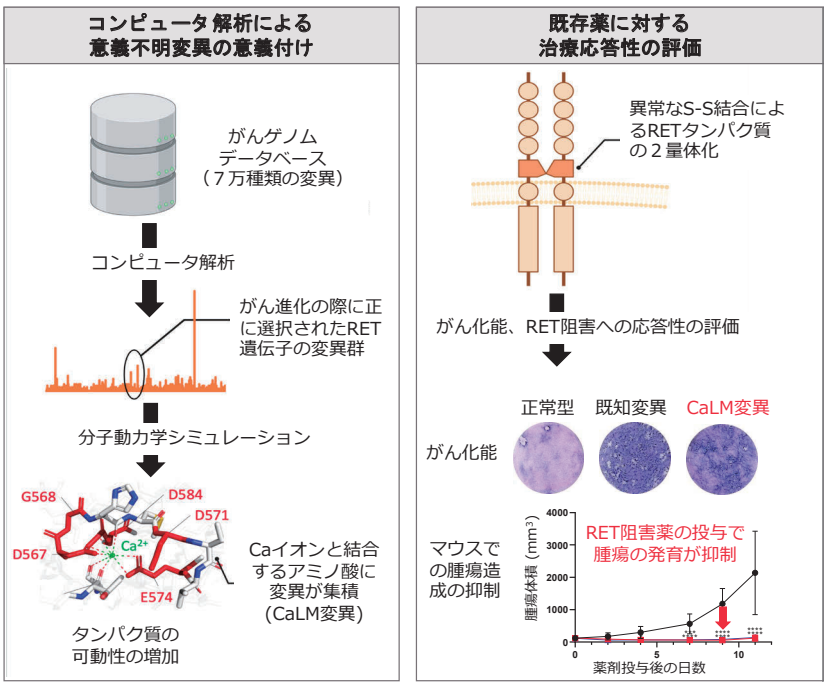
74　分子シミュレーション駆動による変異アノテーション	中奥　敬史

【目的】本研究では、がん患者の大規模ゲノム情報を用いて情報統計学的アプローチにより遺伝子変異を機能構造単位に集積する変異集積として捉え、分子シミュレーションによる表現型理解を実験データと融合させることで、体系的な遺伝子変異の機能アノテーション法を構築することを目的とする。

【方法】本研究では、がん変異データベース GENIE (https://www.aacr.org/professionals/research/aacr-project-genie/) に登録される 7 万個以上の遺伝子変異に対して、コンピュータを用いるインシリコ技術によりがんの進化の過程での正の選択やタンパク質の可動性への影響を評価した。実験手法による変異機能アノテーションとして、変異クラスター構成遺伝子変異を発現する細胞モデルと精製タンパク質を作製し、形質転換能やタンパク質相互作用解析を行った。解析対象変異を導入し、タンパク質の安定性変化やエネルギー変化に着目した分子動力学シミュレーション計算より機能推定を行った。

【結果】71,756 個の変異体を対象とした計算機シミュレーションによる変異選択と、110 個の代表的な RET 変異体の網羅的機能解析により、複数のヒト癌が保有する発がんや治療における意義がわからない意義不明変異 (VUS：variants of unknown significance) の 3 次元クラスターを明らかにした。これらの変異体は Rearranged during transfection (RET) タンパク質のカルモジュリン様モチーフ (CaLM) におけるアミノ酸置換を引き起こす。分子動力学シミュレーションの結果、CaLM 変異は Ca^{2+} イオン周辺の相互作用を減少させ、CaLM を含む RET システインリッチドメインの立体構造に歪みを引き起こすことが示された。RET の CaLM 変異は、異常なジスルフィド結合形成を介した RET タンパク質のホモ二量化により、リガンド非依存的に RET キナーゼを構成的に活性化させることがわかった。RET CaLM 変異体のがん原性／腫瘍形成活性は、RET を標的とする既存のチロシンキナーゼ阻害剤によって抑制された。本研究は、カルシウム結合低下変異を従来の *RET* がん遺伝子における新しいタイプのがん原性変異群として同定するとともに、治療標的であるがん遺伝子の VUS をインシリコ手法によりアノテーションすることが今後の有望な治療戦略となることを示すものである。

