

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）広川貴次
（英語）Takatsugu Hirokawa

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人筑波大学 医学医療系 生命医科学域・
（英語）Division of Biomedical Science, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

II 補助事業の概要

本提案では、創薬標的タンパク質を中心に、ホモロジーモデリング、ドッキング計算（タンパク質-タンパク質、タンパク質-低分子、タンパク質-核酸、核酸-低分子）、分子動力学計算等の要素技術に基づいた分子モデリングおよびシミュレーションを統合的に活用した実用性の高いインシリコ創薬の支援研究と高度化研究を行い、構造生物学データと創薬研究の橋渡しを目的として各課題に取り組んだ。

(1) 支援

代表的な創薬標的タンパク質の GPCR、イオンチャネル、核内受容体、プロテアーゼを始め、創薬標的として難易度の高いタンパク質-タンパク質相互作用や、核酸標的、そして実施内容についてもホモロジーモデリングから結合パルスウェイシミュレーションまで、本提案の「要素技術の統合化戦略で、幅広い創薬支援課題に対して支援する」という特徴を十分に活かした支援が達成された。関連する論文は、23 報となる。支援に関する誌上発表済の成果を標的と実施内容で分類した結果を表 1 に示す。

表 1 創薬標的分子と実施内容および成果論文

標的タンパク質ファミリー	実施内容	発表論文
G タンパク質共役型受容体	ホモロジーモデリング、ドッキング、MD 計算、構造活性相関解析	1、2、11、20、28
	ドッキング、MD 計算、化合物結合パルスウェイシミュレーション (MD)	7
イオンチャネル	MD 計算、化合物結合パルスウェイシミュレーション、薬剤耐性メカニズム解析、QM-MM 計算	5、18
核内受容体-化合物相互作用	MD 計算、変異体モデリング、化合物相互作用計算	19、25
タンパク質-タンパク質相互作用 制御化合物探索	タンパク質-タンパク質ドッキング、ポケット解析、インシリコスクリーニング（ドラッグリポジショニング）	9、21
タンパク質-タンパク質相互作用 天然物の作用メカニズム解析	ドッキング、MD 計算、構造活性相関、ケモインフォマティクス（化合物の配座解析）	3
ペプチド・構造機能解析（タンパク質相互作用、膜透過性）	ドッキング、MD 計算、構造活性相関	22
核酸-低分子相互作用	ループ構造サンプリング（核酸）、ドッキング、構造活性相関、分子デザイン提案	6、8
プロテアーゼ阻害剤探索 (COVID-19 関連)	ドッキング、インシリコスクリーニング（ドラッグリポジショニング）	27
ミトコンドリア局在タンパク質 の機能解析	ホモロジーモデリング、MD 計算	10、15、23、26
赤痢アメーバの膜タンパク質	バイオインフォマティクス解析（主に配列解析）	13、14

