

2012-09006A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片岡 徹

平成25年（2013）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 片岡 徹	----- 1
---	---------

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 島 扶美	----- 6
2、Ras機能阻害活性を有する化合物の有機合成による構造展開に関する研究 閨 正博	----- 10
3、 <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 熊坂 崇	----- 13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 15
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 16
-----------------	----------

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

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）。H24 年度、先行開発については、特許出願を完了した保有リード化合物（KMR084 ならびにその誘導体：特願 2011-105613）について、構造安定性の観点から新たに見出された化合物を実施例化合物として追加することで特許強化を行い、国際出願（PTC/JP2012/061908）を完了した。また、国内大手製薬企業 1 社と本特許の実施権許諾契約を締結するとともに、同社との共同研究契約下で、リード化合物の構造最適化研究を開始した。この共同研究において、フラグメントリンク法を活用した構造展開により、出発リード化合物の活性を細胞試験において顕著に上回る複数の新規誘導体の創出に成功した。また、ヒト大腸がん細胞株を用いた担がんモデル動物システムに加え、膵臓がん、膀胱がん細胞株を用いたモデル動物による新たな薬効評価システムが構築された。バックアップリードを創出するために、後行開発で行ったインシリコスクリーニング（シミュレーション 1 と 2）により選抜した候補化合物の NMR 解析を通じて、Ras の分子表面には低分子化合物が特異的に結合しうるポケットが既存のポケット（保有のリード化合物の結合部位）以外に計 4 か所存在することが明らかになった（シミュレーション 1）。この薬剤結合領域に関する新たな構造情報は、リード化合物の構造最適化研究を進める上で極めて有用な情報と考えられた。また、保有リード化合物の活性を細胞レベルで上回る複数の新規ヒット化合物の同定にも成功しており（シミュレーション 2）、今後は、シミュレーション技術を活用した初期構造展開を通じて、効率的な新規リード創出を目指す。さらに、KMR084 以外の保有ヒット化合物（Kobe0065 ならびにその誘導体）についても、フラグメントリンク法の著効が確認され、先行・後行開発を通じて、構造最適化研究におけるこの手法の有効性が実験的に証明された。特殊試料マウント法を利用した H-Ras の X 線結晶解析では、Ras の新たなポケット構造を発見するとともに、Ras の内因性 GTP 加水分解メカニズムに関する新たな知見が得られた。Kobe0065 ならびにその誘導体に関する研究成果は米国科学アカデミー紀要に掲載され、新聞・TV など報道各社により研究内容の有用性と社会貢献について多数取り上げられた。（参考資料 1 及び 2）

研究分担者

				医薬事業部・創薬化学部長
島	扶美	神戸大学大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 分子生物学分野・准教授	熊坂	崇 公益財団法人高輝度光科学研究 センター利用研究促進部門・ 構造生物グループ副主席研究員
関	正博	神戸天然物化学株式会社		

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關与する。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 (H24年度) 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理論的構造最適化研究を重点的に行う (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を通じて、新たなヒットを同定するとともに、新規ヒット化合物の効率的な初期構造展開システムを構築する。さらに、既に保有する別のヒット化合物の理論的構造最適化研究についても実施する (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保有するリード化合物 (KMR084) ならびにその誘

導体) に関する物質特許 (特願2011-105613) の強化を図るとともに、国際出願を完了する。

②上記リード化合物の導出先となる国内大手製薬企業との特許実施権許諾契約を締結する。

③同社との共同研究契約下で、フラグメントリンク法を活用した、リード化合物の効率的な構造最適化研究を推進する。

④種々のがん腫に対して薬効評価を行える担がんモデル動物システムを構築する。

後行開発：

①出願済み特許 (WO2011/007773号) に記載の新規ポケット構造情報を利用し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1) で選抜した化合物の作用メカニズムをNMRにて解析する。

②出願済み特許 (WO2011/007773号ならびにPCT/J P2012/052078号) に記載の①とは異なる新規ポケット構造情報を利用し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) で選抜した化合物から、生化学・細胞学的にRas機能阻害活性を有するヒット化合物を同定する。さらに、得られたヒットの効率的な構造展開のためのシステム構築を行う。

③既に保有するヒット化合物Kobe0065ならびにその誘導体に関する研究成果を発表するとともに、フラグメントリンク法による初期構造展開を実施する。

④特殊試料マウント法 (HAG法) ならびに放射光 (Spring-8) を利用したX線結晶解析により、Rasの新規ポケット構造を決定する。

(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保有リード化合物 (KMR084) ならびにその誘導体) 関連の物質特許 (特願 2011-105613) の強化と国際出願：

・特願 2011-105613 について、化合物の構造安定性の観点から新たに合成展開を行い Ras 阻害活性が確認された化合物について、実施例化合物として追加し、本年度国際出願を完了した (国際出願番号 PTC/JP2012/061908)。

②上記リード化合物の導出先となる国内大手製薬企業との特許実施権許諾契約の締結：

・上記特許の導出先企業の選定に向けて、製造プロセスの確立と化合物提供ならびに化合物情報提供を行い、国内大手製薬企業への特許実施権許諾

供を行い、国内大手製薬企業への特許実施権許諾契約を締結した。

③国内製薬企業との共同研究契約締結と保有リード化合物の構造最適化研究：

・上記国内大手製薬企業と共同研究契約を締結した。

・H-Rasとリード化合物KMR084の誘導体KMR112との複合体のNMR構造情報に基づいて、化合物とRasとの結合反応において新たな水素結合を発生させることが予測される複数のフラグメントを神戸大学がデザインした。このフラグメントをKMR084に結合させた新規誘導体(フラグメントリンク法による誘導体)について、H-Rasとの結合エネルギーの順位付けを行い(ファルマデザイン社外注)、順位の高かった化合物について、同社製薬企業に提示した。フラグメントリンク法による誘導体の構造情報を参考にして、同社において新規誘導体をデザイン・合成した。得られた17種類の新規誘導体について、Ras機能阻害活性を評価したところ、6種類の化合物については、出発化合物であるKMR084より強力な、がん細胞(*活性型H-RasであるH-RasG12V変異体を有するマウスNIH3T3)の足場非依存性増殖抑制作用を示した。またいずれの誘導体も、細胞内においてH-Rasと標的蛋白質Rafとの結合を有意に阻害したが、H-Ras-Raf結合阻害活性の強度の比較は細胞内評価システムにおいては困難であった。

