

難治性腫瘍に対する副作用の少ない抗がん剤

福岡大学医学部細胞生物学
教授:白澤 専二、准教授:角田俊之

九州大学薬学部環境調和創薬化学分野
教授:大嶋孝志、助教:矢崎 亮

九州大学理学部化学部門複合領域化学
講師:末永正彦

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

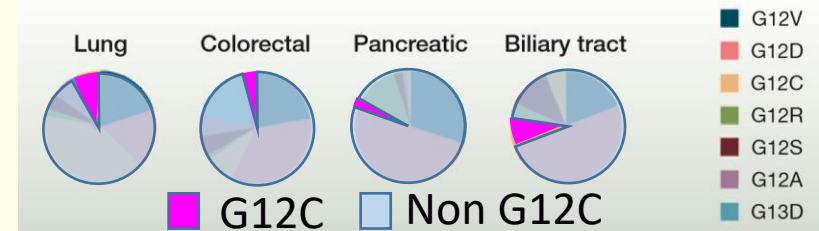
KRASとは? 癌において最も重要な癌遺伝子



	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

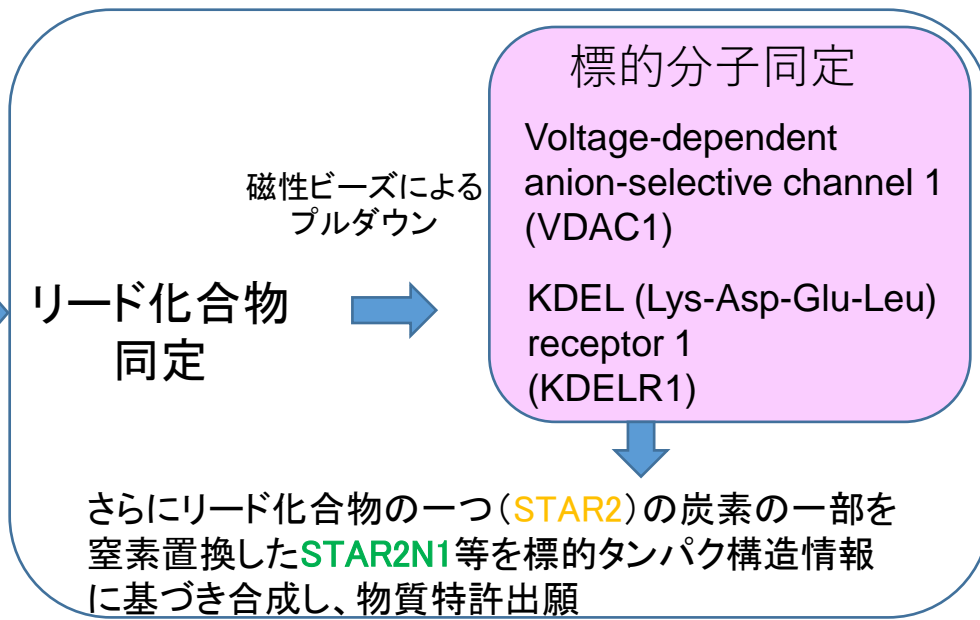
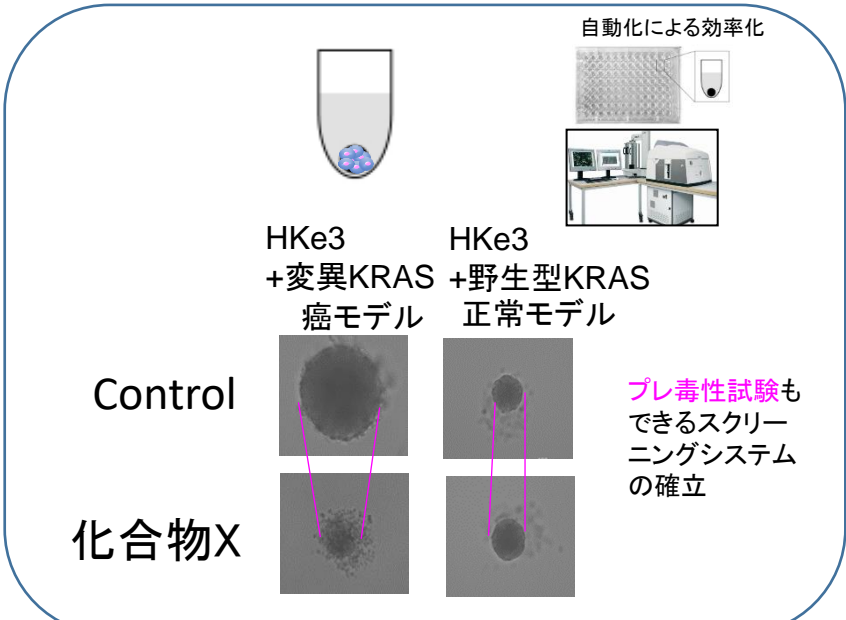
★変異KRAS(G12C)の阻害剤(AMG510)が登場し、治験にて良好な成績を収めているが、G12C変異は全KRAS変異の10%であり、変異KRASは依然としてundruggableである。



★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

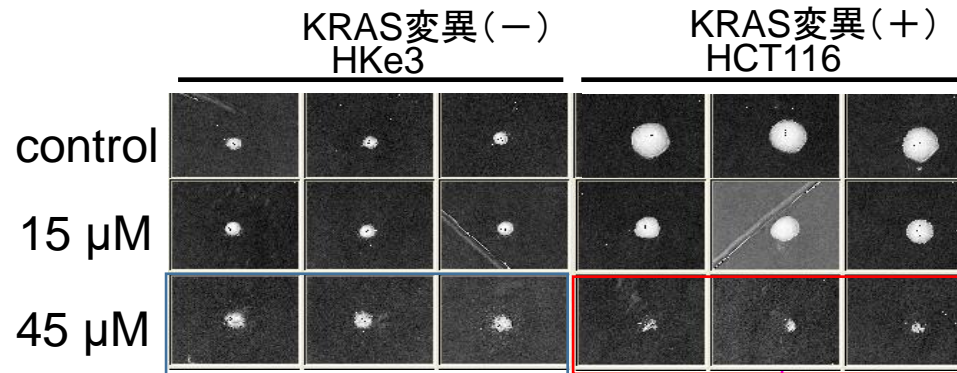
変異KRASを直接標的とすることは非共有結合性の化合物では難易度が高いと考え
変異KRASの下流の関連シグナルを幅広く抑える化合物を3次元浮遊培養システムにて施行



2. STAR2の効果について

In vitroでの有効性

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



毒性無

縮小

未発表データ

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

KRAS変異(+)

KRAS変異(-)

BRAF

PTEN

CTNNB1

KRAS関連シグナル
の変異(+)

Calu-6
(colon)

SW620
(colon)

SK-MEL28
(melanoma)

MDA-MB-231
(breast)

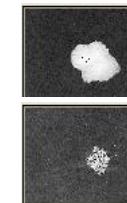
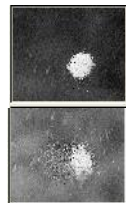
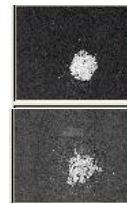
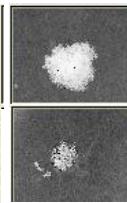
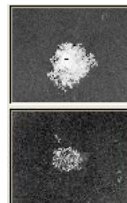
LNCaP
(prostate)

HeLa
(cervix)

HepG2
(liver)

control

45 μM



KRAS関連シグナル
を幅広く抑制

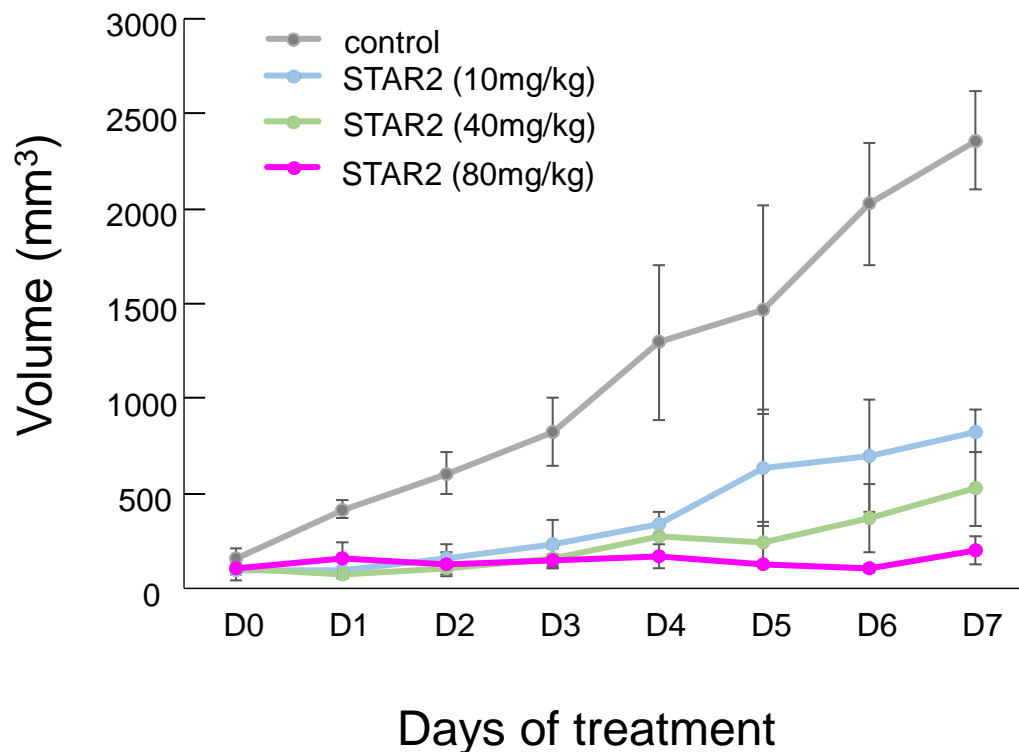
未発表データ

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

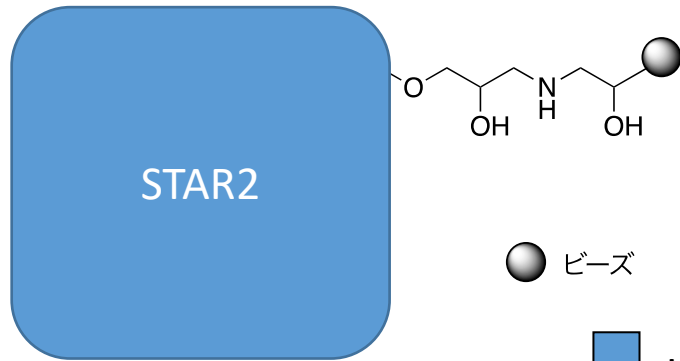
- ・GI50 (50%増殖阻害濃度) = 7.7 mg/kg
- ・80 mg/kgでも毒性無
- ・4週間投与でも毒性無

