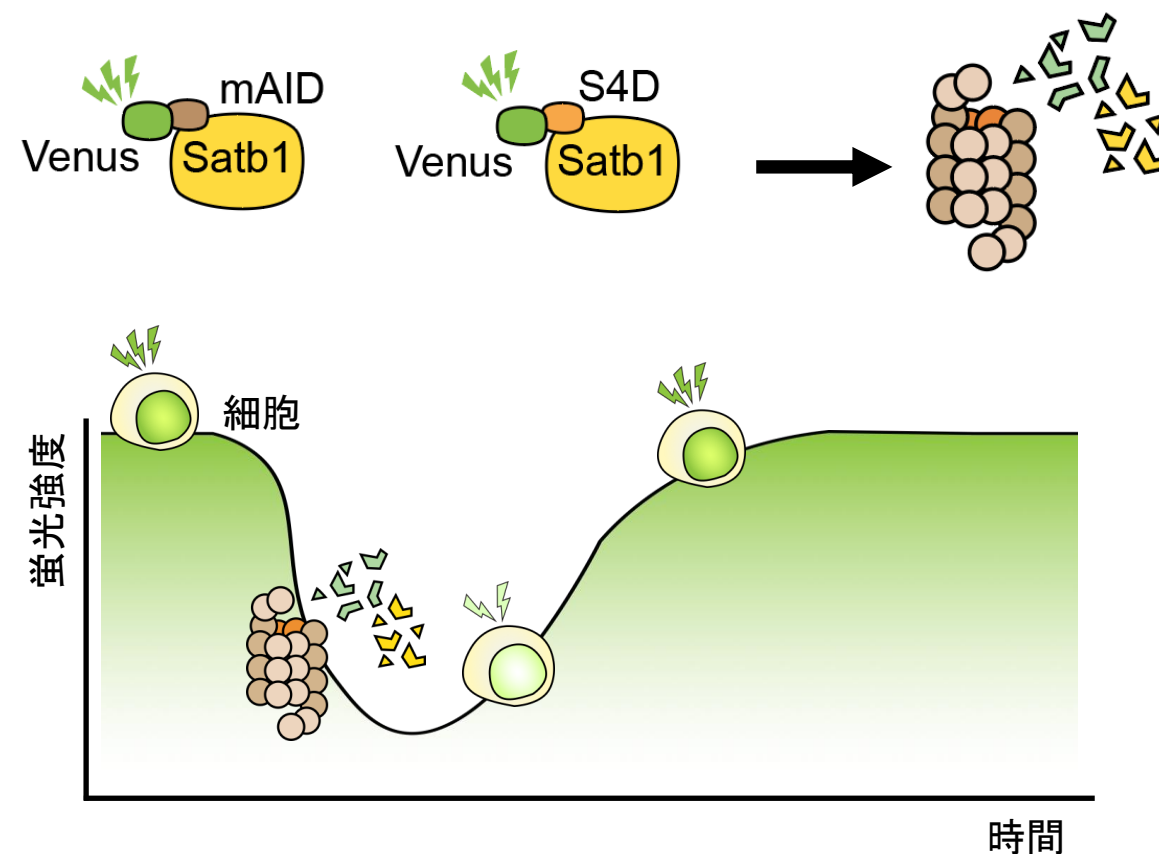
- ・核内タンパク質
- ・細胞膜タンパク質



CRISPR/Cas9遺伝子編集技術によりデグロン配列を
Satb1^{Venus}遺伝子にノックイン

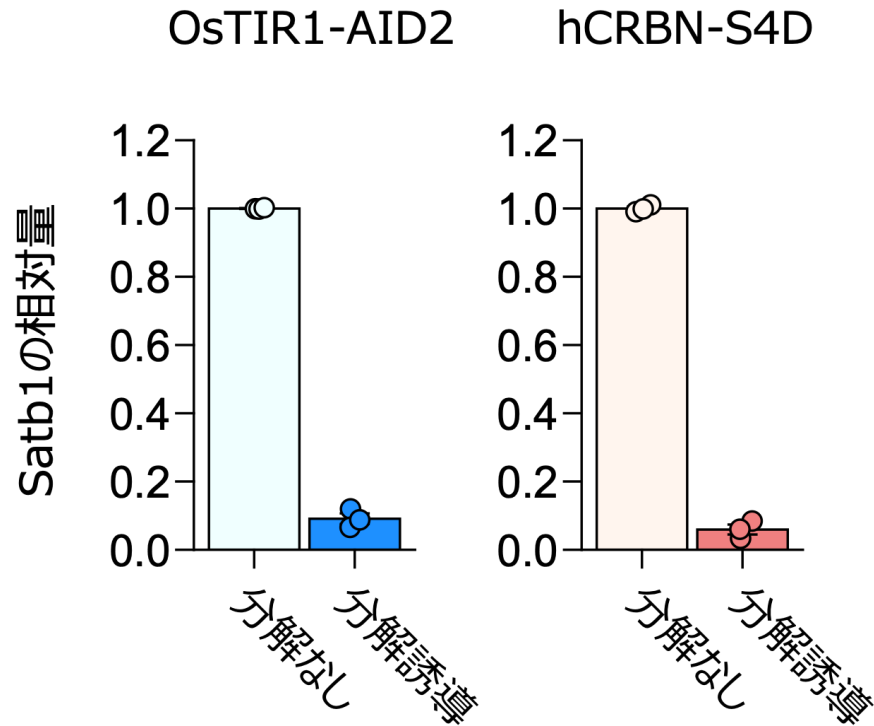


Venusの蛍光を検出することで
Satb1の分解をリアルタイムで定量的に把握できる

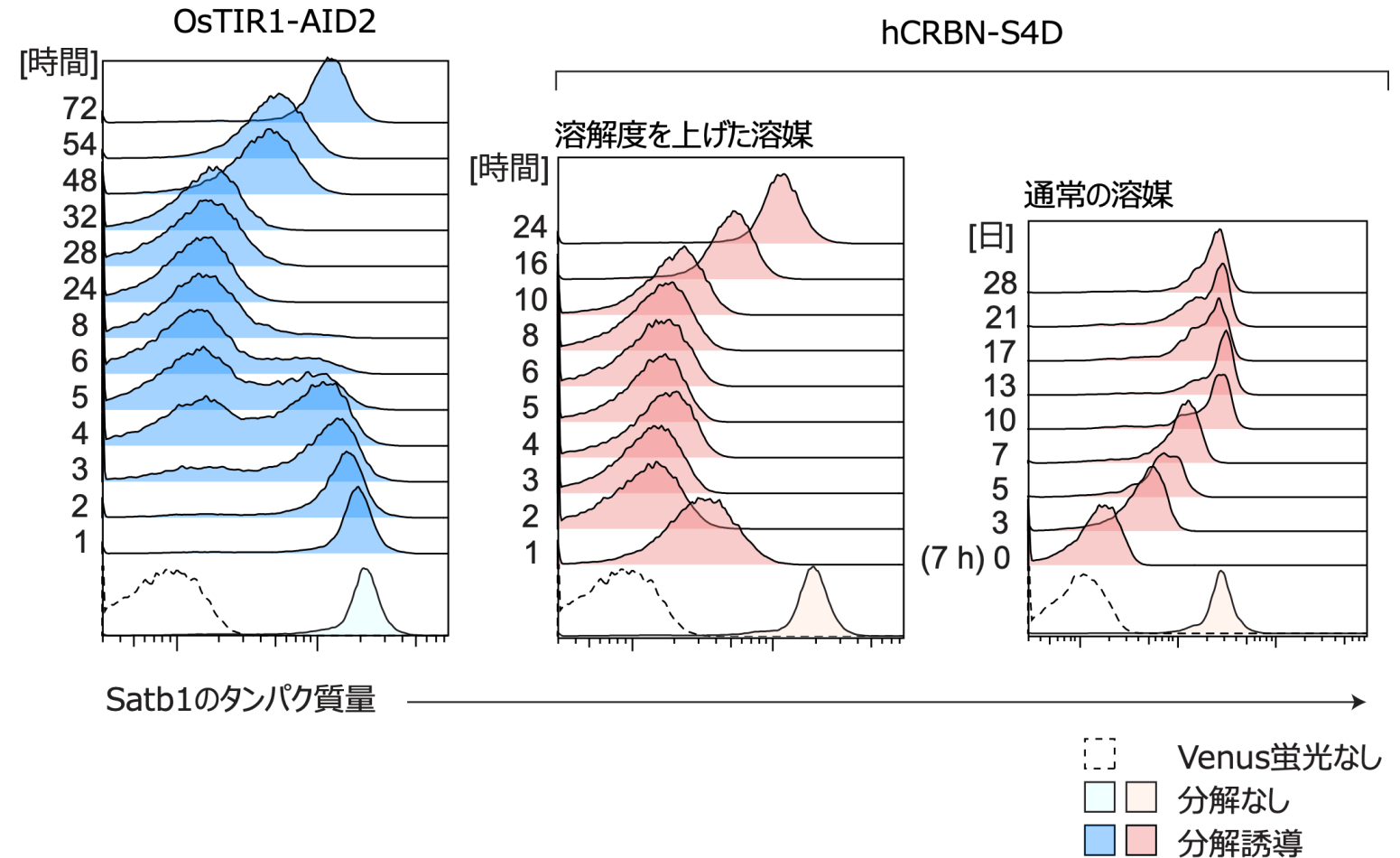


デグロン系による標的タンパク質分解の時間経過

リガンド1回投与後の胸腺におけるSatb1分解