・新規誘導体の溶解度が全体的に極めて低かったことから、生化学試験によるH-Ras-Raf結合阻害活性については一部の化合物についてのみ実施可能であった。実施範囲内では、KMR084より生化学活性が有意に高い化合物が3種類検出された。一方、これらの化合物は細胞活性がKMR084より低かったことから、細胞内への化合物の吸収、細胞内での安定性などの問題の改善が必要と考えられた。

・上記複数の新規誘導体間での、生化学・細胞学的活性比較を通じて、化合物がRas特異的な活性を発現する上で重要な化合物の部分構造が明らかになった。

④複数のがん腫モデルを用いたKMR084の薬効評価：

・これまでのヒト大腸がんモデル動物システム(活性型K-RasG12V変異体を持つヒト大腸がん細胞SW480を移植したヌードマウスに化合物を経口投与し、腫瘍増殖抑制効果を評価する)に加え、ヒト膵臓がん(Panc-1:活性型K-RasG12D変異体)モデル動物システムならびにヒト膀胱がん(EJ-1:活性型H-RasG12V変異体)モデル動物システムを構築し、KMR084の薬効評価を行ったところ、個体数が少なく有意差検定には至らなかつ

たものの、一定の腫瘍増殖抑制傾向が確認された。

後行開発 (番号はBの内容に対応)：

①シミュレーション1により選抜した化合物のRas結合部位の解析と、構造展開への利用：

・新たなドッキングシミュレーション(シミュレーション1)により選抜した化合物については、生化学試験でRas-Raf結合を有意に阻害するものは検出できなかった。分子サイズの小ささが原因の一つと考えられた。

・Ras-Raf結合阻害活性は認められないものの、シミュレーション上はRasへの結合が強く示唆されたため、化合物を構造別に13グループに分類し、各グループごとに代表となる化合物を2~3個(計22個)選抜した後に、HSQCによりRas上の化合物結合領域のNMR解析を行った。その結果、Rasの分子表面には、これまで我々が保有するリード化合物ならびにヒット化合物を利用して同定してきた疎水性のポケット以外に、低分子化合物が結合可能な別のポケット領域が計4か所存在することが明らかになった。これら新規ポケット領域の中には、既知のポケット(疎水性のポケット)と空間的に近いものも複数含まれることから、近接する異なるポケットに結合する化合物(ビルディングブロック)同士を繋ぎ合わせることで、新規の母核構造をデザインできる、新たな構造展開の方向性が見出された。

②シミュレーション2により選抜した化合物の活性検証とヒット化合物の効率的初期構造展開システムの構築：

・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)により選抜した200化合物(KBFMシリーズ)について、生化学試験(Ras-Raf結合阻害試験)を実施したところ、200 μ M以上の溶解度が担保できた化合物についてはヒットを検出できなかった。

・溶解度が極めて低かった40化合物について、がん細胞(*)の足場非依存性細胞増殖抑制作用を評価したところ、4種類の母核構造に分類される18種類のヒット化合物の同定に成功した。これらの化合物は細胞内においてRas-Raf結合阻害作用を示した。

・上記18種類のヒット化合物の中から細胞活性の強かった上位7化合物を選抜し、StarDrop Novaを利用して、溶解度の改善が望める新規誘導体構造を1052種類発生させた(ファルマデザイン社)。この中から、有機化学合成可能な化合物の絞り込み(150種類以内)を今後行う。化合物とH-Rasとの複合体の初期構造モデル(シミュレーション2において化合物を選抜するための結合エネルギー計算

の際に既に得られている)の構造最適化計算を実施(ファルマデザイン社)し、得られた最適化H-Rasモデルを用いて、前述の約150種類の選抜化合物とのドッキングシミュレーションを実施する(ファルマデザイン社)。出発化合物よりH-Rasとの結合エネルギー値が有意に改善された化合物を選抜して、神戸天然物化学株式会社において実際に有機化学合成し、神戸大学で実施する一連の活性検証試験を通じて効率的な初期構造展開を可能にする。

③保有ヒット化合物Kobe0065の初期構造展開：

・Kobe0065ならびにその誘導体(Kobe2601, Kobe2602)の毒性発現に関連する可能性の高いチオセミカルバジド構造を回避する目的で、神戸天然物化学株式会社がデザイン・合成した11種類のチオヒダントイン誘導体について、神戸大学において活性評価を行ったが、Ras特異的な阻害活性は認められなかった。

・Kobe0065とH-Rasとの結合情報(NMRによる複合体の立体構造情報)ならびにジェネンテック社とアボット社が2012年にProc. Natl. Acad. Sci誌等に発表した化合物の構造情報を参考にして、神戸大学内において、フラグメントリンク法により16種類の新規誘導体の構造デザインを行った。これらの誘導体について、分子シミュレーションソフトMOEを用いて、学内においてRasとの結合エネルギーを算出・順位付けを行い、上位に位置した誘導体の構造情報を参考に、神戸天然物化学株式会社において新規誘導体を有機化学合成した。得られた誘導体の活性評価を神戸大学内において行ったところ、出発化合物であるKobe0065より生化学・細胞学的活性の高い新規誘導体NKB23を同定することに成功した。

④HAG法による新規ポケットを有するH-RasのX線結晶構造解析：

・ポケット構造を有するH-Rasの立体構造解析は、自然界では存在しない特殊なアミノ酸置換を導入した変異型Rasポリペプチド(H-RasT35S)を利用したX線結晶解析ならびにNMR解析、あるいはこの変異型Rasポリペプチドの結晶核を利用したクロスシーディング法で作製した野生型H-Rasあるいはがん確認される活性型変異を有するH-Ras G12V, H-RasQ61LのX線結晶解析においてのみ実現可能であった。しかしいずれの立体構造も、自然界では存在比率が極めて低いもの(人工的な構造)であることが前年度までの研究で明らかになっていた。しかし、HAG法で結晶中の水蒸気圧ならびに温度を調節することにより、自然界での存在比率が比較的高いことが予想される新規ポケット構造の決定が可能になった。この新規ポケット構造の詳細な解析を通じて、RasのGTP加水分解メ

カニズムに関する新たな知見が得られた。

D. 考察

・保有リード化合物(KMR084)関連の物質特許の強化を図り、同特許の海外出願を果たすとともに、国内大手製薬企業への特許実施権許諾契約ならびに共同研究契約の締結を完了し、同社との共同研究体制下でのリード化合物の本格的な構造最適化研究をスタートした。