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

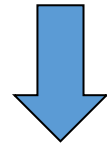
未発表データ

3. STAR2が結合する分子の同定

STAR2標的タンパク質の同定

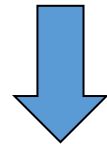


● ビーズ 磁性ナノビーズ



HCT116細胞溶解液を用いてプルダウン

銀染色

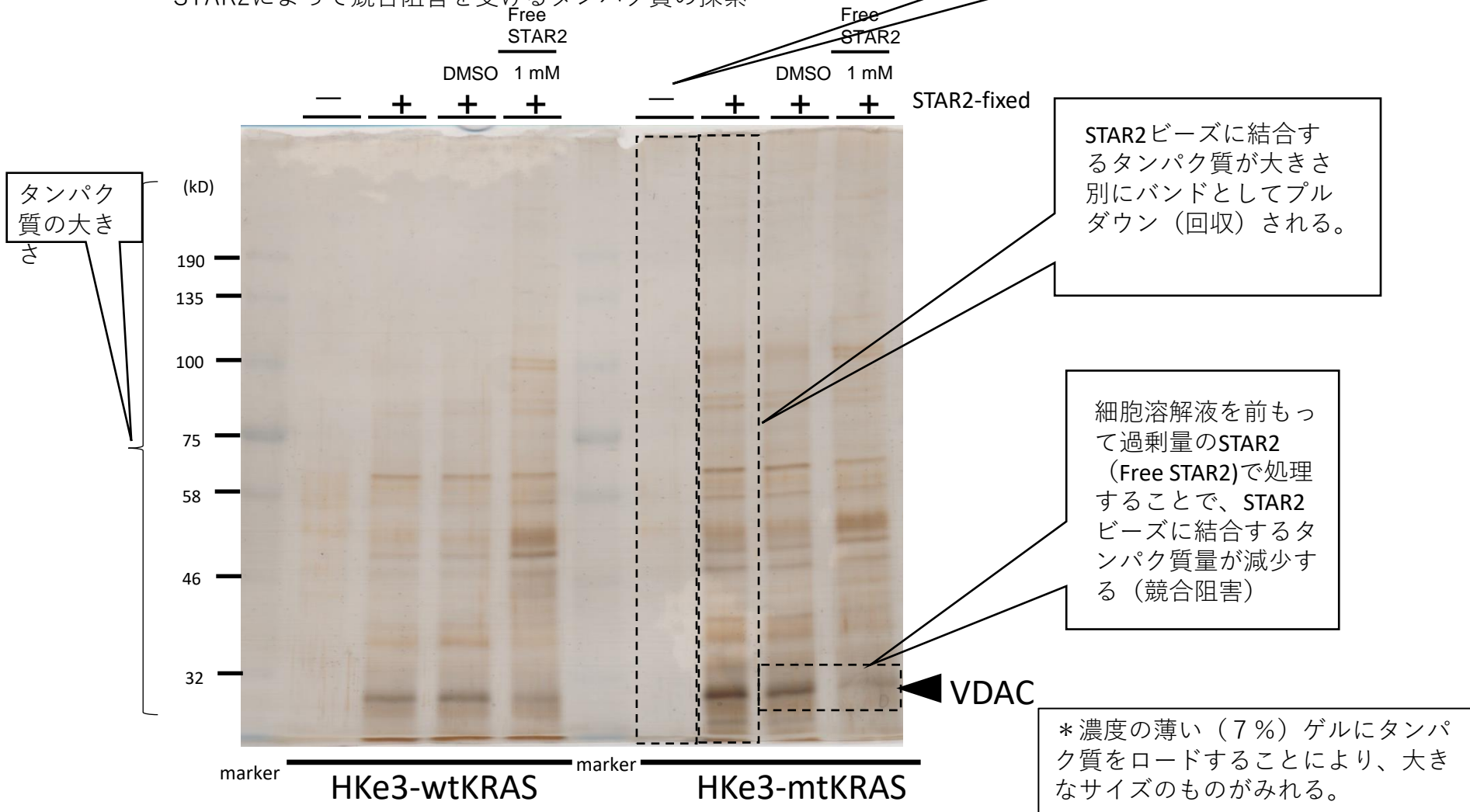


MS解析

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



ビーズそのものにはタンパク質はほとんど結合しない。

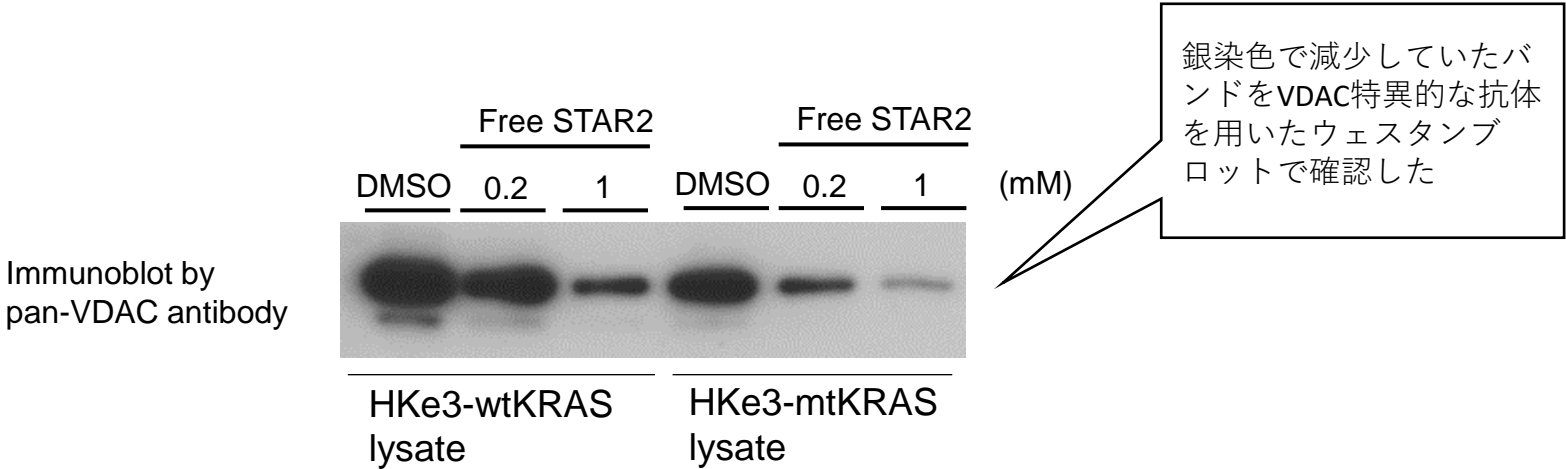
STAR2ビーズに結合するタンパク質が大きさ別にバンドとしてプルダウン(回収)される。

細胞溶解液を前もって過剰量のSTAR2 (Free STAR2)で処理することで、STAR2ビーズに結合するタンパク質量が減少する(競合阻害)

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.