発表論文

1. Wada Y. et al. J Med Chem. 2017 Apr 27;60(8):3252-3265.
2. Sayama M. et al. J Med Chem. 2017 Jul 27;60(14):6384-6399.

3. Okamoto N. et al. J Biol Chem. 2017 Sep 15;292(37):15378-15394.
4. 広川貴次、構造データと分子シミュレーション技術によるインシリコ創薬支援研究、アンサンブル (分子シミュレーション研究会)、2017年、19巻、4号、225頁～229頁
5. Sakai Y. et al. Microbiol Immunol. 2018 Jan;62(1):34-43.
6. Ma Y. et al. Org Biomol Chem. 2018 Oct 17;16(40):7375-7382.
7. Toyoda Y. et al. Nat Chem Biol. 2019 Jan;15(1):18-26.
8. Ma Y. et al. Molecules. 2019 Jan 11;24(2). pii: E263.
9. Shiba-Ishii A. et al. Clin Cancer Res. 2019 May 1;25(9):2809-2820.
10. Sakaue H. et al. Mol Cell. 2019 Mar 7;73(5):1044-1055.e8.
11. Nakagita T. et al. PLoS One. 2019 Mar 18;14(3):e0213552.
12. Yamasaki S. et al. J Comput Aided Mol Des. 2019 May;33(5):497-507.
13. Santos HJ. et al. Genes (Basel). 2019 May 13;10(5). pii: E367.
14. Santos HJ. et al. FEBS J. 2019 Sep;286(17):3416-3432. doi: 10.1111/febs.14870.
15. Araiso Y. et al. Nature. 2019 Nov;575(7782):395-401.
16. Nakai K. et al. Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology, chapter: Prediction of Protein Localization, volume 2, 53-59, 2019
17. 広川貴次、「スーパーコンピューターを用いた分子シミュレーションとインシリコ創薬」、月刊 細胞 The CELL、ニューサイエンス社、51巻7号、pp.16～19、2019年
18. Adachi K. et al. Chemistry. 2020 Feb 11;26(9):2025-2033. doi: 10.1002/chem.201904184.
19. Koiwai K. et al. J Biol Chem. 2020 May 15;295(20):7154-7167.
20. Nakagita T. et al. Chem Senses. 2020 Nov 7;45(8):667-673.
21. Shin WH. Et al. Adv Appl Bioinform Chem. 2020 Nov 12;13:11-25.
22. Sakamoto K. et al. Sci Rep. 2020 Dec 10;10(1):21671. doi: 10.1038/s41598-020-78712-5.
23. Araiso Y. et al. FEBS J. 2020 Dec 10. doi: 10.1111/febs.15661. Online ahead of print.
24. 広川貴次、「創薬支援のための膜タンパク質 - 化合物ドッキングシミュレーション」、膜タンパク質ハンドブック、pp.170-178、エヌ・ティー・エス、2020年
25. Koiwai K. et al. J Pestic Sci. 2021 Feb 20;46(1):75-87.
26. Takeda H. et al. Nature. 2021 Feb;590(7844):163-169.
27. Ohashi H. et al. iScience. 2021 Apr 23;24(4):102367.
28. Misawa K. et al. J Mol Graph Model. 2021 Apr 5;106:107914.

支援研究において、本課題の特徴が生かされた顕著な成果として、支援研究「課題番号 400 : Stratifin を標的とした初期肺腺癌治療薬の開発 (筑波大学)」について詳細を述べる。本支援内容とその成果は、①本提案の戦略を最大限に活用した実施内容、②BINDS 重点項目「創薬を意識した明確な目標の設定」において、新規標的分子、高難度のタンパク質-タンパク質相互作用創薬、医薬品創製に実現可能性の高いドラッグリポジショニングの要素を備えており、③インシリコスクリーニングにより、マウス実験による抗腫瘍活性化合物の同定に成功、④論文発表済 (Clin Cancer Res 誌)、⑤特許出願済み、⑥国際肺癌学会発表、⑦プレスリリース (2019年2月7日、筑波大学)、⑧創薬ブースターの支援テーマ候補、の目標を達成していることが、顕著な成果と判断した理由である。以下に実施内容と成果の概要を述べる。支援の実施内容は、筑波大学で同定された、初期肺腺癌に特異的に発現する標的タンパク質間相互作用を標的に、その阻害薬を探索することを目標に、①標的タンパク質間相互作用

用予測、②ドラッグアブル（機能）部位予測、③バーチャルスクリーニングの3段階を行った（図1）。

標的タンパク質相互作用予測では、本疾患の標的タンパク質である SFN と SKP1 の立体構造を PDB より取得し、タンパク質-タンパク質ドッキング計算により SFN-SKP1 複合体を予測した。そ