・先行開発、後行開発を通じて、化合物とRasとの複合体の立体構造情報を活用したフラグメントリンク法により、出発化合物の生化学・細胞学的活性の改善が可能になり、この手法の構造展開・最適化研究における有効性が示された。

・フラグメントリンク法により得られたKMR084の新規誘導体については、種々のがん細胞株(活性型Rasを有する種々のヒトがん細胞株ならびに有さないがん細胞株)を用いた活性検証試験を通じてRas特異性を確認した上で、担がんモデル動物での薬効評価試験に進める必要がある。生化学試験では強い活性を示すものの細胞活性が弱かった化合物については、今後、細胞内への化合物の吸収、細胞内での安定性などの、代謝動態の解析を行った上で、構造最適化を進めていく必要がある。

・チオセミカルバジド誘導体であるKobe0065については今後、現在進めているフラグメントリンク法により、活性改善が認められる誘導体のヒット総数を増やす(現在ヒットはNKB23のみ)とともに、毒性構造(チオセミカルバジド構造)回避のための構造展開も早期に検討する必要がある。

・前年度に比較して、担がんモデル動物システムの種類が増え、複数のがん腫(大腸がん、すい臓がん、膀胱がん)に対する薬効評価が可能になった。

・Rasの新規ポケット構造をターゲットにした新たなインシリコスクリーニング(シミュレーション1)で選抜された化合物群のNMR解析を通じて、Ras上には薬剤結合可能領域が複数(新規4ポケット)存在することが明らかになった。これらのポケットの中には我々が同定した既知のポケットと空間的に近いものも含まれるため、これらのポケットに結合する異なるの化合物間をフラグメントリンク法でつなぎ合わせるなど、構造展開手法の新たな可能性が見出される結果となった。

・Rasの新規ポケット構造をターゲットにした新たなインシリコスクリーニング(シミュレーション2)により選抜した候補化合物については、当初、溶解度の問題で生化学試験でのヒット検出が困難であったが、その後の綿密な細胞試験を通じて、細胞内でのRas-Raf結合阻害活性が担保された複数のヒット化合物の抽出に至った。得られたヒット

構造展開については、コストと時間の短縮を図るために、インシリコ的手法を取り入れた効率的な初期構造展開が望ましいと考えられた。

・HAG法の利用により、いわゆる天然状態により近い野生型H-Rasのポケット構造決定が可能になった。同手法をH-RasG12VならびにH-RasQ61Lなど、がん特有の変異体を有する活性型Rasの天然のポケット構造解明に利用するとともに、得られた新規立体構造情報に基づくインシリコスクリーニングを通じて、より効果的なRas機能阻害剤の創出を目指す。

・HAG法によるX線結晶解析を通じて得られたRasのGTP加水分解メカニズムに関する新たな知見は、RasとRafをはじめとする種々の標的蛋白質との結合阻害をねらった我々の現在の手法とは全く異なる新たな手法による新規抗がん剤開発に繋がる可能性がある。

E. 結論

異なる母核構造を有する2種類の化合物の構造展開・最適化において、フラグメントリンク法が極めて有効であることが実験的に証明された。現状ではまだ成功例（ヒット数）が少なく、担がんモデル動物での薬効評価も未実施であることから、今後は誘導体数を増やして、さらに高い活性を示す誘導体を多数同定するとともに、担がんモデル動物を用いたより高次の評価系での薬効評価を通じて、この手法の有効性を最終的な形で証明する必要がある。誘導体によっては、生化学試験において活性改善が認められるにも関わらず、吸収、代謝安定性等の問題で細胞活性の改善が認められなかったことが予測されるものも複数確認されたことから、化合物の細胞内への吸収をはじめとする薬物動態を評価できるシステムを早急に構築し、吸収・代謝安定性も考慮した構造展開を検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Muraoka S, Shima F, Araki M, Inoue T, Yoshimoto A,

Ijiri Y, Seki N, Tamura A, Kumasaka T, Yamamoto M, Kataoka T. Crystal structures of the state 1 conformations of the GTP-bound H-Ras protein and its oncogenic G12V and Q61L mutants. *FEBS Lett.* 586, 1715-1718. (2012)

2. 学会発表

Kataoka T. New strategies for development of anti-cancer drugs targeting the Ras pathway. WINPTech 2012. 神戸大学統合研究拠点(兵庫県) 2013年2月18日 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称：Ras機能阻害作用を有するチオキソチアゾリジン誘導体

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

国際出願番号：PTC/JP2012/061908

国際出願日：平成24年5月9日

国際公開番号：WO2012/153775 A1

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

・チオセミカルバジド構造を有するKobe0065ならびに2種類の誘導体 (Kobe2601, Kobe2602) について、化合物のスクリーニング方法ならびに生化学・細胞生物学的活性データを米国科学アカデミー紀要 (Proc. Natl. Acad. Sci) に発表した。電子版公開に伴い、国内外より多数の問い合わせを受け、新聞・TVなど報道各社により研究の有用性ならびに社会貢献について多数取り上げられた (参考資料1：新聞記事の抜粋は次ページ)。またProc. Natl. Acad. Sci誌に掲載された研究内容については、Natureの姉妹誌であるNature Reviews Cancerにハイライトされた。(参考資料2)

< 参考資料：新聞記事 >

※ 著作権の都合上、転載許可を得た一部の新聞記事のみを参考資料としております。

その他

- ・日本経済新聞 平成25年4月30日 朝刊掲載
- ・産経新聞 平成25年4月30日 2面 夕刊掲載
- ・NHK神戸放送局 平成25年4月30日 放送
- ・関西テレビ 平成25年4月30日 放送
- ・時事通信社 平成25年4月30日 掲載
- ・共同通信社 平成25年4月30日 掲載 他多数

朝日新聞
科学面
平成25年5月2日
朝刊



がん増殖止める「鍵穴」発見 神戸大

神戸大の片岡徹教授と馬扶美准教授(分子生物学)らの研究グループは、がん増殖に関係するたんぱく質に、機能を止める「鍵穴」があることを発見した。「鍵」候補の物質も複数見つけており、抗がん剤開発へ大きな手がかりとなりそうだ。このたんぱく質はRasと呼ばれ

る。正常な細胞では、傷の治癒などの時に細胞を増やす働きの一部を担うが、遺伝子が変異し暴走すると、増殖がとまらなくなり、がん化する。全がんの2割に関わっており、特に大腸がんでは5割前後、膵臓がんでは9割近くで、Rasが過剰に活動しているという。

