

る方法を確立することが不可欠なことが判明した。
今後はこの方法について、転移原因を究明しつ
つ確立していきたい。

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
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
特記事項なし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	西條長宏 (編集主幹)	がん分子標的治療	メディカルレビュー社	大阪	2015	p92-98

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

Current progress in the development of anti-cancer drugs targeting ras oncogene product

島 扶美¹ / 吉川 陽子² / 松本 篤幸³ / 片岡 徹¹

Fumi Shima Yoko Yoshikawa Shigeyuki Matsumoto Tohru Katoroku

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¹ / 特務助教² / 特命助教³

SUMMARY

Ras/Raf/MEK シグナル伝達系は、正常細胞のみならずがん細胞においても細胞増殖・生存を制御するうえで中心的な役割を果たしている。このシグナル伝達系の異常はヒトのがんの約30%以上において確認されている。MEKの遺伝子突然変異による活性化率が低頻度であるのに対し、Ras, Rafのそれは高頻度であることから、このシグナル伝達系に対する阻害剤として、Ras および Raf の阻害剤の開発が長らく進められてきた。しかし実際には、現在承認されているがん分子標的薬の半数以上がキナーゼ類をターゲットとした阻害剤であることが示すように、Ras/Raf/MEK シグナル伝達系に対する

阻害剤としては、Raf 阻害剤が臨床の現場では中心的な役割を果たしている。一方、Ras 阻害剤の開発については、固形がんに対するファルネシル転移酵素阻害剤 (FTI) の単剤での延命効果が第Ⅲ相臨床試験において思わしくなかったことを受け、近年、世界中のアカデミア、製薬企業などにおいて、FTIとは異なる作用機序をもつ Ras 阻害剤の開発研究が活発化している。本稿では、筆者らが考案した新規 Ras 阻害剤の開発候補物質をはじめ、国内外での Ras 阻害剤開発研究に関する最新の知見を紹介するとともに、Raf 阻害剤が現在抱える問題点についても概説する。

The Ras/Raf/MEK signaling pathway plays a crucial role in controlling cell proliferation and survival not only in normal cells but also in cancer cells. Aberrant activation of this signaling pathway has been observed in over 30% of human cancers. Contrary to the case with MEK, the high incidence of genomic mutations in Ras and Raf has prompted the development of specific inhibitors that target Ras and Raf in recent years. Reflecting the current situation where over 50% of approved molecular-targeted anti-cancer drugs are kinase inhibitors, Raf inhibitors have played a central role in clinically used Ras/Raf/MEK signal inhibitors to date. In terms of development of Ras inhibitors, since monotherapy with farnesyltransferase inhibitors (FTIs) turned out to be ineffective in prolonging survival in cancer patients with solid tumors in Phase III trials, academic institutions and pharmaceutical companies around the world have recently begun vigorous searches for novel classes of Ras inhibitors with different mechanisms of action from FTIs. In this review article, we will summarize the current status, both domestically and overseas, of the development of Ras inhibitors, including one of our own and outline inherent issues with Raf inhibitors.

KEY WORDS

- ◆ Ras
Ras
- ◆ Raf
Raf
- ◆ SBDD
structure-based drug
design (SBDD)

はじめに：抗がん剤開発のターゲットとしての Ras/Raf/MEK シグナル伝達系

ras がん遺伝子産物 Ras は低分子量 G 蛋白質であり、不活性型である GDP 結合型 (Ras-GDP) と活性型である GTP 結合型 (Ras-GTP) を行き来しながら、細胞増殖・分化、細胞運動、細胞死などの重要な機能に関わる細胞内シグナル伝達系を制御する分子スイッチとして機能している (図 1)。GDP 結合型から GTP 結合型への変換は、son of sevenless (Sos) をはじめとするグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor ; GEF) により促進され、逆方向への変換は Ras 自身もつ内因性 GTP

加水分解活性が GTP 加水分解活性化蛋白質 (GTPase-activating protein ; GAP) により促進されることで調節されている¹⁾ (図 1)。Ras にはアミノ酸配列の類似した Rap, Ral, R-Ras や M-Ras などの類縁蛋白質が多数存在し、Ras ファミリーを形成している。哺乳動物では、H-Ras, K-Ras (K-Ras4A, K-Ras4B), N-Ras の 3 つのアイソフォームが存在し、ヒトのがんではそのいずれかの突然変異により GTP 加水分解活性が低下して細胞内で GTP 結合型が優位となり、結果として Ras のシグナル伝達が恒常的に活性化されることになる。ヒトのがんの 20~30% に Ras の突然変異による活性化が認められており、なかでも大腸がん (40%)、膵臓がん (60%) ではきわめて頻度が高い²⁾。また、

