

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片岡 徹

平成26年(2014)5月

目 次

. 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
---	---------

. 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に関する研究 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

. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 17
------------------	----------

. 研究成果の刊行物・別刷

<別刷 1>

<i>In silico</i> discovery of novel small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction.	----- 18
--	----------

<別刷 2>

Discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by interfering with Ras•GTP-effector interaction.	----- 33
---	----------

<別刷 3>

<i>ras</i> 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	----- 57
--	----------

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、本格的な前臨床試験に入る候補品を創出する（後行開発）。H25 年度、先行開発では、保有リード化合物（KMR084 ならびにその誘導体）に関する特許（WO2012/153775 A1）の実施権許諾契約を提携した国内大手製薬企業との協力型共同研究契約下において、前年度に引き続きフラグメントリンク法を活用したリード化合物の構造展開を実施した。個体レベルでシード化合物 KMR084 を凌ぐ Ras 機能の阻害活性を示す誘導体 K18781 の同定に成功した。この誘導体は腫瘍組織において Ras/Raf シグナル伝達系を有意に阻害したが、担がん動物レベルで濃度依存性の抗がん作用の増強が認められなかったことから、吸収・代謝安定性の改善が必要と考えられた。KMR084 の部分構造からなるフラグメント化合物などを用いた NMR 解析を通じて、Ras と化合物との複合体の結晶作成が困難な場合にも、化合物と Ras との相互作用の NMR 情報とシミュレーションとを組み合わせることにより、シードならびにリード化合物の効率的な構造展開（構造デザイン）を可能にするシステム基盤を構築した。後行開発では、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運動性に関する知見が得られた。また、バックアップリードを創出するために H24 年度の新規スクリーニングで選抜したシード化合物の中から、Kobe0065 に構造類似性を示す化合物を選択し、保有シード化合物 Kobe0065 とともにフラグメントリンク法による構造展開を実施したが、Kobe0065 を上回る活性を示す誘導体の創出には至らなかった。活性改善に至らなかった理由の一つとして、薬剤結合ポケット構造の運動性に由来する誘導体の安定結合の阻害が考えられた。この結果を踏まえ、今後の構造展開においては、ポケットの運動性をも加味した構造展開を進めることが望ましいと判断された。また本研究により、保有シード化合物 Kobe0065 には個体レベルで腫瘍増殖抑制作用のみならず、市販薬 sorafenib には認められない抗がん作用としてがん転移抑制作用が確認され、Lysyl Oxidase の発現抑制を介する化合物のがん転移抑制の分子メカニズムの一端が明らかになった。がんの転移は患者の生命予後を大きく作用する主要要素であり、その分子メカニズムの解明は、抗がん剤開発上極めて重要な課題である。よって本研究開発を通じて、Ras を介するがん転移の分子メカニズムの詳細が解明されれば、Ras 阻害剤の新たな用途が切り開かれる可能性がある。

Kobe0065 とその誘導体に関する研究成果の米国科学アカデミー紀要への掲載（研究成果の刊行物・別刷 1）ならびに *Nature Reviews Cancer* での同研究成果のハイライト（2013 *Nature Reviews Cancer* 13, 381）の公開に伴い、著書などの執筆（Kobe0065 とその誘導体に関する研究成果の米国科学アカデミー紀要への掲載（研究成果の刊行物・別刷 2, 3）、招待講演（学会発表の項参照）などの依頼を国内外から多数受ける結果となった（研究発表の項参照）。

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・准教授
閨 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・利用研究促進部門・構 造生物グループ・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關与する。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。

H25年度、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の理論的構造展開・最適化を前年度に引き続き重点的に行う。構造展開・最適化に際しては、X線結晶解析ならびにNMR解析による化合物とRasとの結合情報を利用し、フラグメントリンク法により実施する (先行開発)。またRasの新規ポケット構造情報を利用した、リード化合物の効率的な初期構造展開のシステム構築

