## 90　腎細胞がん患者における生殖細胞系変異の大規模探索

中川　英刀

**【目的】**腎細胞がんでの遺伝性腫瘍は数%程度とされており、von-Hippel-Lindau（VHL）病や Bitt-Hogg-Dube 症候群などがあり、生殖細胞系遺伝子変異が発症や病勢進行に寄与すること、さらには治療方針も決定することが報告されている。しかし、本邦において腎細胞がんに対する生殖細胞系変異の探索はほとんど行われていない。本研究は、大規模な日本人腎がん症例および非がん症例における遺伝性腫瘍関連遺伝子の rare variants の探索を行い、個々の遺伝子 variants について臨床的意義の解釈を試みて、日本人集団での遺伝性腎がんの頻度を明らかにするものである。

**【方法】**バイオバンクジャパン（BBJ）、秋田大学、京都大学より腎がんと診断された症例群 1,665 例と非がん対照群（60 歳以上で、がん既往歴なし、がん家族歴なし）23,780 例の DNA を解析に用いて、遺伝性乳がん卵巣がん症候群やリンチ症候群などの原因遺伝子を含む 27 遺伝子（*BRCA1/2* など）の翻訳領域のターゲットシークエンスを行った（セット 1）。また、遺伝性腎がんと関連が報告がされている 19 遺伝子（*VHL*、*BAP1*、*FH*、*FLCN*、*TSC1*、*TSC2*、*SDHA/B/C/D* など）パネルを新たに追加し（セット 2）、腎がんと診断された症例群 1,665 例と非がん対照群 5,993 例の DNA のターゲットシークエンスを行った。これらの遺伝子の翻訳領域は合計 137 kb になり、multiple PCR にてこれらのゲノム領域を増幅し、それらのシークエンス解析を行った。様々なシークエンスのフィルターをかけた後に、これら遺伝性腫瘍関連の 46 遺伝子の翻訳領域の variants を抽出し、得られたバリアントのうち、Loss of Function バリアントまたは ClinVar に登録された病的バリアントを、病的バリアントと考え、腎がん群と非がん群間でのアレル頻度での関連解析を実施した。

**【結果】**大規模パネルシークエンス解析の結果、セット 1 については、201 個の病的 variants を同定した。セット 2 は、38 個の variants を同定した。セット 1 の遺伝性腫瘍関連遺伝子について、腎がん症例（1,617 例）と非がん例（2,3716 例）での病的 variants の保有者数の比較を行うと、*BRCA1* 遺伝子の病的 variants のみが、有意に腎がん症例で多かった（$P=7.28\times10^{-3}$、Odds 比 4.90）。一方、セット 2 の腎がん関連遺伝子については、腎がん症例（1,660 例）と非がん例（5,993 例）での病的 variants の保有者数の比較を行うと、*BAP1* 遺伝子（$P=2.24\times10^{-5}$）、*FH* 遺伝子（$P=4.78\times10^{-4}$）、*FLCN* 遺伝子（$P=0.034$）、*TSC1* 遺伝子（$P=0.047$）の病的 variants が、有意に腎がん症例で多い、または多い傾向にあった（表）。

遺伝性腎がん関連遺伝子の病的 variants の保因者の割合

| 遺伝子名 | 合計の病的バリアント | 症例群(n=1,660) 病的バリアント保有者(人) | 症例群(n=1,660) 病的バリアント保有者の割合(%) | 対照群(n=5,993) 病的バリアント保有者(人) | 対照群(n=5,993) 病的バリアント保有者の割合(%) | *P*- value | Odds比　(95% CI) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *BAP1* | 5 | 7 | 0.422 | 0 | 0 | 2.24E-05 | Inf (5.217-Inf) |
| *FH* | 4 | 5 | 0.301 | 0 | 0 | 4.78E-04 | Inf (3.314-Inf) |
| *FLCN* | 3 | 3 | 0.181 | 1 | 0.017 | 0.034 | 10.842 (0.87-567.7) |
| *TSC1* | 1 | 2 | 0.12 | 0 | 0 | 0.047 | Inf (0.678-Inf) |
| *SDHA* | 10 | 5 | 0.301 | 8 | 0.133 | 0.172 | 2.26 (0.581-7.847) |
| *TSC2* | 1 | 1 | 0.06 | 0 | 0 | 0.217 | Inf (0.093-Inf) |
| *VHL* | 3 | 4 | 0.241 | 7 | 0.117 | 0.268 | 2.065 (0.443-8.135) |

