

平成 28年度 委託実験調査成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 創薬支援推進事業 創薬総合支援事業
(英語) Drug Discovery Support Promotion Project “The iD3 Booster”

実験調査課題名 : (日本語) 活性化 RasG12V 変異体の新規ポケット構造を利用した抗がん剤のインシリコ創薬
(英語) *In silico* discovery of anti-cancer drugs targeting a novel pocket structure of the activated RasG12V mutant

実験調査担当者 (日本語) 国立大学法人 神戸大学大学院医学研究科 教授 片岡 徹
所属 役職 氏名 : (英語) Kobe University Graduate School of Medicine, Professor, Tohru Kataoka

実施期間: 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要

- GTP 結合型 H-RasG12V の新規 X 線結晶構造 (state 1) に存在する 2 つの分子表面ポケットをターゲットにしたインシリコスクリーニングにより選抜された 3,637 個の低分子化合物について、我々の評価系でのプロファイリングを完了し、複数のリード化合物を選抜した。
- NMR 測定により、リード化合物 A の複数の類縁体が H-RasG12V の pocket 2 近傍に結合することが示された。また、これらの類縁化合物の幾つかは活性型 Ras によりがん化した細胞の増殖抑制及び Ras の下流シグナル伝達阻害ならびに Ras の pocket 2 近傍への直接結合を示したことから、リード化合物と考えられた。
- リード化合物 A の類縁体として合成した化合物 X は最も強力な RasG12V-Raf 結合阻害活性を示し、活性型 H-RasG12V に対して野生型 H-Ras より約 2 倍強力な活性を示した。また、活性型変異を持つ ras がん遺伝子を有する細胞に特異的な増殖抑制活性と Ras の下流シグナルの阻害活性を示すとともに、NMR にて H-RasG12V の pocket2 近傍への結合が示されたことから、化合物 X を現時点で最も有望なリード候補化合物として同定した。さらに化合物 X は、K-rasG12V を有するヒト大腸がん細胞のヌードマウスへの xenograft モデルにおいて、既存抗がん薬で Raf を含むマルチキナーゼ阻害剤 sorafenib と同等もしくはそれを凌ぐ抗腫瘍効果を示した。
- *In silico* docking screening targeting the two pockets on the surface of the new X-ray crystal structure of GTP-bound H-RasG12V, corresponding to state 1, was carried out, and 3,637 low molecular weight compounds were selected as hits. We completed the profiling of all the compounds by our evaluation systems, and several seed compounds were identified.
- HSQC NMR was successfully used to show the direct binding of compound A-analogues to the vicinity of pocket 2 of H-RasG12V. OtherSome of these analogues exhibited the activities to inhibit the growth of RasG12V-transformed cells and the downstream signaling from Ras and to bind directly to the vicinity of pocket 2. Accordingly, these compounds were regarded as "seed compounds".
- Compound X, a synthetic A-analogue, exhibited not only the most potent activity to inhibit the *in vitro* Ras-Raf binding but also about 2-times stronger activity to inhibit the *in vitro* Raf binding toward H-RasG12V compared to wild-type H-Ras. Moreover, compound X showed the activities to selectively inhibit the growth of cancer cells carrying the mutationally activated *ras* oncogenes, to inhibit the downstream signaling from Ras and to bind directly to the vicinity of pocket 2 by HSQC NMR. Accordingly, compound X was regarded as the most promising lead candidate. Furthermore, compound X exhibited an anti-tumor activity which was equivalent to or a little more potent than that of sorafenib, an approved anti-cancer drug as an inhibitor of multiple protein kinases including Raf, toward a xenograft of human colon cancer cells carrying the K-*ras*G12V on nude mice.

Ⅲ. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
該当なし。
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし。
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし。
- (4) 特許出願
該当なし。

平成 28 年度 委託実験調査成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 創薬支援推進事業 創薬総合支援事業
(英語) Drug Discovery Support Promotion Project “The iD3 Booster”

実験調査課題名 : (日本語) 活性型 RasG12V 変異体の新規ポケット構造を利用した抗がん剤のインシリ
コ創薬
(英語) In silico Drug Discovery Using Novel Pocket Structure of Active RasG12V
Mutant

実験調査担当者 (日本語) 公益財団法人高輝度光科学研究センター タンパク質結晶解析推進室 室
長代理 熊坂崇

所属 役職 氏名 : (英語) Japan Synchrotron Radiation Research Institute, Protein Crystal Analysis
Division, Deputy Director, Takashi Kumasaka

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要

- 活性型 Ras の新規ポケット構造を標的とする新規薬剤開発の構造基盤を与えるため、我々はこのポケット構造を示す結晶の調製法の開発と、単体ならびに化合物複合体の結晶構造解析を進めている。
 - 今年度は、X 線結晶構造解析における結合化合物検出法として独自技術を含む方法を新たに導入し、低占有率化合物の検出感度を従来法より高めた。この方法を用いて、選抜されたフラグメント化合物の標的ポケットへの結合が確認できた。
 - また、神戸大学グループとの協力で、ポケットが開いた構造が優位とされる変異体の結晶化に成功し、これにより変異体結晶を利用した結合評価系を新たに整備した。
-
- To perform structure-based drug designs for novel drug binding pockets in oncogenic Ras protein, we conducted the crystallographic analysis of the novel forms of Ras crystals and its methodological development.
 - In this fiscal year, we introduced new calculation methods of electron density maps to detect ligands even with lower occupancy. By the methods, we observed a fragment compound selected in this project.
 - We were also successful to obtain another crystal forms of a Ras mutant, which showed a druggable pocket and might be useful to evaluate binding availability for various drug candidates.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
該当なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし
- (4) 特許出願
該当なし