

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：83504

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16292

研究課題名(和文) BRCA1/2生殖細胞系列の病的変異保因者における発癌機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of carcinogenesis in individuals harboring germline BRCA1/2 pathogenic variants

研究代表者

弘津 陽介 (Yosuke, Hirotzu)

地方独立行政法人山梨県立病院機構山梨県立中央病院(がんセンター局ゲノム解析センター)・ゲノム解析センター・チーフ研究員

研究者番号：10793838

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)：BRCA1/2遺伝子の生殖細胞系列に病的変異を有する方は、乳癌、卵巣癌、前立腺癌の発症リスクが高くなる。一方、病的変異のは人種によって多種多様であり、その機能的意義や治療標的としての可能性については十分に明らかでなかった。
本研究では、これまでに解析したBRCA1/2遺伝子変異をデータベースに参照し、病的変異の機能的意義づけを再検証し、いくつかのミスセンス変異が機能異常を示すことを明らかにした。また、癌発生時にはオラパリブに対する感受性があることも評価することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、VUSの再評価を行うことで、機能的に再分類されること、PARP阻害剤に対する感受性を再評価することの重要性があることを示した。
日本人で同定されるBRCA1/2バリエーションに対し、データベースを使って解析をすることで、再評価が可能であると考えられる。また、機能的意義が明らかになった癌に対して、ポリADP-リボースポリメラーゼ(PARP)阻害剤に対する感受性を評価することも可能である。

研究成果の概要(英文)：Individuals with germline BRCA1/2 pathogenic mutations have a high-risk of the development of breast, ovarian, and prostate cancers. BRCA1/2 pathological variants are racially diverse. However, it remained systematically unknown the functional significance of BRCA1/2 variants and potential therapeutic targets to PARP inhibitors.
In this study, we examined the BRCA1/2 variants which were previously classified as benign, variants of uncertain significance (VUS) and pathogenic. We assessed these variants using database (MH-BRCA) and redefined some missense variants as likely pathogenic. Furthermore, we could assess whether tumor with these variants have a sensitivity to PARP inhibitor (i.e. olaparib).

研究分野：腫瘍学

キーワード：BRCA1/2 生殖細胞系列 乳癌 卵巣癌 PARP

1. 研究開始当初の背景

BRCA1/2 遺伝子は、二本鎖 DNA 切断が起きると相同組み換え修復の中心的な機能を持つ。*BRCA1/2* の機能欠失変異 (ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライスサイト変異、エクソン欠失等) は、病原性を持つ変異であることから“病的変異”と定義される。*BRCA1/2* 病的変異を有する癌は、プラチナ製剤やポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害剤に対して感受性し、臨床的にも治療効果を示す。

BRCA1/2 遺伝子の生殖細胞系列に病的変異を有する方は、乳がん、卵巣がん、前立腺がんの発症リスクが高くなる。これまでに、我々は本邦における乳がん・卵巣がん患者の *BRCA1/2* 生殖細胞系列病的変異の頻度を明らかにした(Hirotsu et al., Mol. Genet. Genomic Med 2015; Sakamoto et al., Cancer 2016)。*BRCA1/2* 遺伝子の病的変異は人種によって多種多様であり、日本人のデータも増えてきている。データ量の増加にともない、機能意義不明なバリエーションである Variants of Uncertain Significance (VUS)も報告されている。VUS に関しては、その大半の機能的意義や治療標的としての可能性について、詳細は十分に明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの解析により明らかとなっている *BRCA1/2* 遺伝子変異をデータセットとして、バリエーションの機能的意義づけを再評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *BRCA1/2* 遺伝子の次世代シーケンシング解析

BRCA1/2 遺伝子の全エクソン領域およびスプライスサイト領域を PCR 増幅し、アンプリコンシーケンシング解析を実施した。次世代シーケンサーは Ion PGM (Thermo Fisher Scientific 社) を使用した。データのマッピング、変異検出、コピー数異常の検出には、イオンレポーターローカルサーバーを使用した。1000 Genomes Project のデータ、5000 Exome project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)、および Human Genetic Variation Database (HGVD) (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB>)に基づき、マイナーな対立遺伝子頻度(Minor Allele Frequency)<0.01 のミスセンス変異体をレアバリエーションとした。

(2) VUS の評価

ヒト一般集団における VUS の出現頻度を評価するため、2 万人のバリエーション情報が格納された The Exome Aggregation Consortium (ExAC)のデータベースを利用した。日本人特有のバリエーションが評価するため、東北大学メディカル・メガバンク機構 (ToMMo) の 3,554 名のデータベース Integrative Japanese Genome Variation (iJGV)、京都大学の 1,208 名のデータベース The Human Genetic Variation Database (HGVD)を利用した。

(3) MH BRCA データベースを利用した *BRCA1/2* のバリエーション評価

Momozawa ら (Nat. Commun. 2018, 9, 4083.) の症例対照研究と、ACMG ガイドラインと照合した。また、Arai ら (J. Hum. Genet. 2018, 63, 447-457)、Hirotsu ら (Mol. Genet. Genom. Med. 2015, 3, 121-129)、Nakagomi ら (Cancer Sci. 2018, 109, 453-461)の研究データを用いて、日本人における 3 つの遺伝性乳がん卵巣がんコホートをデータセットとして用いた。

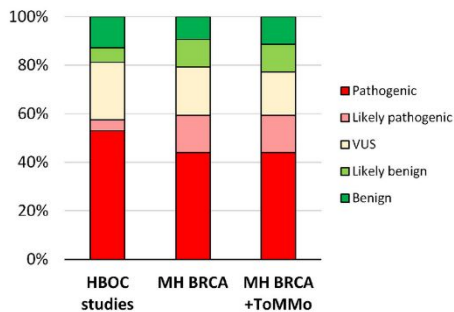
バリエーション分類のアノテーションデータベース(ENIGMA, BIC, ClinVar, ARUP)を統合的に解析する MH BRCA データベースを用いて、バリエーションの機能的評価を実施した。

