

博士論文

がん抑制遺伝子 BRCA2 変異体の新規機能解析法の開発

池上 政周

がん抑制遺伝子 BRCA2 変異体の新規機能解析法の開発

所属 医学系研究科外科学専攻整形外科学

指導教員 田中 栄 教授

学位申請者 池上 政周

目次

略語表	1 頁
要旨	3 頁
第 1 章 序文	4 頁
第 2 章 実験材料および方法	23 頁
2-1. 細胞培養	23 頁
2-2. <i>BRCA2</i> バリアントの選択	23 頁
2-3. ベクターの作成	25 頁
2-4. トランスポゾンを用いた遺伝子の安定導入	26 頁
2-5. デジタルドロップレット PCR	27 頁
2-6. リアルタイム RT-PCR	28 頁
2-7. Western ブロット	29 頁
2-8. 細胞生存アッセイ	30 頁
2-9. MANO-B 法	31 頁
2-10. モデルの評価	32 頁

2-11.	階層ベイズモデリング	32 頁
2-12.	ベイズ推定	37 頁
2-13.	予測精度検査	38 頁
2-14.	DR-GFP レポーターアッセイ	38 頁
2-15.	統計学的解析	39 頁
第 3 章 結果		49 頁
3-1.	<i>BRCA2</i> バリアントの安定発現系の確立	49 頁
3-2.	細胞生存アッセイ	52 頁
3-3.	MANO-B 法による 107 バリアントの機能解析	56 頁
小括 1		65 頁
3-4.	ベイズ推定を用いた 244 バリアントの機能解析	66 頁
3-5.	モデルの検証	82 頁
3-6.	HDR アッセイとの比較	85 頁
小括 2		87 頁
3-7.	迅速な病的意義判定システムの構築	88 頁

小括 3	93 頁
第 4 章 考察	94 頁
第 5 章 結語	104 頁
謝辞	105 頁
引用文献	106 頁

略語表

ABCD: Accurate BRCA Companion Diagnostic

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

BA: benign stand-alone

BF: Bayes factor

BP: benign supporting

BS: benign strong

CI: Credible interval

CTD: C-terminal domain

DBD: DNA-binding domain

DMSO: dimethyl sulfoxide

DR-GFP: direct repeat–green fluorescent protein

FACS: fluorescence-activated cell sorting

FH: family history

GFP: green fluorescent protein

HBOC: Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer syndrome

HCI: Huntsman Cancer Institute

HD: helical domain

HGVS: Human Genome Variant Society

IARC: International Agency for Research on Cancer

LL: lower limit

LOF: loss of function

MAF: minor allele frequency

MANO: mixed-all-nominated-mutants-in-one

MBD: MEILB2-binding domain

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NLS: nuclear localization signal

OB: oligonucleotide/oligosaccharide-binding domain

PARP: poly (ADP-ribose) polymerase

PM: pathogenic moderate

PP: pathogenic supporting

PS: pathogenic strong

PVS: pathogenic very strong

SPiCE: Splicing Prediction in Consensus Element

TAD: transactivation domain

TIR: terminal inverted repeat

UL: upper limit

VUS: variants of unknown significance

要旨

BRCA2 は遺伝性乳がん・卵巣がん症候群の原因となるがん抑制遺伝子であり、数千種類に及ぶ病的意義不明なバリエントが遺伝子検査で発見されている。本研究では *BRCA2* 遺伝子の新規機能解析法である MANO-B 法を構築し、これまでに機能が知られていない 186 種類のバリエントについて、その病的意義を検討した。*BRCA2* 欠損細胞株を用いたバリエントの機能解析およびベイズ階層モデルを用いた病的意義の判定を行った。その結果、126 種類の正常な機能のバリエントと、37 種類の病的バリエントを新たに同定した。また、MANO-B 法の臨床応用の一例として迅速な病的意義判定システムを構築した。

第 1 章

序文

全国がん登録によれば、日本人の女性の生涯累積罹患率は乳がんでは 9%、卵巣がんでは 1%であると報告されており、乳がんは最も頻度の高いがんである。一般にがんは遺伝性疾患ではないものの、乳がん・卵巣がんのうちおよそ 10%は遺伝性に生じることが知られている。特にがん抑制遺伝子である *BRCA1* および *BRCA2* の 2 種類の遺伝子のいずれかに病的な生殖細胞系列変異を有する場合は遺伝性乳がん・卵巣がん症候群（Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer syndrome: HBOC）と呼ばれ、米国 National Comprehensive Cancer Network の報告では生涯累積罹患率が乳がんで 41–90%、卵巣がんで 8–62%と高く、また若年での発がんや多発性発がんの傾向が見られる[1]。HBOC の患者に対しては発がんリスク低減手術である予防的乳房切除術および卵巣・卵管切除術や定期的なサーベイランスに加え、血縁者の遺伝子検査が治療上の選択肢となる（図 1）[2–4]。

細胞内に存在する DNA は紫外線、活性酸素、化学物質などにより常に損傷を受けている。DNA の損傷を正しく修正できず異常が生じれば、遺伝子の機能や染色体構造が変化し、細胞の生存に重大な影響を与えうる。DNA 損傷の修復のため、細胞には塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復、相同組み換え修復といった様々な機構が備わっている。*BRCA1* および *BRCA2* は DNA 二本鎖切断に対する相

同組み換え修復機構の鍵となるタンパク質をコードする遺伝子であり、*BRCA1* あるいは *BRCA2* の機能を喪失した細胞では DNA 損傷の修復が不十分となり DNA の異常が蓄積する (図 2 A)。HBOC 患者の正常細胞では、*BRCA1* あるいは *BRCA2* の片方の対立遺伝子に病的変異があっても、もう一方の対立遺伝子から正常な機能を持つ *BRCA1* あるいは *BRCA2* タンパクが産生されることから DNA 損傷修復機構の機能は保たれている。しかし、何らかの原因で両方の対立遺伝子とも *BRCA1* あるいは *BRCA2* の機能が喪失した細胞は、DNA の異常の蓄積が亢進することでがん細胞へ変化しやすくなると考えられる。HBOC 患者では二段階発がん仮説における 1 ヒット目の変異が既に生じていることから、健常人よりも容易に *BRCA1* あるいは *BRCA2* の両対立遺伝子の機能を喪失するため発がんリスクの上昇が生じているのである。ただし、その詳細は明らかになっていない。

また、*BRCA1* あるいは *BRCA2* の機能喪失により相同組み換え修復機構が破綻しているがんでは、白金製剤による化学療法や poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害薬への感受性が高い傾向があることが知られている [5, 6]。PARP は DNA 一本鎖切断を認識して塩基除去修復を行う機能を持つタンパクである (図 2 B)。細胞内の DNA に一本鎖切断が生じた場合、塩基除去修復により修復され、細胞は生存することができる。DNA 一本鎖切断が修復されない場合、引き続き DNA 二本鎖切断が生じ、相同組み換え修復により修復される。細胞の DNA は上記の二重の機構で保護されており、

一方の機能が損なわれても他方で代償される仕組みになっている。そのため、相同組み換え修復が正常に行なわれている細胞に PARP 阻害薬を投与しても生存が可能である。しかし、*BRCA1* あるいは *BRCA2* 欠損細胞に PARP 阻害薬を投与すると、DNA 修復がうまくいかなくなり細胞死が誘導される (図 2 C)。このように、二つの機構の両方を阻害したときのみ細胞死が誘導される現象を合成致死と呼ぶ。PARP 阻害薬の一つであるオラパリブは既に *BRCA1* あるいは *BRCA2* 病的変異を有する乳がん・卵巣がん患者に対して臨床の場で使用されている。PARP 阻害薬は正常細胞へのダメージが少なくがん細胞のみを死滅させる効果を持つため、副作用が比較的少ないことが知られている。一方で PARP 阻害薬は相同組み換え修復能が正常な腫瘍には効果がないため、投与前に *BRCA1* あるいは *BRCA2* 病的変異の有無の検査を行う必要がある。このような治療とペアとなって事前に治療効果を予測できる検査をコンパニオン診断と呼ぶ。

遺伝子検査やがんゲノム研究の進展に伴い、がん抑制遺伝子である *BRCA2* には 2 万種類以上のバリエーションが発見され、BRCA Exchange (<https://brcaexchange.org>)をはじめとした公共データベースに登録されている[7]。ナンセンスバリエーションやフレームシフトバリエーションといった *BRCA2* の短縮型バリエーションは相同組み換え修復に必要なドメインを欠損させるため病的となることが知られている。しかし、数千種類発見されている非短縮型非同義バリエーションのほとんどは健常人集団にもがん患者にも存在

頻度が低いため、症例対照研究を行っても十分な統計学的な検出力がなく病的意義を判定することが困難であり、BRCA Exchangeをはじめとした公共データベースでは病的意義不明バリエーション（variants of unknown significance: VUSs）とみなされている（表1）[7]。VUSは発がん要因となるとはいえないため保持者への積極的な治療は行われませんが、病的意義が否定もできないため保持者へ不安を与えてしまうことから、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る（図1）。

BRCA2 バリエーションの病的意義を判定する方法として、国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer: IARC）および米国臨床遺伝・ゲノム学会（American College of Medical Genetics and Genomics: ACMG）の分類が標準的に用いられており、いずれの分類でも benign、likely benign、uncertain significance、likely pathogenic、pathogenic の5段階でバリエーションの病的意義を判定する[8-14]。IARC分類は疫学的データのみを基にして定義されるのに対し、ACMG分類は疫学的データだけでなく、コンピュータによる機能予測や基礎実験による機能解析などの様々なデータを採用し総合的に病的意義を判定するという差異がある。また、バリエーションと疾患の関連性について専門家が検証し作成された臨床的データベースとして、ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)や BRCA Exchange が高い信頼性を有している。いずれの手法やデータベースにおいても、病的意義を判定する上で最も重視されているのは疫学的データである。あるバリエーションが健常人集団よりもがん患者・が

ん家系に集積しているかどうか (co-segregation) や、既知の病的バリエントと同時に生じることがあるかどうか (co-occurrence) から、統計学的にそのバリエントが病的である確率を評価できる[9, 10]。しかし、まれなバリエントについては疫学的データを十分に得ることができないという問題がある[11, 12, 15]。ACMG 分類は疫学的データに限定せずエビデンスを採用するため、まれなバリエントの病的意義判定に優れている。コンピュータ予測モデルは実際の頻度によらず全てのバリエントの病原性を予測できるが、現時点で臨床での使用に耐えうるだけの信頼性のあるアルゴリズムは存在しない[16]。ACMG 分類は種々のデータに対して、supporting、moderate、strong、very strong、stand-alone の 5 段階でエビデンスの強さを評価し、更に全てのエビデンスに一定の変換式を適用して最終的な病的意義を判定する (図 3、表 2) [8]。この ACMG 分類の枠組みの中で、基礎実験による機能解析は良悪性の判定における strong evidence として扱われており、疫学的データを補完する重要な位置づけとなっている[17]。生殖細胞系列変異に関する遺伝学的検査によって VUS 保持者と診断された受検者たちに対して臨床的意思決定に有益な情報を提供するため、VUS に対する機能解析を進めることは喫緊の課題であるといえる[18]。

多数のバリエントの機能解析を行うにあたり、個々のバリエントに対して個別に実験を行うと大きな時間と労力を必要とするため、多数のバリエントを同時並行的に一度に実験を行う手法が有効となる。この様な手法をハイスループットな実験手法と呼

ぶ。近年、*BRCA1* 遺伝子のバリエーションに対する機能解析の進展はめざましく、一度に数千バリエーションの機能解析を行えるハイスループット機能解析法が複数開発されている[19-21]。一方、*BRCA2* のバリエーションに対する機能解析は進んでおらず、これまでに機能が調べられたバリエーションは二百種類程度にとどまる。*BRCA2* の相同組み換え能を評価する実験手法のうち最も信頼性が高いとされているのが DR-GFP (direct repeat-green fluorescent protein) レポーターアッセイである (図4) [22,23]。この手法は、DR-GFP レポーターと呼ばれる不完全な *GFP* 遺伝子配列を導入した *BRCA2* 欠損ハムスター細胞株を用いる実験である。DR-GFP レポーター内部の配列を特異的に切断する制限酵素である I-SceI および *BRCA2* バリエーションの2種類のタンパクを同時に一過性に発現させると、相同組み換え修復の過程で正常な *GFP* 遺伝子が形成され、緑色の蛍光を生じる。蛍光活性化セルソーティング (fluorescence-activated cell sorting: FACS) でカウントした蛍光陽性細胞数と、一過性発現させた *BRCA2* バリエーションタンパクの相同組み換え修復能に相関性があることを利用し、バリエーションの病的意義を判定する仕組みである。この DR-GFP レポーターアッセイにおいて、スループットが低いこと、ヒトではなくハムスターの細胞株を使っていること、*BRCA2* の機能を安定発現ではなく一過性過剰発現の実験系で評価していること、*BRCA2* の全配列のうち DNA 結合ドメインという限られた領域だけを評価する系であることが、病的意義を判定する上で問題となっている[18, 24]。しかし、*BRCA2* を両対立遺伝子とも機能喪失したヒト細胞株が限られていること、*BRCA2* が 10,257 塩基対からなる大きな遺

伝子でありバリエーションの安定発現系を作成することが技術的に困難であったため、DR-GFP レポーターアッセイに代わる新たな実験手法は開発されてこなかった[18]。

間野博行研究室では、これまでにがん遺伝子に対する革新的なハイスループット機能解析手法である 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 VUS の機能解析や薬剤感受性の評価を行い報告してきた[25, 26]。MANO 法は、細胞株にがん遺伝子のバリエーションを導入した isogenic な細胞株を樹立し、そのがん遺伝子に対する分子標的薬を投与した際の細胞生存率を測定することで、バリエーション発現細胞が薬剤感受性なのか薬剤耐性を持つのかを判定する実験系である。特徴的なのは、バリエーションを細胞に導入する際にバリエーションと一対一対応する数塩基の配列 (バーコード配列) を非タンパクコード領域に付加している点である。全てのバリエーション導入細胞を混合した上で導入遺伝子を標的とした分子標的薬などの薬剤を投与し、数日後に細胞を回収する。ゲノム DNA を抽出した後、バーコード配列領域を PCR で増幅し、次世代シーケンサーでディープシーケンスすると、バリエーション導入細胞の生存細胞数に比例して各バーコード配列のリード数が得られる。この実験系は全てのバリエーション導入細胞を全く同一の培養条件下で処理することができるため、実験手技に伴うバイアスが軽減できる点、数百種類のバリエーションを一回の実験で同時に評価できる点で、各バリエーションに対して個別に実験を行う実験系と比して優位点がある。しかし、MANO 法はレトロウイルスを用いた実

験系であるため、導入できる遺伝子の大きさに制限があること、またがん抑制遺伝子の評価には対応していないことから、*BRCA2* 変異体の機能解析に直接用いることは困難であった。

BRCA2 遺伝子の機能解析法を新たに開発するうえで、まず、細胞へ *BRCA2* 遺伝子を安定導入する手法を比較検討した (表 3)。10.2 kbp である *BRCA2* 遺伝子を導入可能な手法のうち、トランスフェクションやエレクトロポレーションによる一過性発現後に薬剤選択を行い、単一コロニーをピックアップする手法は、効率が悪く目的とするハイスループットな実験系を得ることができないと判断した。そこで、piggyBac トランスポゾンを用いて *BRCA2* バリエントを細胞に導入することにした[27,28]。また、*BRCA2* と PARP との合成致死の関係性を利用して、*BRCA2* 欠損ヒト細胞株に様々な *BRCA2* バリエントを導入し安定発現株を樹立した上で PARP 阻害薬を投与し、得られた細胞生存率からバリエントの機能を推定する評価系を樹立することにした[29,30] (図 5)。これと MANO 法の手法を組み合わせ、DR-GFP レポーターアッセイと異なり *BRCA2* バリエントの安定発現系に基づいた新たな *BRCA2* バリエントのハイスループット機能解析法が可能になると考え、本研究を開始した。

本研究においては、MANO 法の発展系として、がん抑制遺伝子である *BRCA2* の機能解析に対応した MANO-BRCA 法 (MANO-B 法) を構築した (図 6)。まず *BRCA2* 遺伝子を *BRCA2* 欠損大腸がん細胞株である DLD1 細胞に piggyBac トランスポゾン

を用いて導入し、安定発現系を確立した。更に、バリエントの機能に相関して PARP 阻害薬への感受性が変化することを確認した。そこで、107 種類のバリエントを作成し、MANO-B 法によってこれら全てのバリエントの機能を一回の実験で解析できることを確認するとともに、その最適な実験条件を同定した。最後に、新たにバリエントを追加して、全 244 バリエントに対して MANO-B 法による各バリエントの定量的機能評価を行った。

MANO-B 法によって推定した各バリエントの機能は、大腸がん細胞株を用いた実験系に基づくものであり、そのまま臨床的な病的意義と関連付けるのは妥当性に欠けると判断した。また、野生型と病的バリエントとの中間的な機能を有するバリエントがあり、ある閾値を境にして病的バリエントと正常な機能を有するバリエントに識別することは困難であった。そこで、各バリエントの病的意義を確率論的に評価・分類することができる、ベイズ階層モデルを用いた病的意義の判定法を構築した。最後に MANO-B 法の臨床応用例として、遺伝子検査で新規に同定されたバリエントに対する迅速な病的意義判定システムを構築した。

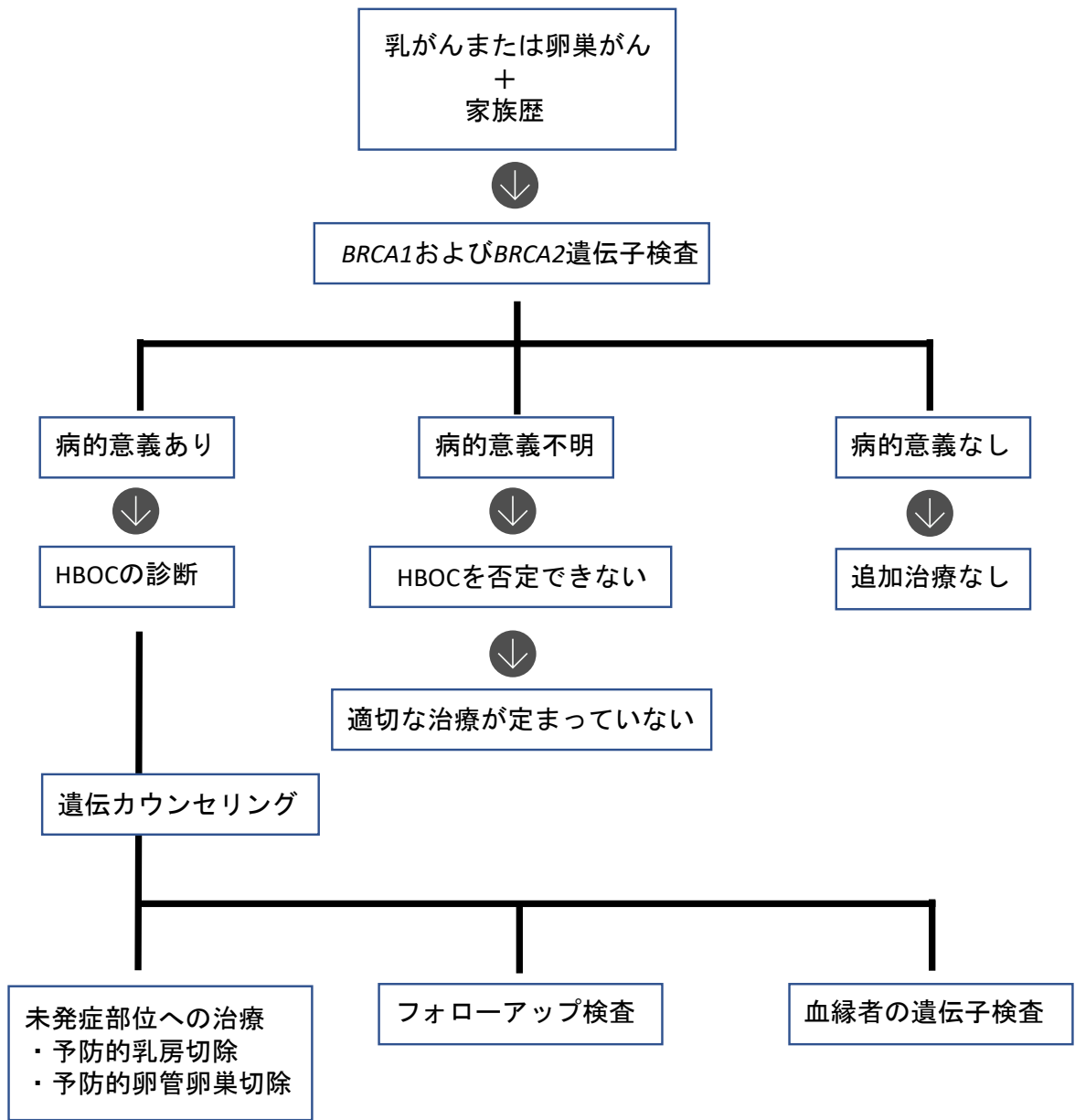


図1 遺伝性乳癌卵巣癌症候群(HBOC)に対する検査と治療の流れ
 家族歴のある乳がんあるいは卵巣がん患者がBRCA1およびBRCA2遺伝子検査を受け、病的意義がない対立遺伝子のみが検出された場合はとくに追加で検査や治療を受ける必要はない。また、病的意義がある対立遺伝子が検出された場合はHBOCと診断される。遺伝カウンセリングを受け、追加治療の必要性についてよく検討した上で、未発症部位の予防的切除、フォローアップ検査、血縁者の遺伝子検査といった対応がなされる。一方で、病的意義不明なBRCA1あるいはBRCA2遺伝子バリエーションが見つかった場合、HBOCとは確定できないため追加の侵襲的処置は行えず、HBOCを否定もできないためフォローアップが不要とも言えない。病的意義不明なバリエーションに対する適切な対応が定まっておらず、医療者と患者に不安を与える結果になっている。

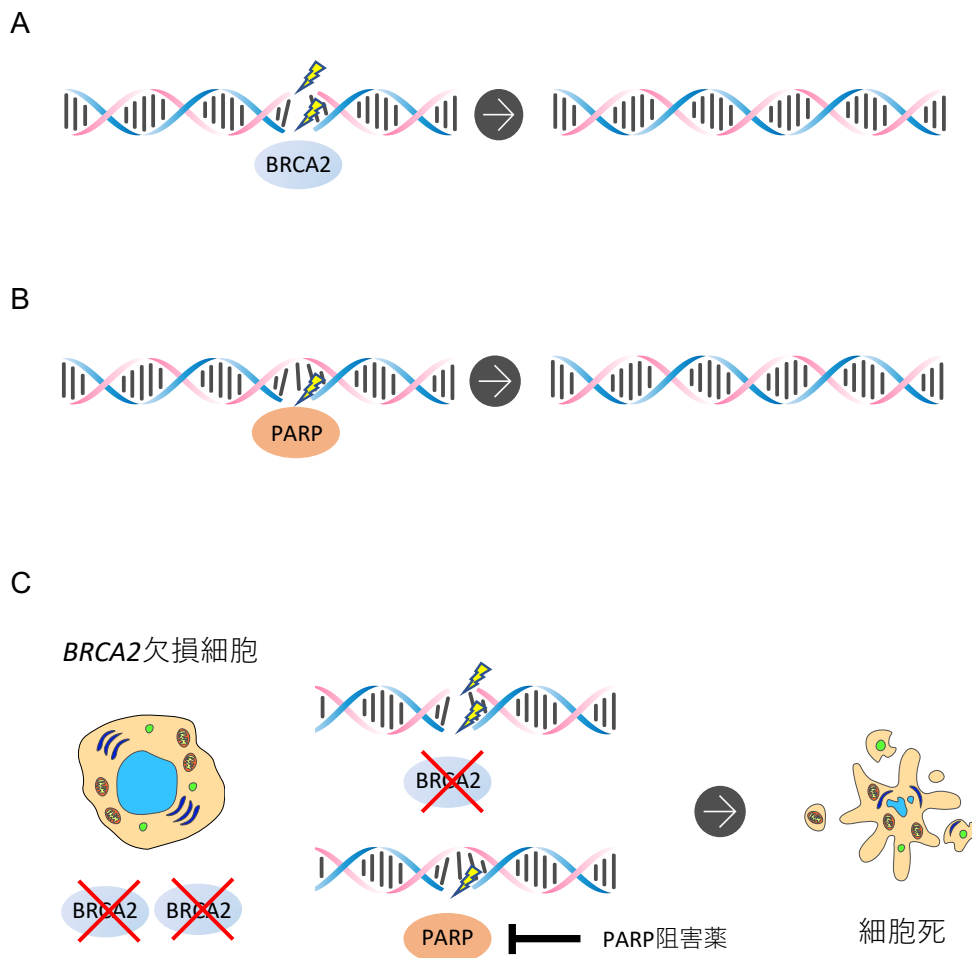


図2 DNA損傷修復の二つの経路

(A) BRCA2はDNAの二本鎖切断損傷を修復する機能を持つ。(B) PARPはDNAの一本鎖切断損傷を修復する機能を持つ。(C) ヒト細胞は二つの*BRCA2*対立遺伝子を持つが、その両者とも機能が喪失した細胞にPARP阻害薬を投与すると、ゲノムDNAの一本鎖切断損傷および二本鎖切断損傷ともに修復が困難となり、ゲノムに高度な障害が生じるため、細胞死に至る。

変異のパターン	病的意義あり	病的意義なし	病的意義不明	合計
短縮型変異	2,620	1	1,119	3,740
非短縮型非同義変異	13	129	6,429	6,571
全ての変異	2,672	1,430	16,603	20,705

表1 BRCA Exchangeによる *BRCA2* バリエントに関する報告

	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very strong
Population data	MAF is too high for disorder BA1/BS1 OR observation in controls inconsistent with disease penetrance BS2			Absent in population databases PM2	Prevalence in affected statistically increased over controls PS4	
Computational and predictive data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product BP4 Missense in gene where only truncating cause disease BP1 Silent variant with non predicted splice impact BP7 In-frame indels in repeat w/out known function BP3	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product PP3	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before PM5 Protein length changing variant PM4	Same amino acid change as an established pathogenic variant PS1	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease PVS1
Functional data	Well-established functional studies show no deleterious effect BS3		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common PP2	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation PM1	Well-established functional studies show a deleterious effect PS3	
Segregation data	Nonsegregation with disease BS4		Cosegregation with disease in multiple affected family members PP1			
De novo data				De novo (without paternity & maternity confirmed) PM6	De novo (paternity and maternity confirmed) PS2	
Allelic data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant BP2 Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant BP2		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant PM3		
Other database		Reputable source w/out shared data = benign BP6	Reputable source = pathogenic PP5			
Other data		Found in case with an alternate cause BP5	Patient's phenotype or FH highly specific for gene PP4			

図3 米国臨床遺伝・ゲノム学会 (ACMG) の提唱するエビデンスの分類法
 様々なエビデンスは、ある変異体が良性バリエーションと病的バリエーションとのどちらであることを示唆するかと、そのエビデンスの確実性などで分類される。BA, benign stand-alone; BS, benign strong; BP, benign supporting; FH, family history; LOF, loss of function; MAF, minor allele frequency; path., pathogenic; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting; PS, pathogenic strong; PVS, pathogenic very strong。(文献番号 [8] Richards et al., 2015 より抜粋、改変)

Clinical significance	Criteria
Pathogenic	(i) 1 Very strong (PVS1) <i>AND</i> (a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) <i>OR</i> (b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) <i>OR</i> (c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) <i>OR</i> (d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) (ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) (iii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> (a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) <i>OR</i> (b) 2 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) <i>OR</i> (c) 1 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Likely pathogenic	(i) 1 Very strong (PVS1) <i>AND</i> 1 moderate (PM1–PM6) (ii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> 1–2 moderate (PM1–PM6) (iii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> ≥ 2 supporting (PP1–PP5) (iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) (v) 2 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> ≥ 2 supporting (PP1–PP5) (vi) 1 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Benign	(i) 1 Stand-alone (BA1) (ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)
Likely benign	(i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) <i>OR</i> (ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
Uncertain significance	(i) Other criteria shown above are not met <i>OR</i> (ii) The criteria for benign and pathogenic are contradictory

表2 米国臨床遺伝・ゲノム学会 (ACMG) の提唱する病的意義判定プロトコル
 渉猟した全てのエビデンスを統合し、統一した規則の基に最終的な病的意義を判定する。BA, benign stand-alone; BS, benign strong; BP, benign supporting; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting; PS, pathogenic strong; PVS, pathogenic very strong. (文献番号 [8] Richards et al., 2015 より抜粋、改変)

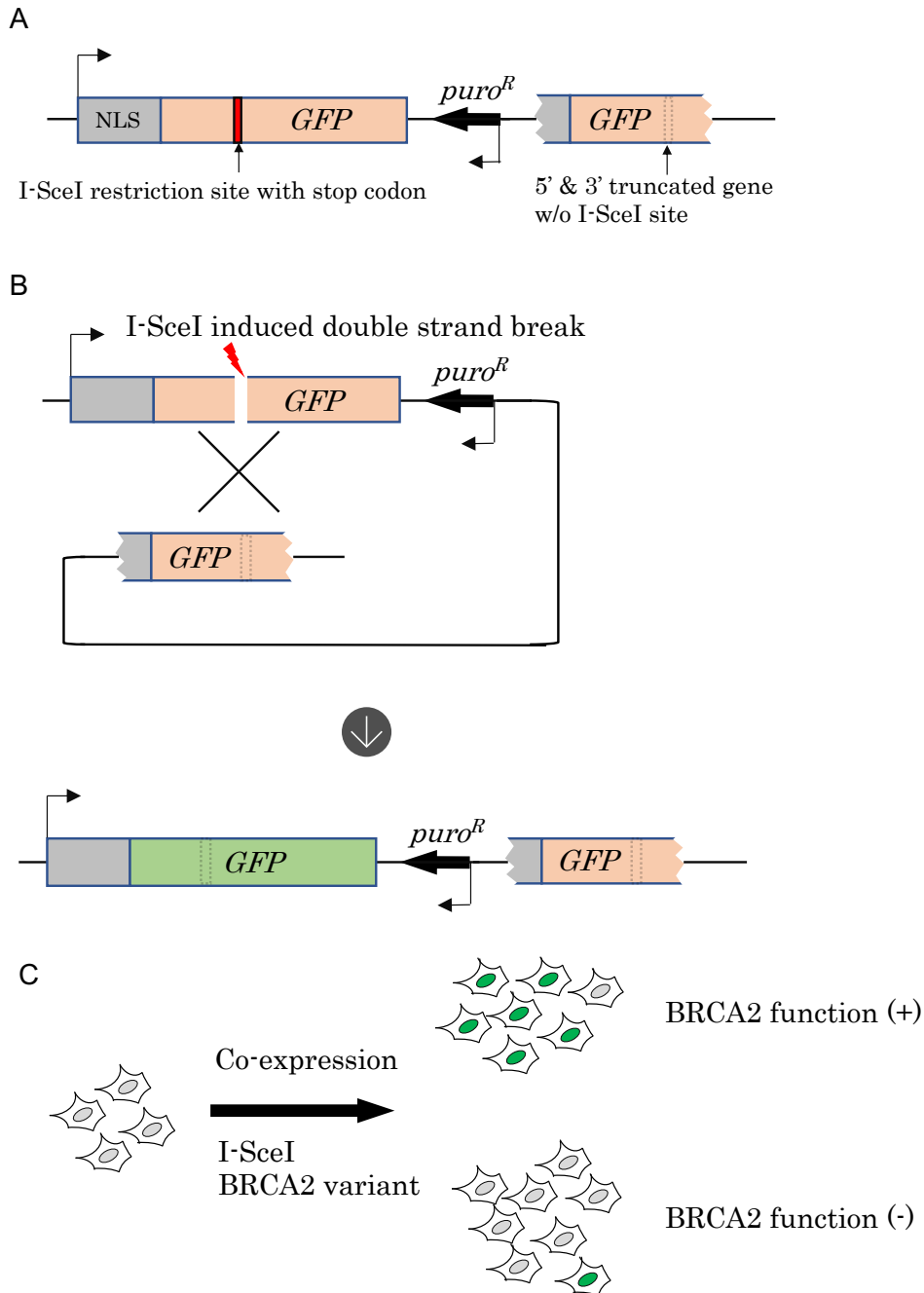


図4 DR-GFPレポーターアッセイによる *BRCA2* 機能解析

(A) DR-GFPレポーターの構造。二つの *GFP* 配列を有しているが、上流の配列は終止コドンが挿入されており、下流の配列は不完全な配列しか持たないため、DR-GFPレポーター導入細胞は蛍光タンパクを発現しない。(B) DR-GFPレポーター導入細胞にI-SceIを一過性に発現させると、上流の *GFP* 配列に二本鎖切断が生じる。これが下流にある部分的な *GFP* 配列と相同組み換え修復を生じると、完全長の *GFP* が発現するようになり、細胞は緑色蛍光を発する。(C) DR-GFPレポーター導入細胞にI-SceIと *BRCA2* バリエントを共発現させると、*BRCA2* バリエントの機能が正常であれば *GFP* 蛍光細胞が多く生じ、機能喪失型バリエントであれば *GFP* 蛍光細胞数は少なくなる。これをFACSで測定し、*BRCA2* バリエントの機能解析を行う。GFP, green fluorescent protein; NLS, nuclear localization signal; FACS, fluorescence-activated cell sorting, w/o; without.

