

遺伝性乳がん・卵巣がんのリスクとなる BRCA2 遺伝子バリエーションの新規機能解析法を開発

国立研究開発法人国立がん研究センター
国立大学法人東京大学
国立研究開発法人理化学研究所
国立研究開発法人日本医療研究開発機構

発表のポイント

- がん抑制遺伝子である BRCA2 遺伝子のバリエーションに対するハイスループット機能解析法を開発しました。
- これまで薬剤感受性や発がんリスクが明らかでなかった 186 種類の意義不明な BRCA2 遺伝子バリエーションについて機能解析を行い、新たに 37 種類の病的なバリエーションを発見しました。
- 本手法の臨床応用例として、遺伝子検査で発見されたバリエーションに対する迅速な病的意義判定システムを構築しました。

概要

国立研究開発法人国立がん研究センター研究所細胞情報学分野 池上政周任意研修生、高阪真路ユニット長、間野博行分野長らの研究グループは、国立がん研究センター中央病院乳腺・腫瘍内科 田村研治科長、国立大学法人東京大学大学院医学系研究科 田中栄教授、細谷紀子准教授、国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター 桃沢幸秀チームリーダーらと共同で、遺伝性乳がん・卵巣がん(注1)の原因として知られるがん抑制遺伝子(注2)BRCA2 遺伝子のバリエーション(注3)に対するハイスループット機能解析法(注4)を開発しました。

本研究グループは、これまでにがん遺伝子(注5)に対する革新的なハイスループット機能解析手法(mixed-all-nominated-mutants-in-one method: MANO 法)を構築し、EGFR や ERBB2 といったがん遺伝子の意義不明バリエーションの機能解析を行ってきました。この手法を発展させ、BRCA2 の機能解析手法である MANO-BRCA 法(MANO-B 法)を確立し、186 種類の意義不明バリエーションを含むこれまでで最大規模の 244 種類のバリエーションについて機能解析を行った結果、新たに 37 種類の病的バリエーションを同定しました。さらに本手法の臨床応用例として、遺伝子検査で新たに発見されたバリエーションの病的意義(注6)を迅速に判定し、報告するシステムを構築しました。本システムは、適切な治療方針が定まらず不安を抱えていた意義不明バリエーション保持者に正しい情報を伝えることができることから、リスク低減手術(注7)や PARP 阻害薬(注8)投与の必要性を判断するためのコンパニオン診断(注9)としての活用が期待されます。

本研究成果は、英国科学雑誌「Nature Communications」に 5 月 22 日付で掲載されました。

背景

日本人の女性は、その生涯のうちに9%が乳がんを、1%が卵巣がんを発症するといわれており、乳がんは最も頻度の高いがんです。一般的にはがんは遺伝する疾患ではありませんが、乳がん・卵巣がんのうちおよそ10%は遺伝性に生じます。特に、BRCA1 および BRCA2 の2種類の遺伝子のいずれかに生まれつき病的バリエーションを有する場合を遺伝性乳がん・卵巣がん症候群(Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer syndrome: HBOC)といい、親から子に二分の一の確率で発がんのリスクが遺伝します。HBOCの女性は、その生涯に乳がんに41-90%、卵巣がんに8-62%の頻度で発症すると報告されており、また若い年齢で発症する傾向やがんが多発する傾向がみられます。HBOCと診断された女性は遺伝カウンセリングを受診し、リスク低減手術や定期的なサーベイランス(注10)といった治療の選択肢の説明を十分に受けた上で、どれを選択するかを決めることになります。また、HBOCの女性の血縁者がHBOCである確率は十分に高いため、血縁者も遺伝子検査を受けるかどうかを慎重に判断する必要があります。