リガンド1回投与後の末梢血T細胞におけるSatb1分解と回復の動態



元のタンパク量と比べておおむね10%未満、

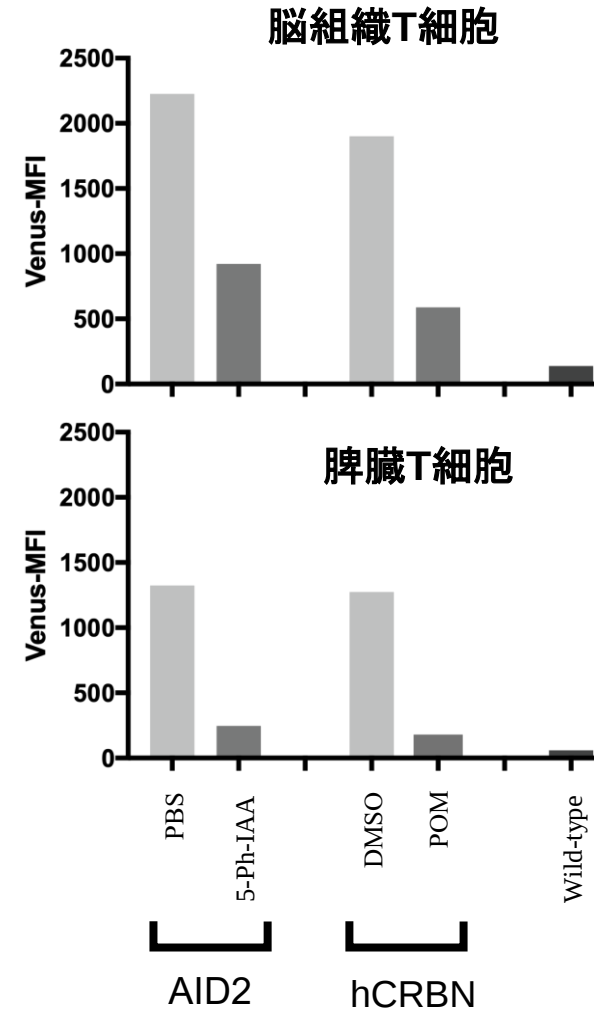
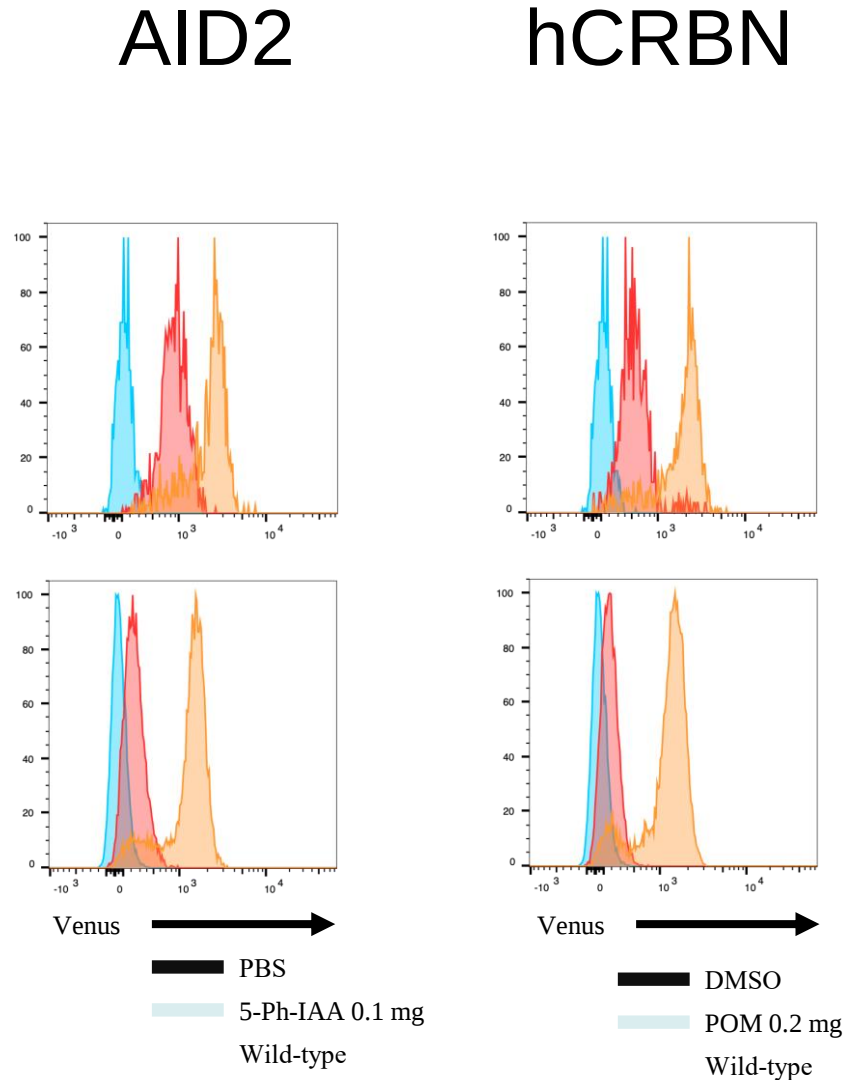
- リガンド（5-Ph-IAAまたはポマリドミド）を1回投与後
 - OsTIR1-AID2系では6時間で分解効果は最大、3日ほどかけて回復
 - hCRBN-S4D系では2時間で分解効果は最大、24時間後には回復
 - リガンドの溶解度を調節することで10日以上分解を維持することも可能

