

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430166

研究課題名(和文)新規STAT3阻害剤開発のための分子基盤の確立

研究課題名(英文)Molecular basis for the development of novel STAT3 inhibitors

研究代表者

浅井 章良 (Asai, Akira)

静岡県立大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60381737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：STX化合物は研究代表者らが見出した新規STAT3阻害剤であり、新たながん治療薬候補として期待されている。本研究ではSTX化合物のSTAT3阻害剤としての臨床応用を目的とした作用機序解析、他阻害剤との比較、さらには感受性因子の探索を行った。STX化合物はSTAT3のSH2ドメインに選択的に結合しSTAT3の転写因子としての機能を阻害することによってがん細胞の増殖を抑制した。さらにPD-L1やIDO1などの免疫チェックポイント関連分子の発現を抑制した。感受性因子と併用薬候補については、siRNAライブラリーおよびキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いた解析によって、候補を複数同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We previously discovered a novel STAT3 inhibitor, STX-COMP, which is expected to be a new anticancer drug candidate. The investigation on the mode of action of STX-COMP and identification of its susceptibility factors are important issues for the purpose of clinical use of this unique compound in future. In this study, we demonstrated STX-COMP inhibits STAT3 dimerization and thereby suppress the transcriptional activity in cancer cells. The profile of this compound in the various bioassays was proved to be quite different from other known STAT3 inhibitors. Furthermore, we revealed that STX-COMP not only inhibited the growth of cancer cells but also suppressed the expression of immune checkpoint factors such as PD-L1 and IDO1 in cancer cells. To identify the biomarker for STX-COMP, we refined the susceptibility factor candidates to the STAT3 inhibition by using the siRNA library. The kinase inhibitors that might be useful for the combination therapies with STX-COMP were also discovered.

研究分野：抗がん剤探索

キーワード：STAT3 SH2 シグナル伝達 免疫チェックポイント IDO1 PD-L1 抗がん

1. 研究開始当初の背景

STAT3 は 1994 年に Darnell JE Jr (ロックフェラー大) らによって発見された STAT ファミリー転写制御因子のひとつである (Zhong et al. Science 1994)。細胞増殖、生存、血管新生などに関わるタンパク質の発現を促進することが知られており、さらにリンパ腫や乳癌、脳腫瘍など多くのがん細胞で恒常的活性化が報告されていることから、新規抗がん剤の標的分子として注目されている。IL-6 や EGF などの刺激により細胞質内の STAT3 の Tyr705 が JAK 等によりリン酸化され、相互の SH2 ドメインを介して STAT3 二量体を形成する。二量化した STAT3 は核内に移行し、標的遺伝子の DNA プロモーター領域に特異的に結合し転写が開始されることが知られている。従って二量化は STAT3 の活性化において重要であり、これを阻害した場合 STAT3 の機能が損なわれがん細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導に繋がる。現在 STAT3 の上流に位置するチロシンキナーゼ JAK を標的としたキナーゼ阻害剤、ルクソリチニブ (JAK1/2) とトファシチニブ (JAK3) が各々骨髄線維症と関節リウマチ治療薬として承認されている。しかし後者においては臨床での優れた効果だけでなく発がんや感染症などの重篤な有害事象も報告されている。その一方で STAT3 のドミナントネガティブ変異体を有するヒトでは、高 IgE 症候群による免疫不全を症状とするものの、発がんなどの症状は報告されていない (Minegishi et al. Nature 2007)。また各種がん細胞において、STAT3 の活性化に関与するチロシンキナーゼは必ずしも JAK のみではなく、SRC、ABL など他のチロシンキナーゼも関わっていることが知られている。したがって、STAT3 に直接作用してその二量化を阻害するタイプの薬剤はその作用としてユニークなだけでなく、チロシンキナーゼに対する阻害剤と比較して、薬効と副作用の両面でアドバンテージが高いと考えている。

