

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07193

研究課題名(和文) 一般集団におけるがん関連遺伝子群の機能未知多様体の発がんへの影響の検討

研究課題名(英文) Analyses of effects of variants with uncertain significance in the cancer related genes on the carcinogenesis in general population

研究代表者

安田 純 (Yasuda, Jun)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・部長

研究者番号：00281684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：家族性腫瘍関連遺伝子の中等度に病的なVUSについて東北大学の日本人全ゲノム参照パネルデータを元に、悪性腫瘍の既往歴・家族歴の蓄積を示すかを調査票情報に基づいて検討した。日本人標準ゲノムパネルである3.5KJPNv2に記載されている遺伝性乳がん卵巣がん症候群の原因遺伝子BRCA1/2について検討し、中等度に病的な変異の条件(CADD>25, Eigen>0.5, MAF<0.0005)を確立した。さらに、東北メディカル・メガバンク計画で収集された3.5万人の既往歴、家族歴情報と比較し、これら中等度の病的変異を持つコホート参加者の姉妹のがん罹患率が統計的に有意に高いことを示し欧文査読誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性腫瘍関連遺伝子の中等度に病的なVUSの腫瘍発症への寄与が統計的に検出可能であることを示したのは前向きゲノムコホートが研究上有用であることを示した。また、こうした腫瘍関連遺伝子の中等度の病的変異を持つ個人にとってがんの発症予防や早期の検診受診などで直接利益が生まれる可能性がある。今後こうした中等度の病的変異をリスク要因として組み込んだ精密医療の確立に大きく資する研究成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated moderately morbid VUS of familial tumor-associated genes based on Tohoku University's Japanese whole genome reference panel data to see whether they indicate an accumulation of history of malignancy and family history of malignancy based on the questionnaire information. We examined BRCA1/2, the causative gene of hereditary breast and ovarian cancer syndromes, which is included in the Japanese standard genome panel 3.5KJPNv2, and established the conditions for moderately pathological mutations (CADD>25, Eigen>0.5, MAF<0.0005). Furthermore, we compared the results with those of 35,000 participants' past and family history data collected by the Tohoku Medical Megabank Project and found that the incidence of cancer in sisters of the cohort with these moderately pathological mutations was statistically significantly higher than that of their counterparts, which was reported in a European peer-reviewed journal.

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：がん素因遺伝子 VUS 前向きゲノムコホート 家族性乳がん卵巣がん症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性腫瘍症候群のうち、成人になるまでこれといった症状がなく、成人後に特定の腫瘍が頻発するタイプのものとして遺伝性乳がん卵巣癌症候群 (HBOC) やリンチ症候群がある。これらの遺伝子の病的な多様体を検出することで疾病の予防や早期発見に資する可能性がある。しかしながら現時点では過去に類例のない遺伝的多様体は意義不明多様体 (VUS) としてまとめられてしまう。これらの中に中等度に腫瘍発症リスクを上昇させ得る多様体が混在することが予想されるが、中等度の腫瘍発症リスクを推定する技術は存在しなかった。

### 2. 研究の目的

東北メディカル・メガバンク計画で収集した日本人全ゲノム参照パネル中に存在する遺伝性がん関連遺伝子多様体が、発がん感受性に関与しうるか検討し、病的な多様体の同定とその浸透度、効果サイズを推定することで個別化医療の道筋を探る。既存の疾患関連の多様体データベース (ClinVar など) の場合、データは病気に罹患した家族の中で病原性多様体が同定されたという過去の報告に基づいているため、一般集団の中には報告されていない新たな病原性多様体が存在する可能性に対応できない。この問題を解決するために、我々は CADD などを用いたアノテーションアプローチで解決することとした。

