

- [14] Y. Fukunishi, Y. Mikami, H. Nakamura, The filling potential method: a method for estimating the free energy surface for protein-ligand docking, *J. Phys. Chem. B* 107 (47) (2003) 13201–13210.
- [15] Y. Fukunishi, Y. Mikami, H. Nakamura, Similarities among receptor pockets and among compounds: analysis and application to *in silico* ligand screening, *J. Mol. Graph. Model.* 24 (1) (2005) 34–45.
- [16] F. Shima, et al., *In silico* discovery of small-molecule Ras inhibitors that display anti-tumor activity by blocking the Ras-effector interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (20) (2013) 8182–8187.
- [17] P. Willett, J.M. Barnard, G.M. Downs, Chemical similarity searching, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 38 (6) (1998) 983–996.
- [18] S. Wilhelm, et al., Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (10) (2006) 835–844.
- [19] S.M. Margarit, et al., Structural evidence for feedback activation by Ras-GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS, *Cell* 112 (5) (2003) 685–695.
- [20] G.M. Wang, et al., Single copies of mutant K-ras and mutant PIK3CA cooperate in immortalized human epithelial cells to induce tumor formation, *Cancer Res.* 73 (11) (2013) 3248–3261.
- [21] Y. Ito, et al., Regional polyesterism in the GTP-bound form of the human c-Ha-Ras protein, *Biochemistry* 36 (30) (1997) 9109–9119.
- [22] N. Nassar, et al., The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue, *Nature* 375 (6532) (1995) 554–560.
- [23] M.E. Pacold, et al., Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma, *Cell* 103 (6) (2000) 931–943.
- [24] L. Huang, F. Hofer, G.S. Martin, S.H. Kim, Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS, *Nat. Struct. Biol.* 5 (6) (1998) 422–426.
- [25] P.J. Hajduk, E.T. Olejniczak, S.W. Fesik, One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (50) (1997) 12257–12261.
- [26] M. Geyer, et al., Conformational transitions in p21ras and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP, *Biochemistry* 35 (32) (1996) 10308–10320.
- [27] M. Geyer, et al., Conformational states of the nuclear GTP-binding protein Ran and its complexes with the exchange factor RCC1 and the effector protein RanBP1, *Biochemistry* 38 (35) (1999) 11250–11260.
- [28] M. Spoerner, et al., Slow conformational dynamics of the guanine nucleotide-binding protein Ras complexed with the GTP analogue GTPγS, *FEBS J.* 274 (6) (2007) 1419–1433.
- [29] J. Liao, et al., Two conformational states of Ras GTPase exhibit differential GTP-binding kinetics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369 (2) (2008) 327–332.
- [30] R.B. Fenwick, et al., Solution structure and dynamics of the small GTPase RalB in its active conformation: significance for effector protein binding, *Biochemistry* 48 (10) (2009) 2192–2206.
- [31] C.J. Halkides, et al., High frequency (139.5 GHz) electron paramagnetic resonance spectroscopy of the GTP form of p21 ras with selective ¹⁷O labeling of threonine, *Biochemistry* 35 (37) (1996) 12194–12200.
- [32] K. Matsumoto, et al., Critical roles of interactions among switch I-preceding residues and between switch II and its neighboring α-helix in conformational dynamics of the GTP-bound Ras family small GTPases, *J. Biol. Chem.* 286 (17) (2011) 15403–15412.

- [33] T. Maurer, et al., Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (14) (2012) 5299–5304.
- [34] Q. Sun, et al., Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (25) (2012) 6140–6143.
- [35] H.J. Hocker, et al., Andrographolide derivatives inhibit guanine nucleotide exchange and abrogate oncogenic Ras function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (25) (2013) 10201–10206.
- [36] K.H. Lim, B.B. Ancrile, D.F. Kashatus, C.M. Counter, Tumor maintenance is mediated by eNOS, *Nature* 452 (7187) (2008) 646–649.

