

博士論文

**BRCAness** に基づく  
遺伝性乳がん原因遺伝子の  
病原性変異評価法の開発

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻  
がん生命科学講座がん治療内科学分野  
吉田玲子

## 1. 要約

背景: 遺伝性乳がん卵巣がん (Hereditary breast and ovarian cancer: HBOC) 症候群の多くは相同組換え (Homologous recombination: HR) 経路に関わる遺伝子の生殖細胞系列の病的変異が原因であり、相同組換え修復不全 (Homologous recombination deficiency: HRD) を伴う腫瘍を発生する。これらの腫瘍に見られる特徴的なゲノムの変化と臨床病理学的所見は、BRCAness と呼ばれている。近年のゲノム解析技術の進歩により一度に多くの遺伝子の検査が可能となり、HBOC 原因遺伝子の病的意義が不明な変異 (Variant of uncertain significance: VUS) が多く検出され、それらをどう扱うかが大きな課題となっている。そこで本研究では、腫瘍の「表現型」である BRCAness に基づいて VUS の病原性を判定する手法の開発を考えた。

方法: 自施設の新鮮凍結保存の乳がん組織と正常組織をペアに持つ 175 検体に対して全エクソーム解析を行い、このうち 69 検体のゲノム情報を用いて、BRCAness を予測する統計モデルを機械学習法 (Lasso logistic regression: ラッソロジスティック回帰) により開発した。大規模がんゲノム情報 The Cancer Genome Atlas (TCGA) に公開されている乳がん組織と正常組織のペア 421 検体の全エクソーム解析データから 113 検体を用いてモデルの精度検証を行った。残りの 413 検体に対し BRCAness 予測値と、臨床病理学的な特徴を用いて VUS

の再判定を行った。

結果：*BRCA1/2* 両アレル機能消失腫瘍と HR 関連遺伝子に異常がない腫瘍に対する BRCAness 予測モデルの正答率は、95.8%であった。TCGA 検体で精度検証を行った正答率は 86.7%であり、十分な精度と汎用性を備えていることが検証できた。本研究の解析で検出された HR 関連遺伝子の 269 種類の VUS に対し、BRCAness モデルの予測値と、臨床病理学的な特徴を利用した結果、5 種類の潜在的病原性変異、35 種類の潜在的良性変異を判定した。これらのうち、症例対照研究法や機能解析法の既報の解釈と照合し、最終的に 1 種類の病的変異疑いと、5 種類の良性疑いの VUS の病原性を再判定することができた。

結論：HR 関連 HBOC 原因遺伝子の VUS の再評価に、BRCAness を利用した方法は、従来の症例対照研究法や機能解析法と共に、バリエントの病原性判定に有用である。

## 2. 研究背景

遺伝性乳がん卵巣がん (Hereditary breast and ovarian cancer: HBOC) 症候群は、高浸透率の *BRCA1*、*BRCA2*、*PALB2* や中浸透率の *CHEK2*、*ATM*、*BARD1*、*RAD51C*、乳がんに限らず多彩な遺伝性腫瘍症候群を呈する *TP53*、*CDH1*、*NF1* などの常染色体優性遺伝形式をとる遺伝子の生殖細胞系列の病的

変異により生じる<sup>1</sup>。近年の次世代シーケンス技術の進歩により、複数の原因遺伝子を一度に調べることができる多遺伝子パネル検査（Multi-Ganem Panel testing: MGP）が普及してきているが<sup>2</sup>、遺伝子検査数の増加に伴い、病原性の意義が不明なバリエーション（Variant of uncertain significance: VUS）が数多く報告されている。VUS は、乳がんの術式選択、PARP 阻害剤などの薬剤投与、放射線療法、予防的外科切除、化学予防、サーベイランス方法などの適切な医学的管理を決定することが困難であるため<sup>3</sup>、VUS の病原性を正しく評価するための手法を開発することは喫緊の課題である。

HBOC 症候群の原因遺伝子の多くは、DNA 二本鎖切断を修復する相同組換え（Homologous recombination: HR）修復経路に関与していることが知られている。セカンドヒットとして体細胞にタンパク合成が途中で中断される追加の変異（Additional somatic truncation: AST）またはヘテロ接合性の消失（Loss of heterozygosity: LOH）が生じ、野生型対立遺伝子（アレル）が不活性化されることで HR 関連遺伝子の機能が完全に消失し<sup>4</sup>、相同組換え修復不全（Homologous recombination deficiency: HRD）を引き起こす。HRD は特徴的な染色体再構成の増加やヌクレオチド置換を呈することが報告されており<sup>5,6,7,8</sup>、*BRCA1* または *BRCA2* が原因で生じる腫瘍の表現型と類似しているものは、‘BRCAness’ と呼ばれ<sup>9,10,11</sup>、PARP 阻害剤やプラチナ製剤の薬剤感受性を予

測する指標（バイオマーカー）となる可能性が示唆されている<sup>12</sup>。これまでに、腫瘍のゲノムの特徴に基づいた BRCAness の分類器は複数報告されている。その代表的なものとしては、*BRCA1* 変異腫瘍と同様なゲノムのコピー数変異（Copy number variant: CNV）パターン<sup>13</sup>、中間サイズの LOH 数（HRD-LOH）<sup>14</sup>、サブテロメア領域のアレル不均衡数（HRD-NtAI）<sup>15</sup>、大規模な染色体再構成数（HRD-LST）<sup>16</sup>、HRD-LOH/HRD-NtAI/HRD-LST の総和（HRD score）<sup>17</sup>、COSMIC 変異シグネチャー分類のシグネチャー #3 の割合<sup>18</sup>、*BRCA1* または *BRCA2* の LOH 状態<sup>19</sup>、全ゲノム解析によって検出された複数のゲノム変数からなる統計モデル（HRDetect）<sup>7</sup> などがある。HRD score は乳がんに対してはプラチナ製剤の効果予測、卵巣がんに対しては PARP 阻害剤の効果予測に有効であることが報告されている<sup>20,21,22,23</sup>。HR 関連遺伝子と BRCAness の相関を考慮すると、遺伝子の病原性変異の評価に腫瘍の BRCAness の判定が有用である可能性があり、これまでの研究では *BRCA1/2* の VUS に対しては潜在的な有用性が示唆されている報告もある<sup>7,18</sup>。しかし、*BRCA1/2* 以外の HBOC 原因遺伝子の VUS に対して変異の病原性再評価に BRCAness が利用できるかどうかは、まだ解明されていない。

本研究では、自施設の乳がん組織および正常組織のペア検体に対し全エクソーム解析を行い、得られた 116 のゲノム変数から BRCAness を推定するための

統計モデルを開発した。さらに独立したコホートとして TCGA より取得した乳がん組織および正常組織のペア検体のデータを使用して、モデルの精度と汎用性を検証した。このモデルと臨床病理学的特徴を利用して 21 種類の HR 関連の HBOC 原因遺伝子 (HBOC-HR 遺伝子) に検出された 269 種類の VUS の病原性について再評価したところ、病原性を疑う 1 種類のバリエント、良性を疑う 5 種類のバリエントを判別することができた。本研究で開発された BRCAness モデルは、VUS の再分類法の 1 つとして有用である可能性があり、病原性を予測することで HBOC 患者の医療に貢献することが期待できる。

### 3. 研究目的

HR 関連遺伝子の遺伝型と表現型 (BRCAness) の相関を利用した病原性変異評価法 (BRCAness モデル) を開発し、VUS と判定されたバリエントの病原性の再評価を行うことを目的とする。

### 4. 研究デザイン

HBOC 乳がんの腫瘍形成過程を示す (図 1)。HBOC-HR 遺伝子の生殖細胞系変異がある細胞に、野生型対立アレルに LOH または AST による 2 番目のヒットが生じ、当該遺伝子の機能が不活性化され<sup>24</sup>、HRD となり<sup>11</sup>、BRCAness

と呼ばれる特徴的なゲノムの変化と、臨床病理学的所見<sup>11</sup>を示す。LOH または AST を伴う *BRCA1/2* を含む HBOC-HR 遺伝子の 1 つに病的変異があることは、BRCAness およびその臨床病理学的特徴と密接に関連しており、その逆も同様であると考えられる。VUS 症例の腫瘍にみられる BRCAness と臨床病理学的特徴から、その VUS の病原性を病的変異または良性に再分類できるかを検討する。

## 5. 研究戦略

図 2 で研究の戦略を示す。最初に自施設(がん研究会 Japanese Foundation for Cancer Research: JFCR) で解析した全エクソームデータを使用して、*BRCA1/2* 両アレル機能消失 (Biallelic loss of function: BAL) : 陽性コントロールのゲノムの特徴と、HBOC-HR 遺伝子のゲノムまたはエピジェネティックな変化であるメチル化(*BRCA1* かつ *RAD51C*)に変化がない: 陰性コントロールのゲノムの特徴を比較し、ラッソロジスティック回帰の機械学習法を用いて BRCAness モデルを構築する【トレーニングステップ】。次に、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の全エクソームデータの陽性コントロールと陰性コントロールで精度検証を行い、最終モデルを決定する【バリデーションステップ】。3 番目に、JFCR と TCGA の陽性・陰性コントロール以外のその他の検体に対

し、構築したモデルで **BRCAness** の予測を行う。これらの検体に認められた **VUS** の病原性について、**BRCAness** 予測値と臨床病理学的所見を照合し、潜在的病的変異疑いと、潜在的良性変異疑いのバリエント候補を検出する。最終的に、これらの候補の変異のうち、既報の機能アッセイや症例対照研究の結果を参照し、病的変異疑い、良性疑いに **VUS** を再分類する。

## 6. 方法

本研究は、①**JFCR** の新鮮凍結保存検体の乳がんと正常組織のペア 175 検体に全エクソーム解析を行い、このうち陽性コントロールと陰性コントロールである 69 検体のゲノム情報を用いて機械学習法により **BRCAness** の統計モデルを開発し、②**TCGA** の乳がんと正常ペア 421 検体の全エクソーム解析データを用いて、陽性コントロールと陰性コントロールである 113 検体のゲノム情報を用いてモデルの精度・汎用性の検証を行い、③残りの 413 検体に対し **HR** 関連の **HBOC** 原因遺伝子の **VUS** に本モデルを適用し、病原性の再評価を行った。

### 6.1. インフォームドコンセント

本研究では、乳がんと正常組織ペア 175 検体（171 人の患者から）に **NGS** で全エクソーム解析を行った。171 人の患者全員が、がん研究会がん研有明病院



で外科手術を受け、書面によるインフォームドコンセントを提供されている。  
がん研究会の倫理委員会から承認を得ている（承認番号 2015-1001, 2016-1098）。

## 6.2. モデル開発の陽性コントロール、陰性コントロールの定義

乳がん新鮮凍結保存検体で、生殖細胞系列 *BRCA 1* または *BRCA 2* に病的変異があり、かつ腫瘍で LOH または AST により *BRCA1/2* の両アレルの機能が消失しているものを陽性コントロール (*BRCA1/2* BAL)、生殖細胞系列かつ体細胞系列で *BRCA1/2* を含む HR 関連遺伝子に変異や *BRCA1* または *RAD51C* のメチル化が検出されなかったものを陰性コントロール (HR quiescent) とする (図 3)。陽性でも陰性でもないその他の検体は、HBOC-HR 遺伝子に少なくとも 1 つ以上の生殖細胞系列または体細胞系列の遺伝子に変異を持つかメチル化変化を持つ検体である。

## 6.3. モデル構築のトレーニングデータ

JFCR の乳がん新鮮凍結保存検体と正常組織（血液も含む）のペア検体で、陽性コントロール 32 検体、陰性コントロール 37 検体を使用した。

## 6.4. モデルの精度検証（バリデーション）データ

TCGA の乳がん新鮮凍結検体と正常組織のペア検体で、陽性コントロール 18 検体、陰性コントロール 95 検体を使用した。

#### 6.5. シーケンスのサンプル準備

新鮮凍結検体は厚さ  $10\ \mu\text{m}$  に切り出しし、針を使った腫瘍部分の回収または、ヘマトキシリン染色した切片を LMD7000 (ライカ) を使い腫瘍部分を選択し回収を行った。血液および組織からの DNA は、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) および QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) を使用して抽出した。

DNA の純度と量は NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) と Qubit 2.0 蛍光光度計 (Thermo Fisher Scientific) で測定した。DNA 純度 (光学密度  $260/280\ \text{nm} > 1.8$ )、dsDNA / ssDNA 濃度の比 ( $> 0.35$ )、および dsDNA 濃度 ( $> 50\ \text{ng} / \mu\text{l}$ ) の基準に合格した DNA サンプルに、全エクソーム解析を行った。

#### 6.6. ライブラリー調整と全エクソーム解析

DNA に切断、末端修復、バーコード化アダプターのリン酸化およびライゲーションを行い、エクソーム用の SureSelect Human All Exon V5 とのハイブリッドキャプチャーにより回収し、HiSeq2500 または 2000 (イルミナ) で塩基

配列を決定した。

## 6.7. The Cancer Genome Atlas (TCGA) データの取得

乳がん組織と正常組織のペア 735 検体の BAM 形式の全エクソームデータは、Genomic Data Commons Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) から入手した。リファレンスヒトゲノム hg38 に配置された BAM データを、bedtools (ver.2.16.2) を使用して FASTQ に転換し、hg19 に再配置を行った。その後、後述する生殖細胞および体細胞の変異検出を行った。TCGA 乳がんの臨床病理学的情報は、Genomic Data Commons Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) から取得した。

## 6.8. 全ゲノム増幅 (Whole genome amplification: WGA) 処理検体

TCGA 検体は、全ゲノム増幅 (Whole genome amplification: WGA) 処理を行っているものが含まれていた。このうち、腫瘍または/かつ正常組織で WGA 処理を行っている検体をトレーニングデータから除いた (後述)。

## 6.9. HBOC-HR 遺伝子

HRD を評価する対象遺伝子として、*ATM*、*BARD1*、*BLM*、*BRCA1*、*BRCA2*、

*BRIP1*, *CHEK2*, *FAM175A*, *FANCC*, *FANCM*, *MRE11A*, *NBN*, *PALB2*,  
*PTEN*, *RAD50*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RECQL*, *RINT1*, *XRCC2*  
の 21 遺伝子を選択した。これらの遺伝子は HBOC の原因となることが知られており<sup>1,25</sup>、HR 経路に関連している<sup>26,27</sup>。本研究では、これを HBOC-HR 遺伝子と名付けた。

#### 6.10. 生殖細胞変異の情報解析

DNA の塩基配列が決定されたリードを、BWA (Burrows-Wheeler Aligner; ver. 0.6.1) を使用して、ヒト参照ゲノム (hg19) に配置した<sup>28</sup>。バリアントの品質スコアを再調整し、局所的な再調整を行うために GATK (GenomeAnalysisTK; ver. 3.4-46) を使用した<sup>29</sup>。生殖細胞系列変異は GATK UnifiedGenotyper と HaplotypeCaller (GATK ver. 3.4-0)<sup>30</sup> で検出され、両方のソフトウェアで検出された場合、信頼できる変異検出と判定した。

生殖細胞変異の条件は以下のものを採用した。1) エクソン翻訳領域の一塩基置換 (Single nucleotide variants: SNV)、インフレーム (3 の倍数の欠失や挿入) 変異、フレームシフトを起こす挿入欠失 (insertion and deletion: indel)、スプライシング異常を起こす変異 (エクソン-イントロン境界領域±2 bp)、2) 読み取り深度が 20 以上のバリアント、3) 読み取り頻度が 0.2 以上のバリアン

ト、4) ExAC (TCGA データを削除した Exome Aggregation Consortium ver. 0.3.1) または NHLBI Exome Sequencing プロジェクト (ESP6500; ver. ESP6500SI-V2) または 1000 ゲノムプロジェクト (3 版) で、集団の中のマイナーアレル頻度 (MAF) スコアが 0.01 未満のバリエーション。MAF は人種による違いについて、ヒト遺伝子変異データベース : HGVD (Human Genetic Variation Database; ver. 1.42) 、東北メディカル・メガバンク統合データ TMM (Tohoku Medical Megabank Project; hum0015.ver. 1)<sup>31</sup>、ExAC の東アジア人のデータを統合し確認して判定した。生殖細胞系列コピー数異常バリエーション (copy number variant: CNV) は、eXome-Hidden Markov Model (XHMM; ver. 1.0)<sup>32</sup> で検出した。

#### 6.11. 生殖細胞系列変異の病原性判定

ACMG-AMP のバリエーション病原性判定ガイドライン<sup>33</sup> は、各バリエーションに対して、(i)集団リファレンスデータベースにおけるマイナーアレル頻度、(ii) 変異のパターン、(iii)変異有害予測ツールの結果、(iv)In-frame INDEL の繰り返し配列との関係、(v)疾患バリエーションデータベース(NCBI による ClinVar : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> と HGMD)における変異の記述、(vi)データベースに紐づけられた文献の記載に基づく分類により 307 通りのコード分

類を行い、次にこのコードの組み合わせにより、5つ、すなわち病的変異/病的変異疑い/VUS/良性変異疑い/良性変異、に最初の変異判定 (raw call) を行った後、表現型、病気 (疾患、症候群) のスペクトラム評価、遺伝子座特異的データベース等の情報を加え最終の変異判定 (final call) とすることが推奨されている。本研究では自施設でガイドラインに従った判定経路 (パイプライン) を作成し病原性判定を行った<sup>34</sup>。

