

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590336

研究課題名(和文) Ras - Raf 結合阻害活性を有する抗がん剤の創製

研究課題名(英文) Development of anti-cancer drugs having Ras-Raf-binding inhibitory activity

研究代表者

島 扶美 (shima, fumi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60335445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：rasがん遺伝子産物Rasは低分子量G蛋白質であり、多くの癌において活性化が認められることから、その機能を阻害する抗がん剤の開発が切望されている。我々は、GTP結合型Rasに特異的なポケット構造に基づいた大規模なスクリーニングを通じて、担がん動物において抗がん活性を示す複数の化合物群(Kobe0065ならびにその誘導体)の同定に成功した。これらの化合物は、Rasと標的蛋白質ならびに上流の調節因子との結合を阻害することでRasのシグナル伝達を阻害し、顕著な抗がん作用を示すことが明らかになった。さらに、これらの化合物は、市販の抗がん剤には認められない癌細胞の転移抑制作用を示すことも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：ras proto-oncogene products Ras, is a member of small GTPases, which is frequently activated in a wide variety of human cancers, making them promising anti-cancer drug targets. Based on the structural information on the specific surface pocket found in the GTP-bound form of Ras proteins (Ras-GTP), we have performed the compound screening in a large scale, and succeeded in the discovery of the novel compounds (Kobe0065 and its analogues) which exhibited a significant anti-tumor activity in animal models. The compound-binding to Ras-GTP potently restrained Ras activities in vitro and in vivo, by the direct binding inhibition of Ras-GTP with the downstream effectors and also with the upstream regulators. Moreover, they showed an anti-metastatic activity on cancer cells, which is not found in the marketed anti-cancer drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：インシリコ 創薬 Ras癌遺伝子 シグナル伝達 がん 低分子量G蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

*ras* 癌遺伝子産物 Ras は多くのヒトの癌、特に大腸癌や早期発見・治療が困難とされる膵臓癌において極めて高率に活性化が認められる。従って Ras を分子標的とし、その機能を特異的に阻害する物質が開発されれば、多くの癌はもとより難治性の癌に対しても革新的な治療法が提供できるようになる。Ras の機能阻害剤としては、Ras の機能に必須の翻訳後脂質修飾ファルネシル基付加を阻害するファルネシル基転移阻害剤が多数の製薬会社で開発されたが、近年の米国等での臨床治験では、少なくとも固形腫瘍については患者への延命効果が認められないことから、開発が頓挫した状況にある。従って、現在世界的に見て、Ras の機能阻害を目指す有効な分子標的薬は存在しない状況であり、創造的かつ革新的な開発アイデアが求められている。

Ras 蛋白質は低分子量 G 蛋白質の一員であり、活性型である GTP 結合型(Ras-GTP)と不活性型である GDP 結合型(Ras-GDP)を行き来しながら細胞増殖・分化に関与するシグナル伝達を制御する分子スイッチとして機能している。哺乳動物では H-, N-, K-Ras という 3 つのアイソフォームが存在し、ヒトの癌においてそのいずれかが突然変異 (G12V 変異など) により活性化している。また Ras には、アミノ酸配列の類似した Rap, R-Ras や M-Ras などのホモログが存在し、Ras ファミリーを形成している。Ras-GTP は細胞生物学の領域では一般的に活性型と呼ばれているが、構造生物学的には均一なポピュレーションでないことが知られている。Ras-GTP には、Raf (セリン/スレオニンキナーゼ) をはじめとする標的蛋白質の認識上最も重要な 2 つのスイッチ領域 (Switch I, Switch II) 近傍の分子表面にポケット構造が出現するポピュレーションが含まれ、ポケットが存在する構造では標的蛋白質と結合できず、Ras-GTP はシグナル伝達を行えない、いわゆる「GTP 結合型ながら不活性型」となっている。一方、Ras-GTP の残りのポピュレーションにはこのポケットが存在せず、標的蛋白質と安定に結合しシグナル伝達を行うことができる。我々は、GTP 型ながら不活性型であるポケットを有する Ras-GTP の立体構造を、Ras のホモログである M-Ras ならびにその H-Ras 型変異体の X 線結晶解析を通じて世界に先駆けて多数決定してきた (Ye M, Shima F\* et al., J Biol Chem. vol. 280(35): p31267-31275, 2005, \*co-first author; Shima F et al., J Biol Chem. vol. 285(29): p22696-22705, 2010)。さらに、標的蛋白質結合部位に近い Ras-GTP のポケットにエネルギー的に安定に結合する物質は、Ras-GTP のポケット構造を安定化し、Raf をはじめとする標的蛋白質と Ras との結合を阻害することにより Ras の癌化シグナル伝達を抑制する抗がん剤になる可能性があることに着目し、2006 年より、ポケットに結合する可能性の高

