

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06978

研究課題名(和文)チロシンキナーゼ-阻害剤間相互作用の速度論的解析に基づく抗がん剤耐性機構の解明

研究課題名(英文)Biophysical evaluation of the interaction between tyrosine kinase and drug for elucidation of drug resistant mechanism

研究代表者

小橋川 敬博 (Kobashigawa, Yoshihiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授

研究者番号：90455600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：受容体型チロシンキナーゼの1種であるFGFR1は種々のがんに関わっており、重要な創薬標的となっている。本研究課題ではFGFR1のがん変異体、中でも特に抗がん剤耐性変異体に着目し、阻害剤との相互作用の物理化学的解析に基づき、阻害剤耐性機構の解明を試みた。2種類の薬剤耐性変異体について解析を行い、N546K変異体は基質であるATPに対する親和性を向上させることで耐性を獲得しており、V561M変異体は変異部位周辺の立体障害と変異に伴う構造変化により生じる立体障害が耐性に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Aberrant activation and over-expression of tyrosine kinases are related to various human cancer. Various tyrosine kinase inhibitors are under clinical use, while occurrence of drug resistant mutants is a severe problem. We performed biophysical analysis of the interaction between FGFR1 kinase domain and its inhibitors. It revealed that N546K mutants exhibited increased affinity for ATP, a substrate of tyrosine kinases, which assumed to cause resistance to the ATP-competitive inhibitors. The V561M mutants exhibited decreased affinity for PD173074, which was assumed to be caused not only by steric hindrance around mutation site but also by steric hindrance caused by structural change induced by mutation. These finding revealed that drug resistant mechanism of tyrosine kinase is quite complicated and detailed analysis of the interaction among the kinases, inhibitors and ATP is essential for elucidation of the drug-resistance mechanism.

研究分野：構造生物化学

キーワード：チロシンキナーゼ 阻害剤 耐性変異体

1. 研究開始当初の背景

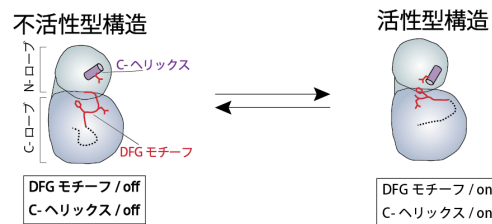
チロシンキナーゼはタンパク質に含まれるチロシン残基のリン酸化を触媒する酵素である。ヒトには 97 種類が存在し、細胞の分化、増殖、接着、免疫反応など細胞内の様々なシグナル伝達のトリガーとなっている。その活性は厳密に制御されており、発現の亢進、無秩序な活性化は多くのがんにおいて見られる。そのため、抗癌剤開発の主要な標的タンパク質となっている。実際、これまでに数多くのチロシンキナーゼ阻害剤が開発され、臨床現場において抗がん剤として使用されている。しかし、薬剤耐性変異体の出現が大きな問題となっている。その克服に向けて、阻害剤耐性機構の解析が、結晶構造解析に基づき行われてきた。その結果、変異体における変異部位は、薬剤の結合部位にもなっており、変異に伴う立体障害の発生が主たる耐性機構であると推測されていた。しかしながら、受容体型チロシンキナーゼの 1 種である FGFR1 の阻害剤耐性変異体について、阻害剤との相互作用を解析したところ、野生型と同等の親和性を有するという、結晶構造からの推測とは矛盾する予備的結果を得ていた。同様の結果は、EGFR の薬剤耐性変異体の 1 種においても報告されている (Yun *et al.*, *PNAS* 2007, Yoshikawa *et al.*, *Oncogene* 2012)。チロシンキナーゼを含め酵素は、触媒サイクルの過程で、様々な構造状態をとることで機能を発揮している。すなわち、動的な構造変化を介して機能していると言える。そのため、静的情報である結晶構造だけでは不十分であり、動的な情報の取得が薬剤耐性機構の解明には不可欠である。

2. 研究の目的

チロシンキナーゼは、触媒ドメインであるキナーゼドメインの活性化ループにあるチロシン残基のリン酸化により活性が制御される。活性の強さは 2 つの構造状態間の平衡の移動により変化するが、非リン酸化状態では不活性型構造、リン酸化状態では活性型構造が優勢となっている (図 1)。がん変異体は、この構造平衡をリン酸化に非依存的に活性型構造に偏らせると推測されている。これまでに行われてきた結晶構造解析により、チロシンキナーゼ阻害剤は、通常、活性型構造もしくは不活性型構造のいずれか一方に選択的に結合することが明らかにされている。このことは、2 つの構造平衡状態間の変換速度および存在比が、阻害剤に対する感受性を支配する要素の一つとなっている可能性を示している。加えて、阻害剤に対する結合・解