#### 6.12. 疾患バリエーションデータベース

既に報告されているバリエーションの解釈と参考文献などの追加情報は、Human Gene Mutation Database (HGMD; ver. 2017.2) と ClinVar (4 / May / 2017) から入手し、パイプラインで使用した。

#### 6.13. 体細胞変異解析 SNV / indel / CNV

SNV は、VarScan (ver. 2.3.7)<sup>35</sup>、MuTect (ver.1.1.4)<sup>36</sup>、および Karkinos (ver. 3.0.22) [<http://sourceforge.net/projects/karkinos/>] で検出した。Indel は VarScan (ver. 2.3.7)、SomaticIndelDetector (ver. 1.5-30)<sup>36</sup>、および Karkinos (ver. 3.0.22) を使用して検出した。SNV と indel は、3つのソフトウェアのうち2つ以上で検出された場合、信頼できる変異と判定した。COSMIC 変異シ

グネチャー<sup>37</sup>（後述）は、既報に従って<sup>38,39</sup>、各検体の塩基置換のトリヌクレオチド頻度から計算した。

体細胞 CNV は、EXCAVATOR (ver. 2.2)<sup>40</sup> または Sequenza (ver. 2.2.0)<sup>41</sup> により遺伝子ごとの CNV 変異を検出した。生殖細胞系列 SNV/indel の腫瘍での LOH 判定は、生殖細胞系列でバリアントの読み取り頻度が 0.2~0.6、腫瘍サンプルで 0.6 以上のときに LOH があると判定した<sup>42</sup>。生殖細胞系列 CNV の LOH 判定は、log-2 比の減少により LOH の判定を行った（腫瘍と生殖細胞の検体間のエクソン平均読み取り数の対数変換比は、LOWESS 散布図で正規化して行った）。

腫瘍の HRD の 3 つのスコアは、Sequenza を使用し特異的なコピー数の状態を検出し、既報を参照し、HRD-LOH/HRD-NtAI/HRD-LST のスコア計算をソフトウェア R (ver 3.6.2) で行った（後述）。

#### 6.14. *BRCA1* または *RAD51C* におけるプロモーター領域のメチル化

JFCR 検体の場合、生殖細胞系列 *BRCA1/2* 野生型または VUS の 137 検体に対し、500 ng DNA を使用して Infinium MethylationEPIC BeadChip アレイ (Illumina) を用いて *BRCA1* と *RAD51C* のプロモーターのメチル化状態を解析した。TCGA のメチル化データは、Infinium Human Methylation 450K

(325 検体) または 27K (96 検体) BeadChip アレイ (Illumina) で取得した。

JFCR 検体のメチル化は、既報に基づき chr17 : 41277006-41277848 および chr17 : 56769830-56770425 (hg19) の領域でそれぞれ設計されたプローブ<sup>43</sup>の平均値を使用した (図 4、表 1)。*BRCA1* および *RAD51C* のメチル化の平均値は共に正規分布を示しており、ヒストグラムからカットオフ値を 0.3 に設定した (図 5)。一方、TCGA 検体は 2 種類のアレイを使用しており (図 6)、先に設計された probe のうち統計学的に相互に相関の強いプローブを選択し判定した。*BRCA1*: 450K アレイを使用した検体で、21 プローブ全ての平均値と、27K アレイで利用可能な①-⑥のプローブ値との相関を確認し (図 7)、0.95 以上の相関係数が得られた③-⑥のプローブの平均値を 27K アレイ検体では使用した (図 8)。*RAD51C*: 450 K アレイを使用した検体で、5 プローブ全ての平均値と、27K アレイで利用可能なプローブ⑧との位置関係が前後にある⑦⑨プローブとの相関を確認し (図 9)、450K 検体では⑦⑨プローブの平均値を使用し、27K 検体では⑧プローブの値を使用した (図 8)。

#### 6.15. ゲノム変数

腫瘍の全エクソーム解析の結果得られたゲノムデータ (実数または計算プログラムによるスコア) から、*BRCA1/2* 機能消失を伴う腫瘍に特徴的なゲノムの



変化として検証されている既報<sup>7, 13-19</sup>を参照に、以下の116のゲノム変数を使用してモデルの構築を行った。(i) SNVのトリヌクレオチド変化96パターンの頻度、(ii) COSMIC変異シグネチャーの割合(シグネチャー #1、#2、#3、#5、#6、#8、#10、#13、#17、#18、#20、#26、および#30)、(iii) SNV数、(iv) indel数、(v) CNV増幅数、(vi) CNV減少数、(vii) HRD状態の3つのスコア(HRD-LOH、HRD-NtAIおよびHRD-LST)。細胞は発がんに至るまでに多数の遺伝子変異を蓄積するが、遺伝子変異の原因として環境(タバコ、紫外線)、老化、感染、DNA損傷修復機構の破綻等があり、それぞれ得意的な塩基置換パターンを示すことが知られている。5'末端側の塩基(A, G, T, C)+塩基置換のパターン(C>G, C>T, C>A, T>A, T>C, T>G)+3'末端側の塩基(A, G, T, C)のトリヌクレオチド変化は96パターンあり、COSMIC変異シグネチャーは、それぞれの頻度をカウントレスペクトラム解析により30のシグネチャーパターンに分類するものである<sup>6</sup>。*BRCA*陽性がんはシグネチャー #3を示すことが報告されている<sup>18</sup>。HRD状態の3つのスコアは、既報に基づき15Mb以上の染色体の一部を占めるLOHの数(HRD-LOH)<sup>14</sup>、テロメア領域にまで広がっておりセントロメアを超えないサブテロメア領域のアレル不均衡数(HRD-NtAI)<sup>15</sup>、10Mb以上離れていて1個1個は3Mb以下のコピーナンバー異常のブレイクポイント数(HRD-LST)<sup>16</sup>を計算した(図10)。

## 6.16. BRCAness 統計モデル

従来の統計解析では、変数が多い場合に変数同士に一次従属が複数認められる多重共線性 (multicollinality) や過剰適合 (オーバーフィッティング) により正しい統計解析が出来ないことや、精度の低下が生じることが一般に知られている (図 11)。このような場合、機械学習法による予測精度の検証や、沢山ある変数の中から変数選択を行う方法が用いられることがある。ラッソ (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator: Lasso) ロジスティック回帰分析<sup>44</sup> は、正則化 (モデルを学習する際に、複雑さが増すことに対するペナルティ (罰則) を設け、過学習を防ぐ) された線形回帰の 1 つであり、回帰係数の推定の際に正則化項 (罰則項) として L1 正則化 (L1 ノルム) を使用する。L1 正則化はパラメーターの最小二乗和を用いる方法で、これによりいくつかのパラメーターの回帰係数を 0 に推定し、パラメーターを選択することでモデルの複雑化を防ぐものである。本研究では 116 のゲノム変数を用いた統計予測モデルとして、既報<sup>7</sup> の BRCAness モデル構築に使用されていたラッソロジスティック回帰を用いることとし、自施設で Python (ver. 3.7) プログラムを作成し実行した。L1 正則化に最適なハイパーパラメーター ( $\lambda$ ) は、トレーニングデータを使用して 10 分割交差検証を行い、平均正答率が最も高くなる (95.8%)  $\lambda$  値 (0.069) を

選択し、同時に変数選択と係数の決定を行った。BRCAness 予測値を高・低の 2 値に判別するカットオフ値は、この統計モデルをすべてのトレーニングデータに使用して、ROC 曲線の Youden インデックスにて 0.534 に設定した。Youden インデックスとは感度+特異度-1 が最大となるカットオフ値の定め方である (図 12)。機械学習の手法で求めたこのラッソロジスティック回帰モデルの予測能を、別の統計手法による分類器の予測能と比較するために、従来の多変量ロジスティック回帰分析も実行した<sup>45</sup>。単変量解析の AUC 値が上位 10 位までの変数を選択し、これらの全ての組み合わせの中から最も正答率が高くなる (95.5%) 変数を選択した。最終的な多変量予測モデル (3 個の変数が選択された) のカットオフ値 (= 0.726) は、ラッソロジスティック回帰モデルと同様に ROC 曲線の Youden インデックスによって決定した。ラッソロジスティック回帰モデルと従来の多変量ロジスティック回帰モデルの汎用性を比較するために、バリデーションデータに対する予測能も検証した。

#### 6.17. 臨床病理学的情報

JFCR 検体は後ろ向きカルテ調査により基本的な臨床情報 (年齢、性別、既往歴) を収集した。病理学的情報は病理レポートの報告に加えて、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、HER2 状態、組織型、核異型度の情報

が不明なものは追加の染色を行い、病理専門医により再検鏡を行った。TCGA の臨床病理学的情報はポータルサイトより入手した。

#### 6.18. その他の統計分析

マン・ホイットニー U 検定、フィッシャー検定、Kruskal-wallis 検定、ピアソン相関係数は、ソフトウェア GraphPad Prism バージョン 8.4.2 を使用して実行した。

### 7. 結果

#### 7.1. コホートの選択と背景

JFCR175 検体と TCGA735 検体の全エクソーム解析の結果、それぞれ 1 検体と 114 検体は、腫瘍含有量が低い (0.3 未満) または/かつ、サンプル内の SNV /indel の検出率が低い (20 未満) という品質管理基準に従って除外した (図 13)。

TCGA の 621 検体のうち、WGA 施行有り 200 検体、施行なし 421 検体について、WGA がゲノム情報に与える影響を検討した。116 のゲノム変数に対し単変量解析で群間比較したところ、15 の変数で有意差が認められた (マン・ホイットニー検定  $p < 0.05$ ) (表 2)。このうち代表的なゲノム変数の結果を図 14 に示す。いずれも WGA 施行検体群の方が高い数値であった。よって、TCGA 検体

のうち WGA 施行有り 200 検体を除外し、最終的に JFCR の 174 検体、TCGA の 421 検体を採用した (図 13)。JFCR 検体は WGA を行っていなかった。JFCR174 検体の臨床病理学的情報を表 3 に示す。一方、TCGA 検体の正確な臨床病理学的データの入手は限られており、乳がん診断年齢と ER/PgR/HER2 状態、サブタイプ情報、民族情報を収集した (表 4)。検体の民族の割合について図 15 に示す。また、JFCR174 検体のうち、同じ患者由来の腫瘍を使用しているものとして、4 ペア 8 検体があった。いずれも異時または同時両側乳がんの検体であり、両側乳がん検体が同じクローン由来の腫瘍ではないことを検証するために、腫瘍の全エクソーム解析によって得られた全ての体細胞変異の共通性を比較した。各ペアとも共通の変異が乏しく独立した (転移ではない) 検体と判断し、腫瘍としては独立の検体として使用した (表 5)。

## 7.2 コホートの分類

ACMG-AMP ガイドライン<sup>33</sup>に従ったバリエント病原性分類を行い、全 595 検体中、266 検体 (44.7%) に VUS が認められた。*BRCA1/2* の VUS は 86 個 69 種類、*BRCA* 以外の HBOC-HR 遺伝子の VUS は 269 個 214 種類であり、アミノ酸置換を伴うバリエントはそれぞれ 97%,99%を占めていた。JFCR の 37 検体と TCGA の 18 検体が *BRCA1/2* BAL 腫瘍、JFCR の 32 検体と TCGA の

95 検体が HR-quietescent 腫瘍であった。その他の検体はそれぞれ 105 検体と 308 検体であり、このうち 251 検体に 1 つ以上の VUS が認められた(図 16、図 17)。

JFCR 検体は TCGA 検体よりも *BRCA1/2* の陽性率が高かった。乳がんまたは/かつ卵巣がんの家族歴がある乳がん罹患者を対象とした家族性乳がん研究の参加者の検体が 174 検体中 82 検体を占めていた。

### 7.3. *BRCA1/2* BAL のゲノムおよび臨床病理学的特徴

JFCR 検体のゲノムの変化と病理学的所見を、*BRCA1/2* BAL、HR-quietescent、その他の検体別に示した(図 18)。病理情報は、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、HER2 発現状況とサブタイプを示している。*BRCA1/2* BAL と HR-quietescent では、SNV/indel の数(図 18B)、CNV 数(図 18C)、1 塩基置換(6 種類: C>A, C>G, C>T, T>A, T>C, T>G) の頻度(図 18D)、COSMIC 変異シグネチャーの割合(図 18F)、HRD の 3 つのスコア値(図 18G) それぞれにおいて、既報と同様に明確な違いを認めた<sup>8,46,47,48</sup>。

SNV/indel/CNV の数とシグネチャー #3 の割合は、HR-quietescent よりも *BRCA1/2* BAL で有意に増加していた(図 19)。COSMIC 変異シグネチャー #3 (BRCA signature) は *BRCA1/2* BAL で顕著に見られる特徴であり、HR-quietescent の多くはシグネチャー #1 (Aging signature) と、シグネチャー #2

および#13(APOBEC signature)を示していた<sup>8,46</sup> (図 18F)。また、*BRCA1/2* BAL の多くはトリプルネガティブサブタイプであったが、HR-quietent の多くはルミナルサブタイプであり、ほとんどがエストロゲンおよびプロゲステロンレセプターが陽性であった (図 18E)。さらにその他の検体は *BRCA1/2* BAL と HR-quietent の中間的な特徴を持ち、幅広い成分分布を呈していた。これらのゲノムの変化と病理学的所見の特徴は、TCGA の検体でも同様に観察されていた (図 20、図 21)。

JFCR 検体の臨床病理学的所見について、*BRCA1* BAL、*BRCA2* BAL、HR-quietent、その他の検体で比較した結果を図 22 に示す。既報<sup>34</sup>と同様に *BRCA1/2* BAL は、若年発症、トリプルネガティブサブタイプ、両側および/または多発乳がん、充実腺管がん、核グレード 3 が多いという特徴がみられたが、これらの特徴は *BRCA2* BAL よりも *BRCA1* BAL でより顕著に認められた。一方、非若年発症、ルミナルサブタイプ、片側性および単発性、乳頭腺管がんまたは硬がん、および低核グレードが多いことが、HR-quietent の特徴であった。TCGA 検体でも JFCR と同様の *BRCA1/2* BAL、HR-quietent に前述のような特徴が見られた (図 23)。

#### 7.4. BRCAness モデルの構築

*BRCA1/2* BAL の再現性のある特徴的なゲノムの変化を、HR-quietescent の特徴と比較し、BRCAness 予測モデルを構築した。予測モデルの統計手法は、ゲノムの特徴 (= BRCAness) を定量的に表し、機械学習法であるラッソロジスティック回帰分析を使用した。JFCR の陽性コントロールと陰性コントロール検体の 116 のゲノム変数に対しラッソロジスティック回帰を行った結果、最終モデルでは HRD-LOH、COSMIC 変異シグネチャー #3 の割合、indel 数の 3 つの変数とその係数が選択された (表 6)。BRCAness 予測モデル式は以下であった。

$$p = \frac{1}{1 + \exp(-Z)}$$

where  $Z = 0.169 + 0.507 \cdot \frac{x_1 - 12.0}{10.1} + 0.359 \cdot \frac{x_2 - 0.326}{0.240} + 0.021 \cdot \frac{x_3 - 7.00}{5.30}$ .

