

201109006A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進（政策創薬探索）研究事業

rasがん遺伝子産物の新規立体構造情報に基づくがん分子標的治療薬の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片岡 徹

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
<i>ras</i> がん遺伝子産物の新規立体構造情報に基づくがん分子標的治療薬の開発	1
片岡 徹	
II. 分担研究報告	
1. Ras機能阻害活性を有する化合物の同定ならびに化合物の構造展開と 生化学・細胞生物学的作用メカニズムの解析に関する研究	7
島 扶美	
2. Ras機能阻害活性を有する化合物の有機化学合成による 構造展開に関する研究	11
関 正博	
3. Ras機能阻害作用を有する低分子化合物とRasとの複合体のNMRによる 立体構造解析に関する研究	13
田村 厚夫	
4. <i>ras</i> がん遺伝子産物を標的とした治療薬開発のための X線結晶構造解析に関する研究	16
熊坂 崇	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

I . 総括研究報告

総括研究報告書

rasがん遺伝子産物の新規立体構造情報に基づくがん分子標的治療薬の開発

研究代表者 片岡 徹 神戸大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 我々は、背景となる研究において、独自に発見した Ras のポケット構造情報に基づくコンピュータシミュレーションと生化学・細胞生物学的検証試験を駆使した独自の大規模 Ras 阻害物質探索研究を通じて、担がん動物において強力な腫瘍増殖抑制効果を示し、低毒性かつ経口薬適性に優れたリード化合物の同定に成功した。本研究では、背景となる研究で獲得・保有するリード化合物から医薬品開発候補獲得のための構造最適化を重点的に行う（先行開発）。また、最近決定した新規ポケット構造情報を用いた新たなインシリコスクリーニングと一連の検証試験も行い、本格的な前臨床試験に入る候補品を創出する（後行開発）。H23 年度、先行開発については、保有リード化合物の特許出願を完了（特願 2011-105613）、構造最適化研究を効率的に推進するためのパートナーとして製薬企業（国内大手 1 社）の選定を概ね完了した。また出願済み特許化合物と Ras との複合体の核磁気共鳴法（NMR）による立体構造決定に成功し、この情報を用いた理論的構造最適化研究を推進するとともに、特許化合物の構造安定性評価試験を通じて、化合物の構造バリエーション拡大に成功し出願済み特許の補強が可能になった。さらに、出願済み特許化合物の生化学・細胞生物学的新規作用メカニズムを解明するとともに、既存薬にはない新規薬効として腫瘍転移抑制作用を発見した。後行開発については、新たなインシリコ・生化学・細胞学的スクリーニングを実施し、構造バリエーションに富んだ複数の新規ヒット化合物の同定に成功した。

研究分担者

島 扶美 神戸大学大学院医学研究科
准教授

関 正博 神戸天然物化学株式会社
創薬化学部長

田村 厚夫 神戸大学大学院理学研究科
准教授

熊坂 崇 高輝度光科学研究センター
副主席研究員

性型（Ras-GDP）と、GTPと結合した活性型（Ras-GTP）の2種類のヌクレオチド結合型がある。細胞外刺激によりグアニンヌクレオチド交換因子の働きを介してGDP型からGTP型への変換が起こり、Ras-GTPはRaf, RalGDS, PI-3キナーゼ (PI3K) などの複数の標的蛋白質との結合と活性化を通じて、下流へのシグナル伝達を行う。

日本国民の死因第1位を占めるがんの約20%において、上記3つのアイソフォームのいずれかの遺伝子の突然変異によるRasの恒常的活性化が認められることから、Rasは抗がん剤開発上格好の分子標的と考えられるが、これまでに開発の成功例はない。我々は、Rasの新規立体構造の解析を通じて、Ras-GTPの分子表面に薬剤開発のターゲットとなりうる特異的ポケット構造が存在することを独自に発見し、このポケット構造情報に基づくコンピュータ（インシリコ）・ドッキングシミュレーションと生化学・細胞生物学的検証試験を駆使した独自の大規模Ras機能阻害物質探索研究を行った結果、担がん動物において強力な腫瘍増殖抑制効果を示し、低毒性かつ経口薬適性に優れたリード化合物の同定に成功した。本研究（H23年度）

A. 研究目的

rasがん遺伝子産物Rasは、低分子量G蛋白質ファミリーの一員であり、細胞増殖・分化など数多くの細胞内シグナル伝達に関与する。ヒトではH-Ras, K-Ras, N-Rasの3つのアイソフォームが存在し、M-Ras, Rap1, Ralなどの類縁蛋白質とともにRasファミリーを形成する。RasにはGDPと結合した不活

では、この背景となる研究により獲得して現在保有するリード化合物 (KMR084) から医薬品開発候補獲得のための構造最適化研究を重点的に行うとともに、成果物の導出先となる国内製薬企業を選定し、効率的な構造最適化をはかるための研究体制、研究内容の分業化について協議する(先行開発)。また、新規ポケット構造情報を用いた新たなインシリコスクリーニングと活性検証試験も実施し、新規ヒット化合物を同定する(後行開発)。

独自の方法論に基づく本研究開発を強力に推進することにより、革新的な医薬品開発候補品が得られれば、厚生労働省が掲げる施策の基本目標 I 「安心・信頼してかかれる医療の確保と国民の健康づくりを推進すること」の施策大目標 8 「新医薬品・医療機器の開発を促進するとともに、医薬品産業等の振興を図ること」への直接的な貢献が見込まれる。

B. 研究方法

先行開発

1) X線結晶解析ならびに多核多次元NMRにより、リード化合物 (KMR084) ならびにその誘導体とH-Ras-GTPとの複合体の立体構造を決定するとともに、その立体構造情報に基づいて、リード化合物の理論的構造最適化研究を行う。X線結晶解析では、KMR084 (及びその誘導体) を、野生型H-Rasならびに野生型と比較して立体構造がより安定となるアミノ酸置換を導入した変異型H-Ras溶液に加えて共結晶化を試みるとともに、成長した結晶を化合物溶液に浸漬させること(ソーキング)で、複合体結晶を作製し、大型放射光施設SPring-8のビームラインBL41XUあるいはBL38B1にてX線回折実験を行って立体構造を決定する。多核多次元NMRでは、¹⁵N, ¹³C原子で標識した変異型H-Rasを使用し、KMR084 (及びその誘導体) との分子間で生じる核オーバーハウザー効果 (NOE) を抽出し、それらのシグナル強度を取り入れた立体構造計算を行うことでRas-KMR084複合体構造を決定する。

上記研究で得られたKMR084が結合する分子表面ポケット(ポケット2)の構造情報と、Ras分子上の標的蛋白質結合界面とオーバーラップするもう一つの分子表面ポケット(ポケット1)の構造情報の両方を利用し、ポケット1とポケット2の両方に結合する化合物を、フラグメントリンク法を用いてインシリコデザインし、結合親和力を増強させることを試みる(フラグメントリンク法)。また、構造安定性試験などを通じた構造最適化研究も実施し、出願済み化合物特許(特願2011-105613)の補強を行う。

2) Rasの下流に位置し、細胞がん化において重要な役割を果たすRaf以外の標的蛋白質(Ral-GDS,

PI3K) を介するシグナル伝達系へのリード化合物の作用とその分子機序を解析する。さらに、Rasの上流に位置し、Rasのヌクレオチド交換反応を制御するグアニンヌクレオチド交換因子Sosへのリード化合物への作用とその機序も解析する。

3) がん転移の動物モデルを用いて、リード化合物のがん転移抑制作用を評価するとともに、その作用機序を解析する。

4) 背景となる研究で獲得・保有するリード化合物の特許を出願するとともに、秘密保守契約(CDA)締結下に情報提供を行い、興味を示した製薬企業に対して物質移動合意書(MTA)締結下に保有リード化合物を提供して製薬企業独自のRas機能阻害評価を実施し、協力研究に合意した企業と特許導出ならびに共同研究体制と研究内容について協議する。