離速度もまた、選択性を支配する要素となる可能性が考えられる。それは、結合の強さが同じ場合であっても、解離速度が速くなっていれば、薬の効き目が持続せず、薬剤耐性となり得るからである。そのため、動的情報 (構造平衡状態間の変換速度、存在比、阻害剤の結合・解離速度) が得られる手法を用いてチロシンキナーゼ-阻害剤間相互作用を解析することが、阻害剤耐性機構を解明する上で不可欠であると言えよう。本研究課題の目的は、FGFR1 をモデルタンパク質として、阻害剤との相互作用を種々の物理化学的手法により解析し、薬剤耐性の動的構造メカニズムについて明らかにすることである。

図 1: チロシンキナーゼの動的構造平衡



3. 研究の方法

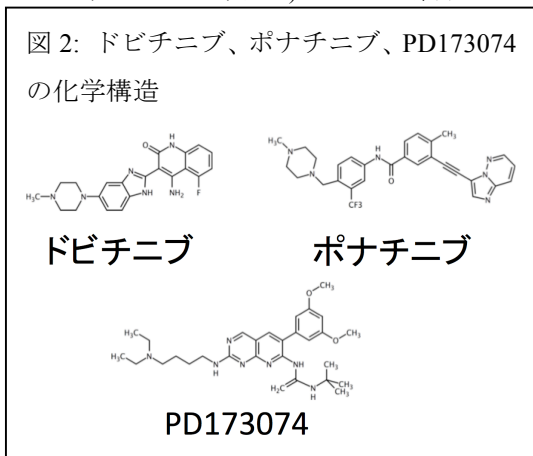
FGFR1 のキナーゼドメインを対象として、野生型、薬剤耐性変異体 2 種類 (N546K 変異体、V561M 変異体) について、阻害剤との相互作用を物理化学的に解析する。具体的には、蛍光スペクトル、示差走査蛍光測定 (DSF : Differential Scanning Fluorometry)、等温滴定熱量測定 (ITC : Isothermal Titration Calorimetry) を用いて FGFR1-阻害剤間相互作用の強さに関する情報を得る。表面プラズモン共鳴 (SPR : Surface Plasmon Resonance) を用いて FGFR1-阻害剤間相互作用の速度に関する情報を得る。さらには、溶液 NMR を用いて構造平衡状態に関する情報を得る。また、現在使われているチロシンキナーゼ阻害薬は基質である ATP の結合を妨げる ATP 拮抗阻害薬である。そこで、ATP アナログとの相互作用についても検討を行う。

4. 研究成果

本研究課題では、FGFR1 の 2 種類の薬剤耐性変異体について解析を行った。一つ目は N546K 変異体である。この変異体の変異部位はモレキュラーブレーキ残基と呼ばれ、不活性型構造の維持に関わる水素結合ネットワークの形成に関わる残基である。様々なチロシンキナーゼ (FGFR1~4、PDGFR、CSF1R、

Flt1、Flt4、Tec、Tie、Flkl など)において残基が保存されており、モレキュラーブレーキ変異体は、キナーゼ間で共通するがん変異体、かつ薬剤耐性変異体になる可能性がある。二つ目は V561M 変異体である。V561 は ATP 結合ポケットの最深部にありゲートキーパー残基と呼ばれる。この部位が嵩高いアミノ酸に置換される変異体は、あらゆるチロシンキナーゼで共通して見られる阻害剤耐性変異体であり、ゲートキーパー変異体と呼ばれる。ゲートキーパー部位は多くの阻害剤の結合部位になっており、この部位が嵩高いアミノ酸に置換されるゲートキーパー変異体においては、阻害剤との間に立体障害が生じ、阻害剤に対する親和性が低下すると推測されていた。