の結果、相互作用エネルギーや出現するポーズのクラスタリング解析から、上位2結合ポーズが有意な複合体構造と判断された。SFNは、二量体構造を形成していることから、両サイドにSKP1が結合していると考えすると2結合ポーズの結果予測は妥当であるといえる。複合体構造からSFNとSKP1との相互作用に重要なアミノ酸残基は、筑波大学における変異体実験によりIP Western法で結合実験を通じて、実際に相互作用に関与していることが検証された。次に、SFNタンパク質内のSKP1結合部位周辺に存在するポケットのドラッグアビリティを本課題で用いている機能部位予測法で評価した。その結果、ドラッグアビリティを示すPLB値が2.86であり、判定基準の2を上回ったことから、低分子結合が可能であると判断した。この結果に基づき、SKP1と競合する医薬品候補となりうる小分子化合物を、既存薬データベースDrugBankからドッキング計算によるバーチャルスクリーニングを行い、ドッキングスコア上位化合物より、購入可能な46候補化合物の選定を行った。候補化合物は、共同研究先の筑波大学で様々な生化学実験で評価が行われた。その結果、*in vitro*の結合阻害実験では、Aprepitant（制吐剤）、Ticagrelor（抗血小板剤）、Ezetimibe（コレステロール吸収阻害薬）、Chlorhexidine（殺菌薬）の4化合物（医薬品）に阻害能が確認された。この4化合物について、肺腺癌細胞、A549をヌードマウス皮下に0日目に移植（ 5×10^6 cells/individual）し、翌日から毎日強制経口投与（80 mg/kg/day）を行った結果、Aprepitant、Ticagrelorの2化合物について、強い腫瘍抑制効果を有することが確認できた。本成果は、Clin Cancer Res. 誌へ発表を行った。本提案の複合体モデリングおよびドラッグアブル機能部位予測、インシリコスクリーニングの技術レベルは、IP Western（部位の確認）および実際に*in vitro*および腫瘍抑制実験で化合物が同定（ドラッグアビリティ）されたことで、創薬現場で適用可能な精度であることを示した。またヒット率については、タンパク質間阻害剤探索という難易度の高い課題でありながらも、*in vitro*では、8.7%（4/46）、腫瘍予測性ヒットでは、4.3%と高いヒット率を達成した（一般的な酵素阻害剤探索では、10%程度）。



図1 支援実施の流れ

(2) 高度化

幅広い創薬現場（民間企業、アカデミア）で実施可能な分子動力学計算とケモインフォマティクスの情報と融合した独自性の高いインシリコ創薬支援の技術開発を目標に以下の4つの代表的な成果について述べる。

1. タンパク質-RNA 複合体予測の開発

開発した予測システムは、1) RNA立体構造予測、2) RNA-RNA複合体予測および相互作用解析、3) RNA-Protein複合体予測および相互作用解析、の3つのモジュールより構成され、KNIMEプラットフォームによる実行可能なシステムとして構築した（図2左）。このモデルを用いて、アプタマーであるpegaptanibについて、pegaptanibの立体構造予測およびVEGFRタンパク質との相互作用予測を行った（図2右）。予測された複合体構造（C1～C3）について、さらにMD計算を行い、塩基の違いによる結合親和性を評価し実験と比較した結果、複合体モデルC3がNMR構造と合致しており、予測構造の妥当性と新規アプタマー設計の知見が得られた。

