

癌特異的な細胞内小器官異常を 制御する低毒性低分子抗癌剤

福岡大学 医学部 医学科

准教授 角田 俊之

2021年5月20日

1. 背景 & 概要

KRASは癌の増生において鍵となる分子であるが、直接の阻害剤はない

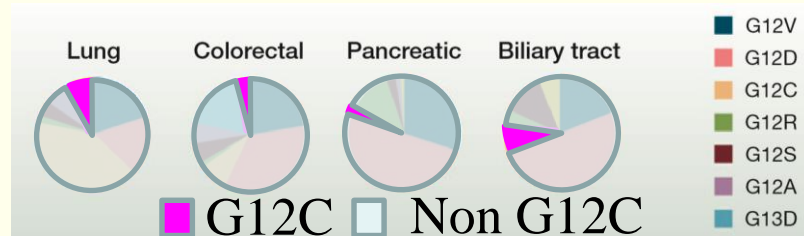
KRASとは? 癌において最も重要な癌遺伝子



	患者数(本邦)
膵臓癌-KRAS 95%	
大腸癌-KRAS 45%	9万人
肺癌-KRAS 35%	7万人
悪性黒色腫-KRAS 15%	

世界の現状

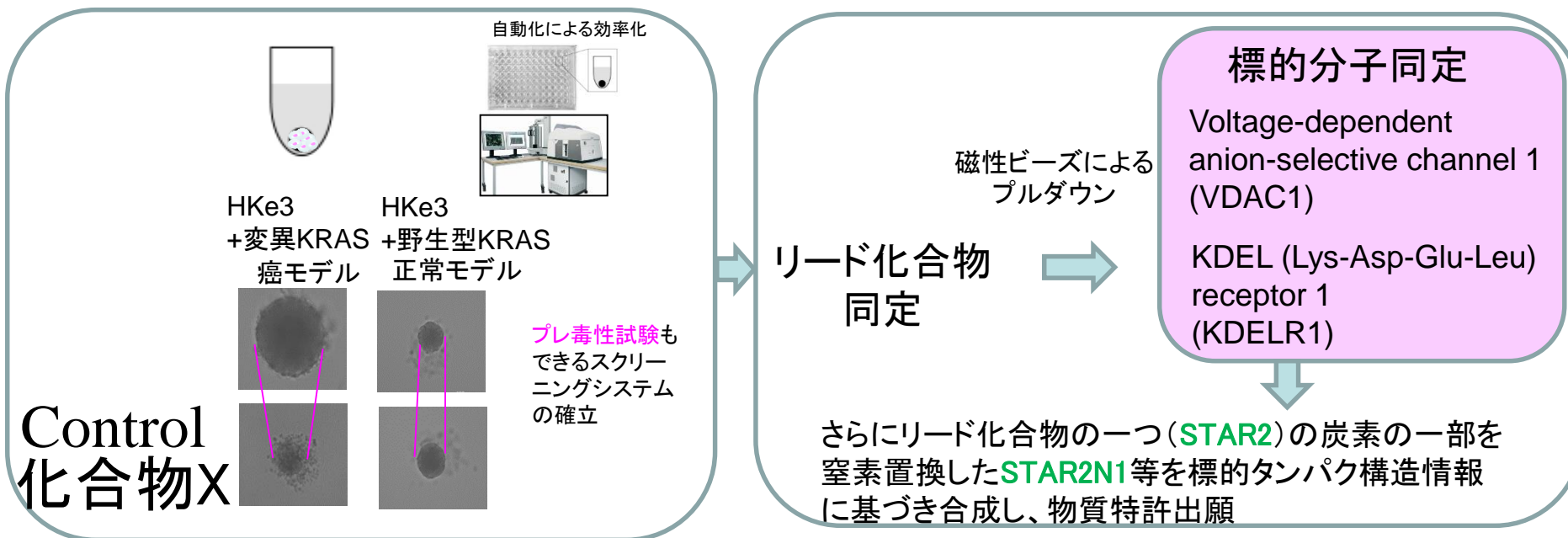
★変異KRAS(G12C)の阻害剤(AMG510)が登場し、治験にて良好な成績を収めているが、G12C変異は全KRAS変異の10%であり、変異KRASは依然としてundruggableである。



★肺癌ではイレッサ等の分子標的薬はKRASに変異がある患者には効果なく保険適用外。

★変異KRAS制御分子関連の癌はさらに多い

変異KRASを直接標的とすることは非共有結合性の化合物では難易度が高いと考え
変異KRASの下流の関連シグナルを幅広く抑える化合物を3次元浮遊培養システムにて施行



従来技術とその問題点

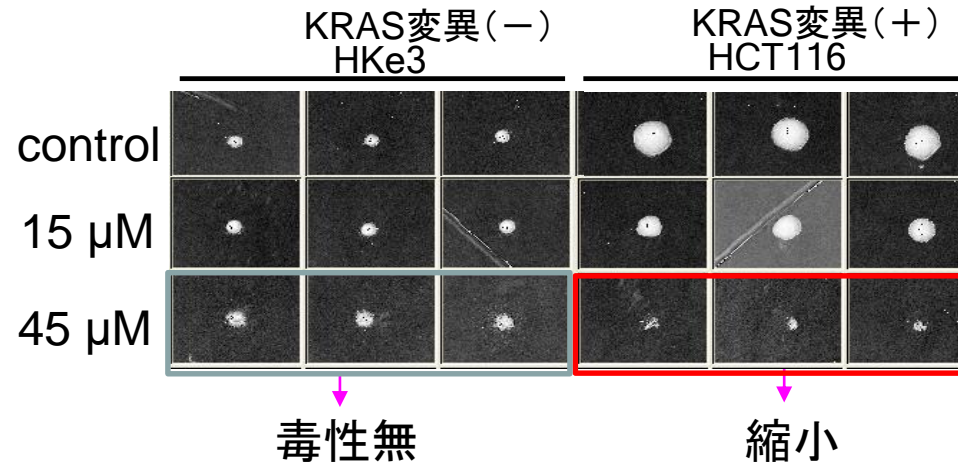
現在開発が進んでいる変異KRASを直接標的出来るAMG510はG12C変異にのみ効果を示す。G12CはKRAS変異の10%に過ぎない。

BRAF、MEK阻害剤などの効果は高いが一時的でありすぐに耐性化(再発)が出現する。最近ではAMG510の耐性化も問題になっている。

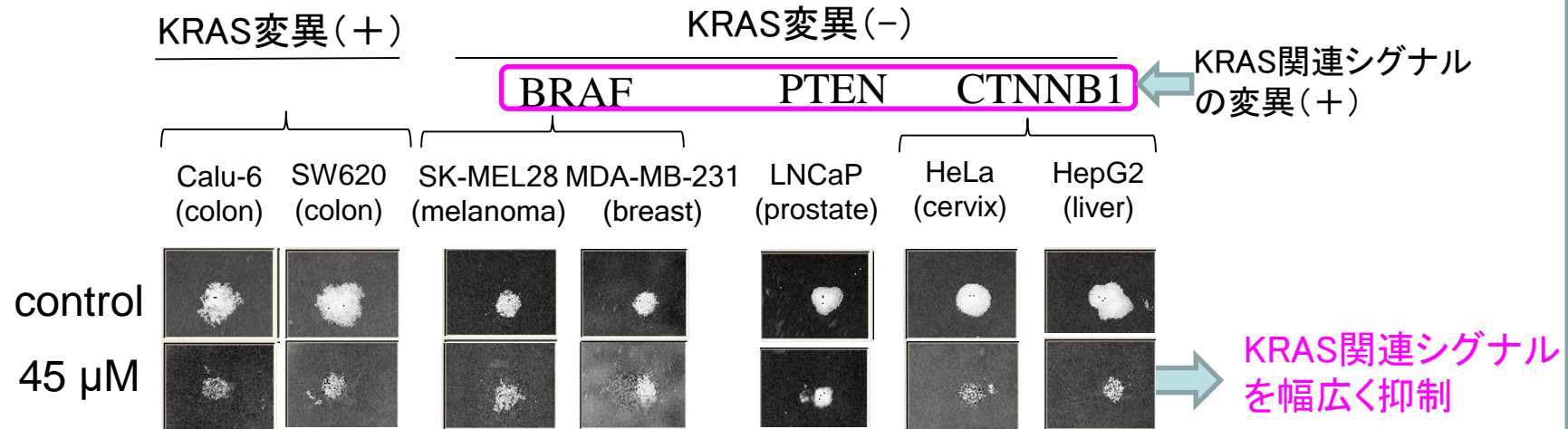
多くの抗癌剤は強い副作用を有する。

2. STAR2の効果について

方法: 3次元浮遊培養(3DFC); Day 0にSTAR2投与、Day6に断面積計測

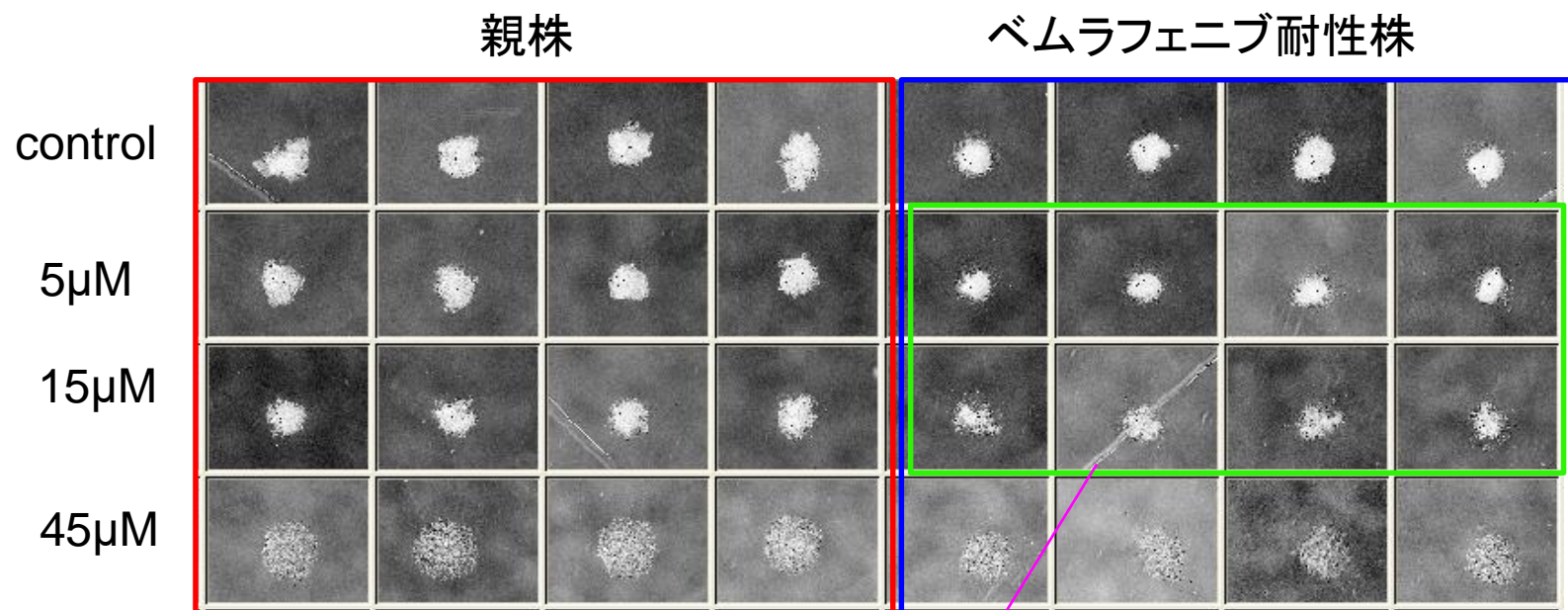


KRAS変異有り無しにかかわらず、
KRAS関連シグナルが活性化する癌細胞株の増殖を抑制する
方法: 3次元浮遊培養(3DFC); Day 0にSTAR2投与、Day6に断面積計測



