

課題番号 70

がん遺伝子のタンパク質相互作用を指標とした 新規創薬標的の同定

[1] 組織

代表者：中奥 敬史
(国立がん研究センター研究所)

対応者：宇井 彩子
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：
田畑 潤哉 (国立がん研究センター研究所)
丸山 宏輔 (国立がん研究センター研究所)

研究費：物件費 20万円

[2] 研究経過

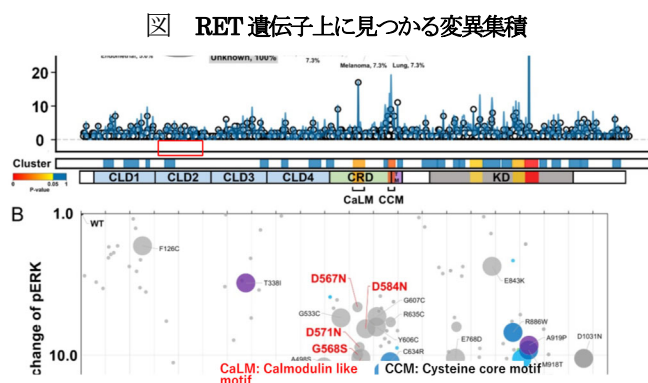
がんゲノム医療の実装により、臨床情報と紐付いたがんゲノムの実世界データの蓄積が進みつつある。しかしながら、見つかる遺伝子異常の大部分は意義不明であり、10%程度しか標的治療薬に結びついていない。申請者らは、がん患者由来の遺伝子異常に対して、細胞や精製タンパク質を用いた *in vitro* 実験と分子動力学シミュレーションを組み合わせることで、変異による活性や薬剤感受性変化による意義付けが可能であることを示してきた(Nakaoku T, et al. Nat Commun. 2018, Wirth, Kohno et al, JCO Pres Oncol, 2019)。また、サンプル中の複数の遺伝子間に共有される変異情報の解析により、がん遺伝子上の変異にはタンパク質相互作用を起こすドメインに集積する傾向があり、変異産物の協調的な働きによる相互作用変化が、がん形質獲得の一因となることがわかってきた。そこで、本研究では、大規模ゲノムデータをもとに共有される変異情報を収集し、その統計学的な有意性と変異産物によるタンパク質相互作用変化ががん形質に与える影響を理解し、治療標的性を明らかにすることを目標とする。

以下に本研究実施にあたり、設けた研究実施項目ごとに、おける研究経過を記載する。

1. VUS 情報のリスト化・変異遺伝子発現ベクターライブラリーの作成

AACR-GENIE 登録された全癌腫 80,000 例のクリ

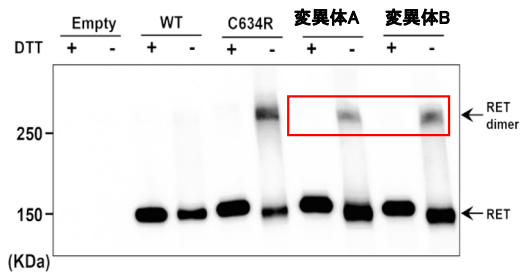
ニカルシークエンスデータより変異情報を収集した。ゲノム情報から機能変異の集積には、変異塩基コンテキスト情報をもとに変異をコンピューター上で発生させ、実測値との比較を行うことで、集積変異の統計的な有意性を検出するシステムを構築した。このシステムの利用により、これまで VUS として治療意義の明らかでなかった変異にもホットスポットを伴う変異集積が認められた。本研究では解析経験のある RET キナーゼタンパク質に認められた遺伝子集積クラスターに着目し、解析を進めた。同定された変異群をタンパク質三次元構造上にマッピングすると、カルモジュリンタンパク質の有する特徴的なモチーフに類似した、Ca²⁺ イオンに直接結合するドメインへ集積する構造的特性が認められた(下図)。選出した変異に対して、cDNA 発現レンチウイルス発現ベクターを構築した。



2. VUS の *in vitro* 解析データ取得

発現ベクターライブラリーを用いて、293H 細胞に対しての一過性発現系によるシグナル変化と NIH-3T3 細胞への安定発現モデルを用いてコロニー形成能にて、がん形質に関わる獲得機能を評価した。対象となった遺伝子異常は複数の癌種渡って見つかり、同じドメインの近傍残基に生じる既知の腫瘍原性変異が甲状腺がんを集積していたことは対照的であった。