脳でのデグロン系による標的タンパク質分解

5-Ph-IAA or
POM i.p.
18 hours

Brain T cells

Splenic T cells



脳では約20-30%程度
標的タンパク質が残る

改善には投与経路の変更や血液脳関門の透過性の高い化合物を用いた検証が必要

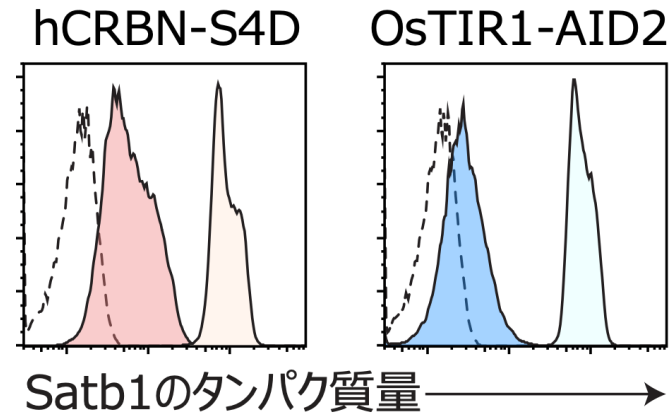
胎児や新生児の組織でも標的タンパク質を分解出来る

胎児における標的タンパク質分解



妊娠マウスにリガンドを腹腔内投与することで分解を誘導することができる

胎児胸腺細胞における
分解前後のSatb1タンパク質量

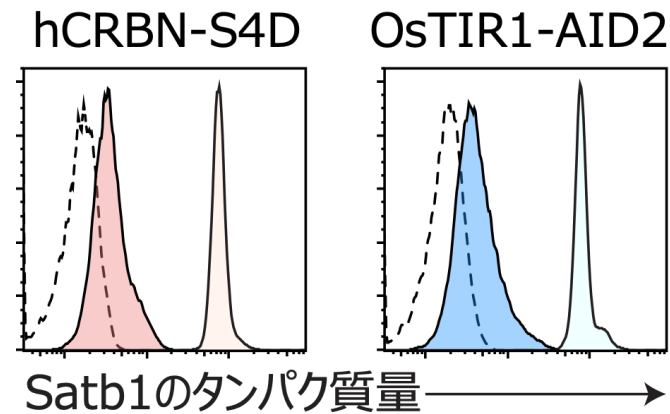


新生児における標的タンパク質分解



授乳マウスにリガンドを腹腔内投与することで分解を誘導することができる

新生児胸腺細胞における
分解前後のSatb1タンパク質量

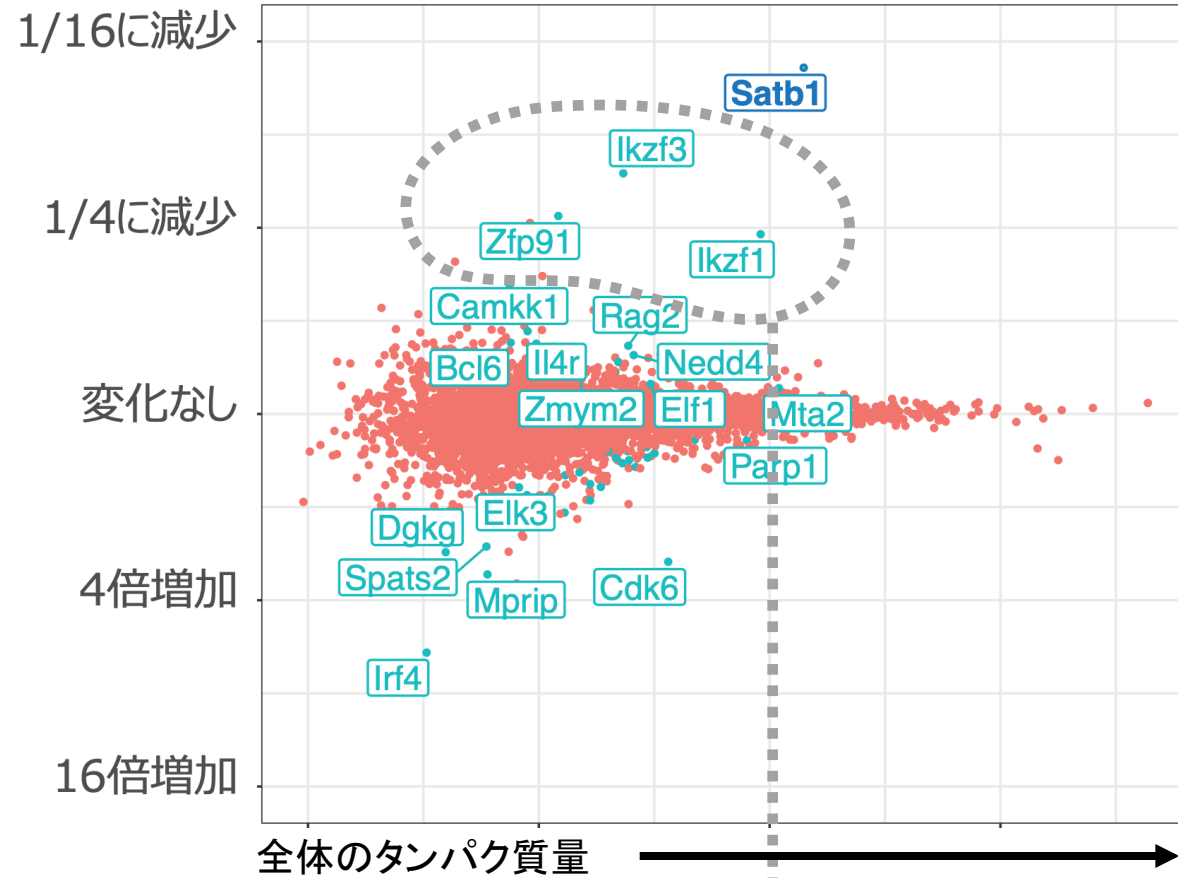


--- Venus蛍光なし
□ 分解なし
■ 分解誘導

OsTIR1-AID2系は基質特異性が高く 標的タンパク質のみを分解する

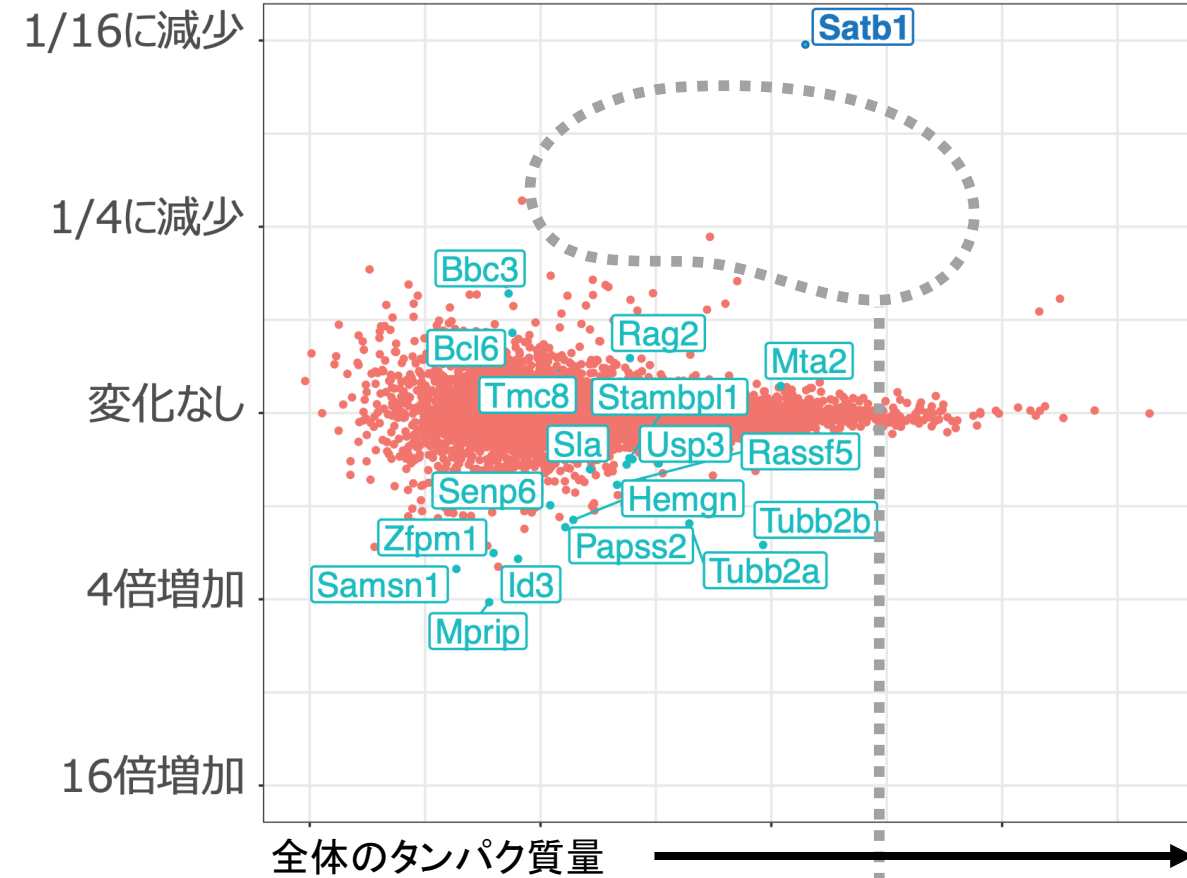
リガンド1回投与後の胸腺プロテオミクス解析で基質特異性を解析

hCRBN-S4D