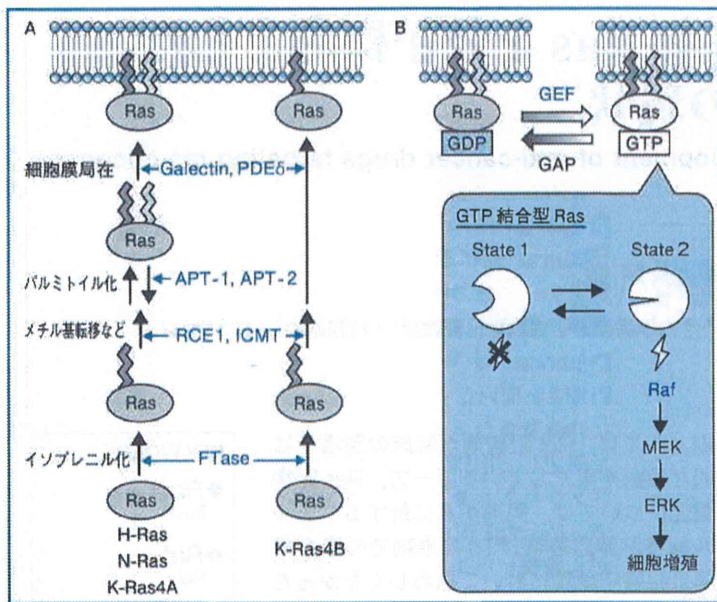


図1 Rasの関与するシグナル伝達系

A: Rasの翻訳後脂質修飾と形質膜への局在化

B: Rasによる下流シグナルの制御機構

Rasのシグナル伝達にはRasの形質膜への局在が必須と考えられている。各アイソフォームにより、膜局在を可能にする翻訳後脂質修飾の種類は若干異なるが、ファルネシル転移酵素 (FTase) によるRasのC末端にあるシステインのファルネシル化は共通かつ必須の脂質修飾であることから、1990年代においては国内外の製薬企業をはじめ多くの研究機関においてFTase阻害剤 (FTI) の開発が進められた。H-Ras, N-Ras, K-Ras4Aではこのファルネシル化に加えパルミトイル化と呼ばれる別の脂質修飾が起こる³⁾。これらの脂質修飾を受けたRasはエスコート蛋白質との結合を介して形質膜に移行し、受容体からのシグナルを受けて活性化し下流にシグナル伝達を行う³⁾ (図1)。

1980年代の終わりにX線結晶構造が決定されて以来、長らくRas自身は分子表面に薬剤が結合可能なポケットを有しない、いわゆる“undruggable target”と考えられてきた。しかし、核磁気共鳴法 (NMR) やX線結晶解析、化合物のスクリーニング技術などの進歩により、2010年以降、Ras-GDP, Ras-GTPのいずれの分子表面にも結合親和性は低いながら低分子化合物が結合可能な比較的小さなポケットが存在することが明らかになってきており、これらのポケット構造情報を利用したstructure-based drug design (SBDD) が最近加速している。

rafがん遺伝子産物Rafはセリン/スレオニンキナーゼであり、前述のRas-GTPとの直接結合により形質膜にリクルートされ活性化されることから、RafはRasの標的蛋白質と呼ばれている。活性化されたRafがMEK (チロシン/

スレオニンキナーゼ) を、MEKがさらに下流のERK (セリン/スレオニンキナーゼ) をリン酸化によって活性化することにより細胞増殖のシグナル伝達を行う (図1)。哺乳動物ではA-Raf, B-Raf, C-Rafなどのアイソフォームが存在するが、ヒトのがんでは、B-Rafの突然変異の頻度が最も高く、C-Rafがこれに次ぐ頻度としてはかなり低い。悪性黒色腫では約50%、甲状腺がんでは約60%にB-Rafの突然変異が確認されている⁴⁾。

がん化との関連が深いRas/Raf/MEKシグナル伝達系において、抗がん剤開発上、RasとRafはきわめて重要な分子標的と考えられるが、臨床の現場ではベムラフェニブなどB-Raf特異的ATP拮抗的キナーゼ阻害剤 (Raf阻害剤) が治療の中心的役割を担ってきた⁵⁾。しかし近年、Raf阻害剤使用中に起こるRafのparadoxical activationなどによる薬剤抵抗性や副作用が問題視されており、これら問題作用へのRasの関与がクローズアップされている⁶⁾⁷⁾。一方、Ras阻害剤開発の流れとしては、国内外で長らく前述のFTIの開発が重点的に進められてきたが、臨床の現場で使用可能な開発成功例は存在しない現状にある。FTIとは全く異なる作用機序を示す阻害剤の開発例としては、Rasの立体構造情報を利用した、標的蛋白質やGEFとRasとの結合阻害剤や、形質膜へのエスコート蛋白質とRasとの結合阻害剤の開発などが最近注目を浴びている。本稿では、Ras阻害剤開発の最新の知見を問題点も含め概説するとともに、Raf阻害剤が抱える問題解決の観点からも、Ras阻害剤の今後の展望を考える。