$x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  はそれぞれ HRD-LOH score, COSMIC 変異シグネチャー #3 の割合、indel 数。これらの変数は、表 6 にリストされている平均と標準偏差によって標準化を行った。

## 7.5. モデルの精度検証

予測性能の評価のため、従来の統計手法である多変量ロジスティック回帰による BRCAness モデルも作成した。まず、単変量解析により AUC 値が上位 10 変数 (indel 数、HRD-LOH、COSMIC 変異シグネチャー #3、HRD-NtAI、CNV



増幅数、GCT>GGT、CCA>CGA、SNV 数、ACG>AGG、CCG>CTG) を選択した (表 7)。これらのすべての組み合わせの中から、AUC が最も高くなる変数の組み合わせを多変量ロジスティック回帰分析により選択した。116 のゲノム変数間には強い相関がみられたため (図 24)、4 変数以上を用いた組み合わせでは 95%信頼区間が出せず、3 変数の組み合わせまでの中で最も AUC が高いものは indel 数、HRD-LOH、SNV 数の 3 変数であった (表 6)。ラッソロジスティック回帰および従来の多変量ロジスティック回帰によるトレーニングデータの 10 分割交差検証の平均正答率は、それぞれ 95.8%および 95.5%であった。ラッソロジスティック回帰モデルは、従来の多変量ロジスティック回帰モデルよりもわずかに精度が高く、予測性能に問題が無い事が確認できた。TCGA 検体の陽性コントロール、陰性コントロールを用いてバリデーションを行ったところ、ラッソロジスティック回帰の BRCAness モデルの正答率は 86.7%であり、汎用性の高さが示された。参考として、従来の多変量ロジスティック回帰では、検証データの正答率は 77.9%であった (表 6)。

## 7.6. BRCAness 予測値

JFCR および TCGA のそれぞれのコホートで、全検体に対し、ラッソロジスティック回帰による BRCAness 予測値と、全ゲノム変数の結果を図 25、図 26

に示した。いずれも陽性コントロールと陰性コントロールでゲノムの特徴が異なることが可視化できた。更に、その他の検体の中で BRCAness 予測値が高い検体は、陽性コントロールとゲノムの特徴が似ていた。また、*BRCA1* BAL、*BRCA2* BAL、HR-quietescent、その他の検体の 4 群で、モデルで選択された変数別および BRCAness 予測値のバイオリンプロットを図示した (図 27A、図 27B、図 28)。各々幅広い成分分布を呈しているが、カットオフ値による高い分別能と、その他の検体群は、*BRCA1/2*BAL 群と HR-quietescent 群の中間位を呈していた。

#### 7.7. その他のゲノムまたはエピジェネティック(メチル化)変化を伴う腫瘍の BRCAness

陽性コントロールと陰性コントロール以外のその他の検体 413 検体について、BRCAness 予測値と 12 種類の様々な遺伝型、すなわち *BRCA1* メチル化、*RAD51C* メチル化、*BRCA1/2* 以外の生殖細胞液列病的変異または VUS (LOH/AST 別)、体細胞系列の *BRCA1/2* を含む HR-HBOC 遺伝子の truncation または VUS (LOH/AST 別)、体細胞系列 HR-HBOC 遺伝子の CNV ホモ接合性欠失とヘテロ接合性欠失の保持について、オンコプリント図で示した (図 29)。カットオフ値 0.534 により、97 の高 BRCAness 腫瘍と、316 の低 BRCAness

腫瘍に分けられた。この 12 種類の遺伝型と BRCAness 予測値の群間比較を、マン・ホイットニー検定で行った結果、*BRCA1* または *RAD51C* プロモーター領域のメチル化、LOH または AST を伴う *BRCA1/2* 以外の生殖細胞系列 HBOC-HR 遺伝子の病的変異、および体細胞系列ホモ接合性欠失の 4 種は BRCAness と有意に相関していることが示された (図 30、表 8、表 9)。すなわち、これらの遺伝型は、BRCAness を引き起こす可能性が高いことを示唆しており、既報の BRCAness 予測法<sup>18</sup>でも同様な報告がされていた。また、その他の検体に対し、臨床病理学的所見 (発症年齢、多発/単発発症、組織型、サブタイプ、核グレード) についても同様に群間比較を行ったところ、トリプルネガティブサブタイプ、核グレード 3 および充実腺管がんは、高 BRCAness 腫瘍で高度に濃縮されており、*BRCA1/2* BAL の特徴と類似していた (図 31)。

## 7.8. BRCAness による VUS の再分類

7.7. の結果 (4 つの遺伝型および臨床病理学的所見と BRCAness 予測値の関連性が妥当であること) を、VUS の病原性の評価に使用し VUS の再分類を行った。*BRCA1/2* を含む HBOC-HR 遺伝子に認められた VUS の再分類フローチャートを図 32 に示す。全体として 337 VUS (269 種類) が認められた。LOH または AST による野生型対立アレルの不活性化は、HRD および BRCAness の

発現に不可欠と仮定し、LOH/AST のない 260 の VUS は評価から除外した。

LOH/AST を伴う 77 VUS のうち、32 VUS が高 BRCAness 腫瘍、45 VUS が低 BRCAness 腫瘍に存在した。高 BRCAness 腫瘍に認められた 32 VUS のうち、BRCAness を引き起こす 4 つの遺伝型(7.7.参照)を有さない 19 VUS は、おそらく病原性があると見なされ、“カテゴリー1”に分類した。BRCAness を引き起こす可能性のある 4 つの遺伝型を有している 10 VUS は“カテゴリー2”に分類した。これは、高 BRCAness を引き起こした原因が VUS によるものか、4 つの遺伝型によるものかの評価ができないと考えたためである。LOH/AST を伴い低 BRCAness 腫瘍に認められた 45 VUS は、おそらく良性と考え、“カテゴリー3”に分類した。このカテゴリー分類に続いて、更に臨床病理学的所見（サブタイプ、組織型、核グレード）による評価を行った。トリプルネガティブサブタイプ、充実腺管がん、核グレード 3 は高 BRCAness 腫瘍、ルミナル、乳頭腺管がん/硬がん、核グレード 1 は低 BRCAness 腫瘍に相関している結果を利用した（7.7. 参照）。入手可能なデータ範囲内で、“カテゴリー1”の VUS を伴う腫瘍が、高 BRCAness 腫瘍の臨床病理学的所見を全て一貫して持つ場合、潜在的病原性 (Potentially Likely Pathogenic: PLP) と判定した。一方、低 BRCAness 腫瘍の“カテゴリー3”の VUS を伴う腫瘍が、1 つ以上の低 BRCAness の臨床病理学的所見を示したときに、潜在的良性 (Potentially Likely Benign: PLB) 」

と判定した（図 32、表 10）。これらの判定の結果、臨床病理学的特徴による評価により、6 VUS（5 種類）および 36 VUS（35 種類）が PLP および PLB に分類された。“カテゴリー1”の *BLM*c.T11C p.V4 および“カテゴリー3”の *ATM* c.T7912G p.W2638G、*CHEK2*c.G683A p.S228N のバリエントは 2 つの腫瘍で検出されていた。5 VUS（2 種類：*BRCA2* c.T5640G p.N1880K、*RECQL* c.G1483C p.D495H）は、高 BRCAness 腫瘍と低 BRCAness 腫瘍の両方に存在し競合した結果であったため、評価不能（Conflicting）とした。さらに最終判定として、これらの PLP と PLB に対し、機能アッセイまたは症例対照研究の文献検索による再評価を行った。PLP の *BRCA1*c.T4951C p.S1651P は、日本人で認められたバリエント（JFCR 検体）であった。日本人の集団データベース<sup>31</sup> および日本人乳がん患者を対象とした大規模な症例対照研究（7,051 症例および 11,241 対照）<sup>49</sup> ではアレル頻度が登録されていないバリエントであったが、ゲノム編集に基づく機能アッセイが海外から報告されていた<sup>50</sup>（表 11）。一方、*ATM* c.C2879A p.P960H、*BRCA2* c.A125G p.Y42C および *PALB2* c.G2509A p.E837K の有病率は日本人乳がん患者を対象とした大規模な症例対照研究<sup>49</sup>で、症例群と対照群で同等であり、良性を示していた。同様に、*PALB2* c.C2135T p.A712V は、オーストラリアの症例対照研究（1,996 症例群および 1,998 対照群）によって良性と判定していた<sup>51</sup>。*BRCA1*c.G4535T p.S1512I および *BRCA2*

c.A125G p.Y42C は、複数の機能アッセイにおいて、野生型タンパク質と同等の HR 修復能<sup>52,53</sup> および細胞生存率<sup>54,55,56</sup> を示していた。これらの結果から、本研究で開発した BRCAness モデルは、VUS から病原性疑い (Likely pathogenic: LP) および良性疑い (Likely Benign: LB) のバリエントを識別するのに有用であった。

## 8. 考察

生殖細胞系列遺伝子の VUS は機能や罹患への重要性の意義が不明なバリエントであり<sup>33</sup>、HBOC 患者の臨床診療において課題となっている<sup>57</sup>。予防的外科切除、サーベイランス方法などの医学的管理が不明であり、PARP 阻害剤やプラチナ製剤の有効性も明らかではない。これらの課題を克服するために、症例対照研究<sup>58</sup> と実験による機能アッセイ<sup>59</sup> が行われているが、研究結果の齟齬や、アッセイの煩雑性、何よりも VUS の数 (種類) の多さに対応しきれないのが現状である。VUS 再分類のもう一つの方法として、BRCAness<sup>60</sup> を利用する方法があり、HBOC を引き起こす多くの遺伝子が HR 修復経路に関与し、その機能的消失が腫瘍形成につながるという事象に基づいた方法である。本研究で病的疑いと再判定された VUS である *BRCA1* p.S1651P は、*BRCA1* C terminal(BRCA)ドメインに位置し、*ABRA1* (*Abraxas*), *BACH1* (*FANCI*),

*BRIP1*) および CtIP のリン酸化タンパク質と結合し、それぞれ BRCA1-A,B,C 複合体を形成する。よって、これらのドメイン部の変異はリン酸化タンパク質との結合阻害を生じる可能性があり、ミスセンス変異であっても HR 機能を消失する病的変異となる可能性があることが知られている<sup>61</sup>。最終的には実験による HR 活性や PARP 阻害剤感受性などの機能アッセイでの判定が伴うことが必要ではあるが、腫瘍の表現型と遺伝型の相関を利用した VUS の病原性評価法は、新たな分類器として臨床遺伝医学に有益である可能性がある。

腫瘍の HRD または BRCAness の程度を推定するゲノムバイオマーカー研究はこれまでも複数報告されている。バイオマーカーには、CNV<sup>13</sup>、HRD-LOH<sup>14</sup>、HRD-NtAI<sup>15</sup>、HRD-LST<sup>16</sup>、HRD-score (HRD-LOH、HRD-NtAI、HRD-LST の合計)<sup>17</sup>、*BRCA1* または *BRCA2* の LOH 状態<sup>19</sup>、COSMIC 変異 signature #3<sup>18</sup>、および HRDetect<sup>7</sup> などがある。これらのバイオマーカーは、MLPA、SNP6 アレイ、全エクソーム解析、および全ゲノム解析などのさまざまなゲノムデータ解析法を用いている。本研究で開発した BRCAness モデルは、正答率<sup>13,18</sup>、感度<sup>7,16</sup>、特異度<sup>18</sup>、および AUC<sup>7,15,18</sup> の成績において、これらの既報より優れた、あるいは同等の成績が得られた結果であった。バイオマーカーのうち、HRDetect のみが多変数統計モデルに基づいて開発されていた<sup>7</sup>。全エクソーム解析による本研究のモデルは COSMIC 変異シグネチャー #3、HRD-LOH お

よび indel 数で構成されているが、全ゲノム解析に基づく HRDetect は COSMIC 変異シグネチャー #3 と #8、HRD-LOH、マイクロホモロジー欠失数、染色体再構成シグネチャー #3 と #5 で構成されていた<sup>7</sup>。COSMIC 変異シグネチャー #3 と HRD-LOH は本モデルと重複していた。マイクロホモロジー欠失と染色体再構成シグネチャープロファイリングは全エクソーム解析では算出することができない点に注意が必要である<sup>8</sup>。

本研究の新規性として以下の 3 点が挙げられる。まず、ラッソロジスティック回帰による機械学習法をモデル構築に用いたことで、全エクソームにより得られる多くのゲノム変数から最適な変数を選択し精度の高い BRCAness モデルを構築したことである。本研究の BRCAness モデル構築の過程で、変数同士の高い多重共線性 (multicollinearity) に気づいた (図 24、表 7)。使用した 116 の変数のうち、相互の相関は、塩基置換に関連する変数間 (SNV のトリヌクレオチド 96 パターンの頻度、COSMIC 変異シグネチャーの割合、SNV 数、indel 数) と、CNV に関連する変数間 (CNV 増幅数、CNV 減少数、HRD-LOH、HRD-NtAI、HRD-LST) でみられた。多重共線性は変数間に強い線形従属性が存在する、という条件で生じ<sup>62,63</sup>、正則化項を用いてモデルの過学習 (過剰適合) を防げるという理由で、従来の多変量ロジスティック回帰よりもラッソロジスティック回帰などのような機械学習に基づいたモデルが、より適切な変数を選択



することが知られている。実際、我々の結果でも、機械学習法のモデルの精度の方が高い結果であった。同じ患者由来の独立した腫瘍検体では、BRCAness 予測値は同程度と予想される。JFCR 検体で同じ患者由来の 2 ペア 4 検体の BRCAness 予測値はそれぞれ、AA67: 0.322075 と 0.303535、AI67: 0.466689 と 0.508683338 であり (表 5)、いずれも低 BRCAness を呈する結果で、本 BRCAness モデルの精度が問題ない事が確認できた。また、本 BRCAness モデルは日本人の乳がん検体を使用してモデルの構築を行った。バリデーションに使用した TCGA 検体について人種別に BRCAness 予測値を比較してみた所、白人、有色人種間で有意差は認められず、他人種の乳がん検体においても有用性であると思われる (図 33)。

2 点目として、WGA ががんのゲノムに影響を与えている結果に着目視、WGA を施行した検体を除外して研究を遂行したことである (図 14、表 2)。本モデルの汎用性を検証した結果、非常に高い正答率 (86.7%) であり、TCGA 乳がん検体データでも *BRCA1/2* BAL 腫瘍の検出が、高い再現性で得られていた。WGA は COSMIC 変異シグネチャー、コピー数異常や LOH の検出に影響を及ぼすことが報告されている<sup>19</sup>。HRD-LOH<sup>14</sup>、LOH<sup>19</sup>、シグネチャー #3<sup>18</sup>を使用した各モデルでは、WGA を施行した検体も含まれた TCGA データを使用した精度結果であった。本研究ではモデル構築およびバリデーション検討にも、

WGA を行った検体を使わなかった点は、モデルの精度、汎用性の面で良い結果につながった要因の一つであると考えられる。

3 点目として、*BRCA1/2* 以外の HR-HBOC についても評価を行ったことである。*BRCA1/2* 以外の遺伝子は、アレル頻度が低く一般臨床で同定されることが少なかったが、近年 NGS による多遺伝子パネル検査の普及に伴い検査数が増加してきている。しかし各遺伝子のデータの蓄積が少ないため *BRCA1/2* よりも VUS 検出率が高いことが臨床で課題となっている。本研究では数が少ないものの *RAD51C*、*PALB2*、*BARD1*、*RAD51D* では BRCAness 予測値が有用である可能性が示唆されている(表 9)。

一方、本研究の限界点として以下の 3 点が挙げられる。まず、本研究では新鮮凍結保存の乳がん検体を使用した研究であり、一般診療で流用しているホルマリン固定検体では使用できないことである。ホルマリン固定検体は、ホルマリンにより生じる塩基置換が起こり、ノイズが複数入ってしまうため本 BRCAness 予測モデルの式をそのまま使用することが出来ない点である。

次に、HBOC-HR 関連遺伝子の中には、本 BRCAness モデルとは異なる分類器が必要な遺伝子が含まれることである。本研究では、すべての HBOC-HR 遺伝子の BAL が BRCAness 表現型を示すという仮定に基づいて、HBOC-HR 遺伝子の VUS 再判定法を開発した。LOH または AST を伴う生殖細胞系列

HBOC-HR 遺伝子の病的変異をもつ腫瘍は全体としては高 BRCAness 腫瘍の傾向がみられたが (図 29、図 30) が、その中で *ATM* BAL は高 BRCAness 腫瘍にならず、トリプルネガティブサブタイプを示していなかった (表 9)。さらに、HR quiescent と *ATM* BAL の BRCAness 予測値は有意差を認めなかった (図 34)。この結果は既報の内容と一致しており、*ATM* 変異乳がんは COSMIC 変異シグネチャー #3 の特徴をとらず<sup>18</sup>、HRD-LST が低く<sup>16</sup>、ルミナルタイプを呈すると報告されている<sup>48,64</sup>。*ATM* は HR 修復経路のコンポーネントではあるが、HR 経路のうち *BRCA1/2* 複合体より上流に位置し、DNA 損傷のシグナルと二本鎖切断 (Double strand break: DSB) の検出を行う役割を担っている。腫瘍細胞の *ATM* が機能を消失していても BRCAness を呈さない理由はまだ不明だが、本研究結果は *ATM* と、おそらく他のいくつかの HBOC-HR 遺伝子の表現型を評価するためには、本 BRCAness モデルとは異なる分類器の必要性を示唆している。

3 つ目として、一般的な遺伝診療で *BRCA* を始めとした変異保持を予測する血縁者の家族歴・浸透率のような臨床情報を使用していない点である。これらの臨床情報や既存の変異保持リスクモデル (例: BRACAPRO<sup>65</sup>, Tyrer-Cuzick model<sup>66</sup> 等) を組み合わせることで、更に精度の高い VUS の再判定が可能となるかもしれない。

本研究の将来展望として、限界点で挙げた点の克服を踏まえ以下のように考える。一般臨床で幅広く利用できる VUS 判定法とするためには、ホルマリンによるノイズ除去を情報統計学的に検討すること、乳がん以外の卵巣がんや膵がん、前立腺がん等他臓器のがんでの有用性・妥当性の検討をすること、*ATM* など本 *BRCAness* 予測値では判定できない HR-HBOC 遺伝子について、更に他の情報を組み合わせることによって有用な分類器が構築できるか検討することである。

## 9. 結論

本研究の *BRCAness* を利用した VUS 病原性再評価法を通じて、病原性の可能性が高いバリエントとして *BRCA1* p.S1651P があげられた。一方、良性である可能性が高いのは *ATM* p.P960H、*BRCA2* c p.Y42C、*PALB2* p.E837K、*PALB2* p.A712V、および *BRCA1* p.S1512I であった。HR 関連の HBOC 原因遺伝子の VUS の再評価に、*BRCAness* を利用した本研究の手法は、従来の症例対照研究法や機能解析法と共に、バリエントの病原性判定に有用であり、遺伝医学の臨床に貢献する可能性がある。