S4D配列と類似性を持つタンパク質がいくつか分解されている

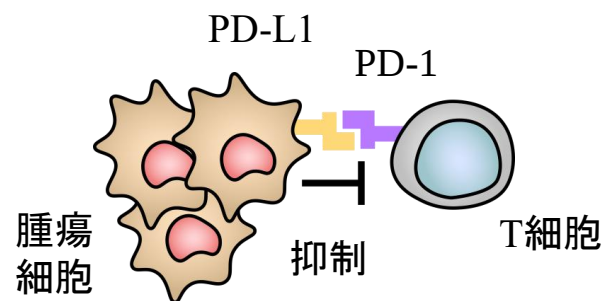
OsTIR1-AID2



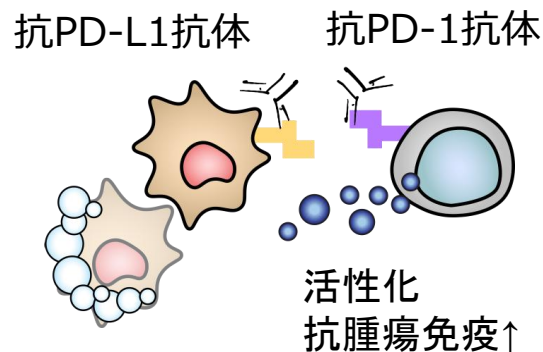
Satb1以外に分解されるタンパク質はほとんどなく基質特異性が高い

応用例：細胞膜タンパク質の分解 (PD-1分解による抗腫瘍免疫増強)

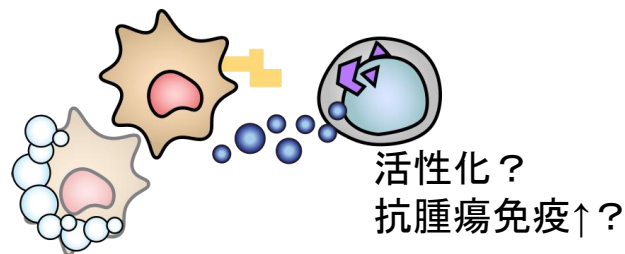
PD-1を介した腫瘍細胞による 抗腫瘍免疫抑制メカニズム



阻害抗体による 免疫チェックポイント阻害療法



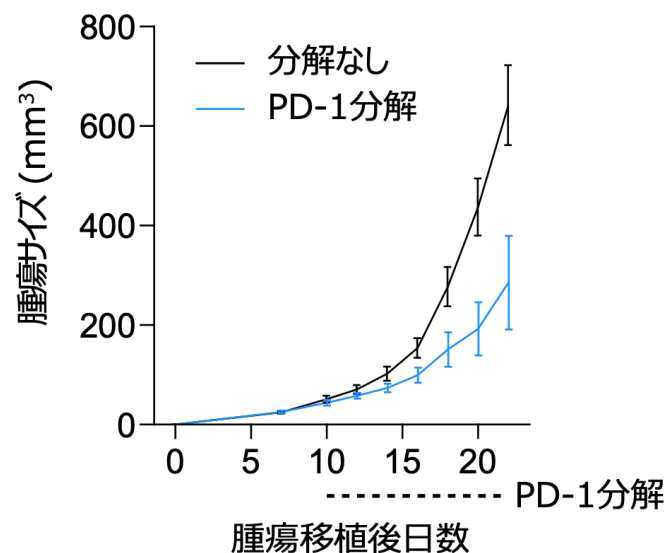
デグロンシステムを用いたPD-1分解



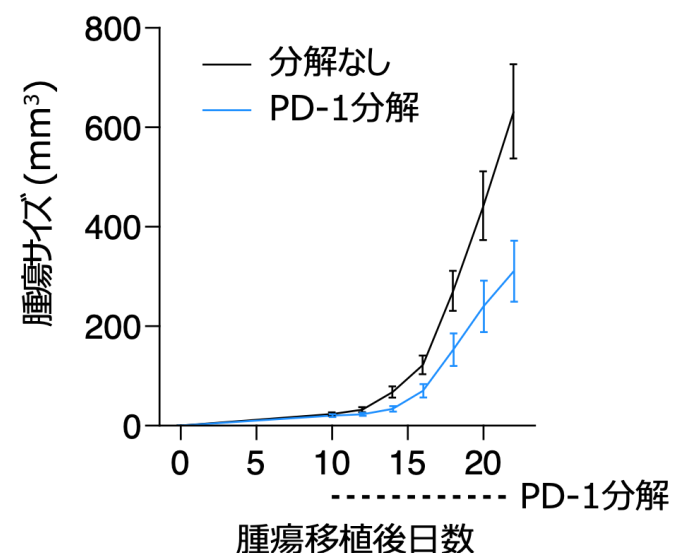
- PD-1を分解する細胞種を選ぶ
- 分解のONとOFFのタイミングを選ぶ

- PD-1をOsTIR1-AID2系で血球全体もしくはCD8⁺ T細胞特異的に分解
- 腫瘍細胞をマウスに移植し、10日後から2日に1回リガンドを投与

血球全体でのPD-1分解



CD8⁺ T細胞でのPD-1分解



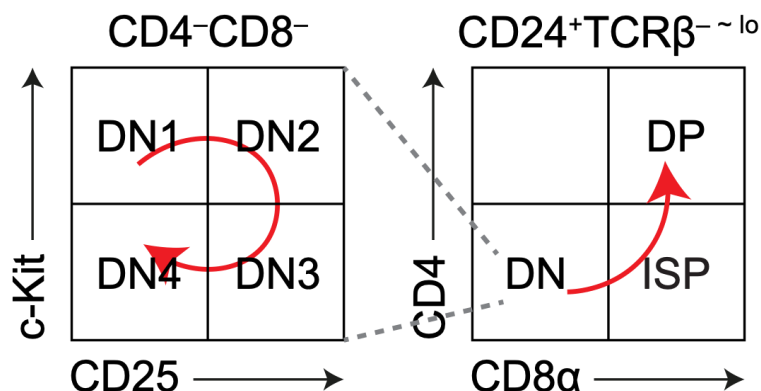
CD8⁺ T細胞特異的なPD-1分解は血球全体でのPD-1分解と同程度に腫瘍増殖を抑制した

