

研究報告書
令和4年度：A課題

2024年 4月 22日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 国立がん研究センター研究所

住所 東京都中央区築地 5-1-1

研究者氏名 小林 祥久

(研究課題)

MET 遺伝子異常による肺がんの研究

令和5年 1月 23日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【背景と目的】

「MET 遺伝子のエクソン 14 がスキップする変異」は肺腺がんの 5%にみられ、MET チロシンキナーゼ阻害剤のカプマチニブとテポチニブが日米で標準治療薬として保険承認済みである。しかし、約1年で次第に効かなくなり耐性となってしまうことが問題である。耐性機序の検出自体がまだ研究段階であるため耐性獲得後の治療法は確立しておらず、従来の殺細胞性の化学療法が行われているが治療効果は乏しいのが現状である。

MET のエクソン 14 にはユビキチンによる蛋白分解に必要な CBL 結合部位があるため、このスキップにより MET 蛋白が分解されず過剰蓄積してがん化すると従来考えられている (2006 Cancer Res PMID:16397241)。一方で、MET エクソン 14 の欠失した配列を強制発現させたマウス細胞モデルでは、極めてコピー数が高くなるように工夫しないと発がん性を示せないことを見出したが (Fujino and Kobayashi et al. J Thorac Oncol 2019 PMID: 31279006)、その機序は不明なままである。

本研究では、最多の発がん遺伝子ファミリー-RAS のスプライシングに関する新規発がん機構を解明した実験系 (Kobayashi et al. Nature 2022 PMID: 35236983) を MET 遺伝子に応用することで、MET エクソン 14 スキッピング変異の発がん機構の観点から耐性克服に向けた新規治療開発を目指す。

【方法】

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に感受性のある EGFR 変異肺癌細胞株および ALK チロシンキナーゼ阻害剤に感受性のある EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌細胞株から、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術によって MET 遺伝子のエクソン 14 スキッピング変異モデルを作成した。これらのモデルで、それぞれの阻害剤に対する薬剤感受性試験で耐性の有無を評価した。さらに、約 2 万個の遺伝子の機能を網羅的に解析するためにゲノムワイド CRISPR スクリーニングの実験系を新たに構築した。

【結果と考察】

MET 遺伝子のエクソン 14 スキッピングは、スプライシングサイトの変異及び MET 遺伝子のエクソン 14 全長の欠失が臨床検体の解析データで報告されていることから、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術で MET 遺伝子のエクソン 14 全長を欠失したモデル及び MET スプライスサイト変異をもつ細胞モデルを構築した。

CRISPR MET モデル細胞のシングルクローンで薬剤感受性を評価したところ、予想外に EGFR 阻害剤および ALK 阻害剤に対して薬剤耐性とならなかった。先行研究で同じ EGFR 肺癌細胞株由来の CRISPR ゲノム編集モデルを用いて KRAS の発がん遺伝子変異を評価した際には EGFR 阻害剤に耐性となり、ゲノム編集細胞集団を EGFR 阻害剤で選択していくにつれて KRAS の VAF (variant allele frequency) は上昇した (Nature 2022)。そこで、MET 変異を作成途中のゲノム編集細胞集団に対して、それぞれ EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤で選択したが、経時的に MET 変異の VAF を濃縮させることはできなかった。つまり、MET 変異単独では耐性を起こさない (発がん性がないまたは弱い) ことがシングルクローンレベルだけでなく細胞集団単位でも再確認された。これらのデータは、臨床的にすでに発がん性および MET チロシンキナーゼ阻害剤に対する治療標的としての意義が確立していることと矛盾する興味深い現象である。

これらのデータを追求して、発がんに必要な未知の要素の解明に挑戦するためにゲノムワイド CRISPR スクリーニングの実験系を新たに構築した。19,114 遺伝子の 76,441gRNA を含む Brunello CRISPR library を増幅し、インハウスでのライブラリー調整を行った。まずは、細胞に感染させる前の library ベクターのみを用いてライブラリー調整して NGS を実施し、Mapped reads は 91%、gRNA の均一な分布の指標である Gini index は 0.06 (均一の指標 < 0.2) であり、品質に問題がないことを確認した。次に、Cas9 発現細胞に対して感染多重度 MOI (Multiplicity of Infection) が 0.3 以下となるようにウイルス力価を調整した上で Brunello library ベクターを感染させて、EGFR 阻害剤および ALK 阻害剤で選択後の検体をライブラリー調整し、現在次世代シーケンサーで解析中である。

【謝辞】

公益財団法人がん研究振興財団からの多大なご支援により、本研究課題の立ち上げから新規実験系の構築に至る基盤的な部分が著しく進捗できましたことに、心より感謝申し上げます。