細胞の中にあるDNAは、紫外線や活性酸素、化学物質などの刺激により、常に損傷を受けています。DNAの損傷がうまく修復されないと細胞が死んでしまったり、異常が蓄積してがん細胞に変化したりします。BRCA遺伝子は損傷を受けたDNAを修復する機能を持ち、細胞ががん化することを抑える働きを持ちます。BRCAの病的バリエーションを持つ細胞ではこの修復機能が低下しているためDNAの異常が蓄積しやすく、結果として病的バリエーションの保持者は乳がんや卵巣がんを発症しやすくなります。そして興味深いことに、完全にBRCAの機能を失ったがん細胞に、BRCAとは別の仕組みでDNA損傷を修復するPARPタンパク質の働きを阻害すると、DNA損傷が顕著となりがん細胞が死んでいくことが知られています。実際に、分子標的治療薬(注11)であるPARP阻害薬の一つオラパリブは、BRCA病的バリエーションを有する乳がん・卵巣がん患者に対して臨床の場で使用されています。

遺伝子を構成しているDNAは4種類の塩基からなり、連続した3個の塩基が1つのアミノ酸に翻訳されます。BRCA2は10,257個の塩基からなる比較的大きな遺伝子で、最終的に3,418個のアミノ酸からなるタンパク質を構成します。BRCA2の遺伝子検査ではこの全ての塩基を決定し、どのようなバリエーションであるかは、最終的に構成するタンパク質にどのような変化が生じるかを判定できます。がん患者を対象としてこれまでに行われてきたゲノム研究や遺伝子検査により、BRCA2遺伝子には多数のバリエーションが発見されています。BRCA2の短縮型バリエーション(注12)が発がんに寄与していることはよく知られており、リスク低減手術やサーベイランス、血縁者への遺伝子検査によるがんの予防と早期発見、そして既に生じたがんにはPARP阻害薬を用いて治療する、などの診療が行われます。一方でBRCA2遺伝子には非同義バリエーション(注13)が数千種類も報告されていますが、そのほとんどは病的意義が明らかとなっていないバリエーション(variants of unknown significance: VUSs)です。VUSの保持者については、そのバリエーションの機能や疾患との関連が不明であるため、検査の結果が治療に繋がらないことになります。また、病的な変化であることを否定もできないため、慎重なサーベイランスを要することから、VUSの存在は遺伝子検査の限界として大きな問題となっています。しかし、日々の遺伝子検査で発見され続けている膨大な数に及ぶBRCA2のVUSに対して、その機能解析に対応できるハイスループットな手法はこれまで存在しておらず、更に遺伝子検査の有用性を高めるには、バリエーションの病的意義に関するデータベースの充実が不可欠です。

BRCA2のバリエーションが病的であるかどうかを判定する上で、そのバリエーションの保持者を多数集めたとき、野生型バリエーションを有する人と比べてがんの発症率が高くなっているかが最も重要です。しかし、BRCA2にはその遺伝子の大きさに起因する数千種類にも及ぶ非同義バリエーションが存在しており、一つ

一つのバリエントの保持者は限られたものになり、病的かどうかを判断するに至りません。このような場合には、細胞実験や動物実験によってバリエントの機能を調べる機能解析法が有用です。これまでも *BRCA2* バリエントの DNA 修復機能を評価するためにさまざまな実験手法が開発されています。しかし、膨大な数の VUS の病的意義を判定するのに重要である、(1)ハイスループットの解析手法であること、(2)ヒトの細胞で *BRCA2* が安定的に発現する実験系であること、(3)*BRCA2* の塩基配列のどの部位のバリエントに対しても機能を評価できること、の 3 点を満たす実験系は存在せず、革新的な機能解析手法の開発が望まれていました。

研究成果

本研究グループはこれまでにがん遺伝子の VUS に対する機能解析法である MANO 法を開発し、多くの VUS の機能と分子標的治療薬への反応性を明らかにしてきました。その経験を活かし、がん抑制遺伝子である *BRCA2* の機能解析に対応した、前述の 3 点を満たす実験系である MANO-B 法を確立しました(図1)。

