

「分子シミュレーションと数理モデル化によるがん化学療法の感受性予測法の確立」

神戸大学医学部附属病院

高岡 裕

1 研究の背景と目的

ヒトゲノム解析の進展により、遺伝子の多様性が薬物代謝と薬効を決定する事が判明し、多くの情報が蓄積されつつある。しかし蓄積された分子情報の有効利用は大きな課題であり、世界中で取り組みが始まったところである。生物医学研究は検証から予測（すなわち理論医学）へと向かって進歩しており、これは理化学研究所計算科学研究機構のスーパーコンピュータ「京」の開発目的でもあり、兵庫県にはこの領域の研究を発展させるのに最適な環境が準備されつつある。

がん化学療法の適応は、薬物代謝（体内動態）と薬効（感受性）の2指標から、的確に判断可能である。このうち、抗がん剤の副作用と感受性は薬物代謝酵素、薬物トランスポーター、標的分子の遺伝子型で決まる事が最近明らかになり、またそれらの遺伝子型は多様性に富み新たな変異が発見されつつある（図1：ゲフィチニブ感受性と上皮増殖因子受容体（EGFR）の遺伝子型）。

新変異の患者の場合、薬物動態と感受性について判断することは非常に困難であり、予測がつかない事から治療には大きなリスクを生じてしまう。そこで、治療前に抗がん剤感受性を予測可能にすることで、治療のリスク軽減を目標に本研究テーマに取り組んだ。本研究では副作用が重篤（死亡）ゆえに事前予測が重要なゲフィチニブ（商品名：イレッサ）とEGFRの遺伝子変異を対象に、薬物感受性の有無を予測可能な解析系の確立を目標とする。我々は抗がん剤の薬物有害反応（副作用）の予測に直結する薬物動態を計算機で予測を能にする分子シミュレーションと数理モデルから成る解析系を確立し特許（日本国特許第5447383号、2014年1月10日）も取得しており、これらの知見も本研究に生かした。

EGFR遺伝子型	薬効
正常型	×
p.D761Y	×
p.T790M	×
p.E709A	○
p.E709G	○
p.E709K	○
p.G719S	○
p.G719A	○
p.G719C	○
p.S768I	○
p.L833V	○
p.H835L	○
p.L838V	○
p.L858R	○
p.L861Q	○
p.E746_A750del	○
p.L747_T751del	○
p.L747_S752del	○
p.S752_I759del	○
p.L747_T751delinsP	○
p.L747_P754delinsQ	○
p.E746_A750delinsRP	○
p.E746_T751delinsVA	○
p.E746_S752delinsA	○
p.L747_T751delinsQ	○
p.L747_S752delinsQH	○
p.L747_T750delinsP	○
p.L747_P753delinsS	○
p.T751_I760delinsS	○

図1 ゲフィチニブ感受性と遺伝子型

2 研究方法・研究内容

最初に、(1)図1にまとめたEGFRの変異体の立体構造を解析する。PDB (<http://pdj.org/>) に正常型EGFRについて、X線結晶回析法で決定された立体構造が複数登録されている。その中で、立体構造中のアミノ酸数が最も多く解像度が3Å以下の、PDB ID: 3gopを用いた。但し、これは単量体なので生体内の存在様式と同じ2量体にする必要がある。具体的には、ZDOCKプログラム (<http://zlab.umassmed.edu/zdock/>) を用いて単量体同士を結合させて、その中から既報 (Zhang et al. Cell 125:1137-1149, 2006) と同じ構造を選択し、構造最適化計算により構造を解析する。1アミノ酸置換型の変異型EGFRの単量体立体構造は、まずアミノ酸を置換したモデル構造を作った後に分子力学計算および分子動力学計算により構造最適化を行い、変異体の立体構造を決定する。また欠損型変異についてはホモロジ

