

〈一般研究課題〉 チロシンキナーゼ阻害ペプチドによる
がん分子標的療法の検討
助成研究者 中部大学 武田 湖州恵



チロシンキナーゼ阻害ペプチドによる
がん分子標的療法の検討
武田 湖州恵
(中部大学)

Molecular targeted therapy for cancer using tyrosine
kinase inhibitory peptides

Kozue Takeda
(Chubu University)

Abstract :

Protein kinases are one of the most important classes of therapeutic targets and the various inhibitors have been developed. We had demonstrated that a conserved cysteine residue of RET is crucial for the disulfide bond-mediated dimerization-linked activation of RET tyrosine kinases. Reagents that bind to the cysteine can inhibit the RET kinases activity through disulfide-bond mediated dimerization. We recently reported that cysteine containing peptides inhibit the activities of RET and effectively reducing the malignant potential of RET-expressing cells. The aim of this study is to further explore the efficacy of these peptides. We reconfirmed that the inhibitory peptides were effective against RET-PTC1 V804M, which is a gatekeeper mutation that provides resistance to ATP-competitive inhibitors. In particular, the reduction of cell proliferation by inhibitory peptides was observed in a more physiological environment than the conventional monolayer culture. The inhibitory peptides were effective against all tested RET mutations. There was no clear difference in the effect among the peptides depending on the type of mutants. Lastly, we found candidate methods for the direct delivery of peptides into cells. Additional work is still needed to establish novel molecular targeted therapies.

1. はじめに

がんの主な分子標的療薬であるチロシンキナーゼ阻害剤のほとんどが、活性に必須なATP結合を阻害し作用する。ATP結合部位は多くのキナーゼで構造がよく似ており、ATP結合阻害剤は本来の標的キナーゼに効果がある一方、他のキナーゼに対しても親和性を示して効果を有する場合がある。また、遺伝子変異で阻害剤結合部位の構造が変化する事などによる薬剤耐性化が問題となっている。こうした問題を解決するため、新規チロシンキナーゼ阻害剤は引き続き求められているが、ATP結合阻害以外の全く作用機序の異なる阻害剤は、現在のところほとんど報告されていない。

受容体型チロシンキナーゼRETの活性型変異は甲状腺がんや肺がんなどに関与しており(Jhiang *et al* 1996, Kohno *et al*, Takeuchi *et al*, Lipson *et al*, 2012)、その治療標的分子として注目されている。

これまで我々は、キナーゼの活性調節にはRET分子のシステインが重要であることを示してきた。酸化ストレス等の細胞外ストレスは、RETキナーゼにあるシステインのSH基に作用し、キナーゼをリガンドが結合したときと同じように、二量体化して活性化することを初めて明らかにした(Kato *et al*. Mol. Biol. Cell. 2000, Takeda *et al*. Antioxid Redox Signal. 2001)。甲状腺がんに関与する活性型RETキナーゼRET-PTC1において、この二量体化に必要なシステインを他のアミノ酸に置換したところ、基本的な活性が著明に減少した(Takeda *et al*. FEBS Lett. 2006)。つまり、RET活性化において、我々が見出したシステインは、ストレス時以外でもきわめて重要な役割を持つと考えられる。

これらの結果を踏まえて、がん遺伝子産物RETキナーゼの活性化をこれまでの阻害剤にはない全く新しい機序により制御し、甲状腺がんのみならずRET活性化の関わる様々ながんに対する新規治療法を提案することを目指してきた。そして最近、活性に重要である特定のシステイン周辺の配列を持つペプチド(以下阻害ペプチド)が、RETキナーゼ活性を抑制し、細胞のがん化を抑える事を見出した(Takeda *et al*. 2020)。本研究は、ペプチドを用いたRETキナーゼ阻害法の有効性をさらに確立し、新規分子標的療法の実現に近づけることを目的としている。

2. 試料および実験方法

2.1 細胞、プラスミド、遺伝子導入

使用したペプチド発現ベクターの構造を図1に示す。

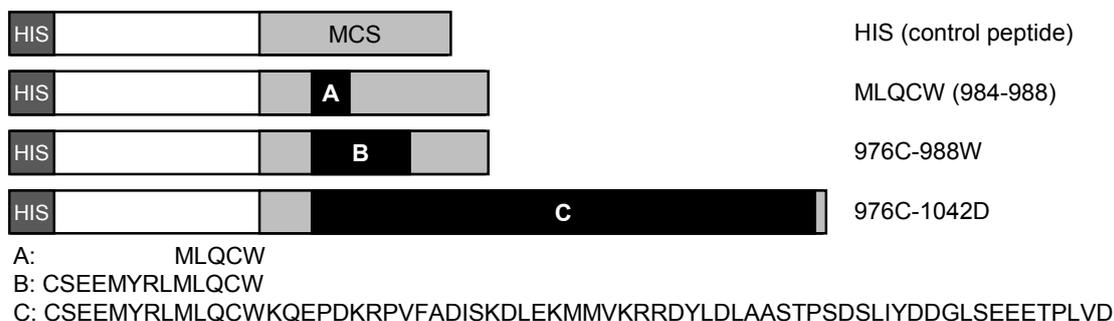


図1. 使用したペプチド発現ベクターの模式図(Takeda *et al*. 2020)