研究グループは、Rasの立体構造を兵庫県にある大型放射光施設「スプリング8」で解析した。すると、Rasの表面に他の物質と結合する鍵穴構造があることが分かった。この鍵穴にぴったり合う化合物で鍵をかければ、Rasの暴走を止めることができる。研究グループは約20万種類の化合物リストからコンビ

ューターで鍵候補を検索し、培養細胞での試験などを経て、最終的に3つの化合物を選び出した。マウスにヒト大腸がん細胞を移植してこれらの化合物を飲ませると、がんの増殖が抑えられた。片岡教授は「体内での安定性など課題は多い。人では悪阻や副作用が起きる可能性がある」ので、慎重に研究を進める必要があるが、3年以内には臨床試験を始めたいと話す。(中村雄子)

「患者2割に有効」 新たな抗がん剤 候補物質発見

大腸がんや膵臓がんなど幅広いがんに効く可能性のある原因となる遺伝子がある。成果は米科学アカデミー紀要(電子版)に近く発表する。

物質を、神戸大学院が作るタンパク質が活性化し、細胞が異常に増殖してきている。Rasの光施設スプリング8を使って発見した。Rasはがん患者全体の約2割で活性化している。この物質の働きを利用した新薬が開発できれば、最も

神戸大など



片岡徹教授

Rasの働きを止める方法がなかった。

グループは、世界最高水準の解析能力があるスプリング8を使ってRasの構造を調べ、薬剤と結合しやすい「鍵穴」を発見。さらに鍵穴と合う化合物を約4万種類の中からシミュレーションし、結果、投与しない場合と絞り、実際に結合させて抗がん作用を確認。薬が半分程度に抑えられ

3年後の臨床試験目標

大腸や膵臓のがんなどの発症に関与するたんぱく質の働きを止める物質をいつけたか、片岡徹・神戸大教授(分子生物学)らの研究チームが発見した。マウスを使った実験で有効性が確認され、新たな抗がん剤候補として期待されるという。成果は、米科学アカデミー紀要(電子版)に近く発表する。

この物質で、働きを止めることを確認できたのはRasたんぱく質。がん細胞の増殖を促す信号を伝える

チームは、Rasたんぱく質の構造を大型放射光施設、スプリング8を使って分析。コンピュータシミュレーションと実験で、約4万種の候補から、Rasたんぱく質の構造にぴったり合い、その働きを阻害する三つの物質を発見した。

この大腸がん細胞を皮膚のみに移植したマウスに、この化合物を口から投与すると、投与しなかったマウスに比べて腫瘍の大きさが4〜5割程度まで小さくなったという。片岡教授は「3年以内にも人を対象に安全性試験をしたい」と話した。

【吉田卓矢】

化合物ががんを防ぐ仕組みのイメージ



今後は抗がん作用を高め、毒性の有無を確認して新薬につなげたいという。研究の中心となった同研究科の片岡徹教授は「3年後を目標に、ヒトへの応用を目指した臨床試験を始めたい」と話す。

(金井恒幸)

がん細胞減らす物質発見

多くのがんの原因となっている遺伝子の働きを止め、がん細胞を減らす。腫瘍の化学物質を突き止めた。神戸大の片岡徹教授らの研究チームが発見した。3年後をめざして臨床試験の実験を開始するという。米科学アカデミー紀要(電子版)に近く論文が掲載される。

この遺伝子は、人のがん遺伝子としてよく知られている「Ras」。大腸がん患者の3割、膵臓がん患者の8割の発症に関与しているという。この遺伝子が作るたんぱく質は、薬が作用する「鍵穴」となっているため、Rasを阻害する薬はこれまで考えられていた。

チームは、たんぱく質が腫瘍の形を築くことに着目し、これまで知られていなかった形のRasたんぱく質の結晶化に成功。大型放射光施設「SPring-8」(スプリング8)で結晶の構造を解析し、薬の作用で阻害する物質を発見した。この阻害物質は、約4万種類の化合物の中から3種類を選び出した。

このうち2種類を、人の大腸がんの細胞を移植したマウスに投与すると、投与しなかった場合と比べ、18日後のがんの大きさが半分程度に抑えられた。片岡教授は「この成果を進め、大腸がんや膵臓がんなどの治療薬として臨床応用を目指したい」と話している。

片岡徹教授(東京大教授)細胞情報学(分子生物学)の片岡徹教授が発見した。新たながん治療薬を開発するうえで重要な一歩だ。

神戸大チーム 大腸、膵臓がんの新薬開発目指す

がん細胞を減らす物質を突き止めた研究



THERAPEUTICS

Blocking RAS effects

“ these compounds seem to have selectivity for RAS-mutant cells ”

Owing to their driver status in many cancers, members of the RAS family of oncoproteins have been strongly pursued as drug targets. However, inhibitors of proteins that farnesylate RAS proteins have shown limited clinical efficacy, hence alternative routes to RAS inhibition are required. A recent study has identified new RAS-binding inhibitors that can block RAS effector functions and that show antitumour effects in RAS-mutant tumours.

In previous structural studies, Tohru Kataoka, Fumi Shima and colleagues identified a surface pocket on RAS proteins that might be amenable to drug targeting to block effector protein binding. In their current study they used computational screening of a virtual library of >40,000 compounds to search for small molecules that might bind this pocket. Promising leads were functionally tested for their ability to disrupt the interaction between HRAS^{G12V} and the CRAF effector protein, and two structurally similar compounds (Kobe0065 and Kobe2602) were found to be the most potent.

The authors found that the proliferation of HRAS^{G12V}-transformed NIH3T3 cells was inhibited by low micromolar doses of the compounds. Treatment inhibited various pathways downstream of RAS, including the MAPK, AKT and RALA pathways, indicating that the compounds inhibit the interaction of

