

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16817

研究課題名（和文）キナーゼタンパク質と阻害剤の相互作用を指標としたRET阻害剤の開発

研究課題名（英文）Development of RET inhibitor based on the interaction between the kinase protein and inhibitor

研究代表者

中奥 敬史（Nakaoku, Takashi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：20779491

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、RET遺伝子を対象に、がんゲノム情報をもとに変異体へのスクリーニングにより有望な既存薬剤を選定し、薬剤耐性変異への影響を受けにくいキナーゼ阻害剤のデザインに向けた知見を得ることを目標とする。自施設にて経験した薬剤耐性獲得検体より新たな耐性変異を同定し、報告した。収集した変異リストをもとに変異をタンパク質と細胞モデルに導入し、薬剤感受性情報を取得した。また、精製タンパク質と阻害剤との共結晶構造の取得に成功した。その結晶構造情報をもとに、複数変異を導入し、分子シミュレーションにて結合安定性情報を取得した。実験データと分子シミュレーションから得られる感受性データには相関を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、キナーゼに生じる変異を題材に、患者由来のゲノム情報と実験データをもとに分子シミュレーション手法を組み合わせ、薬剤結合変化をコンピューター上でシミュレートすることで、感受性の推定モデルの構築を行った。本研究にて構築するのは、従来の実験科学主導型の研究アプローチとコンピューター手法を融合させることで両分野の双方向性を促し、新たな機能解析方法としてコンピューター駆動による阻害剤開発方法を目指す点で学術的意義を有している。また、患者個人の遺伝子情報に臨床的意義を与えると同時に適正な薬剤選択を可能にし、我が国のがんゲノム医療の推進への寄与が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aim to select inhibitors against mutant RET by screening and to obtain knowledge for designing kinase inhibitors that are less susceptible to drug resistance mutations. We identified and reported new resistance mutations from specimens acquired drug resistance. Based on the list of mutations collected, we introduced the mutations into proteins and cell models to obtain drug sensitivity information. We also succeeded in obtaining the co-crystal structure of the purified protein and the inhibitor. Based on the crystal structure information, we performed molecular simulation to understand binding stability. We confirmed the correlation between the experimental data and the susceptibility data obtained from the molecular simulation.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：キナーゼ阻害剤 RET がんゲノム医療

## 1. 研究開始当初の背景

キナーゼの遺伝子異常を標的としたがん個別化治療は、肺がんにおける EGFR 変異や慢性骨髄性白血病における ABL 融合等で実現されている。さらに治療経過で耐性をもたらす EGFR T790M や ALB T315I 等の 2 次変異に応じた薬剤選択も可能となり、より個別化した治療へと発展してきた。申請者の所属する研究室では、RET 遺伝子融合を肺腺がんより同定し (Kohno T, et al. *Nat Med.* 2012)、RET チロシンキナーゼ阻害剤バンデタニブの臨床試験により、その治療効果を証明してきた (Yoh K, et al. *Lancet Respir Med.* 2016)。しかしながら、RET 融合陽性肺がんにおいても数ヶ月程度で薬剤耐性が出現し、治療の限界となっており、より有効な治療法の開発が求められている。

そうしたなか、報告者は RET 融合遺伝子陽性肺がんのバンデタニブ耐性例を解析し、RET タンパク質の ATP 基質結合部位 (薬剤耐性変異が頻発する部位) から離れた活性化ループ (A-loop) 上に薬剤耐性を引き起こすアミノ酸置換変異 S904F を同定した。S904F 変異の導入により、RET キナーゼの活性を著明に上昇する他、*in vitro* kinase アッセイ、Ba/F3 細胞を用いた増殖アッセイにてバンデタニブの阻害効果を低下させた。さらに、スーパーコンピュータ「京」を用いた分子動力学シミュレーション解析により、この S904F 変異体は薬剤選択的にキナーゼとの相互作用を引き起こし、アロステリック効果によって薬剤結合が不安定化させるタンパク構造を誘導することで薬剤結合を不安定化させることを見出した (Nakaoku T, et al. *Nat Commun.* 2018)。