STAT3 の二量化阻害化合物については、これまでにコンピューター支援薬物設計を基にしたペプチド誘導体の研究が活発に行われ、吸収性の向上した複数の薬剤が報告されているものの、臨床上有用な化合物は未だ報告されていない (浅井ら ファルマシア 2012)。研究代表者らは、二量化阻害化合物を探索するための独自のスクリーニング法を開発し (Uehara, Asai et al. BBRC 2009, Takakuma, Asai et al. PLoS One 2013)、さらにバーチャルスクリーニングとの組み合わせにより STAT3 の二量化を選択的に阻害し、かつ担がんマウスモデルにおいて経口投与で抗腫瘍活性を示す STX-0119 (図 1) を発見してきた (Matsuno, Asai et al. ACS Med Chem Lett 2010)。さらに STX-0119 をリード化合物とした構造最適化研究に取り組み、これまでに複数の強活性誘導体を見出してきた。これら研究成果について 2 件の国

際特許を出願しており (Asai et al. PCT/JP2009/003235, PCT/JP2010/073787)、既に米国、欧州、アジア各国で特許登録が完了している。

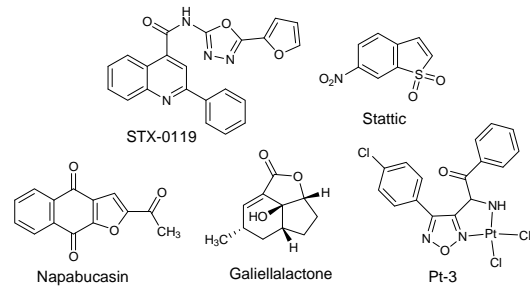


図 1 STX-0119 および他の STAT3 阻害剤の構造

2. 研究の目的

研究代表者らは STX-0119 をリード化合物として、各種誘導体 (STX 化合物) を合成し STAT3 に対する阻害効果を評価してきた。その結果、複数の強活性化合物の創製に成功した。これらの化合物はレポーターアッセイにおいても STAT3 依存的な転写活性を阻害し、ヒトリンパ腫移植ヌードマウスモデルにおいて経口投与で抗腫瘍活性を示すことが明らかとなっている (Asai et al. PCT/JP2009/003235 等)。以上の結果から、STX 化合物は STAT3 を標的とした分子標的薬の候補化合物として有望である。本物質の今後のステージアップには詳細な薬効・毒性評価に加えて、薬効の裏付けやがん種の選択のための分子的基盤が重要である。本研究では STX 化合物の将来的な臨床応用を見据えて、1) 他の STAT3 阻害化合物との比較を含めた作用機序解析、2) 感受性予測因子の探索、2) 他剤との併用効果の検討、を研究課題とする。本研究課題は STX 化合物等の STAT3 二量化阻害剤を医薬品として開発していくための分子的基盤を確立し、さらには次世代 STAT3 シグナル制御薬探索のための新たなコンセプトを提案することを目的とする。

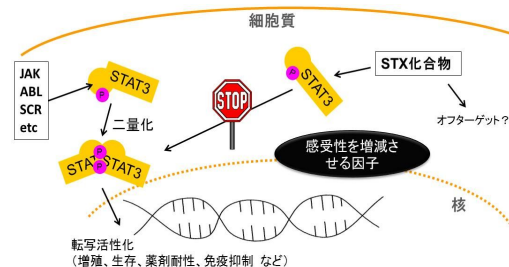


図 2 本研究課題の基本概念: STX 化合物の作用機序を解析し、さらに STX 化合物に対する感受性を増減させる細胞内因子を探索し、STAT3 の機能との関連性を分子レベルで解析することにより、将来的にはバイオマーカー、適応がん種、併用薬の選択のための有用な情報を提供する。

3. 研究の方法

1) Cell-free assay

これまでに研究代表者らによって開発されたアルファスクリーン法を基盤とした手法(Uehara, Asai et al. BBRC 2009, Takakuma, Asai et al. PLoS One 2013)を用いた。各種組換えヒト STAT ファミリー (rhSTAT) および他の SH2 ドメインを有するタンパク質 (Grb2)は大腸菌発現系にて調製し、Avi-tag により N 末特異的にピオチンを導入した。システインをアラニンに置換した各種変異 STAT3 はインバース PCR 法を用いて調製した。これらピオチン化タンパク質と FITC ラベル化したリン酸化ペプチドを用いることにより、各タンパク質とリン酸化ペプチドとの特異的結合をフォトシグナルとして検出した。また各種阻害剤とシステインの-SH 基との反応性の検討には Alexa Fluor 488 C5 Maleimide を用い蛍光によるバンド強度の変化を定量化することで解析した (Iwamoto, Asai et al. PLoS One 2017)。