さまざまなRETキナーゼを発現させた線維芽細胞NIH3T3細胞に、各ペプチド発現遺伝子をLipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)を用いて遺伝子導入した。またRET-PTC1 V804Mを発現したNIH3T3細胞に、各ペプチド発現遺伝子を導入し、RETキナーゼとペプチドの恒常発現細胞を作製した。

2.2 3次元培養

各細胞、1000個ずつPrimeSurfaceプレート96U(住友ベークライト)に播種した。

2.3 ウェスタンブロットは、以前に示した通りの方法で行った(Takeda *et al.* 2020)。

3. 実験結果

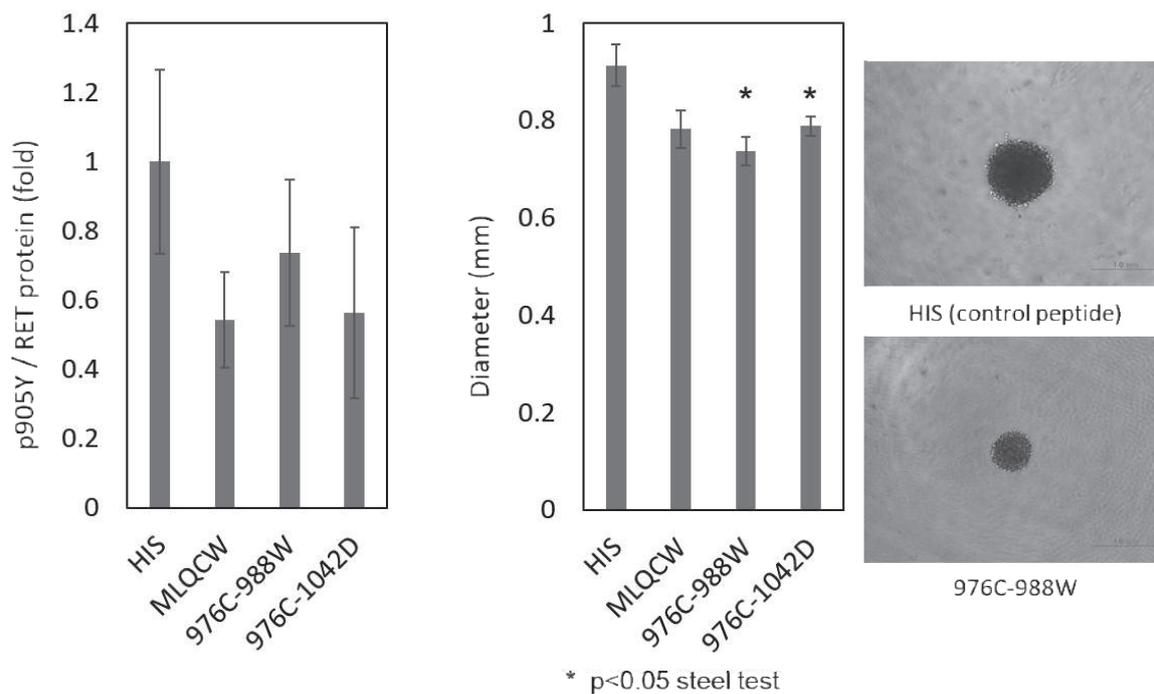
3.1 RET変異の種類による効果の違い

c-RETの点突然変異は多発性内分泌腺腫症multiple endocrine neoplasia2A, 2B(MEN2A, 2B)の原因となる。またRET遺伝子の転座はヒト甲状腺乳頭ガン (PTC) の患者でよく見られる。この転座RET-PTC1は細胞外ドメインを欠損している。

これまでに使用した阻害ペプチドは、RET-PTC1キナーゼの活性を抑制でき、さらに既存のATP結合阻害剤が効きにくい遺伝子変異RET、特にゲートキーパー変異を持つRET-PTC1 V804Mに対しても、活性抑制に有効である結果を得ていた(Takeda *et al.* 2020)。

RET-PTC1 V804Mを発現した細胞の増殖に対する、阻害ペプチドの効果をさらに調べるため、RET-PTC1 V804Mと阻害ペプチド遺伝子の恒常発現細胞を作製した。発現が十分得られた複数のクローンで、コントロールペプチドであるHISを発現したものと比べて、阻害ペプチドを発現した細胞で、RETの活性の指標である905Yのリン酸化(図2A)及びRET下流シグナルであるERKのリン酸化が低下していた。これまで確認されていた一過性発現細胞と同様の効果が確認できた。その結果、これらの細胞の増殖も抑制されていた。3次元培養では、全ての細胞でスフェロイドが形成され、播種5日後に形成されたスフェロイドの直径は、コントロールと比べ阻害ペプチドを発現した細胞で小さかった(図2B)。