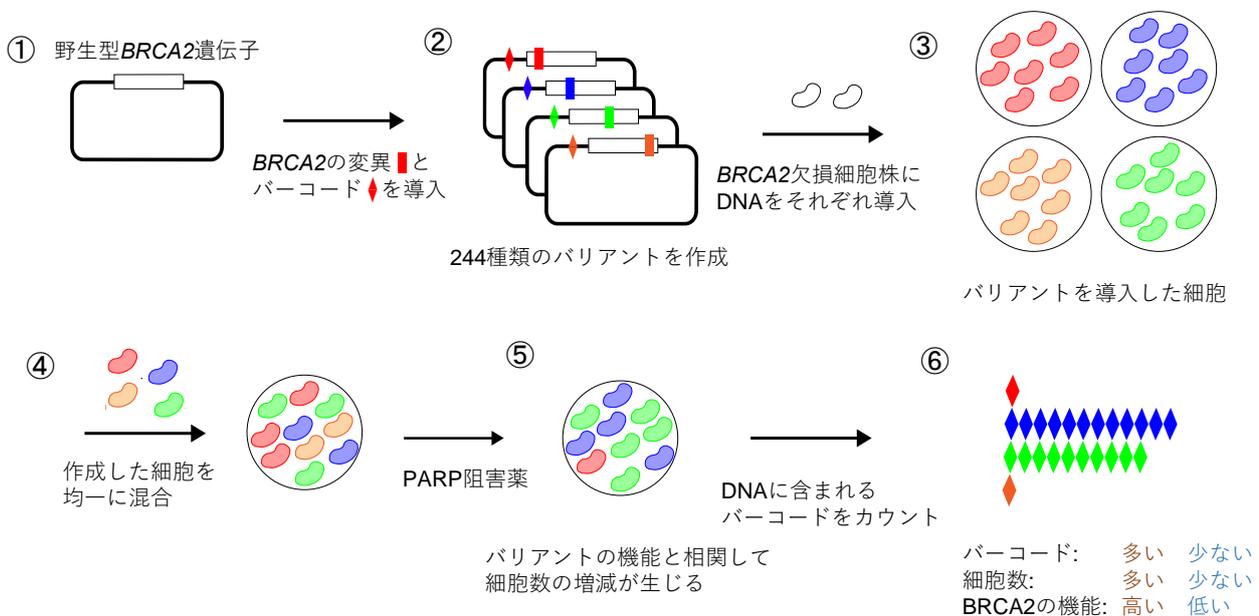


図1 MANO-B 法の概略図

まず *BRCA2* の機能を喪失したヒト大腸がん細胞株である DLD1 にさまざまな *BRCA2* バリエントを導入し、各バリエントの機能に相関して PARP 阻害薬への反応性が変化する現象を確認しました。この事実は、PARP 阻害薬への反応性が高い場合は導入したバリエントの機能が低く、反応性が低い場合は導入したバリエントの機能が低いと評価できることを意味します。

MANO-B 法はトランスポゾンベクター(注14)を用いて *BRCA2* 遺伝子を *BRCA2* 遺伝子欠損の細胞株に導入して機能解析を行います。まず野生型(注15)の *BRCA2* を鋳型として、1ヶ所だけ DNA に変異を導入したベクターを 244 種類作成しました。さらに、それぞれのバリエントに一对一に対応する 10 塩基からなる識別用バーコード配列を組み込んでおきます。*BRCA2* 遺伝子のバリエントを導入した細胞を作成したあと、その全てを均一に混和した状態で PARP 阻害薬とともに一定期間培養します。その後培養細胞のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー(注16)を用いてバーコードの相対量を計測し

