



Title	胆道癌における遺伝性腫瘍関連遺伝子バリエーションと相同組換え欠損についての研究
Author(s)	大川, 裕貴
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15684号
Issue Date	2023-12-25
DOI	10.14943/doctoral.k15684
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91350
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 :
File Information	OKAWA_Yuki.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

胆道癌における遺伝性腫瘍関連遺伝子バリエントと
相同組換え欠損についての研究

(Study of hereditary cancer variants and homologous
recombination deficiency in biliary tract cancer)

2023 年 12 月

北海道大学

大川 裕 貴

学位論文

胆道癌における遺伝性腫瘍関連遺伝子バリエントと
相同組換え欠損についての研究

(Study of hereditary cancer variants and homologous
recombination deficiency in biliary tract cancer)

2023 年 12 月

北海道大学

大川 裕 貴

目次

発表論文目録および学会発表録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	10 頁
結果	16 頁
考察	43 頁
結論	47 頁
謝辞	48 頁
利益相反	49 頁
引用文献	50 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した

1. Okawa Y, Iwasaki Y, Johnson TA, Ebata N, Inai C, Endo M, Maejima K, Sasagawa S, Fujita M, Matsuda K, Murakami Y, Nakamura T, Hirano S, Momozawa Y, Nakagawa H. Hereditary cancer variants and homologous recombination deficiency in biliary tract cancer. *J Hepatol*. 2023 Feb;78(2):333-342. doi: 10.1016/j.jhep.2022.09.025. Epub 2022 Oct 13. PMID: 36243179.

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 大川裕貴, 江畑信孝, 岩崎雄介, Todd Johnson, 松田浩一, 中村透, 平野聡, 桃沢幸秀, 中川英刀
胆道癌 1292 例における遺伝性腫瘍関連遺伝子バリエーションのスクリーニング
第 27 回日本遺伝性腫瘍学会学術集会 2021 年 6 月 19 日・ウェブ開催
2. 大川裕貴, 中村透, 桃沢幸秀, 平野聡, 中川英刀
Prevalence of Hereditary Cancer Variants and Homologous Recombination
Deficiency in Biliary Tract Cancer
第 34 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2022 年 6 月 11 日・愛媛
3. Yuki Okawa, Yukihide Momozawa, Nobutaka Ebata, Shota Sasagawa, Koichi
Matsuda, Yoshinori Murakami, Toru Nakamura, Satoshi Hirano, Hidewaki
Nakagawa
Actionability and Hereditary Evaluations of Biliary Tract Cancers by Large-scale
Genome and Transcriptome Analysis
第 81 回日本癌学会学術集会 2022 年 9 月 29 日・神奈川

要旨

【背景と目的】胆道癌は診断時には切除不能進行癌として発見されることが多く、高い浸潤性を持つ予後不良の悪性腫瘍である。胆道癌発症の危険因子としては、胆石による胆道の炎症、ウイルス性肝炎、原発性硬化性胆管炎、代謝性疾患、アフラトキシンなどの化学物質への曝露などが挙げられるが、これらの危険因子が胆道癌の発癌に必須ではない。一方、乳癌や卵巣癌、大腸癌において遺伝性を有する遺伝性乳癌卵巣癌症候群やリンチ症候群に寄与する生殖遺伝子変異は胆道癌の発癌にも関連するという報告が散見される。しかし、胆道癌は比較的稀な疾患であり、遺伝性がん素因遺伝子の胆道癌への寄与度は未だ不明である。また、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の原因遺伝子である *BRCA1/2* の遺伝子変異によって引き起こされる相同組換え修復欠損 (HRD, homologous recombination deficiency) の検討は胆道癌において行われていない。胆道癌における遺伝性の解明は、癌スクリーニングおよび新規治療ターゲットの同定につながると思われる。

【対象と方法】バイオバンク・ジャパンに登録された胆道癌症例と北海道大学病院で切除された胆道癌症例を併せた 1,292 症例を対象に解析を行った。胆道癌における生殖細胞変異の寄与度を検討するためにバイオバンク・ジャパンに登録されている癌の既往歴と家族歴のない対照者 37,583 人についても解析を行った。合計 38,875 症例の血液サンプルもしくは正常組織サンプルに対してターゲットシーケンスを行い、27 のがん素因遺伝子の生殖細胞変異 (*APC*, *ATM*, *BARD1*, *BMPRIA*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *EPCAM*, *HOXB13*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *SMAD4*, *STK11*, *TP53*。以降、生殖細胞変異と記載) を検出した。胆道癌症例と対照者の間で生殖細胞変異の頻度を比較し、胆道癌の発癌に寄与する生殖細胞変異を明らかにした。次に、生殖細胞変異をもつ胆道癌症例と生殖細胞変異を持たない胆道癌を比較し、生殖細胞変異をもつ胆道癌症例の臨床的特徴を検討した。さらに、胆道癌が HRD の状態であるかの評価を行うために北海道大学病院で切除された胆道癌症例の腫瘍組織を用いて 52 例の胆道癌に対して全ゲノムシーケンスを行った。解析された遺伝子変異情報をもとに、機械学習を用いて胆道癌が HRD の状態であるかを評価した。また、HRD の状態がどの遺伝子異常によって引き起こされているか確認するために、全ゲノムシーケンスのデータを用いて各胆道癌症例の遺伝子異常を確認した。

【結果】ターゲットシーケンスにより胆道癌症例と対照者において合計 5,018 個の生殖細胞変異が検出された。同定された生殖細胞変異は 317 個の病原性変異, 3,611 個の意義不明の変異 (VUS, variants of uncertain significance) , および 1,090 個の良性変異に分類された。胆道癌症例 71 例 (5.5%) には, 27 の遺伝性がん素因遺伝子の中に少なくとも 1 つの病原性バリエントが認められた。胆道癌において有意に認められた病原性変異は, *BRCA1*, *BRCA2*, *APC*, *MSH6* であった ($P < 0.00185$: Bonferroni 補正後の閾値)。乳癌の発癌に關与する *PALB2* 生殖細胞変異は, 統計学的有意性は認めなかったが, 胆道癌の発癌に關連する傾向を示した ($P = 0.01$)。胆道癌の局在別にみると, *BRCA1* や *BRCA2* は同程度の頻度で觀察されたが, *APC* 生殖細胞変異は主に Vater 乳頭部癌に認められた。胆道癌患者において生殖細胞変異を認める症例と認めない症例の臨床情報を比較すると, 生殖細胞変異を認める胆道癌症例に乳癌の既往歴または家族歴が多く認められた。全ゲノムシーケンスにより, HRD の評価を行うことができた症例は 45 症例であった。評価した症例のうち, 相同組換え修復關連遺伝子に病的生殖細胞変異を持つ症例が 7 症例, VUS を持つ症例が 7 症例, 生殖細胞変異を持たない症例が 31 症例含まれていた。機械学習により *BRCA2* および *PALB2* の病原性生殖細胞変異を持ち, かつこれらの遺伝子座にヘテロ接合性喪失 (LOH, loss of heterozygosity) を伴う胆道癌 3 症例が HRD であることが示された。*BRCA1/2* の病原性生殖細胞変異を有していても, LOH を伴わない症例において HRD は認められなかった。また, 相同組換え修復關連遺伝子とされる *ATM*, *BRIP1* の病原性生殖細胞変異は LOH を伴っていても HRD は認められなかった。以上より, 相同組換え修復關連遺伝子に病原性生殖細胞変異を有する胆道癌症例 7 症例中 3 症例に HRD を認めた。一方, 相同組換え修復關連遺伝子に VUS を有する胆道癌症例はいずれも HRD の表現型を示さなかった。生殖細胞変異を持たない胆道癌症例 31 例中 3 症例に HRD の表現型をみとめた。

【考察】本研究では胆道癌のハイリスク生殖細胞変異を同定するために, 日本人の胆道癌患者, および非がん対照者の大規模なゲノム解析研究を実施した。その結果, 日本人の胆道癌の 5.5% に遺伝性腫瘍が含まれ, 特に *BRCA1/2*, *APC*, *MSH6* 遺伝子における生殖細胞変異が胆道癌に有意に關連することが示された。これらの遺伝子に關連が報告されている乳癌, 卵巣癌, 膵癌, 大腸癌などの癌腫についての既往歴や家族歴を多く持つ患者には胆道癌発生のリスクは高い可能性があり, 注意深くスクリーニングを行う必要がある。ゲノム医療によって, 本人および家族について胆道癌のリスク診断や予防を積極的に進めていくべきと考えられる。また, 今回の研究成果により, 相同組換え修復欠損の DNA

修復機構に関わる遺伝子が胆道癌の発生に深く関与することが明らかになった。有効な治療法が未だ乏しい胆道癌に対して、HRD を標的としたポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ (PARP, poly-ADP ribose polymerase) 阻害剤やプラチナ製剤を代表とする DNA 障害性の化学療法、放射線療法の効果が得られる可能性が示された。HRD の状態を評価するためには血液や正常細胞から得られる生殖細胞変異のほかに、腫瘍組織から得られるゲノム情報が必要であることから、遺伝性の評価のみならず、腫瘍のゲノム解析を併せて行うことが胆道癌の治療戦略を拡大するために今後さらに重要な検査になると考える。胆道癌においても遺伝性ならびに腫瘍に対するゲノム解析は、ゲノム医療や個別化医療への貢献が期待できると考えられる。

【結論】 本研究では最大規模の胆道癌症例を解析し、非癌対照症例と比較することで胆道癌におけるハイリスク生殖細胞遺伝子変異を明らかにした。HRD に関連する遺伝子における生殖細胞変異は胆道癌において関連が強く、HRD をターゲットとした治療が胆道癌においても有用である可能性を示した。本研究の結果は遺伝性がん素因遺伝子の評価が胆道癌のスクリーニングや治療戦略を拡大する可能性を示すものである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AMP	Association for Molecular Pathology
AVC	ampulla of Vater carcinoma
CI	confidence interval
ECC	extrahepatic cholangiocarcinoma
FAP	familial adenomatous polyposis
GBC	gallbladder carcinoma
HMF	Hartwig Medical Foundations
HRD	homologous recombination deficiency
ICC	intrahepatic cholangiocarcinoma
LOH	loss of heterozygosity
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
OR	odds ratio
PARP	poly-ADP ribose polymerase
PCR	polymerase chain reaction
PON	Panel-of-Normals
SBS	single base substitution
VUS	variants of uncertain significance

緒言

胆道癌は、解剖学的に肝内胆管癌、肝外胆管癌、胆嚢癌、Vater 乳頭部癌に分類され、世界的にみると稀な悪性腫瘍である。胆道癌の発生率は東アジアや南米で高く、近年、世界的に増加傾向である(Bertuccio *et al.*, 2019)。胆道癌は発生初期の段階では臨床症状に乏しいため進行した状態で診断される。さらに、高い浸潤性を有する癌腫であるため、胆道癌は他の消化器癌に比べて予後は不良である。外科的根治切除術を受けた胆道癌患者であっても、5年生存率は胆嚢癌で5~10%、胆管癌で10~40%である(Eckel, Brunner and Jelic, 2011)。現在最も使用されるゲムシタビンを基本とした化学療法を受けた切除不能胆道癌患者の全生存期間は1年未満とされる(Valle *et al.*, 2010)。以上のように、胆道癌は予後不良の疾患で治療抵抗性も高く、治療の選択肢が限られている現状にある。

胆道癌発症の危険因子としては、胆石による胆道の炎症、ウイルス性肝炎、原発性硬化性胆管炎、代謝性疾患、アフラトキシンなどの化学物質への曝露などが挙げられる(Palmer and Patel, 2012; Koshiol *et al.*, 2017)。しかし、これらの危険因子は胆道癌の発症に必須なものではない。一方、遺伝性腫瘍に関連する生殖細胞変異と胆道癌の関連が報告されている。リンチ症候群の原因となる遺伝子変異 (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) は胆道癌の高リスク因子として報告される(Win *et al.*, 2012)。一方、Breast Cancer Linkage Consortium は乳癌患者の家族歴を調査し、*BRCA2* 生殖細胞変異が胆道癌の発症と関連することを報告した(Breast Cancer Linkage Consortium, 1999)。北海道大学病院で切除された胆道癌症例を用いたゲノム解析の報告では、複数の胆道癌症例に *BRCAl*, *BRCA2*, *MLH1*, *RAD51D* の生殖細胞変異が同定された(Wardell *et al.*, 2018)。しかし、National Comprehensive Cancer Network (NCCN) が発行する胆道癌のガイドラインでは、「ミスマッチ修復欠損またはマイクロサテライト不安定性の高い腫瘍を有する患者や *BRCAl/2* 変異を示唆する家族歴がある場合に生殖細胞検査を考慮する」と記載されているものの、積極的には遺伝子検査を推奨されていない(Benson *et al.*, 2021)。これは、胆道癌が欧州諸国では稀な疾患であり、胆道癌における生殖細胞変異の保因率に関する報告が限られているためと考えられる。胆道癌に対する生殖細胞変異検査の有用性を検討するためには、多数の症例に対する解析を行い、がん素因遺伝子の生殖細胞変異における胆道癌発症の寄与度を明らかにする必要がある。

また、胆道癌の発癌と関連が示唆される *BRCAl/2* 遺伝子は、DNA が損傷した際に働く DNA 修復プロセスの一つである相同組換え修復経路において重要な役割を担っている(図 1)(Lord and Ashworth, 2016; van Wilpe S, 2021)。また、*ATM*,

PALB2, *RAD51* などの遺伝子も相同組換え修復に関与している(Pearl et al., 2015; Casolino et al., 2021)。相同組換え修復関連遺伝子の異常は、相同組換え修復欠損(HRD, homologous recombination deficiency)を引き起こし、乳癌や卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌などの発癌を促進する。一方で、HRDの状態にある腫瘍細胞は、プラチナ製剤や PARP 阻害剤などの治療に対して感受性があり、*BRCA* 遺伝子における生殖細胞変異が HRD を標的とする治療の反応に関する優れた臨床バイオマーカーであることが示唆されている(Hoppe et al., 2018)。よって、腫瘍細胞における HRD の検出は臨床的に極めて重要である。しかし、生殖細胞変異の遺伝子検査を用いて HRD を標的とした治療の有効性を判断することにはいくつかの欠点がある。多くの生殖細胞変異は意義不明の変異(VUS, variants of uncertain significance)として ClinVar などのデータベースに登録されており、その病原性についてはまだ明確にされていない。さらに、相同組換え修復関連遺伝子に変異があるすべての腫瘍が HRD の表現型を持つとは限らない。例えば、*BRCA* 遺伝子座特異的な LOH を持たない *BRCA* 変異卵巣癌 (*BRCA* 遺伝子にシングルヒットのみを持つ腫瘍) は、プラチナ製剤に対する反応性が低いことが報告されている(Maxwell et al., 2017)。また、HRD を引き起こす原因遺伝子としては *BRCA* が良く知られているが、*RAD51C* や *RAD51D*, *PALB2* などの遺伝子も HRD を引き起こすといわれており、*BRCA* 以外の遺伝子変異を持つ腫瘍についても HRD であるか確認する必要がある。

