

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

所属機関 山梨県立中央病院 ゲノム解析センター
職名・氏名 研究員・弘津陽介

1 研究テーマ

遺伝性腫瘍のゲノム解析によるがん個別化予防・治療の推進

2 研究の目的

家系内に多数の癌発症者が集積し、自分自身に遺伝的素因があるかを不安に感じる方がいる。遺伝的素因を持つ方は、30-50代と若くして癌を発症するリスクがあり、働き盛り・子育て時期の方にも認められる。遺伝子技術の進歩により、遺伝的な素因が有るか無いかをあらかじめ知り予防的な措置を取ることで、生涯にわたってがんの発症リスクからの不安を取り除くことができるようになってきた。すでに癌を発症している場合、*BRCA1*または*BRCA2*遺伝子に病的変異を認めた患者に対しては、分子標的薬であるPARP阻害剤が効果を示すことが知られ、遺伝子異常に対して効果的ながん治療を選択する上でも重要である。

本研究では、がん発症に関わる遺伝子群の網羅的解析を進め、がん予防・治療に繋げることを目的とする。また、遺伝的素因、家族歴、他の癌発症リスクとの関わりを分析し、ゲノム情報と臨床情報のデータベース構築を行い、より緻密な診断を行う体制の構築を目指す。

3 研究の方法

ゲノム解析に同意を得た患者から末梢血からパフィーコートDNAを抽出する。*BRCA1/2*遺伝子の全エクソン領域を標的にプライマーを設計し、マルチプレックスPCRにより増幅する。PCRアンプリコンにアダプター、バーコードを付加し、ライブラリーを作成する。ライブラリーを磁器ビーズで精製後、定量PCRで濃度を測定する。等濃度の混合ライブラリーを作成後、エマルジョンPCRでライブラリー増幅し、半導体チップにサンプルを加える。次世代シーケンサーで*BRCA1/2*遺伝子領域を解析後、生殖細胞系列変異を検出するパイプラインにて変異を同定する。タンパク質の構造に影響するナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライス変異をフィルタリングで絞り、病的変異とした。また、ミスセンス変異は、6万人のデータベース(ExAC)、東北メディカルメガバンクの日本人データベース(iJGVD)を元にした変異の頻度情報、タンパク質構造異常のバインディング解析、臨床情報との関連(ClinVar)文献情報等を考慮し、病的な意義を総合的に検証した。

分子診断用HDx標準サンプル3検体および乳癌・卵巣癌患者147名(病的変異陽性20名、エクソン欠失陽性1名、陰性126名が既知)を対象とした。本Early Accessプログラムは本邦で1施設のみ認定を受け参画した。本プログラムで供給を受けたOncoPrint *BRCA1/2* Panel (Thermo Fisher Scientific社)を用いてIon PGMにてNGS解析を行い、遺伝子変異およびコピー数変化を調べ、検出感度・特異度について検証した。新規に同定した変異については、サンガー法にて再検証を実施した。

4 研究の成果

(1) *BRCA1/2* 遺伝子変異およびコピー数欠失を高精度に同時検出する解析系構築と検証

乳癌卵巣癌の生殖細胞系列変異には大きく分けて2種類ある。ひとつは、Single Nucleotide Variant (SNV)、挿入欠失 (INDEL) 等の小さな変異、他はエクソンレベルで挿入欠失が起こる Structural Variant (SV) 等の大きな変異である。従来、小さな変異に対してはサンガー法が、大きな変異に対しては Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法による解析で、臨床的な診断が行われてきた。しかし、これらの方法は異なる2種の解析を実施しなければならないため、時間・コストの面で大きな負担が生じる。近年、一度の解析で大量のデータを得ることができる次世代シーケンス解析 (NGS) が新たな手法として注目されている。本研究では NGS 解析により、*BRCA1/2* 遺伝子の小さな変異および大きな変異を同時に高感度に検出する解析系の構築と検証を行った。