を行うとともに、H25年4月に米国科学アカデミー紀要に発表したリード化合物Kobe0065の、フラグメントリンク法による構造展開についても実施する。さらには、新たに確認されたKobe0065のがん転移抑制作用の分子メカニズムの解明も行う。(後行開発)。

独自の方法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・信頼してかけられ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によるリード化合物の構造最適化

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-RasG12V) 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。

のマウス培養細胞を用いて、誘導体の細胞内での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確認した。

の試験で活性が強かった誘導体については、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誘導体を腹腔内投与し、腫瘍増殖抑制効果を評価した。

新規誘導体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の阻害効果を評価した。

2) リード化合物の構造最適化の効率化のためのRasと化合物との複合体構造情報の収集

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法による構造解析を行った。

後行開発

1) Rasの薬剤結合ポケットの運動性の解析

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運動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、さらに複数の温湿度条件下にてX線結晶解析を行った。

NMR解析によっても同様のポケット構造の運動性についての詳細な解析を行った。

2) 保有リード化合物の構造展開：

保有ヒット化合物Kobe0065をリード化合物とし、フラグメントリンク法を利用して新規誘導体をデザイン・合成し、生化学・細胞生物学的Ras阻害活性を評価した。

Rasの新規ポケット構造情報を利用して、インシリコスクリーニングと*in vitro*のアッセイによりH24年度までに選抜した新規ヒット化合物について構造分類を行い、合成法、特許既知情報・市販類似化合物の調査の後、活性データ、物性(特に水溶性)と合成展開性のバランスの良好な3種類をリード化合物として選抜した。

の選抜リード化合物の中で、保有リードKobe0065との構造類似性が最も高かったKBFM561に着目し、有機化学合成専門家の見知から新規誘導体をデザイン・合成を実施し、生化学・細胞生物学的Ras阻害活性を評価した。

3) 保有リード化合物Kobe0065のがん転移抑制作用の解析

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ヌードマウスにKobe0065を経口投与し、腫瘍細胞の肺転移抑制作用を評価した。

Kobe0065のがん転移関連分子LOX (Lysyl Oxidase) 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2次元(2D)、3次元(3D)培養システムを用いて、LOXのmRNA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

1) フラグメントリンク法によるリード化合物の構造最適化

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課題を確認した。

・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。

2) リード化合物の構造最適化の効率化のためのRasと化合物との複合体構造情報の収集

KMR084の構造展開に有用なフラグメント誘導体のRas結合情報とその利用：

・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ならびに、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¹H-¹⁵N 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互いに近接するものの異なることが明らかになり、今度の構造展開に必須の新たな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¹H-¹⁵N 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設計が可能になった。

後行開発

1) Rasの薬剤結合ポケットの運動性の解析

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のポケット構造の運動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示唆された。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言える。

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な

どに対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抑制する作用を示すことが確認された。

2) 保有シード化合物の構造展開

シード化合物Kobe0065の構造展開:

・フラグメントリンク法ならびにMOE (蛋白質などの構造予測・解析システム) を活用してデザインし、有機化学合成を行った9種類の新規誘導体のうち、細胞試験において顕著な腫瘍細胞増殖抑制作用を示した化合物NKB23について、担がん (大腸がん: SW480) モデルマウスでの抗がん作用 (腹腔内投与) を評価した結果、腫瘍増殖抑制作用はシード化合物と同等であることが確認された。ただし、フラグメントリンク後のMOEでの化合物結合予測の順位と、*in vitro*の活性順位は必ずしも一致しない結果となった。

・Kobe0065の有するチオセミカルバジド構造の等価変換を目的として、保有する構造活性相関データならびにフラグメントリンク法の知見を活用し、新たに8種類の誘導体を合成して活性評価を行ったが、いずれの誘導体もRas-Raf結合阻害試験において大幅な活性低下を示す結果となった。