方法: 患者由来のメラノーマ細胞親株(BRAFV600E変異有)と
ベムラフェニブ(BRFFV600E阻害剤)耐性細胞株を樹立し、
3次元浮遊培養(3DFC); Day 0にSTAR2投与、Day6に断面積計測。

Growth suppression by STAR2 on vemrafenib-resistant melanoma spheroids



結果: 薬剤耐性株により増殖抑制効果あり。

2. STAR2の効果について

Growth suppression by STAR2 on several types of cancer spheroids

Tissue	Cell line	Type of RAS mutation	other sequence variations (ExSPASy)	The effect of STAR2
colorectal	HCT 116	KRAS(G13D)	ACVR2A, BRCA2, CDKN2A, CTNNB, EP300, PIK3CA, TGFBR2	positive
colorectal	HKe3-mtKRAS	KRAS(G13D)		positive
colorectal	DLD-1	KRAS(G13D)	ACVR2A, APC, B2M, EP300, PIK3CA, TGFBR2, TP53	positive(high conc)
colorectal	SW 620	KRAS(G12V)	APC, TP53	positive
colorectal	SW 837	KRAS(G12C)	APC, FBXW7, TP53	positive(high conc)
colorectal	CCK-81	WT	FBXW, PIK3CA, TP53	positive
colorectal	HCT-15	KRAS(G13D)	APC, B2M, BRCA2, PIK3CA, TP53	positive(high conc)
colorectal	LoVo	KRAS(G13D)	ACVR2A, APC, B2M, SMAD, TGFBR2	Positive
colorectal	SW 48	WT	ACVR2A, APC, B2M, CTNNB, TGFBR2	Positive
colorectal	COLO 201	WT	APC, BRAF, CTNNB1	Positive
colorectal	COLO 205	WT	APC, BRAF, CTNNB, TP53	Positive
colorectal	LS 180	KRAS(G12D)	ACVR2A, CTNNB1, PIK3CA, TGFBR2	positive
colorectal	WiDr	WT	APC, BRAF, PIK3CA, SMAD4, TP53	positive
lung	A549	KRAS(G12S)	STK11	positive(high conc)
lung	Calu-6	KRAS(Q61K)	TP53	positive
lung	A-427	KRAS (G12D)	CTNNB1	positive
pancreas	MIA PaCa2	KRAS(G12C)	CDKN2A, TP53	positive(high conc)
pancreas	Hs 766T	KRAS(Q61H)	SMAD4	positive(high conc)
pancreas (meta)	Hs 700T	WT	TP53	positive
melanoma	SK-MEL-28	WT	BRAF, CDK4, EGFR, PTEN, TERT, TP53	positive
stomach meta	Hs 746T	WT		positive
liver	Hep G2	NRAS(Q61L)	TERT	positive
kidney	A-498	WT	VHL	positive
bladder	J82	WT	PIK3CA, PTEN, RB, TP53	positive(high conc)
prostate	LNCaP	WT	AR, MEN1, PIK3R, PTEN	positive
prostate	DU145	WT	CDKN2A, RB, STK1, TP53	positive(high conc)
breast	MCF-7	WT	CDKN2A, PIK3CA	positive(high conc)
breast	BT549	WT	CLTC-VMP, PTEN, RB, TP53	positive(high conc)
breast	MDA-MB-468	WT	PTEN, RB, TP53	positive
breast	MDA-MB-231	KRAS(G13D)	BRAF, CDKN2A, TERT, TP53	positive(high conc)
breast	Hs 578T	KRAS(G13D)	BRAF, CDKN2A, TERT, TP53	positive(high conc)
breast	BT-20	WT	CDKN2A, PIK3CA, RB, TP53	positive
breast	HCC1937	WT	BRCA, PTEN, RB, TP53	positive
cervix	HeLa	WT		positive
cervix	C-33A	WT		positive
cervix	SiHa	WT		positive
endometrium	HEC-1-B	KRAS(G12D)	TP53	positive(high conc)
endometrium	AN3 CA	KRAS(G12D)	MAPK3, PIK3R, PTEN, TP53	positive
ovarian	Caov-3	WT	TP53	positive(high conc)

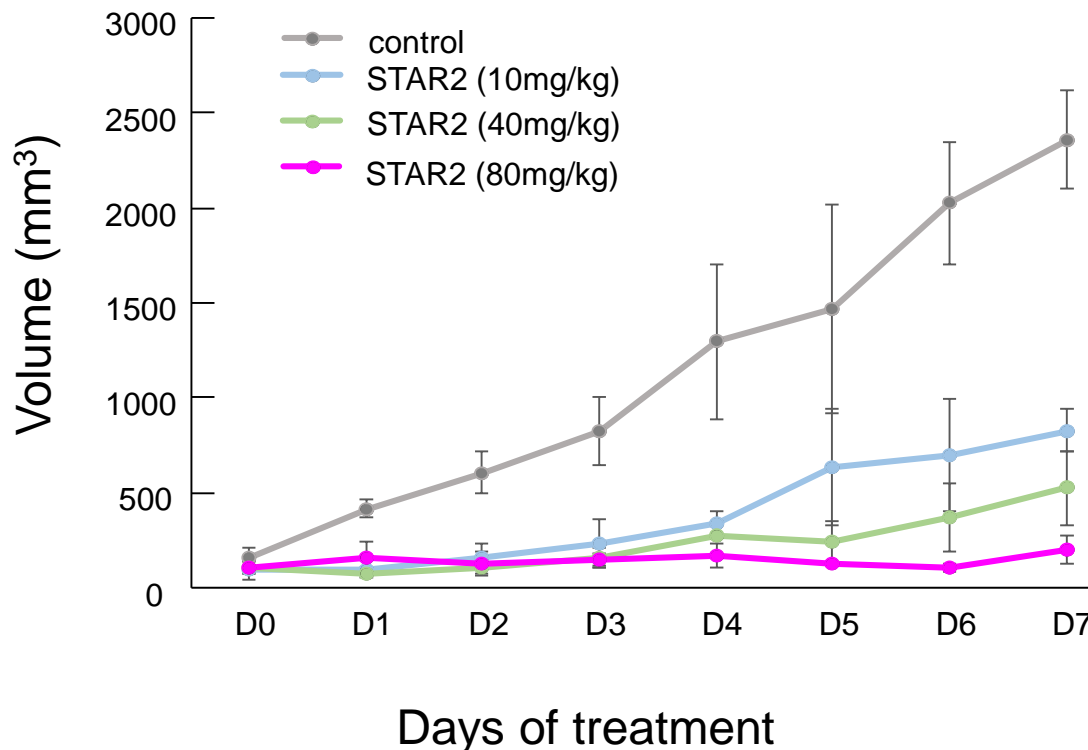
これまで試した癌細胞株の全てに効果を示す。

2. STAR2の効果について

In vivoでの有効性および毒性

マウスにおいても副作用なく抗腫瘍効果示す

方法:ヌードマウス皮下にマトリゲルに懸濁した 1.5×10^6 細胞播種し、腫瘍長径が5mmを超えた時点から、STAR2を腹腔内へ一日一回投与



結果

・GI50 (50%増殖阻害濃度) = 7.7 mg/kg

・80 mg/kgでも毒性無

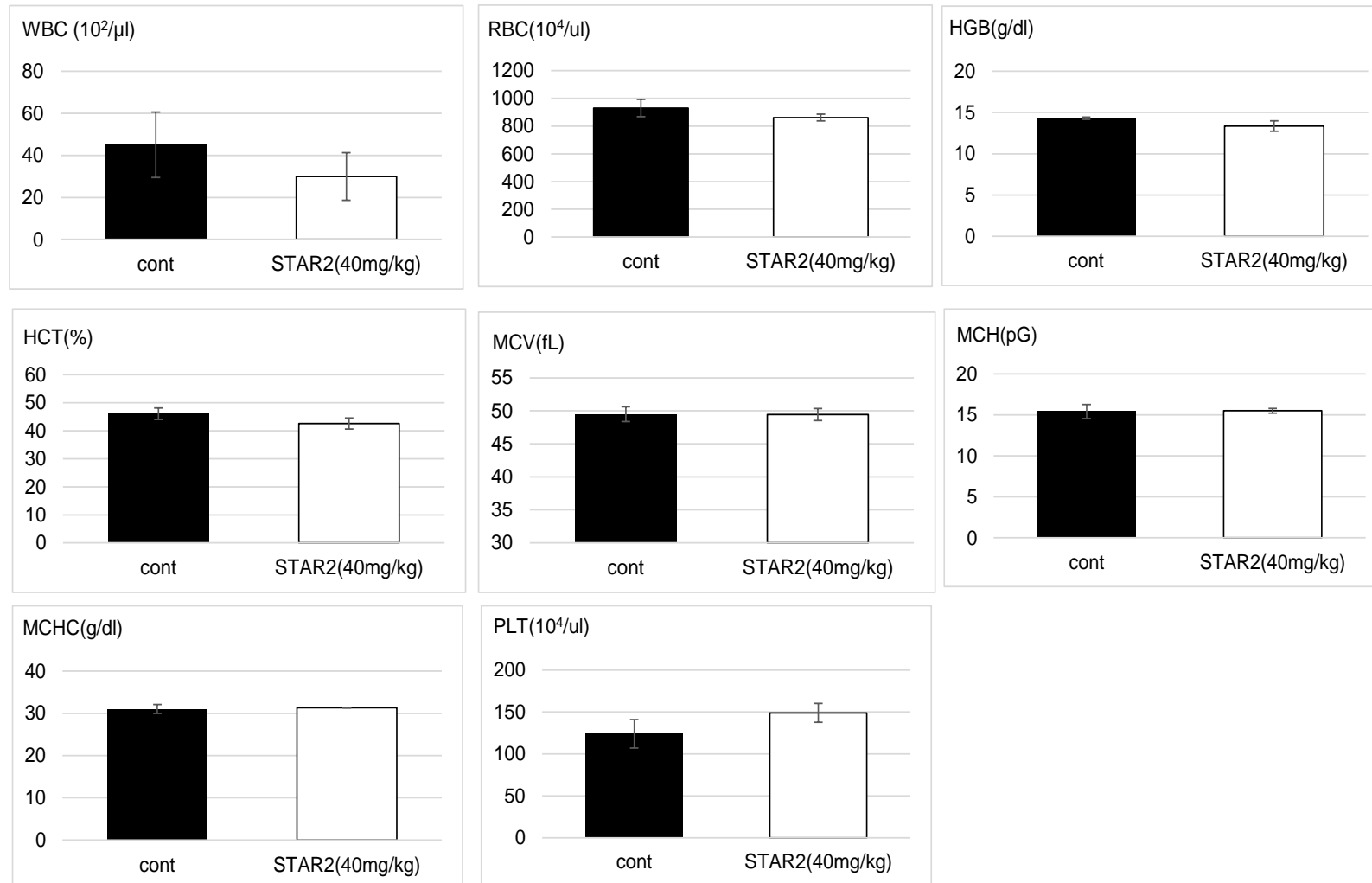
・4週間投与でも毒性無

* Gefitinib(イレッサ)のGI50 = 12.5 mg/kg (> 7.7 mg/kg)
(Cancer Research, 62, 5749-54, 2002)