まず、人工的に変異を導入した3種の標準 DNA サンプル (HD793, HD794, HD795) を用いて、新たに構築された解析系により変異を正確に同定できるか評価した。その結果、標準 DNA サンプルに含まれる24変異を全て検出でき (表1)、変異アレル値も相関していた (図1)。次に、すでに変異の情報が既知の147検体を用いて、同時検出系の感度・特異度を測定した。147名の乳癌・卵巣癌患者のうち、生殖細胞系列に病的変異が陽性21名 (既知20名、新規1名)、陰性126名であった (図2)。新規に同定した変異は8bpのポリA部位であったが、サンガー法にて再確認された (図3)。また、コピー数解析で得られた結果は、MLPA法で同定したエクソン欠失陽性1例、陰性146例ともにデータは完全に一致し、エクソンレベルでの欠失部位も正確に同定可能であった (図4)。この大きな欠失は、*BRCA2* のエクソン21-27の部分で起きており、MLPA法で同定した箇所と完全に一致していた。

本研究では、新たに構築した解析系では高感度に SNV、INDEL、SV 変異を検出することに成功した。また、新規に構築した解析系では、従来のアッセイ系では検出できなかったホモポリマー領域の変異についても同定できた。本解析系は、従来の解析系に比べ、コストを8割削減し、解析時間の短縮につながった。本成果は、小さな変異・大きな変異を同時に高精度に検出できる解析系として、英文科学雑誌に受理された (Hirotzu et al., 2018 *Oncotarget*)。

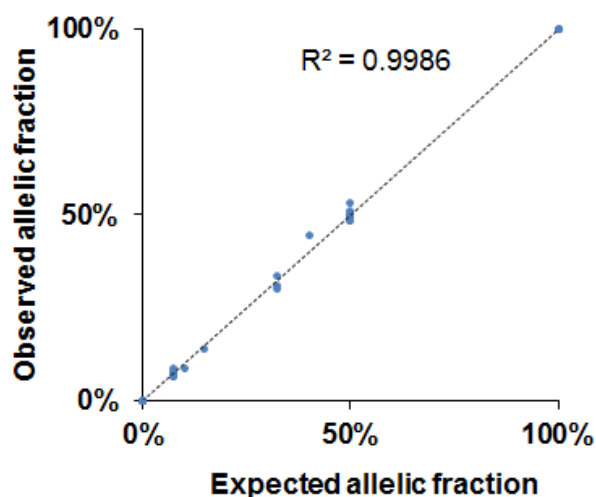


図1 .

標準 DNA サンプルの想定されるアレル頻度 (Y 軸) と実際に測定されたアレル頻度 (X 軸) の相関が認められた ($R^2 = 0.9986$)

Deleterious mutations

Oncomine *BRCA1/2* Panel

		Positive		Negative	
		Positive	Negative	Positive	Negative
IonAmpliSeq <i>BRCA1/2</i> Panel	Positive	20	0	1	126
	Negative	1	126		

図 2 .

新規の解析系(Oncomine *BRCA1/2* Panel)と、既に解析した方法 (IonAmpliSeq *BRCA1/2* Panel) との比較。両者で病的変異陽性例は 20 例、陰性例は 126 例であった。新規解析系でのみ病的変異を 1 例検出した。

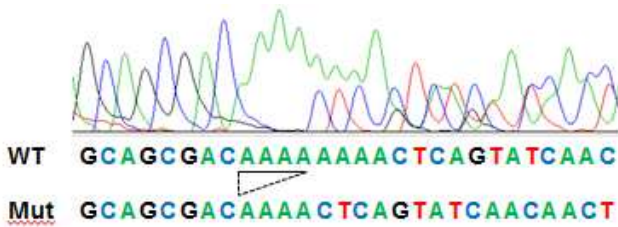


図 3 .