→ 免疫チェックポイント阻害治療の主な標的細胞はCD8⁺ T細胞

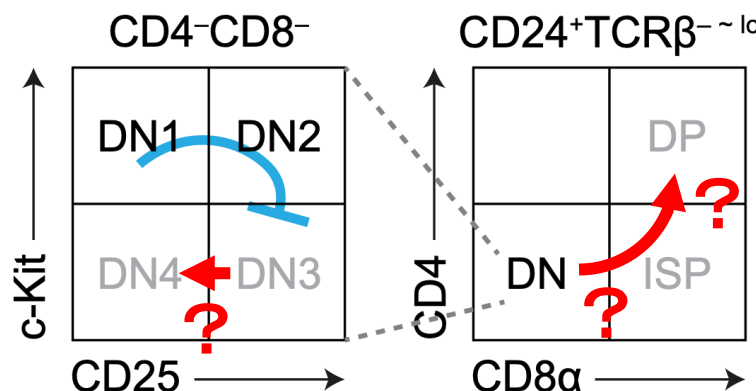
→ 細胞種特異的な免疫チェックポイント阻害は副作用の軽減につながる？

応用例：遺伝子破壊法では明らかにできなかった Bcl11bの新たな機能の解明

胸腺におけるT細胞初期分化

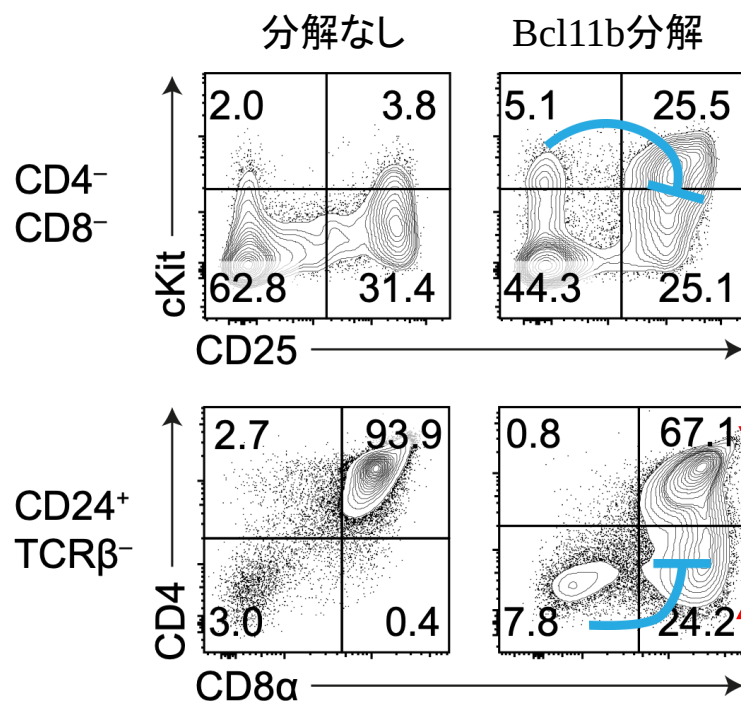


Bcl11bノックアウトマウスからわかってきたBcl11bの機能



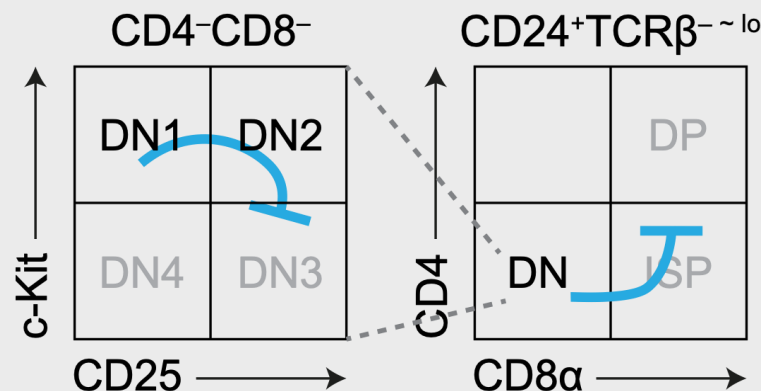
- DN2ステージでの分化が障害される
→ DN2からDN3ステージへの分化にBcl11bは必要
→ DN3ステージ以降の分化段階の細胞は著減するため、これらの細胞でのBcl11bの機能は不明

OsTIR1-AID2系によるBcl11bの分解



- DN2ステージでの分化障害
- ISP (immature CD8 SP) 分化段階からDP (double positive) 胸腺細胞にかけての分化障害も見られる

デグロンシステムによるBcl11b分解系でわかったT細胞初期分化における新たなBcl11bの機能



デグロンシステムだと現存する細胞群から数時間で標的タンパク質が喪失

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術では不可能であったマウス生体内で、急速、一過性に高い特異性を持って、標的タンパク質を分解する技術開発に成功した。
- AID2法は従来は細胞レベルでの使用に限られていたが、OsTIR1^{F74G}発現トランスジェニックマウスの樹立により、マウス生体内での使用が可能となった。
- Cre-loxPとの併用により、OsTIR1^{F74G}を発現する細胞種を限定できるため、特定の細胞種での標的タンパク質の分解が可能。

