

令和3年度シニア・リサーチフェロー  
研究成果報告書

2022年4月23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： 額賀 重成

研究課題：大規模がんゲノム解析から得られる共存する遺伝子異常の機能解明と  
治療応用への展開

研究期間： 自 2021年 4月1日  
至 2022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

### I 要旨

現在、がんの薬物療法の分野では、個々の遺伝子変異の情報に基づく「がんゲノム医療」が進められているが、遺伝子検査結果による薬剤到達率の低さが課題となっている。この一因として、遺伝子パネル検査では複数の遺伝子変異が検出されるが、それらが複合する機能意義について十分明らかになっていないことが挙げられる。そこで本研究では、大規模なゲノム情報のデータベースから有意に複合してくる遺伝子変異の組み合わせを抽出し、モデル細胞による実験によって機能意義を解明することを目的とする。

シニア・リサーチフェロー期間の検討により、肺癌で認められる代表的なドライバー変異に遺伝子Xの変異が有意に共存していることを明らかにした。さらにこれらの複合変異を発現するモデル細胞を複数樹立することに成功し、フェノタイプに変化が見られることを確認した。更に複合変異の誘導により、ドライバー機能が増強される可能性が示唆され、薬剤耐性化機序の解明や新規治療標的の同定につながる知見を明らかにした。

### II 序

現在、がんの薬物療法の分野では、個々の遺伝子変異の情報に基づく「がんゲノム医療」が進められている。個人のがんゲノムを網羅的に解析し、最適な薬剤の選択を行うことで治療の効果を最大限に引き出し、個々の患者に最適な医療を提供することができる。

わが国では第三期がん対策推進基本計画(2018年閣議決定)において、がんゲノム医療が最重要推進課題の一つとされ、その発展が社会的に期待されている。2019年6月からは、次世代シーケンサーを用いた「がん遺伝子パネル検査」が保険収載され、日常臨床でも遺伝子変化に基づいた治療が開始されるようになった。

しかし、がん遺伝子パネル検査によって何らかの遺伝子変異が検出されたとしても有効な治療薬にたどりつける症例は約10%程度と限られており、現時点ではがんゲノム医療は発展途上の段階である。

この原因の一つとして、検査で同定される複数の遺伝子変異の中に、臨床的意義が不明な変異(variants of unknown significance: VUS)が多く含まれることが挙げられる。ゲノム解析はその結果が一義的に決まるものではなく、がん化等に関わる臨床的な意義を有する変異と考えられるかどうかについての検討が重要である。検査の普及により変異の情報は蓄積されつつあるが、患者を有効な治療へ導くためには「変異の意義解明」を同時に進める必要がある。

また、これまで分子標的薬の分野では、主に単一遺伝子に見られる変異の意義について議論されてきた。しかし、実際には同じ変異を有している患者間においても、臨床経過や病理組織像、薬剤感受性などは様々であり、フェノタイプに不均一性が見られる。実際の遺伝子パネル検査で検出される遺伝子変異は単一ではなく、同一遺伝子内、または異なる遺伝子間に渡り、複数の遺伝子変異が同時に検出されることが多い。これらの様々な遺伝子変異が複合して影響することで、患者のフェノタイプが形成されているものと考えられる。

これまでに複数の遺伝子変異が複合することで標的薬剤への感受性が変化する可能性について報告されてきているが、遺伝子変異の複合によりもたらされる機能変化やがん形質に与える意義については未だ不明な点が多い。これらの意義について明らかにすることで新規の治療標的の発見や薬剤耐性化の克服につながる可能性がある。変異の複合という観点での遺伝子変異意義の検討は、よりリアルワールドで認められる変異情報に則した検討になる。患者予後の延長に貢献できる研究であると考え、本研究を立案した。

### Ⅲ 実験方法

#### 1) 大規模データベースからの複合変異抽出

がんの遺伝子変異は、ゲノム不安定性の結果生じた発がんに関与しないランダムな変異(パッセンジャー変異)と発がんに必要な役割を持つ変異(ドライバー変異)に大別される。有意な複合変異を選定するためにはドライバー変異同士の組み合わせから抽出することが必要である。