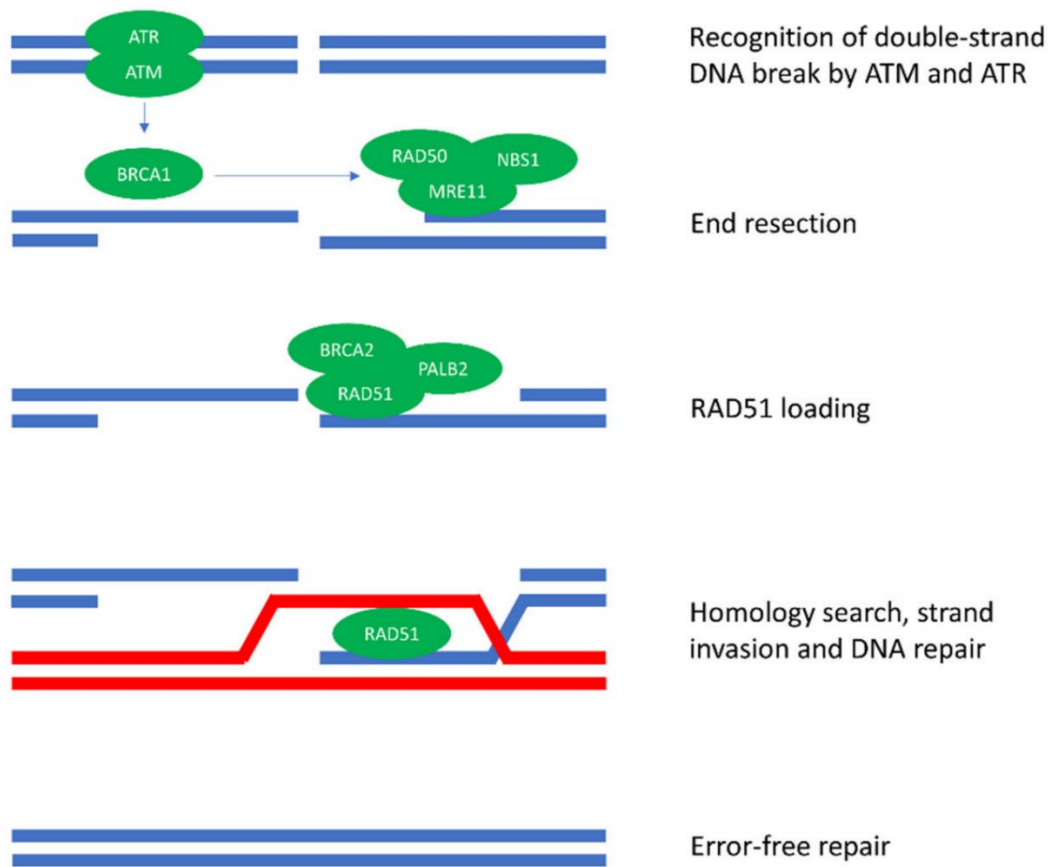


図 1 相同組換え修復について

二本鎖 DNA 切断に対して機能する DNA 修復機構である相同組換え修復には、様々な遺伝子が関与する。まず相同組換え修復は *ATM* と *ATR* が二本鎖 DNA 切断を認識する。*ATM* と *ATR* は *BRCA1* の活性化を行う。この *BRCA1* は DNA 末端切除に必要な修復タンパク質をリクルートする。DNA 末端の切除が行われた後に、*RAD51* は *BRCA2* と *PALB2* とともに、一本鎖 DNA tail に付着する。この一本鎖 DNA は相同染色体の DNA 鎖に侵入し、これを鋳型として DNA 修復が行われる。(図は van Wilpe S, 2021 より引用)

卵巣癌における PARP 阻害薬オラパリブを用いた維持療法を解析した PAOLA-1 試験では、オラパリブの無増悪生存期間の延長効果は腫瘍の *BRCA* 変異の有無に関わらず認められた(Ray-Coquard et al., 2019)。一方で *BCRA* 変異をもつ HRD 腫瘍患者におけるプラセボ群と比較した病勢進行または死亡のハザード比は 0.33 であり、*BCRA* 変異を持たない HRD 腫瘍患者におけるハザード比は 0.43 だったが、HRD がない、または不明な患者でのハザード比は 0.92 でオラパリブの効果は認められなかった。この試験の結果からも HRD の評価は臨床的にも重要であると考えられる。以上より、HRD を標的とした治療の有用性を検討するためには、胆道癌が HRD の状態を有するか評価する必要がある。

近年、桃沢らは日本人 10 万人を対象に *BRCA1* および *BRCA2* の生殖細胞病原性変異を解析し、14 の癌種との関連を評価した(Momozawa et al., 2022)。その結果、*BRCA1* における生殖細胞変異と胆道癌の強い関連が明らかになったが、*BRCA2* における生殖細胞変異との関連は症例数不足のため評価不能であった(図 2)。本研究では桃沢ら(Momozawa et al., 2022)が評価した症例に北海道大学病院で切除された胆道癌症例を追加し、*BRCA1/2* ならびに 25 のがん素因遺伝子における生殖細胞変異について遺伝子解析をおこなった。胆道癌と癌の既往歴と家族歴をもたない対照群における生殖細胞変異を比較し、胆道癌の発癌に強く寄与する生殖細胞変異を明らかにした。さらに、胆道癌の腫瘍組織に対して全ゲノムシーケンシングを行い、HRD の状態を有する胆道癌腫瘍を同定し、その遺伝子学的特徴を明らかにした。

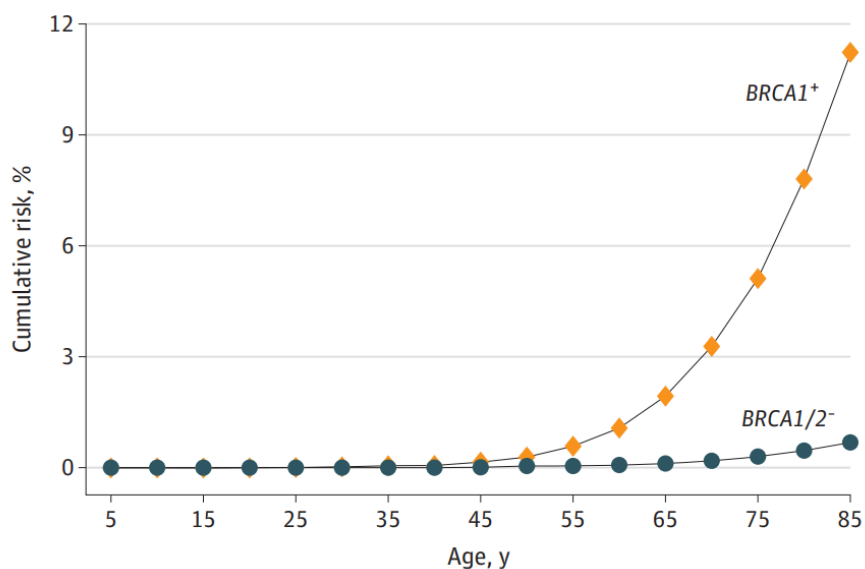


図 2 胆道癌における *BRCA* 変異と発症絶対リスク

桃沢らによって解析された、*BRCA1* の病原性変異の保因者および *BRCA1* と *BRCA2* の非保因者についての 85 歳までの累積リスクを表した図である。胆道癌においては解析症例数が不足していたため *BRCA2* 変異についての解析はできなかった。(図は Momozawa et al, 2022 より引用)

BRCA1⁺, *BRCA1* 病原性変異保因者; *BRCA1/2*⁻, *BRCA1* および *BRCA2* 病原性変異を持たない症例 (非保因者)

方法

生殖細胞変異解析の対象症例

胆道癌症例の DNA サンプルはバイオバンク・ジャパンと北海道大学病院から入手した (図 3)。本研究の胆道癌には肝内胆管癌, 肝外胆管癌, 胆嚢癌, Vater 乳頭部癌が含まれた。バイオバンク・ジャパンは 2003 年から 2018 年まで, 様々な疾患の患者から採取した血液と臨床情報を収集した多施設データベースである (Hirata et al., 2017; Nagai et al., 2017)。バイオバンク・ジャパンから集められた胆道癌症例 976 例は, 桃沢らが解析した症例と一致する (Momozawa et al., 2022)。北海道大学病院から集められた胆道癌症例 316 例については, 2003 年から 2020 年までに手術中に採取された血液または肝臓や胆管粘膜などの正常組織の切除標本から DNA を抽出した。解析の比較対象としてバイオバンク・ジャパンから 60 歳以上で, がんの個人歴および家族歴のない症例を集め生殖細胞変異について解析した。バイオバンク・ジャパンから集められた症例の臨床情報は, データベースに登録される際に行われた質問票を用いた面接, またはカルテ調査によって収集された。北海道大学病院から集められた症例の臨床情報は電子カルテから収集された。がん家族歴は三親等以内の親族に限定して収集した。本研究に参加するすべての患者から文書によるインフォームドコンセントを行い, 研究参加に同意を得た。この研究は, 理化学研究所 (H20-11(19)), 北海道大学病院 (医 18-003) の施設審査委員会の承認を得ており, 「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」, 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。

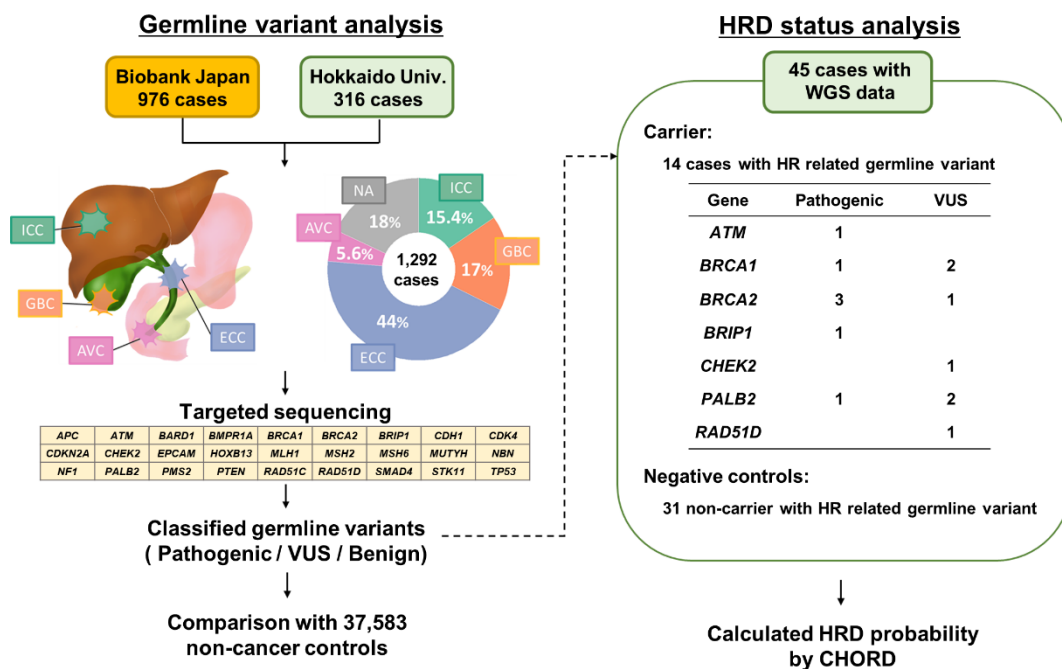


図3 本研究の概略図

(左) ターゲットシーケンスによる生殖細胞変異解析。(右) 全ゲノムシーケンシングによるHRD解析。

AVC, ampulla of Vater carcinoma; ECC, extrahepatic cholangiocarcinoma; GBC, gallbladder carcinoma; HRD, homologous recombination deficiency; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; NA, not available; VUS, variants of uncertain significance。

生殖細胞変異の同定と解析

27のがん素因遺伝子のコーディング領域およびフランキンゲイントロニック領域における生殖細胞変異を Multiplex polymerase chain reaction (PCR) を用いたターゲットシーケンス法により同定した (図3) (Momozawa et al., 2016)。DNA ライブラリーの構築には2ステップのPCR法を用いた。プライマーは Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) を用いて、1000 Genomes Project Phase 1 (Abecasis et al., 2012) の情報をもとにアジア人集団の minor allele frequency > 0.01 の既知のバリエントを避けるように設計された。2回目のPCRのためにフォワードプライマーの5'末端に CGCTCTCCGATCTCTG, リバースプライマーの5'末端に CGCTCTCCGATCTGAC を付加した。Multiplex PCR 反応は、10ng ゲノム DNA, 5μl 2×Platinum Multiplex PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, California, United States), および 0.1pmol 各プライマーを含む 10μl で行

った。PCR は GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies) を用いて、95°C 2 分、95°C 30 秒、60°C 90 秒、72°C 3 分の 25 サイクル、72°C 10 分の伸長反応ステップで行った。

2 回目の PCR のプライマー配列は 5'-AATGA TACG GC GACCACCGAGA TCTAC ACxxxxxxxxACA CTC TT TC CCTA CACGAC GCTCTTC CGATCTCTG-3' と 5'-CAAGCAGAA G ACGGCATACGAG ATxxxxxxxxGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTG CTC TTCC GATCTGAC-3' とした。PCR 反応は、最初の PCR 産物 1µl, 0.1U KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, United States) , 2µl 5×KAPA HiFi Fidelity Buffer, 0.3µl 10 mM dNTP, 0.2pmol の各プライマーを含む 10µl で行なった。PCR 条件は、98°C 4 秒、98°C 15 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分の 4 サイクルで、その後 72°C 1 分の伸長反応ステップで行った。2 回目の PCR 産物はすべて 1 回のシーケンスにプールされた。各ライブラリーを Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, California, United States) を用いて精製してプライマー二量体を除去した。HiSeq2500 (Illumina, San Diego, California, United States)によって 2×150bp ペアエンドリードで DNA ライブラリーの塩基配列を決定した。シーケンスリードは Burrows-Wheeler Aligner を用いてレファレンスゲノム (hg19) にアライメントし(Li and Durbin, 2009), Genome Analysis Toolkit の UnifiedGenotyper と HaplotypeCaller を用いて遺伝子変異の同定を行った(DePristo et al., 2011)。

本研究での解析対象遺伝子は、NCCN ガイドラインで検査が推奨されている 12 遺伝子、および研究開始当時に Myriad 社の遺伝性がんパネル(Buys et al., 2017)で検査対象となっていた 25 遺伝子から選抜した 15 遺伝子の計 27 個の遺伝性腫瘍関連遺伝子とした。

生殖細胞変異の病原性解釈

American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) ガイドラインと ClinVar に登録されている病原性解釈を用いて、すべてのバリエーションの臨床的意義 (病原性=Pathogenic, 良性=Benign, 意義不明=VUS) を判断した (Abou Tayoun et al., 2018) 。2020 年 9 月 19 日時点で ClinVar に登録されていない変異は新規バリエーションとした。

胆道癌腫瘍組織に対する全ゲノムシーケンシングのサンプル準備

胆道癌における HRD の状態を評価するために、胆道癌腫瘍組織に対して全ゲノムシーケンシングを実施した (図 3)。まず、北海道大学病院の症例ですらに解析された 36 症例の腫瘍および正常組織サンプルの全ゲノムシーケン

シングデータを入手した(Fujimoto et al., 2015; Fujimoto et al., 2016; Wardell et al., 2018; Ebata et al., 2021)。これらの胆道癌 36 症例はすべて生殖細胞変異解析のコホートに含まれている。さらに北海道大学病院の胆道癌症例のうち相同組換え修復関連遺伝子に病原性生殖細胞変異または VUS を持つことが確認され、かつ腫瘍組織が入手可能であった 16 症例について追加の全ゲノムシーケンシングを実施した。DNA の抽出は、凍結組織の場合は QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) を、血液の場合は FlexiGene DNA Kit (QIAGEN) を用いて、メーカーのプロトコールに沿って行った。全ゲノムシーケンスライブラリは、TruSeq Nano DNA High Throughput Library Prep Kit (Illumina) を用いて、200ng DNA をインプットして調製した。500-600bp のインサートライブラリを製造元のプロトコールに従って調製した。35 サンプルの全ゲノムシーケンシングライブラリを HiSeq2500 (Illumina) で、17 サンプルの全ゲノムシーケンシングライブラリを NovaSeq (Illumina) によってシーケンスを行い、100~150 bp のペアリードを得た。平均の Coverage depth は、腫瘍組織で×52、正常組織で×36 であった。

GRIDSS-PURPLE-LINX パイプラインを使用して、全ゲノムシーケンシングデータから生殖細胞系および体細胞系遺伝子変異をコールした (Priestley et al., 2019)。

全ゲノムシーケンスデータのアライメント

HiSeq と NovaSeq より出力された Fastq ファイルを元に、Burrows-Wheeler Aligner を用いてシーケンスリードをレファレンスゲノム (hg38) にアライメントした (Li and Durbin, 2009)。Biobambam2 ver.2.0.146 の bamsort (<https://gitlab.com/german.tischler/biobambam2>) と samtools 1.12 を用いて bam ファイル出力した (Danecek et al., 2021)。その後、biobambam2 の bammarkduplicates を用いて、各サンプルの bam ファイルを統合し、重複リードをマークして、各サンプルの bam ファイルを 1 つにまとめて出力した。

コピー数プロファイリング

samtools で bam ファイルを約 1000 万リードペアにダウンサンプリングしたのちに、R Bioconductor パッケージの QDNAseq (Scheinin et al., 2014) と ACE (Poell et al., 2019) を用いて、ゲノム全域の 100kb 間隔でセグメントごとのコピー数を計算した。

一塩基変異および Indel の変異コール

変異コールや構造変異解析は、Hartwig Medical Foundations (HMF) によって提供されるパイプラインを用いて行った。生殖細胞や体細胞の一塩基変異や小さな挿入や欠損 (Indel, insertion and deletion) は、HMF のバリエーションコーラー SAGE 2.8 を使用して変異コールを行った。まず共通の変異やアーチファクトを除外して体細胞変異をアノテーションするために、SAGE の生殖細胞 PON モードを用いて正常組織サンプルそれぞれで生殖細胞変異を同定した。さらに、SAGE で体細胞変異コールを行った。体細胞変異は最新バージョンの ClinVar (2021 年 7 月 12 日にダウンロード) でアノテーションした後、生殖細胞変異やアーチファクトを除くためにフィルター処理した。