遺伝子導入手法	導入サイズ	安定導入効率
トランスフェクション	制限なし	低い
エレクトロポレーション	制限なし	低い
レンチウイルス レトロウイルス	8-9 kbp	高い
トランスポゾン	制限なし	中間

表3 細胞への遺伝子安定導入手法

いずれの手法も導入効率は100%ではないため、薬剤などによる導入細胞の選択が必要となる。

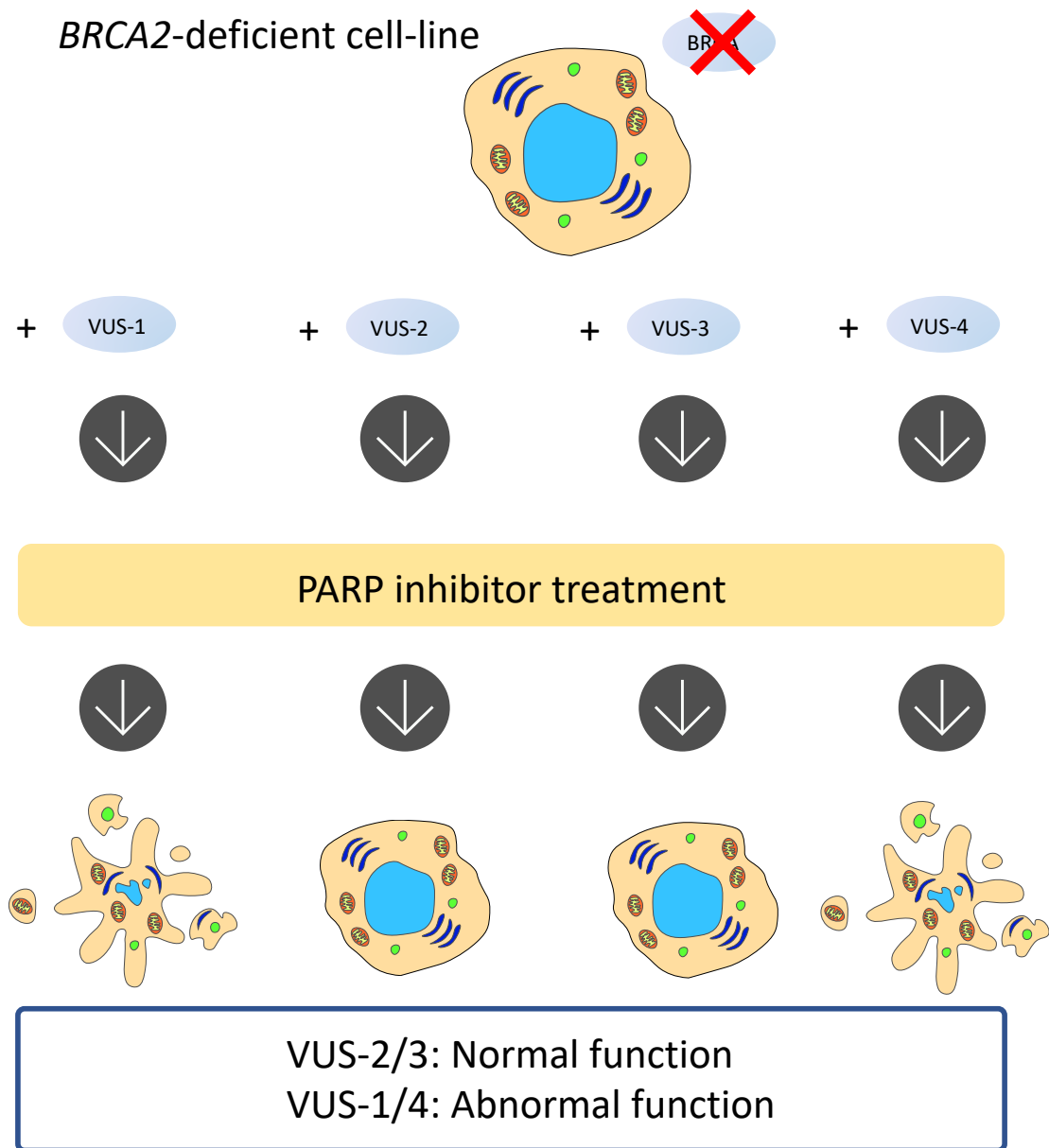


図5 *BRCA2*バリエントの機能解析法の開発コンセプト

*BRCA2*欠損細胞株に*BRCA2*バリエントを安定導入後、PARP阻害薬を投与すると、相同組み換え修復能のあるバリエントを導入した細胞は生存し、相同組み換え修復能を喪失したバリエントを導入した細胞は死滅する。この実験を多数のバリエントに対して同時並行的に行うハイスループットな実験系を構築する。VUS, variant of unknown significance.

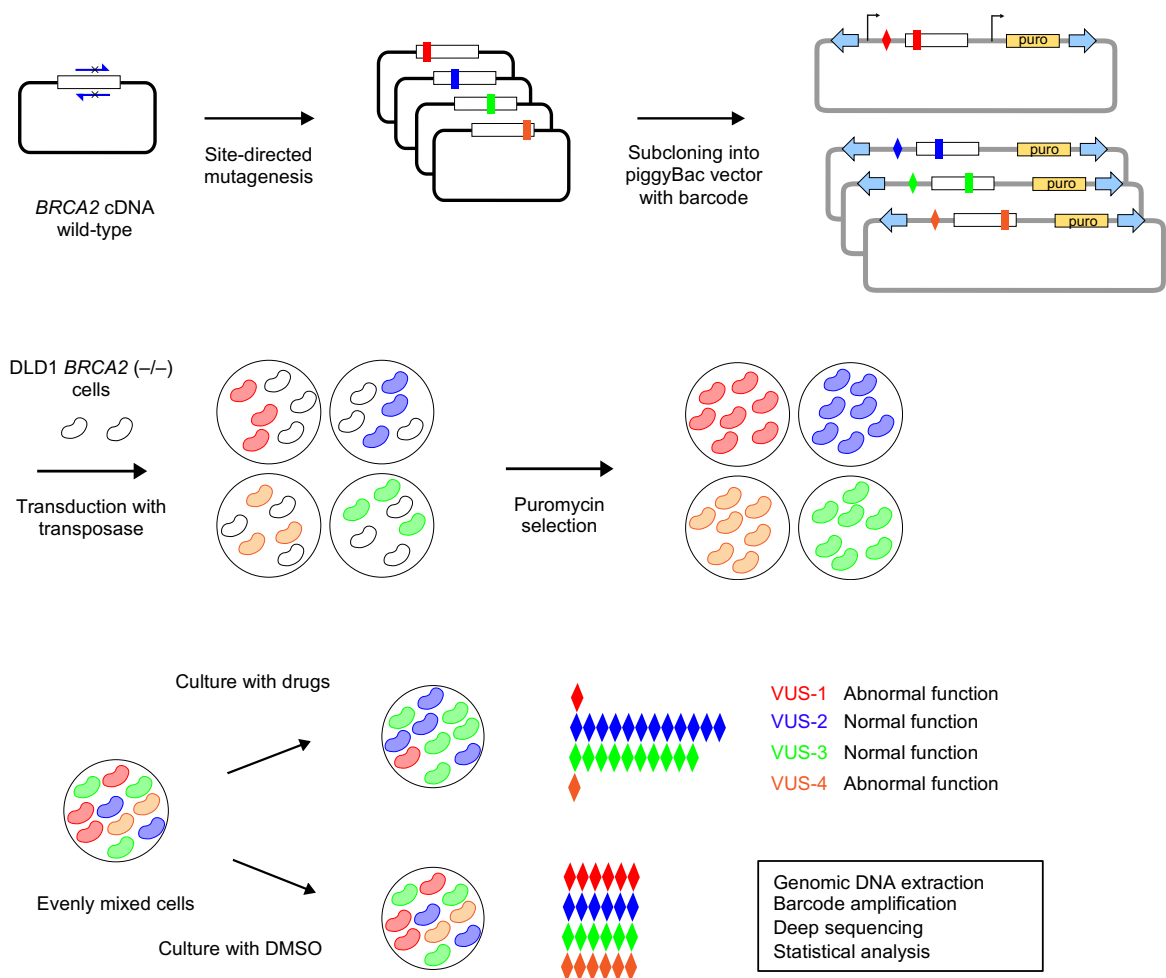


図6 MANO-B法の概略

目的とする *BRCA2* バリエントを site-directed mutagenesis により作成した後、バーコードとなるユニークな塩基配列を持った piggyBac トランスポゾンベクターにサブクローニングする。これを DLD1 *BRCA2* 欠損細胞株に導入後、ピューロマイシンによって選択し、各バリエントの安定発現株を作成する。多数の安定発現株を均一に混合した後、薬剤あるいは DMSO を投与し 12 日間培養し、細胞を回収する。抽出したゲノム DNA からバーコード領域を PCR によって増幅し、次世代シーケンサーによってディープシーケンスを行う。バーコードのリードカウントが各バリエントの相対的な細胞数に対応する。DMSO 処理群と薬剤処理群のバーコード数を比較することで、薬剤感受性を計算する。複数回行った実験の結果をベイズ推定の手法で統合し、各バリエントの病的意義を推定する。DMSO, dimethyl sulfoxide.

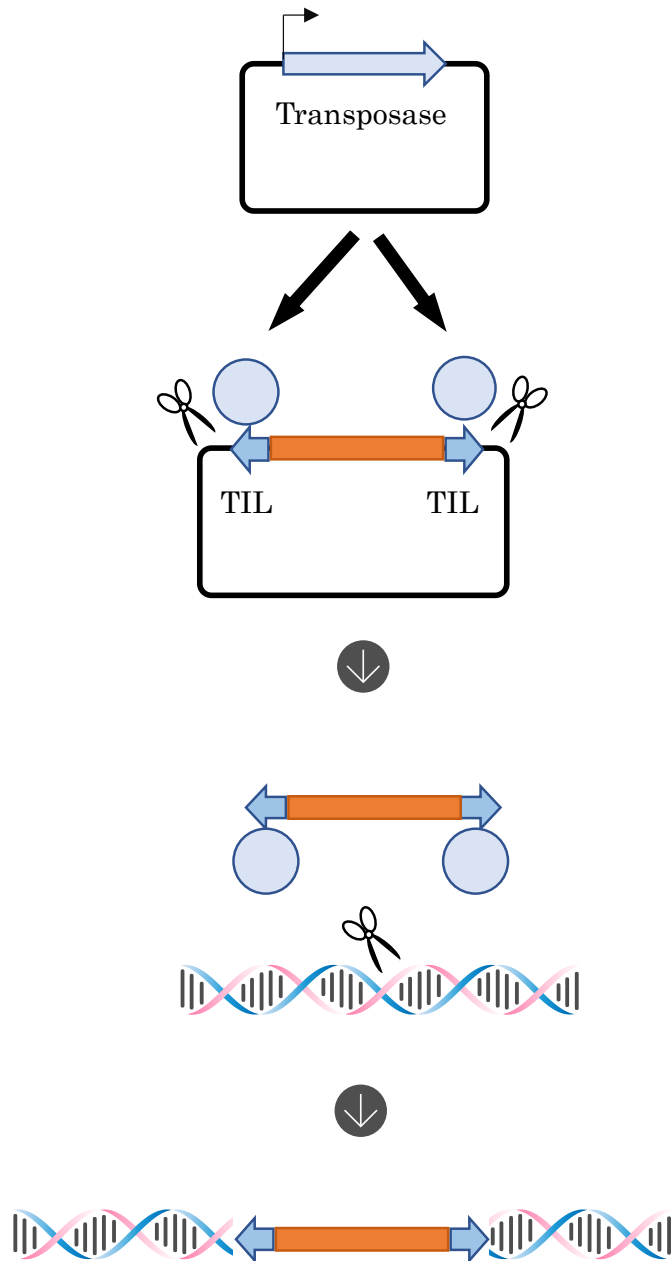


図7 トランスポゾンによる遺伝子の細胞への導入
 逆向きに存在する二つのTIR配列の間に目的とする配列を組み込んだベクターと、トランスポゼース発現ベクターを細胞に同時に導入する。導入された細胞で発現したトランスポゼースはTIR配列を認識して切り出しを行う。piggyBacトランスポゼースの場合、ゲノムDNAのTTAA配列を認識し、ここにトランスポゾンを導入する。TIR, terminal inverted repeat.

第2章 実験材料および方法

2-1. 細胞培養

ヒト大腸癌細胞株である DLD1、および *BRCA2* の両対立遺伝子が短縮型変異をきたしている DLD1 *BRCA2* (-/-) を Horizon Discovery 社から購入した。DLD1 *BRCA2* (-/-) は Cre-loxP 部位特異的組換えを用いて DLD1 の *BRCA2* の両対立遺伝子のエクソン 11 にフレームシフト変異を導入して作成された[29]。DLD1 *BRCA2* (-/-) は親細胞株に比べて細胞形態に変化はないものの細胞増殖得度が低下している。DLD1 はエストロゲン受容体 β アイソフォーム高発現、プロゲステロン受容体発現陰性、ERBB2 低~中等度発現の細胞株であり、TP53 S241F ドミナントネガティブ変異、および MSH6 の両対立遺伝子のフレームシフト変異を保持している[31–34]。いずれの細胞も 10% fetal bovine serum (FBS, ThermoFisher Scientific) および 2 mM L-glutamine (ThermoFisher Scientific) を添加した RPMI 1640 培地 (ThermoFisher Scientific) を用い、庫内温度 37°C、二酸化炭素濃度 5% のインキュベーターで培養した。継代は 70–90% の細胞密度の時点で TrypLE Express (ThermoFisher Scientific) を用いて行った。

2-2. *BRCA2* バリアントの選択

BRCA1 および *BRCA2* に関する最大規模の臨床的データベースである BRCA Exchange を参照し、239 種類のミスセンスバリアントと 5 種類のナンセンスバリアン

トを選択した(表4)。バリエントの命名規則は Human Genome Variant Society (HGVS) に基づいた。野生型のアミノ酸配列として米国国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information: NCBI) における NP_000050.2: p.V2466A を採用した。

244 種類の *BRCA2* バリエントのうち、155 種類は *BRCA2* タンパクの機能ドメインから選択し、残りの 89 種類は機能ドメイン外からランダムに選択した。機能ドメインから選択する際には、病原性のイン・シリコ予測ツールである Align-GVGD を考慮した。病原性がある可能性が最も高いカテゴリーである C65 からは 62 バリエントを選択し、その他のカテゴリーである C0, C15, C25, C35, C45, C55 からはそれぞれ 14-23 バリエントを選択した。

8 種類のバリエントは、スプライスドナー部位におけるエクソン末端の 3 塩基あるいはスプライスアクセプター部位におけるエクソン先端 2 塩基に位置しており、スプライス異常を引き起こす可能性があった。全てのバリエントはスプライス異常のイン・シリコ予測ツールである Splicing Prediction in Consensus Element (SPiCE) v2.1.351 を用いてスプライス異常の可能性を評価し、V159M (c.475G>A)、D23Y (c.67G>T)、V211I (c.631G>A)、R2336P (c.7007G>C)、R2602T (c.7805G>C) の 6 バリエントについてはスプライス異常の可能性が示唆された。このバリエントはスプライス異常が生じないと仮定したうえで cDNA を作成し、選択した 244 種類全てのバリエントを

MANO-B 法による機能解析の対象とした。

2-3. ベクターの作成

BRC A2 を細胞株に導入するにあたり、piggyBac トランスポゾンベクターを用いた。piggyBac dual promoter vector (PB513B-1; System Biosciences 社) の CMV プロモーターとマルチプルクローニングサイトの間には 10 塩基長のランダムな塩基 (バーコード配列) を挿入した。野生型 *BRC A2* 遺伝子の cDNA を pcDNA3 236HSC WT ベクター (Addgene plasmid # 16246) から piggyBac ベクターのマルチプルクローニングサイトにサブクローニングした。各バリエーションは特異的なプライマーを用いて site-directed mutagenesis の手法で導入した。DR-GFP レポーターアッセイには、piggyBac ベクターに含まれる *GFP* 遺伝子配列を削除したベクターを site-directed mutagenesis の手法で作成し用いた。Western ブロットには、N 末端に FLAG タグ (DYKDDDDK) を site-directed mutagenesis で導入したベクターを用いた。作成したベクターに配列を確認するため、プラスミドを E220 Focused-ultrasonicator (Covaris, Inc.) を用いて平均 300 塩基長に断片化し、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England BioLabs) を用いてライブラリー調整した上で MiSeq (Illumina)を用いてシーケンスを行った。導入した変異を含めた *BRC A2* の cDNA 全長の配列、変異と一対一対応するバーコード配列、piggyBac ベクターバックボーンの配列について検証を行った。シーケンスデータを Bowtie2 v2.3.4.2 を用いてリファレンス配列にマッピングし、samtools v1.9、bcftools

v1.9、IGV v2.4.10 を用いてプラスミド全長の配列を決定した。プラスミドに予定外の変異が生じていた場合は破棄した。結果として全てのプラスミドには導入した1つの変異と、変異と一対一対応する固有のバーコード配列のみが導入された。トランスポゾンを用いて細胞に導入するために必要なトランスポゼースとして使用した hyperactive piggyBac transposase expression vector (pCMV-hyPBBase)は Trust Sanger Institute から供与された。DR-GFP レポーターアッセイに用いた pCBASceI と pHPRT-DRGFP (Addgene plasmid #26477、#26476) はメモリアル・スローン・ケタリング研究所の Maria Jasin 博士から供与された。DR-GFP レポーター配列に含まれるピューロマイシン耐性遺伝子はゼオシン耐性遺伝子 (Sh_ble) に置換した。改変した pHPRT-DRGFP を XhoI と SacI でダブルダイジェストして得られた DR-GFP レポーター配列と、piggyBac ベクターを SpeI と ApaI でダブルダイジェストした産物を、ともに末端平滑化処理をした上でライゲートし、細胞にトランスポゾンを用いて DR-GFP レポーター配列を導入するための piggyBac-DRGFP ベクターを作成した。

2-4. トランスポゾンを用いた遺伝子の安定導入

DLD1 細胞株への遺伝子導入はリポフェクションによるトランスフェクションで行った。個々の細胞に確実に一種類だけの *BRCA2* 遺伝子バリエーションを導入するため、全てのバリエーションはそれぞれ別個の well で細胞に導入した。個々のバリエーション導入

細胞から実際にゲノム DNA を採取し組み込まれた配列を確認する実験は行わなかった。複数回の実験を繰り返した際、プラスミドは再作成せず同一のクローンを使用した。トランスフェクションの 24 時間前に細胞を 96-well プレートに 1×10^4 cells/well で播種した。トランスフェクションの直前に、全ての well を 100 μ l の新鮮な培地に交換した。1 well あたり、piggyBac ベクターを 100 ng、pCMV-hyPBase ベクターを 50 ng、Lipofectamine Stem Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を 0.5 μ l、Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) を 50 μ l を用いた。上記の試薬を混合して室温で 20 分間静置した後、各 well に滴下した。トランスフェクションの 2 日後から、7 日間抗生物質を用いて薬剤選択を行い、遺伝子非導入細胞を除去した。*BRCA2* を導入した細胞はピューロマイシン 3 μ g/ml で処置後、得られたポリクローナルな細胞集団をそのまま以後の実験で用いた。DR-GFP レポーターを導入した細胞はゼオシン 100 μ g/ml で処置後、ゼオシン耐性を有する一つのコロニーから細胞をピックアップし、これを増殖させてモノクローナルな細胞株を樹立し、以後の実験で用いた。

2-5. デジタルドロップレット PCR

BRCA2 バリエントを導入した細胞からゲノム DNA を QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用いて調整した。ゲノム DNA 100 ng、Droplet Digital PCR Supermix for

probes (Bio-Rad Laboratories)、*BRCA2* の cDNA あるいは intron をターゲットとしたプライマーおよびプローブを用い、QX100 Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories) を使用してドロップレットを作成した (表 5)。プライマーの最終濃度は 900 nM、プローブの最終濃度は 250 nM とした。PCR 反応は T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) を用い、推奨されている実験条件で行った。ドロップレットのカウントとデータ解析は QX100 droplet reader (Bio-Rad Laboratories) および QuantaSoft v1.6.6.0320 を用いた。ゲーティングはソフトウェアが自動的に最適化した十字線を用いた。各サンプルに対し、約 15,000 個のドロップレットを解析に用いた。DLD1 細胞株は pseudodiploid であり内因性の *BRCA2* 遺伝子のコピー数が 2 であることを利用して、細胞に導入された *BRCA2* cDNA のコピー数を算出した。

2-6. リアルタイム RT-PCR

BRCA2 バリエントを導入した細胞から RNA を RNA-Bee reagent (Cosmo Bio) を用いて回収し、DNase I (Takara) でゲノム DNA の分解を行った後、もう一度 RNA-Bee を用いて DNase I の不活化と精製を行った。得られたトータル RNA 1 µg を SuperScript IV VILO reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) を用いて逆転写し一本鎖 cDNA を得た。*BRCA2* exon 11 および *ACTB* に対するプライマー、Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、7500HT Fast Real-Time PCR System (Thermo

Fisher Scientific)で PCR 反応と蛍光強度の測定を行った (表5)。ターゲットとした *BRCA2* の塩基配列は DLD1 の親細胞株にのみ存在し、isogenic な *BRCA2* 欠損細胞株には存在しない部位を選択した。よって、*BRCA2* 欠損細胞株から検出された mRNA はトランスポゾンによって導入された cDNA 由来となる。ハウスキーピング遺伝子である *ACTB* を内因性コントロールとして規格化し、各サンプルの *BRCA2* の相対発現量を算出した。各サンプルの測定は technical triplicate で行った。実験は biological triplicate で行い、平均値と標準偏差を算出した。

2-7. Western ブロット

N 末端に FLAG タグがついた *BRCA2* バリエントを 20 種類作成し、これらを安定導入した細胞から 2-mercaptoethanol (Sigma)を添加した sodium dodecyl sulfate (SDS)を用いてタンパクを回収した。FLAG-*BRCA2* の検出には 70 μ g のタンパクを用い、50°C で 20 分間処理した。ACTB の検出には 10 μ g のタンパクを用い、95°C で 3 分間処理した。FLAG-*BRCA2* に対しては 6%、ACTB に対しては 10%の SDS ポリアクリルアミドゲルを用い、150V の電圧で電気泳動を行った。分子量マーカーとして Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad Laboratories)を用いた。泳動終了後にタンパクを Immobilon-P transfer membrane (Millipore) に 50V の電圧で 3 時間かけて転写した。抗体の非特異的結合を防ぐため、5%スキムミルクを加えた 0.05% Tween 20 containing

Tris-buffered saline (TBST)で1時間ブロッキングした後、一次抗体として500倍希釈抗FLAGマウスモノクローナル抗体 (F3165; Sigma)および2,000倍希釈抗beta-Actinラビットモノクローナル抗体 (#4970; Cell Signaling Technology)と4°Cで16時間反応させた。TBSTで洗浄後、2次抗体として10,000倍希釈peroxidase標識抗マウスIgGおよび抗ラビットIgG抗体 (NA931VおよびNA934V; GE Healthcare)と室温で4時間反応させた。化学発光試薬としてSuperSignal West Femto (GE Healthcare)を用いて特異的なバンドを検出した。

2-8. 細胞生存アッセイ

DLD1親細胞株、および*BRCA2*欠損DLD1細胞株に*BRCA2*バリエーションを導入した細胞を96-wellプレートに 2.0×10^3 cells/well、培地100 μ l of medium/wellで播種し、PARP阻害薬あるいはカルボプラチン (CBDCA) を種々の濃度で各wellに加えた (olaparib (50 nM–5 μ M, Selleckchem)、niraparib (10 nM–1 μ M, Selleckchem)、rucaparib (50 nM–5 μ M, LC Laboratories)、CBDCA (50 nM–5 μ M, Selleckchem))。薬剤を加えないwellには、dimethyl sulfoxide (DMSO, Nacalai Tesque)を体積濃度0.01%となるように加えた。薬剤を加えてから144時間後、培地に10 μ LのPrestoBlue cell viability reagent (ThermoFisher Scientific)を加えよく混合した。蛍光強度を2030 ARVO X3 microplate reader およびPerkinElmer 2030 Software v4.0 (PerkinElmer) (excitation; 530

nm, emission; 590 nm)で計測した。細胞を加えていない well をネガティブコントロールとした。生存曲線は GraphPad Prism software v8.02 for Mac (GraphPad Software, Inc.) を用いて描画した。

2-9. MANO-B 法

MANO-B 法は、これまでに間野博行研究室が開発したハイスループット遺伝子機能解析法である MANO 法を発展させたものである。*BRCA2* の各バリエントを個別に *BRCA2* 欠損 DLD1 細胞株に導入し *BRCA2* バリエントの安定発現を得た上で、それらすべてを均等に混合し競合的な条件下で培養を行った。細胞は 1×10^4 cells/cm² の密度で播種した。PARP 阻害薬(olaparib、niraparib、rucaparib)、CBDCA、DMSO を培地に加えて 12 日間培養し、途中の 6 日目に一度だけ継代を行った。12 日目に細胞を回収し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を用いてゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA 300 ng (1 細胞あたりのゲノムを 6 pg、細胞に導入された cDNA の平均コピー数を 10 とすると、100,000 個のゲノムあるいは 500,000 個のバーコードに相当) を鋳型としてバーコード配列を PCR 30 サイクルで増幅した。PCR に用いた primer にはディープシーケンス用の index 配列を付加し、PCR 産物をライブラリーとして直接シーケンスできるようにした (表 6)。ライブラリーの定量と評価を Qubit 2.0 fluorometer (ThermoFisher Scientific)および Agilent 2200 TapeStation system (Agilent)で行った。ライ

ブラリーは MiSeq sequencer、MiSeq Control Software v2.5.0.5、および Reagent Kit V2 (300 cycles)を用いてシーケンスし、各バリエーションに対応するバーコード配列をカウントした。各バリエーションは、少なくとも 2 回の独立した biological replicate で行い、各実験は technical triplicate で行った。全ての実験で、野生型および D2723H バリエーションをそれぞれ良性と悪性のコントロールとして用いた。トランスフェクションや遺伝子導入効率が結果に大きな影響を与える実験系であることから、それぞれの biological replicate 実験を行うたびに細胞への遺伝子導入を行った。3 回行われた実験のうち、1 回目は 107 バリエーションと空ベクターを、2 回目と 3 回目は 244 バリエーションと空ベクターを用い、機能解析を行った。

2-10. モデルの評価

MANO-B 法から得られたデータに適合する最適な混合正規分布を推定するため、R 言語および mclust v5.4.5 パッケージによる expectation-maximization アルゴリズムを用いた。Bayesian information criterion が最大となる混合正規分布モデルを採用した。

2-11. 階層ベイズモデリング

MANO-B 法で得られた各バリエーションに対応するバーコードのリードカウントを用

いたバリエーションの機能解析を目的として、ベイズ階層混合モデルを構築した。各バリエーションにおいて、バーコードカウント比率が DMSO 処理群と各薬剤処理群で何倍に変化しているかを計算した。これは、個別に実験を行った場合の、薬剤処理群における細胞生存率の評価に相当する。得られた数値の常用対数を取った後、野生型の数値が $\log_{10}(1.0) = 0$ 、D2723H バリエーションの数値 $\log_{10}(0.003)$ となるように線型変換した。野生型と D2723H バリエーションを除いた残りの 242 バリエーションについて、算出された数値を基にして機能解析を行った。

以下の解析では、expectation-maximization アルゴリズムによって推定したデータの従う最適な混合正規分布に基づき、各バリエーションの真の機能を反映する値である functional variant-specific effect; η_v が 2-component 混合正規分布に従うと仮定した。

各バリエーションが病的バリエーションである事前確率は、無情報事前確率分布である場合と、Huntsman Cancer Institute (HCI) Breast Cancer Genes Prior probabilities website (<http://priors.hci.utah.edu/PRIORS>) および BRCA Exchange website

(<https://brcaexchange.org>) から入手した Align-GVGD 分類に基づく事前確率分布のいずれかを用いた。Align-GVGD 分類は、ウニからヒトまで進化的に保存されてきたアミノ酸残基の情報に基づき C0 から C65 の 7 段階に各単塩基置換変異を分類するものである。この分類は重要な機能があるキードメインに生じた変異にのみ適応できる。キードメインは HCI の情報に従い、以下のように定めた。PALB2 interaction

domain (amino acid residues 10–40), DNA-binding domain (2481–3186), TR2 RAD51-binding domain (3269–3305). キードメイン外に生じた変異の事前確率は、HCI および BRCA Exchange の指針に準じて、Align-GVGD 分類によらず一律に 0.02 と定めた。

モデルのグラフィカルモデルを図 8 に示す。モデルで用いた等式とパラメータは以下の通り。

$$\prod_v \Pr(f_v | D_v, X_v, \theta) = \prod_{\{v: D_v=A\}} \Pr(f_v | D_v, X_v, \theta) \prod_{\{v: D_v=N\}} \Pr(f_v | D_v = N, X_v, \theta) \prod_{\{v: D_v \text{ is unknown}\}} [\pi_{a(v,A)} \Pr(f_v | D_v = A, X_v, \theta) + \pi_{a(v,N)} \Pr(f_v | D_v = N, X_v, \theta)]$$

等式中のパラメータは以下の通り。

$\Pr(\text{Data} | \text{Parameters})$: likelihood of data observation with parameters

v : variant index

f_v : measurements of functional experiments for v

D_v : $\begin{cases} D_v = A & (v = \text{abnormal}) \\ D_v = N & (v = \text{normal}) \end{cases}$

X_v : batch and experimental indices for each measurement

θ : model parameters

$\pi_{a(v,A/N)}$: prior probability that is abnormal/normal

各データとパラメータの真の分布は以下の式で推定した。

$$\Pr(f_{v^*} | D_{v^*}, X_{v^*}, \theta) = \prod_{\{(v,b,e): v=v^*\}} \Pr(f_v | D_v, b, e, \theta)$$

制約条件と弱情報事前分布を以下の様に定めた。

b : batch index

e : experimental index

β_b : batch-specific random intercept effect

τ_b : batch-specific random slope effect

κ_1 : center of the distribution β_b

κ_2 : center of the distribution τ_b

λ_1 : standard deviation of the distribution β_b

λ_2 : standard deviation of the distribution τ_b

η_v : variant-specific random effect

η_{abn} : center of the abnormal variants' η_v distribution

η_{nor} : center of the normal variants' η_v distribution

κ_1 : standard deviation of the abnormal variants' η_v distribution

κ_2 : standard deviation of the normal variants' η_v distribution

ψ : residual error

Key domains: $\left\{ \begin{array}{l} \text{PALB2 interaction domain (amino acid residues 10-40)} \\ \text{DNA-binding domain (2481-3186)} \\ \text{TR2 RAD51-binding domain (3269-3305)} \end{array} \right.$