シード化合物KBFM561の構造展開:

・前年度までに実施した新規スクリーニングにより選抜した新たなヒット化合物について、構造分類を行い、合成法、特許既知情報・市販類似化合物の調査の後、活性データ、物性 (水溶性) と合成展開性のバランスの良かった3種類 (KBFM561, KBFM492, KBFM580) をシード候補化合物として選抜した。

・この中で、既保有シード化合物Kobe0065と構造類似性 (チオセミカルバジド構造) の高いKBFM561に着目し、物性 (溶解度) の改善目的で新規誘導体を5種類デザイン・合成した。そのうち2種類については溶解度 (物性) の改善は認められたものの、有意なRas-Raf結合阻害活性は認められなかった。

3) 保有シード化合物Kobe0065のがん転移抑制作用の解析

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Kobe0

065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投与ならびにK-Rasの発現抑制による遊走の抑制は認められなかったことから、Kobe0065が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へのシグナル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の濃度依存性の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。これらの結果から、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が示唆された。

D. 考察

・フラグメントリンク法の活用により、先行研究において、個体レベルでリード化合物KMR084を凌ぐRas機能の阻害活性を示す誘導体K18781の同定に成功した。この誘導体は腫瘍組織においてRas/Rafシグナル伝達系を有意に阻害したが、担がん動物レベルで濃度依存性の抗がん作用の増強が認められなかったことから、吸収・代謝安定性の問題を改善する必要があると考えられた。・またフラグメントリンク法でデザインした誘導体については、先行研究、後行研究いずれのケースでも、化合物とRasとの理論上の結合エネルギー

の順位と実験上の活性順位とが必ずしも一致していなかったことから、出発化合物に新たに付与したフラグメント部分構造がRas上の予測結合部位と確実に相互作用をしていない可能性が示唆された。HAG法を利用したX線結晶解析で明らかになった、Rasの薬剤結合ポケットの構造ダイナミクスに関する知見は、この結合エネルギーの予測値と実測値の乖離を積極的に指示していた。従って今後の構造展開・最適化では、ポケット構造の運動性をも加味した新規誘導体のデザインが望ましいと判断された。

・X線結晶解析が困難な場合にも、フラグメント化合物とRasとの相互作用のNMR情報とシミュレーションとを組み合わせることで、リードならびにリード化合物の理論的かつ効率的な化合物の構造設を可能にするシステム基盤を構築した。・本年度、有機合成化学の専門家による、保有リード化合物Kobe0065のチオセミカルバジド構造に変わり得る新たな母核構造の探索を行ったが、現時点ではポテンシャルが低いことが確認され、今後の本構造展開については中止することが妥当と判断された。

・Kobe0065以外の3種類の保有リード化合物のうち、Kobe0065に部分構造が類似したKBFM561に着目し初期構造展開を実施したが、有意な活性は確認できなかった。2つ目のヒットであるKBFM492シリーズについても今後、誘導体の合成を実施し、物性・活性の改善を目指す予定である。

・保有リード化合物Kobe0065には、市販薬のsorafenibには認められない、がん転移抑制作用があることが確認され、本年度その分子メカニズムの一端が明らかになり、研究成果を学会報告した。

・Kobe0065とその誘導体に関する研究成果の公開に伴い、著書などの執筆、招待講演など、国内外から多数の依頼を受けた。

E. 結論

Ras阻害剤の開発は、Rasの立体構造が解明されてから25年近く経過しても、世界的に未だ開発成功例のない現状にあり、抗がん剤開発の歴史の中では最も難易度の高い課題の1つとして位置づけられている。米国では昨年度より、米国国立がん研究所を中心に、メガファーマ、複数の大学・研究機関などが参画する、Ras阻害剤開発の国家プロジェクトが立ち上がり、研究開発が世界的に加速している。本研究ではH23年度より、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上回る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である。我々が保有するシード化合物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、がん転移抑制作用が確認された。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。