今後の展望：新たな生物学研究における実験ツールとして

○ 標的タンパク質の分解のタイミングを自由にコントロールできる

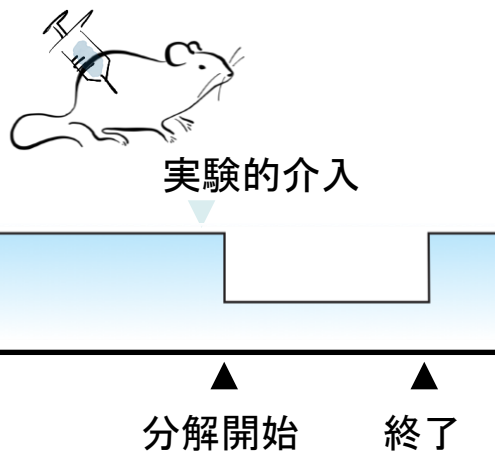
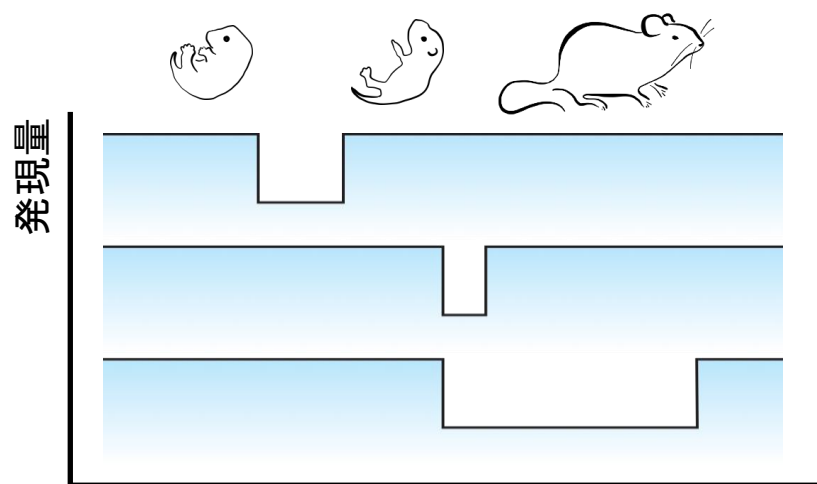
● 特定の発生時期を狙って分解が誘導できる

