

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16828

研究課題名（和文）変異型Rasに高親和性かつ特異的に結合するタンパク質を用いた新規抗がん剤の開発

研究課題名（英文）Development of a new anticancer drug using a protein that has high affinity and specifically binds to mutant Ras

研究代表者

本田 諒（Honda, Ryo）

岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究科・准教授

研究者番号：00820143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：RASは癌治療における最重要標的の一つであるが、従来の低分子医薬品や抗体医薬では創薬が困難な標的（“undruggable target”）と長年考えられてきた。本研究では、RASと生体内で相互作用するタンパク質を基本骨格とする細胞膜透過性タンパク質を51個合成することで、細胞レベルで強い阻害活性を有する新規RAS阻害剤を同定することに成功した。本阻害剤は既存の低分子RAS阻害剤と同程度以上の阻害活性を示しており（Cell Chemical Biology 2021, WO/2022/039026）、有望な創薬シーズと考えることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したRAS阻害剤の最大の特徴は、従来の創薬分子や次世代医薬品のどれとも異なる「細胞膜透過性タンパク質」であるという点である。このため本剤は、分子量が1万Daを超える高分子量タンパク質であるにも関わらず、細胞膜を透過し、細胞内に存在するRASに到達し阻害することが可能である。このようなアプローチはKRASのみならず、他のundruggable targetにも応用することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：KRAS is one of the most important targets in cancer treatment. However, it has been considered as an undruggable target with conventional small molecules and antibodies. In this study, by synthesizing 51 fusion recombinant proteins, we succeeded in identifying a novel KRAS inhibitor with a micromolar inhibitory activity in cultured cell lines. The proteins consist of a RAS-binding protein with a cell-permeable peptide and thereby penetrates through the cell membrane. The best inhibitor shows an inhibitory activity comparable to that of existing small molecule RAS inhibitors, and thus can be considered as a promising lead for the development of new anticancer drugs (Cell Chemical Biology 2021, WO/2022/039026).

研究分野：がん創薬

キーワード：RAS 抗がん剤 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

変異型 Ras タンパク質の阻害剤は、全がんの約 20% に適用可能な、幅広い抗腫瘍スペクトルをもつ画期的な抗がん剤になると期待されている。しかしながら過去 30 年間の世界的規模の研究にも関わらず、変異型 Ras を特異的に阻害する分子標的薬はいまだにない。従来の創薬研究においては、おもに低分子化合物が候補分子として着目され、数十万から数百万からなる化合物ライブラリーから大規模スクリーニングによって Ras 阻害剤を見出す試みがなされてきた。しかし、これらの手法から見出された低分子化合物には二つの欠点から、限られた Ras 阻害効果しか認められてこなかった。すなわち—(1) Ras タンパク質の分子表面に低分子化合物が結合できるポケットがなく、結合親和性が数 μM 程度までしか上がらないこと、(2) 活性型 (変異型) Ras と不活性型 Ras の折り畳み構造が極めて類似しているため、活性型 Ras のみに特異的に結合する低分子化合物を見出すのが難しい—の二点である (Ledford, Nature. 2015)。

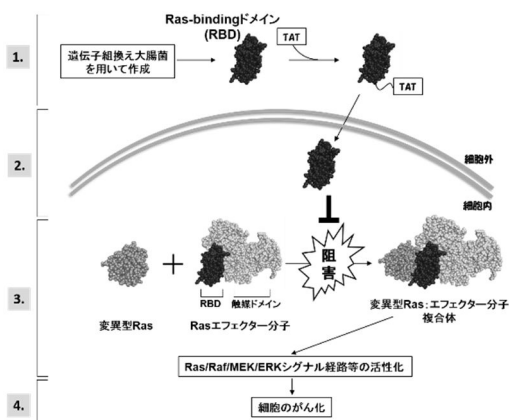
2. 研究の目的

本研究の目的は、「低分子化合物ではなく“人工タンパク質”を用いて変異型 Ras を阻害できるか？」という点を明らかにすることである。人工タンパク質は従来、細胞膜透過性が低く折り畳み構造も不安定であるため、創薬分子として挙げられることはほとんどなかった。しかし、タンパク質はその広い分子表面と複雑な折り畳み構造を生かして、低分子化合物ではありえないような高い親和性と特異性で標的分子に結合することができる。例えば Ras エフェクター分子由来「Ras-binding ドメイン (RBD)」は、活性型 Ras のみを特異的に認識し、かつ活性型 Ras に数 nM の高親和性で結合することができる (Herrmann, JBC. 1996)。さらに、RBD は触媒ドメインを欠損しているため、Ras/Raf/MEK/ERK シグナル等を惹起することなしに活性型 Ras に結合することが可能である。したがって、RBD は天然由来の Ras バインダーとして、Ras 阻害剤に最適な性質を有している。