F.健康危険情報

特記事項なし

G.研究発表

1.論文発表

Shima, F., Yoshikawa, Y., Ye, M., Araki, M., Matsumoto, S., Liao, J., Hu, L., Sugimoto, T., Ijiri, Y., Takeda, A., Nishiyama, Y., Sato, C., Murakami, 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 antitumor 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

片岡 徹 分子標的がん治療薬のインシリコ創薬、第5回スーパーコンピュータ「京」と創薬・医療の産学連携セミナー（HPCI計算生命科学推進プログラム）、グランフロント大阪ナレッジキャピタル（大阪）、2013年10月2日（招待講演）

Osamu Takano, Yoko Yoshikawa, Fumi Shima, Toru 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

片岡 徹 Ras シグナル伝達系を標的とした抗がん剤の開発、MEET 医学研究コロキウム・1 - がんの分子標的治療を考える -（大阪大学産学連携プロジェクト MEET）（大阪大学大学院医学研究科）2013年10月7日（招待講演）

片岡 徹 *ras* がん遺伝子産物の分子標的薬のインシリコ創薬、平成 25 年度臨床研究総合センターシンポジウム～がん治療最前線：ゲノム創薬と免疫治療～（千葉県がんセンター）2013年12月7日（招待講演）

片岡 徹 *ras* がん遺伝子産物を分子標的としたがん治療薬のインシリコ創薬、神戸医療産業都市クラスター交流会「放射光を用いた革新的創薬研究の展開」（神戸市）2014年1月23日（招待講演）

Kataoka, T. *In silico* development of anti-cancer drugs targeting Ras oncoproteins. University of Washington-Kobe University Joint Symposium on Membrane Biology. (Seattle, USA) March 28, 2014（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

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし

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¹H-¹⁵N 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¹H-¹⁵N 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

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 閻 正博（神戸天然物化学株式会社 創薬化学部 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構造情報を用いたインシリコ及び生化学・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。さらに特許の強化を目的にフラグメントリンク法からの合成展開を加え2012年に国際出願（国際出願番号 PTC/JP2012/061908）を完了し、国内大手製薬企業へ特許実施権許諾契約を締結した。本研究では先行開発研究としてリード化合物の構造最適化研究を導出先製薬企業が実施することを研究目標とし、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スクリーニング（コンピュータ・ドッキングシミュレーションと生化学・細胞学的活性評価）により先行開発化合物とは構造の異なるリード化合物をバックアップリードとして見出し非臨床候補化合物を創出することを研究目標として設定した。本年度は既保有ヒット化合物および新たなインシリコスクリーニングより見出されたリード化合物からの構造展開を実施し新たなリード候補化合物の創製を進めている。

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（リード最適化シミュレーション）は本化合物を含む特許の実施権を許諾した国内製薬企業と神戸大学が実施し、開発候補化合物の早期創製を目的とする合成展開を実施する。保有リード化合物からの化合物のデザインと合成は製薬企業が実施することから、我々の分担研究機関では後行開発を実施する。

後行開発

後行開発では保有リード化合物 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) 出願済み特許（PCT/JP2010/61821, PCT/JP2012/052078）に記載されている新規ポケット構造に基づく大規模インシリコドッキングシミュレーション（H23, 24年度）から得られるインシリコヒット化合物より生化学・細胞学的活性が確認された化合物を選抜し、構造展開によるバリデーションを行い、母核構造の異なる新規リード候補化合物の可能性を検証し創製する。

2) 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 を基に、フラグメントリンク法並びにMOEを利用して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の可能性を検証し創製する。