生殖細胞変異は、癌遺伝子パネル

(<https://github.com/hartwigmedical/hmftools/blob/master/sage/GERMLINE.md>) に記載されている遺伝子の変異を同定するための SAGE 生殖細胞モード手順に基づいて変異コールした。SAGE で同定された生殖細胞変異を HMFTools-Resources ファイルと最新バージョンの ClinVar に基づいてアノテーションした。出力された生殖細胞変異から、様々な集団サンプルで一般的な変異 (minor allele frequency ≥ 0.01 かつ allele frequency ≤ 0.99) を除去した。フィルタリングに用いたデータセットは Allele Frequency Aggregator /dbSNP データベースの AF_EAS, AF_TOT, TOMMO, KOREAN, Korea1K, TOPMED, GnomAD, GnomAD_exomes, 1000Genomes であった。

構造異常変異コール

構造異常とゲノム再配置を同定するために GRIDSS 2.12.0 を用いて構造異常変異コールを実行した (Cameron et al., 2017)。次に、下記のツールを用いてブレイクポイントおよびブレイクエンド挿入配列についてアノテーションを行った。(1) GRIDSS 2.12.0 の VIRUSBreakend ソフトウェア (2) gridss_annotate_vcf_kraken2 スクリプト (3) RepeatMasker (Cameron et al., 2021)。その後、HMF の GRIPSS v1.11 を用いて GRIDSS によって出力された構造異常変異のフィルタリングを行った。

構造バリエーションとドライバーの複合解析パイプライン

GRIDSS-PURPLE-LINX の複合パイプラインを使用し、上記の一塩基変異、Indel、構造異常の情報を統合しアノテーションした (Priestley et al., 2019)。GRIDSS-PURPLE-LINX を用いてデータ統合する前処理として、HMF より提供されるパイプライン AMBER と COBALT を用いて解析した。AMBER v3.5 により、腫瘍と正常の bam ファイルを元に、腫瘍の B アレル頻度を算出した。

COBALT v1.11 により、ゲノム上の 1,000 bp ウィンドウにおける腫瘍と正常の bam ファイルのリードの深さの比率を算出した。PURPLE v3.1 は、AMBER と COBALT から提供された B-アレル頻度と read depth 比の情報を、生殖細胞と体細胞の一塩基変異, Indel, 構造異常と組み合わせ、各腫瘍サンプルの腫瘍細胞含有率とコピー数プロファイルを推定するとともに、ドライバー変異候補を同定した。PURPLE で算出された腫瘍細胞含有率が 0.1 以下のサンプルは以降の解析から除外した。LINUX v1.17 により、構造異常, コピー数変化, ドライバー変異のアノテーションを行い, circos plot を作成し, 各サンプルの遺伝子異常を可視化した。

HRD 解析

R パッケージの CHORD を用いて各サンプルの HRD の状態を予測した (Nguyen et al., 2020)。体細胞一塩基変異, Indel, 構造変異の情報を CHORD の関数 extractSigsChord に渡し, 各サンプルの変異状況を集計した。各サンプルの変異状況を関数 chordPredict に渡し, HRD である確率を算出した。HRD の確率が 0.5 以上の場合に HRD と判定した。さらに CHORD の結果を検証するために, 検出されたすべての SNV と, 変異塩基の両隣に位置する 5'側と 3'側の塩基を含む 3 塩基配列に基づいて, 各サンプルの変異シグネチャーを算出した。変異シグネチャーは, R パッケージ Sigminer の Bayesian non-negative matrix factorization アプローチを用いて抽出した (Wang et al., 2021)。これらのシグネチャーは, cosine 類似度を用いて COSMIC v3 データベースと比較した (Alexandrov et al., 2020)。

統計解析

すべての統計解析は R 4.0.2 を用いて行った。生殖細胞変異解析では Fisher の正確検定を用いてケースコントロールの関連性解析を実施した。MUTYH については劣性モデルで, その他の遺伝子については優性モデルを用いた。連続変数には Wilcoxon rank-sum 検定を, 名目変数にはフィッシャーの正確検定を用い, 生殖細胞変異の有無と臨床情報を比較した。傾向検定は Cochran-Armitage 傾向検定を用いて解析した。生存期間解析はログ・ランク検定を用いて解析した。統計的有意性の判定には, 27 の生殖細胞変異解析に対してはボンフェローニ補正を適用し ($P < 0.00185 = 0.05/27$), 他の解析では $P < 0.05$ を統計学的有意性があると判断した。

結果

生殖細胞変異解析における臨床病理学的特徴

胆道癌 1,292 症例および 60 歳以上でがんの既往歴および家族歴のない対照者 37,583 人の生殖細胞変異を解析した。胆道癌症例と対照者の臨床情報を表 1 に示した。胆道癌の平均年齢は 69.2 歳で、66.8%が男性であった。胆道癌症例の 36.9%は少なくとも 1 つのがん既往歴を有し、62.8%の胆道癌症例は 1 つ以上のがん家族歴を有していた。胆道癌の部位は、肝・遠位胆管周囲癌を含む遠位胆管癌が最も多く、次いで胆嚢癌、肝内胆管癌、Vater 乳頭部癌であった。

表 1 生殖細胞変異解析の症例の臨床情報

	BTC case N=1292		Control N=37583
	No. of cases (%)	No. of NA	No. of controls (%)
Mean age at diagnosis, y (IQR1–IQR3)	69.2 (64–76)	8	62 (54–73)
Male	859 (66.8)	7	19903 (53)
Personal cancer history			
Hepatocellular carcinoma	56 (5.2)	225	0 (0)
Gastric cancer	44 (4.1)	225	0 (0)
Colorectal cancer	38 (3.6)	225	0 (0)
Prostate cancer	27 (2.5)	225	0 (0)
Breast cancer	12 (1.1)	225	0 (0)
Lung cancer	11 (1)	225	0 (0)
Esophageal cancer	6 (0.6)	225	0 (0)
Pancreatic cancer	6 (0.6)	225	0 (0)
Cervical cancer	6 (0.6)	225	0 (0)
Endometrial cancer	5 (0.5)	225	0 (0)
Ovarian cancer	3 (0.3)	225	0 (0)
Family cancer history			
Hepatocellular carcinoma	80 (8.1)	301	0 (0)
Gastric cancer	244 (24.6)	301	0 (0)
Colorectal cancer	112 (11.3)	301	0 (0)

Prostate cancer	24 (2.4)	301	0 (0)
Breast cancer	60 (6.1)	301	0 (0)
Lung cancer	113 (11.4)	301	0 (0)
Esophageal cancer	36 (3.6)	301	0 (0)
Pancreatic cancer	61 (6.2)	301	0 (0)
Cervical cancer	15 (1.5)	301	0 (0)
Endometrial cancer	15 (1.5)	301	0 (0)
Ovarian cancer	8 (0.8)	301	0 (0)
Ovarian cancer	8 (0.8)	301	0 (0)
Metastasis			
Lymph node metastasis	292 (33.8)	427	–
Distant metastasis	18 (3.1)	714	–
Tumor location		232	
ICC	199 (18.8)		–
GBC	219 (20.7)		–
ECC	569 (53.7)		–
AVC	73 (6.9)		–

AVC, ampulla of Vater carcinoma; BTC, biliary tract cancer; ECC, extrahepatic cholangiocarcinoma; GBC, gallbladder carcinoma; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; IQR, interquartile range; NA, not available values. Percentages were calculated by excluding NA.

胆道癌における病原性生殖細胞変異体と VUS の比較

27 の遺伝性がん素因遺伝子を対象としたターゲットシーケンシングにより、1,292 例の胆道癌症例と 37,583 例の対照者において合計 5,018 個の生殖細胞変異が同定された。ACMG/AMP ガイドラインと ClinVar を用いて、生殖細胞変異を 317 の病原性変異, 3,611 の VUS, および 1,090 の良性変異に分類した。317 の病原性変異のうち, 127 の変異 (40.1%) は ClinVar に登録されていない新規の変異であった。27 の遺伝性がん素因遺伝子のうち, *BRCA2* に生殖細胞変異が最も多く認められ, *BRCA2* と *ATM* は病原性変異が最も多く認められた (図 4)。

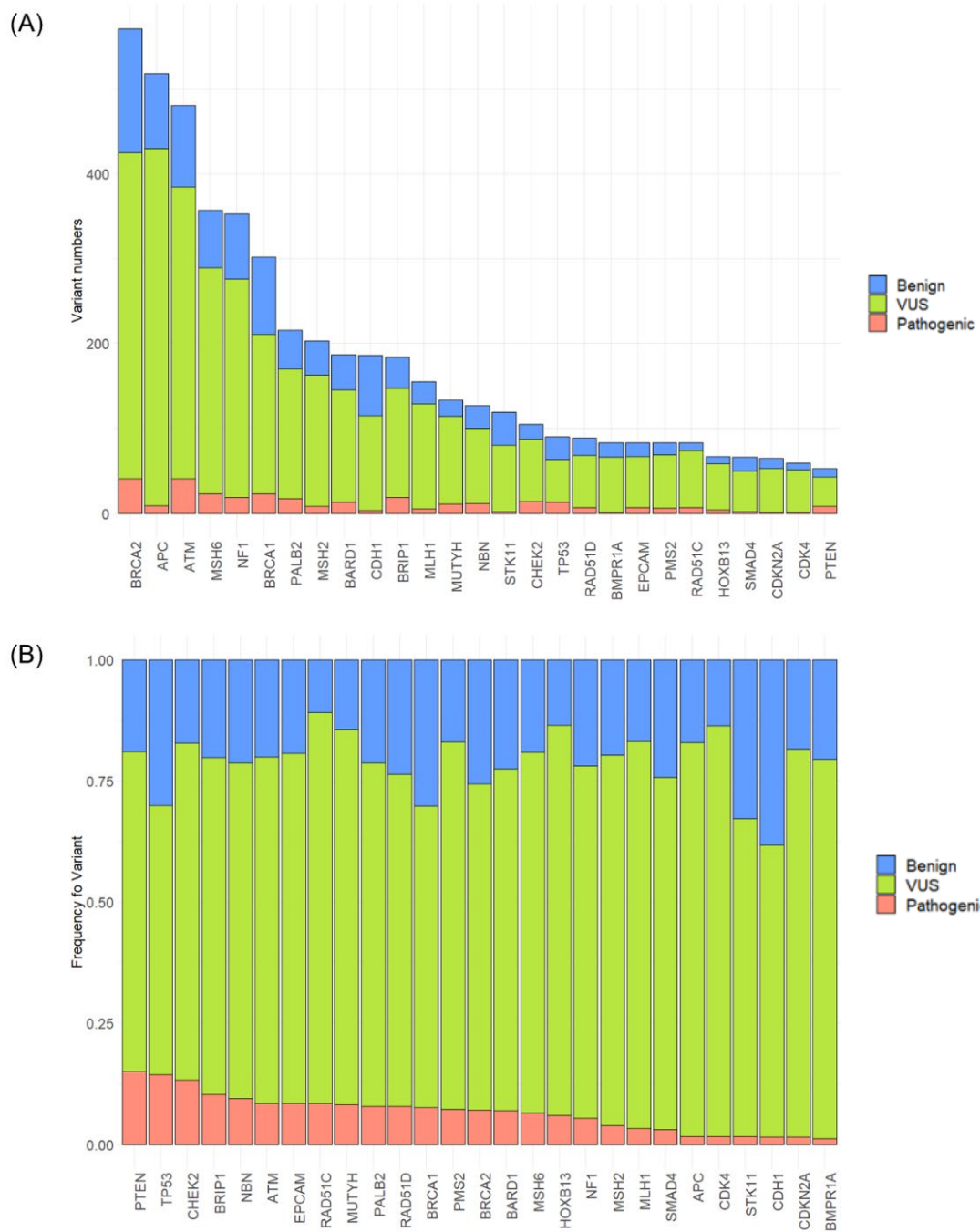


図 4.胆道癌における 27 のがん素因遺伝子の生殖細胞変異

(A)各遺伝子における生殖細胞変異体の数。(B) 各遺伝子における生殖細胞変異の割合。

ピンク、緑、青の列はそれぞれ病理性 (Pathogenic), VUS, 良性 (Benign) を示す。

VUS, variants of uncertain significance.

胆道癌における遺伝子ごとの病原性生殖細胞変異の頻度を対照群と比較した (表 2)。胆道癌症例 71 例 (5.5%) と対照群 520 例 (1.38%) は, 27 のがん素因遺伝子の中に少なくとも一つの病原性生殖細胞変異を有していた ($P = 1.017 \times 10^{-20}$, オッズ比 (OR, odds ratio) = 4.1, 95%信頼区間 (CI, confidence interval) = 3.2-5.4)。10 個の遺伝子は $P < 0.05$ であった (*BRCA1*, *BRCA2*, *APC*, *MSH6*, *PALB2*, *CDK4*, *ATM*, *BARD1*, *MLH1*, *MSH2*)。さらにボンフェローニ補正後では, 下記の 4 つの遺伝子が胆道癌に有意に多いことが示された: *BRCA1* ($P = 4.213 \times 10^{-10}$, OR = 13.6, 95% CI = 6.5-27.3), *BRCA2* ($P = 2.225 \times 10^{-7}$, OR = 6.5, 95% CI = 3.4-11.8), *APC* ($P = 4.143 \times 10^{-5}$, OR = 18.2, 95% CI = 4.7-63.3), および *MSH6* ($P = 7.591 \times 10^{-4}$, OR = 5.2, 95% CI = 2-11.9)。

表 2 胆道癌と対照者における病原性生殖細胞変異の比較

Gene	No. of pathogenic variants	Case No. of carriers (%)	Control No. of carriers (%)	<i>P</i>	OR	95% CI
<i>BRCA1</i>	23	13 (1.01)	28 (0.08)	4.213×10^{-10}	13.6	(6.5–27.3)
<i>BRCA2</i>	41	14 (1.08)	63 (0.17)	2.225×10^{-7}	6.5	(3.4–11.8)
<i>APC</i>	9	5 (0.39)	8 (0.02)	4.143×10^{-5}	18.2	(4.7–63.3)
<i>MSH6</i>	23	7 (0.54)	39 (0.1)	7.591×10^{-4}	5.2	(2–11.9)
<i>PALB2</i>	17	4 (0.31)	22 (0.06)	0.01	5.3	(1.3–15.6)
<i>CDK4</i>	1	2 (0.16)	4 (0.01)	0.015	14.6	(1.3–101.8)
<i>ATM</i>	41	6 (0.46)	59 (0.16)	0.021	3	(1–6.9)
<i>BARD1</i>	13	3 (0.23)	15 (0.04)	0.021	5.8	(1.1–20.6)
<i>MLH1</i>	5	2 (0.16)	5 (0.01)	0.021	11.6	(1.1–71.2)
<i>MSH2</i>	8	2 (0.16)	6 (0.02)	0.027	9.7	(1–54.4)
<i>BRIP1</i>	19	3 (0.23)	23 (0.06)	0.054	3.8	(0.7–12.6)
<i>TP53</i>	13	2 (0.16)	15 (0.04)	0.108	3.9	(0.4–16.7)
<i>NF1</i>	19	2 (0.16)	17 (0.05)	0.13	3.4	(0.4–14.5)
<i>NBN</i>	12	1 (0.08)	14 (0.04)	0.398	2.1	(0–13.7)

<i>PMS2</i>	6	1 (0.08)	16 (0.04)	0.437	1.8	(0–11.7)
<i>RAD51D</i>	7	3 (0.23)	60 (0.16)	0.468	1.5	(0.3–4.5)
<i>CHEK2</i>	14	0 (0)	37 (0.1)	0.636	0	(0–3.1)
<i>MUTYH</i>	11	2 (0.16)	53 (0.14)	0.705	1.1	(0.1–4.2)
<i>PTEN</i>	8	0 (0)	8 (0.02)	1	0	(0–17.1)
<i>EPCAM</i>	7	0 (0)	7 (0.02)	1	0	(0–20.2)
<i>RAD51C</i>	7	0 (0)	10 (0.03)	1	0	(0–13)
<i>HOXB13</i>	4	0 (0)	5 (0.01)	1	0	(0–31.8)
<i>CDHI</i>	3	0 (0)	5 (0.01)	1	0	(0–31.8)
<i>SMAD4</i>	2	0 (0)	3 (0.01)	1	0	(0–70.4)
<i>STK11</i>	2	0 (0)	2 (0.01)	1	0	(0–155)
<i>BMPRI1A</i>	1	0 (0)	1 (0)	1	0	(0–1114.7)
<i>CDKN2A</i>	1	0 (0)	1 (0)	1	0	(0–1114.7)
Sum	317	71 (5.5)	520 (1.38)	1.017X 10 ⁻²⁰	4.1	(3.2–5.4)

