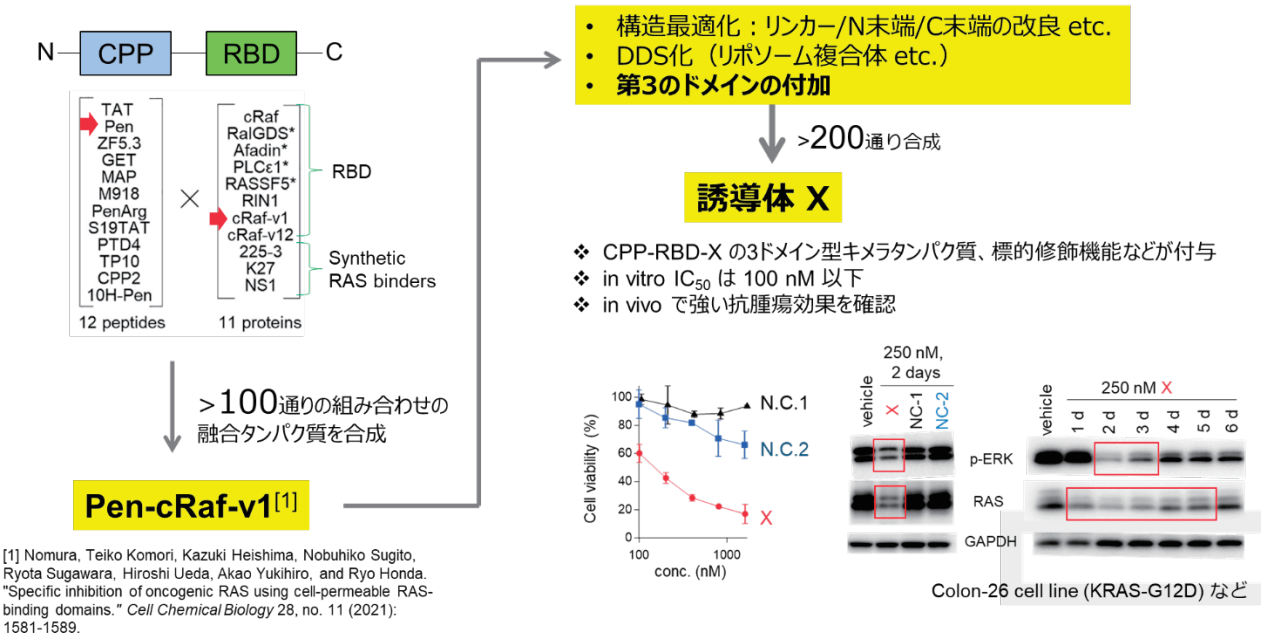
112　KRASを標的とする細胞膜透過性タンパク質の開発	本田　諒

【目的】KRAS は約 30%のがんで活性型に変異しているため、KRAS を標的とする分子標的薬は革新的な抗がん剤となることが期待されている。2021 年には G12C 変異型 KRAS を阻害する sotorasib が FDA で認可され大きな注目を集めたが、非 G12C 変異型の KRAS にはいまだ有効な阻害剤はないのが現状である。本研究ではキメラ型の細胞膜透過性タンパク質に着目することで、非 G12C 変異型 KRAS 阻害剤が開発できないかを検討した。具体的には、複数のタンパク質のドメインの組み合わせを検討し、できたキメラタンパク質の細胞内へのデリバリー方法を検討することで、新規 KRAS 阻害剤の開発を試みた。

【方法】これまでの著者らの研究において、RAS 結合ドメイン（RAS-binding domain：RBD）と細胞膜透過性ペプチド（Cell-permeable peptide：CPP）が融合した新規 KRAS 阻害剤 Pen-cRaf-v1 を見出している。本研究では Pen-cRaf-v1 をリードとし、構造最適化、Drug Delivery system（DDS）化、第 3 のドメインの付加の 3 系統での合成展開を試みた。200 個以上の候補タンパク質を遺伝子組換え大腸菌を用いて合成し、細胞モデルでスクリーニングを実施し、活性を示した誘導体は syngeneic mouse model で評価した。

