

修飾シグナル病 第二回若手ワークショップ
テクニカルセミナー1(自習用資料)

シグナル伝達シミュレーションの考え方と実際

2013年12月6日
東京大学医科学研究所腫瘍数理分野
市川 一寿

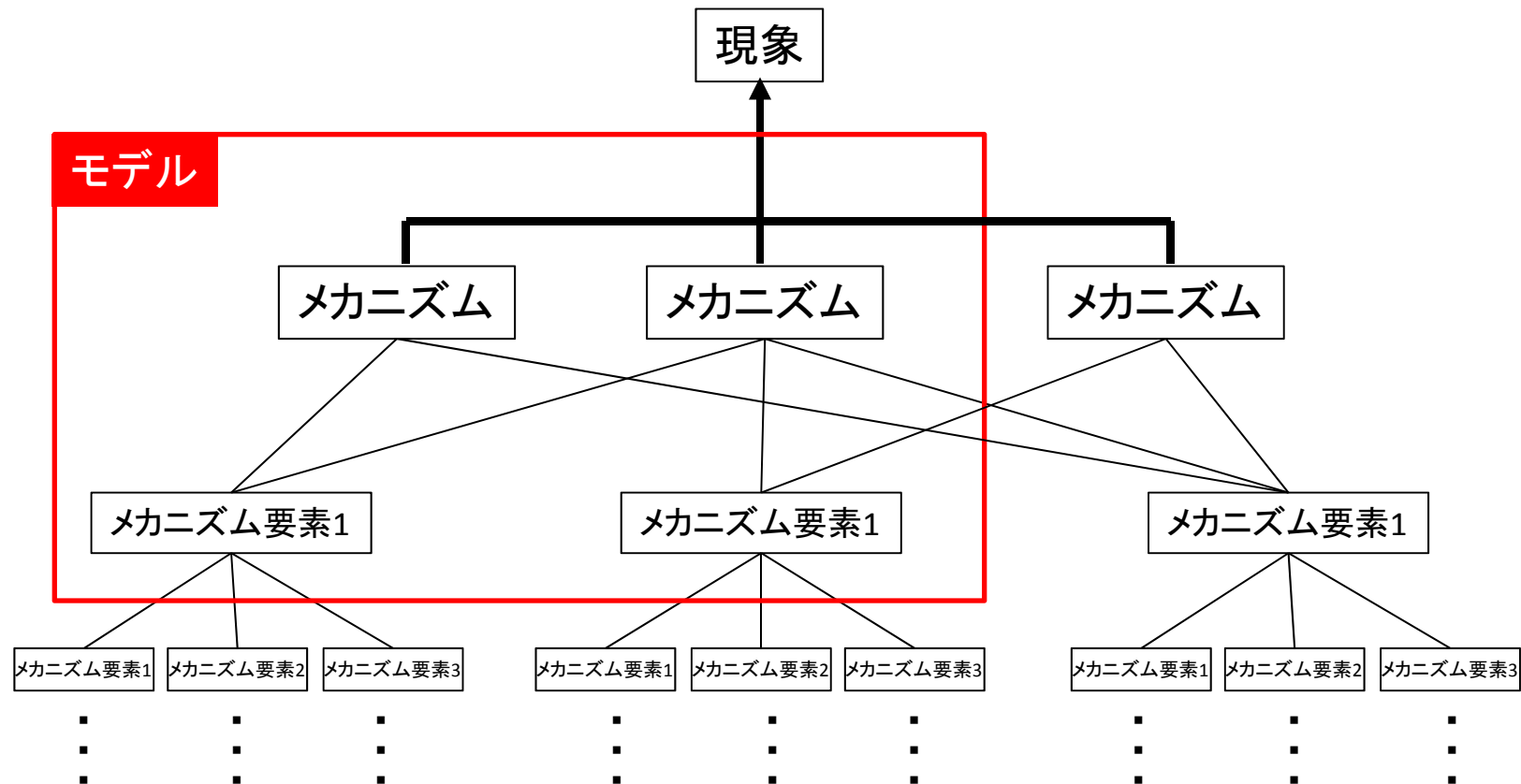
本稿で扱うシグナル伝達モデルの範囲

前提:

- ・ 観測される細胞生物学的現象は、物理(たとえば拡散)と化学(たとえば生化学反応)のメカニズムで記述できる。
- ・ 現象は複数のメカニズムが協調的に働く結果として観測される(下図)。
- ・ モデルを構築するということは、現象を意識しつつメカニズム(の一部)を計算機でシミュレーションできるようにすることである(下図赤枠)。(もちろん、最終的にはメカニズムの一部ではなく全体を対象とすることを目指す。)
- ・ 従って、本論で扱うモデルはメカニズムとの関係があいまいな現象論的モデルは対象としない。(現象論的モデルとは、例えば背後のメカニズムには深入りせず、刺激と細胞応答の関係を簡単な数式で関係付けたものなど。)

前提からの帰結:

- ・ メカニズムをモデル化するので、予測外の結果(現象)をシミュレーションによって得ることが可能である。これが予言となる。



実験状況の場合分けとシミュレーションに対する期待

実験で明らかになっていること に基づく場合分け

現象* タンパク質 メカニズム

○ ○ ○

○ ○ △

○ ○ ×

○ △ ×

○ × ×

× × ×

モデル化の方法とシミュレーションに対する期待

方法: 基本となる反応式(一次反応・二次反応、および平衡反応)を組み合わせて対象とするモデルを構築する。

期待: 観測された現象とメカニズムの確認。反応パラメータの変化に対する現象の変化を調べ、異なる現象の統一的理解や新たな現象の発見(以下同様)を得る。モデルの大部分はこれと次。

方法: 酵素反応と考えられるならミハエリスメンテンで、そうでないならば平衡反応でモデル化する(反応は平衡反応が多い)。

期待: 反応モデルなどを変えて結果を比較することで、メカニズムを推定できる⇒実験ウィンドウを狭める(以下同様)。

方法: モデル化は困難だが他の知識、たとえば類似タンパク質の反応などを参考にしてモデル化する。

期待: メカニズムの範囲を絞り込んで実験の探索ウィンドウを狭める。運が良ければメカニズムを予言できるかもしれない。

方法: 不明なたんぱく質とメカニズムを推定してモデル化する。

期待: 新たなたんぱく質の関与を推定できるかも知れない。

方法: 本稿では扱わない現象論的モデルで我慢する。

方法: (当然だが)モデル化をあきらめる。

* : たとえば濃度や活性の時間変化など
実験で観測する現象。

シミュレーションパラメータの決定法

表1 後述の実例で使用している速度定数

parameters	values	unit	comments
Cpd-CD	2.69x10 ⁶	/s	from our experiment and its analysis
CX	1.18x10 ¹⁰	M/s	from our experiment and its analysis
M14D	6.99x10 ⁶	M	from our experiment and its analysis assuming initial MT1-MMP concentration of 141 nM
M14x	3.01x10 ⁶	M	from our experiment and its analysis assuming initial MT1-MMP concentration of 141 nM
M2	1.00x10 ⁷	M	assumed
MF	3.06x10 ⁶	M	calculated from Ms and occupied sites concentration on the membrane
Ms	6.06x10 ⁶	M	from our experiment and its analysis assuming initial MT1-MMP concentration of 141 nM
T2	1.80x10 ⁷	M	nominal value. Varied from 1 nM to 1 μM in the simulation
Fn	1.00x10 ⁴	M	assumed
kD	0.0385	/s	from our experiment and its analysis
kM14	2.00x10 ⁶	/M/s	calculated from K _D of 5 nM
kM14_	0.01	/s	calculated from K _D of 5 nM
kM2	2.10x10 ⁷	/M/s	from Murphy and Willenbrock, 1995
kM2aT	2.10x10 ⁷	/M/s	from Murphy and Willenbrock, 1995
kM2act	0.02	/s	Karagiannis and Poppel, 2004
kT2	2.74x10 ⁶	/M/s	from Toth et al., 2000
kT2_	2.00x10 ⁴	/s	from Toth et al., 2000
kX	0.00386	/s	from our experiment and its analysis
kfn11	2.00x10 ⁶	/M/s	calculated by assuming kfn11_ of 2.94 /s and kfn12p of 3.18 /s by Olson et al., 1997
kfn11_	2.94	/s	calculated by assuming kfn11_ of 2e6 /M/s and kfn12p of 3.18 /s by Olson et al., 1997
kfn11p	1.59	/s	kfn12p/2
kfn12	4.00x10 ⁶	/s	2*kfn11
kfn12_	2.94	/s	=kfn11_
kfn12p	3.18	/s	from Olson et al., 1997 assuming the same value for fibronectin
kfn2	2.00x10 ⁶	/M/s	calculated assuming K _m of 0.6 μM in Gioia et al., 2007
kfn2_	0.93	/s	from Gioia et al., 2007 assuming the same value for fibronectin
kfn2p	0.27	/s	from Gioia et al., 2007 assuming the same value for fibronectin

シミュレーションを実行するためにはタンパク質の濃度や反応の速度定数がわかってなければならない。しかしいつもこれらの値がわかるとは限らない。不明な場合は以下の方策を考える。

濃度

- ・ オーダー(μMかnMか)でも良いので(実験で)知る努力をする。この時既知の物質との比較が(ある程度)役に立つ。

速度定数

- ・ 結合の速度定数の範囲は通常10⁵~10⁷ /M/sなので、まずは10⁶を使ってみる。
- ・ 解離の速度定数は10⁻⁹~10³位まで広い範囲がありえるが、わからなくてもK_D値がわかればかなり範囲を絞ることができる。

拡散定数

- ・ 水溶液中の溶質の拡散定数は10⁻¹³~10⁻⁸ /m²/sの範囲。まずはタンパク質の拡散定数には10⁻¹¹、mRNAには10⁻¹³を使ってみる(代表値と考えられている値)。

濃度・速度定数・拡散定数共通

- ・ 不安がある場合は、濃度や速度定数を一定の範囲で動かしてシミュレーションを行い、現象を説明できる範囲を調べ、矛盾や問題がないか検討する(ロバストネスの検討)。さらにsensitivity analysisを行う。

シミュレーションのやり方

シミュレーションは構築したモデルをコンピュータで計算することである。その方法は以下。

方法1) モデルの反応式から微分方程式を導出し、自分でシミュレーションプログラムを書く。もちろん数値計算法とそのアルゴリズムの知識があり、かつそれをプログラムに書けなければならない。それに加え、時空間シミュレーションの場合は拡散の扱い方を知らなければならない。上記のようなハードルはあるものの、すべてを自分で制御し、かつ理解しているという安心感がある。一方複雑な反応式をシミュレーションするにはすべての微分方程式を手作業でプログラムに埋め込まなければならないので、膨大な労力が必要なだけでなく、誤りが発生する可能性が高くなる(←これがA-Cell開発の背景)。

方法2) A-Cellを用いる。この場合には反応式を書きさえすればプログラムは自動的に生成されるという大きなメリットがある。またどのような複雑なモデルも自動的にシミュレーションプログラムが生成されるので、手間が省けるだけでなく間違いがない。(したがって、A-Cellが初心者向けであるという認識は間違いである。)A-Cellのシミュレーションプログラムはソースコードを見ることができるので、心配ならばシミュレーションの方法を知ることができる。しかし方法1)とは異なり、わずかではあるがやれることに制限がある。この場合はA-Cellが生成したコードを改変する(著者は時々行う。しかし方法1)同様、プログラミングの素養が必要)。