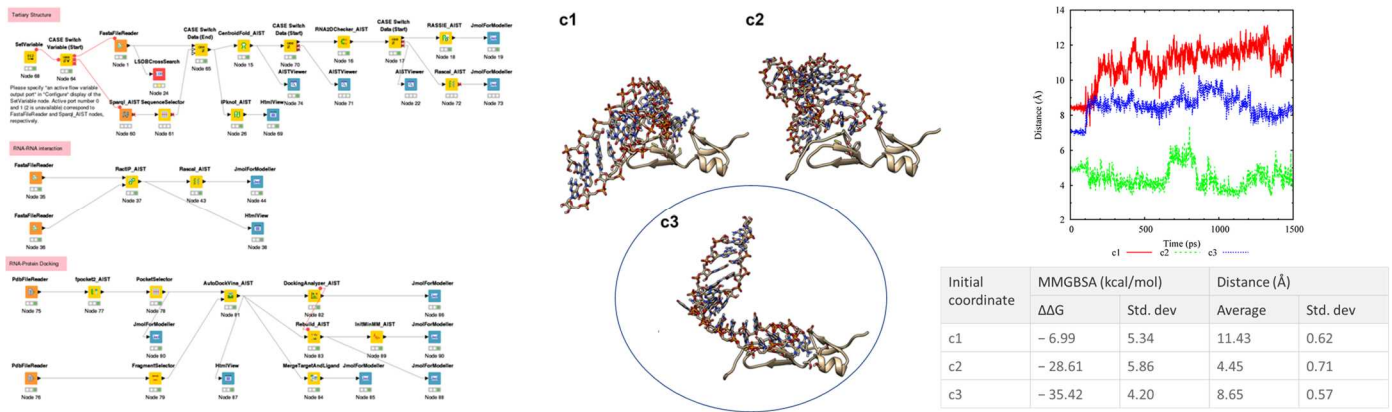


図 2 タンパク質-RNA 複合体予測システム (左) および、Pegaptanib-VEGFR の解析結果 (右)

2. アンサンブル構造を用いたインシリコスクリーニング法の開発

MD 計算 (ストリング法) による構造変化のパスウェイ獲得後、アンサンブル構造からのアロステリック部位同定と化合物データベースによるインシリコスクリーニング、までのプロトコール (図 3 左) を構築した。本手法を ERK2 タンパク質解析に応用した結果、ERK2 の活性-不活性間の構造変化のパスウェイ探索を線形法およびストリング法 (池口グループとの連携) によってエネルギー最小経路の探索を行い、活性-不活性間で変化の大きい 20 構造を最適化しアンサンブル構造を生成した。その後、自由エネルギー地形から中間体の存在を同定した。続いて、得られた中間体で、アロステリック部位の存在を検証するため、構造アンサンブルに対して、ポケット探索と

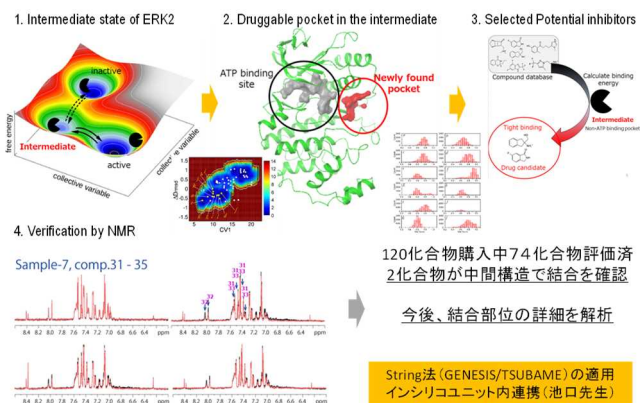


図 3 ERK2 を対象とした解析プロトコール、新規アロステリック部位同定およびインシリコスクリーニング実施結果

Druggability 評価を行った。その結果、ATP 結合部位 (活性部位) とは異なる部位で、化合物結合が期待できる Druggability 値が高いポケットが高頻度で形成されていた (図 3 右)。この新規ポケットは構造変化に重要な部分にあり、化合物の結合により ERK2 の活性 (構造変化) を阻害できるアロステリック部位である確率が高いと判断した。既に、得られたポケットに結合可能な低分子化合物を、ドッキング計算によりインシリコスクリーニングを実施し、NMR による活性評価でヒット候補化合物の獲得に成功した。また他の応用例として、立体構造未知の C3aR について、C5aR を鋳型としてモデリングを行い、既知アンタゴニストの結合モデルを予測。その後、MD 計算により複数の安定構造を同定し、デコイとの判別スクリーニングによりベスト構造推定。MD 構造を用いることで、モデリング構造より大幅に活性化化合物とデコイの分離能が改善することを示した。今後、C3aR の新規化合物インシリコスクリーニングに展開予定である。