後行開発

出願済み特許(PCT/JP/2010/61821及びPCT/JP2012/052078)に記載した新規ポケット構造情報を用いた新たなコンピュータ・ドッキングシミュレーションと生化学・細胞学的活性検証試験により新規ヒット化合物を同定する。

(倫理面への配慮)

本研究が該当する遺伝子組換え実験と動物実験については、それぞれ神戸大学の遺伝子組換え実験安全委員会及び動物実験倫理委員会での審査と承認を得ている。

C. 研究結果

先行開発 (番号はBの内容に対応)

1) Ras-リード化合物複合体の立体構造解析とリード化合物の理論的構造最適化研究ならびに出願済み特許の補強 :

①比較的可溶性の低いリード化合物(KMR084)とRasとの複合体のX線結晶解析を行うために、変異型H-Ras-GTPとdimethylsulfoxide (DMSO) に可溶化したKMR084溶液を混合し、蒸気拡散法による共結晶化を行ったが、複合体の結晶は得られなかった。次に、あらかじめ蒸気拡散法により結晶化した変異型H-Ras-GTPの結晶溶液に、直接KMR084あるいはその複数の誘導体の粉末を直接加えたところ、結晶に着色がみられたことから化合物の結晶相への移行が観測された。これらの結晶溶液を用いてSPring-8 (BL38B1等) でX線回折実験を行ったが、化合物に相当する電子密度は得られなかった。水溶性の低いリード化合物ならびにその誘導体は、DMSO非存在下では蛋白結晶溶液中において、H-Rasと1:1で結合するに十分な濃度で溶解していない可能性が示唆された。

溶解度の低いリード化合物を高濃度可溶化する

ために10~30% DMSOを溶剤として可溶化し、変異型H-Ras-GTPの蛋白質結晶溶液に加えたところ、DMSOに起因する蛋白質結晶の劣化が確認されたため、結晶内Ras分子間架橋（クロスリンク法）を行い、結晶強度の補強を試みた。この方法により得られた変異型H-Ras-GTPの結晶溶液に種々の濃度のDMSOを添加しX線折実験を行ったところ、50% DMSO存在下でも比較的明瞭な回折データが得られ、Rasの立体構造解析が可能であることが確認できた。クロスリンク処理を行ったRasの結晶に10~30%のDMSOに可溶化したリード化合物ならびにその誘導体をソーキングし、SPRING-8（BL38B1等）にて試験的に回折実験を行ったが、化合物の電子密度検出には至らなかった。しかし、測定温度等の条件検討が十分ではなかったことから、今後、測定条件をさらに検討・最適化し、回折実験を再度実施する必要があると考えられた。

②安定同位体¹⁵Nならびに¹³Cで標識した変異型H-Ras-GTP溶液に、リード化合物KMR084を加えて多核多次元NMRを行ったが、化合物の溶解度が低く化合物とRasとの結合情報は得られなかった。しかし、KMR084の1原子誘導體KMR112を用いて同様の実験を行ったところ、Ras分子上の種々の標的蛋白質との結合界面の極めて近傍に存在する分子表面ポケットを構成する複数のアミノ酸残基に化合物が直接結合していることが確認され、Ras-化合物複合体の立体構造モデルの構築が可能となった。KMR084の他の誘導體KMR140とKMR333についても同じポケットへの結合が確認され、この系統の化合物がRasに結合する際に重要な部分構造が明らかになった。一方、KMR084と母核構造は異なるが類似した部分構造を有する別の化合物についても同様の結果が得られたことから、本研究で確認されたRas上の化合物結合ポケット（ポケット2と命名）は、Ras阻害剤の作用点として極めて重要なものと考えられた。一連の化合物はそれらが有する疎水性の部分構造とRasとの疎水性相互作用を介して、結合状態を安定化していることが確認された。

③KMR084が結合する上述のポケット（ポケット2）の構造情報と、Ras分子上の標的蛋白質結合界面とオーバーラップするもう一つの分子表面ポケット（ポケット1）の構造情報の両方を利用し、ポケット1とポケット2の両方に結合する化合物を、フラグメントリンク法を用いてインシリコデザインし、結合親和力を増強させることを試みた。ポケット1に結合するフラグメント（フラグメント1）、ポケット2に結合するフラグメント（フラグメント2：KMR084の部分構造を使用）をデザインし、2つのフラグメントを種々の長さのリンカーを介して結合した新規デザイン化合物と変異型

H-Ras-GTPとの結合自由エネルギー値を予測計算した。このシミュレーション結果を参考に、KMR084の25種類の新規誘導體を実際に有機化学合成し、試験管内でのRas-Raf結合阻害活性を評価したところ、14化合物については阻害活性が確認できたため、実施例追加による出願済み化合物特許（特願2011-105613）の補強をH24年度前半に完了予定である。しかし、KMR084を上回る活性を示す化合物の獲得には至らなかった。

④KMR084ならびにその誘導體の活性は、pHが8を超える条件下では、構造・活性ともに不安定になることが見出された。KMR084の種々の誘導體の分解パターンを質量分析により解析したところ、pH安定性に重要な役割を持つ部分構造が明らかになった。この構造安定化のための部分構造を有する誘導體を新たに複数合成し、生化学・細胞生物学的試験により活性が確認できた新規化合物（1化合物）について、出願済み化合物特許（特願2011-105613）を補強するための実施例追加をH24年度前半に完了予定である。

2) Rasの上流・下流に位置する複数の蛋白質を介するシグナル伝達へのリード化合物の作用の生化学・細胞学的解析：

我々のNMR解析により得られたKMR084誘導體と変異型H-Ras-GTPとの複合体の立体構造情報と、Rasの上流・下流に位置する複数の結合パートナー（グアニンヌクレオチド交換因子ならびに標的蛋白質）とRas-GTPとの複合体の既知の立体構造情報とを比較することにより、KMR084は、これらの結合パートナーのRasとの結合を競合的に阻害することにより、活性を抑制することが強く示唆された。これを検証するため、以下の生化学・細胞生物学的活性検証試験を行った。

①Rasの下流で細胞がん化に関与する標的蛋白質の1つRalGDS（Rasファミリーに属するRalのグアニンヌクレオチド交換因子）へのKMR084の作用を評価するために、化合物処理した2種類のがん細胞株（恒常的活性型変異体H-RasG12Vを有するマウス繊維芽細胞株ならびに恒常的活性型変異体K-RasG12Vを有するヒト大腸がん細胞株）から細胞破碎液を調製し、Ralの標的蛋白質Sec5によるブルダウンアッセイにより活性型Ral（Ral-GTP）の定量を行ったところ、KMR084の濃度依存性にRal-GTP量の低下が認められた。また、化合物処理により、PI3Kの下流分子であるAKTのリン酸化型（活性化型）の減少も認められたことから、KMR084は、Rafのみならず、RalGDSとPI3Kを含む複数の標的蛋白質を介するがん化シグナルの抑制作用を持つことが示唆された。

②細胞増殖因子などの細胞外刺激に応じてRasを活性化する上流調節因子（グアニンヌクレオチド

交換因子、GEF)であるSosは、そのCdc25 (GEF触媒) ドメインによってRas-GDPと結合し、Ras-GTPへの変換 (GDP/GTP交換反応) を促進する。一方、Sosが、そのREMドメインによってRas-GTPと結合することにより、アロステリックにGDP/GTP交換反応が促進される。マウスSos (mSos1) 及びそのREMドメインにアミノ酸置換を導入したmSos1変異体を用いた解析の結果、KMR084は、H-Ras-GDPに対するGDP/GTP交換反応自体には影響がないが、Ras-GTP依存性の交換反応促進効果を強く阻害することがわかった。

以上の結果より、KMR084はRas-GTPに選択的に作用し、標的蛋白質 (Raf, RalGDS, PI3K) を介する下流のシグナル伝達のみならず、調節因子 (Sos) を介する上流のシグナル伝達も阻害することが証明された。

