

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、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。＜先行開発＞フラグメントリンク法を利用して、保有リード化合物KMR084の新規誘導体を製薬企業との共同研究下で作製し活性評価を行った結果、担がんモデル動物システムにおいて、腹腔内投与によりリード化合物より強力な腫瘍増殖抑制作用を示す1種類の誘導体の同定に成功した。H24年度に実施したインシリコスクリーニングで選定した化合物ならびにリード化合物の部分構造からなるフラグメント化合物を使用したRasのNMR解析を通じて、既知の化合物結合領域近傍に、リード化合物の構造展開上有用な新規化合物結合領域が存在することを確認した。＜後行開発＞特殊試料マウント法を利用した野生型H-RasのX線結晶解析ならびにNMR解析を通じて、リード化合物の構造最適化の際に検討すべき、Rasのポケットの辺縁構造の可塑性が明らかになった。保有リード化合物Kobe0065のLysyl Oxidaseを介するがん転移抑制メカニズムに関する研究成果を第72回日本癌学会学術総会（H25年10月、横浜）において発表した。

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参与する。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（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）。H25年度、本研究では、背景となる研究で獲得・特許導出の後、国内製薬企業とのライセンス契約研究ならびに協力型共同研究下で開発中のリード化合物（KMR084）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とともに、保有リード化合物の構造展開に有用な立体構造情報を回収するとともに、新たな抗がん作用であるがん転移抑制作用メカニズムを解明する。（後行開発）。

B．研究方法

先行開発：

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、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協力型共同研究下で合成した29種の新規誘導体について、常時活性化型H-Ras (H-RaG12V) を安定発現するマウスNIH3T3細胞を用いて足場非依存性細胞増殖抑制作用を評価した。

の培養細胞を用いて、化合物による細胞内でのRas-Raf結合抑制作用を評価するとともに、Ras/Rafの下流に位置するシグナル伝達分子MEK, ERKのリン酸化による活性化の抑制について、抗リン酸化MEK, ERK特異的抗体を使用して検出した。

の試験で活性が強かった化合物については、常時活性化型K-Ras (K-RasG12V) を有するヒト大腸がん細胞 (SW480細胞) を移植したヌードマウスに化合物を腹腔内投与し、腫瘍増殖抑制効果を評価した。

化合物を投与したマウスから腫瘍組織を採取し、抗リン酸化ERK特異的抗体を用いた免疫組織染色により、腫瘍組織におけるRas/Rafの下流のシグナル伝達の活性化抑制効果を評価した。

保有リード化合物KMR084の溶解度の改善目的で前述の製薬企業において合成した誘導体、ならびに神戸大の既保有フラグメント化合物を用いて、H-Rasとの複合体のX線結晶解析ならびにNMRによる立体構造解析を行った。

**後行開発**：

HAG (Humid Air and Glue-coating) 特殊試料マウント法を利用して、野生型H-Rasの新規ポケットの辺縁構造の可塑性を評価するために、種々の沈殿剤濃度条件下で結晶溶液を作成し、複数の温湿度条件下にてX線結晶解析を行った。NMRによる同様のポケット構造の可塑性についての詳細な解析も実施した。

K-RasG12Vを有するヒト大腸がんリンパ節転移細胞株SW620を尾静注にて接種したマウスにKobe0065を投与し、腫瘍細胞の肺転移抑制作用を評価した。

Kobe0065のLysyl Oxidase (LOX)の発現抑制とRasの機能阻害作用との関係を調べるために、H-RasG12Vを安定発現するマウスNIH3T3細胞の2D-, 3D-培養システムを用いて、LOXのmRNAレベルならびに蛋白質の発現レベルを調べた。K-RasG12Vを有する大腸がん細胞株SW480, SW620ならびにK-RasG12Dを有するPanc-1、比較対象として野生型Rasを有するPxPC-3を用いて同様の実験を行った。