分子シミュレーション駆動による変異アノテーション



74. 分子シミュレーション駆動による変異アノテーション

中奥　敬史

国立がん研究センター 研究所 ゲノム生物学研究分野

Key words：がんゲノム医療，RET，分子標的治療薬，意義不明変異，分子動力学シミュレーション

緒　言

がん細胞に生じた遺伝子変異を見つけ出し、変異に有効な抗がん薬を投与するがんゲノム医療ががんゲノム医療として行われている。しかしながら、見つかる遺伝子変異の多くは発がんや治療における意義がわからない意義不明変異（VUS：variants of unknown significance）となっている。これらの変異は検出されたとしても、効果の見込まれる抗がん薬が見出せず、がんゲノム医療における大きな課題となっている。今後、がんゲノム医療をより有用なものとするためには、この意義不明変異の意義を理解し、治療に生かしていくことが必要となっている。

Rearranged during transfection（*RET*）遺伝子は、他の遺伝子との融合や変異によって活性化し、肺がんや甲状腺がんを引き起こすがん遺伝子として知られている。RET 上に生じるホットスポット変異は、キナーゼドメインや分子内ジスルフィド結合を形成するシステイン残基に対してアミノ酸置換型の変異として理解されてきた。これらの遺伝子変化を持つがんに対し高い効果を持つ治療薬として RET 阻害剤が開発され、実臨床において用いられている。しかし、*RET*遺伝子の変異において RET 阻害剤が投与される対象となるのは、有効性が確認できているホットスポット変異と呼ばれる一部の変異のみで、他の多くは意義不明変異であった。本研究は、インシリコ駆動型インビトロ機能解析を行うことにより、治療標的であるがん遺伝子の多数の VUS の中から、がん原性変異や治療標的変異を同定することを目的に行った。

方　法

1. RET 変異の選択

米国癌学会のプロジェクト GENIE（バージョン 7.0、https://genie.cbioportal.org/）のウェブサイトから、79,720 個の腫瘍から遺伝子融合やコピー数変化などの全体的な変化を除いた 71,756 個の変異データを収集した。対象コホートのトリヌクレオチド変異確率から導かれるローカルバックグラウンドモデルに基づいてがんドライバー遺伝子を検出する塩基配列ベースのクラスタリングアルゴリズムである OncodriveCLUSTL を用いて解析した。

2. NIH3T3 形質転換アッセイ・*in vivo*　腫瘍形成アッセイ

NIH3T3 細胞を、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、FBS 調製培地にて 2 週間培養した。細胞の形質転換はギムザ染色で評価した。*In vivo* 実験においては、細胞を希釈した PBS と等量のマトリゲルと混合し、6 週齢の雌性 BALB/c-nu/nu マウスの脇腹に皮下注射した。マウスは変異体毎に 3 群に分け、腫瘍の大きさが約 100 mm^3に到達時点でセルペルカチニブまたはプラルセチニブ治療を開始した。経時的に腫瘍体積を算出した。実験終了時に皮下腫瘍重量を測定し、標準プロトコルにしたがってマウスを安楽死させた。この実験は、国立がんセンター（NCC）動物倫理委員会の承認を得ている（承認番号：A277bM1-21）。

3. RET 二量体化アッセイ

Flp-In™ T-REx™-293 システムを用いて、当該遺伝子変異を発現する細胞株を樹立した。ドキシサイクリン添加のカルシウム含有／非含有 培地で 6 時間培養した。ジチオトレイトール含有／非含有により、還元・非還元状態を分けてライセートを調製した。

4. 分子動力学シミュレーション

RET 構造データを Protein Data Bank から入手し、分子力動学（Molecular dynamics：MD）シミュレーションのための構造モデルを構築した。相互作用解析および結合自由エネルギー評価のための MD シミュレーションは、GROMACS 2021/Desmond（Schrödinger, Inc.）にて実施した。モジュールを使用した。すべてのエネルギー最小化されたモデルは、バッファ距離 10Åの斜方晶ボックスに配置され、水和モデルを作成した。ファンデルワールス相互作用のカットオフを設定し、時間ステップ、系の初期温度、圧力にて評価した。MD シミュレーションのすべてのトラジェクトリは、タンパク質 Cα の最初のフレームに整列させた。平均二乗偏差（RMSD）と距離の解析は、最初のフレームの座標に基づいて行った。CRD への Ca イオンの結合自由エネルギーを予測するために MM/PB（GB）SA 法を採用した。結合自由エネルギー解析を各トラジェクトリについて 100 フレーム間隔で行った。

結　果

1. Calmodulin like motif （CaLM）は隠れたがん原性変異クラスターである

VUS の中から変異集積を見つけるために、OncodriveCLUSTL プログラムを用いて 3 塩基のエンリッチメント解析を行った。GENIE コホートから得られた合計 71,756 個のバリアントを、The Cancer Genome Atlas（TCGA）の 9,104 サンプルから作製した変異トリヌクレオチドのコンテキストに基づくバックグラウンド変異率モデルと比較して解析した（図 1A）。C634R ホットスポット変異を含む既知の変異集積の他、VUS のみからなる 557～580 残基における新規クラスターを Calmodulin like motif（CaLM）に見出した（図 1）。