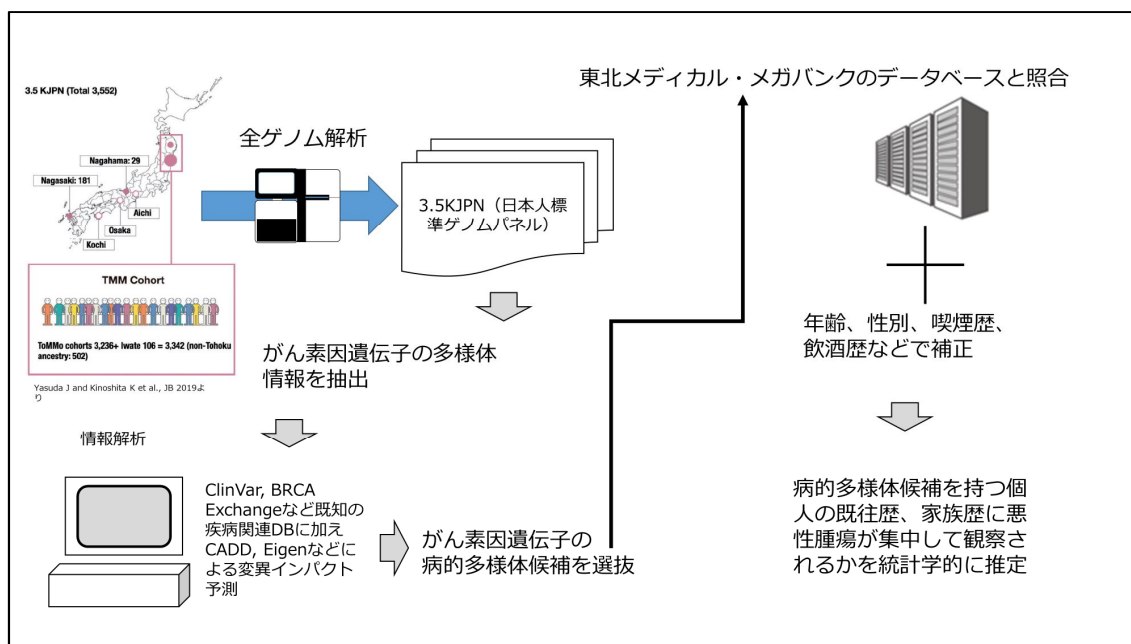


図1 目的の概要

### 3. 研究の方法

東北メディカル・メガバンク計画で構築した日本人全ゲノム参照パネルに登録されている約3500人分、約3700万箇所の一塩基多様体について、癌関連遺伝子とされる131遺伝子の領域に含まれるものを抽出する。さらに、これらの多様体について、AnnoVarなどの属性情報を付加するソフトウェアを活用し、各多様体の遺伝子機能への影響を推定する。この推定に用いるパラメータはCADDおよびeigen、exonic function (アミノ酸変化の内容の推定)を採用する予定である。さらに、各多様体をゲノム中にもつ参加者の年齢、性別、既往歴・家族歴(悪性新生物に限る)を集合として抽出し、悪性新生物との関連を統計的に観察する。

### 4. 研究成果

#### 3.5KJPNv2のBRCA多様体の概要

BRCA遺伝子には3.5KJPNの中に3,600個以上の多様体が見つかり、そのうち6.15%がコーディング領域に存在する。そのうち10個の多様体は、ClinVarデータベースを参照して、「病原性」(P)または「病原性の可能性が高い」(LP)とアノテーションされている。これらの累積頻度は0.0018であり、これは日本におけるHBOCキャリアの臨床的推定値よりも低い。

3.5KJPNv2のBRCA遺伝子多様体をより深く理解するために、130,000以上の多民族のヒトエクソームデータで構成されるgnomADデータベースと比較し、BRCA遺伝子の病原性多様体の総数は、gnomADよりも3.5KJPNv2の方がはるかに少ないことを確認した。さらに集団特異性を調べ

