

## 172. 遺伝性腫瘍の機能不明変異の解釈とデータベース構築

弘津 陽介

山梨県立中央病院 ゲノム解析センター

Key words : 遺伝性腫瘍, 乳癌, 卵巣癌, *BRCA1/2*, CADD

### 緒言

癌未発症者の方の中には、家系内に癌を発症した親戚が集積し、遺伝性腫瘍が疑わしい場合がある。日本では、遺伝性腫瘍に対して認知度が低かったが、2013年に米国女優、アンジェリーナ・ジョリーさんが、*BRCA1*に生殖細胞系列変異があることが取り上げられ、関心が高まった。しかし、日本では、癌に関与する生殖細胞系列の変異情報の蓄積が欧米に比べて十分ではなかった。そのため、日本人特有の多型に関する評価が困難な場合が多い。特に、一般母集団においても頻度が低い多型や、新規に同定された多型は機能未知なバリエーション (Variants of Uncertain Significance、以下VUS) として、臨床診断ができない問題が生じる。

本研究では、遺伝性腫瘍に関わる遺伝子群を次世代シーケンス解析するアッセイ系の構築およびVUSの評価を行った。対象は、遺伝性乳癌卵巣癌および家族性腫瘍が疑われる患者とした。生殖細胞系列のバリエーションを同定し、家族歴や病歴などの臨床情報やバイオインフォマティクスによる手法で機能意義不明なバリエーションの評価を行い、データ蓄積を行った。本研究の成果について報告する [1, 2]。

### 方法

#### 1. 対象患者

書面にてゲノム解析に同意の得られた患者の中で、乳癌、卵巣癌発症者または遺伝性腫瘍の疑われる患者を対象としてスクリーニングを行い、解析対象とした。EDTA-2Na (抗凝固剤) 入りの採血管 (テルモ) に末梢血 5 mL を採血した。採血管は速やかに遠心を行い、バフィーコート層を回収して、DNA抽出まで凍結保存した。また、すでに凍結保存をしている検体の中から、コントロール群として90歳以上の癌未発症者をスクリーニングし、解析対象とした。本研究内容は、当院倫理委員会で承認済みである。

#### 2. DNA抽出

QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (QIAGEN) およびQIAcubeを使用し、バフィーコート 200  $\mu$ L からゲノムDNAを抽出した。DNA濃度は、NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。

#### 3. 次世代シーケンス解析

Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、ゲノムDNAを鋳型としてマルチプレックスPCRにて標的領域を増幅した。増幅したPCR産物のプライマー配列をFuPa試薬で一部除去し、Ion Xpress バーコードアダプター、P1アダプター等をPCR産物の5'末端、3'末端にライゲーションし、次世代シーケンス用のライブラリーを作製した。ライブラリー濃度は、Ion Library TaqMan Quantitation Kitを用いてリアルタイムPCR法で定量した。各サンプルのライブラリー濃度を一定濃度に調整し、エマルジョンPCRを行った。次世代シーケンサー Ion PGM または Ion Proton を使用し、データを取得した。

#### 4. データ解析

次世代シーケンス解析で取得したデータは、専用サーバーTorrent Suite にて標準ゲノム配列へのマッピング、アライメントを実施した。生殖細胞系列変異、コピー数異常、アノテーション等の情報は、Ion Reporter Local サーバーにて解析した。UCSC ゲノムブラウザーのCommon SNPs と同一の多型は、一般母集団での多型と判断し、解析対象

から除外した。また、公開データベース ExAC、iJGVD による多型頻度を調べた。また、VUS の機能評価については、変異情報ファイル (VCF) から Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) スコアを算出し、病的意義が既知の変異とのスコアを比較した。

## 結 果

### 1. *BRCA1/2* 遺伝子の変異とコピー数異常を同時に測定するアッセイ系の構築

生殖細胞系列変異として、一塩基置換 (SNV)、挿入欠失 (INDEL) 等の変異、あるいはエクソンレベルで構造異常 (SV) が知られている。従来、SNV や INDEL にはサンガー法が、SV には Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法により、臨床的な診断が行われてきた。しかし、異なる方法で解析するため、時間とコストがかかる問題が生じる。次世代シーケンス解析により、*BRCA1/2* 遺伝子の SNV、INDEL 等の変異と SV を同時に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 種類の標準 DNA サンプルを用いて検証した。その結果、標準 DNA サンプルに含まれる人工導入変異 24 個を全て検出でき、変異アレル値も相関していた。次に、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。新規に同定した変異は 8 bp のポリアデニン部位であったが、サンガー法にて再確認された (図 1)。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。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 [1]。

