

令和4年度 TR 事業研究奨励助成金

研究成果報告書

令和 5 年 6 月 25 日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知 光 殿

報告者氏名： 小野 華子



研究課題：がんの本態解明に関する研究

(テーマ) *PTEN* 意義不明遺伝子 (VUS) のバイオインフォマティクスの機能解析手法の確立

研究期間： 自 2022 年 4 月 1 日

至 2023 年 6 月 25 日

研究指導者：氏名 加藤 護



公益財団法人 がん研究振興財団

要旨

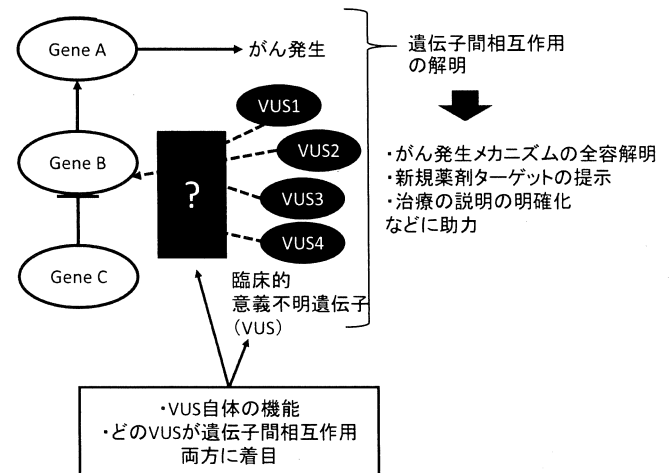
本解析は、がん患者にまれにみられるにもかかわらず、臨床的意義が不明である遺伝子（VUS）の機械的な機能推測方法を提案するものである。がん発生に関して、がん関連遺伝子の機能解析だけでなく、遺伝子間相互作用についても考慮する必要があると考え、既知遺伝子間相互作用に着目することで、VUS の機能をより明確にすることを目標とする。EVE, RENOV0 などの既存のソフトウェアによる VUS 機能推定を行ったが、相互作用推測ソフトウェアによる相互作用探索は実行中であり、実験による機能解析結果と統合予定である。

1. 序

がんの発生機序を解明するために遺伝子間の相互作用に着目する必要

がんの発生、発達には様々な遺伝子が関与することが知られている。特に、がん抑制遺伝子と対立遺伝子が両方機能を失う必要があるとする two-hit hypothesis は言うまでもない。特定の乳がんでは、AKT1、PI3CA、PTEN と複数の発現がみられることも知られている。このように複数の遺伝子の発現及び抑制が複雑に関与し、がんが発生すると考えられる。そこで、がん発生過程を解明するためには、がん関連遺伝子そのものの機能解析だけでなく、遺伝子間相互作用についても考慮する必要がある。

がん発生につながる遺伝子間相互作用にVUSが関与する？



多量に蓄積する臨床的意義不明遺伝子（VUS）の中にがん遺伝子相互作用に関与する可能性

がん発生に複数の遺伝子が複雑に関与すると考えられ、配列解読技術の向上も伴って、高速な遺伝子解析が多く進められるようになった。その結果、ドライバー遺伝子の特定も行われるようになったが、がん患者にまれにみられるにもかかわらず、臨床的意義が不明である遺伝子（VUS）も多く確認されるようになった。これら遺伝子は、データベースに登録、蓄積されている。このVUSの中にも、がん発生に関与する遺伝子間相互作用に深くかかわるものがあるのではないかと考えられた。

多量の VUS 中から複数の変異を選抜し相互作用解析した例はない

VUS は乳がんでは高い頻度で変異が確認される PTEN 遺伝子一つに着目しても、ClinVar 上に 1,003 登録されており、この中から有用であると推測される VUS を選抜することは難しい。

