

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06594

研究課題名(和文) 分子動力学計算と情報科学的解析による、ALK遺伝子変異に伴う薬剤応答性予測

研究課題名(英文) Drug sensitivity prediction for anaplastic lymphoma kinase mutants using molecular dynamics simulation and its informatics analysis

研究代表者

荒木 望嗣 (Araki, Mitsugu)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：10452492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非小細胞肺がんの薬剤耐性に着目し、anaplastic lymphoma kinase (ALK) 遺伝子変異に伴う分子標的薬剤の応答性変化をコンピューター上で予測する方法論を開発・実装した。3種類のALK阻害薬(クリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブ)を対象に、ALK変異体-阻害剤複合体(180変異体×3薬剤)の分子動力学(MD)シミュレーション及び薬剤の結合自由エネルギー計算を実施し、3種の薬剤全てに対して結合親和性が低下した変異体3種を多剤耐性変異体候補として抽出した。これらの変異体の薬剤応答性を実験的に測定したところ、2種類の変異体で実際に全ての薬剤の応答性が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、患者個人のゲノムに基づいて最適な治療を提供する「個別化医療」が注目されているものの、患者のゲノム配列で同定された遺伝子変異の90%以上は機能的意義が不明である。本研究は、どの変異ががんの薬剤耐性化に寄与しているのかを推定可能にする点で、計算科学駆動型医療の先駆けとなる取り組みである。更に、本法によって推定した薬剤耐性の分子メカニズム及び変異体の立体構造情報は、耐性を克服する新薬の分子設計に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on drug resistance of non-small cell lung cancer (NSCLC), and developed a computational method for predicting mutation-induced drug sensitivities of anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors.

First, targeting three ALK inhibitors (crizotinib, alectinib, ceritinib), we performed molecular dynamics (MD) simulation of the ALK mutant-inhibitor complex (180 single mutants x 3 drugs) and computed the binding free energies of these drugs for each mutant. Next, three ALK mutants with reduced binding affinity for all the drugs were extracted as candidates for multidrug-resistant mutants. When the drug responsiveness of these mutants was experimentally measured, those of two mutants was reduced for all the drugs.

研究分野：創薬計算科学

キーワード：非小細胞肺がん ALKキナーゼ 薬剤耐性変異 分子動力学シミュレーション タンパク質-化合物結合親和性 統計解析

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

近年、臨床情報が充実してきており、同じ薬剤を投与しても患者によって薬剤応答性、副作用発現が異なる事が分かってきた。例えば抗癌剤の場合、同じ薬剤を投与し続けるうちにやがて薬効が消失するという癌の薬剤耐性の問題があるが、耐性を起こす薬剤の種類やその起こり方は個人によって様々である。更に、着実に蓄積されてきた個人ゲノム情報の集団レベルでの解析によって、一塩基多型 (SNP) や配列繰り返し数の多型 (CNV) などゲノム多様性が報告され、ゲノム個人差が薬剤応答性の違いを生み出していることが明らかになってきた。しかし、その大半の作用機序は現状不明であり、ゲノム個人差による薬剤応答性の分子メカニズムを正確に理解することで初めて薬剤耐性を克服するための薬剤分子設計や治療方針の提案が可能となる。ここで、標的タンパク質と薬剤の共結晶構造や結合親和性を測定するのに数か月～数年単位の時間を要するため、症例として報告されている膨大な数の SNP や突然変異に対して作用機序を一つ一つ実験的に検証することは現実的ではない。このような経緯から、計算科学的なアプローチによって薬剤応答性の分子メカニズムを迅速に明らかにすることが求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、非小細胞肺癌 (NSCLC) の薬剤耐性に着目し、anaplastic lymphoma kinase (ALK) 遺伝子変異に起因する分子標的薬剤の応答性変化をコンピューター上で高精度に予測することを研究目的とする。具体的には、未知のアミノ酸変異を含めた ALK 一塩基置換体の分子動力学シミュレーションを実施し、得られた膨大な原子座標・エネルギーデータから薬剤結合に重要に関わる構造的特徴量を情報科学的に抽出することによって、遺伝子タイプの違いによる薬剤応答性の変化を推定する。

