

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2020

課題番号：15K10076

研究課題名(和文)新規作用機序を持つチロシンキナーゼ阻害法による甲状腺癌分子標的療法の開発

研究課題名(英文)Development of molecular targeted therapy for thyroid cancer using tyrosine kinase inhibition with a novel mechanism of action

研究代表者

武田 湖州恵 (Takeda, Kozue)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：80345884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで甲状腺癌に関わるRETチロシンキナーゼの活性を、従来の阻害剤とは異なるシステインを介した機序により制御できることを示してきた。本研究ではその効果をさらに検討し有効で副作用の少ない治療法として応用へ近づけることを目的とした。システインを介したRET阻害法は、既存の阻害剤が効きにくいゲートキーパー変異を持つRET活性抑制に有効であった。またこの阻害法では、RETによりがん化した細胞の増殖は抑えられたが、RETを発現しない親細胞では変化がなく正常細胞に対する増殖抑制効果はみられなかった。さらに、ヌードマウス移植腫瘍内でRET活性を抑制できた。しかし効果は弱く投与方法や量に工夫が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RETキナーゼが関与するがんに対する新規分子標的療法の候補分子を探索し、その効果を細胞レベルから実験動物レベルで検討を行った。

これまでのチロシンキナーゼ阻害剤と全く異なった、システインを介する二量体化という新しい活性化機序に基づく新規阻害剤の開発は、我々独自のものである。がんの治療において一種類の薬剤が全ての患者に有効であることはほとんどない。全く作用機序の異なった薬剤は、これまでの薬剤が無効な場合、あるいは耐性化した場合に非常に重要であり、本研究がさらに進めば、治療法の選択肢を増やすことに貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Identification of RET kinase inhibitors promises valuable therapeutic tools for the intervention of RET-driven tumors. We have previously reported that a conserved cysteine of RET is crucial to the disulfide-bonded dimerization-linked activation of RET kinases. Reagents which bind to this cysteine may inhibit the activity of RET kinases through disulfide-bond mediated dimerization. We examine the potential of cysteine containing peptides as candidate kinase inhibitors. We demonstrate that these peptides inhibit the activities of RET and its downstream kinases and effectively reducing the malignant potential of RET-expressing cells. These peptides were also found to be effective against the drug resistant mutant of RET. The inhibition of RET kinase activity by these peptides resulted in suppression of RET-mediated cancer cell growth.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん RET チロシンキナーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ RET の活性化は様々ながんの病態に関与している。チェルノブイリの事故後に発症した甲状腺がん組織を用いた研究では、50-70%という高頻度に受容体型チロシンキナーゼ遺伝子 RET/PTC の再配列異常が認められている(Thomas *et al* 1999)。放射線被曝の場合に加え、放射線とは関係ない甲状腺乳頭がんにおいても、20~40%に RET/PTC 遺伝子の再編成が認められると言われている。この活性型 RET/PTC が甲状腺がんの発生に関与することはこれまでの研究で証明されている (Jhiang *et al* 1996 など)。また近年、肺がんにおいても RET の再配列異常が発見され注目されている (Kohno *et al*, Takeuchi *et al*, Lipson *et al*, 2012)。

また、甲状腺乳頭がんは、ほとんどの症例で予後は良好であり、手術後の10年生存率は90%前後である。しかし、長期の経過では約10%の症例が術後再発や転移をきたす。こうした危険度の高い少数のグループに対してはほとんど治療法がないのが現状である。進行した放射性ヨウ素治療が無効な甲状腺がんにはいくつかの分子標的治療が開発され試みられている。中でも注目されているのがチロシンキナーゼ阻害剤であり、臨床試験等がすすめられている。

チロシンキナーゼは、現在分子標的療法の主要なターゲットになっており、様々な阻害剤が開発されている。そのほとんどが、キナーゼの活性発現に必須である ATP 結合を阻害することを作用機序としている。チロシンキナーゼの ATP 結合部位は多くのキナーゼで構造が良く似ており、ATP 結合阻害剤は本来の標的キナーゼに対する効果(オンターゲット効果)がある一方で、他のキナーゼに対して親和性を示して発揮される効果(オフターゲット効果)を有する場合がある。また、変異により阻害剤結合部位の構造が変化する事などによる薬剤耐性化が問題となっている。こうした問題を解決するためにも、新規チロシンキナーゼ阻害剤は引き続き求められている。しかし、ATP 結合阻害以外の全く作用機序の異なる阻害剤は、現在のところほとんど報告されていない。

本研究では、様々ながんの病態に関与するとして注目されている RET キナーゼを新しい機序に基づいて阻害する分子標的療法の開発を目指した。

### 2. 研究の目的

受容体型チロシンキナーゼは一般にリガンド結合によって二量体となり、位置的に近づいたキナーゼドメインをリン酸化し合うことによって活性化し、増殖シグナルなどを伝達すると考えられている。(二量体化 活性化)

