

論文の内容の要旨

論文題目 がん抑制遺伝子 BRCA2 変異体の新規機能解析法の開発

氏名 池上 政周

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。*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、*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。*BRCA2* 遺伝子に病的な生殖細胞系列変異を有する病態を遺伝性乳がん・卵巣がん症候群 (Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer syndrome: HBOC) と呼び、発がんリスクが上昇していることが知られている。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。

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、poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害薬への感受性が高い傾向がある。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り、*BRCA2* 欠損細胞に PARP 阻害薬を投与すると、DNA 修復機構が完全に破綻し細胞死が誘導されるためである。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薬剤として既に臨床で使用されている。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 *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。

遺伝子検査によってこれまでに発見されている *BRCA2* の非短縮型非同義変異は六千種類以上にも及ぶが、そのほとんどは発生頻度が低く臨床的な意義が判定できず、病的意義不明バリエント (variants of unknown significance: VUSs) とみなされている。VUS は発がん要因となるとはいえな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。

そこで、私は *BRCA2* バリエントに対するハイスループットな機能解析手法を開発し、多数の VUS の病的意義を推定することで、*BRCA2* の遺伝子検査の価値をより高め、個別化医療のより一層の実現を目指すために研究を行った。

私が研究を行った間野博行研究室は、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

い報告した。MANO 法は、細胞株にがん遺伝子のバリエントを導入した isogenic な細胞株を樹立し、そのがん遺伝子を標的とする薬剤を投与した際の細胞生存率を測定することで、バリエント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、バリエントを細胞に導入する際に変異体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。全てのバリエント導入細胞を混合した上で薬剤を投与し、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、バリエント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ント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、数百種類のバリエントを一回の実験で同時に評価できる点で、各バリエント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。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、cDNA が 10.2 kbp と大きい *BRCA2* バリエントの機能解析に直接用いることは困難であった。よって、これらの課題を解決するところから実験を開始した。

がん抑制遺伝子の機能解析を行う上で、*BRCA2* と *PARP* との合成致死の関係性を利用し、*BRCA2* 欠損ヒト細胞株に *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変異体の機能を推定する評価系を樹立することにした。また、*BRCA2* 遺伝子を細胞に導入可能な手法として piggyBac トランスポゾンを採用した。ヒト大腸がん細胞株である DLD1 *BRCA2* 欠損株に 20 種類のバリエントを導入したところ、1 細胞あたり平均 10 コピーの遺伝子を導入することができた。mRNA 発現量は生理的なレベルであった。*BRCA2* タンパク発現量はバリエント間で一定していた。*BRCA2* バリエントを導入した細胞は、そのバリエントの機能に応じて PARP 阻害薬への感受性が変化した。安定した *BRCA2* 遺伝子導入手法が確立できたことから、これと MANO 法を組み合わせる新たな *BRCA2* バリエントのハイスループット機能解析法である MANO-B 法を開発した。

第一段階の実験として 107 種類の *BRCA2* 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。良性バリエントと病的バリエントの機能をともに適切に評価できる実験条件は、niraparib を 0.5 μM の濃度で 12 日間投与した場合であり、以後の実験および解析ではこの条件で行った。良性バリエントと病的バリエントの中間的な機能を有するバリエントとして P2329L, P2639L, D2913H, S3291C の 4 つがあり、単純にある閾値を設けて良性バリエントと病的バリエントを識別することは不適切であることが分かった。

バリエントを追加で作成し、計 244 バリエントの機能解析を最適な条件下で行った。得られた各バリエント導入細胞の生存率は、対数値を取ると 2 峰性の混合正規分布に従って分布しており、それぞれのコンポーネントは良性バリエントと病的バリエントに対応して

いた。二つのコンポーネントが分離せず重複がみられたことから、二分論的な病的意義判定を避け、各バリエーションの病原性をベイズ因子によって確率論的に推定することにした。ベイズ階層混合正規分布モデルを用いて推定した各バリエーションの機能は、米国臨床遺伝・ゲノム学会のガイドラインに基づき判定した各バリエーションの病的意義と一致しており、臨床での使用に耐えうる信頼性がある検査手法であることが示された。186 個の VUS に対する機能解析の結果は、良性が 98 個、おそらく良性が 28 個、中間的機能が 23 個、おそらく病的が 6 個、病的が 31 個であった。機能ドメイン外に生じているバリエーションは全て良性あるいはおそらく良性と判定された。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 であり、既報と一致していた。

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。二つの実験結果は良く相関していたが、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た。

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ーションに対する迅速な病的意義判定システムを構築した。小スケールの実験系で MANO-B 法を行い、既に実施した実験結果とベイズ推定によって結果を統合する簡便な手法であり、5 週間で病的意義を判定することができる。ただし、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る。4 バリエーション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。

以上の通り、今回開発した 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るとともに、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。