3 種類の FGFR 阻害剤 (ドビチニブ、ポナチニブ、PD173074、図 2)について解析を試み



た。最初に ITC による親和性の評価を試みたが、高濃度の阻害剤溶液(200uM 程度)が必要となるため、阻害剤の溶解性の問題により、データが得られなかった。そこで、蛍光スペクトルによる解析を試みた。その結果、V561M 変異体において、解離定数 K_d が大きくなっており、PD173074 に対する親和性の低下が観測された。他の変異体-阻害剤ペアについては親和性の低下は見られなかった (表 1)。

以上の結果より、N546K 変異体については、阻害剤に対する親和性が低下しておらず、耐性機構は親和性の低下ではないことが明らかとなった。一方、V561M 変異体については、PD173074 に対しては親和性の低下が耐性機構となっているが、それ以外の阻害剤について親和性低下が耐性機構ではないことが明らかとなった。

今回用いた阻害剤はいずれも ATP 拮抗阻害薬である。そこで、ATP アナログである AMP-PNP に対する親和性について DSF を用いて検討を行った。その結果、N546K 変異体において ATP アナログに対する親和性の向上が確認された (表 2)。以上より、N546K 変

異体の阻害剤耐性機構は基質である ATP に対する親和性の向上であることが示された。これまで、EGFR のゲートキーパー変異体では同様の報告がなされていたが(Yun *et al.*, *PNAS*. 2007、Yoshikawa *et al.*, *Oncogene* 2012)、モレキュラーブレーキ変異体では初めての結果である。

表 1 : 蛍光スペクトルにより求めた FGFR1 野生型、N546K 変異体および V561M 変異体のドビチニブ、ポナチニブ、PD173074 に対する解離定数 (K_d)

	野生型	N546K	V561M
ドビチニブ (nM)	19.5 (+/- 6.3)	17.5 (+/- 7.8)	3.4 (+/- 2.2)
ポナチニブ (nM)	16.7 (+/- 5.6)	6.0 (+/- 1.8)	7.0 (+/- 2.1)
PD173074 (nM)	2.9 (+/- 3.7)	2.9 (+/- 2.2)	311.0 (+/- 121.3)

表 2: DSF により求めた FGFR1 野生型、N546K 変異体および V561M 変異体の ATP アナログ (AMP-PNP) に対する解離定数 (K_d)

	野生型	N546K	V561M
K_d (mM)	3.1 (+/- 0.1)	0.2 (+/- 0.01)	2.3 (+/- 0.3)

次に、V561M 変異体の PD173074 に対する親和性の低下についてさらなる検討を行った。結晶構造解析の結果より、V561 周辺は PD173074 のジメトキシ基との間でロックアンドキー型の相互作用を形成しており、ゲートキーパー残基が嵩高いアミノ酸に置換されることで立体障害が生じる。そこで、PD173074 と同様にジメトキシ基を介して V561 周辺とロックアンドキー型の相互作用をすることが報告されている BGJ-398 についても親和性を検討した(図 3)。親和性は DSF により評価を行った。その結果、BGJ-398 が PD173074 に比べて V561M 変異体に対する親和性が 10 倍以上高いことが明らかとなった (表 3)。この結果は、変異部位周辺の嵩高さだけが PD173074 に対する親和性低下の要因ではないことを示している。V561M 変異体ではグリシンリッチループの構造状態が活性型構造に類似していることが NMR により明らかしてきた。グリシンリッチループは PD173074 の *tert*-Butyl 基と相互作用しているが、グリシンリッチループの構造が活性型構造に変化すると *tert*-Butyl 基と立体障害を生じることが結晶構造より予想された (図 3)。そこで、ゲートキーパー残基を M ではなく I に置換した変異体 V561I を作製した。I は M よりも嵩高いアミノ酸である。NMR による

解析により、V561I 変異体のグリシンリッチループの構造は野生型に近い、すなわち不活性型構造であることが示された。V561I 変異体について PD173074 および BGJ-398 に対する親和性について検討したところ、PD173074 に対する親和性は V561M 変異体に比べて 10 倍以上高いことが明らかとなった。一方、BGJ-398 に対しては同程度であった (表 3)。このことより、V561M 変異体で見られた PD173074 に対する顕著な親和性の低下が、変異部位周辺の嵩高さだけではなく、変異に伴うグリシンリッチループの構造変化も寄与していることが明らかとなった。

