

Title	胆道癌における遺伝性腫瘍関連遺伝子バリアント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
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:2813
File Information	OKAWA_Yuki.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

胆道癌における遺伝性腫瘍関連遺伝子バリアントと 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アントと 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

発表	論	文	目	録	お	よ	び	学	슻	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

目次

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

- 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アントのスクリーニング 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
- 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
- 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

【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 ながると考えられる。

【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 ゲットシークエンスを行い,27のがん素因遺伝子の生殖細胞変異(APC, ATM, BARDI, BMPRIA, BRCAI, BRCA2, BRIPI, 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クエンスを行った。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 ムシークエ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】ターゲットシークエ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つの病原性バリアントが認められ 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)。乳癌の発癌に関与す 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 関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 は同程度の頻度で観察されたが, 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。全ゲノムシークエンスにより, 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, 相同組換え修復関連遺 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、相同組換え修復関連遺伝子とされる *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,相同組換え修復関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,相同組換え修復関連遺伝子 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関連することが示され た。これらの遺伝子に関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

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 *BRCA1, 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 *BRCA1/2* 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はいない(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 *BRCA1/2* 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 全ゲノムシークエンシングを行い, 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) ターゲットシークエンスによる生殖細胞変異解析。(右) 全ゲノムシークエンシン 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_o

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グイントロニック 領域における生殖細胞変異を Multiplex polymerase chain reaction (PCR)を用い たターゲットシークエ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 miner allele frequency > 0.01の既知のバリアントを避けるように設計された。2回目のPCR のためにフ オワードプライマーの5'末端に CGCTCTTCCGATCTCTG, リバースプライマー の5'末端に CGCTCTTCCGATCTGAC 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℃ 2 分, 95℃ 30 秒, 60℃ 90 秒, 72℃ 3 分の 25 サイクル, 72℃ 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 ACXXXXXXACA CTC TT TC CCTA CACGAC GCTCTTC CGATCTCTG-3' と 5'-CAAGCAGAA G ACGGCATACGAG ATxxxxxxGTGAC 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℃ 4 秒,98℃15秒,65℃30秒,72℃1分の4サイクルで,その後72℃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回のシークエンスにプール 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。シークエンスリード は Burrows-Wheeler Aligner を用いてレファレンスゲノム(hg19) にアライメン \vdash U(Li and Durbin, 2009), Genome Analysis Toolkit \mathcal{O} UnifiedGenotyper \succeq 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、すべてのバリアントの臨床的意義(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アントとした。

胆道癌腫瘍組織に対する全ゲノムシークエ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 ゲノムシークエ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 でに解析された 36 症例の腫瘍および正常組織サンプルの全ゲノムシークエン 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クエンシン 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。全ゲノムシークエンスライブラリは、 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クエンシングラ イブラリを HiSeq2500 (Illumina)で、17 サンプルの全ゲノムシークエンシングラ イブラリを NovaSeq (Illumina)によってシークエンスを行い、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, 全ゲノムシークエンシン 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)。

全ゲノムシークエ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 を用いてシークエ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 一数を計算した。

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 のバリアントコーラー 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。

構造バリアント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。LINX 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。

	BTC c	ase	Control							
	N=12	92	N=37583							
	No. of cases	No of NA	No. of controls							
	(%)	NO. OI NA	(%)							
Mean age at diagnosis, y	(0, 2) $((4, 7))$	0	(2(54,72))							
(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)							