B．研究方法

後行開発

1) 神戸大学で既に出願された新規ポケット構造情報に基づき大規模インシリコドッキングシミュレーションを実施した。対象となる市販化合物ライブラリーはフラグメントエボリューションを目的とする比較的分子量の化合物ライブラリーと分子量にはこだわらないドラッグライクなライブラリーとした。得られたインシリコヒット化合物は生化学・細胞学的活性評価により絞り込みを実施し、それらを構造分類後、合成法、特許既知情報・市販類似化合物の調査を行うと共に、活性データと溶解性など物性データも加味して構造展開性を総合的に解析する。構造展開の可能性が認められたヒット化合物から新たな化合物デザインと合成を行い、生化学・細胞学的活性評価を実施し、新規性のあるリード候補化合物へと導く。

2) 神戸大学で既に見出されている Kobe0065 など既に保有するチオセミカルバジド系ヒット化合物については、これまでに得られているフラグメントリンク手法を応用したデザインや MOE を利用しデザインを行い、構造の展開性を検証する。また、チオセミカルバジド構造を回避する目的でデザインした母核構造の新規等価変換体について見極めを行う。合成する誘導体はこれまで得られている構造活性相関や計算科学的な手法も取り入れた合理的なデザインを行う。

(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

後行開発

1) ドラッグライクな化合物ライブラリーからインシリコスクリーニングによって見いだされたヒット化合物についてRas阻害活性評価を実施した結果、低い水溶性のため結合阻害活性の評価は困難であったが、細胞系の活性評価系で阻害活性を示す化合物が19種類見出された。そこで、これらの化合物の物性(水溶性)の改善を目的に、積極的に優先度の高い7種の化合物を選択し、これらを初期化合物としてStarDropNovaを用いて水溶性の改善が期待できる誘導体構造を複数発生させた。さらに、その中から構造展開性より選抜した化合物について結合自由エネルギーを計算することにより、物性、構造展開性、阻害活性の改善を合わせ持つ化合物群3シリーズ(KBFM561、KBFM492、KBFM580)を得た。これら3シリーズの中から、既保有ヒットKobe0065(チオセミカルバジド構造)と構造類似性の高いKBFM561シリーズにまず着目し、新規誘導体5化合物(NKB038-042)をデザイン・合成した。その結果、2化合物については物性の改善は認められたものの、結合阻害活性では有意な活性は認められなかった。2つ目のヒットであるKBFM492シリーズについても現在誘導体の合成を実施中であり、物性の改善と結合活性の評価により検証を進める予定である。

2) 既保有ヒット化合物からの展開については、*in vitro*と*in vivo*の評価で共に先行開発化合物KMR084と同様に活性が明らかにされているチオセミカルバジド系化合物の構造展開性を再度検討した。まず、チオセミカルバジド構造を保持した上で、これまでの構造活性相関やフラグメントリンク法で得られた知見を活用しデザインした9化合物(NKB002, 005, 20-29)を合成した。その結果、フラグメントリンク法を応用したKNB023は、既存ヒット化合物Kobe0065を結合阻害活性と細胞系評価において共に同等以上の活性を示し、さらに担癌モデルマウス(腹腔内投与)での抗癌作用においても同等の腫瘍増殖抑制作用を示した。一方、さらにRasの特定残基との水素結合形成による活性向上を目的にデザインしたNKB024(塩基性基の導入)やNKB028(フラグメントの伸長と塩基性基の導入)は結合阻害活性において大幅な低下が認められた。このことは今回導入したフラグメントリンクがドッキングシミュレーションから予測したRas結合部位に配置できていないことを示唆した。

また、チオセミカルバジド構造の等価変換を目的とする新規母核誘導体の可能性を検証するために、これまで得られている構造活性相関やフラグメントリンク法の知見を活用した誘導体を主に合成した。新たに8化合物(NKB030-037)を加えた計27化合物をデザインし合成したが、いずれの化合物も結合阻害試験で活性の大幅な低下が認められた。今回、チオセミカルバジド構造に変わり得る母核構造としてはポテンシャルは低いことが確認されたことから、今後の本構造展開は中止することとした。