Ras 阻害剤

これまで開発されてきたRas阻害剤はその作用機序から3つのカテゴリーに分類される。第1はRasの形質膜への局在化阻害剤、第2はRasのGTP化阻害剤、第3はRasと標的蛋白質との結合阻害剤である (表1)。以下にそれぞれの詳細について解説する。

1. Rasの形質膜への局在化阻害剤 (図1A, 表1A)

Rasの膜局在化の阻害剤開発の歴史は、Rasのイソプレニル化の1つであるファルネシル化に関わる①FTaseの阻害剤 (FTI) の開発例にみられるとおりにかなり長い。多くのFTIが固形がん第Ⅲ相臨床試験にまで進んだが、単剤では延命効果が認められなかったことから開発が頓挫している。理由としては、K-RasとN-RasではFTI投与下においてもゲラニルゲラニル化と呼ばれるファルネシル化以外のイソプレニル化が起こり膜局在化を阻害できないこと

表1 Rasの関与するシグナル伝達系を標的とした阻害剤

A. Rasの形質膜への局在化阻害剤		
		文献
FTase阻害	TLN-4601	62)
Galectin阻害	Salirasib	21), 22)
APT-1/2阻害	Palmostatin B, Palmostatin M	18), 20)
PDE δ 阻害	Deltarasin	23)
ICMT阻害	Cysmethynil	12)
B. RasのGTP化阻害剤		
GEF結合阻害	SCH53239	28), 29)
	HBS3	38)
	Andrographolide	35)
	DCAI	32)
	13	33)
	Bisphenol A	34)
K-RasG12C選択的機能阻害	SML-8-73-1, SML-10-70-1	37)
	VSA9, AA12	36)
C. Rasと標的蛋白質との結合阻害剤		
エフェクター結合阻害	Metal-cyclene complexes, Metal-bis(2-picoly) amine complexes	50)~52)
	Antibody fragment	43)
	Sulindac sulfide	60)
	MCP compounds	61)
	Kobe family compounds	54)

や⁸⁾, ファルネシル化を受ける蛋白質が細胞内において多数存在し⁹⁾FTIの作用がRas特異的ではないことなどが挙げられる。FTIについては、現在、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia; AML)など固形がん以外のがんでの臨床試験が進んでおり、第I相臨床試験では一定の効果が報告されている。また、ゲムシタピンなどほかの化学療法剤との併用薬として、固形がんでの臨床試験も進められている¹⁰⁾¹¹⁾。ゲラニルゲラニル化阻害剤については、臨床試験において有意な効果を示す報告は現時点ではない。Rasのファルネシル化には、FTase以外に②プロテアーゼRCE1¹²⁾¹³⁾, メチル基転移酵素(ICMT)¹⁴⁾の関与が知られているが、これらの酵素の阻害剤の細胞活性はFTIには及ばない¹⁵⁾。H-RasとN-Rasの膜局在化はファルネシル化以外に、ゴルジ装置と形質膜との間で行われる可逆的なパルミトイル化反応によっても調節されている。この可逆的パルミトイル化反応に関与する酵素(APT-1, APT-2)の阻害剤も開発されている¹⁶⁾²⁰⁾。しかし、ヒトのがんにおいて最も頻度が高く、パルミトイル化を受けないK-Ras4Bの膜局在化の阻害はこれらの阻害剤では十分には望めない。これを打ち破ろうとして開発されたのがRasの膜局在化を行うエスコート蛋白質の阻害剤である。エスコート蛋白質の

1つである③ galectinの阻害剤 salirasib²¹⁾²²⁾はファルネシルチオサリチル酸(FTS)すなわちファルネシル誘導体であり、ファルネシル基を介するK-Ras4Bと galectinとの結合を競合阻害することで膜局在化を抑制する。Salirasibはすでに臨床試験に進んでおり、第I相、第II相において一定の効果が報告されている²¹⁾²²⁾。また別のエスコート蛋白質④PDE δ の阻害剤 deltarasin²³⁾の開発研究については『Nature』誌においてクローズアップされたことは記憶に新しい。PDE δ は galectin同様、Rasのファルネシル基を認識・結合する比較的大きな疎水性ポケットを有する²⁴⁾。Deltarasinはファルネシル誘導体ではなく、K-Ras4BとPDE δ を用いたALPHA technologyを利用して15万種類の化合物を含むライブラリーからベンズイミダゾール誘導体を同定し、SBDDにより開発された。Deltarasinは、Rasのファルネシル基とPDE δ との結合を特異的に阻害することで、Rasの下流のシグナル伝達を細胞レベルのみならず担がん動物レベルでも効果的に抑制する。しかし最近の研究ではRasファミリーに属するRhebなどほかの低分子量G蛋白質の膜局在化も阻害することが報告されており²⁵⁾、今後、よりRas特異的な誘導体創出のための構造展開が望まれる。