近年、遺伝子変異を塩基配列まで分解し、パッセンジャー変異を起こしやすい塩基配列を統計学的に同定し、この情報をもとにドライバー変異を検出する試みが行われている。この手法を利用したプログラムである Oncodrive CLUSTL (Bioinformatics. 2019;35(22):4788-4790.) および MutPanning (Nat Genet. 2020;52(2):208-218) を用いて、所属研究室が保有する約 1200 例の肺癌コホート (PRISM コホート) の全エクソームシーケンス情報を用いて有意変異の抽出を行った。そして、抽出された変異遺伝子群の中から統計学的に有意に共存する複合変異の組み合わせを選定した。

#### 2) 複合変異を持つモデル細胞の構築

1) で同定した複合変異の機能意義を検討するために複数種類の細胞株を用いてモデル細胞株の作製を行った。

##### ① T-REx-293 細胞モデル

ドキシサイクリン誘導性に遺伝子 X を発現する細胞株を、293 細胞をベースとするライフテクノロジー社の Flp-In™ T-REx™ -293 細胞とそれに付随するシステムを用いて樹立した。pcDNA5/FR T/T0 vector に FLAG-tag を付加したヒト野生型または変異型の遺伝子 X DNA を導入し、ドキシサイクリン誘導性に遺伝子 X が発現することを確認した。その後、レトロウイルスベクターを用いて KRAS 野生型または変異型 (G12C) をトランスダクションし、遺伝子 X 野生型、変異型、KRAS 野生型、変異型の各パターン of 遺伝子型を有する細胞を樹立した (図 1)。

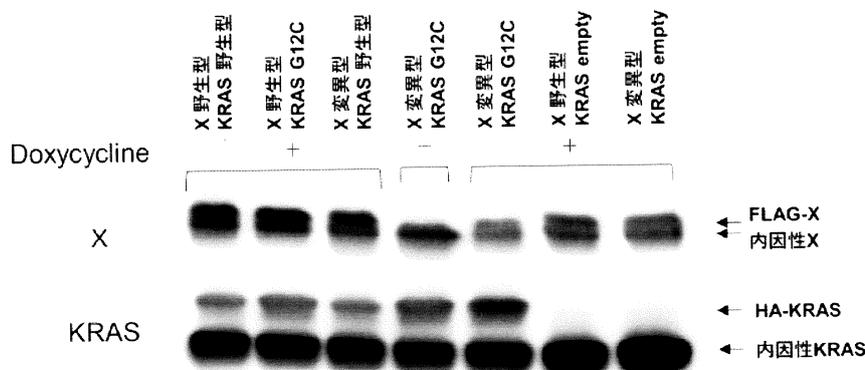


図 1 KRAS・遺伝子 X 変異発現 T-REx-293 細胞モデルの樹立

##### ② 肺癌細胞株モデル

KRAS 変異を有する複数の肺癌細胞株 (A549, NCI-H2122, Lu99A) にクロンテック社の Retro-X™ Tet-On® 3G Inducible Expression System を用いて、FLAG-tag を付加した遺伝子 X 野生型、変異型 DNA を導入し、ドキシサイクリン誘導性に遺伝子 X を発現することができる細胞株を樹立した。

#### 3) モデル細胞を用いた複合変異導入によるフェノタイプ変化の確認

複合変異導入によるトランスクリプトームの変化を確認するために、各変異パターンの①モデル細胞から RNA を抽出し、RNA シーケンスを行った。

①, ②モデル細胞のシグナル伝達の変化を確認するためにウェスタンブロッティングによるタンパク発現の評価や抗体アレイを用いたスクリーニングを行った。

## IV 結果

### 1) 大規模データベースからの複合変異抽出

Oncodrive CLUSTL および MutPanning を使用し、所属研究室が独自に保有する約 1200 例の肺癌の全エクソームシーケンス情報を用いて、有意遺伝子変異の解析を行った結果、既知のドライバー変異を含めた複数の変異遺伝子が抽出された(図2)。

これら二つのプログラムから共通して抽出された推定ドライバー変異の中で共存性を解析し、肺癌で見られる既知のドライバー変異と統計学的に有意に複合する遺伝子 X を同定した(図3)。