D. 考察

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、計算科学的手法によるインシリコスクリーニングヒットからの展開や既保有ヒットからの創薬化学的手法による展開など複数のアプローチを検討し実施している。ドラッグライクである程度の分子量を持つライブラリーから得られたヒット化合物からの誘導体展開については、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っていない。そこで現在、既存ヒット化合物Kobe0065のチオセミカルバジド構造と母核構造の等価性が期待できるKBFM492シリーズの合成展開の可能性を見極めるため、既存ヒット化合物の構造活性相関の活用と水に対する溶解性向上を考慮に入れた誘導体合成を進め、結合阻害活性の確認を実施する予定である。

また、セミカルバジド構造の回避を目的とした本年度検討した等価変換体構造では活性の維持向上は認められなかった。セミカルバジド構造には2つのアミド結合があり、それぞれのシス、トランス異性体から4種の幾何異性体の存在が考えられる。今後、それぞれ配座を安定させるために修飾を加えた類縁体をデザイン合成し、結合活性への影響を確認する。

さらに、既保有ヒットからのフラグメントリンク法を活用した合成展開では新規なポケット構造情報とRas結合部位情報を再度見直すと共にその結合シミュレーション解析を加えることでデザインの精度を向上させていきたい。

E. 結論

インシリコスクリーニングから選択された化合物については生化学・細胞学的活性データ、物性(溶解性)、合成法、既知特許情報に加えて標的蛋白質Rasとの理論計算科学的な解析など様々な視点からデザイン・合成・評価を進めているが、難易度が高く先行開発で進めているリード化合物KMR084と構造の異なる新規リード化合物を得るには

至っていない。考察に記したKBFM492シリーズ化合物からの展開、セミカルバジド構造のフラグメントリンク法から新たに見出したNKB023からの展開も含め、ポケット構造情報に基づく計算科学による合理的なアプローチにより、ツルヒットを見極め、リード候補化合物の早期創製を目指す。

G．研究発表

1．論文発表

無

2．学会発表

無

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ソ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

2．実用新案登録

無

3．その他

無

分担研究報告書

*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 （氏名）熊坂 崇 （所属機関名 職名）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21kDa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。

不活性なRasはGDPと結合しているが、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）によりGTPと交換されると活性化する。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、培養癌細胞レベルおよび担癌モデル動物においても抗癌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が明らかとなった。

今年度は、薬剤ターゲット分子となるState 1構造を有する結晶を作り出す方法を確立することを目的とし、この変化をより詳細に解明するため、種々の条件を変化させつつ実験を行った。具体的には、野生型H-Ras R32型結晶を、HAG法にてマウントし、結晶格子の変化を誘起する。回折強度データは大型放射光施設SPring-8のBL41XUあるいはBL38B1にて測定し、解析計算を実施して、最終構造を得た。

さらに、リード化合物の誘導体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ありません。

C．研究結果

SPring-8 BL38B1にて、2013年7月10日、12月6日のビームタイムを利用し、天然型H-RasのR32型結晶より、HAG法を用いた測定を行った。最終的に計8セットのデータを測定した。

コーティング剤の条件を検討して複数回実験を

行った結果、常に一定の湿度で格子定数の変化が見られた。この試料から得られた回折データに基づく分子構造は、昨年度に得られた構造と基本的に同じであり、構造の転移を再現性良く誘起する条件を見出したといえる。

また、転移現象をより詳細に調べるため、0.1% RH程度のステップで湿度を変化させて、格子定数の変化を追跡した。その結果、当初想像していた湿度の変化に対する格子変化の可逆性はなく、不可逆的であり、一旦State 1構造に変化すると、湿度を上昇させても、State 2構造に戻ることはなかった。したがって、この結晶系においては、むしろState 1構造のほうが安定であると言える。このことは、結晶パッキングにおける分子間の水素結合の数が、転移後に増えていることから示唆される。

