

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23183

研究課題名(和文)血液中遺伝子変異情報に基づく相同組み換え欠損の新規モデル開発

研究課題名(英文) Gene panel based prediction of homologous recombination deficiency in breast cancers

研究代表者

渡辺 智子 (Watanabe, Tomoko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・遺伝カウンセラー

研究者番号：10773187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳がん症例において相同組換え欠損(HRD)をより簡便に予測するため、HRD推定に用いる遺伝子変異・病理学的特徴の4因子のうち、既取得の腫瘍組織の体細胞TP53遺伝子変異情報をCell-free DNA(cfDNA)解析で取得することを試みた。結果として、腫瘍組織とcfDNAの遺伝子解析のTP53変異検出の一致率は、cfDNA解析の検出限界以下の2症例も含めて60%(3/5例)にとどまった。本研究の結果からは乳がんのHRD予測にcfDNA解析を用いることは現時点では難しく、cfDNA解析のTP53変異検出率に影響する因子について再検討し、今後の方策を検討し直す必要があると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんの体細胞TP53遺伝子変異を血液中Cell-free DNA(cfDNA)で測定できれば、体細胞レベルの相同組換え欠損予測に用いる遺伝子変異情報は全て血液中のゲノムDNAもしくはcfDNAにて測定可能と考える。本研究では乳がんの腫瘍組織解析とcfDNA解析のTP53変異の一致率は60%にとどまったが、乳がん症例において血漿中の腫瘍由来遺伝子変異を検出する際の1つの参考情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination deficiency (HRD) score, indicating HRD status, is not routinely assessed in the breast oncology clinic, particularly in patients without germline BRCA1/2 mutations. The prediction model of HRD in our previous study comprises BRCA1/2 mutation, somatic TP53 mutation, triple negative subtype, and higher tumor grade. When we confirm the concordance of TP53 mutation between cell-free tumor DNA and tissue DNA, we are able to detect HRD-high (HRD score ≥ 42) tumors based on genetic information from peripheral bloods. As a result of this study, the concordance rate of TP53 mutation between cell-free tumor DNA and tissue DNA was up to 60% (3/5 cases), of which 2 cases were below the limit of detection. Based on this result, it might be difficult to predict HRD using cell-free DNA in breast cancer under current conditions, and future strategies should be re-examined.

研究分野：がんゲノム

キーワード：相同組換え欠損 乳がん 遺伝医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

約 95%が胚細胞系列の BRCA1/2 遺伝子変異陰性の乳がん患者をゲノム医療につなげるため、体細胞レベルの相同組換え欠損 (Homologous recombination deficiency: HRD) が着目される。しかし、HRD スコア測定には腫瘍組織の網羅的な遺伝子解析が必要となり、より簡便な測定方法が求められる。申請者らは、乳がんでは全エクソーム解析データから算出した HRD-high (HRD スコア 42) をわずか 4 因子 (BRCA1/2 遺伝子変異、体細胞 TP53 遺伝子変異、サブタイプ: TNBC、グレード: Grade3) の遺伝子変異・病理学的特徴の組み合わせで推定できることを示してきた。体細胞 TP53 遺伝子変異を血液中 Cell-free DNA (cfDNA) で測定できれば、遺伝子変異情報 () は全て血液中のゲノム DNA もしくは cfDNA にて測定可能と考え、本研究の立案・実施に至った。さらに、遺伝医療を受ける患者・家族の心理社会的影響の多様性への対応も課題の 1 つであり、遺伝医療の心理社会的影響の把握を試みることで遺伝医療の支援体制構築の一助とすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究は、血液中遺伝子変異情報に基づく相同組換え欠損の新規モデル開発を目指す。セルフリー DNA 解析を用いた新規 HRD 予測モデルの検査性能を明らかにすること、遺伝医療における心理社会的影響の把握に向けた質問紙の選定を目的とする。

3. 研究の方法

新規 HRD 予測モデルの開発に向けて、(1)生殖細胞系列 BRCA1/2 遺伝子に関する日本人病的バリエーションのレファレンスデータを作成、(2)機械学習により HRD 予測因子の最終決定、(3)既存セルフリー DNA 解析パネルを比較・検討、(4)セルフリー DNA 解析パネルで血漿中の腫瘍由来遺伝子変異情報を取得し、既取得の腫瘍組織の遺伝子変異と血漿中の腫瘍由来遺伝子変異の一致率を検証した。加えて、(5)遺伝医療における心理社会的影響の質問紙調査に向けて先行研究調査と質問紙の選定を行った。

4. 研究成果

(1)日本人病的バリエーションのレファレンスデータの作成

乳がん症例において、国内外の既報と当部門の該当症例の生殖細胞系列 BRCA1/2 遺伝子変異頻度を比較した。続いて、これらの変異情報をプロットし、遺伝情報の特徴を明らかにしていく。