3) リード化合物の新規薬効としての腫瘍転移抑制作用:

恒常的活性型変異体K-RasG12Vを有するヒトヒト大腸がん細胞 (遠隔転移を起こしやすい細胞株) をヌードマウスに尾静注し、肺での転移腫瘍形成を観察するがん転移モデルシステムを用いた解析により、KMR084は、既存の分子標的がん治療薬のsorafenib (Raf, と VEGF受容体などの阻害剤) には見られない腫瘍転移抑制作用が確認された。化合物を投与した担がん動物から採取した腫瘍組織では、腫瘍の転移と密接な関係が示唆される lysyl oxidase (LOX) の遺伝子発現の著明な抑制が見られた。また、Ras阻害活性を有するが母核構造がKMR084とは全く異なる化合物にもLOXの発現抑制作用が認められたことから、LOX発現抑制ならびに腫瘍転移抑制はRas阻害剤に特異的な作用である可能性が示唆された。

4) 既に保有し、初期薬物動態試験・毒性試験を概ねクリアしたリード化合物KMR084とその誘導体については、H23年5月に化合物特許の出願を完了 (特願2011-105613) した。また、国内外4社の大手製薬企業に対してCDA締結下に情報提供を行い、興味を示した3社に対してMTA締結下に保有リード化合物を提供して製薬企業独自のRas機能阻害評価を実施し、特許導出と協力研究について協議した結果、国内大手製薬企業1社と大筋合意した。現在、特許 (特願2011-105613を含め本開発に関する3件の保有特許) の導出ならびに協力研究内容と研究体制 (分業化を含む) の詳細について協議段階にある。

後行開発

ファルマデザイン社による理論計算科学解析 (外注) により、以下の2種類のシミュレーションを実施し、その結果に基づき候補化合物を選抜した。
シミュレーション1: 出願済み特許 (PCT/JP/2010/

61821ならびにPCT/JP2012/052078) に記載の変異型H-Ras-GTPの新規ポケット構造 (結晶構造ならびにNMR構造) 情報を用いて、PDBLigandExpoに登録されるリガンドから、リガンドの基本骨格となるフラグメントを抽出した。これらのフラグメント構造を持つ化合物を市販のライブラリーから選択したのち、変異型H-Ras-GTPとの予測結合エネルギーが妥当で、かつ相互作用の核となる残基群との水素結合の形成が予測される約200種類の化合物を選抜して購入した。購入化合物について生化学・細胞生物学的活性検証試験を実施したところ、5種類以上の母核構造を有する複数のヒット化合物の同定に成功した。

シミュレーション2: 出願済み特許 (PCT/JP2012/052078) に記載のRas阻害作用を持つ化合物ならびに前述の3種類のKMR084誘導体と、変異型H-Ras-GTPとの複合体のNMR立体構造情報を用いた分子動力学的 (MD) シミュレーションにより、ポケットの初期構造を発生させ、市販化合物のバーチャルライブラリーから約5万種類の化合物を選抜した。次に、Rasと複数の標的蛋白質との結合界面に存在するアミノ酸残基情報を用いて、標的蛋白質との結合を競合阻害するようなRasとの相互作用が期待される化合物の絞り込みを行い、約500個の化合物を選抜した。うち上位200個について現在購入中である。

D. 考察

リード化合物の構造展開の効率的推進にとって有用な高精度の構造情報が得られるX線結晶解析による化合物-Ras複合体の立体構造の解明には至っていないが、多核多次元NMRを利用することにより、リード化合物KMR084 (実際には1原子異なる誘導体KMR112) 及びその2種類の誘導体とRasとの複合体の立体構造が解明された。化合物とRasとの相互作用様式を詳細に解析することにより、相互作用に関わるRas蛋白質側のポケット (ポケット2) ならびに化合物側の部分構造が明らかになった。また、母核構造がKMR084とは異なる化合物とRasとの複合体のNMR構造との比較研究を通じて、相互作用に重要なKMR084内の部分構造にはある程度の構造バリエーションが許容されることも明らかになった。一方、母核構造が異なる化合物も同じポケットに結合することから、ポケット2はRas阻害剤の結合認識にとって極めて重要な構造領域であることが示唆された。

本研究で解明されたこの複合体の立体構造情報を実際に利用したフラグメントリンク法と新規誘導体の合成・活性検証試験を通じて、リード化合物の構造空間の拡大が可能になった。また、リード化合物の水溶液中での安定性を詳細に解析する

ことにより、化合物の構造・活性安定化に重要な役割を果たす部分構造が同定された。これらの結果を踏まえた、新たな誘導体の有機化学合成と活性検定を通じて、新規の活性化合物の獲得に成功し、出願済み化合物特許の補強の可能性が広がった。

リード化合物の生化学・細胞生物学的作用機序の詳細な解析を通じて、リード化合物はRasの複数の標的蛋白質のみならず、Rasの上流活性調節因子を阻害することにより、極めて効率的にRasを介するシグナル伝達を阻害することが明らかになった。また、リード化合物の新たな薬効として、腫瘍転移抑制作用が確認されるとともに、転移関連遺伝子の発現抑制も見い出された。今後、化合物による転移抑制の分子作用機構を、LOX発現抑制の意義も含め、細胞生物学的手法を用いて詳細に解析する予定である。

出願済み特許に記載した、Ras本体及びRas-化合物複合体に係る新規立体構造情報に基づき、2つの異なった構造計算科学的手法を駆使した新たな母核探索研究を開始した。化合物の購入ならびに活性評価は未だ半数に留まっているが、既に新規母核構造を有する複数のヒットの検出に至っている。今後、複合体の立体構造解析による新規ヒット化合物の結合様式の解析を進めるとともに、初期構造展開を通じて真のヒットを見極めることが必要と考えられた。

E. 結論

平成23年度の達成目標としていた保有リード化合物ならびにその誘導体に係る化合物特許出願については、H23年5月に完了（特願2011-105613）した。また、CDA締結下に国内外4社の大手製薬企業と交渉を開始し、MTA締結下でのリード化合物の活性評価、特許導出と協力研究についての協議を通じて、構造最適化研究のパートナーとして国内大手製薬企業1社の選定も完了した。現在、特許導出条件、協力研究体制および研究内容の細部について協議中である。

フラグメントリンク法ならびにリード化合物の構造安定性評価を通じて、リード化合物の構造バリエーションの拡大に成功し出願済み化合物特許の補強が可能になった一方で、KMR084を上回る活性を示す化合物の創出には至っていない現状にある。また、フラグメントリンク法を利用した理論的構造最適化及び有機化学合成による活性評価については、本年度内にはまだ一部しか実施できていない。よって、今後は、特許導出予定の国内大手製薬企業との慎重な協議の上、協力研究の範囲内で、フラグメントリンク法を初めとするRas-化合物複合体立体構造情報を利用した理論計算科学

的手法を、従来のMed Chemによる有機化学の経験的手法と融合させた新たな手法を用いて、構造最適化研究をこれまで以上に強力に推進し、KMR084の活性を上回る新規誘導体を創出することが必須であると考えられる。

新規ポケット構造情報に基づく新たなスクリーニングでは、既に複数のヒットならびに新たな母核構造の同定に至っている。今回のスクリーニングでは、将来的な構造展開での構造空間の拡大を見据えて、インシリコスクリーニングの段階では分子量の比較的小さな化合物（分子量300前後）を選抜したため、現状のヒットはRasに対する結合親和力が予想通り比較的弱く、生化学・細胞生物学的活性も従来のヒット（分子量500前後）と比較して弱い傾向にあるが、今後、Rasとの複合体の立体構造解析（X線結晶解析ならびに多核多次元NMR）情報を利用した初期構造展開を通じて、フラグメントリンク法などを利用した効率的な活性改善に向けた研究を実施する。母核構造自体が、保有リード化合物とは異なるため、新規リードの創出ならびに新たな特許出願が期待される。また、先に解明したポケットならびに化合物の立体結合情報（NMR構造）を利用することにより、新規誘導体の構造空間のさらなる拡大も期待できる。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Araki M, Shima F, Yoshikawa Y, Muraoka S, Ijiri Y, Nagahara Y, Shirono T, Kataoka T, Tamura A. Solution Structure of the State 1 Conformer of GTP-bound H-Ras Protein and Distinct Dynamic Properties between the State 1 and State 2 Conformers. *J. Biol. Chem.* 286, 39644-39653 (2011)