3. タンパク質-リガンド結合予測法の開発

短時間で目的の結合状態に指南する様々な分子動力学シミュレーションを検討し、これまで Koff を目的としていた Metadynamics (MetaD) を結合シミュレーションとして適用、ベンチマークを通じてプロトコールを開発した。本プロトコールにより、EP4 受容体を標的とした化合物のインシリコスクリーニングでは、EP4 受容体とアンタゴニスト結合をシミュレーションした結果、最初の段階での膜への介入が重要であることが示唆された (図 4)。本成果は、EP4 受容体の X 線構造解析成果と共に Nat Chem. Bio 誌に発表した。また同掲載号の news&views において、Editor である Hollenstein 氏により、プロスタグランジン系化合物の結合メカニズムを示唆するものとして MetaD による本成果が引用された。

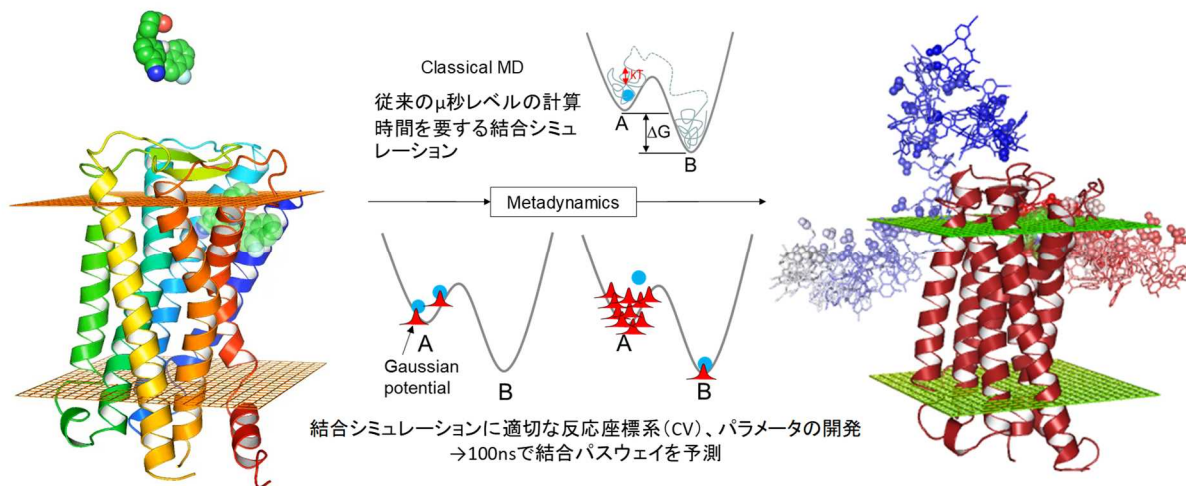


図 4 MetaD による化合物結合シミュレーション法の開発と EP4 受容体-アンタゴニスト結合への応用

4. リード最適化法の開発

本課題では、化合物の結合に伴う構造変化を想定して、アポ体やフラグメント化合物結合複合体を初期構造に、MD 計算を用いコンフォメーションを発生させ、探索や設計の目的に応じて適切なコンフォメーションを選定するシステムの開発を行った：(1) 化合物結合によって想定されるタンパク質構造の揺らぎを分子動力学計算により探索、トラジェクトリーを生成し、(2) 複数のトラジェクトリー構造上において、化合物の結合ポケット周辺の形状を偽原子で暫定的に見立て、(3) 偽原子のサイズ、存在密度、結合部位のドラッグビリティを解析、(4) 目的の化合物（フラグメント化合物、リード化合物）やバーチャルスクリーニングテスト化合物セットを用いて、化合物ドッキングやバーチャルスクリーニング、設計指針に最適な構造を、偽原子からなる疑似化合物と実際の化合物等との簡易形状比較で選定するシステムである。上記のこれまでの設計案について、2020 年度に AI 創薬支援の追加課題を融合させ、現在、AI による化合物自動生成システム ChemTS を改良（3D-ChemTS）し、ヒット to リード予測システムへ拡張している。既にベンチマークとして、本システムを標的タンパク質 c-Src に適応し、ヒット to リードの成功事例を再現した結果、2 ラウンドの時点で、リード化合物に類似した化合物を提案することに成功した。現在、論文化と本手法を様々なタンパク質ファミリーを適用拡大し、汎用性やタンパク質ファミリー毎の特徴を解析している。