では、RBD を細胞内に導入することは可能なのだろうか？近年の drug delivery system の発展は著しく、膜透過ペプチドなどを用いることで、あらゆる分子 (タンパク質、核酸、さらには磁気ビーズなど) を細胞内に導入することが可能になってきている (Guidotti, Trends in Pharm Sci. 2017)。さらに、細胞内のタンパク質の立体構造を解析する In-cell NMR の分野も近年発展しており、折り畳み構造を破壊することなしに“穏やかに”タンパク質を細胞内に導入する手法の研究も進んでいる。特に、RBD とほぼ同じ折り畳み立体構造をもつユビキチンは、モデルタンパク質として、その細胞内導入の手法が確立されつつある (Inomata, Nature. 2009)。これらの手法を用いることで、RBD も細胞内に導入できる可能性が大である。

以上のような考察から、われわれは「膜透過ペプチドなどを用いて RBD を細胞内に導入することで、変異型 Ras を特異的に阻害できる」という仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証し、Ras 特異的阻害剤を開発することを目的とする。具体的には、本剤の将来における in vivo 試験と臨床応用を見据えて、以下の 4 点を達成することを目標とした (下図を参照)。

- (1) RBD を遺伝子組換え大腸菌を用いて発現し、膜透過ペプチドや蛍光標識など必要な化学的修飾を加えたのち、高純度まで精製する手法を確立する。
- (2) RBD を細胞内に導入する。
- (3) RBD を用いて Ras シグナル経路を抑制する。
- (4) RBD を用いて RAS 変異がんを in vitro で制御する。

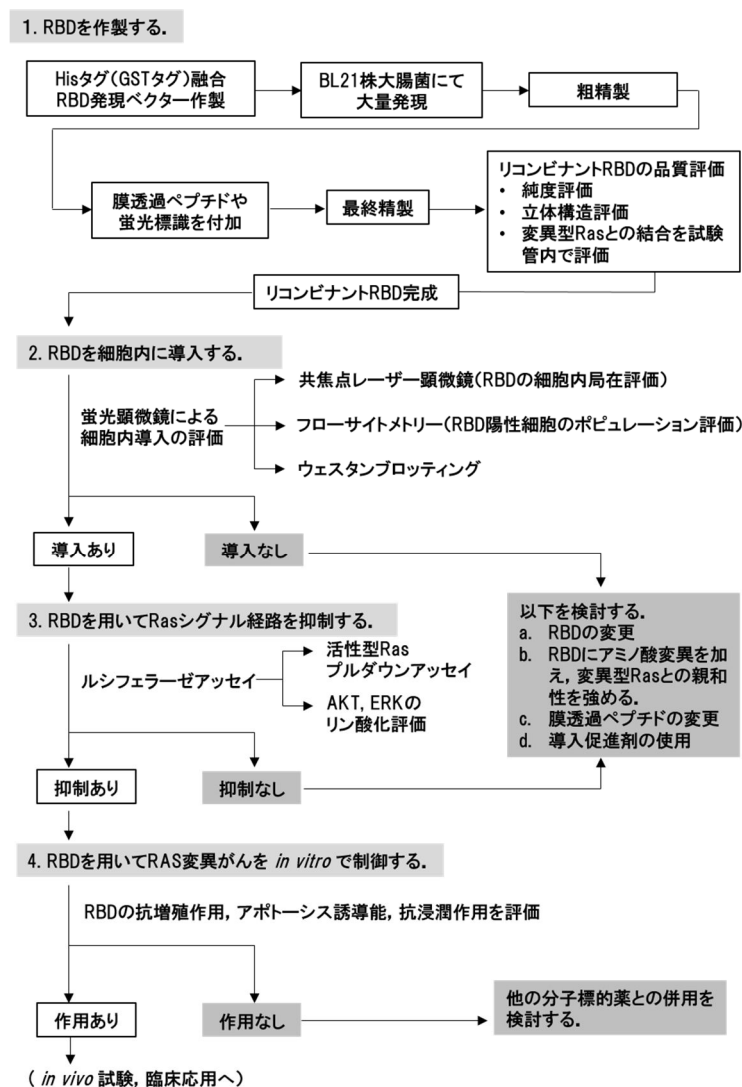


(1) はじめに RBD (黒色の分子) を遺伝子組換え大腸菌を用いて作製し、(2) これを TAT などの膜透過ペプチドを用いて細胞内に導入する。(3) 細胞内に導入された RBD は、変異型 Ras (灰色の分子) に高親和性かつ特異的に結合する。これによって変異型 Ras と Ras エフェクター分子 (Raf, PI3K など) 間の相互作用が競合阻害され、(4) 最終的にはがん細胞の増殖等が抑制される。