【結果】合成展開の結果得られた誘導体 X は、細胞モデルでは IC_{50} が 100 nM 以下で、RAS シグナル依存的な細胞死を誘導した。リードとなる Pen-cRaf-v1 と比較すると活性は 100 倍近く向上した。マウスモデルでも活性が認められ、投与期間中は腫瘍の成長を完全に抑制した。副作用に関しては、体重減少は認められなかったが、1〜2 週間の連日投与直後にショック様の症状が認められた。マウスモデルにおいて分子生物学的な効果としては RAS の修飾と RAS シグナル経路の抑制が認められたが、組織形態学的には炎症性サイトカインの関与を想起させる急速な出血性壊死の発現が認められた。

新規 RAS 阻害剤 Pen-cRaf-v1 と誘導体 X の開発過程



[1] Nomura, Teiko Komori, 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* 28, no. 11 (2021): 1581-1589.

112. KRAS を標的とする細胞膜透過性タンパク質の開発

本田　諒

岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科

Key words：抗がん剤，分子標的薬，KRAS，細胞膜透過性タンパク質，細胞膜透過性ペプチド

緒　言

KRAS は約 30%のがんで活性型に変異しているため、KRAS を阻害する分子標的薬は革新的な抗がん剤となることが期待されている。しかし、KRAS 阻害剤の開発は極めて挑戦的な仕事である。その理由の第一は、KRAS は一般的なタンパク質とは異なり、分子表面に低分子化合物が結合できるポケット（鍵穴）がないことにある。このため、ほとんどの低分子化合物は KRAS に強く結合することができない。第二に、KRAS は受容体やイオンチャネルとは異なり、細胞の「中」に存在する分子である。このため、抗体などの細胞膜透過性がない大型の分子も KRAS まで到達することができず阻害剤となりえない。以上の二つの理由から、既存のモダリティを用いた KRAS 阻害剤開発の試みの多くが失敗に終わってきた［1］。

このような KRAS の“undruggablity”を克服するために、さまざまな切り口からの創薬開発が行われている。2021 年には G12C 変異型 KRAS を阻害する sotorasib が FDA で認可され、大きな注目を集めた。Sotorasib の独創的な点は、KRAS 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って、ポケットがない KRAS にも強く結合できるという点にある（共有結合型薬剤）。これによって従来の低分子化合物の困難性を克服し、がん創薬のブレークスルーを達成した。しかし、このような共有結合型薬剤は、共有結合を形成しにくい他の変異型（G12D、G12V、Q61R など）に応用することは難しい。このため、非 G12C 変異型の KRAS はいまだ創薬困難な標的のままである。非 G12C 変異型は KRAS 変異全体の約 88%を占め、膵臓がん・大腸がん・造血器腫瘍などあらゆるがん種で認められるため、阻害剤の医療ニーズは極めて高い［2］。それにも関わらず、2023 年 4 月現時点では臨床試験をクリアした非 G12C 変異型 KRAS 阻害剤はなく、Rev. Med.社が開発した 3 量体形成型阻害剤 RMC-6236 を含めた数剤が臨床試験で評価中である（NCT05379985 など）。

著者はもともとタンパク質の構造生物学が専門であり、難易度の高い遺伝子組換えタンパク質の合成や、遺伝子組換えタンパク質の迅速合成を得意としていたため［3，4］、キメラ型タンパク質を合成することで KRAS 阻害剤が作れないかと考えた。すなわち複数のタンパク質のドメインを適切に組み合わせ、KRAS 結合タンパク質などを細胞内にデリバリーすることで、KRAS 阻害剤を創出できないかと考えた。

2018 年から今日に至るまで 300 個以上のキメラ型タンパク質を合成し、KRAS 阻害剤の改良を重ねてきた。初期の RAS 結合ドメイン（RAS-binding domain：RBD）と細胞膜透過性ペプチド（Cell-permeable peptide：CPP）を組み合わせた単純な 2 ドメイン型タンパク質からスタートし［5］、合成展開を重ねることで、最近ではマウスモデルで活性を示す KRAS 阻害剤の開発に成功している。本稿では合成展開の基本戦略と、開発した KRAS 阻害剤の活性について報告する。

