| 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 |
|---|---|

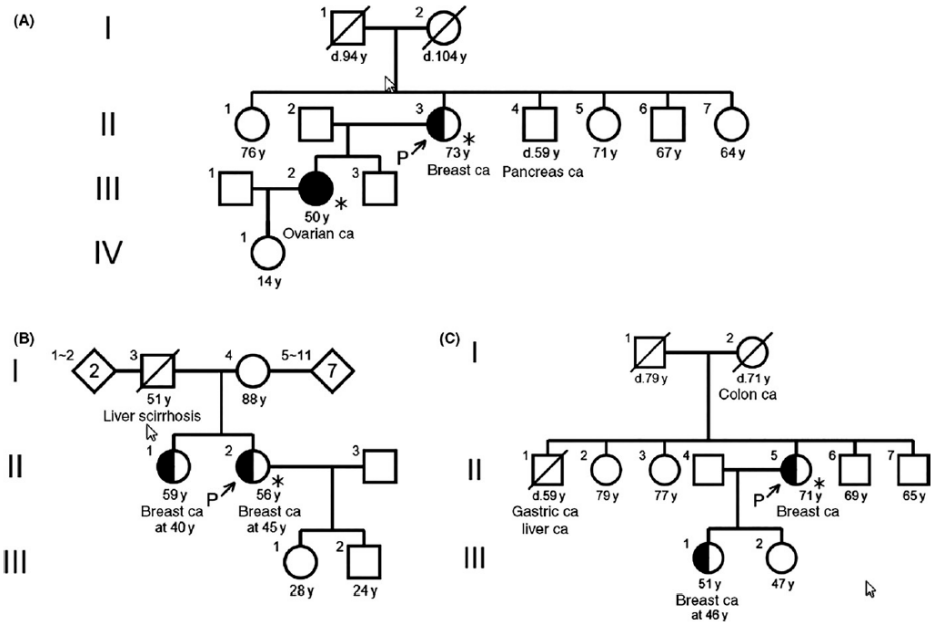
**【目的】**癌発症に関わる遺伝子群の生殖細胞系列変異を次世代シークエンス解析により明らかにし、そのゲノム情報を遺伝性腫瘍の診断・治療につなげる。特に、機能的意義が不明な日本人特有のバリアント（Variants of Uncertain Significance、以下VUS）の意義づけを行う。また、遺伝的素因、家族歴、他の癌発症リスクとの関わりを分析し、ゲノム情報と臨床情報のデータベース構築を行い、より緻密な診断を行う体制を構築する。

**【方法】**遺伝子カウンセリングを受け、ゲノム解析に対し同意を得た乳癌、卵巣癌患者および遺伝性腫瘍が疑われる患者の末梢血液を採取した。また、比較対象の解析をするため、当センターで保管する血液バイオバンクサンプルの中から、90歳以上で癌を発症していない健常人の血液も解析した。血液からDNA抽出し、生殖細胞系列変異を決定するため、遺伝子パネルを用いて次世代シークエンス解析した。遺伝子パネルとしては、*BRCA1/2* の変異とコピー数を同時に検出するパネルの検証を行った。

シークエンスで得られたゲノム情報を、標準ゲノム配列（hg19）と比較し、生殖細胞変異の有無を決定した。病的変異については、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同定した。90 歳以上の癌未発症者で同定された変異は、病的な可能性が低いと判断した。さらに、稀なバリアント（主にミスセンス変異）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インフォマティックス解析（CADD）、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。家族歴の有無、病歴、治療歴は電子カルテ情報から抽出した。

**【結果】**次世代シークエンス解析から、*BRCA1/2* 遺伝子の生殖細胞系列の変異とコピー数欠失を同時に測定する解析系を構築した（Hirotsu et al. *Oncotarget* 2017）。また、ミスセンス変異など日本人集団に頻度の低い機能意義不明な多型について、バイオインフォマティックス解析を実施し、CADD スコアによる病原性の評価を行った（Nakagomi and Hirotsu *et al. Cancer Science* 2018）。得られた結果の変異情報、家族歴、病歴等のデータ蓄積を行い、データベース構築を行った。

BRCA1/2 遺伝子変異陽性者発端者と親族の保有に関する家族歴



# 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アント（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クエ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アントを同定し、家族歴や病歴などの臨床情報やバイオインフォマティックスによる手法で機能意義不明なバリアントの評価を行い、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 μL 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. 次世代シークエンス解析

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、次世代シークエ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。次世代シークエンサー 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

次世代シークエ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。次世代シークエンス解析により、*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］。

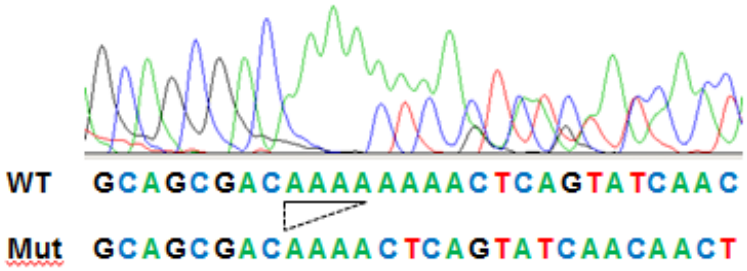



図 1. 不一致が見られた検体のサンガーシークエンスによる検証
アデニンが 8 塩基連続する部分の変異を次世代シークエンス解析で検出できていることを再検証した。
文献［1］より引用。

### 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アントがあり、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、想定しうる 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家系見つかり、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]。

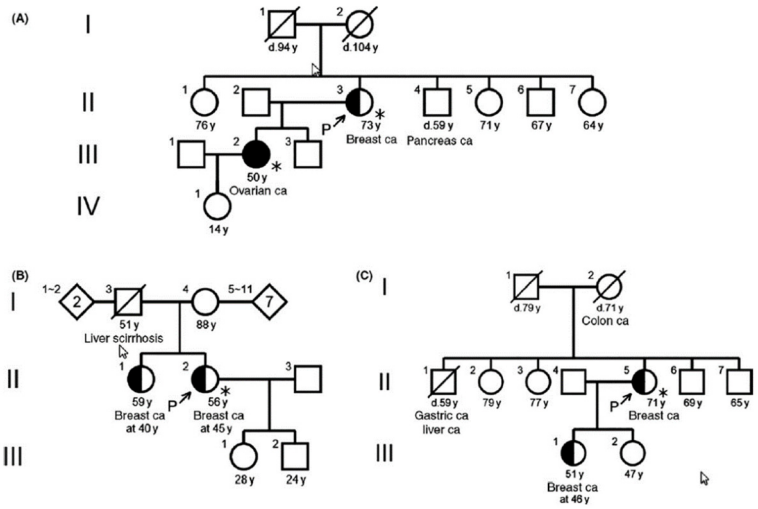



図2. 家系内における同一変異の検出

(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が期待される。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腺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.