3. STAR2が結合する分子の同定

STAR2はVDACに直接結合する

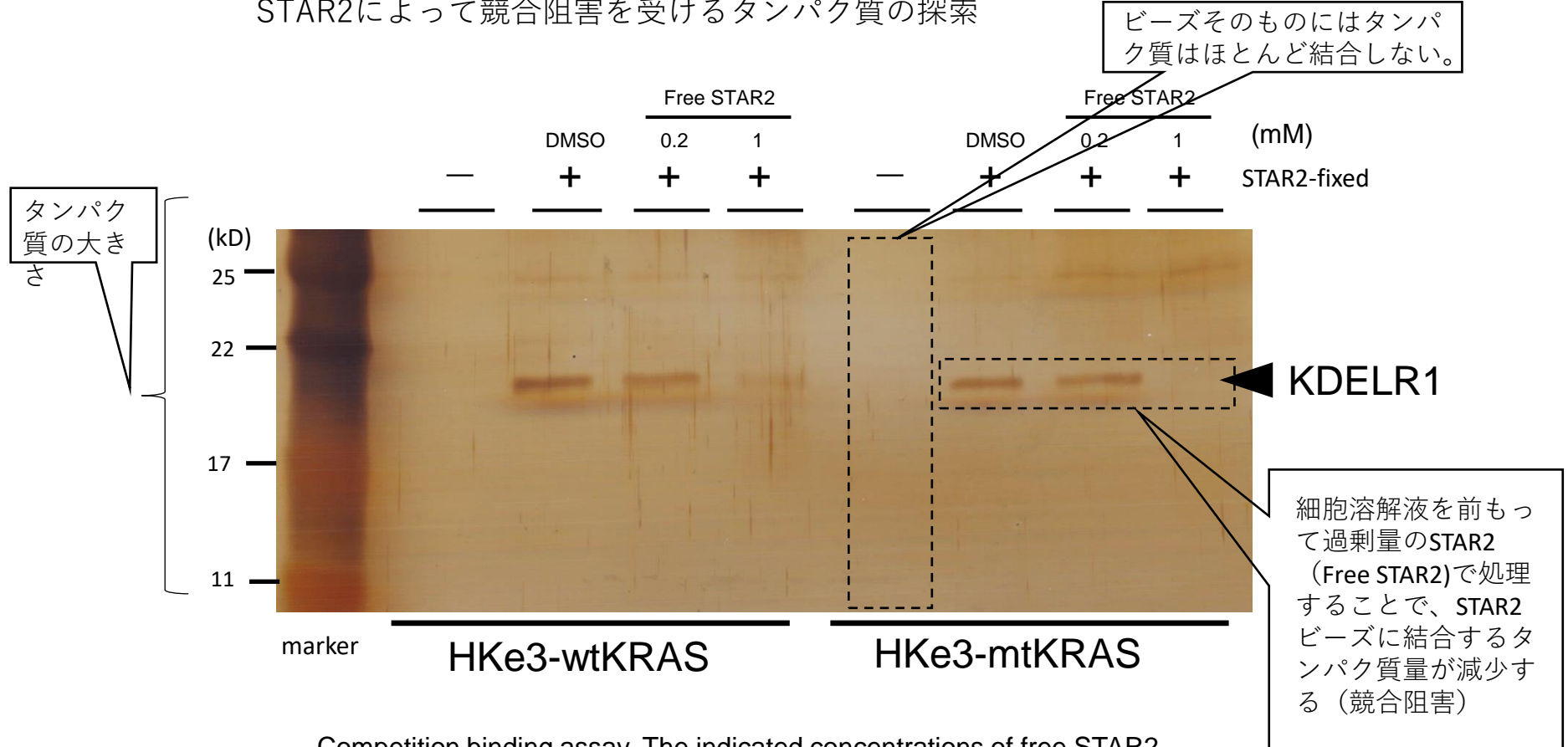


Competition binding assay. The indicated concentrations of free STAR2 were added to HKe3-wtKRAS cell extracts or HKe3-mtKRAS cell extracts. After 1 hr, the extracts were incubated with STAR2-fixed beads. STAR2-binding proteins were purified and detected by immunoblotting with an anti-pan VDAC antibody.

未発表データ

3. STAR2が結合する分子の同定

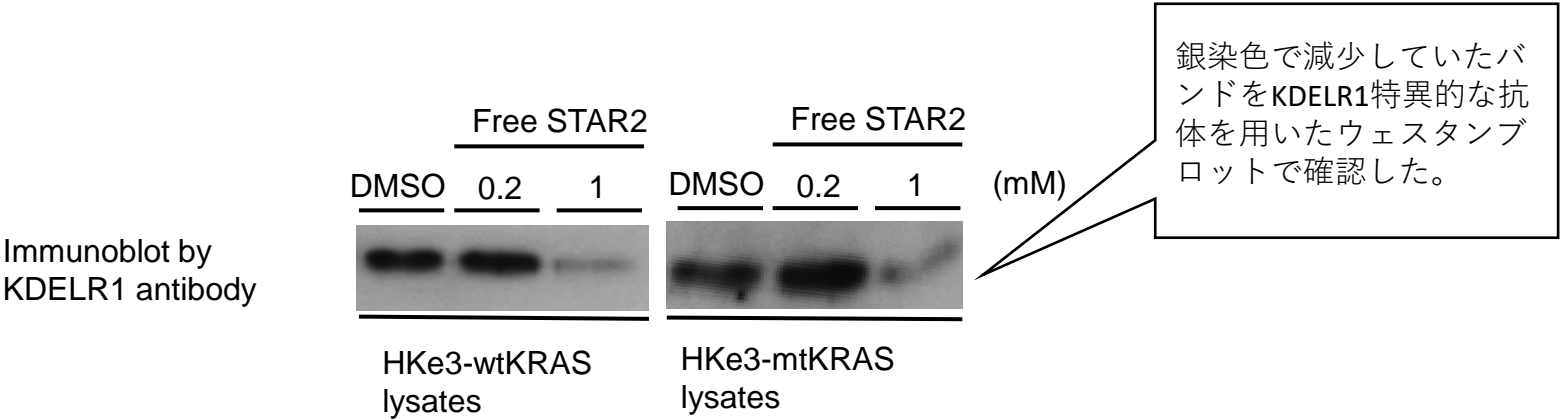
30kD以下のSTAR2ビーズに結合するタンパク質の銀染色における、STAR2によって競合阻害を受けるタンパク質の探索



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.

3. STAR2が結合する分子の同定

STAR2はKDELR1に直接結合する



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-KDELR1 antibody.

未発表データ

3. STAR2が結合する分子の同定

表 1 Mass spectrometry (MS)解析の結果

Results

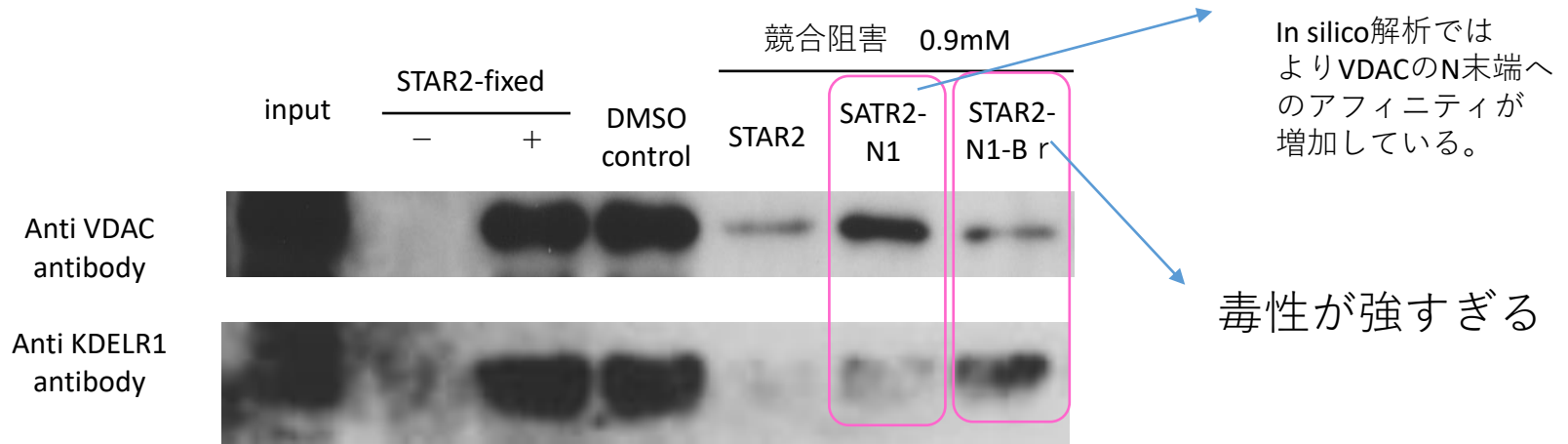
Sample Name	Protein	gene	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession	Note*
20kDa	1 ER lumen protein-retaining receptor 1	KDELRL1 ERD2.1	24,542	88	1	8	P24390	NP_006792.1
30kDa	1 Voltage-dependent anion-selective channel-protein 1	VDAC1 VDAC	30,773	370	13	59	P21796	NP_003365.1
	2 Voltage-dependent anion-selective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

