

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860095

研究課題名(和文) 特異的タンパク質分解による新規活性型Ras分子標的癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular target drug for activated Ras protein by the specific protein degradation system

研究代表者

服部 隆行 (HATTORI, TAKAYUKI)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：50377751

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)：本研究課題では、標的的特異的タンパク質分解法によって、最も有名な癌遺伝子産物の一つ活性型Rasタンパク質の分解を誘導する化合物(SNIPER)の開発を目指す。今回、2種類のSNIPERを合成したが、何れのSNIPERもRasタンパク質を分解する活性を有していなかった。さらにRasタンパク質に結合する化合物を同定するために、in silico docking simulationを行い728個のRasリガンド候補化合物を得ることが出来た。また、対象とした標的タンパク質が、実際にプロテインノックダウンによって分解出来るか否かを事前に検証できるシステムも別途構築した。

研究成果の概要(英文)：The aim this study is to develop the SNIPER that specifically target activated mutant Ras proteins by protein knockdown system. We synthesized two bestatin-Ras-binding compounds hybrids (SNIPERs), however both compounds did not degrade Ras protein in cells. To identify more Ras ligand candidate compounds we performed in silico docking simulation and obtained 728 candidates. In addition, we developed a system that makes us to predict performance of the protein knockdown against proteins of interest by SNIPER before identifying specific ligands for proteins of interest.

研究分野：医歯薬学

キーワード：タンパク質分解 プロテインノックダウン Ras 癌分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

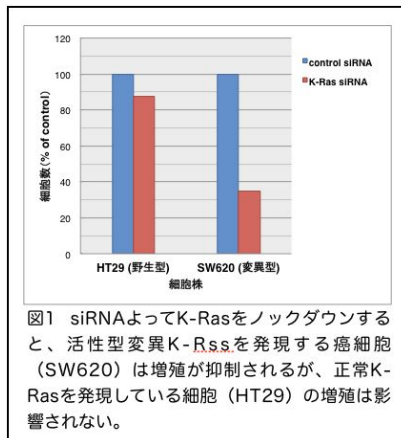


図1 siRNAによってK-Rasをノックダウンすると、活性型変異K-Rasを発現する癌細胞(SW620)は増殖が抑制されるが、正常K-Rasを発現している細胞(HT29)の増殖は影響されない。

低分子量GTP結合タンパク質Rasは、様々な細胞外刺激による細胞の増殖、分化、接着等の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。RasはGTP結合型が活性型、GDP結合型が不活性型であり、両状態の変遷は2種類のタンパク質によって調節されている。一方はグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と呼ばれ、GDPの解離とGTPの取り込みを促進することによりRasを活性化する。他方はGTPase活性化タンパク質(GAP)と呼ばれ、結合したGTPを加水分解しRasを不活性化する。Rasの発癌変異では12、13番目のグリシンおよび61番目のグルタミンが置換していることが多く、これらの変異のあるRasはGTPと結合できるが、GAPによるGTPの加水分解が出来なくなり、上流からのシグナル非依存的に構成的に活性化される。ヒトの腫瘍のおよそ1/3においてras遺伝子に構成的活性型変異が認められ、その頻度は膀胱癌で90%、大腸癌および甲状腺癌で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、活性型変異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Ras経路を標的とした癌治療戦略として、Rasの作用発現に必須である翻訳後修飾を阻害する方法、アンチセンス核酸を用いてRasの発現を減弱させる方法等が試みられてきた。しかし、これまでのところ種々の問題により実際に臨床で用いられているものはなく、Rasはundruggable targetであると思われてきた。

このような現状下、我々はタンパク質分解機構を利用して活性型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た。本研究課題では、内藤らによって考案されたタンパク質ノックダウン法(*J Am Chem Soc* 132, 5820; *FEBS Lett* 585, 1147)により、活性型Rasを特異的に分解の標的にすることにより、これまでundruggable targetとされてきたRasを

介した oncogenic signal を遮断することにより抗腫瘍活性を発揮させることを試みる。我々は実際に、培養癌細胞の活性化型RasをRNA干渉によってノックダウンすると増殖が著しく減弱することを確認している(図1)。一方、正常型Rasを発現する細胞のRasをノックダウンしても増殖は変化せず、Rasを標的する事の正常細胞に対する毒性の低さも示唆されている。