上記の値は以下の分布から生成されると定めた。

$$\begin{aligned}
f_v &\sim \text{Normal}(\beta_b + \tau_b \eta_v, \tau_b \psi) \\
\beta_b &\sim \text{Normal}(\kappa_1, \lambda_1) \\
\tau_b &\sim \text{Normal}(\kappa_2, \lambda_2), \tau_b > 0 \\
\eta_v \mid D_v = A &\sim \text{Normal}(\eta_{\text{abn}}, \sigma_1) \{v: D_v = A \wedge v \neq \text{D2723H}\} \\
\eta_v \mid D_v = N &\sim \text{Normal}(\eta_{\text{nor}}, \sigma_2) \{v: D_v = N \wedge v \neq \text{WT}\} \\
\eta_{\text{WT}} &= \log_{10}(1.0) \\
\eta_{\text{D2723H}} &= \log_{10}(0.003) \\
\eta_{\text{nor}} &= \text{estimated value by mclust package with the training data set} \\
\eta_{\text{abn}} &\sim \text{Normal}(\eta_{\text{D2723H}}, 5) \text{ (training data set)} \\
\eta_{\text{abn}} &= as \beta_b + \tau_b \eta_{\text{abn}} \text{ value is the same in the training data set (full analysis)} \\
\kappa_1 &\sim \text{Normal}(0, 5) \\
\kappa_2 &\sim \text{Normal}(1, 5) \\
\psi, \sigma_1, \sigma_2, \lambda_1, \lambda_2 &\stackrel{iid}{\sim} \text{HalfNormal}(0, 5) \\
D_v &\sim \text{Bernoulli}(\pi_{a(v)}) \{v: D_v \text{ is unknown}\} \\
\pi_{a(v)} &\sim \text{Beta}(1, 1) \text{ (noninformative prior probability)} \\
\left\{ \begin{array}{l} \pi_{a(v)} \sim \text{Beta}(15.00, 3.48) \{v \in \text{C65, inside key domains}\} \\ \pi_{a(v)} \sim \text{Beta}(5.38, 2.57) \{v \in \text{C35, C45, C55, inside key domains}\} \\ \pi_{a(v)} \sim \text{Beta}(3.76, 9.00) \{v \in \text{C15, C25, inside key domains}\} \\ \pi_{a(v)} \sim \text{Beta}(1.43, 73.1) \{v \in \text{C0, inside key domains}\} \\ \pi_{a(v)} \sim \text{Beta}(1.64, 120.44) \{v \in \text{outside key domains}\} \\ \pi_{a(v)} \sim \text{Beta}(387, 1.07) \{v \in \text{nonsense variants}\} \end{array} \right. \\
&\text{(Align-GVGD-based prior probability)}
\end{aligned}$$

このモデルでは、既に知られている 22 種類の病的バリエーションと 37 種類の良性バリエーションをトレーニングデータセットとして用い、定数値として設定する良性バリエーションの variant-specific effect の中央値である η_{nor} を、mclust v5.4.5 package をトレーニングデータセットに適用して expectation-maximization アルゴリズムによって算出した良性バリエーションの variant-specific effect の中央値と定義した。全 244 バリエーションの解析において、 $\beta_b + \tau_b \eta_{\text{abn}}$ がトレーニングデータセットの解析における $\beta_b +$

$\tau_b \eta_{abn}$ と一致するように定めた。Normal(μ, σ) は平均 μ 、標準偏差 σ の正規分布を意味する。X ~ HalfNormal(0,5) は X が平均値 0、標準偏差 5 の正規分布に従うが、X は常に非負にであるという拘束条件に従うことを意味する。Align-GVGD に従った事前分布において、 β 分布のパラメータはその 2.5%–97.5% のパーセンタイルが、Align-GVGD の定める 95% 信頼区間の下限と上限にそれぞれ一致するように定めた。各パラメータの事前分布は、実現可能性があると考えられる範囲を十分に超えて値を取るように定めた。標準偏差のパラメータに対する弱情報事前分布として通常ハーフコーシー分布を用いるが、コーシー分布は今回のモデルでの実現可能な範囲を大きく超えた値を取り得るため不適當と考え、標準偏差のパラメータに対する弱情報事前分布として半正規分布を採用した。

2-12. ベイズ推定

上述のモデルを用い、ハミルトニアンモンテカルロ法によってパラメータの推定を行った。R v3.5.3 および Stan v2.19.3 で記載したソースコードは <https://github.com/MANO-B/Bayes> から入手可能である。サンプラーは 4 チェーンで行い、それぞれのチェーンで 1,500 回のウォームアップ反復と、それに引き続いて 3,500 回のサンプリング反復を行った。全てのサンプリング反復を解析に用いた。これらの連鎖は Gelman and Rubin の収束診断に合格しており、R-hat 値はすべてのパ

ラメータで 1.1 未満であった。これは、ランダムな開始値から開始された 4 つの連鎖が全体として収束していることを示している。各バリエントのモデルパラメータ、ベイズ因子、および病原性カテゴリの周辺事後分布とベイズ信用区間 (CI)、点推定値として平均値を計算した。

2-13. 予測精度検査

ベイズ推定モデルの正確性を検証するため、244 バリエントから得られた実験データと、モデルから生成したデータの一致性を確認した。各バリエント導入細胞の対数正規化相対生存率の事後予測標準残差の QQ プロットを R 言語の `car v3.0.6 package` で描画した。95% 信頼区間を緑色の破線で描画した。 f_v の事後予測分布と観測データとの一致を確認するために、各チェーンから 512 組のパラメータサンプルをランダムに抽出した。次に、バッチ対バッチ比を考慮して、各サンプルの η 、 β 、 τ 、 ψ によって規定される正規分布から、バリエントごとに 612 個のランダム値を生成した。対数正規化された相対生存率データの事後予測密度曲線は、それぞれ 512 個のサンプルを含む 612 個のデータセットから計算された。

2-14. DR-GFP レポーターアッセイ

BRCA2 バリエントを組み込んだ 24 種類の piggyBac ベクター、および I-SceI 発現ベクターである pCBASce を、DR-GFP レポーターを導入した DLD1 *BRCA2* (-/-) 細胞にコトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間前に、細胞を 12 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well の密度で播種した。トランスフェクションの直前に新しい 1 ml の培地で培地交換した。トランスフェクションミクスチャーは *BRCA2* 発現 piggyBac ベクター 1 μ g、pCBASce ベクター 500 ng、Lipofectamine Stem Transfection Reagent 4 μ l、Opti-MEM I Reduced Serum Medium 250 μ l を混合して作成し、室温で 20 分間おいてから各ウェルに加えた。制限酵素である I-SceI によって引き起こされた、DR-GFP レポーター配列中の DNA 二本鎖切断は、近傍にある部分的な *GFP* 配列と相同組み換え修復によって修復され、完全長の *GFP* を発現する細胞が生じる。トランスフェクションの 4 日後に細胞を回収し、BD FACSCanto II および BD FACSDiva Software v6.1.3 (BD Bioscience)を用いた FACS で GFP 蛍光陽性細胞をカウントした。全てのカウント数は線形変換によって D2723H バリエント導入細胞のカウント数と野生型導入細胞のカウント数の比が 1:5 になる様に正規化した。全てのバリエントは biological duplicate および technical triplicate により実験を行った。

2-15. 統計学的解析

全ての統計解析は R 言語で行った。データは平均値 \pm 標準偏差、平均値 \pm 標準誤差、

または平均値 \pm 95%信用区間の形でまとめ、それぞれの図表の説明文中に詳細を記載した。検査の感度と特異度の信頼区間は正確二項信頼区間として求めた。変異体間の差の検定は両側クラスカル・ウォリス検定で行った。p 値が 0.05 未満であるときに統計学的に有意とした。

#	Variant	HGVS mutation	Barcode	IARC classification	Align-GVGD Classification	Align-GVGD key domains
1	Wild-type	-	TCGTTTGTCT	Class 1	Class C0	-
2	Empty-vector	-	GTGTGGTGGG	Class 5	Non-sense	-
3	R18H	c.53G>A	ATCGTATTTC	Class 2	Class C0	PALB2 interaction domain
4	K21R	c.62A>G	TCTGCGATTC	Unclassified	Class C0	PALB2 interaction domain
5	W31C	c.93G>T	TCTTTATGGT	Unclassified	Class C65	PALB2 interaction domain
6	P41L	c.122C>T	CCTTGTCAT	Unclassified	Class C0	-
7	Y42C	c.125A>G	GGGCGTTGT	Class 1	Class C0	-
8	N55S	c.164A>G	TTCCTTACT	Unclassified	Class C0	-
9	P59A	c.175C>G	ATGGGACTTG	Unclassified	Class C0	-
10	N108S	c.323A>G	ATTCTGTTTC	Unclassified	Class C0	-
11	Q147R	c.440A>G	CGCCTGACGT	Unclassified	Class C0	-
12	D156G	c.467A>G	GCACTTCTA	Unclassified	Class C0	-
13	V159E	c.476T>A	TGGCCGGTGC	Unclassified	Class C0	-
14	P168T	c.502C>A	GGTACCTCGT	Class 1	Class C0	-
15	V208G	c.623T>G	TTGCTCGTT	Unclassified	Class C15	-
16	F266L	c.796T>C	TAGCCTCTGC	Unclassified	Class C0	-
17	R324T	c.971G>C	GTTGAGGTTG	Unclassified	Class C0	-
18	S326R	c.978C>A	TTGAATGTCC	Class 1	Class C0	-
19	S445Y	c.1334C>A	TAGGTGGTCC	Unclassified	Class C0	-
20	E462G	c.1385A>G	TGGCTCGGGC	Class 1	Class C0	-
21	N588D	c.1762A>G	TGGCGAGAGG	Class 2	Class C0	-
22	H595Y	c.1783C>T	TGATGTCCGC	Unclassified	Class C0	-
23	T598A	c.1792A>G	GTGTCTGTTG	Class 2	Class C0	-
24	Y600C	c.1799A>G	TTATTAATGA	Unclassified	Class C0	-
25	G602R	c.1804G>A	TCTCCCGACC	Class 1	Class C0	-
26	G602V	c.1805G>T	TTCTTTGTCA	Unclassified	Class C0	-
27	E747G	c.2240A>G	CTGGGACATC	Unclassified	Class C0	-
28	S755C	c.2264C>G	TGCCTAGTTT	Unclassified	Class C0	-
29	N854S	c.2561A>G	ACCGGTCAGC	Unclassified	Class C0	-
30	L1019V	c.3055C>G	ACTTGGGAATC	Class 1	Class C0	-
31	S1074C	c.3220A>T	AATAGGTTTT	Unclassified	Class C0	-
32	I1167V	c.3499A>G	CTCTTGGGGG	Unclassified	Class C0	-
33	M1168I	c.3504G>T	TGTGTGTCA	Unclassified	Class C0	-
34	A1170V	c.3509C>T	TTCAGGCCCA	Unclassified	Class C0	-
35	S1172L	c.3515C>T	TTTAGTCGGC	Class 1	Class C0	-
36	N1228D	c.3682A>G	TTTGCTTTTG	Class 1	Class C0	-
37	R1329S	c.3987A>T	CTGCATTGTA	Unclassified	Class C0	-
38	D1420Y	c.4258G>T	TCGCTAGGGG	Class 1	Class C0	-
39	F1524V	c.4570T>G	CCGCACATTC	Class 1	Class C45	-
40	K1530N	c.4590A>T	GTTGGGGGTG	Unclassified	Class C0	-
41	V1532F	c.4594G>T	TTATCTCAGT	Unclassified	Class C0	-
42	K1690N	c.5070A>C	ACGCGGATTG	Class 1	Class C0	-
43	E1695V	c.5084A>T	GATCATTGCG	Unclassified	Class C15	-
44	G1696V	c.5087G>T	TCGTGTCCCC	Unclassified	Class C0	-
45	D1699N	c.5095G>A	CGTGGTTAAG	Unclassified	Class C0	-
46	D1728N	c.5182G>A	GATCGACCGC	Unclassified	Class C0	-
47	D1737V	c.5210A>T	CTCGTCGGCG	Unclassified	Class C0	-
48	N1878K	c.5634C>G	TGCGGGCCTA	Class 1	Class C0	-
49	H1918R	c.5753A>G	GCATTATGGT	Class 1	Class C0	-
50	S1970L	c.5909C>T	CGGAGGACGT	Unclassified	Class C0	-

表4 作成した*BRCA2*バリエーション244種類および空ベクター

#	Variant	HGVS mutation	Barcode	IARC classification	Align-GVGD Classification	Align-GVGD key domains
51	E2020K	c.6058G>A	CGGTGGCCTC	Class 2	Class C0	-
52	H2074N	c.6220C>A	GGTGTGCGCGT	Class 1	Class C0	-
53	K2075N	c.6225A>C	GTCGTTCACT	Unclassified	Class C0	-
54	V2138D	c.6413T>A	TTCTTAGGAG	Unclassified	Class C0	-
55	H2324R	c.6971A>G	TGTGGGATGG	Unclassified	Class C0	-
56	P2329L	c.6986C>T	TTCATAGTTT	Unclassified	Class C0	-
57	R2336G	c.7006C>G	CGTACTTGGA	Unclassified	Class C0	-
58	T2337A	c.7009A>G	CTTTGTGGTC	Unclassified	Class C0	-
59	K2411T	c.7232A>C	TAGCGTGTGA	Class 1	Class C0	-
60	T2412A	c.7234A>G	TGCGGTTTTC	Unclassified	Class C0	-
61	T2412I	c.7235C>T	GGCAGTGGTA	Unclassified	Class C0	-
62	R2418G	c.7252A>G	GGCTTGAATG	Class 2	Class C0	-
63	N2436I	c.7307A>T	AAAAACATTG	Class 1	Class C0	-
64	Y2601C	c.7802A>G	AGCTGAGATT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
65	L2604P	c.7811T>C	GCACCCGCTG	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
66	G2609D	c.7826G>A	TTATAAGGTG	Class 4	Class C65	DNA binding domain
67	N2622S	c.7865A>G	AACAGTTTCA	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
68	H2623R	c.7868A>G	TTTTGTCAAG	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
69	W2626R	c.7876T>A	GTGCATCTGT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
70	W2626C	c.7878G>C	TGTTTATTTT	Class 5	Class C65	DNA binding domain
71	I2627V	c.7879A>G	GCCGGGCTGG	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
72	P2639L	c.7916C>T	TTTACGTCTT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
73	E2663K	c.7987G>A	CGCTGGGCCT	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
74	I2664M	c.7992T>G	GGTTTTGTTA	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
75	M2676T	c.8027T>C	CCTCTCTTAG	Class 2	Class C0	DNA binding domain
76	L2688P	c.8063T>C	TGAAGCGGCG	Class 4	Class C65	DNA binding domain
77	S2697N	c.8090G>A	CGCTCCCGGC	Class 2	Class C0	DNA binding domain
78	A2717S	c.8149G>T	GTCTTGATTT	Class 1	Class C0	DNA binding domain
79	L2721H	c.8162T>A	GTTTCAGATG	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
80	T2722R	c.8165C>G	TGACTGGCCT	Class 5	Class C65	DNA binding domain
81	T2722K	c.8165C>A	GTTAGTTGTA	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
82	D2723H	c.8167G>C	GGCTTTTCTT	Class 5	Class C65	DNA binding domain
83	D2723E	c.8169T>A	GACTGTGCGG	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
84	G2724W	c.8170G>T	GCTTCCCATG	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
85	K2729N	c.8187G>T	GCTTGCGGGC	Class 1	Class C0	DNA binding domain
86	V2747I	c.8239G>A	TCGCGTTCGG	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
87	G2748D	c.8243G>A	TCCATCGTTT	Class 5	Class C65	DNA binding domain
88	R2842H	c.8525G>A	GGTCTTGAC	Class 1	Class C25	DNA binding domain
89	R2896C	c.8686C>T	ATTTTTTCT	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
90	V2908G	c.8723T>G	CCGTGTCAGG	Class 2	Class C35	DNA binding domain
91	A2911E	c.8732C>A	CCATCGCAGC	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
92	A2911V	c.8732C>T	TCCTGGGTTG	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
93	D2913H	c.8737G>C	TTGTGGCTG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
94	I2944F	c.8830A>T	AACTCTACCT	Class 1	Class C0	DNA binding domain
95	I3044V	c.9130A>G	CTGCTGTGGC	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
96	R3052W	c.9154C>T	TCTGTTGACC	Class 5	Class C65	DNA binding domain
97	P3054S	c.9160C>T	TTGTTCTGGT	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
98	D3095E	c.9285C>A	GGACATCATT	Class 5	Class C35	DNA binding domain
99	E3096K	c.9286G>A	AGGCGTTTCC	Class 2	Class C0	DNA binding domain
100	Y3098H	c.9292T>C	ACTTAGTCAT	Class 1	Class C0	DNA binding domain

表4 (続) 作成したBRCA2バリエーション244種類および空ベクター

#	Variant	HGVS mutation	Barcode	IARC classification	Align-GVGD Classification	Align-GVGD key domains
101	N3124I	c.9371A>T	TTTTCTTTAT	Class 5	Class C65	DNA binding domain
102	I3183V	c.9547A>G	CTTTTTTACT	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
103	N3187K	c.9561T>A	CATTGTGTTT	Unclassified	Class C0	-
104	S3291C	c.9872C>G	TCTGTGTTGGG	Unclassified	Class C65	TR2 RAD51 binding domain
105	P3292L	c.9875C>T	GCTGGTCCTC	Class 1	Class C0	TR2 RAD51 binding domain
106	S3319F	c.9956C>T	AGGTGGTCAG	Unclassified	Class C0	-
107	R3385H	c.10154G>A	ATCATGCCGT	Unclassified	Class C0	-
108	T3387A	c.10159A>G	CGCACAGCCT	Unclassified	Class C0	-
109	R18C	c.52C>T	TCAGCTGGGA	Class 2	Class C15	PALB2 interaction domain
110	G25R	c.73G>A	CGCGGGCTTT	Unclassified	Class C65	PALB2 interaction domain
111	N30H	c.88A>C	GAGCGTCAGG	Unclassified	Class C15	PALB2 interaction domain
112	W31G	c.91T>G	TCCGCGCGCG	Unclassified	Class C65	PALB2 interaction domain
113	W31L	c.92G>T	GGGCATATCG	Unclassified	Class C55	PALB2 interaction domain
114	F32L	c.94T>C	TGTTGTGGGG	Unclassified	Class C15	PALB2 interaction domain
115	T77I	c.230C>T	TTTGTGTTTG	Unclassified	Class C65	-
116	G185V	c.554G>T	GGCTTGCTGG	Unclassified	Class C65	-
117	D191V	c.572A>T	GTTGCGGTGG	Unclassified	Class C35	-
118	T200I	c.599C>T	GTTGAGGCCT	Unclassified	Class C65	-
119	T207I	c.620C>T	TCTGTTCTTT	Unclassified	Class C65	-
19-2	S445Y	c.1334C>A	GGCCCCGGTTC	Unclassified	Class C0	-
120	F590C	c.1769T>G	CCGGTAGGCC	Unclassified	Class C65	-
121	Y592C	c.1775A>G	CGCGTTGTCT	Unclassified	Class C65	-
122	T1128I	c.3383C>T	TTCTCGGACC	Unclassified	Class C65	-
123	G1224V	c.3671G>T	CCGTCTGTAT	Unclassified	Class C65	-
50-2	S1970L	c.5909C>T	CTTTCGGACA	Unclassified	Class C0	-
124	T1980I	c.5939C>T	TCGTGATAGG	Unclassified	Class C65	-
125	S2006R	c.6016A>C	TGTGCCATT	Unclassified	Class C0	-
126	G2057E	c.6170G>A	GTGGTGGTGC	Unclassified	Class C65	-
127	R2488G	c.7462A>G	CCTCTCTTAG	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
128	Q2491R	c.7472A>G	ATCCCTGTTG	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
129	V2503D	c.7508T>A	CTCGCCGGTG	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
130	S2509R	c.7525A>C	TGCTGGAGGT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
131	S2509N	c.7526G>A	TCGCGTGTAG	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
132	L2510P	c.7529T>C	GAAATGATTG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
133	K2514T	c.7541A>C	GTTGCCTTAT	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
134	T2515I	c.7544C>T	GGATTCGATT	Class 1	Class C0	DNA binding domain
135	S2516C	c.7547C>G	GTGTTTTTCC	Unclassified	Class C15	DNA binding domain
136	R2520Q	c.7559G>A	TGAGACTACG	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
137	R2520P	c.7559G>C	GCATCAAGGT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
138	V2527I	c.7579G>A	CCATGTTTAC	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
139	P2532H	c.7595C>A	GTGATAGTTG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
140	G2544D	c.7631G>A	TCGCTTCCTT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
141	F2562V	c.7684T>G	CCTGTTTTCC	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
142	L2581W	c.7742T>G	CATTTAGTTG	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
143	G2584C	c.7750G>T	GCTTTTGGT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
144	K2597N	c.7791A>C	CTCTGCTGGG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
145	A2603T	c.7807G>A	GAAAGTCACT	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
146	T2607P	c.7819A>C	GGCGCTTTCC	Class 4	Class C35	DNA binding domain
147	D2611G	c.7832A>G	CGTGTGTTA	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
148	W2619C	c.7857G>C	TGTGTGGTTCG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain

表4 (続) 作成したBRCA2バリエント244種類および空ベクター

#	Variant	HGVS mutation	Barcode	IARC classification	Align-GVGD Classification	Align-GVGD key domains
149	I2627F	c.7879A>T	TTTCGTTGAT	Class 5	Class C15	DNA binding domain
150	F2642C	c.7925T>G	TGGACTGTAC	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
151	L2647P	c.7940T>C	CATGCTGTGG	Class 4	Class C65	DNA binding domain
152	V2652G	c.7955T>G	CGGTTGAACA	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
153	L2653P	c.7958T>C	ACCCCGCTAT	Class 5	Class C65	DNA binding domain
154	L2654P	c.7961T>C	CGTATCGGCT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
155	Y2660D	c.7978T>G	GCGATCGCGC	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
156	S2670L	c.8009C>T	GTGCTCTGTA	Class 4	Class C15	DNA binding domain
157	S2670W	c.8009C>G	ATGGCCGGGC	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
158	K2673N	c.8019A>T	CACGAGTGGT	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
159	R2678G	c.8032A>G	GGGCGGGTGA	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
160	A2682V	c.8045C>T	TACTGTTCTA	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
161	L2686P	c.8057T>C	TTTTTTTCC	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
162	A2730V	c.8189C>T	TTTCTTTGTG	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
163	R2744G	c.8230A>G	CTTTGCTCTC	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
164	L2745V	c.8233C>G	GGTGCCTTGT	Unclassified	Class C15	DNA binding domain
165	G2755V	c.8264G>T	TGCTCGGGTA	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
166	A2764V	c.8291C>T	TGAGTGCGTG	Unclassified	Class C15	DNA binding domain
167	P2771L	c.8312C>T	GCATGGGGAG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
168	S2773C	c.8318C>G	GTATGGCTGG	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
169	K2777E	c.8329A>G	ACCTTTGGTG	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
170	R2784W	c.8350C>T	CCGTCCCTGG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
171	R2784Q	c.8351G>A	GACGGGCTAT	Class 1	Class C35	DNA binding domain
172	W2788C	c.8364G>C	GGTTTTGGTG	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
173	L2792P	c.8375T>C	TGTTAGTGGC	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
174	G2793V	c.8378G>T	GCTCGCCCTG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
175	P2800T	c.8398C>A	GATAGTGGTG	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
176	P2800R	c.8399C>G	CATTGTTGCG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
177	G2813E	c.8438G>A	GTACTTTGGG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
178	Y2826C	c.8477A>G	TGATGCGACT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
179	P2827A	c.8479C>G	CACGCGGGCT	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
180	K2833N	c.8499G>C	GGTCTCTTTC	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
181	R2842C	c.8524C>T	CCGATGCAAT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
182	R2842L	c.8525G>T	GTTTTTGGTA	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
183	E2847K	c.8539G>A	TGTATATTTC	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
184	L2862Q	c.8585T>A	ATCTGTCATA	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
185	L2865V	c.8593T>G	GTTTGTTTTT	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
186	I2869N	c.8606T>A	TTTGTCAATTG	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
187	F2873C	c.8618T>G	GTACGGGGCT	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
188	D2900V	c.8699A>T	TCTTTTGTGA	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
189	G2901V	c.8702G>T	TAATAGATGG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
190	Y2905H	c.8713T>C	GTTGCAGTCT	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
191	Y2905C	c.8714A>G	GTTGTTTCAG	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
192	D2913V	c.8738A>T	TGTCGTCGCT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
193	S2922R	c.8764A>C	TCCATTGGTC	Unclassified	Class C15	DNA binding domain
194	Q2925R	c.8774A>G	CGTATCTACA	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
195	Q2925H	c.8775G>C	CTTGATCTA	Unclassified	Class C15	DNA binding domain
196	R2933T	c.8798G>C	AAGTGGGGGC	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
197	V2966A	c.8897T>C	GTGGCTAGAC	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
198	L2972W	c.8915T>G	TGGGTTGGTT	Unclassified	Class C15	DNA binding domain

表4 (続) 作成したBRCA2バリエント244種類および空ベクター

#	Variant	HGVS mutation	Barcode	IARC classification	Align-GVGD Classification	Align-GVGD key domains
199	S2998Y	c.8993C>A	CGCAGACCGG	Unclassified	Class C15	DNA binding domain
200	E3002D	c.9006A>T	AGTTCGTGTG	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
201	Y3006D	c.9016T>G	CGCGTGCCTG	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
202	R3007G	c.9019A>G	TCTTCTGGGG	Unclassified	Class C45	DNA binding domain
203	L3011P	c.9032T>C	GTATTGAGGG	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
204	T3030I	c.9089C>T	TTGCAGCTTG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
205	T3033I	c.9098C>T	TTCTGCCATG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
206	Y3035C	c.9104A>G	TTAGGGGAAA	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
207	F3060C	c.9179T>G	CGGATAGGCC	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
208	V3072E	c.9215T>A	TACTTCGCGC	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
209	G3076E	c.9227G>A	TCCCTTTTTG	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
210	L3101R	c.9302T>G	CTGCCTCACG	Unclassified	Class C35	DNA binding domain
211	L3101P	c.9302T>C	TCGGACCTGC	Unclassified	Class C25	DNA binding domain
212	S3123G	c.9367A>G	ACTTTCCTG	Unclassified	Class C55	DNA binding domain
213	S3123R	c.9369C>A	GCAGCTATGC	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
214	Q3126P	c.9377A>C	TTGTCACGAC	Unclassified	Class C15	DNA binding domain
215	R3269G	c.9805A>G	ACCTGGTCTG	Unclassified	Class C45	TR2 RAD51 binding domain
216	R3269T	c.9806G>C	TAGGGGCGTC	Unclassified	Class C25	TR2 RAD51 binding domain
217	L3274W	c.9821T>G	CTGCGTTTTT	Unclassified	Class C55	TR2 RAD51 binding domain
218	P3280R	c.9839C>G	TCATGTTCTG	Unclassified	Class C65	TR2 RAD51 binding domain
219	I3286N	c.9857T>A	TGTGTCTAGC	Unclassified	Class C35	TR2 RAD51 binding domain
220	Q3295P	c.9884A>C	GCTGGCGGGG	Unclassified	Class C15	TR2 RAD51 binding domain
221	P3301L	c.9902C>T	CTCGATCTCT	Unclassified	Class C65	TR2 RAD51 binding domain
106-2	S3319F	c.9956C>T	GTGATGCTAG	Unclassified	Class C0	-
222	Y3035S	c.9104A>C	ATTCTTGTTG	Class 2	Class C55	DNA binding domain
223	A2643G	c.7928C>G	CCTGTACATT	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
224	D3073G	c.9218A>G	CTTGCCAGT	Unclassified	Class C65	DNA binding domain
225	K485X	c.1453A>T	TACGTGCCT	Class 5	Non-sense	-
226	L997X	c.2990T>A	TTTTCTTTT	Class 5	Non-sense	-
227	Q1502X	c.4504C>T	CTGGCGTGGA	Class 5	Non-sense	-
228	K1984X	c.5950A>T	TTTGGCCTGG	Class 5	Non-sense	-
229	C2535X	c.7604_7605del insAG	AGCAGGTCGA	Class 5	Non-sense	DNA binding domain
230	V159M	c.475G>A	GTTTCGGTCTG	Unclassified	Class C0	-
231	D23Y	c.67G>T	TCGTGTTTTT	Unclassified	Class C15	PALB2 interaction domain
232	V211I	c.631G>A	TCATTTTGGG	Unclassified	Class C0	-
233	D23V	c.68A>T	TCTCATTTCC	Unclassified	Class C15	PALB2 interaction domain
234	R2336P	c.7007G>C	TGTTTTGTTT	Unclassified	Class C0	-
235	R2602T	c.7805G>C	ATTTTGTAAT	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
236	R2659G	c.7975A>G	CCCGTCGTTT	Class 5	Class C65	DNA binding domain
237	S2616F	c.7847C>T	TGCGAGCTGC	Unclassified	Class C0	DNA binding domain
238	G2508S	c.7522G>A	TCTGTTGCTA	Class 4	Class C55	DNA binding domain
239	S2041P	c.6121T>C	CCTTGGGTCC	Unclassified	Class C0	-
240	Y232C	c.695A>G	GAGGTTTAAA	Unclassified	Class C0	-
241	V917A	c.2750T>C	TTCGTGACAC	Unclassified	Class C0	-
242	F2058L	c.6172T>C	CACGGGTAGG	Unclassified	Class C15	-
243	H2178R	c.6533A>G	TGTTTTTAT	Unclassified	Class C0	-
244	V2109I	c.6325G>A	CTTTGCGTCC	Unclassified	Class C0	-
245	I1929V	c.5785A>G	CGCCTTTTGC	Class 1	Class C0	-
1-2	Wild-type	-	TGTTGGAGTG	Class 1	Class C0	-
1-3	Wild-type	-	TCTTCTTCTC	Class 1	Class C0	-
82-2	D2723H	c.8167G>C	GAAAATGCGG	Class 5	Class C65	DNA binding domain
82-3	D2723H	c.8167G>C	CCCTGGTGTG	Class 5	Class C65	DNA binding domain

X: stop codon
Align-GVGD key domains: PALB2 interaction domain (amino acid residues 10-40), DNA binding domain (2481-3186), TR2 RAD51 binding domain (3269-3305)

表4 (続) 作成したBRCA2バリエーション244種類および空ベクター

Primer	Sequense
qRT-PCR, BRCA2 exon 11, forward	5'-AGCCAGTGGTAAAATCGTTTGTG-3'
qRT-PCR, BRCA2 exon 11, reverse	5'-CCTCTGAATCATCCAATGCCTCGTA-3'
qRT-PCR, ACTB, forward	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
qRT-PCR, ACTB, reverse	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
ddPCR, BRCA2 cDNA, forward	5'-CCACCCACCCTTAG-3'
ddPCR, BRCA2 cDNA, reverse	5'-CATGAGGAAATACAGTTTCA-3'
ddPCR, BRCA2 cDNA, probe	5'-FAM-ACTGTGCTCATAGTCAGAAATG-BHQ1-3'
ddPCR, BRCA2 intron forward	5'-GTGTGATACATGCTTTGAA-3'
ddPCR, BRCA2 intron reverse	5'-TGCCCATTACCTATATTCC-3'
ddPCR, BRCA2 intron, probe	5'-HEX-TTCATGGCTATAGGGAGTGCA-3'

表5 デジタルドロップレットPCRおよびリアルタイムRT-PCRで使用したプライマーおよびプローブの配列情報

Primer	Sequense
MANO-B_501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTTCGCAGTGCATGTGCCTGAGTAAG
MANO-B_502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCTCGCAGTGCATGTGCCTGAGTAAG
MANO-B_503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTATCCTTCGCAGTGCATGTGCCTGAGTAAG
MANO-B_504	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGATCGCAGTGCATGTGCCTGAGTAAG
MANO-B_505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGGCAAGTCGCAGTGCATGTGCCTGAGTAAG
MANO-B_506	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTATCGCAGTGCATGTGCCTGAGTAAG
MANO-B_507	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGTTTCGCAGTGCATGTGCCTGAGTAAG
MANO-B_508	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAATCTGACTCGCAGTGCATGTGCCTGAGTAAG
MANO-B_701	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGTAATCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_702	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCGACTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_703	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGAGCGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_704	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_705	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGAATCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_706	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_707	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_708	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCATTACTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_709	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAGCCGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_710	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCCGCGACTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_711	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCGAGACTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_712	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTATCGCTCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCG
MANO-B_index-1	CAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAG
MANO-B_index-2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
MANO-B_read-1	CGATTTCGCTTGACAGTGTACACCTGAGTC
MANO-B_read-2	CATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAG
Amplified sequence	CTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATT CTAGTTCTTAGGTTCCAGTCAGGAGAGGTANNNNNNNNNNTCAGCAGGTAGGACTCAGGTGTAACA CTGCAAGCGAATCGATGAAGAGTCGCTTACTCAGGCACATGCACTGCGA

Index primers and custom read primers.

N stands for A, T, G, or C.