Note* : Accession in Mascot Search Results

未発表データ

3. STAR2が結合する分子の同定

STAR2-N派生物とVDACまたはKDEL1との結合確認



STAR2-N1はVDACとKDEL1に結合する

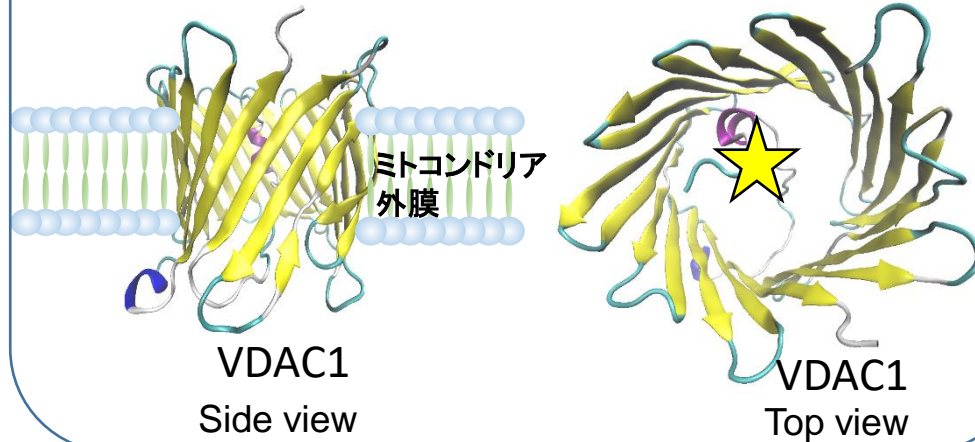
未発表データ

4. VDAC1について

VDAC1に対する予想される作用

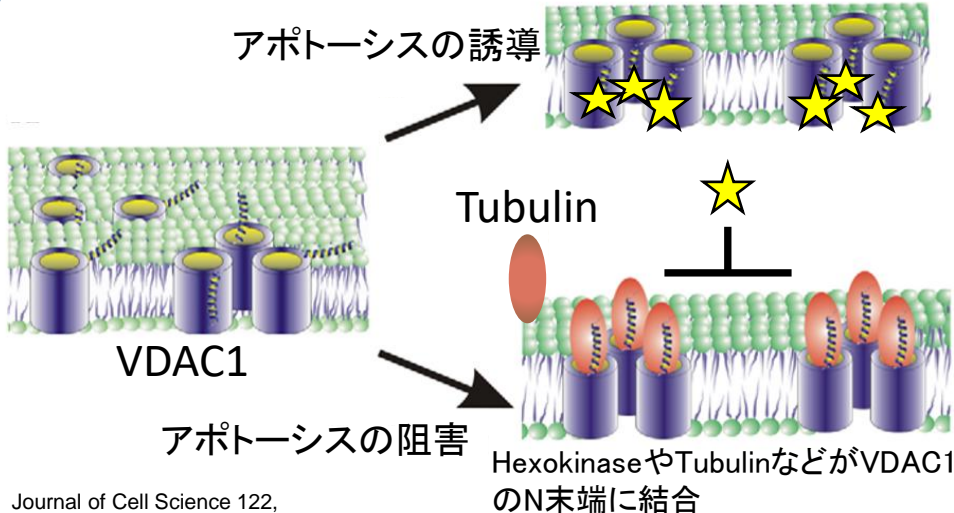
STAR2(★)の結合部位

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



STAR2の作用

アポトーシスの誘導



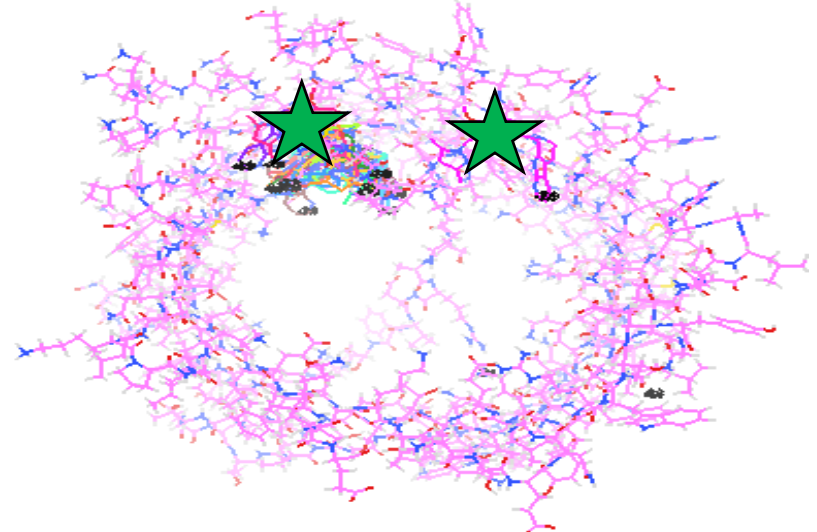
Journal of Cell Science 122,
1906-1916,2009

STAR2は癌特異的にアポトーシスを誘導する

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)



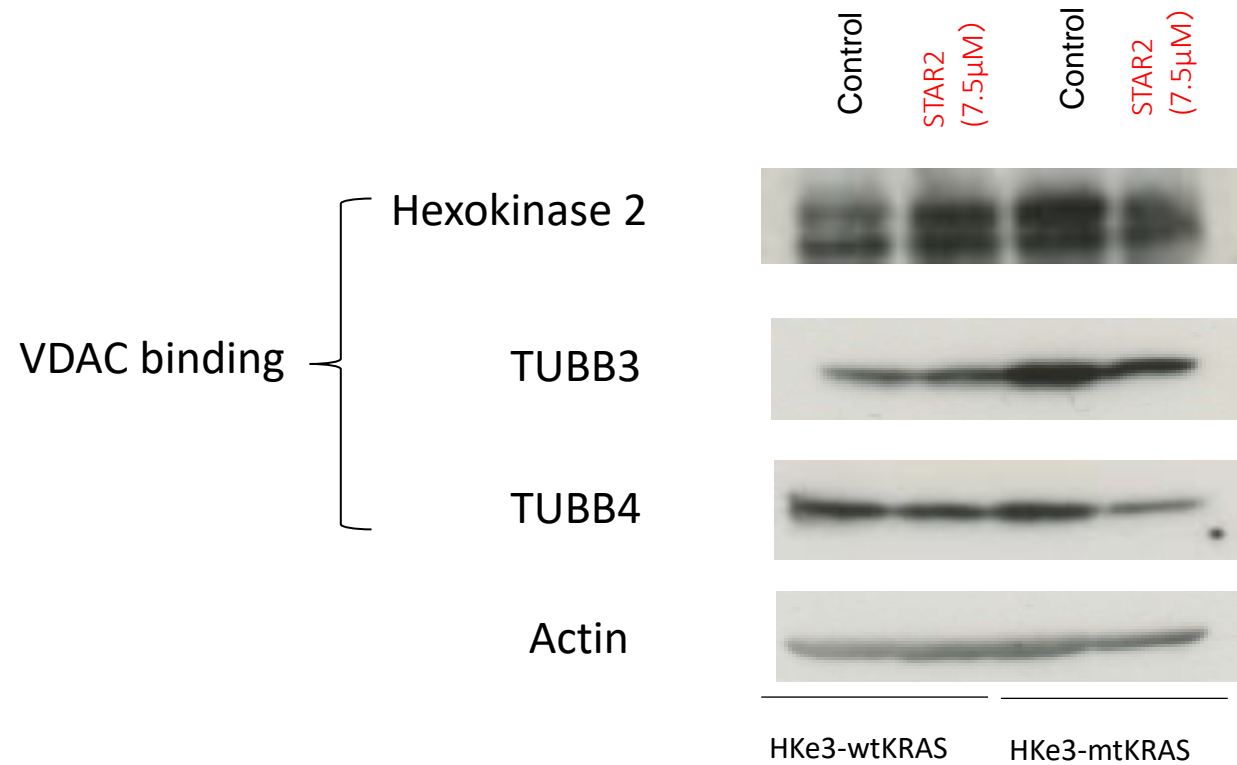
FMO法によるタンパク質-リガンド複合体の
結合エネルギーの計算により、最も結合親和力の
高いものを選択

官能基置換によりさらなる親和性の向上
を試行中

4. VDAC1について

VDACに結合するタンパク質の発現

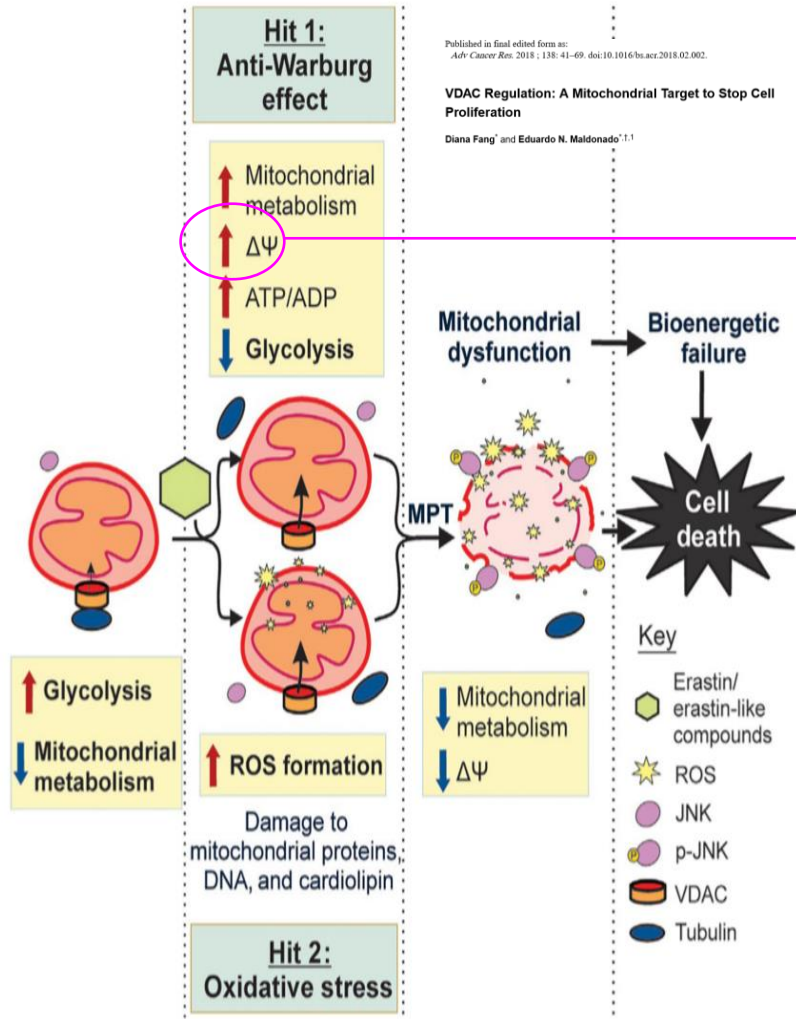
方法：3次元浮遊培養(3DFC)； Day 0にSTAR2投与、 Day6に蛋白回収し、ウェスタンブロット。