# 90. 腎細胞がん患者における生殖細胞系変異の大規模探索

中川　英刀

理化学研究所 生命医科学研究センター がんゲノム研究チーム

Key words：遺伝性腎がん，生殖細胞系変異，パネルシークエンス

## 緒　言

腎細胞がんでの遺伝性腫瘍は数%程度とされており、von-Hippel-Lindau（VHL）病や遺伝性平滑筋腫症ならびに腎細胞がん症候群、Bitt-Hogg-Dube 症候群などがあり、生殖細胞系遺伝子変異が発症や病勢進行に寄与することが報告されている。欧米での 250 例以上の進行腎細胞がん患者の生殖細胞系列 DNA を、遺伝子パネルを用いて解析したところ、非淡明細胞型腎細胞がんでは 20%ほどに何らかの生殖細胞系列遺伝子に病的バリアントを伴っていたと報告されている［1］。また若年発症の腎細胞がんでは遺伝性腎細胞がんの可能性を考え生殖細胞系列遺伝子変異検査や遺伝カウンセリングを考慮するべきとも報告がある［2］。米国の NCCN ガイドラインでは、生殖細胞系 *FH* 遺伝子変異によって生じる遺伝性平滑筋腫症および腎細胞がん症候群に代表される特定の腎細胞がんにおいては Bevacizumab＋Erlotinib／Everolimus による治療が推奨となっており、乳がんや大腸がんと同様に、生殖細胞系変異による治療選択が腎細胞がんにおいても一般的となりつつある。患者本人に対しては病的バリアントに応じた治療選択や予後予測につながり、血縁者においては病的バリアント保有者に対しては密な観察による早期発見につながる可能性もあり、今後、腎がん患者の臨床ゲノム解析をすすめ、解釈のためそのバリアント情報を蓄積していく必要がある。しかしながら、本邦において腎細胞がんに対する生殖細胞系変異の探索はほとんど行われていない。遺伝性腎細胞がんにレジストリ制度はなく、腎細胞がんに関する全国的な情報収集体制は確立されていないのが現状である。また実際に遺伝子解析を行う場合、全ゲノムシークエンスやターゲットシークエンスを行う場合もコストは高額で、実験技術や解析方法の構築など広く普及するには課題が多く特定の施設でのみ実施できている状況である。

本研究では、理研において開発された 27 個の遺伝子からなる遺伝性腫瘍パネルに加えて［3］、遺伝性腎がんとの関連が報告されている 19 遺伝子について、数千の腎がん症例および非がん例の DNA を用いて、大規模なターゲットリシークエンスを行って、これら遺伝性腫瘍関連遺伝子の rare variants の探索を行った。そして個々の遺伝子 variants について、臨床的意義の解釈を試みた。

## 方　法

バイオバンクジャパン（BBJ）、秋田大学、京都大学より腎がんと診断された症例群 1,665 例と非がん対照群（60 歳以上で、がん既往歴なし、がん家族歴なし）23,780 例の DNA を解析に用いて、遺伝性乳がん卵巣がん症候群やリンチ症候群などの原因遺伝子を含む 27 遺伝子（*BRCA1/2*、MMR 遺伝子など）の翻訳領域のターゲットリシークエンスを行った（セット１）。また、遺伝性腎がんと関連が報告がされている 19 遺伝子（*VHL*、*BAP1*、*FH*、*FLCN*、*TSC1*、*TSC2*、*SDHA/B/C/D* など）パネルを新たに追加し（セット 2）、腎がんと診断された症例群 1,665 例と非がん対照群 5,993 例の DNA のターゲットリシークエンスを行った。これらの遺伝子の翻訳領域は合計 137 kb になり、multiple PCR にてこれらのゲノム領域を増幅し、それらの PCR 産物のプールについてシークエンス解析を行った［3］。様々なシークエンスのフィルターをかけた後に、これら遺伝性腫瘍関連の 46 遺伝子の翻訳領域の variants を抽出し、得られたバリアントのうち、Loss of Function バリアントまたは ClinVar に登録された病的バリアントを病的バリアントと考え、腎がん群と非がん群間でのアレル頻度での関連解析を実施した。