MEN2A, 2B変異RETに対する効果の検討では、ペプチド遺伝子が発現させた細胞ではコントロールに比べ、RET 905Yのリン酸化を抑制できたが、いずれも阻害ペプチド間には有意な差は認められなかった。この時RET下流シグナルERKに関しても、いずれもリン酸化が抑えられていた。今回用いた阻害ペプチド間では、ERKのリン酸化抑制に対しては長いペプチドのほうが有効である傾向が見られた。



A: RET活性

B: スフェロイドサイズ(3次元培養)

図2. ゲートキーパー変異を持つRET-PTC1 V804Mに対する阻害ペプチドの効果

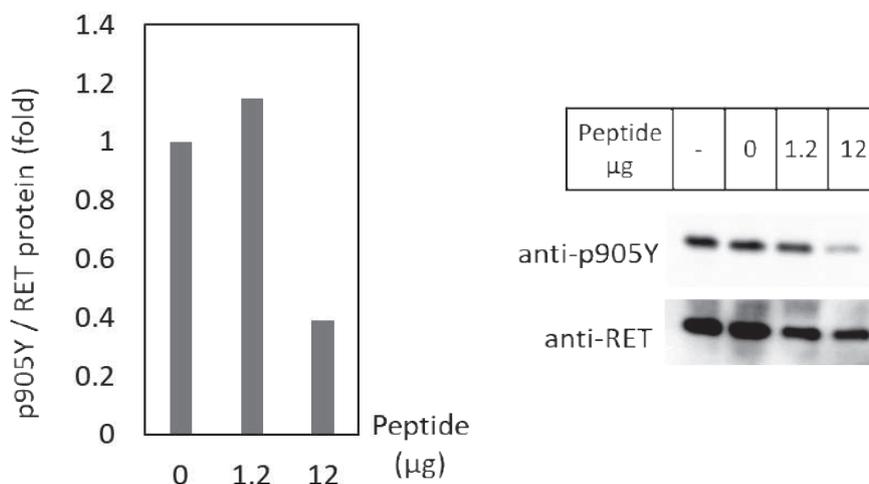


図3. 阻害ペプチドの細胞内投与の効果

3.2 阻害ペプチド投与方法の検討

これまで阻害ペプチドは、発現ベクターを遺伝子導入する方法で細胞内に発現させ、その有効性を検討してきた。今回発現ベクター遺伝子を使わず、市販タンパク質トランスフェクション試薬の使用や、膜透過ペプチド作製などを行い、合成ペプチドを直接細胞内に投与する方法の検討を行った。

試みた多くの方法で、阻害ペプチドによるRET活性が可能であることを示唆する有望な結果が得られた。その一例を図3に示す。このウエスタンブロットの結果では、RET発現細胞に阻害ペプ

チドを12 μ g加えるとRET 905Yのリン酸化が抑制されたことが分かる。さらに今後研究を継続し、最適な方法を検討していきたい。

4. まとめ

使用した阻害ペプチドは、既存のATP結合阻害剤に効きにくいゲートキーパー変異を持つRET-PTC1 V804Mに対して有効であることが改めて確認できた。特に、3次元培養では、従来の単層培養よりも生体に近い環境で、細胞増殖の低下が示された。

阻害ペプチドは検討したすべてのRET変異に対して有効であったが、変異体の種類ごとにどのような阻害ペプチドが有効であるのかに関しては、明らかな差異を認めず、さらなる解析が必要である。

最後に、阻害ペプチドを細胞に直接投与する方法に関しては、まだ検討途中であるが、ペプチドを細胞内に投与可能な方法の候補が得られた。今後研究を継続し、新規分子標的療法の実現に近づけていきたいと考えている。

参考文献

- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW and Fox GM. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85: 1113-1124.
- Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J and Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012; 18: 375-377.
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H and Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18: 378-381.
- Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, Downing SR, Frampton GM, Garcia L, Juhn F, Mitchell KC, White E, White J, Zwirko Z, Peretz T, Nechushtan H, Soussan-Gutman L, Kim J, Sasaki H, Kim HR, Park SI, Ercan D, Sheehan CE, Ross JS, Cronin MT, Janne PA and Stephens PJ. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med* 2012; 18: 382-384.
- Kato M, Iwashita T, Takeda K, Akhand AA, Liu W, Yoshihara M, Asai N, Suzuki H, Takahashi M and Nakashima I. Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 93-101.
- Takeda K, Kato M, Wu J, Iwashita T, Suzuki H, Takahashi M and Nakashima I. Osmotic

stress-mediated activation of RET kinases involves intracellular disulfide-bonded dimer formation. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 473-482.

- Takeda K, Kawamoto Y, Okuno Y, Kato M, Takahashi M, Suzuki H, Isobe K and Nakashima I. A PKC-mediated backup mechanism of the MXXCW motif-linked switch for initiating tyrosine kinase activities. *FEBS Letters* 2006; 580: 839-843.
- Takeda K, Kawamoto Y, Nagasaki Y, Okuno Y, Goto Y, Iida M, Yajima I, Ohgami N, Kato M. Peptides containing the MXXCW motif inhibit oncogenic RET kinase activity with a novel mechanism of action. *Am J Cancer Res* 2020; 10: 336-349.