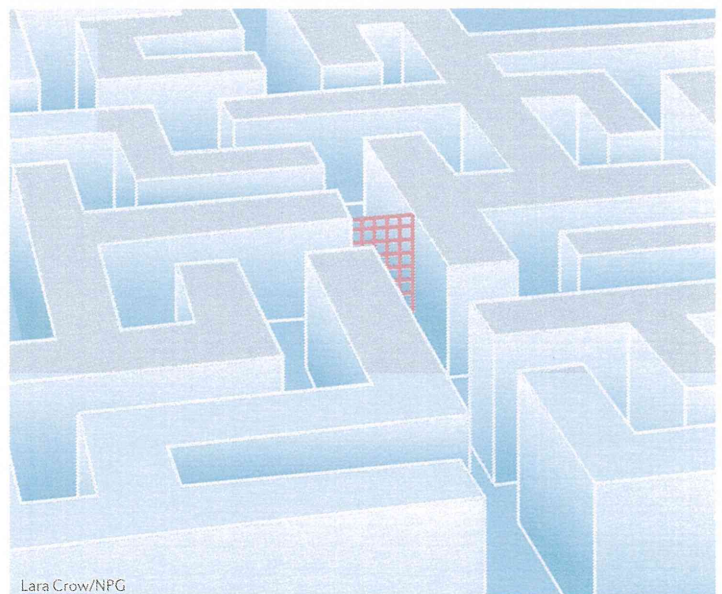
RAS with multiple effector proteins. Additionally, human cancer cell lines with hyperactivated mutant forms of KRAS, HRAS or NRAS were more sensitive to the growth-inhibitory effects of the compounds compared with cells that were wild-type for RAS isoforms. Thus, these compounds seem to have selectivity for RAS-mutant cells. Furthermore, when used in mice, these compounds resulted in modest growth inhibition and apoptosis of KRAS-mutant SW480 human colon carcinoma cell xenografts.

Finally, to characterize in detail the binding interactions of these compounds, the authors used NMR

to solve the atomic structure of a trimeric complex of HRAS bound to a water-soluble derivative of Kobe0065 and a GTP analogue. They indeed found that inhibitor binding occurred in the identified pocket and that this resulted in steric hindrance of effector binding. Moreover, the mode of inhibitor binding was distinct from other recently identified RAS-binding compounds that do not disrupt interactions with RAS effector proteins. Such interaction data could aid the development of future inhibitors with improved RAS-binding potency.

Darren J. Burgess

ORIGINAL RESEARCH PAPER Shima, F. et al. *In silico* discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 29 Apr 2013 (doi:10.1073/pnas.1217730110)



Lara Crow/NPG

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 （氏名）島 扶美 （所属機関名 職名）神戸大学 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・細胞生物学の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、国内大手製薬企業との共同研究を通じて重点的に実施し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。H24年度、先行開発については、フラグメントリンク法による理論的構造最適化研究を通じて、出発リード化合物 KMR084 の活性を、生化学・細胞学的に上回る誘導体の同定に成功した。また、Ras 特異性を規定しうる化合物の部分構造情報の抽出にも成功した。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通じて同定した7種類の新規ヒット化合物について、効率的な初期構造展開を実施するためのシステム構築を行った。また、既に保有する別のヒット化合物 Kobe0065 ならびにその誘導体についての研究成果を米国科学アカデミー紀要（Proc. Natl. Acad. Sci）に発表した。さらに、この化合物群についてもフラグメントリンク法による生化学・細胞学的活性改善が確認されたことから、構造展開・最適化におけるこの手法の有効性が実験的に証明された。

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・細胞生物学の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（H24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（KMR084）から医薬品開発候補獲得のための理論的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ならびに活性検証試験を通じて、新たなヒットを同定するとともに、ヒット化合物の効率的な初期構造展開システムを構築する。さらに、既に保有するヒット化合物の理論的構造最適化研究についても実施する（後行開発）。

B. 研究方法

先行開発：

①H-Rasとリード化合物KMR084の誘導体KMR112

との複合体のNMR構造情報に基づいて、神戸大学が提案するフラグメントリンク法を参考にし、特許（WO2012/153775 A1）導出先である国内大手製薬企業がその誘導体をデザイン・合成する。合成された新規誘導体について、神戸大学内においてRas機能阻害活性を生化学・細胞学的に検証する。

②種々の担がん動物モデルを用いたKMR084の薬効評価を行う。

後行開発：

①出願済み特許（WO2011/007773号ならびにPCT/JP2012/052078号）に記載の新規ポケット（Rasの疎水性ポケット）構造情報を利用し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）により選抜した化合物について、生化学・細胞学的活性検証を行う。得られたヒット化合物の効率的初期構造展開のためのシステム構築を行う。

②既に保有するヒット化合物Kobe0065について、フラグメントリンク法による初期構造展開を実施する。

③特殊試料マウント方法（HAG法）を利用して新規ポケット構造を有するH-RasのX線結晶構造解析を実施する。

（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フラグメントリンク法によるKMR084の構造最適化研究：

・H-Rasとリード化合物KMR084の誘導体KMR112との複合体のNMR構造情報に基づいて、化合物とRasとの結合反応において新たな水素結合を発生させることが予測される複数のフラグメントを神戸大学がデザインした。このフラグメントをKMR084に結合させた新規誘導体（フラグメントリンク法による誘導体）について、H-Rasとの結合エネルギーの順位付けを行った（ファルマデザイン社外注）上で、順位の高かった化合物について、共同研究先の国内製薬企業に提示した。このフラグメントリンク法による誘導体の構造情報を参考にして、同社において新規誘導体をデザイン・合成した。得られた17種類の新規誘導体について、Ras機能阻害活性を評価したところ、6種類の化合物については、出発化合物であるKMR084より強力な、がん細胞（*活性型H-Ras変異体（H-RasG12V）を有するマウスNIH3T3）の足場非依存性増殖抑制作用を示すことが確認された。またいずれの誘導体も、細胞内においてH-Rasと標的蛋白質Rafとの結合を有意に阻害したが、Ras-Raf結合阻害活性の

強度の比較は細胞内システムにおいては困難であった。

・新規誘導体の溶解度が全体的に極めて低かったことから、生化学試験によるRas-Raf結合阻害活性については一部の化合物についてのみ実施可能であった。実施範囲内では、KMR084より生化学活性が有意に高い化合物が3種類検出された。一方、これらの化合物は細胞活性がKMR084より低かったことから、細胞内への化合物の吸収、細胞内での安定性などの問題の改善が必要と考えられた。

・上記複数の新規誘導体の、生化学・細胞学的活性比較を通じて、化合物がRas特異的な活性を発現する上で重要な化合物の部分構造が明らかになった。

②複数のがん腫モデルを用いたKMR084の薬効評価：

・これまでのヒト大腸がんモデル動物システム（ヒト大腸がん細胞SW480（K-RasG12V）を移植したヌードマウスに化合物を経口投与し、腫瘍増殖抑制効果を評価する）に加え、ヒト膵臓がん

（Panc-1：K-RasG12D）モデル動物システムならびにヒト膀胱がん（EJ-1：H-RasG12V）モデル動物システムを構築し、KMR084の薬効評価を行ったところ、個体数が少なく有意差検定には至らなかったものの、一定の腫瘍増殖抑制傾向が確認された。

