

課題番号 71

薬剤到達の効率拡大に資する 意義不明変異の機能アノテーション

[1] 組織

代表者：河野 隆志
(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)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

【背景】

がんゲノム医療の先鋒としての役割が期待される遺伝子パネル検査の結果、既存分子標的薬が投与される患者の割合は 15%程度にとどまることが大きな問題であり、薬剤到達効率の増大が、今後のがんゲノム医療における喫緊の課題である (図1)。

【目的】

本研究では、既承認のキナーゼ阻害剤の治療標的となる EGFR 関連キナーゼがん遺伝子を基盤とした VUS の機能アノテーションを行う。具体的には、正確な機能評価を行うため、細胞の特定のゲノム部位に AAVS システムを用い VUS を含む cDNA 発現ベクターを単一コピー組み込み、野生型と比べた際の下流シグナルの活性化や二量体形成のしやすさを評価する。

VUS の選択については、EGFR,HER2,HER3,RET 遺伝子に関して、これまでの国内外の臨床シークエンス結果より 300 を超える体細胞変異のリスト化を終えている。さらに、本研究期間中、臨床シークエンスで検出される VUS のリスト化を継続しながら、機能アノテーションに用いられる VUS の過不足をエキスパートパネル会議や遺伝子診療部門の診療会議など議論し、追加してゆく。

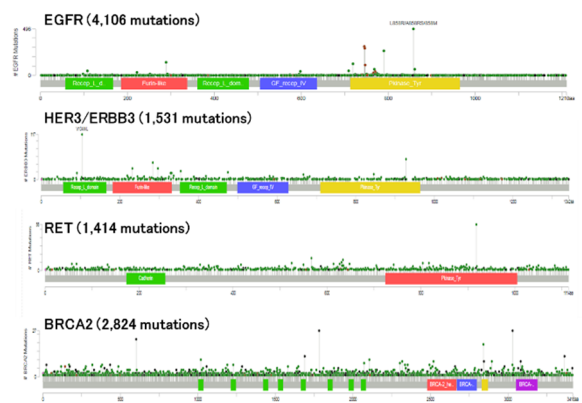


図1. クリニカルシークエンスで同定されるVUS (米国Gennieプロジェクト)

本年度はまず RET に焦点をあてて、上記の実験系の構築を行うために、細胞の選定とプラスミドの構築と機能アノテーションのためのアッセイ系の選択を行う。

また本研究の打ち合わせは1~2か月に1度、対面あるいはオンラインなどにより行った。

【実験計画】

- 1) RET 遺伝子の野生型と VUS のタンパク質を発現させるためのプラスミドの構築を行った。
- 2) 上記 RET 遺伝子の野生型と VUS を安定発現させる細胞を樹立した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1) まず RET の野生型と VUS の配列を、DOX で発現誘導できる Flag-tag 付きプラスミドに組み込んで、DNA シークエンスの確認を行った。その結果、野生型と VUS 共に発現用プラスミドが構築できた

2) 上記プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションした。約2日後に細胞をはがして撒き直すと共に、抗生物質を用いてセレクションを行った。約2週間後、いくつかのコロニー形成が確認されたため、これらのコロニーをピックアップして、新たなプレートで増殖させた。増殖を確認後、一部の細胞を DOX で2日間培養後、WB のサンプル作成のために回収し、サンプル

ル Buffer に懸濁させて 94°C で 3 分加熱した。これらのサンプルを SDS-PAGE で分離し、Flag 抗体により発現を確認した。その結果、上記野生型と VUS のタンパク質が安定に発現されていることが確認できた。今後はこれらの安定細胞を用いて、機能アノテーションを行う予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は RET での機能アノテーションを行うためのシステム構築につながると考えられる。今回、DOX 処理により発現できるシステムが構築できたと考えられたため、今後はこの細胞を用いて機能アノテーションを行い、新たなメカニズムの解明につなげたい。

[4] 成果資料

本研究の成果は論文として投稿中である。