

## KRAS 遺伝子変異を持ったがんを標的とした新規のアルキル化剤の開発について

平成 27 年 4 月 27 日

千葉県がんセンター永瀬浩喜研究所長の研究グループは、同センター消化器内科及び京都大学大学院理学研究科などと共同し、今までなかった難治性の **KRAS** がん遺伝子変異を持ったがんに対する治療薬を開発しました。この薬剤は、通常の化学療法に用いるアルキル化剤をがんの原因となるがん遺伝子（ドライバー遺伝子変異）に直接作用させることで、がん遺伝子を破壊し、さらに従来の化学療法剤としての効果も果たします。実際にヒト大腸がん移植マウスを用いた実験では、低濃度の薬剤で副作用なく腫瘍が縮小する高い治療効果が得られました。

なお、この研究論文は、本日、*Nature Communications* 誌（*Nature* 姉妹誌）において、世界中に公表されます。

### 1 論文発表の概要

(1) 研究論文名：Inhibition of KRAS mutant using a novel DNA-alkylating Pyrrole-Imidazole polyamide conjugate targeting Codon 12 Mutant DNA

(和訳：KRAS コドン 12 の変異 DNA を標的にした新規ピロールイミダゾールポリアミド DNA アルキル化剤複合体による変異 KRAS の阻害)

(2) 著者：氏名（所属）

千葉県がんセンター： 平岡桐子、井上貴博、渡部隆義、越川信子、養田裕行、  
篠原憲一、高取敦志、杉本博一、丸喜明、傳田忠道、  
尾崎俊文、永瀬浩喜

京都大学：板東俊和、杉山弘、Rhys Dylan Taylor

日本大学：藤原恭子

カリフォルニア大学サンフランシスコ校：Allan Balmain

※ 研究代表者：永瀬浩喜（千葉県がんセンター研究所長、千葉大学大学院医学薬学府客員教授、日本大学医学部客員教授）

(3) 発表雑誌：*Nature Communications*（*Nature* 姉妹誌）

(4) 公表日：日本時間 2015 年 4 月 27 日（英国時間 2015 年 4 月 27 日）

### 2 今後への期待

日本で毎年約 3 万人の患者が **KRAS** コドン 12 の変異を持つがんに罹患し、多くが難治性のがんとなりますが、**KRAS** に対する分子標的治療薬は開発されていません。本研究により抗 **KRAS** 効果が確認された化合物 **KR12** は、国からの援助のもとに難治性のがん患者向け治療薬として開発中であり、期待されています。

また、本化合物の開発技術は理論上他のあらゆるがんに応用ができるため、今後は治療法がなくなったがん患者一人一人に合わせた治療薬を供給する新たな道筋となり得ます。

(謝辞)

本研究は文部科学省次世代がん戦略推進プロジェクトにて実施したものである。

## (参考)

### 1 本研究の背景と目的

難治性のがん患者、治療法のないがん患者に一日でも早く効果的な抗がん剤を届けたい。このためにはがんの原因遺伝子・ドライバー遺伝子をたたくことが重要であることを、分子標的治療薬の開発の歴史が物語ってきた。我々はがんにかかわるたんぱく質でなく遺伝子を直接狙い撃ちする方法を開発するため、DNAの副溝を配列特異的に認識するピロールイミダゾールポリアミドとやはりDNAをアルキル化するアルキル化剤について研究を進めてきた。これは、放線菌などの細菌が他の細菌が持つ遺伝子を認識して破壊し、他の菌から自分の増殖の場を守る目的で用いてきた抗生物質と同じものである。この遺伝子の配列認識をがん細胞特異的に作り変えて自動的に合成できる仕組みを千葉県がんセンターのグループは京都大学と共同で開発した。

最初に、もっとも頻度が高く、難治性で、治療薬がないドライバー遺伝子変異、KRASのコードン12の変異を標的に作成したのが本研究論文で報告する薬剤KR12である。KRAS遺伝子などのがんの遺伝子変異を標的にすることでがん細胞に効果を示す薬剤を次々に開発することを研究の目的としました。

### 2 研究方法と成果

いわゆるドライバーオンコジーンを標的にした分子標的治療が広く開発（乳がんに対するハーセプチンや白血病に対するグリーベックなど）されているなか、最も古くから知られている主要ながん原遺伝子であるKRAS遺伝子に対する有効な治療薬は未だ開発されていない。このKRAS遺伝子変異を持つ難治性がん治療のため、ゲノムDNAにおけるKRAS遺伝子の活性化変異部位を標的にしたアルキル化剤の開発を目的として、塩基配列特異的に結合する有機小分子であるピロール・イミダゾールポリアミド(PIP)にアルキル化剤であるCBIを付加し、DNAとの強い結合力を有し、少量でも効果的に遺伝子発現を抑制する抗変異KRAS遺伝子がん治療薬の開発を考案した。

