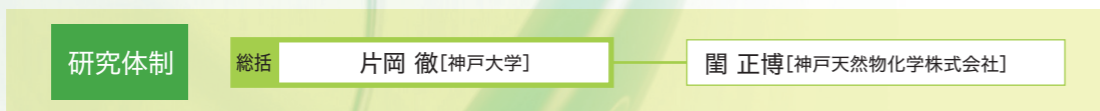


# Rasとその支配するシグナル伝達系の機能阻害を分子標的とした抗癌剤の開発

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)



※平成21年度における研究体制

## Ras阻害剤開発に風穴をあける新規方法論

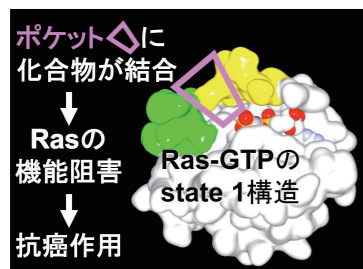
Project KeyWord  
キーワード

Ras	ras癌遺伝子はヒトの癌において高率に活性化が認められることから、その産物である低分子量G蛋白質Ras(ヒトではH-Ras,K-Ras,N-Rasの3つのアイソフォームが存在)は抗癌剤開発上の格好の分子標的と言えます。
分子標的薬	疾患の原因をゲノム・分子レベルで解明し、原因分子を特異的に阻害することにより疾患治療を可能にする医薬品。医薬品設計の段階から分子レベルの標的を定めている点で、従来の医薬品とは異なります。
立体構造遷移	ここでは、GTP型Ras(Ras-GTP)の立体構造の局所的ゆらぎを意味します。Ras-GTPでは、標的と結合できるstate 2(活性型)と、できないstate 1(不活性型)の2種類の構造間での相互変換が起こっています。

### 1 研究の背景・意義

#### GTP型Rasのポケット構造と分子標的薬

ras癌遺伝子産物Rasはヒトの癌において高率に活性化が認められることから、抗癌剤開発上の格好の分子標的と考えられます。Rasの機能阻害薬については、これまでに多数の製薬会社で開発研究が行われてきましたが、世界的には未だ成功例がありません。我々は、GTP型Ras(以下Ras-GTP)における立体構造の遷移というRasの新たな構造上の特徴に着目し、従来にない全く新たな方法論を用いた抗癌剤開発を目指しています。長らく活性型と考えられてきたRas-GTPには、標的との結合能力を有するstate 2構造(活性型)と有さないstate 1構造(不活性型)との間での相互変換(遷移)が存在することが近年の<sup>31</sup>P核磁気共鳴法による構造解析で明らかになってきています。State 2の立体構造は既に決定されていましたが、state 1については、Ras類似蛋白質であるM-Rasならびにその変異体のX線結晶解析を通じて、我々が世界で初めて立体構造決定に成功しました。興味深いことに、state 1構造にはRasの分子表面に低分子量有機化合物が十分挿入できるサイズのポケット構造が存在します。このポケットに選択的に結合し、Rasの構造をstate 1に安定化する物質(化合物)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ります。



◀GTP型Rasのstate 1構造に存在するポケットに結合し、このポケット構造を安定化する物質は、癌化シグナルを抑制します。

### 2 研究プロジェクトの目標

#### Ras機能阻害剤のインシリコ創薬

このプロジェクトでは、我々が独自に決定したRas-GTPのstate 1構造情報に基づくコンピュータ・ドッキングシミュレーションを利用したインシリコ創薬技術、ならびに生化学・分子生物学的検証実験を組み合わせた独自のアプローチによって、Rasのstate 1のポケットに選択的に結合し、Rasを不活化することで抗癌作用を示す低分子量有機化合物の効率的なスクリーニングを行います。生化学試験によってRas機能阻害活性を確認できた化合物については、簡易的な代謝安定性評価試験を行います。これをパスしたヒット化合物についてはさらに、小型実験モデル動物システムを利用して、固形腫瘍に対する抗腫瘍効果を評価します。これら一連の試験を全てパスした化合物を基本骨格別に構造分類し、より高活性で低毒性の化合物を得るために、誘導体の有機化学合成を構造群ごとに実施し、構造活性相関解析(構造展開)を行います。構造展開における活性評価には、前述の生化学・分子生物学的検証試験ならびにモデル動物システムを用います。この過程を繰り返し行うことで、最終的には、リード化合物を創出することをプロジェクトの到達目標とします。これら一連の研究を通じて、Ras-GTPにおける立体構造遷移というRasの新たな構造上の特徴に着目したRas自身の活性阻害薬の開発を可能にします。