解説

ras がん遺伝子産物の新規立体構造情報を利用した分子標的がん治療薬の開発

島 扶美¹, 熊坂 崇², 松本篤幸¹, 吉川陽子¹, 山本雅貴³, 片岡 徹¹

¹神戸大学大学院医学研究科 〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1

²高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

³理化学研究所・放射光科学総合研究センター 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

要旨

ras がん遺伝子はヒトのがんにおいて極めて高率に突然変異による活性化が認められることから、その産物である Ras タンパク質は抗がん剤開発における格好の分子標的と考えられてきた。しかし、その機能阻害薬の開発は、これまでに多数の製薬会社で行われてきたものの未だ成功例がない。Ras の支配するシグナル伝達系を研究する過程で、我々は、Ras の GTP 結合型 (Ras-GTP) には、立体構造の遷移状態が存在し、その遷移過程で Ras の分子表面に薬剤が結合可能なポケット構造が出現することを世界に先駆けて発見した。この新規のポケット構造情報を利用した独自のインシリコとウェットのスクリーニングを実施して Ras の機能を阻害する薬剤の開発に取り組んだ結果、顕著な抗がん作用を示す複数の新規 Ras 機能阻害物質 Kobe0065 ファミリー化合物の同定に成功した。本稿ではその結果と今後の展望について解説する。

1. 抗がん剤開発の流れと現状

抗がん剤開発の歴史は、第二次世界大戦前にドイツでびらん性毒ガス兵器として開発されたマスタードガス (サルファマスタード) に由来するナイトロジェンマスタード (白血病治療薬) に端を発する。1950年代から1960年代にかけて、植物アルカロイド (ビンブラスチン), 代謝拮抗薬 (フルオロウラシル, メトトレキセート, メルカプトプリン) など、現在でもがん治療において重要な役割を果たす従来型の抗がん剤、いわゆる化学療法剤の主流がこの時期に出そろうことになる (なお、1970年代以降には、プラチナ製剤 (シスプラチン), インターフェロン, ホルモン製剤も登場する)¹⁾。これら化学療法剤は、DNA 合成阻害, 細胞分裂阻害, DNA 損傷, 代謝拮抗など殺細胞性の抗がん剤であり、がん細胞の細胞傷害を狙ってはいるものの、造血細胞, 腸管などの粘膜細胞, 毛根細胞など、正常細胞の中でも比較的増殖が活発な細胞群に対しても増殖抑制作用を示すため、実際にこれらの薬剤を服用した場合には、貧血や感染症 (骨髄抑制作用), 悪心・嘔吐, 粘膜のただれ, 脱毛など、治療中の生活クオリティーの大幅な低下につながる重篤な副作用が現れることが多い。

このため、正常細胞へのダメージを可能な限り抑え、がん細胞のみを選択的に攻撃する薬剤が臨床の現場では望まれてきた。この目的で開発された分子標的がん治療薬 (分子標的薬) は、疾患に直接関連する特定の分子 (タンパク

質) を標的としてその機能を制御する。すなわち、がん細胞と正常細胞との違いを細胞ならびに分子レベルで解明し、がん細胞の増殖ならびにがんの転移に必要なタンパク質の機能を選択的に阻害することにより、がんの効果的な治療が可能となる。多くの化学療法剤もその作用機序としては、何らかの分子標的を持つと考えられるが、一般的にはその選択性が低い。一方、分子標的薬の場合は、医薬品の設計の段階から分子レベルで標的を定めているという点において化学療法剤とは大きく異なっている (Table 1)。

分子標的薬は、1980年代より始まったがん細胞に特異的に発現される腫瘍関連抗原を認識して作用を発揮するモノクローナル抗体の開発に端を発する。この腫瘍関連抗原

Table 1 Comparison between chemotherapeutics and molecular targeted (anti-cancer) drugs

	化学療法剤	分子標的薬
標的選択性	低い	高い
投与前の効果予測	不可能	可能
現れる副作用	予測できる (白血球・血小板の減少, 脱毛など)	予測できない
主な開発手法	培養細胞での殺細胞活性評価	<i>in silico</i> スクリーニング 生化学的手法による ハイスループット スクリーニング
医薬品の種類	天然化合物やその誘導体	低分子化合物 抗体薬

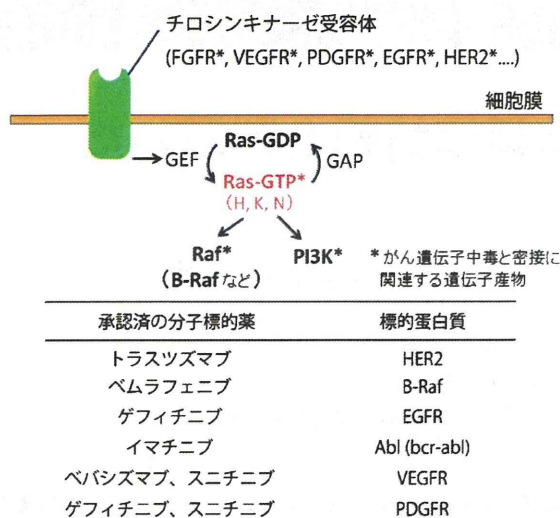


Fig. 1 (Color online) Gene products related to oncogene addiction and molecular targeted anti-cancer drugs targeting them.

