

課題名 (タイトル) : 網羅的計算による高効率インシリコスクリーニングの実現

利用者氏名 : ○本間 光貴, 幸 瞳, 佐藤 朋広, 高谷 大輔, 津田 和実, Gloria Fuentes, 沖山佳生, 渡邊千鶴, 渡邊 博文,
 所属 : 横浜研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 制御御分子設計研究チーム
 横浜研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 創薬分子設計基盤ユニット

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

当チームでは、疾患に関連したタンパク質に対して、ドッキングや MD シミュレーションなどの方法を用いて、それらの機能を制御する低分子化合物や、ペプチドや核酸などの高分子をデザインする研究を行っている。本年はアミノ酸変異を持った EGFR に特異的に結合する低分子阻害剤をデザインする研究を行ったので、後述する (MD による変異 EGFR の阻害剤のデザイン)。

また、DMP に関する業務において、量子化学計算プログラム Gaussian09 を利用し、標的タンパク質と複合体を構成するリガンド低分子に対する構造最適化・静電ポテンシャル計算・自然密度解析計算を行った。これらの結果を利用することで、溶媒効果を含むリガンド結合能の評価ならびに結合サイト内の相互作用解析に対して、非常に有用な情報を得ることができた。

(MD による変異 EGFR の阻害剤のデザイン)

肺がんはがん関連死のなかで主要な要因の一つであり、このがんに関する理解の進展は、がん抑制遺伝子の不活性化やがん促進遺伝子の活性化などを含む、多くのがんの分子レベルでの機序の解明へとつながることが期待される。本研究は ErbB 受容体ファミリーに属するなかで上皮成長因子受容体 (EGFR) と非小細胞肺がんとの関連を取り上げた。

EGFR の変異を含む非小細胞肺がんは、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に極めてよく反応する。特にエクソン 21 上の点変異 L858R とエクソン 19 のフレームシフト変異はよく知られているのに対し、複数の変異を含む場合や、より稀な変異を含む場合の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の臨床上的有効性については、よくわかっていない。

近年ガン由来遺伝子の配列読み取りは腫瘍学の分野において、よく用いられるようになっており、がん遺伝子の状態を知ることは、患者の治療上、重要になりつつある。

Table 1. Tyrosine kinase

TKIs	Status
Iressa	Approved
Erlotinib	Approved
AEE778	Clinical
Lapatinib	Approved
TAK-285	Clinical
Staurosporine	Natural product

Table 2. EGFR mutants.

Single-nucleotide substitutions	in-frame deletions in exon 19	in-frame duplications and/or insertions in exon 20
G719S	E746_A750del	A767_S768insSVD
T790M	E746_T751del	D770_N771insNPG
L858R	L747_A750insP	A763_Y764insFQEA
L861Q	L747_T751del	
G719S/T790M	L747_P753delS	
G719SL858R		
T790ML858R		

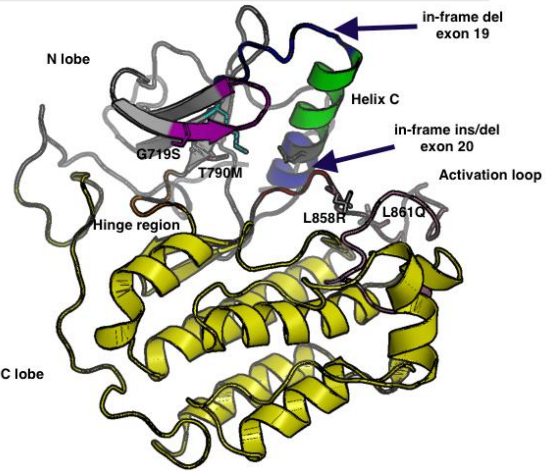


Figure 1. 野生型 EGFR チロシンキナーゼ (活性型) の全体像 (リボン表示)。キナーゼの重要部位 P-loop, helix C, activation loop は、それぞれ紫、緑、オレンジで表す。本文中で言及された変異は矢印で示してある。

治療を行う医師にとって、これら遺伝子変異に対するデータベースの構築は、患者ガン組織に含まれる変異に応じた治療法の選択を行う基盤となるため、重要性が高い。

既に、患者データと阻害剤との有効性との相関を調べる多くのメタ研究が行われているが、本研究のアプローチは、治療を行う前に行われれば、有用な情報を与えると期待される。本研究において、よく知られたチロシンキナーゼ阻害剤 (Table 1) と様々な構造的、動的な特徴をもつ変異 EGFR (Table 2, Figure 1) に対して、結合能との相関をえるプロトコルを提案した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

原子レベルの変異 EGFR と異なる阻害剤の構造をモデリングにより作成した。これらのモデル構造は 50ns の MD シミュレーションを AMBER パッケージの sander プログラムにより行った。合計 5000ns のトラジェクトリを得ることができ、それらは、配座空間の包括的な探索をしていることが期待できる。

3. 結果

本研究では EGFR TKI の分子メカニズムを計算により明らかにし、特定の変異 EGFR に特異的な阻害剤を見出すことにある。

予備的な結果においては、文献で報告されている実験による結合能と MD シミュレーションから得られたエネルギー的な値には相関はまだ、みられていないが、信頼できる結合能の実験値は、今回のアプローチの特長となっている。今後、我々は統計的な回帰により、MD シミュレーションから得られる値を用いて実験値と相関する新しい関数を作成する予定である。この関数は、エネルギーだけでなく、以下のように構造と動的なパラメータを含んだものとなることが考えられる。

結合能: $(K_d \text{ or } IC_{50}) = w_1 \times \text{Energy} + w_2 \times (\text{距離}_1) + w_3 \times (\text{水素結合}_1) + w_4 \times (f_{\text{native contacts}}) + \dots + w_n \times (\text{その他のパラメータ})$ 。

また、MD により野生型及び変異体の代表的なスナップショットを得ることで、EGFR の配座空間は、よく探索されており、これらの構造は、インシリコバーチャルスクリーニングを行う際の構造として使われる。キネーゼ阻害剤をリガンドして使うことにより、異なる変異体それぞれに特異的な阻害剤を予想できることが期待される。

4. まとめ

EGFR と阻害剤の複合体の配座空間の探索を行った。本研究の最終的な目標は、患者由来組織から取得した配列データから有効な阻害剤を予測する方法を確立することにある。MD による配座空間の探索は、EGFR の構造の揺らぎを取り込み、様々な変異体に対する特異的な阻害剤の設計を可能とすることが期待される。

5. 今後の計画・展望

今後はより低い結合能を持った化合物と EGFR との複合体の MD シミュレーションを行うことで、結合能地形においてより広い範囲を取り扱い、活性の大小様々な阻害剤を取り扱えるようにする。また、この計算で得られるデータは、新しい結合能予測スコアの構築に有用であると考えられる。