ます。その値から各バリエントが導入された細胞の相対数を算出することで、各バリエントの機能と PARP 阻害薬への反応性を一度の解析で多数評価できます。

この手法を用いて 244 種類の BRCA2 バリエントの機能解析を行いました。まず、病的意義に関する標準的な評価基準である ACMG 分類(注17)や IARC 分類(注18)と MANO-B 法の結果の一貫性を確認しました。ACMG 分類における 22 種類の良性のバリエントと 19 種類の病的なバリエントは、MANO-B 法によってきれいに 2 つのグループに分別されており、MANO-B 法での機能評価と臨床的な良悪性が対応していることが分かりました(図2)。さらに 186 種類の VUS の機能解析を行った結果、126 種類が正常な機能を持つバリエント、37 種類が機能を喪失した病的バリエントと判明しました。23 種類のバリエントは中間的な機能を持っており、臨床的に良性なのか発がんへの寄与があるのかは判断が困難でした(図3)。また、多くの病的なバリエントは DNA と結合するドメイン(注19)である HD や OB に位置していましたが、HD や OB 以外にも病的バリエントは存在し、また HD や OB のバリエントが必ずしも病的とは限らないことから、個々のバリエントに対して機能解析を行う必要性が明らかとなりました。

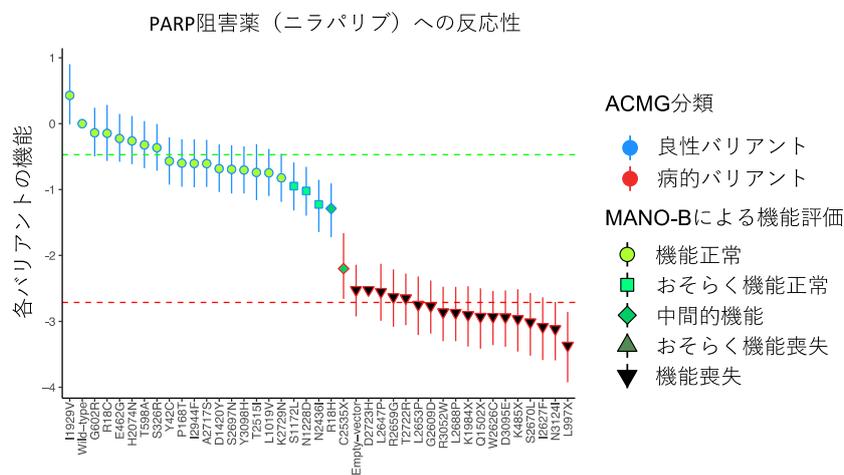


図2 ACMG 分類と MANO-B 法での機能評価の一貫性

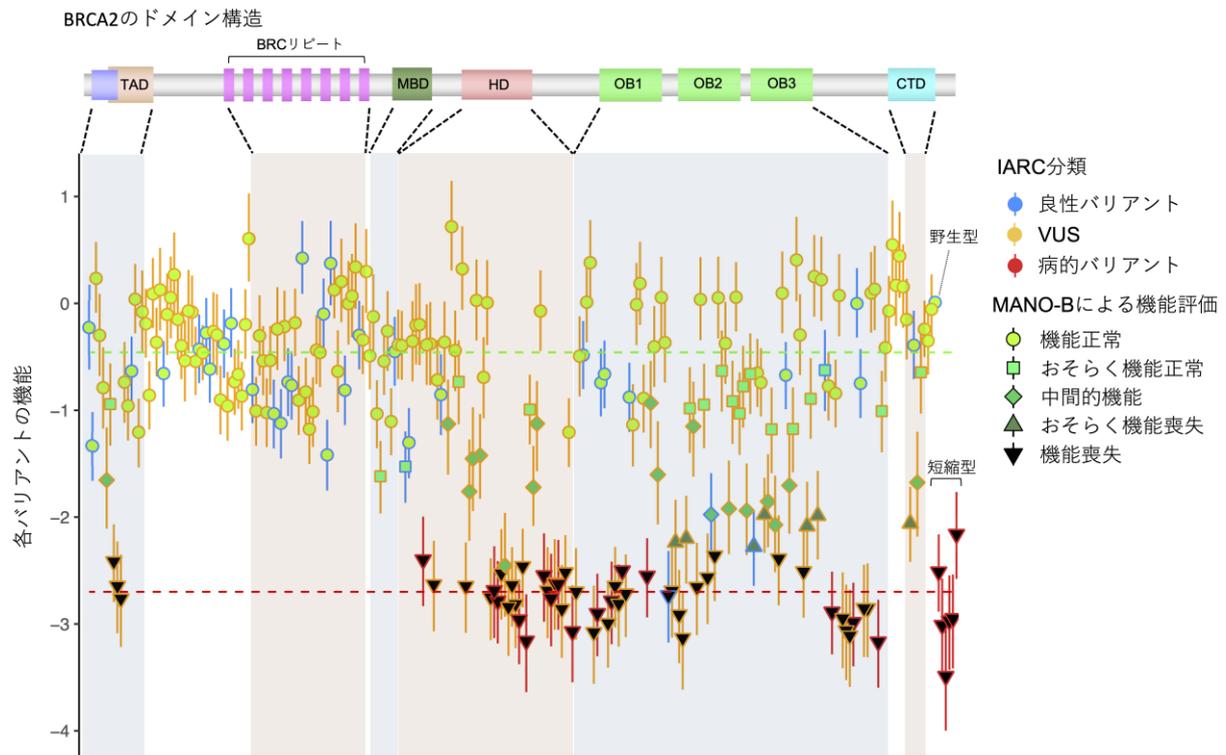


図3 244 バリエアントに対する MANO-B 法での機能評価

更に MANO-B 法を臨床応用することを目的とし、遺伝子検査で新規に発見された VUS の病的意義を患者や医療者に迅速に報告するシステムとして、以下の Accurate BRCA Companion Diagnostic (ABCD) テストを提唱しました。機能を評価したいバリエアント4 種類と、既に機能の分かっているバリエアント 8 種類を用いて MANO-B 法を行い、得られた結果をベイズ推定(注20)の手法で過去の実験結果と統合することで各バリエアントの機能を判定します。ABCD テストは開始から報告まで 5 週間で終了する簡便な実験系でありながら、244 バリエアントを用いた大規模な実験と同様の機能評価ができることが分かりました。

