

分子動力学シミュレーションによる臨床ゲノム情報からの薬剤反応性予測

池口茉莉恵^{†1} 濱谷枝里^{†1} 鎌田真由美^{†2} 荒木望嗣^{†2} 奥野恭史^{†1}

概要：近年、個々人のゲノム背景に基づいて最適な治療や予防の選択を行う「ゲノム医療」が、臨床に適応されつつある。特にがんでは、ゲノム変異による薬剤感受性の違いや薬剤耐性獲得がよく知られており、ゲノムの違いに起因する薬剤親和性の変化やその機序を明らかにすることが重要である。そこで我々は分子動力学シミュレーションによる結合自由エネルギー計算に基づく薬剤親和性の予測手法の開発を行ってきた。本研究では、2つのがん遺伝子 Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) と Janus activating kinase 2 (JAK2) の薬剤感受性既知の変異に対して提案手法を適用し、その有効性について検証を行った。計算により得られた結合自由エネルギーと実験による薬剤感受性の比較から、HER2 での予測では実験値の傾向を再現することが認められた一方、JAK2 ではその傾向が認められなかった。計算結果の解析から、構造モデリング手法や対象薬剤との結合様式を考慮した計算プロトコルの改良が必要であることが示唆された。

キーワード：がん遺伝子、MD シミュレーション、薬剤親和性予測、in silico

1. 背景

近年、個々人のゲノム背景に基づいて最適な治療や予防の選択を行う「ゲノム医療」が、臨床現場でも実現されつつある。特にがんでは、ゲノム変異による薬剤感受性の違いや薬剤耐性の獲得が知られており、ゲノムの違いと疾患および薬剤親和性の変化の関係をj知ることとはとても重要である。現在我々は、AMED「臨床ゲノム情報統合データベース整備事業」において、日本人集団における疾患関連ゲノム情報とそれに付随する臨床情報を疾患横断的に統合するデータベースの開発を行っている。しかし、疾患や薬剤に対する機序不明な変異が未だ数多く存在し、ゲノム医療実現の障壁となっている。特に、膨大な数の変異と薬剤の組み合わせに対して薬剤親和性を生化学的実験で明らかにするには、多くの時間とコストが必要となる。そこで、我々は分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) シミュレーションを用いた結合自由エネルギー計算によって、変異体と薬剤間の薬剤親和性を予測する方法を開発し、これまでいくつかの系でその有効性を確認してきた[1][2]。本研究では、2つのがん遺伝子 HER2 と JAK2 を対象に、提案手法の有効性について検証を行った。

2. 方法

(1) 予測対象

本研究では、以下の2遺伝子に対して、現在分子標的薬として使用されている薬剤との変異体-薬剤間の親和性予測を行った。対象変異は、京都大学医学部附属病院で実施されているクリニカルシーケンス (OncoPrime) で検出されており、かつ既報論文で対象薬剤との親和性が実験的に確認されているものを用いた。

- HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) は、日本人集団の中で高頻度に変異が確認されるがん遺伝子であり、乳がんのバイオマーカーとして使用される。本研究では、3種類の単一変異体 (V773A, T862A, H878Y) 及び EGFR/HER2 二重チロシンキナーゼ阻害剤 Lapatinib を対象

とした。

- JAK2 (Janus Activating Kinase 2) は、血液細胞の増殖や分化を調節するサイトカインシグナルの伝達を担う細胞質型チロシンキナーゼであり、造血器腫瘍において変異が認められる。本研究では、2種類の単一変異体 (R564Q, V617F) と野生型及び JAK2 阻害剤 Ruxolitinib を対象とした。

(2) 変異体-対象薬剤の複合体構造モデリング

本研究では、HER2 と JAK2 の野生型立体構造に対して、神戸先端医療振興財団が開発したシミュレーションソフトウェア K4 を通じてドッキングシミュレーションにより薬剤との複合体構造をモデリングし、Discovery Studio[3]の amino acid replacement機能を用いて変異体の構造モデルを作成した。