方法および結果

1. Pen-cRaf-v1 とその誘導体 X の開発

著者らの先行研究において、細胞膜透過性ペプチド 11 種類と RAS 結合タンパク質 12 種類の組み合わせのスクリーニングを実施、培養細胞モデルで KRAS 阻害活性を示す Pen-cRaf-v1 を同定している（要旨図も参照）

［5］。Pen-cRaf-v1 は CPP の penetratin と cRaf 由来の RBD が融合した 2 ドメイン型のタンパク質である。cRaf 由来 RBD には結合を強める変異が導入されているため、v1 という名称が付いている［6］。本研究では、Pen-cRaf-v1 の誘導体を合成展開することで、より強力な KRAS 阻害活性をもつキメラタンパク質を検索した。合成展開の戦略は、大きく分けて以下の 3 つを用いた。

1）Pen-cRaf-v1 の構造最適化

Pen-cRaf-v1 は CPP と RBD が融合したタンパク質であるが、2 つのドメインを繋ぐリンカー部位や、CPP の N 末端側や、RBD の C 末端側のアミノ酸配列の最適化は行っていなかった。そこで本研究では、リンカー部位を Flexible な GS リピートや剛直な EAAAK リピートに置換した誘導体を合成した。また、N 末端側や C 末端側の余分なアミノ酸配列を除去した誘導体や、末端に第 2 の CPP を付加することも検討した。

2）DDS 化

リードとなる Pen-cRaf-v1 はマウスモデルで活性を示さず、その原因として血中安定性の低さが考えられていた［5］。この点を補うため、本研究では Pen-cRaf-v1 の DDS 化を検討した。具体的には、Pen-cRaf-v1 をリポソームに内包させる手法や、イオン間相互作用を利用してアニオン性リポソームに吸着させる手法、エマルジョン化などを検討した。

3）第 3 のドメインの付加

Pen-cRaf-v1 は CPP と RBD が融合した 2 ドメイン型であるが、これに第 3 のドメインを付加した誘導体も検討した。具体的には Pen-cRaf-v1 に PROTAC 様ドメインや、RAS を修飾する酵素の付加を検討した。

以上の改変を加えた Pen-cRaf-v1 誘導体を約 200 個設計し、先行研究と同じ手法で、遺伝子組換え大腸菌を用いて発現し精製した。精製法は、粗生成として His タグアフィニティークロマトグラフィー、最終精製としてゲル濾過クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーを使った。SDS-PAGE でシングルバンドまで精製した。

はじめに精製したタンパク質を培養がん細胞株に投与し、3 日間培養後の生存率を指標とした第 1 次スクリーニングを実施した。つぎにヒットしたタンパク質をイムノブロットで評価し、RAS シグナル阻害を示すか調べた。並行して、RAS 結合機能等を欠損させたアナログ（negative control 体）も合成し、観察された細胞死が RAS シグナルに特異的かも調べた。以上のスクリーニングの結果、誘導体のひとつが IC_{50} が 100 nM 以下で RAS シグナル依存的な細胞死を誘導した（図 1）。X は RAS を修飾する機能が付加しているため、イムノブロットにおいて抗 RAS 抗体と反応せず band intensity が低下する現象も認められた。