モデルの創り方は領域ホームページの「A-Cellモデル構築ガイド」を参照のこと。

方法3) Mathematicaなどの市販ソフトを使う。

シグナル伝達シミュレーションの実際

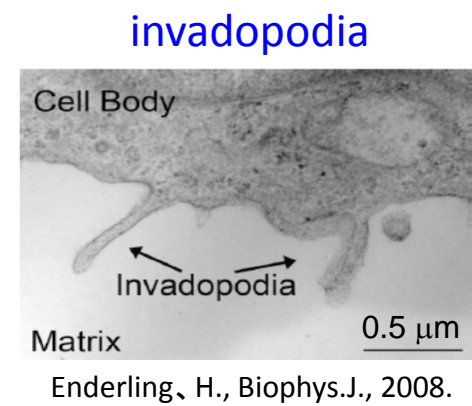
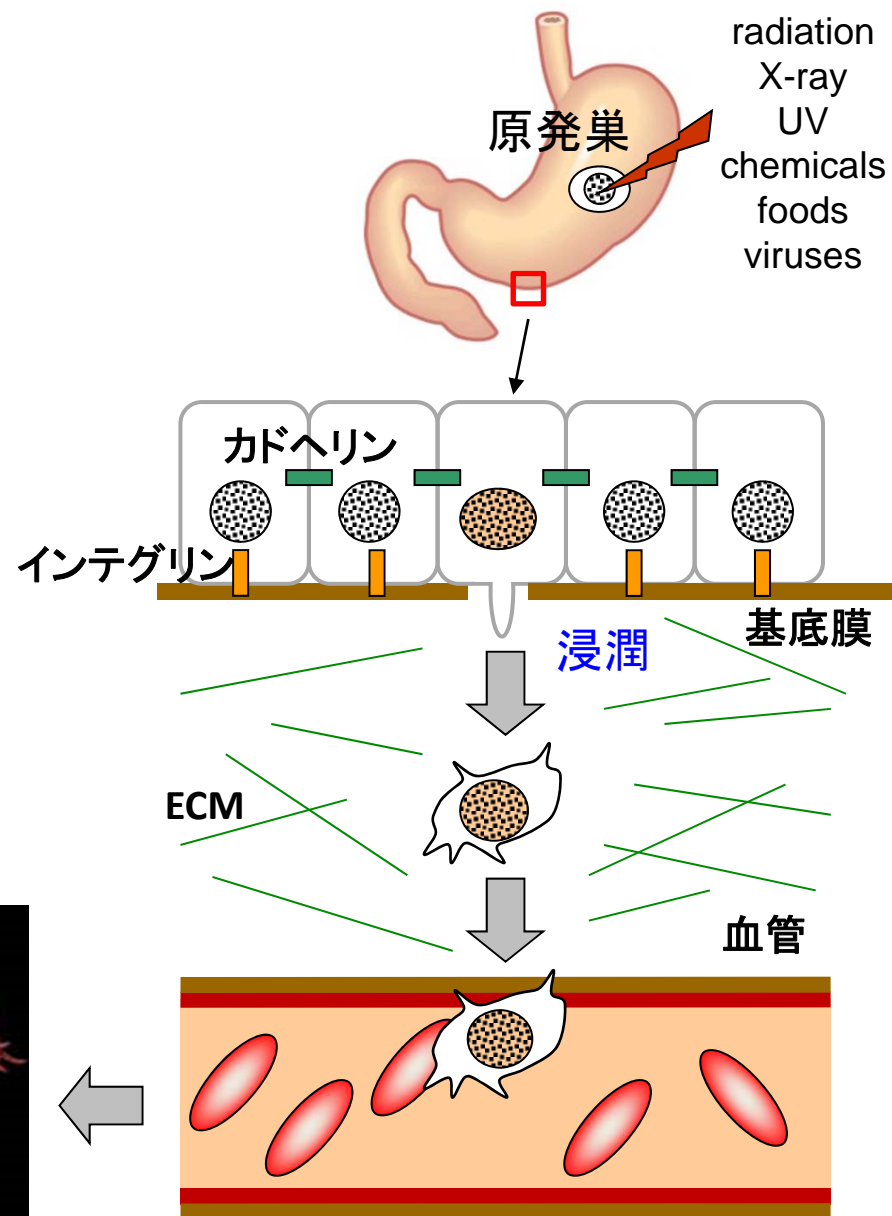
「がん浸潤初期過程の研究におけるシミュレーションと実験の相互作用」
を例にとって

—本例の原論文—

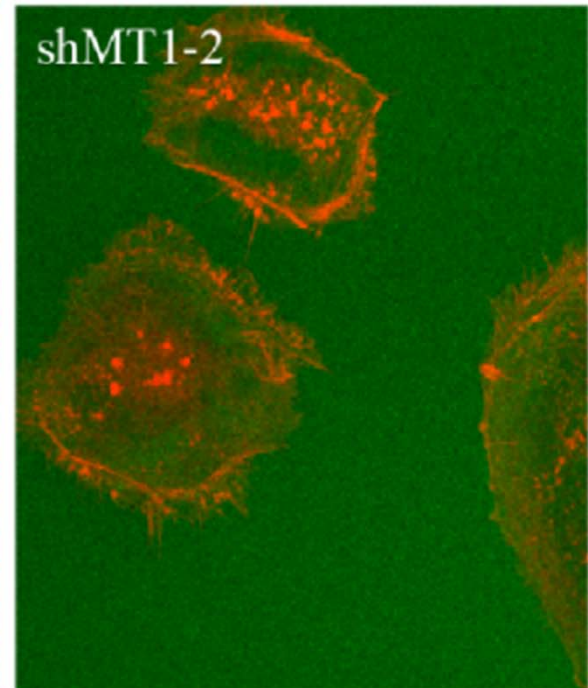
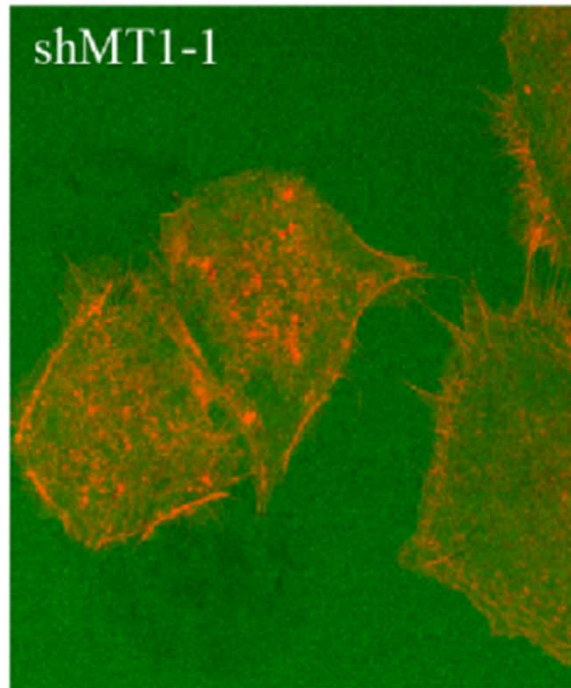
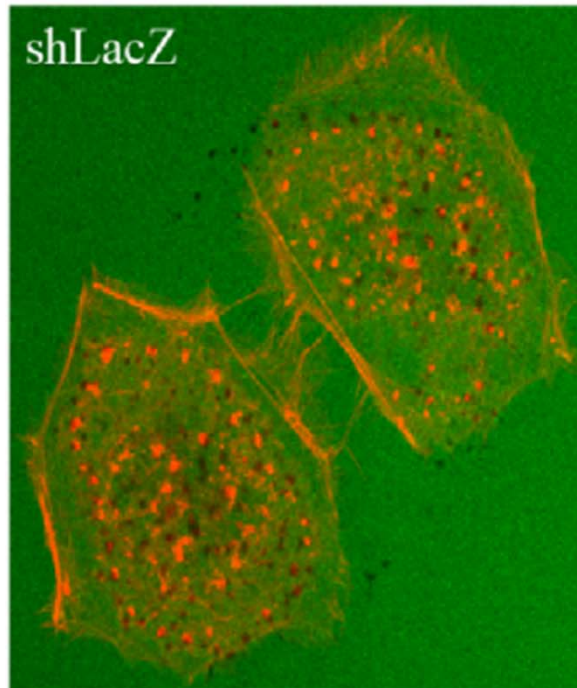
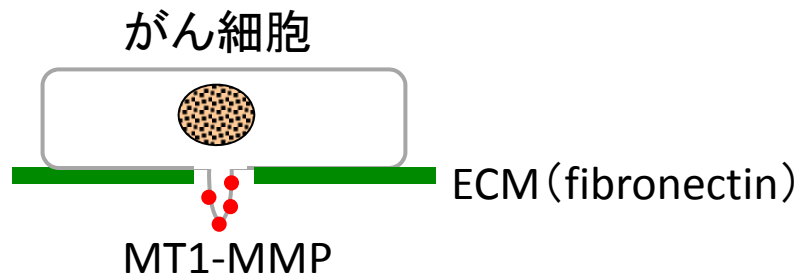
Hoshino, D., et al., PLoS Comp.Biol., 2012, e1002479.

Watanabe, A., et al., PLoS Comp.Biol., 2013, e1003086.

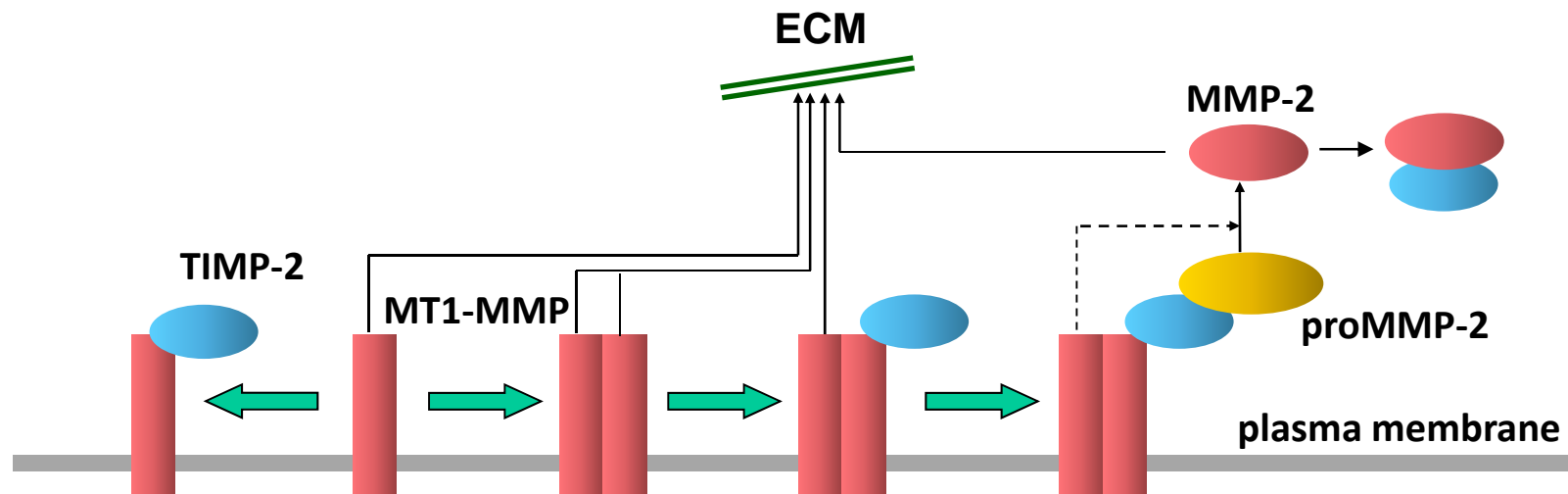
背景：浸潤・転移とinvadopodia (浸潤突起)



背景: invadopodiaではMT1-MMPがECMを分解



背景：MT1-MMPの活性制御とECMの分解



Sato, H., et al., Nature, 1994, 61-65.

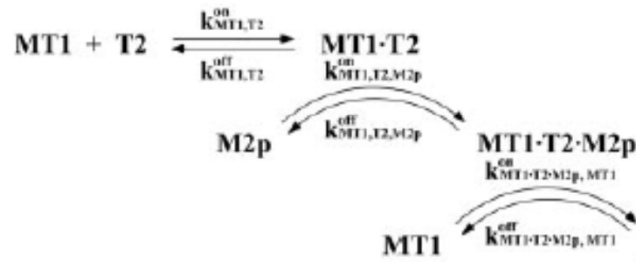
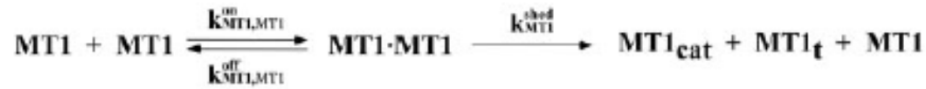
Seiki, M., Curr.Opn.Cell Biol., 2002, 624-632

Seiki, M., Cancer Lett., 2003, 1-11.