後行開発（番号はBの内容に対応）：

①シミュレーション2により選抜した化合物の活性検証とヒット化合物の効率的初期構造展開システムの構築：

・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）により選抜した200化合物（KBFMシリーズ）について、生化学試験（Ras-Raf結合阻害試験）を実施したところ、200 μ M以上の溶解度が担保できた化合物についてはヒットを検出できなかった。

・溶解度が極めて低かった40化合物について、がん細胞（*）の足場非依存性細胞増殖抑制作用を評価したところ、4種類の母核構造に分類される18種類のヒット化合物の同定に成功した。これらの化合物は細胞内においてRas-Raf結合阻害作用を示した。

・上記18種類のヒット化合物の中から細胞活性の強かった上位7化合物を選抜し、StarDrop Novaを利用して、溶解度の改善が望める新規誘導体構造を1052種類発生させた（ファルマデザイン社）。この中から、有機化学合成可能な化合物の絞り込み（150種類以内）を今後行う。化合物とH-Rasとの複合体の初期構造モデル（シミュレーション2において化合物を選抜するための結合エネルギー計算

の際に既に得られている)の構造最適化計算を実施し(ファルマデザイン社)、得られた最適化H-Ras構造モデルを用いて、前述の約150種類の選抜化合物とのドッキングシミュレーションを実施する(ファルマデザイン社)。出発化合物よりH-Rasとの結合エネルギー値が有意に改善された化合物を選抜して、神戸天然物化学株式会社において実際に有機化学合成し、神戸大学内で実施する一連の活性検証試験を通じて、効率的な初期構造展開を可能にする。

②保有ヒット化合物Kobe0065の初期構造展開：

・チオセミカルバジド構造を有するKobe0065ならびに2種類の誘導体(Kobe2601, Kobe2602)について、化合物のスクリーニング方法ならびに生化学・細胞生物学的活性データを米国科学アカデミー紀要(Proc. Natl. Acad. Sci)に発表した。電子版公開に伴い、国内外より多数の問い合わせを受けるとともに、新聞・TVなど報道各社にも研究成果が取り上げられた。またProc. Natl. Acad. Sci誌に掲載された研究内容については、近日中に、Natureの姉妹誌であるNature Reviews Cancerにハイライトされる予定である。

・Kobe0065ならびにその誘導体の毒性発現に関連する可能性の高いチオセミカルバジド構造を回避する目的で、神戸天然物化学株式会社がデザイン・合成した11種類のチオヒダントイン誘導体について、神戸大学において活性評価を行ったが、Ras特異的な阻害活性は認められなかった。

・Kobe0065とH-Rasとの結合情報(NMRによる複合体の立体構造情報)ならびにジェネンテック社とアボット社が2012年にProc. Natl. Acad. Sci誌等に発表した化合物の構造情報を参考にして、神戸大学内において、フラグメントリンク法によって16種類の新規誘導体の構造デザインを行った。これらの誘導体について、分子シミュレーションソフトMOEを用いて、Rasとの結合エネルギーを計算し、上位に位置した誘導体の構造情報を参考に、神戸天然物化学株式会社において誘導体を有機化学合成した。得られた化合物の活性評価を神戸大学内において行ったところ、出発化合物であるKobe0065より生化学・細胞学的活性の強い新規誘導体NKB23を同定することに成功した。

③HAG法による新規ポケットを有するH-RasのX線結晶構造解析：

・ポケット構造を有するH-Rasの立体構造解析は、自然界では存在しない特殊なアミノ酸置換を導入した変異型Rasポリペプチド(H-RasT35S)を利用したX線結晶解析ならびにNMR解析、あるいはこの変異型Rasポリペプチドの結晶核を利用したクロスシーディング法で作製した野生型H-Rasあるいはがん確認される活性型変異を有する

H-RasG12V, H-RasQ61LのX線結晶解析においてのみ実現可能であった。しかしいずれの立体構造も、自然界では存在比率が極めて低いもの(人工的な構造)であることが前年度までの研究で明らかになっていた。しかし、HAG法で結晶中の水蒸気圧ならびに結晶温度を調節することにより、自然界での存在比率が比較的高いことが予想される新規ポケット構造の決定が可能になった。この新規ポケット構造との詳細な比較解析を通じて、RasのGTP加水分解メカニズムに関する新たな知見が得られた。

D. 考察

・先行開発、後行開発ともに、化合物とRasとの複合体構造情報を活用したフラグメントリンク法により、出発化合物の生化学・細胞学的活性を上回る誘導体のデザイン・合成に成功した。

・フラグメントリンク法により得られたKMR084の新規誘導体については、種々のがん細胞株を用いた活性検証試験を通じてRas特異性を担保した上で、担がんモデル動物での活性検証試験に進める必要がある。生化学試験では強い活性を示すものの細胞活性が弱かった化合物については、今後、細胞内への化合物の吸収、細胞内での安定性など、代謝動態の評価を行った上で、構造最適化を進める必要がある。

・フラグメントリンク法により得られたKobe0065の新規誘導体については、今後、活性改善が認められる誘導体総数を増やす(現在ヒットはNKB23のみ)とともに、毒性回避のための構造展開も検討する必要がある。

・前年度に比較して、担がんモデル動物システムの種類が増え、複数のがん腫に対する薬効評価が可能になった。

・Rasの疎水性ポケットをターゲットとしたシミュレーション2により選抜した候補化合物については、当初、溶解度の問題で生化学試験でのヒット検出が困難であったが、その後の綿密な細胞試験を通じて、細胞内でのRas-Raf結合阻害活性が担保されたヒットの抽出に至った。得られたヒットの構造バリエーションが多かったことから、初期構造展開については、コストと時間の観点から、インシリコ的手法を取り入れた効率的な初期構造展開が望ましいと考えられた。

・HAG法を利用することにより、自然界での存在比率が比較的高い(いわゆる天然の)野生型H-Rasのポケット構造決定が可能になった。この手法を用いて、今後H-RasG12VならびにH-RasQ61Lなど、がん特有の変異体を有するRasの天然のポケット構造を解明するとともに、得られた新規構造情報に基づくインシリコスクリーニングを通じて、

より効率的なRas機能阻害剤の創出を目指す。

・HAG法によるX線結晶解析を通じて得られたRasのGTP加水分解メカニズムに関する新たな知見は、Rasと標的蛋白質との結合阻害をねらった我々のこれまでの手法とは全く異なる手法、すなわち、GTPの加水分解作用の促進を介してRasを不活化する新たな医薬品候補の開発に繋がる可能性がある。