表1 生殖細胞変異解析の症例の臨床情報

24 (2.4)	301	0 (0)
60 (6.1)	301	0 (0)
113 (11.4)	301	0 (0)
36 (3.6)	301	0 (0)
61 (6.2)	301	0 (0)
15 (1.5)	301	0 (0)
15 (1.5)	301	0 (0)
8 (0.8)	301	0 (0)
8 (0.8)	301	0 (0)
292 (33.8)	427	_
18 (3.1)	714	_
	232	
199 (18.8)		_
219 (20.7)		_
569 (53.7)		_
73 (6.9)		_
	24 (2.4) $60 (6.1)$ $113 (11.4)$ $36 (3.6)$ $61 (6.2)$ $15 (1.5)$ $15 (1.5)$ $8 (0.8)$ $8 (0.8)$ $292 (33.8)$ $18 (3.1)$ $199 (18.8)$ $219 (20.7)$ $569 (53.7)$ $73 (6.9)$	$\begin{array}{ccccccc} 24 & (2.4) & 301 \\ 60 & (6.1) & 301 \\ 113 & (11.4) & 301 \\ 36 & (3.6) & 301 \\ 61 & (6.2) & 301 \\ 15 & (1.5) & 301 \\ 15 & (1.5) & 301 \\ 8 & (0.8) & 301 \\ 8 & (0.8) & 301 \\ 8 & (0.8) & 301 \\ \end{array}$

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クエンシングにより,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原性 (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× 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 × 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)。

	No. of	Case	Control				
Cono	INO. 01	No. of	No. of	D	OP	05% CI	
Gene	pathogenic	carriers	carriers	Γ	UK	9370 CI	
	variants	(%)	(%)				
BRCA1	23	13 (1.01)	28 (0.08)	4.213X 10 ⁻¹⁰	13.6	(6.5–27.3)	
BRCA2	41	14 (1.08)	63 (0.17)	2.225 X 10 ⁻⁷	6.5	(3.4–11.8)	
APC	9	5 (0.39)	8 (0.02)	4.143 X 10 ⁻⁵	18.2	(4.7–63.3)	
MSH6	23	7 (0.54)	39 (0.1)	7.591 X 10 ⁻⁴	5.2	(2–11.9)	
PALB2	17	4 (0.31)	22 (0.06)	0.01	5.3	(1.3–15.6)	
CDK4	1	2 (0.16)	4 (0.01)	0.015	14.6	(1.3– 101.8)	
ATM	41	6 (0.46)	59 (0.16)	0.021	3	(1–6.9)	
BARD1	13	3 (0.23)	15 (0.04)	0.021	5.8	(1.1–20.6)	
MLH1	5	2 (0.16)	5 (0.01)	0.021	11.6	(1.1–71.2)	
MSH2	8	2 (0.16)	6 (0.02)	0.027	9.7	(1–54.4)	
BRIP1	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)	
NF1	19	2 (0.16)	17 (0.05)	0.13	3.4	(0.4–14.5)	
NBN	12	1 (0.08)	14 (0.04)	0.398	2.1	(0–13.7)	

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

19

PMS2	6	1 (0.08)	16 (0.04)	0.437	1.8	(0–11.7)
RAD51D	7	3 (0.23)	60 (0.16)	0.468	1.5	(0.3–4.5)
CHEK2	14	0 (0)	37 (0.1)	0.636	0	(0–3.1)
MUTYH	11	2 (0.16)	53 (0.14)	0.705	1.1	(0.1–4.2)
PTEN	8	0 (0)	8 (0.02)	1	0	(0–17.1)
EPCAM	7	0 (0)	7 (0.02)	1	0	(0–20.2)
RAD51C	7	0 (0)	10 (0.03)	1	0	(0–13)
HOXB13	4	0 (0)	5 (0.01)	1	0	(0–31.8)
CDH1	3	0 (0)	5 (0.01)	1	0	(0–31.8)
SMAD4	2	0 (0)	3 (0.01)	1	0	(0-70.4)
STK11	2	0 (0)	2 (0.01)	1	0	(0–155)
BMPR1A	1	0 (0)	1 (0)	1	0	(0– 1114.7)
CDKN2A	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 miner 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)。