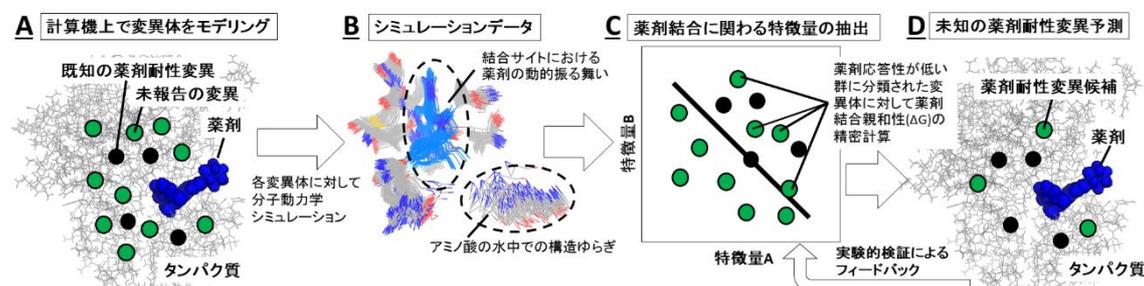


図1 ALK 遺伝子変異に起因する薬剤応答性変化の予測フロー

### 3. 研究の方法

本研究では、まず既知の薬剤耐性変異体に加えて ALK1 塩基置換体を網羅的に発生させ (図 1 A)、各々の分子動力学シミュレーションを実施する (図 1 B)。次に、得られた分子動力学データを統計解析する事で薬剤結合に重要に関わる特徴量を抽出し (図 1 C)、最終的に G 計算によってアミノ酸変異に伴う薬剤応答性の変化を定量する (図 1 D)。予測した変異体の一部の薬効を実験的に検証し、その結果を予測プログラムにフィードバックすることで、薬剤耐性変異を高精度に予測する方法論を完成させる。詳細な計画を下記に述べる。

#### (1) ALK 遺伝子一塩基置換体 (群) に対する分子動力学シミュレーションの実施

まず、ALK 阻害薬に対して薬剤耐性を引き起こす事が知られている既知の ALK 遺伝子変異情報と ALK family の一次配列情報を利用して、薬剤結合に影響を与えうるアミノ酸を 8 9 種類抽出した。続いて、ALK タンパク質 (野生型) と ALK 阻害薬 (crizotinib, alectinib, ceritinib) の共結晶構造 (PDB ID=2XP2:crizotinib, 3AOX:alectinib, 4MKC:ceritinib) に基づいて 1 アミノ酸置換体 180 種の立体構造モデリングを行ったのち、水中でのタンパク質-薬剤結合の動的性質を評価するために、ALK 変異体-薬剤複合体の分子動力学シミュレーションを実施した。1 単位のシミュレーション時間は 50ns とし、ALK 変異体-薬剤 1 ペアに対して原子初速度を変化させて独立に 3 本実施した。シミュレーション時間の合計は 81  $\mu$ s (=50ns  $\times$  3  $\times$  180 変異体  $\times$  3 薬剤) であった。これらは比較的大規模な計算量であったが、「京」コンピューター (ポスト「京」研究開発機) を利用して並列実行する事で、全てのシミュレーションが予定通り完了した。

#### (2) 分子動力学データの統計解析による、薬剤応答性に重要に関わる構造的特徴量の抽出

既知の薬剤耐性変異体及び 1 アミノ酸置換体 180 種のシミュレーションデータを統計解析することにより、薬剤応答性への影響度が高い特徴量を抽出した。まず、ALK 野生型と各変異体の MD トラジェクトリを結合し、薬剤を構成する各々の原子に対して xyz 座標を対象とした主成分分析 (PCA) を行い、第一主成分 (PC1) を抽出した。次に、野生型と変異体間で PC1 の平均の差・分散の比を検定し、野生型と比較して薬剤構成原子の 25% 以上で薬剤結合位置・揺らぎが優位に変化した変異体を薬剤耐性候補として抽出した。更に、アンサンブル型分子動力学シミュレーション

ュレーションによってタンパク質-薬剤の結合自由エネルギーを計算する MP-CAFEE 法を用いることで、各変異体に対する薬剤の結合親和性を推定し、補酵素である ATP の結合親和性も算出することで、ATP に対する薬剤の相対的な結合安定性を評価した。

### (3) 薬剤耐性変異体候補の実験的検証

3種の薬剤全てに対して結合親和性が低下した多剤耐性変異体候補を対象に、各薬剤の応答性を実験的に測定した。具体的には、各変異を有する EML4-ALK 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞株を使用して 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を測定した。この部分は(公財)がん研究会・がん化学療法センターの片山量平博士に支援を得て実施した。

