

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15246

研究課題名（和文）がん遺伝子産物RASを阻害する細胞膜透過性タンパク質の開発

研究課題名（英文）Development of a cell membrane permeable protein that inhibits oncogene RAS proteins

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：RASはがんの約30%で活性型に変異している最もポピュラーながん遺伝子であり、約40年間にわたってRas阻害剤の開発が世界中で進められている。2021年にG12C変異型阻害剤ソトラスブが認可されたが、G12C以外の変異型Rasに対する治療法は未だ認可されていない。研究代表者は2018年から人工タンパク質を使用したRas阻害剤の開発に取り組み、2020年にはNon-G12C変異型Rasを阻害可能な新規Ras阻害剤を開発した。本研究では本阻害剤を基礎とする誘導体の合成と活性の評価を行った。その結果、培養細胞モデルと担がんマウスモデルで強い抗腫瘍効果を示す新規Ras阻害剤Xの開発に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した新規Ras阻害剤Xは細胞内に侵入し活性型Rasを強く阻害することができる。担がんマウスモデルでは80%を超える高い腫瘍退縮率を示す。さらに、Xは血中安定性が高く、毒性も低いため、創薬展開が可能なシーズである。よってXは、G12C以外のRas変異を標的とする新しい治療法へと発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：RAS is the most popular cancer gene that is mutated to the active form in about 30% of cancers, and the development of Ras inhibitors has been underway around the world for about 40 years. The G12C mutant inhibitor sotorasib was approved in 2021, but no treatment for Ras mutants other than G12C has yet been approved. The principal investigator has been working on developing Ras inhibitors using artificial proteins since 2018, and in 2020 developed a new Ras inhibitor that can inhibit the non-G12C mutant Ras. In this study, we synthesized derivatives based on this inhibitor and evaluated their activity. As a result, we developed a novel Ras inhibitor X that exhibits strong antitumor effects in cultured cell models and tumor-bearing mouse models.

研究分野：がん創薬

キーワード：KRAS RAS 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

RAS (H-Ras, K-Ras, N-Ras) はがんの約 30% で活性型に変異している最もポピュラーながん遺伝子であり、約 40 年間にわたって Ras 阻害剤の開発が世界中で進められてきた。しかし、Ras 阻害剤の開発は未だ極めて挑戦的な課題であり、低分子化合物を含めた多くの試みが失敗に終わっている。このような状況の中、2021 年に G12C 変異型 Ras を阻害する低分子化合物 (ソトラシブ) が FDA で認可され、大きな注目を集めた。ソトラシブの独創的な特徴は、Ras の変異したシステイン残基と共有結合を形成することにより、結合ポケットがない Ras にも強く結合できるという点にある。しかし、残り約 90% を占める Non-G12C 変異型 Ras はいまだ創薬展開が困難な標的である。前臨床試験で有望な結果を示す低分子化合物の報告は相次いでいるが (*J Med Chem.* 2022, *Nature.* 2023 など)、臨床で使用可能な薬剤はない。

採択者は 2018 年から人工タンパク質から成る Ras 阻害剤の開発に取り組み、2020 年には Non-G12C 変異型も阻害可能な新規 Ras 阻害剤を開発した (*Cell Chem. Biol.* 2021, 特願 2020-137653)。この成果をさらに発展させるため、本研究では活性型 Ras を特異的に分解・修飾する酵素への改変を行い、新規 Ras 阻害剤 RRSP-v1-TAT とその類縁体の開発に至った (論文作製中、特願 2024-049305)。本剤は担がんモデルマウスで Ras を阻害し腫瘍退縮を誘導するうえ、安定な立体構造を有しているため、組換えタンパク質として大量合成可能であり血中安定性も高く、マウスで明確な毒性もみられないため、創薬展開が可能なシーズである。本稿では RRSP-v1-TAT の開発経緯を報告する。