Kobe0065投与が、Ras/LOXを介するがん細胞の遊走・浸潤に与える影響を調べるために、の細胞を用いて、化合物存在下ならびにK-Rasのノック

ダウン条件下 (siRNA存在下) で、創傷治癒アッセイならびにがん細胞浸潤アッセイを行った。

(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**

フラグメントリンク法でデザイン・合成したKMR084の新規誘導体の細胞増殖抑制作用：

・H24年度に引き続き、フラグメントリンク法を利用して、保有リード化合物KMR084の誘導体を製薬企業との共同研究下で、29種類新たにデザイン・合成し、試験管内Ras-Raf結合阻害活性を測定した。これら化合物の、H-RasG12Vを安定発現するマウスNIH3T3細胞に対する足場非依存性細胞増殖抑制作用ならびに、Ras/Rafの下流の細胞内シグナル伝達 (MEK, ERKのリン酸化) の抑制作用を調べたところ、細胞レベルでKMR084を凌ぐRas機能の阻害活性を示す誘導体K25292の同定に成功した。さらにこの化合物は、SW480に対しても顕著な足場非依存性細胞増殖抑制作用を示した。ただし、常時活性化型Rasを持たないヒト子宮がん細胞株 (Hela細胞) に対しても弱い細胞増殖抑制作用を示した。

フラグメントリンク法で合成したKMR084の新規誘導体の担がんモデル動物での抗がん作用：

・H24年度からH25年度にかけて有機化学合成した合計46化合物のうち、試験管内Ras-Raf結合阻害活性、細胞内Ras-Raf結合阻害活性、細胞活性のバランスの比較的良かった3種類の誘導体を、SW480を異種移植したヌードマウスに腹腔内投与し、個体レベルでの抗がん作用を評価した。その結果、同じ投与量で誘導体K18781は、KMR084より強い腫瘍増殖抑制作用を示すことが確認された。しかし、投与量の増加に伴う作用の増強は認められなかったことから、化合物の吸収・代謝安定性に関する問題点を確認することになった。

・誘導体K18781を腹腔内投与したヌードマウスから採取した腫瘍組織の免疫組織染色により、化合物の腫瘍組織レベルでの顕著なERKの活性化の抑制作用が確認された。

KMR084の構造展開に有用なフラグメント誘導体のRas結合情報：

・保有リード化合物KMR084の溶解度の改善目的で前述の製薬企業において合成した、KMR084の疎水性部分構造からなる誘導体 (フラグメント誘導体) とH-Rasとの複合体の結晶を作成し、放射光を用いて (SPring-8にて) X線回折実験を行ったが、複合体の構造決定には至らなかった。

・一方、KMR084の親水性部分構造からなるフラグメント誘導体、先の疎水性部分構造からなるフラグメント誘導体、さらには既保有の別のフラグメント化合物とH-Rasとの<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC (Heteronuclear Singles Quantum Coherence)-NMRを行った結果、これら誘導体ならびに化合物のRasの分子表面上の結合領域は近接するものの、互いに異なることが明らかになり、新たな構造展開に必須の立体構造情報を収集することができた。また、既保有フラグメント化合物とH-Rasとの<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCならびにSTD (Saturation Transfer Difference)-NMRの解析データを利用して、HADDOCK (NMRの化学シフトをはじめとする相互作用情報を拘束条件として分子ドッキングを行うソフト)により、水溶液中での複合体の構造予測が可能となり、複合体の結晶構造情報の収集が困難な場合にも、NMRによる化合物とRasとの溶液中での相互作用情報に基づく新規誘導体の理論的構造デザインが可能になった。