解析結果が一致しなかった 1 例のサンガー法による検証。本変異は、アデニン (A) が 8 塩基連続するホモポリマー領域である。新規の解析系では、本変異を正確に検出していることが明らかとなった。

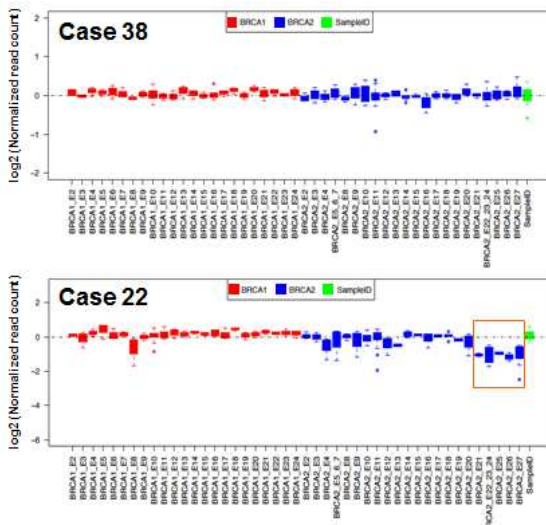


図 4 .

新規の解析系による大きな欠失の同定。Case 38 は、エクソンレベルの大きな欠失が認められないが (上段) Case 22 では橙色枠で囲んだ部分で欠失が認められた。この大きな欠失は、*BRCA2* のエクソン 21-27 の部分が 1 コピー欠失していた。

表 1 . 標準 DNA サンプルと新規解析系で同定された *BRCA1/2* 変異

Gene	Mutation	Expected Allelic Frequency (HD795)	Observed Allelic Frequency	Coding
<i>BRCA1</i>	p.S1613G	7.5%	6.7%	c.4900A>G
<i>BRCA1</i>	p.K1183R	7.5%	7.4%	c.3548A>G
<i>BRCA1</i>	p.K820E	7.5%	8.5%	c.2458A>G
<i>BRCA1</i>	p.R1443X	32.5%	30.8%	c.4327C>T

<i>BRCA1</i>	p.D435Y	7.5%	7%	c.1303G>T
<i>BRCA1</i>	p.P871L	15%	14%	c.2612C>T
<i>BRCA2</i>	p.N289H	7.5%	8%	c.865A>C
<i>BRCA2</i>	p.V2466A	100%	100%	c.7397T>C
<i>BRCA2</i>	p.N991D	7.5%	6.6%	c.2971A>G
<i>BRCA2</i>	p.K1691fs	32.5%	33.4%	c.5067_5067delA
<i>BRCA2</i>	p.N1784fs	40%	44.7%	c.5345_5345delA
<i>BRCA2</i>	p.D1420Y	32.5%	29.9%	c.4258G>T
<i>BRCA2</i>	p.I2675fs	10%	8.8%	c.8015_8016insA
Gene	Mutation	Expected Allelic Frequency (HD793)	Observed Allelic Frequency	Coding
<i>BRCA1</i>	p.S1613G	50%	49.5%	c.4900A>G
<i>BRCA1</i>	p.K1183R	50%	50%	c.3548A>G
<i>BRCA1</i>	p.K820E	50%	49.7%	c.2458A>G
<i>BRCA1</i>	p.R1443X	0%	0%	-
<i>BRCA1</i>	p.D435Y	50%	48.7%	c.1303G>T
<i>BRCA1</i>	p.P871L	100%	100.0%	c.2612C>T
<i>BRCA2</i>	p.N289H	50%	51%	c.865A>C
<i>BRCA2</i>	p.V2466A	100%	100%	c.7397T>C
<i>BRCA2</i>	p.N991D	50%	48.4%	c.2971A>G
<i>BRCA2</i>	p.K1691fs	0%	0%	-
<i>BRCA2</i>	p.N1784fs	50%	53.1%	c.5345_5345delA
<i>BRCA2</i>	p.D1420Y	0%	0%	-
<i>BRCA2</i>	p.I2675fs	0%	0%	-
Gene	Mutation	Expected Allelic Frequency (HD794)	Observed Allelic Frequency	Coding
<i>BRCA1</i>	p.S1613G	0%	0%	-
<i>BRCA1</i>	p.K1183R	0%	0%	-
<i>BRCA1</i>	p.K820E	0%	0%	-
<i>BRCA1</i>	p.R1443X	0%	0%	-
<i>BRCA1</i>	p.D435Y	0%	0%	-
<i>BRCA1</i>	p.P871L	0%	0%	-
<i>BRCA2</i>	p.N289H	0%	0%	-
<i>BRCA2</i>	p.V2466A	100%	100.0%	c.7397T>C
<i>BRCA2</i>	p.N991D	0%	0%	-
<i>BRCA2</i>	p.K1691fs	0%	0%	-
<i>BRCA2</i>	p.N1784fs	0%	0%	-
<i>BRCA2</i>	p.D1420Y	0%	0%	-
<i>BRCA2</i>	p.I2675fs	50%	48.5%	c.8015_8016insA