2. 研究の目的

2020 年に発明者が開発した Ras 阻害剤は、RBD (Ras-binding domain) と CPP (Cell-permeable peptide) の 2 つのドメインから構成される単純な阻害剤であった (*Cell Chem. Biol.* 2021)。この阻害剤の活性を飛躍的に高めるため、本阻害剤と Ras を分解・修飾し失活する酵素 (以下、RAS 失活酵素) との融合を考えた。すなわち、RBD は活性型 Ras (変異型 Ras) に特異的に結合することができるため、Ras 失活酵素との融合によって変異型 Ras を特異的に分解・修飾する酵素へと発展することを期待した。その一方で、CPP-RBD と Ras 失活酵素を融合させることで分子が複雑化し、正しく立体構造を形成しない可能性や、合成できない可能性や、細胞膜透過性が低下する可能性も考えられた。そこで、本研究では 3 つの Ras 失活酵素 (RRSP, TpeL, ExoS) と本阻害剤との融合を検討した。

3. 研究の方法

< 検証実験 I (タンパク質の一過性発現による検証) >

上記アイデアの概念立証を示すため、はじめに RBD と Ras 失活酵素の融合タンパク質を細胞内で一過性発現させ、Ras 阻害活性 (ERK のリン酸化の抑制と、Ras の切断・修飾) をウェスタンブロッティング法で評価した。RBD には採択者の先行研究で最も高い活性が示した cRaf-v1 を使用した (以下、v1)。その結果、3 つの Ras 失活酵素の中で RRSP がもっとも高い活性と、v1 との強い融合効果を示した (図 1)。ExoS も弱い融合効果を示したが、ExoS そのものの活性が低く、トータルの Ras 阻害活性は低かった。TpeL には融合効果は全く認められなかった (図 2)。

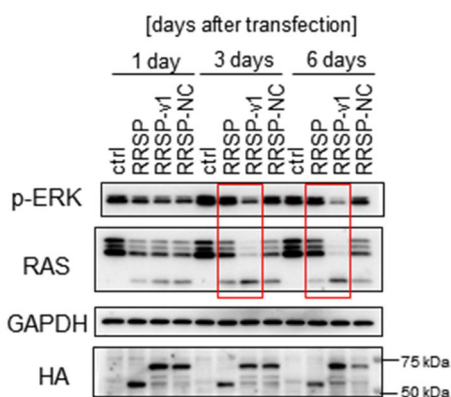


図 1 RRSP と v1 の融合の効果の検証: PANC-1 膵臓がん細胞 (KRAS に G12D 変異をもつがん細胞株) に HA タグを付けた融合タンパク質をコードするベクターを transfection し、数日後に細胞を回収した。得られた細胞ライセートを immunoblot で解析した結果、RRSP と v1 の融合によって、RAS の切断と、RAS の下流シグナル (p-ERK: ERK のリン酸化) の抑制が強く増強されることがわかった (図中の赤枠)。増強は transfection 後 3 日から 6 日の間で認められた。なお、図中の NC は RAS に結合しない 2 アミノ酸変異型の v1 (negative control) を意味する。RRSP と NC との融合では作用の増強が認められず、本現象が RAS 結合に特異的であることが示された。

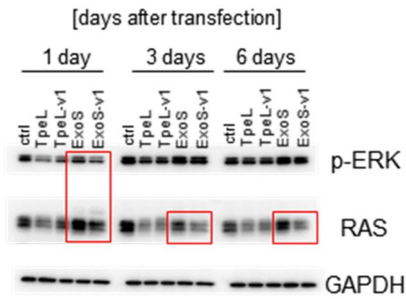


図2 TpeL と ExoS との融合の効果の検証：図1と同じ実験を行った結果、v1 と ExoS の融合により RAS 修飾効果の向上と、RAS の下流シグナル (p-ERK : ERK のリン酸化) の抑制がわずかに増強された (図中の赤枠)。しかし、v1 と TpeL の融合では増強効果は認められなかった。

