

201407006A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

*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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片岡 徹

平成27(2015)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 島 扶美	----- 8
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 閨 正博	----- 12
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	----- 15

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

<i>ras</i> がん遺伝子産物Rasを分子標的としたがん治療薬開発の現状	----- 19
---	----------

I. 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KMR084（WO2012/153775 A1）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、前臨床試験に入る候補品を創出する（後行開発）。H26年度、**先行開発**では、新規フラグメント化合物KBFM123ならびにリード化合物KMR084の部分構造からなるフラグメント化合物のNMRで解析した結合情報に基づき、複合体モデルを構築した。得られた立体構造情報を用いて、フラグメントリンク法・フラグメントマージ法にさらに有機化学合成専門家の知見をも加味した、統合計算科学システムMOEによる効率的なインシリコ計算を行い、候補となりうる代表化合物をデザイン・選抜し、有望なものについては優先的に合成を行った。KMR084の適応がん種を広げるために、ヒト膀胱がん細胞株を用いた腫瘍増殖抑制試験を実施したところ瘍増殖抑制傾向が確認された。KMR084の併用薬としてのポテンシャル評価を行うために、ヒト大腸がん細胞株を異種移植した担がんモデル動物において、既存薬であるマルチキナーゼ阻害剤sorafenibとの併用による薬効評価を行った。その結果、併用による効果の増強傾向が認められたがsorafenib単剤使用との有意差は認められなかった。H27年2月、リード化合物KMR084関連特許（WO2012/153775 A1→Application No. 14/116,152）が米国にて成立した。

後行開発では、評価化合物のRas/Raf結合阻害活性の*in vitro*での検出の効率化をはかるために、ELISA法による新規活性評価システムを構築し本研究に導入した。Kobe0065の誘導体を有機化学合成専門家の知見に基づいて新たにデザイン・合成して、ELISA法で活性評価を行ったところ、Kobe0065の活性を上回る誘導体の同定には至らなかったが、保有化合物ライブラリーを用いたELISA法によるスクリーニングでは新規ヒット化合物が同定され、細胞試験においても有意ながん細胞増殖抑制作用を示すものが複数得られた。従来法であるRI法などと比較して、評価系において使用する蛋白量が微量であり、評価化合物も低濃度で済むため、従来法では溶解度が低く活性検出が困難であった化合物の活性が検出可能になったと考えられる。H-RasT35Sのポケット構造を用いたバーチャルスクリーニングと細胞試験により得られたヒット化合物について、前年度、活性と溶解度改善を目的としたインシリコ計算により選抜した2系統の化合物KBFM561ならびにKBFM492について、新規誘導体を合成し活性検証を行った。その結果、一部の誘導体には良好な水溶性と弱いながらもELISA法でRas/Raf結合阻害活性が確認された。野生型H-Rasとビルディングブロック化合物Benzamidineとの複合体の結晶構造の決定に成功した。また、化合物のインシリコデザインにおいて、合成と活性検証のサイクルを通じてよりドラッグライクな新規化合物を見出すために、既知化合物とRasとの複合体の分子動力学計算法による複合体中の化合物の配位状態の解析を行い、得られた構造情報を誘導体デザインにフィードバックしている。

Kobe0065とその誘導体の開発研究の知見を踏まえた、国内外のRas阻害剤の開発状況に関する総説を執筆、メディカルレビュー社より出版した（がん分子標的治療2015年3月号、Vol.13, No.1, p92-98）。その他、招待講演（学会発表の項参照）などの依頼を複数受けた（研究発表の項参照）。特殊試料マウント（HAG）法と放射光を利用した野生型H-RasのX線結晶解析、NMR解析、ならびに生化学試験を通じて、化合物の構造展開に有用なポケットの開閉運動のメカニズムが明らかになった。研究成果を取りまとめ、論文投稿準備段階にある。

研究分担者

- 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 教授
- 関 正博 神戸天然物化学株式会社
医薬事業部 創薬化学部長
- 熊坂 崇 公益財団法人高輝度光科学研究
センター タンパク質結晶解析
推進室 副主席研究員

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参与する。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。

H26年度の先行開発では、NMRによるフラグメント化合物のRas結合情報を利用し、フラグメントリンク法、フラグメントマージ法に有機化学合成専門家の知見をも加味したインシリコ計算により、リード化合物KMR084の新規誘導体をデザイン・合成して活性検証を行う。さらに、KMR084の適応がん腫の拡大を図るとともに、併用薬としてのポテンシャルの評価も行う。また後行開発では、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法による高感度のRas/Raf結合阻

害活性評価システムを構築して化合物の生化学活性評価の効率化を図るとともに、現在保有する化合物ライブラリーを用いて新規ヒット化合物を同定する。前年度、溶解度改善のためのインシリコ計算による誘導体デザインを行った、KBFM561ならびにKBFM492についても、合成可能な誘導体を有機化学合成し活性検証を行う。また、Humid Air Glue-coating (HAG) 法により、Rasの薬剤結合ポケットの開閉メカニズムを解明するとともに、ビルディングブロック化合物Benzamidine (BZDN) とRasとの複合体の結晶構造解析を行い、得られた複合体の立体構造情報をKMR084の構造展開にフィードバックする。

独自の метод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) フラグメントリンク法・フラグメントマージ法と有機合成化学的知見を活用したリード化合物KMR084の構造最適化

①フラグメントマージング法による誘導体のインシリコデザイン:

H-RasT35Sのstate 1とKMR084の3種類の誘導体 (KMR112, KMR140, KMR333) ならびにKobe2601との複合体のNMR構造情報と、H-RasT35Sのstate 1の新規ポケット構造をターゲットとしたドッキングスクリーニングを通じて得られたフラグメント (分子量: 200~300) 化合物KBFM123とH-RasT35Sとの複合体のNMR構造において、それぞれの複合体中での化合物同士の重なりを考慮したフラグメントマージ法により新規誘導体をインシリコデザインした。

②フラグメントリンク法による誘導体のインシリコデザイン:

KMR084の部分構造からなるK925562ならびにKBFM123の2種類のフラグメント化合物と、H-RasT35Sとのそれぞれの複合体のNMR構造情報に基づき、フラグメント同士を適当なリンカーで繋ぐフラグメントリンク法により、新規誘導体をインシリコデザインした。

③合成展開と活性評価:

①、②のデザイン化合物の構造情報を参考に、部分構造を繋ぐリンカーの長さ、部分構造の配向、リンカーとRasとの結合様式、合成展開の可能性を加味した、有機合成化学の専門家による誘導体の構造デザインを行い、再度シミュレーションによるデザインの妥当性を検証した上で、化合物を実合成し活性検証を行った。

2) ヒト膀胱がん細胞を異種移植した担がんモデル動物を用いたKMR084の腫瘍増殖抑制作用の評価

H-RasG12Vを有する膀胱がん細胞株EJ-1を異種移植した担がんモデル動物を用いて、日本チャールス・リバー株式会社において、化合物の腹腔内投与による腫瘍増殖抑制試験を実施し、適応がん腫の拡大の可能性を評価した。

3) KMR084の併用薬としての可能性の評価

ヒト大腸がん細胞株 (K-RasG12V) を異種移植した担がんモデル動物において、既存薬であるマルチキナーゼ阻害剤sorafenibと併用し、腫瘍増殖抑制効果を単剤投与群と比較し、併用薬としてのポテンシャル評価を行った。