次に、6 つの CaLM 変異を含む GENIE ケースで 3 例以上認められたその他の 79 変異を含む 110 の RET 変異体で、遺伝子網羅的な細胞ベースのアッセイを行った。RET 変異体 cDNA の導入が、NIH3T3 細胞における形質転換活性および HEK293H 細胞における RET 下流の ERK リン酸化に及ぼす影響を調べた（図 1A）。その結果、CaLM は既知のホットスポット変異体と同様の強度を有するがん原性変異体のクラスターであることが確認されたが、一方で特に ECD においてはほとんどの変異体は機能的に中立であった。RET の CaLM は、アミノ酸の負電荷を持つ側鎖やカルボニル骨格と配位結合を形成することで Ca^{2+}イオンを捕捉していた。CaLM 変異は、Ca^{2+}イオンとの結合に関与するアミノ酸の置換（D567Y/N、G568S、D571N、E574D、D584N）により、3 次元クラスターが形成された（図 1B）。

2. CaLM 変異による cysteine-rich domain（CRD）の構造的不安定化

RET－Ca^{2+}イオン複合体の構造保持に対する CaLM 変異の影響を予測するために MD シミュレーションを実施した。CaLM 領域のみの構造を抽出し、1 マイクロ秒のシミュレーションを行い、局所的な構造維持への影響を調べた。D567Y および D567N 変異体の CRD に対する Ca^{2+}イオンの結合自由エネルギー（ΔGbind）は野生型 RET よりも高く、CaLM 変異による構造の不安定化が示唆された。CaLM 変異による Ca^{2+}イオン位置の不安定性は、Ca^{2+}イオンの初期位置からの RMSD の増加によって示された（図 2A、B）。他の CaLM 変異体でも同様の結果が得られ（図 2C）、CaLM- Ca^{2+}複合体の不安定化ががん原性の背景に存在することが強く示唆された。さらに我々はシミュレーションの結果を検証するために、Ca^{2+}イオン保持に寄与する側鎖の影響を取り除いた人工変異体（アラニンに置換した変異体）の特性を調べた（図 2D）。結果としてアラニン変異体は、臨床で認められた CaLM 変異体と同様に高い RMSD 値を示した。このアラニン変異体のがん原性は、RET 下流の ERK 活性化および NIH3T3 細胞の形質転換によって確認された（図 2E、F）。

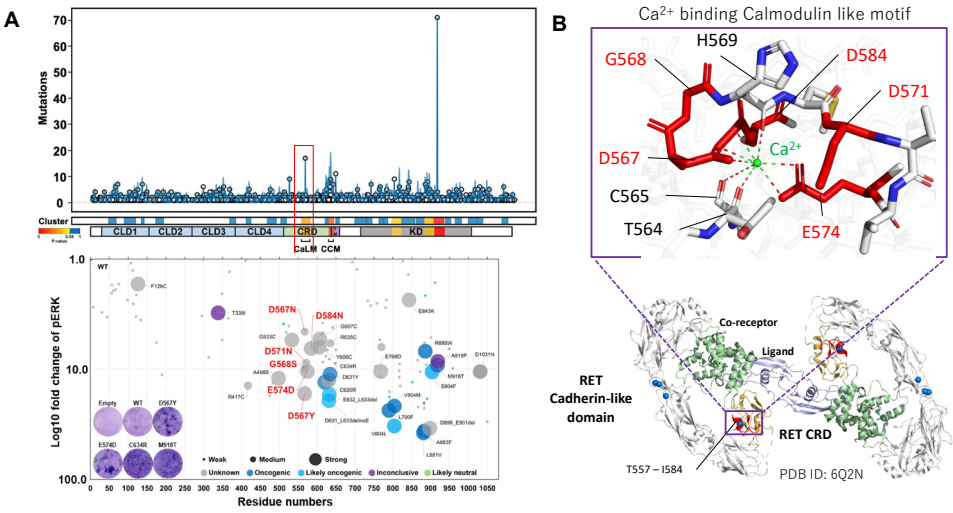


図 1. RET CaLM 変異クラスターの同定

A) 正選択のための突然変異モデル。OncodriveCLUSTL によって決定された変異クラスターを p 値およびドメイン／モチーフの分布とともに示したものである。RET 変異の NIH3T3 細胞形質転換能と ERK リン酸化活性を示すバブルプロット。