(3) ユニット内外での連携成果

COVID-19 の治療薬探索としてドラッグリポジショニングを実施。インシリコユニット内の白井研、金谷研と連携し、既存薬（8085 品目）および天然物データベース（5779 品目）に対し、ウイルス由来のメインプロテアーゼの立体構造に基づいたドッキングスコアと相互作用フィンガープリント法によるインシリコスクリーニングを実施した（図 5）。前仲研究室（ケミカルシーズ・リード探索ユニット）および国立感染症研究所等による活性評価の結果、新型コロナウイルス治療薬の候補の 1 つとして抗エイズウイルス（HIV）薬ネルフィナビルを同定。またネルフィナビルに加え、作用メカニズムの異なる白血球減少症治療薬セファランチンによる作用機序解析も実施した。両医薬品の臨床試験を継続中。成果は、iScience に発表した。

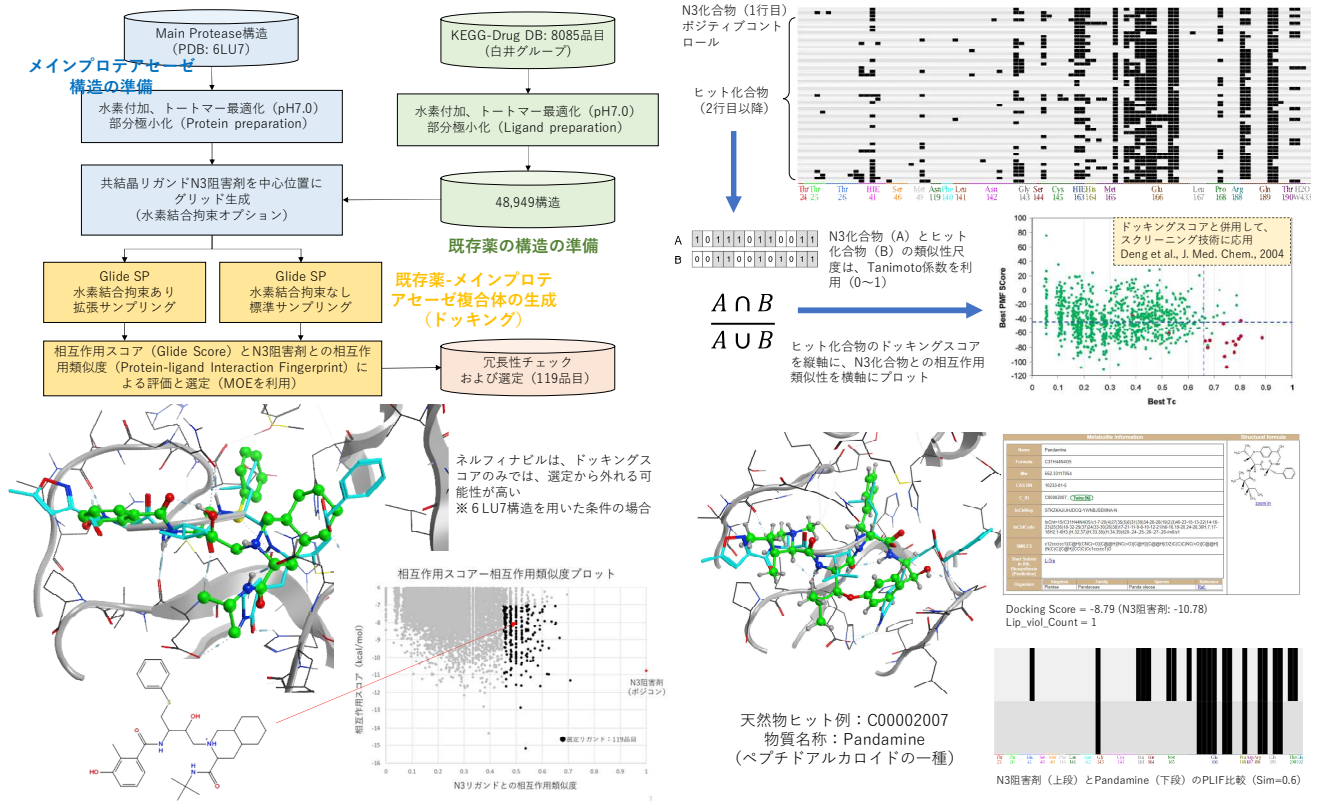


図 5 メインプロテアーゼ構造に基づくインシリコドラッグリポジショニング実施内容

Abstract

In this project, we conducted research to support and advance in silico drug discovery with high practicality by integrating molecular modeling and simulation based on key technologies such as homology modeling, docking calculations (protein-protein, protein-small molecule, protein-nucleic acid, nucleic acid-small molecule), and MD simulation, focusing on drug target proteins. We have addressed the typical drug target proteins such as GPCRs, ion channels, nuclear receptors, and proteases, as well as more challenging protein-protein interactions and nucleic acid targets, using various methods from homology modeling to binding pathway simulation. As a result of this project, more than 23 research papers were published. As a remarkable achievement of the supported research by this project is a study titled “Development of a Therapeutic Drug for Early Stage Lung Adenocarcinoma Targeting Stratifin (SFN)”. Our results indicated that inhibitors of SFN–SKP1 binding could be potential targeted drugs for treatment of lung adenocarcinoma¹. In order to screen potent inhibitors, we based on key technologies adopted an in silico approach utilizing structural data for protein–protein interaction (PPI) targets and a database of known bioactive compounds, a strategy known as “in silico drug repositioning.” This drug-repositioning strategy makes it possible to rationalize experimental protocols, prioritize the design of therapeutic compounds for PPIs, and speed up the development of promising drugs, while reducing the risk of failure in clinical trials. Although the structure of the SFN–SKP1 complex has not been clarified experimentally, a