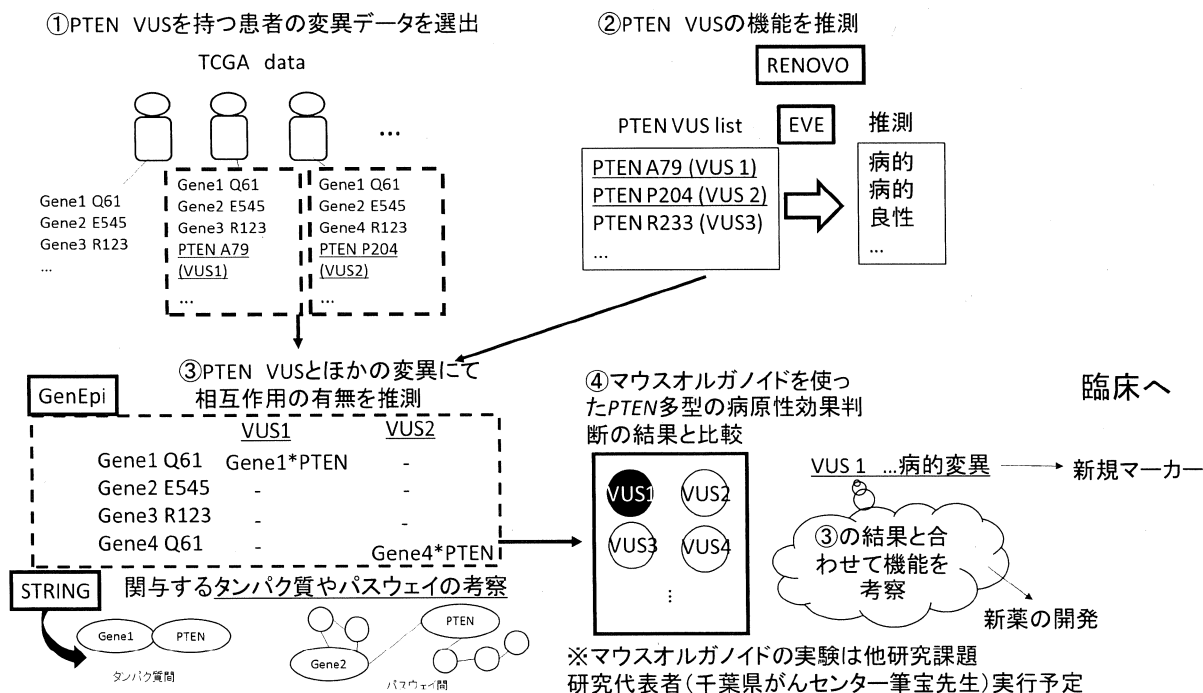
現在までに、一つの VUS に着目し解析された研究 (Saito, Yuki et al. (2021)) および、既知がん関連遺伝子の相互作用に着目した解析 (Wang, Xiaoyue, et al. (2014)) は存在するが、提示された課題のように、多数の VUS に対して並行して解析を実行した例は存在しない。

本解析では複数の VUS に対して、それぞれ機能解析を実行するとともに、既知遺伝子間相互作用に着目することで、VUS の機能をより明確にすることを目標としている。ただし、この VUS そのものの機能解析には、申請者の実行する *in silico* 解析のほかに、千葉県がんセンター筆宝義隆博士

の実行する病原性診断結果も加味する予定である。これにより、複数の VUS の中から新規マーカ-
の探索が可能であるとともに、変異が与える影響が明らかになることにより、患者への説明の明確
化、また新規治療方針の提示が可能となると考えている。

2. 方法

本研究は、千葉県がんセンター 筆宝義隆博士の研究課題「オルガノイドを活用した PTEN 遺伝子 VUS の新規評価法の確立」の一端として、VUS 解析を担い、その延長として相互作用解析を実行する。そこで今回は、乳がんおよび *PTEN* の VUS を対象とする。



3. 結果

3-1. EVE および RENOV0 による VUS の機能推定

今期は EVE および RENOV0 による VUS の機能推定を実施した

EVE は生物種をまたいで現れる変異の分布をもとにモデル作成し、変異の pathogenic を推測する 1 から 0 の間でスコアを算出するものであり、1 が最も pathogenic である可能性が高い。

表 1. EVE によるそれぞれの変異の EVE score 算出

#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO
10	87864470	.	ATG	GCA	.	.	EVE=0.67
10	87864470	.	ATG	GCC	.	.	EVE=0.67
10	87864470	.	ATG	GCG	.	.	EVE=0.67
10	87864470	.	ATG	GCT	.	.	EVE=0.67
10	87864470	.	ATG	TGC	.	.	EVE=0.66
10	87864470	.	ATG	TGT	.	.	EVE=0.66
10	87864470	.	ATG	GAC	.	.	EVE=0.69
10	87864470	.	ATG	GAT	.	.	EVE=0.69
10	87864470	.	ATG	GAA	.	.	EVE=0.62
10	87864470	.	ATG	GAG	.	.	EVE=0.62