に対する抗体療法は、マウス抗体の利用を皮切りに、マウス抗体の定常領域をヒト由来のものに置き換えたキメラ抗体が開発され、1997年に初の抗体医薬品リツキシマブが承認された。今日では完全ヒト化抗体が開発され、トラスツズマブやベバシズマブのように広く使用されているものもあるが、非常に高価である上、必ずしも著効を得られるものではない。

一方、臨床応用に耐える分子標的治療が始まったのは、イマチニブ、ゲフィチニブ (Fig. 1) などの低分子量有機化合物が誕生した1990年代以降である。特に2001年に承認されたイマチニブは、慢性骨髄性白血病に対して大きな効果を発揮し、その評価を飛躍的に高めた。また開発期間も、イマチニブでこそ標的分子である Bcr-Abl チロシンキナーゼ (フィラデルフィア染色体の遺伝子産物、リン酸化酵素) 発見後40年を要したが、最近では承認までの時間が4~5年程度になるものもあり、IT 創薬技術とゲノム医学の進歩が、分子標的薬の開発期間を全般に短縮化・加速化していると考えられる。イマチニブならびにゲフィチニブが、がん化のシグナル伝達において主要な役割を果たすキナーゼ (リン酸化酵素) の ATP 結合阻害物質であったことから、これらの登場は2001年以降、同様のコンセプトを目指した種々のキナーゼ阻害剤の開発研究と承認に拍車をかけることになる。これらのキナーゼ阻害剤は、白血病など比較的発症頻度の低いがんに対する治療薬であり、最近開発された Eml4-Alk キナーゼの分子標的薬クリゾチニブも肺がんの約4%に有効であるのみである。したがって、大腸がん、肺がん、胃がんなど発症頻度の高いがんにも広く有効である分子標的薬はまだほとんどないという現状にある。

2. 分子標的薬とがん遺伝子中毒

がん細胞には、細胞の無制限な増殖機能のみならず細胞の生存自体をがん遺伝子に頼る性質があり、“がん遺伝子中毒”と呼ばれる²⁾。これは、がん遺伝子の発現異常 (発現上昇) あるいはがん遺伝子の突然変異に由来する遺伝子産物 (タンパク質) の細胞内での機能異常が引き起こす性質と考えられている。がん細胞ならびにがん組織において異常ながん遺伝子産物の機能を特異的に阻害すると、細胞増殖の抑制のみならず急速ながんの退縮が起こることは、培養細胞ならびに実験動物を用いた研究でも実際に確認されている。イマチニブ、ゲフィチニブをはじめとする、近年開発された分子標的がん治療薬の多くは、このがん遺伝子中毒と密接に関連する遺伝子産物を標的としている (Fig. 1)。また前述のように近年の開発においてはキナーゼ阻害剤が多いことも特徴である。一方、がん遺伝子中毒関連遺伝子であることが古くから知られているにも関わらず、治療薬が全く存在しないのは今や *ras* と *myc* (転写因子) を残すのみと言われている³⁾。

3. Ras タンパク質の機能と阻害剤開発の流れ

ras がん遺伝子産物 Ras は、200アミノ酸残基足らずの低分子量 G 蛋白質であり、活性型である GTP 結合型 (Ras-GTP) と不活性型である GDP 結合型 (Ras-GDP) を行き来しながら細胞増殖・分化のシグナル伝達を制御する分子スイッチとして機能している。Ras-GTP は、Raf キナーゼやホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K) などの標的タンパク質 (エフェクター) と結合してそれらを活性化することにより、細胞増殖シグナルを細胞核に中継する。GDP 結合型から GTP 結合型への変換はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) により促進され、逆方向の変換は Ras 自身が持つ結合した GTP の加水分解活性によるが、この活性は GTP 加水分解促進タンパク質 (GAP) により促進される。Ras には、アミノ酸配列の類似した Rap, R-Ras や M-Ras などの類縁タンパク質が存在し、Ras ファミリーを形成している。哺乳動物では H-Ras, K-Ras, N-Ras の3つのアイソフォームが存在し、ヒトのがんにおいては、そのいずれかの突然変異によって、GTP 加水分解活性が低下するとともに GAP による GTP 加水分解促進作用を受けなくなるため、細胞内において GTP 結合型が優位になり、結果として Ras によるシグナル伝達が常時活性化されることとなる。Ras は、大腸がんや早期発見ならびに治療がともに困難な膵臓がんなど、多くのがんにおいて極めて高率に突然変異 (大腸がん: 40~50%, すい臓がん: 60~90%) による活性化が認められることから、その機能を特異的に阻害する物質が開発されれば、多くのがんの治療が可能な画期的な新薬の提供が