るために、gnomAD データベースで東アジアの集団( gnomAD-EAS )に見られる ClinVar と InterVar の P または LP の多様体を抽出した。興味深いことに、3.5KJPN と gnomAD-EAS の間では、ClinVar と InterVar の P または LP 多様体について、4 つしか重複しておらず、ある遺伝子の病原性多様体は各民族に非常に特異的であるという知見と一致した。

### 日本人集団における 2 つの BRCA 遺伝子の病原性多様体

InterVar は ACMG ガイドラインに従って、これまでに報告されていないヒトの遺伝子多様体の臨床的重要性を推定するように設計されている。InterVar によって、BRCA 遺伝子の P または LP として別の 13 個の多様体が同定された。一方で、理化学研究所が公開している日本人の全ゲノムシーケンズデータの大規模なデータセットが利用可能であるが、このデータセットは、2,234 個の全ゲノムのディープシーケンズデータ(平均深さ 25 倍)で構成されている。これらの詳細な構成は不明だが、乳がんを含む 6 つの疾患の患者 1,276 人が含まれており、今回の研究で観察された複数の多様体が理研のデータセット中で濃縮が確認されているが、様々な検討から良性と判断できる多様体は濃縮されていなかった。これらの結果は、InterVar によるアノテーションには、偽陽性と偽陰性が含まれている可能性を示唆している。一般集団からパネル構成員を偏りなく選択することによって得られるマイナーアレル頻度に関する正確なデータは、VUS の病原性を推定するために重要であり、InterVar によるアノテーションに基づく HBOC などの成人発症の遺伝性疾患の病原性の基準に含めるべきである。

### 3.5KJPNv2 BRCA 多様体の病原性に関する計算機上のスコアリングツールの推定値

InterVar は、過去の情報が得られない潜在的な病原性多様体の臨床的影響を過小評価する可能性がある。そこで我々は、多様体の病原性について CADD など、バイアスのない計算による推定が、過去の知識がなくても潜在的に病原性のある多様体を見つけるのに使えるかどうかを検証した。興味深いことに ClinVar P または LP 多様体は、CADD\_phred と Eigen\_raw スコアの平均値と最小値が InterVar P または LP 多様体よりも明らかに高く、この観察結果に基づいて、我々は CADD\_phred と Eigen\_raw を潜在的な病原性多様体のさらなるフィルタリングに使用することとした。さらに、マイナーアレル頻度も、生殖細胞多様体の臨床的影響を解釈するための重要なパラメータであり、CADD\_phred および Eigen\_raw は、逆対数のマイナーアレル頻度と弱い正の相関を示した(ピアソン相関係数 = 0.172 および 0.161)。InterVar P または LP 多様体の CADD\_phred および Eigen\_raw スコアは、BRCA1 L52F 多様体を除いて、ClinVar P または LP 多様体のものと類似していた(表 2)。これらの比較に基づいて、病原性を持つ可能性のある BRCA 一塩基多様体の計算上の閾値を CADD\_phred 25.9、Eigen\_raw 0.501、MAF 0.0003 と決定した(図 2A, B)。