## 4. 研究成果

ALK1 アミノ酸置換体-阻害剤複合体(180 変異体×3 薬剤)の分子動力学 (MD) シミュレーションデータを解析したところ、3種の薬剤全てに対して結合に有意な変化が見られたのは 31/180 変異体であった。そこで、これらの変異体群を対象に、MP-CAFEE 法によって薬剤の結合親和性 (結合自由エネルギー) を算出したところ、1種の薬剤に対して結合親和性が低下したのは 11 変異体であり、2種の薬剤に対して結合親和性が低下したのは 3 変異体であった。本計算結果より選抜した薬剤耐性・非耐性変異体候補 19 種を対象に、各 ALK 変異体を恒常的に発現する Ba/F3 細胞株を樹立した。その結果、19種類の細胞株のうち 16種類においては、薬剤非存在下においても ALK の自己リン酸化が認められず、これらの ALK 変異体はキナーゼとして正しく機能していない可能性が示唆されたため、現状の予測プロトコールに対して、キナーゼとして機能を維持する一方で薬剤耐性となる変異のみを抽出するするための改良が求められた。

そこで、ALK と近縁関係にあるキナーゼ 164 種の配列情報を用いることでキナーゼ機能の保持に重要な残基を推定し、これらの残基は耐性変異予測の対象外とするように予測プロトコールを改良した。次に、改良版プロトコールに従って薬剤結合に影響を与えるアミノ酸を抽出した後、上記プロトコールに従って、ALK 変異体-阻害剤複合体の分子動力学 (MD) シミュレーション、MD シミュレーションデータの統計解析、薬剤の結合自由エネルギー計算を行って、薬剤耐性変異体候補を再度抽出した。分子動力学 (MD) シミュレーションが正常に完了した ALK 変異体 177 種のシミュレーション結果を解析したところ、3種の薬剤 (crizotinib, alectinib, ceritinib) の全てに対して結合状態 (結合位置あるいは構造揺らぎ) が変化した変異体は 17 種類であり、このうち薬剤と接触していないアミノ酸の変異は 11 種類含まれていた。これらの中から薬剤耐性変異/ドライバー変異と知られている変異体を除いた 7 種類を未知の多剤耐性変異候補として抽出し、各薬剤の結合自由エネルギーを精密に計算して野生型の値と比較したところ、3種類の変異体では全ての薬剤に対して結合親和性が低下し、残り 4 種類の変異体では 2つの薬剤に対して結合親和性が低下する結果となった。

これらの変異体の薬剤応答性を研究協力者である(公財)がん研究会・がん化学療法センターの片山量平博士に支援を得て測定したところ、薬剤 3 種に対して結合親和性が低下すると予測した変異体 3 種のうち、実際に全ての薬剤の応答性が低下した変異体は 2 種類であった。代表的な変異体 (変異体 A) に対する実験結果を図 2 に示す。以上の実験結果より、本研究で開発した予測プロトコールの計算精度は 67% (=2/3) と見積もられた。

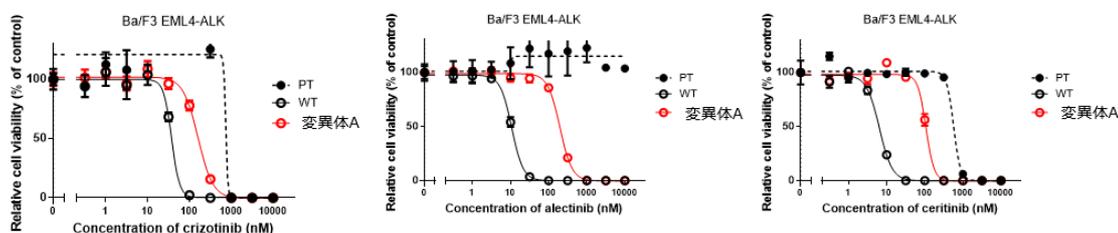


図 2 薬剤濃度に依存した Ba/F3 細胞の生存率のプロット。EML4-ALK 融合遺伝子を導入していない Ba/F3 細胞の生存率を  $\bullet$  で示した。一方、EML4-ALK (野生体、変異体) 融合遺伝子を導入した細胞の生存率をそれぞれ  $\circ$ 、 $\circ$  で示した。