2. RasのGTP化阻害剤(図1B上部, 表1B)

このカテゴリーに属する阻害剤はいずれも開発の初期段階であり臨床試験に入っているものは存在しない。最初に報告されたのは、ATP拮抗的キナーゼ阻害剤と同様の開発コンセプトで行われたGTP拮抗的Ras阻害剤、すなわちGTPアナログの探索である²⁶⁾²⁷⁾。しかし結果的には、GDPより若干高いRasとの結合親和性を示すものが得られただけで、ATPと μ Mオーダーの結合親和性を示すキナーゼの阻害剤開発のケースとは異なり、GTPとpMオーダーの結合親和性を示すRasのGTP拮抗的阻害剤の開発は不成功に終わっている。そこで新たな手法として、RasのGDP/GTP交換反応を阻害することでGTP化を阻害する化合物の探索研究が行われた。初期には、Rasの内因性のGDP/GTP交換活性を阻害する化合物のスクリーニングが行われ、①SCH53239などRas-GDPの分子表面の浅いポケット(ヌクレオチド結合ポケットとは空間的にかなり離れたポケット)に直接結合する化合物が同定された²⁸⁾²⁹⁾。構造展開により、細胞レベルでRasのシグナル伝達阻害を示す誘導体も一部得られたが、作用機序に不明な点が多く構造最適化は進まなかった³⁰⁾³¹⁾。NMRによるフラグメント化合物ライブラリーのスクリーニング技術の進歩により、2010年以降から、Rasのヌクレオチド結合ポケット近傍の疎水性ポケットに結合するフラグメント化合物である②DCAIなどが同定・報告された³²⁾³⁴⁾。これらの化合物は、K-Ras4B-GDPとGEFの1つであるSosとの結合を阻害することにより、RasのGDP/GTP交換反応すなわちGTP化

を抑制し、細胞増殖シグナルを阻害すると考えられている。しかし、Rasとこれらの化合物の結合親和性はきわめて低く、細胞レベルでの明確な阻害メカニズムは証明されていない。K-RasQ61Hの分子表面のmolecular dynamicsに着目し、コンピュータシミュレーションを利用して開発された③ andrographolideとその誘導体³⁵⁾の報告例もあるが、K-RasQ61Hとの結合についてはNMRによる間接的な証明しかなく、細胞内での作用機序についても不明な点が多い。このカテゴリーで注目すべきは、肺がんなどで比較的多いK-RasG12C変異体の12番目のシステインに特異的に共有結合する④ vinyl sulfonamide 9 (VSA9), acrylamide 12(AA12)とその誘導体である³⁶⁾。K-RasG12C変異体に共有結合する化合物としては、GDPアナログとして開発されたSML-8-73-1, SML-10-70-1などの報告³⁷⁾もあるが、これらについてはG12C変異体に対する特異性が低いと考えられている。一方VSA9, AA12は、野生型K-RasではなくK-RasG12C-GDPに特異的に結合してSosによるGDP/GTP交換反応を阻害する。また、ヒトがん細胞株を用いた細胞増殖抑制試験では一定のG12C変異体特異性が確認されている³⁶⁾。しかし、生化学試験と細胞試験で有効活性濃度に乖離が認められることから、細胞内での非特異的作用の存在が否定できない。今後、より特異性の高い誘導体創出のための構造展開が必要と考えられる。また、全く異なる手法で開発された⑤ GDP/GTP交換反応に関わるSosやRasGRF1の部分構造を模倣したペプチド阻害剤³⁸⁾³⁹⁾も報告されているが、細胞レベルでの活性しか示されておらず、ペプチドの細胞内への導入方法を含め課題が多い。

このカテゴリーの阻害剤開発一般にいえることとして、Rasを分子標的とした抗がん剤開発上、Ras-GDPならびにSosを介するRasのGTP化を標的とした阻害剤の開発を第一選択とするには注意が必要である。なぜなら、*ras*の突然変異を有するがん細胞内においては、Rasの顕著なGTP加水分解能の低下により、Ras-GDPに比較してRas-GTPの割合が優位に多くなっているからである。

3. Rasと標的蛋白質との結合阻害剤(図1B下部, 図2, 表1C)

このカテゴリーに属する初期の阻害剤としては①sulindac sulfide⁴⁰⁾⁴²⁾が挙げられる。Sulindacは、RasがRafをはじめとする標的蛋白質を認識するうえで最も重要なswitch I領域に結合し、この領域の構造を安定化することがNMRで確認されている。H-Rasを形質転換したMDCK-F3などにおいて細胞増殖抑制作用を示すことも確認されているが、ヒトがん細胞での活性は示されておらず、構造最適化は進んでいないようである。H-Ras-GTPのswitch I領域を特異