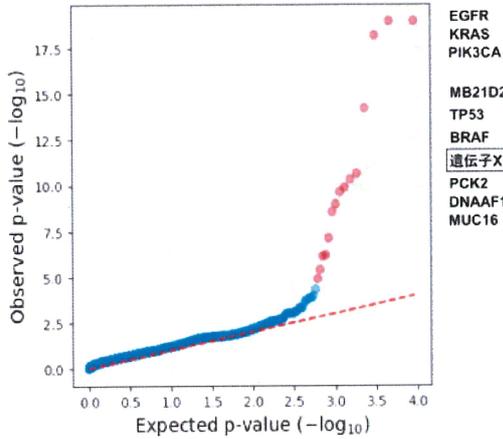


図2 Oncodrive CLUSTL による有意変異の抽出

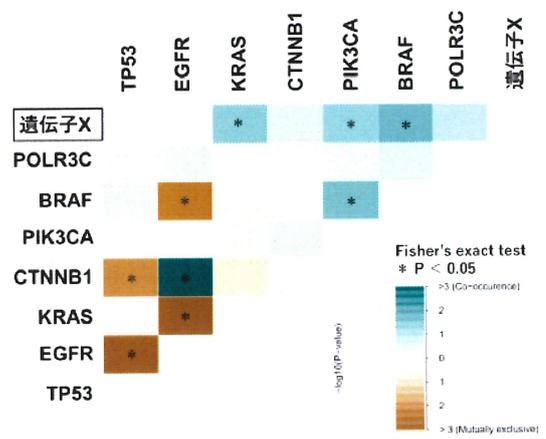
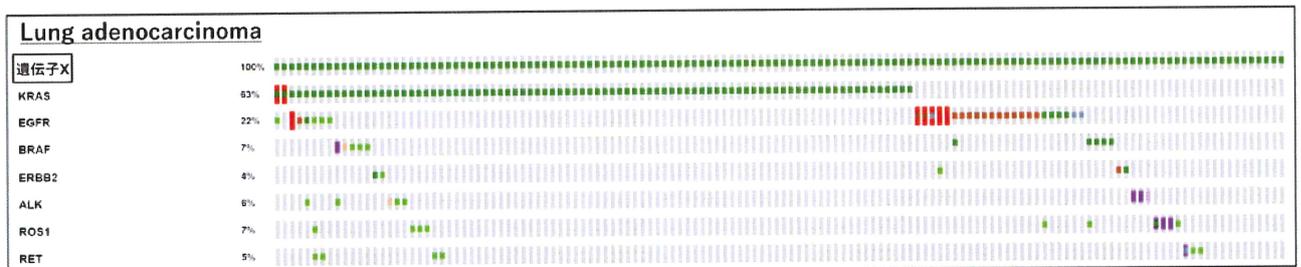


図3 有意変異遺伝子の共存性評価

この複合は米国公開データベースである AACR project GENIE や TCGA などの異なるコホートにおいても同様に見られることを確認した(図4)。

この遺伝子 X で見られる変異は特定の残基にホットスポットを形成し、機能を有するドメインに変異が集中していることから、変異により何らかの機能変化をもたらしている可能性が示唆された(図5)。また、遺伝子 X 変異を持つ症例の大半が、RAS, RAF や受容体チロシンキナーゼの pathogenic 変異と共存していることが明らかとなった(図4, 5)



	KRAS altered group	KRAS unaltered group	p-Value	q-Value	Mutually exclusivity
遺伝子 X	107 (3.69%)	85 (1.45%)	< 10 <sup>-10</sup>	7.83E-09	Co-occurrence

Fisher's exact test

図4 AACR project GENIE における遺伝子 X と肺癌で見られる代表的なドライバー変異との共存性

	遺伝子 X	KRAS	EGFR	BRAF
サンプル 1	変異 Y	G12A		
サンプル 2	変異 Y	G12D		
サンプル 3	変異 Y	G12F		
サンプル 4	変異 Y	G12S		
サンプル 5	変異 Y		E746_A750del	
サンプル 6	変異 Y		E746_A750delinsV	
サンプル 7	変異 Y		L62R, L858R	
サンプル 8	変異 Y			V600E
サンプル 9	変異 Y			K601E

図5 PRISM コホートで見られる遺伝子 X と肺癌で見られる代表的なドライバー変異との共存性

2) 複合変異モデル細胞の作成およびフェノタイプ変化の確認

遺伝子X 変異は RAS, RAF や受容体チロシンキナーゼの変異と共存していることから、共通するシグナル伝達に影響を与えている可能性が考えられた。樹立した T-REx-293 細胞を用いてリン酸化キナーゼ抗体アレイによるスクリーニングを行った結果、変異導入により KRAS の下流シグナル分子である ERK のリン酸化亢進を認めた(図6)。KRAS 変異と遺伝子X 変異の双方の導入で、よりリン酸化が増強されることが示された(図7)。