我々はこれまでに RET キナーゼにおいて、キナーゼ分子のシステインが活性調節において重要な役割をすることを報告してきた。酸化ストレス等の細胞外ストレスは、RET キナーゼにあるシステインの SH 基に作用し、キナーゼをリガンドが結合したときと同じように、二量体化して活性化することを初めて明らかにした(Kato, Takeda *et al*. Mol. Biol. Cell. 2000, Takeda *et al*. Antioxid Redox Signal. 2001)。甲状腺がんに関与する活性型 RET キナーゼ RET/PTC1 において、この二量体化に必要なシステインを他のアミノ酸に置換したところ、基本的な活性が著明に減少した (Takeda *et al*. FEBS Lett. 2006)。つまり、RET 活性化において、我々が見出したシステインは、ストレス時以外でもきわめて重要な役割を持つと考えられる。

本研究では、がん遺伝子産物 RET キナーゼの活性化をこれまでの阻害剤にはない全く新しい機序により制御し、甲状腺がんのみならず RET 活性化の関わる様々ながんに対する新規治療法を提案することを目指した。特に、このシステイン周囲の配列を持つペプチドが、RET キナーゼの活性を抑制し細胞のがん化を抑えるという予備の結果に基づき、検討を進めた。

### 3. 研究の方法

我々がキナーゼ活性に重要であることを示してきた特定のシステイン周辺の配列を持つペプチドが、RET キナーゼ活性を抑制するというこれまでの結果に基づき、以下の実験を進めた。

#### **A. システインを介するRET活性の制御**

新規作用機序に基づき、RET の活性を最も有効に抑制する分子を探索した。

##### 1. 最も有効な阻害分子の検討

これまでRET キナーゼの特定のシステインのS-S結合が活性に必要であることを示してきた。このシステイン周辺の配列を持つペプチドをRET/PTC1に加え、キナーゼ活性の変化を試験管レベルで検定したところ、既にいくつかのペプチドが、RET キナーゼの活性を抑制するという結果を得ていた。これまで得られたペプチド配列を元に、最も活性抑制効果の強いペプチドを、ペプチドの長さやアミノ酸を変化させ探索した。

##### 2. 特定のシステイン周囲の配列を持つペプチドが、本当にシステインによってRETキナーゼに結合しているか？

システイン周囲の配列を持つペプチドと免疫沈降法などで精製したRETタンパクを、試験管内で反応させた。その後ウエスタンブロット法などで、ペプチドとRETタンパクの結合を確認した。

#### **B. 副作用の軽減**

RET活性を抑制する候補ペプチドはRET以外の他のチロシンキナーゼに作用するか、正常細胞にどのような影響を及ぼすかなどを検討し、副作用の可能性の低いペプチドを探した。

##### 1. 特異性の検討

チロシンキナーゼ阻害剤は、本来の標的だけではなく、他のキナーゼに対しても阻害効果をもつ場合がある。がん治療薬として使用するには、標的キナーゼに効果が高いだけでなく、他のキナーゼに対する影響が小さいことも重要である。RET活性阻害効果が認められたペプチドの、他のチロシンキナーゼに対する影響を、網羅的なリン酸化キナーゼアレイの方法によって確認した。

##### 2. 正常細胞への影響

RET活性を抑制しがん細胞の増殖等を抑制できたペプチドが、正常細胞にどのような影響を及ぼすかを検討するために、NIH3T3細胞にRETを導入したモデルにおいてRET導入前のNIH3T3細胞との比較を行った。

#### **C. システインを介する新規分子標的療法の検討**

これまで、がん遺伝子である活性型RETを遺伝子導入した細胞を用いて、システインを介したRET活性阻害の効果を検討してきた。今回はそれに加えて、細胞に発現しているRETが重要な役割をしている複数のがん細胞株を用いて検討した。

## 1. 細胞に対する効果

NIH3T3 細胞はがん遺伝子である *RET/PTC1* を導入すると、その活性に依存してがん化する。この細胞に *RET* の活性を抑制できたペプチドを投与し、細胞のがん化に対する効果を評価した。また細胞へのペプチド投与もこれまで行ってきた遺伝子導入によりペプチドを発現させる方法だけでなく、ペプチド導入試薬などを用い、生体への応用につながる方法を目指した。

さらに、*RET* 変異を持つ甲状腺がん細胞株、*RET* 活性が増殖や治療抵抗性に関与するといわれる乳がん細胞株(Morandi *et al*, Wu *et al*, 2013)を用い、同様のがん化の抑制効果を確認しその適応範囲を広げた。

## 2. 移植がんに対する効果

*RET* によりがん化した NIH3T3 細胞は、ヌードマウスに移植すると腫瘍を形成する。この細胞又は形成した腫瘍に対して、細胞に対する実験で有効であったペプチドを投与し、腫瘍の増殖抑制効果を検討した。