未発表データ

4. VDAC1について

VDACとtublinについて



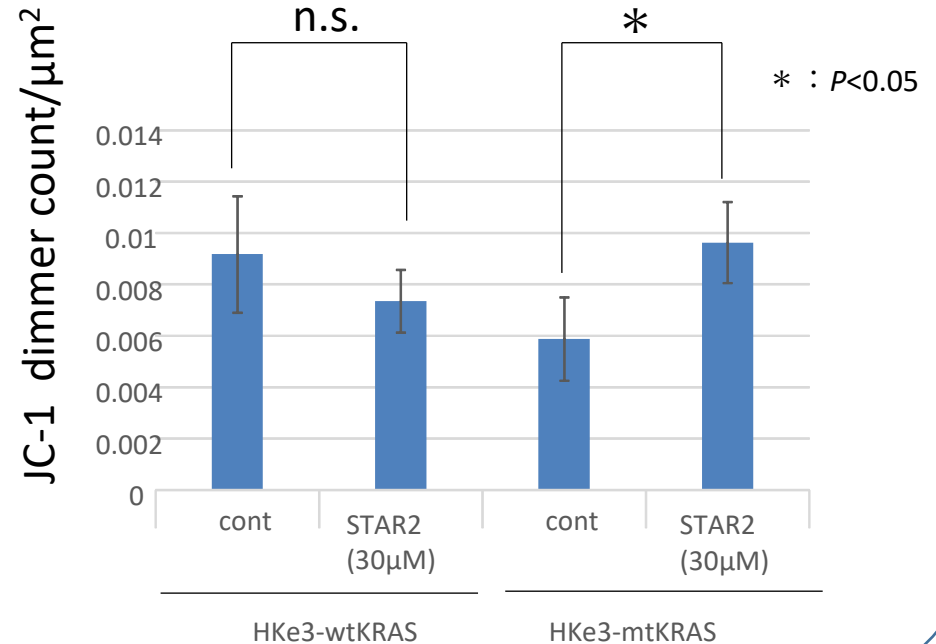
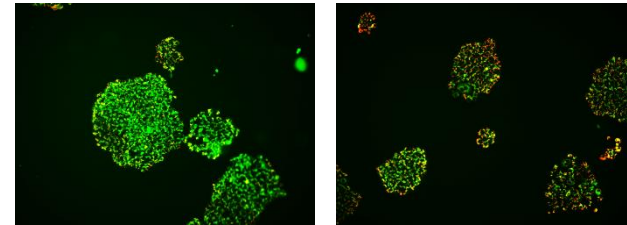
mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$)

2次元培養

STAR2 (30 μ M)は投与後30分でHKe3-mtKRASにおいてmitochondriaの過分極を誘導する。

Green: JC-1 monomer
 Red: JC-1 dimer

JC-1 staining of HKe3-mtKRAS cells in 2DC
 DMSO SATR2 (30 μ M 30min)



未発表データ

Fluoppiについて

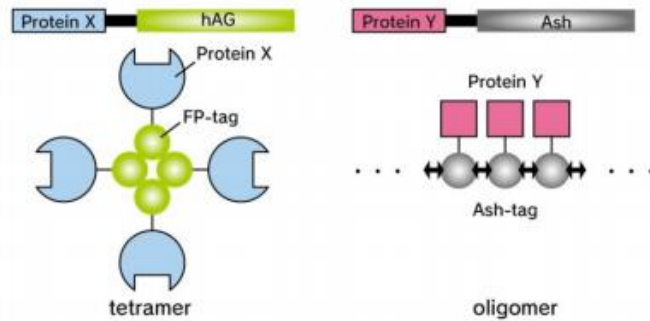


Figure 1 | Key components of Fluoppi technology

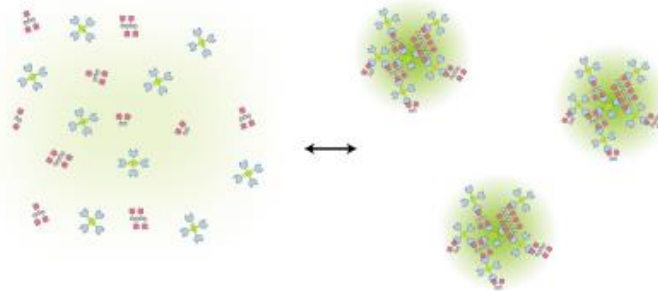


Figure 2 | Mechanism of action

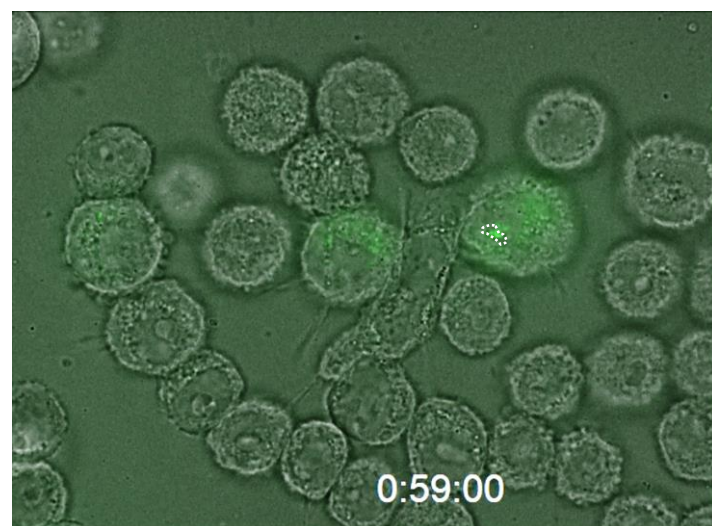
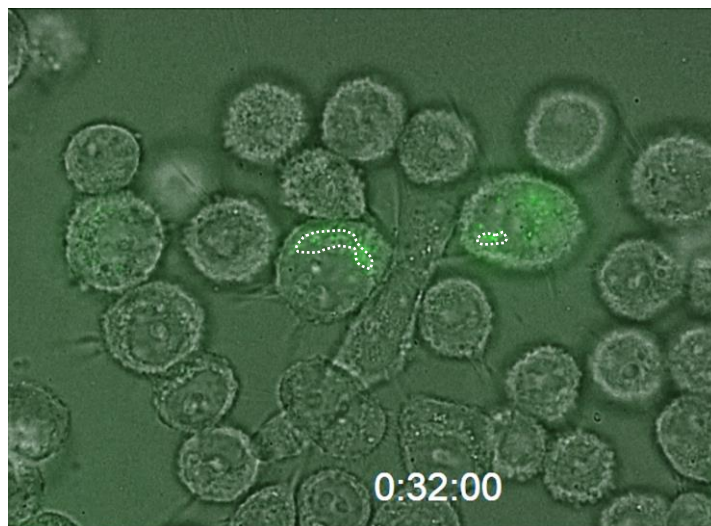
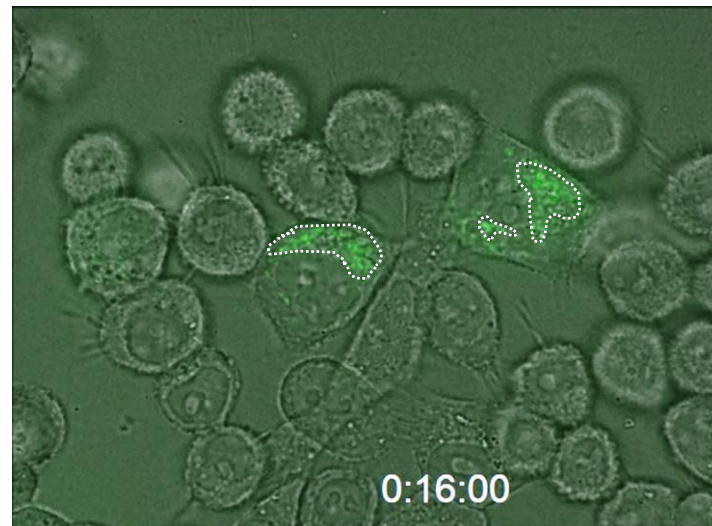
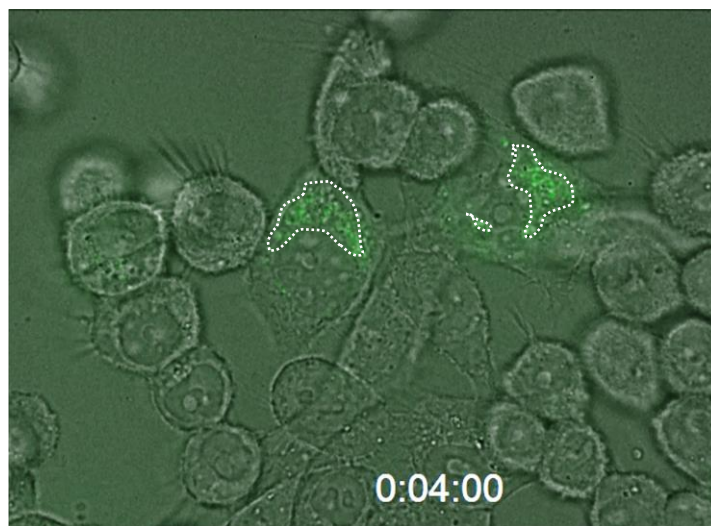
hAG: CoralHue Azami Green

Ash: oligomelic assembly helper (tag)

4. VDAC1について

HCT116-VDAC1-hAG,Ash-TUBB3 (2D culture)