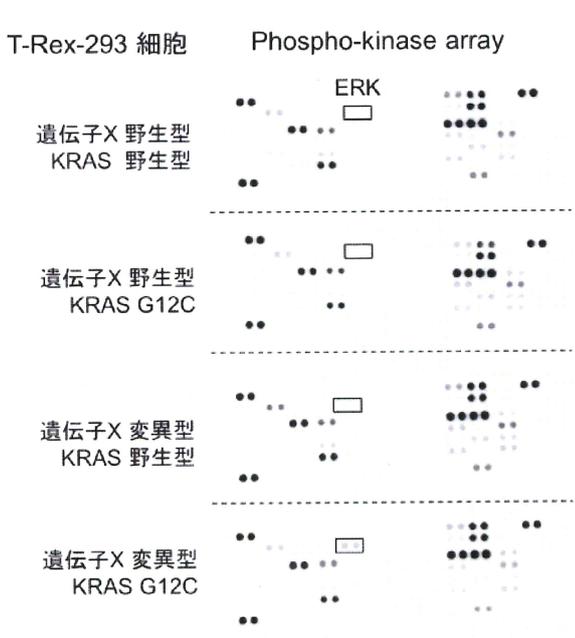


図6 T-REx-293 細胞モデルにおけるリン酸化キナーゼ変化

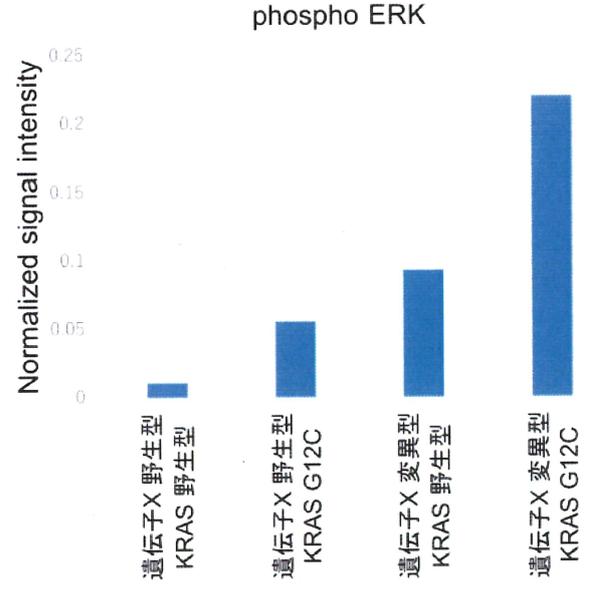


図7 T-REx-293 細胞モデルにおけるリン酸化 ERK の増強

更に KRAS G12C 変異を導入した T-REx-293 細胞において、ドキシサイクリン投与による遺伝子X 変異の誘導前後のトランスクリプトームの変化を確認した。エンリッチメント解析では遺伝子変異 X 前後で特定の遺伝子セットの発現に変化が見られ(図8)、その中には KRAS シグナルにより発現が増強する遺伝子群の変化も含まれていた(図9)。

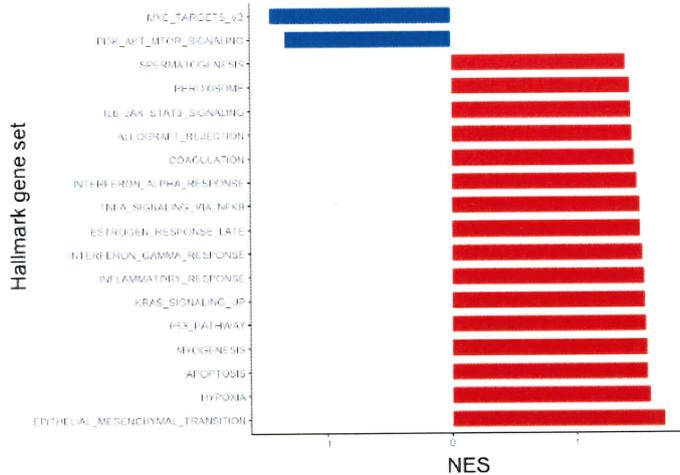


図8 遺伝子X 変異誘導によるトランスクリプトームの変化(GSEA 解析)