E. 結論

フラグメントリンク法を通じて、先行・後行開発化合物の活性改善に成功し、構造展開・最適化における本手法の有効性が証明された。また、複数のがん腫に対する薬効評価を行うシステムも構築された。一方、構造最適化を効率的に進めるために、培養細胞内に取り込まれた化合物ならびに代謝産物の濃度を測定するシステムの構築の必要性が確認された。また、後行開発品であるKobe0065誘導体については、毒性回避のための構造展開を早急に行い、先行・後行開発を通じて、医薬品開発のためのRas機能阻害物質の総数を増やすことの重要性が確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Muraoka S, Shima F, Araki M, Inoue T, Yoshimoto A, Ijiri Y, Seki N, Tamura A, Kumasaka T, Yamamoto M, Kataoka T. Crystal structures of the state 1 conformations of the GTP-bound H-Ras protein and its oncogenic G12V and Q61L mutants. *FEBS Lett.* 586, 1715-1718. (2012)

2. 学会発表

Shima F. *In silico* discovery of novel Ras inhibitors that display anti-tumor activity by blocking the Ras-effector interaction. WINPTech 2012. 神戸大学統合研究拠点 (兵庫県) 2013年2月19日 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称：Ras機能阻害作用を有するチオキノチアゾリジン誘導体

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

国際出願番号：PTC/JP2012/061908

国際出願日：平成24年5月9日

国際公開番号：WO2012/153775 A1

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合成による構造展開に関する研究

研究分担者 関 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構造情報を用いた *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てリード化合物 KMR084 を見出し、特許（特願2011-105613）を出願した。本研究における先行開発研究では特許の強化を目的にフラグメントリンク法からの合成展開と構造安定化の視点からの合成展開を行い見出された化合物は実施例化合物として追加し、本年度、国際出願を完了した（国際出願番号 PTC/JP2012/061908）。また、本特許の導出先製薬企業の選定に向けては製造プロセスの確立と化合物提供ならびに化合物情報提供を行い、国内大手製薬企業への特許実施権許諾契約を締結した。後行開発研究においては新規ポケット構造情報を用いたコンピュータ・ドッキングシュミレーションと生化学・細胞学的活性評価により見出された複数の新規ヒット化合物と先行開発化合物とは構造の異なる既存ヒット化合物から有機合成化学とメドケム手法によりデザインと合成を実施し、その構造と活性のプロファイルからヒット化合物の見極めを行い、先行開発化合物とは構造の異なる新たなリード候補化合物の同定を進めている。

A. 研究目的

先行開発

1) 保有するリード化合物 KMR084 の構造最適化を KMR084 が結合するポケット（ポケット2）と Ras 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ポケット（ポケット1）を共に活用するフラグメントリンク法を用いてデザインする。また、リード化合物 KMR084 誘導体に共通する母核構造の安定性向上を目的とした構造最適化を実施する。

2) 上記最適化過程で合成した化合物は生化学・細胞学的評価を行い、活性と構造安定性が認められる化合物は評価データと共に実施例化合物として KMR084 含む既出願済特許に追加し国際出願を完了する。

3) 上記特許許の導出先製薬企業の選定に向けて、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と化合物情報の提供を行う。

後行開発

1) 構造情報に関する出願済み特許に記載されている新規ポケット構造に基づく大規模インシリコ

ドッキングシュミレーション（H23, 24年度）から得られるインシリコヒット化合物より生化学・細胞学的活性が確認された化合物を選抜し、構造展開によるバリデーションを行い、母核構造の異なる新規リード候補化合物を創製する。

2) KMR084の元となるヒット化合物Kobe2725とほぼ同時期に既に見出されている母核構造の異なるヒット化合物としてチオセミカルバジド誘導体 Kobe0065の構造展開性を見極めるため、再度創薬化学手法を用いて誘導体をデザインし、新規な母核構造への変換を実施する。

B. 研究方法

先行開発

1) リード化合物KMR084の構造最適化・活性増強を目的にKMR084が結合するポケット2と新たに見出したもう一つのポケット1を共に活用するフラグメントリンク法により化合物をデザインする。具体的にはRasのポケット1を構成するアミノ酸側鎖官能基と相互作用可能な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、蛋白質と化合物の相互作用をより強固にすることを目的

とする。合成した化合物の生化学的評価結果を基に最適化を進める。また、リード化合物KMR084はケトーエノール互変異性を有する母核構造を持つことから、その構造安定性を向上するため、共役二重結合の導入により安定化を図る。

2) 1)での最適化研究で得られた結果を既出願済特許(特願2011-105613)に追加すると共に国際出願を行う。

3) 導出先製薬企業の選定に向けてKMR084のプロセス製造法を検討し、MTA下での選定候補会社への評価用サンプルと化合物情報の提供を円滑に行う。

後行開発

1) 神戸大学医で既に出願された新規ポケット構造情報に基づき大規模インシリコドッキングシミュレーションによる検索を実施する。対象となる入手可能な市販化合物ライブラリはフラグメントエボリューションを視野に入れた比較的分子量の化合物ライブラリと分子量にはこだわらないドラッグライクなライブラリが対象として選ばれた。それぞれから選抜されたインシリコヒット化合物はさらに生化学・細胞学的活性評価により絞り込みが実施された後、構造分類、合成法・特許既知情報・市販類似化合物などの検索、活性評価データと溶解性などの物性データなどから構造展開性を総合的に解析し、誘導体デザインと合成を行う。さらに評価結果に基づき新たな化合物デザインへとつなげるサイクルを回し、構造新規性のあるリード候補化合物を創製する。

2) チオセミカルバジド誘導体 Kobe0065 など既に保有するヒット化合物についても見直しを行い、これまでに得られているフラグメントリンク手法のデザインへの応用や母核構造の異なる新たなリード候補化合物創出の可能性をデザイナー-合成-評価のサイクルにより検討する。

(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

先行開発

1) KMR084の構造最適化をフラグメントリンク法によりデザインし25化合物を合成した。また、共役二重結合を導入することにより構造安定化を示す1化合物を見出した。結果としてはKMR084を上回る活性向上を有する化合物を見出すには至っていない。

