

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13201  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K12202  
研究課題名（和文）分子シミュレーション解析と数理モデルによる肺がん分子標的薬の薬効予測の研究  
  
研究課題名（英文）Study of sensitivity prediction of molecular target drugs for non-small cell lung cancer by in silico molecular simulation analysis and a mathematical model  
  
研究代表者  
菅野 亜紀（Sugano, Aki）  
  
富山大学・学術研究部医学系・特命助教  
  
研究者番号：20457039  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤感受性（薬効）は、薬剤標的分子の遺伝子変異と関連することが知られている。本研究では、上皮成長因子受容体（EGFR）を標的とする、肺がん分子標的薬（EGFR-TKI）のゲフィチニブを対象に、EGFRの各変異型との薬物相互作用を分子シミュレーション解析により再現し、各変異型の薬物感受性に関わる特徴を解明した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、肺がん細胞で新規変異体の発見が続くEGFRに対して抗がん剤を選択する可否の判定を実現する手段を提供する点である。東アジアにおけるEGFR変異の頻度は高く、科学的な効果予測因子として認識されている。また、本研究の解析方法は、あらゆる分子標的薬の評価や創薬にも応用可能である。

研究成果の概要（英文）：Drug sensitivity (drug efficacy) is known to be associated with genetic mutations of drug target molecules. In this study, we used molecular simulation analysis to reproduce drug interactions between EGFR mutations and gefitinib, a molecular target drug for lung cancer (EGFR-TKI) that targets the epidermal growth factor receptor (EGFR), and elucidated the characteristics related to drug sensitivity of each mutant EGFR.

研究分野：構造生物学、生物統計学

キーワード：分子シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤は、副作用が少なく薬効が明らかであることが望ましいものの、一般的には臨床データに基づく経験によって使用される。近年になり、多くの遺伝子には多様な変異型が存在すること、特にがん化学療法で、薬物代謝酵素、薬物トランスポーター、薬剤標的分子の遺伝子変異が、薬物有害反応(副作用)や薬剤感受性(薬効)と関連することが判明しつつあり、一部については薬剤感受性と標的分子の遺伝子変異の関係が明らかになっている。そして、例えば肺がん分子標的薬は変異型上皮成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)の遺伝子検査結果に基づいて投与される。しかし、これまでがん細胞でのEGFRの遺伝子変異は多数報告されており年々報告件数は増加しており、一部の变異を除き変異EGFRの薬剤感受性は不明のままである。薬効や副作用は抗がん剤の標的や代謝に関する分子の変異型に左右され、新規変異型の影響は患者への投与後に判明するのが現状である。

我々はこれまでに、肺がん患者で新規に発見されたEGFR変異型の立体構造およびゲフィチニブ(商品名:イレッサ)との結合を*in silico*解析し、結合安定性と薬効の相関を見出した(1)。また、抗がん剤イリノテカン塩酸塩の副作用を分子シミュレーション解析と数理モデルで予測可能な解析手法を確立した(2)。そこで、これらの知見と解析手法を応用して、肺がん分子標的薬(EGFR-TKI)の薬効予測法を確立することとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、EGFR-TKIのうちゲフィチニブと各変異型EGFRとの薬物相互作用を、チロシンキナーゼ活性阻害の分子シミュレーション解析とその数理モデル化により明らかにする。具体的には、ゲフィチニブによるチロシンキナーゼ活性阻害を再現可能な解析条件や数理モデルを決定し、薬効不明の変異型EGFRを有する非小細胞肺がん細胞へのゲフィチニブの薬効を予測可能にする。そして、*in silico*での肺がん分子標的薬の薬効予測法を確立し、その他の薬剤の薬効予測法確立に道を拓く。

## 3. 研究の方法

本研究の分子シミュレーション解析に必要なEGFR2量体、ゲフィチニブ、ATPの立体構造は、各々PDBデータベース(<https://www.rcsb.org/>, <http://pdgj.org/>, <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>)、PubChemデータベース(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)から入手した。EGFR正常型および変異型の立体構造は、ホモロジーモデリングと構造最適化計算で解析した。ホモロジーモデリングは、MOEプログラム(Chemical Computing Group, Canada)を、構造最適化計算にはGROMACS(3)を用いた。EGFRの2量体は生体内での活性化状態の存在様式であり、その役割からレシーバーとアクティベータで構成される。そこで、EGFR2量体の立体構造解析は、正常型と変異型のヘテロ2量体(レシーバーが変異型)、正常型と変異型のヘテロ2量体(レシーバーが正常型)、変異型のホモ2量体、正常型のホモ2量体、の4解析を要し、1変異型あたり①~③の3分子の解析が必要である。

