

■受領No.1414

タンパク質性 Ras 阻害剤 (PRI-73) の構造最適化と癌治療への応用

代表研究者

本田 諒 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 助教



1. 研究目的

がん遺伝子産物RASは約30%のがんで活性化されているため、活性型RASをターゲットとした新規抗がん剤の開発が世界各国で進められている。活性型RASはMEK/ERK経路やAKT/mTOR経路を活性化することによってがんの発生・維持・増殖を促進することが古くから知られている。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、G12C変異体など特定の変異型RASを標的としたものを除いては、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。これは、RASの特徴的な3次元立体構造と細胞内局在によるところが大きい。すなわ、RASの分子表面には低分子化合物が結合できる鍵穴がなく、また細胞内に存在するため、従来の低分子薬や抗体医薬の標的にならないのである。

これに対して、細胞膜透過性タンパク質などの高分子化合物は、鍵穴非依存的にRASに結合できるため、有力なRAS阻害剤候補と考えることができる。例えば「RAS-bindingドメイン (RBD)」はRAFやPI3KなどのRASエフェクター分子に共通して認められるドメインであり、RASに高親和性に結合することができる。その他にも、RASに高親和性に結合する天然または人工のタンパク質が多数知られており、これらすべてがRAS阻害剤候補になると考えられる。しかし、タンパク質のRAS阻害剤としての可能性は、その合成の難しさ・ロー

スループットなどからほとんど追及されていない。

申請者は長年来タンパク質の構造生物学に従事しており、大腸菌を用いた遺伝子組換えタンパク質の合成を得意としている。これまでの研究において、RBDを基本骨格とし細胞膜透過性ペプチドで膜透過性を改善した人工タンパク質を多数合成することで、*in vitro*で有効な新規RAS阻害剤「PRI-73」を見出すことに成功している。本研究ではPRI-73の構造を最適化し、がん治療薬としての応用可能性を追求した。

2. 研究内容

2.1 PRI-73の *in vivo* 活性・血中安定性の評価

はじめにPRI-73が*in vivo*で抗腫瘍効果を示すかを検証した。膵臓がん細胞と大腸がん細胞を皮下移植したモデルマウスを作製し、30mg/KgのPRI-73を尾静脈経路で隔日投与した。しかし、期待していた抗腫瘍効果は認められなかった(図1A)。

次にPRI-73の生体内安定性を評価するために、尾静脈投与後15分と60分後に対側の尾静脈から採血し、抗HA抗体を用いたイムノブロット法を行った。検量線を用いて血中濃度を半定量的に算出したところ、15分後と60分後の血中濃度はそれぞれ56 nMと29 nMであった(図1B)。PRI-73の*in vitro*でのIC₅₀値がおおよそ数μMであることを考慮すると、nMレベルではRAS阻害効果は発現しない。ゆ

えに、PRI-73の活性の向上または血中安定性の向上が*in vivo*活性を示すのに重要であることが推測された。

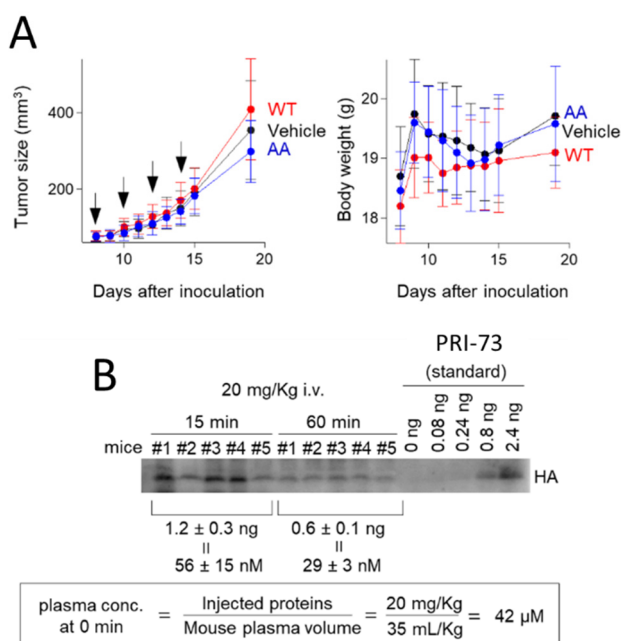


図 1. PRI-73 の *in vivo* 活性と血中安定性を示すデータ。(A) 大腸がん細胞 (Colon-26) を移植したマウスに対して 30 mg/Kg の PRI-73 を尾静脈から隔日・計4回投与した。Vehicle はコントロール、WT は PRI-73、AA は PRI-73 のアラニン変異体 (Ras 結合性を欠損しているネガティブコントロール) を投与したときの腫瘍成長曲線を示す。(B) PRI-73 の血中安定性を抗 HA 抗体を用いたイムノプロット法で解析した結果を示す (注: PRI-73 はそのアミノ酸配列内に HA 配列を有している)。標準線を作製して血中濃度を計算したところ、投与後 15 分以内に血中濃度がおよそ 42 μM から 56 nM に急速に低下していることがわかった。