4) がん細胞パネルを用いたKMR084の薬効評価

カルナバイオ社において、66種類のヒトがん細胞株を用いたがん細胞パネルによるKMR084の細胞増殖抑制試験を実施した。

5) リード化合物KMR084関連特許の米国成立

後行開発

1) 保有ヒット化合物Kobe0065の有機合成化学的見地からの構造展開

Extendedな構造を有するチオセミカルバジド構造をfoldedな環構造へ変換する合成展開を行い、Ras/Raf結合阻害活性を評価した。

Kobe0065の誘導体として27化合物を新たにデザイン・合成し、Ras/Raf結合阻害活性を評価した。

2) ELISA法による保有ライブラリーからの新規ヒット化合物の同定

大腸菌で発現し精製したGST-cRaf1-RBDをH-Rasを用いた、ELISA法による化合物のRas/Raf結合阻害活性の評価系を新たに構築した。保有する化合物ライブラリーを用いて、ELISA法による*in vitro*スクリーニングを実施し、阻害活性を示した化合物については、活性型Rasを有する NIH3T3細胞、活性型Rasを有するヒトがん細胞株ならびに活性型Rasを有さないヒトがん細胞株を用いた足場非依存性細胞増殖作用の確認による活性評価を行った。一部のヒット化合物については初期構造展開を実施し、誘導体の活性評価を行った。

3) KBFM561, KBFM492の活性・溶解度改善のための初期構造展開

H-RasT35Sのポケット構造を用いたバーチャル

スクリーニングと細胞試験により得られたヒット化合物について、活性と溶解度改善を目的としたインシリコ計算により選抜した2系統の化合物KBFM561ならびにKBFM492について、新規誘導体を合成し、活性評価を行った。

4) 分子動力学計算法を用いた新規化合物設計

H-RasT35SとKobe2601との複合体NMR構造情報(平均構造)と、野生型H-RasのX線結晶構造情報を用いて、分子動力学計算法により複合体中の化合物の配位状態を解析した。これまでに得られた化合物の活性情報をより良く説明できる配位状態(スナップショット)の候補を得て新たに見出した配位ポケット構造情報を基に、化合物のインシリコデザインを行い、合成と検証のサイクルを通じてよりドラッグライクな新規化合物を見出す。

5) 放射光によるH-Ras/BZDN複合体のX線結晶解析

H-Ras蛋白質の結晶を作成後、リザーバー溶液にbenzamidine (BZDZ) を溶解し、H-Ras結晶を浸漬した後、放射光にてX線回折実験を行った。得られた回折データから複合体の立体構造モデルを構築し、H-RasとBZDNの結合様式を解析した。

6) Rasの薬剤結合ポケットの開閉メカニズムの解明と研究成果の取りまとめ

HAG特殊試料マウント法、NMR解析、RasのGTP結合/解離速度ならびに内因性GTP加水分解速度の解析を通じて、新規ポケットの開閉メカニズムとstate 1構造の生理的意義を解明し、研究成果を取りまとめた。

(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

1) フラグメントリンク法・フラグメントマージ法と有機合成化学的知見を活用したリード化合物の構造最適化

①フラグメントマージング法による誘導体のインシリコデザイン:

H-RasT35Sのstate 1とKMR084の3種類の誘導体(KMR112, KMR140, KMR333)ならびにKobe2601との複合体のNMR構造情報と、フラグメント化合物KBFM123とH-RasT35Sとの複合体のNMR構造において、化合物同士の重なりを考慮して、107種類の化合物からなる化合物データベースを構築した。HAG法で決定したH-RasWTのstate 1

の結晶構造座標のエネルギー最小化を行い、統合計算科学システムMOEに装備されたSiteFinder機能を用いて、化合物のドッキング標的部位の決定を行った後に、ドッキングプログラムASEDockを用いたドッキング計算を行い、11種類の候補化合物をインシリコ選抜した。

②フラグメントリンク法による誘導体のインシリコデザイン：

KMR084の部分構造からなるK925562ならびにKBFM123の2種類のフラグメント化合物と、H-RasT35Sとのそれぞれの複合体のNMR構造情報に基づき、592種類の化合物からなる化合物データベースを構築し、①と同様の手法でドッキング計算を行い、20種類の化合物をインシリコ選抜した。

③合成展開と活性評価：

①②誘導体の構造情報に基づき、神戸天然物化学株式会社 (KNC) が合成展開可能な52種類の化合物をデザインし、H-RasWTのstate 1の結晶構造を用いた複合体のドッキングシミュレーションによるインシリコの結合活性の検証を通じて、結合可能性が高い5種類以上の誘導体をインシリコ選抜した。そのうち、KNCにおいて3種類の化合物をまず合成し、Ras/Raf結合阻害活性を確認したが、現時点でKMR084の活性を上回る誘導体の同定には至っていない。引き続き合成展開を進め、活性検証を行う予定である。

2) ヒト膀胱がん細胞を異種移植した担がんモデル動物を用いたKMR084の腫瘍増殖抑制作用の評価

KMR084は、ヒト大腸がん細胞株 (K-RasG12V) 以外にヒト膀胱がん細胞株 (H-RasG12V) に対しても細胞増殖抑制作用を示す。この細胞株を異種移植した担がんモデル動物を用いて、日本チャールス・リバー株式会社において腫瘍増殖抑制試験を実施 (外注) した。BALB/cヌードマウス (8週齢、雌) に上記がん細胞浮遊液を背部皮下に接種し、21日目に腫瘍が生着したことを確認した後、KMR084 80 mg/kg, 240 mg/kg, sorafenib 80 mg/kg、非投与群の4群に群分けを行い、5回/週の割合で化合物を腹腔内投与した。35日目 (投与後2週間) においては、KMR084 240mg/kg投与群は、sorafenib 80mg/kg投与群よりも弱いものの、非投与群と比較して有意に (マンホイットニーの有意差検定) 腫瘍増殖を抑制した。42日目 (投与後3週間) では、非投与群との有意差は認められないものの、腫瘍増殖抑制傾向が確認できた。

3) KMR084の併用薬としての可能性の評価

BALB/cヌードマウス (8週齢、雌) に、ヒト大腸がん細胞浮遊液を側腹部皮下に接種し、腫瘍の生着を確認の後、KMR084 240 mg/kg, sorafenib 80

mg/kg, KMR084 240 mg/kg + sorafenib 80 mg/kgをそれぞれ5回/週腹腔内投与し、腫瘍増殖抑制効果を比較した。これまでの実験で、Kobe0065とsorafenibの併用群は、sorafenib単剤投与群と比較して、より強力な腫瘍増殖抑制効果 (有意差あり) を示すことが確認できたが、KMR084とsorafenibの併用群ではsorafenib単剤投与群と比較して、やや強い腫瘍増殖抑制傾向を示すのみで、有意差は認められなかった。

4) がん細胞パネルを用いたKMR084の薬効評価

66種類のヒトがん細胞株を用いたがん細胞パネルによる細胞増殖抑制試験を実施した。0.4% DMSOに可溶化した化合物を、0.5%血清下で66種類のヒトがん細胞株と72時間培養したのち、ATP lite ATP検出システムで生細胞数を評価したところ、RasのGAP (GTPase-activating protein) であるNF1の遺伝子異常を有するDaoy (HTB-186) 細胞において、弱い細胞増殖抑制作用が確認された。

5) リード化合物KMR084関連特許の米国成立

リード化合物KMR084関連特許 (特願2011-105613) を2011年国内出願し、さらに2012年に国際出願 (国際出願番号PTC/JP2012/061908) を行った後、国内大手製薬企業へ特許実施権許諾契約を締結した。さらに、本特許は2014年1月に米国で特許化 (Application No. 14/116,152) を完了、翌2015年2月、同国にて特許が成立した。