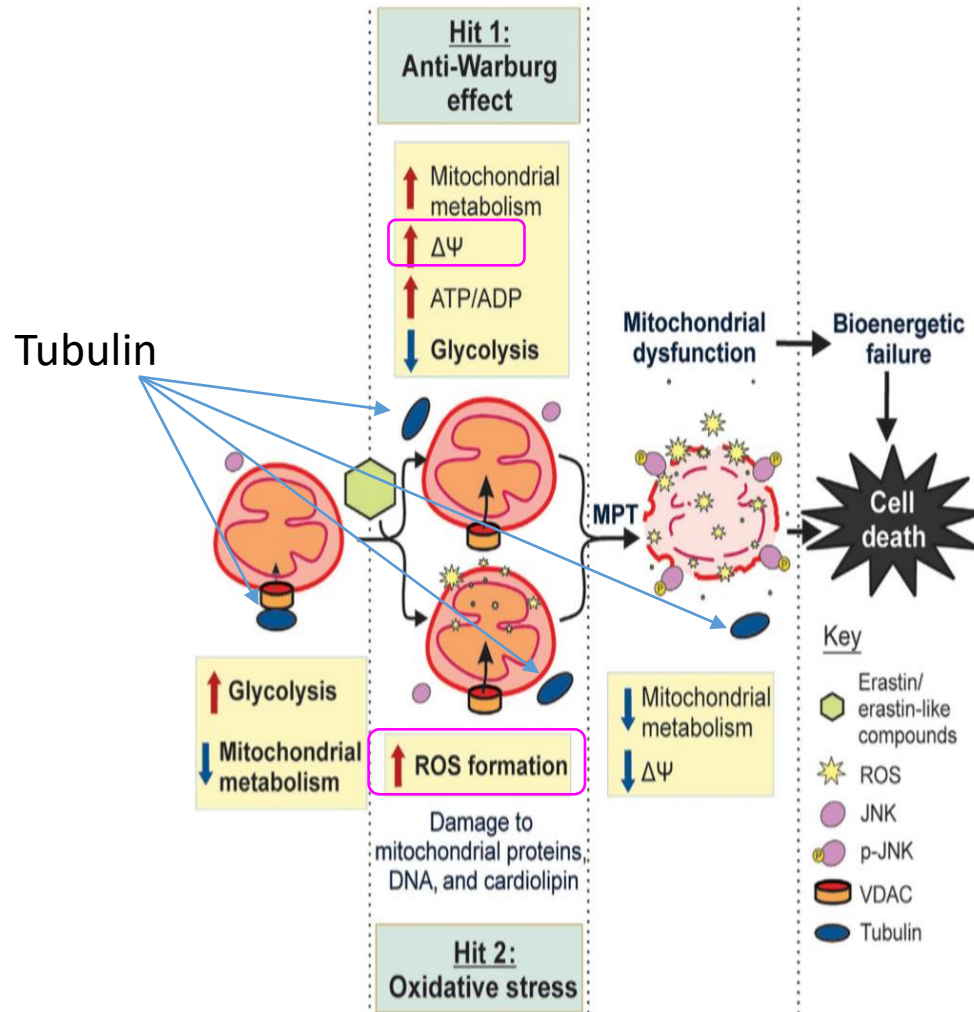
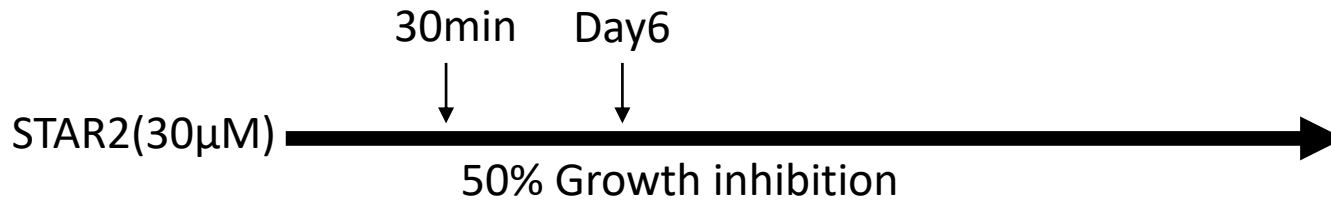
におけるSTAR2(30 μ M)投与後のVDAC1-hAG+AshTUBB3複合体 (dot)の減少
time course (overlay)



STAR2の競合阻害によりVDAC1-hAG+Ash-TUBB3複合体 (dot)が減少する (未発表データ)。

4. VDAC1について

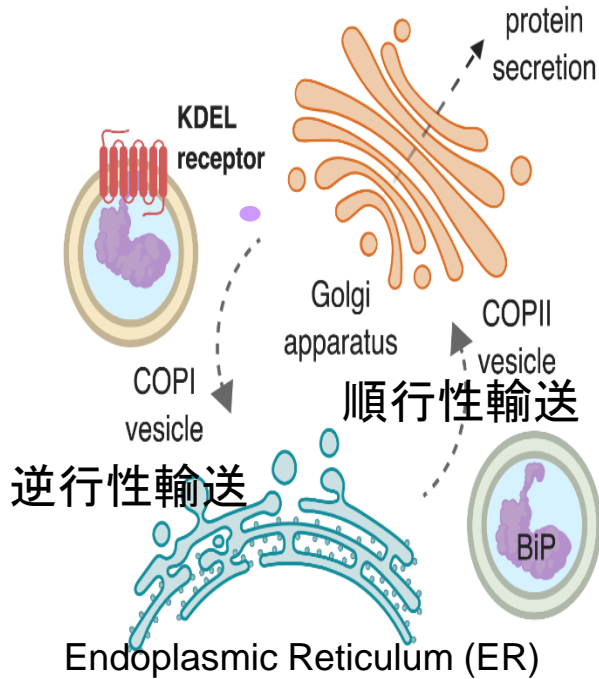
VDACに対するSTAR2の作用



5. KDELR1について

KDELR1に対する予想される作用

KDELR1について

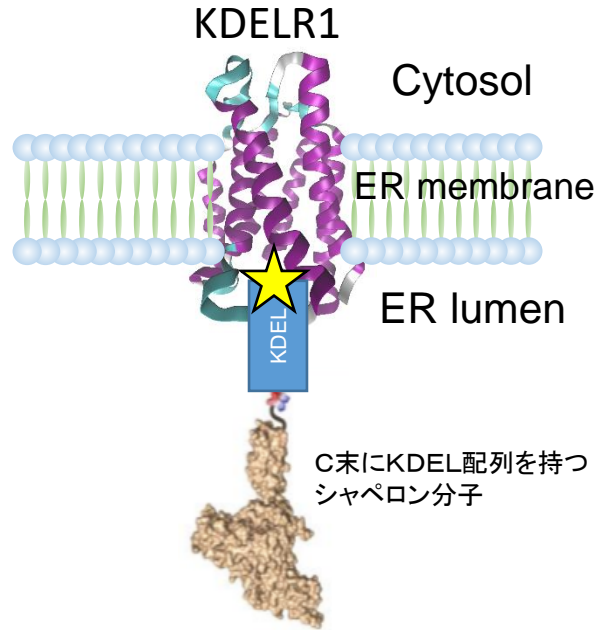


KDELR1は逆行性輸送に関与し、タンパク質の品質管理に関与する

●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)

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

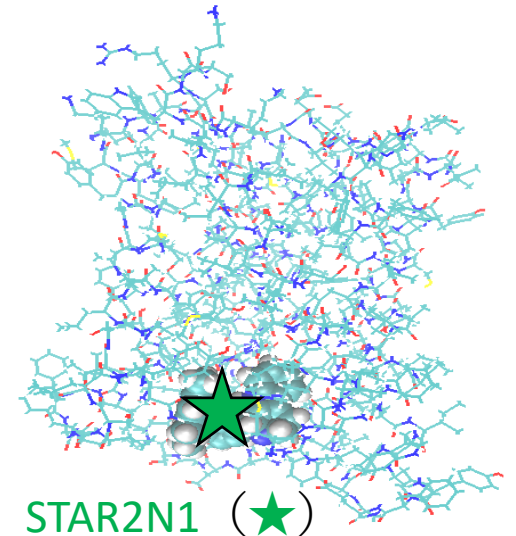


KDELR1の下流のMAPK-HIF axisを抑制する可能性

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

5. KDELR1について

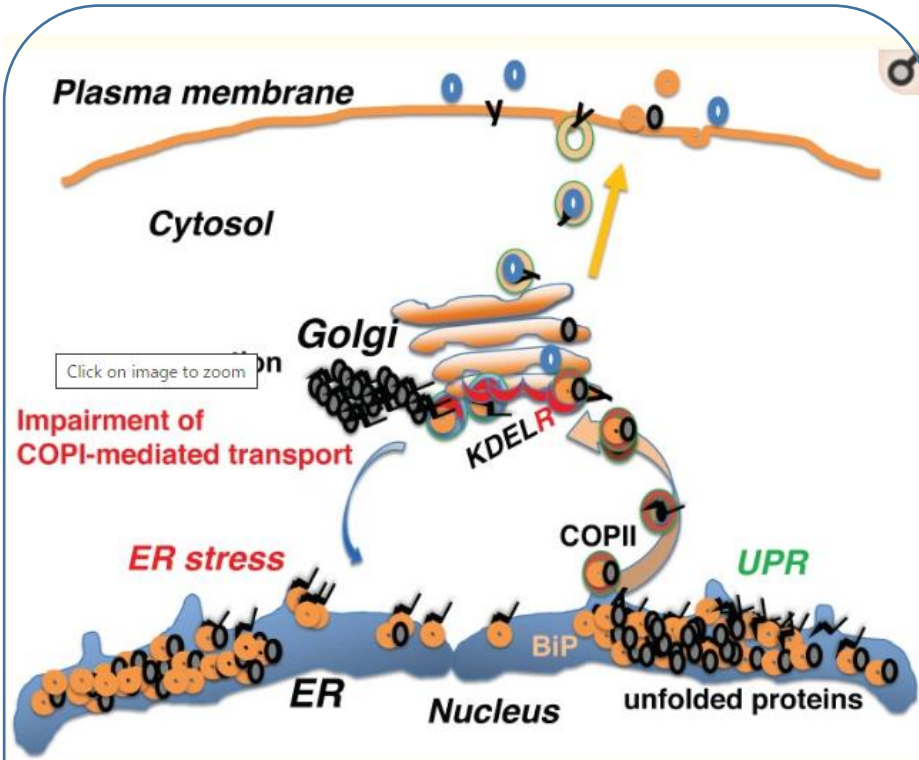
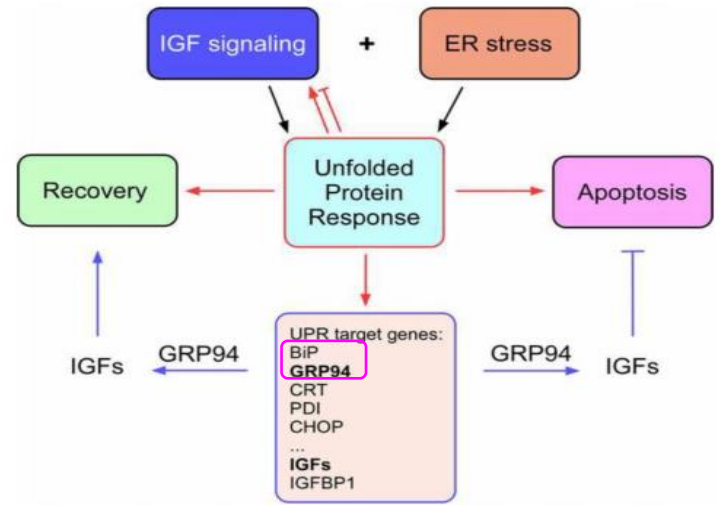