表6 バーコード領域の増幅およびライブラリー作成に用いたプライマー、MiSeqを用いたシーケンスに用いたプライマー、および増幅されたバーコード領域の配列

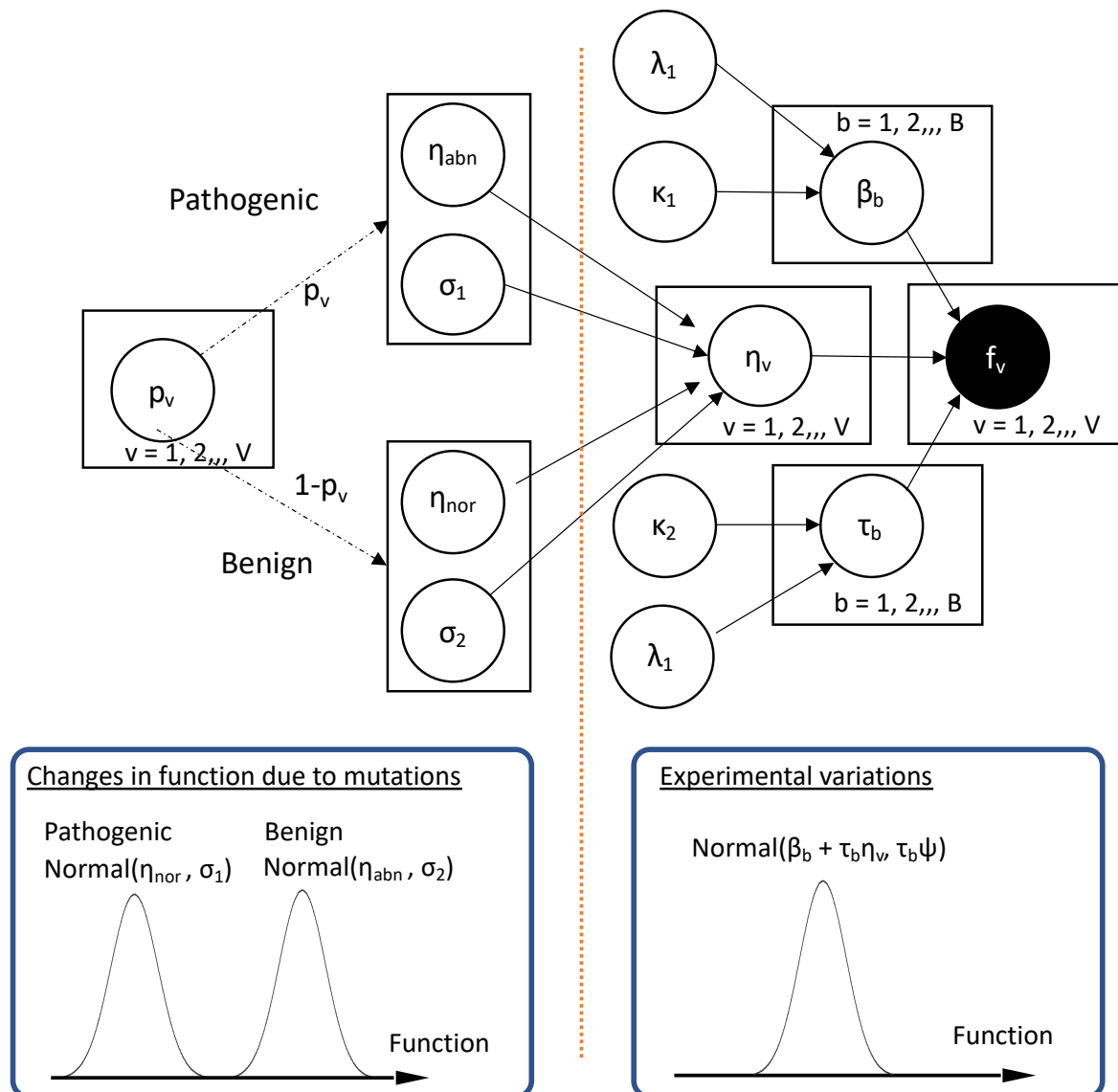


図8 階層ベイズモデリングのグラフィカルモデル

各バリエーション v が病的である確率を p_v 、良性である確率を $1 - p_v$ とする。良性バリエーション、病的バリエーションの機能はそれぞれ平均値 η_{nor}/η_{abn} 、標準偏差 σ_1/σ_2 に従って正規分布する。各バリエーションの真の機能を推定する値である variant-specific effect η_v は、実験のバッチごとに batch-specific effect である β_b と τ_b によって調整されて定まる正規分布に従い、最終的な実験によって得られる生存率のデータである f_v となる。 β_b と τ_b はそれぞれ平均値 κ_1/κ_2 、標準偏差 λ_1/λ_2 である正規分布に従う。全ての f_v がモデルに最も適合するように、ハミルトニアンモンテカルロ法を用いて各パラメータを最適化する。

第3章 結果

3-1. *BRCA2* バリアントの安定発現系の確立

まず 107 個の *BRCA2* バリアントを BRCA Exchange から選択した。IARC の分類で、32 個は良性 (Class 1/2)、10 個は病的 (Class 4/5)、そして 65 個は病的意義不明なバリアント (Class 3) であった。これらの *BRCA2* バリアントの cDNA を site-directed PCR mutagenesis の手法で作成し、バリアントに一対一対応する 10 塩基の DNA バーコード配列を付加した piggyBac ベクターにサブクローニングした。作成したベクターは hyPBase トランスポゼース発現ベクターとともに DLD1 *BRCA2* (-/-) 細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシンで導入細胞を選択した。

野生型を含む 20 個のバリアントについて、*BRCA2* バリアントの導入効率を定量的リアルタイム逆転写 RT-PCR (qRT-PCR) およびデジタルドロップレット PCR で測定した。ゲノムに導入された *BRCA2* cDNA のコピー数は 10 程度であった (図 9 A)。導入したバリアントの mRNA 発現量は内因性の *BRCA2* の生理的な発現レベルと同程度であり、またバリアント間での発現量に有意な差はなかった ($p = 0.37$ 、図 9 B)。Western ブロットでは、野生型以外の 19 個のバリアントのタンパク発現レベルは野生型のタンパク発現レベルと同程度であった (図 10)。

以上から、piggyBac ベクターを用いた *BRCA2* バリアントの導入と生理的なレベルでの安定発現系の樹立に成功したと判断した。

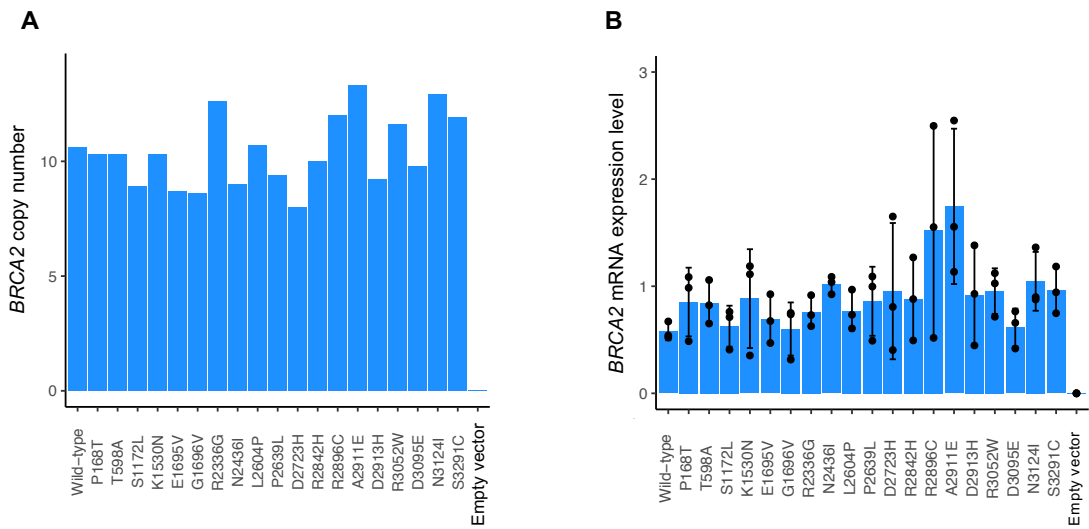


図9 DLD1 *BRCA2*(-/-) 細胞株への*BRCA2*バリエント導入と安定発現系の樹立(A) 導入した*BRCA2*cDNAのコピー数をデジタルドロプレットPCRで計測した。一回のバッチの実験結果を示す。(B) DLD1親細胞株の内因性*BRCA2*mRNA発現量を基準として、DLD1 *BRCA2*(-/-)細胞株に導入した*BRCA2*バリエントのmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRによって計測した。*BRCA2*の発現量は、同じ細胞の*ACTB*発現量で正規化した。実験はtechnical triplicatesで行った。結果はbiological triplicatesのそれぞれの結果を黒点で、平均値を青い棒グラフで、標準偏差を黒線で示した。各バリエント間で発現量に有意差はなかった($p = 0.37$)。

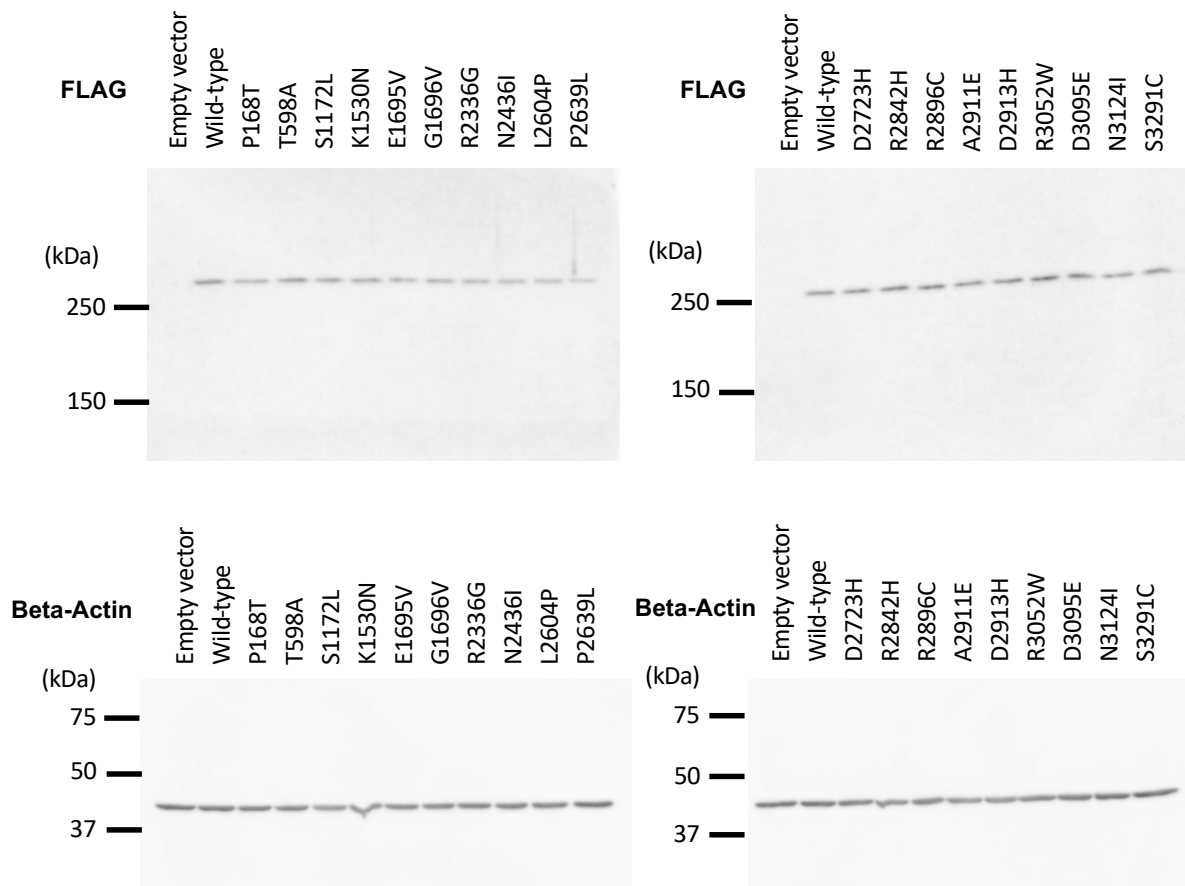


図10 *BRCA2*バリエント導入DLD1 *BRCA2*(-/-)細胞株のWesternブロット
 FLAGタグをN末端に付加した*BRCA2*バリエントを安定導入したDLD1 *BRCA2*
 (-/-)細胞株からセルライゼートを採取し、抗FLAG抗体および抗ACTB抗体を用いて
 Westernブロットを行った。19種類の*BRCA2*バリエントのタンパク発現レベルは野生
 型のタンパク発現レベルと同程度であった。サンプルは同一の実験で採取したもの
 を使用し、全てのゲルとブロットは平行して処理した。二つのbiological replicatesで同様
 の結果が得られ、その代表例を示した。

3-2. 細胞生存アッセイ

*BRCA2*変異体導入 DLD1 *BRCA2*(-/-)細胞を用いて細胞生存アッセイを行い、薬剤感受性が変化したかを確認した。細胞を様々な濃度の 3 種類の PARP 阻害薬 (olaparib, niraparib, and rucaparib) およびカルボプラチン(CBDCA)で 6 日間処理したのち、PrestoBlue reagent を用いて細胞生存率を計測した (図 1 1)。野生型および良性変異体は病的変異体と比較して薬剤への抵抗性が高くなっていた。しかし、良性変異体と病的変異体の間には明確な閾値は存在しなかった (図 1 2)。重要な事実として、野生型 *BRCA2* を導入した DLD1 *BRCA2*(-/-)細胞は、DLD1 親細胞株と比べて薬剤への感受性が非常に高く、外的に *BRCA2*を導入しても必ずしも親細胞株と同程度の相同組み換え修復能となるわけではないことがわかった。この原因として、導入した *BRCA2* バリアントのタンパク発現量が親細胞株の生理的発現量よりも少ない可能性があること、親細胞株 *BRCA2* (-/-)細胞株の間で細胞増殖速度が異なること、親細胞株 *BRCA2* (-/-)細胞株の間で *BRCA1*、*PALB2*、*BRIP1*、*RAD51* といった *BRCA2* と相互作用を生じるタンパク質の発現パターンが異なる可能性があることなどが考えられる。よって、以後変異体間の比較を行う上で、基準として DLD1 親細胞株を用いるのではなく、野生型 *BRCA2*を導入した細胞を用いることにした。これまでの結果から、図 5 で示した *BRCA2*変異体の機能解析法の開発コンセプトが成立

すると判断し、MANO 法の手法を応用した新たな BRCA2 変異体のハイスループット機能解析手法である MANO-B 法の開発に着手した。

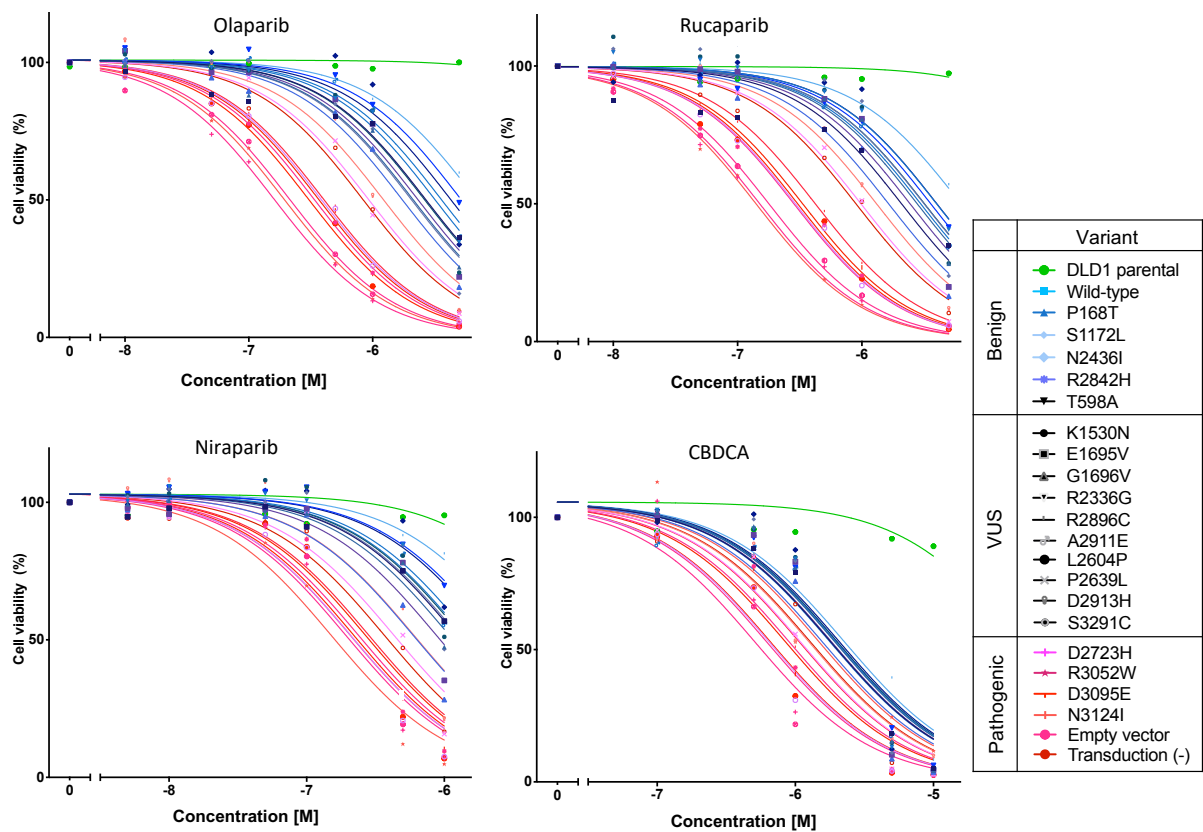


図 1 1 DLD1細胞株のPARP阻害薬およびCBDCAを用いた細胞生存試験
DLD1親細胞株、DLD1 *BRCA2* (-/-)細胞、および20種類の*BRCA2*バリエーションあるいは空ベクターを導入したDLD1 *BRCA2* (-/-)細胞に対し、各薬剤を種々の濃度で144時間処理した。PrestoBlue cell viability reagentを用いて生存細胞数を推定した。薬剤処理を行わなかった群と比較して細胞生存率を算出した。各バリエーション導入細胞の薬剤感受性はIARC分類による病原性と良い相関を示した。2回のbiological replicatesで実験を行い、同様の結果を得た。代表的な結果を示す。IARC class 1/2 (benign), blue; unclassified (VUS), black; class 4/5 (pathogenic), red.

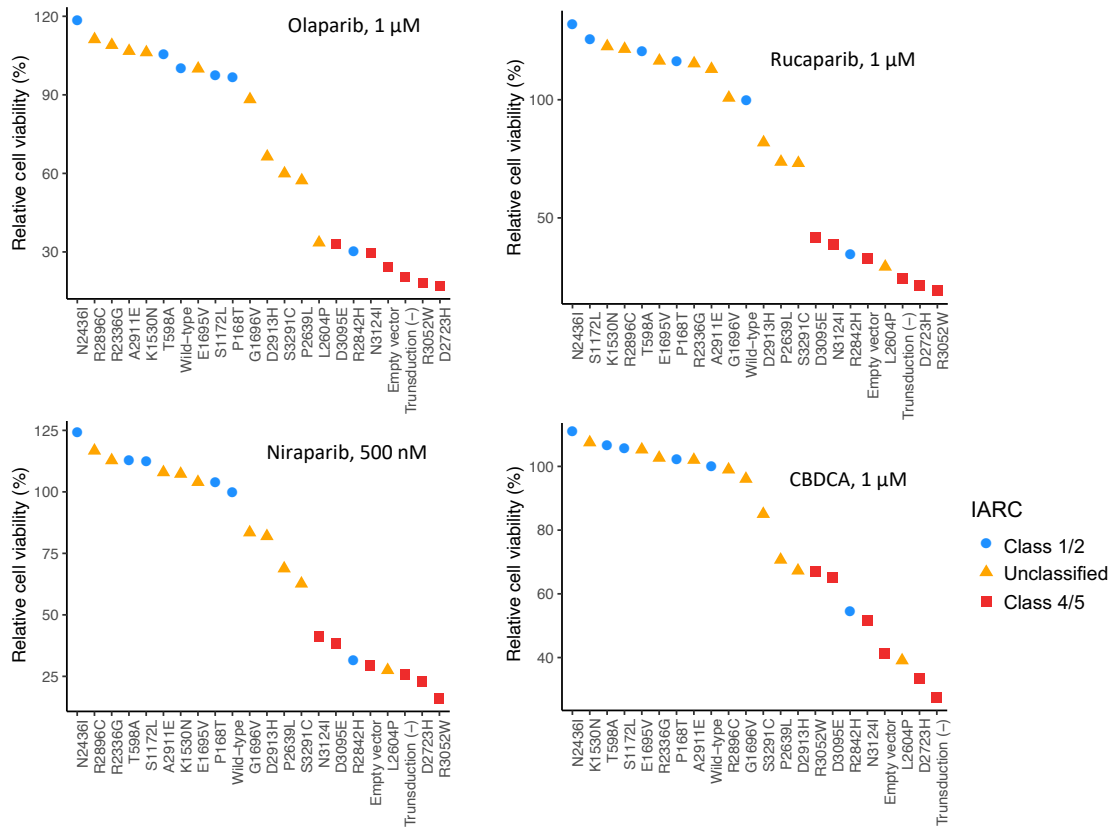


図 1 2 臨床的病原性と薬剤感受性の関係

DLD1 *BRCA2*(-/-)細胞、および20種類の*BRCA2*バリエーションあるいは空ベクターを導入したDLD1 *BRCA2*(-/-)細胞に対し、各薬剤を記載したの濃度で144時間処理した。PrestoBlue cell viability reagent を用いて生存細胞数を推定した。薬剤処理を行わなかった群と比較して細胞生存率を算出した。各変異体導入細胞の薬剤感受性はIARC分類による病原性と良い相関を示した。5つのtechnical replicates、2回のbiological replicatesで実験を行い、同様の結果を得た。代表的な結果を示す。マークは technical replicatesの平均値を示し、色はIARC分類に対応する。IARC分類による良性バリエーションと悪性バリエーションの間で、薬剤感受性に明確な閾値はなかった。IARC class 1/2 (benign), blue; unclassified (VUS), yellow; class 4/5 (pathogenic), red.

3-3. MANO-B 法による 107 バリアントの機能解析

MANO-B 法においては、DLD1 *BRCA2*(-/-)細胞に piggyBac トランスポゾンを用いて *BRCA2* バリアントの cDNA をバリアント特異的なバーコードとなる DNA 配列とともに導入したうえで、多数の導入細胞を均等に混合し薬剤を投与して培養した。回収した細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR でバーコード配列を増幅し、ディープシーケンスを行った。各バリアントに対応するバーコード配列のリード数はバリアントを導入した細胞の細胞数に比例すると考えた[25]。薬剤で処理した細胞における各バーコード配列のリード数を DMSO で処理した細胞におけるリード数で正規化した。得られた数値に基づいて、そのバリアントが良性であるのか病的であるのかを判定した。

まず 107 個の変異体を作成し、4 つの薬剤を様々な濃度で使用して MANO-B 法を行った。各薬剤で処理した各バリアント導入細胞の相対生存率は DMSO 処理群での相対生存率と比較して補正し、さらに野生型 *BRCA2* 導入細胞の相対生存率との比を取って正規化した。バリアント間で薬剤感受性に明らかな差が観察されるのは、いずれの薬剤でも高い濃度での実験条件下であった。バリアントの機能解析を行う上で最適な薬剤濃度は olaparib 2.0 μ M、niraparib 0.5 μ M、rucaparib 2.0 μ M、CBDCA 2.0 μ M と判断した。DMSO 処理群での培養前後のバーコード配列のリード比率を比較し、*BRCA2* バリアントが細胞増殖速度に与える影響は大きくないことを確認した (図 1

3)。全てのバリエントを最適な濃度における相対生存率でソートし、薬剤感受性をヒートマップとして図 1 4 にまとめた。107 バリエントおよび空ベクターの全 108 種類のうち、P2329L, P2639L, D2913H, S3291C バリエントは全ての薬剤で 83 番目から 87 番目の生存率を示しており、良性と病的の中間的な機能を有するバリエントと考えられた。そこで、各薬剤において 1 番目から 82 番目の生存率を示したバリエントを normal function、83 番目から 87 番目の生存率を示したバリエントを intermediate、88 番目から 108 番目の生存率を示したバリエントを abnormal function と暫定的に推定した。MANO-B 法での病原性の推定と、Align-GVGD 分類、IARC 分類、ClinVar が判定した病的意義とは強い関連性がみられた。

異なる薬剤間での結果を比較するため、各薬剤への薬剤感受性が低い順にバリエントを順位付けした上で、olaparib の順位に対する各薬剤の順位の散布図を作成した(図 1 5)。各バリエントの薬剤感受性は薬剤によらず一定の傾向を示し、中間的な感受性を示す P2329L, P2639L, D2913H, S3291C を除き、高感受性群と低感受性群の 2 群に分類された。既知の良性バリエントは R2842H と V2908G を除いて低感受性群に属していた。この R2842H と V2908G の二つのバリエントは既報でも DR-GFP レポーターアッセイで機能の低下がみられていた[22]。また、既知の病的バリエントは N3187K を除き全て高感受性群に属していた。N3187K は ClinVar データベースで病的バリエントとされていたが、MANO-B 法では正常な機能を示しており、また 2020 年 3 月に

ClinVar は N3187K を病的バリエントから VUS にアノテーションを変更している。これらの臨床的データベースと MANO-B 法での機能解析の結果との相違は、発生頻度の非常に低いバリエントについての臨床的意義づけに誤りがある可能性を示唆していると考えた。

IARC 分類によって良性バリエントとされている R2842H および V2908G バリエントが MANO-B 法によって機能が低下していると評価された相違は、IARC 分類が基づいている臨床的エビデンスの信頼性が低いことが原因と考えられた。IARC 分類は家族性の発がんなどの疫学情報を基にして行なわれる[11]。一塩基多型などデータベースである Genome Aggregation Database によれば、R2842H (minor allele frequency = 6.34×10^{-5}) および V2908G (minor allele frequency = 1.69×10^{-5}) とともに非常に頻度の低いバリエントであり、統計学的な評価による病原性の推定に十分な情報が得られないと考えた。ClinVar も R2842H および V2908G を良性バリエントと判定しており、根拠として疫学データと機能解析実験の結果を採用していた。R2842H は短縮型バリエントであり病的バリエントとして知られている Q3066X とともに同一患者から検出された報告があるが、ACMG ガイドラインによれば、あるバリエントが病的バリエントと同一患者の別対立遺伝子から検出され、そして病的バリエントの浸透率が 100% である場合は、そのバリエントが良性である supporting evidence として扱うことになっている。しかし、BRCA2 の病的変異体の浸透率は 100% ではなく、単一遺伝子の

変異で発がんリスクの全てを説明することはできない。環境要因や SNP などの遺伝的背景によっても発がんリスクは変動する。そのため病的変異体とともに検出される変異は必ずしも良性ではなく、良性と病的の中間的な機能を有する機能低下型変異体である可能性は除外できないと考えた。一例として、機能低下型バリエントとして知られている R2784Q は、BRCA1 および BRCA2 の病的バリエントと同一患者から検出されている[13]。V2908G は同一グループから複数の機能解析の報告がなされており、ClinVar は Wu らの 2005 年の報告と Farrugia らの 2008 年の報告を基にして、このバリエントの機能が正常と判断している[35, 36]。しかし、ClinVar は同じグループが 2008 年以降に報告した 2 つの論文を検討していない。同一グループが報告した 2013 年と 2018 年の論文では V2908G の機能が徐々に低下してきており正常下限となっていた[22, 37]。これは、直近に行なわれた実験では病的な機能を示していたことを示唆している。また、彼らの 2005 年および 2008 年の結果を再現した他の研究室はない。よって、彼らの報告と MANO-B 法の結果をあわせると V2908G は機能低下型バリエントと考えられた。

良性バリエントと病的バリエントの中間的な機能を持つバリエントが存在することを踏まえた上で各バリエントの病原性を正確に評価するためには、疫学的データだけでなく種々のエビデンスを用いた分類法で各バリエントを評価する必要がある。そこで、MANO-B 法で評価したバリエントのうち IARC 分類で良性あるいは病

的と判定された 59 個のバリエント (37 個が良性、22 個が病的) について、ACMG のガイドラインに従って再評価を行った[14, 38]。結果として、R2842H と V2908G を含む 18 バリエント(31%) はエビデンスが不十分なため VUS と判定された (表 7)。また、ClinVar で病的とされており MANO-B 法では正常な機能を示した N3187K は、IARC 分類および ACMG 分類で VUS と判定された。ACMG 分類は多数のエビデンスの組み合わせで病原性を判定しており、他の判定法と比べて保守的かつ厳格であることから、VUS と判定される割合が多くなっている[8]。IARC 分類、ClinVar の判定、ACMG 分類といういずれも信頼されている分類の間でも相違があることは、これらの分類手法では確実な病原性の判定ができていないことを示唆している。さらに、IARC および ACMG の分類法は、バリエントが全て病的と良性の二つの群に分かれることを前提として作成された手法であり、機能が中等度に低下し、疾患発症リスクが中等度に上昇するような機能低下型バリエントの評価には不適切であることには注意が必要である[13]。以上から、MANO-B 法の結果と臨床的データベースの判定との間に見られた相違は妥当であると判断した。

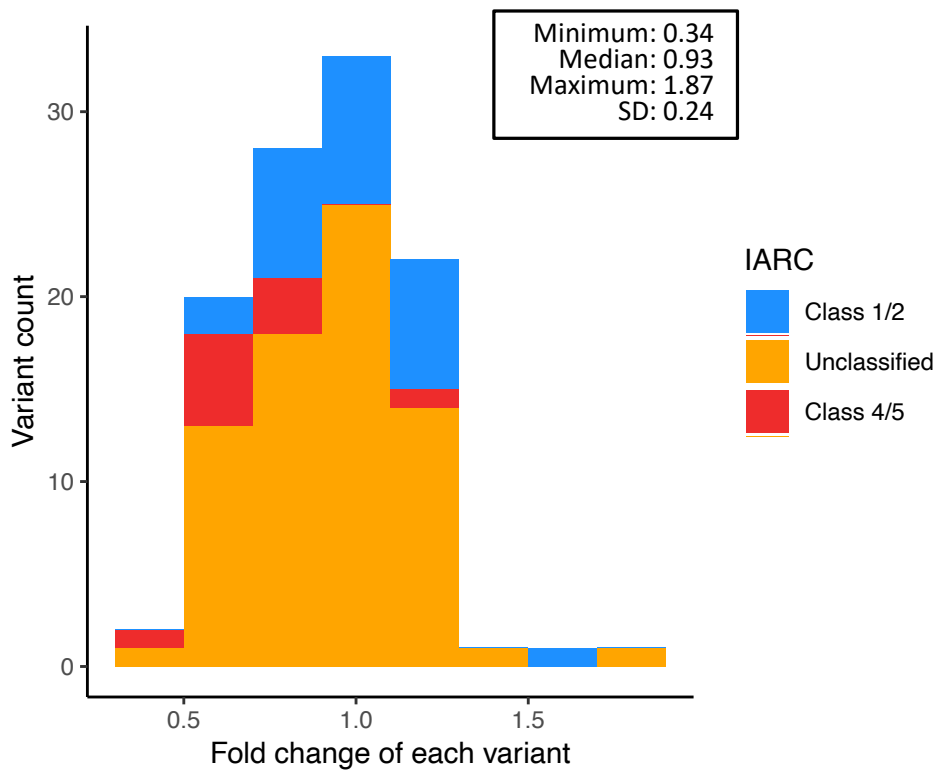


図13 *BRCA2*バリエントの細胞増殖に与える影響

*BRCA2*バリエント107種および空ベクターをDLD1 *BRCA2*(-/-)細胞に導入し、均一に混合し、DMSOを12日間投与して培養した。培養前と培養後でそれぞれ細胞を回収、ゲノムDNAを回収し、PCRおよびディープシーケンスによって各バーコード配列の比率の変化を計測した。108種類のバーコードのうち97種類(90%)は培養前後で0.5-2倍の変化にとどまっており、導入した*BRCA2*バリエントの細胞増殖に与える影響は大きくないと判断した。