ーモデリング法により単量体モデル構造を作り、同様に構造最適化により解析する。変異型 EGFR も、正常型と同様に単量体構造同士をドッキング解析した後に、2 量体の構造を最適化して決定した。次に、(2) ゲフィチニブの構造を ChemIDPlus (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) から取得してドッキング解析に供した。なお、既に 2007 年に Yun らが EGFR とゲフィチニブの複合体の結晶構造を決定しており (Cancer Cell, 11:217, 2007)、ドッキング解析の解析条件や解析結果の評価では、この論文を指標に分析した。そして、(3) ドッキング解析は一変異体の解析につき 100 回行う事で、確率論的に生じる分子間の相互作用を数値化する。また、EGFR の静電ポテンシャル解析も行い、タンパク質表面の電荷も解析した。最後に、(4) 分子シミュレーションの結果から明らかになった薬効メカニズムと解析結果から、感受性スコア値を求める数理モデルを導出する。導出したモデルに解析で求めた分子シミュレーション結果を代入して感受性スコアを計算し、がん化学療法時の組織への効果を指標にスコア値の閾値を決定する (図 2)。

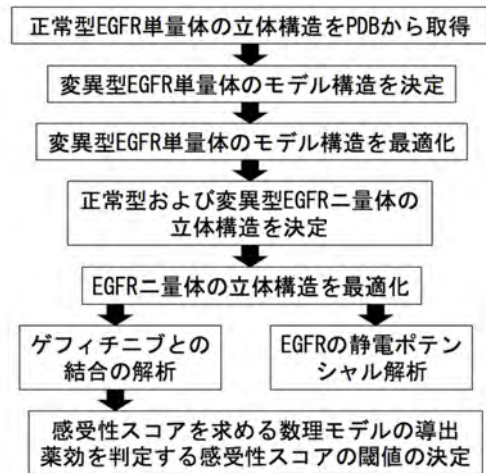


図2 本研究の解析プロセスの概要

3 研究成果

今回の解析対象は、ゲフィチニブ耐性が 4 分子、ゲフィチニブ感受性が 25 分子の EGFR である。限られた計算資源の中でゲフィチニブ耐性を優先にして解析し、計 11 分子 (耐性: wild, p.D761Y, p.T790M; 感受性: p.E709A, p.E709G, p.E709K, p.G719S, p.G719A, p.G719C, p.L858R, p.E746del) まで単量体の変異構造の解析まで終了した。

構造最適化計算が想定以上に時間を要することが判明したため、これらの変異のうち新規変異でありゲフィチニブ感受性が不明な p.E746del の単独変異について、この変異を有する患者への薬剤投与に加えてシミュレーション解析を実施した。なお、既知の変異でゲフィチニブ感受性が報告されている E746_A750 欠損の EGFR も解析する事で、E746del 型の EGFR 解析結果の比較対象とした。図 2 に示す全ての解析を、正常型 EGFR、E746del EGFR、E746_A750del EGFR の 3 分子について、当初は患者がこの変異のホモなのかヘテロなのか不明であったので、ヘテロ変異体とホモ変異体の両方について解析した。その結果、正常型ホモ (ゲフィチニブ耐性) と、E746del ヘテロ、E746del ホモ、E746_A750del ヘテロと E746_A750del ホモの ATP 結合部位の構造に明らかな違いが見られた (図 3)。