● 実験的な介入に合わせた分解ができる

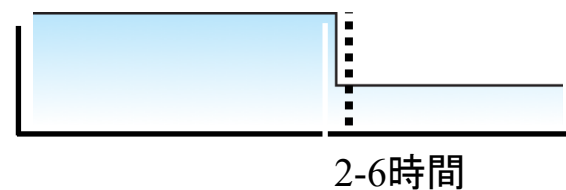
○ 標的タンパク質の分解が数時間で誘導できる

● 標的タンパク質欠乏の一次的な影響が観察できる

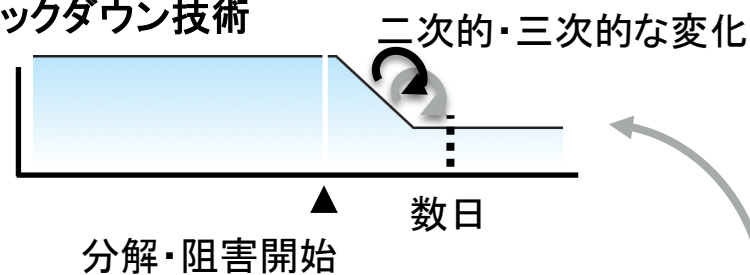
生体内デグロンシステム



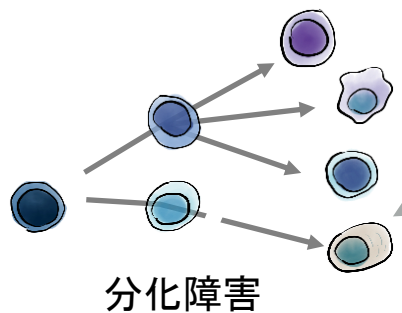
生体内デグロンシステム



既存ノックダウン技術



遺伝子ノックアウト



発現を後から回復させることはできない

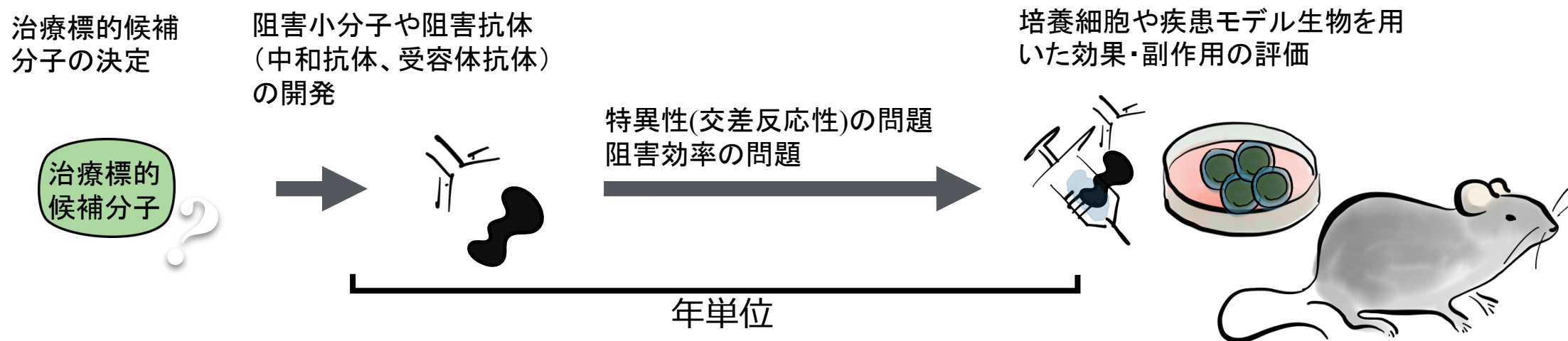
標的タンパク質の欠損後、影響が出るまでの「時間」の評価は無理

分化障害をきたす場合に欠損する細胞への影響がわからない

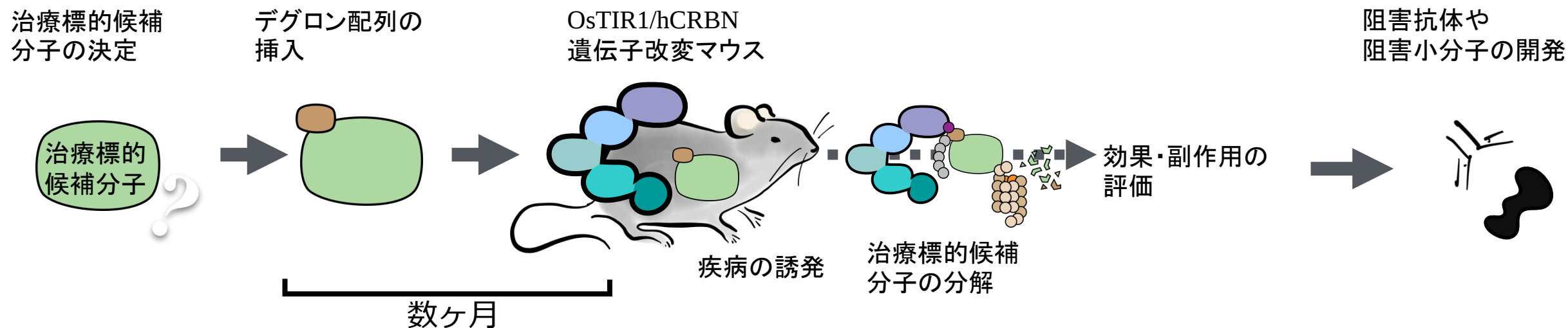
十分なタンパク質量の減少が得られるまでに二次的・三次的な影響が出てしまう。

今後の展望：効率的な創薬研究手法として

分子標的治療開発の一般的な創薬研究アプローチ



● 生体内標的タンパク質分解技術を利用した新たな創薬研究アプローチ



想定される用途

- 創薬標的分子候補の妥当性（薬効及び副作用）検討。
- 特定のライフステージにおけるタンパク質Xの発現または機能喪失が病気の原因と疑われる場合、その仮説の検証。
- 同一系統マウスでも個体間でばらつきの出やすい形質（行動など）について、同一個体における標的タンパク質有無の影響の評価。

実用化に向けた課題

- 複数の実例で有用性が証明され、ほぼ確立された技術と考えているが、さらに下記のような改良によって、より広範な応用展開が可能となる。
 - 現状では1－2週間程度の連続腹腔内投与可能だが、数ヶ月単位の長期投与が必要な場合、**投与混餌経口投与法の開発**が望ましい。
 - 脳組織での標的タンパク質の分解効率をあげる為に、血液脳関門透過性の高い化合物の開発等、**研究目的に即したリガンドの最適化**。
 - 標的タンパク質の発現量、機能に影響の少ない**デグロン配列挿入位置の予測技術**（現状、細胞株を用いてin vitroで確認）。
 - **病態モデルマウス**への導入効率化。

社会実装への道筋

時期	取り組む課題や明らかにしたい原理等	社会実装へ取り組みについて記載
現在	OsTIR1 ^{F74G} トランスジェニックマウスを樹立済み	
3-6ヶ月後	・標的タンパク質の選定とmAIDデグロン配列挿入部位の検定	細胞株での発現解析
0.5-1年後	・標的タンパク質の選定とmAIDデグロン配列を挿入したマウス系統の樹立	ゲノム編集によるmAID挿入、マウス交配 OsTIR1 ^{F74G} マウス由来の受精卵にゲノム編集を行うことで交配に要する時間の短縮が可能
1年後	・マウス生体内での標的タンパク質の一過性分解の影響解析	表現型解析補助
1.5年後	例: 薬剤開発に向けた効果判定	

