

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： *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

2. 研究開発代表者： 片岡 徹

3. 研究開発の成果：

本研究は、がんの約 20%において突然変異による恒常的活性化が認められる Ras 蛋白質を分子標的としたがん治療薬の開発を目的とする。研究開発代表者らは、Ras の新規立体構造 (State 1) に存在する薬剤開発ターゲットとなる分子表面ポケットの構造情報に基づくインシリコスクリーニングと生化学・細胞生物学的検証試験を駆使した薬剤探索研究を実施し、市販抗がん剤 Sorafenib に匹敵する抗腫瘍活性を示し低毒性かつ経口薬適性に優れた低分子化合物 KMR084 及び Kobe0065 を同定した。本研究では、医薬品の有機合成化学研究に優れた神戸天然物化学（株）ならびに高輝度光科学研究センター（SPring-8）と共同で、保有リード化合物から臨床開発候補品を獲得する構造最適化研究を完了し、成果物を国内製薬企業へ導出して前臨床試験を遂行すること（先行開発）、ならびに、新規結晶化技術を用いて決定した State 1 のより精密なポケット構造情報を用いたインシリコスクリーニングと一連の検証試験により新たな活性化合物を同定し構造展開により臨床開発候補品を創出すること（後行開発）を達成目標とした。

先行開発では、KMR084 及びその誘導体の国際特許出願を完了（H27.6.16 米国特許成立）し、国内大手製薬企業と特許実施権許諾契約を締結し、共同研究にてフラグメントリンク法等を活用した構造最適化研究を推進した結果、細胞試験及び腫瘍増殖抑制試験にて KMR084 の活性を顕著に上回る新規誘導体 A を同定したが、化合物の吸収・代謝安定性に関する問題のため、前臨床試験候補化合物に選定しなかった。さらに、Ras との結合を NMR にて確認した新規フラグメント化合物 B、ならびに、KMR084 と Kobe0065 (*PNAS*誌に 2013 年に発表) 及びそれらの類縁化合物と Ras との複合体の NMR 構造情報を活用したフラグメントリンク法、フラグメントマージング法及び分子動力学計算法を活用したインシリコデザインによる構造最適化研究を実施した。インシリコデザイン化合物を有機化学合成して生化学・細胞試験による活性検証を行ったが、KMR084 と Kobe0065 を上回る活性を示す誘導体の同定には至らなかった。KMR084 の適応がん種拡大のため、保有する 46 種類のがん細胞株を用いた細胞増殖抑制試験を実施したところ、3 種類の Ras 依存性がん細胞株に対して Sorafenib と同等の細胞（腫瘍）増殖抑制効果を示した。また、KMR084 と Kobe0065 が、lysyl oxidase の遺伝子発現抑制により腫瘍の肺転移抑制作用を持つことを証明し、Ras 阻害剤の転移抑制に対する有用性を示唆した。後行開発では、H-RasT35S 変異体の新規 State 1 ポケット構造情報（結晶構造）及び KMR084 と Kobe0065 の類縁体と State 1 の複合体の NMR 構造情報を用いて、様々な手法を用いてインシリコスクリーニングを行った。また、神戸大学保有化合物ライブラリー（約 1700 化合物）から ELISA 法を用いた試験管内 Ras/Raf 結合阻害試験と細胞試験にて 4 種のヒット化合物を見出し、有機化学合成による構造展開研究を行った。しかし、いずれにおいても KMR084 と Kobe0065 に匹敵する Ras 阻害活性を有する化合物は見出せなかった。特殊試料マウント（HAG）法により野生型 H-Ras の State 1 結晶の安定的調製方法を確立しその立体構造を決定した。その結果、今後のインシリコ創薬の有力なターゲットとなる新規ポケット構造を発見するとともに、H-Ras とビルディングブロック化合物との複合体の立体構造決定に成功した。また、野生型 H-Ras の 2 つの State 間での立体構造遷移のメカニズムとその生理的意義を解明し、論文が *Scientific Reports* 誌にアクセプトされた。