実現できる。

Ras 機能阻害剤開発の流れとしては、1990年代の半ばから Ras の機能発現に必須の翻訳後脂質修飾ファルネシル化を阻害するファルネシル転移阻害剤 (FTI) が国内外の多数の製薬企業で開発された⁴⁾。しかし、ファルネシル化が Ras 特異的でないこと、ファルネシル化阻害を回避し別の脂質修飾 (ゲラニルゲラニル化) により活性化される Ras が存在することもあり、近年の米国等での臨床治験において、少なくとも固形腫瘍については患者への延命効果が認められないことから、開発が頓挫している。また 2012年以降は、FTI とは異なるコンセプトで Genentech 社などが、不活性型である Ras-GDP に特異的に結合し、Ras と GEF の 1 つである Sos との相互作用を介する Ras-GTP (活性型) への変換を特異的に阻害する物質の開発研究について論文発表^{5,6)}している。しかし Genentech 社らの化合物は、培養がん細胞での活性は極めて弱く、担がん動物モデルでの抗腫瘍活性は全く評価されていない。その他、2013年には Andrographolide 誘導体も報告されているが、作用機序については既存の Ras の立体構造情報を用いた相互作用の予測データしかなく、Ras への直接結合等、相互作用を証明する実験値は一切示されていない⁷⁾。このように、現在世界的に見て、がん細胞内で優位な GTP 結合型の Ras に直接作用することで Ras の機能阻害活性を示す有望な分子標的薬は皆無であり、創造的かつ革新的な開発アイデアが切望されている。

4. GTP 結合型における新規不活性型構造の X 線結晶構造解析

Ras 機能阻害剤の開発、特にタンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計 (Structure-Based Drug Design: SBDD) を目指す場合には、がん細胞において優位な GTP 型 (Ras-GTP) を標的構造にする必要がある。Ras-GTP の立体構造は、H-Ras を用いた X 線結晶解析により 1990 年に Wittinghofer らによって明らかにされた⁸⁾。これ以降多くの構造生物学者が変異体も含めた様々な Ras の立体構造を明らかにしてきたが、Ras-GTP の分子表面には、キナーゼ阻害剤が作用するキナーゼの ATP 結合ポケットのような理想的な薬剤結合ポケットは存在しない、というのが構造生物学者たちの共通認識であったと推察される。実際、Ras を標的とした SBDD は最初の結晶構造決定以降全く進まなかった。

しかし、1990年代の半ば以降になると、³¹P 核磁気共鳴法 (³¹P-NMR) による構造解析により、長らく単一の活性型構造と考えられてきた Ras-GTP には、標的との結合能力を有する state 2 構造 (活性型) と有さない state 1 構造 (不活性型) との間での相互変換 (構造遷移) が存在することが明らかになってきた (Fig. 2)⁹⁾。溶液中での存在比率が高い state 2 (野生型では GTP 型全体の約 60%

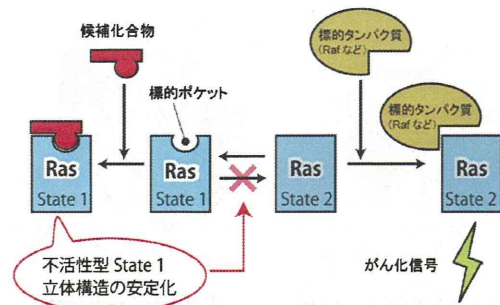


Fig. 2 (Color online) Role of the conformational transition of GTP-bound Ras in oncogenic signal transduction.

で残りが state 1 構造) の X 線結晶構造は高分解能で既に決定されていたものの、state 1 についてはその存在比率が増加する T35S 変異体 (野生型のアミノ酸残基番号 35 のトレオニン Thr をセリン Ser に置換した変異体) の不完全な結晶構造が得られているのみであった¹⁰⁾。電子スピン共鳴法 (EPR) の結果から、state 1 構造では Ras が標的タンパク質を認識する際に重要な役割を果たす、switch I (アミノ酸残基番号 32-38)、switch II (アミノ酸残基番号 60-75) と呼ばれる 2 つの switch 領域のうち、switch I が GTP の γ 位のリン酸基から離れた構造をしている (ポケットが出現する) 可能性が示唆されていた^{11,12)}。しかし、T35S 変異体の結晶構造においても、両 switch 領域の構造情報がともに完全に欠損したものであったため¹⁰⁾、state 1 がいかなる構造的特徴を示すものか、ましてや分子表面に薬剤が結合可能なポケット構造が存在するか否かについては全く不明であった。