Matsumoto K, Shima F, Muraoka S, Araki M, Hu L, Ijiri Y, Hirai R, Liao J, Yoshioka T, Kumasaka T, Yamamoto M, Tamura A, Kataoka T. Critical roles of interactions among switch I-preceding residues and between switch II and its neighboring alpha-helix in conformational dynamics of the GTP-bound Ras family small GTPases. *J. Biol. Chem.* 286, 15403-15412. (2011)

Harada Y, Edamatsu H, Kataoka T. PLC ϵ cooperates with the NF- κ B pathway to augment TNF α -stimulated CCL2/MCP1 expression in human keratinocyte. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 414, 106-111 (2011)

Oka M, Edamatsu H, Kunisada M, Hu L, Takenaka N, Sakaguchi M, Kataoka T, Nishigori C. Phospholipase

Cε has a crucial role in ultraviolet B-induced neutrophil-associated skin inflammation by regulating the expression of CXCL1/KC. *Lab. Invest.* 91, 711-718 (2011)

Bilasy SE, Satoh T, Terashima T, Kataoka T. RA-GEF-1 (Rapgef2) is essential for proper development of the midline commissures. *Neurosci. Res.* 71, 200-209 (2011)

Edamatsu H, Takenaka N, Hu L, Kataoka T. Phospholipase Cε as a potential molecular target for anti-inflammatory therapy and cancer prevention. *Inflamm. Regen.* 31, 370-374 (2011)

2. 学会発表

Araki M, Shima F, Yoshikawa Y, Muraoka S, Ijiri Y, Nagahara Y, Shirono T, Tamura A, Kataoka T. Solution structure of the state 1 conformer of GTP-bound H-Ras protein and distinct dynamic properties between the state 1 and state 2 conformers. *Biophysical Society 56th Annual Meeting*. Pos-L1 SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA, FEBRUARY, 2012 (ポスター)

Kataoka T. New strategies for development of anti-cancer drugs targeting the Ras Pathway. The 2nd International Symposium on Cancer and Cancer Stem Cells Research in Toyama. 富山大学 (富山県) 2012年2月28日 (招待講演)

Kataoka T. Universal roles of phospholipase Cε in carcinogenesis and inflammation. 2011 Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell signaling and Gene Regulation. (Tainan, Taiwan) Nov. 19-22, 2011 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

①名称：Ras機能阻害剤のスクリーニング方法
発明者：片岡徹、島扶美、田村厚夫、荒木望嗣
出願番号：PCT/JP2012/052078 (特願2011-023695)
出願日：平成24年1月31日 (優先日：平成23年2月7日)

②名称：微小試料用キャピラリー
発明者：熊坂崇、牧野正知、桑本いづみ、山本雅貴
出願番号：特願2012-18603
出願日：平成24年1月31日

③名称：MUTANT RAS POLYPEPTYDE CRYSTAL
発明者：Tohru Kataoka, Fumi Shima, Atsuo Tamura, Takashi Kumasaka
出願番号：US13/383835 (特願2009-165717)

出願日：平成24年1月12日 (優先日：平成21年7月14日)

④名称：非公開希望により未記載
発明者：片岡徹、島扶美、関正博、笹原大輔
出願番号：特願2011-105613
出願日：平成23年5月10日

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
特記事項なし。

II. 分担研究報告

分担研究報告書

Ras機能阻害活性を有する化合物の同定ならびに化合物の構造展開と
生化学・細胞生物学的作用メカニズムの解析に関する研究

研究分担者 島 扶美 神戸大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨 我々は、背景となる研究で、独自に発見した Ras のポケット構造情報に基づくコンピュータシミュレーション（インシリコスクリーニング）と生化学・細胞生物学的活性検証試験を利用した独自の大規模 Ras 阻害物質探索研究を通じて、担がん動物において強力な腫瘍増殖抑制効果を示し、低毒性かつ経口薬適性に優れたリード化合物の同定に成功した。本研究は、背景となる研究で獲得したリード化合物から医薬品開発候補獲得のための構造最適化を重点的に実施して医薬品開発候補品獲得を目指す先行開発と、申請者らが最近決定した新規ポケット構造情報を用いた新たなインシリコスクリーニングと一連の検証試験を通じて本格的な前臨床試験に入る候補品を創出する後行開発から構成される。H23 年度、先行開発については、出願済み特許化合物（特願 2011-105613）と Ras との複合体の核磁気共鳴法（NMR）による立体構造決定に成功し、この情報を用いた理論的構造最適化を推進するとともに、特許化合物の構造安定性評価試験を通じて、化合物の構造バリエーション拡大に成功した。さらに、出願済み特許化合物の腫瘍増殖抑制に係る新たな生化学・細胞学的作用を解明するとともに、既存薬にはない新規薬効として腫瘍転移抑制作用を発見した。後行開発については、新たなインシリコ・生化学・細胞学的スクリーニングを実施し、選抜 200 化合物より構造バリエーションに富んだ複数の新規ヒット化合物同定に成功した。

A. 研究目的

A. 研究目的

rasがん遺伝子産物Rasは、低分子量G蛋白質であり、細胞増殖・分化、細胞死、細胞運動など数多くの細胞内シグナル伝達に関与する。ヒトではH、K、N-Ras 3つのアイソフォームが存在し、M-Ras, Rap, Ralなどの類縁蛋白質とともにRasファミリーを形成する。RasにはGDPと結合した不活性型（Ras-GDP）と、GTPと結合した活性型（Ras-GTP）の2種類のヌクレオチド結合型がある。細胞外刺激によりグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）の働きを介してGDP型からGTP型への変換が起こり、Ras-GTPはRaf, RalGDS, PI3Kなど複数の標的蛋白質との結合・活性化を通じて、下流へシグナル伝達を行う。

多くのヒトのがん（がん全体の約20%）でRasの活性化が認められることから、Rasは抗がん剤開発上格好の分子標的と考えられてきたが、これまでに抗がん剤開発の成功例はない。我々は、Rasの新規立体構造解析を通じて、Ras-GTPの分子表面に薬剤開発のターゲットとなりうる特異的ポケット構造が存在することを独自に発見し（Ye et al. *J. Biol. Chem.* 2005）、このポケット構造情報に基づ

くコンピュータシミュレーションと生化学・細胞生物学的検証試験を駆使した独自の大規模Ras機能阻害物質探索研究を行った結果、担がん動物において強力な腫瘍増殖抑制効果を示し、低毒性かつ経口薬適性に優れたリード化合物の同定に成功した（背景となる研究）。本研究（H23年度）では、背景となる研究で獲得し、現在保有するリード化合物から医薬品開発候補獲得のための構造最適化を重点的に行う（先行開発）。また、新規ポケット構造情報を用いた新たなインシリコスクリーニングと活性検証試験もH23年度内に実施し、新規ヒット化合物を同定する（後行開発）。

B. 研究方法

先行開発：

①Rasとリード化合物（KMR084）との複合体の立体構造を決定するために、リード化合物の複数の誘導体とH-Rasとの共結晶化を行い、放射光（SPring-8）によるX線回折実験を行う。また、溶解度の低い化合物を可溶化する溶剤DMSOによる蛋白結晶のダメージを回避するための共結晶化方法として、クロスリンク法の有効性を検討する。

② 多核多次元NMRを用いたリード化合物

(KMR084)の誘導体とRas-GTPとの複合体の立体構造情報ならびに、Rasと標的蛋白質との結合界面の立体構造情報に基づいて、フラグメントリンク法を利用したリード化合物の構造最適化を行う。