## 1 0 . 略語一覽

HBOC: Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome

HRD: Homologous Recombination Defficiency

VUS: Variant of uncertain significance

SNV: Single Nucleotide Variants

indel: insertion and deletion

CNV: Copy Number Variants

BAL: Biallelic Loss of function

LOH: Loss of heterozygosity

AST: Additional Somatic Truncation

## 1 1 . 文献

1. Easton, D. F., Pharoah, P. D., Antoniou, A. C., et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med*. 2015;372:2243-2257.
2. Castéra, L., Krieger, S., Rousselin, A., et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Europ J Hum Genet*. 2014;22:1305-1313.
3. Andrews L. The known unknown: the challenges of genetic variants of uncertain significance in clinical practice. *J Law Biosci*. 2018;22:648-657.
4. Riaz, N., Blecua, P., Lim, R. S., et al. Pan-cancer analysis of bi-allelic alterations in homologous recombination DNA repair genes. *Nat Commun*. 2017;8:1-7.
5. Hasty, P., Montagna, C. Chromosomal Rearrangements in Cancer: Detection and potential causal mechanisms. *Mol Cell Oncol*. 2014;1:e29904.
6. Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*. 2020;578:94-101.
7. Davies, H., Glodzik, D., Morganella, S., et al. HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nat Med*. 2017;23;517-525.
8. Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016;534:47-54.
9. Lips, E. H., Mulder, L., Oonk, A., et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer*. 2013;108:2172-2177.
10. Domagala, P., Hybiak, J., Cybulski, C., et al. BRCA1/2-negative hereditary triple-negative breast cancers exhibit BRCAness. *Int J Can*. 2017;140:1545-1550.
11. Lord, C. J., Ashworth, A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:110-120.
12. Lord, C. J., Ashworth, A. PARP inhibitors: the first synthetic lethal targeted therapy. *Science*. 2017;355:1152-1158.
13. Lips, E. H., Laddach, N., Savola, S. P., et al. Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness. *Br Cancer Res*. 2011;13:R107.
14. Abkevich, V., Timms, K. M., Hennessy, B. T., et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2012;107:1776-1782.
15. Birkbak, N. J., Wang, Z. C., Kim, J. Y., et al. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Discov*. 2012;2:366-375.
16. Popova, T., Manié, E., Rieunier, G., et al. Ploidy and large-scale genomic instability consistently

- identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. *Cancer Res.* 2012;72:5454-5462.
17. Timms, K. M., Abkevich, V., Hughes, E., et al. Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. *Br Cancer Res.* 2014;16:475.
  18. Polak, P., Kim, J., Braunstein, et al. A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nat Genet.* 2017;49:1476-1486.
  19. Maxwell, K. N., Wubbenhorst, B., Wenz, B. M., et al. BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers. *Nat Commun.* 2017;8: 1-11.
  20. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al. Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2016;375:2154–64.
  21. Moore, K. N., Secord, A. A., Geller, M. A., et al. Niraparib monotherapy for late-line treatment of ovarian cancer (QUADRA): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20:636-648.
  22. Telli ML, Timms KM, Reid J, et al. Homologous recombination deficiency (HRD) score predicts response to Platinum-Containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:3764–73.
  23. Sharma P, Barlow WE, Godwin AK, et al. Impact of homologous recombination deficiency biomarkers on outcomes in patients with triple-negative breast cancer treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide (SWOG S9313). *Ann Oncol* 2018;29:654–60.
  24. Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013;500:415-421.
  25. Melchor, L., Benítez, J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet.* 2013;132:845-863.
  26. Nielsen, F. C., van Overeem Hansen, T., Sørensen, C. S. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:599-612.
  27. D'Andrea, A. D. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *New England Journal of Medicine.* 2010;362:1909-1919.
  28. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009; 25: 1754-1760.
  29. DePristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics.* 2011; 43: 491-498.
  30. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2013; 43: 11 10 11-33.
  31. Nagasaki M, Yasuda J, Katsuoka F, Nariai N, Kojima K, Kawai Y, et al. Rare variant discovery

- by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals. *Nat Commun.* 2015;6:8018.
32. Fromer M, Moran Jennifer L, Chambert K, et al. Discovery and Statistical Genotyping of Copy-Number Variation from Whole-Exome Sequencing Depth. *The American Journal of Human Genetics.* 2012; 91: 597-607.
  33. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405-423.
  34. Kaneyasu T, Mori S, Yamauchi H, et al. Prevalence of disease-causing genes in Japanese patients with BRCA1/2-wildtype hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *NPJ Breast Cancer.* 2020;6:25. Published 2020 Jun 12. doi:10.1038/s41523-020-0163-1
  35. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome research.* 2012; 22: 568-576.
  36. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nature biotechnology.* 2013; 31: 213-219.
  37. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Campbell PJ, Stratton MR. Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell Rep.* 2013; 3: 246-259.
  38. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013; 500: 415-421.
  39. Tanaka N, Takahara A, Hagio T, et al. Sequencing artifacts derived from a library preparation method using enzymatic fragmentation. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227427. doi:10.1371/journal.pone.0227427
  40. Magi A, Tattini L, Cifola I, et al. EXCAVATOR: detecting copy number variants from whole-exome sequencing data. *Genome biology.* 2013; 14: R120.
  41. Favero F, Joshi T, Marquard AM, et al. Sequenza: allele-specific copy number and mutation profiles from tumor sequencing data. *Ann Oncol.* 2015; 26: 64-70.
  42. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature.* 2015; 521: 489-494.
  43. Gotoh O, Sugiyama Y, Takazawa Y, et al. Clinically relevant molecular subtypes and genomic alteration-independent differentiation in gynecologic carcinosarcoma. *Nat Commun.* 2019;10(1):4965.
  44. Tibshirani R. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. *J R Statist. Soc. B.* 1996;58:267-288.
  45. Kleinbaum D.G., Klein M. Book review of “Logistic regression: a self-learning text” 3rd edition. Springer 2010.
  46. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013;500:415-421.



47. The ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*. 2020;578:82-93.
48. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21:134-147.
49. Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT, et al. Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *Nat Commun*. 2018;9:1-7
50. Findlay GM, Daza RM, Martin B, et al. Accurate classification of BRCA1 variants with saturation genome editing. *Nature*. 2018;562:217-222.
51. Thompson ER, Goringe KL, Rowley SM, et al. Prevalence of PALB2 mutations in Australian familial breast cancer cases and controls. *Breast Cancer Res*. 2015;17:111.
52. Farrugia DJ, Agarwal MK, Pankratz VS, et al. Functional assays for classification of BRCA2 variants of uncertain significance. *Cancer Res*. 2008;68:3523-3531.
53. Anantha RW, Simhadri S, Foo TK, et al. Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance. *Elife*. 2017;6:e21350. doi:10.7554/eLife.21350.
54. Caligo MA, Bonatti F, Guidugli L, et al. A yeast recombination assay to characterize human BRCA1 missense variants of unknown pathological significance. *Hum Mutat*. 2009;30(1):123-133.
55. Kuznetsov SG, Liu P, Sharan SK. Mouse embryonic stem cell-based functional assay to evaluate mutations in BRCA2. *Nat Med*. 2008;14(8):875-881.
56. Wu K, Hinson SR, Ohashi A, et al. Functional evaluation and cancer risk assessment of BRCA2 unclassified variants. *Cancer Res*. 2005;65(2):417-426.
57. Macklin S, Durand N, Atwal P, et al: Observed frequency and challenges of variant reclassification in a hereditary cancer clinic. *Genet Med*. 2018;20:346-350.
58. Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, Peterlongo P, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PLoS One*. 2013;8(2):e55681.
59. Guidugli L, Pankratz VS, Singh N, et al. A classification model for BRCA2 DNA binding domain missense variants based on homology-directed repair activity. *Cancer Res*. 2013;73:265-275.
60. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):814-819.
61. Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B.A. et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*. 2007;25:316(5828):1194-8.
62. Dormann, C. F., Elith, J., Bacher, S., et al. Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*. 2013;36:27-46.

63. Alin, A. Multicollinearity. *WIREs Comp Stat.* 2010;2:370-374.
64. Renault AL, Mebirouk N, Fuhrmann L, et al. Morphology and genomic hallmarks of breast tumours developed by ATM deleterious variant carriers. *Breast Cancer Res.* 2018;20:28.
65. Berry DA, Iversen ES Jr, Gudbjartsson DF et al. BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol.* 2002 Jun 1;20(11):2701-12.
66. <https://ibis.ikonopedia.com/>

## 1 2. 図の説明

### 図 1：研究デザイン：HBOC-HR 遺伝子の腫瘍形成過程と VUS の病原性評価

HBOC-HR 遺伝子の腫瘍形成は、相同組換え修復不全 (HRD) を経て、*BRCA1* または *BRCA2* 変異腫瘍に認められるような特徴的なゲノム変化と臨床病理像 ‘BRCAness’ を呈する。これを利用して、HBOC-HR 乳がんに見られる VUS の病原性を評価する。

LOH; ヘテロ接合性消失、AST; 野生型アレルの体細胞変異

### 図 2：研究戦略：本研究の BRCAness モデルと VUS の病原性評価への応用

BRCAness モデルは最初に、*BRCA1/2* 両アレル機能消失 (BAL) 腫瘍のゲノムの特徴を、相同組換え (HR) quiescent 腫瘍の特徴と比較することによって構築し、TCGA 乳がん検体でモデルの精度検証を行う。次に生殖細胞系列 *BRCA1/2* およびその他の相同組換え修復関連 (HBOC-HR) 遺伝子に VUS を含む腫瘍の BRCAness を予測する。VUS の病原性は、BRCAness、臨床病理学的特徴に基づいて評価し、VUS から病原性の可能性 (PLP) または良性の可能性 (PLB) のあるバリエーションを特定する。最後に既報の症例対照研究や機能アッセイと照合し、病的変異疑い (LP) と良性変異疑い (LB) の最終的な判定とする。

### 図 3：生殖細胞系列と体細胞の変異型の分類

赤とピンクのセルは、ヘテロ接合性の消失 (LOH) または体細胞変異 (AST) により野生型対立遺伝子の不活性化を伴う生殖細胞系列の *BRCA1/2* であり、*BRCA1/2* 両アレル機能消失 (*BRCA1/2* BAL) の腫瘍である【陽性コントロール】。スカイブルーは、HR 修復経路に関与する遺伝性乳がん卵巣がん感受性遺伝子 (HBOC-HR 遺伝子) で、生殖細胞系列かつ体細胞の変異が検出されない、HR quiescent 腫瘍である【陰性コントロール】。

CN; コピー数

### 図 4：JFCR 検体の *BRCA1/RAD51C* メチル化のヒートマップ図

JFCR174 検体の *BRCA1* (21 プローブ) と *RAD51C* (5 プローブ) の実測値のヒートマップ図

### 図 5：JFCR 検体の *BRCA1*, *RAD51C* メチル化値

JFCR174 検体の *BRCA1* 21 プローブの平均値と *RAD51C* 5 プローブの平均値のヒストグラム。正規分布を示しており、それぞれ 0.3 をカットオフ値とした。

### 図 6：TCGA 検体の *BRCA1/RAD51C* メチル化のヒートマップ図

TCGA325 検体は 450K を使用し *BRCA1* は 21 プローブ、*RAD51C* は 5 プローブの判定が可能であった。96 検体は 27K を使用しており、*BRCA1* は 6 プローブ、*RAD51C* は 1 プローブの判定が可能であった。

#### 図 7 : TCGA 検体 (450K) の *BRCA1* メチル化プローブの相関

450K を使用している TCGA 検体で、21 プローブの平均と①～⑥の各プローブのメチル化値の相関図。相関係数  $r > 0.95$  のものは③～⑥のプローブであった。

r; ピアソン相関係数

#### 図 8 : TCGA 検体で最終判定に使用したプローブの相関

450K を使用している TCGA 検体で、*BRCA1* は 21 プローブの平均値と③-⑥のプローブ平均値の相関と、*RAD51C* は 5 プローブの平均値と⑦と⑨の平均値の相関図。いずれも高い相関が得られており、解析に用いる最終プローブを決定した。

r; ピアソン相関係数

#### 図 9 : TCGA 検体 (450K) の *RAD51C* メチル化プローブの相関

450K を使用している TCGA 検体で、5 プローブの平均と、27K で使用可能な⑧のプローブの前後に位置する⑦と⑨のプローブのメチル化値の相関図。

r; ピアソン相関係数

#### 図 10 : HRD 状態を示すスコア

既報の HRD-LOH, KR-D-NtAI, HRD-LST の計測方法のシェーマ図。

HRD-LOH; 15Mb 以上の染色体の一部を占める LOH の数<sup>14</sup>

HRD-NtAI: テロメア領域まで広がっており、セントロメアを超えないサブテロメア領域のアレル不均衡数<sup>15</sup>

HRD-LST; 10Mb 以上離れていて 1 個 1 個は 3 Mb 以下のコピーナンバー異常のブレイクポイント数<sup>16</sup>

#### 図 11 : 機械学習によるモデルの構築

従来の統計解析では、変数が多い場合には変数間に強い相関が生じることが多く、多重共線性が生じ正しい統計解析が行えないことや、過剰適合 (過学習) によりモデルの汎用性が低下することが知られている。このような場合、機械学習により予測精度を上げ、変数選択を行いモデル作成を行う方法がある。

#### 図 12 : 予測値の ROC 曲線とカットオフ値 (Youden index)

Youden index は感度 + 1 - 特異度が最大値となるポイントをカットオフ値とする方法である。本研究では 0.534 が得られた。

#### 図 13 : 本研究で使用した検体の品質管理

自施設(JFCR)検体と TCGA 検体は、全エクソームデータに基づいて、腫瘍含有量が低い(<0.3) 検体と、SNV /indel 数が少ない (<20) 114 検体を除外した。全ゲノム増幅 (WGA) を行った 200 検体も除外した (本文 7.1 参照)。JFCR 検体は WGA を行っていない。最終的なモデル構築に使用したサンプルは、JFCR174 検体、TCGA421 検体となった。

SNV; 一塩基置換、indel; 挿入/欠失

#### 図 14 : WGA の影響

解析の品質管理を満たした TCGA621 検体のうち、WGA を施行した 200 検体と、WGA 未施行の 421 検体でゲノム変数値の群間比較を行った。CNV 増幅数、indel 数、SNV 数、HRD-NtAI はいずれも WGA 施行群で有意に高い値を示していた。

WGA; Whole genome amplification (全ゲノム増幅)

p 値: Mann-Whitney U 検定

#### 図 15 : TCGA421 検体の人種の割合

TCGA ポータルサイトより得られた検体の人種の割合を円グラフで示した。白人が多数を占め、アジア人のデータは全体の 8%であった。

#### 図 16 : JFCR および TCGA コホートにおける *BRCA1* / 2 両アレル機能消失を伴う腫瘍と HR quiescent 腫瘍の遺伝型の内訳

*BRCA1/2* 変異保有率は JFCR 検体で高かった。これは、JFCR コホートに、家族性乳がん研究参加者の検体が多く含まれているのが原因と思われる。

#### 図 17 : JFCR および TCGA 検体の内訳

JFCR 37 検体と 32 検体は、それぞれトレーニングステップの陽性コントロールと陰性コントロールとして使用された。同様に TCGA 18 検体と 95 検体は検証ステップで陽性コントロールおよび陰性コントロールとして使用された。その他の JFCR 105 検体および TCGA 308 検体に対し、モデルを使用し BRCAness を予測した。

#### 図 18 : JFCR 検体のゲノム異常と病理学的所見のプロファイル

陽性コントロール、陰性コントロール、その他の検体別に、検体のゲノムの異常と病理学的所見のプロファイルを示す。上から B:SNV と indel 数、C:CNV 数、D:一塩基置換の頻度(%)、E:ホルモン受容体と HER2 状態とサブタイプのオンコプリント図、F: COSMIC 変異シグネチャーのヒートマップ図、G:HRD-LOH / HRD-NtAI / HRD-LST スコアのヒートマップ図。

SNV; 一塩基変異、CNV; コピー数異常、BAL; 両アレル機能消失、HR; 相同組換え、ER; エストロゲン受容体、PgR; プロゲステロン受容体、TN; トリプルネガティブ

#### 図 19 : HRD 腫瘍における特徴的なゲノムの変化 (JFCR)

TCGA 検体 *BRCA1* BAL、*BRCA2* BAL、HR quiescent、その他の 4 群間で SNV/indel/CNV の数とシグネチャー #3 の割合を比較した。*BRCA1/2* BAL 腫瘍は、HR-quiescent 腫瘍よりも *BRCA1/2* BAL 腫瘍で有意に増加していた。

*p* 値; Kruskal-wallis 検定

#### 図 20 : TCGA 検体のゲノム異常と病理学的所見のプロファイル

陽性コントロール、陰性コントロール、その他の検体別に、検体のゲノムの異常と病理学的所見のプロファイルを示す。上から B:SNV と indel 数、C:CNV 数、D:一塩基置換の頻度(%)、E:ホルモン受容体と HER2 状態とサブタイプのオンコプリント図、F: COSMIC 変異シグネチャーのヒートマップ図、G:HRD-LOH / HRD-NtAI / HRD-LST スコアのヒートマップ図。

SNV; 一塩基変異、CNV; コピー数異常、BAL; 両アレル機能消失、HR; 相同組換え、ER; エストロゲン受容体、PgR; プロゲステロン受容体、TN; トリプルネガティブ

#### 図 21 : HRD 腫瘍における特徴的なゲノムの変化 (TCGA)

TCGA 検体 *BRCA1* BAL、*BRCA2* BAL、HR quiescent、その他の 4 群間で SNV/indel/CNV の数とシグネチャー #3 の割合を比較した。*BRCA1/2* BAL 腫瘍は、HR-quiescent 腫瘍よりも *BRCA1/2* BAL 腫瘍で有意に増加していた。

BAL; 両アレル機能消失、HR; 相同組換え

*p* 値; Kruskal-wallis 検定

#### 図 22 : JFCR 検体の臨床病理学的特徴

JFCR 検体 *BRCA1* BAL、*BRCA2* BAL、HR quiescent、その他の検体 4 群間の初発乳がん発症年齢、サブタイプ、乳がん発症回数、組織型、核異型度