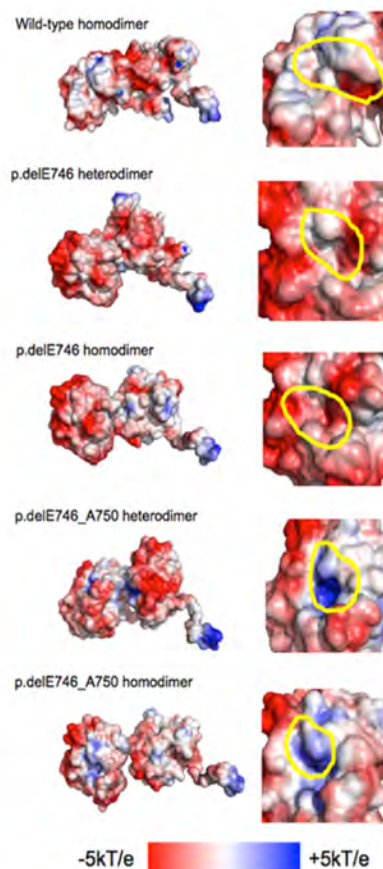


図3 正常型およびE746欠損、E746_A750欠損のホモ/ヘテロ2量体構造

表1 EGFRとゲフィチニブのドッキング解析結果

Dimerization of EGFR	The instances of docking times of EGFR and gefitinib
wt / wt	12 times / 100 times
wt / delE746	37 times / 100 times
delE746 / delE746	30 times / 100 times
wt / delE746_750	25 times / 100 times
delE746_750 / delE746_750	16 times / 100 times

この結果から、ATP ドッキング部位に対するゲフィチニブのドッキング能に違いが出る事が予想された。そこで、これらの EGFR とゲフィチニブのドッキング解析を行い、薬剤の有効性の予測を行った。その結果、ゲフィチニブ耐性の正常型ホモでは 12 回だったゲフィチニブドッキングの回数が、ゲフィチニブ感受性が判明している E746_A750 欠損ヘテロでは 25 回という結果であった。そして、今回新規変異として解析した E746del ヘテロとホモでは、37 回、30 回であった (表 1)。これは、既知のゲフィチニブ感受性の変異体の解析結果よりも多く、この新規変異型に対するゲフィチニブの有効性を示唆している。実際、この患者へのゲフィチニブ投与は有効であり、5ヶ月間の投与により腫瘍サイズ減少と呼吸機能の改善、新たな転移も抑制された。最終的にこの患者は別の脳疾患により薬物投与出来なくなり死亡したが、本研究提案による予測方法が有効であることが示された。

文献: Masahito Ogasawara, Yutaka Nakamura, Naoto Morikawa, Hiroto Nitani, Satoshi Moriguchi, Ryosuke Chiba, Heisuke Saito, Mika Ohta, Tatsuo Tanita, Tamotsu Sugai, Kazutaka Maeyama, Kohei Yamauchi, Yutaka Takaoka: Analysis of a single codon E746 deletion in exon 19 of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* DOI 10.1007/s00280-016-3021-y, 2016.

最後に、全解析終了後に閾値を求めるための数理モデルを導出した。E746del 変異型 EGFR の解析では、ゲフィチニブの ATP 結合サイトへのドッキングについてのみ着目して、薬物の耐性と感受性を示す事が出来た。しかし、ここでは ATP の ATP 結合部位への結合様式は反映させていない。そこで、より厳密に EGFR の TK 活性を式に反映すべく、ATP の ATP 結合部位への結合を組み込むことにした。すなわち、ATP が ATP 結合部位へ正しく結合した時には TK 活性がプラスになり、ATP が ATP 結合部位に異常な向きで結合した時には TK 活性はマイナスになる。これらを反映し導出した数理モデルが図 4 である。



$$f = \frac{B_{\text{gefitinib}}}{B_{\text{ATP}}} + \left(1 - \frac{B_{\text{gefitinib}}}{B_{\text{ATP}}}\right) \left(1 - \frac{C_{\text{ATP}}}{B_{\text{ATP}}}\right)$$

図4 導出した数理モデル

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究は、実現可能な他では試みの無い、先端的かつ独創的な取り組みとして取り組んだものである。現在までの研究成果から、薬物感受性の予測が十分に可能である事が示された。現在、遂行中の解析を完遂する事で薬物感受性の予測系が確立されると期待

され、さらにはこの方法を他の薬にも適応して、あらゆる薬物で薬剤感受性を明らかに出来る可能性が高い。今回、検討すべき標的分子の数が多数であり、未だ本来の目標に対する解析は実行中である。この、解析の高速化には高速計算機「京」の利用が不可欠であり、そのための予算獲得に向けて努力しているところである。また、薬物動態の数理モデルと薬物感受性の数理モデルを統合させることで、疾患予後の予測に繋がる期待もある。今回の本研究の成果は、安心安全な医療を実現するのみならず理論医学の端緒としての取り組みであり、科学的意義は大きいと考えている。