③ KMR084ならびにその誘導体を種々のpH溶液に可溶化して生化学・細胞学的活性検証を実施し、化合物の安定性を評価する。誘導体合成とその一連の活性評価を通じて、リード化合物の安定性担保に重要な化学構造を抽出し、新規誘導体の合成・活性評価を通じて、出願済み特許の強化に役立てる。

④ Rasの下流に位置し、細胞がん化において重要な役割を果たすRaf以外の標的蛋白質を介するシグナル伝達系へのリード化合物の作用機序を解析する。さらに、Rasの上流に位置し、Rasのヌクレオチド交換反応を制御する因子Sosへのリード化合物への作用機序も解析する。

⑤ 転移がん動物モデルを用いたKMR084の新規薬効評価ならびにその作用機序の解析を行う。

後行開発：

出願済み特許 (PCT/JP2012/052078号) に記載の新規ポケット構造情報を用いた新たなドッキングシミュレーション (シミュレーション2) による候補化合物を選抜する。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験と動物実験は、学内の安全委員会及び倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

先行開発 (番号はBの内容に対応)：

① Rasとリード化合物との複合体のX線結晶解析：

・溶解度の低いリード化合物 (KMR084) とRasとの複合体のX線結晶解析を行うために、変異型H-RasGTPとDMSOに可溶化したKMR084溶液を混合し、蒸気拡散法による共結晶化を行ったが、複合体の結晶は得られなかった。次に、あらかじめ蒸気拡散法により結晶化した変異型H-Ras-GTPの結晶溶液に、直接KMR084あるいはその複数の誘導体の粉末を直接加えたところ、結晶に着色がみられたことから、化合物が結晶相に移行していることが観測された。これらの結晶溶液を用いてSPring-8 (BL38B1等) で回折実験を行ったが、化合物に相当する電子密度は得られなかった。水溶性の低いリード化合物ならびにその誘導体は、DMSO非存在下では蛋白結晶溶液中において、H-Rasと1:1で結合するに十分な濃度溶解していない可能性が示唆された。

・溶解度の低いリード化合物を高濃度可溶化するために10~30% DMSOを溶剤として用いて可溶化

し、変異型H-Ras-GTPの蛋白結晶溶液に加えたところ、溶剤であるDMSOに起因する蛋白結晶の劣化が確認されたため、結晶内Ras分子間架橋 (クロスリンク法) を行い、蛋白結晶強度の補強を試みた。この方法により得られた変異型H-Ras-GTPの結晶溶液に種々の濃度のDMSOを添加し回折実験を行ったところ、50% DMSO存在下でも比較的明瞭な回折データが得られ、Rasの立体構造解析が可能であることが確認できた。

② 多核多次元NMRによるRasとリード化合物との複合体の立体構造解析とフラグメントリンク法による構造最適化：

・安定同位体¹⁵Nならびに¹³Cでラベルした変異型H-Ras-GTP溶液に、20% DMSOに可溶化したリード化合物KMR084を加え多核多次元NMRを行ったが、化合物の溶解度が低くRasとの結合情報は得られなかった。次にKMR084の誘導体KMR112を用いて同様の実験を行ったところ、Rasと種々の標的蛋白質との結合界面に極めて近い領域の複数のアミノ酸残基 (6残基) に化合物が直接結合していることが確認された。その他の誘導体KMR140、KMR333についても同様の領域への結合が確認された。また、KMR084と母核構造が全く異なる化合物についても同様の結果が得られたことから、本研究で確認された化合物結合領域はRas阻害剤の作用点として極めて重要なポケット (Ras阻害剤が特異的に結合するポケット；以降ポケット2) と考えられた。また、化合物とRasとの結合は、化合物の疎水性の部分構造とRasとの疎水性相互作用により安定化されていることが確認された。

・Rasと標的蛋白質との結合界面に近いポケット (ポケット1) 構造情報と、多核多次元NMRにより決定した前述のポケット (ポケット2) の構造情報を利用し、ポケット1に結合するフラグメント (フラグメント1) とポケット2に結合するフラグメント (フラグメント2) を種々の長さのリンカーで結合することによりRasと化合物との結合を強化し活性を向上させることが予想される化合物のデザイン (フラグメントリンク法) を試みた。KMR084の部分構造情報からフラグメント2を抽出・デザインし、新たにデザインしたフラグメント1とフラグメントリンクした新規デザイン化合物と変異型H-Ras-GTPとの結合自由エネルギー値を予測した (ファルマデザイン社による理論計算科学解析)。このシミュレーション結果を参考に、KMR084の新規誘導体を実際に有機化学合成 (神戸天然物化学実施) し、Ras-Raf結合活性を評価したところ、14化合物については阻害活性が確認できたため、今後、実施例追加による出願済み化合物特許 (特願2011-105613) の強化を行う予定である。

③ 出願済み特許化合物の構造安定性評価：

・短時間（2~3時間）で行う生化学的活性評価系（Ras-Raf結合阻害試験）において、KMR084ならびにその誘導体の活性は、溶液pHの影響を受けないが、化合物を培養液に可溶化したのち長時間（3~14日）かけて活性を調べる細胞学的評価系において、pHが8を超える条件下では、化合物の構造・活性ともに不安定になることが確認された。pH8を超える溶液中での既存の誘導体の分解パターンを質量分析により解析したところ、pH安定性に重要な化合物の部分構造が明らかになった。この構造安定化のための部分構造を有する誘導体を新たに合成し、生化学・細胞学的に活性が確認できた新規化合物については今後、出願済み化合物特許（特願2011-105613）の強化の目的で実施例追加を行う予定である。

④ Rasの上流・下流に位置する複数の蛋白質群を介するシグナル伝達へのリード化合物の作用の生化学・細胞学的解析：

・我々のNMR解析により得られたKMR084誘導体と変異型H-Ras-GTPとの複合体の立体構造情報と、Rasの上流・下流に位置する複数の結合パートナー（調節因子ならびに標的蛋白質）とRasとの複合体の既知の立体構造情報との比較により、KMR084はこれら複数の結合パートナーとRasとの結合に干渉し活性を抑制する可能性が示唆された。この可能性を評価するために以下の生化学・細胞学的活性検証試験を行った。

・Rasの下流に位置し細胞がん化に関与するRaf以外の標的蛋白質の1つRalGDS（Rasファミリーに属するRalのグアニンヌクレオチド交換因子）へのKMR084の作用を評価するために、化合物処理した2種類のがん細胞（活性型H-Rasを有するマウス繊維芽細胞ならびに活性型K-Rasを有するヒト大腸がん細胞）から細胞溶解液を調整し、Ralの標的蛋白質Sec5によるプルダウンアッセイにより活性型Ral（Ral-GTP）の検出を行ったところ、KMR084の濃度依存性にRal-GTP結合量の低下が認められた。また、化合物処理によりPI3Kの下流に位置するAKTのリン酸化による活性化抑制作用も認められたことから、KMR084はRafのみならず、RalGDS、PI3Kを含む複数の標的蛋白質を介するがん化シグナルを抑制する可能性が示唆された。

・Rasの上流に位置し、増殖因子などの細胞外刺激によりRasのGDP/GTP交換反応を行う調節因子SosによるRasの活性化（Ras-GTPの生成）は、SosのCdc25ドメインへ結合したRas-GDPのGDP/GTP交換反応（前者）と、この反応を加速するSosのREMドメインへのRas-GTPの結合反応（後者）からなる。マウスSos（mSos1）ならびにそのREMドメインにRas-GTPが結合できなくなるアミノ酸置換を導入

した変異型mSos1を用いて、KMR084存在下でH-RasのGDP/GTP交換反応を解析したところ、Ras-GTP依存性の後者の反応を強く阻害する結果が得られた。

・これらの結果より、KMR084はRasの下流の標的蛋白質（Raf, RalGDS, PI3K）のみならず上流の調節因子（Sos）を介するRasのシグナル伝達も阻害することが確認された。