## 結果および考察

大規模パネルシークエンス解析の結果、セット 1 については、201 個の病的 variants を同定した。セット 2 は、38 個の病的 variants を同定した。セット 1 の遺伝性腫瘍関連遺伝子について、腎がん症例（1,617 例）と非がん例（23,716 例）での病的 variants の保有者数の比較を行うと、*BRCA1* 遺伝子の病的 variants のみが、有意に腎がん症例で多かった（$P=7.28\times10^{-3}$、Odds 比 4.90）。一方、セット 2 の腎がん関連遺伝子については、腎がん症例（1,660 例）と非がん例（5,993 例）での病的 variants の保有者数の比較を行うと、*BAP1* 遺伝子（$P=2.24\times10^{-5}$）、*FH* 遺伝子（$P=4.78\times10^{-4}$）、*FLCN* 遺伝子（$P=0.034$）、*TSC1* 遺伝子（$P=0.047$）の病的 variants が、有意に腎がん症例で多い、または多い傾向にあった（表 1）。

*BRCA1* 遺伝子は、遺伝性乳がん卵巣がん（HBOC）の原因遺伝子であるが、ゲノム損傷を修復するためのマスター分子である。HBOC 以外に、前立腺がん膵がんなど他の様々ながん腫の発生にも深く関与していることが分かってきているが、腎がん発生との関連は報告されていない。また、*BRCA1* 遺伝子の生殖細胞変異が原因で発生した腫瘍はゲノム不安定の 1 つ HRD （homologous recombination deficient） を示しており、PARP1 阻害剤や CDDP といった治療の効果が期待できるとされており、*BRCA1* 遺伝子の生殖細胞変異のある腎がんについても、これらの治療の効果があるかもしれない。

*BAP1* 遺伝子は、BAP1 Tumor Predisposition Syndrome：BAP1-TPDS）の原因遺伝子であり、皮膚腫瘍（非典型スピッツ母斑、皮膚黒色腫、基底細胞がん）、眼腫瘍（ぶどう膜黒色腫）、腎がん（腎明細胞がん）、悪性中皮腫の発生が報告されているが、詳細は不明なところが多い。BAP1 は、BRCA 蛋白と関連し、その機能はゲノム修復と関連すると報告されている。

*FH* 遺伝子は、遺伝性平滑筋腫症・腎細胞がん症候群（HLRCC）の原因遺伝子であり、フマル酸ヒドラターゼ酵素をコードしている。HLRCC は、皮膚平滑筋腫、子宮平滑筋腫（筋腫）、および腎がんに特徴づけられ、HLRCC の患者のうち約 10～16%に、主に乳頭状腎細胞がんが発症する。

*FLCN*遺伝子は、Birt-Hogg-Dubé 症候群（BHD）の原因遺伝子であり、BHD は皮膚症状（線維毛包腫、毛盤腫/血管線維腫、毛包周囲線維腫、アクロコルドン）、肺嚢胞/気胸歴、腎がんが含まれる。BHD 患者は腎腫瘍発症のリスクが健常人の 7 倍となっており、典型的には両側性かつ多発性に嫌色素性腎細胞がん（chromophobe）やオンコサイトーマと嫌色素性がんのハイブリッド腫瘍（いわゆる hybrid oncocytic chromophobe tumor：HOCT）が発生する。

*TSC1* 遺伝子は、結節性硬化症の原因遺伝子の 1 つであり、全身性に過誤腫病変や様々な症状が認められる、古くは、精神遅滞、てんかん発作、顔面の血管線維腫が結節性硬化症の三主徴とされる。結節性硬化症患者の 60～80%に何らかの腎病変が認められ、腎血管筋脂肪腫（renal angiomyolipoma）、腎嚢胞（renal cyst）、腎細胞がんが発生する。腎細胞がんの多くは、腎血管筋脂肪腫と併発するといわれている。

*SDHA* 遺伝子は、家族性パラガングリオーマまたは褐色細胞腫の原因であり、副腎腫瘍や腎腫瘍を併発する。腎細胞がんとの関連は、詳細には報告されていない。

*VHL* 遺伝子は、Von Hippel-Lindau 病の原因遺伝子であり、脳や網膜の血管腫、腎細胞がんといった血管が豊富な腫瘍の発生が特徴づけられる。*VHL* 遺伝子は、腎淡明細胞がんにおいて最も重要ながん抑制遺伝子である。今回の研究にて、腎がん患者と非がん症例の *VHL* 変異頻度に有意な差が見られなかったが、非がん症例に 7 例（0.117%）の頻度で VHL 遺伝子の病的 variants が観察されており、我々が考えている以上に VHL 病の浸透率は高くないのかもしれない。

遺伝性腎がん関連も含む、46 遺伝子の遺伝性腫瘍関連の病的 variants の日本人集団での保有頻度は、約 3%（665／1660 人）であった。一方で、遺伝性腎がん特有の遺伝子の病的 variants の非がん症例の割合は、前述の *VHL* 遺伝子の病的 variants を含みて約 0.5%であり、腎がん症例では 1.747%（29／1660 人）で有意に頻度が高かった（$P=3.22\times10^{-6}$、Odd 比 3.53）。これまで腎がん特有と考えられた遺伝子以外に *BRCA1* 遺伝子が、腎がんの発生と関連している可能性が示唆された。腎がんの薬物療法の選択は現在沢山あるが、*BRCA1/2* 変異を保有する腎がん（約 0.6%）については、HRD での合成致死を誘導する PARP1 阻害剤の効果が期待できるかもしれない。

本研究にて、日本人集団における遺伝性腎がんの頻度が明らかになり、この結果は、今後の日本人でのゲノム医療へ貢献するものである。

表 1. 遺伝性腎がん関連遺伝子の病的 variants の保因者の割合

| 遺伝子名 | 合計の病的バリアント | 症例群(n=1,660) | | 対照群(n=5,993) | | *P*- value | Odds比 (95% CI) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 病的バリアント保有者(人) | 病的バリアント保有者の割合(%) | 病的バリアント保有者(人) | 病的バリアント保有者の割合(%) | | |
| *BAP1* | 5 | 7 | 0.422 | 0 | 0 | 2.24E-05 | Inf (5.217-Inf) |
| *FH* | 4 | 5 | 0.301 | 0 | 0 | 4.78E-04 | Inf (3.314-Inf) |
| *FLCN* | 3 | 3 | 0.181 | 1 | 0.017 | 0.034 | 10.842 (0.87-567.7) |
| *TSC1* | 1 | 2 | 0.12 | 0 | 0 | 0.047 | Inf (0.678-Inf) |
| *SDHA* | 10 | 5 | 0.301 | 8 | 0.133 | 0.172 | 2.26 (0.581-7.847) |
| *TSC2* | 1 | 1 | 0.06 | 0 | 0 | 0.217 | Inf (0.093-Inf) |
| *VHL* | 3 | 4 | 0.241 | 7 | 0.117 | 0.268 | 2.065 (0.443-8.135) |

腎がん症例 1,600 例、非がん症例 5,993 例。統計的には、*BAP1* と *FH* の病的 variants の頻度が有意に腎がん症例で高い（Fisher's exact test、$P<0.001$）。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所生命医科学研究センター基盤技術開発研究チームの桃沢幸秀、岩崎雄介、秋田大学大学院医学系研究科腎泌尿器科学講座の関根悠哉、沼倉一幸、羽渕友則、京都大学大学院医学研究科泌尿器科学の赤松秀輔、小川修、BBJ の松田浩一である。

## 文　献

1) Carlo MI, Mukherjee S, Mandelker D, Vijai J, Kemel Y, Zhang L, Knezevic A, Patil S, Ceyhan-Birsoy O, Huang KC, Redzematovic A, Coskey DT, Stewart C, Pradhan N, Arnold AG, Hakimi AA, Chen YB, Coleman JA, Hyman DM, Ladanyi M, Cadoo KA, Walsh MF, Stadler ZK, Lee CH, Feldman DR, Voss MH, Robson M, Motzer RJ, Offit K. Prevalence of germline mutations in cancer susceptabilty genes in patients with advanced renal cell carcinoma. JAMA Oncol. 2018 Sep 1;4(9):1228-1235. doi:10.1001/jamaoncol.2018.1986. PMID: 29978187

2) Shuch B, Vourganti S, Ricketts CJ, Middleton L, Peterson J, Merino MJ, Metwalli AR, Srinivasan R, Linehan WM. Defining early-onset kidney cancer: implications for germline and somatic mutation testing and clinical management. J Clin Oncol. 2014 Feb 10;32(5):431-7. doi: 10.1200/JCO.2013.50.8192. Epub 2013 Dec 30.PMID: 24378414

3) Momozawa Y, Iwasaki Y, Hirata M, Liu X, Kamatani Y, Takahashi A, Sugano K, Yoshida T, Murakami Y, Matsuda K, Nakagawa H, Spurdle AB, Kubo M. Germline Pathogenic Variants in 7636 Japanese Patients With Prostate Cancer and 12 366 Controls. Natl Cancer Inst. 2020 Apr 1;112(4):369-376. doi:10.1093/jnci/djz124. PMID: 31214711