BAL; 両アレル機能消失、HR; 相同組換え、DCIS; 非浸潤性乳がん、TN; triple negative

#### 図 23 : TCGA 検体の臨床病理学的特徴

TCGA 検体 *BRCA1* BAL、*BRCA2* BAL、HR quiescent、その他の検体 4 群間の初発乳がん発症年齢、サブタイプ、乳がん発症状況、組織型、核異型度

BAL; 両アレル機能消失、HR; 相同組換え、DCIS; 非浸潤性乳がん、TN; triple negative

#### 図 24 : ゲノム変数 116 の相関

ゲノム変数間には相関がみられ、多重共線性が生じる原因となっていた。

#### 図 25 : JFCR 検体のゲノムの変化と BRCAness 予測値の結果

JFCR 検体で、*BRCA1/2* BAL、HR-quiescent、その他の検体の 3 群における BRCAness 予測値

と変数の結果をヒートマップで示した。上から、ラッソロジスティック回帰による BRCAness 予測値、モデルに選択された 3 つの変数 (HRD-LOH, シグネチャー#3, indel 数)、モデルに選択されなかった 113 の変数である。

*BRCA1/2* BAL と HR-quietescent でゲノムの特徴が異なることが可視化できた。更に、その他の腫瘍で BRCAness 予測値が高い検体は、*BRCA1/2* BAL とゲノムの特徴が似ていた。

#### 図 26 : TCGA 検体のゲノムの変化と BRCAness 予測値の結果

TCGA 検体で、*BRCA1/2* BAL、HR-quietescent、その他の検体の 3 群における BRCAness 予測値と変数の結果をヒートマップで示した。上から、ラッソロジスティック回帰による BRCAness 予測値、モデルに選択された 3 つの変数 (HRD-LOH, シグネチャー#3, indel 数)、モデルに選択されなかった 113 の変数である。

JFCR 検体と同様(図 25)の結果であり、*BRCA1/2* BAL と HR-quietescent でゲノムの特徴が異なること、その他の検体で BRCAness 予測値が高い検体は、*BRCA1/2* BAL とゲノムの特徴が似ていることが可視化できた。

#### 図 27 : JFCR 検体と TCGA 検体の HRD-LOH, シグネチャー #3, Indel 数のバイオリンプロット

A: JFCR 検体、B: TCGA 検体で、*BRCA1* BAL、*BRCA2* BAL、HR-quietescent、その他の検体の 4 群で、本研究のモデルに使用された 3 つの変数ごとのバイオリンプロット図である。

BAL; 両アレル機能消失 HR; 相同組換え

#### 図 28 : JFCR 検体と TCGA 検体の BRCAness 予測値のバイオリンプロット

JFCR、TCGA 検体の BRCAness 予測値のバイオリンプロット図。カットオフ値は 0.534 に設定した。幅広いスペクトルを呈しているが、カットオフ値による高い分別能を示した。その他の検体は、*BRCA1/2* BAL と HR-quietescent の中間位を呈していた。

BAL; 両アレル機能消失 HR; 相同組換え

#### 図 29 : BRCAness 予測値と遺伝型のオンコプリント図

JFCR 検体と TCGA 検体のその他の検体を、高 BRCAness 群と低 BRCAness 群 (カットオフ値 0.534) の 2 群に分けて、*BRCA1/2* または HBOC-HR 遺伝子のゲノムまたはエピジェネティック (メチル化) 変化についてオンコプリント図で示した。上から: BRCAness 予測値、*BRCA1* の高メチル化、*RAD51C* の高メチル化、生殖細胞系列病的変異、生殖細胞系列 VUS、体細胞 truncation 変異、体細胞 VUS、体細胞ホモ接合性欠失 (CN = 0)、体細胞ヘテロ接合性欠失 (CN = 1)

#### 図 30 : 遺伝型の BRCAness 予測値に対する群間比較

*BRCA1/2* または HBOC-HR 遺伝子のゲノムまたはエピジェネティック（メチル化）変化について、BRCAness 予測値と有意に相関があったものは、*BRCA1* または *RAD51C* の高メチル化と、*BRCA1/2* 以外の生殖細胞系列 HBOC-HR 遺伝子 BAL、体細胞ホモ接合性欠失であった。

BAL; 両アレル機能消失

*p* 値; Mann-Whitney U 検定

### 図 31 : 高 BRCAness および低 BRCAness 腫瘍の臨床病理学的特徴

JFCR 検体と TCGA 検体のその他の腫瘍で、高 BRCAness と低 BRCAness の病理学的特徴の群間比較。左 : サブタイプ、中央 : 核グレード、右 : 組織型

TN; トリプルネガティブ、DCIS; 非浸潤性乳管がん

*p* 値: Fisher 検定

### 図 32 : BRCAness 予測値と臨床病理学的特徴を照合した VUS の病原性評価のフローチャート

JFCR 検体と TCGA 検体のその他の腫瘍について、ヘテロ接合性の消失 (LOH) または体細胞変異 (AST) を伴う VUS 腫瘍を、高 BRCAness と低 BRCAness に分類した。このうち高 BRCAness 腫瘍は、*BRCA1* または *RAD51C* プロモーターの高メチル化、LOH または AST を伴う HBOC-HR 遺伝子生殖細胞系列病的変異、および *BRCA1/2* または HBOC-HR 遺伝子の体細胞ホモ接合性欠失の BRCAness を引き起こすゲノムの変化を伴うか否かによりカテゴリー1 とカテゴリー2 に分類した。更に、BRCAness の臨床病理学的特徴 (トリプルネガティブ、充実腺管がん、高核グレード) と照合し、潜在的な病原性を評価した。低 BRCAness 腫瘍も同様に臨床病理学的所見と照合し、潜在的な良性と評価した。それぞれのカテゴリーごとに判定例を提示した。

### 図 23 : 同じ患者由来の2つの腫瘍の SNV アレル頻度の相関図

2つの腫瘍での相関低く、独立した (転移ではない) 腫瘍と判断した。

### 図 33 : TCGA 検体の人種別 BRCAness 予測値

TCGA421 検体の BRCAness 予測値を、人種ごとに比較した。白人と黄色人種で有意差は認められなかった。

WHITE; 白人、BLACK; 黒人またはアフリカ系アメリカ人、ASIAN; アジア人、INDIAN; アメリカインディアンまたはアラスカ原住民

### 図 34 : *ATM* 両アレル機能消失 (BAL) と、*BRCA1/2* BAL (陽性コントロール)、HR-quiescent (陰性コントロール) の BRCAness 予測値の群間比較

*ATM* 両アレル機能消失 (BAL) 腫瘍の BRCAness 予測値は、HR-quiescent (陰性コントロール) 腫瘍の予測値と統計学的に有意差を認められなかった。