我々は、H-Ras の類縁タンパク質である M-Ras の構造解析を進める中で偶然、M-Ras は H-Ras とは異なり溶液中 (³¹P-NMR) において state 1 構造を優位 (90% 以上) に取り、しかも興味深いことに、その X 線結晶構造には 2 つの switch 領域と GTP に囲まれた領域に低分子量有機化合物が十分挿入可能なサイズのポケット構造が存在することを発見した¹³⁾。State 1 構造は GTP 型における不活性型の構造であるため、そのポケットに選択的に結合し、Ras の構造を state 1 に安定化する物質 (化合物) 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が直ちに推察された (Fig. 2)。しかし M-Ras の結晶構造 (PDB ID: 1X1S) では、ポケットの辺縁を構成する switch II の 5 残基 (アミノ酸残基番号 69-73; H-Ras の 59-63 に相当) の電子密度が欠損しており、ポケット構造の完全決定には至らなかった。

5. 不活性型 Ras-GTP のポケットに選択的に結合する物質のインシリコスクリーニング

まず我々は、既存の H-Ras の switch I を M-Ras の

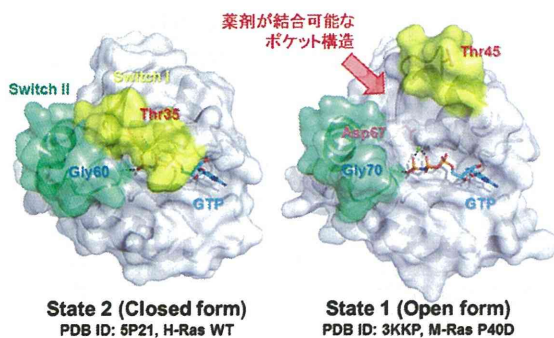


Fig. 3 (Color online) Structural characteristics of the two conformational states of GTP-bound Ras.

switch I と入れ替えたキメラ構造をシミュレーションにより予測し、数万種類の化合物を含むライブラリーからコンピュータドッキングシミュレーションによってポケットに結合可能な候補化合物を試験的に選抜した。Ras と標的タンパク質の1つである Raf キナーゼとの直接結合を阻害する活性を目安にして、選抜化合物の Ras 阻害活性を生化学的に検証してみたが、阻害活性を示すヒット検出には至らなかった。この結果は、予測構造を用いたインシリコスクリーニングが現実的には困難であることを示していた。

しかし、2005年の野生型 M-Ras の不完全なポケット構造の決定から約1年後に、我々は、M-Ras のアミノ酸番号40のプロリンを、H-Ras の対応する残基であるアスパ

ラギン酸に置換した M-RasP40D 変異体 (PDB ID: 3KKP) の結晶解析によって、Ras-GTP の state 1 の完全なポケット構造を決定することに成功した (Fig. 3)。State 2 構造では、GDP には存在しない GTP のγリン酸が Thr45 側鎖 (H-Ras では Thr35 に対応) の水酸基および Gly70 (H-Ras では Gly60 に対応) 主鎖のアミド基と相互作用しているのに対し、この新規構造では Thr35 側鎖との相互作用が切れ switch I が大きく開いていた。この新規ポケット構造には予想通り、switch I, switch II ならびに GTP に囲まれた領域に薬剤が結合可能な比較的大きなポケットが確認できた¹⁴⁾。さらに、SBDD の材料に資するには、高分解能の構造情報が必須であるが、M-RasP40D の結晶は SPring-8 の BL41XU で測定を行って 1.35 Å 分解能の回折データが得られ、GTP 周辺の水分子の電子密度まで鮮明に決定できた。

この結果を受けて、ポケットの底にあたる Asp67 (H-Ras では Asp57 に対応) から半径 6.5 Å の範囲を薬剤結合部位として設定し、この領域にエネルギー的に安定に結合する物質を新たに選び出した。コンピュータドッキングシミュレーション (MMPB-SA 法) を利用して、約 4 万種類の低分子化合物の情報を含むバーチャルライブラリーから約 100 種類が選抜された (Fig. 4)¹⁵⁾。