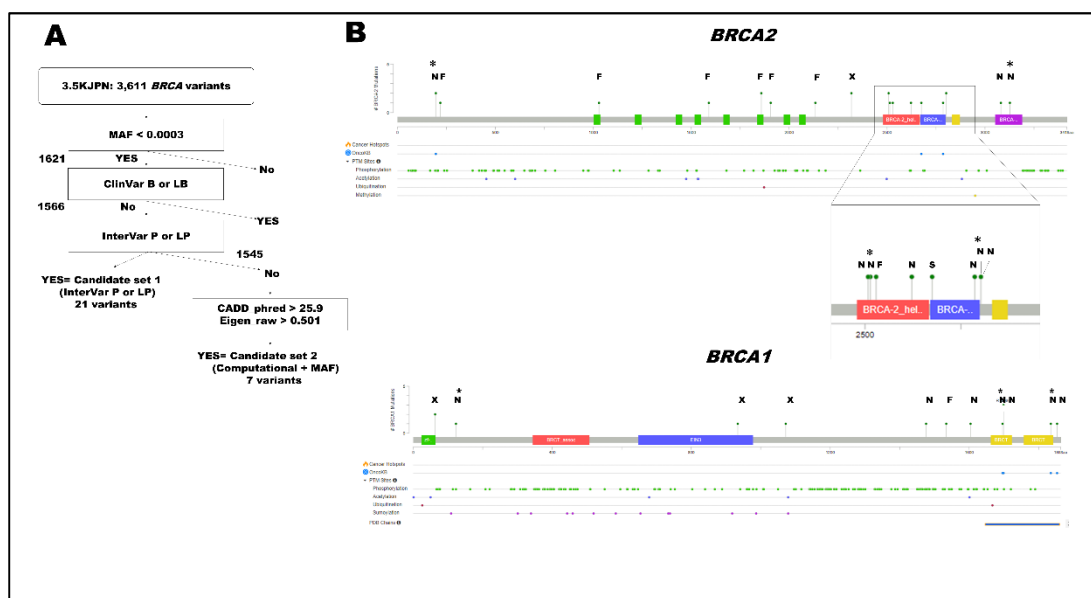


図 2 採用したフィルタリングプロトコールと検出された候補病的多様体

病原性 BRCA 多様体保有者はがんになりやすい家族歴を持つ傾向がある

東北メディカル・メガバンク機構が実施した地域住民コホートの参加者は、がんを含む様々な疾

患の個人歴および家族歴を紙ベースのアンケートで報告している。*BRCA* 病原性多様体保有者とその家族は、他のコホートメンバーとその家族に比べて、がん罹患する頻度が高い可能性がある。図2は、参加者本人、その家族、配偶者のがん罹患数を示したものである。非キャリアの参加者数は、InterVar P や LP、計算機 + MAF で選択された *BRCA* 多様体キャリアの参加者数の1,500倍以上であったが、がん発症の全体的なプロファイルは類似していた。例えば、*BRCA* 多様体の有無にかかわらず、参加者の父親は母親よりもがんの罹患率が高かった。病原性を持つ可能性のある *BRCA* 多様体を確実に保持している人とそれ以外のコホートとの間の顕著な違いは、担がん姉妹の割合であった。InterVar P または LP の保持者は、他のコホートよりも担がん姉妹の割合が非常に高いことが示された（図3および図3の挿入図； $p = 3.08 \times 10^{-5}$ 、カイ二乗検定、Yatesの補正あり）。さらに、InterVar の P または LP のキャリアは、他のキャリアよりも担癌の子孫の割合が高かったが、これは統計的に有意ではなかった（ $p = 0.041$ ）。興味深いことに、参加者自身のがん発症率は、InterVar P または LP のキャリアとその他のコホートメンバーとの間に顕著な差は見られなかった。これは、InterVar P または LP キャリアの半数近くが男性であるため、*BRCA* 関連の乳がん罹患する可能性が低いことから、妥当な結果であると考えられる（図3挿入図）。

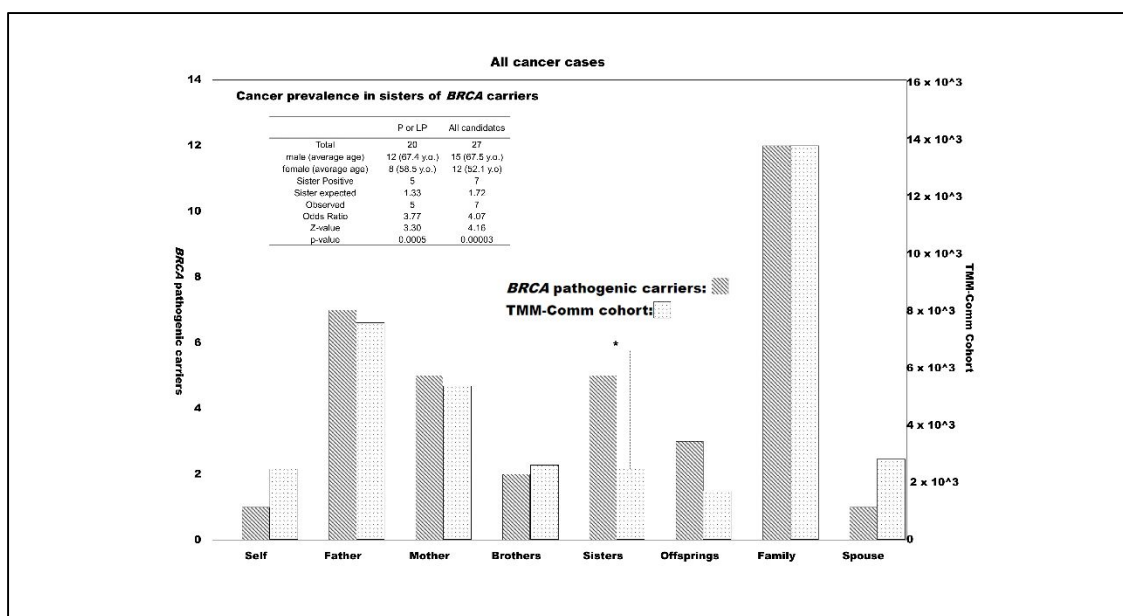


図3 家庭内癌蓄積について、一般集団と *BRCA* 病的候補多様体キャリアとの比較

### 結論

本研究では、日本人の大規模な全ゲノムシーケンスデータセット（3.5KJPNv2）には、HBOCの代表的な原因遺伝子である *BRCA1* および *BRCA2* に、確実に病原性のある多様体および病原性の可能性のある多様体が含まれていることが示された。ClinVar と ACMG ガイドラインに依拠したアノテーションツール InterVar は、3.5KJPNv2 に含まれる明らかに良性の多様体1つを含む、20以上の多様体を病原性または病原性の可能性があるとして検出した。さらに、計算機上のスコアリングと MAF の組み合わせにより、ClinVar で定義された良性と思われる多様体1つを含む、さらに8つの候補が検出された。また、いくつかの多様体は、他のデータベースと病原性の注釈が一致していました。病因となりうる *BRCA* 多様体の保因者の自己申告による個人歴および家族歴を分析したところ、保因者の姉妹について、がんの罹患率が一般集団に比べ上昇していることが明らかとなった。本研究は、プロスペクティブなゲノムコホート研究が、病原性多様体を特定するための強力なツールであることを示した。本研究は、このような中等度の疾患に寄与する多様体を集団で特定するのに有用であり、個人のゲノム情報に基づいた個別化医療の発展に貢献するものと思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kiniwa Yukiko, Yasuda Jun, Saito Sakae, Saito Rumiko, Motoike Ikuko N., Danjoh Inaho, Kinoshita Kengo, Fuse Nobuo, Yamamoto Masayuki, Okuyama Ryuhei	4. 巻 94
2. 論文標題 Identification of genetic alterations in extramammary Paget disease using whole exome analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 229 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.03.006	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 Mori Minako, (中略) Yasuda Jun (28人中8番目), (中略), Takata Minoru	4. 巻 104
2. 論文標題 Pathogenic mutations identified by a multimodality approach in 117 Japanese Fanconi anemia patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1962 ~ 1973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.207241	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 Abe Jiro, Tanuma Nobuhiro, Nomura Miyuki, Ito Shin, Kasugai Isao, Sato Ikuro, Tamai Keiichi, Mochizuki Mai, Yamaguchi Kazunori, Shima Hiroshi, Okada Yoshinori, Yasuda Jun	4. 巻 522
2. 論文標題 Novel activating KRAS mutation candidates in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 690 ~ 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagasaki Masao, (中略), Yasuda Jun (24人中23番目), Yamamoto Masayuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Construction of JRG (Japanese reference genome) with single-molecule real-time sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-019-0057-7	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 Kiniwa Yukiko, Yasuda Jun, Saito Sakae, Saito Rumiko, Motoike Ikuko N., Danjoh Inaho, Kinoshita Kengo, Fuse Nobuo, Yamamoto Masayuki, Okuyama Ryuhei	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Identification of genetic alterations in extramammary Paget disease using whole exome analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.03.006	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 Mori Minako, Hira Asuka, Yoshida Kenichi, Muramatsu Hideki, Okuno Yusuke, Shiraiishi Yuichi, Anmae Michiko, Yasuda Jun, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Pathogenic mutations identified by a multimodality approach in 117 Japanese Fanconi anemia patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.207241	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 Yasuda Jun, Kinoshita Kengo, et al.,	4. 巻 165
2. 論文標題 Genome analyses for the Tohoku Medical Megabank Project towards establishment of personalized healthcare	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 139 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda Jun, et al.,	4. 巻 19