後行開発

1) 保有ヒット化合物 Kobe0065 の有機合成化学的見地からの構造展開

Kobe0065 のチオセミカルバジド構造回避と結合親和力の向上を求めて、環状化構造への変換を実施した。Extended な構造を有するチオセミカルバジド構造を folded な環構造へ変換した5化合物 (NKB047, NKB048, NKB049, NKB053, NKB054) を合成したが、水溶性が大きく低下したため結合阻害活性を評価できなかった。

2) ELISA 法による保有ライブラリーからの新規ヒット化合物の同定：

新たに構築した ELISA 法による *in vitro* の Ras-Raf 結合阻害活性スクリーニングシステムを用いて、保有する化合物ライブラリー (1100 種類の化合物を含む) から、Kobe0066, Kobe0067, Kobe1268, Kobe2400 をはじめとする Ras/Raf 結合阻害活性を示す複数 (約 50 種類) の新規ヒット化合物を同定した。これらについて活性型 Ras (H-RasG12V あるいは K-RasG12V) を有する NIH3T3 細胞を用いた足場非依存性細胞増殖抑制試験を実施した結果、細胞活性を示す 8 種類のヒット化合物を同定した。

① Kobe2400 の初期構造展開：

Kobe2400 は生化学的、細胞学的阻害活性が比較

的強いことが確認されたため、合成展開に向けて誘導体合成を実施した。本化合物はイミン結合を2か所対称に持つ化合物で、構造特性としてアルデヒドとアミンへ容易に分解することが予想された。分解で生じるアルデヒドを評価した結果、Ras/Raf結合阻害活性が生化学的に確認されたが、Ras特異的な作用ではないことが細胞試験で明らかとなった。そこで分解が起こらないより安定なアルキルアミン構造へ構造変換することを試みた結果、アルキルアミン体(NKB067)では弱いながら阻害活性が認められたものの、その類縁体であるKNB070, KNB075, KNB076, KNB077には活性が認められなかった。

② Kobe0066の作用の特異性評価：

Kobe0065と同じ部分構造であるヒドラジン構造を有するKobe0066は、ELISA法でのRas/Raf結合阻害試験において、全長RasとRafとの結合の阻害活性を示したが、カルボキシ末端のHVL(hypervariable region)を除いた166番目までのアミノ酸残基から成るRasとRafとの結合の阻害活性を示さなかったことから、全長RasとRafとの結合を阻害する新規Ras機能阻害剤である可能性が示唆された。しかしながら、NMR解析では、166番目までのアミノ酸残基を有するRasとの直接結合は認められず、細胞内におけるMEK、ERKのリン酸化抑制効果についても、Kobe0065より弱いことが確認された。

③ Kobe0067の初期構造展開と作用の特異性評価：

Kobe2400と同一のチアジアゾール母核を有するKobe0067について、その追加合成を行うとともに誘導体NKB071, KNB072, KNB073, KNB074をデザインし合成した。これら4化合物のうち、NKB073, KNB074はELISA法ならびにOriole-dye法で、Ras/Raf結合阻害活性を示したが、細胞試験ならびにNMR解析の結果から、Ras特異的な阻害作用を示さないことが明らかとなった。

④ Kobe1268の作用の特異性評価：

Kobe1286は、分子量262.2の小分子有機化合物であり、活性型Rasを有するヒト培養がん細胞(NCI-H441, SK-CO-1)の足場非依存性および足場依存性細胞増殖をKobe0065より強力に阻害する作用を示した。一方、活性型Rafを有するNIH3T3細胞ならびに活性型Rasを有さないヒト培養がん細胞(SK-MEL-1, NCI-H1437, SNU-CO1)では全く増殖阻害作用を示さなかった。ELISA法では、Kobe1286はKobe0066と同様に、全長のRasとRafとの結合阻害活性を示したが、166番目までのアミノ酸残基から成るRasとRafとの結合阻害活性を示さなかったことから、全長のRasとRafとの結

合を阻害する新規Ras機能阻害剤である可能性が示唆された。現在、細胞内MEK、ERKのリン酸化抑制活性について検討を加えている。

⑤その他の化合物Kobe1175, Kobe1767, Kobe1985, Kobe2001については現在、Ras特異性評価のための細胞試験の実施過程にある。

3) KBFM561, KBFM492の活性・溶解度改善のための初期構造展開

H-RasT35Sのポケット構造を用いたバーチャルスクリーニングと細胞試験により得られた18種類のヒット化合物について、活性と溶解度改善を目的としたStraDropNovaによる構造デザインとMM-PBSA計算でスコアが良好であった2系統の化合物KBFM561ならびにKBFM492について、21種類の新規誘導体を新規合成し活性評価を行った。その結果、KBFM492の誘導体NKB045には良好な水溶性と弱いながらもELISA法でRas/Raf結合阻害活性が認められた。

4) 分子動力学計算法を用いた新規化合物設計

統合計算科学システムMOEを用いて、Kobe0065の誘導体で構造が比較的コンパクトなKobe2601とH-RasT35Sとの複合体NMR構造情報から得られたKobe2601の配位構造を、野生型H-RasX線結晶構造(state 1)に重ね合わせた分子モデルを作成した。分子動力学計算法(NAMDコード)を用いてこの動的配位状態を解析することにより、初期解析段階ではあるが、より安定・強固と考えられる配位状態ならびにSwitch I, Switch II領域の移動等いくつかの興味深い配位状態の知見を得ることに成功した。今後、Kobe2601周辺の電荷状態をも考慮に入れながら、種々の条件設定下で分子動力学計算による配位状態の解析を進めていく予定である。

5) 放射光によるH-Ras/BZDNの複合体のX線結晶構造解析

Trypsin阻害剤として知られているBenzamidine(BZDN)を浸漬した結晶からは、分解能1.3ÅのX線回折データを収集した。解析の結果、 $R/R_{free} = 15.7/17.4\%$ となり、十分な精度で複合体モデルを決定した。非対称単位に含まれる1分子のRas分子に対して2分子のBZDNが観測された。一方のBZDNは結晶中の分子間接触領域に存在していたため、単独のRas分子への結合ではなく、アーティファクトと考えられた。しかし、もう一方のBZDNについては、Rasの $\alpha 2$ ヘリックスとコア β シートに挟まれる領域、すなわちLys5, Val7, Asp54, Leu56等の側鎖で囲まれた分子内のポケット内に存在し、Ras分子特異的に結合していることが確認できた。

BZDNは単純な構造を持つため、創薬研究で

は fragment screening にも用いられている。今回得られた構造は、2012年に Maurer らが K-Ras について調べたもの (PDB ID: 4DSO) と同じ領域に存在し [Maurer et al. PNAS, 109, 5299 (2012)], この部分のアミノ酸側鎖は相同であるため、基本的には類似した結合様式を有していることが示された。

しかし、結晶内の蛋白質分子の分子間接触の様式が Maurer ら (4DSO) のそれとは若干異なるため、主鎖構造にもわずかながら違いが見られ、今回の実験では、BZDN は少なくとも2つのコンフォメーションを持ちつつ Ras に結合していることがわかった。4DSO では、BZDN のアミジン基は Asp54 の側鎖と静電相互作用しているが、本構造ではそれに加えて、一部分がベンゼン環の中心で 60 度程度回転して、Tyr71 のカルボニル酸素と相互作用できる状態になっていた。今回の構造は 4DSO とは異なり、 $\alpha 2$ ヘリックスが若干開いた構造を示しており、近接する Tyr71 の側鎖は溶媒領域に向かって伸びて、化合物の結合ポケットのサイズをやや広げるとともに、Tyr71 のカルボニル酸素が BZDN に向かってやや近づいた結果とみることができた。その点では、 $\alpha 2$ ヘリックスの可動性にもかかわらず、BZDN は結合能を有しており、その結合多様性は構造展開するフラグメントとしても有意義であることが明らかとなった。

