

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）遺伝性腫瘍に見られる VUS に対する、包括的 *in vivo* スクリーニングと *in silico* 構造解析を融合した高精度機能的アノテーション
（英語）Functional annotation of VUS using *in vivo* comprehensive screening and *in silico* structural estimation

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）細野 祥之
（英語）Yasuyuki Hosono

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人岡山大学 学術研究院医歯薬学域 薬理学分野 教授
（英語）Okayama University, Graduate School of Medicine, Dentistry & Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacology, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

遺伝性腫瘍診断の臨床現場において、多遺伝子パネル検査の実用化により原因となる様々な病的バリエント（特定の遺伝子に生じた塩基配列の変異）が同定されてきた。しかしすべてのバリエントが癌の易罹患性に関与しているわけではなく、病的意義が不明なバリエント(variants of uncertain significance: VUS)の判定件数も増加しており、現在では検出されるバリエントの約 1/3 が VUS と判定されている。臨床的に有用な VUS の判定には、迅速な信頼できる機能評価系が必要だが、特に多機能で浸透率が 100%でない疾患原因遺伝子の病原性への関与を定量的に判定することは、既存の系では困難となっている。

これらの問題点に対し本研究開発では、遺伝性腫瘍の原因遺伝子をモデルに、特に多機能遺伝子に対して、*in vivo* スクリーニングを核とし、*in silico* と *in vitro* を統合した新たな評価系を確立する。病原性の本来の意味である「そのバリエントを持つと、疾患になりやすいのか？そうでないのか？」をアウトプットに、様々な VUS の機能解析を行い、遺伝性腫瘍の易罹患性に関与しているバリエントを判定する。

まず、BRCA2 に見られる VUS に対する、多次元機能的アノテーションの結果を報告する。*in vivo* 系として、255 種類の BRCA2 バリエント(中央西日本遺伝性腫瘍コホート研究+過去の論文)について、スクリーニングライブラリーを作成し、ゼブラフィッシュのゲノムに導入した。現在第 2 世代 (F2) までの系統と 3 種類の腫瘍サンプルを得てその推移を観察しており、シーケンスデータを解析中である。さらにバリエントの判定が 7 日間で可能（生後 5 日目のゼブラフィッシュを用いて、2 日間で解析する）な超短期間スクリーニング系を構築し、51 個の VUS に対して再判定を行い、内 24 個に対する新規判定結果を得た。現在はこれらの結果をまとめて、投稿準備中である。また、同モデルに対する国際特許出願も済ませており（「ゼブラフィッシュを用いた遺伝性疾患に見られる VUS に対する診断補助法の発明」、特願 2023-211959、

PCT/JP2024/43848)、ゼブラフィッシュを用いた様々な試験に対する認可に特化した EU の開発業務受託機関 (CRO) にコンタクトを取り協議を開始している。今回の我々の発見により、短期間、低コストで哺乳類使用を抑制したバリエーションの高精度な評価・解析という課題解決への道筋の一つを示すことができたと考えている。欧米では既に医薬品の開発・安全性試験において哺乳類の使用を規制する方向に進んでいるが、ゼブラフィッシュは生後 5 日前後までは生物として扱われないため、動物愛護の観点からも試験機関の負担が軽減されることが期待される。

次に、TP53 に見られる VUS に対する、多次元機能的アノテーションの結果を報告する。*in vivo* 系として、データベースに登録されている TP53 の 453 種類バリエーションについて、スクリーニングライブラリーを作成し、ゼブラフィッシュの生殖系列に組み込んだモデル系列を確立した。現在 F3 までの系統と 3 種類の腫瘍サンプルを得てその推移を観察しており、既存の判定結果 (ClinVar) と比較して約 80% の一致率を得ている。本系は、ゼブラフィッシュの管理が容易で大規模な飼育スペースを必要としないという特徴を生かした、特定の選択圧下における複数のバリエーションの変動を一度に解析可能な系である。生殖系列ゲノムに導入した 250 種類のバリエーションプールの変遷を世代を超えてバーコード情報として追跡することにより、病原性や薬剤感受性だけでなく、浸透率や妊孕性に与える影響なども判定可能であると考えている。

