

令和2年度シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

2021年6月11日提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 田畑 潤哉



研究課題：キナーゼ遺伝子に同定される意義不明変異の機能ゲノム解析に基づく
がんゲノム医療の推進

研究期間： 自 2020年4月1日
至 2021年3月31日

研究指導者：氏名 河野 隆志



公益財団法人 がん研究振興財団

(1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

1) 要旨

現在、がんゲノム医療において遺伝子検査結果による薬剤到達性の低さが問題視されている。この原因の一端として、がん遺伝子上に臨床的意義の不明な遺伝子変異 (Variants of uncertain significance: VUS) が多数報告されていることが挙げられ、VUS の解決が求められている。そこで今回の研究では、RET キナーゼ遺伝子上に生じる VUS を対象とし、新たな治療標的を同定し、その活性化機構を解明することを目的とした。

RET 遺伝子上に認められる VUS において活性スクリーニングを行ったところ、新たな活性化変異のクラスターが見出された。これらの活性化変異は RET 特異的阻害剤に対して感受性を示した。さらにこの活性化変異群のうち複数の変異は、RET 活性化時に協働するリガンド及び共受容体との反応性が上昇していることが明らかになった。これらの研究結果により RET 遺伝子の VUS の中に、これまで認知されてこなかった活性化機構を有する、新たな治療標的となる活性化変異群が存在していることを明らかにした。

2) 序

2019年6月に保険収載された遺伝子パネル検査はがんゲノム医療の基盤として期待されている。しかし遺伝子検査の結果、分子標的薬が投与される患者の割合は15%程度と不十分である。一方で、既知の治療標的遺伝子に多くのVUSが検出されることが明らかになっており、VUSの意義付けによる機能ゲノム情報が、薬剤到達率の向上に寄与すると強く期待されている。また当研究室が関わるSCRUM-Japanなどの産学連携全国がんゲノムスクリーニングにおいても、様々ながん遺伝子に多数のVUSが検出されている。その中でRETやEGFRなどのチロシンキナーゼ遺伝子には、既に治療標的とされているホットスポット変異以外にも遺伝子全般でVUSが多く検出され、その一部は癌形質獲得に寄与し、薬剤感受性や耐性に影響を与えることが分かってきた。当研究室では既にRETキナーゼ遺伝子変異の機能に関して研究経験があり、これまでにRETキナーゼドメイン上に出現した2次変異が、薬剤耐性に寄与する機能獲得型変異であることを報告(Nakaoku et al. Nat Commun. 2018)している。これらの研究で検証されてきた機能ゲノム解析手法はVUSの意義付けや治療薬剤の選別に応用可能であると考えられる。

そこで本研究ではRETキナーゼ遺伝子上に生じるVUSを対象とし、新たな治療標的と治療方法の探索、活性化機序の解明を行うことを目標に、複数の細胞実験系を用いた活性スクリーニングを行った。

3) 実験方法

細胞株

Ba/F3 細胞は慶応義塾大学の安田浩之博士から提供された。293FT 細胞と WEHI-3B 細胞は、それぞれ Invitrogen 社 (Carlsbad, CA, USA) と 理研バイオリソースセンター (日本) から入手した。293H 細胞は Thermo Fisher Scientific 社 (Waltham, MA, US) から入手した。NIH3T3 細胞は国立がん研究センター研究所の間野博行博士から提供された。

WEHI-3B 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI 培地で培養した。Ba/F3 細胞は 10%FBS と 5%WEHI-3B 調整培地 (インターロイキン 3 [IL3] の供給源) を含む RPMI 培地で培養した。HEK293FT 細胞、HEK293H 細胞は 10%FBS を含む DMEM 培地で培養した。NIH3T3 細胞は 10%FBS を含む DMEM/F-12 培地で培養した。すべての細胞を 37°C、5%CO₂ で培養した。

