

日本医療研究開発機構 ゲノム創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) オルガノイドを活用した PTEN 遺伝子 VUS の新規評価法の確立
(英 語) Development of an organoid-based evaluation method for VUS in the PTEN gene

研究開発実施期間：令和 4 年 4 月 22 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 筆宝 義隆
(英 語) Yoshitaka Hippo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 千葉県がんセンター・研究所・研究所長
(英 語) Chiba Cancer Center Research institute/ Director

II 研究開発の概要

*PTEN*は 403 アミノ酸をコードする癌抑制遺伝子であり、多くのがんで変異や欠失を認める。また、生殖細胞系列病的多型を有する患者では遺伝性腫瘍性疾患 Cowden 症候群や、自閉症スペクトラム障害 (ASD) を含む神経発達障害が見られる。Cowden 症候群においては、その標的臓器である乳腺、消化管、子宮内膜などに良性腫瘍である過誤腫が好発し、悪性腫瘍発生のリスクも高い。癌抑制遺伝子産物としての *PTEN* の最も重要な機能は Lipid phosphatase として PI3K/AKT/mTOR 経路を負に制御することであり、その機能的失活が発がんおよび悪性化を促進する。一方、Protein phosphatase としての性質や非酵素的な Scaffold protein としての役割を持つこと、DNA 修復やゲノム安定性における重要な役割を担うこと、などもその後の研究により明らかにされている。

一般に、遺伝性腫瘍の遺伝カウンセリング及びがんゲノム医療の現場において VUS および変異の正確な評価は重要な課題だが、個々の変異の機能解析には多大な時間と労力を要するため、実務上は配列情報と機能ドメインを考慮した推定に基づき判定が行われているのが実情である。そのため、迅速なアッセイに基づく多型の直接的かつ機能的な評価法の確立が強く求められていたが、多くの遺伝子において未達であった。*PTEN*については遺伝データベース ClinVar に 2245 種類の多型が登録されているが、このうち機能評価を詳細に行われた変異・多型はわずか 10 程度に過ぎない。残りは推定に基づき病的 697、良性 534、意義不明 (VUS) 1003、解釈不能 65 などに分類されてきたが半数が VUS であり、多型に対して包括的にアノテーションをつけることが課題となっていた。

PTEN が失活しているがん細胞では mTOR 経路の活性化および DNA 二重鎖切断修復の異常をきたすため、それぞれ mTOR 阻害剤 (ラパマイシン等) および PARP 阻害剤 (オラパリブ等) に高い感受性を呈する。そこで、本研究では *PTEN* 欠損細胞に *PTEN* 多型を再導入後の薬剤感受性の変化を指標として多型に機能的アノテーションをつけることを着想した。具体的には、代表研究者が熟達しているオルガノイド培養技術を用いて、96 穴プレート一枚上でレンチウイルスによる遺伝子導入から薬剤感受性評価まで 1 週間程度で完了する系を考案した。生殖細胞系列の多型の評価を実施することから、変異が蓄積し個人差も大きいがん細胞ではなく正常細胞を優先すること

とした。また、臓器としては Cowden 症候群の標的である乳腺、消化管、子宮内膜の正常細胞を候補とし、遺伝的に均一であり正常細胞が採取しやすいマウス初代培養オルガノイドをまず用いることとした。

Pten 野生型マウス由来オルガノイドのラパマイシン感受性は、子宮内膜および小腸細胞の予想通り低かったが shRNA による *Pten* ノックダウンでは予想に反して大きく変化しなかった。一方、乳腺細胞はラパマイシン感受性がもともと高く、mTOR 系活性化の指標である pAKT 発現をある程度認めていた。*Pten* ノックダウンにより pAKT 発現量は確かにさらに上昇したが、ラパマイシン抵抗性に変化したため予想とは逆方向だった。そこで、mTOR 系をもう一段階活性化させるために、*Rosa26-Pik3ca^{H1047R}* マウス由来乳腺オルガノイドへの Cre 導入により活性型変異である *Pik3ca^{H1047R}* を誘導してから *Pten* ノックダウンを行った。その結果、遺伝子導入前ほとんど見られなかった pAKT が段階的に上昇したが、ラパマイシン抵抗性も段階的に上昇した。このように mTOR 経路の活性化が当初の想定と逆方向の変化を誘導したことは、正常に近い細胞内ではシグナルの feedback 機構ががんとは異なる可能性を示唆した。ただし、逆方向ではあるものの乳腺細胞は *Pten* の有無でラパマイシン感受性が変化することから、アッセイ系としては利用可能と判断した。なお、通常のマトリゲル培養では ATP 量に基づく生細胞数評価が手技的に煩雑になることからスフェロイド培養を行う方針に変更していたが、上記三臓器の中では乳腺細胞が最も安定的な増殖を見せた。また、オラパリブに対する感受性は上記三臓器のいずれの場合でも *Pten* ノックダウンによって大きな変化を認めなかった。以上の結果を踏まえ、*Pik3ca^{H1047R}* 発現 *Pten* ノックダウン乳腺オルガノイドを用いて PTEN 多型のラパマイシン感受性評価を目的とするアッセイ系を構築することとした。