Figure 4

Dysfunction of COPI-mediated transport from the Golgi to the ER disrupts protein folding in the early secretory pathway, resulting in the accumulation of misfolded proteins and the subsequent induction of ER stress and the unfolded protein response (UPR).

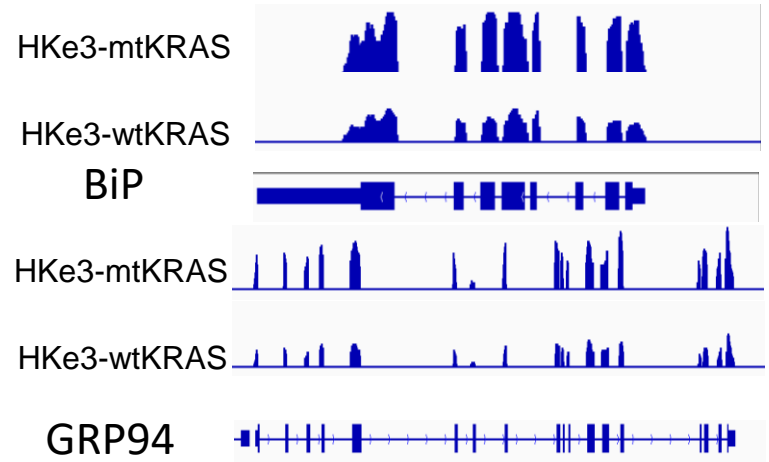
Kokubun et al. IJMS, 2019

Retrograde transportの減弱はER stressを誘導する。



Eletto et al. Semin Cell Dev Biol, 2010

変異KRASによるBiP, GRP94の発現上昇
3DF RNA-seq (Day6)

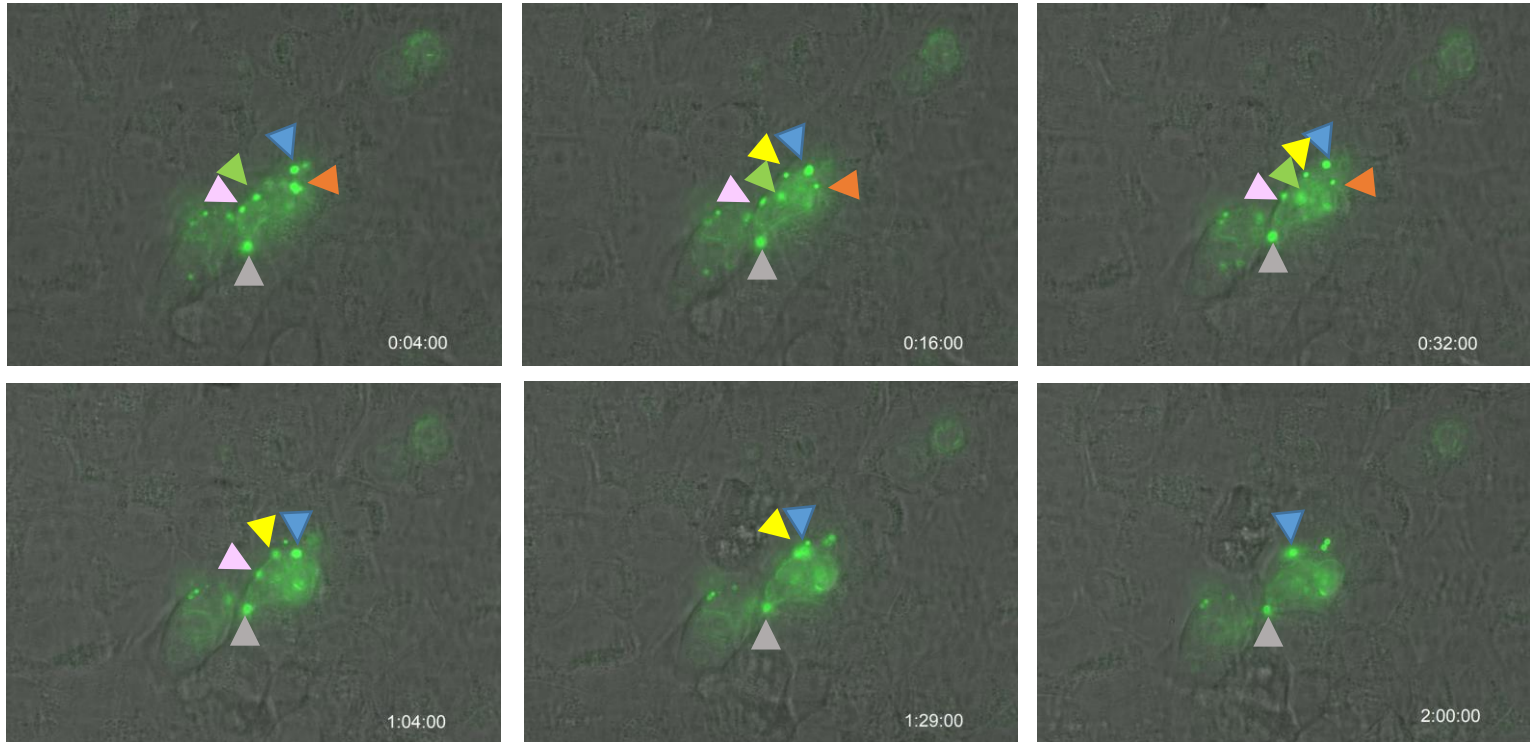


未発表データ

7. KDELR1について

HCT116-KDELR1-hAG, Ash-BIP におけるSTAR2(30 μ M)投与後のKDELR1-hAG+Ash-BIP複合体 (dot)の減少

time course (overlay)