AMG 510は100mg/kg投与により腫瘍が一旦縮減するが再増殖する。

方法:ヌードマウス皮下にマトリゲルに懸濁した 1.5×10^6 細胞を播種し、腫瘍長径が5mmを超えた時点から、STAR2を腹腔内へ一日一回投与。Day8に採血

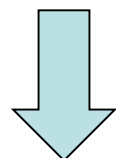
血液学的検査 (Day8)



STAR2標的タンパク質の同定

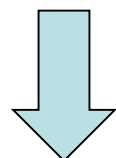


磁性ナノビーズ



HCT116細胞溶解液を用いてプルダウン

銀染色

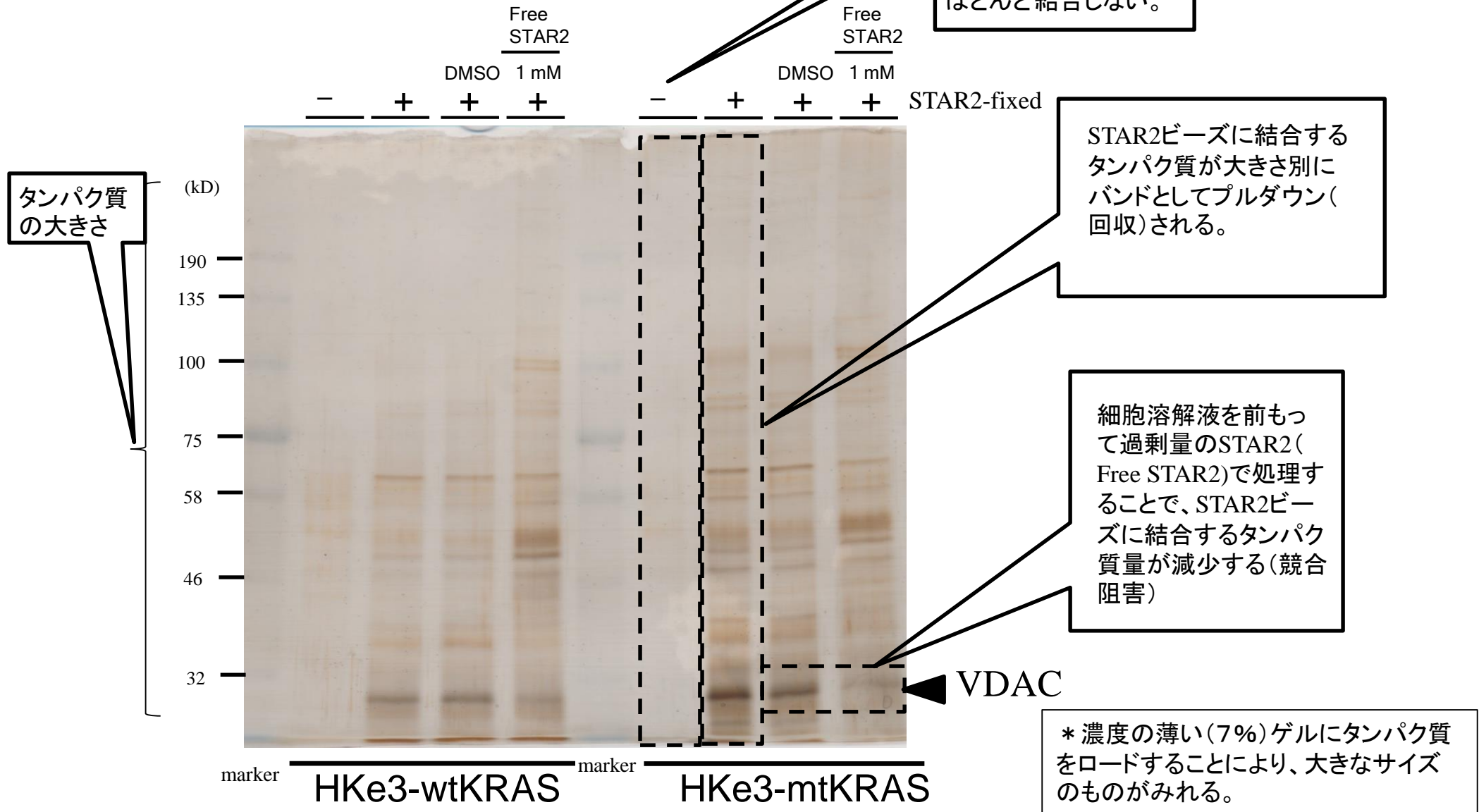


MS解析

競合阻害されるバンドが2本

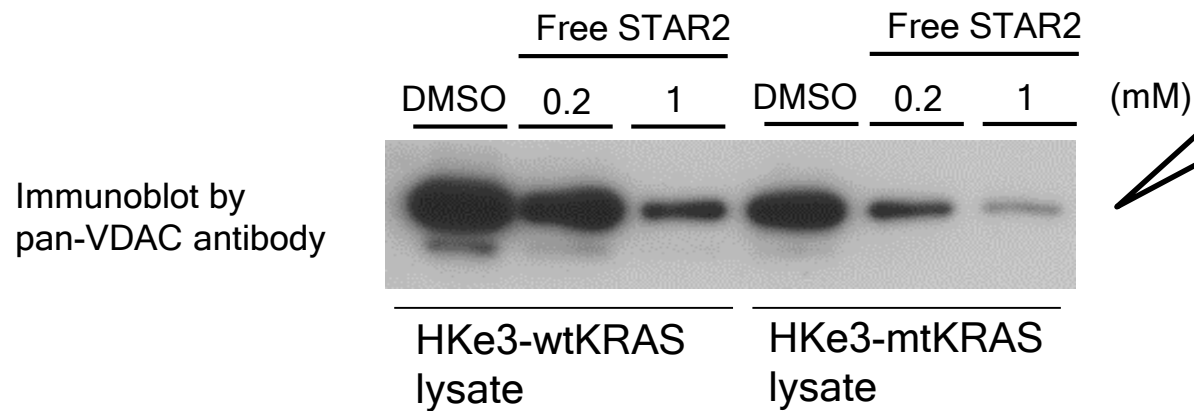
3. STAR2が結合する分子の同定

30kD以上の以下のSTAR2ビーズに結合するタンパク質の銀染色におけるSTAR2によって競合阻害を受けるタンパク質の探索



Competition binding assay. Free STAR2 (1mM) were added to HKe3-wtKRAS cell extracts or HKe3-mtKRAS cell extracts. After 1 hr, the extracts were incubated with STAR2-fixed (+) or empty (-) beads. STAR2-binding proteins were purified and detected by silver staining. Mass spectrometry analysis identified VDAC1 and VDAC 2 as an STAR2-binding protein.

STAR2はVDACに直接結合する

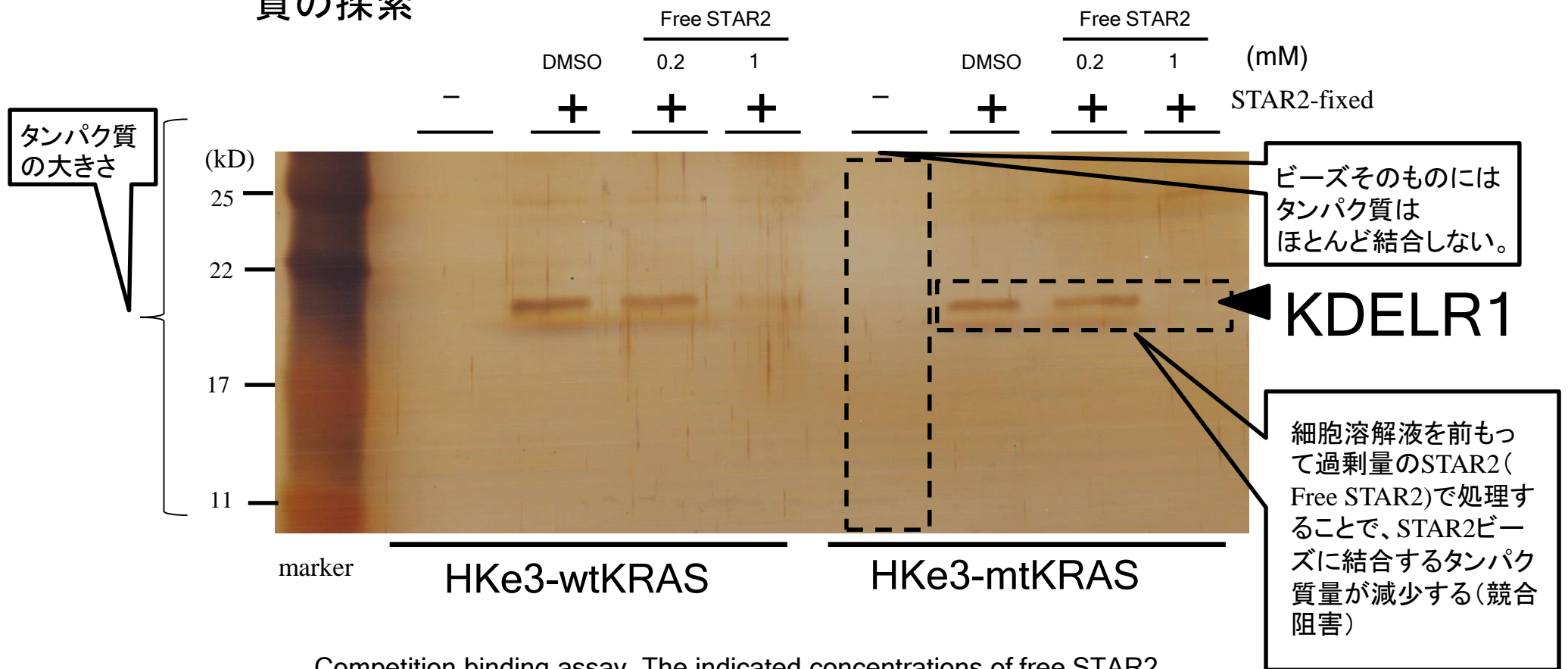


銀染色で減少していたバンドをVDAC特異的な抗体を用いたウェスタンブロットで確認した

Competition binding assay. The indicated concentrations of free STAR2 were added to HKe3-wtKRAS cell extracts or HKe3-mtKRAS cell extracts. After 1 hr, the extracts were incubated with STAR2-fixed beads. STAR2-binding proteins were purified and detected by immunoblotting with an anti-pan VDAC antibody.