2) Cell-based assay

STAT3 による転写活性化の測定にはルシフェラーゼレポーターアッセイ (HeLa 安定株) を用いた。また目的に応じて HeLa, Karpas299, MDA-MB-468, MDA-MB-235 などのヒト由来がん細胞株を用い、STAT3 標的遺伝子の mRNA の解析には、リアルタイム RT-PCR 法、タンパク質はウェスタンブロット法 (Iwamoto, Asai et al. PLoS One 2017) 細胞増殖阻害試験には WST-8 法または CellTiter-Glo 法を用いた。キナーゼ阻害剤との併用効果は、Calculusyn ソフトウェアを用いることにより、併用効果の指標である Combination Index (CI)を算出した。

4. 研究成果

1) 作用機序解析

STX 化合物の STAT3 に対する作用を無細胞系および細胞系で検討し、他の STAT3 阻害化合物 (図 1) との比較を行った。なお、この中で Pt-3 はミラノ大との共同で本研究期間中に見出した新規化合物である (Porta, Asai et al. Eur J Med Chem. 2017)。表 1 に無細胞系と細胞系での各種活性データをまとめた。STX 化合物は他の阻害剤と比較して以下の点で異なることが明らかとなった。

表 1 STX 化合物および他の STAT3 阻害化合物の活性プロファイル

Inhibitors	Cell-free assay			Cell-based assay			
	STAT3 SH2 binding	STAT1 SH2 binding	STAT3 Cys binding	STAT3 Luc reporter	WST8 MDA-MB-468	WST8 MDA-MB-453	p-STAT3 /STAT3
STX	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	none	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	no change
Stattic	3.2	7.2	yes	0.4	1.6	2.8	decrease
Napabucasin	3.5	>30	yes	0.16*	1.9	0.56	decrease
Galiellalactone	>10	NT	yes	8.7	5.7	0.96	no change
Pt-3	1.8	5.9	yes	17	NT	NT	no change

* Cell viability IC₅₀: 0.2 μM (Napabucasin)

STAT1-SH2 (78% homology) と比較して STAT3-SH2 に対して選択的に作用する。他の阻害化合物ではシステインとの共有結合が示唆されるが、STX 化合物ではその可能

性が極めて低い。無細胞系と細胞系とではほぼ同程度の濃度で STAT3 阻害とがん細胞増殖阻害が認められる。STAT3 Tyr705 のリン酸化阻害が認められない。STAT3 サイレントな MDA-MB-453 と比較して STAT3 恒常的活性化型のがん細胞株 MDA-MB-468 に対して選択的な細胞増殖阻害を示す。以上の結果から STX 化合物は他の阻害剤と比較して選択的な作用を有すると考えられる。さらに SH2 ドメインへの作用を検証する目的で STAT3 の SH2 ドメイン周辺の Cys に点変異を導入した組換え STAT3 タンパクを調製し、リン酸化ペプチドとの競合阻害活性評価を行った。その結果 C687A と C712A の変異体でその感受性が大きく異なることが明らかとなった (図 3)。またこれまでの SPR を用いた試験結果からも STX 化合物が STAT3 の SH2 ドメインに結合し上記システイン残基との共有結合を介さない相互作用が結合に重要であることが示唆される。現在より詳細な作用を検討する目的で共結晶解析を検討中である。

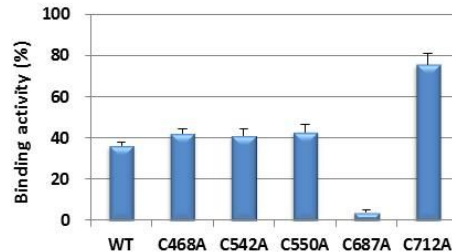


図 3 SH2 ドメインと STX 化合物の相互作用: SH2 ドメイン周辺の点変異によって阻害の感受性が異なる。

さらに腫瘍組織における STAT3 阻害作用を想定して、免疫チェックポイント関連分子の発現に対する STX 化合物の作用をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。HeLa 細胞では IFN-刺激により PD-L1 及び IDO1 が惹起される。このため腫瘍組織内では T 細胞からの攻撃を抑制すると考えられている。本研究では STX 化合物が IFN-刺激による PD-L1 と IDO1 の発現上昇を濃度依存的に抑制することを明らかとした (図 4)。