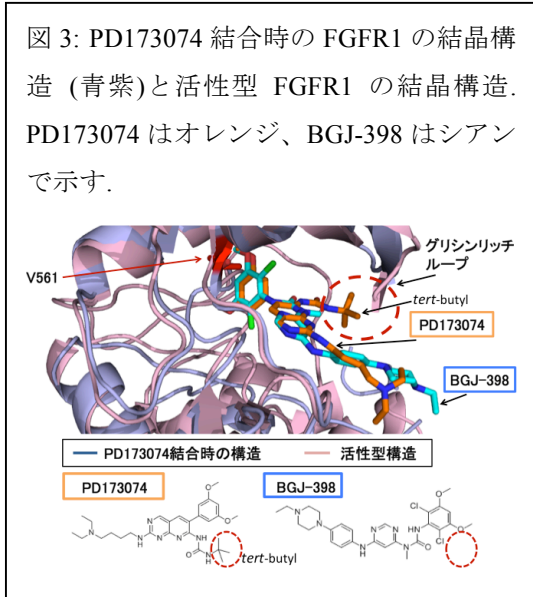


表 3: DSF により求めた FGFR1 野生型、V561M 変異体および V561I 変異体の PD173074 および BGJ-398 に対する解離定数 (K_d)

	野生型	V561M	V561I
PD173074 (nM)	4.4 (+/- 1.6)	285 (+/- 163)	23.6 (+/- 19.1)
BGJ-398 (nM)	2.3 (+/- 0.9)	11.4 (+/- 9.3)	20.2 (+/- 10.3)

以上の研究により、N546K 変異体に対する耐性機構、V561M 変異体の PD173074 に対する耐性機構は明らかになったが、V561M 変異体のポナチニブおよびドピチニブに対する耐性機構については明らかにはなっていない。そこで、次に FGFR1-阻害剤間相互作用の速度論的解析を試みた。最初に、表面プラズモン共鳴 (SPR) による解析を試みた。その結果、センサーチップへの FGFR1 の固定化が鍵となるが、種々の固定化方法を試みたものの、固定化した FGFR1 が失活したり、センサーチップが再生できなかつたり、固定化した FGFR1 の脱離によるバックグラウンドの変化の影響、固定化量の問題により、解析に

耐え得る良好なデータを得ることはできなかった。そこで、ストップフロー蛍光スペクトルを用いた、阻害剤との相互作用の速度論的解析を試みた。最初に、25°Cにおいて、ドピチニブについて結合過程の解析を行った。その結果、1 相性の反応速度に従うことが明らかとなった。ポナチニブについても同様であった。ポナチニブについて、阻害剤濃度を変えた実験を行い、得られた速度定数を阻害剤濃度に対してプロットし、 k_{on} および k_{off} を求め、それと用いて K_d 値を求めたところ、200nM 程度であり、蛍光スペクトルにより求めた値 (表 1) に比べて、10 倍程度大きかった。次に、5°Cにおいて測定を行った。その結果、ポナチニブの FGFR1 への結合は速い反応と遅い反応の 2 相性の反応速度に従うことが明らかとなった。これは、FGFR1 とポナチニブの結合が 1 : 1 の反応過程に従うのではなく、Induced-fit や Conformational-selection などのように、結合過程で FGFR1 の構造変化を伴う可能性を示唆している。5°Cにおいてさらなる解析を行ったところ、遅い相の速度定数と阻害剤耐性の間に相関が見られており、細胞実験で耐性を示すことが報告されている変異体と阻害剤のペアでは遅い相の速度定数が野生型に比べて小さくなっていた。結合における構造変化の過程の速度が耐性と関わると考えられる。

以上のように、種々の物理化学的測定を通して、FGFR1 の阻害剤耐性機構について多くの知見が得られた。FGFR1 以外のキナーゼについては、未解明である。今後、本研究と同様の方法を他のキナーゼに適用していくことで、耐性機構の解明がより進んでいくと期待される。その知見が今後の阻害剤開発に活かされていき、薬剤耐性変異体の克服につながっていくことを期待している

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Yoza K, Himeno R, Amano S, Kobashigawa Y, Amemiya S, Fukuda N, Kumeta H, Morioka H, Inagaki F
Biophysical characterization of drug-resistant mutants of fibroblast growth factor receptor 1. *Genes to Cells*, 21, 1049-1058, 2016 年 10 月 査読あり

② Kobashigawa Y, Amano S, Yoza K, Himeno R, Amemiya S, Morioka H, Yokogawa M,

Kumeta H, Schlessinger J, Inagaki F
Nuclear magnetic resonance analysis of the conformational state of cancer mutant of fibroblast growth factor receptor 1 tyrosine kinase domain.
Genes to Cells, 21, 357-362, 2016年2月
査読あり

