

令和元年6月19日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08652

研究課題名(和文)蛋白質立体構造解析と分子動力学に基づくEGFR分子標的薬の効果予測と創薬

研究課題名(英文) Construction of dynamic prediction model of EGFR tyrosine kinase inhibitors efficacy for mutated EGFR based on protein three-dimensional structure analysis

研究代表者

大西 宏明(Ohnishi, Hiroaki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80291326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛋白立体構造解析および分子動力学の手法を用いて、変異EGFRタンパクと各種EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)との結合能について検討を行った。その結果、今回用いた分子結合能シミュレーション法による予測では、第1世代のEGFR-TKIに対してはdelE746A750変異、L858R変異、delE746A750+T790M変異、L858R+T790M変異、V843I+L858R変異の順に効果が高く、第2・3世代のEGFR-TKIは第1世代のEGFR-TKIに比べT790M変異を有する細胞株に対し有効性が高いという、in vitroの実験結果とほぼ適合する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の分子結合の静的モデルでは、種々のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)と変異EGFR蛋白との結合性を正確に予測することは困難であった。今回開発した動的分子シミュレーションモデルを用いることにより、EGFRの変異ごとのTKI感受性や、第1-3世代のTKIのT790M変異に対する効果の違いをほぼ正確に予測することができた。今後この手法を用いることで、新たな肺癌の分子標的薬(EGFR-TKI)の開発において、実際の臨床効果を正確に予測しうる効率的な創薬が可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-small cell lung cancer(NSCLC) patients harboring the epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations benefit from therapies by the EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs). We developed a new dynamic prediction model of TKIs efficacy using computed simulation of binding of mutated EGFR protein and TKIs. We were able to correctly predict the responsiveness of various TKIs to NSCLC with EGFR mutation. Especially, this computer dynamic simulation calculates that third generation EGFR TKIs will be more effective than 1st and 2nd generation EGFR TKIs. It was also predictable that most TKIs are not effective against the rare V843I+L858R mutant. Our new model is very promising for appropriate selection of various existing TKIs for various EGFR mutants as well as discovery of new TKIs by application of dynamic molecular simulation technology.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 肺癌 動的分子シミュレーション

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

EGFR およびその関連シグナル伝達分子の異常は、肺癌、脳腫瘍、消化器癌など、様々な癌の発症・進展に関わっている。肺癌では、EGFR 遺伝子のエクソン 18-21 の変異がチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の効果に関与することが明らかとなっている。例えば、エクソン 19 内の 15 塩基欠失変異(del19)やエクソン 21 の L858R 変異は、TKI に対する感受性を獲得する代表的遺伝子変異として知られている。一方、T790M に代表されるエクソン 20 の変異は、TKI に対する耐性をもたらす。

我々は過去の報告において、EGFR 遺伝子の V843I 生殖細胞系変異が遺伝性肺腺癌の原因遺伝子であることを明らかにした。本変異を有する肺癌細胞株は薬剤感受性試験において TKI に耐性であり、実際に TKI を投与された患者でもその効果は認められなかった<sup>1)</sup>。さらに、EGFR 遺伝子 V843I 変異を導入した NIH3T3 細胞株を用いた解析により、本変異が細胞増殖の亢進に関与することを明らかにした。また、本家系の患者から樹立された細胞株に対する、数種の TKI や EGFRV843I 変異特異的 siRNA を用いた解析により、本変異が T790M に比べてより幅広い TKI に対する耐性を示すことも明らかとなった。

このような TKI の感受性や耐性に関与する EGFR 変異は他にも知られており、コンピューターシミュレーションによる EGFR 分子構造の推定に基づく TKI 結合能の推測などからその機序の解析が行われている。しかしながら、結合定数の計算に基づく EGFR と TKI との結合能測定により、必ずしも実際の TKI の効果を正確に予測できるものではない。特に、低頻度変異や、二つ以上の EGFR 変異が同時に生じている例についてはこのような検討はほとんどなされていない。薬物を含む物質の結合部位は一般的に静的なものではなく、規則的な立体構造の変動を伴っており、機能分子や薬物との結合もその変動を考慮する必要が明らかとなってきている。このような分子メカニズムの解明は、EGFR-TKI に対する耐性の克服による抗癌治療のみならず、新たな抗 EGFR 薬の創薬による新規抗癌治療の開発に不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、TKI の効果に深く関与するチロシンキナーゼ部位における TKI 分子の結合動態を明らかにするために、蛋白質立体構造解析および分子動力学解析の手法を用いて、EGFR およびその変異体の動的立体構造を解析した。そのうえで、変異 EGFR タンパクと各種 EGFR-TKI との結合能について予測可能な動的コンピューターシミュレーションモデルの構築を試みた。

研究分担者である中村のこれまでの研究により、EGFR の TKI 結合部位は、T790M、V843I 等の 1 アミノ酸置換により大幅な立体構造の変化が生じ、ゲフィチニブ、エルロチニブ等の TKI 分子の accessibility に変化が生じていることが明らかとなっている。しかしながら、研究分担者である広川らの近年の研究により、このような薬物を含む物質の結合部位 (分子ポケット) は一般的に静的なものではなく、規則的な立体構造の変動を伴っており、機能分子や薬物との結合もその変動を考慮する必要が明らかとなってきている。

本研究は、del19、L858R の EGFR-TKI 感受性変異、および T790M、V843I の EGFR-TKI 耐性に関わる変異をもつ EGFR 蛋白に対して、TKI 結合部位の分子構造の動態をコンピューターシミュレーションにより予測し、これまでの静的な立体構造解析ではわからなかった分子間の作用動態について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) in vitro における変異 EGFR に対する各種 EGFR-TKI の効果