B) CaLM 変異の 3 次元図。RET-GDNF-GFRα1 六量体の細胞外部分の俯瞰図（PDB：6Q2N）と CaLM の拡大図。変異した残基は赤。

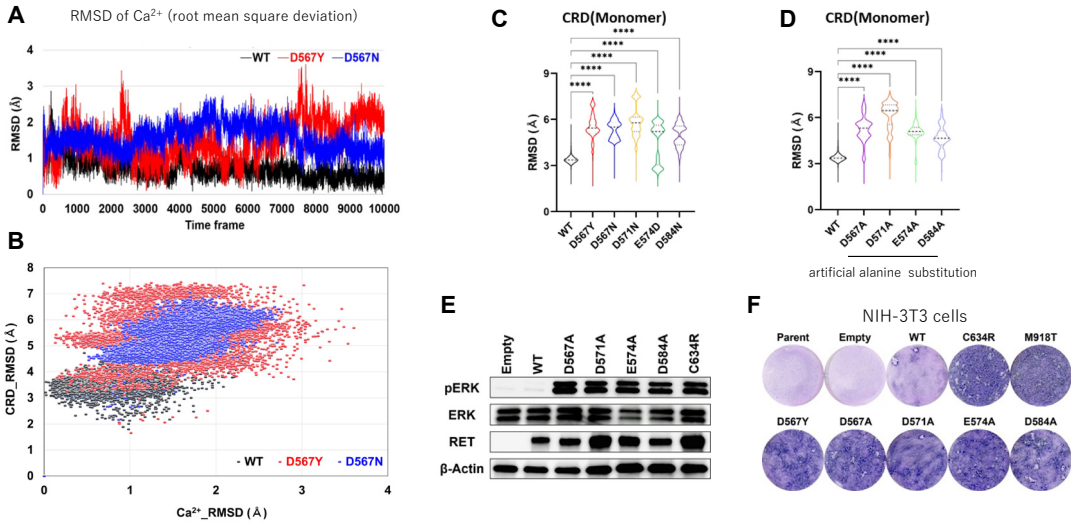


図 2. CaLM 変異による構造変化と機能獲得

A) Ca^{2+}イオンの分子シミュレーションにて計算された RSMD の時系列プロット。

B) CaLM 変異体の動的構造の Ca^{2+}イオンと構造 Cα 原子の RMSD の相関図。

C) CaLM 変異体の動的構造の Ca 原子の RMSD のバイオリンプロット。

D) アラニン置換体の動的構造の Cα 原子の RMSD のバイオリンプロット。

E、F) アラニン置換体のがん化能。293H へ一過性発現系における ERK リン酸化評価と NIH3T3 フォーカス形成評価。

3. CaLM 変異が異常な分子間ジスルフィド結合形成を誘発する

CaLM 変異が RET の構造およびリガンド／共受容体との相互作用に及ぼす影響を調べるため、二量体化した細胞外 RET、2 分子の GFRα1 および GDNF からなる複合体構造（PDB：6Q2N）を用いて MD シミュレーションを実施した。CaLM 変異体は、野生型 RET 複合体と比較して、Ca^{2+}イオンとその周囲の残基との相互作用が失われ、CRD 構造に歪みが認められた。また、構造の歪みにより、システイン残基 C565、C570、C585 の溶媒露出表面積（SASA）が増加した（図 3A）。これらのシステイン残基の露出により、分子間ジスルフィド結合の形成が誘導されることが想定された。HEK293H 細胞に RET 全長の cDNA を外因性に発現させると、CaLM 変異体は C634R CCM 変異体と同様に異常な分子間ジスルフィド結合を介して二量体化した（図 3B）。CaLM 変異における Ca^{2+}イオン保持の減弱を模倣し、培養液から Ca^{2+}イオンを枯渇させると、野生型 RET においても分子間ジスルフィド結合形成による二量体化を引き起こしたため（図 3B）、CaLM が RET の異常な二量体化を抑制していることが示唆された。