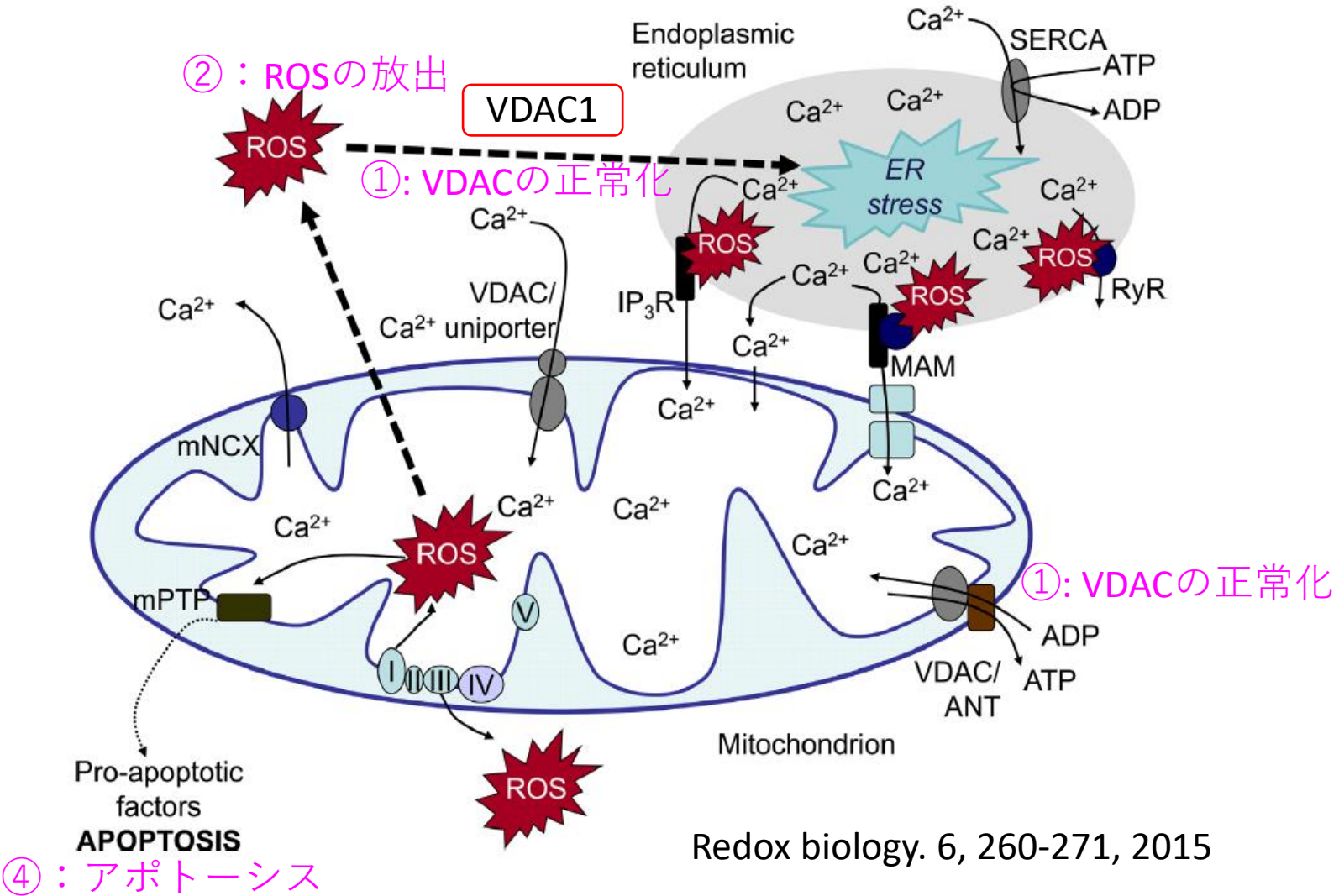


STAR2の競合阻害によりKDELR1-hAG+Ash-BIP複合体 (dot)が減少する (未発表データ)。

6. VDAC1とKDELR1を標的にすることによる効果

KDELR1

③ : ER stressの誘導



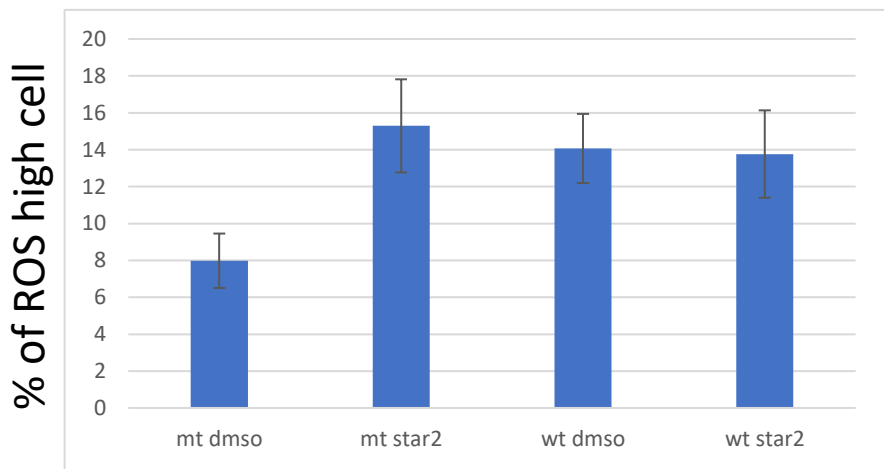
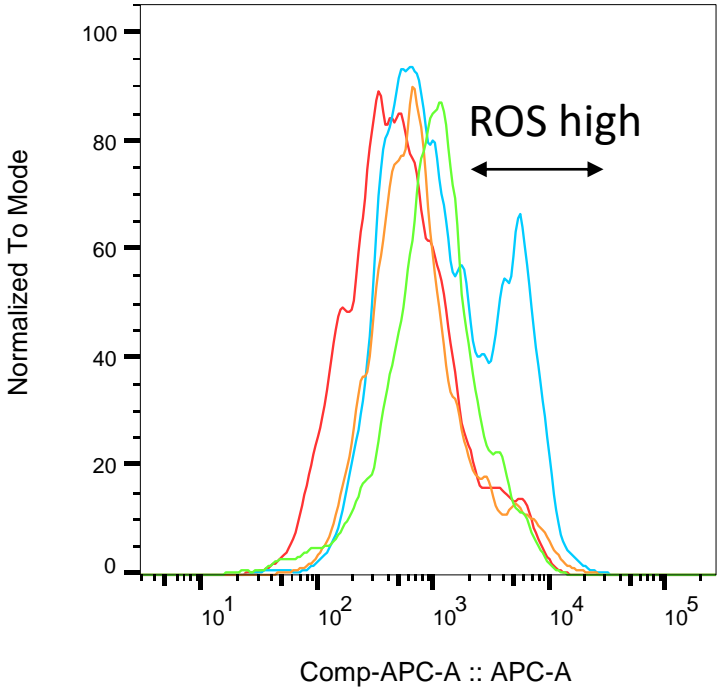
Redox biology. 6, 260-271, 2015

6. VDAC1とKDELR1を標的にすることによる効果

STAR2は最終的に 3次元浮遊培養にてROSを誘導する。

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

Cellular ROS Assay Kit (Deep Red)使用



	Sample Name	Subset Name	Count
■	wt star.fcs	APC-A subset	3598
■	wt dms0.fcs	sigle cells 2	5502
■	mt star.fcs	sigle cells 2	4103
■	mt dms0.fcs	sigle cells 2	6957

Wt typeのROSレベルに誘導される (未発表データ)。

7. その他

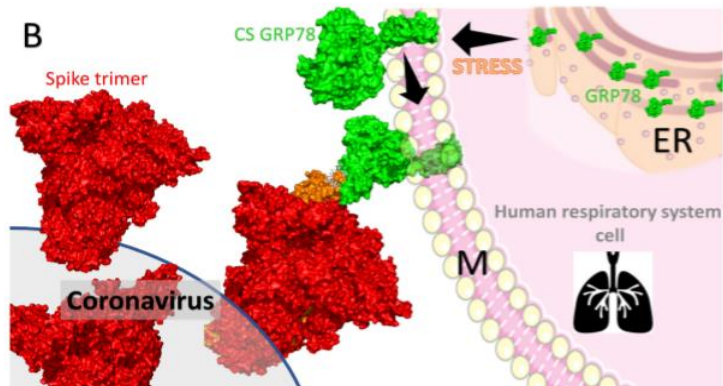
BiP/GRP78/HSP5Aに関して



COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction

Ibrahim M. Ibrahim^a, Doaa H. Abdelmalek^a, Mohammed E. Elshahat^a, Abdo A. Elfiky^{ab,*}

^a Biophysics Department, Faculty of Sciences, Cairo University, Giza, Egypt
^b College of Applied Medical Sciences, University of Al-Jouf, Saudi Arabia



Open Access Article

A KDEL Retrieval System for ER-Golgi Transport of Japanese Encephalitis Viral Particles

by Robert YL Wang^{1,2,*}, Yu-Jen Wu³, Han-Shan Chen² and Chih-Jung Chen^{4,1}

¹ Department of Biomedical Sciences and Molecular Medicine Research Center, Chang Gung University, Taoyuan 33302, Taiwan

² Graduate Institute of Biomedical Sciences, College of Medicine, Chang Gung University, Taoyuan 33302, Taiwan

³ Department of Food Science and Nutrition, Meiho University, Pingtung 91202, Taiwan

⁴ Division of Pediatric Infectious Diseases, Department of Pediatrics, Chang Gung Memorial and Children's Hospital, Linkou 33375, Taiwan

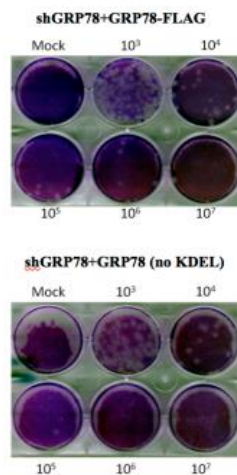
* Authors to whom correspondence should be addressed.

† These authors contributed equally to this work.

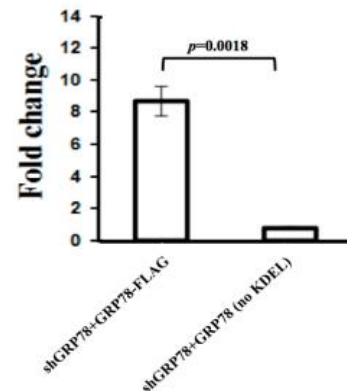
Academic Editor: Andrew Tai

Viruses 2016, 8(2), 44; <https://doi.org/10.3390/v8020044>

C. Infectivity



BIPのKDEL 配列を除去するとVirusの感染が減弱する
BIPはKDEL R1に結合して初めて機能を発揮する

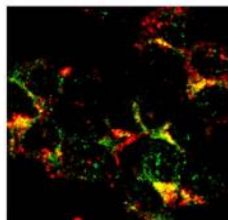


SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Involvement of voltage-dependent anion channel (VDAC) in dengue infection

Received: 07 September 2016
Accepted: 05 October 2016
Kunlakanya Jitobaom¹, Natthida Tongluan² & Duncan R. Smith^{1,2}

VDACとBIPはdengue virus感染時にミトコンドリアで共局在する。



STAR2はバキュロウィルスの感染も抑え（未発表データ）、エンドサイトーシス抑制を介した抗ウイルス効果も期待できる。

7. その他

In vivoでの有効濃度が比較的高いのに比べ、In Vivoでは比較的低濃度で効果を示している。



生体内における免疫賦活作用？

BiPの阻害によってmacrophageの抗腫瘍活性および免疫チェックポイント阻害薬の反応性が上昇する。

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 46), pp: 80545-80559

Research Paper

Unfolded protein response signaling impacts macrophage polarity to modulate breast cancer cell clearance and melanoma immune checkpoint therapy responsiveness

David R. Soto-Pantoja^{1,3}, Adam S. Wilson¹, Kenysha YJ. Clear¹, Brian Westwood¹, Pierre L. Triozzi^{2,3} and Katherine L. Cook^{1,3}



現在THP-1モデルを用いて検証中であり、腫瘍塊浸潤マクロファージの腫瘍増生効果を阻害する効果がSTAR2に認められている（未発表データ）。