3. 研究の方法

上に述べた(1)~(4)の目的を達成するために、本研究では以下の方法を使用した(下図参照)。

- (1) はじめに、RBD 遺伝子を His または GST タグ融合ベクターにサブクローニングし、これを BL21 株大腸菌にて大量発現した。発現した RBD を Nickel カラムなどで粗精製した後、膜透過ペプチドや蛍光標識をチオールカップリング法等で付加した。最後に、HPLC 等で RBD を 90% 以上の高純度まで精製した。ITC や NMR を用いて、精製した RBD と変異型 Ras との結合を調べた。
- (2) 精製した RBD を細胞培養液に添加し、蛍光顕微鏡を用いて細胞内への移行を観察した。次に、フローサイトメトリーや、抗 His/GST 抗体や抗 RBD 抗体を用いたウェスタンブロットリング法により、RBD が細胞質に正しく導入されているかを評価した。
- (3) 血清応答要素と変異型 Ras 過剰発現ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにより、RBD の抗 Ras シグナル活性を調べた。次に、活性型 Ras プルダウンアッセイや、Ras シグナル下流分子のリン酸化の程度をウェスタンブロットリングで調べ、RBD が変異型 Ras を直接的に阻害しているかを評価した。
- (4) RAS 変異がん細胞株 (A549, DLD-1 など数種類) を用いて、RBD の抗腫瘍効果・アポトーシス誘導能・抗浸潤作用を評価した。



4. 研究成果

研究当初は3. に述べた流れで開発を進めてきたが、目的としていた RAS 阻害剤を得ることはできなかった。そこで、(1) のステップに変更を加え、RBD と膜透過性ペプチドが融合した遺伝子組換えタンパク質を多数合成する戦略をとった。これは、約 10 種類の RBD が遺伝子組換え大腸菌を用いて作製可能であり (Herrmann, JMB. 2009)、これらの RBD 間のアミノ酸配

列の相同性は低く、異なる物性（細胞内寿命や変異型 Ras への結合親和性など）を有していると予測されたためである。同じく、膜透過ペプチドに関しても TAT, R8 など 10 種類以上のが知られており、それぞれの膜透過性や細胞特異性が異なっている (Guidotti, Trends in Pharm Sci. 2017)。また、細胞レベルでのスクリーニングのスピードアップを図るために、(2) の細胞内導入確認ステップを後回しにし、合成したタンパク質の RAS 阻害活性を細胞モデルで直接評価することとした。

結果、51 種類の人工タンパク質を合成することで、目的としていた RAS 阻害剤 (#73) を得ることができた (下図)。#73 は膜透過ペプチドに penetratin を使い、RBD に cRaf 変異体を使っていることから、Pen-cRaf-v1 と名付けた。

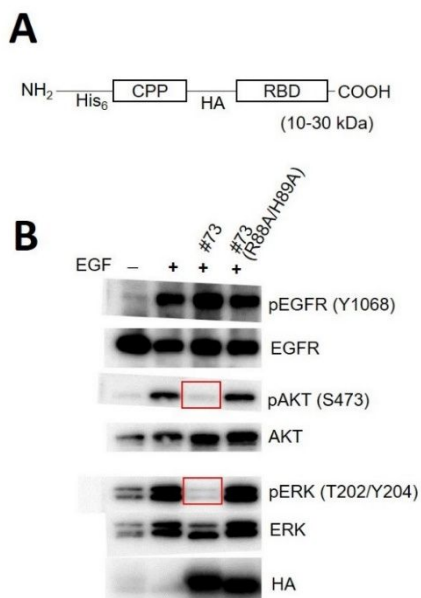


図 2 (A) 本研究で合成したタンパク質の基本構造を示す。膜透過ペプチド (CPP) と RBD から成り、His-tag と HA-tag を含む分子量 10-30kDa のタンパク質である。(B) #73 および negative control (R88A/H89A) 投与後の細胞のウェスタンブロットング像を示す。#73 は ERK と AKT のリン酸化を完全に抑制した。