2.2 PRI-73 の合成展開

上記結果に基づき、PRI-73の合成展開を行い、改良を試みた。これまでの研究でRBDと細胞膜透過性ペプチド部位の組み合わせが最適化されているので、本研究ではその他の領域(リンカー部位、N末端C末端領域)の最適化に取り組んだ。その他にも、RBDに二つのシステイン残基を導入しジスルフィド結合を形成することで、血中安定性の向上を図った。このような誘導体を100種類超合成し

た結果、PRI-73のリンカー領域を疎水的アミノ酸に置換することで、活性が3倍ほど向上することがわかった。また、RBDにジスルフィド結合を導入することで、Ras阻害性を失うことなしに、熱安定性・血中安定性が飛躍的に向上することがわかった (図2)。現在、これらの誘導体の*in vivo*活性を評価している。

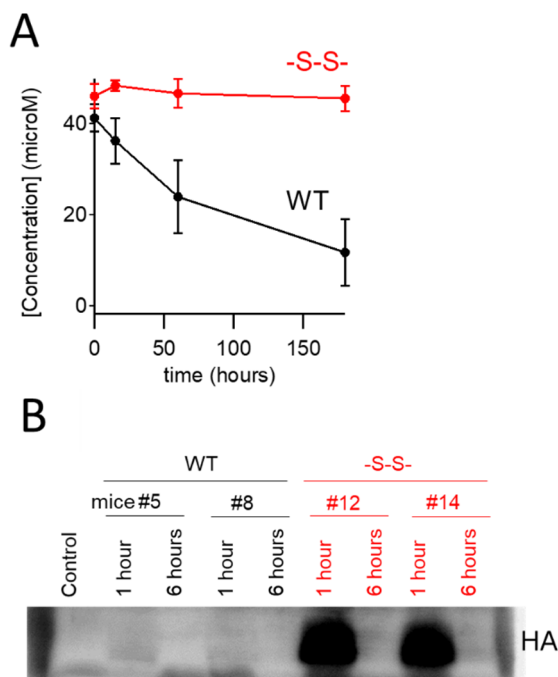


図 2. ジスルフィド結合 (-S-S-) 導入による安定性の改善。(A) 熱安定性の改善を示す。薬剤を 98°C で加熱し、遠心後に上清画分に残存しているタンパク質を定量した。その結果、-S-S-の導入により 98°C で 180 分間加熱しても、タンパク質が全く凝集沈殿しないことがわかった。(B) 血中安定性の改善を示す。薬剤を尾静脈経路で 20 mg/Kg 投与した 1-5 時間後に、血中に滞留しているタンパク質をイムノプロット法により定量した。-S-S-の導入により 1 時間後の血中タンパク質濃度が飛躍的に (バンドの定量からは 100 倍以上) 向上している。

2.3 今後の展開

われわれの研究で最初に同定したPRI-73は血中安定性が低く、期待していた*in vivo*活性は認められなかった。しかし、RBDにジスルフィド結合を導入することで血中安定性を飛躍的に向上させる

ことができ、その他の改変を加えることでRAS阻害活性を向上させることにも成功した。今後はこれらの誘導体の *in vivo* 活性を評価するとともに、ジスルフィド結合導入の最適な部位を検索し、PEG基やリポソーム化なども併用することで、さらなる血中安定性の向上を目指す。また、PRI-73が血中から代謝・分解・排泄されるメカニズムも調べる予定である。

3. 発表 (研究成果の発表)

Teiko K Nomura, Kazuki Heishima, Nobuhiko Sugito, Ryota Sugawara, Hiroshi Ueda, Akao Yukihiro, and Ryo Honda: Specific inhibition of oncogenic RAS using cell-permeable RAS-binding domains, *Cell Chemical Biology*, in press