## 4. 研究成果

### A. システインを介する*RET*活性の制御

#### 1. 最も有効な阻害分子の検討

これまでに、*RET* キナーゼ活性に重要な特定のシステイン周辺の配列を持ついくつかのペプチドが、*RET* キナーゼの活性を抑制するという結果を得ていた。それらのペプチド配列を元に、ペプチドの長さやアミノ酸を変化させ探索したところ、甲状腺がんを引き起こす *RET-PTC1* だけでなく、*RET-MEN2A*, *MEN2B* についてもキナーゼ活性およびその下流シグナルを抑制できることが示された。それぞれの変異 *RET* ごとに、どのペプチドが最も有効であるか検討したが、今回試した候補ペプチド間には明らかな差は認められなかった。

#### 2. 特定のシステイン周囲の配列を持つペプチドが、本当にシステインによって *RET* キナーゼに結合しているか？

システイン周囲の配列を持つペプチドと免疫沈降法などで精製した *RET* タンパクを、試験管内で反応させた。その後ウエスタンブロット法などで、ペプチドと *RET* タンパクの結合を確認することができた。この結合は還元処理によって外れるため、その結合様式は S-S 結合であることが示された。

### B. 副作用の軽減

#### 1. 特異性の検討

*RET*活性阻害効果が認められたペプチドの、他のチロシンキナーゼに対する影響を、網羅的なリン酸化キナーゼアレイの方法によって確認したところ、*RET*キナーゼ非存在下で大きな活性変動を示した受容体型チロシンキナーゼは検出されず、ペプチドの阻害効果は*RET*に特異的であることが示唆された。しかし*RET*キナーゼ活性を阻害した時、同時に活性が低下、あるいはかえって増強するキナーゼがいくつか検出されたため、これらに対する影響については、さ

らなる検討が必要である。

## 2. 正常細胞への影響

RET活性を抑制しがん細胞の増殖等を抑制できたペプチドが、正常細胞にどのような影響を及ぼすかを検討した。システインを介したRET阻害法は、RETを導入しがん化したNIH3T3細胞に対して細胞増殖抑制効果を示したが、RETを発現しない親細胞に対してはその効果は認められず、正常細胞の増殖にはほとんど影響を与えないと考えられた。

## C. システインを介する新規分子標的療法の検討

### 1. 細胞に対する効果

上記の通り、複数のペプチドがRETを導入しがん化したNIH3T3細胞に対して細胞増殖抑制効果を示した。

また、既存の阻害剤とは全く異なるシステインを介したRET阻害法では、既存の阻害剤が効きにくい遺伝子変異を持つRET、特にゲートキーパー変異を持つRETキナーゼの活性とその下流シグナル、および細胞増殖の抑制に有効であることが示された。

さらに、RET変異を持つ甲状腺がん細胞株(TT)、RET活性が増殖や治療抵抗性に関与するといわれる乳がん細胞株(MCF7)を用い、RETキナーゼ活性およびその下流シグナルを抑制できることを示し、その適応範囲を広げた。

細胞へのペプチド投与は、これまで行ってきた遺伝子導入によりペプチドを発現させる方法だけではなく、ペプチド導入試薬などを用い、生体への応用につながる方法を目指したところ、これらの方法でRETキナーゼの活性抑制が可能で示す結果が得られているが、まだ検討数が少なく、今後の継続した研究が必要である。

### 2. 移植がんに対する効果

ヌードマウスに移植した腫瘍（RETによりがん化したNIH3T3）に対しシステインを介したRET阻害法を試みたところ、腫瘍内でのRETキナーゼの活性が抑制できる可能性が示された。しかしその効果はまだ弱く、腫瘍増殖を抑えるには不十分であった。引き続き、投与方法や投与量の検討が必要であると考えられる。

以上のように、RETキナーゼが関与するがんに対する新規分子標的療法の候補分子を探索し、その効果を細胞レベルから実験動物レベルで検討を行った。

これまでのチロシンキナーゼ阻害剤と全く異なった、システインを介する二量体化という新しい活性化機序に基づく新規阻害剤の開発は、我々独自のものである。がんの治療において一種類の薬剤が全ての患者に有効であることはほとんどない。全く作用機序の異なった薬剤は、これまでの薬剤が無効な場合、あるいは耐性化した場合に非常に重要であり、本研究がさらに進めば、治療法の選択肢を増やすことに貢献できると考えており、今後も研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeda K, Kawamoto Y, Nagasaki Y, Okuno Y, Goto Y, Iida M, Yajima I, Ohgami N, Kato M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Peptides containing the MXXCW motif inhibit oncogenic RET kinase activity with a novel mechanism of action.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 336-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田湖州恵、川本善之、坂川久仁子、川添健司、矢嶋伊知朗、大神信孝、加藤昌志
2. 発表標題 システインを介したRETキナーゼの活性阻害
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川本 善之  (Kawamoto Yoshiyuki)  (10410664)	中部大学・生命健康科学部・准教授    (33910)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	加藤 昌志  (Kato Masashi)  (10281073)	名古屋大学・医学(系)研究科・教授    (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------