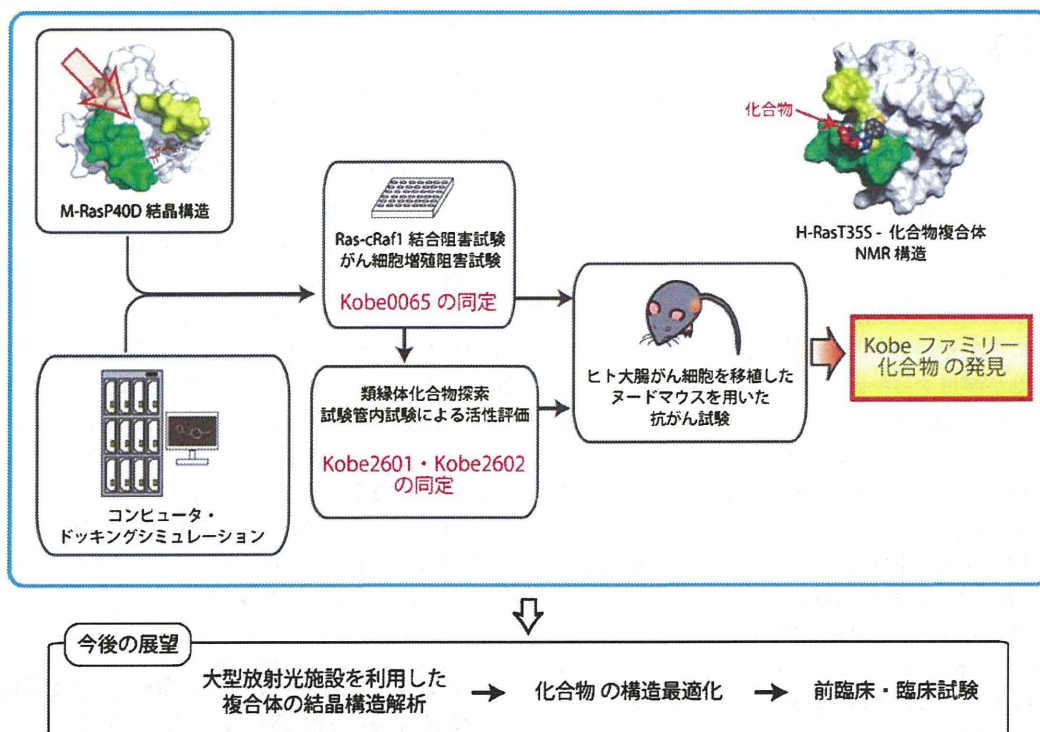


Fig. 4 (Color online) Drug screening based on the novel surface pocket structure of GTP-bound Ras.

6. 選抜化合物の活性検証～ヒット化合物の絞り込み

選抜した化合物は、実際に化学合成メーカーから購入し、M-RasP40D と Raf キナーゼとの結合を実際に阻害するかどうか、生化学試験により1つずつ活性を評価したところ、Raf との結合を阻害する6種類のヒット化合物を同定することができた。しかし、H-Ras を用いて同様の生化学試験を行ったところ、パスしたヒット化合物はわずか1種類 (Kobe0065) に留まった (Fig. 4)。そこでさらに、分子類似性を示す Tanimoto 係数を用いてこの新規化合物 Kobe0065 の構造類似化合物を約16万種類の化合物ライブラリーからスクリーニングし、選抜した約270化合物について同様の生化学試験を実施したところ、2種類の類縁化合物 Kobe2601 と Kobe2602 を同定することができた (Fig. 4)¹⁵⁾。生化学試験をパスしたこれらの化合物は、H-Ras ならびに K-Ras が突然変異 G12V により常時活性化している培養がん細胞の細胞増殖を顕著に抑制した。化合物で処理したがん細胞では、Ras の標的タンパク質である Raf, PI3K などの活性化の著明な低下が観察され、Ras 下流のシグナル伝達が強く抑制されていることが分子レベルで確認できた。また、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たところ、市販抗がん剤ソラフェニブに匹敵する腫瘍増殖抑制作用 (抗がん作用) が確認された (Fig. 4)。化合物を投与したマウスから採取した腫瘍組織では、Raf の下流のシグナル伝達の有意な抑制と、がん遺伝子中毒関連遺伝子産物の抑制時に観察される、がん細胞のアポトーシス (プログラムされた細胞死) が確認された¹⁵⁾。