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

次に、病的意義が未だ不明である VUS が胆道癌の発癌に寄与しているかどうかを調べるため、検出された 3,611 個の VUS から minor allele frequency < 0.001 の非同義置換であった 2,917 個の VUS を抽出し、胆道癌症例における VUS 頻度を対照者と比較した (表 3)。その結果、2 群間に有意差は認められなかった ($P = 0.075$, OR = 0.9, 95% CI = 0.8-1)。

表 3 胆道癌と対照者における VUS の比較

Gene	No. of VUS	Case	Control	<i>P</i>	OR	95% CI
		No. of carriers (%)	No. of carriers (%)			
<i>BRCA2</i>	322	22 (1.7)	1005 (2.67)	0.034	0.6	(0.4–1)
<i>ATM</i>	285	44 (3.41)	1027 (2.73)	0.142	1.3	(0.9–1.7)
<i>SMAD4</i>	32	0 (0)	75 (0.2)	0.183	0	(0–1.5)

<i>HOXB13</i>	29	9 (0.7)	164 (0.44)	0.194	1.6	(0.7–3.1)
<i>MSH2</i>	128	11 (0.85)	479 (1.28)	0.205	0.7	(0.3–1.2)
<i>PMS2</i>	54	2 (0.16)	151 (0.4)	0.252	0.4	(0–1.4)
<i>PALB2</i>	121	19 (1.47)	426 (1.13)	0.284	1.3	(0.8–2.1)
<i>STK11</i>	56	6 (0.46)	121 (0.32)	0.321	1.4	(0.5–3.2)
<i>CHEK2</i>	60	15 (1.16)	343 (0.91)	0.371	1.3	(0.7–2.1)
<i>PTEN</i>	30	1 (0.08)	92 (0.25)	0.378	0.3	(0–1.8)
<i>APC</i>	345	30 (2.32)	1025 (2.73)	0.433	0.8	(0.6–1.2)
<i>MLH1</i>	103	8 (0.62)	328 (0.87)	0.442	0.7	(0.3–1.4)
<i>RAD51D</i>	47	3 (0.23)	147 (0.39)	0.495	0.6	(0.1–1.8)
<i>BRIP1</i>	103	10 (0.77)	366 (0.97)	0.564	0.8	(0.4–1.5)
<i>TP53</i>	41	6 (0.46)	151 (0.4)	0.653	1.2	(0.4–2.6)
<i>NF1</i>	200	14 (1.08)	469 (1.25)	0.702	0.9	(0.5–1.5)
<i>MUTYH</i>	74	6 (0.46)	228 (0.61)	0.713	0.8	(0.3–1.7)
<i>MSH6</i>	233	29 (2.25)	799 (2.13)	0.768	1.1	(0.7–1.5)
<i>BMPRIA</i>	50	4 (0.31)	109 (0.29)	0.791	1.1	(0.3–2.8)
<i>CDKN2A</i>	38	4 (0.31)	159 (0.42)	0.824	0.7	(0.2–1.9)
<i>BRCA1</i>	166	16 (1.24)	492 (1.31)	1	0.9	(0.5–1.6)
<i>BARD1</i>	104	7 (0.54)	231 (0.62)	1	0.9	(0.4–1.9)
<i>CDHI</i>	94	9 (0.7)	284 (0.76)	1	0.9	(0.4–1.8)
<i>NBN</i>	69	4 (0.31)	126 (0.34)	1	0.9	(0.2–2.4)
<i>RAD51C</i>	50	6 (0.46)	184 (0.49)	1	0.9	(0.3–2.1)
<i>EPCAM</i>	47	3 (0.23)	101 (0.27)	1	0.9	(0.2–2.6)
<i>CDK4</i>	36	2 (0.16)	82 (0.22)	1	0.7	(0.1–2.7)
Sum	2917	255 (19.74)	8201 (21.82)	0.075	0.9	(0.8–1)

CI, confidence interval; OR, odds ratio; VUS, variants of uncertain significance.

またボンフェローニ補正により閾値を超えなかった病原性生殖細胞変異の中で、最も低い P 値を示したのは、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の原因遺伝子として知られる *PALB2* であった ($P = 0.01$)。胆道癌において有意に認められた 4 つの遺伝子と *PALB2* における病原性生殖細胞変異を Lollipop として図 5 に示す。胆道癌における病原性生殖細胞変異のほとんどがサンプル中に 1 回のみ出現するシングルトンであったが、*BRCA2* の p.Arg2318*, *BRCA1* の p.Leu63*, *MSH6* の p.Glu546Gln, *PALB2* の p.Ilu558fs は胆道癌で複数症例に観察された。これまで

に、乳癌、前立腺癌、膵癌における生殖細胞変異がバイオバンク・ジャパンの症例で報告されている(Momozawa et al., 2018; Momozawa et al., 2020; Mizukami et al., 2020)。これら3つの報告では、*BRCA2* の p.Arg2318*は3つの癌のすべてにおいて有意な危険因子であり、*BRCA1* の p.Leu63*は乳癌の危険因子として同定された。*MSH6* の p.Glu546Gln は膵癌研究で唯一確認されたが膵癌における有意性は示されなかった変異である。一方、*PALB2* の p.Ilu558fs, これらの腫瘍における研究では確認されなかった変異であった。

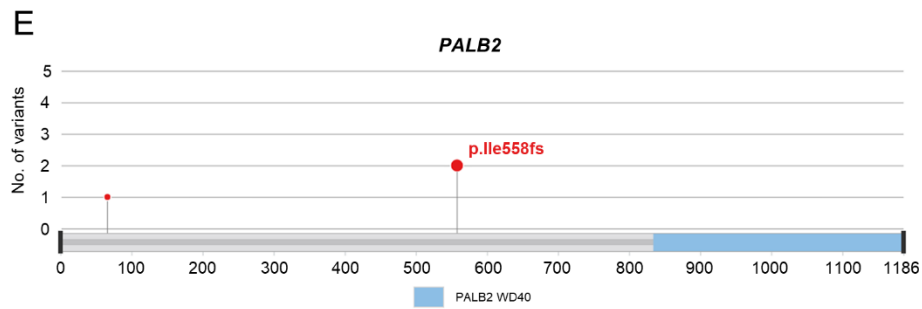
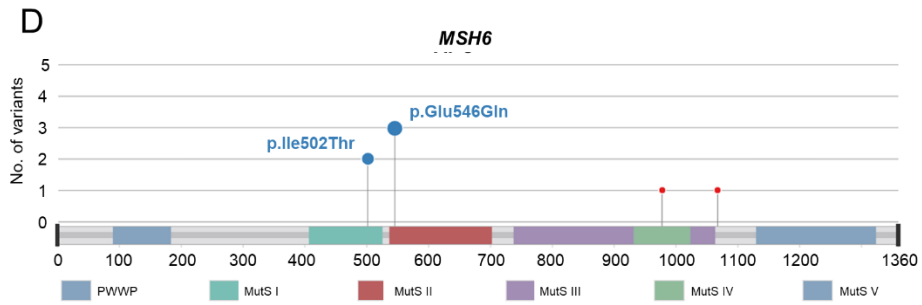
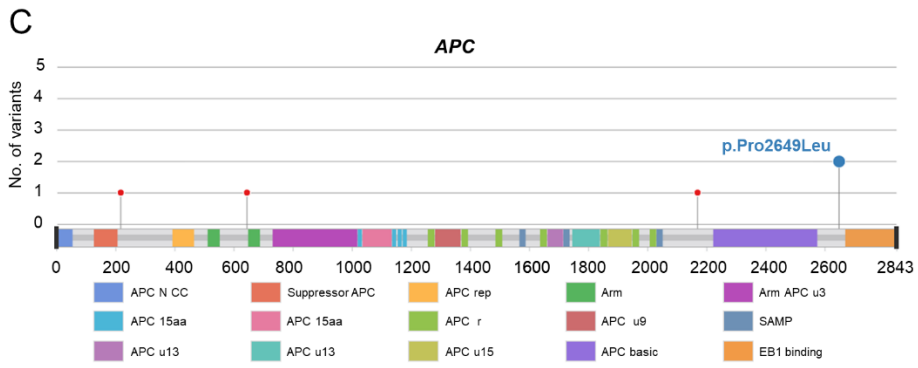
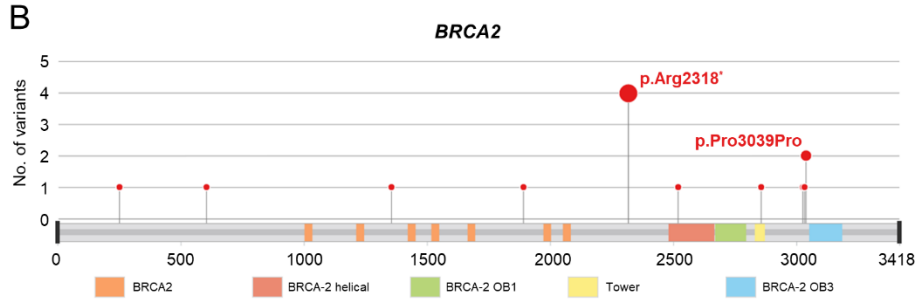
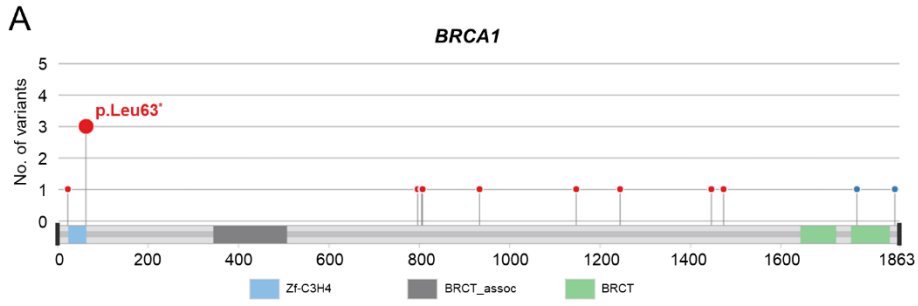


図 5 胆道癌における病原性生殖細胞変異の種類と数

(A) *BRCA1*, (B) *BRCA2*, (C) *APC*, (D) *MSH6*, (E) *PALB2*。X 軸はアミノ酸残基の位置, Y 軸は病原性生殖細胞変異を持つ症例の総数を示している。赤丸は **truncating** 変異, 青丸はミスセンス変異を表す。複数の症例で観察された変異について, 図に変異情報を記した。

次に, *BRCA1/2* と *ATM* の病原性生殖細胞変異が膵癌と関連することを報告したバイオバンク・ジャパンの症例で解析した研究結果と本研究の結果を比較した(Mizukami et al., 2020)。膵癌における病原性生殖細胞変異の保因率は 6.67% であり, 今回の胆道癌研究と同様の頻度であった。また, 膵癌における *BRCA1* 生殖細胞変異の保因率は 0.9% であり, 胆道癌 (1.01%) と同様の頻度であった。しかし, 膵癌における *BRCA2* 変異の保因率は胆道癌の 2 倍以上 (胆道癌 1.08%, 膵癌 2.49%) であったが, リンチ症候群の原因遺伝子の総保因率は胆道癌の約半分程度 (胆道癌 0.93%, 膵癌 0.4%) であった。

病原性生殖細胞変異体保有者の臨床病理学的特徴

病原性生殖細胞変異を有する胆道癌症例 (保因者) の臨床病理学的特徴を評価するために, 保因者 71 名と非保因者 1,221 名を比較した (表 4)。保因者の平均診断年齢は 66.9 歳で, 非保因者 (平均 69.3 歳) より有意に低い傾向にあった (Wilcoxon rank-sum test: $P = 0.038$)。保因者の割合は年齢が下がるにつれて増加し (Cochran-Armitage 傾向検定: $P = 0.019$) , 50 歳未満の胆道癌症例を占める保因者の割合は 12.8% をであった (図 6)。保因者は乳癌の既往歴および家族歴が有する割合が非保因者より多かった(既往歴: $P = 0.026$, OR = 5.8, 95% CI = 1.3–22.1; 家族歴: $P = 0.047$, OR = 2.5, 95% CI = 1–5.5, 表 4)。一方, 性別, リンパ節転移, 遠隔転移に有意差はなかった。

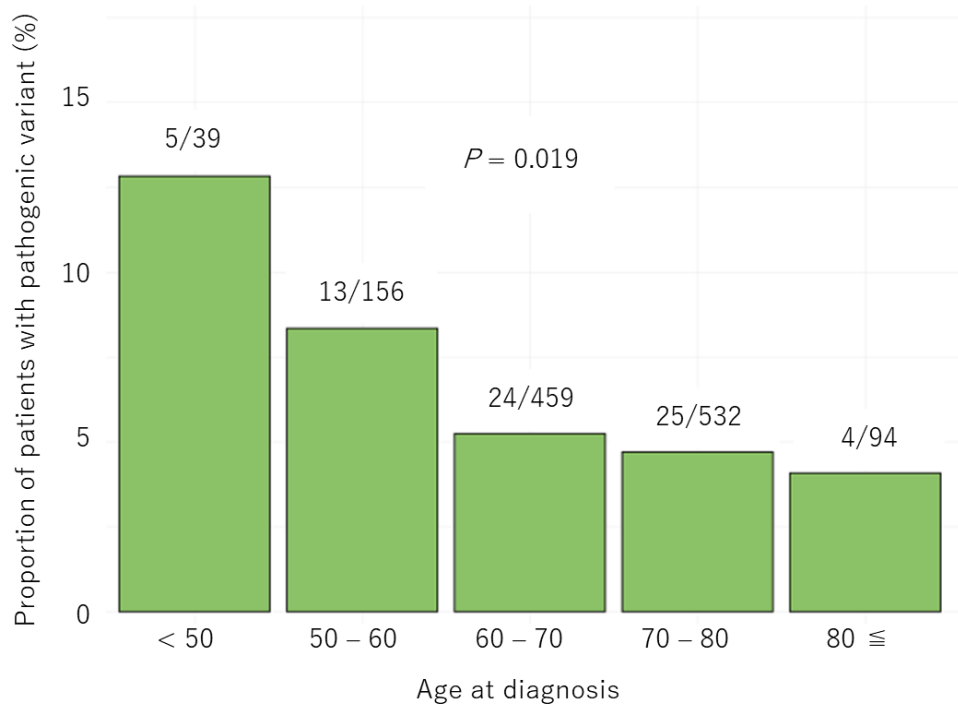


図 6 病原性生殖細胞変異を有する胆道癌症例の年齢層別の割合
Cochran-Armitage 傾向検定を用いて傾向検定を行った。

表 4 胆道癌における病原性生殖細胞変異保因者と非保因者の臨床的特徴

	Pathogenic variant carriers N = 71	Non-carriers N = 1,221	<i>P</i>	OR	95% CI
Mean age at diagnosis, y (IQR1–IQR3)	66.9 (60.5–73.5)	69.3 (64–76)	0.038		
Male	47 (66.2)	812 (66.9)	0.897	1	(0.6–1.6)
Personal cancer history					
Lung cancer	0 (0)	11 (1.1)	1	0	(0–6.3)
Esophageal cancer	0 (0)	6 (0.6)	1	0	(0–12.1)
Gastric cancer	5 (8.3)	39 (3.9)	0.095	2.3	(0.8–6.1)
Colorectal cancer	5 (8.3)	33 (3.3)	0.057	2.7	(1–6.9)
Hepatocellular carcinoma	4 (6.7)	52 (5.2)	0.55	1.3	(0.4–3.8)
Pancreatic cancer	0 (0)	6 (0.6)	1	0	(0–12.1)
Prostate cancer	3 (5)	24 (2.4)	0.19	2.2	(0.5–7.1)
Breast cancer	3 (5)	9 (0.9)	0.026	5.8	(1.3–22.1)
Cervical cancer	1 (1.7)	5 (0.5)	0.294	3.4	(0.1–25.2)
Endometrial cancer	1 (1.7)	4 (0.4)	0.252	4.2	(0.2–33.1)
Ovarian cancer	1 (1.7)	2 (0.2)	0.16	8.5	(0.3–109.6)
Family cancer history					
Lung cancer	8	105	0.68	1.2	(0.5–2.5)

	(12.9)	(11.3)			
	3	33			
Esophageal cancer	(4.8)	(3.6)	0.488	1.4	(0.3–4.7)
	17	227			
Gastric cancer	(27.4)	(24.4)	0.648	1.2	(0.6–2.1)
	9	103			
Colorectal cancer	(14.5)	(11.1)	0.406	1.4	(0.6–2.9)
Hepatocellular carcinoma	(8.1)	(8.1)	1	1	(0.4–2.5)
	4	57			
Pancreatic cancer	(6.5)	(6.1)	0.788	1.1	(0.3–3)
	3	31			
Biliary tract cancer	(4.8)	(3.3)	0.466	1.5	(0.4–5)
	1	23			
Prostate cancer	(1.6)	(2.5)	1	0.6	(0–4.1)
	8	52			
Breast cancer	(12.9)	(5.6)	0.047	2.5	(1–5.5)
	2	13			
Cervical cancer	(3.2)	(1.4)	0.24	2.3	(0.4–10.7)
	2	13			
Endometrial cancer	(3.2)	(1.4)	0.24	2.3	(0.4–10.7)
	0	8			
Ovarian cancer	(0)	(0.9)	1	0	(0–8.9)
Lymph node metastasis	22	270			
	(40.7)	(33.3)	0.298	1.4	(0.8–2.4)
	3	15			
Distant metastasis	(7.5)	(2.8)	0.121	2.8	(0.7–10)

CI, confidence interval; IQR, interquartile range; OR, odds ratio.