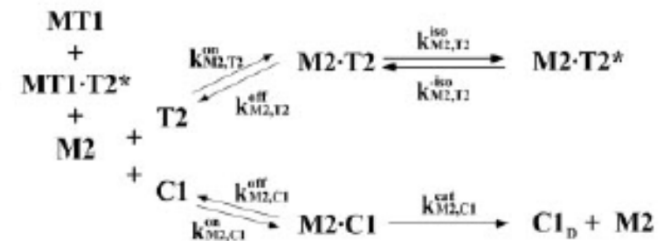
背景: シミュレーションの先行研究 (現象の再現)

Karagiannis, E.D. and Popel, A.S., JBC, 2004(279), 39105-39114

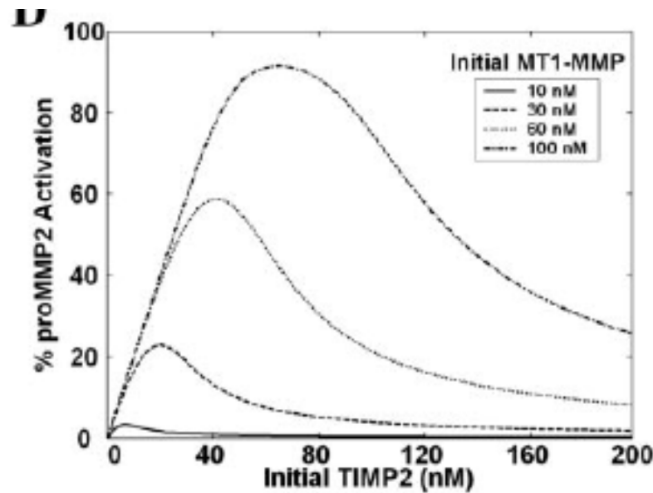
モデル



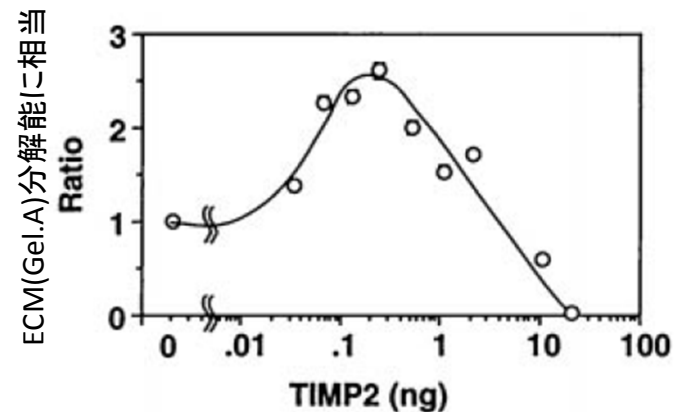
MT1: MT1-MMP
 MT1c: MT1-MMPcat
 MT1t: truncated MT1-MMP
 M2: MMP2
 M2p: proMMP2
 T2: TIMP2
 C1: Collagen type I
 C1_D: Denatured Collagen I



Karagiannisらのシミュレーション結果



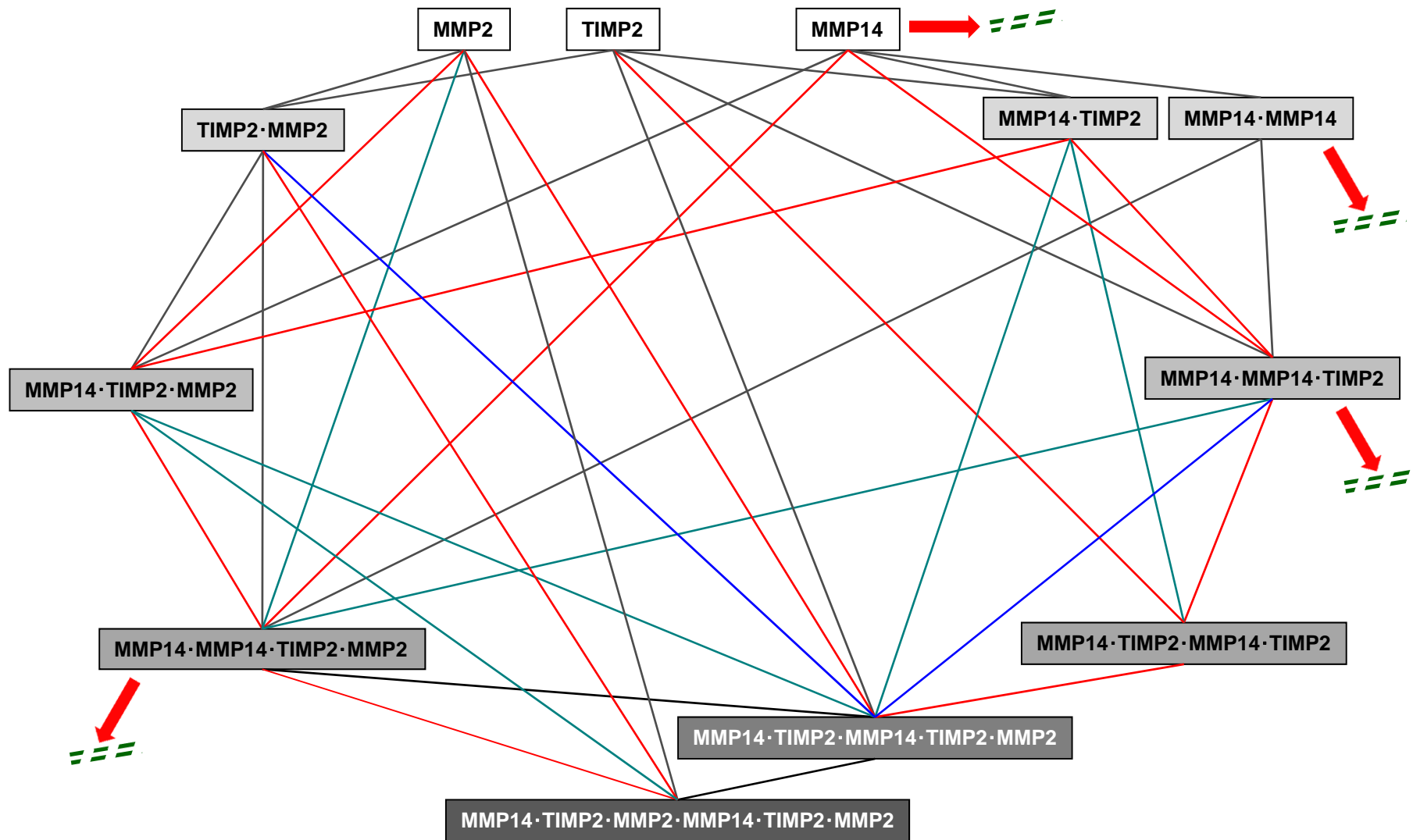
他のグループによる実験結果



Kinoshita, T., et al., JBC, 1998, 16098-16103.

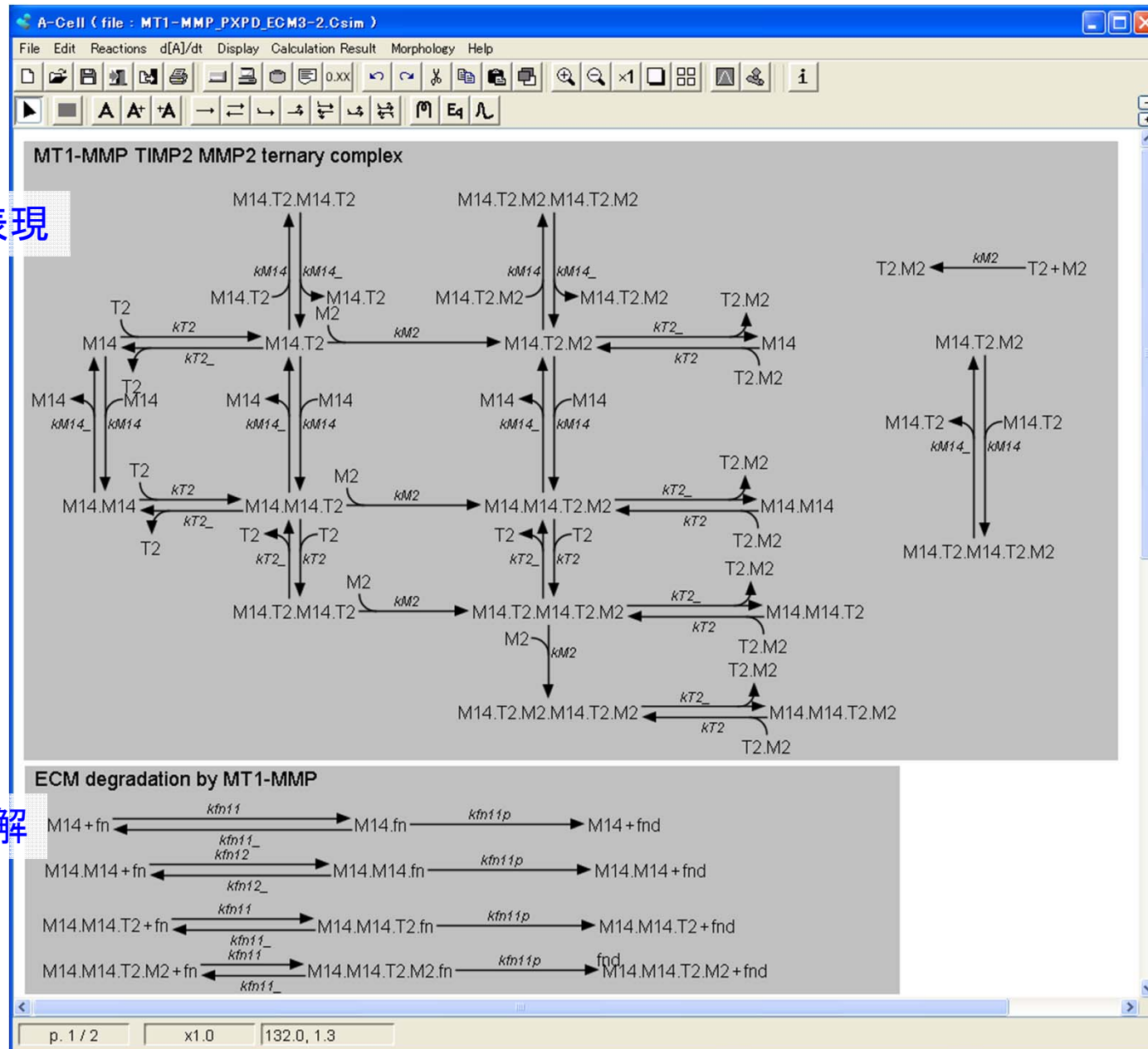
モデル構築の実際:MT1-MMP複合体形成のダイアグラム

MT1-MMP(MMP14)/TIMP-2/MMP-2複合体とその形成パスウェイの完全なセット



モデル構築の実際：A-Cellを使ってモデルを構築する

前頁の反応のA-Cell表現



ECM分解

モデル構築の実際: パラメータの決定

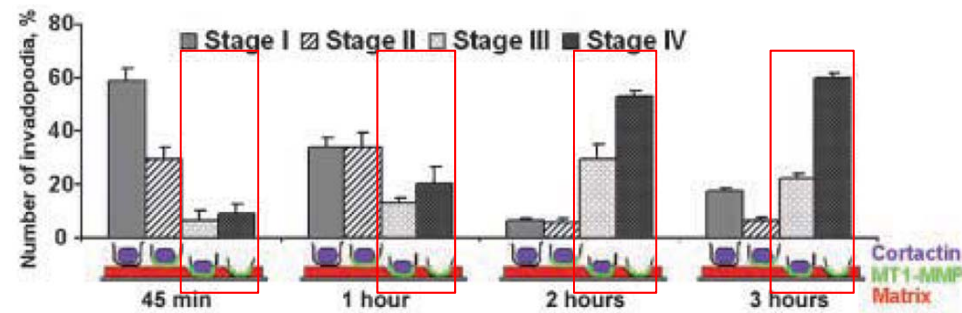
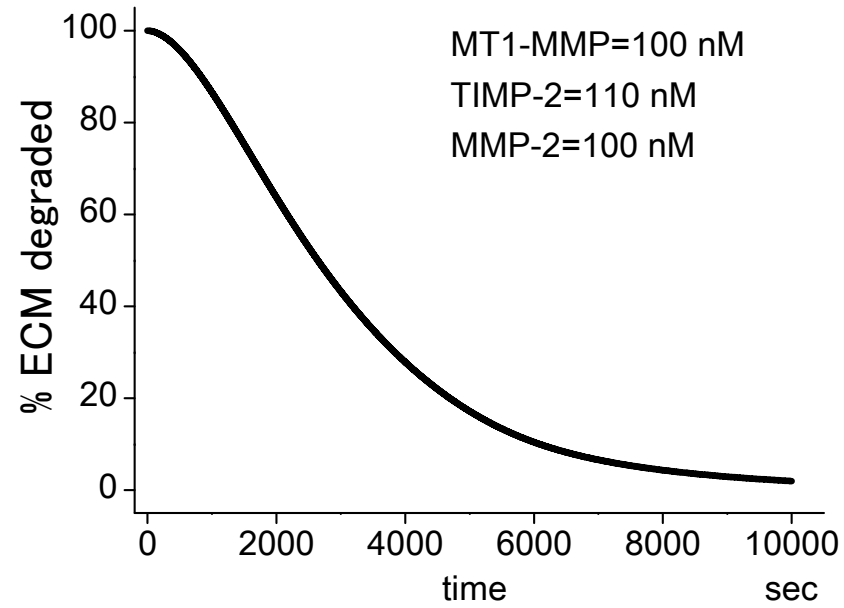
MMPs-TIMP binding & dissociation

	$\frac{k_f}{(M/s)}$	$\frac{k_b}{(s)}$	$\frac{K_D}{(M)}$
MT1-MMP:TIMP2	4.2x10 ⁶ (Will1996) 4.18x10 ⁶ (Butler1998)	0.01 (calc.)	2.54nM (Strongin1995)
	2.74x10 ⁶ (Toth2000) 1.83x10 ⁶ (Bigg2001) 3.2x10 ⁶ (English2001) 3.54x10 ⁶ (Toth2002)	2x10 ⁻⁴ (Toth2000) <2.75x10 ⁻⁴ (calc.) 3.8x10 ⁻³ (English2001) 2x10 ⁻⁴ (Toth2002)	1.6 or 2.5nM(Emmert-Buck1995) 1.39nM/0.77nM (Zucker1998) 0.07nM (Toth2000) <150pM(Bigg2001) 1.2nM (English2001, ΔTM MT1-MMP) 0.06nM (Toth2002)
TIMP2:proMMP2	2.1x10 ⁷ (assumed) 2.47x10 ⁴ (Olson1997) 1.41x10 ⁵ (Olson1997)	1.05x10 ⁻³ (calc.) 4.7x10 ⁻³ (Olson1997) 7x10 ⁻⁴ (Olson1997)	50pM (Murphy1995) 190nM (Olson1997, low aff. site) 5.2nM (Olson1997, high aff. site)
TIMP2:MMP2	2.1x10 ⁷ (Murphy1995) 4.8x10 ³ (Olson1997) 3.26x10 ⁴ (Olson1997) 2.23x10 ⁵ (Olson1997) 3.8x10 ⁶ (Butler1998) 7.02x10 ⁶ (Bigg2001)	1.26x10 ⁻⁸ (calc.) 1.27x10 ⁻² (Olson1997) 8x10 ⁻⁴ (Olson1997) 1.6x10 ⁻³ (Olson1997) <6.32x10 ⁻⁵ (calc.)	0.6fM (Brew2000) 2.7μM (Olson1997, low aff. site) 23.1nM (Olson1997, high aff. site) 7.2nM (Olson1997) <9pM (Bigg2001)
MT1-MMP:MT1-MMP	2x10 ⁶ (assumed)	0.01 (assumed)	5nM (assumed)