最初に、PTEN 野生型および詳細な機能解析が報告済みのがん特異的既知 8 変異（そのうち 2 変異は Lipid phosphatase 機能欠損）を上記オルガノイドに導入した。当初ハイスループットのアッセイ系構築を目指していたため薬剤選択なしでの評価を試みたが、Western blot ではほとんど発現が確認できなかつたことからがん特異的変異であるにもかかわらず培養環境下での優位性がないことが示唆された。そこで、ハイグロマイシンによる薬剤選択後にタンパクの発現を再確認したところ、がん特異的既知 8 変異ではほぼ同レベルの発現なのに対し、野生型は発現が有意に低く、同細胞が mTOR 経路に依存していることが示唆された。実際、野生型 PTEN の導入により同細胞のラパマイシン抵抗性がさらに増加したが、これは mTOR 経路に依存するがんで見られるのと同じ方向の変化であることから、同細胞の mTOR 経路への依存性獲得を裏付けるものと考えられた。そこで、さらに選抜した未解析の多型について野生型 PTEN を陽性コントロール、GFP を陰性コントロールとしてラパマイシン感受性の変化率の評価を行った。しかし、(1) 同細胞では野生型 PTEN の導入後発現レベルが低いため、薬剤感受性の比較対照として使用することは適正なのか、(2) VUS 導入により誘導される薬剤感受性変化はアッセイ系としてのダイナミックレンジが小さい上にアッセイごとのばらつきも大きい、などの問題が表面化したため、並行して進めていた患者由来オルガノイド(PDO) 及び通常の癌細胞株の利用を改めて検討した。

なお、2000 種類以上存在する PTEN 遺伝子多型のうち優先的に評価すべきものを選抜した。具体的には、機械学習や Deep Learning を基盤とする AI 予測モデルを導入し、複数データベースの情報を統合することで多型の病原性を総合的に評価するアプローチを採用した。令和 4 年度には、Random Forest を基盤とする RENOVO (Favalli et al, AJHG, 2021) と Deep Learning を基盤とする EVE (Frazer et al, Nature, 2021) を Docker で実装し実行環境を構築した。また、ClinVar、jMorp (ToMMo)、gnomAD といった主要な遺伝子多型データベースから各変異の集団頻度及び病原性評価等を抽出し、データテーブルの作成に着手した。令和 5 年度にはこれらのビッグデータに加えがん関連変異データベース COSMIC とタンパク質ドメインデータベース PROSITE を統合した。さらに、Google DeepMind が開発した高精度な AI 病原性予測モデルである AlphaMissense の結果を活用する準備も進め、複数の AI 予測モデルとビッグデータを統合することで、病的変異、良性変異、VUS 変異候補の選抜を行った。令和 6 年度にはこれまでの成果を精査・統合し、ClinVar、ToMMo、gnomAD、COSMIC、PROSITE といったビッグデータと、EVE、RENOVO、AlphaMissense による AI 病原性予測を総合的に評価し、引き続き、病的変異、良性変異、VUS 変異を実験的な機能的アノテーションの候補として選抜した。さらに、タンパク質の立体構造変

化を評価する可能性を探るため、AlphaFold2 の試験的な導入も行った。これらにより令和5年度には70、令和6年度には130、合計200の多型を選抜してそれぞれ外注により遺伝子合成を行った。