さらに、薬剤なしの H-Ras の構造と比較した結果、Thr74 がポケットの空間を作るように外側に向かって動いていた。さらに、Tyr71 の側鎖は溶媒に向かって伸びたままになっているものの、そのカルボニル酸素は BZDN の二つ目のコンフォメーションを支えるようにアミジン基に向かって動いていることも分かった。

Tyr71 については、Kobe0065 の誘導体である Kobe2601 存在下での H-Ras の MD シミュレーションの結果、Asp38 との水素結合のリアレンジメントを介してポケットの開閉運動に関与する、という初期解析結果が得られていることから、今回得られたデータは、state 1 構造の安定化を図る化合物の構造設計上、有用な情報と考えられた。

6) Ras の薬剤結合ポケットの開閉メカニズムの解明と研究成果の取りまとめ

HAG法を利用して決定した、GTP結合型H-Rasの新規state 1構造と、state 1とstate 2の中間型と考えられる新規state 2構造 (state 2*) と、既知のstate 2構造について、ポケットを形成する2つのSwitch 領域 (Switch IとSwitch II) とそれを繋ぐGTP (繋がることでポケットが閉じる) ならびに

その周辺の水素結合のネットワークを詳細に比較・解析した。その結果、state 2からstate 1への構造遷移の初期に、Switch領域とGTPとを繋ぐ2つの水分子の位置変化と、それに伴うSwitch IIとSwitch IIに隣接する $\alpha 3$ ヘリックスの間の水素結合のリアレンジメントとSwitch IIの構造・位置変化が、GTPの位置変化を引き起こし、それに伴ってSwitch Iのループが外側に大きく開き、薬剤が結合可能なポケットが形成される可能性が示唆された。さらに、溶液中でstate 1構造を優先的にとるH-RasT35SとH-Ras-GTPそれぞれの、GTP結合/解離速度と内因性GTP加水分解速度の解析により、H-Rasがヌクレオチド交換因子によるGDP結合型からGTP結合型への変換を受けた直後は、内因性GTPの加水分解活性が低くGTP結合型を維持しやすいstate 1構造に一旦安定化し、その後には標的蛋白質との結合に有利なstate 2構造に変換され、シグナル伝達が行われる可能性が示唆された。

このGTP結合型における薬剤結合ポケットの開閉メカニズムとstate 1の生理的意義についての研究成果を取りまとめ、論文投稿準備中である。

D. 考察

・フラグメントリンク法、フラグメントマーキング法の活用により、チオキソチアゾリジン構造を有するリード化合物KMR084の母核構造を大きく変更した誘導体の合成展開が可能になった。また、部分構造を繋ぐリンカーの長さ、部分構造の配向、リンカーとRasとの結合様式と合成展開の可能性を考慮した、誘導体の効率的なデザインが可能になった。誘導体とRasとの相互作用の予測から、誘導体の中央に位置するリンカーの部分構造とTyr71の相互作用が化合物の結合安定性を改善する一つの要素となりうることを確認できた。実合成が完了した化合物数が現時点ではまだ少なく、KMR084の活性を大きく上回る誘導体の獲得には至っていないが、ELISA法によるRas/Raf結合阻害活性評価の効率化が本年度より可能になったことから、今後、実合成のスピードアップを図り、活性の高い誘導体の迅速な獲得を目指す。

・KMR084についてはこれまで、適応がん腫をK-RasG12Vを有する大腸がんにと絞って開発研究を行ってきたが、本年度実施した担がんモデル動物での腫瘍増殖抑制試験の結果から、H-RasG12Vを有する膀胱がんにも一定の有効性を示すことが明らかになった。

・ELISA法による保有ライブラリーの再スクリーニングによって、新規ヒット化合物の獲得に成功

した。感度の高いELISA法では、従来法（RI法）では検出が困難だった溶解度の低い化合物の検出も可能になり、複数の新規ヒット化合物の獲得に至った。今回得られたヒット化合物には、Rasのカルボキシ末端が関与するRas/Raf結合認識を阻害するという、既知ヒット化合物にはない新規の作用メカニズムが確認された。一部の化合物（Kobe1268）については、細胞増殖抑制試験においてRas特異性が既に確認されており、今後、細胞内シグナルならびNMRでの結合のRas特異性の検証をクリアできれば、新規阻害メカニズムを有する化合物の構造展開が可能になる。

・H-Ras/BZDNの複合体のX線結晶構造解析とMDシミュレーションにより、state 1構造安定化に寄与するSwitch領域の水素結合のネットワーク情報の一部が明らかになった。長時間MDによるデータ検証と複合体構造（結晶構造）の詳細な解析を通じて、化合物の構造展開に有効な構造情報を抽出し誘導体のデザインにフィードバックする。

E. 結論

フラグメントリンク法、フラグメントマーキング法、複合体の結晶構造情報、MDシミュレーションから得られる化合物の結合予測情報をフルに活用して、今後さらに効率的な誘導体のデザインを行い、ELISA法による迅速な阻害活性評価を通じて、リード化合物ならびに保有シード化合物の構造展開のスピードアップを図り、医薬品開発候補の早期創製を目指す。

保有ライブラリーのELISA法による再スクリーニングで得られた新規ヒット化合物については、作用のRas特異性の検証作業を急ぎ、構造展開を効率的に進める。HAG法を利用した薬剤結合ポケットの開閉メカニズムとstate 1構造の生理的意義に関する研究成果については、早急に論文発表する。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1-1. 論文発表 該当なし

1-2. 著書（総説）

島扶美、吉川陽子、松本篤幸、片岡徹 「rasがん遺伝子産物Rasを分子標的としたがん治療薬開

発の現状」メディカルレビュー社、がん分子標的治療（別冊）、Vol.13, No. 1, p92-98, 2015年3月

2. 学会発表

片岡 徹 アカデミア発、ras がん遺伝子産物を分子標的にした抗がん剤の開発、CBI 学会第 349 回研究講演会「日本版 NIH の現状とオープンイノベーションの成果」（大阪）、2014 年 4 月 11 日（招待講演）

片岡 徹 分子標的がん治療薬の開発と SPring-8、SPring-8/SACLA コンファレンス 2014「進化する光が拓く科学技術」（東京）、2014 年 12 月 1 日（招待講演）

Kataoka, T. Universal roles of phospholipase C ϵ in carcinogenesis and inflammation. 5th International Symposium on Carcinogenic Spiral “Infection, Immunity, and Cancer” (PORTPIA HOTEL, Kobe) February 26, 2015（招待講演）

Kataoka, T. Structure-based drug design of anti-cancer compounds targeting Ras oncoproteins. Workshop on Innovation and Pioneering Technology (WINTech) 2015 (Kobe University) March 12, 2015（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

米国特許化：

US Pat Application No.: 14/116,152

Filing Date: 01/17/2014

Title of invention: Thioxothiazolidine derivative having Ras function inhibitory effect