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

表3 胆道癌と対照者における VUS の比較

HOXB13	29	9 (0.7)	164 (0.44)	0.194	1.6	(0.7–3.1)
MSH2	128	11 (0.85)	479 (1.28)	0.205	0.7	(0.3–1.2)
PMS2	54	2 (0.16)	151 (0.4)	0.252	0.4	(0–1.4)
PALB2	121	19 (1.47)	426 (1.13)	0.284	1.3	(0.8–2.1)
STK11	56	6 (0.46)	121 (0.32)	0.321	1.4	(0.5–3.2)
CHEK2	60	15 (1.16)	343 (0.91)	0.371	1.3	(0.7–2.1)
PTEN	30	1 (0.08)	92 (0.25)	0.378	0.3	(0–1.8)
APC	345	30 (2.32)	1025 (2.73)	0.433	0.8	(0.6–1.2)
MLH1	103	8 (0.62)	328 (0.87)	0.442	0.7	(0.3–1.4)
RAD51D	47	3 (0.23)	147 (0.39)	0.495	0.6	(0.1 - 1.8)
BRIP1	103	10 (0.77)	366 (0.97)	0.564	0.8	(0.4–1.5)
TP53	41	6 (0.46)	151 (0.4)	0.653	1.2	(0.4–2.6)
NF1	200	14 (1.08)	469 (1.25)	0.702	0.9	(0.5–1.5)
MUTYH	74	6 (0.46)	228 (0.61)	0.713	0.8	(0.3–1.7)
MSH6	233	29 (2.25)	799 (2.13)	0.768	1.1	(0.7–1.5)
BMPR1A	50	4 (0.31)	109 (0.29)	0.791	1.1	(0.3–2.8)
CDKN2A	38	4 (0.31)	159 (0.42)	0.824	0.7	(0.2–1.9)
BRCAI	166	16 (1.24)	492 (1.31)	1	0.9	(0.5–1.6)
BARDI	104	7 (0.54)	231 (0.62)	1	0.9	(0.4–1.9)
CDH1	94	9 (0.7)	284 (0.76)	1	0.9	(0.4–1.8)
NBN	69	4 (0.31)	126 (0.34)	1	0.9	(0.2–2.4)
RAD51C	50	6 (0.46)	184 (0.49)	1	0.9	(0.3–2.1)
EPCAM	47	3 (0.23)	101 (0.27)	1	0.9	(0.2–2.6)
CDK4	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。

	Pathogenic				
	variant	Non-carriers	р	OR	95% CI
	carriers	N = 1,221	1	OK	9570 CI
	N = 71				
Mean age at diagnosis,	66.9	69.3			
y (IQR1–IQR3)	(60.5–73.5)	(64–76)	0.038		
	47	812			
Male	(66.2)	(66.9)	0.897	1	(0.6–1.6)
Personal cancer					
history					
	0	11			
Lung cancer	(0)	(1.1)	1	0	(0-6.3)
	0	6			
Esophageal cancer	(0)	(0.6)	1	0	(0-12.1)
	5	39			
Gastric cancer	(8.3)	(3.9)	0.095	2.3	(0.8–6.1)
	5	33			
Colorectal cancer	(8.3)	(3.3)	0.057	2.7	(1-6.9)
Hepatocellular		52			
carcinoma	4 (6.7)	(5.2)	0.55	1.3	(0.4–3.8)
	0	6			
Pancreatic cancer	(0)	(0.6)	1	0	(0-12.1)
	3	24			
Prostate cancer	(5)	(2.4)	0.19	2.2	(0.5–7.1)
	3	9			
Breast cancer	(5)	(0.9)	0.026	5.8	(1.3–22.1)
	1	5			
Cervical cancer	(1.7)	(0.5)	0.294	3.4	(0.1–25.2)
	1	4			
Endometrial cancer	(1.7)	(0.4)	0.252	4.2	(0.2–33.1)
	1	2			
Ovarian cancer	(1.7)	(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)

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

	(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	5	75			
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	22	270			
metastasis	(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7BTC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

3

4

(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。

6

Time (year)

