

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07125

研究課題名（和文）新規家族性乳がん感受性遺伝子の同定と既知原因遺伝子のVUSリスク評価法の確立

研究課題名（英文）Identification of novel susceptibility genes and establishment of VUS risk assessment approach in Japanese familial breast cancer

研究代表者

松下 洋輔（Matsushita, Yosuke）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・研究員

研究者番号：70634450

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では家族性乳がん24家系84人の生殖細胞系列の全エキソーム解析を通じて、リスク予測やがんにおける各遺伝子の機能を解析し、6つの候補遺伝子まで絞り込むことに成功した。この中でも他の癌腫で発がんとの関連が報告されていた遺伝子（GeneA）に関して機能解析を進め、新規感受性遺伝子としての妥当性を評価した。また、近年のNGS解析の増加に伴い意義不明の遺伝子変異（VUS）の解釈が問題となっている。本研究ではBRCA1とBARD1において認められたVUSの評価を相同組換え修復能だけでなく、遺伝子の機能に適した解析法を確立し、評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性乳がんの原因遺伝子として、DNA損傷時の相同組換え修復に重要なBRCA1/2が同定されているが、不明な症例も存在することから、さらなる解明と新たな治療戦略が必要である。一方、近年の急速な次世代シーケンサー解析の普及のため、リスク不明な遺伝子変異（VUS）の医学的意義が問題となっている。本研究では新たな易罹患性遺伝子の同定が期待されるだけでなく、VUSの機能評価によるリスク予測も行うことで、新たな診断法確立にも寄与すると考えられることから、その社会的意義と貢献度は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the risk prediction and the function of each gene in cancer through whole exome analysis of the germline of 84 individuals from 24 families with familial breast cancer, and succeeded in narrowing down the candidate genes to six. Among these, functional analysis was conducted on a gene (GeneA) that has been reported to be associated with carcinogenesis in other cancers, and its potential as a novel susceptibility gene was evaluated. In addition, with the recent increase in NGS analysis, the interpretation of genetic variants of unknown significance (VUS) has become an issue. In this study, we evaluated VUS in BRCA1 and BARD1 by establishing an analytical approach appropriate for the function of the gene as well as its homologous recombination repair ability.

研究分野：乳がん

キーワード：乳がん 家族性乳がん VUS 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の乳がん罹患率は年々増加傾向にあり、11人に1人の女性が生涯で乳がんにかかるとされている。そのうち家族性乳がんは全乳がんの約15%と推定され、この約1/3、すなわち全乳がんの約5%が遺伝性乳がんと示唆されている。これまで家族性乳がんの原因遺伝子として同定されたBRCA1/2遺伝子に生殖細胞系列変異を有する遺伝性乳癌・卵巣癌症候群(HBOC)の患者の乳がんの生涯リスクは40-80%と非常に高いことが明らかになっている。また、他の遺伝性疾患と同様、家族性乳癌卵巣癌の中で単一遺伝子疾患の原因遺伝子として、高度易罹患性から低度易罹患性遺伝子群が同定・分類された。しかしながら、現在同定されているBRCA1/2以外の高度易罹患性原因遺伝子による遺伝性乳がん卵巣がんの頻度は、HBOCと比べても極めて少なく、常染色体優性遺伝性乳がん卵巣がんの30~40%は未だ原因不明と考えられている。さらに、高度~低度易罹患性遺伝子群を考慮しても、全体の51%が未同定の易罹患性遺伝子と推測されている。一方、NCCNガイドライン(version 3, 2019)において、単一検査遺伝子として明記されている既知遺伝子群(BRCA1/2, TP53, PTEN)は高浸透率を示す遺伝子変異が明らかになっているが、次世代シーケンサー(NGS)解析による全ゲノム解析やWES(Whole Exome Sequencing)、近年承認された遺伝子パネル検査の普及により、浸透率やリスク不明な遺伝子変異(VUS: Variant of uncertain significance)が多く検出されるようになり、これらの医学的意義が問題になっている。実際我々のWES解析からも既知遺伝子群に変異が認められているが、そのうちいくつかはVUSであることから、そのリスク評価は重要な課題である。以上のことから、新規感受性遺伝子の同定とVUSのリスク評価を行うことが、遺伝性乳がんのリスク予測と診断法確立の基盤となり得る。