⑤ リード化合物の新規薬効としての腫瘍転移抑制作用：

・ヒト大腸がん細胞株（遠隔転移を起こす細胞株で、ヌードマウスに尾静注すると肺に生着する）を用いた転移がんモデルシステムにおいて、KMR084には既存薬のsorafenib（Raf, VEGF受容体阻害剤）にはない腫瘍の転移抑制作用が確認された。化合物を投与した担がん動物から採取した腫瘍組織では、腫瘍の転移と密接な関係が示唆されるlysyl oxidase（LOX）の遺伝子発現抑制が確認された。また、Ras阻害活性を有するが母核構造がKMR084とは全く異なる化合物にもLOXの発現抑制が認められたことから、LOX発現抑制ならびに腫瘍の転移抑制はRas阻害剤に特異的な作用であることが示唆された。

後行開発：

・ファルマデザイン社の理論計算科学解析（外注）により、以下シミュレーション（総括研究報告書のシミュレーション2に対応）により化合物を選抜した。具体的には出願済み特許PCT/JP2012/052078号に記載のRas阻害物質、ならびに3種類のKMR084の誘導体と変異型H-Ras-GTPとの複合体のNMR構造情報を用いたMDシミュレーションにより、ポケットの初期構造を発生させ、市販のライブラリーから約5万種類の化合物を選抜した。次に、Rasと複数の標的蛋白質との結合界面に存在する残基情報を用いて、標的蛋白質との結合を阻害するRasとの相互作用が期待される化合物の絞り込みを行い、約500個の化合物を選抜した。このうち上位200個について、活性検証のため購入予定にある。

D. 考察

リード化合物の構造展開を効率的に推進する上で有用な高精度の立体構造情報が得られるX線結晶解析による化合物の結合様式検出には至っていないが、多核多次元NMRを利用することにより、分解能がやや劣るものの、リード化合物ならびに複数の誘導体とRasとの結合様式が解明された。この立体構造情報を実際に用いたフラグメントリンク法と新規誘導体の合成・活性検証試験を通じて、出願済み化合物特許の強化が可能になった。また、リード化合物の水溶液中での安定性を詳細に解析

することにより、化合物の構造・活性安定化にある部分構造が重要な役割を果たすことが確認された。この結果を踏まえ、この部分構造を有する新規誘導体を合成・活性検証を行い、出願済み化合物特許のさらなる補強が可能になった。

リード化合物の生化学・細胞生物学的作用機序の詳細な解析を通じて、リード化合物は複数のRasの標的蛋白質、さらにはRasの上流でRasの活性化を促進する調節因子の活性をも阻害することにより、極めて効率的にRasの介するシグナル伝達を阻害することが明らかになった。また、リード化合物の新たな薬効として、腫瘍転移抑制作用が確認されるとともに、関連遺伝子の発現抑制も検出された。今後、作用機序を詳細に解析することにより、リード化合物の特性を明らかにすることが重要と考えられた。

E. 結論

フラグメントリンク法ならびにリード化合物の構造安定性評価を通じて、リード化合物の構造空間の拡大に成功し、出願済み化合物特許の強化の可能性が広がった。しかし、現時点でKMR084を上回る活性を示す化合物の創出には至っていない。また、フラグメントリンク法による解析結果を利用した構造最適化ならびに有機化学合成による活性評価については、まだ一部しか実施できてないことから、特許導出後、協力研究体制を組む製薬企業と協議の上、この手法を利用した構造最適化研究をさらに進め、KMR084の活性を上回る誘導体を創出することが必要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

①Araki M, Shima F, Yoshikawa Y, Muraoka S, Ijiri Y, Nagahara Y, Shirono T, Kataoka T, Tamura A. Solution Structure of the State 1 Conformer of GTP-bound H-Ras Protein and Distinct Dynamic Properties between the State 1 and State 2 Conformers. *J. Biol. Chem.* 286, 39644-39653 (2011)

②Matsumoto K, Shima F, Muraoka S, Araki M, Hu L, Ijiri Y, Hirai R, Liao J, Yoshioka T, Kumasaka T, Yamamoto M, Tamura A, Kataoka T. Critical roles of interactions among switch I-preceding residues and between switch II and its neighboring alpha-helix in conformational dynamics of the GTP-bound Ras family small GTPases. *J. Biol. Chem.* 286, 15403-12. (2011)

2. 学会発表

Araki M, Shima F, Yoshikawa Y, Muraoka S, Ijiri Y, Nagahara Y, Shirono T, Tamura A, Kataoka T. Solution structure of the state 1 conformer of GTP-bound H-Ras protein and distinct dynamic

properties between the state 1 and state 2 conformers. *Biophysical Society 56th Annual Meeting* Pos-L1 SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA, FEBRUARY, 2012 (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

①名称：Ras機能阻害剤のスクリーニング方法
発明者：片岡徹、島扶美、田村厚夫、荒木望嗣
出願番号：PCT/JP2012/052078 (特願2011-023695)
出願日：平成24年1月31日 (優先日：平成23年2月7日)

②名称：MUTANT RAS POLYPEPTYDE CRYSTAL
発明者：Tohru Kataoka, Fumi Shima, Atsuo Tamura, Takashi Kumasaka
出願番号：US13/383835 (特願2009-165717)
出願日：平成24年1月12日 (優先日：平成21年7月14日)

③名称：非公開希望により未記載
発明者：片岡徹、島扶美、閔正博、笹原大輔
出願番号：特願2011-105613
出願日：平成23年5月10日

2. 実用新案登録
なし

3. その他
特記事項なし。

分担研究報告書

Ras機能阻害活性を有する化合物の有機化学合成による構造展開に関する研究

研究分担者 閨 正博 神戸天然物化学株式会社 創薬化学部 部長

研究要旨 我々は、Ras 機能阻害作用を有する医薬候補化合物を創出するために Ras 構造情報より *in silico* 及び生化学・細胞生物学的スクリーニングで見出されたヒット化合物からメドケム手法により構造展開を実施しリード化合物 KMR084 を見出した。本年度は KMR084 を代表とする一連の化合物を含む物質特許を出願（2011 年 5 月 10 日出願完了）し、権利化すると共にリード化合物 KMR084 を基にさらに生化学・細胞生物学的評価、構造生物学的解析、計算科学的手法、および創薬合成化学手法を駆使した構造最適化を行い、臨床開発候補品を創製することを目標とする。医薬品の有機合成を強みとする弊社はリード化合物 KMR084 からの構造最適化研究を化合物のデザインと合成から進める。また、本年度は成果物である特許ライセンス導出先となる製薬企業選定に向けた化合物情報（構造は非開示）提供、及び評価化合物として KMR084 の製造プロセス検討、製造と支給品提供を実施する。

A. 研究目的

本年度は保有するリード化合物 KMR084 をさらに構造展開することよりポテンシーとエフィカシーの両面で最適化を進めると共に 2011 年 5 月に出願予定の物質特許をさらに強化することを目的とする。また、新規ポケット構造情報に基づくインシリコドッキングシュミレーションを実施し、見出されるヒット化合物の構造展開、誘導体合成からツループットの見極を行い、新たな母核構造探索を開始する。

さらに、本年度計画している成果物の導出先の選定に向けて、CDA 及び MTA 下での化合物情報の提供（構造非開示）並びに製造プロセス検討と化合物の支給を行う。

B. 研究方法

1) リード化合物 KMR084 の活性増強を目的としたフラグメントリンキング法による化合物デザインと合成による構造最適化：多核多次元 NMR を用いた Ras-化合物 (KMR084) の複合体の立体構造情報、並びに Ras とその標的蛋白質の結合部位の立体構造情報を基に、ラショナルに KMR084 の構造最適化を行うフラグメントリンキング法を活用し、より強固な相互作用を有する化合物をデザイン・合成する。具体的には、蛋白質と化合物の結合をより