ヒト子宮体がんでも最も頻度の高い類内膜がんでは、PTEN と PIK3CA の変異頻度がそれぞれ 80%、50%程度であり、同じシグナル経路であるにも関わらず両遺伝子に同時に変異のある症例も多い。PTEN 変異を有する類内膜がん PDO では、がん特異的既知8変異はいずれも導入可能だったが野生型 PTEN の導入は不可能であることから、mTOR 経路への依存が強いと考えられた。一方、漿液性がん PDO は野生型 PTEN も問題なく導入可能だったが、これは p53 欠失かつ PTEN 野生型で mTOR 経路への依存性がないためと考えられた。平面細胞培養の系での検討では、PTEN が欠失しているが、細胞の増殖を PTEN 経路に依存していない細胞株を樹立するため、ヒト膀胱癌培養細胞株 Capan-1 (KRAS G12V の Oncogenic 変異と、TP53 A159V の Likely Oncogenic 変異) を用いて、CRISPR-Cas9 システムにより PTEN をノックアウト (KO) した。ラパマイシン感受性を PTEN 野生型親細胞と比較したが、有意な差を認めなかつたことから、細胞増殖が PTEN に全く依存していない場合にはラパマイシンの薬効変化検出は困難と考えた。次に、PTEN 機能喪失を有するヒト悪性黒色腫 A2058 (PTEN deletion p.V175GfsTer3) を用いて解析を行った。レンチウイルスにより正常な全長 PTEN を導入したところ、導入自体は問題なく施行できたが A2058 は細胞増殖能が極端に減弱するが判明した。そのため本研究計画に用いるには不適であると判断した。以上の結果から、本研究には PTEN を欠失しているながら、それへの依存性が強すぎない細胞が適切と考えられた。

そこで、PTEN 欠損にも関わらず mTOR 経路へ依存性がない子宮体がんを探索したところ、p53 と PTEN の二重欠失の未分化がん PDO を見出した。同細胞は PTEN 野生型の導入および高レベルの発現が可能であり、同時に pAKT も顕著に抑制されることを確認した。機能既知8変異を用いた検討では、全て同程度のタンパク発現量でありながら mTOR 経路を活性化する lipid phosphatase 失活2変異のみで pAKT に変化がなく、その他の6変異では PTEN 野生型と同程度に pAKT を抑制していた。PTEN 多型による pAKT の抑制率を画像解析により定量したところ、薬剤感受性と比較してダイナミックレンジが十分大きく再現性も高い上に手技的にも簡便なため、アッセイとして優位性があると判断した。ただし、導入した一部 PTEN 多型の発現量にばらつきがあったため、正確を期すために PTEN 発現量で pAKT 抑制率を補正した指標で評価することとした。また、発現量が極端に少ない場合には常に pAKT 抑制率が低かったが、機械的に補正すると同指標が極端に大きくなり見かけ上良性の判定になるという欠点があるため、PTEN 多型発現量が野生型の 20% を cut-off に設定して、それ以下の多型は定性的に病的と判断して別枠で扱うこととした。定量の結果、PTEN 補正 pAKT 抑制率の値は -0.1 ~ 1.2 に幅広く分布したため、暫定的に 0.2 以下 (病的)、0.8 以上 (良性)、0.2 ~ 0.8 (中間) に層別化を行った。また、病的・良性と推定されているもの多くはそれぞれ pAKT 抑制なし・抑制あり、と想定通りに分類された。一方、発現が低い多型は従来病的と信じられていたが、本アッセイでは pAKT 抑制が明らかであり良性と判定すべきものも少なからず含まれていた。また、逆に従来良性と推定されていたが pAKT 抑制が見られないものもあった。多くの VUS も本アッセイにより初めて上記の 3 型に分類された。

このように、lipid phosphatase 活性に絞った *in vitro* アッセイではあるが、初めて PTEN 多型の正確な分類が可能になった点が画期的だったといえる。評価予定の 200 多型はウイルス作成が完了しており、順次 pAKT 抑制率の評価が進行中である。本アッセイは遺伝子合成に 1 ヶ月、ウイルス作成から Western blotting までに 1 ヶ月程度の期間で評価が可能であり、前半は 100 多型が同時に処理可能で、後半は 10 多型が同時に処理可能である。また、機能既知の多型については、lipid phosphatase 機能障害以外にも Protein phosphatase 機能障害や核局在の消失なども知られている。これらも標的蛋白のリン酸化や分画後検体の Western blotting 解析で評価可能であることから、将来的には容易に拡張して統合的な解析も可能と考えられる。

PTEN is a tumor suppressor gene encoding 403 amino acids and is mutated or deleted in many cancers. Patients with germline pathological polymorphisms have Cowden syndrome, an inherited neoplastic disease with high risk of malignancy. The most important function of PTEN as a tumor suppressor gene product is to negatively regulate the PI3K/AKT/mTOR pathway as a Lipid phosphatase, and its functional inactivation promotes carcinogenesis and malignant transformation. Whereas accurate evaluation of VUS and mutations is an important issue in genetic counseling for hereditary tumors and in cancer genome medicine, the practical reality is that decisions are made based on sequence information and inference considering functional domains, because functional analysis of individual mutations requires a great deal of time and effort. Hence, the establishment of a functional evaluation method for polymorphisms based on rapid assays has been strongly desired, but has not been achieved for many genes including PTEN. As cancer cells with inactivated PTEN are highly sensitive to mTOR inhibitors (e.g., rapamycin), we here proposed to annotate PTEN polymorphisms in PTEN-deficient cells based on the change in drug sensitivity after reintroduction. Since the evaluation of germ-line polymorphisms was also to be conducted, we decided prioritized normal cells rather than cancer cells. We also selected normal cells of the mammary gland, intestine, and endometrium, the target organs of Cowden syndrome, as candidates, and prioritized primary cultured mouse organoids, as being genetically identical.

We introduced PTEN wild-type and 8 known cancer-specific mutations (2 of which are defective in Lipid phosphatase function) into the above organoids. Whereas the cancer-specific known 8 mutations were expressed at approximately the same level, wild-type expression was significantly lower, suggesting that the cells were dependent on the mTOR pathway. In fact, introduction of wild-type PTEN further increased rapamycin resistance in the cells, a change in the same direction as seen in mTOR pathway-dependent cancers, supporting the acquisition of dependence of the cells on the mTOR pathway. While evaluating the rapamycin sensitivity, the following issues surfaced: (1) the expression level of wild-type PTEN is s after transduction, which may be inadequate as a reference; (2) the dynamic range of drug sensitivity change induced is small while the variability of the assay is high. Therefore, we reexamined the use of patient-derived organoids (PDOs). Among the more than 2,000 PTEN gene polymorphisms, those that should be prioritized were selected. Specifically, we adopted an approach to comprehensively evaluate the pathogenicity of polymorphisms by introducing AI prediction models based on machine learning and deep learning and integrating information from multiple databases. A total of 200 polymorphisms were selected, which were subsequently synthesized as a lentivirus vector.

In endometrioid carcinoma PDO with PTEN mutations, all of the eight known cancer-specific mutations could be transduced, but not the wild-type PTEN, suggesting a strong dependence on the mTOR pathway. On the other hand, wild-type PTEN could be readily transduced into serous carcinoma PDO, which is thought to be due to the lack of dependence on the mTOR pathway because of p53 deletion. Therefore, we searched for PDO that were not dependent on the mTOR pathway despite PTEN deficiency, and found an undifferentiated carcinoma PDO with a double deletion of p53 and PTEN. The cells were found to be capable of transducing and expressing high levels of PTEN wild type, while pAKT was also markedly suppressed. The other six mutations suppressed pAKT to the same extent as the PTEN wild type. The dynamic range of pAKT suppression by PTEN polymorphisms was sufficiently large and reproducible compared to drug sensitivity, and the assay was considered to be superior because of its simplicity in terms of technique. However, since the expression levels of some of the introduced PTEN

polymorphisms varied, it was decided to evaluate the pAKT suppression rate as an index corrected for PTEN expression levels to ensure accuracy. However, the index was extremely large when corrected mechanically, resulting in an apparently benign result. The results of the quantification showed that the PTEN-corrected pAKT suppression were widely distributed between -0.1 and 1.2, so we tentatively stratified them into 0.2 or less (pathological), 0.8 or more (benign), and 0.2 to 0.8 (intermediate). Many of those presumed pathological and benign were classified as no pAKT suppression and suppressed, respectively, as expected. On the other hand, the low expression polymorphisms, conventionally believed to be pathological, included a small number of polymorphisms that were clearly pAKT suppressed in this assay and should be classified as benign. On the other hand, there were also some types of VUS that had been presumed to be benign but showed no pAKT suppression. Many VUS were classified into the above three types for the first time by this assay.

Thus, although the *in vitro* assay was limited to lipid phosphatase activity, it was a breakthrough in that it enabled accurate classification of PTEN polymorphisms for the first time. The assay requires one month for gene synthesis and one month from lentivirus generation to western blotting. 100 polymorphisms can be processed simultaneously in the first half of the assay, and 10 polymorphisms can be processed simultaneously in the second half. Virus production has been completed for the 200 polymorphisms to be evaluated, and evaluation of pAKT repression rates is in progress.