*p* 値 : Mann-Whitney U 検定



13. 図

図1. 研究デザイン：HBOC-HR 遺伝子の腫瘍形成過程と VUS の病原性評価。

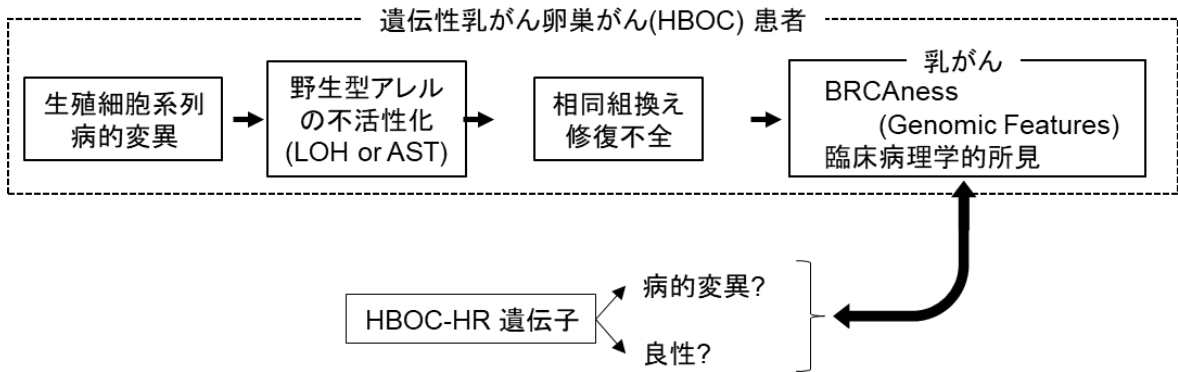


図2. 研究戦略：本研究の BRCAness モデルと VUS の病原性評価への応用

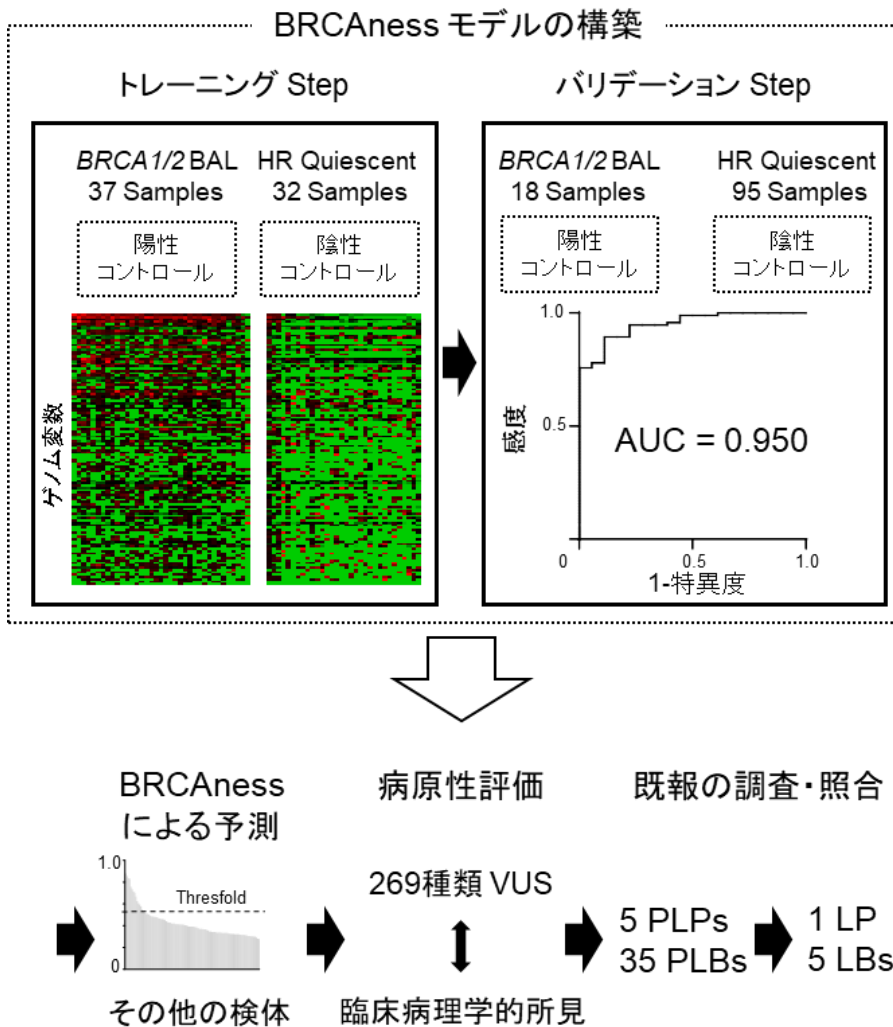


図 3. 生殖細胞系列と体細胞の変異型の分類

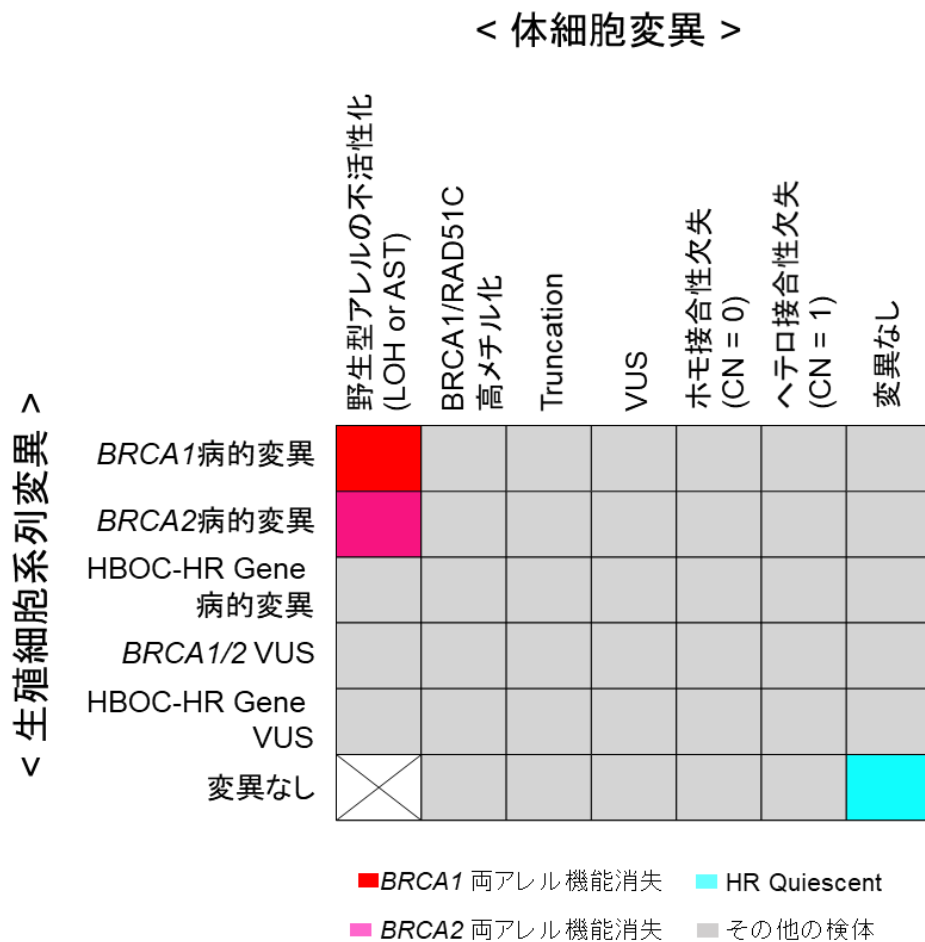


図 4. JFCR 検体の *BRCA1/RAD51C* メチル化のヒートマップ図

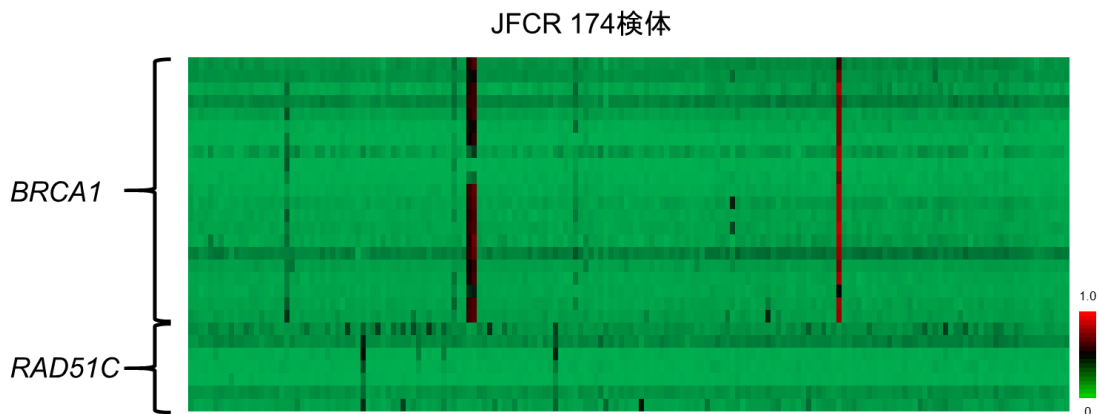


図 5. JFCR 検体の *BRCA1*, *RAD51C* メチル化 (平均値) のヒストグラム

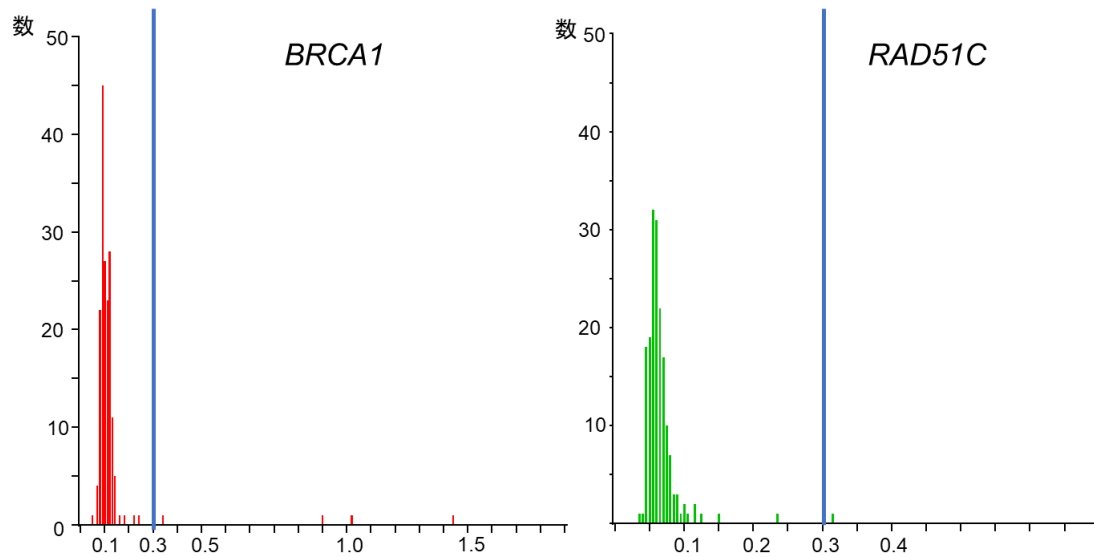


図 6. TCGA 検体の *BRCA1*/*RAD51C* メチル化のヒートマップ図

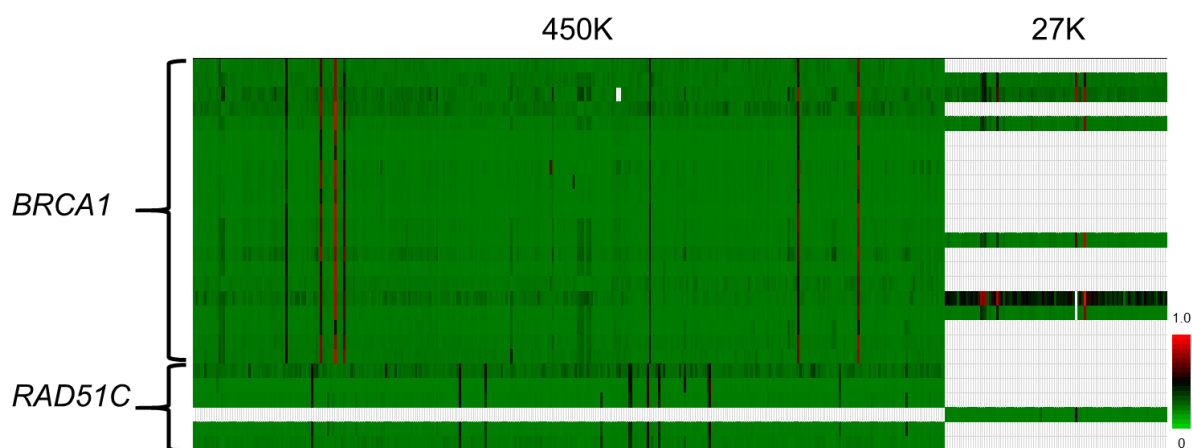


図 7. TCGA 検体(450K)の *BRCA1* メチル化プローブの相関

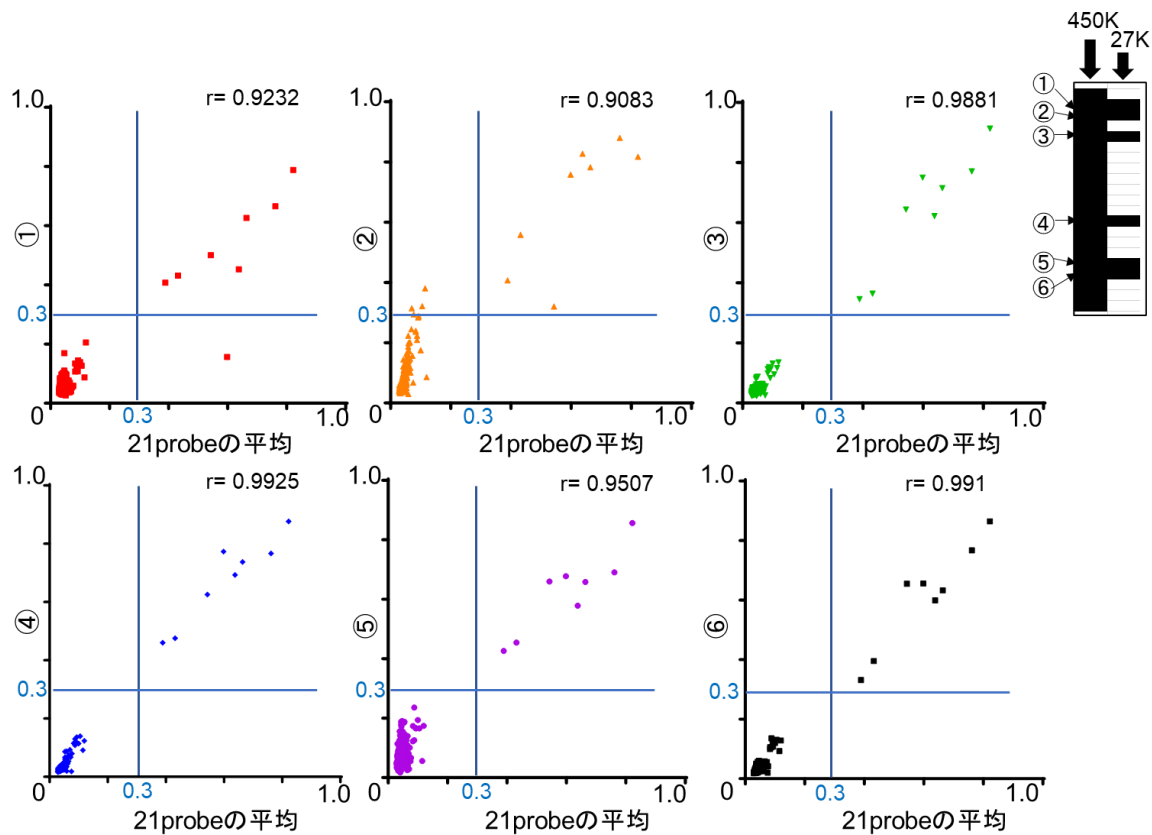


図 8. TCGA 検体で最終判定に使用したプローブの相関

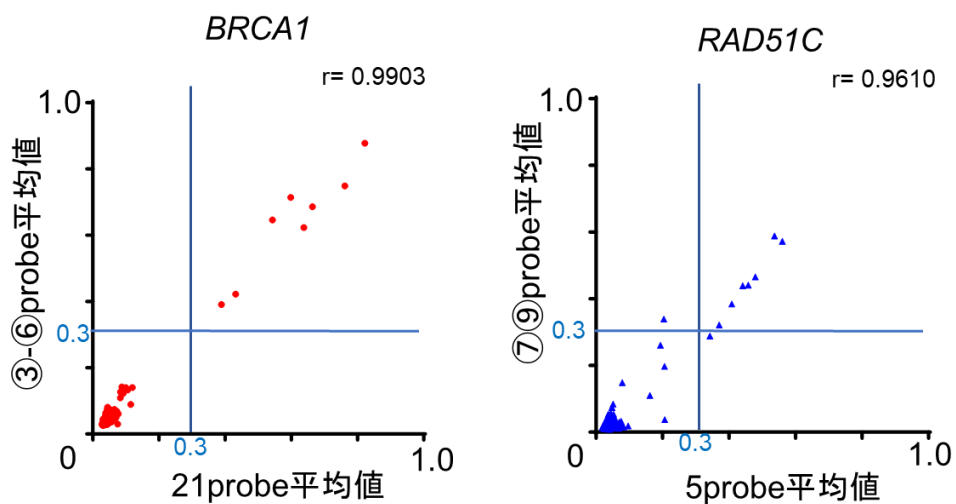


図 9. TCGA 検体(450K)の *RAD51C* メチル化 probe の相関

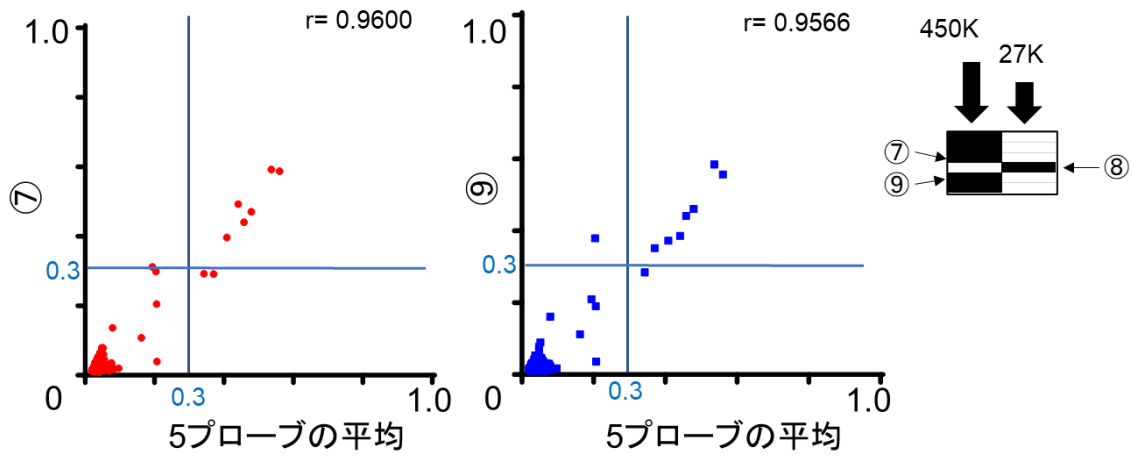


図 10. HRD 状態を示すスコア

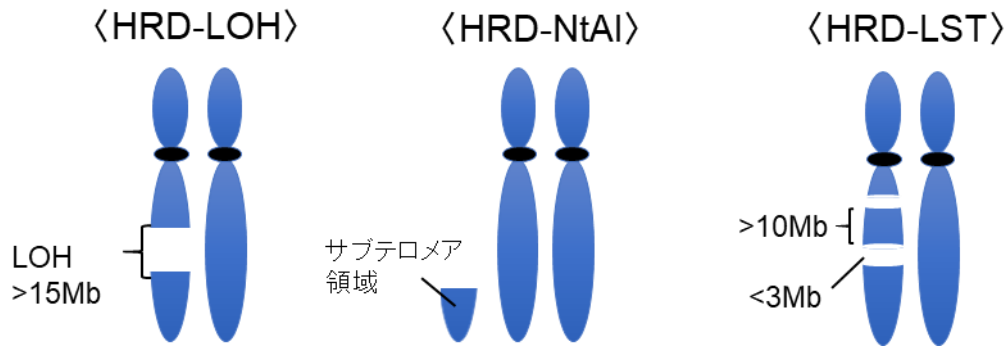


図 11. 機械学習によるモデルの構築

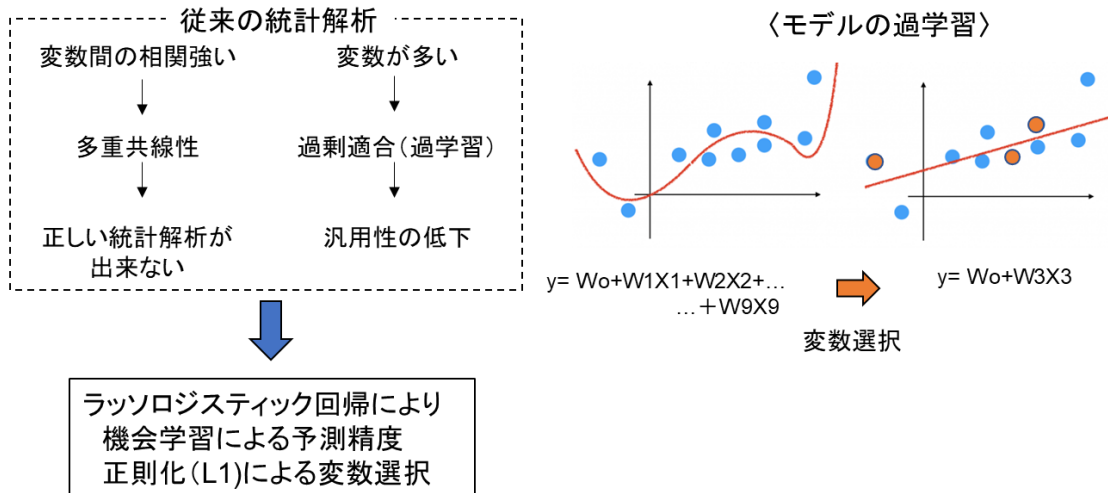


図 12. 予測値の ROC 曲線とカットオフ値 (Youden index)

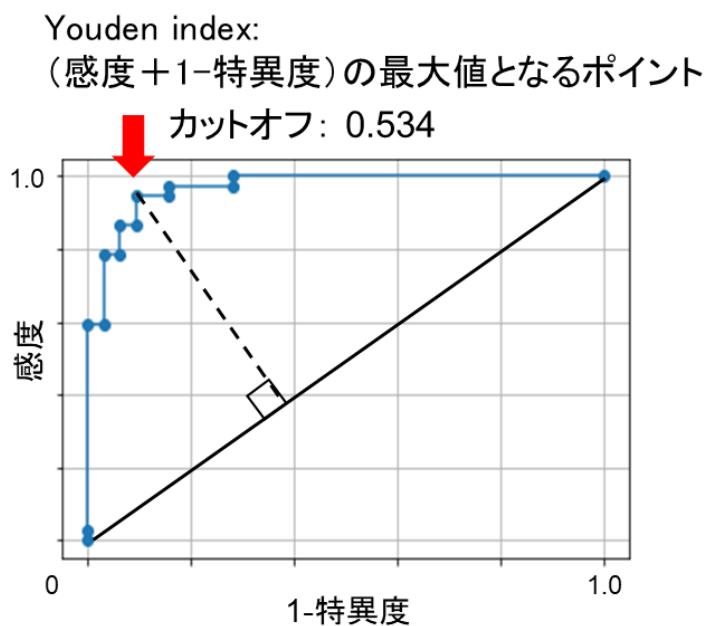


図 13. 本研究で使用した検体の品質管理

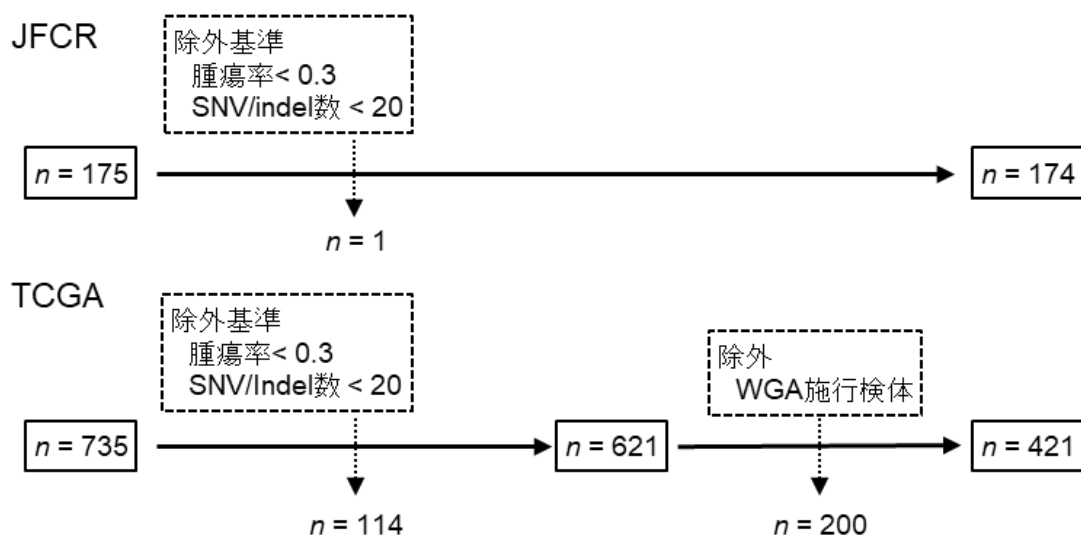


図 14. WGA の影響

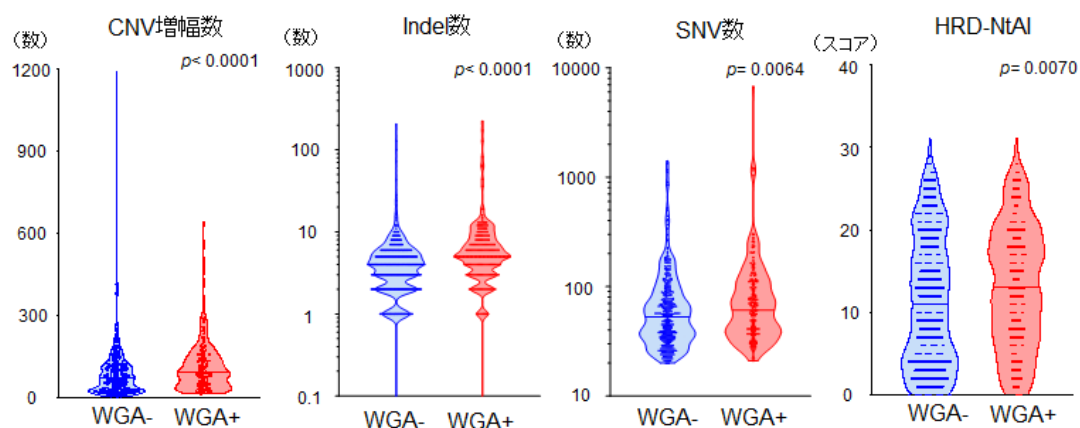


図 15. TCGA 421 検体の人種情報

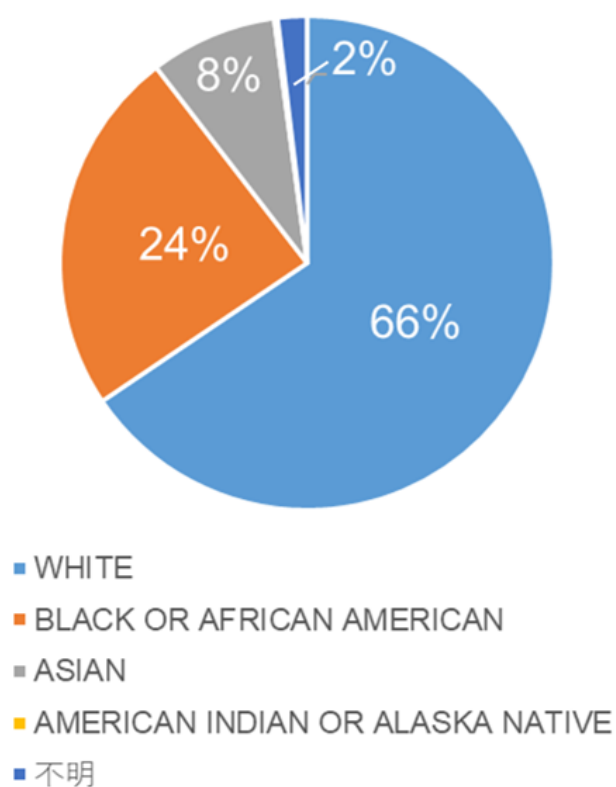


図 16. JFCR および TCGA コホートにおける *BRCA1/2* 両アレル機能消失を伴う腫瘍と HR quiescent 腫瘍の遺伝型の内訳

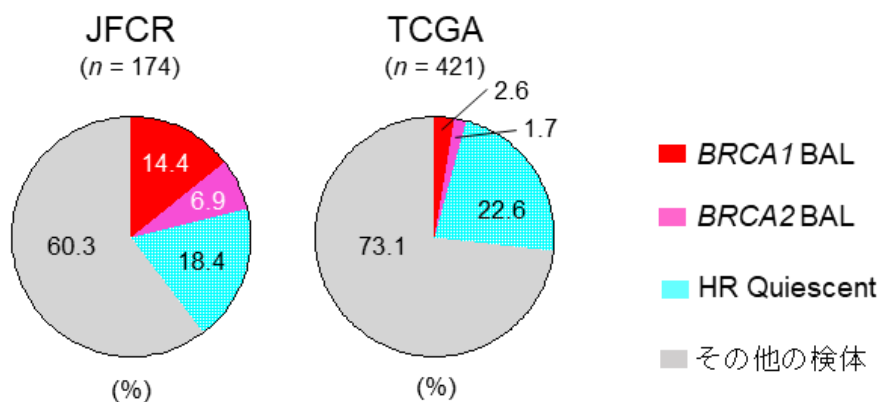


図 17. JFCR および TCGA 検体の内訳

**JFCR n= 174**

*n* = 37: *BRCA1/2* Biallelic Loss (陽性コントロール) } トレーニング  
*n* = 32: HR Quiescent (陰性コントロール) } コホート  
*n* = 105: Other Genomic Change