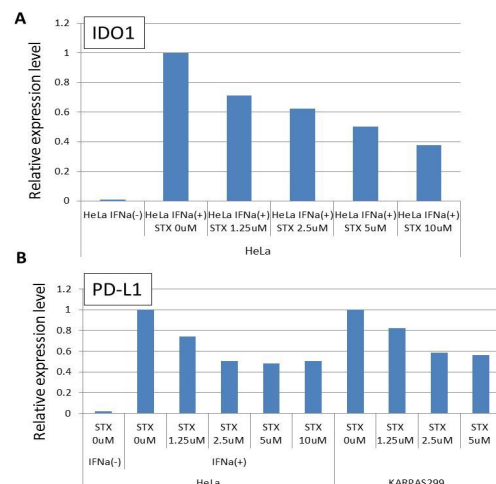


図 4 STX 化合物による IDO1 (A) および PD-L1 (B) の発現抑制作用

さらに STX 化合物は PD-L1 を恒常的に発現している Kapras293 の場合にも同様に PD-L1 の発現を抑制した。以上の結果から腫瘍微小環境における STX 化合物による効果はがん細胞自身への作用だけでなくがん細胞の腫瘍免疫からの逃避機構を解除する作用が期待される。

2) 感受性因子と併用薬の探索

STX 化合物の細胞内 STAT3 阻害作用はルシフェラーゼレポーターアッセイ (HeLa 安定株) にて簡便に評価可能であり、本アッセイを用いて STX 化合物に対する感受性を変化させる因子の探索を行った。具体的には Human siGENOME siRNA library 合計 1084 遺伝子 (Protein Kinase 712 遺伝子、Phosphatase 256 遺伝子、Cytokine Receptors 116 遺伝子を含む) また併用薬の探索には Kinase inhibitor screening library 270 化合物を用いた。

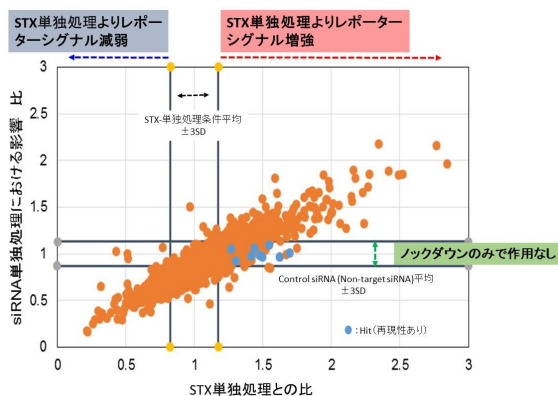


図 5 siRNA ライブラリー一次スクリーニング結果

図 5 に示した通り一次スクリーニングの結果多数のヒットが見出されたが、再現性確認実験によって最終的には STX 化合物の効果を減弱させる 12 遺伝子がヒットとして同定された。その内訳は Protein Kinase (7 遺伝子)、Protein Phosphatase (2 遺伝子)、Cytokine Receptors (3 遺伝子) であり今後は STX 化合物の効果予測のマーカーとしての有用性を検討予定である。また同様の手法でキナーゼ阻害剤との併用効果の解析を行っており、STX 化合物との併用で CI 値<1 を示すキナーゼ阻害剤 11 種類を同定することに成功した。これらの結果は、臨床上有用な STAT3 阻害剤の感受性因子と併用薬の同定に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1) Hato SV, Figdor CG, Takahashi S, Pen AE, Halilovic A, Bol KF, Vasaturo A, Inoue Y, de Haas N, Verweij D, Van Herpen CML, Kaanders JH, van Krieken JHJM, Van