強固にするために、Ras の分子表面上の新たな作用点と相互作用可能な複数の官能基を適切なスペーサーで KMR084 に繋ぐデザイン手法であり、合成した化合物の活性評価結果を基に合成と評価のサイクルを回すことにより最適化を進める。

2) 化合物の安定性評価と安定性向上を目指した構造最適化：リード化合物の水溶液中での pH 安定性を検討し、安定性を向上するための構造最適化を実施する。

3) 新たな母核構造の探索：新規ポケット構造情報に基づくインシリコドッキングシュミレーション、生化学的・分子生物学的評価、デザインと合成の構造展開による新たな母核化合物の創出。

（倫理面への配慮）

本研究は遺伝子組み換え実験や動物実験は含まれておらず、有機合成化学的手法によるものである。

C. 研究結果

1) 標的である Ras の分子表面上の新たな作用点と相互作用可能な種々の官能基を種々のスペーサーで KMR084 に繋いだ新規な 25 化合物をデザインし合成した。デザインには Ras 構造情報に基づ

いたファルマデザイン社からのコンピュータ計算化学委託解析結果を参考に実施した。結果として、KMR084の活性を上回る化合物を見出すには至っていないが、活性を発現する構造的なバリエーションを広げることが出来た。合成した新規タイプ化合物の内14化合物はKMR084を含む出願済み特許（特願2011-105613）を強化するために実施例化合物として追加する予定である。

2) 溶液中でのpH安定性を検討した結果、pHが8を超える緩衝溶液中で不安定であることが判明した。

*In vitro*評価系であるRas-Raf結合阻害活性の評価系及びがん化形質抑制作用を評価する細胞培養評価系で用いる培養溶液はpH8以下であり、顕著な化合物の変化は認められなかった。これまでに合成した化合物のpH安定性確認試験を実施した結果、pH安定性を示す構造的特徴を確認することができた。この知見を新たな化合物の最適化デザインに応用した化合物を合成し、出願済み特許の強化のために実施例追加する予定である。

3) 母核構造の異なる新たなヒット化合物の探索を目的に、NMRにより確認されたRasの残基と化合物との距離情報及び変異型H-Rasの結晶構造における新規ポケット構造情報を用いたドッキングテストよりランダム化合物から絞り込みを実施し、選抜購入された化合物を薬効評価スクリーニングする予定で進めている。Ras-Raf結合阻害活性が認められた化合物については構造毎に分類し、その周辺の誘導体をデザイン合成し構造活性相関を解析することによりヒットバリデーションを行う。さらに選ばれたツルーパーヒットを合成展開することで、新規なリード化合物へと導く計画である。

D. 考察

多核多次元NMRを用いたRas-化合物(KMR084)の複合体の立体構造情報、並びにRasとその標的蛋白質の結合部位の立体構造情報からRas-化合物の結合を高めるためのデザインと合成を進めた。現時点ではKMR084を上回る化合物を得るには至っていないが、今後は特許ライセンスを導出する協力研究先製薬企業を含めた研究推進体制においてリード最適化研究をさらに加速させることが必要と考える。

E. 結論

リード化合物KMR084の構造最適化研究をRas立体構造情報に基づき論理的なデザインを駆使して実

施した。計算科学的な手法と合成化学的な手法を組み合わせたフラグメントリンキング法、化合物の異性化メカニズムに基づく安定性向上を目的とした構造変換検討からは新たな構造多様性の広がりの可能性を確認することが出来た。これらの構造展開から見出された複数の化合物は今後特許強化のための新たな実施例化合物として追加する予定である。

また、CDA及びMTAによる情報提供や交渉を重ね、本年度、特許導出・協力研究先となる国内製薬企業を選定することが出来、現在、ライセンス契約及び協力研究契約の条件交渉を進めている。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称：非公開希望により未記載

発明者：片岡徹、島扶美、関正博、笹原大輔

出願番号：特願2011-105613

出願日：平成23年5月10日

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。

Ras機能阻害作用を有する低分子化合物とRasとの複合体のNMRによる立体構造解析に関する研究

研究分担者 田村 厚夫 神戸大学大学院理学研究科 准教授

研究要旨

我々は Ras を分子標的とした抗がん剤の開発に向けて、標的タンパク質の立体構造情報に基づいたインシリコスクリーニングおよび生化学・細胞生物学的試験によって見出されたヒット化合物からメドケム手法による構造展開を実施し、リード化合物 KMR084 を創出した。理学研究科は、KMR084 を代表とする一連の化合物と Ras により形成される複合体の立体構造を実験的にモデリングし化合物の結合阻害メカニズムを解明するとともに、その情報をリード化合物の構造最適化に役立て臨床開発候補品の創製を目指す。本年度は医学研究科と共同で、多核多次元核磁気共鳴法（NMR）を使用して KMR084 ならびにその構造類縁体である KMR112、あるいは KMR084 から更に構造展開した KMR140、KMR333 と Ras との複合体の立体構造を決定し、その構造情報を理論計算科学ならびに合成化学的手法を駆使した KMR084 の構造最適化にフィードバックした。

A. 研究目的

本年度は Ras 機能阻害作用を有するリード化合物 KMR084 およびその周辺の化合物と、標的タンパク質である Ras との複合体の立体構造を実験的にモデリングすることにより、これらの化合物が有する結合メカニズムを明らかにし、より結合能、阻害能の高い化合物の創出に向けた化学構造最適化に役立てる。更には、より副作用の少ない臨床開発候補品を創出するために、得られた化合物の結合情報を生化学・細胞生物学的試験結果と組み合わせ Ras 機能阻害機構にフィードバックすることで、他の低分子量Gタンパクへの阻害能が少なくなおかつ Ras 特異的に高い阻害活性を發揮する化合物のデザインを行う。

B. 研究方法

GTP 結合型の野生型 H-Ras は、溶液中において複数の立体構造をとること（以下の「構造的揺らぎ」）が理由で NMR 解析が困難であった。しかし申請者らの最新の研究（Araki et al. *J. Biol. Chem* 2011）により、Ras が標的タンパク質を認識する領域にある種のアミノ酸置換を導入した変異型 H-Ras では、野生型の活性を保持しつつ NMR シグナルを消失させ構造解析を困難にする構造的揺らぎが顕著に抑制される事が明らかになった。従って、Ras と化合物との複合体の立体構造解析には、シグナル検出と解析がこの野生型より容易なこの変異型 H-Ras を使用し、多核多次元 NMR を実施する。

1) Ras とリード化合物 KMR084 との複合体の立体構造解析：

Ras に対して生化学・細胞生物学的に強い阻害作用を示す KMR084 が Ras のどの部位にどのような配向で結合しているかを明らかにするために、¹⁵N, ¹³C 原子でラベルした変異型 H-Ras を使用して分子間（変異型 H-Ras と KMR084）で生じる核オーバーハウザー効果（NOE）を抽出し、それらのシグナル強度を取り入れた立体構造計算を行うことで Ras-KMR084 複合体構造を決定する。

2) Ras と KMR084 周辺化合物との複合体の立体構造解析：

リード化合物 KMR084 とその誘導体の Ras への作用メカニズムを詳細に比較解析して、リードの構造最適化にフィードバックするために、¹⁵N, ¹³C 原子でラベルした変異型 H-Ras を使用して、誘導体との分子間で生じる NOE を抽出し、それらのシグナル強度を取り入れた立体構造計算を行うことで、Ras-化合物（誘導体）複合体の立体構造を決定する。

（倫理面への配慮）

変異型 H-Ras を過剰発現させる事を目的とした遺伝子組み換え実験に関して、本学が定める遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律施行規則に基づいて研究を行う。

C. 研究結果

1) リード化合物 KMR084 は溶解度が低く、NMR 実験に必要な濃度(1 mM 以上)を実験系に持ち込むことが出来なかったため、複合体の立体構造決定には至らなかった。一方 KMR084 の 1 原子置換体である KMR112 では十分な溶解性を担保することができたため、19 個の分子間 NOE シグナルを抽出することに成功した。これらの帰属結果およびシグナル強度を用いて Ras-KMR112 複合体の立体構造をモデリングした。