次いで NanoBRET アッセイを使用して、融合タンパク質と K-Ras-G12V の相互作用の評価を行った。その結果、RRSP、ExoS、TpeL に v1 を融合することによって、BRET ratio がそれぞれ 1.6 倍、2.2 倍、1.1 倍向上した。すなわち、RRSP もしくは ExoS に v1 を融合させると、期待通り RAS への結合性が強く向上することが示された。上の図1と図2の結果と合わせると、融合効果の発現には「v1 との融合によって Ras 失活酵素が Ras に強く結合すること」が必要条件であることが示唆された。

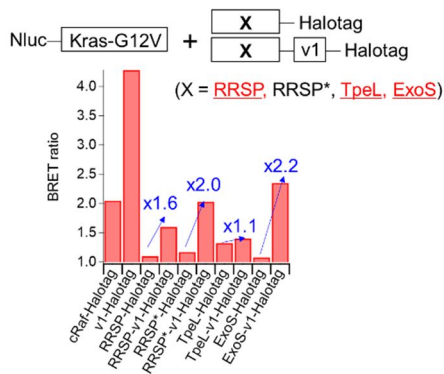


図3 融合タンパク質の RAS への結合の強さの測定：PANC-1 細胞にルシフェラーゼ (Nluc) を付けた変異型 RAS (KRAS-G12V) と、Halotag を付けた融合タンパク質を一過性に発現させ、両者間の相互作用の強さを調べた。本実験系では BRET ratio が高いほど相互作用が強いことを意味する。図中の RRSP* は RAS 切断活性を失活させた RRSP を示すが、RRSP* と v1 の融合でも BRET ratio の 2.0 倍向上が認められた。

< 検証実験 II (細胞膜透過性タンパク質を使用した検証) >

つぎに融合タンパク質に細胞膜透過性ペプチド (CPP) を付けたキメラタンパク質を遺伝子組換え大腸菌を使用して合成した。精製したタンパク質をがん細胞に投与し、6 日後にがん細胞の生存率を測定した。この実験では細胞膜透過性ペプチドとして一般的な TAT を使用した。その結果、一過性発現実験の結果と同じく、RRSP と v1 の融合によってがん細胞傷害の IC50 値が 10 倍以上向上した (> 2,000 nM → 200 nM)。ExoS と v1 の融合でも弱い活性の向上が認められたが、やはり ExoS そのものの活性が低く IC50 値は融合タンパク質でも検出範囲外であった (> 10,000 nM)。TpeL と v1 の融合の効果は認められなかった。

以下の実験ではもっとも活性の高い RRSP-v1 融合タンパク質に着目し、さらなる開発を進めた。すなわち、RRSP- [RBD]- [CPP] を基本構造として、[RBD] と [CPP] 部位を改変した誘導体を 30 種類以上合成し、そのがん細胞傷害性を評価した。結果、RRSP-v1-TAT が最も高い活性を示し (IC50 は数百 nM) した。さらに、RRSP-NS1-TAT や RRSP-v1-CPP44 などの中程度の活性を示す類似体も得ることができた。

< 検証実験 III (in vivo) >

担がんマウスモデルを使用して RRSP-v1-TAT の in vivo 活性を評価した。また、比較対象となる非融合タンパク質 (RRSP-TAT) の活性も評価した。はじめに、K-Ras G12D 変異をもつ Colon-26 大腸がん細胞をマウスの皮下に移植して、RRSP-v1-TAT および RRSP-TAT を尾静脈経路で投与した。その結果、50 mg/kg RRSP-v1-TAT を 6 回投与すると腫瘍成長率を 10% まで抑制できた。しかし、同じ容量の非融合タンパク質 (RRSP-TAT) は腫瘍成長を全く抑制しなかった。さらに、薬剤投与後に腫瘍を摘出し、ライセートのイムノブロットで Ras 阻害性を評価したところ、in vitro と同様に ERK のリン酸化の抑制と Ras の修飾を認めた。