シミュレーションに使ったパラメータ

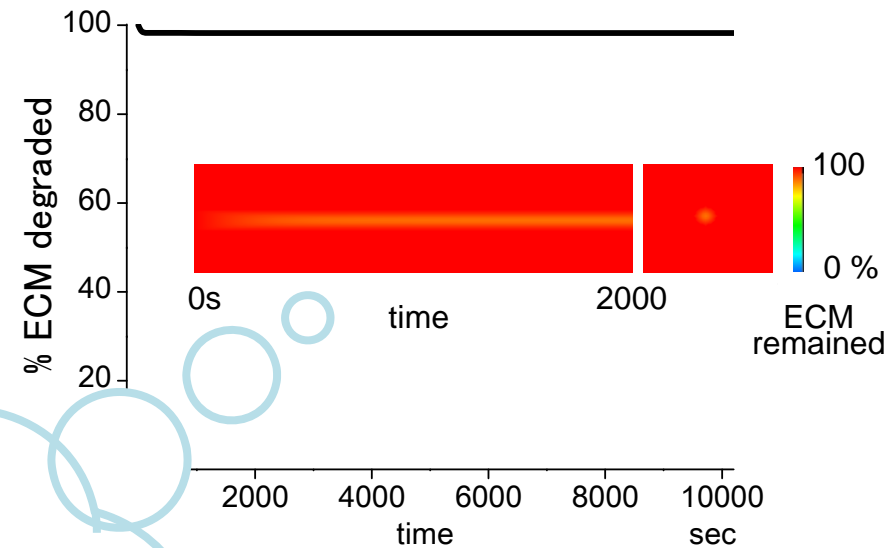
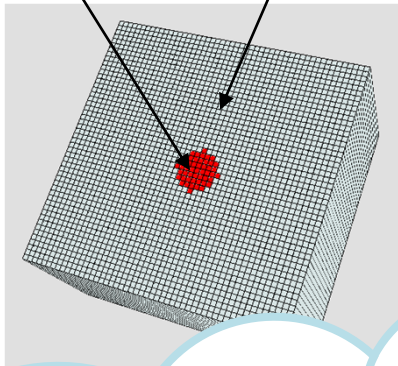
parameters	values	unit	comments
Cpd·CD	2.69×10^{-9}	/s	from our experiment and its analysis
CX	1.18×10^{-10}	M/s	from our experiment and its analysis
M14D	6.99×10^{-8}	M	from our experiment and its analysis assuming initial MT1-MMP concentration of 141 nM
M14x	3.01×10^{-8}	M	from our experiment and its analysis assuming initial MT1-MMP concentration of 141 nM
M2	1.00×10^{-7}	M	assumed
MF	3.06×10^{-8}	M	calculated from Ms and occupied sites concentration on the membrane
Ms	6.06×10^{-8}	M	from our experiment and its analysis assuming initial MT1-MMP concentration of 141 nM
T2	1.80×10^{-7}	M	nominal value. Varied from 1 nM to 1 μ M in the simulation
Fn	1.00×10^{-4}	M	assumed
kD	0.0385	/s	from our experiment and its analysis
kM14	2.00×10^6	/M/s	calculated from K_D of 5 nM
kM14_	0.01	/s	calculated from K_D of 5 nM
kM2	2.10×10^7	/M/s	from Murphy and Willenbrock, 1995
kM2aT	2.10×10^7	/M/s	from Murphy and Willenbrock, 1995
kM2act	0.02	/s	Karagiannis and Poppel, 2004
kT2	2.74×10^6	/M/s	from Toth et al., 2000
kT2_	2.00×10^{-4}	/s	from Toth et al., 2000
kX	0.00386	/s	from our experiment and its analysis
kfn11	2.00×10^6	/M/s	calculated by assuming kfn11_ of 2.94 /s and kfn12p of 3.18 /s by Olson et al., 1997
kfn11_	2.94	/s	calculated by assuming kfn11_ of 2×10^6 /M/s and kfn12p of 3.18 /s by Olson et al., 1997
kfn11p	1.59	/s	kfn12p/2
kfn12	4.00×10^6	/s	$2 \times kfn11$
kfn12_	2.94	/s	$=kfn11_$
kfn12p	3.18	/s	from Olson et al., 1997 assuming the same value for fibronectin
kfn2	2.00×10^6	/M/s	calculated assuming K_m of 0.6 μ M in Gioia et al., 2007
kfn2_	0.93	/s	from Gioia et al., 2007 assuming the same value for fibronectin
kfn2p	0.27	/s	from Gioia et al., 2007 assuming the same value for fibronectin

シミュレーション結果:まずは実験の再現(点モデルでは再現できる)



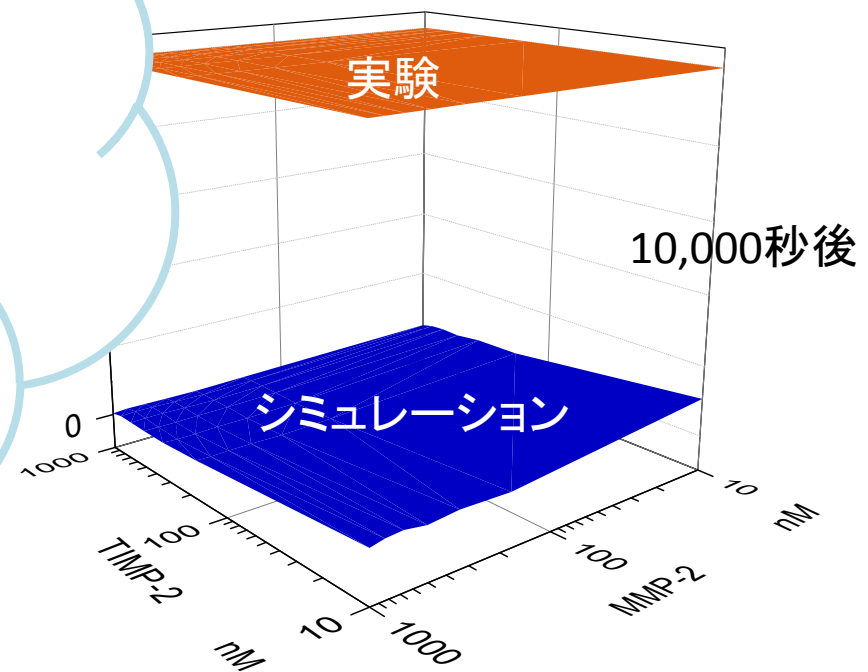
シミュレーション結果: 3Dモデルでは実験を再現できない

MT1-MMP
TIMP-2, MMP-2

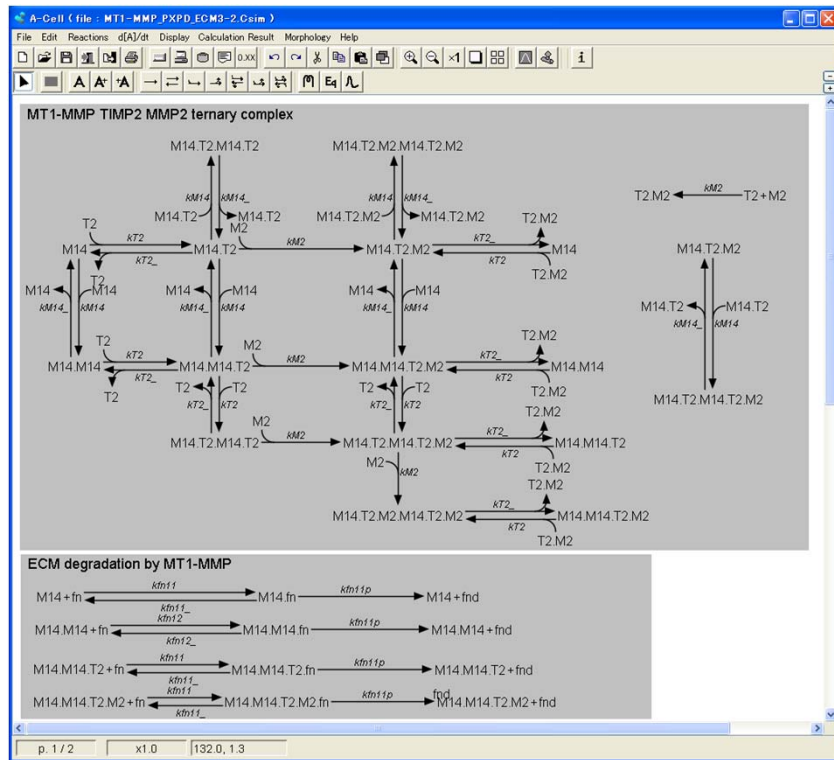


点モデル(temporal model)
と3Dモデル(spatio-
temporal model)の比較は
シミュレーションにしかでき
ないから、ちょっと優越感。

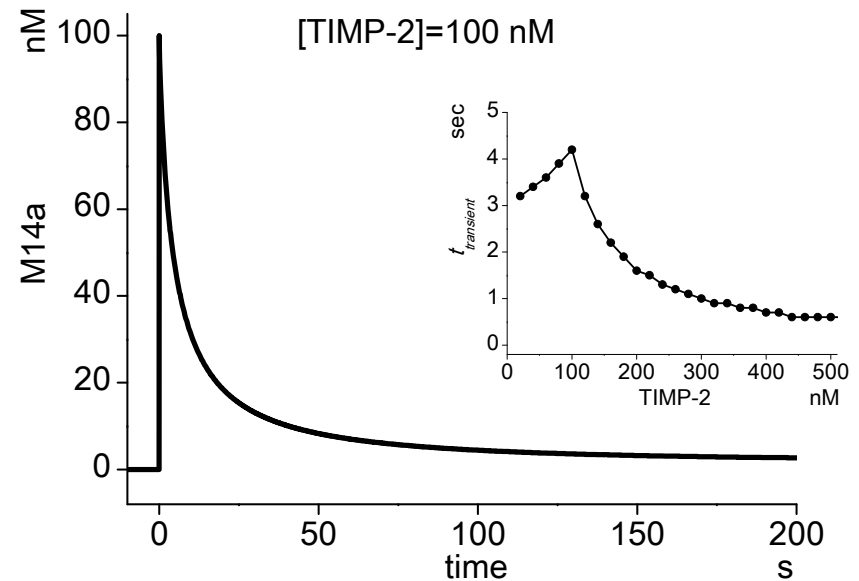
教訓: 点モデルの結果は
疑ってかかろう!



