2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

学　校　名	**日　本　医　科　大　学**	研究所名等	先 端 医 学 研 究 所	
研 究 課 題	1塩基解像度による分子標的低分子医薬品の耐性変異機構の探索 －分子標的薬抵抗性メカニズムの横断的理解による精密医療の実現－		研 究 分 野	医　　学
キ ー ワ ー ド	①ドライバー変異　②　肺がん　　③　薬剤耐性			

〇研究代表者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
吉　田　圭　介	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	准　教　授	研究統括・培養細胞のゲノム編集

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
本　田　一　文	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	大学院教授	1塩基変異による細胞表現型解析
村　上　善　則	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	特 命 教 授	接着分子の遺伝子構造発現異常による薬剤感受性変化の解析
山　　本　　林	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	大学院教授	EML4-ALK融合遺伝子の機能解析
清　家　正　博	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	大学院教授	臨床検体の変異解析（肺がん）
臼　田　実　男	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	大学院教授	臨床検体の表現型解析（肺がん）
吉　　田　　寛	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	大学院教授	臨床検体の変異解析(肝がん)
近　藤　幸　尋	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	大学院教授	臨床検体の変異解析(腎がん)
清　　水　　章	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	大学院教授	病理形態学診断・病理学的助言
大　橋　隆　治	日 本 医 科 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	大学院教授	病理形態学診断・病理学的助言

1塩基解像度による分子標的低分子医薬品の耐性変異機構の探索
－分子標的薬抵抗性メカニズムの横断的理解による精密医療の実現－

1. 研究の目的

現在のがんゲノム研究では、膨大な臨床検体の次世代シーケンス情報と臨床疫学を基盤とするがんゲノム解析（top-down cancer genomics）が主流となっている。しかしながら、こうしたアプローチでは、

1）臨床検体を集める労働的・時間的コスト［特に、希少がんや薬剤抵抗性の症例について］
2）機能的なドライバー変異と、パッセンジャー変異を区別する統計解析の複雑性
3）同定された個別の変異について、細胞実験によるドライバー活性評価の欠如

などの問題点があり、変異情報から得られる新規性の高い知見については、飽和状態にある。

これに対して、細胞表現型変化を出発点とする変異機能の解析基盤(bottom-up cancer genomics)を確立することが出来れば、top-down と重ね合わせることで、がん発症の分子機序の解明・効果的な薬剤作用点を迅速に同定できるようになると考えられる。こうした背景から申請者らは、「細胞の特定の内在性遺伝子領域に対して、1 塩基変異を網羅的に導入すること(BELT 法)で、機能的変異をスクリーニングできる実験系」を新規に開発した(特許出願準備中: 吉田圭介ほか)。この系を中心として、本課題では、下記の項目を明らかにする。下記の項目を明らかにする。

[本研究の目標]
- 分子標的医薬品の標的遺伝子上の変異に起因するがん悪性化の分子機序を解明する
- 臨床現場で使用されている分子標的医薬品に対する薬剤耐性変異を網羅的に同定する

2. 研究の計画

上述の研究背景から申請者らは、bottom-up cancer genomics の実験系を新規に構築するため、「細胞の特定の内在性遺伝子領域に対して、1 塩基変異を網羅的に導入することができる実験手法、**BELT 法**(Base Editor and gRNA Library-based gene locus-driven Targeting mutagenesis)を開発した。これは、「特定のゲノムサイトに 1 塩基トランジション変異を誘導するゲノム編集酵素 Base Editor（以下、BE)」と「ガイド RNA(以下、gRNA)の発現ベクターライブラリー」を組み合わせた技術である。BE とは、DNA 二重鎖切断活性を欠損させたゲノム編集酵素 dCas9 に対して、シチジンデアミナーゼ(C 塩基を T に変換する酵素)またはアデノシンデアミナーゼ(A 塩基を G に変換する酵素)を接合したものである。Cas9 は gRNA と複合体を形成し、gRNA の 5’末端に存在するスペーサー配列と呼ばれる 20 塩基の配列に相同的なゲノム領域に Cas9 がリクルートされる。従って、特定の 20 塩基のゲノム配列を含む gRNA 発現ベクターを BE 発現ベクターと共に細胞に導入すれば、任意のゲノムサイトに 1 塩基変異を誘導することができる。一方で申請者らは、制限酵素などの DNA クローニング技術を応用することで、特定の DNA 断片について、これに含まれるランダムな 20 塩基を発現する gRNA ベクターライブラリーへと変換する技術を独自に開発した(特許出願中: 吉田圭介ほか)。これら BE（near PAM-less 型)と gRNA ライブラリーの発現ベクターを細胞に導入することによって、任意の内在性ゲノム領域に対して、網羅的にランダム変異を導入することに成功している。