2. 実用新案登録

該当なし

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

研究分担者 島 扶美 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KMR084（WO2012/153775 A1）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。＜H26年度先行開発＞KMR084の適応がん種を広げるために、ヒト膀胱がん細胞株を用いた腫瘍増殖抑制試験を実施したところ瘍増殖抑制傾向が確認された。KMR084の併用薬としてのポテンシャル評価を行うために、ヒト大腸がん細胞株を異種移植した担がんモデル動物において、既存薬であるマルチキナーゼ阻害剤sorafenibとの併用による薬効評価を行った。その結果、併用による効果の増強傾向が認められたものの、sorafenib単剤使用との有意差は認められなかった。H27年2月、リード化合物KMR084関連特許（WO2012/153775 A1→US Patent Application No.: 14/116,152）が米国にて成立した。＜H26年度後行開発＞評価化合物のRas/Raf結合阻害活性の*in vitro*での検出の効率化をはかるために、ELISA法による新規活性評価システムを構築し本研究に導入した。保有化合物ライブラリーを用いたELISA法によるスクリーニングでは、新規ヒット化合物が同定され、細胞試験においても有意ながん細胞増殖抑制作用を示すものが複数獲得できた。従来法（RI法など）と比較して、評価系において使用する蛋白量が微量であり、評価化合物も低濃度ですむため、従来法では溶解度が低く活性検出が困難であった化合物の活性検出が可能になったと考えられる。

Kobe0065とその誘導体の開発研究の知見を踏まえた、国内外のRas阻害剤の開発状況に関する総説を執筆し、メディカルレビュー社より出版した（がん分子標的治療2015年3月号, Vol. 13, No.1, p92-98）。特殊試料マウント（HAG）法と放射光を利用した野生型H-RasのX線結晶解析、NMR解析、ならびに生化学試験を通じて、化合物の構造展開に有用なポケットの開閉運動のメカニズムが明らかになった。研究成果を取りまとめ、論文投稿準備段階にある。

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KMR084の同定に成功した（背景となる研究）。H26年度、リード化合物KMR084の適応がん腫の拡大を図るとともに、併用薬としての可能性を探る（先行開発）。また、評価化合物のRas/Raf結合阻害活性の*in vitro*での検出の効率化をはかるために、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法による新規活性評価システムを構築して保有ライブラリーのスクリーニングを実施して新規ヒット化合物を同定し、迅速な構造展開を行う。（後行開発）。

B. 研究方法

先行開発：

1) ヒト膀胱がん細胞を異種移植した担がんモデル動物を用いたKMR084の腫瘍増殖抑制作用の評価
H-RasG12Vを有する膀胱がん細胞株EJ-1を異種移植した担がんモデル動物を用いて、日本チャールス・リバー株式会社において、化合物の腹腔内投与による腫瘍増殖抑制試験を実施し、適応がん腫の拡大の可能性を評価した。

2) KMR084の併用薬としての可能性の評価

ヒト大腸がん細胞株（K-RasG12V）を異種移植した担がんモデル動物において、既存薬であるマルチキナーゼ阻害剤sorafenibと併用し、腫瘍増殖抑制効果を単剤投与群と比較し、併用薬としてのポテンシャル評価を行った。

後行開発

1) ELISA法による保有ライブラリーからの新規ヒット化合物の同定

大腸菌で発現生成したGST-cRaf1-RBDをH-Rasを用いた、ELISA法による化合物のRas/Raf結合阻害活性の評価系を新たに構築した。保有する化合物ライブラリーを用いて、ELISA法による*in vitro*スクリーニングを実施し、阻害活性を示した化合物については、活性型Rasを有する NIH3T3細胞、活性型Rasを有するヒトがん細胞株、ならびに活性型Rasを有さないヒトがん細胞株を用いた足場非依存性細胞増殖作用の確認による活性評価を行った。一部のヒット化合物については初期構造展開を実施し、誘導体の活性評価を行った。

2) Rasの薬剤結合ポケットの開閉メカニズムの解明と研究成果の取りまとめ

HAG特殊試料マウント法、NMR解析、RasのGTP結合/解離速度ならびに内因性GTP加水分解速度の解析を通じて、新規ポケットの開閉メカニズムとstate 1構造の生理的意義を解明し、研究成果を取りまとめた。

C. 研究結果

先行開発

1) ヒト膀胱がん細胞を異種移植した担がんモデル動物を用いたKMR084の腫瘍増殖抑制作用の評価
KMR084は、ヒト大腸がん細胞株（K-RasG12V）以外にヒト膀胱がん細胞株（H-RasG12V）に対しても細胞増殖抑制作用を示す。この細胞株を異種移植した担がんモデル動物を用いて、日本チャールス・リバー株式会社において腫瘍増殖抑制試験を実施（外注）した。BALB/cヌードマウス（8週齢、雌）に上記がん細胞浮遊液を背部皮下に接種し、21日目に腫瘍が生着したことを確認した後、KMR084 80 mg/kg, 240 mg/kg, sorafenib 80 mg/kg、非投与群の4群に群分けを行い、5回/週の割合で化合物を腹腔内投与した。35日目（投与後2週間）においては、KMR084 240mg/kg投与群は、sorafenib 80mg/kg投与群よりも弱いものの、非投与群と比較して有意に（マンホイットニーの有意差検定）腫瘍増殖を抑制した。42日目（投与後3週間）では、非投与群との有意差は認められないものの、腫瘍増殖抑制傾向が確認できた。

2) KMR084の併用薬としての可能性の評価

BALB/cヌードマウス（8週齢、雌）に、ヒト大腸がん細胞浮遊液を側副部皮下に接種し、腫瘍の生着を確認の後、KMR084 240 mg/kg, sorafenib 80 mg/kg, KMR084 240 mg/kg+ sorafenib 80 mg/kg, をそれぞれ5回/週、腹腔内投与し、腫瘍増殖抑制効果を比較した。これまでの実験で、Kobe0065とsorafenibの併用群は、sorafenib単剤投与群と比較して、より強力な腫瘍増殖抑制効果（有意差あり）を示すことが確認できたが、KMR084とsorafenibの併用群ではsorafenib単剤投与群と比較して、やや強い腫瘍増殖抑制傾向を示すのみで、有意差は認められなかった。

後行開発

1) ELISA 法による保有ライブラリーからの新規ヒット化合物の同定：

新たに構築したELISA法による*in vitro*のスクリーニングシステムを用いて、保有する化合物ライブラリー（1100種類の化合物を含む）から、Kobe0066, Kobe0067, Kobe1268, Kobe2400をはじめとするRas/Raf結合阻害活性を示す複数（約50種類）の新規ヒット化合物を同定した。これらについて活性型Ras（H-RasG12VあるいはK-RasG12V）を有するNIH3T3細胞を用いた足場非依存性細胞増殖抑制試験を実施した結果、細胞活性を示す8種類のヒット化合物を同定した。

① Kobe2400の初期構造展開：

Kobe2400は生化学的、細胞学的阻害活性が比較的強いことが確認されたため、合成展開に向けて誘導体合成を実施した。本化合物はイミン結合を2

か所対称に持つ化合物で、構造特性としてアルデヒドとアミンへ容易に分解することが予想された。分解で生じるアルデヒドを評価した結果、Ras/Raf 結合阻害活性が生化学的に確認されたが、Ras 特異的な作用ではないことが細胞試験で明らかとなった。そこで分解が起こらないより安定なアルキルアミン構造へ構造変換することを試みた結果、アルキルアミン体 (NKB067) は弱いながら阻害活性は認められたもののその類縁体である KNB070, KNB 075, KNB 076, KNB 077 には活性が認められなかった。

② Kobe0066 の作用の特異性評価：

Kobe0065 と同じ部分構造であるヒドラジン構造を有する Kobe0066 は、ELISA 法での Ras/Raf 結合阻害試験において、全長の Ras と Raf との結合阻害活性を示したが、カルボキシ末端の HVL(hypervariable region)を除いた 166 番目までのアミノ酸残基を有する Ras と Raf との結合阻害活性を示さなかったことから、全長の Ras と Raf との結合を阻害する新規 Ras 機能阻害剤である可能性が示唆された。しかしながら、NMR 解析では、166 番目までのアミノ酸残基を有する Ras との直接結合は認められず、細胞内における MEK、ERK のリン酸化抑制効果についても、Kobe0065 より弱いことが確認された。

③ Kobe0067 の初期構造展開と作用の特異性評価：

Kobe2400 と同一のチアジアゾール母核を有する Kobe0067 について、その追加合成を行うと共に誘導体 NKB071, KNB 072, KNB 073, KNB 074 をデザイン・合成した。これら 4 化合物のうち、NKB073, KNB 074 は ELISA 法ならびに Oriole-dye 法で、Ras/Raf 結合阻害活性を示したが、細胞試験ならびに NMR 解析の結果から、Ras 特異的な阻害作用を示さないことが明らかとなった。

④ Kobe1268 の作用の特異性評価：

Kobe1286 は、分子量 262.2 の小分子有機化合物であり、活性型 Ras を有するヒト培養がん細胞(NCI-H441, SK-CO-1)の足場非依存性および足場依存性細胞増殖を Kobe0065 より強力に阻害する作用を示した。一方、活性型 Raf を有する NIH3T3 細胞ならびに活性型 Ras を有さないヒト培養がん細胞(SK-MEL-1, NCI-H1437, SNU-CO1)では全く増殖阻害作用を示さなかった。ELISA 法では、Kobe1286 は Kobe0066 と同様に、全長の Ras と Raf との結合阻害活性を示したが、166 番目までのアミノ酸残基を有する Ras と Raf との結合阻害活性を示さなかったことから、全長の Ras と Raf との結合を阻害する新規 Ras 機能阻害剤である可能性が示唆された。現在、細胞内 MEK、ERK のリン酸化抑制効果の確認段階にある。

⑤その他の化合物 Kobe1175, Kobe1767, Kobe1985, Kobe2001 については現在、Ras 特異性評価のための細胞試験の実施過程にある。

2) Rasの薬剤結合ポケットの開閉メカニズムの解明と研究成果の取りまとめ

HAG法を利用して決定した、GTP型H-Rasの新規state 1構造と、state 1とstate 2の中間型と考えられる新規state 2構造 (state 2*) と、既知のstate 2構造について、ポケットを形成する2つのSwitch 領域 (Switch IとSwitch II) とそれを繋ぐGTP (繋がることでポケットが閉じる)、ならびにその周辺の水素結合のネットワークを詳細に比較・解析した。その結果、state 2からstate 1への構造遷移の初期に、Switch領域とGTPとを繋ぐ2つの水分子の位置変化と、それに伴うSwitch IIとSwitch IIに隣接する $\alpha 3$ ヘリックスの間の水素結合のリアレンジメント、さらにSwitch IIの構造・位置変化が、GTPの位置変化を引き起こし、それに伴ってSwitch Iのループが外側に大きく開き、薬剤が結合可能なポケットが形成される可能性が示唆された。また、溶液中でstate 1構造を優先的にとるH-RasT35SとH-RasGTPそれぞれの、GTP結合/解離速度と、内因性GTP加水分解速度の解析により、H-Rasがヌクレオチド交換因子によるGDP型からGTP型への変換を受けた直後は、内因性GTPの加水分解活性が低くGTP型を維持しやすいstate 1構造に一旦安定化し、その後には標的蛋白質との結合に有利なstate 2構造に変換され、シグナル伝達が行われる可能性が示唆された。

このGTP型における薬剤結合ポケットの開閉メカニズムとstate 1構造の生理的意義についての研究成果を取りまとめ、現在論文投稿準備中にある。

D. 考察

・リード化合物KMR084についてはこれまで、適応がん腫をK-RasG12Vを有する大腸がんに絞って開発研究を進めてきたが、本年度実施した担がんモデル動物での腫瘍増殖抑制試験の結果から、H-RasG12Vを有する膀胱がんにも一定の有効性を示すことが明らかになった。Kobe0065とは異なり、既存薬であるマルチキナーゼ阻害剤との併用薬としての可能性については、薬効の有意な増強効果が認められなかったことから、現時点では低いと考えられた。

・ELISA法による保有化合物ライブラリーのスクリーニングによって、新規ヒット化合物の獲得に成功した。感度の高いELISA法では、従来法 (RI法) では検出が困難だった溶解度の低い化合物の検出も可能になり、複数の新規ヒット化合物の獲得に至ったと考えられる。今回得られたヒット化

化合物には、Rasのカルボキシ末端が関与するRas/Raf結合認識を阻害するという、既知ヒット・リード化合物にはない新規の作用メカニズムが示された。一部の化合物（Kobe1268）については、細胞増殖抑制試験においてRas特異性が既に確認されており、今後、細胞内シグナルならびNMRでの結合のRas特異性の検証をクリアできれば、新規阻害メカニズムを有する化合物の構造展開が可能になる。

・GTP結合型H-Rasのstate 1構造における薬剤結合ポケットの開閉メカニズムとstate 1構造の生理的意義が明らかになった。研究成果を早急に取り纏め論文発表する。

E. 結論

リード化合物KMR084の米国特許は無事成立したものの、化合物自体の構造最適化研究には遅れが生じている。総括研究代表者が推進する、フラグメントリンク法、フラグメントマーキング法、複合体の結晶構造情報、MDシミュレーションから得られる化合物の結合予測情報をフルに活用し、今後さらなる誘導体デザインの効率化を進め、ELISA法による迅速な阻害活性評価を通じて、リード化合物ならびに保有リード化合物の構造展開のスピードアップを図ることで早期創製を目指す。

保有ライブラリーのELISA法による再スクリーニングで得られた新規ヒット化合物については、作用のRas特異性の検証作業を急ぎ、構造展開を効率的に進める。

G. 研究発表

1-1. 論文発表 該当なし

1-2. 著書（総説）

島扶美, 吉川陽子, 松本篤幸, 片岡徹. 「*ras*がん遺伝子産物Rasを分子標的としたがん治療薬開発の現状」メディカルレビュー社、がん分子標的治療（別冊）、Vol.13, No. 1, p92-98, 2015年3月

2. 学会発表

島扶美. Ras/Rafシグナル伝達を阻害する新規抗がん剤の探索. 創薬支援ネットワーク・シンポジウム「オールジャパンの創薬支援—創薬立国日本に向けて」（大阪）、2015年1月16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

米国特許化：

US Pat Application No.: 14/116,152

Filing Date: 01/17/2014

Title of invention: Thioxothiazolidine derivative having Ras function inhibitory effect

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

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

研究分担者 閩 正博

神戸天然物化学株式会社 創薬化学部長

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。さらに2012年に国際出願（国際出願番号 PTC/JP2012/061908）後、国内大手製薬企業へ特許実施権許諾契約を締結した。本特許は2015年2月に米国での特許化（Application No. 14/116,152）を完了した。先行開発研究ではフラグメント化合物 KBFM123 及びリード化合物 KMR084 の部分フラグメント化合物のRasとの結合情報をNMRで解析し構築した複合体モデルを用い統合計算科学システム MOE による計算を実施した。その結果に基づいた化合物のデザインと合成によるリード化合物の構造最適化研究を開始した。一方、後行開発研究では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による *in silico* スクリーニング及び新たに構築したELISA法による保有ライブラリーのスクリーニングを実施し、得られるヒット化合物の構造情報を基に先行開発化合物とは構造の異なるリード化合物の探索を実施した。バックアップリード化合物の同定と構造最適化により非臨床候補化合物の早期創出を研究目標として設定し研究を進めている。