(2)機械学習による HRD 予測因子の最終決定

予測モデルの精度向上を目的として、既取得の乳がんの公開大規模遺伝子データ (The Cancer Genome Atlas (TCGA), the International Cancer Genome Consortium (ICGC)) を用いた機械学習 ElasticNet による HRD 予測モデル因子の再検証を行った。予測モデルの追加候補因子となりうる遺伝子として PALB2 遺伝子変異が抽出された。PALB2 遺伝子変異と HRD との関連は先行研究 (Polak et al, Nat Genet. 2017) でも報告されている。PALB2 変異例は 1%未満と低頻度であり、本研究の対象症例では認められていないが、HRD 予測モデルに加えることで精度が改善する可能性が示唆された。

(3)既存セルフリー DNA 解析パネルの比較・検討

セルフリー DNA 測定パネルの遺伝子カバー領域・検出限界等を比較・検討し、本研究の解析に用

いる測定パネルを確定した。最終的に Guardant360 を採用した。Guardant360 は 74 遺伝子の cfDNA 解析パネルであり、必要な血漿量は 2ml ~、必要な cfDNA 量は 5 ~ 30 ng であるとされていた。乳がんでは TP53 遺伝子と PIK3CA 遺伝子の体細胞変異が最も高頻度で認められるため (Nik-Zainal et al., Nature, 2016) 今回の解析で着目することとした。該当パネルは TP53 遺伝子の全エクソン領域をカバーしていた。また、PIK3CA 遺伝子の E542K・E545K・H1047L・H1047R は腫瘍の NGS データとの比較で陽性的中率および陰性的中率ともに 100% であると報告されており、加えて本症例で検出されていた他の PIK3CA 遺伝子変異も報告可能な変異に含まれていた。よって、PIK3CA 変異を 1 つの指標に、TP53 変異なし・PIK3CA 変異ありの症例において、TP53 変異のみが検出されないのか、PIK3CA 変異・TP53 変異いずれも検出されないのかを検証することとした。

(4) 既取得の腫瘍組織の遺伝子変異と血漿中の腫瘍由来遺伝子変異の一致率の検証

本研究で 6 例、他研究で 9 例の合計 15 例の乳がん症例において cfDNA 解析を行った。ステージは、ステージ 1 が 3 例、ステージ 2 が 10 例、ステージ 3 が 2 例であった。診断年齢はいずれも 30 代であった。既取得の腫瘍組織の遺伝子解析では、5 例が HRD-high かつ TP53 変異あり、10 例が HRD-low かつ TP53 変異なし・PIK3CA 変異ありであった。

既に正常組織・腫瘍組織の遺伝子解析データが得られている上記の症例において、国立がん研究センターのバイオバンクに登録されている血漿を解析したところ、最終的な血漿量は 1.5 ~ 3 ml で、cfDNA 収量は 4.0 ~ 18.2 ng であった (表 1)。3 例 (症例 No.1 ~ 3) は、規定の血漿量である 2 ml に達していたものの、cfDNA 収量は 5 ng に満たなかった。今回の症例ではステージと cfDNA 濃度に一定の傾向は認められなかった (図 1)。

cfDNA 解析の結果として認められた体細胞変異は 2 か所のみであった。1 つは TP53 変異 (VAF:3.34%) で、もう 1 つは ATM 変異 (VAF:1.41%) であった。cfDNA の ATM 変異は事前の正常組織・腫瘍組織の遺伝子解析で検出されなかった。cfDNA の TP53 変異は腫瘍組織の遺伝子解析結果と一致していた。この 1 例に加えて、2 例は検出限界以下 (1 ~ 2 リード) で腫瘍組織と同一の TP53 変異を認めた。よって、腫瘍組織で TP53 変異を認めた 5 例のうち 3 例で同一箇所の TP53 変異を cfDNA 解析で検出した (表 2)。残りの 2 例は cfDNA 解析では、腫瘍組織で認められた TP53 変異は検出されなかった。TP53 変異を認めなかった 2 例のうち 1 例は cfDNA 収量が 5 ng に満たなかった。したがって、腫瘍組織と cfDNA の遺伝子解析の TP53 変異検出の一致率は 20 ~ 60% であった。また、腫瘍組織で TP53 変異を認めなかった 10 例はいずれも PIK3CA 変異を認めていたが、cfDNA 解析では PIK3CA 変異を検出しなかった。腫瘍組織の TP53 変異陰性例は cfDNA 解析においても TP53 変異陰性であったが、腫瘍組織で認めた PIK3CA 変異も cfDNA 解析で認めなかったため、腫瘍組織の体細胞変異を cfDNA 解析で検出できた状態で TP53 変異を認めないのか、腫瘍組織の体細胞変異を検出できないのかどうか区別できなかった。よって、真の陰性的中率は算出できなかったと考える。今回の結果より、現時点では HRD 予測に cfDNA 解析データを用いることは難しいと考えた。今後、cfDNA 解析の TP53 変異検出率に影響する因子について再検討し、今後の方策を検討し直す必要があると考える。