**TCGA n=421**

*n* = 18: *BRCA1/2* Biallelic Loss (陽性コントロール) } バリデーション  
*n* = 95: HR Quiescent (陰性コントロール) } コホート  
*n* = 308: Other Genomic Change

*n* = 413: BRCAness予測  
 (*n* = 251 with VUSs)



図 18. JFCR 検体のゲノム異常と病理学的所見のプロファイル

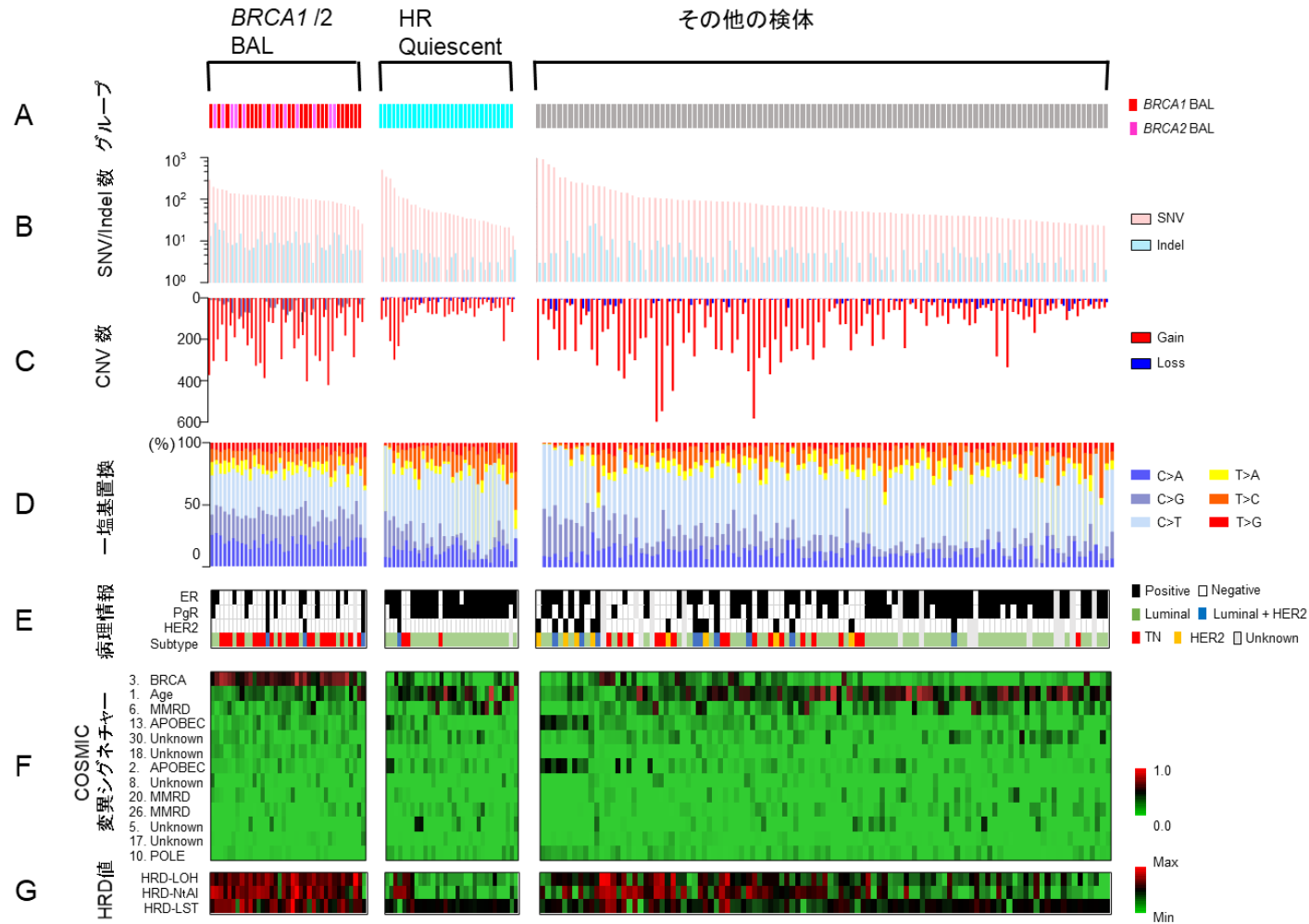


図 19. HRD 腫瘍における特徴的なゲノムの変化 (JFCR)

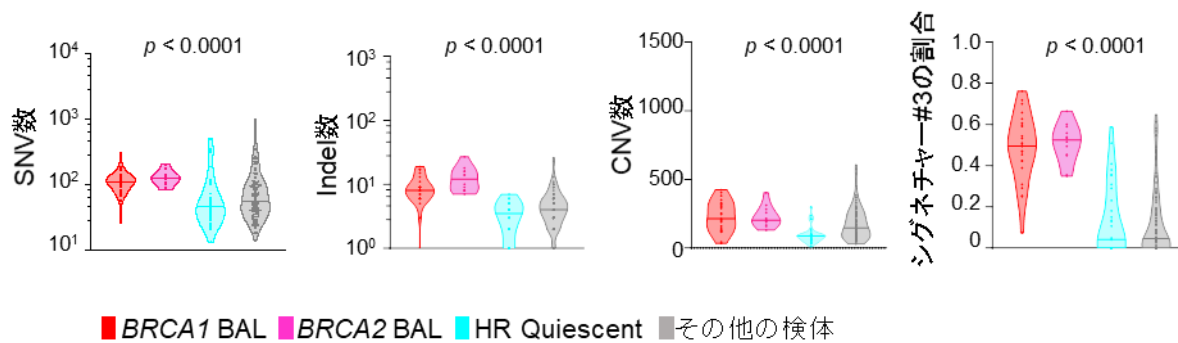


図 20. TCGA 検体のゲノム異常と病理学的所見のプロファイル

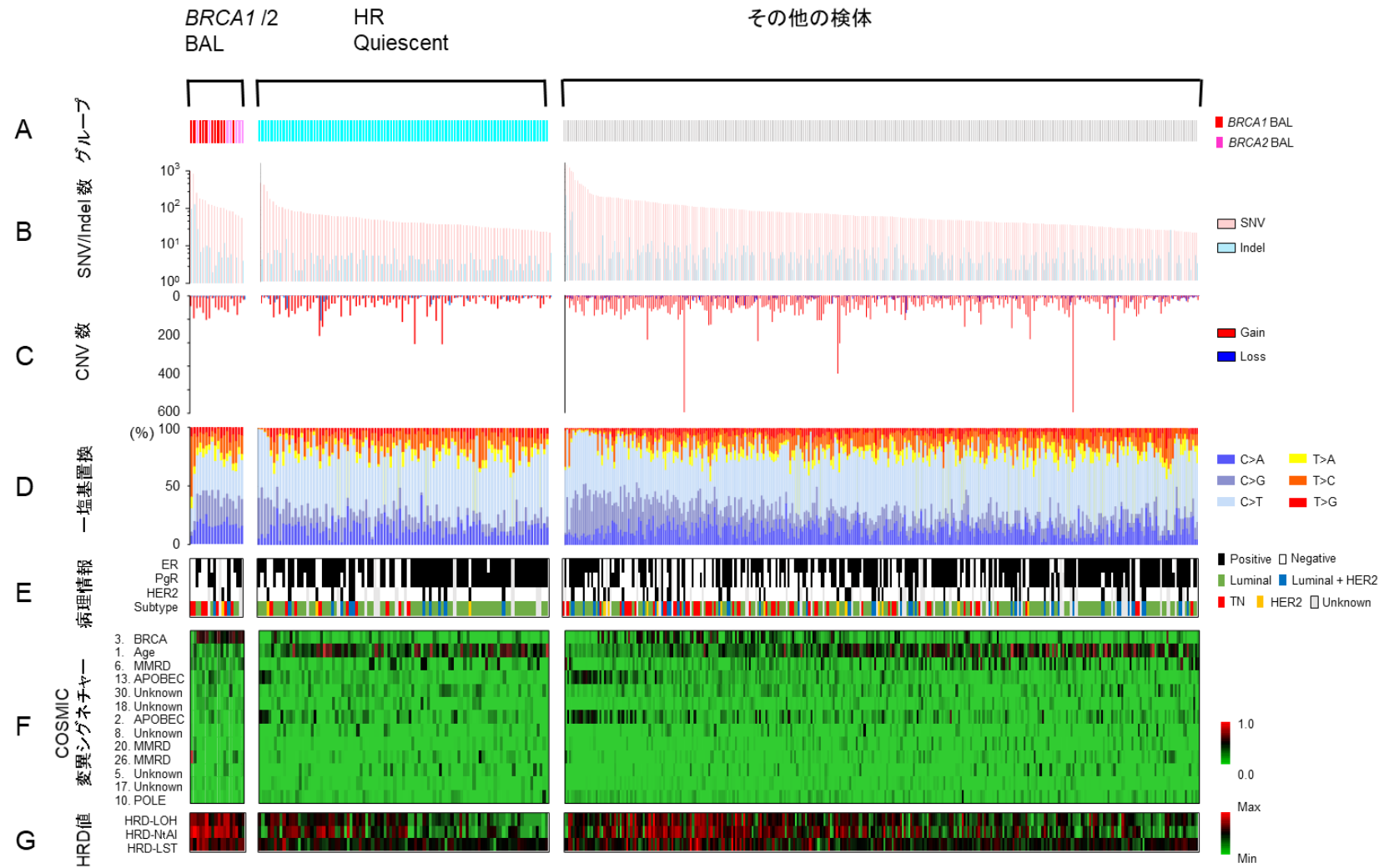


図 21. HRD 腫瘍における特徴的なゲノムの変化 (TCGA)