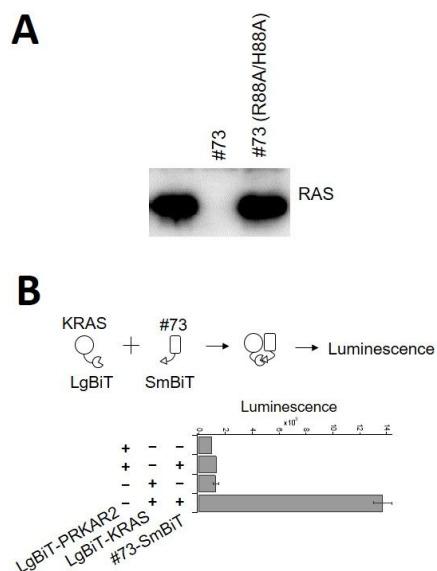
さらに #73 が RAS と相互作用するかを細胞フリーの条件下で調べた。はじめに等温滴定カロリーメトリ測定を行ったところ、#73 は KRAS GTP 型と $K_d = 22 \text{ nM}$ の高親和性で結合することがわかった。一方で KRAS GDP 型との K_d は $1.3 \mu\text{M}$ であったため、#73 は活性型 RAS に特異的に結合することが示唆された。その他のアッセイ (グアノシン解離阻害アッセイ、プルダウンアッセイ) でも同様に、#73 と KRAS GTP 型との相互作用を確認することができた。

また、#73 が細胞膜を透過し、細胞内の RAS と相互作用するかを調べた。はじめに活性型 RAS プルダウンアッセイを行ったところ、#73 を投与した細胞からは活性型 RAS のプルダウンが観察されなかった (右図 A)。これは、#73 が細胞内の活性型 RAS に結合し、そのプルダウンを競合的に抑制していることを示唆している。

Split luciferase アッセイ (NanoBiT[®]) は生細胞におけるタンパク質間相互作用を検出するアッセイである。目的タンパク質が相互作用する場合に、目的タンパク質にタグ付けされた LgBiT と SmBiT も融合し、発光酵素を形成することを検出原理としている (右図 B)。本研究では、KRAS-LgBiT を細胞内で一過性に発現させ、細胞外から #73-SmBiT を投与する実験を行った。その結果、KRAS-LgBiT 発現細胞に #73-SmBiT を投与した場合にのみ発光が観察された。以上のことから、#73 は細胞膜を透過し、細胞内の RAS と相互作用していることが示された。

さらに、培養がん細胞を用いて #73 の抗がん作用を調べたところ、#73 は RAS 変異細胞に数 μM から十 μM でアポトーシス細胞死を誘導することがわかった。いっぽうで、RAS 野生型細胞株に対する抗がん作用は十 μM から二十 μM と、比較的弱かった。

以上の結果は、すべて #73 が RAS 阻害剤として機能することを明確に示している。#73 の開



発よって、「低分子化合物ではなく“人工タンパク質”を用いて変異型 Ras を阻害できるか？」、「膜透過ペプチドなどを用いて RBD を細胞内に導入することで、変異型 Ras を特異的に阻害できる」という本研究の仮説を証明することに成功した。

次なる問いは、「#73 は抗がん剤として実用化できるか？」という点である。この点を確かめるために、われわれは癌細胞を移植したマウスモデルを用いて実験を行った。しかしながら、期待していた抗がん作用は認められなかった。この結果が示していることは、#73 および開発した人工タンパク質は確かに RAS 阻害剤として機能するが、抗がん剤として実用化するには、まだまだ挑戦的な障壁が数多く存在するという点である。最大の障壁は、やはり血中安定性と考えられる。#73 の血中安定性を測定したところ、静脈投与後の数分以内に、その 99%近くが消失していた。ゆえに、リポソーム化や PEG 化によって#73 の血中安定性を向上させることが重要である。また、#73 は単純に膜透過ペプチドと RBD を繋げただけの単純な構造をしている。ゆえに N 末端側、リンカー部位、C 末端側にはいまだ改善の余地があり、将来的にはこれらを改善することで、まずはマウスモデルで RAS 阻害活性を証明することを目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomura Teiko Komori, Heishima Kazuki, Sugito Nobuhiko, Sugawara Ryota, Ueda Hiroshi, Yukihiro Akao, Honda Ryo	4. 巻 28
2. 論文標題 Specific inhibition of oncogenic RAS using cell-permeable RAS-binding domains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1581 ~ 1589.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2021.04.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 人工タンパク質、R a s 阻害剤及び抗がん剤	発明者 本田諒、赤尾幸博	権利者 国立大学法人東海国立大学機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-137653	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 人工タンパク質、R a s 阻害剤及び抗がん剤	発明者 本田諒、赤尾幸博	権利者 国立大学法人東海国立大学機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/028880	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------