KRAS遺伝子のコードン12の変異は、化学療法抵抗性の転移を有する大腸癌患者に多く、さらに肺がん及び現在でも最も治療の困難な膵臓がんにも多くみられる。同じKRASのコードン13の変異を有する大腸癌の患者ではモノクローナル抗体であるセツキシマブにより有意な予後改善が得られる例があるが、KRAS遺伝子のコードン12の変異に対しては有効な治療薬が見つかっておらず、治療薬剤が必要とされるまさにアンメットな標的がん原遺伝子変異と考えられる。そこでこのコードン12の遺伝子をコードするDNA配列を特異的に認識し結合することで、その発現を抑制する薬剤をデザインした。この薬剤は、従来の治療薬とは全く異なる新たな抗がん剤として難治性の大腸がんや膵臓がん、肺がんに対する効果が期待される。

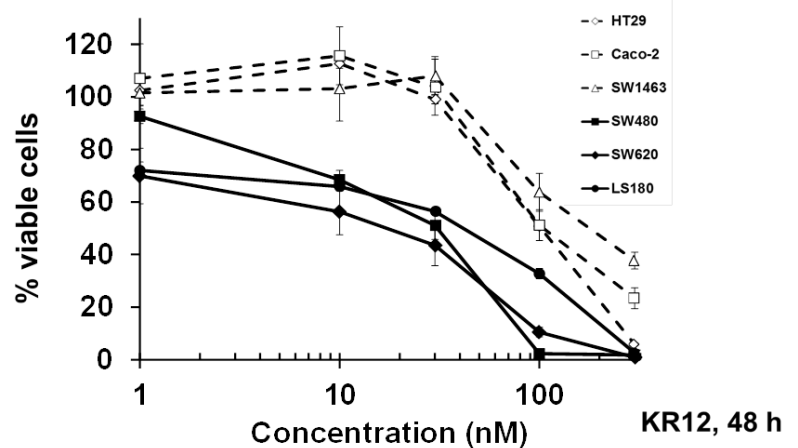
PIPは抗生物質デスタマイシンをモチーフとして開発された人工小分子であり、2本鎖DNAのマイナーグループへ配列特異的に結合することが報告されており、PIPによる標的配列の遺伝子の発現抑制が多く研究されている。さらにマウスを用いた動物実験により腎障害に対する薬剤や抗がん剤、角膜外傷、肥厚性癍痕、骨疾患等に対する治療薬としての研究も進められている。また近年では、iPS細胞の研究の一環として京都大学のiPS細胞プロジェクトであるiCeMsの研究においてもPIPによるiPS細胞誘導の研究が行われているなど、様々な研究成果が期待されて

いる有機小分子である。この PIP の特徴として、①任意の遺伝子配列をターゲットとして設計することが可能 ②DNA に対する結合能が転写因子よりも強い ③ベクターやドラッグデリバリーシステム (DDS) 無しに細胞の核に取り込まれる ④核酸分解酵素に分解されず、細胞や生体内で安定であり、尿胆汁より未分解物として排泄される ⑤N 及び C 末端を容易に修飾することが可能であり、様々な機能性小分子との複合体の形成が可能であることなどが挙げられる。

PIP は、Py/Im ペアが CG、Py/Py ペアが AT または TA、Im/Py ペアが GC を認識し、これにより様々な任意の二重鎖 DNA に配列特異的に結合することが可能である。標的遺伝子に結合した PIP は、転写因子の DNA への結合を阻害し、特定の遺伝子発現を抑制する遺伝子スイッチとして研究されている。

KRAS コドン 12 の変異配列を標的とする hPIP に京都大学の杉山、板東らにより開発された DNA 塩基のアデニンの特異的アルキル化を引き起こす seco-CBI を縮合させることで KRAS のコドン 12 の変異を特異的に認識する hPIP-seco-CBI (KR12) を合成し、抗がん活性についての研究を行なった。KRAS コドン 12 の変異配列を持つ大腸がん細胞株

SW480、SW620、LS180 および SNU-C2B においては生き残った細胞数が低濃度でも少なく、KR12 が認識する変異を持たない HT-29、Caco-2、DLD-1、SW1463 では、高濃度にならないと細胞死を誘導できなかった (右折れ線グラフ) また、IC50 (がん細胞の 50% が死ぬ濃度) が KR12 認識配列を持つ細胞では



50nM 前後で得られたが、KR12 認識配列を持たない細胞では IC50 は 2-3 倍の高濃度であった (右表)。コドン 12 の変異をもつ細胞株でより選択性の高い細胞死誘導が見られており、コドン 12 の変異特異的アルキル化

cells	IC50 (nM)		KRAS status	
	KR12	CBI		
HT-29	102	25	WT	G12
Caco-2	105	18	WT	G12
DLD-1	153	13	MUT	G13D
SW1463	178	20	MUT	G12C
SW480	31	10	MUT	G12V
SW620	17	10	MUT	G12V
LS180	42	17	MUT	G12D
SNU-C2B	57	18	MUT	G12D