5

7

8

9

10

11

12

Α

0.2

0.0

0

1

2

Overall survival: Hokkaido University

胆道癌腫瘍組織の HRD 解析

BRCA1/2 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クエンシングを行った。シークエンスし 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 PURLE 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 log2(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)。

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

表 5 HRD	解析を行っ	た胆道癌 45	症例の臨	床情報
---------	-------	---------	------	-----

RK137	74	F	ICC	_	_	0.5
RK138	75	F	ICC	gastric	_	0.32
RK142	57	М	ICC	_	1 hepatocellular	0.22
RK182	65	М	ICC	_	_	0.5
RK194	67	Μ	ICC	_	—	0.61
RK204	83	М	ICC	hepatocellular	_	0.36
RK208	60	М	ICC	esophageal, colorectal	_	0.22
RK226	59	М	ICC	_	_	0.16
RK269	74	Μ	ICC	colorectal	_	0.16
RK272	78	F	ICC	_	_	0.8
RK298	68	Μ	ICC	_	_	0.3
RK303	76	Μ	ICC	_	_	0.18
RK312	66	М	ICC	_	_	0.81
RK316	54	F	ICC	_	_	0.2
RK317	73	М	ICC	_	_	0.14
RK560	51	Μ	GBC	_	1 gastric	0.19
RK567	75	М	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, *BRCA1*: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 (*BRCA1*: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。

ID	Gene	Clinical significance	Annotation	HGVS.c	HGVS.p	
HK110	ATM	Pathogenic	frameshift	c.7886_7890	p.Ile2629fs	
		C	variant	delTATTA	-	
			frameshift	c.3731 3734		
HK09	BRCA1	Pathogenic	variant&stop	_ dupATAG	p.Ser1245fs	
			gained	1		
HK20	BRCA2	Pathogenic	frameshift	c.9097dupA	p.Thr3033fs	
		6	variant	1	1	
			splice region			
CHK005	BRCA2	Pathogenic	variant&synon	c.9117G>A	p.Pro3039Pro	
			ymous variant			
BHK59	BRCA2	Pathogenic	stop gained	c.9076C>T	p.Gln3026*	
RK 567	RRIP1	Pathogenic	missense	c 1045G>T	n Ala349Ser	
iiii07	Ditti i	i unogenie	variant	0.1010001		
BHK072	PALR2	Pathogenic	frameshift	c.1671_1674	n Ile558fs	
DIIRO72	1 ALD2	Tuniogenie	variant	delTATT	p.11022015	
HK 95	RRC 41	VUS	missense	c 418A>G	n Ser140Glv	
1110/0	Diteili	100	variant		pierriediy	
HK 98	RRC 41	VUS	missense	c 2486T>G	n Phe829Cvs	
iiii)	DRCIII	105	variant	0.21001/ 0	p.i iico2) Cys	
HK 59	RRC 42	VUS	missense	c 4195T>C	p.Cys1399Ar	
THC /	DRC112	000	variant	0.4195120	g	
HK 8/	CHEK?	VUS	missense	$c_{1324G>A}$	n Və144211e	
111104	CHER2	V 05	variant	0.152+0-A	p. v a144211e	
нкол	PAIR	VUS	missense	c 3796C>T	p.Thr1099Me	
1111.74	I ALD2	V05	variant	0.52700-1	t	
CHK008	ΡΛΙΒΊ	VUS	missense	c 2560A>C	n Asn85/His	
	I ALD2	100	variant	0.2300A-C	P.73110341115	
HK 100	RAD51	VUS	missense	с ? З?С>Т	n Ala78Ser	
11111100	D	00	variant	V.2J2UZ I	p.7.10/0501	

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

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 はタンデム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 全ゲノムシークエ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原性生殖細胞変異や 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.