(2) 機能的意義不明なミスセンス変異のインフォマティクス解析

*BRCA1/2*の多型を解析する上で、非常に稀な SNV が検出されることがある。こうした稀な多型は、遺伝子機能にどのような影響を与えるか未知のバリエーションがあり、Variants of Uncertain Significance (VUS) と呼ばれている。VUS のタンパク質機能への寄与度を解析するため、想定する 86 億変異に対して順位付けした Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) 法で解析した。本手法による統計学的な *in silico* 解析でタンパク質機能予測を実施し、機能面への影響をデータベースと照合して相関を調べた。

解析した乳癌・卵巣癌患者 283 例の変異データを CADD 法による解析を行ったところ、病原性が高いと推定される CADD スコア 10 以上の変異は、*BRCA1* で 18 例、*BRCA2* で 34 例同定された。このうち、病的変異は全て CADD スコアが 10 以上として分類された。また、稀な SNV の内、CADD スコアが 10 以上で *in silico* 解析、頻度データベース、臨床背景を考慮した結果、VUS として想定されたものは *BRCA1* で 7 例、*BRCA2* で 4 例に見いだされ、全体の 283 名の内 11 例であった (3.9%)。また、家系内に乳癌・卵巣癌を罹患した方がいるか家族歴調査を行い、罹患した血縁者の方が遺伝カウンセリングを受診され、発端者と同一変異が有るか 3 家系について、さらに VUS の評価を実施した。家系内に発端者と同一変異が同定された 1 家系見つか (図 5) 今後定期的に調査を行い変異の病原性について詳細を調べていく必要がある。一方、同一変異が同定されなかった 2 家系は、変異の病原性が低いことが明らかとなった (図 5)。本手法を用いることで、今後新たに同定される VUS の評価につながることを期待される。本成果は、英文科学雑誌に受理された (Nakagomi et al., 2018 *Cancer Science*)。