#### 後行開発

特殊試料マウント (HAG) 法によるX線結晶解析により明らかになったH-Rasのポケット構造の可塑性と構造情報の化合物デザインへの利用：

・同一蛋白質結晶のX線回折実験時に結晶の温湿度の制御がHAG法により可能になる特殊X線結晶解析を通じて、野生型H-Rasの分子表面には、既保有リードならびにシード化合物が結合するポケットの他に、その近傍に比較的大きな新規のポケット構造が存在することが明らかになった。既知ポケットは、RafをはじめとするRasの標的蛋白質の結合領域である2つのSwitch領域 (Switch IとSwitch II) の辺縁に位置するが、今回明らかになった新規ポケットは、2つのSwitch領域にまさにはさまれる位置に存在することから、新規ポケットに結合可能な化合物は、より効果的にRasと標的蛋白質との結合を阻害する可能性が予測された。また、新規ならびに既知ポケット構造は互いに隣接するため、既知リードならびにシード化合物の理論的構造展開にも有用な立体構造情報の収集に成功したと考えられる。

保有シード化合物Kobe0065の担がんモデル動物でのがん転移抑制作用：

・常時活性化型K-RasG12Vを有し高い転移能を示すヒト大腸がん細胞株SW620をヌードマウスに尾静注し、Kobe0065の経口投与下でのSW620の肺転移の頻度を調べた。その結果、化合物非投与群ならびに対象薬であるsorafenib (Raf, VEGFをはじめとするマルチキナーゼ阻害剤) 投与群では全例肺転移が認められたのに対して、Kobe0065投与群では濃度依存的に肺転移を起こした個体数が減少し

ていた。また、肺組織切片において肉眼で確認できた腫瘍の個数はKobe0065投与群では濃度依存的に減少していたことから、Kobe0065は、常時活性化型K-Rasを有するがん細胞の肺転移を有意に抑制することが確認された。

保有シード化合物Kobe0065のがん転移抑制メカニズムの解析：

・H-RasG12Vを導入したマウスNIH3T3細胞の3D-培養では、コントロールと比較して有意なLOXの発現上昇が認められることが、前年度までの研究で確認されていた。同様の培養条件下でKobe0065を投与したところ、LOXの有意な発現抑制が認められた。また、常時活性化型K-Rasを有し、siRNA処理によるK-Rasの発現抑制によりLOXの発現抑制が認められる3種類のヒト培養がん細胞株SW480, SW620ならびにPanc-1についても、3D-培養条件下での化合物処理により、有意なLOXの発現抑制が確認された。一方、K-Rasの発現抑制がLOXの発現に影響を与えない野生型K-Rasを有するBxPC-3ではKobe0065処理によるLOXの発現抑制は認められなかった。これらの結果は、Rasに活性化型変異を有する細胞群では、Kobe0065処理がRasを介するLOX発現を抑制する可能性を示唆していた。

・Kobe0065の作用がRas/LOXを介するがん細胞の遊走に与える影響を調べるために、SW620, Panc-1, BxPC-3を用いた創傷治癒アッセイを行った。siRNA処理によるLOX発現抑制およびLOX特異的阻害剤処理は、使用したこれらすべての細胞の遊走を阻害したことから、これらの細胞の遊走にLOXが重要な役割を果たしていることが示された。これらのがん細胞にKobe0065の投与ならびにK-Rasの発現抑制を行った結果、K-Rasに活性化型変異を有するSW620とPanc-1では遊走の抑制が観察されたが、野生型K-Rasを有するBxPC-3ではKobe0065処理ならびにK-Rasの発現抑制による遊走の抑制は認められなかった。従って、Kobe0065はRasに活性化型変異を有するがん細胞特異的に、Rasを介するLOXのシグナル伝達を抑制する事で細胞遊走を阻害する可能性が示唆された。

・次に、がん細胞の浸潤におけるKobe0065の効果についても検証した。Rasに活性化型変異を有するSW620ならびにPanc-1では、Kobe0065の濃度依存的細胞浸潤の阻害が認められた。一方、野生型K-Rasを有するBxPC-3ではほとんど浸潤抑制はなかった。これらの結果は、Kobe0065がRasに活性化型変異を有するがん細胞特異的に浸潤を阻害する可能性を示唆していた。