シミュレーションの解析に基づく新たな仮説の構築



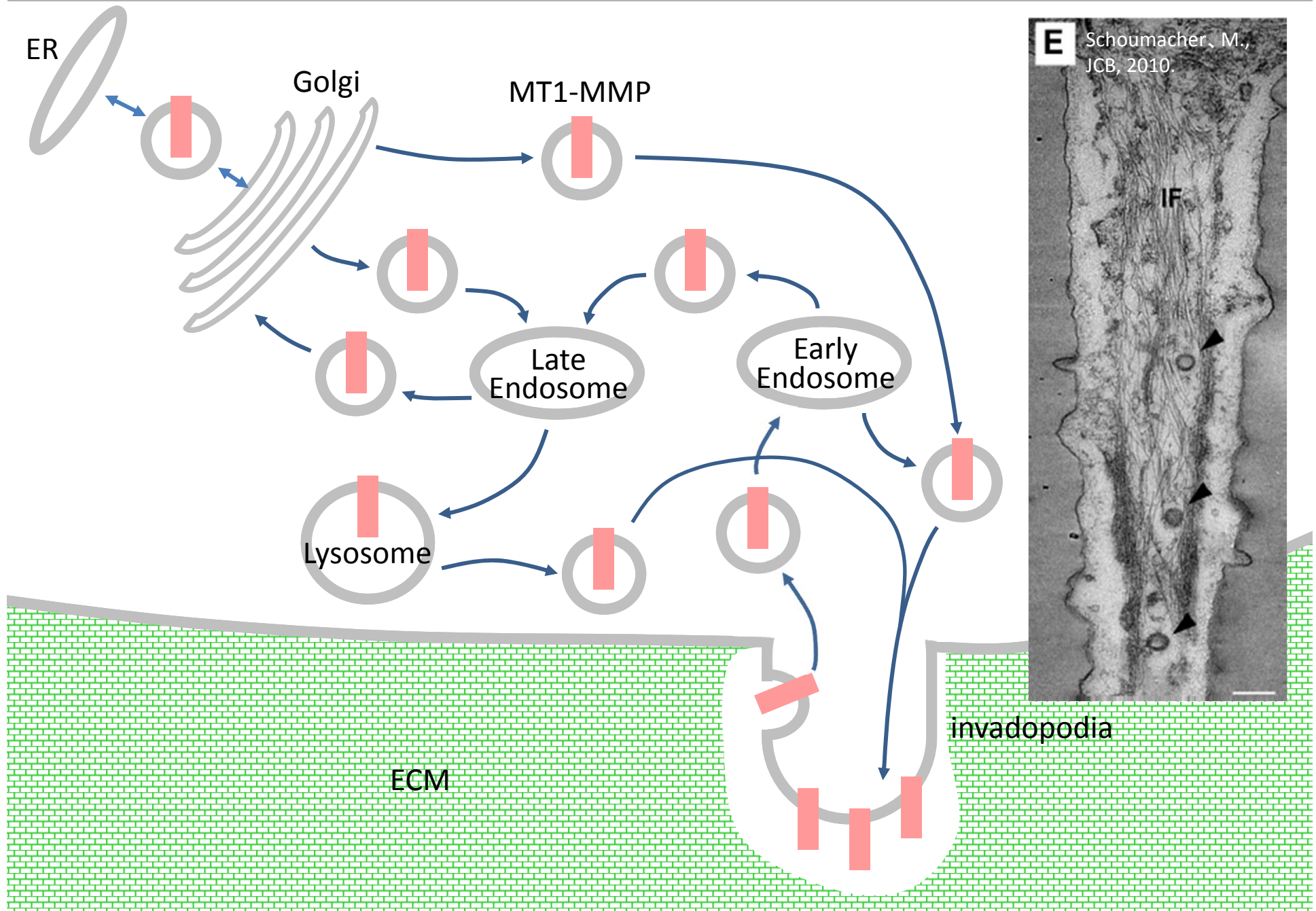
M14a: MT1-MMP複合体全体の fibronectin分解活性



このシャープなピークがECMの分解に有効であるためには、MT1-MMPが次々と繰り返して膜に挿入される必要があるであろう。

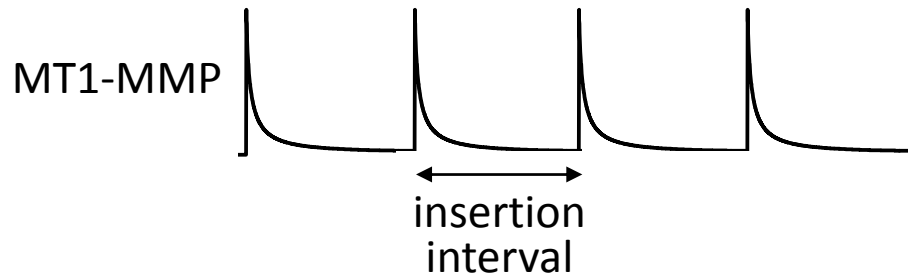
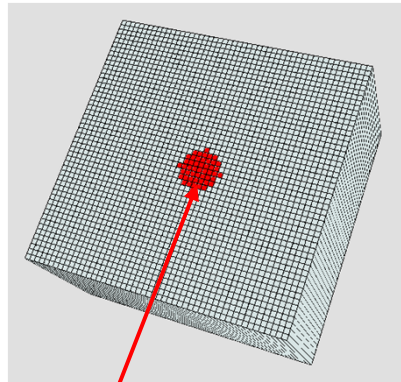


仮説の妥当性: invadopodiaへのMT1-MMPの輸送

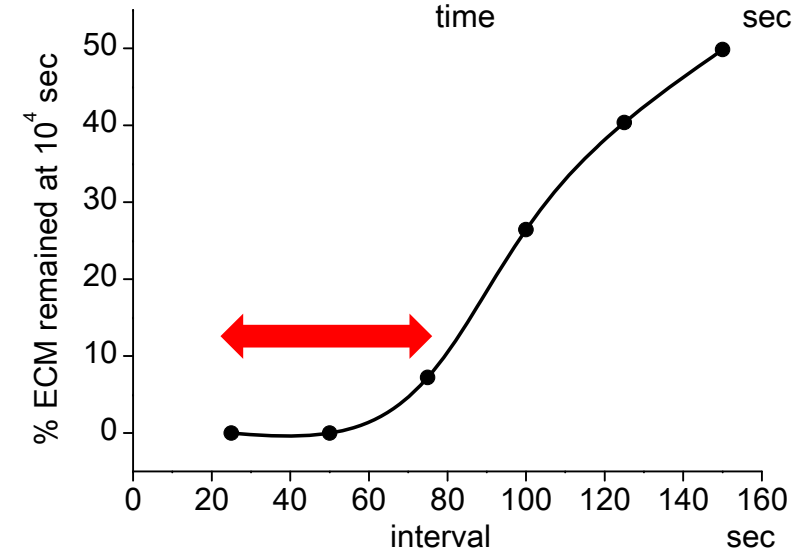
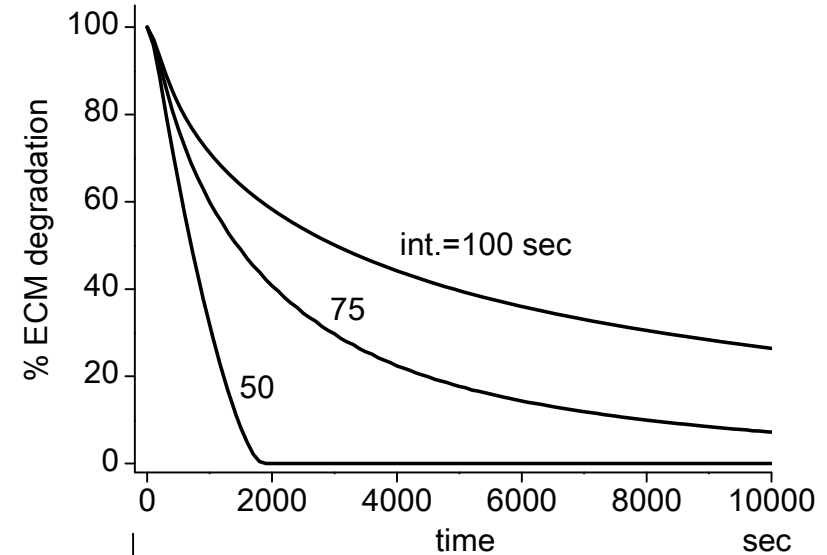


新たなモデルのシミュレーション結果： MT1-MMPの繰り返し膜挿入により3Dで効率的にECMが分解される

モデルの概要

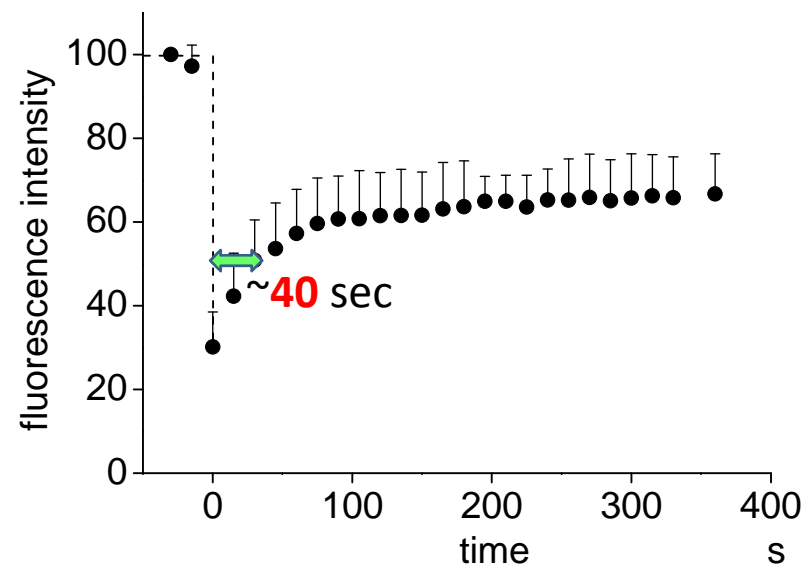
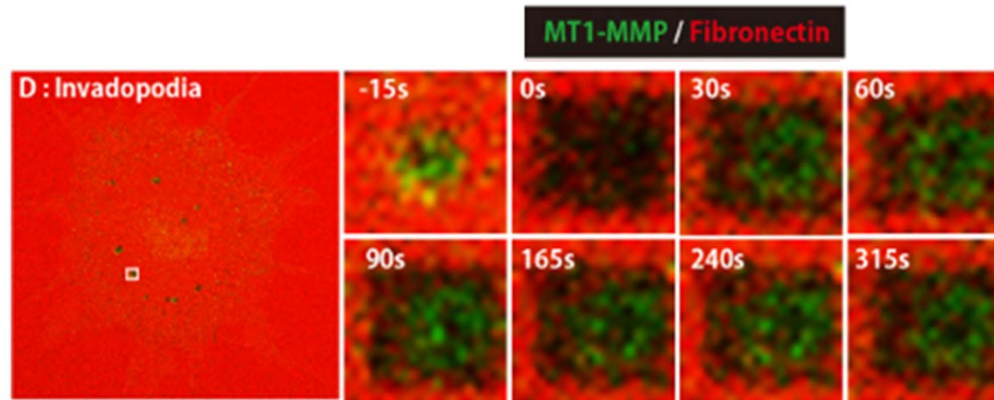


シミュレーション結果

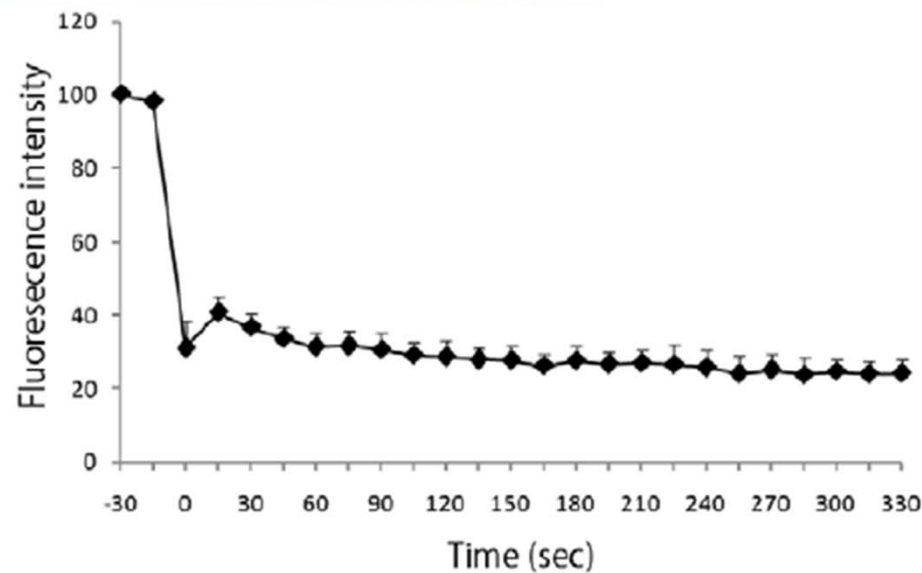
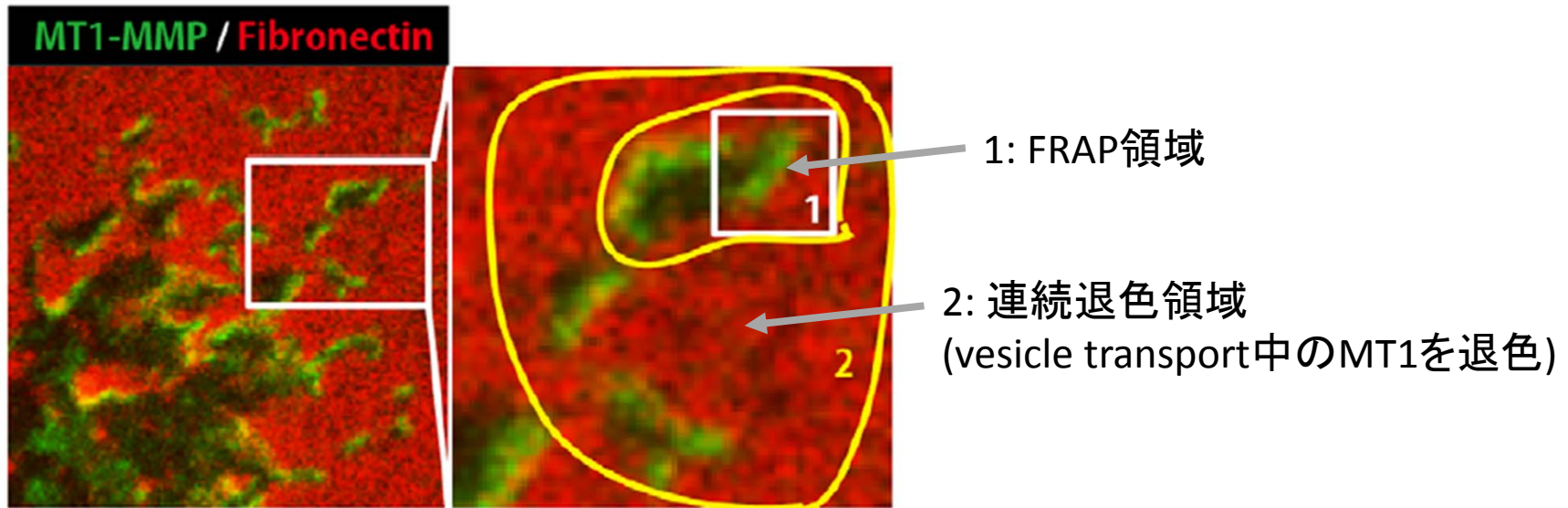