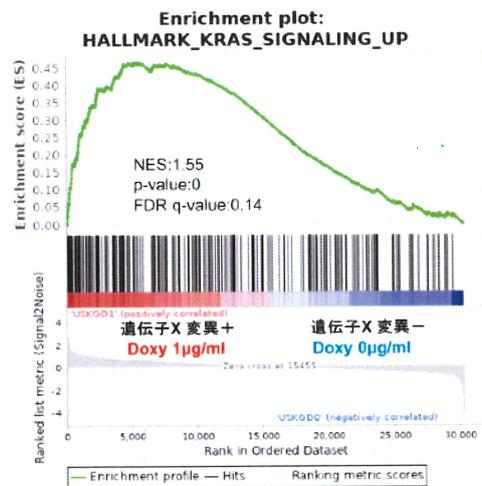


図9 遺伝子X 変異誘導による KRAS シグナルの増強

KRAS 変異肺癌細胞株をベースに樹立した遺伝子 X 誘導モデルにおいても、ドキシサイクリンによる変異型 X 誘導によってリン酸化 ERK の亢進が認められ、異なる細胞モデルで再現性があることを確認した (図 10)。

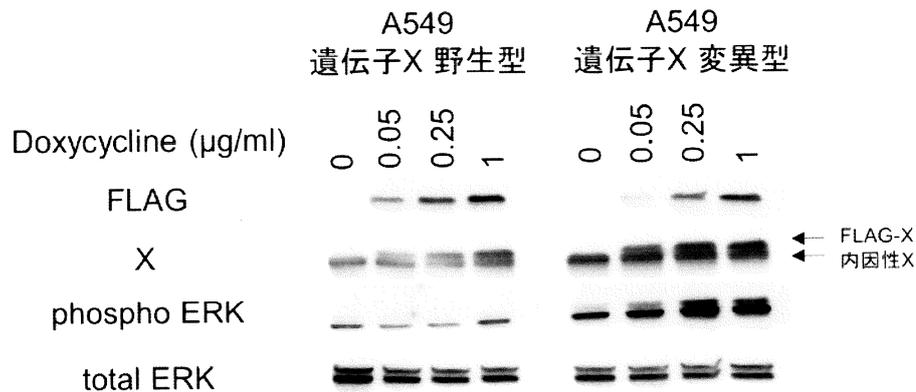


図 10 KRAS 変異肺癌細胞株モデルにおける X の誘導とリン酸化 ERK の増強

#### IV 考察

本研究では、大規模なゲノムデータベースから統計学的有意に複合する遺伝子変異を同定し、異なるコホートにおいて複合が見られることを確認した。遺伝子 X は肺癌で見られる代表的なドライバー遺伝子である KRAS や受容体チロシンキナーゼの pathogenic 変異と共存することから、その機能を増強している可能性が示唆された。複合変異を導入した細胞モデルでは、変異のステータスによりリン酸化やトランスクリプトームなどのフェノタイプ変化が見られ、共存するドライバー下流のシグナル伝達を増強していることが示唆され、仮説を支持する結果であった。

(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

今回の研究期間中の検討により、遺伝子 X 変異が肺癌で見られるドライバー変異の機能を増強させている可能性が示された。遺伝子 X 変異は他癌腫においても認められており、同様の機能を有している可能性がある。今後、研究を全がん領域に展開することで、多くの癌患者の役に立つ知見を得ていきたい。

遺伝子 X は、共存するドライバー変異の機能を増強することにより、薬剤耐性化をもたらしていることが予想され、機能解明を行うことにより患者予後改善に貢献できる可能性がある。更に、遺伝子 X 変異自体が治療標的となる可能性もあり得るため、モデル細胞を利用した薬剤によるシグナル変化の確認や薬剤感受性試験も行う予定である。

また、遺伝子 X は RNA プロセシングに関与するため、トランスクリプトームの変化を介して、機能変化をもたらしていることが考えられる。本研究室で保有するヒト検体から採取した 1000 例を超える RNA シーケンスデータを利用して、更なる機能解明を進めていく。

今回のシニア・リサーチフェロー期間では、大規模データベースの解析から、実際の臨床現場でも検出される複合変異の抽出を行うことができ、その機能解明の基礎となるモデル細胞の樹立など研究の基盤を構築することができた。今後更に研究を発展させ、がんゲノム医療の推進に貢献できる研究成果を出していきたい。