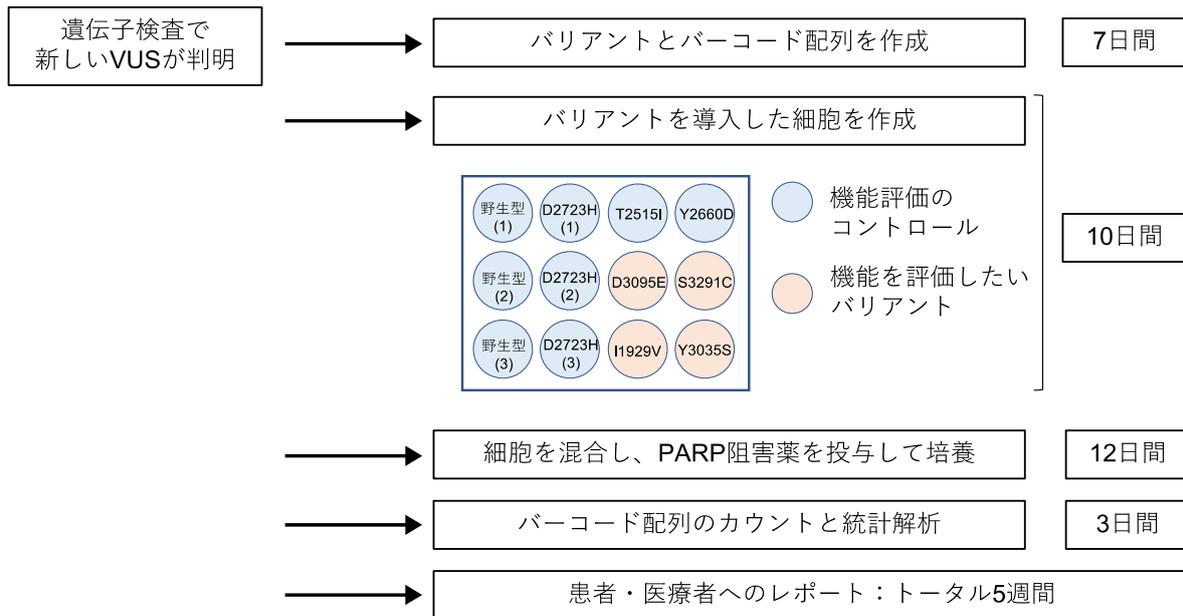


図4 新規 VUS に対する迅速な病的意義報告システムである ABCD テストの概要

展望

本研究において、これまで病的意義が不明であった 186 種類の *BRCA2* バリエントの機能解析を行い、37 種類の病的バリエントと 126 種類の正常な機能のバリエントを新たに同定できたことは、遺伝子検査の有用性を向上させることに繋がる大きな結果です。この MANO-B 法を継続して多数の VUS の存在に対して実施していくことで、適切な治療方針が定まらず不安を抱えている VUS 保持者を減らすことができます。一方で、23 種類の中間的な機能を持つバリエントが認められ、これらが発がんに寄与しているかどうかについて、今回の結果からは意義付けができませんでした。中間的な機能を持つバリエントの保持者を多数集め、がんの発症率を解析するような疫学研究が望まれます。

また、今回提唱した ABCD テストは 5 週間で報告可能であり、臨床的に許容できる迅速性を有します。VUS を保持することが判明し不安になっている患者に対して、リスク低減手術や PARP 阻害薬投与の必要性を判断するためのコンパニオン診断としての臨床応用が期待されます。

発表論文

雑誌名: *Nature Communications*

タイトル: High-throughput functional evaluation of *BRCA2* variants of unknown significance

著者: Masachika Ikegami, Shinji Kohsaka, Toshihide Ueno, Yukihide Momozawa, Satoshi Inoue, Kenji Tamura, Akihiko Shimomura, Noriko Hosoya, Hiroshi Kobayashi, Sakae Tanaka, and Hiroyuki Mano

国立がん研究センター

研究所	細胞情報学分野	任意研修生	池上政周
研究所	細胞情報学分野	ユニット長	高阪真路
研究所	細胞情報学分野	主任研究員	上野敏秀
研究所	細胞情報学分野	特任研究員	井上聡

中央病院	乳腺・腫瘍内科	科長	田村研治
中央病院	乳腺・腫瘍内科	医員	下村昭彦（当時）
研究所	細胞情報学分野	分野長	間野 博行
東京大学大学院医学系研究科			
疾患生命工学センター放射線分子医学部門	准教授	細谷紀子	
整形外科学講座	講師	小林寛	
整形外科学講座	教授	田中栄	
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	チームリーダー	桃沢幸秀	

DOI: 10.1038/s41467-020-16141-8

掲載日: 日本時間:2020年5月22日午後6時

研究費

本研究は下記事業の支援を受けて行われました。

日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業 (JP19ck0106252)

日本医療研究開発機構 臨床ゲノム情報統合データベース整備事業 (JP18kk0205003)

日本医療研究開発機構 革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ (JP18am0001001)

日本学術振興会 科学研究費助成事業 (19J13207)

用語解説

注1 遺伝性乳がん・卵巣がん

乳がんや卵巣がんは基本的には遺伝しませんが、*BRCA1* および *BRCA2* の2種類の遺伝子のうちいずれかに生まれつき病的バリエントを有する場合は、親から子に発がんのリスクが遺伝します。乳がん・卵巣がんのうちおよそ10%が遺伝性に生じます。