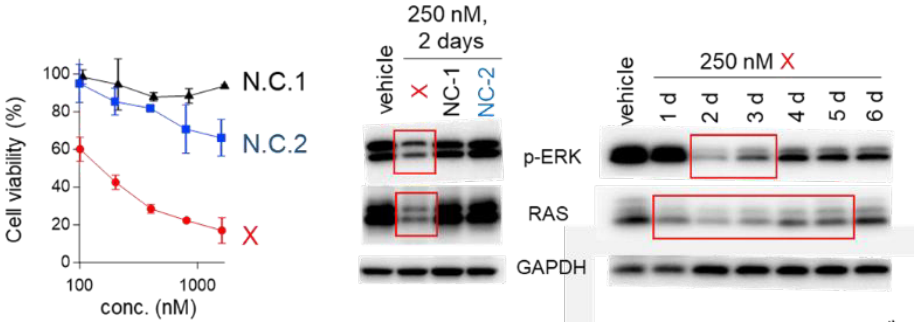


図 1. 誘導体 X の培養がん細胞に対する効果

左図） がん細胞株 Colon-26 の生存率に与える影響を示す。X の IC_{50} は約 100 nM である。N.C.は X のアナログで、RAS 結合機能等を欠損させた negative control 体である。生存率は薬剤投与 3 日後に評価している。

中央図） がん細胞株 PANC-1 に 250 nM の薬剤を培地に添加し、2 日後に回収した細胞ライセートをイムノブロット法で調べた。

右図） 同細胞株に対して、薬剤処理時間のタイムコース（1～6 日）を調べた結果を示す。

2. 誘導体 X の *in vitro* における効果

誘導体 X を著者らが保有する 29 種のがん細胞株に投与し、抗がん作用のプロファイリングを行った（図 2）。X の IC_{50}値は 30～2000 nM と 100 倍以上の幅でばらつきがあり、もっとも薬剤感受性が高いのは 143B であった。143B は骨肉腫細胞株（HOS）を v-ras で形質転換した細胞株であるため、HOS の薬剤感受性も調べたところ、IC_{50}値は 1000 nM であった。したがって、v-ras で形質転換することで薬剤感受性が約 30 倍に向上することになる。以上の結果と X の推定作用機序から考察して、層別化マーカーとして（1）RAS タンパク質の変異の有無、（2）RAS タンパク質の発現量、の二つが使用できると筆者は推測している。現在解析を実施中であるが、少なくとも（1）に関しては、RAS 変異がん細胞株と野生型がん細胞株の間で薬剤感受性の有意差は認められなかった（図 2）。したがって、RAS タンパク質の発現量も加味した重相関解析が必須と考えられる。

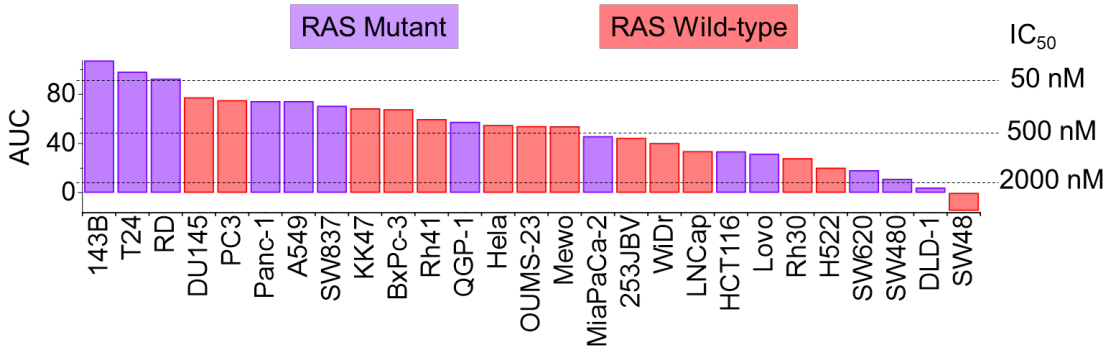


図 2. Pen-cRaf-v1 の誘導体 X の抗がん活性

29 種のがん細胞株に対する X の抗がん作用を示す。左軸は生存率曲線における AUC（エリア下面積）を示し、右軸は IC_{50}値を示す。

3. 誘導体 X の *in vivo* における効果

つぎに誘導体 X の活性を *in vivo* で評価した。モデルはマウスがん細胞を健常マウスの皮下に移植した syngeneic model を使用した。一般的には抗がん剤の *in vivo* 評価には、ヒトがん細胞を免疫不全マウスの皮下に移植した xenograft model が使用されるが、著者らが前者のモデルを選択した理由は二つある。（1）著者らが開発している RAS 阻害剤は高分子量タンパク質であるため、中和抗体の産生やアナフィラキシーショック等の要素も加味して活性の評価を行う必要がある。よって正常な免疫機能を有する syngeneic model が薬効と毒性を評価するのに適している。（2）RAS はヒト・マウス間で相同性が高く、特に RBD が結合する表面は相同性が 100%のため、マウスがん細胞でも RAS 阻害剤の活性を正しく評価することができる。