2) 1)において見出された15化合物については製法と活性評価結果を出願済特許(特願

2011-105613)に追加し、請求クレーム範囲と実施例化合物数・製法を追加拡大した国際出願(国際出願番号: PTC/JP 2012/061908、国際出願日: 2012年5月9日)を完了した(国際公開番号WO2012/153775A1)。

3) 上記特許の導出先企業選定に向けたKMR084の効率的なプロセス合成法を確立し、MTA下での評価サンプル提供を円滑に実施すると共に適切な化合物情報の提供を行った。最終的に国内大手製薬企業と特許実施権許諾契約を締結することが出来た。

後行開発

1) ヒット化合物の構造展開についてはまずRas蛋白質のポケットに結合し得る比較的分子量の小さなフラグメント化合物をインシリコドッキングシミュレーションにより選抜された。活性評価の結果得られたKBFM148は活性的には非常に弱いものであったが、その構造展開性や活性向上の可能性を見極めるため、類縁誘導体のデザインを行い、25化合物を合成し評価した。いずれの化合物も活性の向上は認められなかった。また、分子量にはこだわらないドラッグライクな化合物ライブラリからのインシリコスクリーニングによって見出されたヒットについては生化学評価である結合阻害活性と細胞学的活性の評価項目を共にパスする化合物は得られなかった。これはヒット化合物の水溶性が低いと細胞系活性評価では活性が認められるが、結合阻害活性では明らかな活性を評価することが出来ないという結果による。その中で細胞系では活性が認められた19個のヒット化合物について、構造分類、特許既知化合物情報、合成法、水に対する溶解性改善に向けた構造展開性を検討し、ヒットバリデーションを実施している。構造展開性が期待できるヒット化合物については化合物デザインと合成を進める予定である。

2) 既存ヒット化合物の展開については、*in vitro*と*in vivo*の評価で共に先行開発化合物KMR084と同様に活性が明らかにされているチオセミカルバジド系化合物に再度着目し、新たにチオセミカルバジド母核構造の等価変換体としてチオヒダントイン構造を持つ化合物11化合物をデザインし合成した。さらにチオセミカルバジド構造を残し、これまでの構造活性相関やフラグメントリンク法で得られた知見を活用し、新たに6化合物を合成した。その結果、フラグメントリンク法を応用したNKB23はヒット化合物Kobe0065を生化学評価と細胞系評価において共に上回る活性を示した。今後、この結果を更なる化合物デザインに活用し、新規母核を有するリードの早期創出を図りたい。

D. 考察

先行開発においては特許の補強と国際出願を完了し、国内大手製薬企業への特許導出を達成することが出来た。

一方、新たに前臨床試験に入り得る新規リード候補化合物の創出を目的とするインシリコスクリーニングヒットからツルーヒット（リード候補となる得るヒット化合物）の同定はまだ至っていない。低分子量のフラグメントスクリーニングからの構造展開では、標的蛋白質Rasへの結合の弱さから蛋白-蛋白相互作用（Rasとその標的蛋白質）を明確に阻害することは難度が高い。それら低分子フラグメントが結合する部位が特定され、それぞれが異なる部位に結合するフラグメントが複数個同定することが出来、それぞれを適切なジャンクションで繋ぐことができれば蛋白-蛋白の結合阻害力を向上することができると考えられる。また、ドラッグライクである程度の分子量を持つライブラリから得られているヒット化合物については溶解性が悪く生化学的評価である結合阻害活性を確認するには至っていない。そこで、ヒット化合物の構造展開性を見極めるため、Ras蛋白との結合に必要な部分構造を理論計算科学と実際の誘導体合成により明らかにし、その結果をもとに結合に関与しない部分構造に適切な親水性置換基を導入することで溶解性の向上と結合アフィニティの向上を共に達成することが必要と考える。

また、既存ヒット化合物として注目しているチオセミカルバジド系化合物には代謝を受けてヒドラジンが生成し副作用に繋がる懸念がある。今回フラグメントリンク法から見出すことが出来たNKB23の置換基を基にした最適化と共に、ヒドラジン副成の無い別母核構造への変換が重要な課題と考えられた。

E. 結論

既に出願した特許を請求項の拡大と実施例化合物の追加により補強し、国際特許を出願すると共に国内製薬企業への特許実施権許諾契約締結を完了した。新たな研究分業化体制に従い、当社の先行開発に関わる研究は完了した。今後の研究目標は後行開発における新規なリード化合物と前臨床試験候補化合物の創出にある。インシリコスクリーニングから選択された化合物については生化学・細胞学的活性データ、物性（溶解性）、合成法、既知特許情報に加えて標的蛋白質Rasとの理論計算科学的な解析など様々な視点から評価を開始しており、今後、数種の化合物に絞り込むための課題解決を図っていきたいと考えている。フラグメントリンク法から新たに見出したNKB23からの展

開も含めH25年度にはこれらヒット候補化合物よりツルーヒットを見極め、リード候補化合物の創製を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

無

2. 学会発表

無

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願日：平成23年5月10日

出願番号：特願2011-105613

発明の名称：「Ras機能阻害作用を有するチオキンチアゾリジン誘導体」

国際出願番号：PTC/JP2012/061908

国際出願日：平成24年5月9日

国際公開番号：WO2012/153775 A1

2. 実用新案登録

3. その他

*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

研究分担者 （氏名）熊坂 崇 （所属機関名 職名）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蛋白質は、低分子GTP結合蛋白質の一種で、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蛋白質は分子質量約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もち細胞膜に繋ぎ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。Ras-GTPは、従来活性型と考えられていたが、エフェクター分子との結合能力を有するstate 2構造 (真の活性型) と有さないstate 1構造 (不活性型) との間での構造遷移 (ゆらぎ) が存在することが近年のNMR解析で明らかになった。

我々はこれまでにX線結晶解析により、野生型Rasでは初めてとなるstate 1の立体構造決定に成功した。このRasのstate 1構造には分子表面に低分子化合物が十分挿入できるサイズのポケット構造が存在することが明らかとなった。このポケットに選択的に結合してRasの構造をstate 1に安定化する物質は、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いる。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抗がん活性を示す複数のヒット化合物の同定に成功している。

本分担研究では、これらとRas蛋白質の複合体構造を解明し、医薬品候補としてふさわしい活性獲得を目指したヒット化合物のデザインを推進することを目的としている。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、野生型Ras蛋白質に加え、state 1を取りやすいH-RasT35Sを用いて、抗がん活性を示す複数のヒット化合物との複合体の立体構造を解析する。

すでに得られているRas蛋白質単体の結晶化条件を基に、化合物を蛋白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)

蛋白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