実際に BELT 法を用いて、がん遺伝子に網羅的に変異導入し、細胞ごとに異なる 1 塩基変異を有する細胞群を、がんの特徴の一つである足場非依存的増殖条件下で培養すると、スフェロイド形成が観察されると共に、Xenograft モデルで腫瘍形成が観察されている。ここでスフェロイド形成に関わる細胞群には、がんドライバー変異が濃縮していることが考えられたため、

NGS で変異解析を行うと、既知のドライバー変異(がん検体で一定数検出され、強い細胞増殖活性が実験的にも確認されている変異)の濃縮が観察されている。

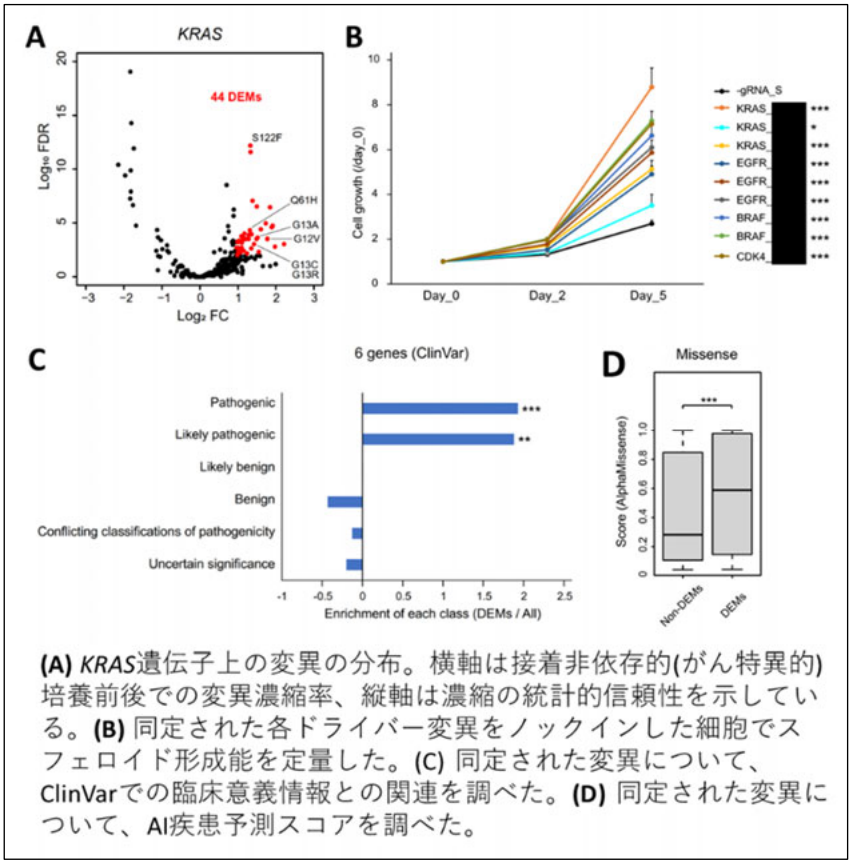
こうした予備実験の結果から本研究では、「BELT 法による標的がん遺伝子上変異の 1 塩基レベルでの機能評価」と「臨床検体でのドライバー変異のスクリーニング解析」を組み合わせることで、実験的・疫学的に検証された、信頼性の高いがんドライバー及び薬剤耐性に関わる変異データベースを構築すると共に、変異細胞のオミックス解析から耐性メカニズムを解析する。

3. 研究の成果

(1)がん遺伝子における、ドライバー変異の網羅的同定

肺がん患者で変異が検出されるがん遺伝子について、高頻度の順から *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *MDM2*, *MET*, *CDK4* を選択し、ドライバー変異のスクリーニング実験を行った。ヒト正常様培養細胞である HEK293 を用いて、これら遺伝子群のコーディングエキソン領域に 1 塩基ランダム変異を BELT 法で導入し、接着非依存的条件下で培養することで、ドライバー変異を濃縮させ、NGS 解析で変異箇所を同定した。ここでは、上記の 6 遺伝子のエキソン領域において、がん患者で検出報告のある変異個所(COSMIC データベース登録変異)である 3,930 か所に着目して解析した。

