

Doctoral dissertation

Antitumor effects and predictive marker identification  
for a novel non-ATP-competitive MEK1/2 selective inhibitor,  
SMK-17

March 2015

Masaki Kiga

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	木我 真基
主論文題目： Antitumor effects and predictive marker identification for a novel non-ATP-competitive MEK1/2 selective inhibitor, SMK-17 (新規 ATP 非拮抗型 MEK1/2 選択的阻害剤 SMK-17 の抗腫瘍活性と感受性規定因子同定)				
(内容の要旨)				
<b>(1) 研究背景</b> Ras/MEK/MAPK シグナル経路は、細胞の増殖/生存シグナルを制御する重要な経路であり、この経路を構成するキナーゼである MEK1/2 の上流には、複数の癌遺伝子が存在している。これら上流遺伝子の変異による恒常的活性化は、腫瘍細胞の悪性形質獲得に寄与していることが以前より知られていた。MEK1/2 に対する低分子阻害剤は複数存在していたが、癌治療薬として高活性でより選択性が高い化合物が求められていた。本研究では、新規 MEK1/2 選択的阻害化合物の取得、および MEK1/2 阻害薬の新たな感受性規定因子同定を試みた。				
<b>(2) 新規高活性 MEK1/2 阻害剤 SMK-17 の創出</b> 新規 MEK1/2 阻害剤の取得を目指し、化合物スクリーニングを行った結果、ジフェニルアミンスルファミド構造を持つ compound 1 を見出した。この化合物をリードに誘導体展開した 1,000 以上の類縁化合物の MEK 阻害活性および化学物性を評価した結果、高活性かつ高水溶性の化合物である SMK-17 を取得した。SMK-17 は、ヒト MEK1 に対する結合ドメイン解析から、MEK1 の ATP 結合ドメインとは異なるポケット構造に入りこみ、さらに ATP $\gamma$ リン酸とも相互結合していることが予想された。この知見は、SMK-17 が、他の多くの化合物で見られる ATP 結合競合とは異なる阻害様式を有していることを示唆していた。Kinetics 解析からも、SMK-17 が ATP 濃度によらず MEK1 を阻害できる ATP 非拮抗型の阻害剤であることが示された。さらに、233 種のキナーゼに対する阻害試験では、MEK1/2 以外のキナーゼを阻害せず (1000 nM でいずれも 30% 以下の阻害活性)、MEK1/2 に対して極めて特異性が高いことを確認した。さらに、SMK-17 は、BRAF 変異型大腸癌細胞 HT-29 に、 <i>in vitro</i> で増殖抑制活性を示した。この際、MEK 下流で制御されている cyclin D1 の発現低下による G1 期細胞周期停止を誘導した。 <i>In vivo</i> では、経口投与により HT-29 担癌マウスにおいて移植腫瘍の完全増殖抑制を示した。				
<b>(3) SMK-17 を用いた MEK1/2 阻害剤の感受性規定因子の同定</b> SMK-17 の詳細な感受性規定因子の同定を目的に、ヒト癌細胞株計 24 株の感受性プロファイリングを実施した。この結果、BRAF 活性化型変異だけではなく、 $\beta$ -catenin 活性化型変異を有する腫瘍細胞株ではアポトーシス誘導を伴う強い感受性を示すことが明らかになった。これをさらに検証するため、 $\beta$ -catenin 野生型細胞に、活性化型 $\beta$ -catenin を強制発現したところ (gain of function)、SMK-17 添加によりアポトーシスが誘導され、逆に $\beta$ -catenin 変異癌に、Wnt/ $\beta$ -catenin pathway 下流の TCF4 を不活化する dominant negative TCF4 を強制発現した結果 (loss of function)、アポトーシスが減弱された。ヒト腫瘍皮下移植モデルを用いた解析でも、上記の培養細胞の結果と同様に、ヒト大腸癌細胞株 SW48 や colo-205 のような $\beta$ -catenin 変異癌に特異的にアポトーシス誘導ならびに腫瘍退縮が確認された。これらのことから、 $\beta$ -catenin の活性化型変異が MEK1/2 阻害薬の新たな感受性規定因子となることが示唆された。				
<b>(4) 結論</b> 新規 MEK1/2 選択的阻害剤 SMK-17 を見出し、この化合物を使った解析から、 $\beta$ -catenin 変異が MEK1/2 阻害薬の新たな感受性規定因子となる可能性を見出した。本研究成果は、MEK1/2 阻害薬の $\beta$ -catenin 変異癌に対する新たな治療戦略を提案できると考えられた。				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name KIGA, Masaki
Title Antitumor effects and predictive marker identification for a novel non-ATP-competitive MEK1/2 selective inhibitor, SMK-17		
<p><b>Abstract</b></p> <p><b>(1) Background</b></p> <p>The Ras/MEK/MAPK signal is a well-known intracellular pathway that plays an important role in many intracellular responses such as cell proliferation and survival. Constant activation of the MAPK pathway, because of aberrant receptor tyrosine kinase activation and ras or BRAF mutations, is frequently found in human cancers and represents a major factor in determining abnormal cell growth. Some compounds have been approved including issues such as insufficient efficacies in clinical. Thus, we needed potent and highly selective MEK1/2 inhibitors at the time. In this thesis, the author documented antitumor activities and predictive marker identifications for a novel MEK1/2 selective inhibitor, SMK-17.</p> <p><b>(2) Creation of a novel potent MEK1/2 inhibitor, SMK-17</b></p> <p>The author obtained a very potent and novel MEK1/2 inhibitor, SMK-17 from a structure-activity correlation study from over 1,000 derivatives of diphenyl amine sulfonamide. The binding model showed that SMK-17 binds to an allosteric pocket adjacent to the ATP binding site. In addition, the protonated amine of this compound forms salt-bridges with the <math>\gamma</math>-phosphate of ATP. A kinase profiler using 233 kinases and kinetics study revealed that SMK-17 is a completely non-ATP-competitive and highly selective MEK1/2 inhibitor.</p> <p>SMK-17 exhibited potent antitumor activity against tumor models harboring mutated BRAF, such as HT-29 cells, both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> animal models by oral administration. SMK-17 selectively blocked the MAPK pathway signaling, which induced downregulation of cyclin D1 without affecting other signal pathways.</p> <p><b>(3) Predictive biomarker identification for a MEK1/2 inhibitor</b></p> <p>This study demonstrated that <math>\beta</math>-catenin mutation accelerates MEK1/2 inhibitor-induced apoptosis from the comprehensive cell line profiling study. SMK-17 induced apoptosis in tumor cell lines harboring <math>\beta</math>-catenin mutation at the effective concentration. To confirm the possibility of mutation of <math>\beta</math>-catenin as a prediction marker of the MEK inhibitor, the author evaluated the effects of dominant negative TCF4 (DN-TCF4) and active mutated <math>\beta</math>-catenin on MEK inhibitor-induced apoptosis. As a result, DN-TCF4 reduced MEK inhibitor-induced apoptosis (loss of function). In contrast, active mutated <math>\beta</math>-catenin accelerated MEK inhibitor-induced apoptosis (gain of function). The findings provided <math>\beta</math>-catenin mutation as a novel and important responder biomarker for the treatment of MEK1/2 inhibitors.</p> <p><b>(4) Conclusion</b></p> <p>These findings would provide the novel clinical usefulness of MEK1/2 inhibitor as single agents for the patients with tumors carrying the Wnt/<math>\beta</math>-catenin pathway mutation.</p>		