HER2-Lapatinib 複合体構造モデルの作成には、野生型 HER2 と EGFR/HER2 二重チロシンキナーゼ阻害剤 TAK-285 との共結晶構造 (PDB-ID:3PP0) を用いた。Lapatinib と TAK-285 は同じポケットで HER2 と結合することから、これらの共通部分構造に着目し、構造の重ね合わせに基づき Lapatinib を配置し、HER2-Lapatinib 複合体を形成した。

JAK2-Ruxolitinib 複合体の作成には、野生型 JAK2 と ATP との共結晶構造 (PDB-ID:4FVQ) 及び JAK2 と同じのチロシンキナーゼである Src の Ruxolitinib 複合体構造 (PDB-ID:4U5J) を用いた。上記2構造の重ね合せから、ATP 結合ポケットと Ruxolitinib 結合ポケットが同一であると推測された為、JAK2-ATP 複合体構造の ATP 結合ポケットを対象に Ruxolitinib のドッキングポーズを作成した。得られたドッキングポーズから、4U5J における結合ポーズとの RMSD 値が最も小さくなる結合ポーズを選出した。

(3) MD シミュレーションと結合自由エネルギー計算

先行研究[1]で提案する MPCAFFEE 法[4] (Massively Parallel Computation of Absolute binding Free Energy) のプロトコルに基づき、結合自由エネルギー計算を実施した。計算プロトコルは以下の通りである。まず、変異体立体構造モデルの歪みを取り除くために、複合体構造及び薬剤分子の各々に対して MD シミュレーション (平衡化計算) を実

^{†1} 京都大学

^{†2} 京都大学大学院医学研究科

施した。そして、タンパク-薬剤のエネルギープロファイルに基づき、エネルギー的に安定な構造を選出し、その構造を初期構造として非平衡化計算を行うことによりタンパク質と化合物の結合自由エネルギー (ΔG_{bind}) を次の通りに求めた。複合体に対する自由エネルギー ($\Delta G_{\text{complex}}$) とリガンド化合物に対する自由エネルギー (ΔG_{ligand}) を各々計算し、式 (1) により ΔG_{bind} を算出できる。

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{complex}} - \Delta G_{\text{ligand}} \dots (1)$$

なお MPCAFFEE 法は、複合体状態からタンパク質と化合物の解離状態への遷移過程を複数の状態遷移過程に分割し、各々の状態に対して独立 (並列) に計算を行うことが可能であるため、大規模な並列化計算が可能である。本研究では、スーパーコンピュータ「京」[5]を用いた。

(4) 結果の検証

実験的に測定された薬剤の阻害活性値 (IC_{50}) と、本研究の計算により得られた ΔG_{bind} の傾向を比較し、予測結果を検証した。HER2 は Kancha RK ら[6], JAK2 は Etheridge SL ら[7][8]によって報告されている IC_{50} 値を用いた。

3. 結果・考察

本研究では平衡化計算として、複合体では5つのランダムな初速度に対して、リガンド分子では3初速度に対してそれぞれ50nsと20nsのMDシミュレーションを実施した。MDシミュレーションには Gromacs 4.6.5 [9]を用いた。得られる各々のエネルギープロファイルから、最安定な構造を選出し、MPCAFFEE 法により結合自由エネルギーを推定した。HER2 及び JAK2 に対して得られた ΔG_{bind} と既報の IC_{50} の値を、表1に示す。

	HER2			JAK2		
変異	H878Y	T862A	V773A	R564Q	V617F	野生型
$\Delta G_{\text{complex}}$	-81.04	-71.73	-71.6	-29.13	-28.3	-29.01
ΔG_{ligand}	-50.84 (Lapatinib)			-18.6 (Ruxolitinib)		
ΔG_{bind}	-30.2	-20.89	-20.76	-10.53	-9.7	-10.41
IC_{50}	14*	125*	146*	15.2**	114.7** /200***	250***