Percentages were calculated by excluding not available values (NA).

胆道癌の腫瘍局在別では、肝内胆管癌症例で最も保因者の割合が多かった (17/199=8.5%) (図 7)。BRCA1 生殖細胞変異はすべての部位で同程度の頻度で観察された (肝内胆管癌：1%，胆嚢癌：0.9%，肝外胆管癌：1.1%， Vater 乳頭

癌：1.4%）。一方, *APC* 生殖細胞変異は Vater 乳頭癌で最も多く観察され (2.7%), 肝内胆管癌や胆嚢癌では観察されなかった。しかし *APC* 生殖細胞変異を有する胆道癌症例は, 家族性大腸腺腫症の既往歴および家族歴は認められなかった。

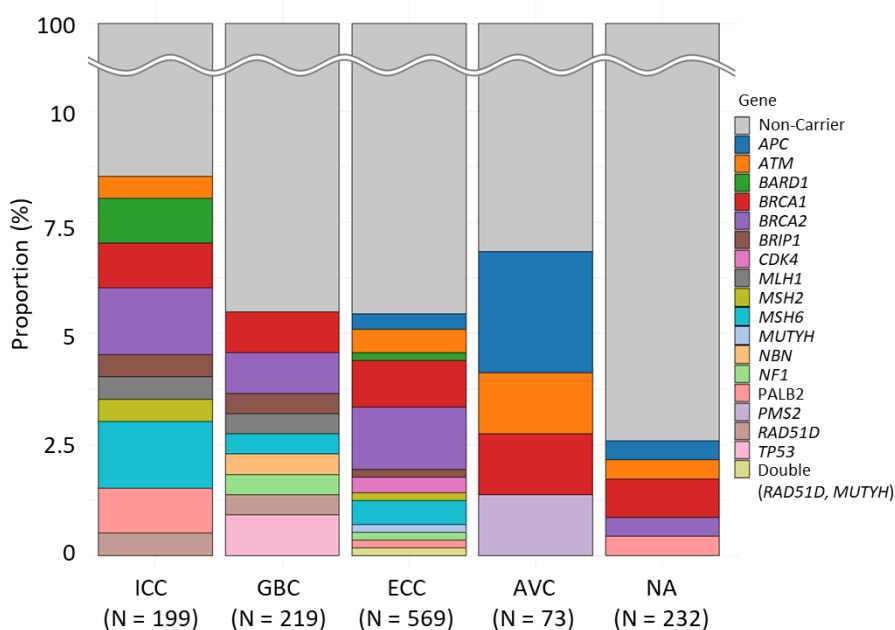


図 7 BTC の部位別の病原性生殖細胞変異体の割合

AVC, ampulla of Vater carcinoma; ECC, extrahepatic cholangiocarcinoma; GBC, gallbladder carcinoma; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; NA, not available.

北海道大学病院とバイオバンク・ジャパンの2つの解析集団において生存期間解析を行ったが, 保因者と非保因者の間に予後に関する有意差は認められなかった (予後情報が取得可能であった症例数 (保因者/非保因者): 北海道大学病院 = 18/259, バイオバンク・ジャパン = 10/159。図 8)。

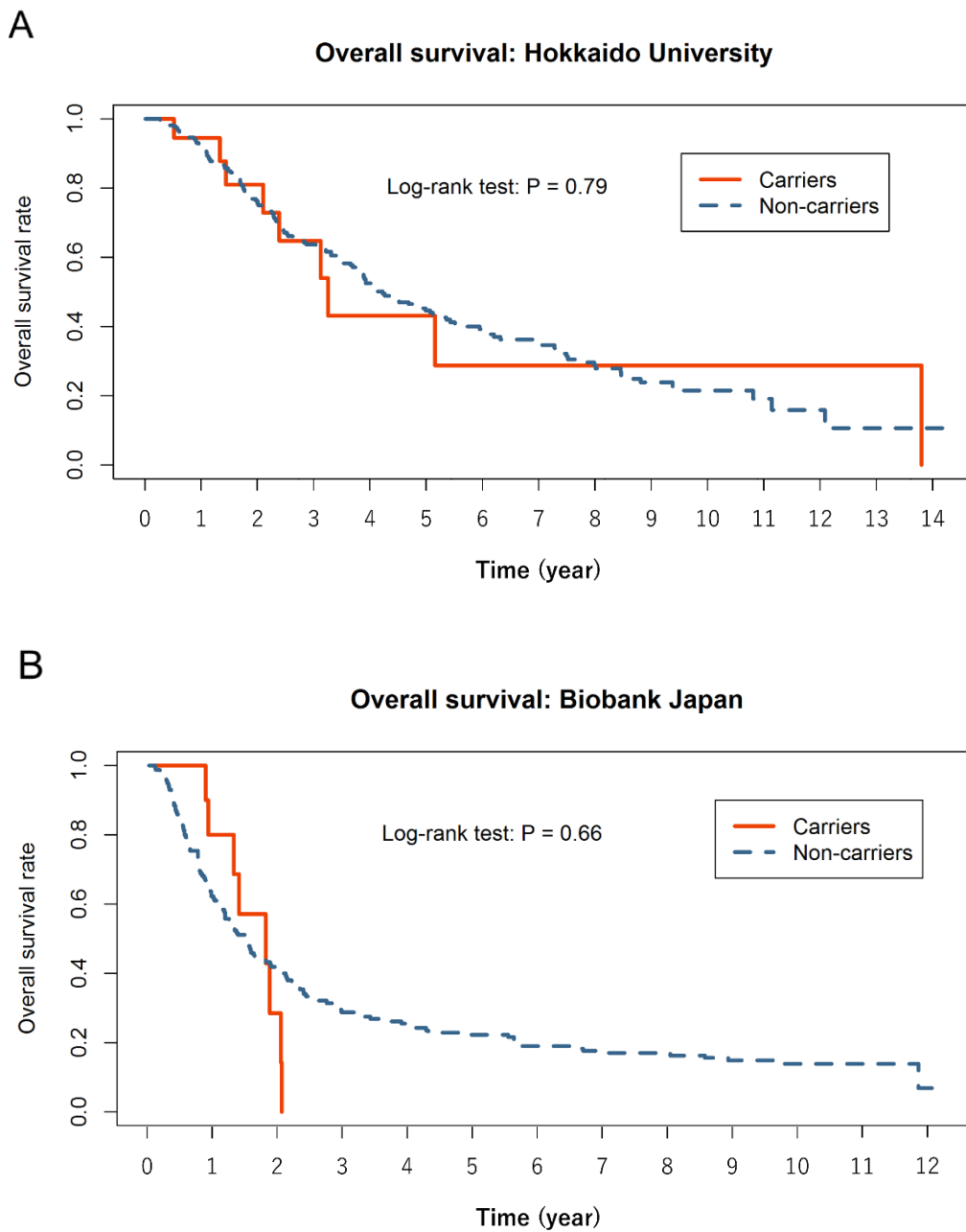


図 8 胆道癌症例の保因者と非保因者における生存解析

(A) 北海道大学病院の症例では、予後情報を有する胆道癌症例 277 例（保因者/非保因者 = 18/259）について解析した。北海道大学病院の症例は、全例が外科的切除を受けた。生存期間は手術日を起点とした。(B) バイオバンク・ジャパンの症例では、予後情報を有する胆道癌症例 166 例（保因者/非保因者 = 10/159）について解析した。生存期間は診断日を起点とした。

胆道癌腫瘍組織の HRD 解析

BRCAl/2 や *PALB2*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1* などの相同組換え修復に関連する遺伝子の生殖細胞変異が胆道癌症例に認められた点に着目し、相同組換え修復関連生殖細胞変異を有する症例の胆道癌腫瘍が HRD の表現型を有するか検討した。北海道大学病院で切除された胆道癌症例より腫瘍組織が採取可能であった 52 症例の胆道癌に対して全ゲノムシーケンシングを行った。シーケンスした組織は腫瘍と考えられる部位から採取したものであり、実際に病理学的に腫瘍含有割合は評価されていなかった。そこで QDNAseq で解析したコピー数のデータを元に、パイプライン PURPLE を用いて腫瘍細胞含有率を推定した。その結果、6 症例の胆道癌において腫瘍細胞含有率が 10%以下であると推定された。PURPLE で推定した腫瘍細胞含有率が最も高い症例 (症例 ID: RK279, 腫瘍細胞含有率 = 99%) と最も低い症例 (症例 ID: BHK75, 腫瘍細胞含有率 = 8%) の QDNAseq で解析したコピー数データを図 9 に示す。症例 RK279 の腫瘍組織ではコピー数変化が各染色体で観察された。しかし、BHK75 の腫瘍細胞におけるコピー数変化は正常組織のコピー数変化と同程度であった。これは検体から採取した腫瘍組織に含まれた細胞のほとんどが腫瘍細胞以外の間質細胞や免疫細胞であったことが推察される。

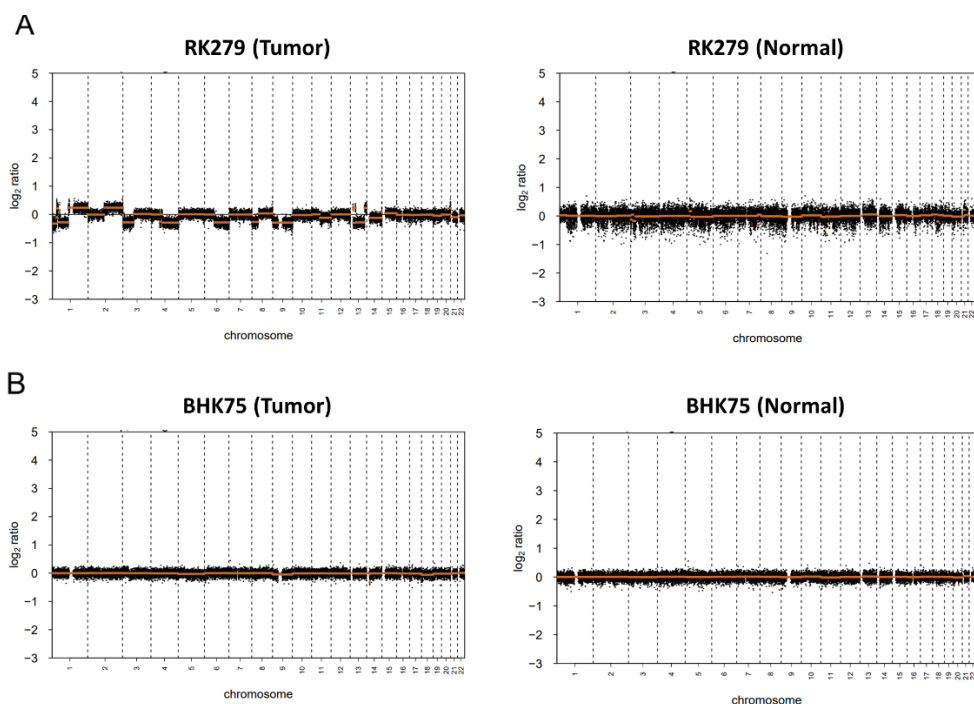


図9 腫瘍組織と正常組織におけるコピー数変化のプロファイル

黒点は100,000塩基毎に算出されたコピー数をプロットしたものである。オレンジ線は黒点を平均して算出されたコピー数変化を表している。縦軸は \log_2 (コピー数変化/2) , 横軸は染色体番号を表している。(A) 腫瘍細胞含有率が最も高かった症例 RK279 の腫瘍組織と正常組織におけるコピー数変化。(B) 腫瘍細胞含有率が最も低かった症例 BHK75 の腫瘍組織と正常組織におけるコピー数変化。

腫瘍細胞含有率が10%以下であった胆道癌6症例は以降の解析から除外した。全ゲノム体細胞変異プロファイルから得られたIndelと構造異常のデータを元に、パイプラインCHORDを用いて、機械学習により胆道癌のHRDの状態を評価した。CHORDは高頻度マイクロサテライト不安定性腫瘍に対してはHRDについて評価することができないため、高頻度マイクロサテライト不安定性をもつ胆道癌1症例を以降の解析から除外した。以上の除外基準より胆道癌45症例についてHRD状態の評価を行った(表5)。

表 5 HRD 解析を行った胆道癌 45 症例の臨床情報

ID	Age	Sex	Location	Personal cancer history	Cancer history within three-degree relatives	Tumor purity
BHK072	54	M	ICC	–	1 gastric, 1 lung	0.16
BHK59	61	M	ECC	–	2 biliary, 2 gastric, 1 colorectal, 1 pancreatic	0.24
CHK005	79	M	ECC	hepatocellular	1 hepatocellular	0.32
CHK008	73	M	ECC	prostate	–	0.29
HK01	61	F	ICC	–	1 hepatocellular	0.37
HK09	58	M	ICC	–	–	0.21
HK100	64	M	ICC	–	1 gastric	0.18
HK108	71	F	ECC	–	1 pancreatic	0.22
HK110	60	F	ECC	–	–	0.23
HK122	67	M	ECC	–	–	0.5
HK139	NA	NA	ECC	–	–	0.78
HK154	74	M	ECC	–	–	0.44
HK157	75	M	ECC	–	–	0.27
HK169	68	M	ECC	–	–	0.77
HK20	56	M	ICC	–	1 gastric, 1 lung	0.31
HK23	62	F	ICC	–	–	0.68
HK59	75	M	ECC	–	–	0.21
HK71	71	F	GBC	–	–	0.7
HK72	61	M	GBC	–	–	0.82
HK82	84	F	GBC	–	–	0.67
HK84	82	M	GBC	–	–	0.88
HK89	76	M	GBC	–	–	0.81
HK94	82	F	GBC	–	–	0.8
HK95	64	M	GBC	–	–	0.15
HK96	63	M	GBC	–	1 pancreatic	0.63
HK97	61	F	GBC	–	–	0.86
HK98	61	F	ICC	–	–	0.9
RK109	84	M	ICC	–	–	0.35

RK137	74	F	ICC	–	–	0.5
RK138	75	F	ICC	gastric	–	0.32
RK142	57	M	ICC	–	1 hepatocellular	0.22
RK182	65	M	ICC	–	–	0.5
RK194	67	M	ICC	–	–	0.61
RK204	83	M	ICC	hepatocellular	–	0.36
RK208	60	M	ICC	esophageal, colorectal	–	0.22
RK226	59	M	ICC	–	–	0.16
RK269	74	M	ICC	colorectal	–	0.16
RK272	78	F	ICC	–	–	0.8
RK298	68	M	ICC	–	–	0.3
RK303	76	M	ICC	–	–	0.18
RK312	66	M	ICC	–	–	0.81
RK316	54	F	ICC	–	–	0.2
RK317	73	M	ICC	–	–	0.14
RK560	51	M	GBC	–	1 gastric	0.19
RK567	75	M	ICC	colorectal, GIST, prostate	–	0.22

ECC, extrahepatic cholangiocarcinoma; GBC, gallbladder carcinoma; GIST, gastrointestinal stromal tumor; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma

HRD 解析の対象となった胆道癌 45 症例には、相同組換え修復関連遺伝子に病原性生殖細胞変異を持つ 7 症例 (*ATM* : 1 症例, *BRCAl* : 1 症例, *BRCA2* : 3 症例, *BRIP1* : 1 症例, *PALB2* : 1 症例) と、相同組換え修復関連遺伝子に VUS を持つ 7 症例 (*BRCAl* : 2 症例, *BRCA2* : 1 症例, *CHEK2* : 1 症例, *PALB2* : 2 症例, *RAD51D* : 1 症例) が含まれた。残る 31 症例は、相同組換え修復関連遺伝子に生殖細胞変異を持たないネガティブコントロールとして解析した。相同組換え修復関連遺伝子に病原性生殖細胞変異もしくは VUS を持つ 14 症例の変異情報を表 6 に示す。

表 6 相同組換え修復関連遺伝子に生殖細胞変異を持つ胆道癌 14 症例

ID	Gene	Clinical significance	Annotation	HGVS.c	HGVS.p
HK110	<i>ATM</i>	Pathogenic	frameshift variant	c.7886_7890 delTATTA	p.Ile2629fs
HK09	<i>BRCA1</i>	Pathogenic	frameshift variant&stop gained	c.3731_3734 dupATAG	p.Ser1245fs
HK20	<i>BRCA2</i>	Pathogenic	frameshift variant	c.9097dupA	p.Thr3033fs
CHK005	<i>BRCA2</i>	Pathogenic	splice region variant&synonymous variant	c.9117G>A	p.Pro3039Pro
BHK59	<i>BRCA2</i>	Pathogenic	stop gained	c.9076C>T	p.Gln3026*
RK567	<i>BRIP1</i>	Pathogenic	missense variant	c.1045G>T	p.Ala349Ser
BHK072	<i>PALB2</i>	Pathogenic	frameshift variant	c.1671_1674 delTATT	p.Ile558fs
HK95	<i>BRCA1</i>	VUS	missense variant	c.418A>G	p.Ser140Gly
HK98	<i>BRCA1</i>	VUS	missense variant	c.2486T>G	p.Phe829Cys
HK59	<i>BRCA2</i>	VUS	missense variant	c.4195T>C	p.Cys1399Arg
HK84	<i>CHEK2</i>	VUS	missense variant	c.1324G>A	p.Val442Ile
HK94	<i>PALB2</i>	VUS	missense variant	c.3296C>T	p.Thr1099Met
CHK008	<i>PALB2</i>	VUS	missense variant	c.2560A>C	p.Asn854His
HK100	<i>RAD51D</i>	VUS	missense variant	c.232G>T	p.Ala78Ser

VUS, variants of uncertain significance.