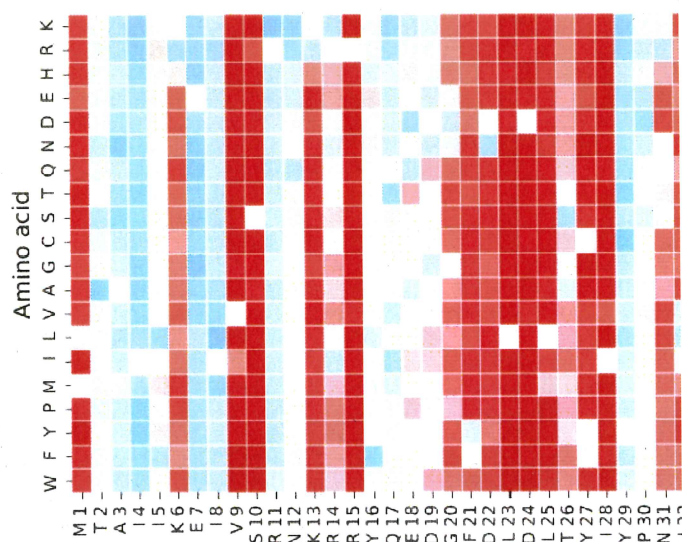


図 1. EVE より作成される heat map アミノ酸変異を考慮

表 2. EVE score をもとに各 VUS の病原性を推定

wt_aa	position	mt_aa	ClinVar_ClinicalSignificance	Gold_Stars	NumberSubmitters	Starred_CoarseGrainedClin_Sig	EVE_classes_90_pct_retained_ASM	EVE_classes_25_pct_retained_ASM	EVE_classes_75_pct_retained_ASM	evolutionary_index_BPU	EVE_scores_BPU	uncertainty_BPU	EVE_classes_75_pct_retained_BPU	coarse_differential_significance_post	clinical_significance_post
M	1	T					Pathogenic	Uncertain	Pathogenic					pathogenic	Likely Pathogenic
M	1	V	Pathogenic	3	3	pathogenic	Pathogenic	Uncertain	Pathogenic	7.25	0.69	0.62	Pathogenic	pathogenic	Pathogenic
M	1	W					Pathogenic	Uncertain	Pathogenic					pathogenic	Likely Pathogenic
M	1	Y					Pathogenic	Uncertain	Pathogenic					pathogenic	Likely Pathogenic
T	2	A				uncertain	Benign	Benign	Benign	-0.50	0.08	0.28	Benign	uncertain	uncertain
T	2	C					Benign	Uncertain	Benign						
T	2	D					Benign	Uncertain	Benign						
A	3	T	Uncertain significance	1	1	uncertain	Benign	Benign	Benign	1.74	0.13	0.39	Benign	uncertain	Uncertain significance
A	3	V	Uncertain significance	2	2	uncertain	Benign	Uncertain	Benign	3.42	0.20	0.50	Benign	uncertain	Uncertain significance
A	3	W					Benign	Uncertain	Benign						
I	4	P					Benign	Benign	Benign						

以上解析により ClinVar に登録がないが病原性が疑われる変異 1753 変異を検出することに成功した。

3-2. 相互作用解析

当初の計画通り GenEpi のインストールを行ったが software の version の問題から run の実行が難しくなりました。そこで、最新の epistasis software である BitEpi をインストールして、解析を開始した。TCGA site より MUTATION SNP から PTEN VUS データを持つ変異情報の検索を行った (somatic mutation mis sense PTEN R130L) (図 2)。

その結果 TCGA-UCEC 検体で corpus uteri で 3 症例の maf file を入手することに成功した。

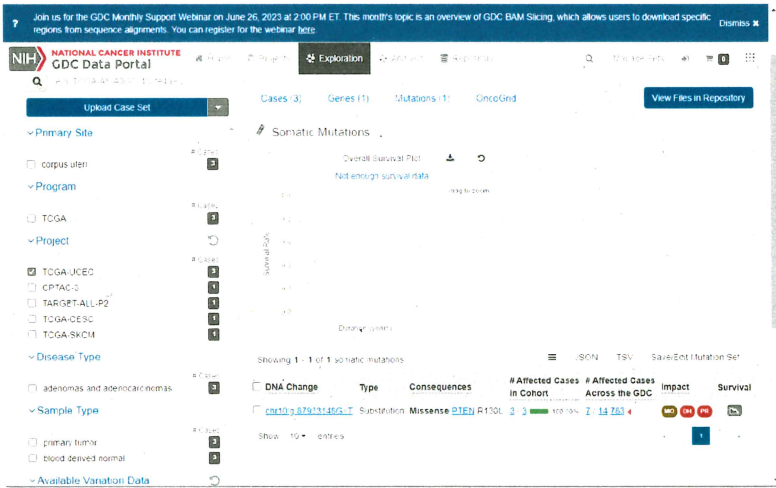


図 2 TCGAデータベースからのデータ選出およびダウンロード

この 3 ファイルの maf file の変異情報を統合して snp あり: 1、snp なし: 0 の csv file に変換した。さらに reference データが必須となるのですべて 0 とした ref data を追加した (図 3) この 1, 0 file をインプットとして解析を開始した。3 症例のうちいずれか変異を持つ変異を合わせると 1884 変異となった。GenEpi と同様に 1 対 1 のみでなく 1 対 3 まで相互作用を検索

SNP_ID	TCGA_A1	TCGA_A2	TCGA_B1
A18G_ch1	0	1	0
A21M1_c1	1	0	0
A4AS_ch1	0	1	0
A4AS_ch2	0	1	0
AAMP_ch1	0	1	0
ABCA1_c1	0	1	0
ABCA1_c2	0	1	0
ABCA1_c3	0	1	0
ABCA1_c4	1	0	0
ABCA1_c5	0	1	0
ABCC4_c1	0	1	0
ABCC5_c1	0	1	0
ABCC5_c2	0	1	0
ABCC5_c3	0	1	0
ABCC5_c4	0	1	0
ABCC5_c5	0	1	0
ABCC5_c6	0	1	0
ABCC5_c7	0	1	0
ABCC5_c8	0	1	0
ABCC5_c9	0	1	0
ABCC5_c10	0	1	0
ABCC5_c11	0	1	0
ABCC5_c12	0	1	0
ABCC5_c13	0	1	0
ABCC5_c14	0	1	0
ABCC5_c15	0	1	0
ABCC5_c16	0	1	0
ABCC5_c17	0	1	0
ABCC5_c18	0	1	0
ABCC5_c19	0	1	0
ABCC5_c20	0	1	0
ABCC5_c21	0	1	0
ABCC5_c22	0	1	0
ABCC5_c23	0	1	0
ABCC5_c24	0	1	0
ABCC5_c25	0	1	0
ABCC5_c26	0	1	0
ABCC5_c27	0	1	0
ABCC5_c28	0	1	0
ABCC5_c29	0	1	0
ABCC5_c30	0	1	0
ABCC5_c31	0	1	0
ABCC5_c32	0	1	0
ABCC5_c33	0	1	0
ABCC5_c34	0	1	0
ABCC5_c35	0	1	0
ABCC5_c36	0	1	0
ABCC5_c37	0	1	0
ABCC5_c38	0	1	0
ABCC5_c39	0	1	0
ABCC5_c40	0	1	0
ABCC5_c41	0	1	0
ABCC5_c42	0	1	0
ABCC5_c43	0	1	0
ABCC5_c44	0	1	0
ABCC5_c45	0	1	0
ABCC5_c46	0	1	0
ABCC5_c47	0	1	0
ABCC5_c48	0	1	0
ABCC5_c49	0	1	0
ABCC5_c50	0	1	0
ABCC5_c51	0	1	0
ABCC5_c52	0	1	0
ABCC5_c53	0	1	0
ABCC5_c54	0	1	0
ABCC5_c55	0	1	0
ABCC5_c56	0	1	0
ABCC5_c57	0	1	0
ABCC5_c58	0	1	0
ABCC5_c59	0	1	0
ABCC5_c60	0	1	0
ABCC5_c61	0	1	0
ABCC5_c62	0	1	0
ABCC5_c63	0	1	0
ABCC5_c64	0	1	0
ABCC5_c65	0	1	0
ABCC5_c66	0	1	0
ABCC5_c67	0	1	0
ABCC5_c68	0	1	0
ABCC5_c69	0	1	0
ABCC5_c70	0	1	0
ABCC5_c71	0	1	0
ABCC5_c72	0	1	0
ABCC5_c73	0	1	0
ABCC5_c74	0	1	0
ABCC5_c75	0	1	0
ABCC5_c76	0	1	0
ABCC5_c77	0	1	0
ABCC5_c78	0	1	0
ABCC5_c79	0	1	0
ABCC5_c80	0	1	0
ABCC5_c81	0	1	0
ABCC5_c82	0	1	0
ABCC5_c83	0	1	0
ABCC5_c84	0	1	0
ABCC5_c85	0	1	0
ABCC5_c86	0	1	0
ABCC5_c87	0	1	0
ABCC5_c88	0	1	0
ABCC5_c89	0	1	0
ABCC5_c90	0	1	0
ABCC5_c91	0	1	0
ABCC5_c92	0	1	0
ABCC5_c93	0	1	0
ABCC5_c94	0	1	0
ABCC5_c95	0	1	0
ABCC5_c96	0	1	0
ABCC5_c97	0	1	0
ABCC5_c98	0	1	0
ABCC5_c99	0	1	0
ABCC5_c100	0	1	0