い低分子量有機化合物 (以下化合物、図 1) をコンピュータドッキングシミュレーション、コンピュータ能動学習法、構造類似体検索 (日本電気との共同研究) を駆使して市販の化合物ライブラリー (250 万種類の化合物を含む) からインシリコスクリーニングした。約 1000 種類の選抜化合物の活性検証を行うために、生化学・細胞生物学的活性検証試験 (H-Ras-Raf 結合阻害試験→活性化 H, K, N-Ras を有するヒト各種癌細胞株による癌化形質抑制試験→活性型 K-Ras を有する大腸癌細胞を移植した担癌マウスモデルでの抗癌作用試験) を実施した結果、市販の抗癌剤 sorafenib (マルチキナーゼ阻害剤) に匹敵する強い抗癌作用を示す、2 種類の母核構造を有するヒット化合物 (A 群、B 群) を同定することに成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では、約 20 種類のヒト癌細胞株 (活性型 Ras を有する群、活性型 Raf を有する群、Ras-Raf 系の活性化が関与しない群: Ras の上流の受容体が活性化したものを含む) を利用した癌化形質抑制試験 (細胞増殖抑制試験、足場非依存性細胞増殖試験など) を通じて、A 群ヒット化合物の Ras 特異性の検証を行うとともに、分子レベルでの化合物の作用メカニズムを解析する。また、Ras と類似した構造的特徴を有する他の低分子量 G 蛋白質 (Rho ファミリーなど) への作用も評価するために、レコンビナント蛋白質を用いた標的蛋白質結合阻害試験も同時並行して行う。また、A 群化合物の新規活性として確認された、腫瘍細胞の転移抑制作用のメカニズムを解明するために、化合物存在下で細胞接着・運動の表現型の変化を詳細に観察するとともに、関連分子の発現・局在の変化も詳細に解析する。さらに、理学研究科・田村厚夫准教授との共同研究により核磁気共鳴法 (NMR) で決定した、ヒット化合物と Ras (H-Ras) との複合体の立体構造情報ならびに前述の Ras 特異性に関する活性情報を利用し、(株) 神戸天然化合物の協力のもと、ヒット化合物の構造展開 (誘導体を有機化学合成し一連の生化学・細胞生物学的活性検証試験を実施) を通じて、より高活性で低毒性の医薬品開発候補品に育成する。

### 3. 研究の方法

(1) Ras-GTP の新規立体構造情報に基づく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駆使して同定した、Ras/Raf 結合阻害活性を有する前述の 2 種類の母核構造を有するヒット化合物 (A 群、B 群) のうち、A 群の化合物 (Kobe0065, Kobe2601, Kobe2602 の抗癌作用のメカニズムを以下の方法で解析した。  
①化合物存在下での、<sup>35</sup>S-GTP<sub>γ</sub>S でラベルした Ras と Raf との結合活性を評価し Ki 値を算出した。

②活性化型 H-Ras (H-RasG12V)を有するマウス NIH3T3 細胞ならびに、ヒト大腸癌細胞株 SW480 (K-RasG12V) をはじめとする活性化型変異 Ras (H-, K, あるいは K-Ras) を有する種々のヒト培養癌細胞株を用いて、A 群化合物による足場非依存性細胞増殖抑制効果 (癌化形質の1つ) を評価した。比較対象薬



市販薬である sorafenib (マルチキナーゼ阻害剤) ③A 群化合物による細胞内での Ras のシグナル伝達経路の阻害メカニズムを解明するために、細胞内での Ras/Raf 結合阻害作用、MEK, ERK のリン酸化レベル、PI3K の下流の AKT のリン酸化レベル、RalGEF の下流の RalA の GTP 型のレベルの増減を調べた。

④A 群化合物存在下での、Ras の上流の調節因子 Sos による GDP/GTP 交換因子効率を調べることで、上流因子への作用を評価した。

⑤大腸癌細胞株 SW480 を移植したヌードマウスに、A 群化合物を経口投与して腫瘍増殖抑制効果の評価するとともに、腫瘍組織切片における ERK のリン酸化レベルを調べることにより、化合物による Ras のシグナル伝達抑制効果の評価した。腫瘍組織でのアポトーシスについても調べた。