また、上記のシミュレーション手法を応用することで、PIK3CA, ALK, EGFR といったがん遺伝子上の変異に起因するタンパク質活性異常あるいは薬剤耐性獲得の分子メカニズムを推定し、論文発表に至った。また、タンパク質に対する薬剤の結合ポーズ・結合経路を推定するシミュレーション手法、タンパク質変異による薬剤結合親和性の変化を直接的に計算する新たなシミュレーション手法、を開発して論文発表に至った。更に、非小細胞肺癌 (NSCLC) における薬剤耐性獲得メカニズムに関する総説を発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto S, Araki M, Isaka Y, Ono F, Hirohashi K, Ohashi S, Muto M, Okuno Y.	4. 巻 119(3)
2. 論文標題 E487K-Induced Disorder in Functionally Relevant Dynamics of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 628-637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Yuki Saito, Junji Koya, Mitsugu Araki, Yasunori Kogure, Sumito Shingaki, Mariko Tabata, Marni B. McClure, Kota Yoshifuji, Shigeyuki Matsumoto, Yuta Isaka, Hiroko Tanaka, Takanori Kanai, Satoru Miyano, Yuichi Shiraishi, Yasushi Okuno, Keisuke Kataoka	4. 巻 582
2. 論文標題 Landscape and function of multiple mutations within individual oncogene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 95-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Fumie Ono, Shuntaro Chiba, Yuta Isaka, Shigeyuki Matsumoto, Biao Ma, Ryohei Katayama, Mitsugu Araki, Yasushi Okuno	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Improvement in predicting drug sensitivity changes associated with protein mutations using a molecular dynamics based alchemical mutation method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Okada K, Araki M, Sakashita T, Ma B, Kanada R, Yanagitani N, Horiike A, Koike S, Oh-hara T, Watanabe K, Tamai K, Maemondo M, Nishio M, Ishikawa T, Okuno Y, Fujita N, Katayama R	4. 巻 41
2. 論文標題 Prediction of ALK mutations mediating ALK-TKIs resistance and drug re-purposing to overcome the resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 105-119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Ikeda A, Funakoshi E, Araki M, Ma B, Karuo Y, Tarui A, Sato K, Okuno Y, Kawai K, Omote M.	4. 巻 27(9)
2. 論文標題 Structural modification of indomethacin toward selective inhibition of COX-2 with a significant increase in van der Waals contributions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1789-1794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Bekker, G; Araki, M; Oshima, K; Okuno, Y; Kamiya, N	4. 巻 123(11)
2. 論文標題 Dynamic Docking of a Medium Sized Molecule to its Receptor by Multicanonical MD Simulations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2479-2490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Araki Mitsugu, Iwata Hiroaki, Ma Biao, Fujita Atsuto, Terayama Kei, Sagae Yukari, Ono Fumie, Tsuda Koji, Kamiya Narutoshi, Okuno Yasushi	4. 巻 39
2. 論文標題 Improving the Accuracy of Protein-Ligand Binding Mode Prediction Using a Molecular Dynamics-Based Pocket Generation Approach	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Computational Chemistry	6. 最初と最後の頁 2679 ~ 2689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcc.25715	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 -

1. 著者名 荒木望嗣, 奥野恭史	4. 巻 16
2. 論文標題 非小細胞肺癌 (NSCLC) における薬剤耐性獲得メカニズムの予測.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 がん分子標的治療	6. 最初と最後の頁 53-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mitsugu Araki and Yasushi Okuno
2. 発表標題 Effect of conformational flexibility of protein-ligand binding free energy computation and its significance in predicting mutation-induced drug sensitivity changes in oncogenic kinases
3. 学会等名 ACS Fall 2020 Virtual Meeting & Expo (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒木望嗣, 奥野恭史
2. 発表標題 スパコンを用いたタンパク質-化合物結合親和性の高精度予測と医療・創薬への応用
3. 学会等名 第48回構造活性相関シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsugu Araki and Yasushi Okuno
2. 発表標題 Protein-drug binding mode prediction from the apo-protein structure using a molecular dynamics-based pocket generation approach
3. 学会等名 Biophysical Society 64th annual meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsugu Araki and Yasushi Okuno
2. 発表標題 Protein-ligand binding mode prediction from the apo-protein structure using a molecular dynamics-based pocket generation approach
3. 学会等名 Fall 2019 ACS National Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsugu Araki and Yasushi Okuno
2. 発表標題 DRUG RESISTANCE INDUCED BY LOCAL AND ALLOSTERIC CONFORMATIONAL CHANGES IN ONCOGENIC TYROSINE KINASES.
3. 学会等名 Biophysical Society 63rd annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsugu Araki and Yasushi Okuno
2. 発表標題 Drug resistance acquired by local and allosteric conformational changes in oncogenic tyrosine kinases
3. 学会等名 Spring 2019 ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	片山 量平  (Katayama Ryohei)  (60435542)	公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・部長   (72602)	

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
---------	---------