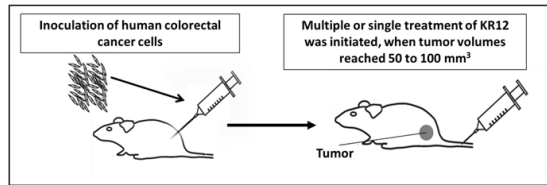
KR12認識配列部位無し

KR12認識配列部位有り

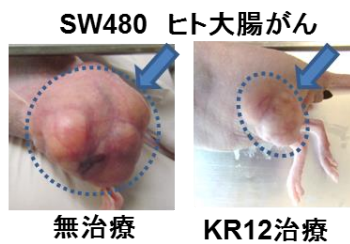
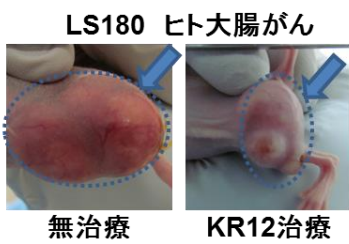
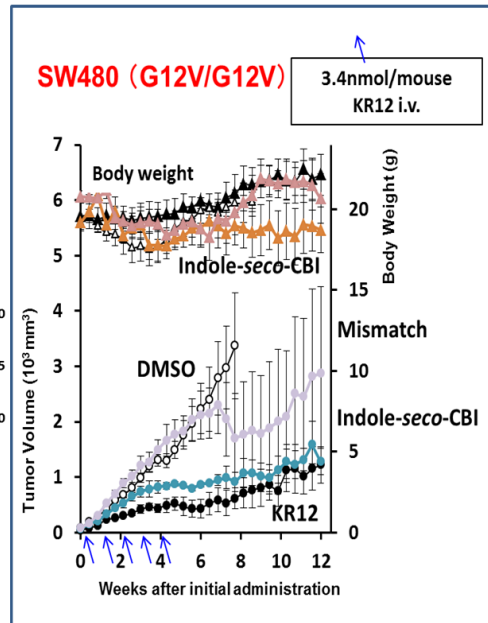
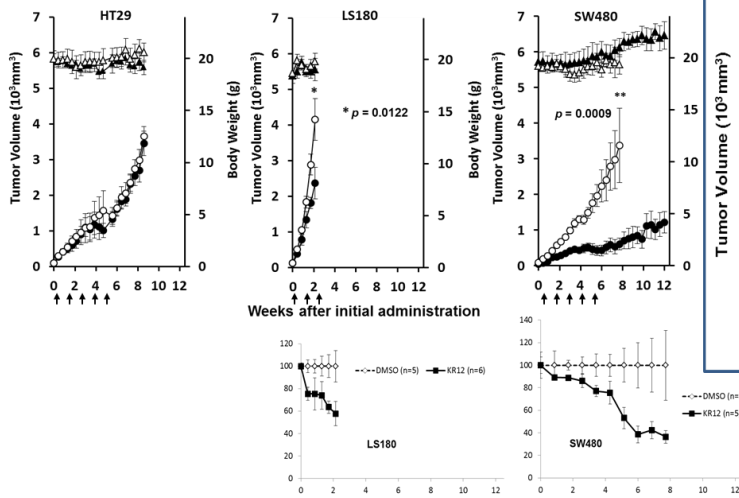
による抗がん剤としての開発の可能性が示唆されている。また、本薬剤の投与によりヒト大腸がんを移植した免疫不全マウスへの投与による抗癌作用を調べたところ、KR12 の認識配列を持つ LS180、SW480 細胞株で、優位にがん細胞の増殖を抑え、KRAS 変異をもたない HT29 大腸がん細胞には効果を示さなかった。また、SW480 大腸がん細胞に対する効果は、アルキル化剤部分のみよりも PIP を付加した KR12 の方が優れておりさらに、アルキル化剤単独では、マウスの体重が減少し、抗がん剤の副作用が確認されたが、KR12 では同濃度での副作用が認められなかった (次頁図)。これは KRAS の変異を持つ細胞に特異性が高く細胞死を誘導することから

も、変異を持たない細胞には効きにくいことから副作用が少なくより低濃度で効果を示す抗がん剤として期待される。参考として、治療によりマウスに移植したヒト大腸がんが徐々に縮小した様子を写真で示す。

## ヒト大腸癌株移植マウスにおけるKR12の抗腫瘍活性(連続投与)



週一回尾静脈連続投与実験(0.32mg/kg)5回投与



### 3 Nature Communications 誌について

**Nature Communications** は、2010年4月にネイチャー・パブリッシング・グループ (NPG) が、Nature 誌に次ぐ第二の統合ジャーナルとして、新たに創刊したオンライン限定の学際的ジャーナルです。生物科学、化学、物理科学のあらゆる領域における質の高い研究論文を出版することを目的としています。各分野の専門家にとって意義深い重要な進展を示す研究論文を、本誌で出版しています。昨年はずべての分野で 2800 論文が採択され、日本から 198 編が採択されています。

下記に **Nature Communications** 誌に使用される **Thumbnail image** (縮小画像) を示す。