対応者である、宇井彩子准教授との共同研究を通じて、この遺伝子異常をドキシサイクリン誘導下で安定発現させた 293 細胞を樹立した。変異タンパク質産物を発現させると、非還元化での RET タンパク質の 2 量体化が認められた(図)。



また、Ca イオンを培養細胞培地から除去すると変異体に与える影響は乏しい一方で、野生型は2量体化の促進が認められた。この2量体化によりRETタンパク質と下流シグナルのリン酸化への関連性が認められた。また、当該変異を有するドメインの局所的なコンストラクトとして発現させた精製タンパクを取得することができ、タンパク質の相互作用を調べると、変異体では、2量体化が確認した。

また安定発現させたBa/F3細胞モデルにおいてはRET特異的な阻害剤に対して感受性が認められ、新たな治療標的として期待のできる結果が得られた。

加齢研側の対応教員である宇井彩子准教授とは、およそ2~3ヶ月に1回程度の研究進捗についてWebおよび面談での継続的な情報共有を行うとともに、細胞株の活用案や精製タンパク質実験における研究方針について注意深くディスカッションを行った。

3. 分子動力学シミュレーションを組み合わせた変異機能理解

当該変異の存在するドメインモノマーを切り出し、野生型と変異体に対してCaイオンの局在性とその変化が与える構造変化を1マイクロ秒の分子動力学シミュレーションを行った。変異群は、バリエーションによる強弱の程度を認めるが、Caイオンの局在性に変化を生じさせ、一様にタンパク質の構造を不安定化させることがわかった。このタンパク質の構造変化はタンパク質表面の極性残基の露出面に変化をもたらすことがわかった。さらに、RET細胞外メインとリガンド、共受容体で構成される多量体での分子動力学シミュレーションも実施しており、Caイオンの結合に与える影響がタンパク質間の不安定化に寄与することをモデル化できた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度の共同研究により、80,000例のシークエンスデータより収集した大規模ゲノム情報をもとに、既知のがん遺伝子であるRET遺伝子上にこれまで意義不明であった有意変異集積を見変異集積を見出した。

有意集積のあった変異をタンパク質構造にマッピングを行い、細胞外ドメインのCaイオン結合モチーフ

に集積していることがわかった。そのフェノタイプの再現に分子動力学シミュレーションを行い、変異体でのCaイオンの局在安定性低下と構造変化、また、機能獲得を示唆するタンパク表面の電化の変化が認められた。対応者との共同研究を通じ、当該変異を導入したタンパク質と細胞モデルでは、2量体化に影響を与える変化が認められ、遺伝子導入した細胞ではがん形質獲得と特異的阻害剤による活性阻害効果が認められた。

これらをまとめ論文作成準備中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究成果により、新規変異群を検出することによるRETキナーゼ阻害薬への応答が見込まれるがん患者の同定法の開発につなげる導出へつながっている。RETキナーゼに対する阻害薬は世界で開発されており、米国では肺がんや甲状腺がんに対して、セルパカチニブとプラルセチニブが承認され、前者は本邦でも保険収載されている。その治療効果は上記以外のがん種でも示され、pan-cancerでの承認が期待されている。本研究に見出したRET変異は、現在のRET阻害剤治療のコンパニオン診断薬が対象としない新規のものであり、その検出はRETキナーゼ阻害薬が高い治療効果をもたらすがん患者の同定をもたらし、進行がんの個別化治療の推進への寄与が期待される。

また、本研究では、変異の機能理解に、実験手法と分子動力学シミュレーションを組み合わせた新たな機能解析法を用いた。この手法を応用することで、これまで機能意義の明らかでなかった変異の機能理解への応用が考えられ、変異機能情報を取得することで、がんゲノム医療への寄与を図っていく。

[4] 成果資料

(1) Annotation of variants of unknown significance on RET for precision oncology. Takashi Nakaoku, Junya Tabata, Takashi Kohno, 第80回日本癌学会学術総会、2021、国内、ポスター

(2) Development of a drug response model: prediction of RET TKIs sensitivity using MD simulation, Kosuke Maruyama, Takashi Nakaoku, Junya Tabata, Takashi Kohno, 第80回日本癌学会学術総会、2021、国内、口演

(3) Identification of novel druggable mutations of RET kinase -Novel activation mode of RET kinase protein, Junya Tabata, Takashi Nakaoku, Takashi Kohno, 第80回日本癌学会学術総会、2021、国内、口演