レンチウイルスの作成と Ba/F3 細胞への感染

293FT 細胞 (10cm プレートあたり 6×10^6 細胞) に、野生型または変異型 RET cDNA を含む pLenti-6/V5-DEST プラスミドと ViraPower パッケージングミックス (Invitrogen) を Lipofectamine 3000 試薬 (Invitrogen) を用いてトランスフェクトし、レンチウイルスを作製した。培地交換から 42 時間後にウイルス上清を回収し、10 μ g/ml の Polybrene (SigmaAldrich, St Louis, MO, USA) の存在下で、32°C、3000 \times g、150 分間の遠心分離を行い、 4.0×10^5 個の Ba/F3 細胞に感染させた。37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した後、IL3 と 8 μ g/ml のブラストサイジン (Invitrogen) を含む培地中で 10-14 日間培養した。ブラストサイジン耐性細胞を IL3 を含まない培地で 14 日間培養した。RET タンパク質の発現はイムノブロットングで確認した。

フォーカスフォーメーションアッセイ

NIH3T3 細胞に 4 μ g/ml の Polybrene (SigmaAldrich, St Louis, MO, USA) の存在下でレンチウイルスを感染させた。37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した後、培地を通常培地へ交換した。感染 72 時間後より、RET リガンド Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) と共受容体 GDNF Family Receptor Alpha1 (GFRA1) を含むまたは含まない B55% を含む DMEM/F-12 培地で培養した。感染 17 日後にギムザ染色を行い、フォーカスの形成を評価した。

HEK293H 細胞トランジェントアッセイ

HEK293H 細胞に野生型または変異型 RET cDNA を Lipofectamine 3000 試薬 (Invitrogen) を用いてトランスフェクトした。FBS を含まない DMEM 培地で 72 時間培養後に細胞を回収した。また RET リガンド GDNF と共受容体 GFRA1 を段階希釈して細胞培地に含有し、6 時間培養後に細胞を回収した。

Ba/F3 細胞生存率の測定

RET 変異を有するもしくは有さない RET 安定発現 Ba/F3 細胞 5000 個を 96 ウェルプレートに播種した。阻害剤は段階希釈してウェルに加えた。細胞生存率は薬剤処理 72 時間後に CellTiter-Glo 試薬 (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、EnVision (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) で測定した。細胞生存率は未処理サンプルの細胞数に対する薬剤処理サンプルの細胞数で算出した。データは GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いてグラフ表示した。

ウェスタンブロット解析

HEK293H 細胞トランジェントアッセイでの細胞回収後に、RIPA 緩衝液 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) に PMSF、Protease /Phosphatase inhibitor cocktail (Cell Signaling Technology) を加え、遠心分離後に上清に SDS 緩衝液 (Cell Signaling Technology) を加えた。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを室温 1 時間で PVDF ブロッキング試薬 (TOYOBO, Osaka, JP) を用いてブロッキングした。次いで一次抗体を含む Can Get Signal Solution1 (TOYOBO) で標識した。TBS-T で洗浄後、一次抗体ホストに応じた二次抗体を含む TBS で標識した。TBS-T で洗浄後 Western Lightning ECL pro (Perkin Elmer) を用いて化学発光シグナルを検出した。検出には LAS-3000 Imaging System (Fujifilm, Tokyo, JP) を用い、シグナル強度を Multi Gauge Software を用いて解析した。一次抗体には RET (Cell Signaling Technology, #14556)、リン酸化 RET (Cell Signaling Technology, #3221)、Erk (Cell Signaling Technology, #9102)、リン酸化 Erk (Cell Signaling Technology, #4370)、二次抗体には抗マウス (Cell Signaling Technology, #7074) を使用した。