⑥A 群化合物の原子レベルでの Ras への作用メカニズムを解明するために、安定同位体 ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) ラベルした GppNHp (加水分解されない GTP アナログ) 結合型 H-RasT35S 変異用いた Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (NOESY) NMR を実施し、化合物と Ras との複合体のモデル構造を決定した。

⑦H-Ras 以外の低分子量 G 蛋白質 (M-Ras, RalA, Rap1A, Rap2A, RhoA, Cdc42, Rac1) の、A 群化合物存在下での Relaxation-edited 1D  $^1\text{H}$  NMR により、化合物の Ras 特異性の評価を行った。

⑧①から⑦の研究成果を学会発表するとともに、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2013) **110** (20)をはじめとする科学雑誌に発表した。

(2) A 群化合物の新規作用として確認された腫瘍転移抑制作用の分子メカニズムを以下の方法で解析した。

①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。

②化合物存在下での細胞接着・運動の表現型の変化を創傷治癒アッセイならびに細胞遊走試験を行った。関連分子として Lyzyl Oxidase (LOX) の発現と Ras の機能との関連に着目し、これらの分子の siRNA による発

現抑制と表現型の変化を調べた。

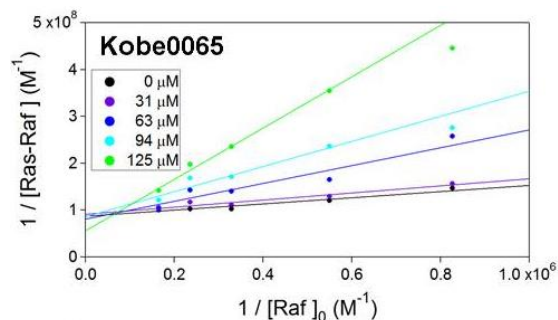
③①、②の研究成果を第 72 回日本癌学会学術総会にて発表した。

(3) H-RasT35S と化合物 Kobe2601 との複合体の立体構造情報に基づいて、活性改善目的にヒット化合物の誘導体を神戸天然物化学株式会社と共同でデザインし、同社において有機化学合成した新規デザイン化合物について、一連の生化学・細胞生物学的活性検証試験で活性評価することにより、化合物の構造展開を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) A 群化合物の抗癌作用メカニズムの解析:

①A 群の代表化合物である Kobe0065 存在下で、 $^{35}\text{S}$ -GTP $\gamma\text{S}$  でラベルした Ras と Raf との結合阻害試験を行い算出した Ras に対する Kobe0065 の  $K_i$  値は  $40 \pm 20 \mu\text{M}$  であった。他の 2 つの誘導体についても数百  $\mu\text{M}$  という  $K_i$  値が得られた。



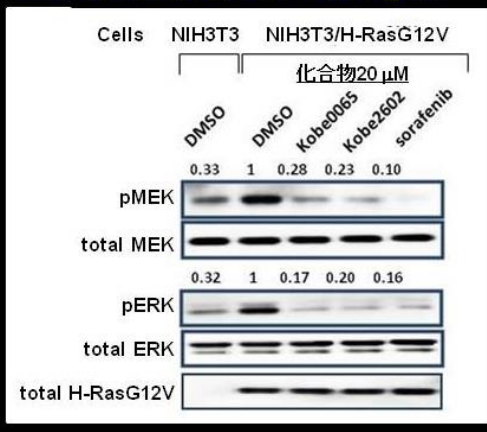
②比較対象薬である sorafenib が活性化型 Ras ならびに活性化型 Raf の変異を有するヒト癌細胞株のいずれに対しても足場非依存性細胞増殖抑制と足場依存性細胞増殖抑制を示したのに対して、A 群化合物は、SW480 をはじめとする活性化型 Ras を有するヒト癌細胞株 (上表の赤字と赤矢印部分) に対して選択的に細胞増殖抑制作用を示した。

cancer cell line	organ	H-Ras	K-Ras	N-Ras	B-Raf	PTEN	PIK3CA	inhibitory effect (%)		
								Kobe0065	Kobe2602	sorafenib
SW480	colon		G12V					66.30↑	65.00↑	83.80↑
PANC-1	pancreas		G12D					63.50↑	96.00↑	96.30↑
EJ-1	bladder		G12V					62.70↑	51.50↑	67.70↑
HT1080	tissue			G61L				79.00↑	80.50↑	70.00↑
DLD-1	colon		G13D				E545K	60.50↑	63.00↑	60.70↑
HCT116	colon		G12D				H1047R	55.00↑	59.00↑	99.00↑
A375	melanoma				V600E			26.00	41.00	93.00↑
T-47D	breast						H1047R	11.00	25.00	97.00↑
LNCap	prostate					frameshift		49.00	23.00	67.00↑
BxPC-3	pancreas							15.00	24.00	59.70↑
MCF-7	breast						E545K	26.00	27.00	93.00↑
HepG2	liver							14.50	0	72.50↑
HeLa	cervix							13.50	23.50	86.90↑

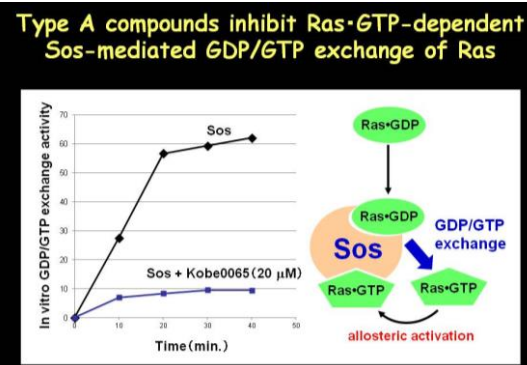
③A 群化合物は、細胞内において Ras と Raf との結合を抑制するとともに、下流のシグナル分子である MEK, ERK のリン酸化による活性も有意に抑制した (次ページ 図③)。

また、化合物処理を行った細胞において AKT のリン酸化レベルが低下するとともに GTP 結合型 RalA の量が減少していたことから、A 群化合物は、Ras の下流で機能する PI3K ならびに RalGEF のシグナル伝達をともに抑制することが示唆された。

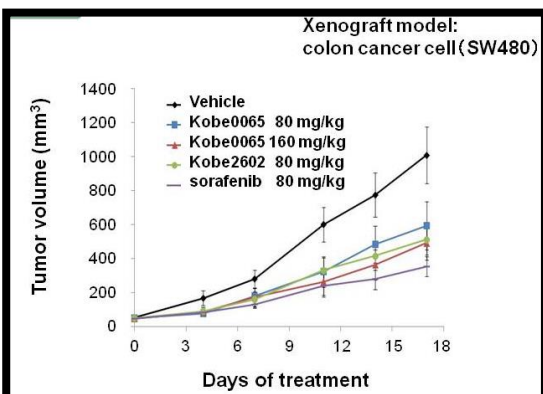
### ③ Inhibition of Raf/MEK/ERK signal



④ A 群化合物は、GTP 結合型 H-Ras (H-Ras-GTP) に結合することにより、Ras の上流の GDP/GTP 交換因子 Sos による Ras のヌクレオチド交換反応を阻害する作用を有することも明らかになった。



⑤ ヒト大腸癌細胞株 SW480 を移植したヌードマウスに A 群化合物を経口投与し、抗癌作用評価したところ、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、化合物を経口投与下マウスから採取した腫瘍の組織切片を用いた免疫染色試験により、ERK のリン酸化が有意に抑えられていた。この結果は、化合物が培養細胞のみならず、個体レベルでも Ras/MAPK 系のシグナル伝達を抑制することを示唆していた。また、A 群化合物を投与した腫瘍組織では、腫瘍細胞の顕著なアポトーシスが確認された。



⑥ A 群化合物の中で最も溶解度が高く H-Ras との複合体の立体構造解析に適した Kobe2601 を用いて NOESY-NMR を実施した

結果、各分子の原子間の距離情報に基づく複合体のモデル構造決定に成功した。複合体のモデル構造の解析から、化合物の Ras への結合は、Raf, PI3K, RalGEF などの複数の標的蛋白質ならびに、上流の調節因子である Sos と Ras との結合をも阻害することが示唆され、この結果は、前述の①～⑥の化合物の生化学的、細胞生物学的活性を支持していた。

⑦ Relaxation-edited 1D <sup>1</sup>H-NMR では、A 群化合物は H-Ras のみならず、M-Ras, RalA, Rap2A など Ras ファミリーに属する他の低分子量 G 蛋白質にも結合作用を示すことが明らかになった。一方、Rho ファミリーの蛋白質への結合作用は弱いことが確認された。

⑧ 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 (雑誌論文の項参照) ならびに *Nature Reviews Cancer* での本研究成果のハイライト (2013 *Nature Reviews Cancer* **13**, 381) の公開に伴い、著書などの執筆依頼 (雑誌論文の項参照)、国内外での報道・取材等を多数受ける結果となった。

(2) A 群化合物の腫瘍転移抑制作用の分子メカニズムの解析:

① 活性化型 K-RasG12V を有し高い転移能を示すヒト大腸癌細胞株 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比較対象薬である sorafenib 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、K-RasG12V 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。