Clinical	HRD related ge	ermline variants	CHC	ORD results	sults			
information								
ID	Gene	Clinical	HRD	HRD	HRD			
	Gene	significance	probability	status	type			
HK110	ATM	Pathogenic	0.008	HRP	-			
HK09	BRCA1	Pathogenic	0	HRP	_			
			0.702		BRCA2			
HK20	BRCA2	Pathogenic	0.792	HRD	type			
CHK005	BRCA2	Pathogenic	0	HRP	_			
BHK 59	BRC42	Pathogenic	0 758	HRD	BRCA2			
DIIK	DRCHZ	Tutilogenie	0.750	Inc	type			
RK 567	RRIP1	Pathogenic	0	HRP	_			
KK507	DNIF I	Famogenic	0	ПКГ				
DIMAGO	-		~ ~ ~ /		BRCA2			
BHK072	PALB2	Pathogenic	0.754	HRD	type			
HK95	BRCA1	VUS	0	HRP	_			
HK98	BRCA1	VUS	0	HRP	_			
HK59	BRCA2	VUS	0.002	HRP	_			
HK84	CHEK2	VUS	0	HRP	_			
HK94	PALB2	VUS	0.002	HRP	_			
CHK008	PALB2	VUS	0.016	HRP	_			
HK100	RAD51D	VUS	0.004	HRP	—			
HK01	Non-Carrier	_	0	HRP	_			
HK108	Non-Carrier	_	0.024	HRP	_			
HK 122	Non-Carrier	_	0.776	HRD	BRCA2			
1111122					type			
HK139	Non-Carrier	—	0.002	HRP	_			
HK154	Non-Carrier	—	0.022	HRP	_			
HK157	Non-Carrier	—	0.002	HRP	—			

表 7	機械学習バ	ペプライン	CHORD による	HRD 判定結果
-----	-------	-------	-----------	----------

	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	BRCA2 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	BRCA2
					type
RK182	Non-Carrier	—	0	HRP	—
RK182 RK194	Non-Carrier Non-Carrier	_	0 0	HRP HRP	_
RK182 RK194 RK204	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0	HRP HRP HRP	-
RK182 RK194 RK204 RK208	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0	HRP HRP HRP HRP	_ _ _
RK182 RK194 RK204 RK208 RK226	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0 0.014	HRP HRP HRP HRP HRP	_ _ _ _
RK182 RK194 RK204 RK208 RK226 RK269	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0.014 0	HRP HRP HRP HRP HRP HRP	- - - -
RK182 RK194 RK204 RK208 RK226 RK269 RK272	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0.014 0 0	HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP	_ _ _ _ _
RK182 RK194 RK204 RK208 RK226 RK269 RK272 RK298	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0 0.014 0 0 0 0.096	HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP	
RK182 RK194 RK204 RK208 RK226 RK269 RK272 RK298 RK303	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0.014 0 0 0.096 0	HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP	
RK182 RK194 RK204 RK208 RK226 RK269 RK272 RK298 RK303 RK312	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0.014 0 0 0.096 0 0	HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP	
RK182 RK194 RK204 RK208 RK226 RK269 RK272 RK298 RK303 RK312 RK316	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0.014 0 0 0.096 0 0 0 0	HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP	
RK182 RK194 RK204 RK208 RK226 RK269 RK272 RK298 RK303 RK312 RK316 RK317	Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier Non-Carrier		0 0 0 0 0.014 0 0 0.096 0 0 0 0 0 0.026	HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP HRP 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 $_{\circ}$

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 *BRCA2* 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。 (A) (B) Summary of HRD case: BHK59 61-year-old male Patient Germline variant (p.Gln3026*) Somatic mutation (p.Asn1544Lys) **BRCA2** variants Loss of heterozygosity Diagnosis Perihilar cholangiocarcinoma **Cancer history** None 2 biliary tract cancers, 2 gastric cancers, Family cancer history colorectal cancer, pancreatic cancer



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クエンスにより、*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ーシス(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 ムシークエンシングでは, 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クエ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クエ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も、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 皆様に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(JP19kk0305010)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 functionPVS1 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., Raitses-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.