3. STAR2が結合する分子の同定

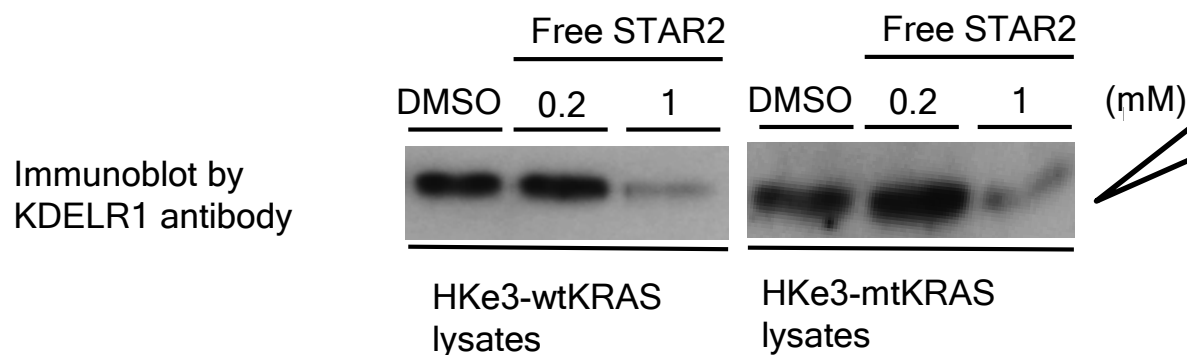
30kD以下のSTAR2ビーズに結合するタンパク質の銀染色における、STAR2によって競合阻害を受けるタンパク質の探索



Competition binding assay. The indicated concentrations of free STAR2 were added to HKe3-wtKRAS cell extracts or HKe3-mtKRAS cell extracts. After 1 hr, the extracts were incubated with STAR2-fixed (+) or empty (-) beads. STAR2-binding proteins were purified and detected by silver staining. Mass spectrometry analysis identified KDELR1 as an STAR2-binding protein.

* 濃度の濃い(15%)ゲルにタンパク質をロードすることにより、小さなサイズのものが見られる。

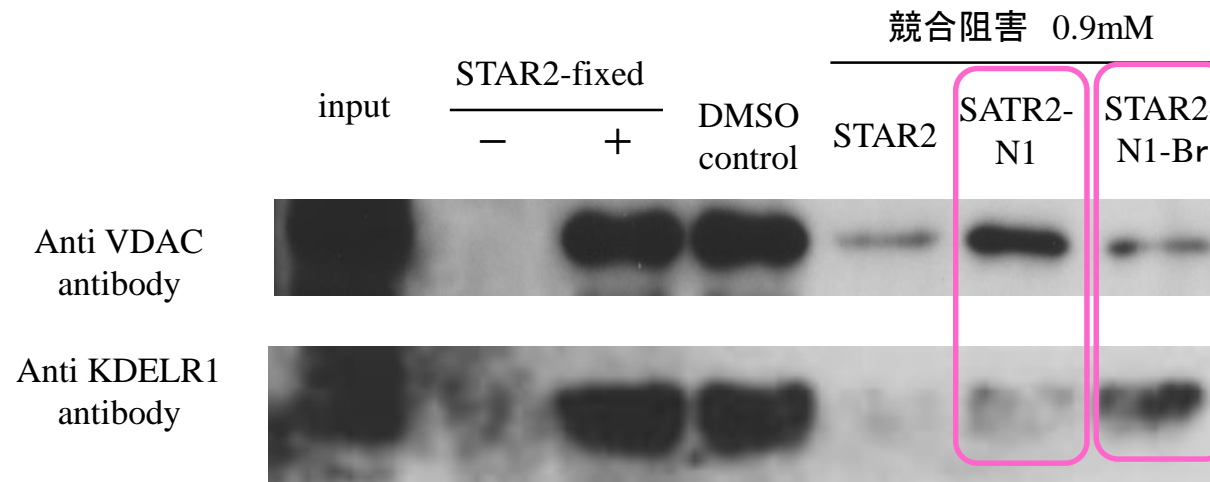
STAR2はKDELRL1に直接結合する



銀染色で減少していたバンドをKDELRL1特異的な抗体を用いたウェスタンブロットで確認した。

Competition binding assay. The indicated concentrations of free STAR2 were added to HKe3-wtKRAS cell extracts or HKe3-mtKRAS cell extracts. After 1 hr, the extracts were incubated with STAR2-fixed beads. STAR2-binding proteins were purified and detected by immunoblotting with an anti-KDELRL1 antibody.

STAR2-N派生物とVDACまたはKDELRL1との結合確認



STAR2-N1はVDACとKDELRL1に結合する

表1 Mass spectrometry (MS)解析の結果

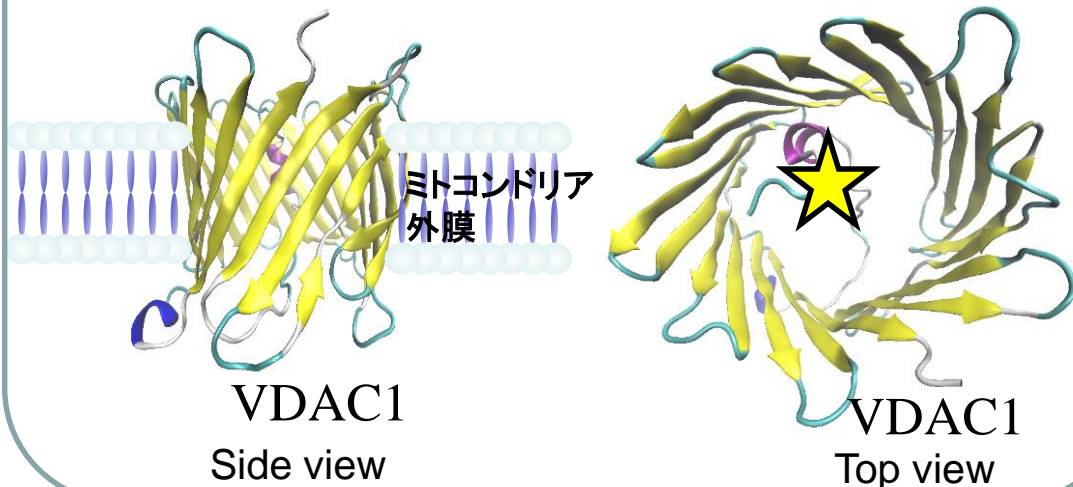
Results

Sample Name	Protein	gene	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession	Note*
20kDa	1 ER lumen protein-retaining receptor 1	KDELRL1 ERD2.1	24,542	88	1	8	P24390	NP_006792.1
30kDa	1 Voltage-dependent anion-selective channel-protein 1	VDAC1 VDAC	30,773	370	13	59	P21796	NP_003365.1
	2 Voltage-dependent anion-selective channel-protein 2	VDAC2	31,567	99	5	19	P45880	NP_003366.2

Note* : Accession in Mascot Search Results

STAR2(★)の結合部位

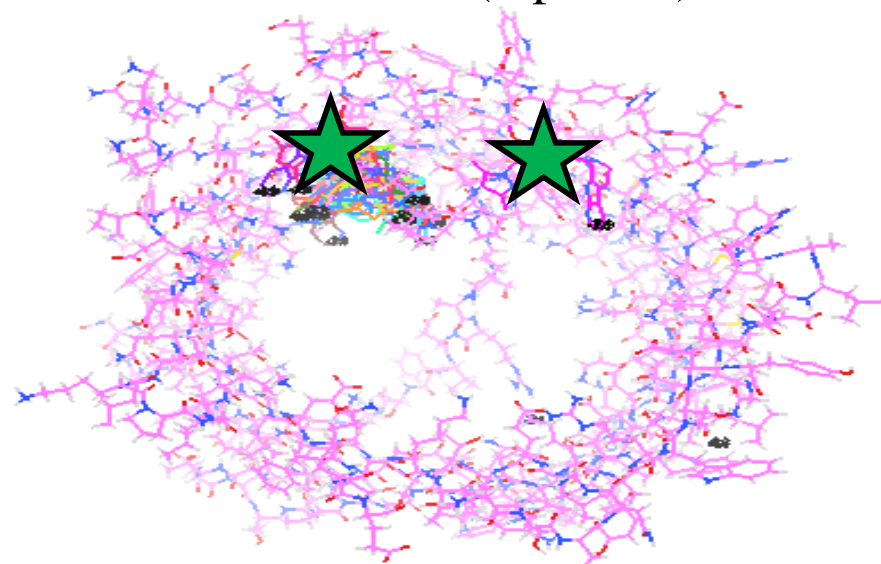
フラグメント分子軌道(FMO)法によりSTAR2とVDAC1の結合位置を探索し、N末端αヘリックスへの結合が判明



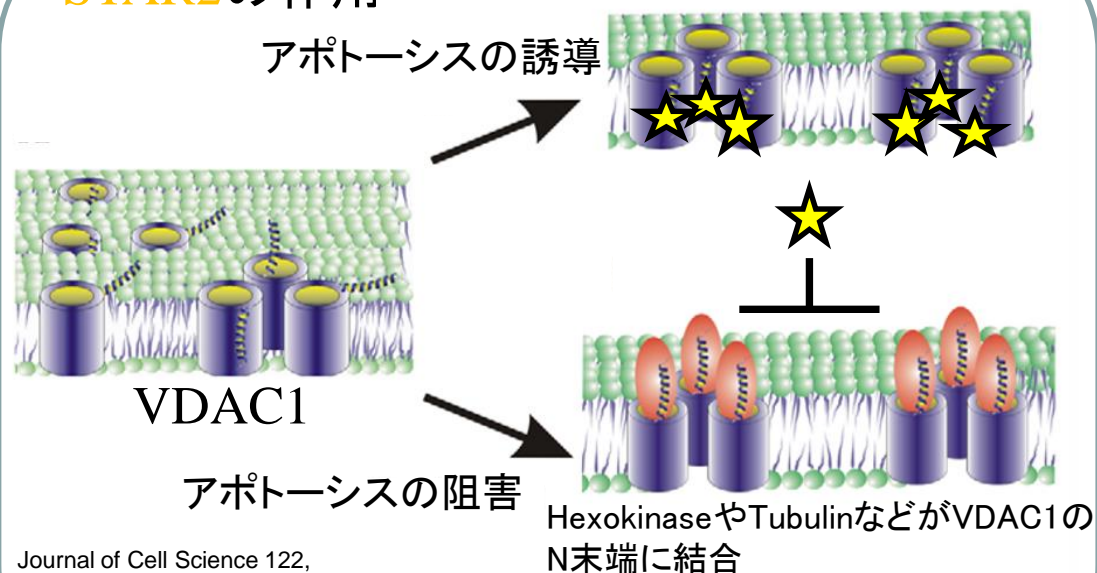
機能ドメインへのアフィニティの改変

STAR2の基本構造が有する4つの炭素を窒素に置換し、STAR2N1~4(炭素-窒素置換体)(★)を作製

VDAC1(top view)