図 3 BitEpi input data抜粋

図 4 BitEpi output data抜粋

することができるため、すべての組み合わせにおいて検索を行ったが、BitEpiにおいて擬陽性の相互作用が多く検出され有意な相互作用を検出することができなかった（図4）。これは、3症例すべての検体においてPTEN変異を持ち同様の傾向がみられることが原因と考えられた。そこで、PTEN変異を持たない3症例も組みあわせ、合計6症例を用いて解析を行ったが、やはり有意な相互作用検出はできなかった（data not shown）。しかし、PTENと相互作用すると推測されるPIKとの相互作用は候補の中に含まれていた。相互作用候補を広範囲でなく絞って検出することで有意差が出るのではないかと予測された。

4. 考察

EVEやRENOVOのような機能推定では新規の機能を推定することができたが、相互作用検出は計画通りの結果を得ることができなかった。

これは、原因が2つ考えられた

1. 公共データベースのみであると目的とする症例データの入手が難しい

同症例のtumorとnormalセットや目的VUSの変異を持つ症例データが乏しく解析が困難であった。

2. 機械的な相互作用検出のみでなく遺伝子機能やパスウェイを考慮した相互作用検出ソフトウェアが必要

相互作用解析は3症例2000弱の変異であっても12時間以上の時間がかかっていた

計算の効率化やその後の解析を考慮してGO解析やパスウェイ解析を実行したうえでの相互作用検出が有用であると考えられた（図5）。

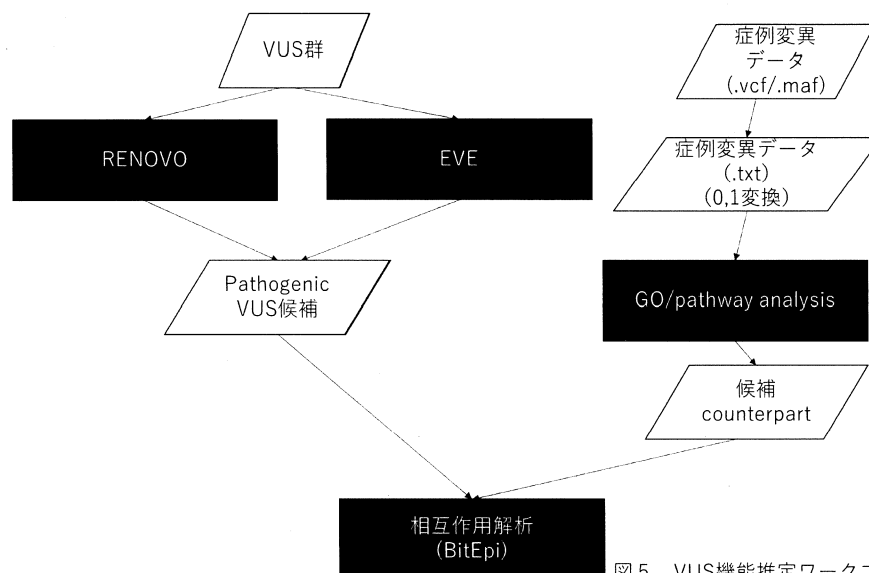


図5 VUS機能推定ワークフロー