(4) 治療反応性の評価

BRCA1/2 のバリエーションを MH ガイドのデータベースと照合し、PARP 阻害剤に対する感受性に対して評価した。

4. 研究成果

(1) 日本人で同定されたバリエーションに関して、臨床的な意義付けと MH BRCA データベースとの比較を行った。202 種類の *BRCA1/2* 変異体の分類を、3 つの遺伝性乳がん卵巣がんコホートから抽出し、ToMMo の日本人ゲノムコホートデータの有無で MH BRCA と比較した。5-Tier システム (Pathogenic, Likely pathogenic, VUS, Likely benign, Benign) に基づき分類したところ、ToMMo のデータを参照することによって、診断精度が増すことが示された。



(2) 遺伝性乳癌卵巣癌において見出された *BRCA1/2* 生殖細胞系列変異を、ACMG ガイドライン、ClinVar、ENIGMA 等のアノテーションデータセットを基準にした HM-BRCA データベースと比較した。本邦の研究から抽出した *BRCA1/2* 変異 (1,040 変異) の評価では、病原性との高い一致率 (98.1%) が示された。また、海外のデータセット (4,975 変異) においても、高い一致率 (99.98%) が示された。

(3) *BRCA1/2* 遺伝子の VUS の機能的意義について、HM BRCA データベースから再評価を行った。これまでに VUS として判定されていたバリエント *BRCA1* p.V1653L (NM_007294.3: c.4957G>T; rs80357261) は、病原性の可能性が高いバリエントに再分類されることが明らかとなった。我々の解析データからも、*BRCA1* p.V1653L を有する 3 家系が同定され、家族へのリスクマネジメントの必要性が示された。

Case-ID	Gene	HGVS g.	HGVS c.	HGVS p.	SNP-ID Number	YCH	MH BRCA
BRCA006	<i>BRCA1</i>	41222974C > A	4957G > T	V1653L	rs80357261	VUS	LP
	<i>BRCA2</i>	32914623G > T	6131G > T	G2044V	rs56191579	B	B
BRCA008	<i>BRCA1</i>	41222974C > A	4957G > T	V1653L	rs80357261	VUS	LP
	<i>BRCA2</i>	32914623G > T	6131G > T	G2044V	rs56191579	B	B
	<i>BRCA1</i>	41243841T > C	3707A > G	N1236S	rs863224760	VUS	VUS
	<i>BRCA2</i>	32910842A > G	2350A > G	M784V	rs11571653	B	B
BRCA052	<i>BRCA1</i>	41222974C > A	4957G > T	V1653L	rs80357261	VUS	LP

(4) PARP 阻害に対する治療効果の関連性は、MH BRCA で分類された病的変異の 95.4% を占めていた。一方、良性 (Benign) に分類された 87.6% のバリエントは、機能的に中立であり、PARP 阻害剤に対する抵抗性があると予測された。

また、MH BRCA による VUS と良性の可能性の高い (Likely benign) バリエントは、相同組換え修復機能に関する証明が十分ではなかったが、6.4% の VUS と 3.4% の Likely benign のバリエントは、PARP 阻害剤に対して抵抗性があると予測された。

興味深いことに、病的の可能性の高い (Likely pathogenic) バリエントである *BRCA2* p.I2675V (rs397507954) は、PARP 阻害剤に対して治療効果が低いことが推定された。本研究のデータセットによる *BRCA1/2* 遺伝子変異の再評価は、臨床的に機能的意義のアノテーションと治療効果を予測する上で重要な指標となることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirotsu Y, Schmidt-Edelkraut U, Nakagomi H, Sakamoto I, Hartenfeller M, Narang R, Soldatos TG, Kaduthanam S, Wang X, Hettich S, Brock S, Jackson DB, Omata M	4. 巻 21
2. 論文標題 Consolidated BRCA1/2 Variant Interpretation by MH BRCA Correlates With Predicted PARP Inhibitor Efficacy Association by MH Guide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E3895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21113895	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 Sakamoto I, Hirotsu Y, Nakagomi H, Ikegami A, Teramoto K, Omata M	4. 巻 45
2. 論文標題 Durable Response by Olaparib for a Japanese Patient With Primary Peritoneal Cancer With Multiple Brain Metastases: A Case Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 743-747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.13851	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 弘津 陽介
2. 発表標題 BRCA1/2生殖細胞系列変異保因者の癌組織における遺伝子異常
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中込 博
2. 発表標題 Assessment of “hereditary risk of patients with bilateral breast cancer
3. 学会等名 第17回臨床腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Udo Schmidt-Edelkraut
2. 発表標題 BRCA variant classification is improved by Japanese SNP data and correlate with response to PARP inhibition in MH GUIDE
3. 学会等名 第17回臨床腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中込 博
2. 発表標題 遺伝性乳癌患者に対するリスク軽減乳房切除について
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弘津 陽介
2. 発表標題 遺伝子パネル検査の院内実装と精度管理・外部認定取得に向けて
3. 学会等名 第26回日本乳がん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弘津 陽介
2. 発表標題 ゲノム情報と知識データベースの融合による治療薬の選択
3. 学会等名 第22回分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中込 博
2. 発表標題 Pathogenicity of BRCA Variants for Familial Breast and/or Ovarian Cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 弘津 陽介	4. 発行年 2019年
2. 出版社 肝胆膵 アークメディア	5. 総ページ数 1043-1046
3. 書名 臨床検体を用いたパネル検査	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----