STAR2の作用



Journal of Cell Science 122,
1906-1916,2009

STAR2はアポトーシスを誘導する

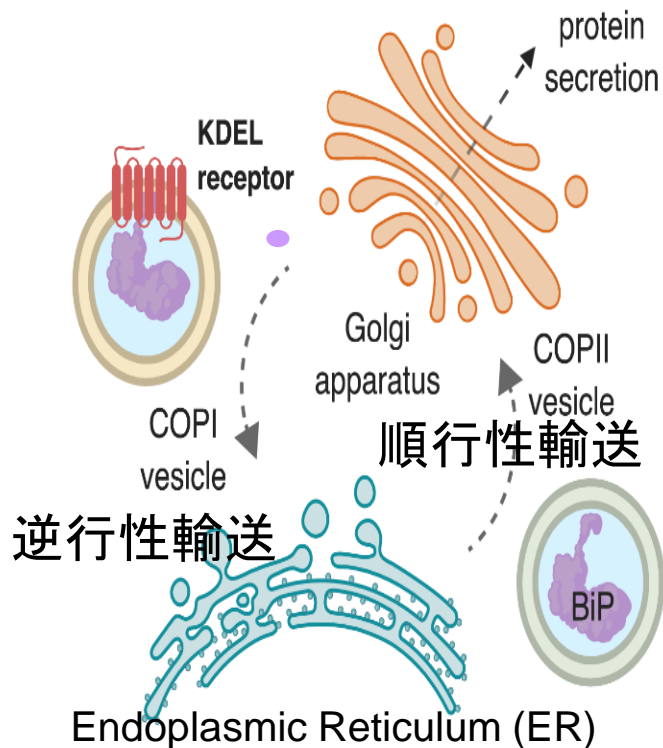
FMO法によるタンパク質-リガンド複合体の結合エネルギーの計算により、最も結合親和力の高いものを選択

官能基置換によりさらなる親和性の向上を試行中

5. KDELR1について

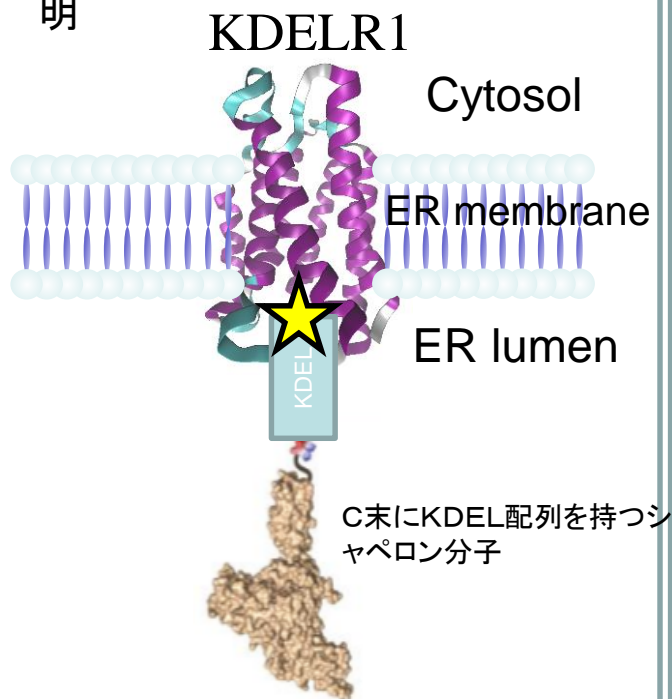
KDELR1に対する予想される作用

KDELR1について



- KDELR1は逆行性輸送に関与し、タンパク質の品質管理に関与する
- KDELR1の阻害はERストレスの誘導とMAP kinase シグナルの阻害をもたらす (JBC, 278, 34525-32, 2003)
 - ERストレスはHIF-1の活性化をもたらす (JBC, 289, 3352-64, 2014)

FMO法により、STAR2(★)とKDELR1の結合部位探索し、KDEL配列認識部位に結合することが判明

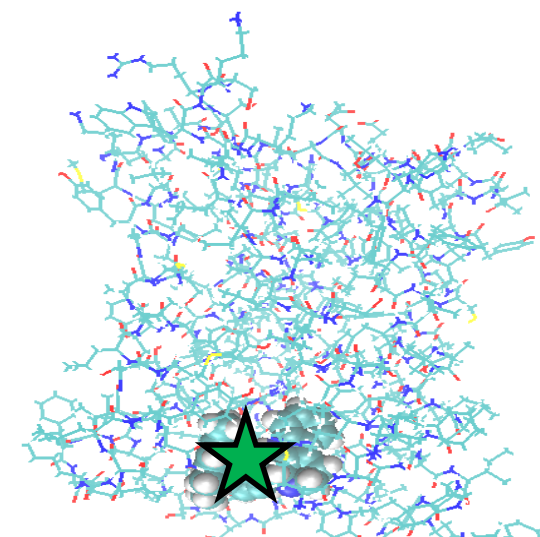


KDELR1の下流のMAPK-HIF axisを抑制する可能性

機能ドメインへのアフィニティの改変

STAR2N1~4のうちSTAR2N1はKDELR1に対しても高い結合親和力を有していた

KDELR1(side view)



STAR2N1 (★)

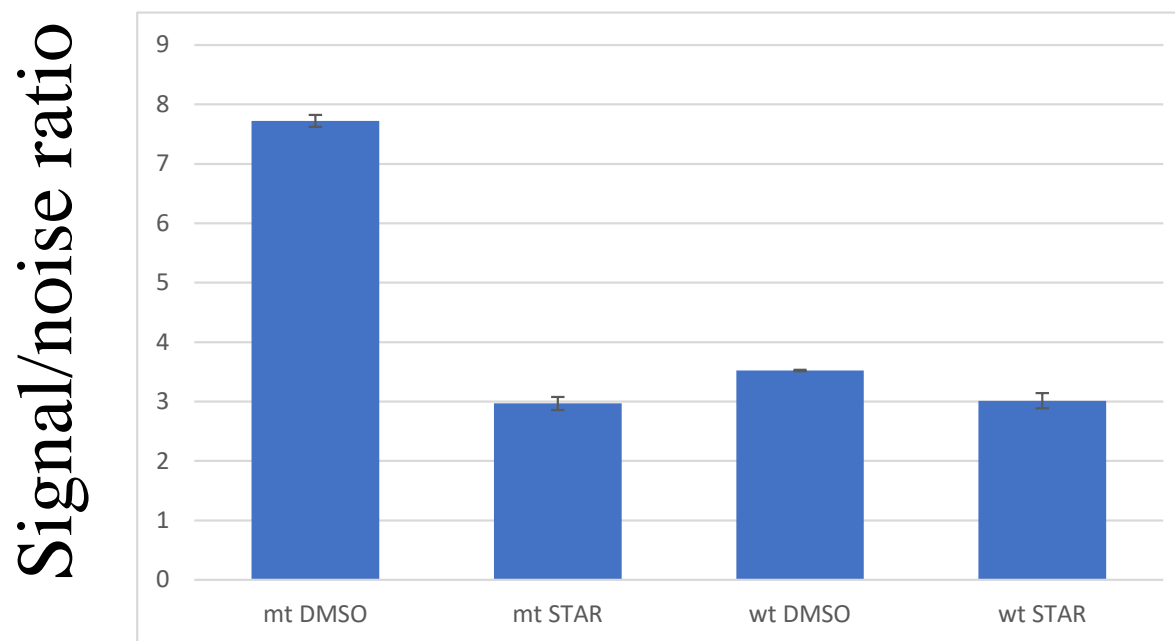
官能基置換によりさらなる親和性の向上を試行中

6. STAR2の作用機序

STAR2は浮遊培養にてROSを抑制する。

HKe3-wtKRAS or HKe3-mtKRAS in 3DF
culture at Day6 with STAR2 (30 μ M)

ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA-使用



STAR2は癌で高いレベルのROSを抑制する。

関連論文

frontiers
in Oncology

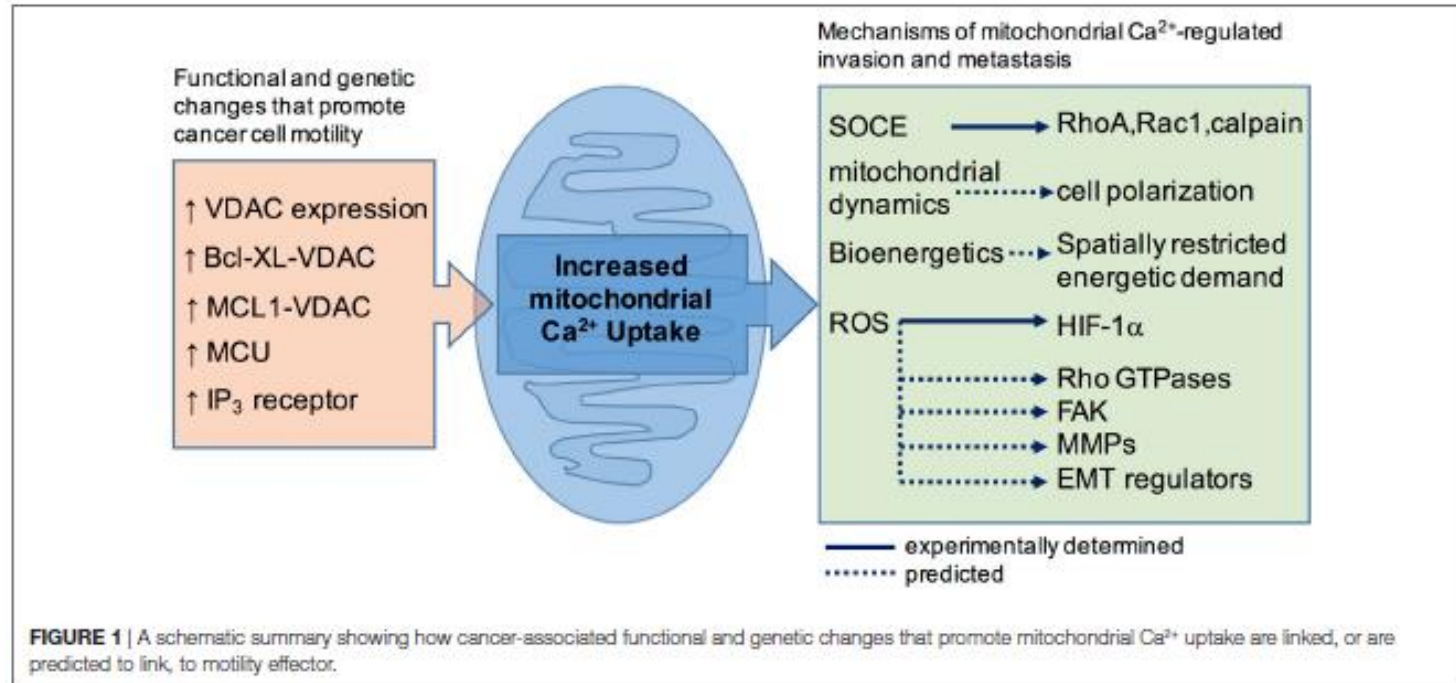
MINI REVIEW
published: 10 August 2017
doi: 10.3389/fonc.2017.00171



The Regulation of Tumor Cell Invasion and Metastasis by Endoplasmic Reticulum-to-Mitochondrial Ca²⁺ Transfer