マイクロホモロジーを伴う短い欠失のデータを用いて HRD 状態を予測するパイプライン CHORD により、胆道癌 45 症例について HRD である確率を算出した (図 10, 表 7)。CHORD は、マイクロホモロジーを伴う欠失に着目し、腫瘍における HRD の状態を機械学習により予測するツールである。CHORD は放射線と関連する 1 塩基のマイクロホモロジーを伴う欠失は除外して、2 塩基以上のマイクロホモロジーを伴う欠失が多い腫瘍を HRD であると予測する。さらに、CHORD はタンDEM重複が多くみられる *BRCA1* 型 HRD を *BRCA2* 型 HRD と区別するために 1-100kb の構造的重複のデータを用いて、1-100kb の構造的重複が多い腫瘍を *BRCA1* 型 HRD であると予測することが可能である。

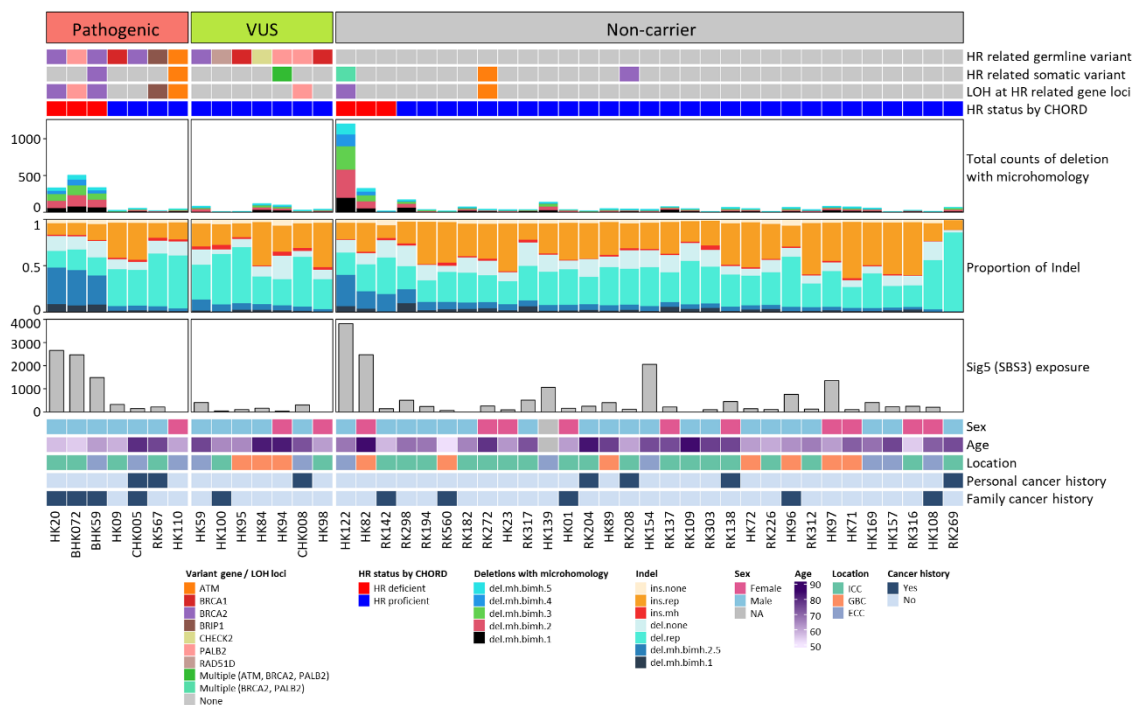


図 10 全ゲノムシーケンシングによる胆道癌の HRD 解析

胆道癌症例は相同組換え修復関連遺伝子に病理性生殖細胞変異や VUS を持つ症例、生殖細胞変異を持たない症例で分類されている。さらに全 Indel に対する del.mh.bimh.2.5 の割合の降順でソートされている。

del.mh.bimh.2.5, 2 塩基以上のマイクロホモロジーを伴う欠失; del.mh.bimh.x, x 塩基のマイクロホモロジーを伴う欠失; del.rep, リピート領域の欠失; del.none, 上記のいずれでもない欠失; ins.mh, マイクロホモロジーを伴う挿入; ins.rep, リピート領域の挿入; ins.none, 上記のいずれでもない挿入。ECC, extrahepatic cholangiocarcinoma; GBC, gallbladder carcinoma; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; NA, not available.

表 7 機械学習パイプライン CHORD による HRD 判定結果

Clinical information	HRD related germline variants		CHORD results			
	ID	Gene	Clinical significance	HRD probability	HRD status	HRD type
	HK110	<i>ATM</i>	Pathogenic	0.008	HRP	–
	HK09	<i>BRCA1</i>	Pathogenic	0	HRP	–
	HK20	<i>BRCA2</i>	Pathogenic	0.792	HRD	<i>BRCA2</i> type
	CHK005	<i>BRCA2</i>	Pathogenic	0	HRP	–
	BHK59	<i>BRCA2</i>	Pathogenic	0.758	HRD	<i>BRCA2</i> type
	RK567	<i>BRIP1</i>	Pathogenic	0	HRP	–
	BHK072	<i>PALB2</i>	Pathogenic	0.754	HRD	<i>BRCA2</i> type
	HK95	<i>BRCA1</i>	VUS	0	HRP	–
	HK98	<i>BRCA1</i>	VUS	0	HRP	–
	HK59	<i>BRCA2</i>	VUS	0.002	HRP	–
	HK84	<i>CHEK2</i>	VUS	0	HRP	–
	HK94	<i>PALB2</i>	VUS	0.002	HRP	–
	CHK008	<i>PALB2</i>	VUS	0.016	HRP	–
	HK100	<i>RAD51D</i>	VUS	0.004	HRP	–
	HK01	Non-Carrier	–	0	HRP	–
	HK108	Non-Carrier	–	0.024	HRP	–
	HK122	Non-Carrier	–	0.776	HRD	<i>BRCA2</i> type
	HK139	Non-Carrier	–	0.002	HRP	–
	HK154	Non-Carrier	–	0.022	HRP	–
	HK157	Non-Carrier	–	0.002	HRP	–

HK169	Non-Carrier	–	0	HRP	–
HK23	Non-Carrier	–	0	HRP	–
HK71	Non-Carrier	–	0	HRP	–
HK72	Non-Carrier	–	0	HRP	–
HK82	Non-Carrier	–	0.604	HRD	<i>BRCA2</i> type
HK89	Non-Carrier	–	0	HRP	–
HK96	Non-Carrier	–	0	HRP	–
HK97	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK109	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK137	Non-Carrier	–	0.002	HRP	–
RK138	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK142	Non-Carrier	–	0.58	HRD	<i>BRCA2</i> type
RK182	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK194	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK204	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK208	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK226	Non-Carrier	–	0.014	HRP	–
RK269	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK272	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK298	Non-Carrier	–	0.096	HRP	–
RK303	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK312	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK316	Non-Carrier	–	0	HRP	–
RK317	Non-Carrier	–	0.026	HRP	–
RK560	Non-Carrier	–	0.002	HRP	–

HRD, homologous recombination deficiency; HRP, homologous recombination proficiency; VUS, variants of uncertain significance.

相同組換え修復経路に関連する病原性生殖細胞変異を持つ胆道癌 7 症例のうち、3 症例 (HK20, BHK072, BHK59) が機械学習により *BRCA2* 型 HRD と予測された。(HRD probability > 0.5) , この 3 症例はいずれも相同組換え修復経路に関する遺伝子に truncating 変異 (*BRCA2* p.Thr3033fs , *BRCA2* p.Gln3026* , *PALB2* p.Ile558fs) を有しており、その変異遺伝子座に LOH を伴っていた。さらに、これら 3 症例はいずれも癌の家族歴を有していた。その一方で、*ATM* に生殖細胞フレームシフト変異 (p.Ile2629fs) を持つ HK110 は、*ATM* に LOH を伴っていたにもかかわらず、homologous recombination proficient (HRP) と予測された。また *BRIP1* に生殖細胞ミスセンス変異 (p.Ala349Ser) を持つ RK567 も、*BRIP1* に LOH を伴っていたにもかかわらず HRP と予測された。このミスセンス変異は ClinVar では VUS として登録されていたが、本研究では ACMG/AMP ガイドラインに基づき病原性変異として分類された変異であった。他の HRP と予測された胆道癌 2 症例 (CHK005, HK09) は、各変異座に LOH が認められなかった。これらの結果は、*BRCA2* および *PALB2* の変異と遺伝子座特異的 LOH が胆道癌腫瘍の HRD を誘発するために必要であることを示し、腫瘍抑制遺伝子の古典的な 2 ヒットモデルと一致するものであった。また、*ATM* と *BRIP1* の変異は、胆道癌の HRD 状態の発現には影響を及ぼさない可能性が示された。

一方、相同組換え修復経路関連 VUS を持つ胆道癌 7 症例はいずれも HRP の状態であった。VUS をもつ 7 症例のうち、*PALB2* のミスセンス変異 (c.2560A>C p.Asn854His) を持つ症例 CHK008 のみ、変異遺伝子座に LOH を伴っていた。ネガティブコントロール 31 症例のうち、3 症例 (HK122, HK82 , RK142) が *BRCA2* 型 HRD と判定された。HK122 は *BRCA2* の体細胞フレームシフト変異 (c.6373dupA p.Thr2125fs) と変異遺伝子座に LOH を有していた。後者の 2 症例では、HRD の原因として明らかな遺伝子変異は観察されなかった。また RK272 は *ATM* に体細胞変異があり、変異遺伝子座に LOH が観察されたが、HRP と判定された。本研究では、*BRCA1* 型 HRD と予測された胆道癌はなかった。

主に短い Indel と構造異常に着目して HRD 状態を判定するパイプライン CHORD の結果を検証するために、一塩基置換 (single base substitution, SBS) における変異シグネチャー解析を行った。その結果 13 種類の SBS シグネチャーが抽出された (図 11)。Sig5 は、COSMIC v3 に登録されている HRD と関連する SBS3 (コサイン類似度 : 0.766) と最も高い類似性を示した。HRD と判定された胆道癌 3 症例はいずれも Sig5 の保有量が高く (図 10) , 一方、HRP と判定された病原性生殖細胞変異体や VUS を持つ胆道癌症例は Sig5 の保有量が低かったが、ネガティブコントロール症例の Sig5 の保有量はさまざまであった。

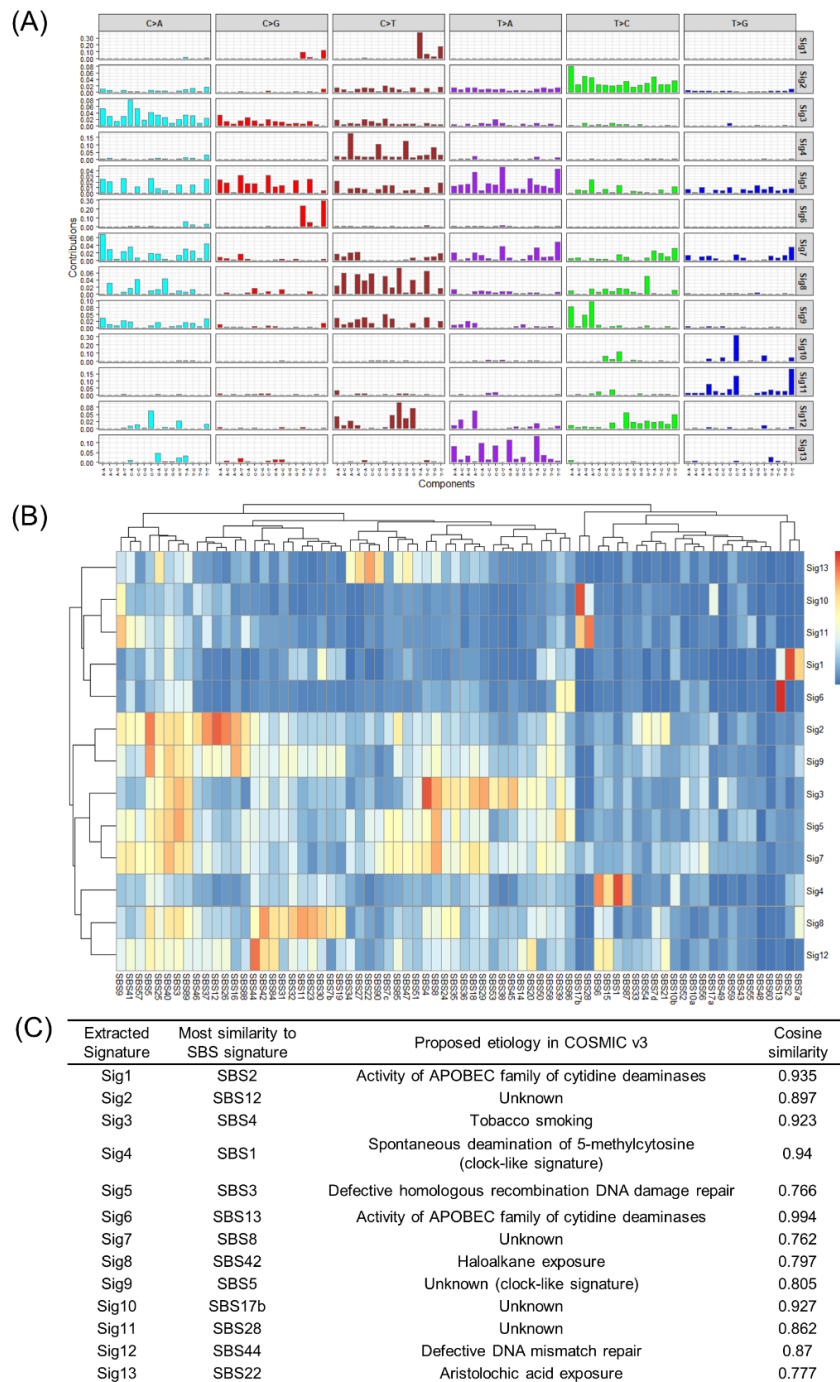


図 11 変異シグネチャー解析により抽出された 13 の SBS シグネチャー

(A) 抽出した 13 種類のシグネチャーのパターン。(B) 抽出したシグネチャーと COSMIC v3 データベースに登録されている SBS シグネチャーで計算したコサイン類似度のヒートマップ。(C)抽出されたシグネチャーと最も高いコサイン類似度を持つ COSMIC v3 データベースの SBS とその病因。