それでは実際にどの程度素早くMT1-MMPがturnoverしているのか？

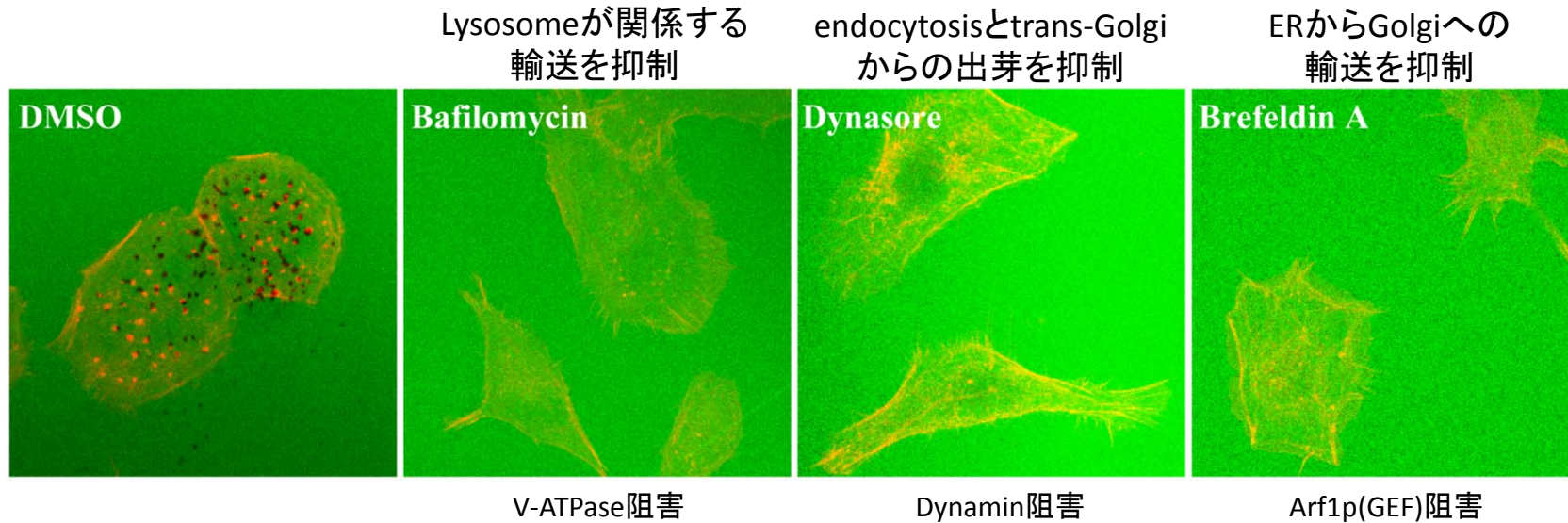
新たなモデルの実験的検証： FRAP実験 (invadopodiaにおいてMT1-MMPは素早くturnoverする)



実験による仮説の確認： MT1-MMPの回復は側方拡散ではない(FLIP-FRAPによる実験)



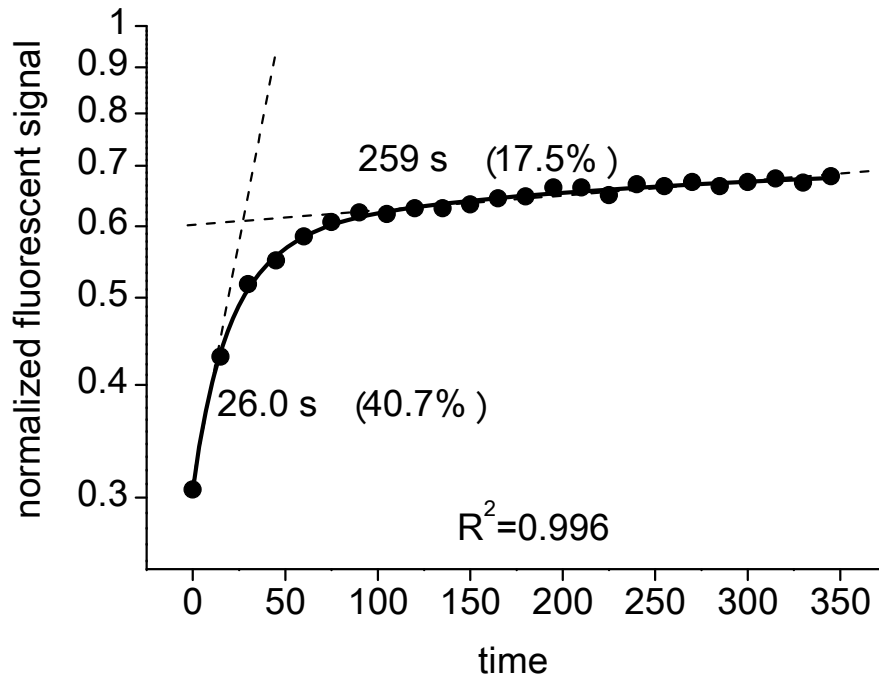
実験による仮説の確認： Vesicle輸送の阻害剤により MT1-MMPによるfibronectin分解が抑制される



数理シミュレーションの予言が検証された！？

実験的検証による新たな発見： 蛍光強度の回復は二つのexponentialカーブの重ね合せで近似できる

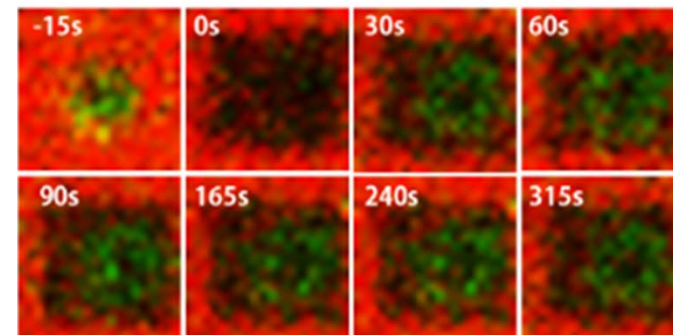
$$F = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + F_0$$



MT1-MMPのturnoverは独立した
二つのランダムプロセスから成る

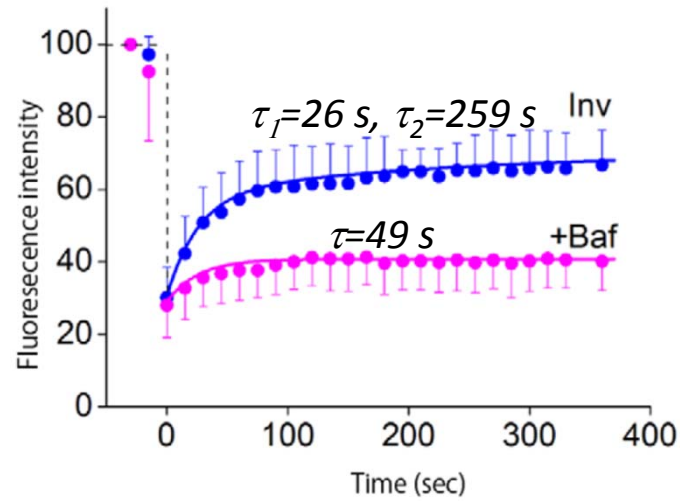
速いプロセス
 $\tau = 26.0 \text{ sec}$

遅いプロセス
 $\tau = 259 \text{ sec}$



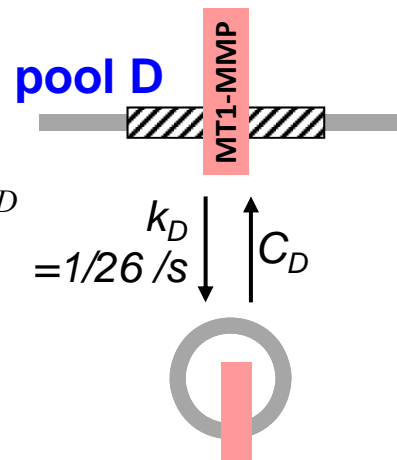
実験の新発見に基づく数理モデルの再構築

bafilomycin-sensitive and -insensitive sites



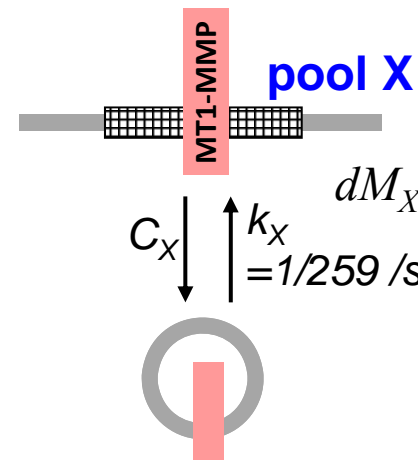
bafilomycin-insensitive
(fast process) site:
fast recovery

bafilomycin-sensitive
(slow process) site:
slow recovery



$$dM_D/dt = C_D - k_D M_D$$

$$= 1/26 \text{ /s}$$



$$dM_X/dt = k_X (M_S - M_X) - C_X$$

$$= 1/259 \text{ /s}$$

数理モデルの再構築: モデルパラメータを求める

モデル理論式

$$M = \frac{C_D k_X + (k_X M_S - C_X) k_D}{k_X k_D} - \frac{k_X (M_S - M_{X0}) - C_X}{k_X} e^{-k_X t} - \frac{(C_D - k_D M_{D0})}{k_D} e^{-k_D t}.$$

FRAP実験の近似式

$$y = ((1 - y_0)(1 - y_S) + y_0) - (1 - y_0)A_1 e^{-t/\tau_1} - (1 - y_0)A_2 e^{-t/\tau_2}.$$

($y_0, y_S, A_1, A_2, \tau_1, \tau_2$ は実験の解析から直接求まる値。)

理論式と近似式を比較して、

$$\frac{C_D k_X + (k_X M_S - C_X) k_D}{k_X k_D} = (1 - y_0)(1 - Y_S) + y_0 = 0.709, \quad \frac{C_D - k_D M_{D0}}{k_D} = (1 - y_0)A_1 = 0.282,$$
$$\frac{k_X (M_S - M_{X0}) - C_X}{k_X} = (1 - y_0)A_2 = 0.121, \quad k_D = 1/26 \text{ /s}, \quad k_X = 1/259 \text{ /s}.$$