Carl White*

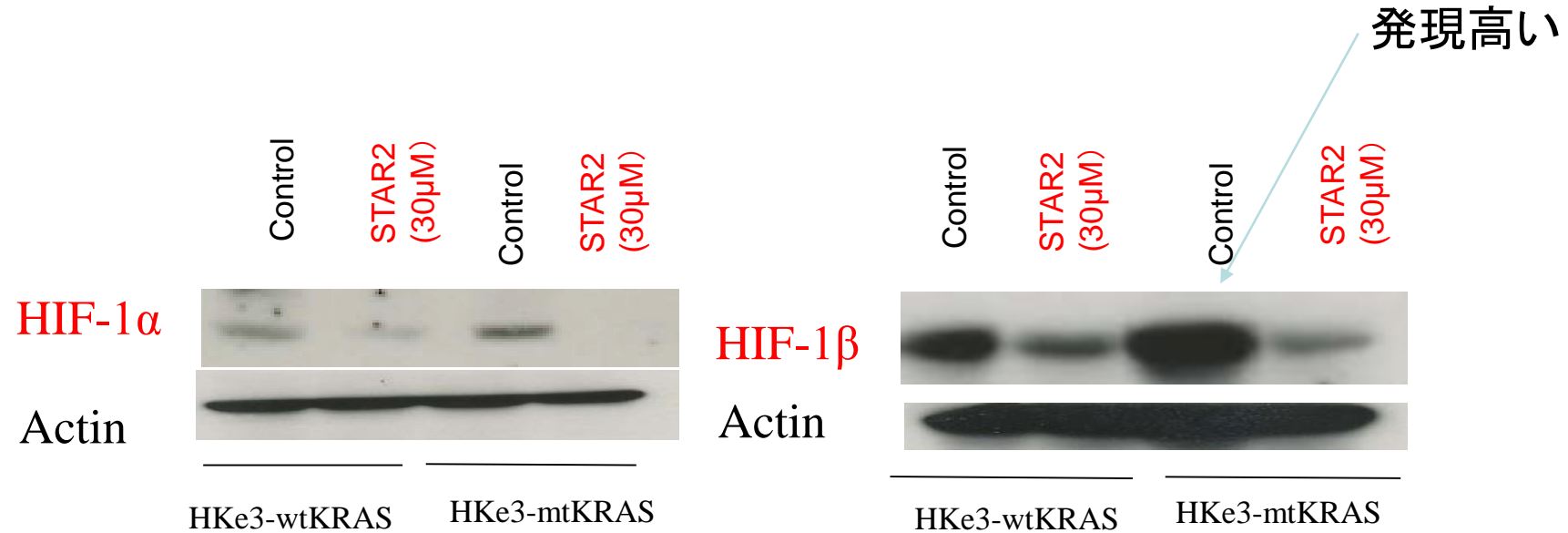
Physiology and Biophysics, Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, IL, United States



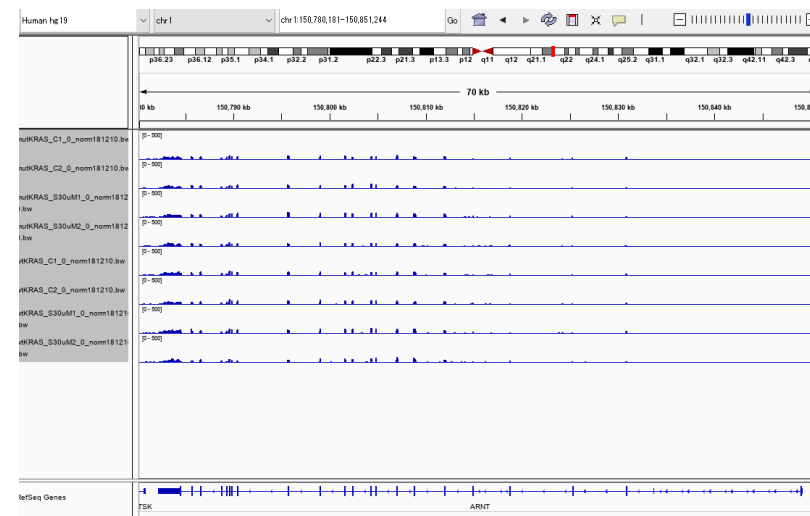
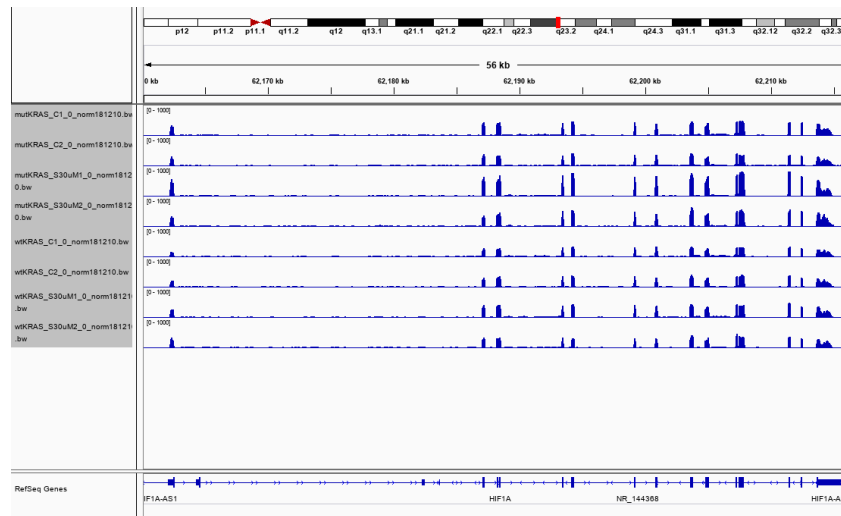
6. STAR2の作用機序

HIF-1に対するSTAR2の効果

方法:3次元浮遊培養(3DFC);Day 0にSTAR2投与、Day6に蛋白回収し、ウェスタンブロット。



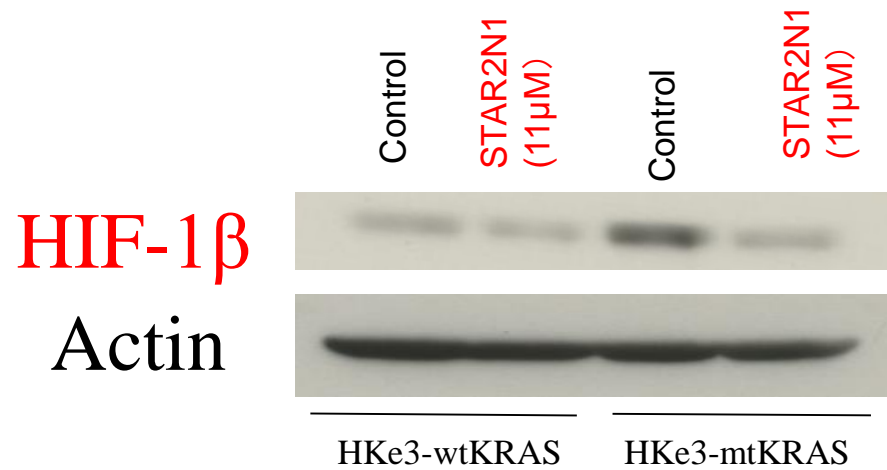
RNA-seqのdata上ではどちらもmRNAの大きな変化は認められない。



6. STAR2の作用機序

HIF-1 β に対するSTAR2N1の効果

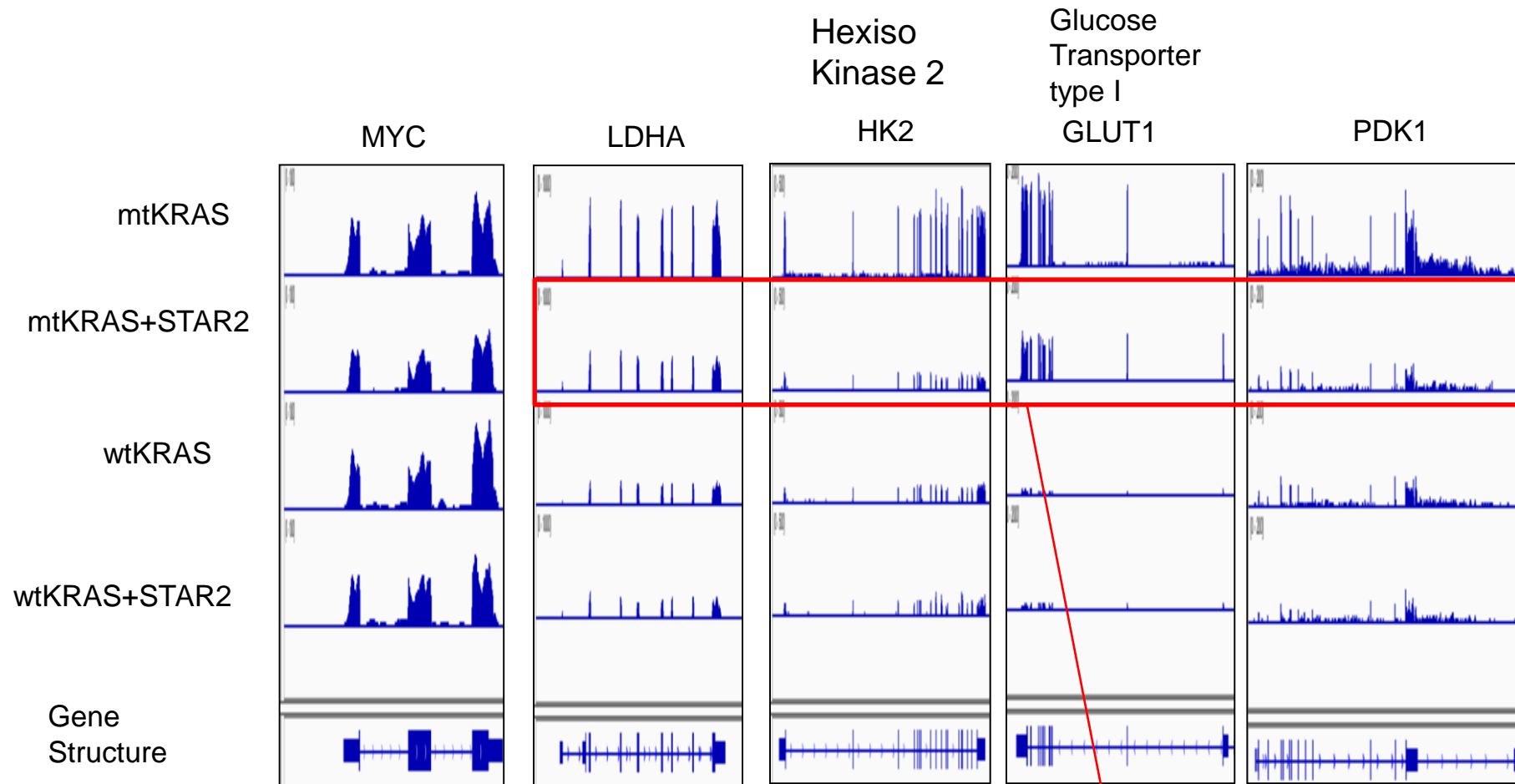
方法:3次元浮遊培養(3DFC); Day 0にSTAR2N1(11 μ M:25% 阻害濃度)投与、Day6に蛋白回収し、ウェスタンブロット。



6. STAR2の作用機序

STAR2投与により発現低下するHIF-1標的遺伝子(嫌気性解糖関連分子)