SBS, single base substitution。

HRD を有する胆道癌症例の治療経過

本研究において全ゲノム解析を行った胆道癌症例に、HRD に対して有用である PARP 阻害剤を実際に使用した症例は含まれなかった。しかし HRD を有する胆道癌症例のうち DNA 障害性抗がん剤であるプラチナ製剤や 2 本鎖 DNA 切断を起こす放射線により治療された症例が存在したため報告する (図 12)。

症例 ID BHK59 は肝門部胆管癌と診断された 61 歳男性で、本研究における解析で *BRC A2* に生殖細胞変異が確認された症例である。悪性腫瘍の既往歴はなかったが、悪性腫瘍の家族歴を複数有していた。原発巣に対して肝右葉切除と肝外胆管切除を施行したが、その後、3 度の再発を経験した。肝再発に対してはシスプラチンとゲムシタビンによる全身化学療法が奏効した。傍大動脈リンパ節再発に対しては陽子線と S-1 療法が奏効した。これらの治療後のタイミングであるが、本研究の解析でこの症例の胆道癌は HRD の表現型を有していることが判明した。DNA 障害性抗がん剤であるプラチナ製剤や 2 本鎖 DNA 切断を起こす放射線療法のいずれも奏功した点も HRD の表現型を有していたことが理由の一つと考えられる。

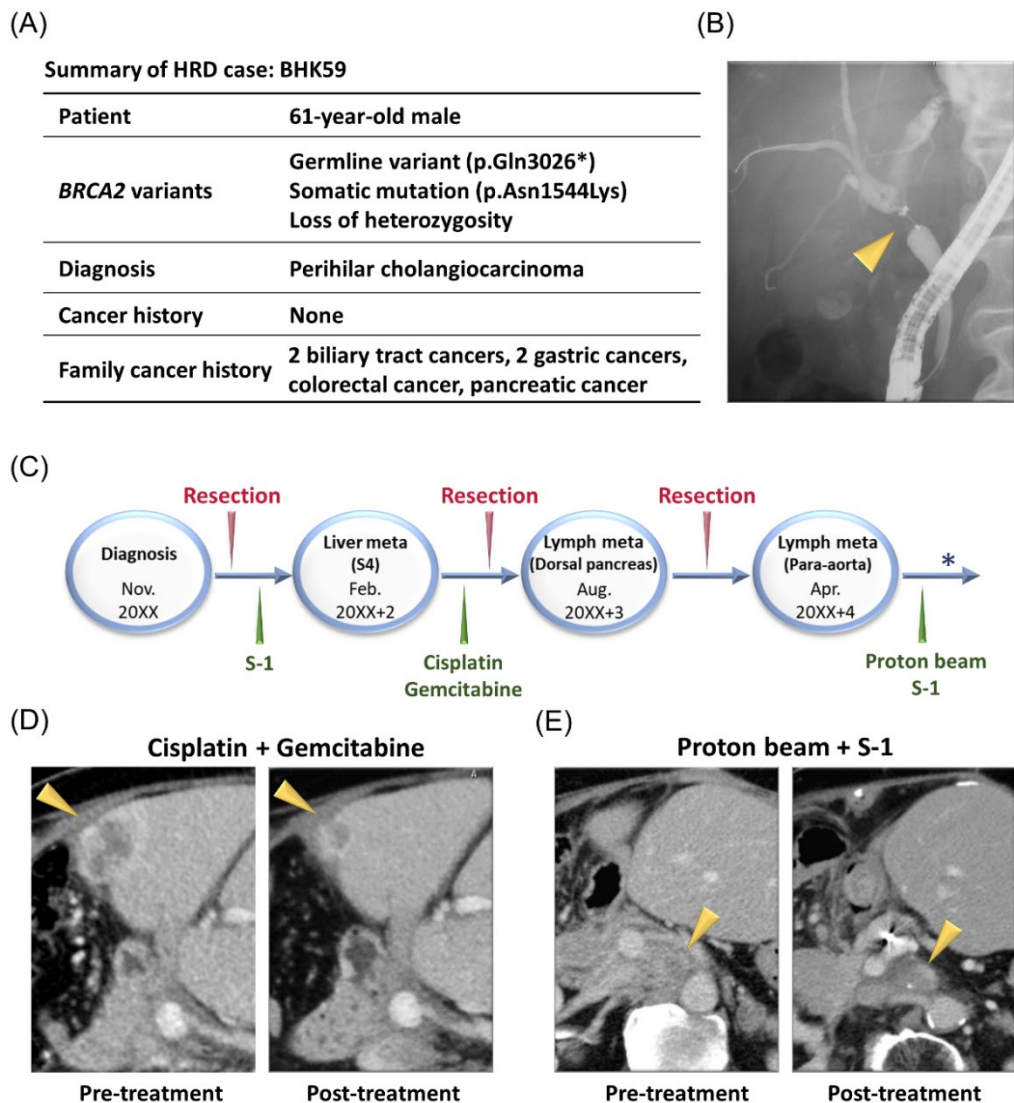


図 12. HRD 表現型を持つ胆道癌症例

(A) 症例 ID BHK59 の臨床情報 (B) 内視鏡的逆行性胆汁膵管造影法。矢頭が原発巣を示す。(C) 治療経過の概要。アスタリスクは、この患者が HRD であることが明らかになったタイミングを示す。(D, E) 転移巣のコンピュータ断層撮影画像。(D) 肝転移巣に対してシスプラチンとゲムシタビンを 6 コース投与した結果、部分奏効 (Partial response, PR) を示した。(E) 大動脈リンパ節再発に対して、陽子線と S-1 を照射。治療後画像は治療前 12 ヶ月後のものではあったが、PR を示した。

考察

本研究では胆道癌を発癌した日本人患者の 5.5%が、27 の遺伝性がん素因遺伝子のうち、いずれかの病原性のある生殖細胞系列変異を有していることが明らかとなった。さらに、胆道癌患者と非癌対照者を比較すると、*BRCA1/2*, *APC*, *MSH6* における病原性生殖細胞変異の保因者は胆道癌の発がんのリスクが高いことが示された。さらに全ゲノムシーケンスにより、*BRCA2* および *PALB2* に病原性生殖細胞変異を持つ患者の胆道癌腫瘍に LOH を伴う腫瘍は HRD の表現型を持つことが示された。

胆道癌患者における生殖細胞変異の保因率についてはいくつかの報告が存在する。Maynard らは、複数人種集団の胆道癌 131 症例における生殖細胞変異を解析し、変異保因者の保因率は 16%であることを示した(Maynard et al., 2020)。Lin らは、アーカイブデータからの症例を含む中国人胆道癌患者 803 症例における生殖細胞変異を評価し、変異保因者の保因率は 12%であることを示した(Lin et al., 2021)。本研究では生殖細胞変異保因者の保因率は 5.5%であった。本研究では 27 遺伝子をターゲットとして解析したが、先に述べた先行研究では、Maynard らは 468 遺伝子について評価し、Lin らは全エクソーム解析のデータを用いて解析していた。このように先行研究との保因率の違いは、遺伝子パネルの違いが原因であると考えられる。

本研究では、*BRCA1*, *BRCA2*, *MSH6* などの DNA 損傷修復遺伝子の変異が胆道癌において有意に観察されることを示した。DNA 損傷修復遺伝子における生殖細胞変異体を有する胆道癌は、プラチナ製剤と PARP 阻害薬に対して高い感受性を示すことが報告されている(Golan et al., 2017)。また免疫チェックポイント阻害剤もリンチ症候群患者およびマイクロサテライト不安定性を有する癌腫において有効であることが示されている(Therkildsen et al., 2021)。これらの薬剤は、胆道癌に対する新規治療標的となる可能性があり、DNA 損傷修復遺伝子についての生殖細胞変異の検索は、胆道癌における治療法を検討する検査の一つに成り得ると考える。

APC 生殖細胞変異は、胆道癌の危険因子として同定され、特に Vater 乳頭部癌において高頻度に観察された。*APC* は、家族性腺腫性ポリポシス (familial adenomatous polyposis, FAP) の原因遺伝子であり、*APC* に生殖細胞変異を有する場合、十二指腸癌や傍乳頭癌の生涯発症リスクは約 100%といわれている (Brosens et al., 2005)。Vater 乳頭部癌は腸型または胆膵型の表現型を持つ不均一な腫瘍であるが、Vater 乳頭部癌における *APC* 変異は胆膵型よりも腸型に多く見られる可能性が報告されている(Wong et al., 2019)。ただし、本研究では組織

亜型について検討することはできなかった。また、典型的 FAP の APC 生殖細胞変異はコドン 1,250 から 1,464 の間で観察される(Nagase et al., 1992)。一方, Attenuated FAP の APC 生殖細胞変異は主に 5'末端, エキソン 9, 遠位 3'末端に観察される(Wong et al., 2016; Knudsen, Bisgaard and Bülow, 2003)。変異部位から, 今回観察された APC 変異を有する胆道癌症例は, すべて Attenuated FAP である可能性が高いと考えられる。既報における APC 生殖細胞変異を有する胆道癌も, Attenuated FAP であると考えられていた(Knudsen, Bisgaard and Bülow, 2003; Dinarvand et al., 2019)。しかし, 症例数が少ないため, 病態メカニズムの解明は十分ではなく, APC 変異と胆道癌発癌との関連性解明にはさらなる症例の集積が必要である。

HRD は, 相同組換え修復関連遺伝子の異常によって引き起こされ, 乳癌や卵巣癌, 前立腺癌, 膵臓癌の発癌に関与する。PARP 阻害薬の臨床試験では, BRCA1/2 変異と市販の myChoice アッセイによって算出される HRD スコアを用いて腫瘍における HRD の状態を判定している(Telli et al., 2015; Coleman et al., 2017)。これらの臨床試験では, HRD-High の乳癌と卵巣癌は, PARP 阻害薬とプラチナ製剤に対して良好な感受性を示すことが示されている。本研究の全ゲノムシーケンシングでは, HRD と判定された胆道癌 3 症例はいずれも HR 関連の病原性生殖細胞変異を有し, かつ変異遺伝子座に LOH を伴う症例であった。一方, BRCA1/2 病原性生殖細胞変種を持つ症例であっても, LOH がない場合, HRP と予測された。この結果は, HRD には HR 関連の病原性変異体と LOH による腫瘍抑制遺伝子の機能喪失が共存していることが必要であることを示唆している。もしくは, 突然変異やエピゲノム変化による体細胞ダブルヒットが必要であり, これは我々の研究で少なくとも 1 例で観察された。BRIP1 と ATM も相同組換え修復関連遺伝子に関与しているが, これらの遺伝子変異を持つ胆道癌症例は HRP と判定された。BRIP1 のミスセンス変異は ClinVar においては VUS と分類されていたが, 本研究では ACMG/AMP ガイドラインに基づき病原性 (Pathogenic) であると評価した変異であった。しかし, この変異は胆道癌において有害な機能喪失に至らなかった可能性がある。また前立腺癌の臨床研究において, ATM 変異だけでは PARP 阻害薬が有効でないことが報告されている (de Bono et al., 2020)。少なくとも胆道癌では, ATM 変異は相同組換え修復経路にほとんど影響を及ぼさない可能性が示唆される。

相同組換え修復関連遺伝子に VUS を持つ症例は, 全症例で HRP と評価された。特に PALB2 のミスセンス変異 (c.2560A>C p.Asn854His) を有する症例は, 変異遺伝子座に LOH を伴うにもかかわらず HRP と評価され, この変異は病原性が低い可能性が示唆される。HRD 状態の解析は, VUS に対するより深い解釈

を可能とする可能性がある(Osorio et al., 2002)。さらに, HRD と予測された症例のうちいくつかの症例では HRD に関連するドライバー遺伝子が同定されなかった。本研究で使用したパイプライン CHORD について記載した原著では, HRD と判定された症例のうち原因遺伝子が不明である症例が存在したと報告されている(Nguyen et al., 2020)。これらの症例では, エピジェネティックな変化や未知の相同組換え修復関連遺伝子変異が関与している可能性があり, さらなる解析が必要である。

Golan らは, プラチナ製剤または PARP 阻害薬で治療した BRCA 変異胆道癌症例は, 他の方法で治療された胆道癌症例よりも全生存が良好であると後方視的に報告している(Golan et al., 2017)。残念ながら本研究の解析対象患者の中には PARP 阻害薬で治療した胆道癌症例は存在しなかった。しかし, 症例提示したように *BRCA2* 生殖細胞変異と HRD 表現型を持つ胆道癌患者において, 実際に DNA2 本鎖切断を引き起こすプラチナ製剤と放射線療法によく反応した症例を経験した。プラチナ製剤や放射線など DNA 傷害性の治療法が HDR を持つ腫瘍に対して有効な治療法であるという報告もあり(Abbotts et al., 2019; Park et al., 2020), これらの結果は, HRD 陽性胆道癌患者に対する DNA 傷害性の治療および PARP 阻害薬の有用性を支持するものであると考える。さらに本研究では, 統計学的に有意ではないものの *PALB2* の病原性変異が胆道癌において多い傾向にあり, 全ゲノム解析では LOH を伴う *PALB2* フレームシフト変異を有する胆道癌症例が HRD 表現型を有していることが示された。近年 ACMG ガイドラインが更新され, *PALB2* 変異は *BRCA1/2* と同等の乳がん・卵巣がんのリスクを有しており, ゲノム解析の結果を還元することを推奨している(Miller et al., 2021)。このように, これまで治療法の選択肢が限られていた胆道癌において, *BRCA1/2* や *PALB2* などの相同組換え修復関連遺伝子の評価は治療戦略を拡大するためには有用であると考えられる。

本研究にはいくつかの問題点がある。第一に, 解析されたコホートが日本人に限定されている点である。生殖細胞変異の頻度は人種によって異なることが予想されるため, 他の地域によっては生殖細胞変異の頻度は異なる可能性がある。人種や地域性についても明らかにするためには, 生殖細胞変異解析は胆道癌保因率の高いアジア全域または欧米まで拡大し解析が行われるべきである。

第二に, 全ゲノム解析をおこなうことができた症例が少なかったことである。腫瘍組織を集めることができた症例は, 北海道大学病院で治療した症例の一部に限られていた。さらに組織の全ゲノムをシーケンスするためには組織自体の質が担保されている必要があり, 腫瘍組織を新鮮凍結標本としてのみ採取をおこなった。しかし採取した組織の腫瘍含有量を事前に評価することがで

きなかったため、本研究で全ゲノムシーケンスを行った症例のうち1割以上（6/51 症例）のサンプルで腫瘍含有量が少ないと推定され HRD の評価を行うことができなかった。腫瘍の HRD 状態を全ゲノム解析で評価するためには、より多くの症例から腫瘍組織をサンプリングするとともに、新鮮凍結標本と一緒に病理学的に腫瘍含有量を測定できるように組織採取の方法を改善するべきであると思われる。

最後に、考察の中でも述べたように、本研究の中で HRD と判定された胆道癌症例の中で HRD をターゲットとする PARP 阻害薬を投与された症例が存在せず、PARP 阻害薬の HRD 胆道癌に対する有用性が不透明な点である。しかし、本研究のなかでも HRD 胆道癌に対して DNA 傷害性の治療法が有用であった症例が1例であるが存在しており、PARP 阻害剤が HRD 胆道癌に有用である可能性はあると考えられる。本研究では *BRCA* 変異の有無だけでは HRD 状態であることと一致しないことが明らかになったことから、ゲノム情報を合わせた PARP 阻害薬の胆道癌に対する有用性の評価が行われることが期待される。

結論

①本研究全体から得られた新知見

- 日本人胆道癌症例の 5.5%に遺伝性がん素因遺伝子変異が確認された。
- *BRCA1/2*, *APC*, *MSH6* の生殖細胞変異は胆道癌の発生に大きく寄与していると考えられる。
- *BRCA2* および *PALB2* の生殖細胞変異があり、かつその遺伝子座に LOH を伴っている胆道癌は HRD の状態であることを明らかにした。

②新知見の意義

遺伝性疾患である乳癌卵巣癌症候群や家族性大腸腺腫症，リンチ症候群の患者やその家族においては乳癌や大腸癌のみならず，胆道癌のスクリーニングが必要であることを意味する。また *BRCA* の遺伝子変異がある症例では HRD をターゲットとした治療が奏効する可能性があるため，乳癌の家族歴を多くもつ場合など遺伝性乳癌卵巣癌症候群が疑われる場合は生殖細胞変異の検索をおこなうべきであると考えられる。一方で HRD 関連遺伝子である *BRCA2* や *PALB2* の変異のみでは HRD の表現型を示さなかったことから，胆道癌においても HRD の検出が行われるべきである。

③本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

HRD 関連の遺伝子変異を有する，または HRD を伴う胆道癌症例に対して，PARP 阻害薬やプラチナ製剤が奏効するかを確認するための検証実験が展開されることが望まれる。また，*APC* や *MSH6* 生殖細胞変異が生じた症例に対しても全ゲノム解析を行うことで，胆道癌における遺伝子学的特徴がさらに明らかになり，治療標的が増えることを期待する。

④今後の課題

胆道癌は全癌腫の中では比較的頻度の低い悪性腫瘍であり，その中の 5.5%と比較的低い頻度で観察された遺伝性がん素因遺伝子をどの集団に対して検索を行うか検討されるべき課題である。一方で，胆道癌は浸潤性の高い悪性腫瘍であり，診断時には切除不能である症例も多いため，早期診断のためには遺伝性がん素因遺伝子変異を検索し，適切にスクリーニングをおこなうことにはメリットがあると考えられる。胆道癌に対する遺伝性がん素因遺伝子の検索については費用対効果の面からも検討されるべきであると考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行わせていただき非常に丁寧にご指導いただいた理化学研究所生命医科学研究センターがんゲノム研究チーム中川 英刀 チームリーダー、および本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。本研究を遂行するにあたり様々な方々のご指導、ご協力を賜りました。また本研究においては北海道大学病院の症例のみならずバイオバンク・ジャパンに登録された数多くの症例を解析させていただきました。このような大規模な実験の計画および遂行にあたり、ご協力いただきました理化学研究所生命医科学研究センター基盤技術開発研究チーム 桃沢 幸秀 チームリーダーに深く感謝致します。また、様々なご協力をいただいたがんゲノム研究チームの皆様、基盤技術開発研究チームの皆様、そして北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの皆様から心から感謝致します。

利益相反

この研究の一部は, AMED の助成金(JP19k0305010)と日本学術振興会の科研費 (18H04049, 22H03063 : H.N) の助成を受けたものである。

引用文献

Abbotts, R., Topper, M. J., Biondi, C., Fontaine, D., Goswami, R., Stojanovic, L., Choi, E. Y., McLaughlin, L., Kogan, A. A., Xia, L., et al. (2019). DNA methyltransferase inhibitors induce a BRCAness phenotype that sensitizes NSCLC to PARP inhibitor and ionizing radiation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*, 22609-22618.