reliable computational model of the complex, which was consistent with the results of in vitro mutational experiments, and in silico detection of the druggable pockets overlapping at the SFN–SKP1 interaction interface led to the successful identification of 2 independent drugs for this particular PPI: aprepitant and ticagrelor.

We also enhanced high precision of modelling structure using MD simulation. Example, the rational design of antagonists for prostaglandin E receptor (EP4) is one of outcome of supporting drug discovery in collaboration with research groups in the field of X-ray crystallography of GPCRs. To analyze ligand access to EP4 from the solvent environment, we performed a 100-ns metadynamics simulation of the EP4 structure embedded in an explicit POPC bilayer². In the simulation, the extracellular surface remained occluded by 2nd extra cellular loop. The antagonist first inserted itself into the membrane bilayer and then laterally accessed the ligand-binding pocket between TM1 and TM7. Throughout this process, the carboxyl group of antagonist was oriented toward the aqueous phase, and its hydrophobic domain was adjacent to the fatty acid tails of the membrane phospholipids. All prostanoids contain a carboxyl group in their chemical structures, and most EP4 antagonists shared this feature. Demonstration of this ligand binding simulation at the atomic level will be a new strategy for more sophisticated in silico drug discovery and design. The availability/possibility of in silico drug discovery and design for target protein with structural changes and flexibility gives us the chance of the expansion in the selection of target disease, and ripple effects are expected in pharmaceutical industry.

References

- 1) Shiba-Ishii A. et al. Stratifin Inhibits SCF FBW7 Formation and Blocks Ubiquitination of Oncoproteins during the Course of Lung Adenocarcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2019 May 1;25(9):2809-2820.
- 2) Toyoda Y. et al. Ligand binding to human prostaglandin E receptor EP 4 at the lipid-bilayer interface. *Nat Chem Biol.* 2019 Jan;15(1):18-26.