#### D. 考察

・Ras阻害剤の開発は、抗がん剤開発の歴史の中では極めて難易度が高い課題の1つとして位置づけ

られており、Rasの立体構造が解明されてから25年近く経過しても、世界的に見て未だ開発の成功例のない現状にある。本研究では、Rasのポケット構造情報に基づく理論的創薬を展開しており、本年度は、国内製薬企業との協力型共同研究下でのフラグメントリンク法による構造展開を通じて、保有リード化合物KMR084の活性を上回る誘導体をいくつか獲得している。しかし現時点では、リード化合物の活性を劇的に凌ぐ誘導体の同定には至っていない。原因としては、立体構造ベースの理論的構造展開を進めて行く上で必須の、RasならびにRasと化合物との複合体の精密な立体構造(X線結晶解析ならびにNMR解析)の情報量の不足が挙げられる。また、薬剤結合ポケットの可塑性(構造ダイナミクス)の問題も、結合親和性の高い化合物の創出を困難にしている要因の一つと考えられる。よって今後は、Rasと化合物との複合体の高精度の立体構造情報の収集に注力するとともに、ポケット構造のダイナミクスをも考慮した、シードならびにリード化合物の構造展開を進めて行く必要があると判断される。

・がん患者の生命予後を大きく作用するがん転移の分子メカニズムの解明は、抗がん剤の開発上極めて重要な研究課題である。近年の研究で、がん転移の分子メカニズムにLOXが含まれ、RasからLOXへのシグナル伝達についてはPI3K/Aktの関与などが示唆されているが、詳細については不明な点が多い。我々が開発した保有シード化合物Kobe0065は、Rasの分子表面のポケット部分に直接結合し、複数のエフェクターとRasとの直接結合を阻害することにより個体レベルで抗がん作用(腫瘍増殖抑制作用)を示すが、本研究により市販薬sorafenibにはない新たな作用として、がん転移抑制作用を示す。本研究を通じてRasを介するがん転移の詳細な分子メカニズムが解明されれば、Ras阻害剤の新たな用途を切り開くことができる。

## E. 結論

リードならびにシード化合物の構造展開・最適化を加速するために、現在のX線結晶解析ならびにNMR解析システムをさらに進化・改良させ、Rasと化合物との複合体のより高精度の立体構造情報を収集する。得られた複合体の立体構造情報に基づき、Rasの薬剤結合ポケットの構造ダイナミクスをも考慮した誘導体の構造展開を推進する。また、Rasの介するがん転移の分子メカニズムを解明し、Ras阻害剤の新たな可能性を探求する。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shima, F., Yoshikawa, Y., Ye, M., Araki, M., Mat

sumoto, S., Liao, J., Hu, L., Sugimoto, T., Ijiri, Y., Takeda, A., Nishiyama, Y., Sato, C., Muraoka, S., Tamura, A., Osoda, T., Tsuda, K., Miyakawa, T., Fukunishi, H., Shimada, J., Kumasaka, T., Yamamoto, M., and Kataoka, T. *In silico* discovery of novel small-molecule Ras inhibitors that display anti tumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2013) **110** (20): 8182-8187

Shima, F., Yoshikawa, Y., Matsumoto, S., and Kataoka, T. Discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by interfering with Ras•GTP-effector interaction. *The Enzymes* (2013) Vol. **34**, Inhibitors of the Ras superfamily G-proteins, pp1-23 (Tamanoi, F. and Der, C. J., eds. Elsevier)

島 扶美, 熊坂 崇, 松本 篤幸, 吉川 陽子, 山本 雅貴, 片岡 徹 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 日本放射光学会誌 *放射光* (2014) **27** (1) :3-9

Shima, F., and Kataoka, T. Structure-based drug design of small-molecule Ras inhibitors having anti-tumor activity. *Spring-8 Research Frontiers* (2013), in press.

## 2. 学会発表

Osamu Takano, Yoko Yoshikawa, Fumi Shima, Tohru Kataoka. Analysis of the mechanism underlying the anti-metastatic action of Ras inhibitors by using a lung metastatic model mouse. 第72回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013年10月4日

## 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、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

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

なし