

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。＜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。

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。

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。

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。

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。

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

3ヘリックス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と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

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ソチアゾリジン誘導体

発明者：片岡徹、島扶美、閨正博、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