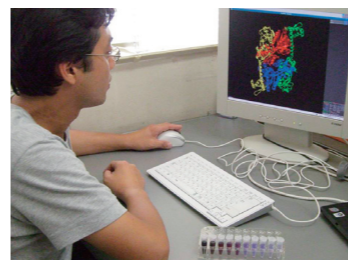


◀Rasのポケット構造情報に基づくインシリコスクリーニングとウェットアッセイを組合わせて、Rasの機能阻害剤を開発する。

### 3 研究プロジェクトの成果

#### インシリコ選抜化合物の生化学的活性検証

Ras-GTPのstate 1のポケットに安定に結合する物質を、250万種類以上の化合物を含む巨大ライブラリーから、コンピュータ・ドッキングシミュレーションを利用して1200種類以上選抜し、Rasと標的蛋白質との結合阻害試験(生化学試験)を実施しました。この段階で複数のヒットが得られたので、構造類縁体を化合物ライブラリーから探索するとともに、生化学試験を実施したすべての化合物の構造・活性情報を利用してコンピュータ能動学習法による候補選抜ならびにアッセイによって、さらにヒットを増やすことに成功しました。



◀Rasのポケット構造情報に基づく候補化合物のインシリコ選抜とRas阻害活性の生化学的検証によってヒットを得ました。

#### 選抜化合物の培養癌細胞での抗癌作用検証

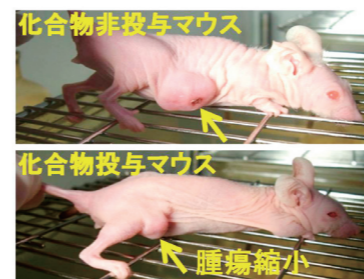
生化学試験をパスした化合物については、まず、細胞毒性試験を実施しました。毒性を示さない化合物について、活性型Rasで癌化した培養癌細胞株を使用して、癌化形質の抑制作用を評価しました。この段階で10種類以上の化合物がヒットとして残りました。Rasの活性化が関与しない培養癌細胞株では作用を示さなかったことから、ヒット化合物はRasに特異的な癌化抑制作用を示すことが細胞レベルで確認できました。ヒットの中には、化合物の活性強度の指標となるIC50値が20 nM以下の強い活性を示すものも複数含まれていました。



▶生化学試験をパスした化合物の抗癌作用を評価するために、癌細胞の軟寒天中でのコロニー形成試験を実施しました。

#### 選抜化合物のモデル動物での抗癌作用検証

培養癌細胞を用いた癌化形質抑制試験をパスした化合物については、簡易的な薬物代謝試験(マウス肝ミクロソーム試験)を実施しました。代謝安定性が確認できた化合物は、担癌モデル動物システムで活性評価を行いました。具体的には、ヒト大腸癌細胞株(活性型Ras変異を持つ)をヌードマウスに皮下接種し固形腫瘍を形成させた後、化合物を内服投与して腫瘍増殖抑制効果を評価しました。この試験をパスしたヒット化合物の中には、市販薬のマルチキナーゼ阻害剤Sorafenib