②③ Ras が常時活性化された癌細胞株では、Kobe0065 処理により LOX の有意な発現抑制が認められた。また Ras が常時活性化されている癌細胞株では、siRNA 処理による Ras の発現抑制により、LOX の有意な発現抑制が確認された。これらの結果を踏まえ、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、創傷治癒アッセイを行った。その結果、Kobe0065 は、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により、細胞遊走を阻害する可能性が示唆された。癌細胞の浸潤における Kobe0065 の作用についても同様の知見が得られた。これらの結果をまとめ、第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) において研究成果を発表した。

(3) H-RasT35S と Kobe2601 との複合体の NMR 立体構造情報に基づいて、A 群化合物の活性改善目的に新規誘導体を神戸天然物化学株式会社と共同で複数種類デザインし、同社において有機化学合成した。得られた新規誘導体の Ras/Raf 結合阻害活性ならびに、細胞増殖抑制作用、個体レベルでの抗がん作

用の評価を行ったが、現時点では出発化合物である Kobe0065, Kobe2601, Kobe2602 の活性を顕著に上回る誘導体の獲得には至っていない。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 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. 査読有
- ② 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 査読有
- ③ 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. 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 査読有
- ④ Muraoka S, Shima F., Araki M, Inoue T, Yoshimoto A, Ijiri Y, Seki N, Tamura A., Kumasaka T, Yamamoto M, Kataoka T. Crystal structures of the state 1 conformations of the GTP-bound H-Ras protein and its oncogenic G12V and Q61L mutants. **FEBS Lett.** (2012) **586**, 1715-1718. 査読有
- ⑤ Araki, M., Shima, F., Yoshikawa, Y., Muraoka, S., Ijiri, Y., Nagahara, Y., Shirono, T., Kataoka, T., Tamura A. Solution Structure of the State 1 Conformer of GTP-bound H-Ras Protein and Distinct Dynamic Properties between the State 1 and State 2 Conformers. **J. Biol. Chem.** (2011) **286**, 39644-39653 査読有  
[学会発表] (計 3 件)
- ① 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
- ② Shima F. In silico discovery of novel Ras inhibitors that display anti-tumor activity by blocking the Ras-effector interaction. WINPTech 2012. 神戸大学統合研究拠点 (兵庫県) 2013年2月19日 (招待講演)
- ③ Araki M, Shima F., Yoshikawa Y, Muraoka S, Ijiri Y, Nagahara Y, Shirono T, Tamura A, Kataoka T. Solution structure of the state 1 conformer of GTP-bound H-Ras protein and distinct dynamic properties between the state 1 and state 2 conformers. **Biophysical Society 56<sup>th</sup> Annual Meeting.** Pos-L1 SAN DIEGO,

CALIFORNIA, USA, FEBRUARY, 2012 (ポスター)

[図書] (計 1 件)

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)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

①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、関正博、笹原大輔  
権利者: 神戸大学、神戸天然物化学株式会社  
種類: 特許

国内出願番号: 特願2011-105613

国内出願年月日: 平成23年5月10日

国際出願番号: PTC/JP2012/061908

国際公開番号: WO2012/153775 A1

国際出願年月日: 平成24年5月9日

国内外の別: 国外

②名称: Ras部分ポリペプチド含有水溶液及び機能阻害剤のスクリーニング方法 (Aqueous Solution Containing Partial Ras Polypeptide and Method For Screening Inhibitor of Ras Function)

発明者: 片岡徹、島扶美、田村厚夫、荒木望嗣

権利者: 神戸大学

種類: 特許

国内出願番号: 特願2011-023695

国内出願年月日: 平成23年2月7日

国際出願番号: PCT/JP2012/052078

国際出願年月日: 平成24年1月31日

国内外の別: 国外

③名称: 変異型Rasポリペプチドの結晶 (MUTANT RAS POLYPEPTIDE CRYSTAL)

発明者: 片岡徹、島扶美、田村厚夫、熊坂崇  
権利者: 神戸大学、高輝度光科学研究センター

種類: 特許

国内出願番号: 特願2009-165717

国内出願年月日: 平成21年7月14日

国際出願番号: US13/383835

国際出願年月日: 平成24年1月12日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

①所属研究科のホームページ:

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/molbiol/index.html>

②研究成果のハイライト記事

<http://www.nature.com/nrc/journal/v13/n6/full/nrc3533.html>

[http://www.spring8.or.jp/ja/news\\_publications/press\\_release/2013/130430\\_2/](http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2013/130430_2/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

島 扶美 (SHIMA, Fumi)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60335445

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

田村 厚夫 (TAMURA, Atsuo)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：90273797