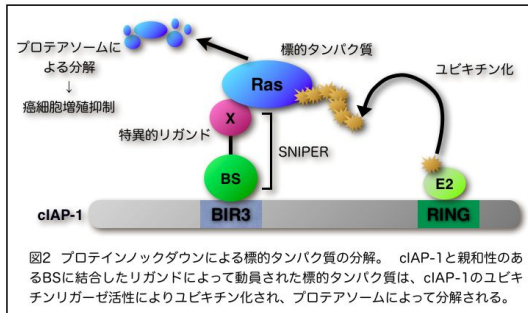


図2 タンパク質ノックダウンによる標的タンパク質の分解。cIAP-1と親和性のあるBSに結合したリガンドによって動員された標的タンパク質は、cIAP-1のユビキチンリガーゼ活性によりユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。

タンパク質ノックダウンはユビキチン-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(図2)。アポトーシス阻害タンパク質ファミリー(IAP)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。最近、抗癌剤として知られるベスタチン(BS)のメチルエステルが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(*J Biol Chem* 283, 8961)。さらに、BS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た(図2)。現段階でタンパク質ノックダウンは、all-trans retinoic acid(ATRA)をリガンドとしてATRA結合タンパク質CRABP2を標的とした試験管内の反応の観察に留まっているが、我々は本技術の潜在的な有用性に着目し、有害タンパク質の消失による病態の改善に本技術が応用できると着想した。そこで我々は、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。

タンパク質ノックダウンによる標的タンパク質の分解には特異的に結合するリガンドの

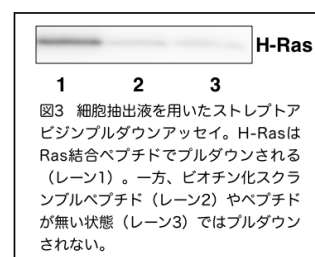


図3 細胞抽出液を用いたストレプトアビジンプルダウンアッセイ。H-RasはRas結合ペプチドでプルダウンされる(レーン1)。一方、ビオチン化スクランブルペプチド(レーン2)やペプチドが無い状態(レーン3)ではプルダウンされない。

存在が必須である。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いる。そのうち、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 と結合することを我々は確認している (図 3)。

## 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

本研究は、以下の大きく以下の 3 点に分けて研究を進めた。

1. 活性型 Ras に特異的に結合するリガンドを種々のスクリーニング法を駆使して、複数の候補化合物の同定を目指した。また、先述した報告されている Ras 結合化合物やペプチドが実際に Ras に結合するかを検証し、結合が確認できたものに関してはリガンドとして利用した。

2. Ras 高親和性化合物として見出された候補化合物は BS と架橋し、BS-候補化合物ハイブリッド (Specific and No-genetic IAP-dependent Protein eraser: SNIPER) を作製した。各 SNIPER を用いて培養癌細胞の活性型 Ras 分解誘導活性を測定した。

3. リガンドスクリーニングに平行して、Ras タンパク質が実際に SNIPER によって分解に導くことが可能かどうかを検証するシステムを構築した。本システムではタグ付きの Ras タンパク質の発現ベクターを作製し、培養細胞に発現させ、そのタグに対する特異的リガンドを用いた SNIPER でプロテインノックダウンを行い、Ras タンパク質を分解誘導する。本システムによって、Ras に対するプロテインノックダウンの効果を Ras に対する特異的リガンドを同定する前に予測することが可能となる。

## 4. 研究成果

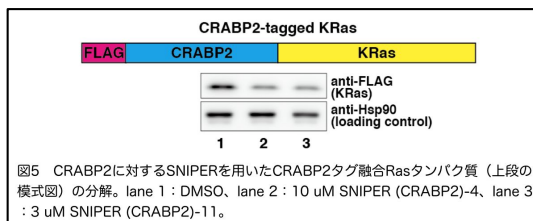
(1) 文献検索等により、少なくとも 8 種類の Ras タンパク質結合低分子化合物候補を得た。これらの候補化合物をビオチンで標識し、*in vitro* pull-down assay を行い、実際に Ras タンパク質と結合する可能性があるかどうか検証した。その結果、2 種類の化合物 2 およ

	Rasとの結合	Ras分解
Ras ligand-1	△	ND
Ras ligand-2	○	×
Ras ligand-3	△	ND
Ras ligand-4	×	ND
Ras ligand-5	×	ND
Ras ligand-6	×	ND
Ras ligand-7	×	ND
Ras ligand-8	○	×

図4 Ras結合低分子化合物候補の活性。化合物2と8は、結合活性が確認できた (○) がSNIPER活性は認められなかった。△は極めて弱い結合を、NDはSNIPER化しての検証を行わなかったことを示す。

び 8 は実際に細胞内で Ras タンパク質に結合することが確認できたため、これらの化合物を SNIPER 化し、それらのプロテインノックダウン活性を確認した。しかしながら、これら二つの化合物由来の SNIPER は細胞に作用させても Ras タンパク質を分解する活性を發揮しなかった (図 4)。

(2) さらに Ras 結合低分子化合物候補を同定するために、*in silico* docking simulation によって活性化型 KRas に結合する化合物群を網羅的にスクリーニングした。一般に、阻害剤ベースの化合物スクリーニングは標的タンパク質の活性を抑制することを指標にしたスクリーニングであったため、酵素活性に寄与するポケットに結合する化合物が探索されてきた。Ras の場合も同様であり、自ずと狙うポケットが限定されていた。今回、我々の目的では必ずしも Ras タンパク質の活性を阻害する化合物を探索する必要が無く (いわゆる silent binder が同定できれば十分) 先行研究とは異なった戦略で、これまで探索されなかったポケットに結合する化合物をスクリーニングすることができた。市販化合物 850 万化合物より重複を除いた後得られた 650 万化合物に対し、スクリーニングを行い、種々の絞り込みを行った結果、728 化合物が結合候補化合物として示された。現在、スコアの高い化合物を優先に、*in vitro* での Ras タンパク質結合活性の再検証を行っている。



(3) Ras タンパク質が真に SNIPER によってプロテインノックダウンの系により分解誘導する事が可能な標的か否かを検証するシステムの構築を行った。以前の研究により CRABP2 タンパク質は ATRA をリガンドとした SNIPER (CRABP2) によって (図 2 の X の部分が ATRA である SNIPER) ユビキチン化、

分解誘導されることが分かっている (*FEBS Lett* **585**, 1147)。この CRABP2 と Ras との融合タンパク質の発現ベクターを作製し、CRABP2 をタグとして Ras タンパク質を SNIPER (CRABP2)を用いたプロテインノックダウンにより分解誘導できるか否かを検証した (図 5)。その結果、2 種類の cIAP-1 リガンド由来 (図 2 の BS の部分が異なる 2 種類) の SNIPER (CRABP2)-4 と SNIPER (CRABP2)-11 は、共に CRABP2 タグ化した KRas タンパク質を分解に導くことが示され、Ras タンパク質はプロテインノックダウンの系によって分解に導くことが可能な標的であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 5 件)

Nobumichi Ohoka, Katsunori Nagai, Takayuki Hattori, Keiichiro Okuhira, Norihito Shibata, Nobuo Cho, Mikihiro Naito. Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin proteasome pathway. *Cell Death Dis.*, **5**, e1513, 2014.

Hongyan Cui, Weijia Wu, Keiichiro Okuhira, Kun'ichi Miyazawa, Takayuki Hattori, Kimie Sai, Mikihiro Naito, Kazuhiro Suzuki, Tetsuji Nishimura, Yoshimitsu Sakamoto, Akio Ogata, Tomokazu Maeno, Akiko Inomata, Dai Nakae, Akihiko Hirose, Tomoko Nishimaki-Mogami. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers as well as long needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1 $\beta$  secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **452**, 593-599, 2014.

Takayuki Hattori, Chiharu Uchida, Hirotaka Takahashi, Naoki Yamamoto, Mikihiro Naito, Yoichi Taya. Distinct and Site-Specific Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein at Serine 612 in Differentiated Cells. *PLOS ONE*, **9**, e80769, 2014.

Chiharu Uchida, Takayuki Hattori, Hirotaka Takahashi, Naoki Yamamoto, Masatoshi Kitagawa, Yoichi Taya. Interaction between RB protein and NuMA is required for proper alignment of spindle microtubules. *Genes Cells*, **19**, 89-96, 2014.

Keiichiro Okuhira, Yosuke Demizu, Takayuki Hattori, Nobumichi Ohoka, Norihito Shibata, Tomoko Nishimaki-Mogami, Haruhiro Okuda,

Masaaki Kurihara, Mikihiro Naito. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor-alpha and necrotic cell death in breast cancer cells. *Cancer Sci.*, **104**, 1492-1498, 2013.

### [学会発表] (計 16 件)

服部 隆行, 高橋 美帆, 椎名 勇, 大橋 愛美, 巨 慎吾, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦. 新規小胞輸送阻害薬による志賀毒素の細胞死誘導活性の抑制. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 (神戸市).

大岡 伸通, 永井 克典, 服部 隆行, 奥平 桂一郎, 柴田 識人, 長 展生, 内藤 幹彦. ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤の開発と抗がん活性評価. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 (神戸市).

沖津 航陽, 出水 庸介, 三澤 隆史, 正田 卓司, 服部 隆行, 内藤 幹彦, 栗原 正明. 細胞内タンパク質に対する蛍光スイッチング機能を持つ小分子プローブの開発. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 (神戸市).

山下 博子, 出水 庸介, 三澤 隆史, 服部 隆行, 大庭 誠, 田中 正一, 内藤 幹彦, 栗原正明. 二次構造制御に基づくカチオン性膜透過ペプチドの開発. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 (神戸市).

Nobumichi Ohoka, Katsunori Nagai, Keiichiro Okuhira, Norihito Shibata, Takayuki Hattori, Nobuo Cho, Mikihiro Naito. SNIPER(TACC3) degrades TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway and induces apoptosis in cancer cells expressing a large amount of TACC3. 26th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (2014.11, Barcelona, Spain).

大岡 伸通, 永井 克典, 奥平 桂一郎, 柴田 識人, 服部 隆行, 長 展生, 内藤 幹彦. ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤による癌細胞死の誘導. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 12 月 (横浜市).

沖津 航陽, 出水 庸介, 三澤 隆史, 正田 卓司, 服部 隆行, 内藤 幹彦, 栗原 正明. 細胞内 His タグタンパク質応答性蛍光プローブの開発. 第 58 回日本薬学会関東支部大会. 2014 年 10 月 (町田市).

大岡 伸通, 奥平 桂一郎, 柴田 識人, 服部 隆行, 内藤 幹彦. ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤によるがん細胞死の誘導. 第 73 回日本癌学会学術総会.

2014年9月(横浜市).

内田 千晴, 服部 隆行, 山本 直樹, 北川 雅敏, 田矢 洋一. RB タンパク質は紡錘体微小管の正しい配置に関わる. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月(横浜市).

服部 隆行, 高橋 美帆, 大岡 伸通, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦. プロテアソーム阻害による志賀毒素誘導性細胞死の抑制. 第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2014年7月(京都市).

服部 隆行, 大岡 伸通, 内藤 幹彦. プロテアソーム阻害薬によるシガトキシン誘導性アポトーシスの抑制. 日本がん分子標的治療学会第18回学術集会. 2014年6月(仙台市).

服部 隆行, 高橋 美帆, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦. 志賀毒素耐性 THP-1 細胞クロームの単離と解析. 日本薬学会第134年会. 2014年3月(熊本市).

奥平 桂一郎, 出水 庸介, 服部 隆行, 大岡 伸通, 柴田 識人, 最上 知子, 栗原 正明, 奥田 晴宏, 内藤 幹彦. エストロゲン受容体分解誘導剤による乳癌の細胞死誘導分子機構. 日本薬学会第134年会. 2014年3月(熊本市).

服部 隆行, 高橋 美帆, 大岡 伸通, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦. プロテアソーム阻害によるシガトキシン誘導性アポトーシス様細胞死の抑制. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月(神戸市).

内田 千晴, 服部 隆行, 高橋 宏隆, 山本 直樹, 北川 雅敏, 田矢 洋一. pRB-NuMAの相互作用はE2F1の機能制御ならびに細胞周期進行に関わる. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月(神戸市).

内田 千晴, 服部 隆行, 高橋 宏隆, 山本 直樹, 北川 雅敏, 田矢 洋一. 分裂期進行におけるRBタンパク質とNuMAの相互作用の関与. 第86回日本生化学会大会. 2013年9月(横浜市).

〔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/mtgt/index.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

(現遺伝子医薬部)・主任研究官

研究者番号: 50377751