7. まとめと今後の展望

今回の成果である3種類の新規化合物は、臨床試験に供するには毒性および活性の点でまだ十分ではなく、さらなる構造展開 (化合物の構造改良) が必要と考えられる。現在、化学合成メーカーとの共同研究のもと、さらに構造を変えたドラッグライクな化合物の探索を進めている。また我々は、NMR における核オーバーハウザー効果の測定によって、Ras における化合物の結合部位を既に明らかにしており、Ras と化合物との複合体の NMR 構造情報を利用した Kobe0065 ファミリー化合物の構造展開も精力的に進めている (Fig. 4)。複合体の高分解能の結晶構造が今後決定され、Ras と化合物との結合様式の詳細が明らかになれば、その立体構造情報を利用することによって、より特異的に Ras に結合し強力な阻害活性を示す化合物の効率的な構造デザインが可能になり、リード化合物創製が加速化される可能性が高い。そのためには、放射光を利用した結晶構造解析を引き続き精力的に進める必要がある (Fig. 4)。

放射光を利用した我々の創薬研究は、薬剤が作用するポケット構造の発見から候補化合物の同定に至るまで、製薬企業のサポートが全くない状況で行われてきており、国内で製薬企業と大学とが共同で行う一般的な産学連携の研究開発とは全く性質が異なる開発例と言える。まだ開発の途中段階にある Kobe0065 ファミリー化合物が、Ras 機能阻害剤としてすぐに臨床の現場で使用されることはないものの、研究成果の公開によって Ras 機能阻害剤の研究開発が世界規模で今後ますます加速されることを期待したい。また、そうした開発競争を通じて、真に臨床の現場で役立つ医薬品が一日でも早く患者様の手に届くことを心より願っている。

参考文献

- 1) 抗がん剤の種類と副作用 <http://www.anticancer-drug.net>
- 2) I. B. Weinstein and A. Joe: Oncogene addiction. *Cancer Res.* 2008, vol. 68, p3077-3080.
- 3) H. Varmos: The new era in cancer research. *Science.* 2006, vol. 312, p1162-1165.
- 4) A. E. Karnoub and R. A. Weinberg: Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008, vol. 9, p517-531.
- 5) T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, M. J. C. Ludlam, K. K. Bowman, J. Wu, A. M. Giannetti, M. A. Starovasnik, I. Mellman, P. K. Jackson, J. Rudolph, W. Wang and G. Fang: Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit Sos-mediated nucleotide exchange activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012, vol. 109, p5299-5304.
- 6) Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejnczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese and S. T. Fesik: Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012, vol. 51, p6140-6143.
- 7) H. J. Hocker, K. J. Cho, C. Y. Chen, N. Rambahal, S. R. Sagineedu, K. Shaari, J. Stanslas, J. F. Hancock and A. A. Gorfe: Andrographolide derivatives inhibit guanine nucleotide exchange and abrogate oncogenic Ras function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013, vol. 110, p10201-10206.
- 8) E. F. Pai, U. Krengel, G. A. Petsko, R. S. Goody, W. Kabsch and A. Wittinghofer: Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* 1990, vol. 9, p2351-2359.
- 9) M. Geyer, T. Schweins, C. Herrmann, T. Prisner, A. Wittinghofer and H. R. Kalbitzer: Conformational transitions in p21ras and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP. *Biochemistry.* 1996, vol. 35 p10308-10320.
- 10) M. Spoerner, C. Herrmann, I. R. Vetter, H. R. Kalbitzer and A. Wittinghofer: Dynamic properties of the Ras switch I region and importance for binding to effectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, vol. 98, p4944-4949.
- 11) C. J. Halkides, C. T. Farrar, R. G. Larsen, A. G. Redfield and D. J. Singel: Characterization of the active site of p21 ras by electron spin-echo envelope modulation spectroscopy with selective labeling: comparisons between GDP and GTP forms. *Biochemistry.* 1994, vol. 33, p4019-4035.
- 12) B. F. Bellew, C. J. Halkides, G. J. Gerfen, R. G. Griffin and

- D. J. Singel: High frequency (139.5 GHz) electron paramagnetic resonance characterization of Mn(II)-H₂(17)O interactions in GDP and GTP forms of p21 ras. *Biochemistry*. 1996, vol. 35, p12186-12193.
- 13) M. Ye, F. Shima, S. Muraoka, J. Liao, H. Okamoto, M. Yamamoto, A. Tamura, N. Yagi, T. Ueki and T. Kataoka: Crystal structure of M-Ras reveals a GTP-bound "off" state conformation of Ras family small GTPases. *J Biol Chem*. 2005, vol. 280, p31267-31275.
- 14) F. Shima, Y. Ijiri, S. Muraoka, J. Liao, M. Ye, M. Araki, K. Matsumoto, N. Yamamoto, T. Sugimoto, Y. Yoshikawa, T. Kumasaka, M. Yamamoto, A. Tamura and T. Kataoka: Structural basis for conformational dynamics of GTP-bound Ras protein. *J Biol Chem*. 2010, vol. 285, 22696-22705.
- 15) F. Shima, Y. Yoshikawa, M. Ye, M. Araki, S. Matsumoto, J. Liao, L. Hu, T. Sugimoto, Y. Ijiri, A. Takeda, Y. Nishiyama, C. Sato, S. Muraoka, A. Tamura, T. Osoda, K. I. Tsuda, T. Miyakawa, H. Fukunishi, J. Shimada, T. Kumasaka, M. Yamamoto and T. Kataoka: In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013, vol.110: 8182-8187.