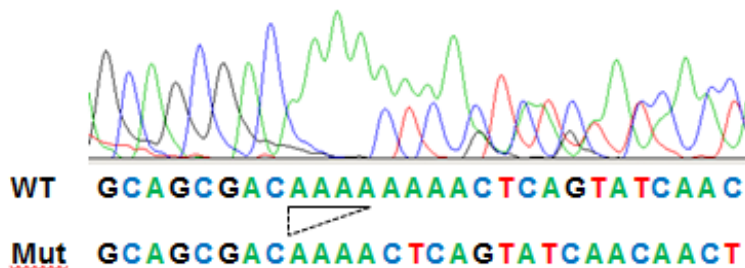


図 1. 不一致が見られた検体のサンガーシーケンスによる検証

アデニンが 8 塩基連続する部分の変異を次世代シーケンス解析で検出できていることを再検証した。  
文献 [1] より引用。

### 2. 機能意義不明な VUS の CADD スコアによる評価

*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 CADD スコア化で解析した。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(図2)。家系内に発端者と同一変異が同定された1家系見つか、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と判定された[2]。

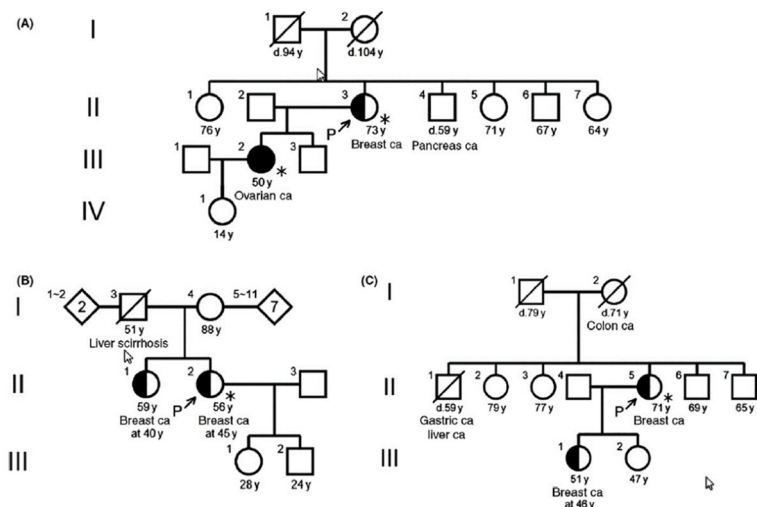


図2. 家系内における同一変異の検出

- (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。  
 文献[2]より引用。

## 考 察

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の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。本邦において、乳癌、卵巣癌の薬物治療としてPARP阻害剤が承認された。PARP阻害剤は、*BRCA1/2*遺伝子に病的変異が認められる場合、高い治療効果が期待される。本研究のように、VUSを含めて機能意義を評価することで、治療対象の拡大につながることを期待される。また、さらなるデータ蓄積により、日本人における遺伝性腫瘍のリスクを評価にも結び付けることができると考えられる。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、山梨県立中央病院乳癌外科の中込博副院長、井上正行部長、婦人科の坂本育子部長に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Hirotsu Y, Ooka Y, Sakamoto I, Nakagomi H, Omata M. Simultaneous detection of genetic and copy number alterations in *BRCA1/2* genes. *Oncotarget*. 2017 Dec 6;8(70):114463-114473. PMID: 29383094 DOI: 10.18632/oncotarget.22962.
- 2) Nakagomi H, Mochizuki H, Inoue M, Hirotsu Y, Amemiya K, Sakamoto I, Nakagomi S, Kubota T, Omata M. Combined annotation-dependent depletion score for *BRCA1/2* variants in patients with breast and/or ovarian cancer. *Cancer Sci*. 2018 Feb;109(2):453-461. PMID: 29215753 DOI: 10.1111/cas.13464. Epub 2018 Jan 17.