表1 HER2, JAK2 における ΔG_{bind} 値と IC_{50} 値。*は文献[6],

は文献[7], *は文献[8]に記載されている IC_{50} 値である。

結果的に、HER2 変異体3種に対する ΔG_{bind} 値の傾向と既報の IC_{50} 値の傾向に相関が認められた。このことから、本研究で得られた結合自由エネルギー算出結果の妥当性を確認できた。一方、JAK2 の2変異に対する結果では、 ΔG_{bind} 値の傾向と既報の IC_{50} 値の傾向に相関を認めることができなかった。これらの結果より、対象タンパク質によって予測精度が異なり、これにはタンパク質構造の違いや変異部位の違いが関連していると考えられた。予測精度を高めるためには、シミュレーション時間や薬剤結合構造のモデリング手法など、個々のタンパク質及び薬剤の特性に合わせ

た対策が必要であることが示唆された。

4. 結論

本研究では、分子動力学計算に基づく結合自由エネルギー計算プロトコルを用いて、2つのがん遺伝子産物 HER2 と JAK2 に対して、薬剤との結合親和性予測を行った。HER2 では単一変異体3種、JAK2 では単一変異体2種に対して結合自由エネルギーを推定し、既報論文で示された実験値と比較し計算結果の評価を行った。その結果、HER2 に対する計算では、推定結果と実験値の間に相関を認めることが出来たが、JAK2 については十分な妥当性を示せなかった。対象タンパク質によって予測精度が異なることから、複合体初期構造のモデリング手法の精密化やシミュレーション時間の長時間化が必要であると考えられた。今後、本法を様々な系に適用し、対象タンパク質によらず薬剤応答性を精度高く予測できる方法論へと改良する予定である。

謝辞

OncoPrime との共同研究の機会をいただいた京都大学医学部附属病院 武藤学教授に感謝申し上げます。また、本研究に対して多数のご助言をいただいた神戸先端医療振興財団の馬彪先生、井阪悠太先生に感謝申し上げます。本研究は、文部科学省ポスト「京」重点課題1「生体分子システムの機能制御による革新的創薬基盤の構築」の一環として実施したものです。また、分子動力学計算には、情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所が有する遺伝研スーパーコンピュータシステム、及び理化学研究所のスーパーコンピュータ「京」を利用しました (課題番号: hp170275)

参考文献

- [1] Araki M, Kamiya N, Sato M, Nakatsui M, Hirokawa T, Okuno Y (2016). The Effect of Conformational Flexibility on Binding Free Energy Estimation between Kinases and Their Inhibitors. *J.Chem. Inf. Model.*, 2016, 56 (12), pp 2445-2456
- [2] Brown JB, Nakatsui M, Okuno Y (2014) Constructing a Foundational Platform Driven by Japan's K Supercomputer for Next-Generation Drug Design. *Mol Inform.* 2014 Dec;33(11-12):732-41.
- [3] BIOVIA (2017). Discovery studio. <http://accelrys.com/> (accessed 2017-12-5)
- [4] H. Fujitani, Y. Tanida, A. Matsuura. (2009). Massively parallel computation of absolute binding free energy with well-equilibrated states. *Phys. Rev. E*, 79
- [5] RIKEN AICS (2017). K computer. <http://www.aics.riken.jp/en/k-computer/about/> (accessed 2017-12-5)
- [6] Kancha RK, von Bubnoff N, Bartosch N, Peschel C, Engh RA, Duyster J(2011). Differential Sensitivity of ERBB2 Kinase Domain Mutations towards Lapatinib. *PLoS One*, 10, 6
- [7] Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V, Corbo LM, Roh ME, Seeliger MA, Chan EL, Hitchcock IS. (2012). A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood*. 2014 Feb 13;123
- [8] Meyer SC, Keller MD, Chiu S, Gaul C, Radimerski T, Levine RL (2015) CHZ868, a Type II JAK2 Inhibitor, Reverses Type I JAK Inhibitor Persistence and Demonstrates Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell* 28, 15-28
- [9] GROMACS (2017). GROMACS. <http://www.gromacs.org/> (accessed 2017-12-5)