解析対象の変異型EGFRは、ゲフィチニブの薬効が既知の変異とした。その選定の際には、日本肺癌学会の「肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き」(4)の検査対象である変異型、臨床研究での報告件数の多い変異型、*in vitro*研究の細胞実験で報告されている変異型を参考にした。加えて、次のことにも留意した:臨床研究では、ゲフィチニブ投与後に標的病変が進行あるいは悪化したと報告されているEGFR変異型であっても、*in vitro*研究では効果的ながん細胞の生存抑制あるいは正常型EGFRより薬効感受性が高いなど、一致しない例が存在する(5-8)。これは、臨床では、抗がん剤投与時の患者の状態など、多くの要素が治療効果に関連することに加え、バイオプシーや薬効判定など様々な要素も関係するためである。*in vitro*研究は薬効の解析精度が高いと考えられるが、臨床例が存在しない変異型の薬剤感受性も報告されている(9)。

次に、EGFRとゲフィチニブ又はATPの分子ドッキングシミュレーションをMOEプログラム(Chemical Computing Group, Canada)を用いて行った。ドッキング結果を既報のX線結晶構造での結合様式(PDB ID: 3VJO, 2GS6, 2ITY)を参考に集計し、結合回数や結合安定性を指標に、薬剤感受性に関連があると思われる特徴を検討した。

## 4. 研究成果

EGFR2量体のうちレシーバーを対象にゲフィチニブとドッキングシミュレーションを100回行い、EGFRのATP結合部位にゲフィチニブが結合した回数を指標として、各変異型の薬剤感受性を数値化した。結合回数を集計する際は、ゲフィチニブの向きや既報のX線結晶構造で報告された相互作用するアミノ酸との位置関係も考慮した。

結合回数を指標にした変異型の薬剤感受性を図1に示す。変異型を*in vitro*研究で報告された薬剤感受性の有無で分類し、それぞれドッキングシミュレーション結果を基に算出した薬剤感

受性をプロットしたところ、EGFR(2量体)各変異型における3分子の平均値で比較した場合に薬剤感受性の閾値の存在が示唆された。

次にEGFRのATP結合部位を対象にゲフィチニブ、又はATPとドッキングシミュレーションを行った。そして、EGFRとゲフィチニブ、又はEGFRとATPの結合安定性の比を算出し、変異型で比較した。このシミュレーションの結果も既報の薬剤感受性と同様の傾向を示しており、今後さらに変異型を追加してシミュレーションを行う予定である。また、今回は3分子の平均値が既報の薬剤感受性と同様の結果を示したが、これらの分子の細胞における存在比を数理モデルで考慮すべきかが今後の検討課題となった。