4) 結果

RET 細胞外ドメインには新たな活性化変異クラスターが存在する

HEK293H 細胞と NIH3T3 細胞を用いて RET 変異体の活性スクリーニングを行った。HEK293H 細胞に RET 野生型または 60 種類の変異型 cDNA をトランスフェクトし、ウェスタンブロットで Erk のリン酸化を評価した。VUS を含む複数の RET 変異において、野生型と比較して 5 倍以上のリン酸化強度の上昇を認めた。また NIH3T3 細胞に対して、RET 野生型または変異型 cDNA レンチウイルスを感染させ、フォーカスの形成を評価した。複数の RET 変異において、野生型では認められないフォーカスの形成を認めた。リン酸化強度及びフォーカス形成の関係を変異毎にプロットすると、既知の活性化変異群に加え複数の VUS において活性を示した。また一部の活性化変異はクラスターを形成しており、新たな活性化変異領域が存在することが示唆された (図 1)。

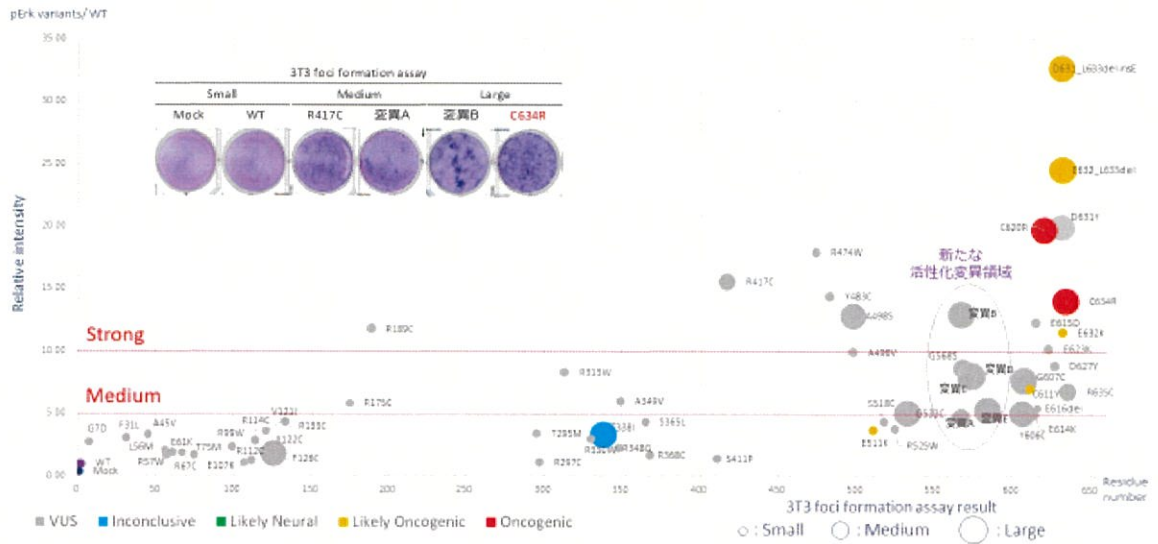
RET 変異 Ba/F3 細胞は RET 依存的に生存活性を獲得している

スクリーニングにおいて、リン酸化およびフォーカス形成双方で強い活性を示した変異体に関して RET 安定発現 Ba/F3 細胞を作成した。RET 特異的阻害剤である Selpercatinib、Pralsetinib で薬剤試験を行うと、RET 安定発現 Ba/F3 細胞はそれぞれの阻害剤に対して感受性を示した。このことから活性型 RET 遺伝子変異によって RET 依存的な細胞生存形質を獲得していることが示された (図 2)。

RET の新規活性化変異クラスターにはリガンドおよび共受容体との反応性が上昇する変異が存在する

スクリーニングで見出した新規活性化変異群において、RET リガンド GDNF と共受容体 GFRA1 を用いてスクリーニング時と同様のアッセイで活性を評価した。フォーカスフォーメーションアッセイでは新規活性化変異群の一部の変異 (変異 1、変異 3) では野生型と比較してリガンド及び共受容体の存在下でのフォーカス形成が増加しており、リガンド及び共受容体との反応性が上昇していることが示唆された。また同様に HEK 293H 細胞を用いたトランジェントアッセイ系でも変異 1 において、リガンド及び共受容体との反応性が上昇していることが示された (図 3)。