従って、

$$M_S = 60.6 \text{ nM},$$

$$M_{X0} = 12.9 \text{ nM},$$

$$M_{X\infty} = 30.1 \text{ nM},$$

$$C_X = 1.18 \times 10^{-10} \text{ M/s},$$

$$k_D = 1/26 \text{ /s},$$

$$M_{D0} = 30.1 \text{ nM},$$

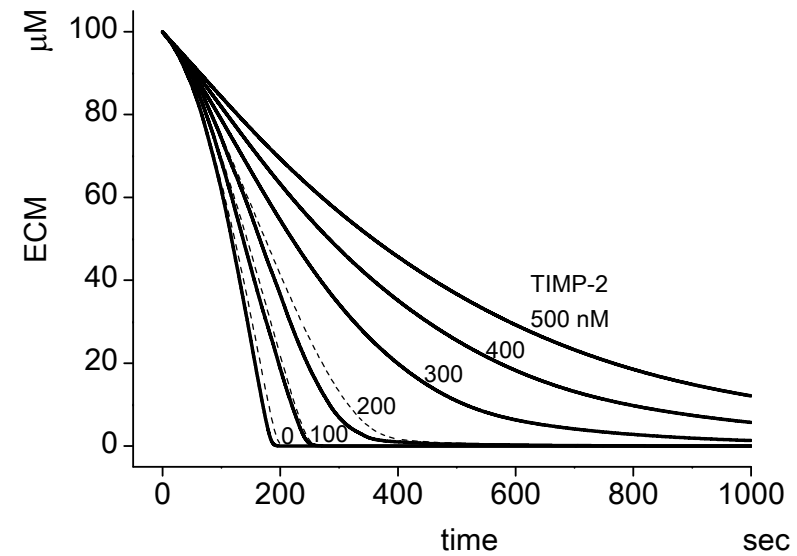
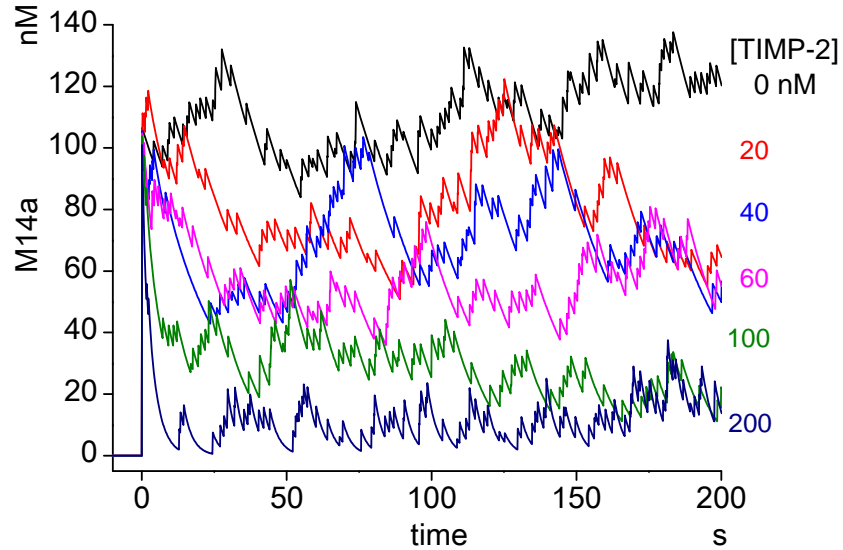
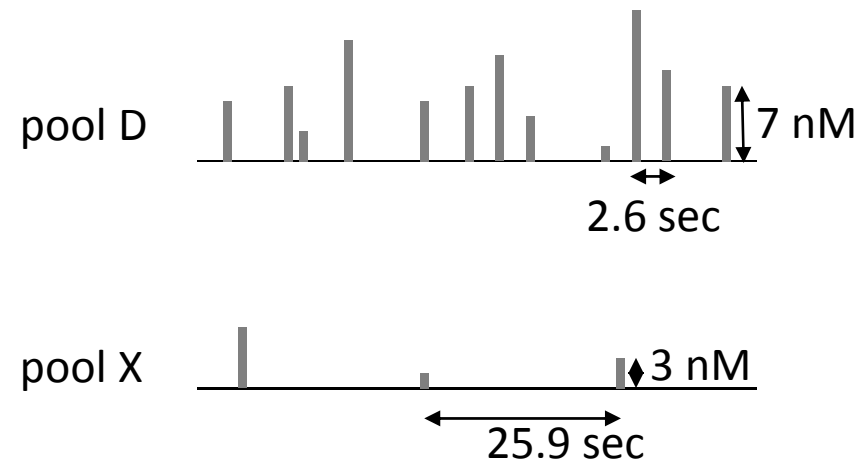
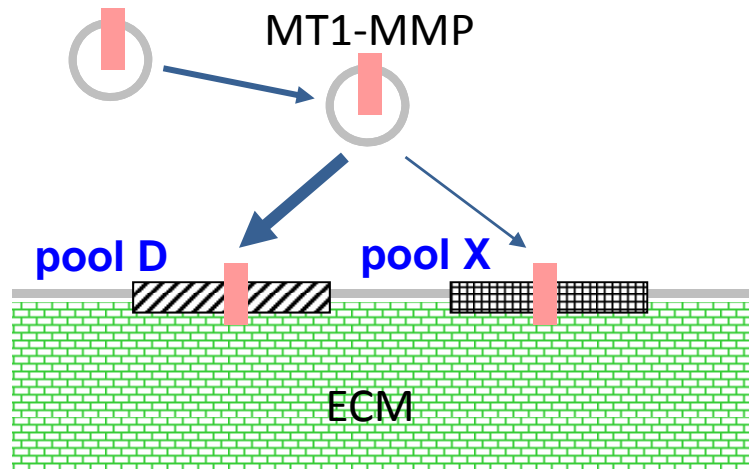
$$M_{D\infty} = 69.9 \text{ nM},$$

$$C_D = 2.69 \times 10^{-9} \text{ M/s},$$

$$k_X = 1/259 \text{ /s}.$$

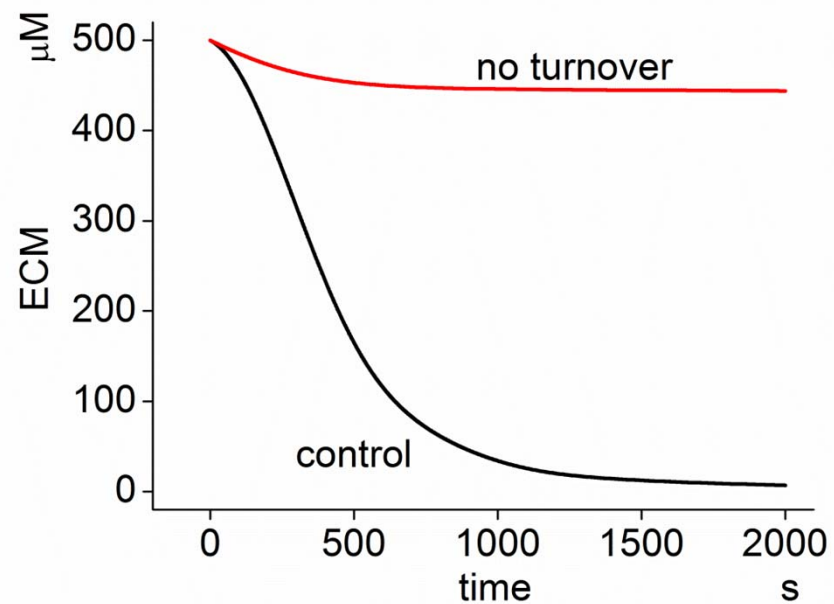
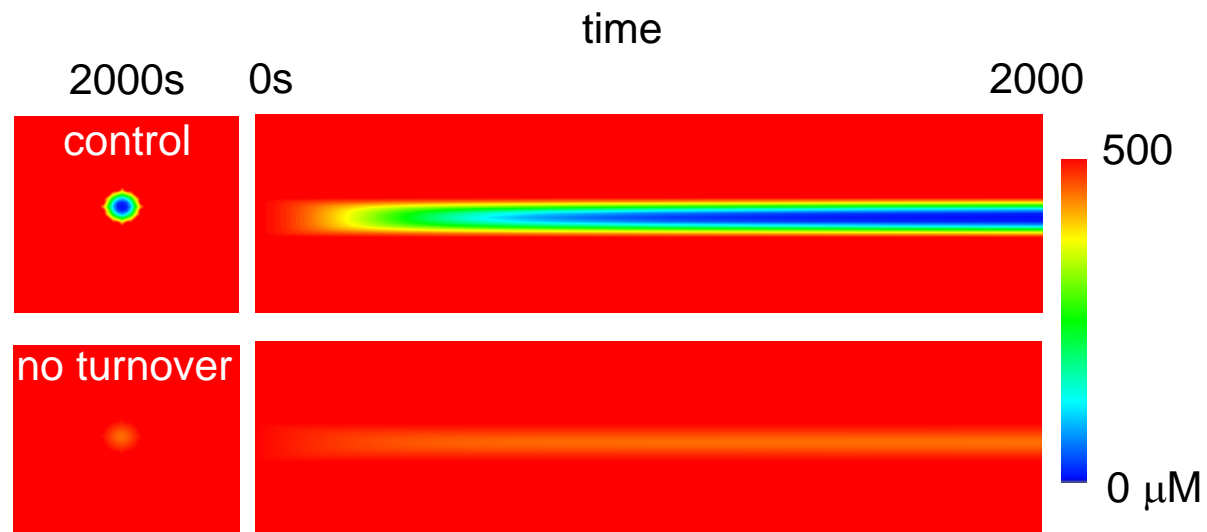
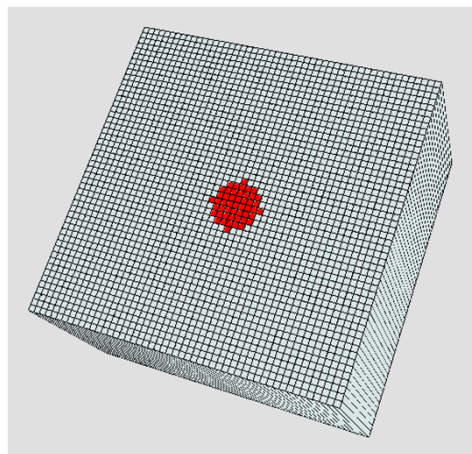
(ただし、photobleach前のMT1-MMP濃度を141nMと設定。)

再構築モデルのシミュレーション結果(点モデル:実験を再現)

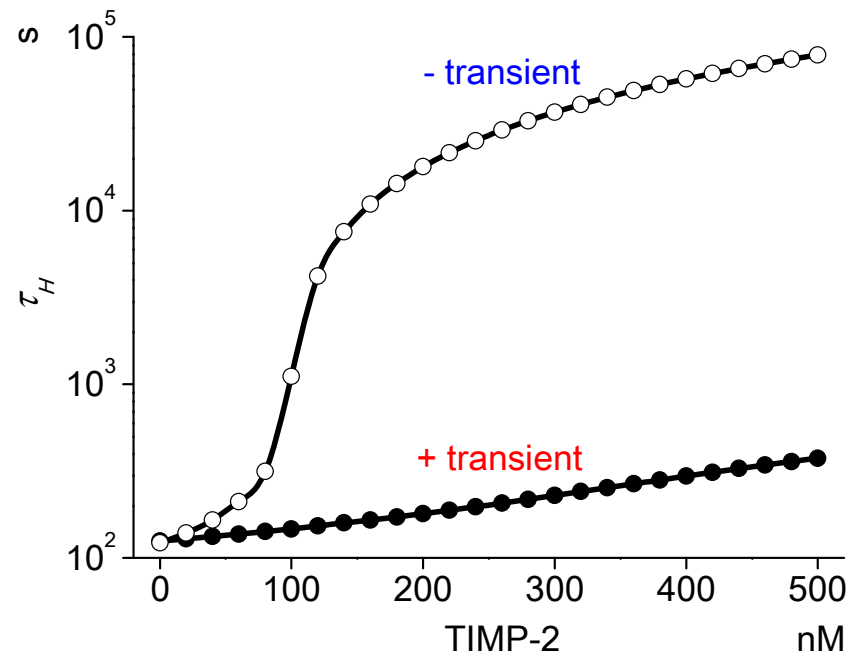
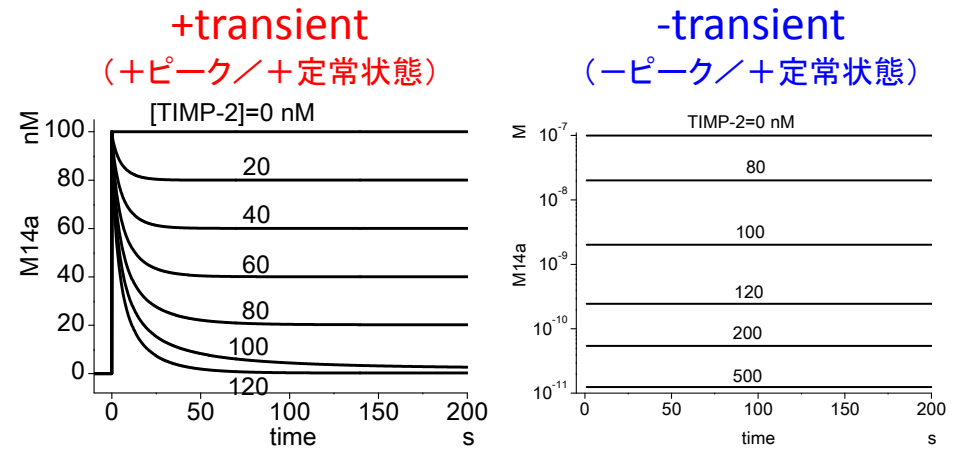
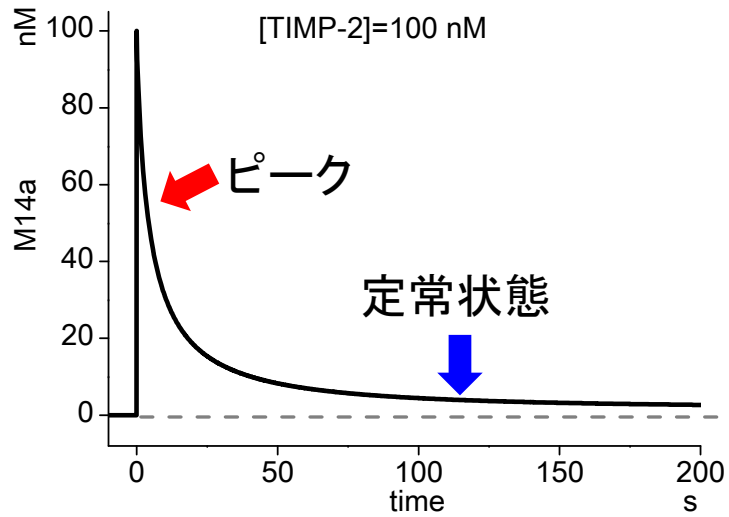


(M14a: fibronectin分解活性を持つ複合体)