Abecasis, G. R., Auton, A., Brooks, L. D., DePristo, M. A., Durbin, R. M., Handsaker, R. E., Kang, H. M., Marth, G. T. and McVean, G. A. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes, *Nature*, *491*, 56-65.

Abou Tayoun, A. N., Pesaran, T., DiStefano, M. T., Oza, A., Rehm, H. L., Biesecker, L. G. and Harrison, S. M. (2018). Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion, *Hum Mutat*, *39*, 1517-1524.

Alexandrov, L. B., Kim, J., Haradhvala, N. J., Huang, M. N., Tian Ng, A. W., Wu, Y., Boot, A., Covington, K. R., Gordenin, D. A., Bergstrom, E. N., et al. (2020). The repertoire of mutational signatures in human cancer, *Nature*, *578*, 94-101.

Benson, A. B., D'Angelica, M. I., Abbott, D. E., Anaya, D. A., Anders, R., Are, C., Bachini, M., Borad, M., Brown, D., Burgoyne, A., et al. (2021). Hepatobiliary Cancers, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, *J Natl Compr Canc Netw*, *19*, 541-565.

Bertuccio, P., Malvezzi, M., Carioli, G., Hashim, D., Boffetta, P., El-Serag, H. B., La Vecchia, C. and Negri, E. (2019). Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma, *J Hepatol*, *71*, 104-114.

Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. (1999). *J Natl Cancer Inst*. *91*, 1310-1316.

Brosens, L. A., Keller, J. J., Offerhaus, G. J., Goggins, M. and Giardiello, F. M. (2005). Prevention and management of duodenal polyps in familial adenomatous polyposis, *Gut*, *54*, 1034-1043.

Buys, S. S., Sandbach, J. F., Gammon, A., Patel, G., Kidd, J., Brown, K. L., Sharma, L., Saam, J., Lancaster, J. and Daly, M. B. (2017). A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes, *Cancer*, *123*, 1721-1730.

Cameron, D. L., Jacobs, N., Roepman, P., Priestley, P., Cuppen, E. and Papenfuss, A. T. (2021). VIRUSBreakend: Viral Integration Recognition Using Single Breakends, *Bioinformatics*. *37*, 3115-3119

Cameron, D. L., Schröder, J., Penington, J. S., Do, H., Molania, R., Dobrovic, A., Speed, T. P. and Papenfuss, A. T. (2017). GRIDSS: sensitive and specific genomic rearrangement detection using positional de Bruijn graph assembly, *Genome Res*, *27*, 2050-2060.

Casolino, R., Paiella, S., Azzolina, D., Beer, P. A., Corbo, V., Lorenzoni, G., Gregori, D., Golan, T., Braconi, C., Froeling, F. E. M., et al. (2021). Homologous Recombination Deficiency in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Prevalence Meta-Analysis, *J Clin Oncol*, *39*, 2617-2631.

Coleman, R. L., Oza, A. M., Lorusso, D., Aghajanian, C., Oaknin, A., Dean, A., Colombo, N., Weberpals, J. I., Clamp, A., Scambia, G., et al. (2017). Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet*, *390*, 1949-1961.

de Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K. N., Sartor, O., Agarwal, N., Olmos, D., et al. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer, *N Engl J Med*, *382*, 2091-2102.

DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data, *Nat Genet*, *43*, 491-498.

Dinarvand, P., Davaro, E. P., Doan, J. V., Ising, M. E., Evans, N. R., Phillips, N. J., Lai,

J. and Guzman, M. A. (2019). Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations, *Arch Pathol Lab Med*, *143*, 1382-1398.

Ebata, N., Fujita, M., Sasagawa, S., Maejima, K., Okawa, Y., Hatanaka, Y., Mitsuhashi, T., Oosawa-Tatsuguchi, A., Tanaka, H., Miyano, S., et al. (2021). Molecular Classification and Tumor Microenvironment Characterization of Gallbladder Cancer by Comprehensive Genomic and Transcriptomic Analysis, *Cancers*, *13*. 733

Eckel, F., Brunner, T. and Jelic, S. (2011). Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann Oncol*, *22*, 40-44.

Fujimoto, A., Furuta, M., Shiraishi, Y., Gotoh, K., Kawakami, Y., Arihiro, K., Nakamura, T., Ueno, M., Ariizumi, S., Nguyen, H. H., et al. (2015). Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity, *Nat Commun*, *6*, 6120.

Fujimoto, A., Furuta, M., Totoki, Y., Tsunoda, T., Kato, M., Shiraishi, Y., Tanaka, H., Taniguchi, H., Kawakami, Y., Ueno, M., et al. (2016). Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer, *Nat Genet*, *48*, 500-509.

Golan, T., Raites-Gurevich, M., Kelley, R. K., Bocobo, A. G., Borgida, A., Shroff, R. T., Holter, S., Gallinger, S., Ahn, D. H., Aderka, D., et al. (2017). Overall Survival and Clinical Characteristics of BRCA-Associated Cholangiocarcinoma: A Multicenter Retrospective Study, *Oncologist*, *22*, 804-810.

Hirata, M., Kamatani, Y., Nagai, A., Kiyohara, Y., Ninomiya, T., Tamakoshi, A., Yamagata, Z., Kubo, M., Muto, K., Mushiroda, T., et al. (2017). Cross-sectional analysis of BioBank Japan clinical data: A large cohort of 200,000 patients with 47 common diseases, *J Epidemiol*, *27*, S9-S21.

Hoppe, M. M., Sundar, R., Tan, D. S. P. and Jeyasekharan, A. D. (2018) Biomarkers for Homologous Recombination Deficiency in Cancer, *J Natl Cancer Inst*, *110*, 704-713.

Knudsen, A. L., Bisgaard, M. L. and Bülow, S. (2003). Attenuated familial adenomatous

polyposis (AFAP). A review of the literature, *Fam Cancer*, 2, 43-55.

Koshiol, J., Gao, Y. T., Dean, M., Egner, P., Nepal, C., Jones, K., Wang, B., Rashid, A., Luo, W., Van Dyke, A. L., et al. (2017). Association of Aflatoxin and Gallbladder Cancer', *Gastroenterology*, 153, 488-494.e1.

Li, H. and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform, *Bioinformatics*, 25, 1754-1760.

Lin, J., Cao, Y., Yang, X., Li, G., Shi, Y., Wang, D., Long, J., Song, Y., Mao, J., Xie, F., et al. (2021). Mutational spectrum and precision oncology for biliary tract carcinoma, *Theranostics*, 11, 4585-4598.

Lord, C. J. and Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited, *Nat Rev Cancer*, 16, 110-120.

Maxwell, K. N., Wubbenhorst, B., Wenz, B. M., De Sloover, D., Pluta, J., Emery, L., Barrett, A., Kraya, A. A., Anastopoulos, I. N., Yu, S., et al. (2017). BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers, *Nat Commun*, 8, 319.

Maynard, H., Stadler, Z. K., Berger, M. F., Solit, D. B., Ly, M., Lowery, M. A., Mandelker, D., Zhang, L., Jordan, E., El Dika, I., et al. (2020). Germline alterations in patients with biliary tract cancers: A spectrum of significant and previously underappreciated findings, *Cancer*, 126, 1995-2002.

Miller, D. T., Lee, K., Chung, W. K., Gordon, A. S., Herman, G. E., Klein, T. E., Stewart, D. R., Amendola, L. M., Adelman, K., Bale, S. J., et al. (2021). ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), *Genet Med*, 23, 1381-1390.

Mizukami, K., Iwasaki, Y., Kawakami, E., Hirata, M., Kamatani, Y., Matsuda, K., Endo, M., Sugano, K., Yoshida, T., Murakami, Y., et al. (2020). Genetic characterization of pancreatic cancer patients and prediction of carrier status of germline pathogenic variants in cancer-predisposing genes, *EBioMedicine*, 60, 103033.

Momozawa, Y., Akiyama, M., Kamatani, Y., Arakawa, S., Yasuda, M., Yoshida, S., Oshima, Y., Mori, R., Tanaka, K., Mori, K., et al. (2016). Low-frequency coding variants in CETP and CFB are associated with susceptibility of exudative age-related macular degeneration in the Japanese population, *Hum Mol Genet*, *25*, 5027-5034.

Momozawa, Y., Iwasaki, Y., Hirata, M., Liu, X., Kamatani, Y., Takahashi, A., Sugano, K., Yoshida, T., Murakami, Y., Matsuda, K., et al. (2020). Germline Pathogenic Variants in 7636 Japanese Patients With Prostate Cancer and 12 366 Controls, *J Natl Cancer Inst*, *112*, 369-376.

Momozawa, Y., Iwasaki, Y., Parsons, M. T., Kamatani, Y., Takahashi, A., Tamura, C., Katagiri, T., Yoshida, T., Nakamura, S., Sugano, K., et al. (2018). Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls, *Nat Commun*, *9*, 4083.

Momozawa, Y., Sasai, R., Usui, Y., Shiraishi, K., Iwasaki, Y., Taniyama, Y., Parsons, M. T., Mizukami, K., Sekine, Y., Hirata, M., et al. (2022). Expansion of Cancer Risk Profile for BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants, *JAMA Oncol*, *8*, 871-878.

Nagai, A., Hirata, M., Kamatani, Y., Muto, K., Matsuda, K., Kiyohara, Y., Ninomiya, T., Tamakoshi, A., Yamagata, Z., Mushiroda, T., et al. (2017). Overview of the BioBank Japan Project: Study design and profile, *J Epidemiol*, *27*, S2-S8.

Nagase, H., Miyoshi, Y., Horii, A., Aoki, T., Ogawa, M., Utsunomiya, J., Baba, S., Sasazuki, T. and Nakamura, Y. (1992). Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients, *Cancer Res*, *52*, 4055-4057.

Nguyen, L., J. W. M. M., Van Hoeck, A. and Cuppen, E. (2020). Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency, *Nat Commun*, *11*, 5584.

Osorio, A., de la Hoya, M., Rodríguez-López, R., Martínez-Ramírez, A., Cazorla, A., Granizo, J. J., Esteller, M., Rivas, C., Caldés, T. and Benítez, J. (2002). Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial

breast cancer', *Int J Cancer*, 99, 305-309.

Palmer, W. C. and Patel, T. (2012). Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma, *J Hepatol*, 57, 69-76.

Park, W., Chen, J., Chou, J. F., Varghese, A. M., Yu, K. H., Wong, W., Capanu, M., Balachandran, V., McIntyre, C. A., El Dika, I., et al. (2020). Genomic Methods Identify Homologous Recombination Deficiency in Pancreas Adenocarcinoma and Optimize Treatment Selection', *Clin Cancer Res*, 26, 3239-3247.

Pearl, L. H., Schierz, A. C., Ward, S. E., Al-Lazikani, B. and Pearl, F. M. Therapeutic opportunities within the DNA damage response, *Nat Rev Cancer*, 15, 166-180.

Poell, J. B., Mendeville, M., Sie, D., Brink, A., Brakenhoff, R. H. and Ylstra, B. ACE: absolute copy number estimation from low-coverage whole-genome sequencing data, *Bioinformatics*, 35, 2847-2849.

Priestley, P., Baber, J., Lolkema, M. P., Steeghs, N., de Bruijn, E., Shale, C., Duyvesteyn, K., Haidari, S., van Hoeck, A., Onstenk, W., et al. (2019). Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours, *Nature*, 575, 210-216.

Ray-Coquard, I., Pautier, P., Pignata, S., Pérol, D., González-Martín, A., Berger, R., Fujiwara, K., Vergote, I., Colombo, N., Mäenpää, J., et al. (2019). Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer, *N Engl J Med*, 381, 2416-2428.

Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *Methods Mol Biol*, 132, 365-386.

Scheinin, I., Sie, D., Bengtsson, H., van de Wiel, M. A., Olshen, A. B., van Thuijl, H. F., van Essen, H. F., Eijk, P. P., Rustenburg, F., Meijer, G. A., et al. (2014). DNA copy number analysis of fresh and formalin-fixed specimens by shallow whole-genome sequencing with identification and exclusion of problematic regions in the genome assembly, *Genome Res*, 24, 2022-2032.

Telli, M. L., Jensen, K. C., Vinayak, S., Kurian, A. W., Lipson, J. A., Flaherty, P. J., Timms, K., Abkevich, V., Schackmann, E. A., Wapnir, I. L., et al. (2015). Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105, *J Clin Oncol*, *33*, 1895-1901.

Therkildsen, C., Jensen, L. H., Rasmussen, M. and Bernstein, I. (2021). An Update on Immune Checkpoint Therapy for the Treatment of Lynch Syndrome, *Clin Exp Gastroenterol*, *14*, 181-197.

Valle, J., Wasan, H., Palmer, D. H., Cunningham, D., Anthoney, A., Maraveyas, A., Madhusudan, S., Iveson, T., Hughes, S., Pereira, S. P., et al. (2010). Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer, *N Engl J Med*, *362*, 1273-1281.

van Wilpe S, Tolmeijer SH, Koornstra RHT, de Vries IJM, Gerritsen WR, Ligtenberg M, Mehra N. (2021). Homologous Recombination Repair Deficiency and Implications for Tumor Immunogenicity. *Cancers (Basel)*. *13*, 2249.

Wang, S., Li, H., Song, M., Tao, Z., Wu, T., He, Z., Zhao, X., Wu, K. and Liu, X. S. (2021). Copy number signature analysis tool and its application in prostate cancer reveals distinct mutational processes and clinical outcomes, *PLoS Genet*, *17*, e1009557.

Wardell, C. P., Fujita, M., Yamada, T., Simbolo, M., Fassan, M., Karlic, R., Polak, P., Kim, J., Hatanaka, Y., Maejima, K., et al. (2018). Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations, *J Hepatol*, *68*, 959-969.

Win, A. K., Lindor, N. M., Young, J. P., Macrae, F. A., Young, G. P., Williamson, E., Parry, S., Goldblatt, J., Lipton, L., Winship, I., et al. (2012). Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome, *J Natl Cancer Inst*, *104*, 1363-1372.

Wong, K., Serafi, S. W., Bhatia, A. S., Ibarra, I. and Allen, E. A. (2016). Melanoma with gastric metastases, *J Community Hosp Intern Med Perspect*. *6*, 31972.

Wong, W., Lowery, M. A., Berger, M. F., Kemel, Y., Taylor, B., Zehir, A., Srinivasan, P., Bandlamudi, C., Chou, J., Capanu, M., et al. (2019). Ampullary cancer: Evaluation of somatic and germline genetic alterations and association with clinical outcomes, *Cancer*, *125*, 1441-1448.