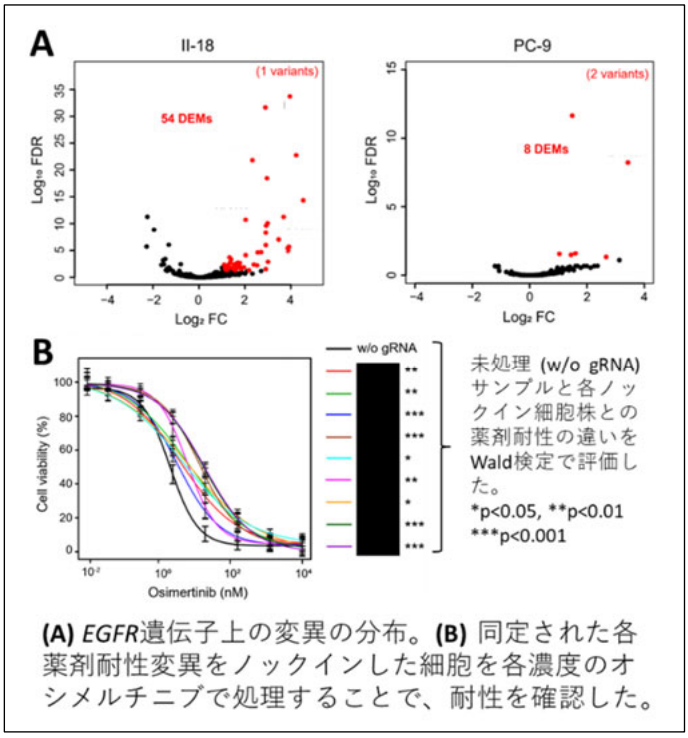
その結果、116 か所のドライバー変異の同定に成功し、*KRAS, EGFR, BRAF* で比較的多く検出され、それぞれ 44, 39, 14 か所であった(Fig. 1A)。実際に、これらがドライバー変異として機能するか調べるため、代表的なものをゲノム編集法で個別に導入すると、接着非依存的増殖能の亢進が観察された(Fig. 1B)。また、同定された変異について、疾患変異データベースである ClinVar の変異機能情報と比較すると、ここで同定された変異群では(likely)pathogenic と判定されているものが有意に含まれていた(Fig. 1C)。さらに、最新の AI 疾患変異予測プログラム AlphaMissense で解析すると、疾患性スコアの高いものが濃縮されていた(Fig. 1D)。以上の結果から、BELT 法による我々の実験的ドライバー変異探索法によって、臨床的にも疾患性の高い変異について、高い信頼性で抽出が可能であることが示された。



(A) *KRAS*遺伝子上の変異の分布。横軸は接着非依存的(がん特異的)培養前後での変異濃縮率、縦軸は濃縮の統計的信頼性を示している。**(B)** 同定された各ドライバー変異をノックインした細胞でスフェロイド形成能を定量した。**(C)** 同定された変異について、ClinVarでの臨床意義情報との関連を調べた。**(D)** 同定された変異について、AI疾患予測スコアを調べた。

(2)分子標的治療薬における耐性変異の網羅的同定

EGFR 陽性の肺がん患者の分子標的治療薬として使用されているオシメルチニブに着目して解析した。前項と同様に、*EGFR* 遺伝子にランダム変異を導入した肺がん細胞株 II-18 及び PC-9 を調整し、オシメルチニブ含有培地で継続培養することで、薬剤耐性変異を濃縮させた。その結果、それぞれの細胞株で 54 及び 8 か所の薬剤耐性としての新規機能変異を同定した(Fig. 2A)。これらの内、代表的なものを個別に細胞に導入すると、オシメルチニブ処理時の増殖阻害の抵抗性(Fig. 2B)、EGFR 脱リン酸化への抵抗性が観察されたため、薬剤耐性が検証できている。



(A) *EGFR*遺伝子上の変異の分布。**(B)** 同定された各薬剤耐性変異をノックインした細胞を各濃度のオシメルチニブで処理することで、耐性を確認した。

4. 研究の反省・考察

本年度の研究から、「肺がん患者で変異が検出される、がん遺伝子上のドライバー変異のマッピング」、「EGFR 分子標的治療薬であるオシメルチニブのオンターゲット耐性変異の網羅的同定」が達成されており、当初の実験計画通り、研究が進められた。

BELT 法を用いたドライバー変異スクリーニングで同定された変異箇所の出現分布は、(特に *KRAS*, *EGFR* において)臨床の患者分布におけるホットスポットとコドン位置が一致していること、in silico による疾患度予測スコアと相関していることから、本手法による機能変異スクリーニングは、標的遺伝子上における機能的変異マッピングの汎用的有用性が期待できる。また、同定された分子標的薬のオンターゲット薬剤耐性変異のリストについては企業と連携し、コンパニオン診断薬の開発などにつなげていきたい。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

① 吉田圭介, 本田一文 「Comprehensive and Accelerated Detection of Driver Mutations through Single-Nucleotide Random Mutagenesis of Target Genes」 The 3rd JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference 2025年6月29日

② 吉田圭介 「早い! 安い! うまい! – 標的遺伝子領域へのランダム変異導入による網羅的ドライバー変異の同定法の開発」 日本分子腫瘍マーカー研究会 2025年9月24日

③ 吉田圭介 「標的遺伝子領域への1塩基ランダム変異の導入による迅速なドライバー変異の網羅的同定」 第84回 日本癌学会 学術集会 2025年9月25日

(3)出版物

① Yoshida K. et. al. "Comprehensive and accelerated mapping of driver mutations through single-nucleotide random mutagenesis of target genes" (BioRxiv: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.11.05.686667v1.full)