注2 がん抑制遺伝子

がんの発生を抑制する機能を持つタンパク質をコードする遺伝子。がん抑制遺伝子の機能喪失によりがん化が促進されます。

注3 バリエント

遺伝子の多様性を意味する言葉で、ヒトによってさまざまなDNAの配列が異なることが、ヒトの特徴や体質の多様性を生み出しています。

注4 ハイスループット機能解析法

機能解析の対象となる多数の遺伝子バリエントの実験を個別に行うのではなく、同時並行的に行うことで、一実験で大量の結果を得ることを可能にする実験手法。

注5 がん遺伝子

遺伝子に生じた異常によりがんの発生や増殖を促進するように変化した遺伝子。

注6 病的意義

バリエントが病気の発生に関与するかどうかについての有意性。

注7 リスク低減手術

BRCA1 遺伝子や *BRCA2* 遺伝子の病的バリエント保持者に対して、がんが発症する前に予防として

乳腺や卵巣・卵管を切除する手術。

注8 PARP 阻害薬

PARP(poly ADP-ribose polymerase)というDNAの損傷を修復するタンパク質を阻害する分子標的治療薬。*BRCA1*あるいは*BRCA2*の機能を喪失したがん細胞の細胞死を誘導できることから、*BRCA*遺伝子の病的バリエントを有する乳がん・卵巣がんなどのがん患者の治療に用いられています。

注9 コンパニオン診断

治療の効果や副作用を実施前に予測するために行なわれる臨床検査のこと。

注10 サーベイランス

定期的に検査や診察を行い、がんの早期発見に努めること。

注11 分子標的治療薬

がん細胞の増殖に関わる特定のタンパク質を標的にして、がんの増殖を抑制する薬剤。

注12 短縮型バリエント

遺伝子が作り出す本来のタンパク質と比べて、一部分が欠失したタンパク質を作るようになるバリエント。

注13 非同義バリエント

野生型と比較してタンパク質を構成する多数のアミノ酸のうち別のアミノ酸に変化しているバリエント。

注14 トランスポゾンベクター

遺伝子を細胞に導入する操作に用いる運び屋の一種で、目的の遺伝子を高効率に細胞のゲノムに組み込み、組み込み後に除去が可能なもの。

注15 野生型

バリエントの中で最も多くみられる型のこと。

注16 次世代シーケンサー

DNAの配列を、従来法と比べて桁違いに迅速かつ大量に決定できる実験機器。

注17 ACMG 分類

米国臨床遺伝・ゲノム学会(American College of Medical Genetics and Genomics)の提唱する、遺伝子バリエントの病的意義分類。

注18 IARC 分類

国際がん研究機関(International Agency for Research on Cancer)が疫学研究をもとにして判定したバリエントの病的意義分類。

注19 ドメイン

タンパク質の一部で他の部分とは独立した機能を持った構造。

注20 ベイズ推定

過去に得られたデータと新たに得たデータをもとにして、不確実な事柄を予測する統計手法。

問い合わせ先

- 研究に関する問い合わせ

国立研究開発法人国立がん研究センター

研究所 細胞情報学分野

高阪 真路(こうさか しんじ)

電話番号：03-3542-2511(代表)

E-mail: skohsaka@ncc.go.jp

- 広報窓口

国立研究開発法人国立がん研究センター

企画戦略局 広報企画室

電話番号：03-3542-2511(代表) FAX: 03-3542-2545

E-mail: ncc-admin@ncc.go.jp

国立大学法人東京大学

医学部・大学院医学系研究科総務係

電話番号：03-5841-3303

E-mail: ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

国立研究開発法人理化学研究所

広報室 報道担当

電話番号：048-467-9272 FAX: 048-462-4715

E-mail: ex-press@riken.jp

- AMED 事業に関するお問い合わせ先

国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)

疾患基礎研究事業部 疾患基礎研究課

電話番号：03-6870-2225

E-mail: cancer@amed.go.jp