

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：82601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2013

課題番号：23890251

研究課題名（和文）プロテインノックダウン法による活性化型 Ras を標的とした新規抗腫瘍薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel antitumor drugs targeting activated Ras by protein knockdown

研究代表者

服部 隆行 (HATTORI TAKAYUKI)

国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・主任研究官

研究者番号：50377751

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、プロテインノックダウン法によって、活性化型 Ras タンパク質を特異的に標的する SNIPER の開発を目的とする。今回、実際に癌細胞の活性化型 Ras を標的すると癌細胞の増殖が抑制され、活性化型 Ras が癌治療の潜在的標的となることが示された。さらに、SNIPER 作成に必須である Ras 結合低分子化合物を数種類確認し、ベストチンとのハイブリッドの合成に取りかかっている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we are developing the SNIPERs that specifically target activated mutant Ras proteins. We demonstrated that proliferation of tumor cells harboring activated mutant Ras was inhibited by ablation of mutant Ras. Furthermore, we identified some Ras-binding compounds as a ligand of SNIPER. We are now synthesizing bestatin-Ras-binding compounds hybrid (SNIPER).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	0	1,300,000
2012年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	0	2,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：Ras・癌・分子標的治療・タンパク質分解

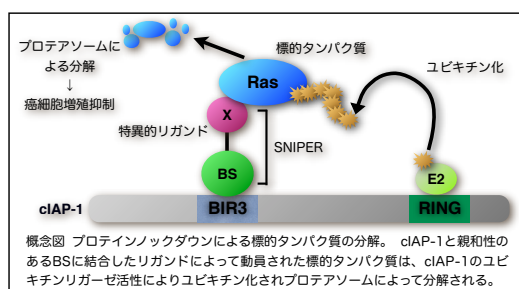
1. 研究開始当初の背景

Ras は低分子量 GTP 結合タンパク質スーパーファミリーに属し、様々な細胞外刺激による細胞の増殖、分化、アポトーシスなどの細胞内シグナルを上流の受容体型チロシンキナーゼから下流のエフェクターへと仲介する。ヒトの腫瘍のおよそ3分の1において *ras* 遺伝子に活性化型変異が認められ、上流からのシグナル非依存的に構成的に活性化されている。その頻度は膀胱癌での90%を筆頭に、大腸癌または甲状腺癌で50%、肺癌で30%、

黒色腫で25%と報告されており、*ras* はヒトの癌において最も高頻度で変異が見られる癌遺伝子である。従って、活性化型 Ras を標的とした医薬品は単独使用、または他の抗癌剤との併用により癌の分子標的治療戦略の上では最も有効な手段となる。

これまで様々な Ras を標的とした癌治療研究が試みられてきたが、種々の問題により実際に臨床で用いられる段階にまで達しているものは殆どなく、Ras は undruggable target であると思われてきた。

この様な現状下、研究代表者はタンパク質分解機構を基礎とするプロテインノックダウン法によって活性型 Ras を標的できれば従来型の阻害剤ベースの薬剤とは異なる新しい治療薬の創出が可能であろうと考えてきた。プロテインノックダウン法はユビキチン-プロテアソーム系を介して標的タンパク質を特異的に分解に導くことの出来る手法である (*J Am Chem Soc* **132**, 5820; *FEBS Lett* **585**, 1147)。アポトーシス阻害タンパク質ファミリーの一員である cIAP-1 は、アポトーシス促進性のタンパク質をユビキチン化しプロテアソーム依存性の分解を促進するユビキチンリガーゼである。抗癌剤として知られるベスタチンのメチルエステル (MeBS) が cIAP-1 の BIR3 ドメインに結合し、cIAP-1 の自己ユビキチン化反応とその分



解を促進することが見出された。さらに、MeBSに標的タンパク質特異的なリガンドをつなげることにより、そのリガンドと特異的に結合する標的タンパク質をユビキチン-プロテアソーム系を介して分解できることが見出されている (概念図)。現段階ではプロテインノックダウン法は、限られたモデル分子を標的とした試験管内の反応の観察に留まっているが、研究代表者は本技術の潜在的な有用性に着目し、有害なタンパク質の消失による病態の改善に応用できると着想した。そこで研究代表者は、ヒトの腫瘍において最も高頻度で変異が見られ、未だ薬剤を用いての克服が成功していない活性型 Ras を標的とすることが、最も本技術を生かした分子標的治療に繋がると発想した。