Colon-26 を Balb/c マウスの皮下に移植し腫瘍体積が 60～150 mm^3に達した後、X を尾静脈から投与し抗腫瘍効果を調べた。X は溶液量 0.1 ml で PBS に溶解しフィルター濾過で滅菌した。ToxinSensor®で調べたところ、LPS の残存量は 0.01 EU/μg 以下でエンドトキシンフリーの状態であった。その結果、単回投与では抗腫瘍効果は一過性であったが、連日投与により腫瘍の成長を完全に抑制することができた（図 3）。50 mg/kg もしくは 25 mg/kg の連日投与で有効であった。

副作用に関しては、初回の 50 mg/kg 投与後には血液の一般生化学検査を含めて、異常は認められなかった。体重減少も 1～2 週間の投与期間中は認められなかった。しかし、投与を 1～2 週間継続した場合、薬剤投与直後（数分以内）に数匹のマウスの活動量が低下する現象が認められた。原因は解析中であるが、薬剤に対する抗体の産生とアナフィラキシーショックなどを推測している。この現象のため 1～2 週間以上の薬剤投与は実施しなかったが、投与期間中は腫瘍の成長は完全に抑制できていた。

図 3 の中央に摘出した腫瘍のイムノブロット像を示す。*in vitro* の結果と同じく RAS の修飾とシグナル抑制が

認められ、わずか 8 mg/kg の投与でも活性が認められたことは特筆すべきである。図 3 の右側に摘出した腫瘍の HE 染色像を示す。特筆すべき特徴としては、静脈投与のわずか 3 時間後から組織形態学的な変化が出現し、出血を伴う壊死像（hemorrhagic necrosis）が認められた。この特徴は TNF α や IL-1 などの炎症性サイトカインと一部共通しているため、X が抗腫瘍免疫を誘導している可能性が示唆された。