3次元浮遊培養 D6のRNA回収しRNA-seq施行。mRNAの発現をIGVにて表示。
Y軸が発現量を示す。それぞれのピークはエクソンを示す。

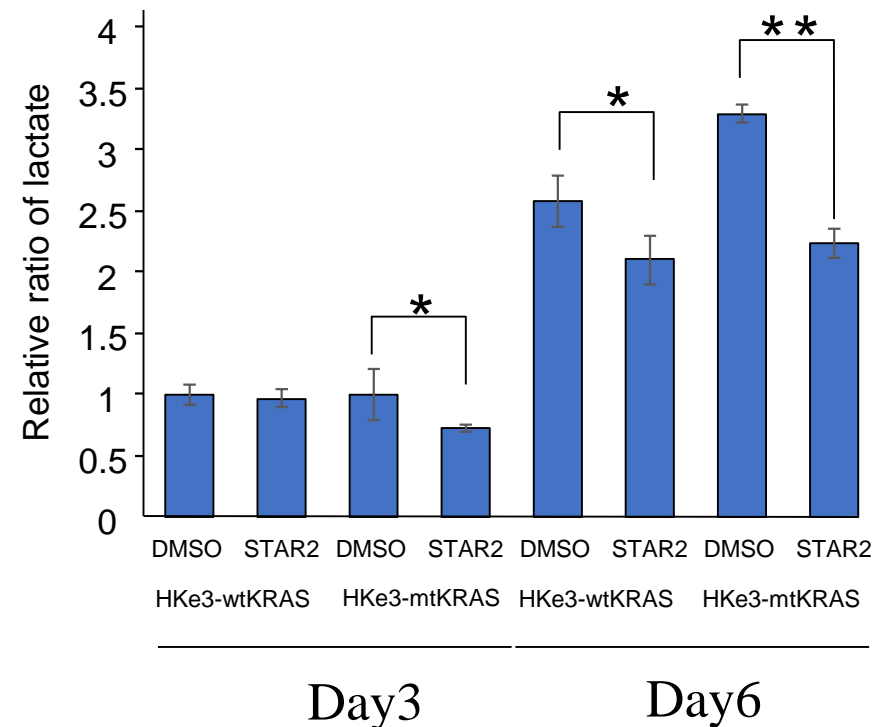
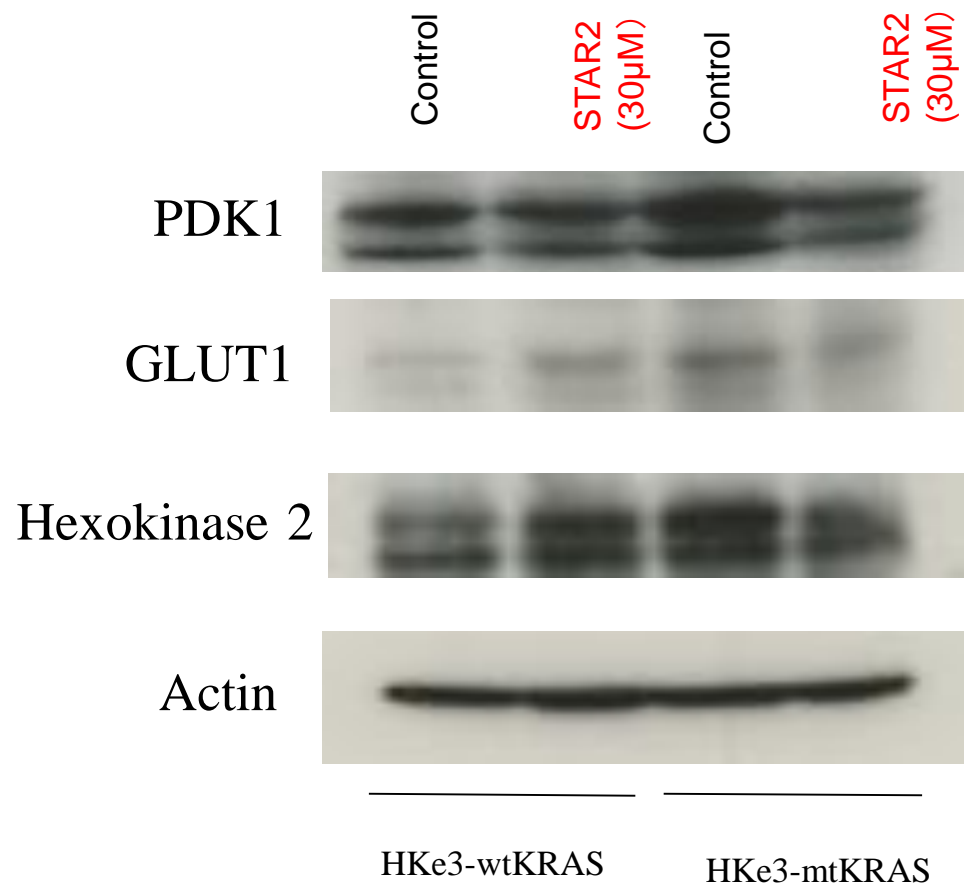


STAR2投与により発現低下
(HKe3-mtKRASでのみ。HIF-1の標的)

STAR2投与により発現低下するHIF-1標的遺伝子(嫌気性解糖関連分子)

方法:3次元浮遊培養(3DFC);Day 0にSTAR2投与、Day6に蛋白回収し、ウェスタンブロット。

3次元浮遊培養においてSTAR2(7.5 μ M)投与し、培養上清中の乳酸をDay3およびDay6に計測した。

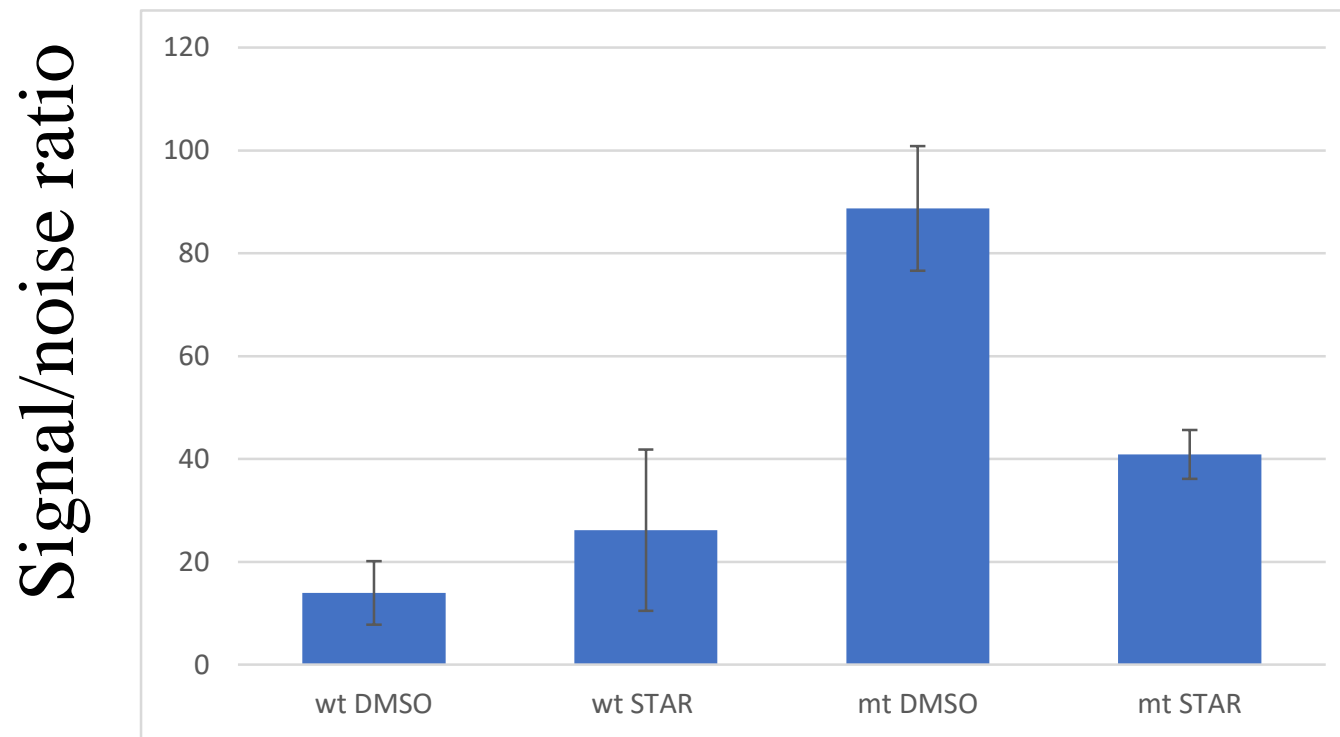


* :P<0.05 ** :P<0.01

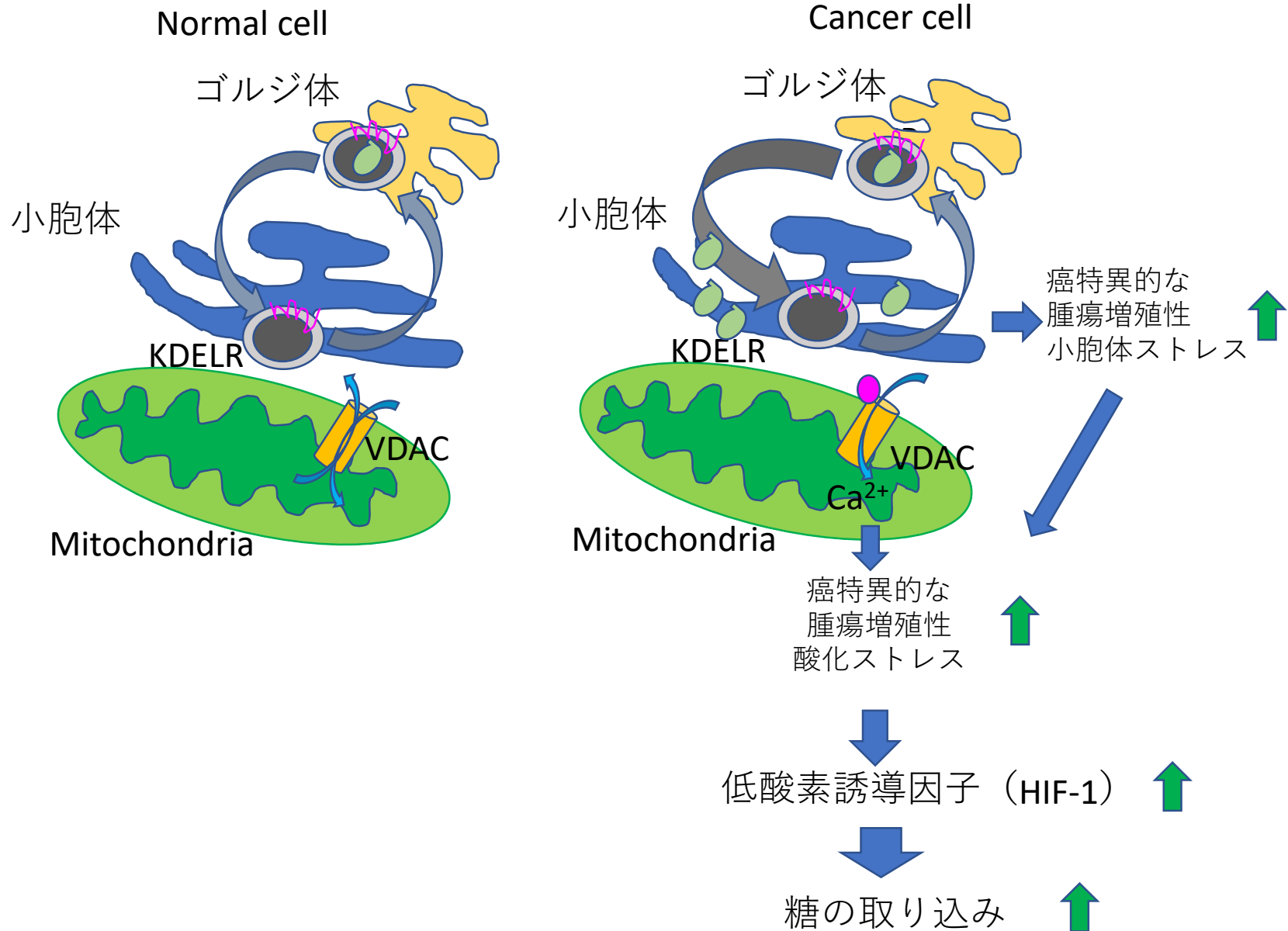
6. STAR2の作用機序

HKe3-wtKRAS or HKe3-mtKRAS in 3DF culture at Day6 with STAR2 (30 μ M)