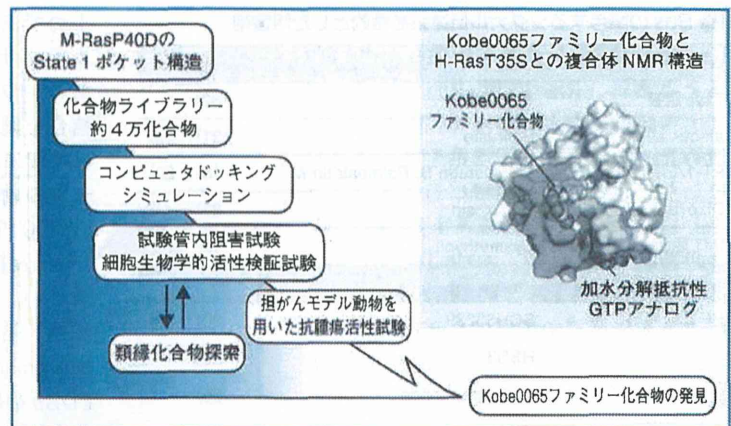


図2 Kobe0065ファミリー化合物の発見と相互作用様式(カラーグラビア p. 6 参照)

的に認識することにより、標的蛋白質との結合を阻害するRas特異的抗体の開発研究も行われている⁴³⁾⁴⁴⁾。これについては、肺がんのトランスジェニックマウスモデルで一定の発がんインシエーションの抑制が確認されている。Yeast two-hybrid法で同定されたMCP化合物は、Ras/Raf結合を阻害することでRas/Raf/MEKシグナル伝達系を阻害し、担がんモデル動物でも抗がん作用が確認されている⁴⁵⁾⁴⁷⁾。RasとRafとの界面を形成するそれぞれの分子のアミノ酸配列情報を利用した、短鎖ペプチドによるRas/Raf結合阻害の研究も行われているが、生化学試験にとどまっておろべき点は少ない⁴⁸⁾⁴⁹⁾。

Ras-GTPには、GTP結合型ながら標的蛋白質と結合できない不活性型であるstate 1構造と、結合できる真の活性型であるstate 2構造の2種類の立体構造が存在する。State 1構造を安定化する阻害剤として②メタルサイクレンなど⁵⁰⁾⁵²⁾が同定された。いずれもstate 1安定化作用は強いが、Ras/Raf結合の阻害作用が弱く、細胞レベルでの阻害活性は全く示されていない。われわれは、このstate 1構造には低分子化合物が結合可能なポケットが存在することを、M-RasのX線結晶解析とNMR解析を通じて世界に先駆けて発見した⁵³⁾。State 1構造の存在はRasに共通の性質であり、M-Rasのポケットに結合して標的蛋白質であるRafとの結合を阻害する物質は、3つのRasのアイソフォームとRafとの結合をも阻害する可能性があることに注目した。H-Ras型アミノ酸変異を導入した変異体M-RasP40Dを用いて、X線結晶解析により高分解能のstate 1ポケット構造を決定し、この構造情報を利用したコンピュータドッキングシミュレーションと細胞生物学的活性検証試験を組み合わせた開発研究を行い、種々のヒトがん細胞株において細胞増殖抑制作用を示すのみならず、担がんモデル動物においても抗がん作用を示す③Kobe0065ファミリー化合物⁵⁴⁾を同定することに成功した(図2)。これらの化合物は、

細胞内においてRas/Raf結合ならびにRas/Raf/MEKシグナル伝達系を阻害するとともに、Ras/PI3K、Ras/RalGDSシグナル伝達系など、がん化に関与する複数のRasのシグナル伝達系を効果的に阻害した。さらに腫瘍組織において、Ras/Raf/MEKシグナル伝達系を阻害することが確認できており、state 1構造を有意にとるH-RasT35Sとの複合体のNMRによる立体構造の決定にも成功している(図2)。現在、SBDDによる構造展開を進めている。

まとめと今後の展望： B-Raf 阻害剤が抱える問題 と Ras 阻害剤の今後の展望

現在臨床で使用可能なRas阻害剤は世界的にみても存在しない。最も早くから開発が進められてきたRasの膜局在化阻害剤のカテゴリーに属するFTIについては、固形がんに対する延命効果が望めないことから、現在は固形がん以外での臨床試験、ほかの化学療法剤との併用薬としての可能性を探る臨床試験が積極的に進められている¹³⁾。このカテゴリーに属する阻害剤としては、近年、Rasのエスコート蛋白質に対する阻害剤が注目されており、galectinを標的とする salirasib については現在臨床試験が行われている。また別のエスコート蛋白質であるPDE δ に対する阻害剤 deltarasin についても、臨床試験には進んでいないものの世界的に注目を浴びている。RasのGTP化阻害剤、Rasと標的蛋白質との結合阻害剤についての最近の傾向として注目すべきは、従来型のハイスループットスクリーニングではなく、Rasの立体構造情報に基づく *in silico*, wet のスクリーニングならびに初期ヒット化合物同定後のSBDDによる構造展開、最適化が積極的に進められている点にある。Rasの立体構造のダイナミックスをも考慮した化合物スクリーニングならびに医薬品のデザインが、今後ますます進んでいくことが予想される。

Ras/Raf/MEKシグナル伝達系の阻害剤として早くから臨床の現場で使用されてきたベムラフェニブ、dabrafenibなどのRaf阻害剤(B-Raf阻害剤)について、近年、適応がん腫の1つである悪性黒色腫の治療の経過中、Rafのparadoxical activation、血小板由来増殖因子(PDGF)、インスリン様成長因子(IGF)などの上皮成長因子(EGF)以外の受容体型チロシンキナーゼ(RTK)を介するRasの下流のシグナル伝達系の活性化、COT(セリン/スレオニンキナーゼ)によるMEK/ERKの活性化などにより、投与後比較的早期に現れる薬剤抵抗性、上皮系がんの増悪、皮膚がん(基底細胞がん、扁平上皮がん)の発症など副作用の問題が指

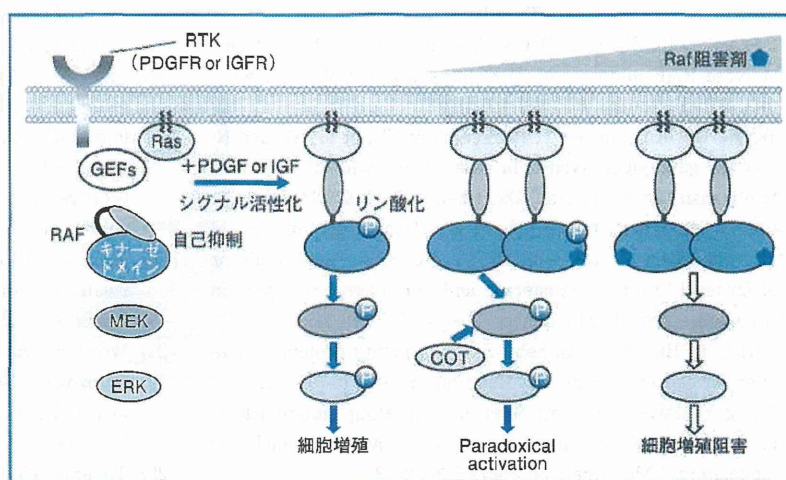


図3 Raf阻害剤による薬剤抵抗性と副作用のメカニズム

摘されている(図3)。特にRasに活性型変異をもつ悪性黒色腫、野生型Rafを有する悪性黒色腫にB-Raf阻害剤を投与したケースに多い。Rafのparadoxical activationには、Rafの二量体形成によるRafの活性化が関与しており、二量体中に含まれるRafに化合物が結合していない場合には、下流のMEK以下のシグナルが活性化してしまう。このRafの二量体の形成に活性型変異を有するRasが深く関与している⁵⁵⁾⁻⁵⁷⁾。悪性黒色腫の場合には、RTKからのシグナルがさほど優位ではなく、MEK阻害剤との併用でこの問題を回避することができるが、甲状腺がん、大腸がんなど、もともとRaf/MEK以下のシグナル伝達より、上流のRTKからのシグナル伝達が優位ながん腫では、B-Raf阻害剤の効果が弱いうえに、上記の問題が深刻化する傾向にある⁵⁸⁾⁻⁵⁹⁾。このようなB-Raf阻害剤のもつ問題を解決するためにも、臨床の現場で使用可能なRas阻害剤の開発は急務であり、今後、開発のさらなる加速が必要と考えられる。

文献

- 1) Cherfilis J, Zeghouf M : Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 93 : 269-309, 2013
- 2) Prior IA, Lewis PD, Mattos C : Comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 72 : 2457-2467, 2012
- 3) Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, et al : Regulating the regulator ; post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 : 39-51, 2012
- 4) Davies H, Bignell GR, Cox C, et al : Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 417 : 949-954, 2002
- 5) Tsai J, Lee JT, Wang W, et al : Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 : 3041-3046, 2008
- 6) Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al : RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance

- growth. *Nature* **464** : 431-435, 2010
- 7) Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, et al : RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* **464** : 427-430, 2010
 - 8) Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, et al : K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* **272** : 14459-14464, 1997
 - 9) Lobell RB, Liu D, Buser CA, et al : Preclinical and clinical pharmacodynamic assessment of L-778, 123, a dual inhibitor of farnesyl : protein transferase and geranylgeranyl : protein transferase type- I. *Mol Cancer Ther* **1** : 747-758, 2002
 - 10) Berndt N, Hamilton AD, Sebt SM : Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11** : 775-791, 2011
 - 11) Wang Y, Kaiser CE, Freit B, et al : Targeting mutant KRAS for anticancer therapeutics : a review of novel small molecule modulators. *J Med Chem* **56** : 5219-5230, 2013
 - 12) Winter-Vann AM, Casey PJ : Opinion : post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **5** : 405-412, 2005
 - 13) Go ML, Leow JL, Gorla SK, et al : Amino derivatives of indole as potent inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase. *J Med Chem* **53** : 6838-6850, 2010
 - 14) Wahlstrom AM, Cutts BA, Liu M, et al : Inactivating Icm1 ameliorates K-RAS-induced myeloproliferative disease. *Blood* **112** : 1357-1365, 2008
 - 15) Baines AT, Xu D, Der CJ : Inhibition of Ras for cancer treatment : the search continues. *Future Med Chem* **3** : 1787-1808, 2011
 - 16) Rocks O, Peyker A, Bastiaens PI : Spatio-temporal segregation of Ras signals : one ship, three anchors, many harbors. *Curr Opin Cell Biol* **18** : 351-357, 2006
 - 17) Rocks O, Gerauer M, Vartak N, et al : The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell* **141** : 458-471, 2010
 - 18) Dekker FJ, Rocks O, Vartak N, et al : Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat Chem Biol* **6** : 449-456, 2010
 - 19) Rusch M, Zimmermann TJ, Bürger M, et al : Identification of acyl protein thioesterases 1 and 2 as the cellular targets of the Ras-signaling modulators palmostatin B and M. *Angew Chem Int Ed Engl* **50** : 9838-9842, 2011
 - 20) Hedberg C, Dekker FJ, Rusch M, et al : Development of highly potent inhibitors of the Ras-targeting human acyl protein thioesterases based on substrate similarity design. *Angew Chem Int Ed Engl* **50** : 9832-9837, 2011
 - 21) Riely GJ, Johnson ML, Medina C, et al : A phase II trial of salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations. *J Thorac Oncol* **6** : 1435-1437, 2011
 - 22) Laheru D, Shah P, Rajeshkumar NV, et al : Integrated preclinical and clinical development of S-*trans*, *trans*-farnesylthiosalicylic acid (FTS, Salirasib) in pancreatic cancer. *Invest New Drugs* **30** : 2391-2399, 2012
 - 23) Zimmermann G, Papke B, Ismail S, et al : Small molecule inhibition of the KRAS-PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* **497** : 638-642, 2013
 - 24) Chandra A, Grecco HE, Pisupati V, et al : The GDI-like solubilizing factor PDE δ sustains the spatial organization and signaling of Ras family proteins. *Nat Cell Biol* **14** : 148-158, 2012
 - 25) Ismail SA, Chen YX, Rusinova A, et al : Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo. *Nat Chem Biol* **7** : 942-949, 2011
 - 26) Noonan T, Brown N, Dudycz L, et al : Interaction of GTP derivatives with cellular and oncogenic ras-p21 proteins. *J Med Chem* **34** : 1302-1307, 1991
 - 27) Wolin R, Wang D, Kelly J, et al : Synthesis and evaluation of pyrazolo[3, 4-*b*]quinoline ribofuranosides and their derivatives as inhibitors of oncogenic Ras. *Bioorg Med Chem Lett* **6** : 195-200, 1996
 - 28) Taveras AG, Remiszewski SW, Doll RJ, et al : Ras oncoprotein inhibitors : the discovery of potent, ras nucleotide exchange inhibitors and the structural determination of a drug-protein complex. *Bioorg Med Chem* **5** : 125-133, 1997
 - 29) Ganguly AK, Wang YS, Pramanik BN, et al : Interaction of a novel GDP exchange inhibitor with the Ras protein. *Biochemistry* **37** : 15631-15637, 1998
 - 30) Peri F, Airoidi C, Colombo S, et al : Design, synthesis and biological evaluation of sugar-derived Ras inhibitors. *ChemBiochem* **6** : 1839-1848, 2005
 - 31) Sacco E, Abraham SJ, Palmioli A, et al : Binding properties and biological characterization of new sugar-derived Ras ligands. *Med Chem Commun* **2** : 396-401, 2011
 - 32) Maurer T, Garrenton LS, Oh A, 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** : 5299-5304, 2012
 - 33) Sun Q, Burke JP, Phan J, et al : Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. *Angew Chem Int Ed Engl* **51** : 6140-6143, 2012
 - 34) Schöpel M, Jockers KF, Dümpe PM, et al : Bisphenol A binds to Ras proteins and competes with guanine nucleotide exchange : implications for GTPase-selective antagonists. *J Med Chem* **56** : 9664-9672, 2013
 - 35) Hocker HJ, Cho KJ, Chen CY, et al : Andrographolide derivatives inhibit guanine nucleotide exchange and abrogate oncogenic Ras function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** : 10201-10206, 2013
 - 36) Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al : K-Ras(G12C)inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* **503** : 548-551, 2013
 - 37) Lim SM, Westover KD, Ficarro SB, et al : Therapeutic Targeting of Oncogenic K-Ras by a Covalent Catalytic Site Inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl* **53** : 199-204, 2014
 - 38) Patgiri A, Yadav KK, Arora PS, et al : An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction. *Nat Chem Biol* **7** : 585-587, 2011
 - 39) Sacco E, Metalli D, Spinelli M, et al : Novel RasGRF1-derived Tat-fused peptides inhibiting Ras-dependent proliferation and