(5) 遺伝医療の心理社会的影響に関する先行研究調査と質問紙の選定

尺度の選定基準として、海外の先行研究で複数使用されていること、他言語への翻訳実績があることの 2 点を確認した。両条件を満たす尺度を選定し、著者および出版社に尺度の使用許可を得た。質問紙調査に向けて準備を進めている。

表1 . ステージおよび血漿インプット量 (ml)・セルフリーDNA の収量 (ng)

No.	Stage	cfDNA_ng	Plasma_ml_input	cfDNA(ng/ml)
1	2a	4.0	3	1.33
2	2b	4.2	2.6	1.62
3	2a	4.4	2.7	1.62
4	2a	6.8	2.9	2.36
5	3a	7.5	2.5	3.00
6	3a	8.1	1.9	4.27
7	2b	8.3	3	2.75
8	1a	9.7	1.5	6.49
9	2a	9.9	2.6	3.80
10	2b	11.4	2.8	4.08
11	1b	11.8	3	3.94
12	1a	12.2	2.9	4.20
13	2a	16.2	2.8	5.78
14	2a	18.0	2.5	7.20
15	2b	18.2	2.6	7.00

図1 . ステージと cfDNA 濃度の関係

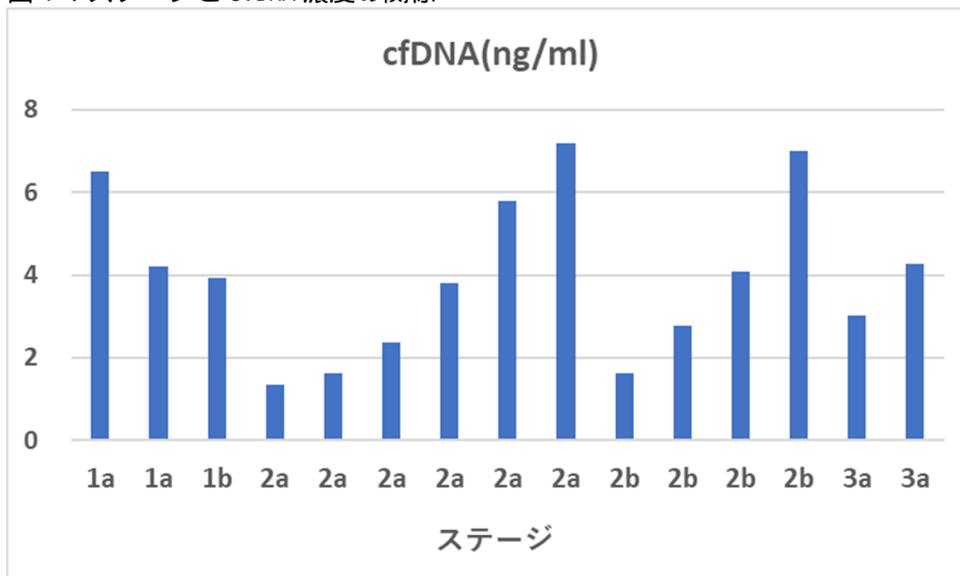


表 2 . 腫瘍組織の TP53 変異と cfDNA 解析で認められた体細胞変異

No.	TP53 mutation in tumor	Mutation in cfDNA	cfDNA(ng)	Stage
14	p.R196X	#N/A	18.0	2a
6	p.D57fs	TP53 p.D57fs (3.34%)	8.1	3a
2	p.R196X	#N/A	4.2	2b
10	p.R248Q	TP53 p.R248Q (2 reads)*	11.4	2b
4	p.Y236C	TP53 p.Y236C (1 read)* ATM (1.41%)	6.8	2a
8	#N/A	#N/A	9.7	1a
5	#N/A	#N/A	7.5	3a
15	#N/A	#N/A	18.2	2b
11	#N/A	#N/A	11.8	1b
9	#N/A	#N/A	9.9	2a
3	#N/A	#N/A	4.4	2a
1	#N/A	#N/A	4.0	2a
12	#N/A	#N/A	12.2	1a
7	#N/A	#N/A	8.3	2b
13	#N/A	#N/A	16.2	2a

*Not called by bioinformatics pipeline

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺智子、本多隆行、吉田正行、谷岡真樹、白石航也、新井恵史、牛尼美年子、田村研治、吉田輝彦、金井弥栄、河野隆志
2. 発表標題 若年性乳がんにおける相同組換え欠損の推定モデルの構築
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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