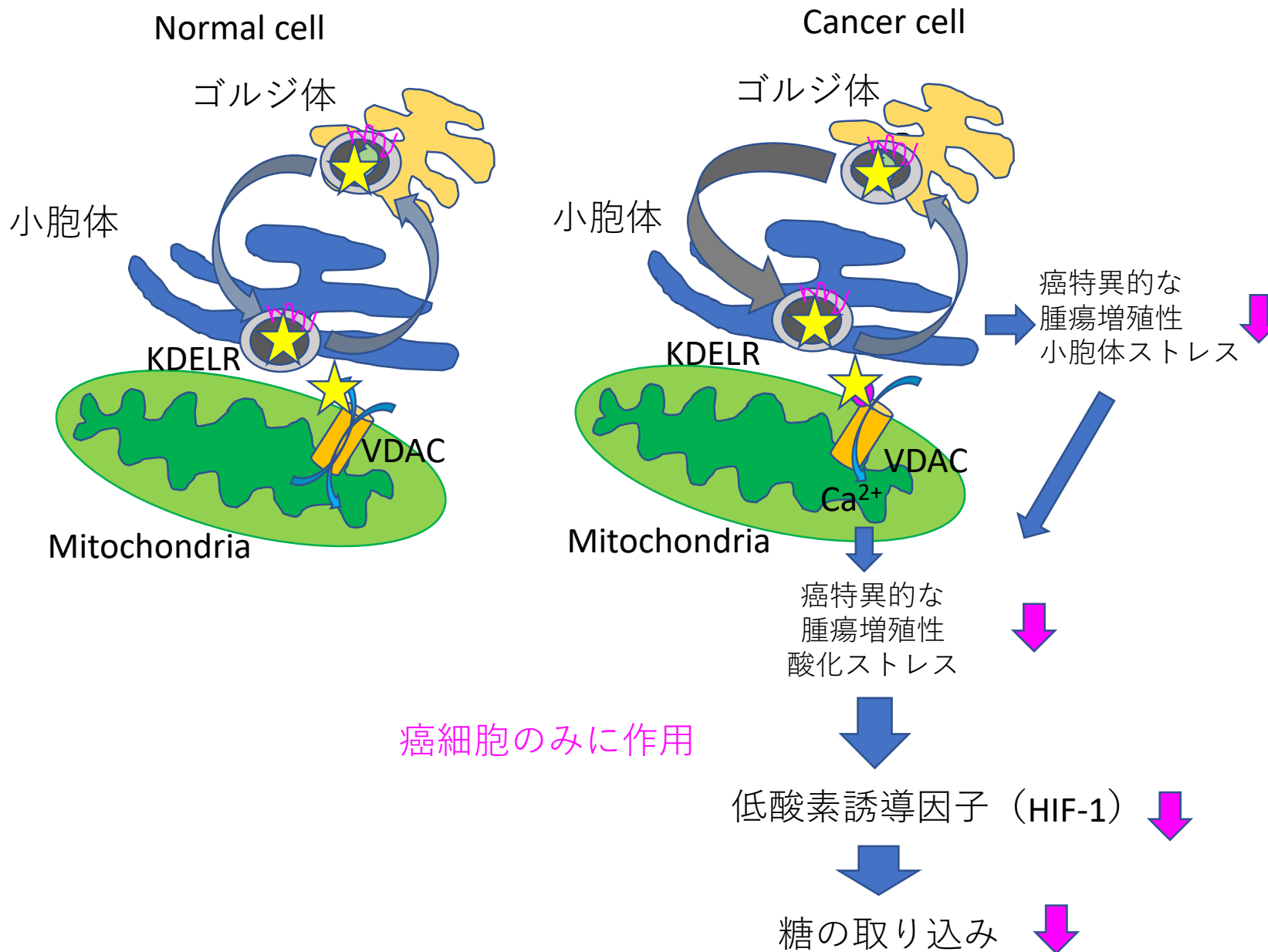
Glucose Uptake Assay Kit -Green使用

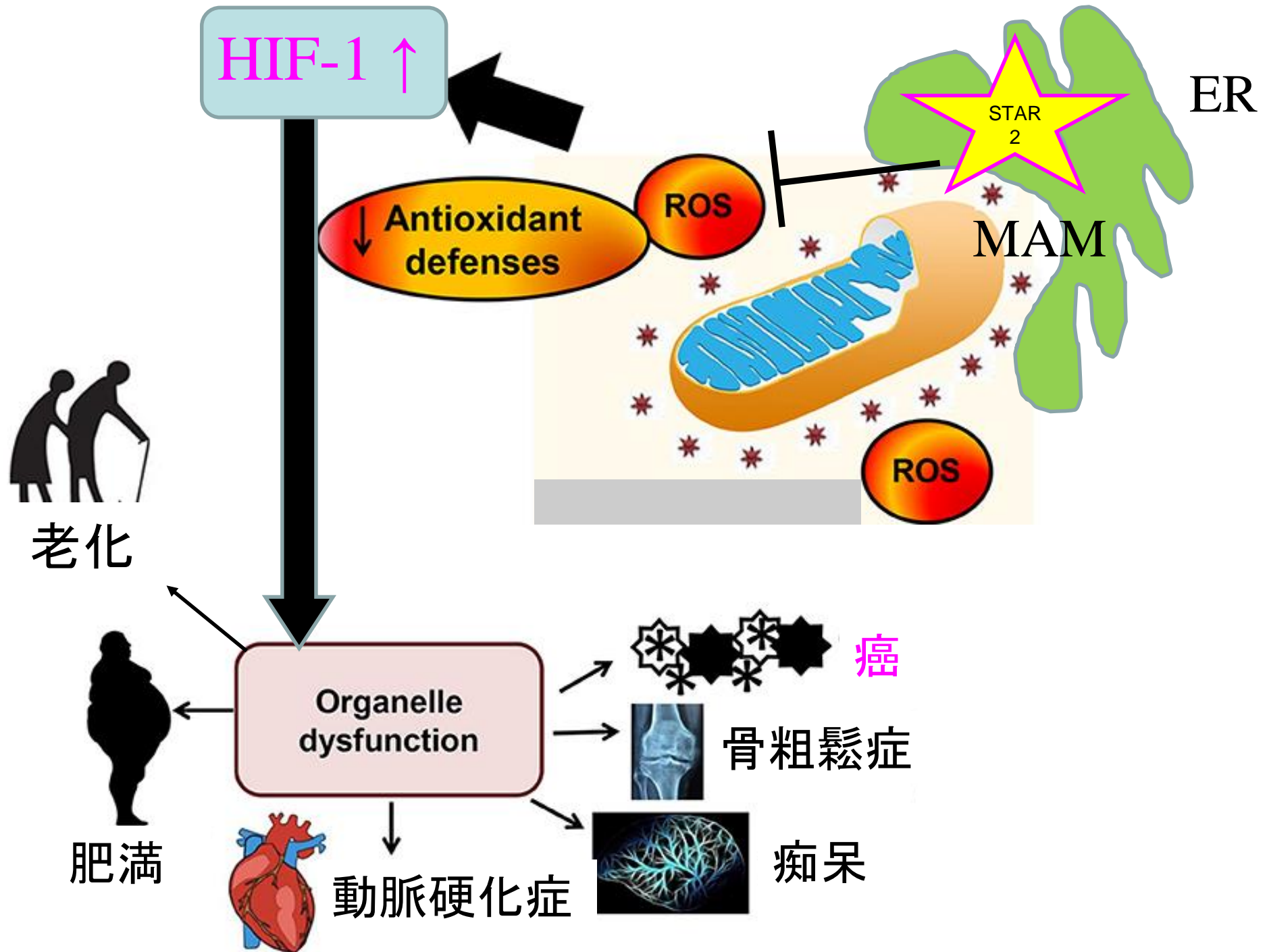


正常と癌細胞の違い



STAR2の作用点





新技術の特徴・従来技術との比較

- 多くの変異KRAS陽性癌に効果あり、耐性化が出現しにくい。
- 従来の抗癌剤が活性酸素種を誘導することで殺細胞効果を示すので、正常細胞も影響が出るが、STAR2は癌の増殖を刺激する活性酸素種を抑制するため、副作用が少ない。
- 癌特異的な糖代謝を抑制するので、変異に関係なく多くの癌種に適応可能。
- 癌以外にも、活性酸素種に関連する老化や肥満などに効果を示す可能性がある。

想定される用途

- 全ての癌種に対して効果を示し、副作用が少ないので、濃度を高めて短期間で使用したり、低濃度で長期間の予防的な使用も可能。
- 上記以外に、抗加齢、抗肥満等、血管性疾患予防の効果が得られることも期待される。

実用化に向けた課題

- 現在、化合物の鏡像異性体を精製し、より作用点への作用が高まるところまで確認済み。さらなる効果増強のための官能基改変、今後の臨床応用へ向けた体内動態などの検査がまだなされていない。

企業への期待

- 製剤開発、臨床治験移行までの開発能力が高い製薬企業との共同研究を希望。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ピラゾール誘導体及び医薬組成物
- 出願番号 : 特願2020-017307
- 出願人 : 学校法人福岡大学 [100%]
- 発明者 : 白澤専二*、角田俊之**
福岡大学 医学部 医学科 細胞生物学
: 大嶋孝志*、矢崎亮****
九州大学 薬学部 環境調和創薬化学分野
: 末永正彦***
九州大学 理学部 化学科
*: 教授、**: 准教授、*** : 講師、**** : 助教

産学連携の経歴

- 2020年 - 国内薬品会社と新規PDE4阻害剤共同研究開始、今後STAR2に関する自然免疫への影響を中心に解析(秘密保持契約締結済)
- 2020年- JSTの特許協力条約(PCT)に基づく出願支援事業に採択

お問い合わせ先

福岡大学 産学官連携センター

TEL 092-871-6631

FAX 092-866-2308

e-mail sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp