

《様式B》

研究テーマ	「遺伝子組換えタンパク質を用いた新規 Ras 阻害剤の開発」		
研究責任者	所属機関名	国立大学法人岐阜大学	
	官職又は役職	助教	
	氏名	本田諒	メールアドレス ryohonda@gifu-u.ac.jp
共同研究者	所属機関名		
	官職又は役職		
	氏名		

(平成 30 年度募集) 第 31 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)  
※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

がん遺伝子産物 Ras は膵臓癌・大腸直腸癌等を含む約 30%のがんで活性化されている。活性型 Ras はがん治療標的として最重要視されているものの一つで、おもに MEK/ERK と AKT/mTOR シグナル経路を活性化することでがんの発生・維持・増殖を促進する。このことから、活性型 Ras をターゲットとした分子標的薬の開発が世界的規模で進められている。しかし従来の創薬手法による Ras 阻害剤の開発は困難を極めており、いまだ臨床応用に至った Ras 阻害剤はないのが現状である。

Ras 阻害剤開発の困難性は、Ras タンパク質の特徴的な 3 次元立体構造と、Ras タンパク質の生体内局在によるところが大きい。まず、Ras の分子表面には低分子化合物が結合できるポケット (鍵穴) がいないため、従来の低分子化合物は有効な Ras 阻害剤になりえない。さらに Ras は細胞内に局在するため、細胞膜透過性をもたない抗体の標的にもならない。これらに対して細胞膜透過性タンパク質は、鍵穴非依存的に Ras に結合し、なおかつ細胞膜透過性を有するため、有効な RAS 阻害剤になると考えられる。しかし、細胞膜透過性タンパク質は、その合成の難しさ・研究開発の Low throughput などからほとんど研究対象とされていない。

本研究では、既知の細胞膜透過ペプチドと既知の Ras 結合タンパク質の任意の組み合わせから成る 51 種類の融合タンパク質を合成し、これらをスクリーニングすることで、強い Ras 阻害効果と抗がん作用をもつ新規 Ras 阻害剤#73 を開発することに成功した。また、マイクロアレイを用いた網羅的解析によって#73 の標的特異性も証明することが

できた。本発明品は RAS 変異がんに対する新規治療薬の基本骨格になると期待される。令和 2 年度内に特許出願予定である。

## 2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

### (1) タンパク質合成とスクリーニング

はじめに、既知の細胞膜透過ペプチドと既知の Ras 結合タンパク質の任意の組み合わせから成る 51 種類の融合タンパク質を遺伝子組換え大腸菌を用いて発現・精製した。これらを RAS 変異がん細胞株に投与し、RAS シグナル下流分子 (AKT と ERK) のリン酸化の抑制程度をウェスタンブロッティング法で調べた。その結果、3 種のタンパク質が ERK と AKT のリン酸化を強く抑制することがわかった。つぎに、これらのタンパク質の RAS 結合表面に 2 カ所のアラニン変異 (以下 “AA” と略記) を導入し同様の実験を行ったところ、いずれにおいてもリン酸化の抑制がキャンセルされた (図 A)。この 3 種類のタンパク質の中から、非特異的な細胞毒性を示さなかったタンパク質 #73 を新規 RAS 阻害剤として同定した (図 B)。

### (2) 試験管内での RAS 阻害性の証明

#73 と活性型 RAS との結合親和性を等温滴定カロリーメトリで測定したところ、解離定数は 22 nM であった (図 C)。一方で、不活性型 RAS との解離定数は 1.8  $\mu$ M であったため (図 D)、#73 は活性型 RAS に特異的に結合することが示唆された。次に活性型 RAS プルダウンアッセイを行ったところ、#73 は 10 nM 程度の低濃度域でも活性型 RAS のプルダウンを競合的に阻害した (図 E)。以上から、試験管内においては、#73 は活性型 RAS に数 nM レベルの高親和性で結合することが示された。

### (3) 細胞内での RAS 阻害性の証明

細胞内での RAS 阻害性を証明するために三つの実験を行った。一つ目は上述した ERK と AKT のリン酸化をウェスタンブロッティング法で調べる実験である。10%血清存在下では #73 は  $IC_{50}=11.2 \mu$ M で RAS シグナル経路を抑制した (図 F)。さらに、血清非存在下で EGF によって惹起される RAS シグナルを  $IC_{50}=5.5 \mu$ M で抑制したが、RAS の上流にある EGFR のリン酸化は抑制しなかった (図 G)。

二つ目の実験は NanoBiT システムを使ったアッセイである。このアッセイでは、まず LgBiT タグ付 KRAS と SmBiT タグ付 cRaf-RBD を細胞内で発現させる。阻害剤がない場合には、KRAS と cRaf-RBD は結合し、LgBiT と SmBiT から成る発光酵素が再構成され、

細胞は発光する（図 H）．この発光アッセイを用いて#73 の RAS 競合阻害能を測定したところ、 $IC_{50}=6.4 \mu M$  との値が得られた．以上一連の実験から、#73 は細胞内において 5～11  $\mu M$  の濃度域で RAS を阻害することが示された．

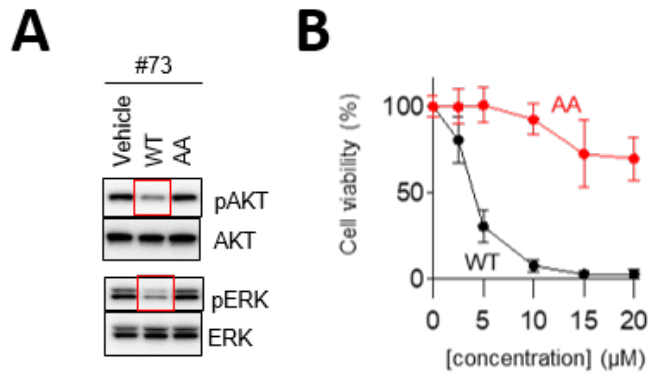
三つ目の実験は、マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの網羅的解析である（図 I）．#73 投与によって 871 個の遺伝子発現が優位に変動し、うち 768 個が WT に特異的であった．これらの遺伝子を Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベースを用いて帰属した結果、そのほとんどが MAPK 経路（注：MEK/ERK 経路と同義）、癌関連シグナル経路、アポトーシス経路、ErbB 経路（注：EGFR 経路と同義）に帰属された．同様に、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した結果、トップにランクされたのは KRAS 関連シグナル経路がほとんどであった．以上のことは、#73 が RAS 関連シグナル経路のみを特異的に阻害することを示している．

#### （4）抗がん作用の証明

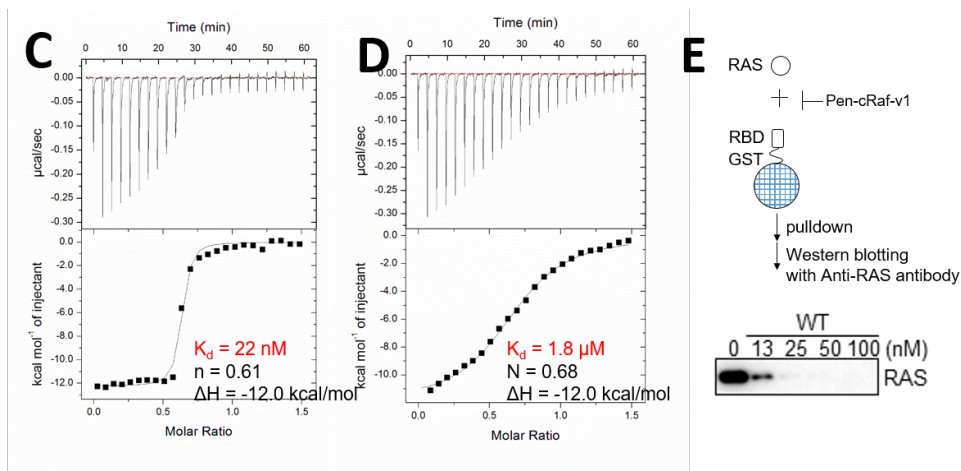
RAS 遺伝子変異をもつ膵臓癌細胞株（Mia PACA-2）に対しては、培養条件（培地組成や培養次元）によって異なるが、 $IC_{50}=4-12 \mu M$  程度の抗がん作用を示した（図 P）．さらに、他 10 種類の膵臓癌細胞株（PANC-1, BxPC-3）と大腸癌細胞株（SW48, SW480, Lovo, DLD1, Colo201, HT29, Colon26）に対しても抗がん作用が認められた．また Annexin V と PI (propidium iodide) の 2 重染色によって、低濃度処理（5  $\mu M$ ）で初期アポトーシス像、高濃度処理（15  $\mu M$ ）で後期アポトーシス像をとらえることができた．これらのことは、Pen-cRaf-v1 が癌細胞のアポトーシス性細胞死を誘導することを示唆している．

#### （5）結論

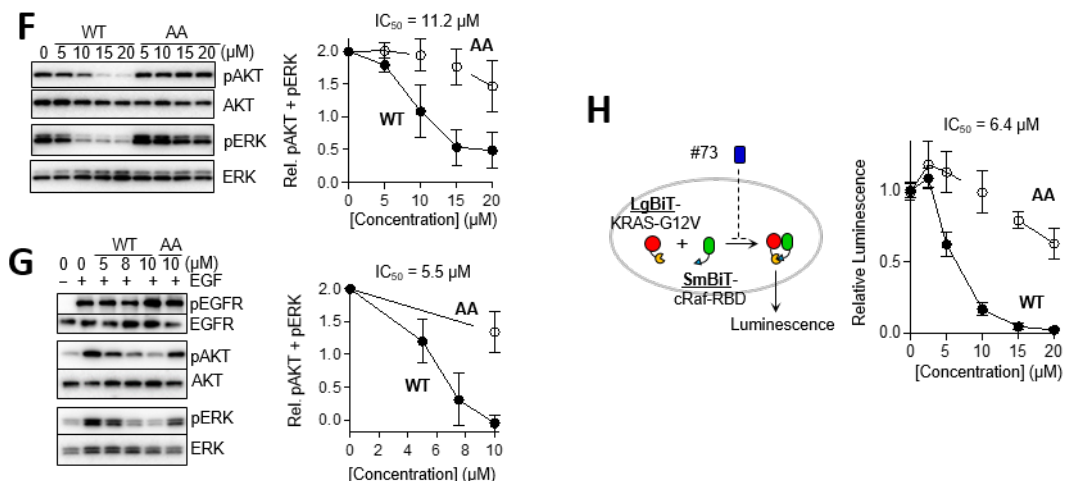
#73 は Ras 阻害効果と抗がん作用をもつ新規 Ras 阻害剤である．マイクロアレイによる網羅的解析の結果は、#73 が RAS 関連シグナルのみを特異的に阻害することを示している．今後は#73 を基本骨格とした類縁体を合成展開することで、臨床応用可能な RAS 阻害剤の開発を目指す．



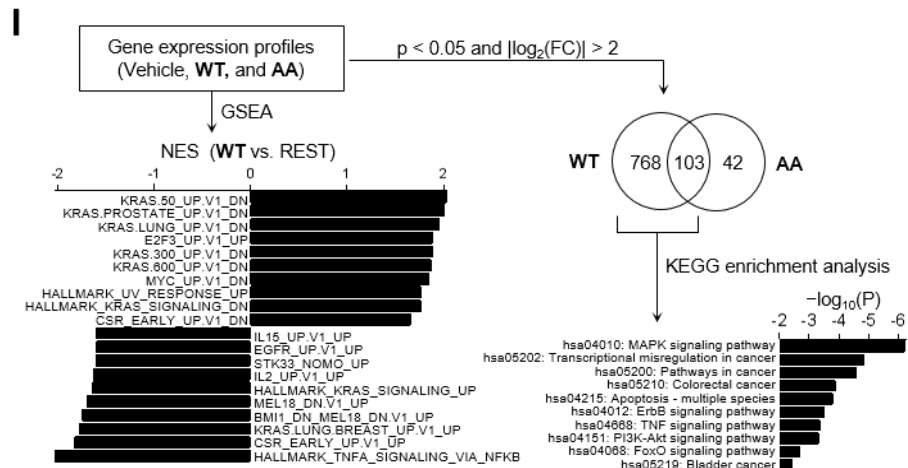
**図A**：合成した#73 (WT, 野生型) は ERK と AKT のリン酸化を強く抑制する. さらに, RAS 結合表面にアラニン変異 (AA) を導入することで, ERK と AKT のリン酸化の抑制はキャンセルされる. **図B**：#73 の WT と AA 体の膀胱癌細胞株に対する抗がん作用を示す. AA 体には非特異的な抗がん作用はほとんど認められず, WT には  $\text{IC}_{50}=4\mu\text{M}$  程度の抗がん作用が認められた.