2. 研究の目的

ras は腫瘍全体の約 3 分の 1 で活性化変異が認められている最も普遍的な癌遺伝子であり、その産物である低分子量 G 蛋白質 Ras は抗腫瘍薬開発上、最も有効な分子標的と考えられる。本研究課題では、プロテインノックダウン法によって、癌細胞中の活性型 Ras タンパク質を特異的に標的し、分解に導くための基盤技術を開発することを第一の目的とする。さらにその技術を応用、発展させることにより、活性型変異 Ras を持つ癌細胞株の癌化形質を抑制することの出来る新規癌の分子標的治療薬候補の開発を目指す。

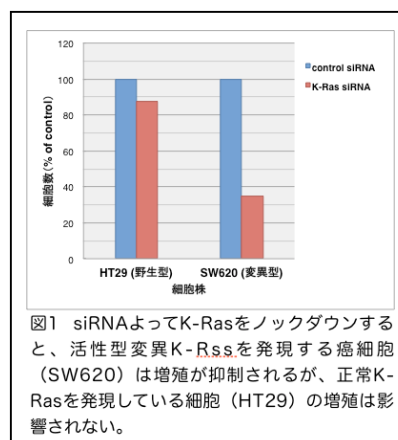
3. 研究の方法

(1) 本研究課題の初段階においては、活性型 Ras を特異的に認識して結合するリガンドとして機能する低分子化合物を探索する。NMR ならびに X 線結晶解析を用いた GTP 結合 (活性化) 型 Ras の三次元構造の情報から、それに結合すると予想される化合物をインシリコスクリーニングする。または、Raf-1 などの Ras 下流のエフェクター分子と結合した活性型 Ras の三次元構造、およびこれらのエフェクター分子の Ras 結合部位の情報から、活性型 Ras と親和性の高いペプチドミミックをデザインする。さらに、これまでに報告されている Ras 結合低分子化合物の Ras 結合能を検証し、プロテインノックダウンにおけるリガンドとして使用できるかを判断する。

(2) Ras 高親和性化合物として見出された候補化合物は MeBS と架橋し、プロテインノックダウンの系にのせる。この MeBS-候補化合物ハイブリッド (Specific and No-genetic IAP-dependent Protein eraser: SNIPER と命名) を使い、活性型変異 Ras を有する培養癌細胞に対する Ras 分解誘導活性測定、癌化形質抑制試験を実施し、実際に活性化 Ras を標的にした薬剤が抗腫瘍薬として機能できる可能性があるかを判定する。

4. 研究成果

(1) まず、活性型 Ras が真に癌治療の標的となりうるかどうかを確認した。野生型 K-Ras を持つ大腸癌細胞株、および活性型変異 K-Ras を持つ大腸癌細胞株の K-Ras を RNA 干渉法でノックダウンしてそれぞれの細胞株の増殖を比較した。K-Ras の発現を抑制すると、野生型 K-Ras を持つ細胞の増殖は影響を受けなかったが、活性型変異 K-Ras を持つ細胞の増殖は著しく抑制された (図 1)。このことから Ras をプロテインノックダウン方で分解の標的とすることは、活性型変異を持つ癌の増殖を選択的に抑制する有効な癌治療法となりうる事が示された。



(2) これまで、種々の低分子化合物等が Ras

に結合することが報告されており (PNAS 109, 5299, *Bioorg Med Chem Lett.* 19, 4217 その他)、これらをリガンドとして利用できる可能性がある。合成可能なものから Ras との結合を検証した。そのうちの一つ、phage display によって同定された特定の配列のペプチド (*Chem Bio Chem* 11, 517) が、実際に Ras と結合することをビオチン化したリガンドを用いてプルダウンアッセイを行って確認している (図 2)。このほかにもいくつかの Ras 結合活性を有す化合物を確認した。

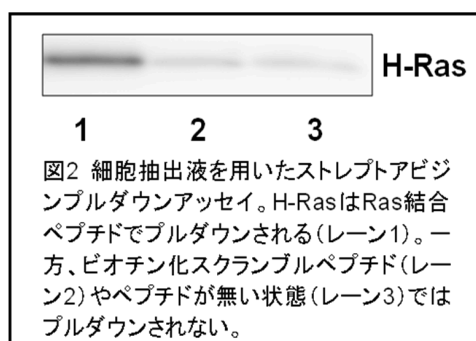


図2 細胞抽出液を用いたストレプトアビジンプルダウンアッセイ。H-RasはRas結合ペプチドでプルダウンされる(レーン1)。一方、ビオチン化スクランブルペプチド(レーン2)やペプチドが無い状態(レーン3)ではプルダウンされない。