各種の EGFR 変異をもつ肺癌細胞株について、MTS 法を用いてエルロチニブ、ゲフィチニブ等の EGFR-TKI に対する薬剤感受性試験を行った。また、各種文献から、変異 EGFR 細胞株に対する各種 EGFR-TKI の薬剤感受性試験の結果を抽出した。IC<sub>50</sub> 値によりキナーゼ阻害効果を示す EKI score と称するスコアリングシステムを作成し、EGFR-TKI の効果について評価した。

### (2) 初期分子構造の構築

結晶構造に基づいたホモロジーモデリング法による初期構造の構築により、野生型および変異を持つ EGFR 分子について、TKI 結合部位を中心として立体構造解析を行った。また、ポケット構造の動態のサンプリングによる構造ランドスケープ解析により、ポケット構造の揺らぎを二次元で表現し、野生型と変異型との俯瞰図を構築した。

### (3) 結合親和性予測

MOE 2014 (CCG 社) および ROCS (OpenEye 社) を用い、変異 EGFR 分子のポケット構造の形状と EGFR-TKI の形状の類似性をスコア化した。形状類似性スコアを横軸に、出現頻度を縦軸にとってグラフ化し、変異 EGFR に対する各種の EGFR-TKI の結合親和性を視覚化した。また、結合能の相対値について affinity level で比較した。

## 4. 研究成果

### (1) in vitro における変異 EGFR に対する各種 EGFR-TKI の効果

EGFR-TKI の効果を 5 段階の数値で示す EKI score は、表 1 ようになった。

## (2) 初期分子構造の構築

蛋白質立体構造解析の結果、野生型 EGFR 分子ではチロシンキナーゼ部位のポケットが広く、EGFR-TKI の一つであるエルロチニブとの結合が不安定な状態が見られた。それに対し、EGFR L858R 変異では R858 残基と D837 残基とのイオン結合によりポケット部位が縮小し、エルロチニブが結合しやすくなっている状態が認められた。構造ランドスケープ解析では、野生型 EGFR では二次元グラフ上で局在点が複数観測され、ポケットが複数の構造状態を持つためエルロチニブの結合が不安定となる可能性が示唆された。一方 EGFR L858R では、二次元グラフ上で単一の局在点が見られ、ポケットの揺らぎが減少しエルロチニブの分子サイズに適合した状態で安定化していることが予想された。

## (3) 結合親和性予測

L858R では、野生型(WT)EGFR に比べ、全ての TKI について、結合親和性が向上していた(分布が右にシフト)。一方、L858R+T790M は L858R 単独と比較して、結合親和性が低下していると予測された。これは、in vitro における阻害効果の傾向と一致していた。(図 1)

各種 TKI に対する affinity level で比較すると、WT で 0.3-0.6 であったのに対し、L858R で 0.6-1.3, del19 で 0.4-1.2 と結合能の増加が見られた。しかしながら、T790M 変異の付加により、両者の affinity level はそれぞれ 0.6-1.1, 0.3-1.0 と低下傾向を認めた。

V843I については、T790M と同様 TKI に対する耐性を生ずる変異であり、一部の TKI については T790M よりも耐性の程度が強い(親和性が低い)ことが予測された。これは in vitro の結果と一致していた。

また、TKI の間での比較では、第 3 世代 EGFR-TKI である osimertinib は第 1, 2 世代の EGFR-TKI に比べ、T790M 変異を有する EGFR に対し高い affinity level を示した。これは、in vitro での阻害効果の結果、および臨床効果とも一致する結果であった。

以上の結果から、我々が開発した動的分子結合シミュレーションモデルは、変異 EGFR に対する各種 EGFR-TKI の効果を概ね正確に予測でき、今後の EGFR-TKI 開発・創薬においてきわめて有用なツールになることが期待された。

この内容については、下記学会に報告した後、現在論文化の準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

大西宏明、大塚弘毅、松島早月、中村浩之、広川貴次、渡邊卓. 蛋白質立体構造解析と分子動力学に基づく EGFR 分子標的薬の効果予測. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会平成 28 年 9 月 1 日(木)~4 日(日)神戸国際会議場(神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 卓

ローマ字氏名：WATANABE Takashi

所属研究機関名：杏林大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00191768

研究分担者氏名：広川 貴次

ローマ字氏名：HIROKAWA Takatsugu

所属研究機関名：産業技術総合研究所

部局名：創薬分子プロファイリング研究センター分子シミュレーションチーム

職名：チーム長

研究者番号(8桁): 20357867

研究分担者氏名：中村 浩之  
 ローマ字氏名：NAKAMURA Hiroyuki  
 所属研究機関名：東京工業大学  
 部局名：科学技術創成研究院  
 職名：教授  
 研究者番号（8桁）：30274434

研究分担者氏名：大塚 弘毅  
 ローマ字氏名：OHTSUKA Kouki  
 所属研究機関名：杏林大学  
 部局名：医学部  
 職名：学内講師  
 研究者番号（8桁）：70439165

(2)研究協力者  
 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

表 1

EGFR 遺伝子変異	エルロチニブ	ゲフェチニブ	アファチニブ	ダコミチニブ	ロシレチニブ
WT	0-1	0-1	0-2	0-2	0-1
L858R	1-2	1-2	1-2	3	3
delE746-A750	2-4	1-3	2-4	3-4	2-3
L858R+T790M	0	0	1-2	0-1	2-3
delE746-A750+T790M	0	0	1-2	1	0-2
L858R+V843I	0	0	0	0	0

図 1