2. 研究の目的

家族性乳がんは全乳がん患者の約15%と推定されており、その原因として、DNA損傷の相同組み替え修復に重要なBRCA1/2が同定されているものの、原因遺伝子が不明な症例も存在することから、それらの解明と新たな治療戦略が課題である。従来の探索研究では、個々の罹患状況や家系図といった家系情報は充実しているが、対象家系が数家系のみ研究や、大多数のサンプルを用いているが、各家系内の情報が不十分と考えられる研究が多い。また、疾患感受性遺伝子探索研究の大部分が白人を対象としたものであるが、遺伝的背景が異なる日本人ではリスクに対する感受性が異なることが予測される。本課題では、四国遺伝性乳癌研究会の協力のもとサンプリングした詳細な臨床情報・家系情報を有する、四国在住者由来のサンプルを用いることで、高い純度の遺伝的背景を有していることが期待される。そのため、我々は家族性乳がん24家系84人の生殖細胞系列のWESを通じて、新規感受性遺伝子の同定へ繋げることを目的とした。一方、近年のNGS解析の増加に伴い、BRCA1/2でも様々な変異が報告されてきているが、VUSの解釈が問題となっていることから、既知リスク遺伝子のVUSを評価することで、遺伝性乳がんのリスク予測・診断法開発へ寄与することも目的とした。

3. 研究の方法

1) WES解析による新規感受性遺伝子の探索

家族性乳がん24家系84人の生殖細胞系列のWES解析から、アミノ酸変化を起こすレアバリエントをリスト化し、既知乳がん感受性遺伝子バリエントを含む家系を除去し、残りの家系から新規乳がん感受性遺伝子バリエントを絞り込んだ。

2) 新規感受性候補遺伝子の機能解析

WES解析から、同一もしくは複数の家系内での罹患者と非罹患者での分離、家系内集積性を解析することで第一候補遺伝子を絞り込んだ。これらの遺伝子群のうち、データベースを用いたリスク予測や、がんにおける各遺伝子の機能を解析することで数種類の候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子の中から、機能喪失が予測される frameshift deletion を認めた遺伝子 GeneA について機能解析を行った。具体的には GeneA との相互作用が報告されている分子との結合を GST pull down assay を用いて、野生型と変異型における結合能を評価した。さらに腫瘍部での遺伝子発現を検討し、その変動メカニズムを解明するため、GeneA のプロモーター領域のメチル化に関し、pyrosequencing 法を用いて評価した。

3) 既知原因遺伝子の VUS 評価を通じたリスク予測

家族性乳がん24家系84人の生殖細胞系列のWES解析から、NCCNガイドラインで単一検査遺伝子として明記されている既知遺伝子群を探索し、そのうちいくつかのバリエントがVUSであった。そのためBRCA1については相同組換え修復(HDR)を評価した。さらに、GeneA変異を認めた家系では、BARD1の変異も同定された。BARD1はHDR活性だけでなく、ユビキチンリガーゼとしての活性も評価することで、BARD1変異型の機能を検討した。

4. 研究成果

WES 解析による新規感受性遺伝子の探索

家族性乳がん 24 家系 84 人の生殖細胞系列の全エキソーム解析 (WES) から、アミノ酸変化を起こすレアバリエントをリスト化し、既知乳がん感受性遺伝子バリエントを除去し、同一もしくは複数の家系内での罹患者と非罹患者での分離、家系内集積性を解析し、25 個の疾患感受性バリエントまで絞り込みを行った。これらの遺伝子群のうち、データベースを用いたリスク予測や、がんとの関連を調査し、6 つの遺伝子を見出した。

新規候補遺伝子 GeneA の機能解析と発現制御機構

絞り込んだ 6 つの遺伝子の中で、機能消失が予測される frameshift deletion を認めた GeneA について機能解析を行った。具体的には、GeneA は分子 X に結合することで、その機能を制御することが報告されている。そのため、GST pull down assay を用いて、GeneA の野生型と変異体における結合能について検討した。その結果、GeneA 野生型は分子 X との結合が確認できたのに対し、GeneA 変異体はその結合が認められなかったことから、その制御機構を消失していることが明らかになった。

また、GeneA の遺伝子発現を腫瘍部と非腫瘍部で比較したところ、非腫瘍部と比較し、腫瘍部において有意な減少が認められた。この発現制御機構を明らかにするため、GeneA のプロモーター領域のメチル化を pyrosequencing 法にて評価した。その結果、非腫瘍部と比較し、腫瘍部の GeneA プロモーター領域において、メチル化の亢進が認められ、これが発現減少の一因である可能性が示唆された。