(3) 上記 (2) で Ras との結合活性が確認できた数点の化合物については、MeBS と結合させた SNIPER を作製する。現在合成中のものもあるが、SNIPER 化に成功しているものもあり、この SNIPER が実際に細胞内 Ras を分解する活性があるか検証中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 加藤 雅士, 正田 卓司, 出水 庸介, 井上 英史, 服部 隆行, 内藤 幹彦, 栗原 正明. 細胞膜透過性蛍光 NTA の設計・合成. 日本薬学会第 133 年会. 2013 年 3 月 (横浜市).
- ② 服部 隆行, 内田 千晴, 高橋 宏隆, 山本 直樹, 内藤 幹彦, 田矢 洋一. 細胞分化に伴う RB タンパク質のセリン 612 の特異的リン酸化. 日本薬学会第 133 年会. 2013 年 3 月 (横浜市).
- ③ Takayuki Hattori, Chiharu Uchida, Hirotaka Takahashi, Naoki Yamamoto, Mikihiro Naito, Yoichi Taya. Distinct phosphorylation of the retinoblastoma protein at serine 612 in differentiated cells. Ninth AACR/JCA Joint Conference. 2013 **February (Hawaii, USA)**.
- ④ Keiichiro Okuhira, Yosuke Demizu, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata,

Takayuki Hattori, Tomoko Nishimaki-Mogami, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Mikihiro Naito. **Development of SNIPER(ER) that induces estrogen receptor degradation followed by rapid cell death in breast cancer cells.** Ninth AACR/JCA Joint Conference. 2013 **February (Hawaii, USA)**.

- ⑤ 正田 卓司, 加藤 雅士, 井上 英史, 服部 隆行, 内藤 幹彦, 栗原 正明. 細胞膜透過性蛍光 NTA の創製. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 2012 年 10 月 (東京都).
- ⑥ 服部 隆行, 田矢 洋一. 分化細胞における RB タンパク質の serine 612 の部位特異的リン酸化. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月 (札幌市).
- ⑦ 奥平 桂一郎, 出水 庸介, 大岡 伸通, 柴田 織人, 服部 隆行, 最上 (西巻) 知子, 栗原 正明, 奥田 晴宏, 内藤 幹彦. プロテインノックダウン法によるエストロゲンレセプターの分解. 日本薬学会第 132 年会. 2012 年 3 月 (札幌市).
- ⑧ 服部 隆行, 大岡 伸通, 高橋 美帆, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦. シガトキシン B サブユニットによる細胞死誘導機構. 日本薬学会第 132 年会. 2012 年 3 月 (札幌市).
- ⑨ Mikihiro Naito, Keiichiro Okuhira, Yosuke Demizu, Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata, Takayuki Hattori, Tomoko Nishimaki-Mogami, Masaaki Kurihara, and Yuichi Hashimoto. Development of Hybrid Small Molecules That Induce IAP-Mediated Ubiquitylation and Proteasomal Degradation of Target Proteins in a Specific Manner. Genetics and Chemistry Sharing a Language of Discovery. 2012 May (Boston, USA).
- ⑩ Keiichiro Okuhira, Yosuke Demizu, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata, Takayuki Hattori, Tomoko-Nishimaki Mogami, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, and Mikihiro Naito. Degradation of Estrogen Receptor Induced by a Small Hybrid Molecule SNIPER (ER). The 16th Japanese Foundation for Cancer Research-International Symposium on Cancer Chemotherapy. 2012 January (Tokyo).
- ⑪ 奥平 桂一郎, 出水 庸介, 大岡 伸通, 柴田 織人, 服部 隆行, 最上 (西巻) 知

子, 栗原 正明, 奥田 晴宏, 内藤 幹彦.
プロテインノックダウン法によるエストロゲン受容体の分解. 第70回 日本
癌学会総会. 2011年10月(名古屋市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/dfbg/frame.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 隆行 (HATTORI TAKAYUKI)

国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学
部・主任研究官

研究者番号: 50377751

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: