

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 長洲毅志

### 1. 序

Ras 遺伝子(H-ras, K-ras, N-ras)の活性化変異は臨床の癌で非常に多く観察され(ヒト癌全体の20~30%、大腸癌では50%近く、膵癌では80%以上)、癌特異的な抗癌剤のターゲットとして重要と考えられる。Ras タンパクの機能発揮には細胞膜への局在が必須であり、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。本研究ではファルネシル化阻害剤の抗癌剤への応用を企図し、CAAX ペプチドを出発物質として合成展開を行い B956 を得た。B956 でコンセプトが証明されたので、更なる合成展開を行い、臨床応用を期待できる化合物を得た。

### 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、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、ヒト癌細胞株 19 株を用いて足場非依存性増殖を指標に癌細胞特有の異常増殖に対する効果を調べた。その結果、B956 はコロニー形成を用量依存的に抑制した。 $IC_{50}$  は、H-ras 変異を有する癌細胞株は非常に感受性が高く、N-ras は中程度、K-ras は中程度から非常に感受性が低いもの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 を腹腔内投与したところ用量依存的な腫瘍の増殖の抑制を示した。

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 細胞のヌードマウスに移植系を用い、B956 投与後明らかな増殖抑制効果を認めた時点で腫瘍を回収し、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、対照群の ras タンパクは膜画分に局在するのに対し、薬剤処理群では可溶性画分に蓄積することが示された。即ち 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. ニードマウス移植各種ヒト癌細胞の増殖に対する影響

細胞内移行性を高めたメチルエステルプロドラッグ B1086 を用い、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 (100mg/kg/day) では投与期間中の増殖は完全に抑制された。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。動物の状態は良好で、HT-1080 由来の悪液質が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かった。

#### 5. 新たな化合物展開と ER-51784 の *in vitro* の活性

以上の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。しかしながら投与量が多く化合物として完成度が低いと考え更なる化合物合成展開を行った結果、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。

ER-51784 は前述の B956 と同様に強い FTase 阻害活性を示した。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。全ての化合物が B956 同様 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。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経口投与薬剤の可能性を見出した。

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。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。

創投与量が同じであれば分割投与の方が強い治療効果を認めた。また、高濃度での非特異的毒性発現(心毒性)を避ける目的で、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結果、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十分な効果を示したが K-ras 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ので、まず足場非依存性増殖試験での併用効果を検討した。その結果、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において Paclitaxel との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。また、調べた範囲で相乗的な作用は 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。その結果、単剤では見られなかった強い腫瘍縮小効果を認めた。

#### 8. 結語

申請者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。

ゲノム創薬の重要性が叫ばれるなかで特に抗癌剤については、新しい考え方を取り入れて真に患者様のためになる薬を創出せねばならない。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り、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいと判定した。