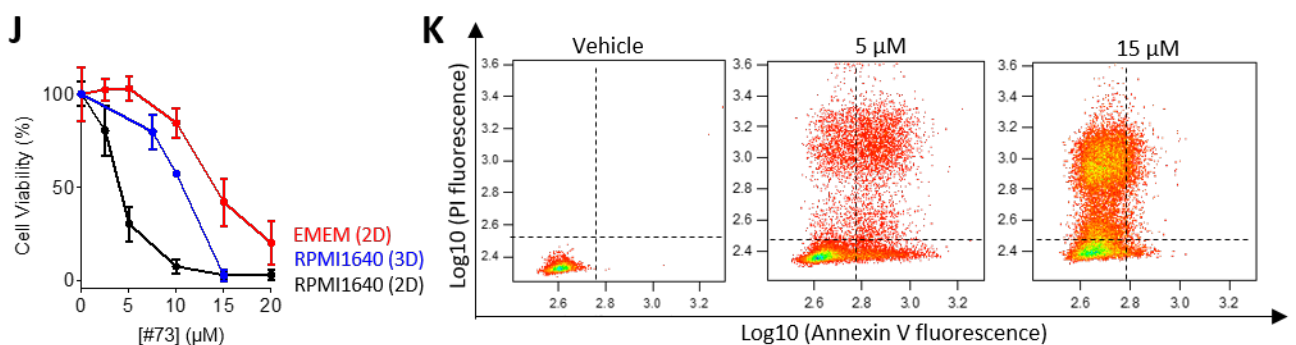
**図C**：活性型 RAS ( $\text{KRAS}^{\text{GTP}\gamma\text{S}}$ ) と #73 の滴定曲線. **図D**：活性型 RAS ( $\text{KRAS}^{\text{GDP}}$ ) と Pen-cRaf-v1 の滴定曲線. **図E**：活性型 RAS プルダウンアッセイの結果を示す. 大腸癌細胞株から抽出した活性型 RAS を cRaf-RBD-GST でプルダウンし, 抗 RAS 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した.



**図F**: 10%血清存在下での RAS 阻害活性を示す. **図G**: 血清非存在下において EGF によって活性化される EGFR/RAS シグナルに対する阻害効果を示す. #73 は RAS より上流にある EGFR (図B 参照) のリン酸化を抑制しないいっぽうで, AKT と ERK のリン酸化を抑制する. **図H**: NanoBiT アッセイの結果を示す. #73 は活性型 RAS (KRAS<sup>G12V</sup>) と cRaf-RBD の相互作用を IC<sub>50</sub>=6.4 μM で競合阻害する.



**図I**: マイクロアレイ解析の結果を示す. (右側) #73 投与によって 871 個の遺伝子が優位に変動し (p<0.05 かつ fold change が 2 倍以上), うち 768 個は WT に特異的であった. 871 個の遺伝子を KEGG データベースを用いて帰属した結果, そのほとんどが RAS 関連シグナル経路に帰属した. (左側) 発現プロファイルを GSEA で解析した場合も同様に, KRAS 関連シグナル経路がトップにランクされた.



**図J**: さまざまな培養条件における#73 投与後の細胞の生存曲線を示す. RPMI1640 培地と 2 次元培養条件において最も強い抗腫瘍効果が認められた. **図K**: Annexin V (横軸) と PI (縦軸) の 2 重染色の結果を示す. 低濃度処理 (5 μM) では Annexin V 陽性細胞が増加しており, 初期アポトーシスを示唆している. 高濃度処理 (15 μM) では PI 陽性細胞が増加しており, 後期アポトーシスを示唆している