2) KMR084 が有する化学構造を三種類の部分構造 (A, B, C) に大別し、各部分構造を他の化学構造に置換した類縁体について、NMR 試験を実施して Ras に対する結合メカニズムを検証した。その結果、部分構造 A を異なる構造に変化させた KMR140、ならびに部分構造 B を異なる構造に変化させた KMR333 についてそれぞれ 12 個、17 個の分子間 NOE シグナルを抽出することができたため、これらの帰属結果およびシグナル強度を用いて Ras-KMR140、Ras-KMR333 複合体の立体構造をモデリングした。

D. 考察

多核多次元 NMR により決定された Ras-KMR112 (KMR084)複合体構造と Ras-KMR140 および Ras-KMR333 複合体構造とを比較した結果、3 種類の化合物は Ras の分子表面上のほぼ同一の領域に結合している事が明らかになった。更に KMR084 が有する部分構造 A (KMR084, KMR112, KMR333 に共通) は、Ras との疎水性相互作用を介して結合状態を大きく安定化しているものの、この部分を化学構造が類似した疎水性基に変化 (KMR140) させても結合能が担保される事が明らかになった。更に部分構造 B は Ras との結合に積極的に関わっておらず溶媒側に露出しており、その欠如 (KMR333) によって化合物の結合部位、配向状態はほとんど影響を受けないことが明らかになった。これらの結果から、より高い結合能を獲得するためには、部分構造 B を他の化学構造に置換することによって Ras の分子表面上の新たな作用点との相互作用を形成させる事が望ましいと推測された。

E. 結論

溶液 NMR を使用して、リード化合物 KMR084 を代表とする一連の化合物と Ras により形成される複合体の立体構造解析を実施した。その結果、化合物の化学構造において結合安定性に寄与する重要な部分構造 (部分構造 A)、および結合にほとんど寄与しない部分構造 (部分構造 B) に分類す

ることが出来た。これらの複合体の立体構造情報に基づいて、Ras に対する結合能がより強化される化合物を創出するために、KMR084 が持つ部分構造 A に種々の官能基をスペーサーで繋いだ化合物を新規に神戸天然物化学にてデザイン・有機化学合成し、構造活性相関研究を医学研究科と共同で実施した (詳細については神戸天然物化学の分担研究報告書ならびに医学研究科の分担・総括研究報告書を参照)。

G. 研究発表

1. 論文発表

○Araki M, Shima F, Yoshikawa Y, Muraoka S, Ijiri Y, Nagahara Y, Shirono T, Kataoka T, Tamura A. Solution structure of the state 1 conformer of GTP-bound H-Ras protein and distinct dynamic properties between the state 1 and state 2 conformers. *J. Biol. Chem* 286, 39644-39653 (2011)

○Matsumoto K, Shima F, Muraoka S, Araki M, Hu L, Ijiri Y, Hirai R, Liao J, Yoshioka T, Kumasaka T, Yamamoto M, Tamura A, Kataoka T. Critical roles of interactions among switch I-preceding residues and between switch II and its neighboring alpha-helix in conformational dynamics of the GTP-bound Ras family small GTPases. *J. Biol. Chem.* 286, 15403-15412. (2011)

2. 学会発表

Araki M, Shima F, Yoshikawa Y, Muraoka S, Ijiri Y, Nagahara Y, Shirono T, Tamura A, Kataoka T. Solution structure of the state 1 conformer of GTP-bound H-Ras protein and distinct dynamic properties between the state 1 and state 2 conformers. *Biophysical Society 56th Annual Meeting*. Pos-L1 SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA, FEBRUARY, 2012 (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

①名称: Ras機能阻害剤のスクリーニング方法
発明者: 片岡徹、島扶美、田村厚夫、荒木望嗣
出願番号: PCT/JP2012/052078 (特願2011-023695)
出願日: 平成24年1月31日 (優先日: 平成23年2月7日)

②名称: MUTANT RAS POLYPEPTYDE CRYSTAL
発明者: Tohru Kataoka, Fumi Shima, Atsuo Tamura, Takashi Kumasaka
出願番号: US13/383835 (特願2009-165717)
出願日: 平成24年1月12日 (優先日: 平成21年7月14日)

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。

分担研究報告書

*ras*がん遺伝子産物を標的とした治療薬開発のためのX線結晶構造解析に関する研究

研究分担者 熊坂 崇 高輝度光科学研究センター 副主席研究員

研究要旨

「*ras* がん遺伝子産物の新規立体構造情報に基づくがん分子標的治療薬の開発」を目指して、低分子GTP結合蛋白質の一種で細胞増殖の分子スイッチである *ras* 遺伝子産物を対象とした研究を行っている。本分担研究ではその一環として、*Ras* の構造変化を認識して結合する分子標的薬のデザインを効率的に行うための構造情報を得るため、主に X 線結晶構造解析の手法を用いて、*Ras* 蛋白質の変異体を含む種々の状態の分子構造ならびに薬剤複合体の構造を解明することを目的とする。

A. 研究目的

*Ras*タンパク質は、低分子GTP結合タンパク質の一種で、転写や細胞増殖、細胞の運動性の獲得のほか、細胞死の抑制など数多くの現象に関わっている。*Ras*の異常は細胞のがん化に大きく関わるため*ras*遺伝子は原がん遺伝子に分類される。

また、*Ras*タンパク質は分子質量約21kDaの単量体分子であり、GTP/GDPの結合部位と、PI3キナーゼ (PI3K) やRaf、Ral-GEFと相互作用するためのエフェクターループと呼ばれる部位を有している。また、C末端側には脂質の尾部を持ち細胞膜に繋がとめられるようになっている。がん化した*Ras*はGly12やGln61などGTP結合部位にミスセンス変異があることが多い。

不活性な*Ras*はGDPと結合しているが、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によりGTPと交換されると活性化する。

我々は、放射光 (SPring-8) を用いたX線結晶解析を通じて、GTP結合型*Ras*では世界で初めてとなる、分子表面に低分子化合物が十分挿入できるサイズの特異的ポケットを有する立体構造の決定に成功した (Ye et al. *J. Biol. Chem.* 2005)。このポケットに選択的に結合して*Ras*を不活化する物質は、*Ras*の機能を阻害する抗がん剤として作用する可能性があることに着目し、候補化合物をインシリコ選抜し、生化学・細胞生物学的手法を駆使して、選抜化合物の活性検証を行ってきた。その結果、培養がん細胞レベルおよび担がんモデル動物においても顕著な抗がん活性を示し、低毒性かつ経口薬適性に優れたリード化合物 (KMR084) の獲得に

成功した。

H23年度、本分担研究では、現在保有するリード化合物ならびにその複数の誘導体と*Ras*タンパク質との複合体のX線結晶解析を実施し、得られた立体構造情報を用いたリード化合物の効率的な構造最適化を推進する。

B. 研究方法

野生型*Ras*タンパク質に加え、野生型と比較して立体構造がより安定になるアミノ酸置換を導入した変異型H-*Ras*を用いて、現在保有するリード化合物ならびにその誘導体との複合体の立体構造を決定する。

既に得られている*Ras*タンパク質単体の結晶化条件を基に、化合物をタンパク質溶液に加えて共結晶化を試みるほか、成長した結晶を化合物溶液に浸漬させることで、複合体結晶を作成する。

得られた結晶の回折強度データは大型放射光施設SPring-8のBL41XUあるいはBL38B1にて測定し、解析計算を実施して、最終構造を得る。

(倫理面への配慮)

タンパク質や有機化合物を材料としており、特に問題になる点はありません。

C. 研究結果

B. に記載した通り、複数種の比較的親和性の高い化合物について、共結晶化並びに浸漬法により複合体結晶の作成を試みた。

いずれの化合物も結晶化条件の溶媒に対して溶