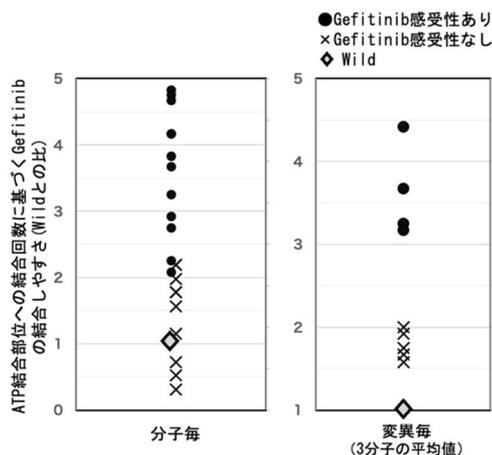


図 1. 分子シミュレーション結果

<参考文献>

- (1) Ogasawara M, Nakamura Y, Morikawa N, Nitana H, Moriguchi S, Chiba R, Saito H, Ohta M, Tanita T, Sugai T, Maeyama K, Yamauchi K, Takaoka Y. Analysis of a single-codon E746 deletion in exon 19 of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016 doi: 10.1007/s00280-016-3021-y.
- (2) Takaoka Y, Takeuchi A, Sugano A, Miura K, Ohta M, Suzuki T, Kobayashi D, Kimura T, Sato J, Ban N, Nishio H, Sakaeda T. Establishment of the experimental procedure for prediction of conjugation capacity in mutant UGT1A1. *PLoS One.* 2019 doi: 10.1371/journal.pone.0225244.
- (3) M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, and E. Lindahl, “GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers,” 2015, *SoftwareX*, 1–2 19–25.
- (4) 日本肺癌学会, バイオマーカー委員会, 肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き第 4.2 版 (2019 年 3 月 6 日)
- (5) Donovan MJ, Kotsianti A, Bayer-Zubek V, Verbel D, Teverovskiy M, Cordon-Cardo C, Costa J, Greco FA, Hainsworth JD, Parums DV. A systems pathology model for predicting overall survival in patients with refractory, advanced non-small-cell lung cancer treated with gefitinib. *Eur J Cancer.* 2009, 45(8):1518-26. doi: 10.1016/j.ejca.2009.02.004.
- (6) Mukohara T, Engelman JA, Hanna NH, Yeap BY, Kobayashi S, Lindeman N, Halmos B, Pearlberg J, Tsuchihashi Z, Cantley LC, Tenen DG, Johnson BE, Jänne PA. Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. *J Natl Cancer Inst.* 2005, 97(16):1185-94. doi: 10.1093/jnci/dji238.
- (7) Pilotto S, Bria E, Peretti U, Massari F, Garassino M, Pelosi G, Tortora G. Lung adenocarcinoma patient refractory to gefitinib and responsive to crizotinib, with concurrent rare mutation of the epidermal growth factor receptor (L861Q) and increased ALK/MET/ROS1 gene copy number. *J Thorac Oncol.* 2013, 8(12):e105-6. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182a00e37.
- (8) Yang S, Qu S, Perez-Tores M, Sawai A, Rosen N, Solit DB, Arteaga CL. Association with HSP90 inhibits Cbl-mediated down-regulation of mutant epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.* 2006, 66(14):6990-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1042.
- (9) Kohsaka S, Nagano M, Ueno T, Suehara Y, Hayashi T, Shimada N, Takahashi K, Suzuki K, Takamochi K, Takahashi F, Mano H. A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer. *Sci Transl Med.* 2017 doi: 10.1126/scitranslmed.aan6566.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamamura T, Horinouchi T, Adachi T, Terakawa M, Takaoka Y, Omachi K, Takasato M, Takaishi K, Shoji T, Onishi Y, Kanazawa Y, Koizumi M, Tomono Y, Sugano A et al	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of an exon skipping therapy for X-linked Alport syndrome with truncating variants in COL4A5.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Commun.	6. 最初と最後の頁 2777(1-8)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16605-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takaoka Y, Ohta M, Tateishi A, Sugano A, Nakano E, Miura K, Suzuki T, Nishigori C	4. 巻 9
2. 論文標題 In Silico Drug Repurposing by Structural Alteration after Induced Fit: Discovery of a Candidate Agent for Recovery of Nucleotide Excision Repair in Xeroderma Pigmentosum Group D Mutant (R683W)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 249(1-10)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9030249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takaoka Y, Takeuchi A, Sugano A, Miura K, Ohta M, Suzuki T, Kobayashi D, Kimura T, Sato J, Ban N, Nishio H, Sakaeda T	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of the experimental procedure for prediction of conjugation capacity in mutant UGT1A1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0225244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takaoka Y, Sugano A, Morinaga Y, Ohta M, Miura K, Kataguchi H, Kumaoka M, Kimura S, Maniwa Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Prediction of infectivity of SARS-CoV2: Mathematical model with analysis of docking simulation for spike proteins and angiotensin-converting enzyme 2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microb Risk Anal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mran.2022.100227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高岡 裕  (Takaoka Yutaka)  (20332281)	富山大学・学術研究部医学系・教授   (13201)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	大田 美香  (Ohta Mika)  (20274706)	富山大学・学術研究部医学系・特命助教   (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------