図 1. RET 細胞外ドメインには新たな活性化変異クラスターが存在する



横軸は残基番号を示す。縦軸は HEK293H 細胞を用いたトランジェントアッセイでの Erk のリン酸化を定量化し、各変異型と野生型との相対値を示す。円の大きさはフォーカスフォーメーションアッセイのフォーカス形成の程度を 3 段階に分けて示す。円の色は OncoKB のクライテリアに基づいたアノテーション情報を示す（灰色；VUS、水色；Inconclusive、緑；Likely Neural、黄色；Likely oncogenic、赤；Oncogenic）。

図 2. RET 変異 Ba/F3 細胞は RET 依存的に生存活性を獲得している

a Selpercatinib (ug/ml) 細胞生存率 (%)

0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
0.001	96.90	99.88	87.01	105.22	109.39	101.47	109.37	102.83	104.01
0.003	90.44	94.47	71.50	105.92	104.13	98.52	104.31	98.45	99.83
0.01	88.22	87.45	20.56	109.76	112.25	91.43	105.31	102.51	97.41
0.03	65.72	71.27	4.29	101.37	92.98	55.07	81.63	77.36	28.19
0.1	36.56	63.40	1.33	61.28	9.46	11.28	12.77	3.97	2.46
0.3	17.83	74.03	1.03	33.00	0.77	6.09	6.04	0.46	0.81
1	16.32	56.41	0.65	22.80	0.36	4.93	5.29	0.20	0.33
3	11.44	19.20	0.31	10.83	0.24	3.25	3.93	0.12	0.13
10	7.46	5.83	0.21	0.89	0.18	1.24	2.16	0.08	0.07
	R417C	変異A	変異B	C620R	D631Y	D631_L633	E632_L633	C634R	M918T

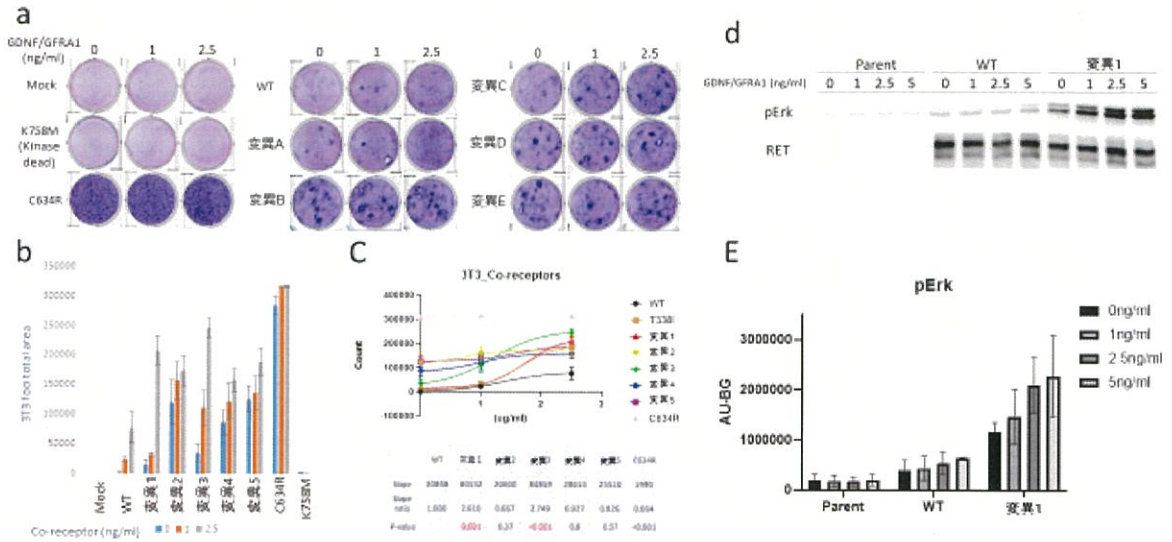
b Pralsetinib (ug/ml) 細胞生存率 (%)