に匹敵もしくはそれを凌ぐ抗癌作用を示すものも含まれました。

◀ヒット化合物を投与したヌードマウスでは、大腸癌細胞由来の移植腫瘍の顕著な縮小効果が確認できました。

### 4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

#### 真のヒット見極めとリード化合物の創製

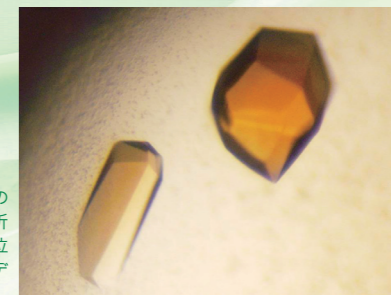
インシリコ選抜試験→生化学試験→細胞生物学試験→担癌小型モデル動物試験の一連の評価をクリアしたヒット化合物は、10種類存在しました。これらは、母核構造別に大きく3種類に分類されました。これらの構造・活性情報に基づいて、毒性発現の可能性が高い置換基や代謝的に不安定な化学構造を生物学的等価体と置換した新たな化合物(誘導体)を、神戸天然物化学株式会社を中心となって有機化学合成し、誘導体を用いた前述の一連の活性評価試験を神戸大学内において繰り返し実施しました。現時点で、真のヒット化合物の見極め作業についてはほぼ完了しており、今後、真のヒットから、創薬化学的手法によって、特許的に構造新規性を有しかつ合成展開性のあるリード化合物を創製し、さらにそれを最適化する方向に進みます。最終リード化合物が具備すべき目標クライテリアとしては、①生化学的・細胞生物学的有効活性濃度が数10 nMオーダー、②担癌モデル動物での有効活性濃度が既存薬(Sorafenib等)と同等以上、③薬物動態評価において既存薬と同等以上のプロファイルを有する、④副作用に關与する受容体親和性試験をクリアする、④遺伝毒性、心毒性、マウス/ラット急性・慢性毒性試験において重篤な副作用を示さない、などを設定しています。



◀ヒット化合物の母核構造に基づいて、有機化学合成によって誘導体を多数合成し、構造活性相関研究を行っています。

#### 化合物の結合部位の同定とリードデザイン

一連の活性評価試験をパスしたヒット化合物は、<sup>31</sup>P核磁気共鳴法によって、Rasのstate 1構造安定化作用があることが確認できました。これによって、我々が提唱する作業仮説「Rasのstate 1のポケットに結合し構造安定化する物質のインシリコスクリーニングを行うことによって、Rasの機能を阻害し抗癌作用を示す低分子量有機化合物の効率的な探索が可能になる」が正しいことが実際に証明されました。また、核オーバーハウザー効果(核磁気共鳴法の一つ)を調べることによって、ヒット化合物とRasとの直接の結合部位も徐々に明らかになりつつあります。Rasとヒット化合物との結合部位ならびに結合様式が明らかになれば、その立体構造情報を利用することによって、より特異的にRasに結合し強力な阻害活性を示す化合物の構造デザインが可能になるので、リード化合物創製のための構造展開も、今後より効率的に進むと考えられます。これを実現するために、現在我々は、Rasとヒット化合物との複合体の結晶化ならびに放射光(SPring-8)を利用したX線結晶構造解析についても精力的に進めています。



▶ヒット化合物とRasとの複合体の結晶化・構造解析を行い、化合物の結合部位に関する情報をリードのデザインに役立てます。

#### 参考文献

Ye M, Shima F, Muraoka S, Liao J, Okamoto H, Yamamoto M, Tamura A, Yagi N, Ueki T, Kataoka T. Crystal structure of M-Ras reveals a GTP-bound "off" state conformation of Ras family small GTPases. *J Biol Chem.* 2005, vol. 280, p31267-31275.

Liao J, Shima F, Araki M, Ye M, Muraoka S, Sugimoto T, Kawamura M, Yamamoto N, Tamura A, Kataoka T. Two conformational states of Ras GTPase exhibit differential GTP-binding kinetics. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 vol. 369, p327-332.

Geyer M, Schweins T, Herrmann C, Prinsner T, Wittinghofer A, Kalbitzer HR. Conformational transitions in p21ras and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP. *Biochemistry.* 1996, vol. 35 p10308-10320.