著者紹介



島 扶美

神戸大学大学院医学研究科・准教授

E-mail: sfumi@med.kobe-u.ac.jp

専門：分子生物学

【略歴】

1991年神戸大学医学部医学科卒業，1998年神戸大学大学院医学系研究科修了，博士（医学）。1998年日本学術振興会特別研究員，2000年神戸大学医学部・助手，2010年神戸大学大学院医学研究科・講師を経て，2011年より現職。



熊坂 崇

高輝度光科学研究センター・副主席研究員

E-mail: kumasaka@spring8.or.jp

専門：放射光構造生物学

【略歴】

1996年東京工業大学大学院生命理工学研究科博士後期課程修了，博士（理学）。同年理化学研究所播磨研究所・研究員，2002年東京工業大学大学院生命理工学研究科・講師を経て，2007年より現職，構造生物グループ・グループリーダー。2008年より関西学院大学・客員教授（併任）。



松本篤幸

神戸大学大学院医学研究科・特務助教

E-mail: smat@med.kobe-u.ac.jp

専門：構造生物学

【略歴】

2009年大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程修了，博士（薬学）。2009年医薬基盤研究所・特任研究員，2011年学術研究員，2014年より現職。



吉川陽子

神戸大学大学院医学研究科・特務助教

E-mail: yokoyosh@med.kobe-u.ac.jp

専門：分子生物学

【略歴】

1991年神戸大学大学院理学系研究科修士課程修了，2007年神戸大学大学院医学系研究科博士課程修了，博士（医学）。2007年学術推進研究員，2011年より現職。



山本雅貴

理化学研究所・放射光科学総合研究センター・利用システム開発研究部門・部門長

E-mail: yamamoto@riken.jp

専門：X線結晶構造解析

【略歴】

1991年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了，博士（理学）。同年理化学研究所研究員。2004年高輝度光科学研究センター利用研究促進部門副部門長兼務（2006年まで）2004年理化学研究所播磨研究所研究技術開発室室長。2005年兵庫県立大学大学院生命理工学研究科連携分野客員教授。2008年理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター基盤研究部部長。2011年より現職。



片岡 徹

神戸大学大学院医学研究科・教授，医学研究科長・医学部長

E-mail: kataoka@people.kobe-u.ac.jp

専門：分子生物学

【略歴】

1977年東京大学医学部医学科卒業，1981年大阪大学大学院医学研究科修了（医学博士），1981年大阪大学医学部・助手，1985年米国コールドスプリングハーバー研究所・研究員，1986年米国ハーバード医科大学・アシスタントプロフェッサー，1989年神戸大学医学部・教授，2001年神戸大学大学院医学研究科・教授，2013年神戸大学大学院医学研究科長・医学部長。

Development of molecular targeted anti-cancer drugs based on the information on a novel crystal structure of the ras oncogene products

Fumi SHIMA¹, Takashi KUMASAKA², Shigeyuki MATSUMOTO¹,
Yoko YOSHIKAWA¹, Masaki YAMAMOTO³ and Tohru KATAOKA¹

¹Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1, Kusunoki, Chuo-ku, Kobe, 650-0017 Japan

²Japan Synchrotron Radiation Research Institute (SPring-8),
1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo, 679-5198 Japan

³RIKEN SPring-8 Center, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo, 679-5148 Japan

Abstract Mutational activation of the ras oncogene products, Ras proteins, is frequently observed in various human cancers, making them promising anti-cancer drug targets. Despite vigorous efforts made on the development of Ras inhibitors by many pharmaceutical companies, no effective therapeutic agents have been available to date. Our recent structural studies on Ras proteins unveiled for the first time that GTP-bound Ras proteins (Ras-GTP) undergo a dynamic transition between different conformations, which results in formation of a drug-accessible surface pocket. Based on this structural information on the novel pocket of Ras-GTP, we performed an *in silico* screening followed by an *in vitro* screening for Ras inhibitors and succeeded in the discovery of the Kobe0065-family compounds, which exhibited a potent anti-tumor activity *in vivo*. In this article, we will describe the results of our study and its future prospects.