また、TP53 に見られる VUS に対する *in silico* 系として、TP53 に見られる全 453 種類バリエーションについて 4 量体の構造予測を行い、さらに DNA との結合安定性についての計算を完了した。その中で 4 量体形成ドメインの変異に対する新規の *in silico* 判定アルゴリズムを構築し、ROWVA (the root mean square deviation value when comparing the wild-type and variant structures predicted by AlphaFold2) と命名した。さらに 4 量体形成ドメインに存在する 12 個の変異についての、luciferase assay をベースとした転写活性確認実験結果との比較により、ROWVA がこれまでの立体構造予測を用いた判定結果より優れていることを確認し、それらの結果をまとめて論文投稿を行った。なお、12 個の変異についての、luciferase assay をベースとした実験による新規判定結果は、MGenD への登録が完了している (MGS000092.1)。本研究結果により、AlphaFold2 をベースとした簡便な *in silico* 病原性判定ツールを開発することができただけでなく、その過程で行った細胞株を用いた実験結果により、これまで VUS と判定されていた 12 個のバリエーションに対する新規判定を行い、その結果を MGenD に登録することができた。

最後に、明らかな家族性の集積を認め、PTEN 過誤腫症候群を疑ったが、VUS と判定されていた PTEN 変異について、*in silico*, *in vitro*, *in vivo* の系を用いて解析を行った。まず、*in silico* 系により、PTEN 変異により PTEN の立体構造自体は変わらないが、2 種類の PTEN 結合タンパク質との結合が安定化されることを、網羅的ドッキングシミュレーション法を用いて見出した。さらに、精製タンパク質を用いた SPR 解析法や、細胞株を用いた pull-down 法により、*in silico* シミュレーションの結果予測された変異型 PTEN タンパク質と 2 種類の結合タンパク質の結合が安定化することを確認した。また同変異を導入した正常乳腺上皮細胞株は細胞増殖能や浸潤能が亢進していることを見出し、その表現型は結合安定性が増加した PTEN 結合タンパク質に対する阻害剤の処理によりキャンセルされることを発見した。さらに *in vivo* モデルとして同変異を CRISPR/Cas9 法を用いて導入し、遺伝子改変モデルマウスを作製したところ、作成されたマウスは PTEN 過誤腫症候群の大項目 3 つを満たす世界初の PTEN 過誤腫症候群モデルマウスであることが判明した。さらに PTEN 過誤腫症候群モデルマウスの皮膚粘膜病変は、PTEN 結合タンパク質の阻害剤治療によって、改善することを見出した。

遺伝性腫瘍は遺伝子の変異によって発生し、変異の多くはがん抑制遺伝子に起こる。しかし、がん抑制遺伝子の変異はその大部分が機能喪失変異であるため分子標的薬の開発が難しく、BRCA1/2 に対する PARP 阻害薬等の一部の例を除き、がん抑制遺伝子の変異に起因するがんに対する明確な分子標的薬は存在しない。今回に我々の発見により、これまで治療薬が存在しなかった PTEN 変異に起因する悪性腫瘍に対する新規治療法が開発されただけでなく、がん抑制遺伝子の変異に起因する新規治療法開発の道が開かれたと考えている。

First, for an *in vivo* system targeting VUS observed in BRCA2, we constructed a screening library of 255 BRCA2 variants and introduced them into the germline of zebrafish. We have currently established second-generation (F2) lines and obtained three tumor samples to observe their progression, with sequencing data under analysis. In addition, we developed an ultra-short-term screening system that enables variant classification within seven days. Using this system, we reclassified 51 VUS and obtained new classification results for 24 of them. An international patent application for this model has also been filed (PCT/JP2024/43848).

Next, for an *in vivo* system targeting VUS observed in TP53, we created a screening library for 453 TP53 variants registered in databases and introduced them into the germline of zebrafish. We have now established third-generation (F3) lines and obtained three tumor samples to monitor their progression, achieving an approximately 80% concordance rate when compared with existing classifications (ClinVar).

Furthermore, as an *in silico* system, we developed a novel evaluation method for mutations in the tetramerization domain of TP53, naming it ROWVA (the root mean square deviation value when comparing the wild-type and variant structures predicted by AlphaFold2). We confirmed its superiority over conventional structure-based evaluation methods by comparing it with luciferase assay results for 12 variants, and submitted a paper summarizing these findings. The experimental evaluation results for these 12 variants have been registered in MGenD (MGS000092.1).

Finally, regarding a PTEN variant that showed familial clustering but had been classified as VUS, comprehensive *in silico* docking simulations revealed that the mutation stabilized binding with two PTEN-binding proteins. This enhanced binding stability was further confirmed through SPR analysis using purified proteins and pull-down assays in cell lines. Moreover, normal mammary epithelial cell lines carrying the mutation exhibited increased proliferation and invasion abilities, which were reversed by treatment with inhibitors targeting the PTEN-binding proteins. In an *in vivo* model, a genetically modified mouse line with the same mutation was developed. These mice met all three major diagnostic criteria for PTEN hamartoma tumor syndrome (PHTS), making them the world's first PHTS model mice. Notably, their skin and mucosal lesions improved with treatment using PTEN-binding protein inhibitors.