0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
0.001	101.00	101.73	98.78	97.00	103.18	97.29	101.36	104.91	93.94
0.003	101.83	103.00	87.34	103.36	104.49	95.96	96.57	107.24	97.84
0.01	101.70	94.47	25.03	98.12	100.10	76.76	78.99	106.71	96.10
0.03	74.33	79.08	1.80	90.75	63.58	23.13	24.94	105.87	95.73
0.1	19.78	62.34	0.36	33.22	1.86	1.34	5.05	16.18	13.80
0.3	2.11	32.82	0.20	2.64	0.48	0.85	4.14	0.70	1.77
1	0.38	2.00	0.12	0.45	0.27	0.68	3.85	0.27	0.49
3	0.15	0.30	0.08	0.22	0.20	0.43	3.50	0.14	0.20
10	0.09	0.17	0.08	0.17	0.17	0.45	3.44	0.09	0.10
	R417C	変異A	変異B	C620R	D631Y	D631_L633	E632_L633	C634R	M918T

RET 変異 Ba/F3 細胞を RET 特異的阻害薬 Selpercatinib 及び Pralsetinib で処理した場合の細胞生存率を示す。

- (a) Selpercatinib で処理した Ba/F3 細胞の細胞生存率 (%)。
 (b) Pralsetinib で処理した Ba/F3 細胞の細胞生存率 (%)。

図 3. RET の新規活性化変異クラスターにはリガンドおよび共受容体との反応性が上昇する変異が存在する



- (a) RET リガンド GDNF と共受容体 GFRA1 の存在下または非存在下で行ったフォーカスフォーメーションアッセイ。
- (b) 各細胞におけるフォーカス形成の定量値の比較。平均値±標準誤差で表記。
- (c) 各細胞におけるフォーカス形成の定量値の平行分析。表では各変異における傾き、野生型との傾き比、p 値を示す。
- (d) RET リガンド GDNF と共受容体 GFRA1 の存在下または非存在下で行った HEK293H 細胞の全細胞溶解液を用いたウェスタンブロット。
- (e) 各変異型におけるウェスタンブロットでの Erk リン酸化の定量値。平均値±標準誤差で表記。

5) 考察

本研究では、複数の細胞実験系を用いたスクリーニングにより RET 遺伝子の VUS には複数の治療標的となる活性化変異が含まれていることを示した。さらにこれらの変異が RET 遺伝子上の一定の領域に集積している事を確認した。また新たに発見した活性化変異が RET 特異的阻害剤による治療標的になることを示した。さらにこの活性化変異群には、リガンドおよび共受容体との反応性が向上することで活性を獲得する変異が存在することを見出した。

本研究で用いた RET 特異的阻害剤 Selpercatinib および Pralsetinib は既に臨床応用が成されており、本研究での知見が RET を標的としたがんゲノム医療の拡充につながることを期待される。また新たな活性化機構に関する発見は治療標的の探索のみならず、新規治療方法の開発などのがんゲノム医療の進展に有用な情報であり、さらに詳細な活性化機構の解明が強く期待される。

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

シニア・リサーチフェロー期間中は、がんゲノム医療の推進に関わる研究成果を目標とし、がんキナーゼ遺伝子上の VUS の意義付けを目的とした研究を行ってきた。今回の研究結果から多様ながんで認められる RET 遺伝子変異には、現状の認識よりも多くの治療標的が存在することを明らかにすることができた。

今後は新たに見出した RET 活性化変異クラスターの活性化機構に関して更なる検証を行う予定である。そのために現在の細胞レベルの実験系に加え、タンパク質レベルの実験系とスーパーコンピューターを用いた *in silico* 解析系での検証を進めている。これらの系を組み合わせた統合機能ゲノム解析手法を用いて、RET キナーゼを対象とした実臨床での個別化治療へ向けて本研究成果を繋げていきたい。