Laarhoven HWM, Hooijer GKJ, Punt CJA, Asai A, de Vries IJM, Lesterhuis WJ. Direct inhibition of STAT signaling by platinum drugs contributes to their anti-cancer activity. *Oncotarget* (in press) 【査読有】

- 2) Porta F, Facchetti G, Ferri N, Gelain A, Meneghetti F, Villa S, Barlocco D, Masciocchi D, Asai A, Miyoshi N, Marchianò S, Kwon BM, Gandin V, Marzano C, Rimoldi I. An in vivo active 1,2,5-oxadiazole Pt(II) complex: a promising anticancer agent endowed with STAT3 inhibitory properties. *Eur J Med Chem.* 131, 196-206 (2017) 【査読有】
- 3) Iwamoto K, Uehara Y, Inoue Y, Taguchi K, Muraoka D, Ogo N, Matsuno K, Asai A. Inhibition of STAT3 by Anticancer Drug Bendamustine. *PLoS One* 12, e0170709 (2017) 【査読有】
- 4) Miyata H, Ashizawa T, Iizuka A, Kondou R, Nonomura C, Sugino T, Urakami K, Asai A, Hayashi N, Mitsuya K, Nakasu Y, Yamaguchi K, Akiyama Y. Combination of a STAT3 Inhibitor and an mTOR Inhibitor Against a Temozolomide-resistant Glioblastoma Cell Line. *Cancer Genomics Proteomics* 14, 83-91 (2017)
- 5) Gabriele E, Porta F, Facchetti G, Galli C, Gelain A, Meneghetti F, Rimoldi I, Romeo S, Villa S, Ricci C, Ferri N, Asai A, Barlocco D, Sparatore A. Synthesis of new dithiolethione and methanethiosulfonate systems endowed with pharmaceutical interest. *Arkivoc part ii*, 235-250 (2017) 【査読有】
- 6) Poli G, Gelain A, Porta F, Asai A, Martinelli A, Tuccinardi T. Identification of a new STAT3 dimerization inhibitor through a pharmacophore-based virtual screening approach. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 31, 1011-1017 (2016) 【査読有】
- 7) Meneghetti F, Villa S, Masciocchi D, Barlocco D, Toma L, Han DC, Kwon BM, Ogo N, Asai A, Legnani L, Gelain A. Ureido-pyridazinone derivatives: Insights into the structural and conformational properties for STAT3 inhibition. *Eur J Org Chem.* 22, 4907-4912 (2015) 【査読有】
- 8) Dell'Orto S, Masciocchi D, Villa S, Meneghetti F, Celentano G, Barlocco D, Colombo D, Legnani L, Toma L, Jeon YJ, Kwon BM, Asai A, Gelain A. Modeling, synthesis and NMR characterization of novel chimera compounds targeting STAT3. *Med Chem Commun.* 5, 1651-1657 (2014) 【査読有】

- 9) Asai A, Takakuma K. Expression and purification of soluble STAT5b/STAT3 proteins for SH2 domain binding assay. SH2 Domains: Methods and Protocols, Machida K, Liu BA (Eds) Springer, New York, p351-356 (2017) 【査読無】
- 10) Asai A, Takakuma K. Alpha-based Multiplexed Assay for Identifying SH2 Domain Antagonists. SH2 Domains: Methods and Protocols, Machida K, Liu BA (Eds) Springer, New York, p163-172 (2017) 【査読無】
- 11) 浅井章良 新薬のためのコンセプトデザイン *Biophilia* Vol6 No.1, 22-28 (2017) 【査読無】
- 12) 浅井章良 がんの免疫逃避機構を標的とする新しい抗がん剤の開発 *化学工業* 66 No.12 13-21 (2015) 【査読無】