③ Kobashigawa Y, Amano S, Yokogawa M, Kumeta H, Morioka H, Inouye M, Schlessinger J, Inagaki F
Structural analysis of the mechanism of phosphorylation of a critical autoregulatory tyrosine residue in FGFR1 kinase domain.
Genes to Cells, 20, 860-870 2015年10月
査読あり

[学会発表] (計 8 件)

① 与座 魁斗、福田 夏希、姫野 梨花、森岡 弘志、天野 伸治郎、横川 真梨子、Joseph Schressinger、稲垣 冬彦、小橋川 敬博
薬剤耐性変異体チロシンキナーゼ-阻害剤間相互作用の解析
平成 27 年度 日本生化学会九州支部例会
平成 27 年 5 月 16 日～5 月 17 日
九州大学箱崎キャンパス (福岡市)

② 雨宮 舜、赤星 璃、天野 伸治郎、久米田 博之、稲垣 冬彦、森岡 弘志、小橋川 敬博
キナーゼドメイン二量体相互作用面を標的とした阻害ペプチドの探索と評価
第 15 回日本蛋白質科学会年会
2015年6月24日～6月26日
あわぎんホール (徳島市)

③ 雨宮 舜、赤星 璃、天野 伸治郎、久米田 博之、稲垣 冬彦、森岡 弘志、小橋川 敬博
キナーゼドメイン相互作用面を標的とした阻害ペプチドの探索と評価
第33回日本薬学会九州支部大会
2016年12月3日～12月4日
鹿児島大学 (鹿児島市)

④ 林田 大輝、与座 魁斗、雨宮 舜、姫野 梨花、佐藤 卓史、福田 夏希、赤星 璃、逆瀬川 知香、森岡 弘志、小橋川 敬博
阻害剤耐性および選択性の分子機構の解明へ向けた阻害剤-FGFR 間相互作用の物理化学的解析
第 39 回日本分子生物学会年会
2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日
パシフィコ横浜 (横浜市)

⑤ 小橋川 敬博、稲垣 冬彦

受容体チロシンキナーゼ FGFR1 のがん変異体の動的構造状態と阻害剤耐性機構の解析
第 55 回 NMR 討論会
2016 年 11 月 16 日～11 月 18 日
広島国際会議場 (広島市)

⑥ 逆瀬川 知香、雨宮 舜、与座 魁斗、姫野 梨花、林田 大輝、赤星 璃、佐藤 卓史、森岡 弘志、小橋川 敬博
FGFR4 活性化に関わる FGFR4-FGFR1 キナーゼドメイン間相互作用の NMR による解析
第 55 回 NMR 討論会
2016 年 11 月 16 日～11 月 18 日
広島国際会議場 (広島市)

⑦ 赤星 璃、与座 魁斗、雨宮 舜、林田 大輝、姫野 梨花、矢口 悠、佐藤 卓史、森岡 弘志、小橋川 敬博
受容体型チロシンキナーゼ FGFR の阻害剤耐性機構の物理化学的解析
平成 29 年度 日本生化学会九州支部例会
平成 29 年 5 月 13 日～5 月 14 日
宮崎大学 (宮崎市)

⑧ 雨宮 舜、与座 魁斗、川越 聡一郎、斎尾 智英、石森 浩一郎、姫野 梨花、林田 大輝、矢口 悠、森岡 弘志、小橋川 敬博
受容体型チロシンキナーゼ (FGFR) の薬剤耐性変異体における阻害剤耐性機構の物理化学的解析とその克服へ向けた試み
日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会
2017 年 6 月 7 日～6 月 9 日
北海道大学 クラーク会館 (札幌市)

[図書] (計 1 件)

① 小橋川 敬博、雨宮 舜、与座 魁斗、佐藤 卓史、森岡 弘志
「第 10 章 9 節 キナーゼドメイン間相互作用面を標的とした阻害ペプチドの探索」
ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術
技術情報協会、2017 年 12 月

[その他]

ホームページ等
<http://seimeibunseki.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小橋川 敬博 (KOBASHIGAWA, Yoshihiro)
熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬) ・

准教授

研究者番号：90455600

(2) 研究分担者

森岡 弘志 (MORIOKA, Hiroshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬) ・
教授

研究者番号：20230097