申請者はこの薬剤耐性変異の克服に向け、キナーゼ阻害剤のスクリーニングを行い、RET と相性の高い VEGFR2 に対する阻害剤 A を選出し、S904F 変異体に野生型に比べより高い感受性を示す知見を得ている (図 2)。また、阻害剤 A は、RET 上に生じるゲートキーパー変異 V804M/L を含む既知の耐性変異に対しても、他の薬剤と異なり、薬剤耐性は認めなかった。既存の VEGFR2-A との共結晶構造から考察されるのは、A の疎水性芳香族環が RET の疎水性アロステリックポケットに位置し、P-loop 疎水性残基を安定化させる可能性であり、その構造的特性により、RET の P-loop 疎水性残基の安定をもたらす、効果的な RET の化学的阻害に繋がっている可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、RET タンパク質を対象に複数の変異体への結合親和性の高い阻害剤をモデルとして、阻害剤-タンパク質間の相互作用に着目しつつ、*in vitro* アッセイと *in silico* 解析を行うことで、その有効性・特異性の機構を明らかにし、活性型キナーゼの制御に向けた新たな創薬アイデアを得ることを目標とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、RET キナーゼを対象に、阻害剤-タンパク質の相互作用による薬剤感受性変化に着目し、精製タンパク質を用いた *in vitro* アッセイや分子動力学シミュレーション等の *in silico* 解析を行うことで分子標的治療の奏効・耐性の指標となる阻害剤の化学的・構造的特性を明らかにする。得られた結果を細胞実験等と照らし合わせながら、RET キナーゼの新たな創薬を提案することを目指す。

### 1. RET キナーゼタンパク質の発現系を用いて有望な阻害剤の選出

昆虫細胞を用いた RET キナーゼタンパク質の発現コンストラクトの提供を受けており、それに対して複数変異を導入し、GST-RET の融合タンパク質としての発現系は準備済みである。精製したタンパク質を用いて、*in vitro* キナーゼアッセイによる  $K_m$ 、 $K_i$  値の測定し、阻害剤-タンパク質の結合安定性を調べ、変異導入による特性変化を調べる。有望な阻害剤は構造解析を試み、阻害剤の有効性・特異性を構造の側面から精査する。

### 2. 分子動力学シミュレーションを行い、結合相互作用の解析

RET タンパクと各種阻害剤との線共結晶構造を対象に、分子動力学シミュレーション解析に着手を行う。シミュレーションの解析では、タンパク質-阻害剤間の相互作用や、出現した過渡的構造の結合自由エネルギーを算出し、構造と阻害剤による阻害効果の関係を調べる。細胞実験やキナーゼ実験の結果と照らし併せながら、RET キナーゼに対する新たな創薬アイデアにつながる知見を得る。

## 4. 研究成果

RET キナーゼを対象に、SCRUM-Japan や公開データベースから得られる遺伝子情報をもとに、各種ヒトがんを観察される RET 活性化変異をリスト化した。特に自施設にて経験した、薬剤耐性獲得後の検体を採取できた症例より、薬剤耐性の 2 次変異を新たに同定した。自施設症例での耐性変異と収集した変異リストをもとに、複数の変異をタンパク質と Ba/Fa3 細胞を用いた薬剤感受性モデルに導入し、計 30 変異体作成した。これらをもとに各種薬剤で処理し、キナーゼアッセイや細胞生存アッセイを行うことで、薬剤感受性情報を取得している。また、精製タンパク質と阻害剤との複数共結晶構造の取得に成功した。

その結晶構造情報をもとに、各種変異を導入し分子シミュレーションにて自由エネルギー値として薬剤感受性情報を取得し、60 以上の計算を行った。

上記の自施設で経験した薬剤耐性獲得の 2 次変異に対して、実験データと分子動力学シミュレーションから得られる感受性データには相関が認められた。現在は構造情報から薬剤感受性に影響を与える残基やモチーフを導出し、メカニズムを解明に着手した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kohno T, Tabata J, Nakaoku T	4. 巻 22;41(2)
2. 論文標題 REToma: A cancer subtype with a shared driver oncogene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 123-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgz184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Lori J Wirth, Takashi Kohno, Hibiki Udagawa, Shingo Matsumoto, Genichiro Ishii, Kevin Ebata, Brian B Tuch, Edward Y Zhu, Michele Nguyen, Steve Smith, Lauren M Hanson, Michael R Burkard, LouAnn Cable, James F Blake, Kevin R Condroski, Barbara J Brandhuber, Steve Andrews, S Michael Rothenberg, Koichi Goto	4. 巻 11;3
2. 論文標題 Emergence and Targeting of Acquired and Hereditary Resistance to Multikinase RET Inhibition in Patients With RET-Altered Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCO Precis Oncol	6. 最初と最後の頁 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/P0.19.00189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Nakaoku, Junya Tabata, Mitsugu Araki, Yasushi Okuno, Takashi Kohno
2. 発表標題 Targeting RET-VUS in precision oncology using molecular dynamics simulation
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------