

# 日本医療研究開発機構 ゲノム創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）発がん関連遺伝子における生殖細胞系列バリエーションのハイスループット機能解析法に関する研究開発

（英語）Study of high-throughput functional analysis for germline mutation related to tumorigenesis

研究開発実施期間：令和4年4月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）高阪 真路

（英語）Shinji Kohsaka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）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・分野長

（英語）Division of Cellular Signaling, National Cancer Center Research Institute

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

*BRCA1/2* 遺伝子は遺伝性乳癌卵巣癌症候群（hereditary breast and ovarian cancer syndrome: HBOC）の原因遺伝子の一つであるため、*BRCA1/2* バリエーションの機能評価をすることは、予防医学の観点において重要である。また、*BRCA1/2* の病的バリエーションは白金製剤や DNA 修復にかかわる酵素である poly ADP-ribose polymerase (PARP) 阻害薬の奏効における予測因子として示されており、薬効予測の上での意義も大きい。

一方で、*BRCA* 等の遺伝性腫瘍の原因遺伝子の多くは、がん抑制遺伝子の機能欠失であることから、hotspot が存在する機能獲得型のがん遺伝子に比べ、変異の解釈が困難である場合が多い。NCBI で運営されているデータベース ClinVar には *BRCA1/2* の意義不明のバリエーション（variant of unknown significance: VUS）が 5 千バリエーション以上登録されており、臨床上の課題となっている。

本研究ではハイスループット機能解析法である MANO-B 法を用い、*BRCA1/2* の網羅的機能解析を行い、データベースを構築し、PARP 阻害薬の治療効果判定等の臨床的データとの相関を評価した。また、MANO-B 法によるスコアリングシステムを構築し、HBOC の診断や PARP 阻害薬適応の判断として妥当性を検証した。更に、MANO-B 法を遺伝性腫瘍の関連遺伝子の機能解析に応用し、ゲノム医療で発見される生殖細胞系列の VUS を網羅的に解析するプラットフォームを構築することを目指した。

臨床シーケンスによって同定された *BRCA* バリエーション情報の収集として、C-CAT に蓄積された国内の遺伝子パネル検査のデータベースや ClinVar などの公共データベースを参照し、生殖細胞系列における *BRCA1/2* バリエーション情報を収集した。その内、既知の病的バリエーションを 100 種類、良性バリエーションは 100 種類を ClinVar より選定し、VUS は 896 種類を選定した。さらに行われた治療やその反応性等の臨床情報を収集した。

MANO-B 法による *BRCA1/2* バリエーションのハイスループット機能解析として、PCR site-directed mutagenesis による変異遺伝子を作成した。野生型 *BRCA1/2* cDNA を鋳型とし、高精度の PCR 酵素を用いた PCR site-directed mutagenesis の手法で 1000 種類以上の変異遺伝子を作成した。バリエーション固有の 10 塩基長の barcode 配列を付加し、抗菌薬耐性遺伝子と piggyBac トランスポゾン配列を含むベクターに標的遺伝子を組み込んだ。

*BRCA1* の安定的導入系の確立を行い、DLD1 親株に piggyBac トランスポゼースを用いて *BRCA1* の cDNA をゲノムに組み込み、安定発現させた。その安定発現株に 3' UTR を標的とした shRNA を用いて *BRCA1* をノックダウンし、相同修復能機能アッセイ法である DR-GFP 法や、PARP 阻害薬に対する薬剤感受性試験を cell viability assay を用いて実施した。DLD1 親株では shRNA による *BRCA1* ノックダウンにより PARP 阻害薬感受性が亢進する一方で、*BRCA1* 安定発現株では感受性亢進がみられないことから、DLD-1 細胞株における *BRCA1* 機能解析が可能であることを確認した。

前向き臨床データによる BRCA スコアリングシステムの POC 取得として、家族性乳癌が疑われる患者において見つかった新規の VUS である、*BRCA2* c.7847C>T (p.Ser2616Phe) の機能評価を前向きに行った。解析結果として pathogenic が示唆され、この結果を基に、ACMG ガイドラインによりバリエントの再評価が行われ、臨床的意義が修正された。機能解析が実臨床の治療判断に直結しうることを示した非常に重要な知見であったため、この成果をまとめて発表した (Yamazawa K, et al. Cancer Sci.)。

臨床データによる MANO-B 法の臨床的妥当性・有用性の評価としては、MANO-B 法での pathogenicity 及び感受性予測結果と実際の BRCAAnalysis や HRD score での判定結果との相関を検証し、PARP 阻害薬の投与が行われた症例における治療効果判定との相関を評価した。