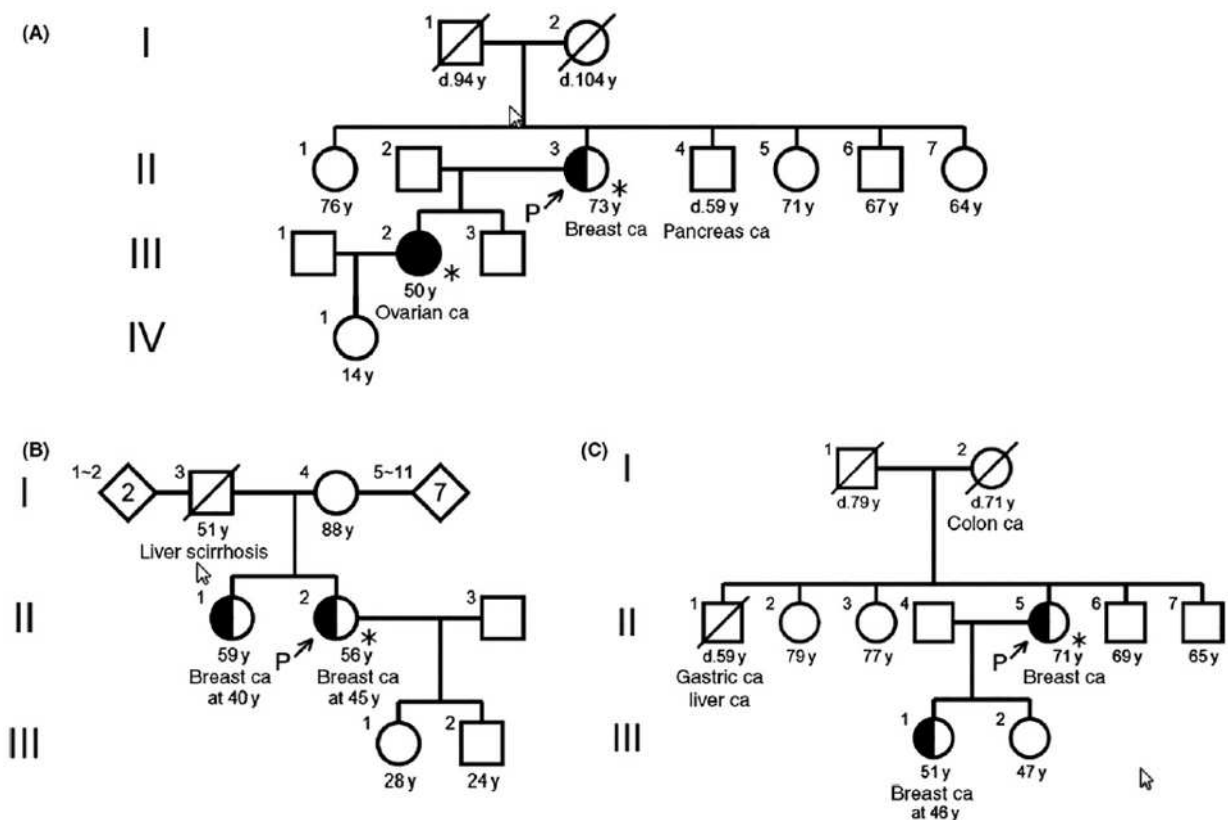


図 5 . (A) 発端者 (母) は乳癌に罹患し (P と示す)、娘は卵巣癌を発症した。同一変

異が親子で同定された。(B)発端者(妹)姉ともに乳癌を発症しているが、姉には発端者と同じ変異は認められない(C)発端者(母)と娘はともに乳癌を発症しているが、娘には発端者と同じ変異は認められない。

5 今後の展望

高精度に SNV, INDEL, SV 変異を同時検出する解析系が構築できたことにより、BRCA1/2 遺伝子の生殖細胞系列変異が同定に役立つことが期待できる。また、解析によって同定される VUS についても機能面の推定が可能になったことで、遺伝性癌のリスク予想および予防・治療選択をする上で重要になると考えられる。今後、生殖細胞系列の遺伝子の情報が蓄積することで、日本人の発がんリスクを評価することにつながる。さらに、ヒトのみならず他の生物種との比較ゲノム解析をすることで、遺伝子異常の機能面での評価が正確なものになることが予想される。現在、他施設との共同研究を進めており、これらの課題の解決を実施している。

6 研究成果の発信方法(予定を含む)

研究成果は、英文科学雑誌に投稿し受理された。また、第 55 回日本癌治療学会学術集会(パシフィコ横浜)で口頭発表した。今後も研究成果を発信していきたいと考えている。

Simultaneous detection of genetic and copy number alterations in BRCA1/2 genes.

Hirotsu Y, Ooka Y, Sakamoto I, Nakagomi H, Omata M.

Oncotarget. 2017;8(70):114463-114473

Combined annotation-dependent depletion score for BRCA1/2 variants in patients with breast and/or ovarian cancer.

Nakagomi H, Mochizuki H, Inoue M, Hirotsu Y, Amemiya K, Sakamoto I, Nakagomi S, Kubota T, Omata M.

Cancer Sci. 2018;109(2):453-461.

次世代シーケンス解析による BRCA1/2 遺伝子変異とコピー数異常の高精度同時測定系の構築

弘津陽介、大岡美彦、中込博、坂本育子、小俣政男

癌治療学会 2017 年 10 月 20 日(金)~22 日(土) パシフィコ横浜

7 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご支援を賜りました山梨県大村智人材育成基金事業に深く御礼申し上げます。