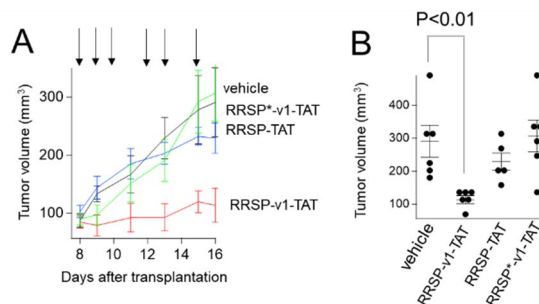


図4 : RRSP-v1-TAT の in vivo 活性の検証 1 : (A) Colon-26 がん移植モデルに対する RRSP-v1-TAT の活性を示す。縦軸が腫瘍体積で、横軸が癌移植日からの日数を示す。黒矢印が付いた日に vehicle control、50 mg/kg RRSP-v1-TAT、50 mg/kg RRSP-TAT、50 mg/kg RRSP*-v1-TAT を尾静脈経路で投与した (RRSP* は RRSP の RAS 失活酵素を欠損させた陰性対照)。 (B)

day 16 における腫瘍体積の比較を示す。RRSP-v1-TAT だけが優位に腫瘍の成長を抑制する。

さらに、15 種類の担がんマウスモデルでも同様の実験を行った。その結果、CT-26 (KRAS G12D 変異をもつマウスがん細胞) と MC-38 (KRAS 野生型のがん細胞) 移植モデルに対して本剤は強力な活性を示し、それぞれ腫瘍成長率は-6%、-20%であった。これらのモデルでは腫瘍の完全退縮も認められ、それぞれのモデルでマウス 6 匹中 4 匹、マウス 6 匹中 5 匹で腫瘍が完全退縮した。よって RRSP-v1-TAT は *in vivo* でも強力な活性を示すため、non-G12C 変異型 Ras を阻害する新しい分子標的薬へ発展する可能性がある。

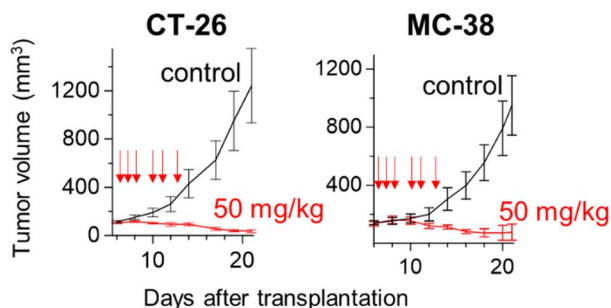


図 5 : RRSP-v1-TAT の *in vivo* 活性の検証 2 : CT-26 と MC-38 がん移植モデルに対する RRSP-v1-TAT の活性を示す。縦軸が腫瘍体積で、横軸ががんを移植した日からの日数を示す。赤矢印が付いた日に、溶媒 Control もしくは 50 mg/kg の RRSP-v1-TAT を尾静脈経路で投与した。

4. 研究成果

- 1) 論文投稿準備中
- 2) 特願 2024-049305、出願日：令和 5 年 3 月 26 日、「融合タンパク質」、発明者：本田諒
- 3) 2023 年 4 月 26 日 オンラインシンポジウム：未踏の KRAS 遺伝子に挑む、本田諒、「人工キメラタンパク質による KRAS 分子標的薬の開発の試み」
- 4) 2023 年 2 月 9 日 2022 年度【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会、本田諒、「細胞膜透過性タンパク質による KRAS 阻害剤の開発」

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田諒
2. 発表標題 人工キメラタンパク質による KRAS 分子標的薬の開発の試み
3. 学会等名 オンラインシンポジウム：未踏のKRAS遺伝子に挑む
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田諒
2. 発表標題 細胞膜透過性タンパク質によるKRAS阻害剤の開発
3. 学会等名 2022年度【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 融合タンパク質	発明者 本田諒	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2024-049305	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------