既知原因遺伝子 BRCA1 の VUS 評価

WES 解析から、BRCA1 変異は 5 家系に認められ、そのうち 3 家系で検出されたバリエントは VUS であった。BRCA1 は様々な機能を有しているが、中でも DNA 二本鎖切断の修復機構の一つである相同組換え修復 (HDR) に中心的な役割を果たすことが知られている。そのため、既存の報告に従い (Ransburgh DJ et al. Cancer Res. 2010 70(3)988-995) アッセイ系を構築するとともに、陽性および陰性の変異体も用いて、BRCA1 の VUS を評価した。その結果、本 WES 解析で認めた 3 つの VUS はいずれも HDR 活性を BRCA1 野生型と同程度保持していることが観察された。

BARD1 変異の機能解析

BARD1 は NCCN のガイドラインにおける単一検査遺伝子としては明記されていないものの、BRCA1 と DNA の二本鎖切断修復機構に関与すること、さらに VUS が 2 家系に認められ、GeneA 変異を認めた家系においても変異を有していたことから、これら 3 つの変異に関する機能評価も行った。まず、HDR 活性を BRCA1 と同様に検討したところ、3 つの変異全てが、BARD1 野生型と同程度であり、機能消失型のバリエントではない可能性が示唆された。BARD1 は BRCA1 と結合し、E3 ユビキチンリガーゼとして機能することが報告されている。GeneA 変異を有する家系にて認められた BARD1 のミスセンス変異は BRCA1 との結合に重要なドメイン内で認められている。そのため、BRCA1 との結合を検討したところ、本変異はその相互作用に影響は認められなかった。次にユビキチン活性を評価したところ、BARD1 野生型と BRCA1 野生型、BARD1 変異体と BRCA1 野生型のいずれの組み合わせも違いは認められなかったことから、GeneA 変異を有する家系内で観察された BARD1 変異は発癌等に影響がないと推測された。

結論

GeneA は公共データベースを用いた解析から、発現低下が予後不良と関連することを見出している。さらに造血器腫瘍では高頻度の変異や治療抵抗性との関連も報告されるなど、がんとの関連が高い。本解析では高い純度の遺伝的背景を有していることが期待される 24 家系 84 のサンプルの WES 解析を通じて、新規感受性候補遺伝子の絞り込みを行った。特に GeneA 変異型については、その機能消失や腫瘍部での発現減少、その制御機構としてプロモーター領域のメチル化を明らかにするなど、新たな易罹患性遺伝子の可能性が示唆された。さらに近年問題となっている VUS のリスク評価についても BRCA1 と BARD1 について実施し、HDR 活性だけでなく、BARD1 については BRCA1 との結合能やユビキチンリガーゼ活性など、包括的に評価することでリスク予測の精度の改善に努めた。その結果、BARD1 で認めた変異体、特に GeneA 変異を有する家系で観察された変異体は野生型と同定の活性を維持していたことから、その影響はないと推測した。以上のことから、GeneA が日本人家族性乳がんの新規感受性遺伝子であると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名	Abdullah S. Ili, Yosuke Matsushita, Yasuko Takahashi, Masato Komatsu, Kazuma Kiyotani, Yasuo Miyoshi, Junko Honda, Shozo Ohsumi, Mitsunori Sasa and Toyomasa Katagiri
2. 発表標題	Whole-exome sequencing for the identification of Japanese familial breast cancer susceptibility genes
3. 学会等名	第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Ili Syazwana Abdullah, Yosuke Matsushita, Yasuko Takahashi, Masato Komatsu, Kazuma Kiyotani, Yasuo Miyoshi, Junko Honda, Shozo Ohsumi, Mitsunori Sasa, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題	Identification and characterization of novel susceptibility genes in hereditary Japanese familial breast cancer
3. 学会等名	第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	松下洋輔・Ili Syazwana Abdullah・高橋定子・小松正人・清谷一馬・吉丸哲郎・三好康雄・本田純子・紺谷桂一・大住省三・笹三徳・片桐豊雅
2. 発表標題	日本人家族性乳癌家系の新規感受性遺伝子の解析
3. 学会等名	日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	松下洋輔・吉丸哲郎・片桐豊雅
2. 発表標題	トリプルネガティブ乳癌におけるグルタミン代謝のマスターレギュレーターである RHBDL2 の役割解明
3. 学会等名	第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 松下洋輔・奥村和正・小松正人・吉丸哲郎・尾野雅哉・三好康雄・笹三徳・片桐豊雅
2. 発表標題 RHBDL2-ASCT2 axis have critical roles for modulating glutaminolysis in triple negative breast cancer
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ili S. Abdullah, Yosuke Matsushita, Masato Komatsu, Kazuma Kiyotani, Yasuo Miyoshi, Shozo Ohsumi, Mitsunori Sasa, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 Whole-exome sequencing reveals new potential susceptibility gene for Japanese familial breast cancer
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------