

論文の内容の要旨

論文題目 Ras タンパクのファルネシル化阻害に基づく抗癌剤
創出に関する研究

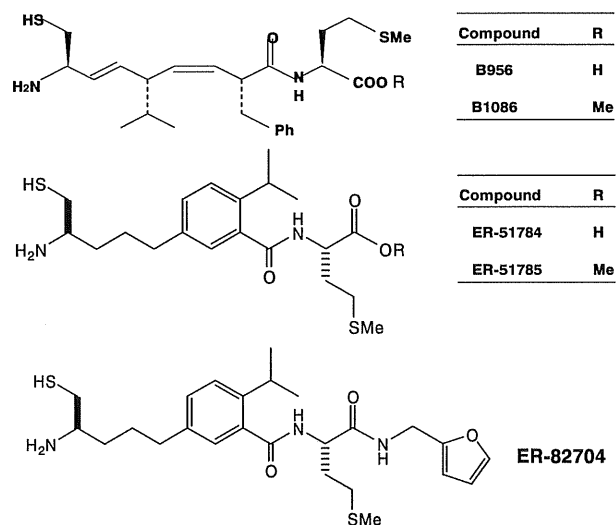
氏 名 長 洲 毅 志

1. 序

Ras プロト癌遺伝子(H-ras, K-ras, N-ras)産物は細胞の増殖・分化に重要な低分子量 G タンパクで、刺激を受けると GDP 結合型から GTP 結合型に変化しシグナルを下流に伝える。造腫瘍性を発揮する ras の活性化変異は、ヒト癌の 20~30%において観察され、特に大腸癌では 50%近く、膵癌では 80%以上に見られる。

Ras を介するシグナル伝達には ras タンパクの細胞膜への局在が必須である。そのためには ras タンパクの C 末端から 4 番目のシステインがファルネシル化を受けることが必要である。それを触媒するファルネシルトランスフェラーゼ(FTase)は C 末端の 4 アミノ酸(CAAX モチーフ)を基質として認識する。我々はファルネシル化阻害剤の抗癌剤への応用を企図し、CAAX モチーフの CVFM を出発物質として合成展開を行い B956 を得た(図1)。

図1. 化合物の構造



2. ヒト癌細胞株の足場非依存性増殖への影響

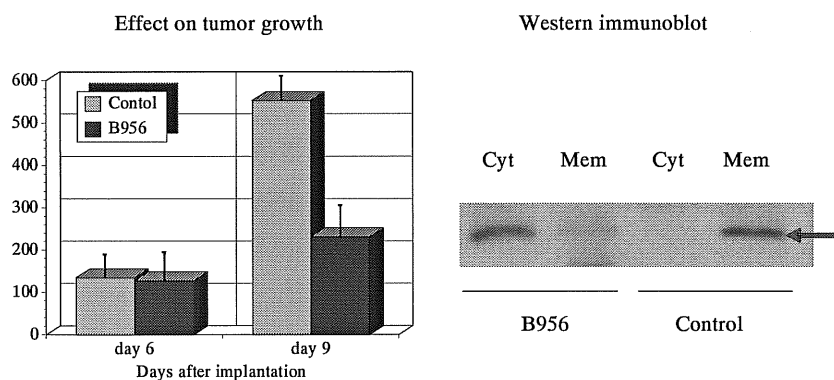
B956 は H-ras タンパクのファルネシル化を $IC_{50}=11nM$ で阻害した。細胞レベルにおいても、マウス繊維芽細胞株 NIH-3T3 の活性化 H-ras, K-ras 形質転換株で発現している ras タンパクのファルネシル化をそれぞれ $IC_{50}=0.5, 25\mu M$ で阻害した。そこで、癌細胞特有の異常増殖に対する効果を検討するためにヒト癌細胞株 19 株を用いて足場非依存性増殖への影響を調べた。

これら癌細胞株を軟寒天培地上で培養すると、正常細胞とは異なり足場非依存的な増殖によりコロニーを形成する。培地への B956 添加によりコロニー形成が用量依存的に抑制された。 IC_{50} は細胞株により極めて広範囲に分散していたが、ras の種類によって感受性が異なる傾向が認められた。すなわち、H-ras 変異を有する癌細胞株は非常に感受性が高く ($IC_{50}<1\mu M$)、N-ras は中程度 ($1\mu M<IC_{50}<10\mu M$)、K-ras は中程度から非常に感受性が低いもの ($10\mu M<IC_{50}$) まで広く分散していた。一方、ras 遺伝子が正常な細胞株は低感受性であった。

3. 形質転換 NIH-3T3 マウス繊維芽細胞株によるマウス腫瘍への影響

次に B956 の *in vivo* での抗腫瘍効果を NIH-3T3 の活性化 H-ras 形質転換細胞株(zH1)を用いて検討した。ヌードマウス腹側皮下に zH1 を移植し、その翌日より B956 を腹腔内投与した。B956 は用量依存的に腫瘍の増殖を抑制し、投与期間終了後は用量に依存した増殖再開の遅延を認めた。増殖再開後は対照群と同様の増殖速度であった。この投与量では体重の推移も対照群と差がなく、明確な毒性発現は認められなかった。