A. 研究目的

先行開発

保有するリード化合物KMR084の構造最適化研究を研究目的とする。

リード化合物KMR084の部分フラグメント構造及び新たに見出したフラグメント化合物KBFM123とのNMR及びHADDOCKを用いた結合情報や複合体モデル構造を活用した統合計算科学システム（MOE）によりインシリコで新規な化合物をデザインする。デザインされた化合物を実合成とアッセイにより見極めと構造展開により保有リード化合物KMR084の構造最適化を実施する。

後行開発

後行開発では既保有リード化合物KMR084とは構造の異なる新規リード化合物の創製を研究目的とする。

1) 既保有ヒット化合物であるチオセミカルバジド誘導体Kobe0065及びドラッグライブラリーからのインシリコスクリーニング選抜ヒット化合物（KBFM561, KBFM492）の構造展開性を検証するために新規誘導体をデザイン・合成し、保有リード化合物KMR084とは母核構造の異なるリード候補化合物を創製する。

2) 新たに構築されたELISA法を用いた神戸大保有ライブラリーのスクリーニングから見出され

るヒット化合物のリードへの構造展開性を検証するためにその誘導体をデザイン・合成し、保有リード化合物KMR084とは母核構造の異なるリード候補化合物を創製する。

B. 研究方法

先行開発

フラグメントマーキング法とフラグメントリンク法を活用した保有リード化合物KMR084の構造最適化研究では、これまで実施された新規ポケット構造をターゲットとしたドッキングスクリーニングからの低分子フラグメントの構造情報やNMRやHADDOCKを用いたH-Rasとの複合体モデルからの結合情報を活用し、統合計算科学システム（MOE）を用いて新たな化合物をインシリコでデザインする。デザインした新規化合物については、合成法も含めて検討し、実合成を行い、その構造活性相関から合成展開性を検証する。

後行開発

1) 神戸大学において実施された大規模 *in silico* ドッキングシミュレーションにより得られた既保有ヒット化合物チオセミカルバジド誘導体（Kobe0065）からの構造展開としてフラグメントリンク法の応用による化合物デザイン・合成を実

施した。本年度は extended な構造を有するチオセミカルバジド構造を folded な環構造へ変換することにより結合阻害活性の向上を試みた。

また、ドラッグライブラリーからのインシリコスクリーニングから選抜した 2 化合物 KBFM561 及び KBFM492 の誘導体をデザイン、合成し、その構造活性相関から合成展開性を検証する。

2) 新たに構築された ELISA 法を用いた神戸大保有ライブラリーのスクリーニングから見出される新たなヒット化合物について周辺誘導体をその構造特性に基づきデザイン、合成し、得られる構造活性相関から合成展開性を検証する。

(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

新規ポケット構造をターゲットとしたドッキングスクリーニングからの低分子フラグメントの構造情報やNMRやHADDOCKを用いたH-Rasとの複合体モデルからの結合情報を活用し、神戸大で統合計算科学システム (MOE) を用いた新たな化合物のインシリコデザインが実施された。これらデザインされた新規化合物についてRasとの予測結合モードの3次元グラフィックスをもとに合成的な見地も含め協議を重ね、合成可能な52化合物の化合物群をデザインし、再度のシミュレーションを実施し、優先順位付けを行い、化合物の合成を開始した。既に合成した3化合物についてはRas/Raf阻害活性は確認できたが、KMR084を上回る化合物を見出すには現時点では至っていない。優先順位の高い化合物を順次合成し評価する予定である。

後行開発

1) 既保有ヒット化合物チオセミカルバジド誘導体 (Kobe0065) からの構造展開としてフラグメントリンク法の応用により 27 化合物をデザインし合成したが、チオセミカルバジド構造を回避する結合様式を見出すことは出来なかった。本年度はチオセミカルバジド構造回避とより高い親和性を求めて環状化構造への変換を実施した。extended な構造を有するチオセミカルバジド構造を folded な環構造へ変換した 5 化合物(NKB047, 048, 049, 053, 054)を合成したが水溶性が大きく低下したため、結合阻害活性を評価することが出来ない結果となった。

また、ドラッグライブラリーのインシリ

コスクリーニングから選抜したヒット化合物 KBFM561 から構造展開については既存保有ヒット化合物 Kobe0065 との構造類似性にも着目し、フラグメントリンク法からの構造情報も加味した新規誘導体 5 化合物 (NKB040, 041, 042, 043, 044) をデザインし合成した。結果としてこれら 5 化合物に結合阻害活性を見出すことは出来なかった。一方、KBFM492 からの誘導体 NKB045 には良好な水溶性と弱いながらも ELISA 系で結合阻害活性が認められたことから、さらにその周辺誘導体 16 化合物 (KNB046~065) を合成したが NKB045 を上回る阻害活性を示す化合物を見出すには至らなかった。

2) 新たに構築された ELISA 法を用いた保有ライブラリーのスクリーニングから Kobe2400、Kobe0066 および Kobe0067 が新たに見出された。Kobe2400 は H-Ras への阻害活性が比較的高いことが明らかとなり、合成展開に向けて誘導体合成を実施した。本化合物はイミン結合を 2 か所対称に持つ化合物で、構造特性としてアルデヒドとアミンへの分解が予想される。分解で生じるアルデヒドを評価した結果、阻害活性が確認されたが Ras 特異的な阻害ではないことが細胞系の評価で明らかとなった。そこで分解が起こらないより安定なアルキルアミン構造へ構造変換することを試みた。その結果、合成したアルキルアミン体 (NKB067) は弱いながら阻害活性は認められたが、その類縁体である KNB070, 075, 076, 077 には活性が認められなかった。

もう一つのヒット化合物 Kobe0067 は Kobe2400 と同一のチアジアゾール母核を有し、Kobe0067 の追加合成と共にその誘導体 NKB071, 072, 073, 074 を合成した。これら 4 化合物は ELISA 法では強い阻害活性を、また従来法である Oriole-dye 法でも NKB073, 074 は阻害活性を示したが cell-based assay 系からは Ras 特異的な阻害活性ではないことが明らかとなった。一方、ヒット Kobe066 は Kobe0065 と同じ部分構造であるヒドラジン構造を含有する化合物であるが、その後の評価結果より下流の MEK、Ark のリン酸化抑制作用が確認されたことよりその後の構造展開はペンディングとした。

D. 考察

先行開発

現在、保有するリード化合物 (KMR084系)、シード化合物 (Kobe0065系) 並びにリード化合物のフラグメント化合物の Ras との複合体モデル構造情報やNMRによる解析で得られた Ras との結合情報を統合する計算科学システム MOE を用いて、新たなシード化合物の構造デザインに着手した。これ

らのデザイン化合物を基に合成法も加味した複数のタイプの化合物群をデザインし、それらをさらにMOEにより再解析評価を実施し、優先度の高い化合物の絞り込みを行い化合物合成を進めている。本法により保有するリード化合物KMR084の構造最適化研究を効率的に進める。

後行開発

非前臨床試験候補と成り得る新規構造を持つリード化合物の創出を目的に、本年度は既保有ヒット化合物やドラッグライブラリーのインシリコスクリーニングヒット化合物からの創薬化学的手法による展開、並びに新たなELISA法を用いた保有ライブラリーのスクリーニングヒットからの展開と複数のアプローチを実施した。既保有ヒット化合物からの展開では毒性懸念のあるチオセミカルバジド構造の回避を目的に環状構造への変換を試みたが溶解性の改善と結合阻害活性の発現を両立する化合物を得るには至らなかった。また、適正な分子量を持つドラッグライクなライブラリーから得られたインシリコスクリーニングヒット化合物からの誘導体展開については、阻害活性を示す化合物を得るには至らなかった。また、新たに構築されたELISA法を用いたスクリーニングからは既存保有ヒット化合物とは構造の異なるヒット化合物が得られたことより、ヒット化合物の検証のために新たに周辺誘導体をデザインし合成した。その結果、結合阻害活性を示す化合物も見出されたが、細胞評価系においてRas特異的な阻害ではないことが明らかとなり、目的とする別骨格リード候補化合物を見出すには至っていない。

E. 結論

既保有ヒット化合物に加え、新たなスクリーニングにより見出したヒット化合物を含めそれぞれのヒット化合物からリード創出のための構造展開を実施したが、先行するリード化合物KMR084と構造が異なり、且つ同等以上の活性を有するリード候補化合物を見出すには至っていない。

今後はこれまで蓄積されたRasと様々な化合物との複合体構造情報や結合情報を統合する計算科学システムMOEの活用により、既保有ヒット化合物KMR084の構造最適化と共に別骨格構造を持つヒット創出とその構造展開からのリード化合物の創製を早期に達成する。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

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ノ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

米国特許化：

US Pat Application No.: 14/116,152

Filing Date: 01/17/2014

Title of invention: Thioxothiazolidine derivative having Ras function inhibitory effect

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

*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 熊坂 崇 公益財団法人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21 kDa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。

不活性型であるRasはGDPと結合しているが (Ras-GDP)、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によりGDPがGTPと交換されると活性型 (Ras-GTP) になる。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癌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タンパク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

昨年度までに、野生型Rasタンパク質結晶について、HAG (Humid Air and Glue-coating) 法を用いて、試料雰囲気湿度を下げることでState 2構造からState 1構造への変化を誘起できることを明らかとし、その変化を詳細に解明した。

今年度は主に、野生型H-Ras R32結晶を種々の化合物溶液に浸漬させて得た薬剤複合体結晶のX線回折実験をHAG法により行った。本研究の目的は、薬剤結合構造を得ることにあるが、特に結晶化段階では作り出せないState 1構造に薬剤を結合させる方法を検討することを目指している。このため、薬剤を浸漬させた結晶について試料雰囲気湿度を変化させることも試みた。

さらに、リード化合物KMR084の部分構造からなる誘導体 (ビルディングブロック化合物) を使用した複合体の結晶解析のための回折実験も合わせて開始している。

(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ない。

C. 研究結果

Spring-8 BL38B1にて、2014年7月14日のビームタイムを利用し、野生型 H-Ras の R32 型結晶に

ついて、薬剤を浸漬した浸漬した試料について HAG 法を用いた測定を行った。

Trypsin 阻害剤として知られている Benzamidine (以下、BZDN) を浸漬した結晶からは、分解能 1.3 Å の X 線回折データを測定した。解析の結果、 $R/R_{\text{free}} = 15.7/17.4\%$ となり、十分な精度で構造が決定できた。

電子密度を観察したところ、非対称単位に含まれる 1 分子の Ras 分子に対して 2 分子の BZDN が観測され、それぞれ 601, 602 の残基番号を与えた。601 は結晶中の分子間接触領域にあり、単独の Ras 分子への結合ではなく、アーティファクトと言える。しかし、602 はヘリックス 2 とコア β シートに挟まれる領域、すなわち Lys5, Val7, Asp54, Leu56 等の側鎖で囲まれた分子内のポケット領域に存在し、Ras 分子特異的に結合していることが分かった。

BZDN は単純な構造を持つため、創薬研究では Fragment screening にも用いられている。今回得られた構造は、2012 年に Maurer らが K-Ras について調べたもの (PDB ID: 4DSO) と同じ領域に有り [Maurer et al. PNAS, 109, 5299 (2012)]、この部分のアミノ酸側鎖は相同であるため、基本的に類似した結合様式を有していることが示された。

しかし、結晶内のタンパク質分子パッキング様式が若干異なるため、主鎖構造にもわずかながら違いがみられ、今回の構造は少なくとも 2 つのコンフォメーションを持ちつつ結合していることが分かった。4DSO では、BZDN のアミジン基は Asp54 の側鎖と静電相互作用しているが、本構造ではそれに加えて、一部分がベンゼン環の中心で 60 度程度回転して、Tyr71 のカルボニル酸素と相互作用できる状態になっていた。今回の構造は 4DSO と異なって、ヘリックス 2 がやや開いた構造をしており、近接する Tyr71 の側鎖は溶媒領域に向かって伸びて、結合ポケットのサイズをやや広げるとともに、Tyr71 のカルボニル酸素が BZDN に向かってやや近づいた結果とみることができる。その点では、ヘリックス 2 の可動性にもかかわらず、BZDN は結合能を有しており、その結合多様性は構造展開するフラグメントとしても有意義であることが明らかとなった。

さらに、薬剤未結合の H-Ras 構造と比較したところ、Thr74 がポケットの空間を作るように外に向かって動いていた。さらに、Tyr71 の側鎖は溶媒に向かって伸びたままなものの、そのカルボニル酸素は BZDN の二つ目のコンフォメーションを支えるようにアミジン基に向かって動いていることも分かった。

一方、研究代表者らのグループで Ras との直接結合が NMR で確認された KMR084 のビルディン

グブロック化合物についても同様の解析を行ったが、こちらは化合物に相当する電子密度を得ることができなかった。Tyr71 および Thr74 についても、薬剤未結合構造と類似しており、このポケットへの結合は見られなかった。

引き続き、その後の複数回のビームタイムを用いて BZDN およびビルディングブロック化合物と Ras との複合体結晶について、HAG 法による湿度調整条件下での構造転移を試みた。しかし、いずれの条件でも State 1 構造への転移は起こらなかった。

D. 考察

BZDN 分子の Ras への結合は、結合ポケットの可動性にもかかわらず安定に起こっており、こうしたフラグメント分子を可能な結合サイトについて探索する試みには一定の意義があると思われる。さらに、結合に伴って生じるタンパク質分子側の構造変化を詳細に調べることによって、こうした分子構造変化と Switch 領域の構造変化、ひいては State 制御との関連性について評価を行っていく。

一方、ビルディングブロック化合物についてはこれまでも複合体の解析を試みてきたが、成しできていない。特に今回、State 2 構造で薬剤浸漬した結晶の転移ができなかったことは、Ras 不活性化薬剤探索法としての HAG 法の一つの可能性を失ったことになる。今後は残された可能性、すなわち、State 1 構造を持つ結晶を安定に作成し、溶液中でも維持させたいうえで、薬剤を浸漬する方法を確立することに集中する必要がある。このためには、湿度による構造転移の原因を解明せねばならない。

この原因は、これまで浸透圧によるものと考えてきた [Baba et al., Acta Cryst. D69, 1839-1849 (2013)]。浸透圧は水の活量に対応するため、その変化はタンパク質の水和構造にも影響を及ぼし得る。実際、Tyr32 側鎖およびその水和水の構造変化がおきている。

しかし、もう少し丁寧に問題を見直す必要を感じている。実際、研究代表者のグループとの議論の中で、いくつかの可能性が上がってきている。次年度は、これらの検討を進めつつ、State 1 構造への薬剤浸漬による解析を行いたい。

E. 結論

今年度は薬剤浸漬結晶について、HAG 法による構造転移を試みた。残念なことに転移を起こすことはできなかったが、State 2 構造に結合した BZDN の構造が得られ、従来構造に加え新しい情報を得ることができた。

不活性構造への転移については、薬剤化合物を含まない結晶で安定に State 1 構造を作成、維持す