ただし、転移過程に複数の経路が存在することを示唆する結果も得られている。7月の実験では、細かいステップで湿度を降下させた際に、R32 (H32)とは異なる空間群の結晶が見られている。しかし、12月の実験では、複数の結晶で試みたものの、同様の現象は見いだせなかった。これは、結晶の質的な問題にも関係するものと想像されるが、詳細は後述する。

一方、State 2構造を有する結晶とリード化合物の誘導体を使用した複合体構造の解析を開始した。残念ながら、現時点で化合物の電子密度を得るには至っていない。

D．考察

結晶を溶媒から露出させ、その雰囲気湿度調整によって、結晶に変化を誘起する試みは、これまでもなされてきたものの、成功例は少なかった。結晶はそもそも溶媒から露出させると不安定になり、含水量の多いタンパク質結晶では難しいと考えられていた。しかし、HAG法は高分子溶液をコーティング剤として用いることでその弱点を克服し、これまでにも多くの試料で安定に試料をマウントできることを示してきたが、今回の結果は結晶構造変化への利用も可能であることを示している。

この変化を誘起する原因は複数考えられるが、本件に関しては、浸透圧によるものと考えている [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。このState 構造の変化において、重要な役割を果たす水分子の水和に影響を与えたものと考えられる。

こうして結晶を構成する分子の構造相転移現象は、浸透圧の変化に伴って起こることが想定されるが、結晶状態を維持したまま分子構造の変化が

起こるかについては、さらに検討が必要である。H-Rasについても、結晶全体として中間状態となる異なる空間群の結晶を経由してState 1への変化を起こすケースと、State 1/2がそれぞれ局所的に変化を起こすケースの二通りが観察された。後者は、いわゆるモザイク広がりが高い試料で見られており、結晶の完全性が十分でない場合は、構造転移が局所的に速やかに起こるのであろう。より多くの構造バリエーションを集めるという視点に立てば、完全性の高い結晶を作成することも重要だといえる。

化合物との複合体解析に関しては、野生型Rasの溶液からState 1構造を有する結晶を直接得ることはできておらず、共結晶化や通常の浸漬法では難しいようである。State 2構造を有する結晶の調製が可能になったため、今後はこれに浸漬する方法をとることを進めていく。

E．結論

柔軟な構造を持つH-RasにHAG法を適用したところ、外場制御によって格子の状態を変化させることで、異なる分子構造を解析できることが明らかとなった。

以上のことから、薬剤ターゲットとなるState 1構造を有する結晶を安定に作成する方法を確立することができ、今後の薬剤との複合体結晶の作成に一步前進したと言える。

今後はこの構造について薬剤を浸漬させた結晶の構造決定を進めていきたい。

G．研究発表

1．論文発表

Shima, F., Yoshikawa, Y., Ye, M., Araki, M., Matsumoto, S., Liao, J., Hu, L., Sugimoto, T., Ijiri, Y., Takeda, A., Nishiyama, Y., Sato, C., Muraoka, S., Tamura, A., Osoda, T., Tsuda, K.I., Miyakawa, T., Fukunishi, H., Shimada, J., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Kataoka, T.

In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2013) **110**(20):8182-8187.

2．学会発表

(本件に関してはありません。)

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

特にありません。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
別刷 2	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.	Fuyuhiko Tamanoi, Chan-ning J. Der	The Enzymes	Academic Press	Burlington	2013	1-23

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
別刷 1	Shima, F., Yoshikawa, Y., Ye, M., Araki, M., Matsumoto, 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.	<i>In silico</i> discovery of novel small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	110 (20)	8182-8187	2013
別刷 3	島 扶美, 熊坂 崇, 松本 篤幸, 吉川 陽子, 山本 雅貴, 片岡 徹	<i>ras</i> 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	27 (1)	3-9	2014
	Shima, F., and Kataoka, T.	Structure-based drug design of small-molecule Ras inhibitors having anti-tumor activity.	SPring-8 Research Frontiers		in press.	2013