企業への期待

- 新薬創製を研究開発の軸とする企業への特許ライセンス、技術指導または共同研究を希望する。
 - － フィージビリティ・スタディによる技術評価
 - － 本格共同研究による標的分子妥当性検証
 - － 技術改良に向けた共同研究（例：5-ph-IAAの混餌経口投与の検討）

企業への貢献、PRポイント

- 創薬研究において標的分子の枯渇が懸念される中、標的分子候補妥当性を、より迅速かつ確実に判断頂くことに貢献できる。
- 本技術の導入を検討頂ける場合、フィージビリティスタディによって、必要な追加実験を行い、科学的裏付けを行うことが可能。
- 本格導入に当たっては、企業に寄り添い、伴走する形の技術指導を実施。

本技術に関する論文発表

nature communications



Article

<https://doi.org/10.1038/s41467-024-54308-9>

Cell-type specific, inducible and acute degradation of targeted protein in mice by two degron systems

Received: 15 May 2024

Accepted: 5 November 2024

Published online: 29 November 2024



Check for updates

Motoi Yamashita ¹, Chihiro Ogawa¹, Baihao Zhang ², Tetsuro Kobayashi³, Aneela Nomura ¹, Clive Barker⁴, Chengcheng Zou¹, Satoshi Yamanaka ^{5,6}, Ken-ichiro Hayashi⁷, Yoichi Shinkai ⁸, Kazuyo Moro³, Sidonia Fargarasan ², Koshi Imami ^{4,9}, Jun Seita ⁴, Fumiyuki Shirai ¹⁰, Tatsuya Sawasaki ⁵, Masato T. Kanemaki ^{11,12,13} & Ichiro Taniuchi ¹

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 遺伝子改変マウス
 - 出願番号 : PCT/JP2024/008753
 - 出願人 : 理化学研究所、加計学園、情報・システム研究機構
 - 発明者 : 谷内一郎、鐘巻将人、林謙一郎
-
- 発明の名称 : 非ヒト動物、及びその使用
 - 出願番号 : 特許第7458615号, US17/620993
 - 出願人 : 加計学園、情報・システム研究機構
 - 発明者 : 鐘巻将人、林謙一郎、北本直美、相賀裕美子、安島 理恵子

お問い合わせ先

株式会社理研イノベーション

新技術説明会事務局

Email: license-contact@innovation-riken.jp