MANO 法による遺伝性腫瘍関連遺伝子変異のハイスループット機能解析法の樹立としては、細胞株バンクより評価対象遺伝子の機能欠損した細胞株を購入、あるいは siRNA や CRISPR を用いてノックダウン/アウト細胞株を樹立した。それらの機能欠損した細胞に野生型の遺伝子を導入し、細胞の形質の変化を評価した。細胞に形質変化を確認できた *PALB2*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2* では、分析的妥当性の検証として既知の病的バリエントおよび良性バリエントを各遺伝子 10 種類程度クローニングし、MANO 法により細胞競合下での機能解析が可能かを検討した結果、解析系が妥当であることが確認された。さらにそれぞれ約 100 種類のバリエントをデータベースより抽出してハイスループットの機能評価を進めた。*PALB2* の機能解析では、164 バリエントを作製し、評価を行った。その内、5 バリエントが病的バリエントとして疑われた。*PMS2* の機能解析では 48 バリエントを作製し、評価を行った。その内、5 バリエントが病的バリエントとして疑われた。

以上、本研究課題の成果として、様々な遺伝性腫瘍関連遺伝子変異のハイスループット機能解析法が確立され、大規模ゲノム医療データで報告される生殖細胞系列の VUS を網羅的に解析するプラットフォームが構築されたと共に、個々の症例における VUS の機能解析を行い診断や予防に活用される可能性が示された。今後の研究計画としては、AI・機械学習の活用による診断精度向上を目指し、大規模データを用いて、AI アルゴリズムにより高精度な診断モデルを構築し、個別化医療への展開を図る。これにより、発症リスク予測や薬剤効果予測の精緻化が進み、がんの予防や最適な治療薬選択に大きく貢献されることが見込まれる。

In this study, we performed a comprehensive functional analysis of *BRCA1/2* using the MANO-B method, a high-throughput functional analysis method, and constructed a database and evaluated the correlation with clinical data such as the determination of therapeutic efficacy of PARP inhibitors. We also constructed a scoring system using the MANO-B method and validated it as a method for diagnosing HBOC and determining the indication for PARP inhibitors. Furthermore, we applied the MANO-B method to functional analysis of genes related to hereditary tumors, aiming to establish a platform for comprehensive analysis of germline VUS discovered in genomic medicine.

To collect information on *BRCA* variants identified by clinical sequencing, we referred to domestic gene panel test databases accumulated in C-CAT and public databases such as ClinVar to collect information on *BRCA1/2* variants in germline series. Of these, 100 known pathological variants and 100 benign variants were selected from ClinVar, and 896 VUS were selected. In addition, clinical information such as treatments given and their responses were collected.

As a high-throughput functional analysis of *BRCA1/2* variants using the MANO-B method, we generated mutant genes by PCR site-directed mutagenesis. More than 1000 variant genes were generated by PCR site-directed mutagenesis using wild-type *BRCA1/2* cDNA as a template and highly accurate PCR enzymes. A variant-specific 10-base length barcode sequence was added, and the target gene was incorporated into a vector containing an antimicrobial resistance gene and a piggyBac transposon sequence.

As a POC acquisition for the BRCA scoring system with prospective clinical data, a functional evaluation of *BRCA2* c.7847C>T (p.Ser2616Phe), a novel VUS found in patients with suspected familial breast cancer, was performed prospectively. The results of the analysis suggested pathogenic, and based on these results, the variant was reevaluated by the ACMG guidelines and its clinical significance was revised. The results of this study are summarized and presented in this paper (Yamazawa K, et al. Cancer Sci.), because these findings were very important in showing that functional analysis can be directly related to real clinical treatment decisions.

To evaluate the clinical validity and usefulness of the MANO-B assay using clinical data, the correlation between the pathogenicity and susceptibility predicted by the MANO-B assay and the actual results of the BRCAAnalysis and HRD score was verified, and the correlation between the results and the judgment of treatment efficacy in patients who received a PARP inhibitor was evaluated. The correlations between the results of the PARP inhibitor

To establish a high-throughput functional analysis method for hereditary tumor-related gene mutations using the MANO method, we purchased cell lines with loss-of-function of the gene under evaluation from a cell line bank, or established knockdown/out cell lines using siRNA or CRISPR. Wild-type genes were introduced into these functionally deficient cells, and changes in cell traits were evaluated. In *PALB2*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, and *PMS2*, where we were able to confirm the changes in the cells, we cloned about 10 known pathological and benign variants of each gene for analytical validation and examined whether functional analysis under cell competition was possible by the MANO method, which confirmed that the analytical system was valid. The results confirmed the validity of the analysis system. In the functional analysis of *PALB2*, 164 variants were generated and evaluated. For functional analysis of *PMS2*, 48 variants were generated and evaluated, of which 5 variants were suspected as pathological variants. Of these, 5 variants were suspected as pathological variants.