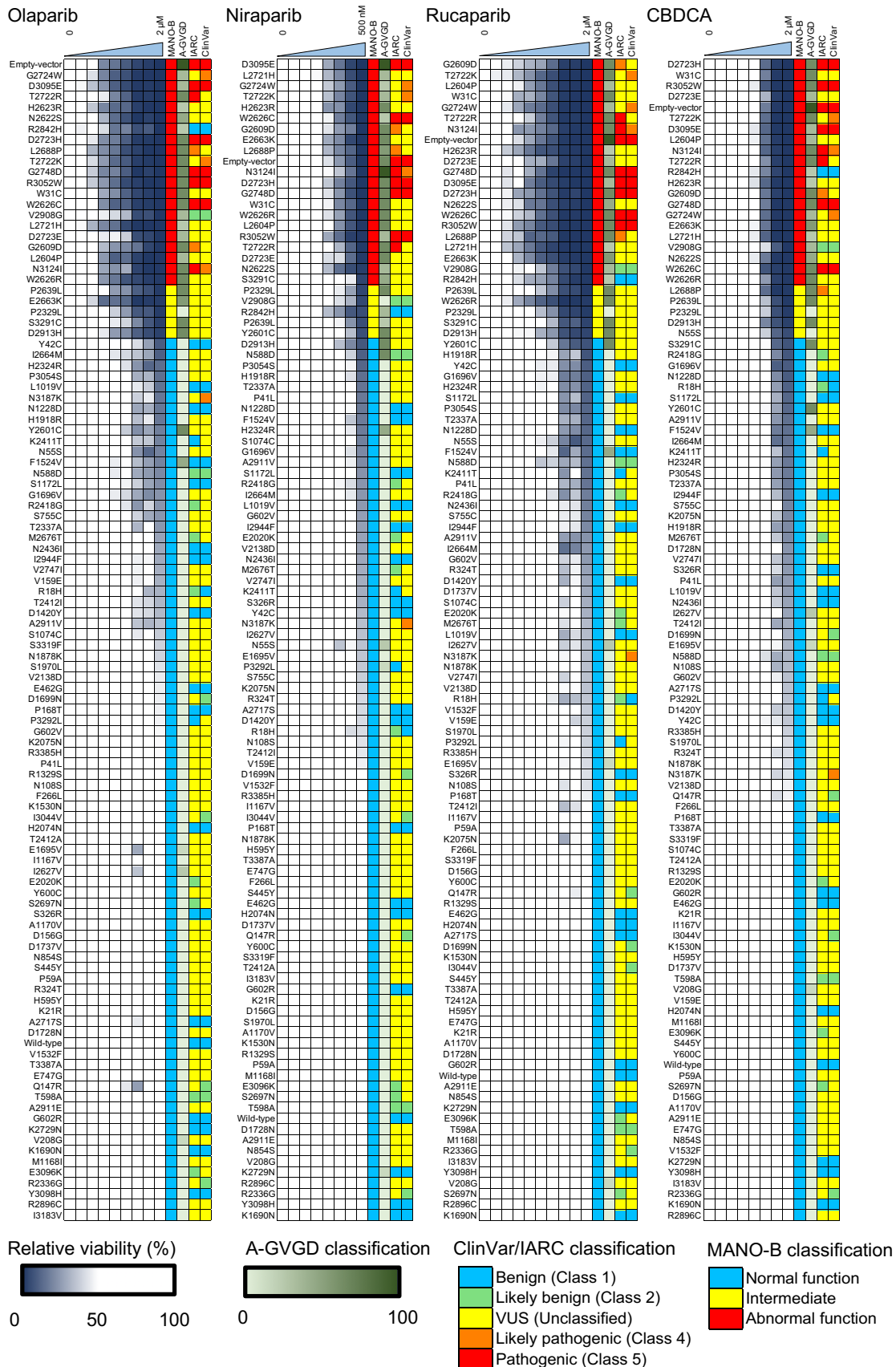


図 1 4 *BRCA2* バリエント 107 種類に対する MANO-B 法の結果
 MANO-B 法での機能解析と臨床データベースでの病的意義をカラーコードで示す。

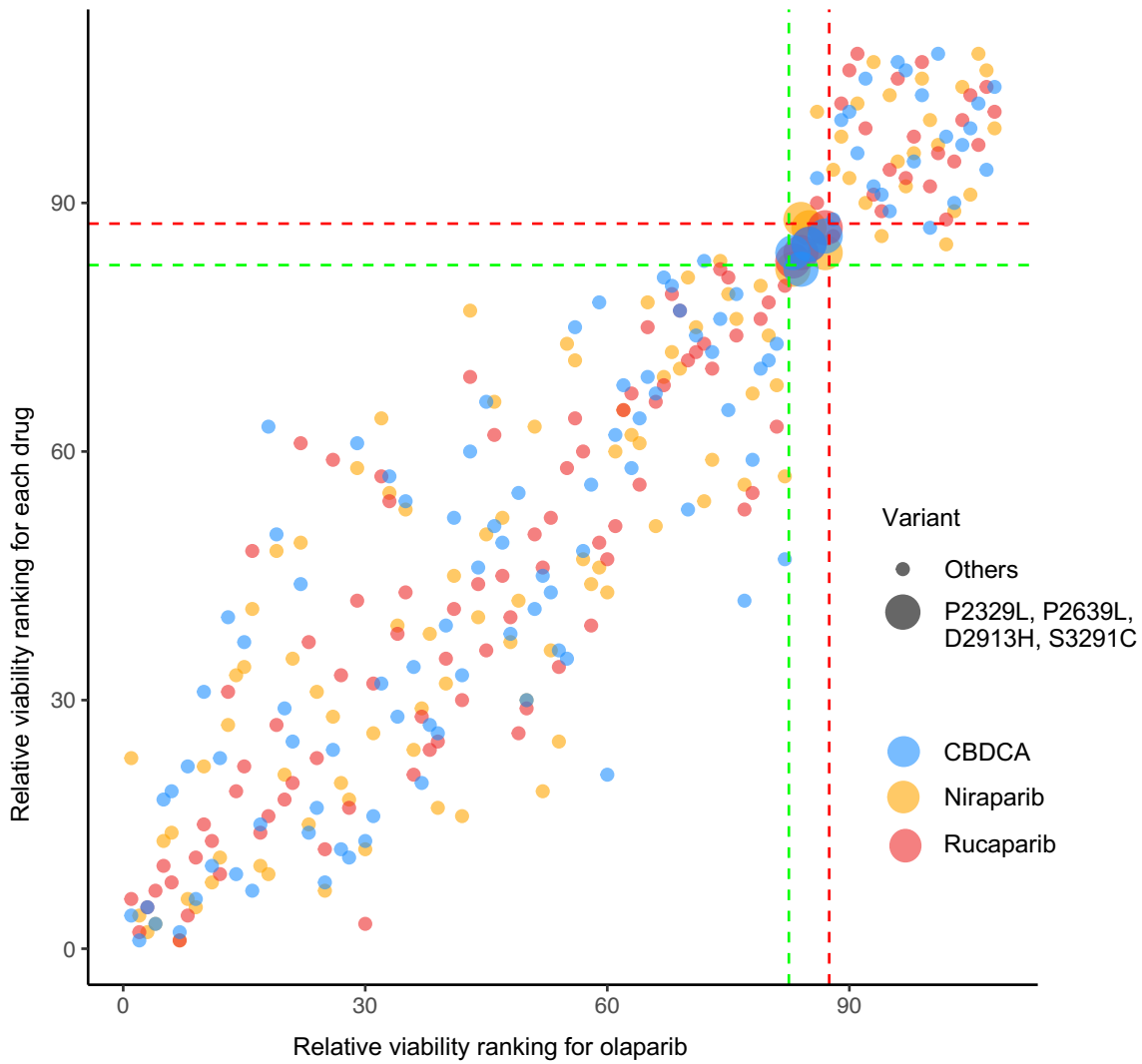


図15 *BRCA2*バリエント107種を導入した細胞の薬剤感受性
*BRCA2*バリエント107種および空ベクターをDLD1 *BRCA2*(-/-)細胞に導入しMANO-B法でolaparib, niraparib, rucaparib, CBDCAを用いて薬剤感受性を評価した。細胞生存率の高い順にバリエントに順位をつけ、olaparibでの順位を横軸として、残りの3薬剤の順位をプロットした。P2329L, P2639L, D2913H, S3291Cバリエントは全ての薬剤で83位から87位の細胞生存率であり中間的な感受性を示していた。細胞生存率が1位から82位のバリエントを低感受性、88位から108位のバリエントを高感受性とする、その他のバリエントはいずれの薬剤でも高感受性あるいは低感受性の群に属していた。緑破線は83位を、赤破線は87位を示す。

Variant	IARC Classification	ClinVar classification	ACMG classification	MANO-B classification	Type of evidence
R18H	Class 2	Benign	Benign	fClass 3	BS3, BS4, BP4, BP6
R18C	Class 2	VUS	Likely benign	fClass 1	PM2, BS4, BP2
Y42C	Class 1	Benign	Benign	fClass 1	BS1, BS3, BS4, BP2, BP6
P168T	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 1	BS3, BP6
S326R	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 1	BP2, BP6
E462G	Class 1	Benign	Benign	fClass 1	BS3, BS4, BP6
N588D	Class 2	Likely benign	Uncertain significance	fClass 1	-
T598A	Class 2	Benign/Likely benign	Benign	fClass 1	BS1, BS2, BS4, BP6
G602R	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 1	BS4, BP6
L1019V	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 2	BS4, BP4, BP6
S1172L	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 2	BS1, BP6
N1228D	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 2	BS4, BP6
D1420Y	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 1	BS1, BP2, BP6
F1524V	Class 1	Benign	Uncertain significance	fClass 1	PP3, BP6
K1690N	Class 1	Benign	Uncertain significance	fClass 1	BP6
N1878K	Class 1	Conflicting	Uncertain significance	fClass 1	-
H1918R	Class 1	Conflicting	Uncertain significance	fClass 3	BP2
I1929V	Class 1	Benign	Benign	fClass 1	BS1, BS4, BP2, BP4, BP6
E2020K	Class 2	VUS	Uncertain significance	fClass 2	PM2, BP4
H2074N	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 1	BP4, BP6
K2411T	Class 1	Conflicting	Uncertain significance	fClass 1	BS3
R2418G	Class 2	Conflicting	Uncertain significance	fClass 3	PM2, BP4
N2436I	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 3	BP2, BP4, BP6
G2508S	Class 4	Conflicting	Uncertain significance	fClass 4	PP3, BS3
T2515I	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 2	BS3, BP2, BP6
T2607P	Class 4	VUS	Uncertain significance	fClass 5	PM2
G2609D	Class 4	Likely pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP3
W2626C	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP3, PP5
I2627F	Class 5	Pathogenic	Likely pathogenic	fClass 5	PS3, PP3, PP5
L2647P	Class 4	Conflicting	Pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP3
L2653P	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP5
R2659G	Class 5	Conflicting	Likely pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP1, PP3
S2670L	Class 4	Conflicting	Likely pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP3
M2676T	Class 2	Conflicting	Uncertain significance	fClass 1	BS3
L2688P	Class 4	Conflicting	Pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP3
S2697N	Class 2	Conflicting	Benign	fClass 1	BS3, BS4, BP4
A2717S	Class 1	Benign	Benign	fClass 1	BS1, BS3, BP2, BP6
T2722R	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP3, PP5
D2723H	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PS3, PM2, PP1, PP3, PP5
K2729N	Class 1	Benign	Benign	fClass 2	BS1, BS3, BS4, BP6
G2748D	Class 5	Pathogenic	Uncertain significance	fClass 5	PS3, PP5
R2784Q	Class 1	Conflicting	Uncertain significance	fClass 5	PS3, PP3, BS4, BP2
R2842H	Class 1	Benign	Uncertain significance	fClass 3	BP2, BP6
V2908G	Class 2	Likely benign	Uncertain significance	fClass 4	PP3, BS3
I2944F	Class 1	Benign	Benign	fClass 1	BS1, BS3, BP6
Y3035S	Class 2	Conflicting	Uncertain significance	fClass 1	-
R3052W	Class 5	Pathogenic	Likely pathogenic	fClass 5	PS3, PP1, PP3, PP5
D3095E	Class 5	Pathogenic	Likely pathogenic	fClass 5	PS3, PP3, PP5
E3096K	Class 2	VUS	Uncertain significance	fClass 1	-
Y3098H	Class 1	Benign	Likely benign	fClass 1	BS3, BP4, BP6
N3124I	Class 5	Pathogenic/likely pathogenic	Likely pathogenic	fClass 5	PS3, PP1, PP3
P3292L	Class 1	Conflicting	Uncertain significance	fClass 1	PP3
Wild-type	Class 1	Benign	Benign	fClass 1	BA1, BS3, BP4, BP6
Empty-vector	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PVS1, PS3, PP5
K485X	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PVS1, PS3, PP5
L997X	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PVS1, PS3, PP5
Q1502X	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PVS1, PS3, PP5
K1984X	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 5	PVS1, PS3, PP5
C2535X	Class 5	Pathogenic	Pathogenic	fClass 4	PVS1, PS3, PP5
N3187K	Unclassified	Likely pathogenic	Uncertain significance	fClass 1	PM2, PM6, BS3

PP3, BP4, deleterious threshold: PolyPhen-2 score > 0.15, Align-GVGD class > C15, SIFT score < 0.05, PROVEAN score < -2.5

BP2, neutral likelihood threshold: Co-occurrence < 0.053

BS4, neutral likelihood threshold: Segregation < 0.053

PP1, deleterious likelihood threshold: Segregation > 18.7

BS1, Maximal expected allele frequency for a non-common pathogenic BRCA2 variant: 0.075%

PS3, BS3: based on HDR assays

表7 *BRCA2* バリエーションのIARC分類、ClinVarの判定、およびACMG分類

小括 1

がん遺伝子の機能解析法である MANO 法を応用し、がん抑制遺伝子である BRCA2 のバリエーションの機能解析法である MANO-B 法を確立した。まず手法のコンセプトを発案した。コンセプトの実現可能性を判断するため、まず個々のバリエーションに対し、piggyBac トランスポゾンを用いた遺伝子導入、BRCA2 タンパクの安定発現、PARP 阻害薬への感受性の変化を確認した。その上で 107 バリエーションについて MANO-B 法での機能解析を行い、臨床的データベースでの病原性の判定と関連した結果を得ることができた。

3-4. ベイズ推定を用いた 244 バリアントの機能解析

以上の結果から更に多数のバリアントの機能解析を行うこととし、PCR mutagenesis によるバリアント作成によって解析するバリアント数を 244 に増やした。うち 186 個がこれまでに機能が知られていない VUS であった。以後の解析では、各薬剤の濃度は最適濃度の 1 種類のみを用いた。各バリアント導入細胞の細胞生存率の数值は計 7,344 個得られ、これを用いて病的意義の判定を行った。まず各バリアント導入細胞の生存率閾値を設け、これまでに病的意義が判明している 59 バリアントについて受信者操作特性曲線を描き、感度と特異度を算出した。Niraparib を用いた場合、IARC 分類での病的バリアントに対する感度は 100% (95%信頼区間: 85–100%)、特異度は 95% (95%信頼区間: 82–99%) であった (図 1 6)。

しかし、ある閾値を境にしてバリアントを良性と病的とに分類する手法は機能低下型変異には不適切である。そこで、単純な二分論ではなく確率論的にバリアントの病的意義を推定する手法を採用することにした。各バリアント導入細胞の相対生存率を対数值とし、さらに野生型と D2723H をそれぞれ良性バリアントと病的バリアントの基準値として、これらが一定値を取るようにアフィン変換による正規化を行った。得られたデータを expectation-maximization algorithm で解析すると、二つのコンポーネントからなる混合正規分布モデルが最もデータにフィットした (図 1 7)。この二つのコンポーネントはそれぞれ良性バリアント群と病的バリアント群に対応していた。

二群の間に明確な境界はなく、また機能低下型バリエーションはバリエーション数が少ないため明確な集簇を観察できなかった。

以下の解析では、ベイズ因子 (Bayes factor, BF) を、各バリエーションの病原性を示唆するエビデンスの強さとして用いた。これまでの結果から各バリエーション導入細胞の相対生存率が、混合正規分布のどちらのコンポーネントに属しているかの確率を算出することで、良性あるいは病的である確率を推定できると考えた。よって、DR-GFP レポーターアッセイにおいて Guidugli らが用いた VarCall モデルを改変し、ベイズ階層混合正規分布モデルを用いて推定したベイズ因子による病原性の推定法を構築した[22, 39, 40]。ベイズ因子は、あるデータセットが得られたときに、各バリエーションが良性である時にそのデータセットが得られる可能性と、病的であるときにデータセットが得られる可能性の比を取ったものである。このモデルでは事前分布を任意に設定でき、疫学的情報、遺伝学的情報、アミノ酸配列に対するコンピュータシミュレーションなどによる病原性予測を事前確率分布として用い、種々のエビデンスを組み合わせる最終的な病原性予測を行うことが可能である。以下の解析ではこの手法自体の予測性能を評価するため、無情報事前確率を用いた。

ベイズ因子に基づいた各バリエーションに対する 5 段階の機能分類を、ACMG ガイドラインに則して設定された閾値に基づいて以下の通り行った[41]。fClass 1 (正常機能、 $BF \leq 0.003$)、fClass 2 (おそらく正常機能、 $0.003 < BF \leq 0.053$)、fClass 3 (中間的機

能、 $0.053 < BF < 18.7$)、fClass 4 (おそらく機能喪失、 $18.7 \leq BF < 350$)、fClass 5 (機能喪失、 $350 \leq BF$) と定義した。

バリエント v の機能は variant-specific effect である η_v として推定した。まず IARC 分類により臨床的に病的意義が判定している 22 個の病的バリエントと 37 個の良性バリエントを training set として、これらに対して MANO 法の結果から η_v を推定した。結果として η_v の値は良性バリエントで高く病的バリエントで低い傾向があったものの、明確な閾値なく分布していた。MANO-B 法によって病的バリエント (fClass 4/5) と予測した変異について、IARC 分類による病的バリエントをゴールドスタンダードとした感度は 95% (95%信用区間 77–100%)、特異度は 95% (95%信用区間 82–99%) であった。無情報事前確率、すなわち事前確率として各バリエントが病的である可能性を 50% に設定した条件下では、あるバリエントが MANO-B 法によって fClass 4/5 と予測された場合、陽性オッズ比は 17.7 であり、病的バリエントの予測として確定的な結果を得られるとは言えない数値であった。この原因は IARC 分類の不正確性に起因していると判断し、MANO-B 法での病原性予測と ACMG 分類の相関性を改めて評価した。ACMG 分類に基づく 19 個の病的バリエントと 22 個の良性バリエントの η_v は明確に二群に分かれ、陽性オッズ比は無限大となった (表 7、図 17)。fClass 1/2 のバリエントは全て ACMG 分類で良性バリエント、fClass 4/5 のバリエントは全て ACMG 分類で病的バリエントであったことから、ベイズ推定に基づく機能推定法

である MANO-B 法は ACMG ガイドラインの枠組みにおいて strong evidence に相当する結果を提供できる検査法と考えた[17, 41]。

実験は 4 薬剤を用いて行われ、それぞれの結果に基づく病的意義推定には一貫性が見られた (図 1 9)。Niraparib を用いた実験系では良性バリエーション群と病的バリエーション群の両方で η_v が広い範囲で分布しており、中間的な機能をもつバリエーションに対してより正確な評価ができると判断した。薬剤間での η_v の分布に差異が見られた原因としては、薬剤の効果に差があるのではなく、niraparib と比較して他の 3 薬剤は実験に用いた濃度が真の至適濃度よりも高く、病的バリエーション導入細胞がほぼ完全に死滅してしまったため、統計解析に十分なデータのばらつきを得ることができなかったからだと考えた。実際、各バリエーション導入細胞を個別に実験した図 1 2 の結果では、olaparib、rucaparib、CBDCA の 3 薬剤は MANO-B 法の半分の濃度で実験を行っており、niraparib と同様の分布のばらつきがみられていた。

機能解析を行った 186 個の VUS の、niraparib を用いた解析による分類は、fClass 1 が 98 個、fClass 2 が 28 個、fClass 3 が 23 個、fClass 4 が 6 個、fClass 5 が 31 個であった (図 2 0、表 8)。機能ドメイン外に生じたバリエーションは全て良性 (fClass 1/2) と判定された。最も多くの病的バリエーションが検出されたのは DNA-binding domain (DBD) であった。その他の機能低下型あるいは病的バリエーションとして、W31C/G/L が transactivation domain に[42]、P2329L が MEILB2-binding domain に[43]、S3291C が C-

terminal domain (CTD)に生じていた。CTD は BRCA2 と RAD51 の相互作用によってリン酸化を受ける残基として知られている[29]。

これまでの解析は、無情報事前分布を用いた MANO-B 法に基づくベイズ推定による病原性予測であったが、このモデルは本実験系と独立した事前分布を併用することで、種々のエビデンスを組み合わせた病原性予測を行うことも可能である。そこで、バリエーションが生じたアミノ酸残基が進化的に保存されているかどうか、あるいはその残基の生物物理学的性質を基にして病原性を推定するアルゴリズムである Align-GVGD を事前確率に採用して同様の解析を行った (図 2 1) [44]。ほとんどのバリエーションは Align-GVGD の病原性予測と MANO-B 法での機能予測が一致していたため、事前確率の使用の有無で結果は変わらなかったが、MANO-B 法単独では fClass 5 の病的バリエーション群に分類され、Align-GVGD では C0 の良性バリエーション群に分類された。両者で一貫性がなかった変異である S2616F は fClass 3 の病原性が判定困難なバリエーション群に分類された。ただし、Align-GVGD は DBD 内のバリエーションにしか妥当性の検証がなされていないため、DBD 以外のバリエーションの結果の解釈には注意が必要である。

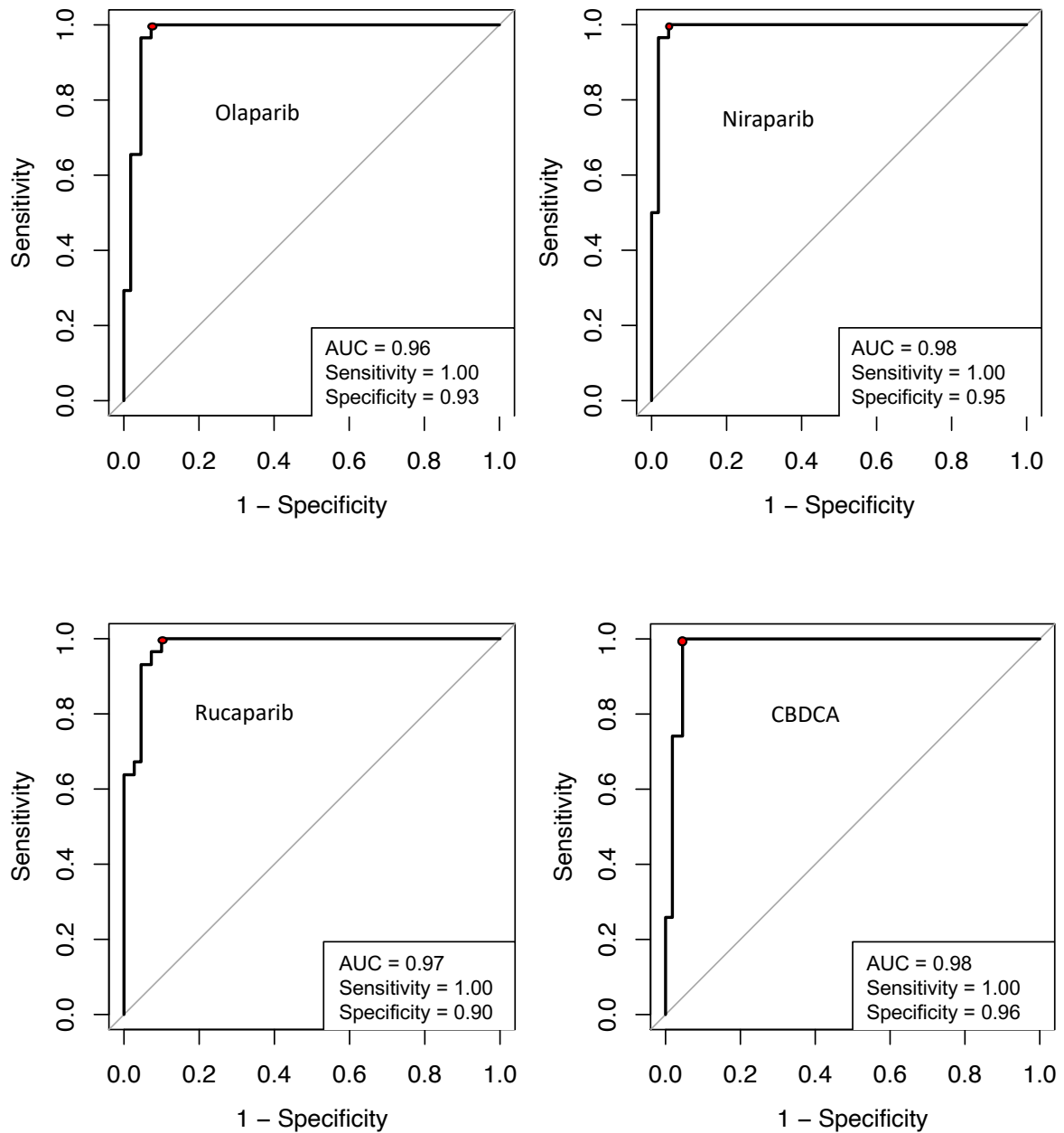


図16 *BRCA2*バリエント59種に対する受信者操作特性曲線

IARC分類により病的意義が判定されている*BRCA2*の37種の良性バリエント、22種の病的バリエント、および空ベクターをDLD1細胞に導入し、MANO-B法でolaparib, niraparib, rucaparib, CBDCAを用いて薬剤感受性を評価し、受信者操作特性曲線を描画した。機能低下型バリエントと考えられるR2784Q、R2842H、G2908VはIARC分類では良性であったがROC曲線の赤丸で示した Youden index に基づく閾値では病的バリエントと判定される傾向があった。

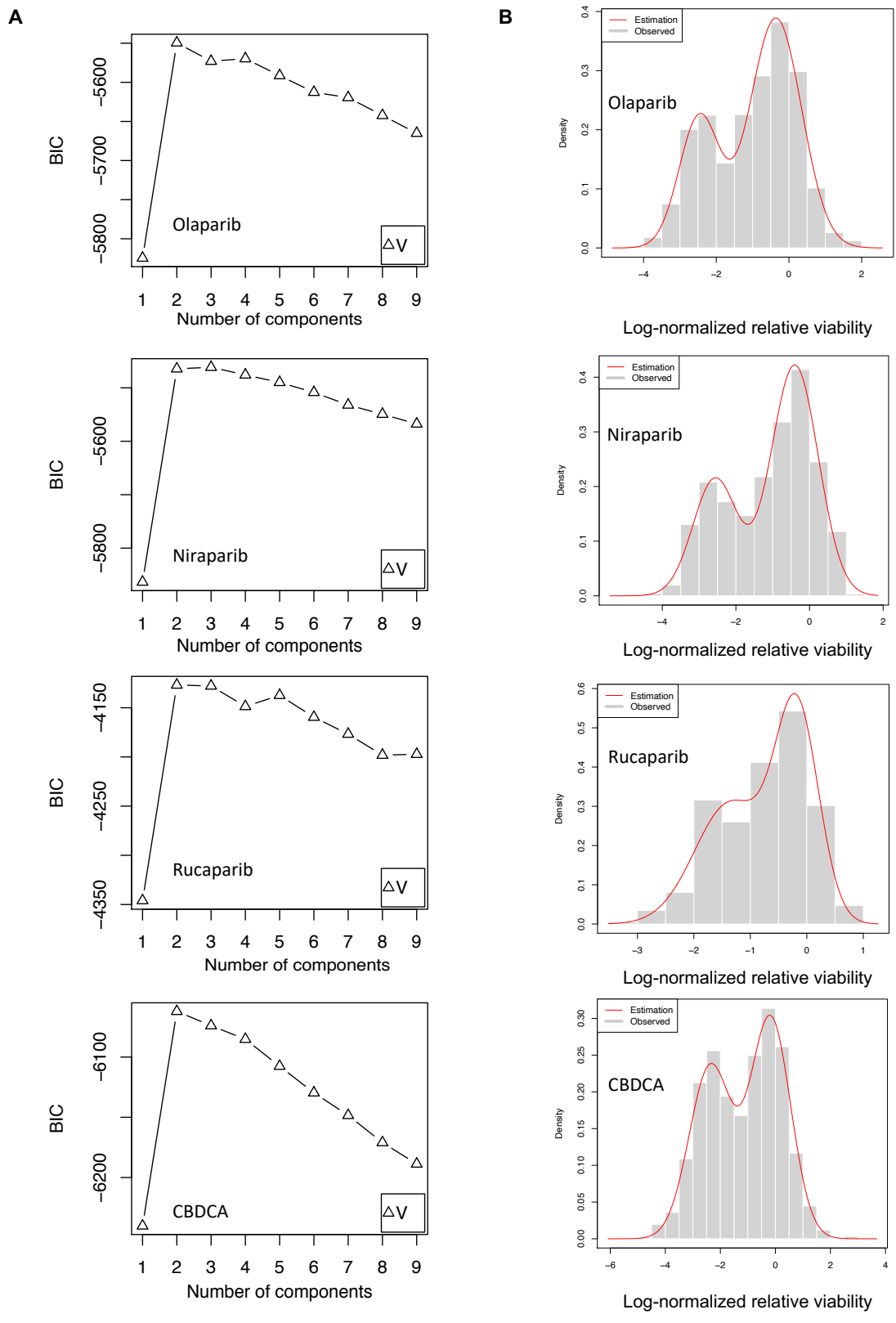


図 17 *BRCA2*バリエント244種の相対生存率のモデリング

A, Expectation-maximization algorithmを用いてデータに最もフィットするモデルを推定した。Bayesian information criterion (BIC) から2つのコンポーネントからなる混合正規分布モデルが最適と判定した。B, 推定したモデルの分布密度曲線(赤線)と実際の分布。左側の群が病的バリエント群、右側の群が良性バリエント群に対応する。

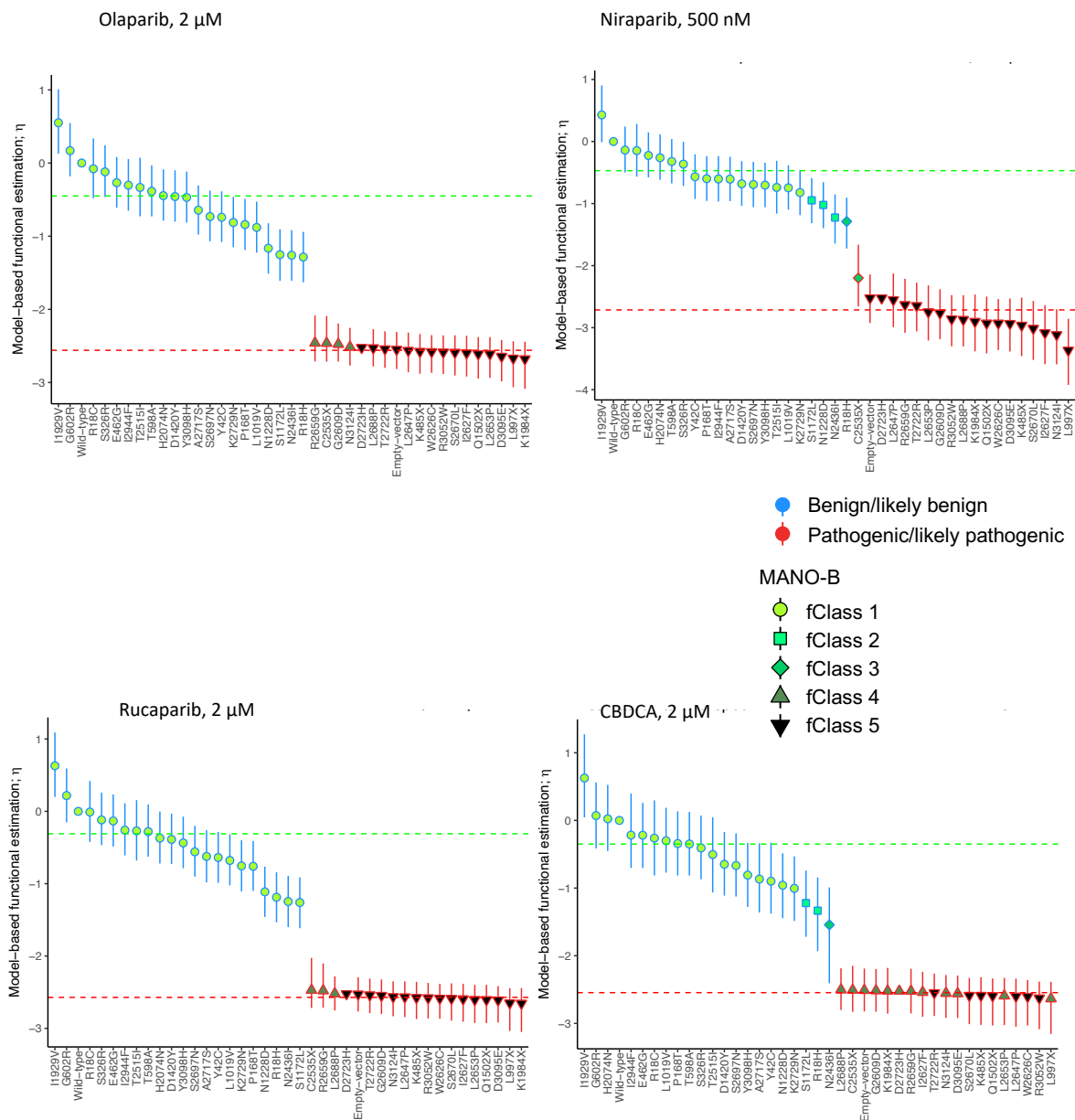


図 1 8 *BRCA2*バリエント41種のMANO-B法による機能解析
 ACMG分類により病的意義が判定されている*BRCA2*の22種の良性バリエント、19種の病的バリエント、および空ベクターをDLD1細胞に導入し、MANO-B法でolaparib, niraparib, rucaparib, CBDCAを用いて薬剤感受性を評価し、機能を推定した。ACMG分類での良性および病的バリエントとMANO-B法での機能は完全に一致した。マークが機能の点推定値、縦線が95%信用区間を示す。

¥

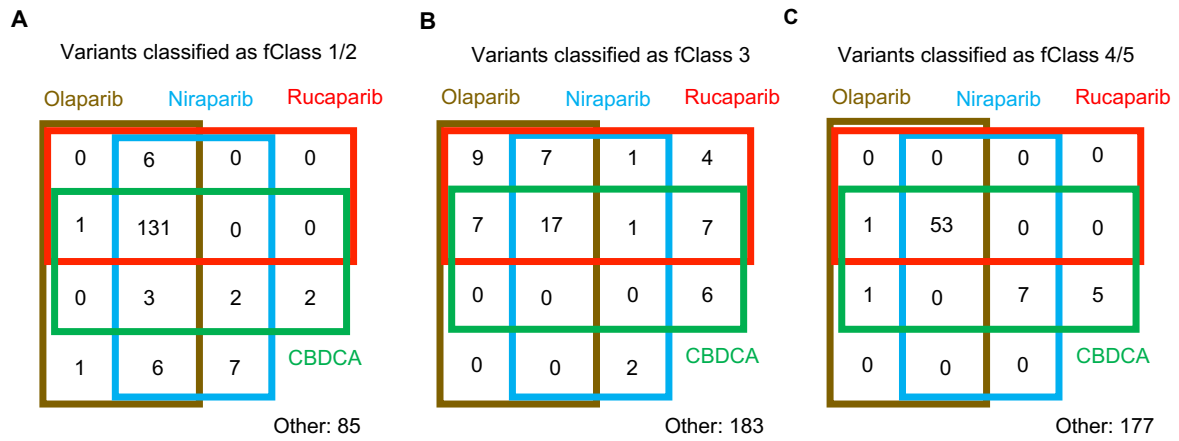


図19 *BRCA2*バリエント244種のMANO-B法による機能解析

Olaparib, niraparib, rucaparib, CBDCAの4薬剤による各バリエントの分類。数値は各薬剤が何個のバリエントをfClass 1/2 (A), fClass 3 (B), fClass 4/5 (C) に分類したかを示す。ある薬剤がfClass1/2、別の薬剤がfClass 4/5という一貫性のない分類をしたバリエントはなかった。

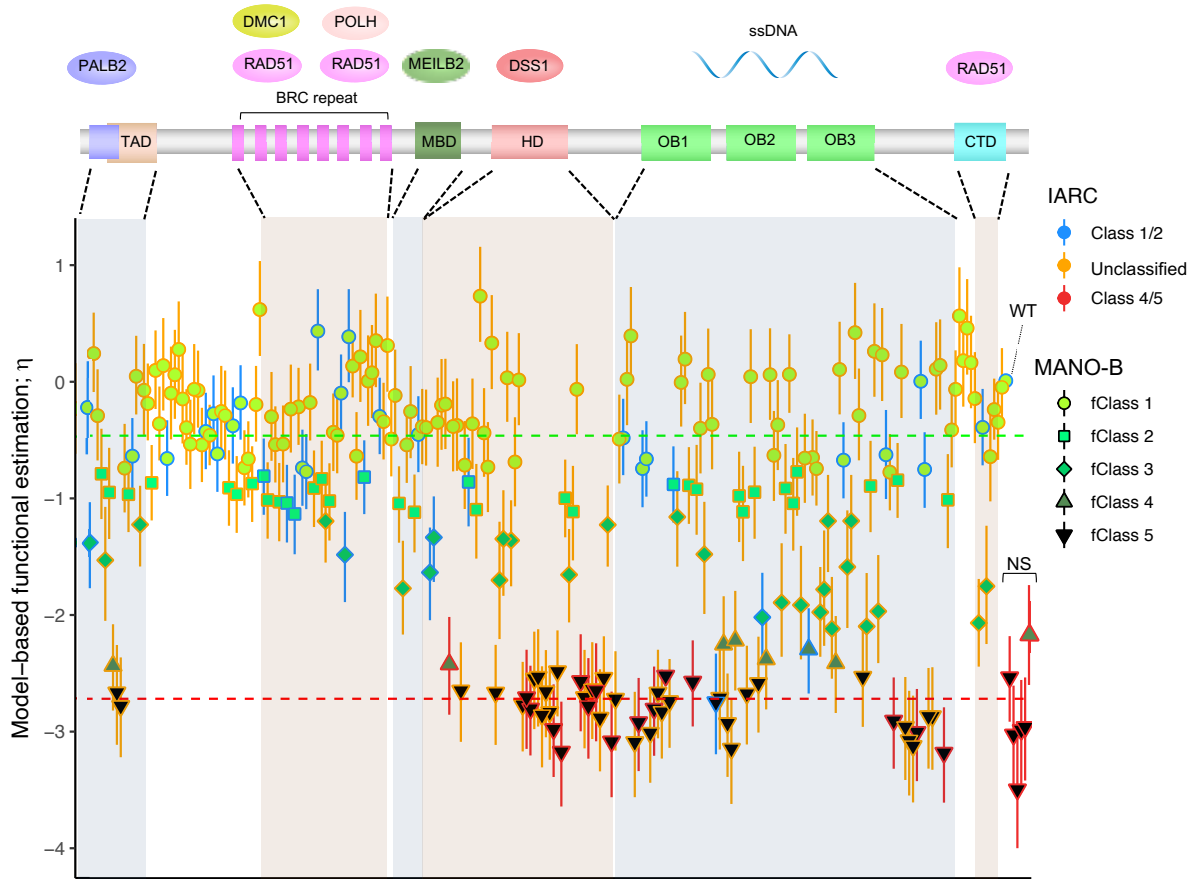


図 20 *BRCA2* バリエント 244 種の MANO-B 法による機能解析と臨床的分類
 無情報事前分布を用いた MANO-B 法によるベイズ推定に基づく各バリエントの variant-specific effect (η_v) と機能分類をバープロットで示す。*BRCA2* の機能ドメインは PALB2 interaction domain (a.a.10–40)、transactivation domain (TAD) (a.a. 18–105)、BRC repeat を含む RAD51-binding domain (a.a. 1008–2082)、MEILB2-binding domain (MBD, a.a. 2117–2339)、DNA-binding domain (a.a. 2402–3186)、helical domain (HD, a.a. 2402–2669)、oligonucleotide/oligosaccharide-binding domains (OB, a.a. 2670–2803, 2809–3048, 3056–3102)、C-terminal RAD51-binding domain (CTD, a.a. 3270–3305) が知られている。Niraparib を用いた解析結果を代表例として示す。バリエントは大きく 2 群に分かれ、上側が良性バリエント、下側が病的バリエントに相当する。破線は各群の η_v の中央値を示す。各バリエントの機能分類はベイズ因子 (BF) に基づき判定され、マークの色と形状で表されている。線の色は IARC 分類による病的意義に対応する。マークの位置は推定した η_v の中央値を、線の延びている範囲は η_v の 95% 信用区間を示す。

fClass 1 (normal) ($BF \leq 0.003$), fClass 2 (likely normal) ($0.003 < BF \leq 0.053$), fClass 3 (intermediate) ($0.053 < BF < 18.7$), fClass 4 (likely abnormal) ($18.7 \leq BF < 350$), and fClass 5 (abnormal) ($350 \leq BF$). WT, wild-type; NS, nonsense variants; a.a., amino acid.

Variant	IARC Classification	Niraparib				
		Mean	η		BF	fClass
			95% CI			
			LL	UL		
R18H	Class 2	-1.38	-1.76	-1.03	1.76E-01	fClass 3
R18C	Class 2	-0.23	-0.62	0.16	1.31E-04	fClass 1
K21R	Unclassified	0.23	-0.10	0.57	2.03E-05	fClass 1
D23Y	Unclassified	-0.80	-1.18	-0.41	4.47E-03	fClass 2
D23V	Unclassified	-0.30	-0.67	0.09	1.83E-04	fClass 1
G25R	Unclassified	-1.54	-2.06	-1.07	5.01E-01	fClass 3
N30H	Unclassified	-0.95	-1.34	-0.57	1.20E-02	fClass 2
W31C	Unclassified	-2.43	-2.81	-2.08	2.39E+02	fClass 4
W31G	Unclassified	-2.66	-3.11	-2.25	1.06E+03	fClass 5
W31L	Unclassified	-2.78	-3.23	-2.37	2.38E+03	fClass 5
F32L	Unclassified	-0.75	-1.13	-0.36	2.71E-03	fClass 1
P41L	Unclassified	-0.97	-1.30	-0.65	9.82E-03	fClass 2
Y42C	Class 1	-0.64	-0.97	-0.31	1.17E-03	fClass 1
N55S	Unclassified	0.04	-0.29	0.37	3.67E-05	fClass 1
P59A	Unclassified	-1.23	-1.59	-0.89	6.78E-02	fClass 3
T77I	Unclassified	-0.08	-0.47	0.31	4.77E-05	fClass 1
N108S	Unclassified	-0.19	-0.51	0.14	1.14E-04	fClass 1
Q147R	Unclassified	-0.87	-1.19	-0.54	5.19E-03	fClass 2
D156G	Unclassified	0.09	-0.24	0.43	3.64E-05	fClass 1
V159E	Unclassified	-0.37	-0.69	-0.05	1.95E-04	fClass 1
V159M	Unclassified	0.13	-0.26	0.52	2.78E-05	fClass 1
P168T	Class 1	-0.66	-0.99	-0.34	1.26E-03	fClass 1
G185V	Unclassified	-0.11	-0.49	0.29	7.20E-05	fClass 1
D191V	Unclassified	0.05	-0.33	0.45	3.70E-05	fClass 1
T200I	Unclassified	0.27	-0.12	0.68	1.51E-05	fClass 1
T207I	Unclassified	-0.15	-0.53	0.23	7.48E-05	fClass 1
V208G	Unclassified	-0.40	-0.72	-0.07	2.79E-04	fClass 1
V211I	Unclassified	-0.54	-0.91	-0.16	6.67E-04	fClass 1
Y232C	Unclassified	-0.07	-0.45	0.31	7.09E-05	fClass 1
F266L	Unclassified	-0.09	-0.41	0.24	7.60E-05	fClass 1
R324T	Unclassified	-0.55	-0.88	-0.23	5.80E-04	fClass 1
S326R	Class 1	-0.44	-0.75	-0.11	3.54E-04	fClass 1
S445Y	Unclassified	-0.47	-0.73	-0.20	3.18E-04	fClass 1
E462G	Class 1	-0.28	-0.60	0.05	1.41E-04	fClass 1
N588D	Class 2	-0.62	-0.94	-0.30	8.92E-04	fClass 1
F590C	Unclassified	-0.26	-0.64	0.12	1.50E-04	fClass 1
Y592C	Unclassified	-0.30	-0.68	0.10	2.36E-04	fClass 1
H595Y	Unclassified	-0.91	-1.23	-0.59	6.84E-03	fClass 2
T598A	Class 1	-0.38	-0.71	-0.05	2.79E-04	fClass 1
Y600C	Unclassified	-0.97	-1.30	-0.64	1.08E-02	fClass 2
G602R	Class 1	-0.19	-0.52	0.14	7.87E-05	fClass 1
G602V	Unclassified	-0.74	-1.06	-0.43	1.93E-03	fClass 1
E747G	Unclassified	-0.67	-1.00	-0.34	1.33E-03	fClass 1
S755C	Unclassified	-0.88	-1.20	-0.55	5.03E-03	fClass 2
N854S	Unclassified	-0.20	-0.52	0.13	8.77E-05	fClass 1
V917A	Unclassified	0.61	0.21	1.02	1.08E-05	fClass 1
L1019V	Class 1	-0.81	-1.14	-0.50	3.30E-03	fClass 2
S1074C	Unclassified	-1.02	-1.35	-0.69	1.39E-02	fClass 2
T1128I	Unclassified	-0.31	-0.69	0.09	1.87E-04	fClass 1
I1167V	Unclassified	-0.55	-0.87	-0.22	6.83E-04	fClass 1
M1168I	Unclassified	-1.03	-1.37	-0.71	1.58E-02	fClass 2
A1170V	Unclassified	-0.54	-0.86	-0.22	5.47E-04	fClass 1

表8 *BRCA2*バリエントのIARC分類およびMANO-B法での分類
LL, lower limit; UL, upper limit; CI, Credible interval; BF, Bayes factor.

Variant	IARC Classification	Niraparib				BF	fClass
		η					
		Mean	95% CI				
			LL	UL			
S1172L	Class 1	-1.04	-1.38	-0.71	1.83E-02	fClass 2	
G1224V	Unclassified	-0.24	-0.62	0.15	1.50E-04	fClass 1	
N1228D	Class 1	-1.14	-1.48	-0.81	3.36E-02	fClass 2	
R1329S	Unclassified	-0.22	-0.54	0.11	9.38E-05	fClass 1	
D1420Y	Class 1	-0.74	-1.07	-0.42	2.06E-03	fClass 1	
F1524V	Class 1	-0.77	-1.09	-0.45	2.54E-03	fClass 1	
K1530N	Unclassified	-0.19	-0.51	0.15	8.18E-05	fClass 1	
V1532F	Unclassified	-0.92	-1.24	-0.60	6.41E-03	fClass 2	
K1690N	Class 1	0.42	0.09	0.78	9.31E-06	fClass 1	
E1695V	Unclassified	-0.84	-1.16	-0.51	4.01E-03	fClass 2	
G1696V	Unclassified	-1.20	-1.56	-0.86	5.40E-02	fClass 3	
D1699N	Unclassified	-1.03	-1.36	-0.71	1.52E-02	fClass 2	
D1728N	Unclassified	-0.44	-0.76	-0.12	3.11E-04	fClass 1	
D1737V	Unclassified	-0.47	-0.79	-0.14	4.21E-04	fClass 1	
N1878K	Class 1	-0.11	-0.43	0.23	6.45E-05	fClass 1	
H1918R	Class 1	-1.48	-1.89	-1.12	3.40E-01	fClass 3	
I1929V	Class 1	0.37	-0.02	0.79	1.05E-05	fClass 1	
S1970L	Unclassified	0.12	-0.15	0.40	1.75E-05	fClass 1	
T1980I	Unclassified	-0.65	-1.04	-0.25	1.47E-03	fClass 1	
S2006R	Unclassified	0.20	-0.19	0.61	2.47E-05	fClass 1	
E2020K	Class 2	-0.82	-1.15	-0.50	3.23E-03	fClass 2	
S2041P	Unclassified	0.00	-0.39	0.39	4.69E-05	fClass 1	
G2057E	Unclassified	0.07	-0.32	0.46	3.45E-05	fClass 1	
F2058L	Unclassified	0.34	-0.05	0.75	1.27E-05	fClass 1	
H2074N	Class 1	-0.31	-0.62	0.02	1.45E-04	fClass 1	
K2075N	Unclassified	-0.35	-0.67	-0.03	1.85E-04	fClass 1	
V2109I	Unclassified	0.30	-0.09	0.71	2.14E-05	fClass 1	
V2138D	Unclassified	-0.50	-0.81	-0.18	4.12E-04	fClass 1	
H2178R	Unclassified	-0.13	-0.51	0.27	7.41E-05	fClass 1	
H2324R	Unclassified	-1.05	-1.38	-0.72	1.71E-02	fClass 2	
P2329L	Unclassified	-1.77	-2.17	-1.38	1.64E+00	fClass 3	
R2336G	Unclassified	-0.55	-0.88	-0.22	6.51E-04	fClass 1	
R2336P	Unclassified	-0.27	-0.65	0.12	1.66E-04	fClass 1	
T2337A	Unclassified	-1.12	-1.46	-0.79	2.91E-02	fClass 2	
K2411T	Class 1	-0.46	-0.78	-0.13	3.38E-04	fClass 1	
T2412A	Unclassified	-0.39	-0.72	-0.07	2.67E-04	fClass 1	
T2412I	Unclassified	-0.40	-0.72	-0.08	2.19E-04	fClass 1	
R2418G	Class 2	-1.64	-2.05	-1.25	8.00E-01	fClass 3	
N2436I	Class 1	-1.34	-1.72	-1.00	1.37E-01	fClass 3	
R2488G	Unclassified	-0.36	-0.74	0.03	2.24E-04	fClass 1	
Q2491R	Unclassified	-0.21	-0.59	0.18	1.14E-04	fClass 1	
V2503D	Unclassified	-0.20	-0.59	0.19	1.30E-04	fClass 1	
G2508S	Class 4	-2.42	-2.85	-2.01	1.54E+02	fClass 4	
S2509R	Unclassified	-0.39	-0.77	-0.01	2.55E-04	fClass 1	
S2509N	Unclassified	-0.39	-0.78	0.00	2.80E-04	fClass 1	
L2510P	Unclassified	-2.65	-3.10	-2.24	9.36E+02	fClass 5	
K2514T	Unclassified	-0.72	-1.11	-0.34	2.29E-03	fClass 1	

表8 (続) *BRCA2*バリエーションのIARC分類およびMANO-B法での分類
LL, lower limit; UL, upper limit; CI, Credible interval; BF, Bayes factor.

Variant	IARC Classification	Niraparib				BF	fClass	
		η			Mean			
		95% CI		LL				UL
T2515I	Class 1	-0.87	-1.26	-0.48	6.45E-03	fClass 2		
S2516C	Unclassified	-0.37	-0.74	0.02	2.00E-04	fClass 1		
R2520Q	Unclassified	0.72	0.32	1.15	6.64E-06	fClass 1		
R2520P	Unclassified	-1.10	-1.51	-0.71	3.43E-02	fClass 2		
V2527I	Unclassified	-0.45	-0.83	-0.07	3.61E-04	fClass 1		
P2532H	Unclassified	-0.74	-1.12	-0.35	2.64E-03	fClass 1		
G2544D	Unclassified	0.32	-0.07	0.74	1.44E-05	fClass 1		
F2562V	Unclassified	-2.66	-3.10	-2.25	1.11E+03	fClass 5		
L2581W	Unclassified	-1.70	-2.20	-1.20	1.12E+00	fClass 3		
G2584C	Unclassified	-1.35	-1.84	-0.94	1.80E-01	fClass 3		
K2597N	Unclassified	0.03	-0.37	0.43	3.42E-05	fClass 1		
Y2601C	Unclassified	-1.36	-1.74	-1.02	1.56E-01	fClass 3		
R2602T	Unclassified	-0.70	-1.08	-0.32	1.87E-03	fClass 1		
A2603T	Unclassified	0.01	-0.38	0.41	5.20E-05	fClass 1		
L2604P	Unclassified	-2.77	-3.16	-2.40	3.21E+03	fClass 5		
T2607P	Class 4	-2.70	-3.14	-2.30	1.54E+03	fClass 5		
G2609D	Class 4	-2.80	-3.20	-2.43	4.22E+03	fClass 5		
D2611G	Unclassified	-2.54	-2.97	-2.14	4.29E+02	fClass 5		
S2616F	Unclassified	-2.53	-2.96	-2.13	4.13E+02	fClass 5		
W2619C	Unclassified	-2.85	-3.32	-2.43	3.81E+03	fClass 5		
N2622S	Unclassified	-2.65	-3.05	-2.29	1.17E+03	fClass 5		
H2623R	Unclassified	-2.83	-3.24	-2.46	4.58E+03	fClass 5		
W2626R	Unclassified	-2.48	-2.86	-2.12	3.62E+02	fClass 5		
W2626C	Class 5	-2.97	-3.39	-2.60	1.14E+04	fClass 5		
I2627V	Unclassified	-1.00	-1.33	-0.68	1.28E-02	fClass 2		
I2627F	Class 5	-3.16	-3.64	-2.73	2.71E+04	fClass 5		
P2639L	Unclassified	-1.66	-2.06	-1.26	8.93E-01	fClass 3		
F2642C	Unclassified	-1.12	-1.53	-0.73	3.82E-02	fClass 2		
A2643G	Unclassified	-0.07	-0.46	0.31	4.56E-05	fClass 1		
L2647P	Class 4	-2.56	-3.01	-2.16	4.98E+02	fClass 5		
V2652G	Unclassified	-2.70	-3.15	-2.30	1.53E+03	fClass 5		
L2653P	Class 5	-2.78	-3.22	-2.36	2.33E+03	fClass 5		
L2654P	Unclassified	-2.63	-3.07	-2.22	8.89E+02	fClass 5		
R2659G	Class 5	-2.65	-3.09	-2.23	8.56E+02	fClass 5		
Y2660D	Unclassified	-2.87	-3.33	-2.46	5.12E+03	fClass 5		
E2663K	Unclassified	-2.54	-2.92	-2.18	5.42E+02	fClass 5		
I2664M	Unclassified	-1.23	-1.59	-0.91	6.46E-02	fClass 3		
S2670L	Class 4	-3.08	-3.55	-2.65	1.74E+04	fClass 5		
S2670W	Unclassified	-2.71	-3.15	-2.30	1.61E+03	fClass 5		
K2673N	Unclassified	-0.50	-0.88	-0.12	5.77E-04	fClass 1		
M2676T	Class 2	-0.49	-0.82	-0.16	3.70E-04	fClass 1		
R2678G	Unclassified	0.01	-0.39	0.40	5.60E-05	fClass 1		
A2682V	Unclassified	0.38	-0.01	0.79	1.20E-05	fClass 1		
L2686P	Unclassified	-3.08	-3.55	-2.65	1.75E+04	fClass 5		
L2688P	Class 4	-2.91	-3.33	-2.54	8.29E+03	fClass 5		
S2697N	Class 2	-0.75	-1.08	-0.42	2.49E-03	fClass 1		
A2717S	Class 1	-0.67	-0.99	-0.35	1.21E-03	fClass 1		

表8 (続) BRCA2バリエーションのIARC分類およびMANO-B法での分類
LL, lower limit; UL, upper limit; CI, Credible interval; BF, Bayes factor.

Variant	IARC Classification	Niraparib				
		Mean	η		BF	fClass
			95% CI			
			LL	UL		
L2721H	Unclassified	-3.01	-3.43	-2.63	1.44E+04	fClass 5
T2722K	Unclassified	-2.80	-3.19	-2.42	3.86E+03	fClass 5
T2722R	Class 5	-2.66	-3.05	-2.30	1.39E+03	fClass 5
D2723H	Class 5	-2.52	-2.52	-2.52	7.61E+02	fClass 5
D2723E	Unclassified	-2.82	-3.23	-2.47	4.04E+03	fClass 5
G2724W	Unclassified	-2.73	-3.13	-2.37	2.63E+03	fClass 5
K2729N	Class 1	-0.88	-1.21	-0.56	5.72E-03	fClass 2
A2730V	Unclassified	-1.16	-1.60	-0.77	5.61E-02	fClass 3
R2744G	Unclassified	-0.01	-0.39	0.37	3.83E-05	fClass 1
L2745V	Unclassified	0.18	-0.21	0.59	2.69E-05	fClass 1
V2747I	Unclassified	-0.90	-1.23	-0.57	5.93E-03	fClass 2
G2748D	Class 5	-2.57	-2.95	-2.21	6.80E+02	fClass 5
G2755V	Unclassified	-0.93	-1.32	-0.54	1.02E-02	fClass 2
A2764V	Unclassified	-0.41	-0.79	-0.02	3.37E-04	fClass 1
P2771L	Unclassified	-1.48	-1.99	-1.04	3.79E-01	fClass 3
S2773C	Unclassified	0.05	-0.33	0.45	3.58E-05	fClass 1
K2777E	Unclassified	-0.37	-0.76	0.02	2.61E-04	fClass 1
R2784W	Unclassified	-2.71	-3.15	-2.30	1.56E+03	fClass 5
R2784Q	Class 1	-2.74	-3.19	-2.33	2.09E+03	fClass 5
W2788C	Unclassified	-2.26	-2.68	-1.85	4.03E+01	fClass 4
L2792P	Unclassified	-2.92	-3.39	-2.51	6.42E+03	fClass 5
G2793V	Unclassified	-3.14	-3.62	-2.70	2.38E+04	fClass 5
P2800T	Unclassified	-0.99	-1.38	-0.61	1.56E-02	fClass 2
P2800R	Unclassified	-2.22	-2.64	-1.79	2.88E+01	fClass 4
G2813E	Unclassified	-1.11	-1.52	-0.74	3.70E-02	fClass 2
Y2826C	Unclassified	-2.67	-3.11	-2.26	1.07E+03	fClass 5
P2827A	Unclassified	0.04	-0.35	0.44	4.35E-05	fClass 1
K2833N	Unclassified	-0.95	-1.35	-0.57	1.13E-02	fClass 2
R2842H	Class 1	-2.02	-2.40	-1.63	8.18E+00	fClass 3
R2842C	Unclassified	-2.58	-3.02	-2.17	5.39E+02	fClass 5
R2842L	Unclassified	-2.38	-2.79	-1.98	1.15E+02	fClass 4
E2847K	Unclassified	0.05	-0.33	0.45	3.61E-05	fClass 1
L2862Q	Unclassified	-0.64	-1.01	-0.27	1.36E-03	fClass 1
L2865V	Unclassified	-0.38	-0.76	0.01	2.39E-04	fClass 1
I2869N	Unclassified	-1.89	-2.36	-1.38	2.99E+00	fClass 3
F2873C	Unclassified	-0.92	-1.31	-0.53	9.05E-03	fClass 2
R2896C	Unclassified	0.05	-0.28	0.40	2.93E-05	fClass 1
D2900V	Unclassified	-1.05	-1.46	-0.66	2.46E-02	fClass 2
G2901V	Unclassified	-0.78	-1.16	-0.40	3.04E-03	fClass 2
Y2905H	Unclassified	-0.67	-1.05	-0.28	1.61E-03	fClass 1
Y2905C	Unclassified	-1.92	-2.37	-1.42	3.45E+00	fClass 3
V2908G	Class 2	-2.29	-2.67	-1.95	7.64E+01	fClass 4
A2911E	Unclassified	-0.66	-0.97	-0.34	1.35E-03	fClass 1
A2911V	Unclassified	-0.75	-1.06	-0.43	2.33E-03	fClass 1
D2913H	Unclassified	-1.97	-2.35	-1.58	6.02E+00	fClass 3
D2913V	Unclassified	-1.78	-2.28	-1.28	1.64E+00	fClass 3
S2922R	Unclassified	-1.20	-1.63	-0.80	6.87E-02	fClass 3
Q2925R	Unclassified	-2.41	-2.84	-2.01	1.48E+02	fClass 4
Q2925H	Unclassified	-2.12	-2.56	-1.66	1.37E+01	fClass 3
R2933T	Unclassified	0.09	-0.29	0.49	3.21E-05	fClass 1
I2944F	Class 1	-0.68	-1.00	-0.35	1.27E-03	fClass 1

表8 (続) *BRCA2*バリエントのIARC分類およびMANO-B法での分類
LL, lower limit; UL, upper limit; CI, Credible interval; BF, Bayes factor.

Variant	IARC Classification	Niraparib				
		Mean	η		BF	fClass
			95% CI			
			LL	UL		
V2966A	Unclassified	-1.59	-2.11	-1.12	6.65E-01	fClass 3
L2972W	Unclassified	-1.20	-1.63	-0.81	6.69E-02	fClass 3
S2998Y	Unclassified	0.41	0.02	0.83	1.23E-05	fClass 1
E3002D	Unclassified	-0.30	-0.67	0.09	1.99E-04	fClass 1
Y3006D	Unclassified	-2.53	-2.96	-2.12	3.41E+02	fClass 4
R3007G	Unclassified	-2.09	-2.53	-1.63	1.10E+01	fClass 3
L3011P	Unclassified	-0.90	-1.30	-0.51	8.10E-03	fClass 2
T3030I	Unclassified	0.25	-0.13	0.65	1.53E-05	fClass 1
T3033I	Unclassified	-1.97	-2.42	-1.48	4.74E+00	fClass 3
Y3035C	Unclassified	0.22	-0.17	0.64	1.98E-05	fClass 1
Y3035S	Class 2	-0.63	-1.01	-0.25	1.11E-03	fClass 1
I3044V	Unclassified	-0.78	-1.10	-0.47	2.71E-03	fClass 1
R3052W	Class 5	-2.90	-3.31	-2.53	7.64E+03	fClass 5
P3054S	Unclassified	-0.85	-1.17	-0.53	4.19E-03	fClass 2
F3060C	Unclassified	0.07	-0.31	0.47	2.74E-05	fClass 1
V3072E	Unclassified	-2.95	-3.42	-2.54	6.38E+03	fClass 5
D3073G	Unclassified	-3.07	-3.54	-2.63	1.13E+04	fClass 5
G3076E	Unclassified	-3.12	-3.61	-2.67	2.16E+04	fClass 5
D3095E	Class 5	-3.00	-3.41	-2.62	1.33E+04	fClass 5
E3096K	Class 2	0.00	-0.33	0.32	4.93E-05	fClass 1
Y3098H	Class 1	-0.76	-1.08	-0.43	2.43E-03	fClass 1
L3101R	Unclassified	-2.87	-3.33	-2.44	4.28E+03	fClass 5
L3101P	Unclassified	-2.87	-3.32	-2.45	4.67E+03	fClass 5
S3123G	Unclassified	0.10	-0.30	0.49	3.35E-05	fClass 1
S3123R	Unclassified	0.13	-0.26	0.54	3.09E-05	fClass 1
N3124I	Class 5	-3.17	-3.61	-2.79	3.70E+04	fClass 5
Q3126P	Unclassified	-1.02	-1.42	-0.63	1.97E-02	fClass 2
I3183V	Unclassified	-0.42	-0.74	-0.09	2.81E-04	fClass 1
N3187K	Unclassified	-0.07	-0.40	0.25	5.07E-05	fClass 1
R3269G	Unclassified	0.55	0.16	0.96	1.43E-05	fClass 1
R3269T	Unclassified	0.17	-0.22	0.57	2.21E-05	fClass 1
L3274W	Unclassified	0.45	0.05	0.86	9.19E-06	fClass 1
P3280R	Unclassified	0.15	-0.23	0.56	2.68E-05	fClass 1
I3286N	Unclassified	-0.15	-0.54	0.24	8.19E-05	fClass 1
S3291C	Unclassified	-2.07	-2.43	-1.69	1.15E+01	fClass 3
P3292L	Class 1	-0.40	-0.72	-0.07	2.47E-04	fClass 1
Q3295P	Unclassified	-1.75	-2.25	-1.26	1.46E+00	fClass 3
P3301L	Unclassified	-0.65	-1.04	-0.27	1.40E-03	fClass 1
S3319F	Unclassified	-0.25	-0.51	0.02	1.23E-04	fClass 1
R3385H	Unclassified	-0.36	-0.68	-0.03	1.95E-04	fClass 1
T3387A	Unclassified	-0.06	-0.39	0.28	4.97E-05	fClass 1
Wild-type	Class 1	0.00	0.00	0.00	2.35E-05	fClass 1
Empty-vector	Class 5	-2.53	-2.92	-2.17	5.34E+02	fClass 5
K485X	Class 5	-3.02	-3.50	-2.60	1.27E+04	fClass 5
L997X	Class 5	-3.49	-4.00	-3.02	1.04E+05	fClass 5
Q1502X	Class 5	-2.98	-3.44	-2.56	1.10E+04	fClass 5
K1984X	Class 5	-2.96	-3.42	-2.55	6.83E+03	fClass 5
C2535X	Class 5	-2.17	-2.59	-1.73	1.97E+01	fClass 4

BF: Bayes factor

LL: lower limit, UL: upper limit

表8 (続) BRCA2バリアントのIARC分類およびMANO-B法での分類

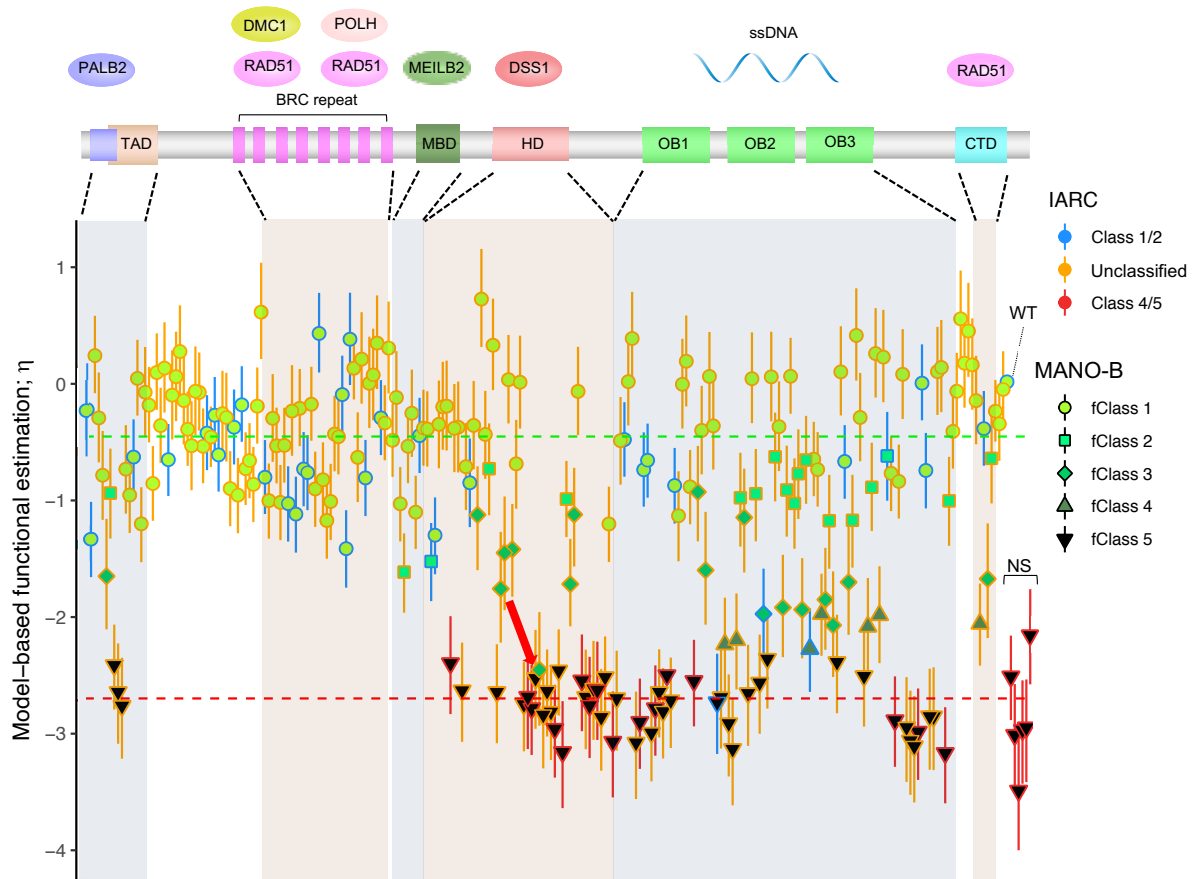


図2 1 *BRCA2*バリエント244種のMANO-B法による機能解析と臨床的分類
Align-GVGDによる事前確率を用いたMANO-B法によるベイズ推定に基づく各バリエントのvariant-specific effect (η_v)と機能分類をバープロットで示す。*BRCA2*の機能ドメインはPALB2 interaction domain (a.a.10–40)、transactivation domain (TAD) (a.a. 18–105)、BRC repeatを含むRAD51-binding domain (a.a. 1008–2082)、MEILB2-binding domain (MBD, a.a. 2117–2339)、DNA-binding domain (a.a. 2402–3186)、helical domain (HD, a.a. 2402–2669)、oligonucleotide/oligosaccharide-binding domains (OB, a.a. 2670–2803, 2809–3048, 3056–3102)、C-terminal RAD51-binding domain (CTD, a.a. 3270–3305)が知られている。Niraparibを用いた解析結果を代表例として示す。バリエントは大きく2群に分かれ、上側が良性バリエント、下側が病的バリエントに相当する。破線は各群の η_v の中央値を示す。各バリエントの機能分類はベイズ因子(BF)に基づき判定され、マークの色と形状で表されている。線の色はIARC分類による病的意義に対応する。マークの位置は推定した η_v の中央値を、線の延びている範囲は η_v の95%信用区間を示す。赤矢印はS2616Fバリエントを示す。

fClass 1 (normal) ($BF \leq 0.003$), fClass 2 (likely normal) ($0.003 < BF \leq 0.053$), fClass 3 (intermediate) ($0.053 < BF < 18.7$), fClass 4 (likely abnormal) ($18.7 \leq BF < 350$), and fClass 5 (abnormal) ($350 \leq BF$). WT, wild-type; NS, nonsense variants; a.a., amino acid.

3-5. モデルの検証

モデルの妥当性の検証として、posterior predictive check を行った。ベイズ推定による事後予測分布は、実際に観察されたデータの分布とマッチしていた (図 2 2)。

Quantile-Quantile (Q-Q) プロットは事後予測標準化残差が正規分布に従うことを示した (図 2 3)。以上から、ベイズ推定による機能推定と実際の機能の間の相違はランダムなノイズによって生じており、モデルにはバイアスが小さいと判断した。

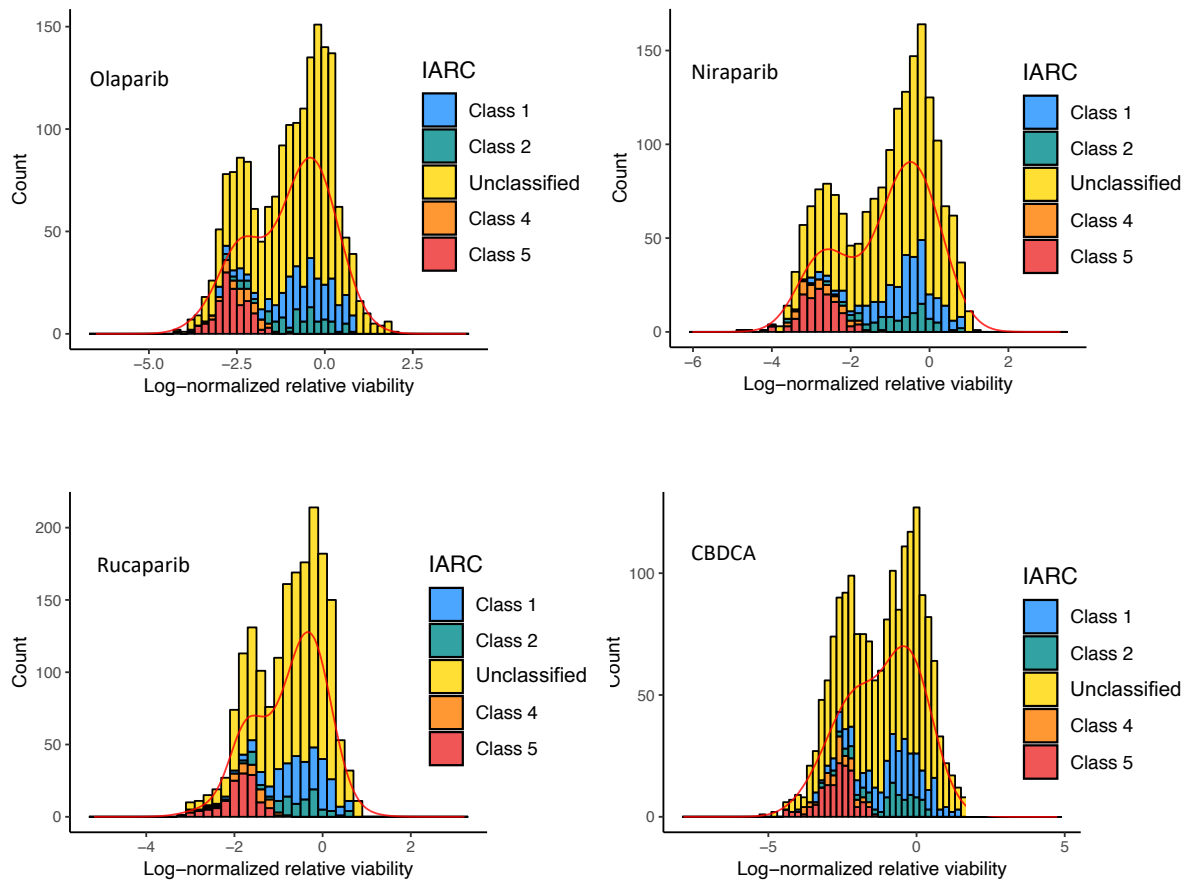


図 2 2 MANO-B法での機能予測と実際のデータの関係

MANO-B法によるベイズ推定で算出した対数化相対的生存率の事後予測密度曲線と実際に得られたデータのヒストグラムを示す。ともに2峰性の混合正規分布に従っている。

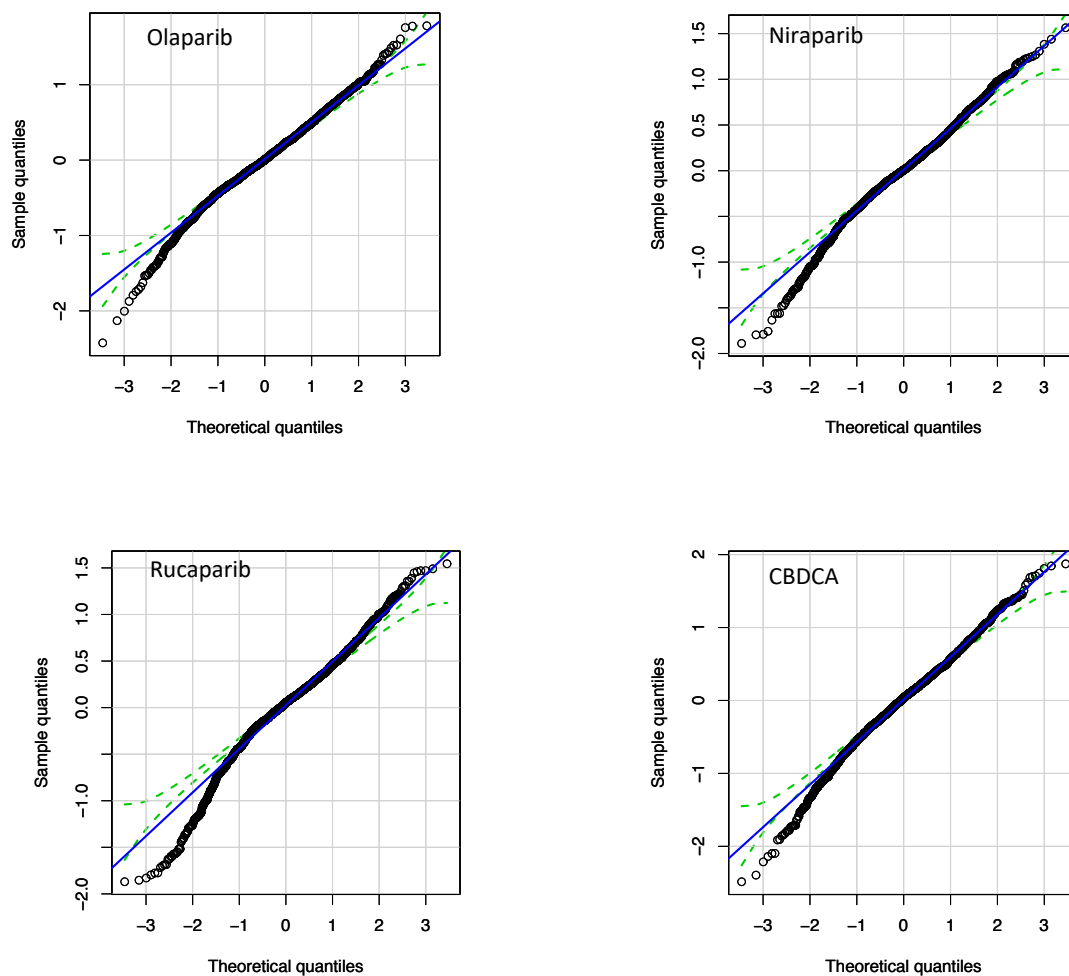


図 2 3 MANO-B法での機能予測と実際のデータの誤差
 MANO-B法によるベイズ推定で算出した対数化相対的生存率の事後予測密度曲線と実際に得られたデータとの誤差をQ-Qプロットで評価した。各バリエントの誤差は直線上に分布しており、誤差が正規分布に従っていることを示す。

3-6. HDR アッセイとの比較

従来 *BRCA2* 機能解析法のゴールドスタンダードとされてきた DR-GFP レポーターアッセイを 24 個のバリエーションに対して行い、MANO-B 法との一貫性を検討した (図 2 4)。二つの実験結果は良く相関していたが、わずかに相違点があった。S3291C バリエーションは MANO-B 法と比較して DR-GFP レポーターアッセイではやや高い相同組み換え修復能を示していた。S3291 は CDK1/2 によるリン酸化を受ける残基であり、他の病的バリエーションとは違った機構で *BRCA2* の機能が障害されると想定される [45]。DR-GFP レポーターアッセイのような短期間で行う過剰発現系での実験では S3291C バリエーションの機能への影響を評価することが困難であったのではないかと考えた。

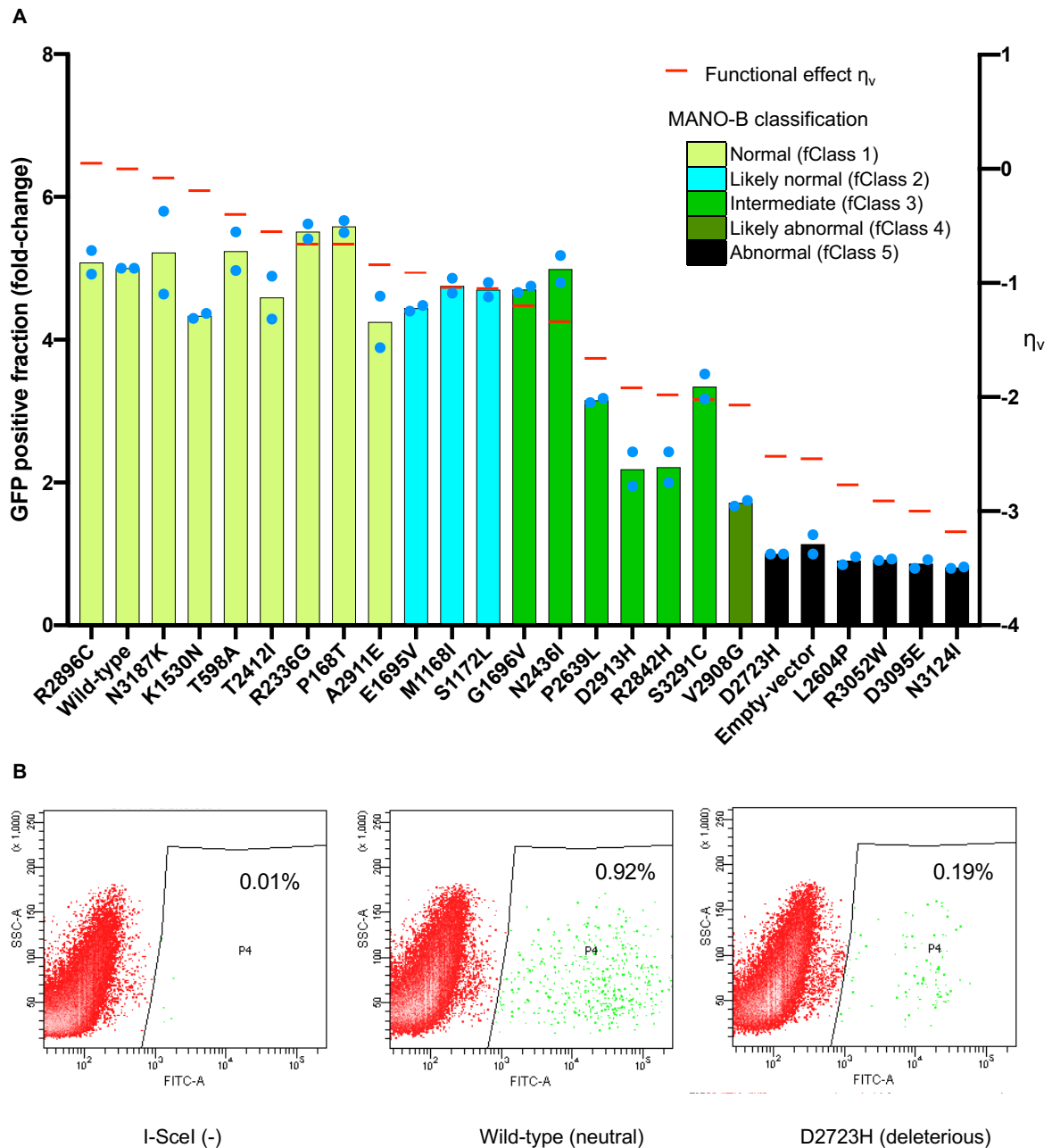


図 2 4 DR-GFPレポーターアッセイとMANO-B法での機能予測の比較

24個の *BRCA2* バリエーションに対してDR-GFPレポーターアッセイによる機能推定を行った。(A) MANO-B法での分類とDR-GFPレポーターアッセイで求めた機能には一貫性があった。*BRCA2* バリエーション発現ベクターとI-SceI発現ベクターを一過性に発現させた4日後、GFP蛍光陽性細胞数をFACSでカウントした。GFP蛍光陽性細胞率は野生型導入細胞を5、D2723H導入細胞を1としてアフィン変換で正規化した。全てのバリエーションはbiological duplicateおよびtechnical triplicateで評価した。青点が実際に得られたtriplicateの平均値を示す。棒グラフの色がMANO-B法での分類を示し、高さが正規化したGFP蛍光陽性細胞率を示す。赤線はMANO-B法で推定した各バリエーションの機能(η_v)を示す。(B) 実際のGFP蛍光陽性細胞のゲーティング。

小括 2

MANO-B 法での機能分類は ACMG 分類による病的意義と完全に一致していた。

186 個の *BRCA2* VUS を評価し、新たな 37 個の病的バリエーションを予測した。予測モデルは実際に観察されたデータとマッチしており、明らかなバイアスはみられなかった。従来のゴールドスタンダードである DR-GFP レポーターアッセイとも結果の一貫性が見られた。

3-7. 迅速な病的意義判定システムの構築

MANO-B 法により新たに 186 個の VUS に対して機能解析を行ったが、表 1 で示したとおり *BRCA2* には未だ数千種類の VUS が存在しており、また日々行なわれている遺伝子検査によって新たな VUS が検出され続けている。そこで、MANO-B 法を継続して行い網羅的に VUS の機能解析を行うだけではなく、新たに発見されたバリエーションに対して、その病原性を迅速に判定する Accurate BRCA Companion Diagnostic (ABCD) テストを MANO-B 法の臨床応用例として考案した (図 2 5)。ABCD テストは具体的には担がん患者における PARP 阻害薬のコンパニオン診断として用いることができる。遺伝子検査での新規 VUS 検出から機能の報告までを 5 週間以内に行うことができる。ただし、実際には ABCD テストの結果の解釈を各医療施設のエキスパートパネルで検討してから患者に適用する必要がある、もう数週を要すると想定されるが、これは生命予後の限られた担がん患者であっても現実的に許容できる時間である。また、実験にかかる費用は主にシーケンス試薬代で、新規の 4 バリエーションを解析する場合は 1 バリエーションあたり約 4 万円程度であり、これに人件費が加わる。一度に多くのバリエーションを評価すると費用はより少なくなる。

ABCD テストは 12 個のバリエーションを用いて行われる。良性バリエーションのコントロールとして野生型と T2515I バリエーションを、病的バリエーションのコントロールとして D2723H と Y2660D バリエーションを用い、小スケールの MANO-B 法を行い、4 個の新た

に発見されたバリエーションの機能解析を行うことができる。実験結果はこれまでに行なわれた MANO-B 法の結果とベイズ推定によって統合され、実験バッチ間でのバイアスを補正した上で病的意義が判定される。ただし、MANO-B 法は塩基置換のサプライスへの影響は評価できないため、サプライス異常による機能低下が疑われる場合は患者の組織あるいは血液を用いて転写産物の解析を行う必要がある[46]。もしなんらかの異常な転写産物が検出された場合は、発見された転写産物全てに対して ABCD テストで機能評価が可能である。

ABCD テストの正確性を評価するために、仮に I1929V、D3095E、Y3035S、S3291C の 4 バリエーションを新規に検出されたバリエーションとして扱い、これらの ABCD テストでの機能予測が大スケールで複数回行われた MANO-B 法の結果とどの程度一致しているかを評価した。ABCD テストの検証実験は biological replicate として 3 回行われ、病原性予測は D3095E の一つのバッチの結果を除いて一貫性があった（表 9）。臨床での実用化において予測の一貫性が得られないことは重大な問題となり得る。MANO-B 法はトランスフェクションを用いた遺伝子導入法であり、実験の各バッチごとに遺伝子導入効率にばらつきが生じることは原理的に不可避である。よって、一回のバッチの結果だけで診断を行うことには危険性が伴う。独立したバッチで繰り返しトランスフェクションを行うことが安定した正確な分類を行うためには必須である。そこで、3 回行われた ABCD テストのバッチの結果を統合して解析を行うと、

MANO-B 法での機能予測と ABCD テストでの機能予測は一致した。今回の実験では 4 バリエーションで再現性を確認しただけであり、臨床応用には更なる妥当性と再現性の検証が必要である。

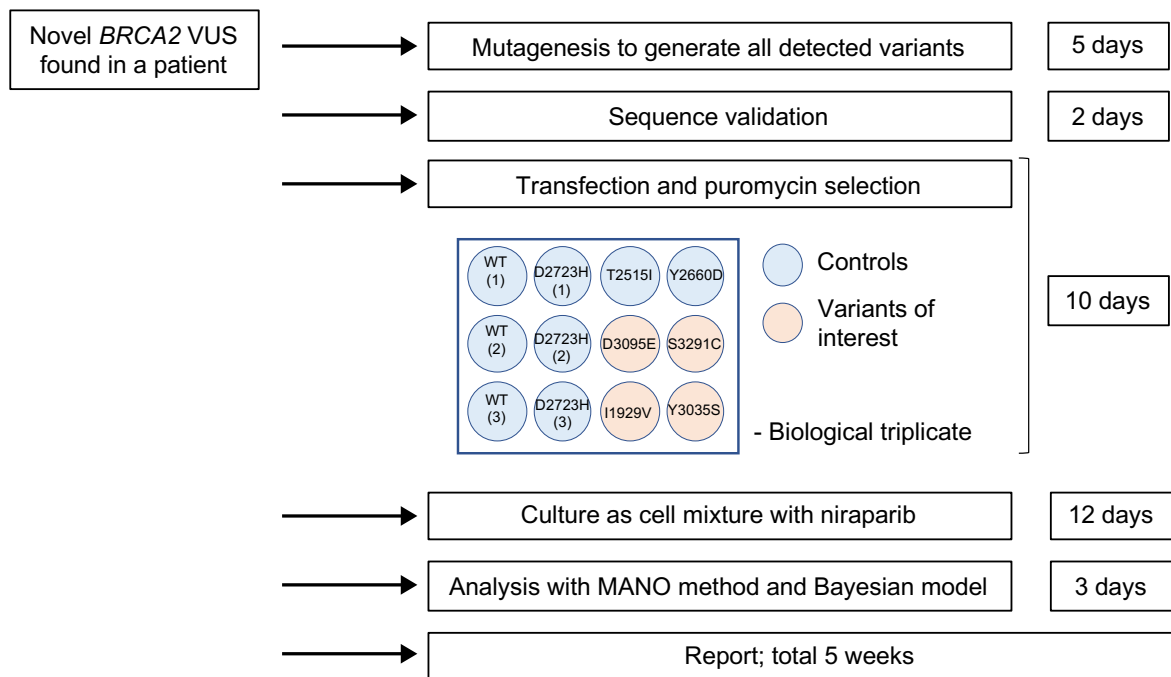


図 2 5 Accurate BRCA Companion Diagnostic (ABCD) テストの概略

遺伝子検査で新規に検出された *BRCA2* バリエントに対して RNA シーケンシングでスプライス異常を確認の上、検出された産物に対して cDNA を作成する。コントロールとして 2 種類の良性バリエント（野生型と T2515I）、2 種類の病的バリエント（Y2660D と D2723H）をおき、4 種類の新規バリエントの機能を小スケールの MANO-B 法で解析する。実験誤差の補正のために実験は biological triplicate で行う。得られた結果を過去に行った MANO-B 法の結果とベイズ推定によって統合し、最終的な結果を 5 週間で返却する。

Variant	IARC classification	ABCD test	η	Bayes factor	fClass
I1929V	Class 1	Previous batches	0.37 (-0.02–0.79)	1.05×10^{-5}	fClass 1
		New batch-1	0.19 (-0.33–0.73)	1.02×10^{-5}	fClass 1
		New batch-2	-0.23 (-0.73–0.28)	1.63×10^{-4}	fClass 1
		New batch-3	0.08 (-0.43–0.6)	3.71×10^{-5}	fClass 1
		3 batches combined	0.11 (-0.23–0.44)	1.40×10^{-5}	fClass 1
Y3035S	Class 2	Previous batches	-0.63 (-1.01–0.25)	1.11×10^{-3}	fClass 1
		New batch-1	-0.55 (-1.05–0.04)	1.12×10^{-3}	fClass 1
		New batch-2	-0.53 (-1.04–0.02)	9.57×10^{-4}	fClass 1
		New batch-3	-0.36 (-0.87–0.16)	3.01×10^{-4}	fClass 1
		3 batches combined	-0.47 (-0.79–0.15)	2.79×10^{-4}	fClass 1
D3095E	Class 5	Previous batches	-3 (-3.41–2.62)	1.33×10^4	fClass 5
		New batch-1	-2.31 (-2.8–1.78)	4.45×10^1	fClass 4
		New batch-2	-2.63 (-3.12–2.15)	5.75×10^2	fClass 5
		New batch-3	-2.69 (-3.2–2.19)	9.28×10^2	fClass 5
		3 batches combined	-2.52 (-2.85–2.19)	7.85×10^2	fClass 5
S3291C	Unclassified	Previous batches	-2.07 (-2.43–1.69)	1.15×10^1	fClass 3
		New batch-1	-1.06 (-1.7–0.53)	6.15×10^{-2}	fClass 3
		New batch-2	-2.06 (-2.6–1.34)	7.05×10^0	fClass 3
		New batch-3	-1.35 (-2.12–0.74)	3.17×10^{-1}	fClass 3
		3 batches combined	-1.46 (-1.86–1.11)	3.39×10^{-1}	fClass 3

Data are presented as means (95% credible interval).

表9 Accurate BRCA Companion Diagnostic (ABCD) テストの結果

各バリエントの、複数回大スケールで行ったMANO-B法での機能予測（previous batches）と、3回行ったABCDテストでの機能予測（new batches）。D3095E変異はうち一回の実験で分類に不一致が生じている。実験バッチ間でのバイアスを軽減するため、3回の実験結果を統合して解析すると、全てのバリエントでMANO-B法の機能予測とABCDテストでの機能予測は一致した。

小括 3

MANO-B 法の臨床応用の一例として、遺伝子検査で検出された新規 VUS の迅速な機能解析システムである ABCD テストを考案した。小スケールの実験系であり実験バッチ間のバイアスの影響を受けることから、複数回の独立した実験結果を統合して病的意義を判定する必要があった。4 バリエントという限られた数ではあるが、大規模な MANO-B 法での解析と一致する実験結果を得られた。

第4章 考察

これまでに *BRCA2* バリアントの機能解析法は複数開発されてきている。しかし、*BRCA2* には複数の機能があり、ある機能が低下することが発がんしやすさに直接繋がるわけではないことには注意が必要である。一例として、確実に病的バリアントと考えられている R3052W はセントロソーム増殖アッセイでは病原性を示さない[36]。また、良性バリアントとされている G2353R は自発的相同組み換えアッセイでは病的な機能を示す[47]。これらの事実は、個々の機能解析の実験結果は臨床的なエビデンスも踏まえて注意深く解釈する必要性を示唆している。

特記すべき点として、MANO-B 法での機能予測の分布は良性バリアントと病的バリアントの2群による2峰性混合正規分布となるが、2群は連続しており明確な閾値が存在しないことを挙げたい。この現象は DR-GFP レポーターアッセイでの機能予測でも同様に観察されており、良性バリアントと病的バリアントの中間的な機能を持つ機能低下型バリアントの存在を支持している[22, 48]。機能低下型バリアントの保持者は病的バリアント保持者よりも低い程度で発がんリスクを上昇させ、また環境要因の影響を受けると想定される。よって、*BRCA2* の機能解析においては、ある閾値を境に病的と良性を二分する方法ではなく、機能低下型バリアントも考慮した分類手法が必要であった。

MANO-B 法では、全てのバリアント導入細胞を均一に混合し一枚のディッシュで

薬剤を投与しながら培養する。全ての細胞は完全に同一な環境で競合的に増殖するため、個別に実験をする場合と比べて培地の pH、温度、薬剤濃度、培養時間といった実験誤差の原因となる要素を排除することができる。これにより、機能のわずかな変化であっても検出しやすくなるため、これまでに開発された DR-GFP レポーターアッセイをはじめとした実験系よりも機能低下型バリエーションの評価に優れていると考える。

BRCA1 バリエーションを一度に数千種類評価できる機能解析法として、Findlay らは saturation genome editing 法を開発した[19]。これは、一倍体細胞株 HAP1 の *BRCA1* 遺伝子に CRISPR/cas9 システムを用いて変異を導入すると、相同組み換え修復能が失われた細胞が死滅していく現象を観察するものである。MANO-B 法よりも優れている点として、saturation genome editing 法はスプライス異常による機能低下やプロモーター領域の変異による発現量減少による影響を正確に評価できることが挙げられる。一方で、MANO-B 法は二倍体細胞を用いており、より生理的な条件下で相同組み換え修復能を評価できていることや、同一対立遺伝子内の compound 変異の評価が可能であることが有利な点である。さらに、MANO-B 法は直接的にバリエーション導入細胞の PARP 阻害薬への反応性をみているため、発がんに関与することがはっきりしている相同組み換え修復能の異常を検出できるが、saturation genome editing 法の結果は変異導入後の細胞の生死であり、必ずしも相同組み換え修復能を評価しているとは限らな

い。いまだ saturation genome editing 法は *BRCA2* の機能解析を実現できてはいないものの、将来的にも MANO-B 法と saturation genome editing 法は互いに補完し合うものになると考える。

日々行なわれている遺伝子検査によって多数の *BRCA2* バリエントが発見されているが、ほとんどの VUS は非常にまれなものであり、疫学的データから頑健なエビデンスを得ることが困難である。最近になって行なわれた大規模なケースコントロール研究において、比較的まれなバリエントである G2508S (IARC Class 4) および Y3035S (IARC Class 2) が発がんリスクを高める可能性が示唆された[48]。このような十分とは言えない疫学的エビデンスを MANO-B 法を用いて検証した。G2508S は fClass 4 ($\eta_v = -2.42$) であり疫学データと同じく機能低下型バリエントを示唆する結果であった。一方、Y3035S は fClass 1 ($\eta_v = -0.63$) と正常な機能を呈した。ただし、Y3035S に対応する塩基置換である c.9104A>C がスプライスに影響を来している可能性は否定できない。ACMG ガイドラインが提唱するように、複数の異なる種類のエビデンスが一貫して同じ病的意義を支持しているときに限って信頼性があると考えれば、G2508S は病的バリエントあるいは機能低下型バリエントとみなしてよく、一方で Y3035S は判定を留保するのが妥当と言える。機能低下型バリエントを保持する患者に対し、どのような治療が最適であるのかはいまだ不明であるが、MANO-B 法は PARP 阻害薬への感受性を直接評価する実験系であることから、MANO-B 法によって

機能低下が示されたバリエントを保持する担がん患者は PARP 阻害薬を用いた治療の適応になり得ると考える。

全体として、MANO-B 法は *BRCA2* バリエントの機能解析法として頑健であり、機能の定量的あるいは確率的評価が可能な手法であると言える。さらに、今回行った 244 バリエントでの解析は、ベイズ推定の手法を用いることで、今後追加で行う実験のデータと統合し、実験のバッチ間でのバイアスを補正した上で正確な機能予測を行う基礎となる。また、この手法は *BRCA2* 以外のがん抑制遺伝子であっても、なんらかの合成致死の関係にある二つの遺伝子であれば応用の余地があるため、*BRCA1* をはじめとした様々ながん抑制遺伝子のバリエント保持者の易発がん性を予測するためのエビデンス構築に用いることができる。

MANO-B 法の臨床応用例として考案した ABCD テストは、二つの使用方法が考えられる。一つは担がん患者に対する PARP 阻害薬による治療のコンパニオン診断であり、もう一つはがん未発症者に対する、今後の発がんリスクを軽減するための予防的乳房切除術および卵巣・卵管切除術の適応の判断としてのコンパニオン診断である。前者については、MANO-B 法が PARP 阻害薬への感受性を直接観察している実験系であることから、腫瘍の増大抑制を目的とした PARP 阻害薬のコンパニオン診断として ABCD テストを用いることは妥当性があり、また PARP 阻害薬の毒性が低いこと、患者に残された時間が短いことから、確定的なエビデンスではないものの ABCD テ

ストのみを根拠に治療適応を判断することに合理性はある。ただし、ABCD テストあるいは MANO-B 法での分類や variant-specific effect がどの程度であれば治療効果が見込めるのかという閾値の設定は今後の課題である。後者については、患者はがんを未発症であり、治療の緊急性は乏しい。実際、遺伝子検査で *BRCA1* あるいは *BRCA2* の病的バリエントが検出されたがん未発症者の半分は予防的卵巣・卵管切除術を受けるまで1年以上待機している[49]。予防的手術は不可逆的かつ侵襲が大きい医療行為であるため、不確実なエビデンスを基に手術を行うことは避けなくてはならない一方、待機していても十分な疫学的エビデンスが得られる見込みも乏しい。発がんリスクが高いと思われる fClass 5 と判定されたバリエントの保持者に対しては、十分な遺伝カウンセリングを行った上で予防的手術を行うことは選択肢になると考えるが、部分的に機能が残存していると思われる fClass 3/4 のバリエントの保持者においては、発がんリスクはバリエントの機能低下の程度に依存していると考えられるため、十分なエビデンスのない現時点では予防的手術よりは定期的なチェックアップを受ける方が良いであろう。

腫瘍の PARP 阻害薬への反応性は *BRCA1* あるいは *BRCA2* の病的バリエント以外にも、*EMSY* 遺伝子増幅、ファンconi貧血パスウェイの不活化、その他の相同組み換え修復遺伝子の機能喪失といった要因で生じる[50]。PARP 阻害薬のコンパニオン診断としては、これらの個々の要因を評価する他に、腫瘍組織の whole-genome

sequencing における変異や遺伝子再構成のシグニチャー解析によって相同組み換え修復能を評価する手法がある[51, 52]。この手法のメリットとして、どのバリエントが機能喪失型であるのかという具体的な情報なしに相同組み換え修復能を評価できる点が挙げられる。Nones らは 22 例の *BRCA2* 病的バリエント保持患者の乳がん組織に対して whole-genome sequencing を行い、うち 21 例を相同組み換え修復能が低下していると判定し、残りの 1 例は正常な機能と判定していた[52]。この手法は *BRCA1* あるいは *BRCA2* 以外の異常を含めた相同組み換え修復能全体を評価している点で MANO-B 法よりも優れているが、一方で相同組み換え修復能の低下の程度と PARP 阻害薬の奏効性の関連性については評価がなされていない。また、この手法は腫瘍組織を必要とするため、がん発症前のバリエント保持者に対する発がんリスク評価法とはなり得ない。よって、ABCD テストと whole-genome sequencing による相同組み換え修復能評価は並列して行うことでより多くの情報が得られるであろう。また、MANO-B 法および ABCD テストを他の相同組み換え修復関連遺伝子に拡張していくことで、より薬剤奏効性を正確に評価できるようになると考える。

MANO-B 法をバリエントの臨床的意義づけとして活用するには幾つかの限界がある。MANO-B 法は原理的には *BRCA2* バリエント導入細胞の PARP 阻害薬への感受性から相同組み換え修復能を評価する実験系であり、バリエントの発がん性を直接観察しているわけではない。また、*BRCA2* は G2 期から M 期への遷移の制御、転写伸長

の制御などの相同組み換え修復能以外の機能も有しているが、MANO-B 法はこれらの機能を評価できていない[53, 54]。確かに MANO-B 法の結果は IARC 分類や ACMG 分類による病的意義と高い関連性があり、それは *BRCA2* バリアントの病原性が主に相同組み換え修復能異常に起因しているためであるが、相同組み換え修復能以外の要因による発がん性はわかっていない。さらに、*BRCA2* の病的バリアントは発がんの浸透率が 100%ではないため、MANO-B 法が高いベイズ因子を持ってあるバリアントが相同組み換え修復能を喪失していると予測しても、MANO-B 法でのベイズ因子の数値は発がんイベントの発生率を直接予測するわけではないことには注意が必要である。このことは、明確に良性あるいは病的とは言えない機能低下型バリアントにおいて特に重要である。例えば、MANO-B 法による機能予測と ClinVar による臨床的病的意義が乖離している変異である R2842H と V2908G は機能低下型バリアントと考えられるが、一般に機能低下型バリアントによる発がんへの影響の程度は疫学的には明らかになっておらず、これらのバリアントに対する適切な臨床的対応は定まっていない。ゆえに、MANO-B 法による *BRCA2* バリアントの機能解析の結果は ACMG ガイドラインの枠組みの中でその他のエビデンスと組み合わせて慎重に解釈されるべきものであると考える。

また、MANO-B 法が基づいている cDNA を用いた実験系に由来する限界もある。この手法は塩基置換がもたらすスプライス異常による機能への影響を評価すること

ができない。これまでにスプライス異常を予測する幾つかのコンピュータ予測モデルが開発されているが、いずれも臨床的に仕様可能なほどの信頼性は獲得できておらず、とくにコンセンサススプライス部位以外の領域での変異に対しては適切なモデルは開発されていない[55]。ハイブリッドミニジーン法や saturation genome editing 法といった手法を用いた基礎実験に基づくエビデンスの構築が必要である[19, 56, 57]。個々の患者から検出されたバリエーションに対しては、患者の血液や腫瘍から抽出した mRNA に対して RNA シーケンシングを行うことによってスプライス異常を検出することが可能である[46]。

その他に MANO-B 法の限界として、単一の大腸がん細胞株で実施した実験の結果に基づいている点が挙げられる。*BRCA2* の病的バリエーションが大腸がんの発がんリスクを上昇させるかどうかに関するエビデンスはいまだ存在しない[58]。また、他のがん腫に由来する細胞株でも同様の結果が再現性をもって得られるかどうかは不明である。MANO-B 法の結果の信頼性を高めるためには、*BRCA2* 病的バリエーションによって高い頻度で生じる乳がんや卵巣がんの細胞株を含む、様々な相同組み換え修復能の状態の細胞株を用いた再現実験が行われることが望ましい。私も実際に 2 種類の乳がん細胞株（HCC1599 および HCC1428）での再現実験を試みたが、遺伝子の導入効率が低く実験の再現は困難であった。

また、*BRCA2* バリエーション導入細胞において生理的なレベルの mRNA 発現量を得る

ために、10 コピー相当を導入する必要があったこと、CMV プロモーターによって非生理的かつ恒常的に発現する BRCA2 タンパクが、細胞内でどの程度正常な機能を有するのかが不明である点にも注意が必要である。さらに、Western ブロットでは抗 FLAG 抗体を用いたため、親細胞株と *BRCA2* バリエント導入 DLD1 *BRCA2* (-/-)細胞株でタンパク発現量が同程度かどうかは確認できていない。親細胞株と DLD1 *BRCA2* (-/-)細胞株で細胞増殖速度が異なることも、薬剤感受性へ影響を与えていると考えられる。

なお、MANO-B 法は DLD1 *BRCA2* (-/-)細胞株には培養しているだけで DNA 二本鎖切断損傷が加わっているという前提、DNA 二本鎖切断損傷が *BRCA2* 欠損細胞では相同組み換え修復によっては修復されず、非相同末端結合などの複製エラーが生じやすい代替経路によって修復されるという前提、および生じた DNA 二本鎖切断損傷が導入した *BRCA2* バリエントによって修復されるという前提に基づいて行ったが、これらの前提は証明していない。DNA 二本鎖切断損傷にともない H2AX の ATM によるリン酸化が生じるため、形成された γ H2AX を抗体で検出することで DNA 二本鎖切断損傷が細胞に生じているかどうか判定できる。また、正常な機能を持つ *BRCA2* バリエントを導入した細胞では機能喪失型バリエントを導入した細胞と比較して DNA 損傷が修復されやすいため γ H2AX の染色性が低下すると考えられる。この γ H2AX の評価を行うことで、MANO-B 法の理論的背景を強化することが今後の課題

として挙げられる。

以上の通り、MANO-B 法は相同組み換え修復能異常に関するがん生物学への知見を深め、がんの診断と治療を改善し個別化医療の実現に繋がる革新的な機能解析手法である。なお、本研究内容については 2020 年 5 月に *Nature Communications* 誌に公開した [59]。本研究の解析の再現に必要なソースコードとデータは <https://github.com/MANO-B/Bayes> からダウンロード可能である。

結語

本研究により、*BRCA2* バリエントに対する臨床的病的意義の確率論的推定手法を確立し、新たに 186 個の VUS の機能解析を行った結果、37 個の新たな病的バリエントが予測された。さらに臨床応用例として、遺伝子検査で新規に検出された VUS の迅速な病的意義判定システムを構築した。

謝辞

本研究は、東京大学大学院医学系研究科 感覚・運動機能医学講座 整形外科学 分野、同生化学・分子生物学講座 細胞情報学分野、および国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野でおこなわれました。

本論文の作成にあたり、基礎研究を始める機会を与えていただいた東京大学整形外科学教室 田中栄教授、小林寛講師に深謝いたします。本研究の立案および遂行にあたり、多くの助言と指導を賜りました国立がん研究センター研究所 間野博行研究所長、高阪真路ユニットリーダーに深謝いたします。

本研究の実験をサポート頂きました井上聡先生、丸山茜さんをはじめ、研究室の同僚の方々に感謝いたします。

引用文献

1. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* **348**, 2339-2347 (2003).
2. Finch AP, Lubinski J, Møller P, Singer CF, Karlan B, Senter L, Rosen B, Maehle L, Ghadirian P, Cybulski C, Huzarski T, Eisen A, Foulkes WD, Kim-Sing C, Ainsworth P, Tung N, Lynch HT, Neuhausen S, Metcalfe KA, Thompson I, Murphy J, Sun P, Narod SA. Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *J Clin Oncol* **32**, 1547-1553 (2014).
3. Heemskerk-Gerritsen BA, Brekelmans CT, Menke-Pluymers MB, van Geel AN, Tilanus-Linthorst MM, Bartels CC, Tan M, Meijers-Heijboer HE, Klijn JG, Seynaeve C. Prophylactic mastectomy in BRCA1/2 mutation carriers and women at risk of hereditary breast cancer: long-term experiences at the Rotterdam Family Cancer Clinic. *Ann Surg Oncol* **14**, 3335-3344 (2007).
4. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, Senkus E; ESMO Guidelines Committee. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol* **27**, v103-v110 (2016).
5. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917-921 (2005).
6. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913-917 (2005).
7. Cline MS, Liao RG, Parsons MT, Paten B, Alquaddoomi F, Antoniou A, Baxter S, Brody L, Cook-Deegan R, Coffin A, Couch FJ, Craft B, Currie R,

- Clott CC, Dolman L, den Dunnen JT, Dyke SOM, Domchek SM, Easton D, Fischmann Z, Foulkes WD, Garber J, Goldgar D, Goldman MJ, Goodhand P, Harrison S, Haussler D, Kato K, Knoppers B, Markello C, Nussbaum R, Offit K, Plon SE, Rashbass J, Rehm HL, Robson M, Rubinstein WS, Stoppa-Lyonnet D, Tavtigian S, Thorogood A, Zhang C, Zimmermann M; BRCA Challenge Authors, Burn J, Chanock S, Rättsch G, Spurdle AB. BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2. *PLoS Genet* **14**, e1007752 (2018).
8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **17**, 405-424 (2015).
 9. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, Hogervorst FB, Hoogerbrugge N, Spurdle AB, Tavtigian SV; IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* **29**, 1282-1291 (2008).
 10. Tavtigian SV, Greenblatt MS, Goldgar DE, Boffetta P, Group IUGVW. Assessing pathogenicity: overview of results from the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. *Hum Mutat* **29**, 1261-1264 (2008).
 11. Easton DF, Deffenbaugh AM, Pruss D, Frye C, Wenstrup RJ, Allen-Brady K, Tavtigian SV, Monteiro AN, Iversen ES, Couch FJ, Goldgar DE. A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes. *Am J Hum Genet* **81**, 873-883 (2007).
 12. Lindor NM, Guidugli L, Wang X, Vallée MP, Monteiro AN, Tavtigian S, Goldgar DE, Couch FJ. A review of a multifactorial probability-based model for classification of BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance (VUS). *Hum Mutat* **33**, 8-21 (2012).

13. Parsons MT, Tudini E, Li H, Hahnen E, Wappenschmidt B, Feliubadaló L, Aalfs CM, Agata S, Aittomäki K, Alducci E, Alonso-Cerezo MC, Arnold N, Auber B, Austin R, Azzollini J, Balmaña J, Barbieri E, Bartram CR, Blanco A, Blümcke B, Bonache S, Bonanni B, Borg Å, Bortesi B, Brunet J, Bruzzone C, Bucksch K, Cagnoli G, Caldés T, Caliebe A, Caligo MA, Calvello M, Capone GL, Caputo SM, Carnevali I, Carrasco E, Caux-Moncoutier V, Cavalli P, Cini G, Clarke EM, Concolino P, Cops EJ, Cortesi L, Couch FJ, Darder E, de la Hoya M, Dean M, Debatin I, Del Valle J, Delnatte C, Derive N, Diez O, Ditsch N, Domchek SM, Dutrannoy V, Eccles DM, Ehrencrona H, Enders U, Evans DG, Farra C, Faust U, Felbor U, Feroce I, Fine M, Foulkes WD, Galvao HCR, Gambino G, Gehrig A, Gensini F, Gerdes AM, Germani A, Giesecke J, Gismondi V, Gómez C, Gómez Garcia EB, González S, Grau E, Grill S, Gross E, Guerrieri-Gonzaga A, Guillaud-Bataille M, Gutiérrez-Enríquez S, Haaf T, Hackmann K, Hansen TVO, Harris M, Hauke J, Heinrich T, Hellebrand H, Herold KN, Honisch E, Horvath J, Houdayer C, Hübel V, Iglesias S, Izquierdo A, James PA, Janssen LAM, Jeschke U, Kaulfuß S, Keupp K, Kiechle M, Kölbl A, Krieger S, Kruse TA, Kvist A, Lalloo F, Larsen M, Lattimore VL, Lautrup C, Ledig S, Leinert E, Lewis AL, Lim J, Loeffler M, López-Fernández A, Lucci-Cordisco E, Maass N, Manoukian S, Marabelli M, Matricardi L, Meindl A, Michelli RD, Moghadasi S, Moles-Fernández A, Montagna M, Montalban G, Monteiro AN, Montes E, Mori L, Moserle L, Müller CR, Mundhenke C, Naldi N, Nathanson KL, Navarro M, Nevanlinna H, Nichols CB, Niederacher D, Nielsen HR, Ong KR, Pachter N, Palmero EI, Papi L, Pedersen IS, Peissel B, Perez-Segura P, Pfeifer K, Pineda M, Pohl-Rescigno E, Poplawski NK, Porfirio B, Quante AS, Ramser J, Reis RM, Revillion F, Rhiem K, Riboli B, Ritter J, Rivera D, Rofes P, Rump A, Salinas M, Sánchez de Abajo AM, Schmidt G, Schoenwiese U, Seggewiß J, Solanes A, Steinemann D, Stiller M, Stoppa-Lyonnet D, Sullivan KJ, Susman R, Sutter C, Tavgigian SV, Teo SH, Teulé A, Thomassen M, Tibiletti MG, Tischkowitz M, Tognazzo S, Toland AE, Tornero E, Törngren T, Torres-Esquius S, Toss A, Trainer AH, Tucker KM, van Asperen CJ, van Mackelenbergh MT, Varesco L, Vargas-Parra G, Varon R, Vega A, Velasco Á, Vesper AS, Viel A, Vreeswijk MPG, Wagner SA, Waha A, Walker LC, Walters RJ, Wang-Gohrke S, Weber BHF, Weichert W, Wieland K, Wiesmüller L, Witzel I, Wöckel A, Woodward ER,

- Zachariae S, Zampiga V, Zeder-Göb C; KConFab Investigators, Lázaro C, De Nicolo A, Radice P, Engel C, Schmutzler RK, Goldgar DE, Spurdle AB. Large scale multifactorial likelihood quantitative analysis of BRCA1 and BRCA2 variants: An ENIGMA resource to support clinical variant classification. *Hum Mutat* **40**, 1557-1578 (2019).
14. Lee JS, Oh S, Park SK, Lee MH, Lee JW, Kim SW, Son BH, Noh DY, Lee JE, Park HL, Kim MJ, Cho SI, Lee YK, Park SS, Seong MW. Reclassification of BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance: a multifactorial analysis of multicentre prospective cohort. *J Med Genet* **55**, 794-802 (2018).
 15. Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT, Kamatani Y, Takahashi A, Tamura C, Katagiri T, Yoshida T, Nakamura S, Sugano K, Miki Y, Hirata M, Matsuda K, Spurdle AB, Kubo M. Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *Nat Commun* **9**, 4083 (2018).
 16. Ernst C, Hahnen E, Engel C, Nothnagel M, Weber J, Schmutzler RK, Hauke J. Performance of in silico prediction tools for the classification of rare BRCA1/2 missense variants in clinical diagnostics. *BMC Med Genomics* **11**, 35 (2018).
 17. Brnich SE, Abou Tayoun AN, Couch FJ, Cutting GR, Greenblatt MS, Heinen CD, Kanavy DM, Luo X, McNulty SM, Starita LM, Tavtigian SV, Wright MW, Harrison SM, Biesecker LG, Berg JS; Clinical Genome Resource Sequence Variant Interpretation Working Group. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework. *Genome Med* **12**, 3 (2019).
 18. Toland AE, Andreassen PR. DNA repair-related functional assays for the classification of BRCA1 and BRCA2 variants: a critical review and needs assessment. *J Med Genet* **54**, 721-731 (2017).
 19. Findlay GM, Daza RM, Martin B, Zhang MD, Leith AP, Gasperini M, Janizek JD, Huang X, Starita LM, Shendure J. Accurate classification of

- BRCA1 variants with saturation genome editing. *Nature* **562**, 217-222 (2018).
20. Starita LM, Young DL, Islam M, Kitzman JO, Gullingsrud J, Hause RJ, Fowler DM, Parvin JD, Shendure J, Fields S. Massively parallel functional analysis of BRCA1 RING domain variants. *Genetics* **200**, 413-422 (2015).
 21. Starita LM, Islam MM, Banerjee T, Adamovich AI, Gullingsrud J, Fields S, Shendure J, Parvin JD. A multiplex homology-directed DNA repair assay reveals the impact of more than 1,000 BRCA1 missense substitution variants on protein function. *Am J Hum Genet* **103**, 498-508 (2018).
 22. Guidugli L, Shimelis H, Masica DL, Pankratz VS, Lipton GB, Singh N, Hu C, Monteiro ANA, Lindor NM, Goldgar DE, Karchin R, Iversen ES, Couch FJ. Assessment of the clinical relevance of BRCA2 missense variants by functional and computational approaches. *Am J Hum Genet*, **102**, 233-248 (2017).
 23. Hart SN, Hoskin T, Shimelis H, Moore RM, Feng B, Thomas A, Lindor NM, Polley EC, Goldgar DE, Iversen E, Monteiro ANA, Suman VJ, Couch FJ. Comprehensive annotation of BRCA1 and BRCA2 missense variants by functionally validated sequence-based computational prediction models. *Genet Med*, **21**, 71-80 (2019).
 24. Guidugli L, Carreira A, Caputo SM, Ehlen A, Galli A, Monteiro AN, Neuhausen SL, Hansen TV, Couch FJ, Vreeswijk MP; ENIGMA consortium. Functional assays for analysis of variants of uncertain significance in BRCA2. *Hum Mutat* **35**, 151-164 (2014).
 25. Kohsaka S, Nagano M, Ueno T, Suehara Y, Hayashi T, Shimada N, Takahashi K, Suzuki K, Takamochi K, Takahashi F, Mano H. A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer. *Sci Transl Med* **9**, eaan6566 (2017).

26. Nagano M, Kohsaka S, Ueno T, Kojima S, Saka K, Iwase H, Kawazu M, Mano H. High-throughput functional evaluation of variants of unknown significance in ERBB2. *Clin Cancer Res* **24**, 5112-5122 (2018).
27. Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* **122**, 473-483 (2005).
28. Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1531-1536 (2011).
29. Hucl T, Rago C, Gallmeier E, Brody JR, Gorospe M, Kern SE. A syngeneic variance library for functional annotation of human variation: application to BRCA2. *Cancer Res* **68**, 5023-5030 (2008).
30. Dréan A, Williamson CT, Brough R, Brandsma I, Menon M, Konde A, Garcia-Murillas I, Pemberton HN, Frankum J, Rafiq R, Badham N, Campbell J, Gulati A, Turner NC, Pettitt SJ, Ashworth A, Lord CJ. Modeling therapy resistance in BRCA1/2-mutant cancers. *Mol Cancer Ther* **16**, 2022-2034 (2017).
31. Yabuta T, Shinmura K, Yamane A, Yamaguchi S, Takenoshita S, Yokota J. Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int J Oncol* **24**, 697-702 (2004).
32. Fiorelli G, Picariello L, Martinetti V, Tonelli F, Brandi ML. Functional estrogen receptor beta in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 521-527 (1999).
33. Kuo CT, Lee WS. Progesterone receptor activation is required for folic acid-induced anti-proliferation in colorectal cancer cell lines. *Cancer Lett* **378**, 104-110 (2016).
34. Wickstroem K, Karlsson J, Ellingsen C, Cruciani V, Kristian A, Hagemann UB, Bjerke RM, Ryan OB, Linden L, Mumberg D, Brands M,

- Cuthbertson A. Synergistic Effect of a HER2 Targeted Thorium-227 Conjugate in Combination with Olaparib in a BRCA2 Deficient Xenograft Model. *Pharmaceuticals (Basel)* **12**, 155 (2019).
35. Wu K, Hinson SR, Ohashi A, Farrugia D, Wendt P, Tavgigian SV, Deffenbaugh A, Goldgar D, Couch FJ. Functional evaluation and cancer risk assessment of BRCA2 unclassified variants. *Cancer Res* **65**, 417-426 (2005).
 36. Farrugia DJ, Agarwal MK, Pankratz VS, Deffenbaugh AM, Pruss D, Frye C, Wadum L, Johnson K, Mentlick J, Tavgigian SV, Goldgar DE, Couch FJ. Functional assays for classification of BRCA2 variants of uncertain significance. *Cancer Res* **68**, 3523-3531 (2008).
 37. Guidugli L, Pankratz VS, Singh N, Thompson J, Erding CA, Engel C, Schmutzler R, Domchek S, Nathanson K, Radice P, Singer C, Tonin PN, Lindor NM, Goldgar DE, Couch FJ. A classification model for BRCA2 DNA binding domain missense variants based on homology-directed repair activity. *Cancer Res* **73**, 265-275 (2013).
 38. So MK, Jeong TD, Lim W, Moon BI, Paik NS, Kim SC, Huh J. Reinterpretation of BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance in patients with hereditary breast/ovarian cancer using the ACMG/AMP 2015 guidelines. *Breast Cancer* **26**, 510-519 (2019).
 39. Woods NT, Baskin R, Golubeva V, Jhuraney A, De-Gregoriis G, Vaclova T, Goldgar DE, Couch FJ, Carvalho MA, Iversen ES, Monteiro AN. Functional assays provide a robust tool for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance. *NPJ Genom Med* **1**, 16001 (2016).
 40. Iversen ES, Jr., Couch FJ, Goldgar DE, Tavgigian SV, Monteiro AN. A computational method to classify variants of uncertain significance using functional assay data with application to BRCA1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 1078-1088 (2011).

41. Tavgigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, Nussbaum RL, Prabhu SA, Boucher KM, Biesecker LG; ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group (ClinGen SVI). Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genet Med* **20**, 1054-1060 (2018).
42. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* **22**, 719-729 (2006).
43. Zhang J, Fujiwara Y, Yamamoto S, Shibuya H. A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nat Commun* **10**, 722 (2019).
44. Tavgigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A. Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic and molecular-epidemiology applications. *Hum Mutat* **29**, 1342-1354 (2008).
45. Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**, 598-604 (2005).
46. Farber-Katz S, Hsuan V, Wu S, Landrith T, Vuong H, Xu D, Li B, Hoo J, Lam S, Nashed S, Toppmeyer D, Gray P, Haynes G, Lu HM, Elliott A, Tippin Davis B, Karam R. Quantitative analysis of BRCA1 and BRCA2 germline splicing variants using a novel RNA-massively parallel sequencing assay. *Front Oncol* **8**, 286 (2018).
47. Balia C, Galli A, Caligo MA. Effect of the overexpression of BRCA2 unclassified missense variants on spontaneous homologous recombination in human cells. *Breast Cancer Res Treat* **129**, 1001-1009 (2011).
48. Shimelis H, Mesman RLS, Von Nicolai C, Ehlen A, Guidugli L, Martin C, Calléja FMGR, Meeks H, Hallberg E, Hinton J, Lilyquist J, Hu C, Aalfs CM, Aittomäki K, Andrulis I, Anton-Culver H, Arndt V, Beckmann MW, Benitez J, Bogdanova NV, Bojesen SE, Bolla MK, Borresen-Dale AL, Brauch H, Brennan P, Brenner H, Broeks A, Brouwers B, Brüning T,

Burwinkel B, Chang-Claude J, Chenevix-Trench G, Cheng CY, Choi JY, Collée JM, Cox A, Cross SS, Czene K, Darabi H, Dennis J, Dörk T, Dos-Santos-Silva I, Dunning AM, Fasching PA, Figueroa J, Flyger H, García-Closas M, Giles GG, Glendon G, Guénel P, Haiman CA, Hall P, Hamann U, Hartman M, Hogervorst FB, Hollestelle A, Hopper JL, Ito H, Jakubowska A, Kang D, Kosma VM, Kristensen V, Lai KN, Lambrechts D, Marchand LL, Li J, Lindblom A, Lophatananon A, Lubinski J, Machackova E, Mannermaa A, Margolin S, Marme F, Matsuo K, Miao H, Michailidou K, Milne RL, Muir K, Neuhausen SL, Nevanlinna H, Olson JE, Olswold C, Oosterwijk JJC, Osorio A, Peterlongo P, Peto J, Pharoah PDP, Pylkäs K, Radice P, Rashid MU, Rhenius V, Rudolph A, Sangrajrang S, Sawyer EJ, Schmidt MK, Schoemaker MJ, Seynaeve C, Shah M, Shen CY, Shrubsole M, Shu XO, Slager S, Southey MC, Stram DO, Swerdlow A, Teo SH, Tomlinson I, Torres D, Truong T, van Asperen CJ, van der Kolk LE, Wang Q, Winqvist R, Wu AH, Yu JC, Zheng W, Zheng Y, Leary J, Walker L, Foretova L, Fostira F, Claes KBM, Varesco L, Moghadasi S, Easton DF, Spurdle A, Devilee P, Vrieling H, Monteiro ANA, Goldgar DE, Carreira A, Vreeswijk MPG, Couch FJ; for kConFab/AOCS Investigators; for NBCS Collaborators. BRCA2 hypomorphic missense variants confer moderate risks of breast cancer. *Cancer Res* **77**, 2789-2799 (2017).

49. Bradbury AR, Ibe CN, Dignam JJ, Cummings SA, Verp M, White MA, Artioli G, Dudlicek L, Olopade OI. Uptake and timing of bilateral prophylactic salpingo-oophorectomy among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Genet Med* **10**, 161-166 (2008).
46. Lim D, Ngeow J. Evaluation of the methods to identify patients who may benefit from PARP inhibitor use. *Endocr Relat Cancer* **23**, R267-285 (2016).
47. Davies H, Glodzik D, Morganella S, Yates LR, Staaf J, Zou X, Ramakrishna M, Martin S, Boyault S, Sieuwerts AM, Simpson PT, King TA, Raine K, Eyfjord JE, Kong G, Borg Å, Birney E, Stunnenberg HG, van de Vijver MJ, Børresen-Dale AL, Martens JW, Span PN, Lakhani SR, Vincent-Salomon A, Sotiriou C, Tutt A, Thompson AM, Van Laere S, Richardson AL, Viari A, Campbell PJ, Stratton MR, Nik-Zainal S.

HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nat Med* **23**, 517-525 (2017).

48. Nones K, Johnson J, Newell F, Patch AM, Thorne H, Kazakoff SH, de Luca XM, Parsons MT, Ferguson K, Reid LE, McCart Reed AE, Srihari S, Lakis V, Davidson AL, Mukhopadhyay P, Holmes O, Xu Q, Wood S, Leonard C; Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Aspects of Breast Cancer (kConFab); Australian Breast Cancer Tissue Bank (ABCTB); Brisbane Breast Bank (BBB), Beesley J, Harris JM, Barnes D, Degasperi A, Ragan MA, Spurdle AB, Khanna KK, Lakhani SR, Pearson JV, Nik-Zainal S, Chenevix-Trench G, Waddell N, Simpson PT. Whole-genome sequencing reveals clinically relevant insights into the aetiology of familial breast cancers. *Ann Oncol* **30**, 1071-1079 (2019).
49. Daniels MJ, Wang Y, Lee M, Venkitaraman AR. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* **306**, 876-879 (2004).
50. Shivji MKK, Renaudin X, Williams CH, Venkitaraman AR. BRCA2 regulates transcription elongation by RNA polymerase II to prevent R-loop accumulation. *Cell Rep* **22**, 1031-1039 (2018).
51. Leman R, Gaildrat P, Le Gac G, Ka C, Fichou Y, Audrezet MP, Caux-Moncoutier V, Caputo SM, Boutry-Kryza N, Léone M, Mazoyer S, Bonnet-Dorion F, Sevenet N, Guillaud-Bataille M, Rouleau E, Bressac-de Paillerets B, Wappenschmidt B, Rossing M, Muller D, Bourdon V, Revillon F, Parsons MT, Rousselin A, Davy G, Castelain G, Castéra L, Sokolowska J, Coulet F, Delnatte C, Férec C, Spurdle AB, Martins A, Krieger S, Houdayer C. Novel diagnostic tool for prediction of variant spliceogenicity derived from a set of 395 combined in silico/in vitro studies: an international collaborative effort. *Nucleic Acids Res* **46**, 7913-7923 (2018).
52. Acedo A, Hernandez-Moro C, Curiel-Garcia A, Diez-Gomez B, Velasco EA. Functional classification of BRCA2 DNA variants by splicing assays in a large minigene with 9 exons. *Hum Mutat* **36**, 210-221 (2015).

53. Acedo A, Sanz DJ, Durán M, Infante M, Pérez-Cabornero L, Miner C, Velasco EA. Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the BRCA2 gene by hybrid minigenes. *Breast Cancer Res* **14**, R87 (2012).
54. Oh M, McBride A, Yun S, Bhattacharjee S, Slack M, Martin JR, Jeter J, Abraham I. BRCA1 and BRCA2 gene mutations and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* **110**, 1178-1189 (2018).
55. Ikegami M, Kohsaka S, Ueno T, Momozawa Y, Inoue S, Tamura K, Shimomura A, Hosoya N, Kobayashi H, Tanaka S, Mano H. High-throughput functional evaluation of BRCA2 variants of unknown significance. *Nat Commun* **11**, 2753 (2020).