2. 論文標題 Regional genetic differences among Japanese populations and performance of genotype imputation using whole-genome reference panel of the Tohoku Medical Megabank Project	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-018-4942-0	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 Mimori Takahiro, Yasuda Jun, et al.,	4. 巻 -
2. 論文標題 Construction of full-length Japanese reference panel of class I HLA genes with single-molecule, real-time sequencing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Pharmacogenomics Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41397-017-0010-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mimori Takahiro, Yasuda Jun, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Construction of full-length Japanese reference panel of class I HLA genes with single-molecule, real-time sequencing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacogenomics J.	6. 最初と最後の頁 0010-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41397-017-0010-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi-Kabata Yumi, ToMMo Study Group, Yasuda Jun et al.	4. 巻 63
2. 論文標題 Evaluation of reported pathogenic variants and their frequencies in a Japanese population based on a whole-genome reference panel of 2049 individuals	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 213 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-017-0347-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibuya Yusuke, Tokunaga Hideki, Saito Sakae, Shimokawa Kazurou, Katsuoka Fumiki, Bin Li, Kojima Kaname, Nagasaki Masao, Yamamoto Masayuki, Yaegashi Nobuo, Yasuda Jun	4. 巻 57
2. 論文標題 Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinoma with next generation sequencing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes Chromosomes Cancer.	6. 最初と最後の頁 51 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22507	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hachiya Tsuyoshi, Furukawa Ryohei, Shiwa Yuh, Ohmomo Hideki, Ono Kanako, Katsuoka Fumiki, Nagasaki Masao, Yasuda Jun, Fuse Nobuo, Kinoshita Kengo, Yamamoto Masayuki, Tanno Kozo, Satoh Mamoru, Endo Ryuji, Sasaki Makoto, Sakata Kiyomi, Kobayashi Seiichiro, Ogasawara Kuniaki, Hitomi Jiro, Sobue Kenji, Shimizu Atsushi	4. 巻 2
2. 論文標題 Genome-wide identification of inter-individually variable DNA methylation sites improves the efficacy of epigenetic association studies	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NPJ Genom Med.	6. 最初と最後の頁 0016-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41525-017-0016-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Jun Yasuda
2. 発表標題 Variants of uncertain significance of the cancer predisposing genes in 3.5 thousand Japanese whole genome sequencing data
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Shibuya, (five others), Jun Yasuda
2. 発表標題 Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinomas with next generation sequencing
3. 学会等名 SRI 64th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yusuke Shibuya, (five others), Jun Yasuda
2. 発表標題 Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinomas with next generation sequencing
3. 学会等名 日本産婦人科学会
4. 発表年 2017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
研究 分担 者	齋藤 さかえ  (Sakae Saito)  (20335491)	東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師   (11301)	

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
---------	---------