図2. ヌードマウス移植zH1細胞内rasタンパクの局在



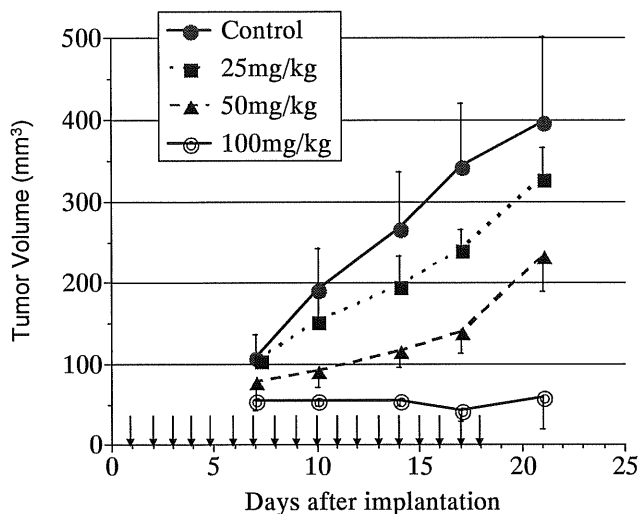
B956 の *in vivo* での腫瘍増殖抑制がファルネシル化阻害に基づくものであることを示すために、腫瘍中の ras タンパクの局在を検討した。zH1 細胞をヌードマウスに移植後腫瘍体積が $100mm^3$ 程度になる時点まで増殖させ、B956 を 3 日間投与した。投与終了後には明らかな増殖抑制効果を認めた。その後腫瘍を回収し、膜画分と可溶性画分を SDS ゲル電気泳動後、抗 ras 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、対照マウスから回収した腫瘍の ras タンパクは膜画分に局在するのにに対し、薬剤処理群では可溶性画分に蓄積することが示された(図2)。これらのことから、B956 が生体内でも ras タンパクのファルネシル化を阻害していることが示唆された。

4. ヌードマウス移植各種ヒト癌細胞の増殖に対する影響

B956 の *in vivo* 効果はヒト癌細胞移植モデルでの有用性を検討するにはまだ不十分と考えられたので、細胞内移行性を上げたメチルエステルプロドラッグ B1086 を合成し(図 1)、ヌードマウス移植各種ヒト癌細胞の増殖に対する治療効果を検討した。ヒト腫瘍細胞としては EJ-1 膀胱癌株 (H-ras 変異)、HT-1080 繊維肉腫株 (N-ras 変異)、HCT116 大腸癌株 (K-ras 変異) を用いた。

EJ-1 が最も高い感受性を示し、その作用は用量依存的であった。最大耐用量である $100mg/kg$ では投

図3. ヒト膀胱癌細胞株EJ-1移植ヌードマウスに対するB1086の抗腫瘍効果



100mg/kg 投与で有意な増殖抑制を示したもののその程度は約 20%であった。

与期間中の増殖は完全に抑制された。いわゆる従来の抗癌剤に強い耐性を示す EJ-1 に対して B1086 が腫瘍増殖を完全に抑制した意義は大きい(図3)。

HT-1080 に対する B1086 の効果は EJ-1 の場合ほど顕著ではないが、統計的有意差を持って腫瘍増殖を抑制した。増殖の抑制は用量依存的であり、100mg/kg での実験終了時の腫瘍体積は対照群の約 60%であった。HT-1080 は悪液質を引き起こすことが知られているが 100mg/kg 群では動物の状態は比較的良好で、悪液質も抑制されている可能性が示唆された。

HCT116 は用いた中では最も感受性が低く

5. 新たな化合物展開と ER-51784 の in vitro の活性

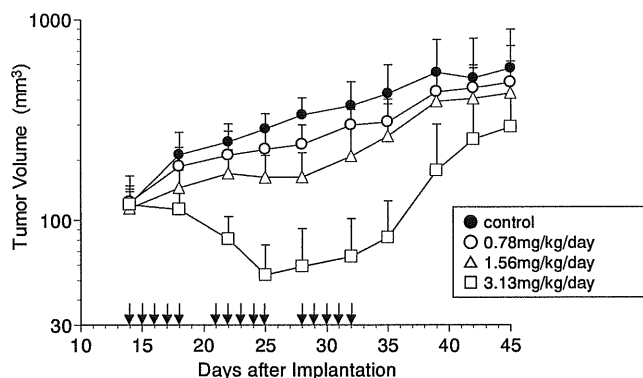
B956・B1086 を用いた実験からファルネシル化阻害剤が ras タンパクの膜移行を阻害し抗腫瘍活性を示すことが明らかとなりコンセプトの妥当性が示された。しかしながらまだ投与量が多く臨床での効果を期待するには不十分と考えられた。そこで更なる化合物合成展開を行い、ER-51784 およびそのエステルプロドラッグ ER-51785、経口投与可能な C 末端フルフリルアミド体 ER-82704 を創出した(図 1)。ER-51784 は前述の B956 と同様に強い FTase 阻害活性を示した(IC₅₀=13nM)。フルフリルアミド化合物 ER-82704 の活性はエステル体 ER-51785 と同程度であった。一方、細胞系においては、ER-51785 は、フリー体の ER-51784 やアミド体の ER-82704 よりも約十倍ほど強い活性を示した。このことは、メチルエステルが細胞内への透過に重要であることを示唆している。アミド体は細胞レベルでの活性は低かった。おそらく細胞内でフリー体に変換されないことが原因と考えられる。

ER-51785 は種々の ras 変異を有する細胞に対し、軟寒天培地上での足場非依存的増殖を阻害した。ER-51785 はフルフリルアミド体 ER82704 よりも優れた効果を示した。また、K-ras 変異よりも H-ras 変異を有する癌に対して強い活性を示した。

6. ヒト膀胱癌 EJ-1 ヌードマウス移植モデルでの縮小効果

エステルプロドラッグ ER-51785 とフルフリルアミド体 ER-82704 を用いて EJ-1 ヌードマウス皮下移植モデルでの効果を検討した。EJ-1 は in vivo でも感受性が高く ER-51785 の静脈内投与実験で腫瘍の縮小を観察することができた(図 4)。アミド体の場合には腫瘍縮小は観察されるもののその効果は 2 倍ほど弱かった。しかしながら、化合物を経口投与した場合にはアミド体の方が強い効果を示した。これはアミド

図4. ヒト膀胱癌細胞株EJ-1移植ヌードマウスに対するER-51785の抗腫瘍効果



体が、エステル体よりも優れた経口吸収性を有するためと考えられる。

ER-51785 の静注での効果は明確な用量依存性を示し、3.13mg/kg/day 投与において 50%以上の腫瘍縮小を認めた(図4)。体重推移は対照群と同様で重篤な副作用がないことが推測された。

分割投与の方が強い治療効果を認め、かつ高濃度での非特異的毒性発現(心毒性)を避けられることから、浸透圧ポンプを用いて血中濃度を長期間保つことを試みた。

その結果 2.6mg/ml 以上のポンプ内濃度で 3.13mg/kg/day と同等の腫瘍縮小効果を認めた。抗癌剤の臨床では点滴が一般的であることを考慮すると、ポンプで有効性を示し、濃度依存的毒性発現を避ける見通しが立ったことは意義深い。

7. ER-51785 と Paclitaxel の併用効果の検討

ER-51785 は H-ras 変異を有する腫瘍には単剤で有効性を期待できるまでに最適化されたものの、K-ras 変異を有する腫瘍に対する効果は不十分であった。最近、K-ras タンパクの細胞膜への局在が、Paclitaxel

で阻害されることが報告された。FTase 阻害剤が、Paclitaxel との併用で K-ras に対する効果増強ができれば、临床上の有用性は大きくなる。そこでまず足場非依存性増殖試験での併用効果を検討した。ER-51785 によるヒト膀胱癌株 (K-ras 変異)MIA PaCa-2 の足場非依存性増殖阻害効果は、2.5nM の Paclitaxel 添加で相

乗作用が認められた。一方、K-ras 遺伝子が野生型である HT-29(ヒト大腸癌細胞株)では効果は相加的なものであった。比較対照として作用機序の異なる市販の抗癌剤 5-FU、シスプラチンを用いて検討した結果、これらの薬剤と ER-51785 は相加的であり、相乗的な作用は Paclitaxel に特有であった。

次に Paclitaxel との in vivo 併用効果を、in vitro で相乗的な効果の見られた MIA PaCa-2 の皮下移植ヌードマウスモデルで検討した。ER-51785 の 10、30mg/kg において Paclitaxel 6.25mg/kg を併用した場合に、単剤では見られなかった強い腫瘍縮小効果を認めた(図5)。

8. 結語

我々は癌細胞に特異性の高い抗癌剤創出を目指し、癌遺伝子の中で最も臨床での関与が明らかな ras の機能発揮に不可欠なファルネシル化を阻害する薬剤を創出した。

前臨床の実験により、創出した化合物は H-ras 変異を有する癌に対しては単剤で、K-ras 変異を有する癌には Paclitaxel との併用で有効であることが示された。今後臨床での効果が期待される。

この研究は、癌の悪性形質に直接アプローチするものとして、抗癌剤創薬の新しい波につながるものであると信じている。

図5. MIA PaCa-2移植ヌードマウスモデルでのE-51785とPaclitaxelの併用効果