再構築モデルのシミュレーション結果(3Dモデル:実験を再現)



シミュレーション結果の検討:ピークと定常状態のどちらが重要か？



シミュレーションの展開・発展: 如何にして浸潤を阻止するか 方法1: 仮想的MT1-MMP阻害剤 (MT-block) によるピーク抑制

知られている分子標的薬を参考にする

阻害剤	血中濃度(μM)	k_f ($V/M/s$)	k_b (V/s)	K_D (nM)	IC_{50} (nM)
TIMP-2 ¹⁾	~0.1	2.74×10^6	2.00×10^{-4}	0.07	
マリマスタット ²⁾				2.1	1.5~9 (MT1)
(イマチニブ ³⁾	7	1.53×10^5	5.85×10^{-4}	3.83	

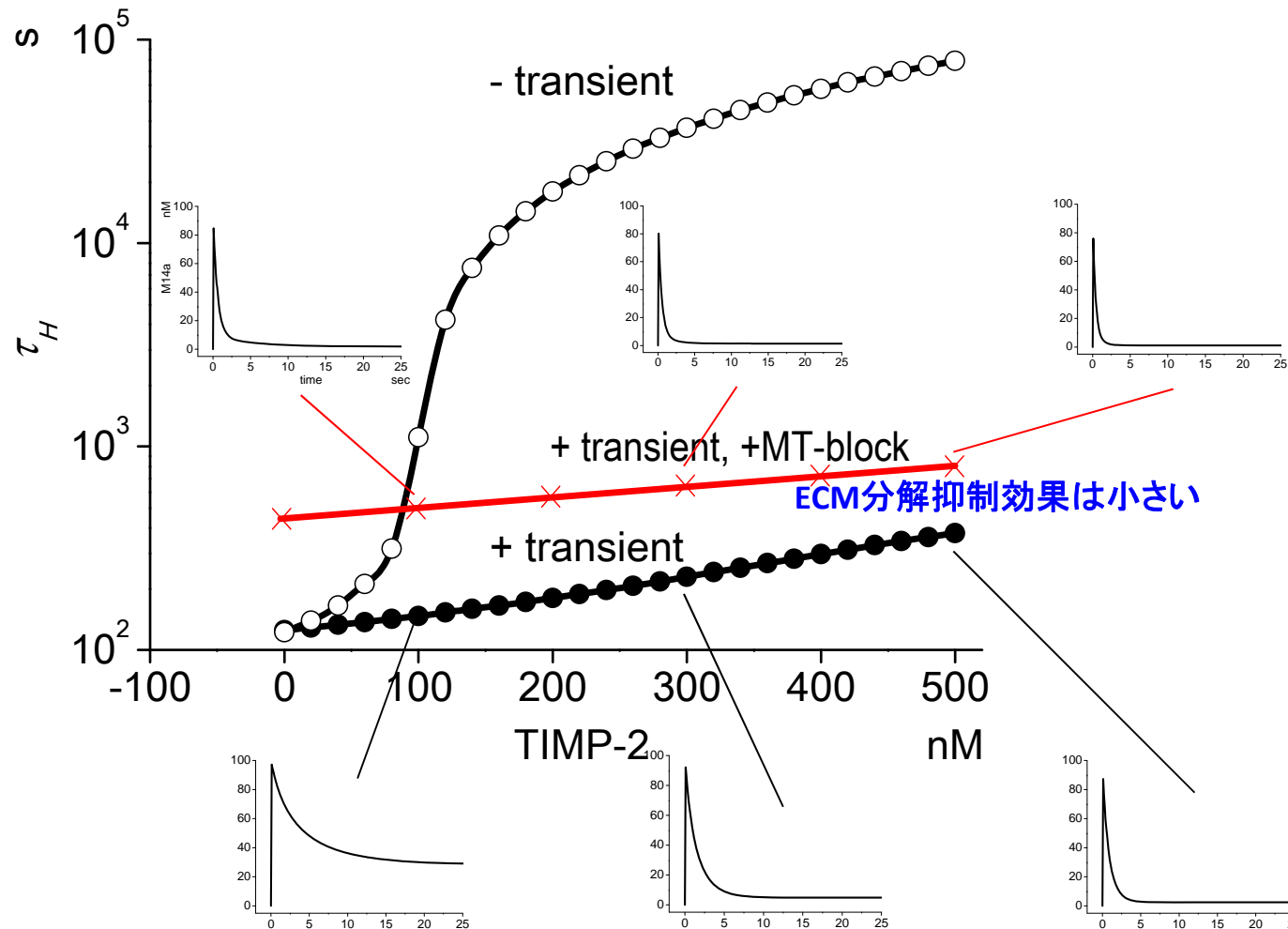
1) endogenous MT1-MMP inhibitor

2) broad spectrum MMP inhibitor

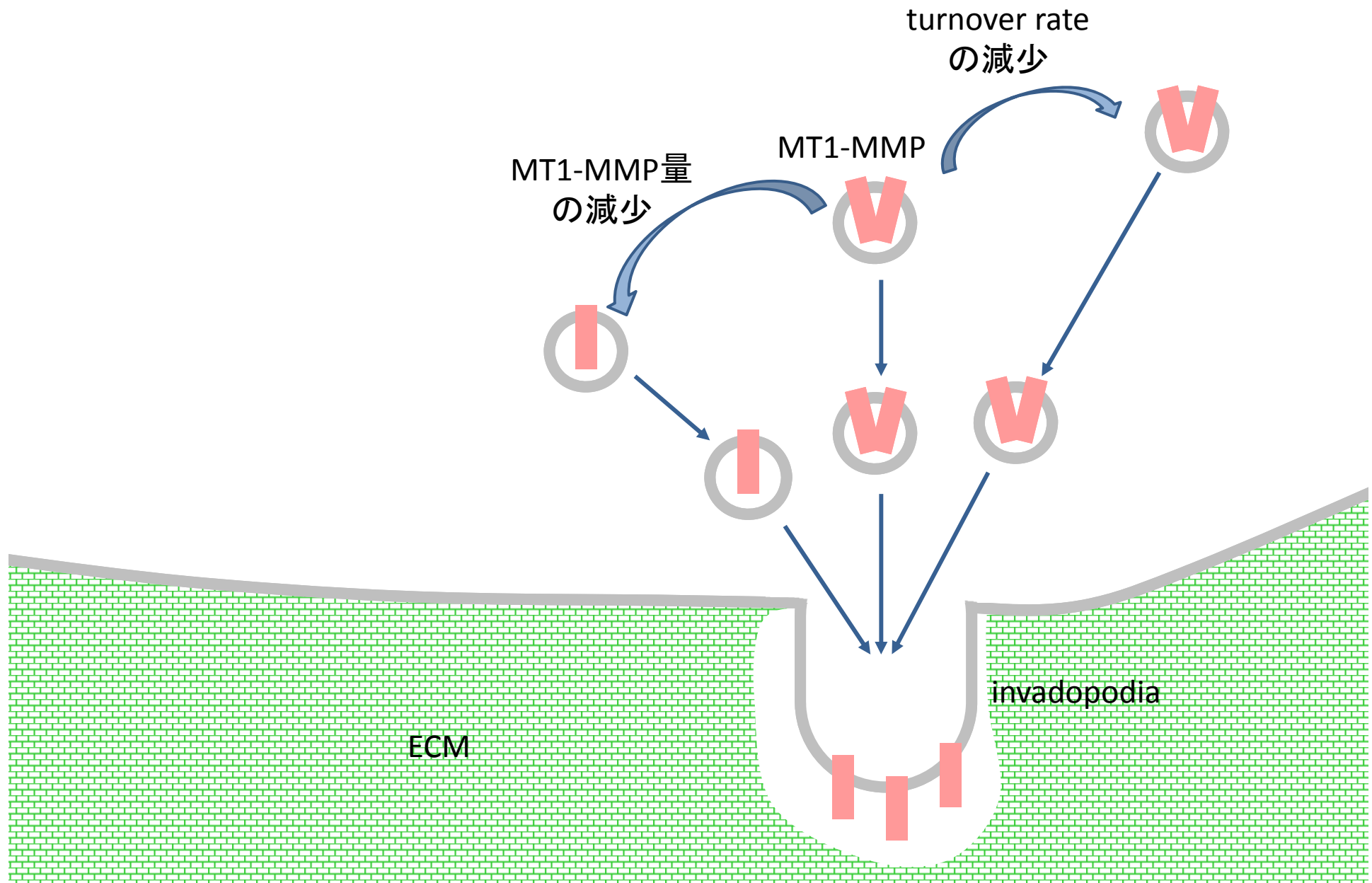
3) tyrosine kinase inhibitor

シミュレーションの展開・発展：如何にして浸潤を阻止するか 方法1：仮想的MT1-MMP阻害剤(MT-block)によるピーク抑制

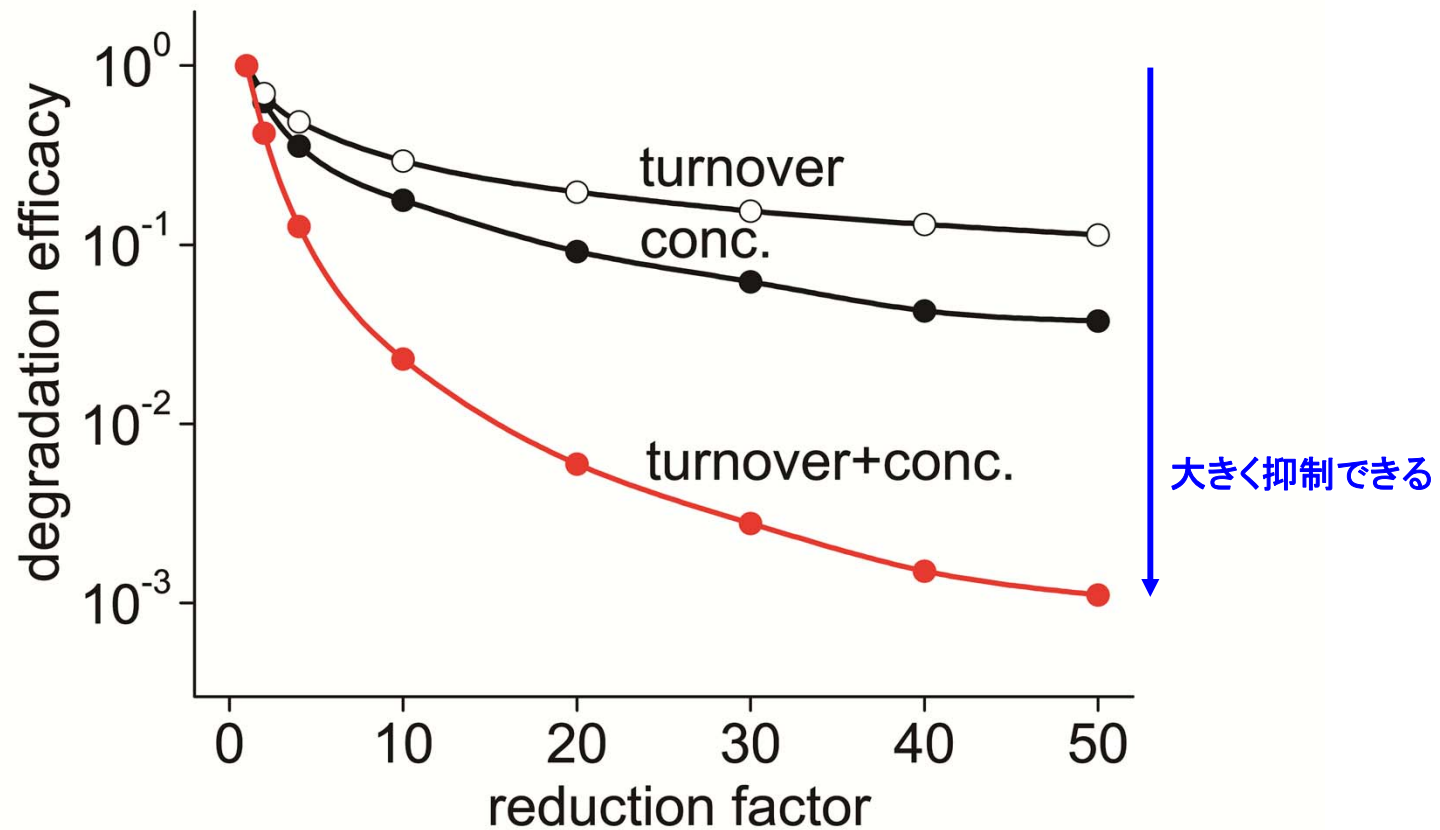
血中濃度： $7\mu M$ 、 $k_f=1.53 \times 10^5 / M/s$ 、 $k_b=5.85 \times 10^{-4} / s$ 、 $K_D=3.83 nM$



シミュレーションの展開・発展：如何にして浸潤を阻止するか 方法2: InvadopodiaにおけるMT1-MMP量の抑制



シミュレーションの展開・発展: 如何にして浸潤を阻止するか 方法2: InvadopodiaにおけるMT1-MMP量の抑制



シミュレーションの実例のまとめ(研究で発見したこと)