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) 小跡竜也, 小郷尚久, 田口今日子, 増田吉昭, 浅井章良: ビスベンゾキノン誘導体による STAT3 阻害作用の生化学的解析. 日本薬学会第 136 年会(横浜) 演題番号 27AB-pm250S、2016 年 3 月 27 日
- 2) Elena Gabriele, Dario Brambilla, Chiara Ricci, Nicola Ferri, Akira Asai, Anna Sparatore: NEW ROSMARICINE DERIVATIVES AS ANTICANCER AGENTS. XXIV National Meeting in Medicinal Chemistry (Perugia, Italy), September 12, 2016
- 3) 飯塚 明, 浅井 章良, 山口 建, 秋山 靖人: テモゾロミド耐性神経膠芽腫細胞に対する STAT3 阻害剤と mTOR 阻害剤との併用抗腫瘍効果. 第 75 回日本癌学会学術集会(横浜) 演題番号 P-2344、2016 年 10 月 7 日
- 4) 浅井章良: システイン誘導体による細胞周期停止作用(シンポジウム) 第 68 回日本細胞生物学会大会(京都) 演題番号 S20-1、2016 年 6 月 17 日
- 5) 浅井章良: がんの特性を踏まえた次世代抗がん剤の探索研究. 第 19 回 静岡健康・長寿学術フォーラム(沼津) 要旨集, pp.24-25、2014 年 11 月 7 日
- 6) Kazunori Iwamoto, Yukie Inoue, Kyoko Taguchi, Yutaka Uehara, Kenji Matsuno, Yuka Unno, Naohisa Ogo and Akira Asai: Inhibition of STAT3 by an anti-lymphoma drug bendamustine. The 2nd International Conference on Pharma-Food (ICPF 2014) (Shizuoka) Poster #P-44, Abstract, p.123, 2014 年 11 月 6 日
- 7) 岩本一徳, 上原裕, 海野雄加, 小郷尚久, 浅井章良: STAT3 転写活性に対するベンダムスチンの阻害作用. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 演題番号 P-2403、要旨集, p.221、2014 年 9 月 26 日

- 8) Arianna Gelaina, Federica Porta, Silvia Dell'Orto, Stefania Villa, Daniela Masciocchi, Daniela Barlocco, Fiorella Meneghetti, Nicola Ferri, Giulio Poli, Tiziano Tuccinardi, Byoung-Mog Kwon, Akira Asai: Sviluppo di MD77: nuovi derivati eterociclici inibenti STAT3. NMMC 2014 XXV National Meeting on Medicinal Chemistry (Rende, Italy) #FAR 015, September 10, 2014
- 9) Federica Porta, Arianna Gelain, Daniela Masciocchi, Fiorella Meneghetti, Daniela Barlocco, Nicola Ferri, B-M Kwon, Akira Asai, Stefania Villa: Novel STAT3 inhibitors: Development of 1,2,5-oxadiazoles for anticancer therapy. EFMC-ISMIC 2014 XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry (Lisbon, Portugal) Poster #R052, Abstract, p.284, September 9, 2014
- 10) Fiorella Meneghetti, Silvia Dell'Orto, Stefania Villa, Daniela Masciocchi, Arianna Gelain, Daniela Barlocco, Laura Legnani, Byoung-Mog Kwon, Akira Asai: Blocking STAT3 signaling in cancer: Synthesis of new potential inhibitors bearing the pyridazinone moiety. EFMC-ISMIC 2014 XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry (Lisbon, Portugal) Poster #R030, Abstract, p.271, September 9, 2014
- 11) 浅井章良: 静岡県におけるアカデミア創薬の実践. 創薬懇話会 2014(岐阜) 要旨集, p.34-25、2014 年 7 月 10 日(木)
- 12) 島久 登, 大庭悠貴, 佐々木 駿, 松尾明大, 渡邊 駿, 松橋徹郎, 三島英換, 秋山泰利, 鈴木千登世, 浅井章良, 林謙一郎, 伊藤貞嘉, 阿部高明: 腎線維化, 炎症改善効果を有する化合物の探索と臨床応用. 第 57 回日本腎臓学会学術総会(横浜) 演題番号 P-099、2014 年 7 月 4 日
- 13) Elena Gabriele, Anna Barteselli, Federica Porta, Arianna Gelain, Akira Asai, Anna Sparatore: Methanethiosulfonate derivatives as ligands of STAT3-SH2 domain. VIII Meeting NPCF (Parma, Italy), June 9-11, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 章良 (AKIRA ASAI)

静岡県立大学大学院・薬学研究院・教授
研究者番号: 60381737