- migration in mouse and human cancer cells. *Biotechnol Adv* 30 : 233-243, 2012
- 40) Herrmann C, Block C, Geisen C, et al : Sulindac sulfide inhibits Ras signaling. *Oncogene* 17 : 1769-1776, 1998
 - 41) Müller O, Gourzoulidou E, Carpintero M, et al : Identification of potent Ras signaling inhibitors by pathway-selective phenotype-based screening. *Angew Chem Int Ed Engl* 43 : 450-454, 2004
 - 42) Waldmann H, Karaguni IM, Carpintero M, et al : Sulindac-derived Ras pathway inhibitors target the Ras-Raf interaction and downstream effectors in the Ras pathway. *Angew Chem Int Ed Engl* 43 : 454-458, 2004
 - 43) Tanaka T, Williams RL, Rabbitts TH : Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J* 26 : 3250-3259, 2007
 - 44) Tanaka T, Rabbitts TH : Interfering with RAS-effector protein interactions prevent RAS-dependent tumour initiation and causes stop-start control of cancer growth. *Oncogene* 29 : 6064-6070, 2010
 - 45) Kato-Stankiewicz J, Hakimi I, Zhi G, et al : Inhibitors of Ras/Raf-1 interaction identified by two-hybrid screening revert Ras-dependent transformation phenotypes in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 14398-14403, 2002
 - 46) Lu Y, Sakamuri S, Chen QZ, et al : Solution phase parallel synthesis and evaluation of MAPK inhibitory activities of close structural analogues of a Ras pathway modulator. *Bioorg Med Chem Lett* 14 : 3957-3962, 2004
 - 47) Skobeleva N, Menon S, Weber L, et al : *In vitro* and *in vivo* synergy of MCP compounds with mitogen-activated protein kinase pathway- and microtubule-targeting inhibitors. *Mol Cancer Ther* 6 : 898-906, 2007
 - 48) Barnard D, Sun H, Baker L, et al : *In vitro* inhibition of Ras-Raf association by short peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 247 : 176-180, 1998
 - 49) Wu X, Upadhyaya P, Villalona-Calero MA, et al : Inhibition of Ras-effector interactions by cyclic peptides. *Medchemcomm* 4 : 378-382, 2013
 - 50) Spoerner M, Graf T, König B, et al : A novel mechanism for the modulation of the Ras-effector interaction by small molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 334 : 709-713, 2005
 - 51) Rosnizeck IC, Graf T, Spoerner M, et al : Stabilizing a weak binding state for effectors in the human Ras protein by cyclen complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* 49 : 3830-3833, 2010
 - 52) Rosnizeck IC, Spoerner M, Harsch T, et al : Metal-bis(2-picolylo)amine complexes as state 1(T)inhibitors of activated Ras protein. *Angew Chem Int Ed Engl* 51 : 10647-10651, 2012
 - 53) Ye M, Shima F, Muraoka S, et al : Crystal structure of M-Ras reveals a GTP-bound "off" state conformation of Ras family small GTPases. *J Biol Chem* 280 : 31267-31275, 2005
 - 54) Shima F, Yoshikawa Y, Ye M, et al : *In silico* discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 : 8182-8187, 2013
 - 55) Holderfield M, Merritt H, Chan J, et al : RAF inhibitors activate the MAPK pathway by relieving inhibitory autophosphorylation. *Cancer Cell* 23 : 594-602, 2013
 - 56) Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al : RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464 : 431-435, 2010
 - 57) Doma E, Rupp C, Varga A, et al : Skin tumorigenesis stimulated by Raf inhibitors relies upon Raf functions that are dependent and independent of ERK. *Cancer Res* 73 : 6926-6937, 2013
 - 58) Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, et al : EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov* 2 : 227-235, 2012
 - 59) Prahallad A, Sun C, Huang S, et al : Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E)inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483 : 100-103, 2012
 - 60) Pasricha PJ, Bedi A, O'Connor K, et al : The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 109 : 994-998, 1995
 - 61) González-Pérez V, Reiner DJ, Alan JK, et al : Genetic and functional characterization of putative Ras/Raf interaction inhibitors in *C. elegans* and mammalian cells. *J Mol Signal* 5 : 2, 2010
 - 62) Campbell PM, Boufaied N, Fiordalisi JJ, et al : TLN-4601 suppresses growth and induces apoptosis of pancreatic carcinoma cells through inhibition of Ras-ERK MAPK signaling. *J Mol Signal* 5 : 18, 2010

