

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関	山梨県立中央病院ゲノム解析センター
職名・氏名	研究員・弘津 陽介 ㊞

1 研究テーマ

遺伝性腫瘍のゲノム解析によるがん個別化予防・治療の推進

2 研究の目的

家系内に多数の癌発症者が集積し、自分自身に遺伝的素因があるか不安に感じる方がいる。遺伝的素因を持つ方は、30-50代と若くして癌を発症するリスクがあり、働き盛り・子育て世代の方にも認められる。遺伝子技術の進歩により、遺伝的な素因が有るか無いかをあらかじめ知り予防的な措置を取ることで、生涯にわたってがんの発症リスクからの不安を取り除くことができるようになってきた。すでに癌を発症している場合、BRCA1またはBRCA2遺伝子に病的変異を認めた患者に対しては、分子標的薬であるPARP阻害剤が効果を示すことが知られ、遺伝子異常に対して効果的ながん治療を選択する上でも重要である。本研究では、がん発症に関わる遺伝子群の網羅的解析を進め、がん予防・治療に繋げることを目的とする。

3 研究の方法

ゲノム解析に同意を得た患者の末梢血からバフィーコートDNAを抽出する。BRCA1/2遺伝子の全エクソン領域を標的にプライマーを設計し、マルチプレックスPCRにより増幅する。PCRアンプリコンにアダプター、バーコードを付加し、ライブラリーを作成する。ライブラリーを磁器ビーズで精製後、定量PCRで濃度を測定する。等濃度の混合ライブラリーを作成後、エマルジョンPCRでライブラリー増幅し、半導体チップにサンプルを加える。次世代シーケンサーでBRCA1/2遺伝子領域を解析後、生殖細胞系列変異を検出するパイプラインにて変異を同定する。タンパク質の構造に影響するナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライス変異をフィルタリングで絞り、病的変異とした。また、ミスセンス変異については、各種データベース、臨床背景、文献情報等を考慮し、病的な意義を総合的に検証した。

4 研究の成果

(1) BRCA1/2遺伝子変異およびコピー数欠失を高精度に同時検出する解析系構築と検証

乳癌卵巣癌の生殖細胞系列変異には大きく分けて2種類ある。ひとつは、Single Nucleotide Variant (SNV)、挿入欠失 (INDEL) 等の小さな変異で、他にはエクソンレベルで挿入欠失が起こる Structural Variant (SV) 等の大きな変異である。従来、小さな変異に

留意事項

3枚程度で作成してください。

特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

対してはサンガー法が、大きな変異に対しては Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法による解析で、臨床的な診断が行われてきた。しかし、これらの方法は異なる2種の解析を実施しなければならないため、時間・コストの面で大きな負担が生じる。近年、一度の解析で大量のデータを得ることができる次世代シーケンズ解析 (NGS) が注目されている。本研究では NGS 解析により、*BRCA1/2* 遺伝子の小さな変異および大きな変異を同時に高感度に検出する解析系の構築と検証を行った。すでに変異の情報が既知の147検体を用いて、同時検出系の感度・特異度を測定した。その結果、新たに構築した系では高感度に SNV、INDEL、SV を検出することに成功した。また、新規に構築した解析系では、従来のアッセイ系では検出できなかったホモポリマー領域の変異についても同定できた。本解析系は、従来の解析系に比べ、コストを8割削減し、解析時間の短縮につながった。本成果は、小さな変異・大きな変異を同時に高精度に検出できる解析系として、英文科学雑誌 *Oncotarget* に受理された。

(2) 機能的意義不明なミスセンス変異のバイオインフォマティクス解析

BRCA1/2 遺伝子を解析した際に、データベースに登録されていない非常に稀な多型が検出されることがある。こうした稀な多型は、遺伝子機能にどのような影響を与えるか不明であり、Variants of Uncertain Significance (VUS) と呼ばれている。VUS のタンパク質機能への寄与度を解析するため、想定しうる86億変異に対して順位付けした Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) 法で解析した。本手法による統計学的な *in silico* 解析でタンパク質機能予測を実施し、機能面への影響をデータベースと照合して相関を調べた。当院で検出した VUS について調べたところ、CADD スコアによる順位付けのデータは、タンパク質機能への影響を予測することが可能であった。本手法を用いることで、今後新たに同定される VUS の評価につながることを期待される。本成果は、英文科学雑誌 *Cancer Science* に受理された。

5 今後の展望

高精度に SNV, INDEL, SV 変異を同時に検出する解析系が構築できたことにより、生殖細胞系列変異の同定が低コストで速やかに同定することが可能になる。また、解析によって同定される VUS についても機能面の推定が可能になったことで、遺伝性癌のリスク予想および予防・治療選択をする上で重要になると考えられる。今後、生殖細胞系列の遺伝子の情報が蓄積することで、日本人の発がんリスクを評価することにつながる。さらに、ヒトのみならず他の生物種との比較ゲノム解析をすることで、遺伝子異常の機能面での評価が正確なものになることが予想される。現在、他施設との共同研究を進めており、これらの課題の解決を実施している。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

研究成果は、英文科学雑誌に投稿し受理された。また、第55回日本癌治療学会学術集会(パ

留意事項

3枚程度で作成してください。

特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

シフイコ横浜)で口頭発表した。今後も研究成果を発信したいと考えている。

Simultaneous detection of genetic and copy number alterations in BRCA1/2 genes.

Hirotsu Y, Ooka Y, Sakamoto I, Nakagomi H, Omata M.

Oncotarget. 2017;8(70):114463-114473

Combined annotation-dependent depletion score for BRCA1/2 variants in patients with breast and/or ovarian cancer.

Nakagomi H, Mochizuki H, Inoue M, Hirotsu Y, Amemiya K, Sakamoto I, Nakagomi S, Kubota T, Omata M.

Cancer Sci. 2018;109(2):453-461.

次世代シーケンス解析による *BRCA1/2* 遺伝子変異とコピー数異常の高精度同時測定系の構築

弘津陽介、大岡美彦、中込博、坂本育子、小俣政男

癌治療学会 2017年10月20日(金)~22日(土) パシフィコ横浜

留意事項

3枚程度で作成してください。

特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。