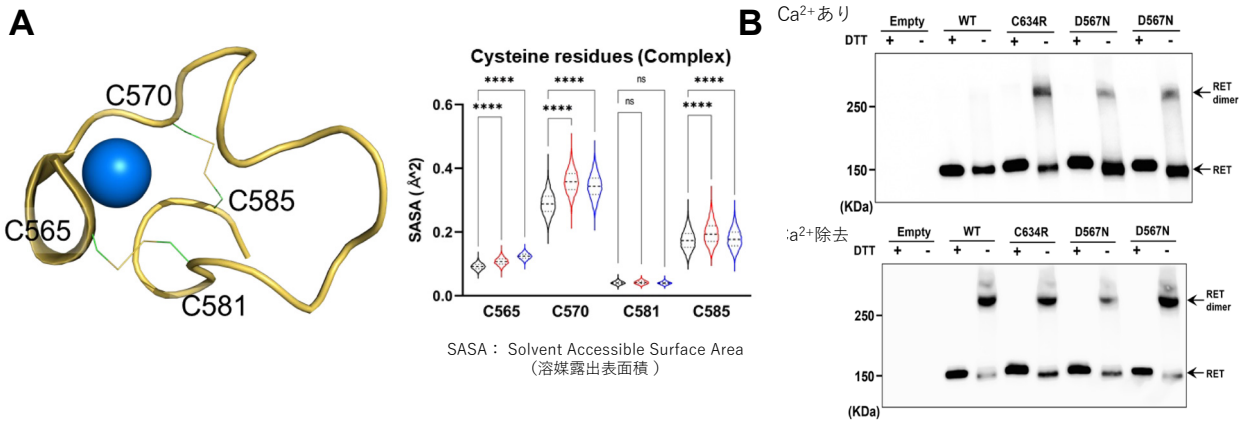


図 3. CaLM の変異によって誘導された異常な分子間ジスルフィド結合

A) RET タンパク質の模式図（左）および RET-GDNF-GFRα1 細胞外複合体の MD シミュレーションにて得られたシステイン残基（C565、C570、C581、C585）の溶媒露出面積 SASA を示すバイオリンプロット（右）。

B) 分子間 RET 二量体形成アッセイ。ドキシサイクリン誘導性の RET cDNA を導入した細胞を、カルシウム含有（上）もしくはカルシウムフリー（下）培地で培養し、還元条件または非還元条件下で調製した。

4. RET-CaLM 変異体は RET-TKI のターゲットとなる

RET-CaLM 変異体が既存の RET-TKI の標的となるかどうかを検証した。D567N および D567Y 変異体を安定的に発現する NIH3T3 細胞は、C634R 変異体を発現する細胞と同様にヌードマウスで腫瘍を形成した。セルペルカチニブとプラルセチニブはいずれも、C634R 変異体を発現する NIH3T3 細胞に対する効果と同様に、D567N と D567Y を発現する NIH3T3 細胞の増殖を抑制した。

考　察

本研究では *RET* 遺伝子に生じる多数の VUS の中から、がん原性があり治療標的となる新規の変異をインシリコ解析により同定した。これらは CaLM における Ca^{2+}結合を低下させる変異であり、異常な二量体化を誘導することで RET キナーゼを構成的に活性化させるものであった。変異体の同定には、ゲノムレベルでのインシリコ変異モデリングによる正に選択された変異の同定と、遺伝子レベルでの細胞ベースの変異体スクリーニングの 2 つの戦略を用いた。

CaLM は RET における新規のがん原性変異の 3D クラスターが位置していると明らかにされた。CRD 単体および

RET／リガンド／共受容体複合体の MD シミュレーションを行い、CaLM 変異の機能的影響を予測した。細胞およびタンパク質ベースのアッセイにより、この予測は裏付けられ、RET-CaLM 変異のがん原性および治療標的としての特性が示された。本研究はがんゲノムにおいて、よく知られたがん遺伝子であっても未発見のがん原性／治療標的性変異が存在することを強く示唆するものである［1］。

RET-ECD：リガンド：共受容体複合体の MD シミュレーションにより、RET-CaLM 変異体は生理的条件下では分子内ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基のタンパク質表面への露出を引き起こすことが示され、MD シミュレーションの変異機能理解の有用性が示された。本研究では、MD シミュレーションを用いて変異の機能的効果の推定に有効であった。CaLM の臨床で認められた変異体および人工変異体では、CRD の揺らぎが増加し、Ca^{2+}イオンとの相互作用が減少することがわかった。タンパク質複合体の MD シミュレーションは、ヒト癌に存在する膨大な数の VUS の機能アノテーションの方法として有望である［1］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻ビッグデータ医科学分野の荒木望嗣ならびに筑波大学医学医療系トランスボーダー医学研究センターの吉野龍ノ介である。

文　献

1） Tabata J, Nakaoku T (Correspoding author)*, Araki M, Yoshino R, Kohsaka S, Otsuka A, Ikegami M, Ui A, Kanno SI, Miyoshi K, Matsumoto S, Sagae Y, Yasui A, Sekijima M, Mano H, Okuno Y, Okamoto A, Kohno T*. Novel Calcium-Binding Ablating Mutations Induce Constitutive RET Activity and Drive Tumorigenesis. Cancer Research, 82(20):3751-3762, 2022. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-22-0834.