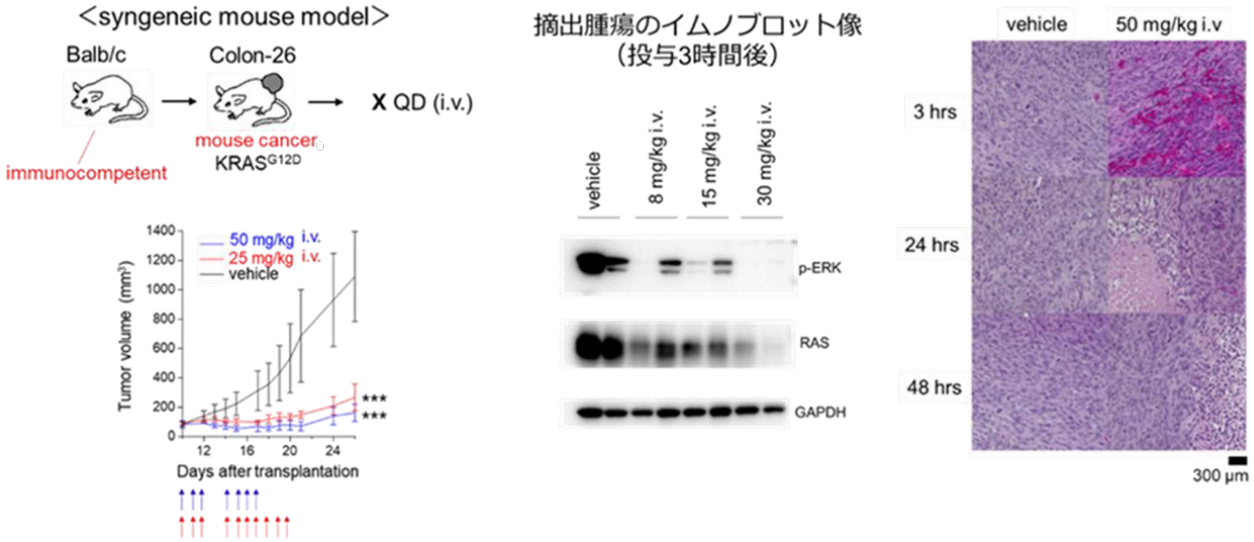


図 3. 誘導体 X の担癌モデルマウスにおける活性

左図） syngeneic model における誘導体 X の投与後の腫瘍体積の変化。図下部の上向き矢印が誘導体 X の投与日を示す（週末を除いた連日投与）。平均±標準誤差、***は t 検定において P＜0.005 を示す。

中央図） 同モデルにおいて、X 投与 3 時間後に摘出した腫瘍ライセートのイムノブロット像を示す。

右図） 摘出した腫瘍の HE 染色像を示す。

考　察

上記のように、著者らは細胞膜透過性タンパク質に着目し、KRAS 阻害剤の開発に取り組んできた。これまでに開発した誘導体 X は細胞モデルでは数十 nM の濃度でも活性を示し、マウスモデルでも抗腫瘍効果が認められている。今後は誘導体 X を合成展開しさらに活性を高めるとともに、抗がん剤としての実用化を目指した translational research も実施する。

ここ数年の RAS 阻害剤の開発は目まぐるしく、優れた RAS 阻害剤の発表が相次いでいる。G12C 変異型に関しては分子標的薬が完成し、非 G12C 変異型に関しても、2022 年に KRAS-G12D 選択的阻害剤（MRTX1133）の構造が発表され、その他 ASP3082 や RMC6236 などの低分子 RAS 阻害剤が phase I/Ib で評価され始めている。よって RAS 阻害剤の開発に対するニーズは今後小さくなると予測される。しかし、薬剤耐性の問題や undruggable mutants （G12V 変異型など）の問題はまだ残っており、著者らが開発中の RAS 阻害剤がこれらの問題の解決に役立てれば幸甚である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜大学の赤尾幸博、平島一輝、杉戸信彦である。

文　献

1) Moore AR, Rosenberg SC, McCormick F, Malek S. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? Nat Rev Drug Discov. 2020 Aug;19(8):533-552. doi: 10.1038/s41573-020-0068-6. Epub 2020 Jun 11. Erratum in: Nat Rev Drug Discov. 2020 Dec;19(12):902. PMID: 32528145; PMCID: PMC7809886.

2) Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. Cancer Res. 2012 May 15;72(10):2457-67. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612. PMID: 22589270; PMCID: PMC3354961.

3) Honda R. Amyloid-β Peptide Induces Prion Protein Amyloid Formation: Evidence for Its Widespread Amyloidogenic Effect. Angew Chem Int Ed Engl. 2018 May 22;57(21):6086-6089. doi: 10.1002/anie.201800197. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29645399.

4) Honda R, Kuwata K. Evidence for a central role of PrP helix 2 in the nucleation of amyloid fibrils. FASEB J. 2018 Jul;32(7):3641-3652. doi: 10.1096/fj.201701183RR. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29401635.

5) Nomura TK, Heishima K, Sugito N, Sugawara R, Ueda H, Yukihiro A, Honda R. Specific inhibition of oncogenic RAS using cell-permeable RAS-binding domains. Cell Chem Biol. 2021 Nov 18;28(11):1581-1589.e6. doi: 10.1016/j.chembiol.2021.04.013. Epub 2021 May 7. PMID: 33964212.

6) Wiechmann S, Maisonneuve P, Grebbin BM, Hoffmeister M, Kaulich M, Clevers H, Rajalingam K, Kurinov I, Farin HF, Sicheri F, Ernst A. Conformation-specific inhibitors of activated Ras GTPases reveal limited Ras dependency of patient-derived cancer organoids. J Biol Chem. 2020 Apr 3;295(14):4526-4540. doi: 10.1074/jbc.RA119.011025. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32086379; PMCID: PMC7136003.