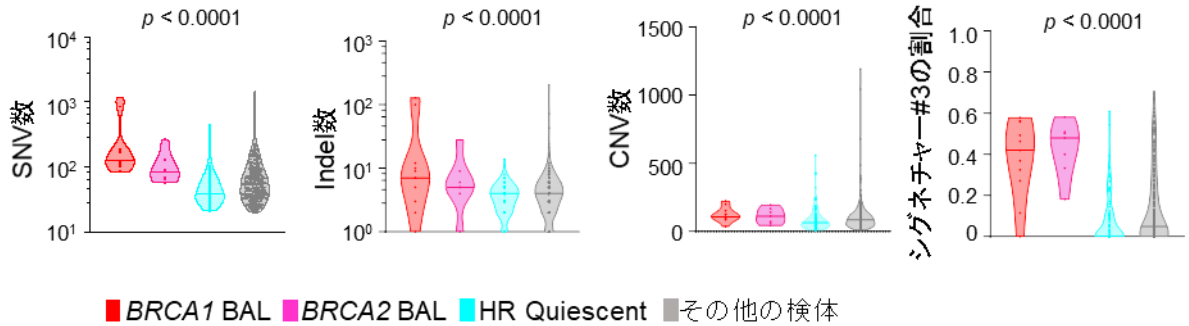


図 22. JFCR 検体の臨床病理学的特徴

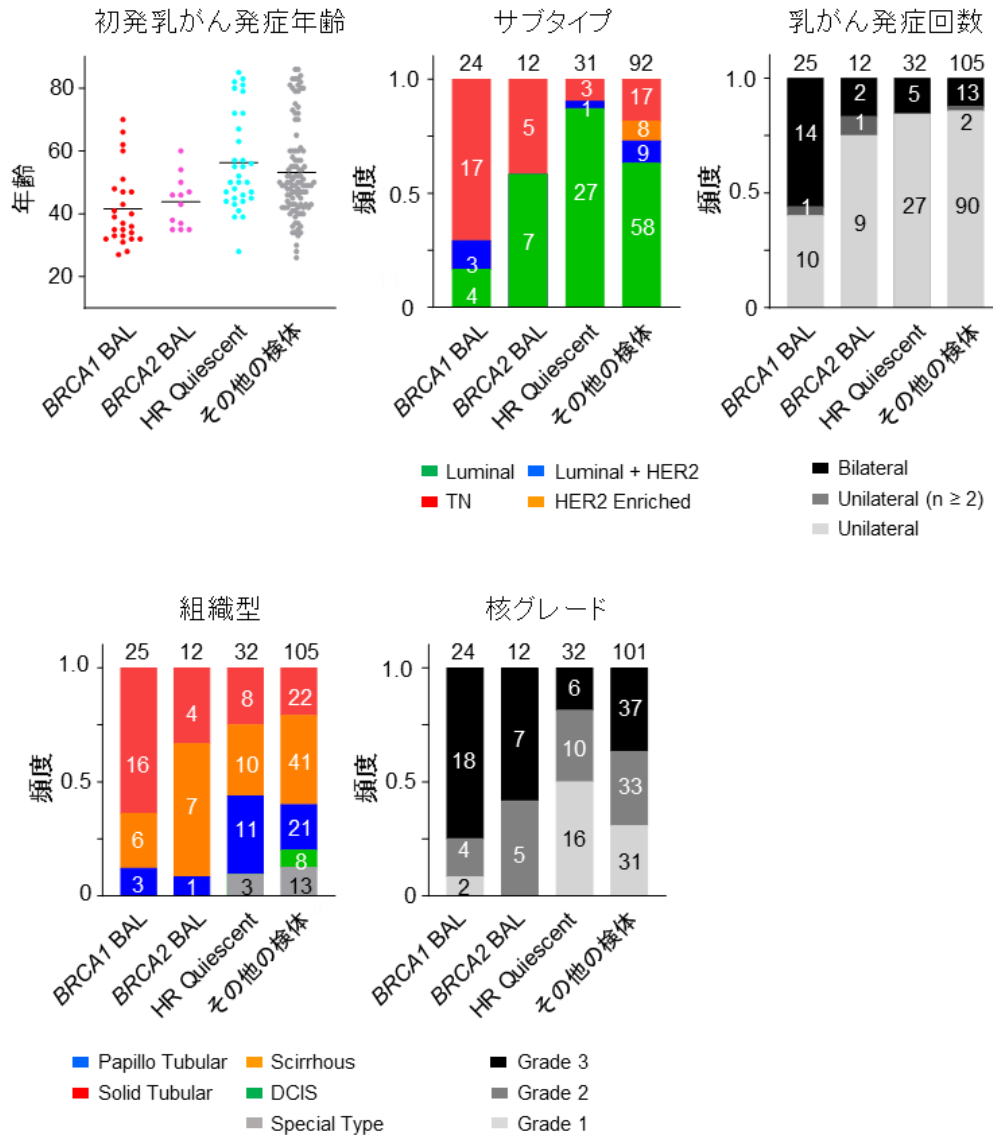


図 23. TCGA 検体の臨床病理学的特徴。

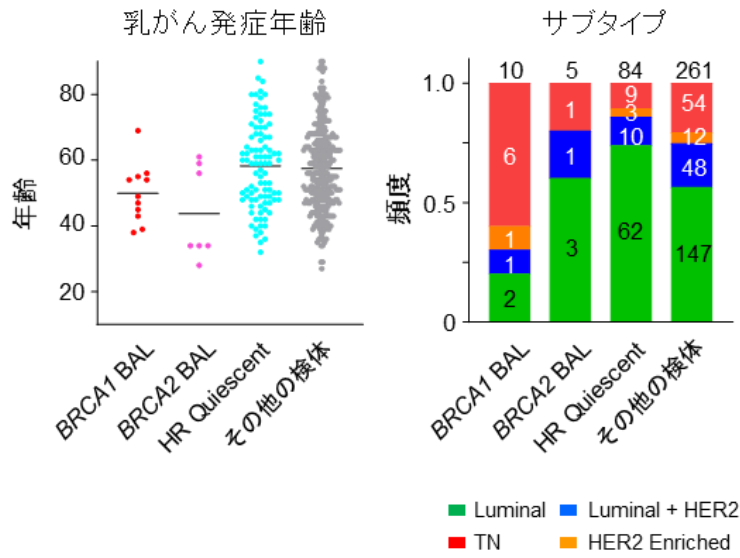


図 24. ゲノム変数 116 の相関

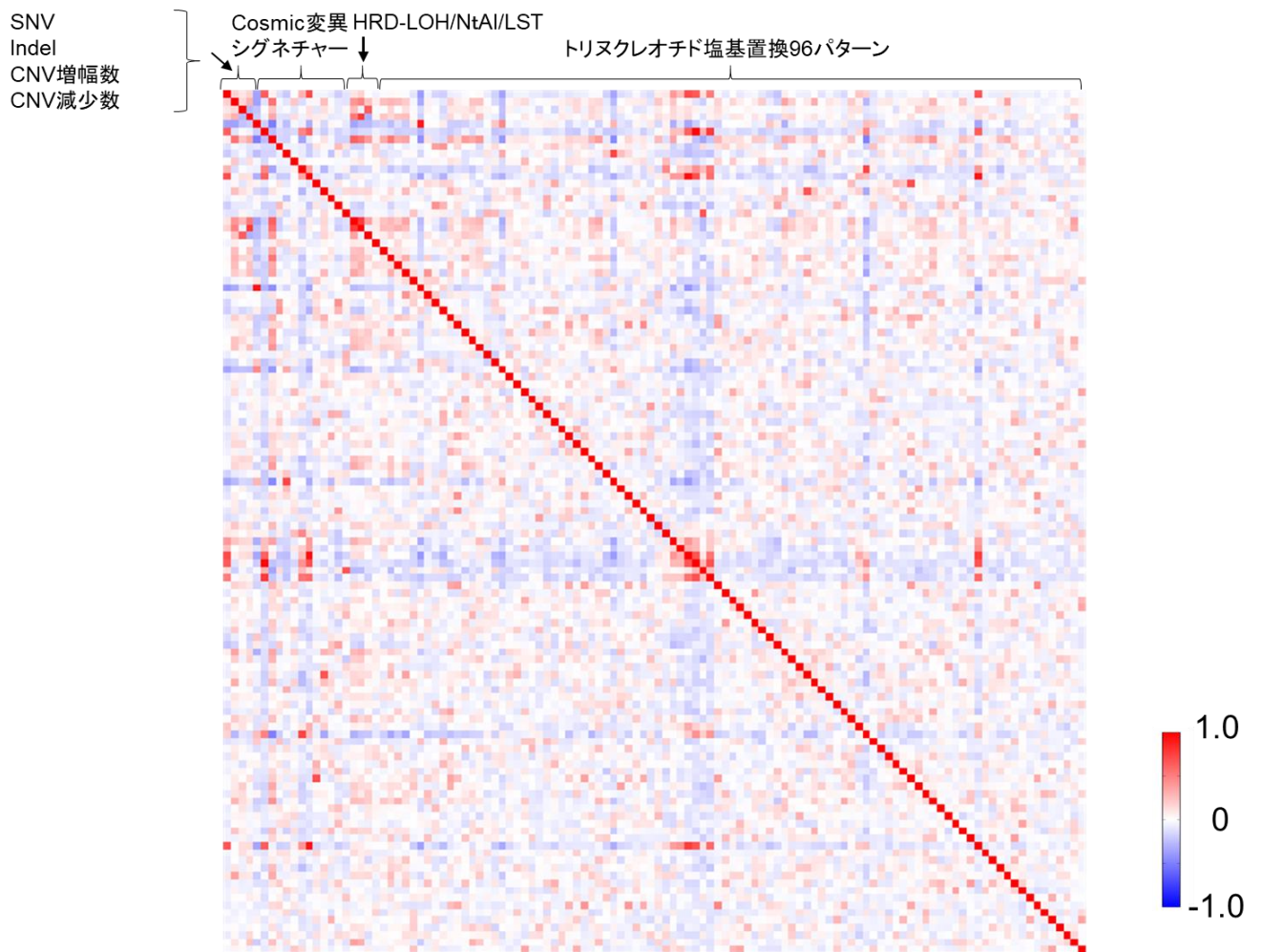


図 25. JFCR 検体のゲノムの変化と BRCAness 予測値の結果

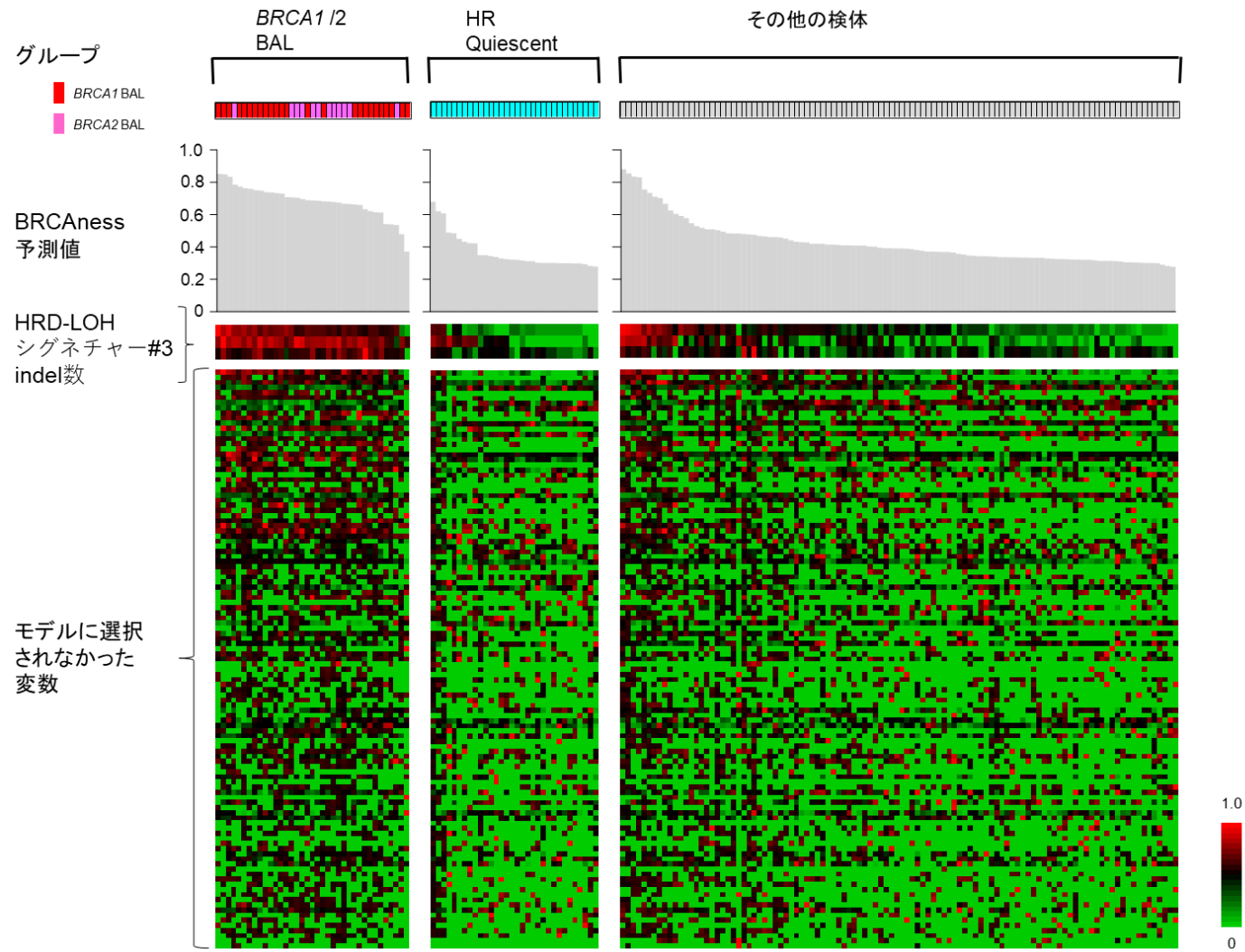


図 26. TCGA 検体のゲノムの変化と BRCAness 予測値の結果

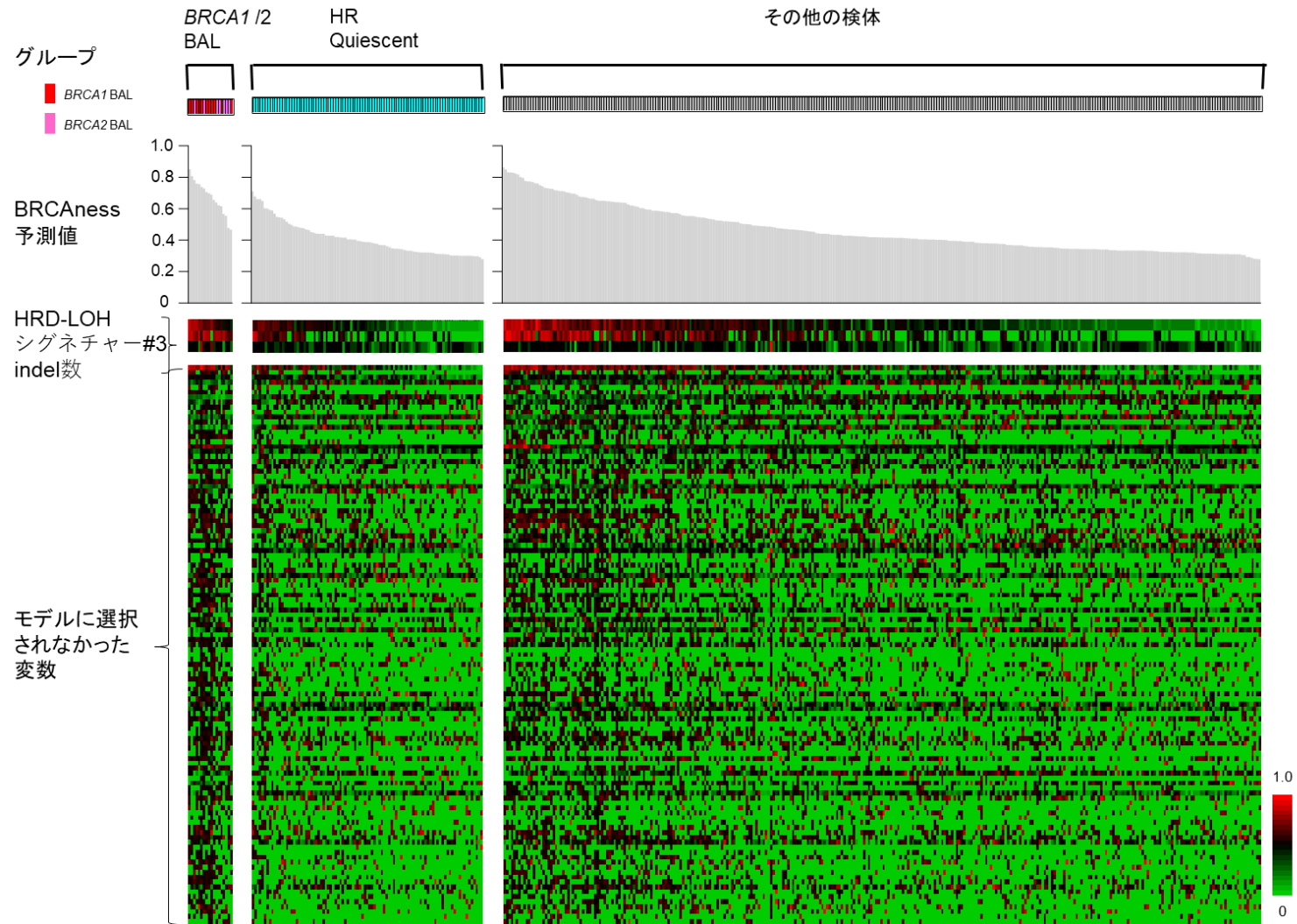
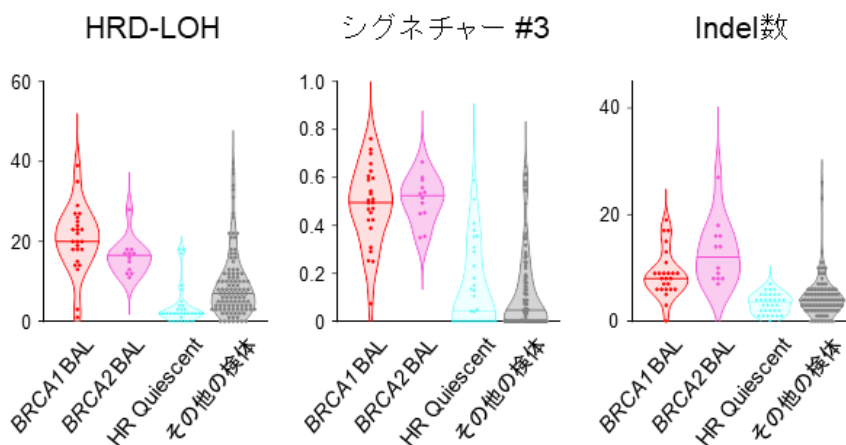


図 27. JFCR 検体と TCGA 検体の HRD-LOH, シグネチャー #3, Indel 数のバイオリンプロット

A. JFCR検体



B. TCGA検体

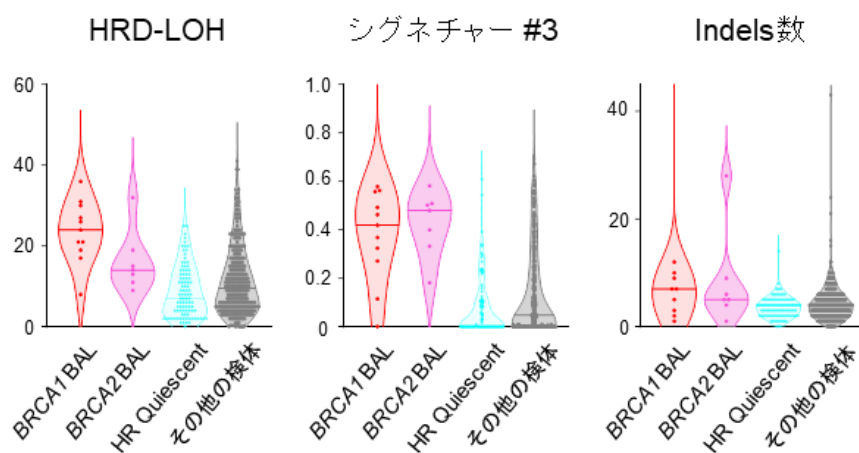




図 28. JFCR 検体と TCGA 検体の BRCAness 予測値のバイオリンプロット

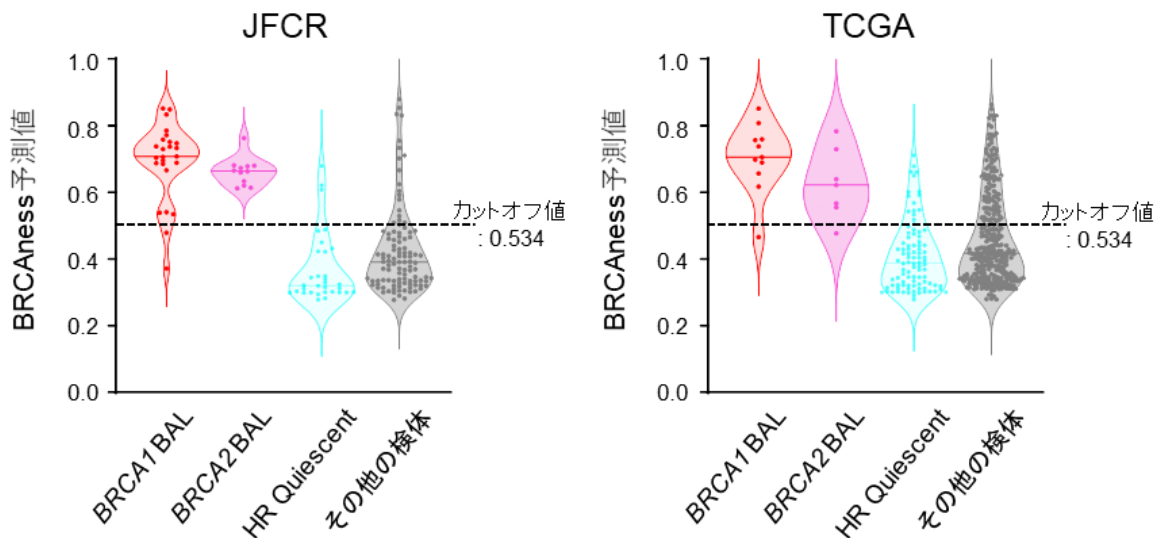


図 29. BRCAness の予測値と遺伝型のオンコプリント

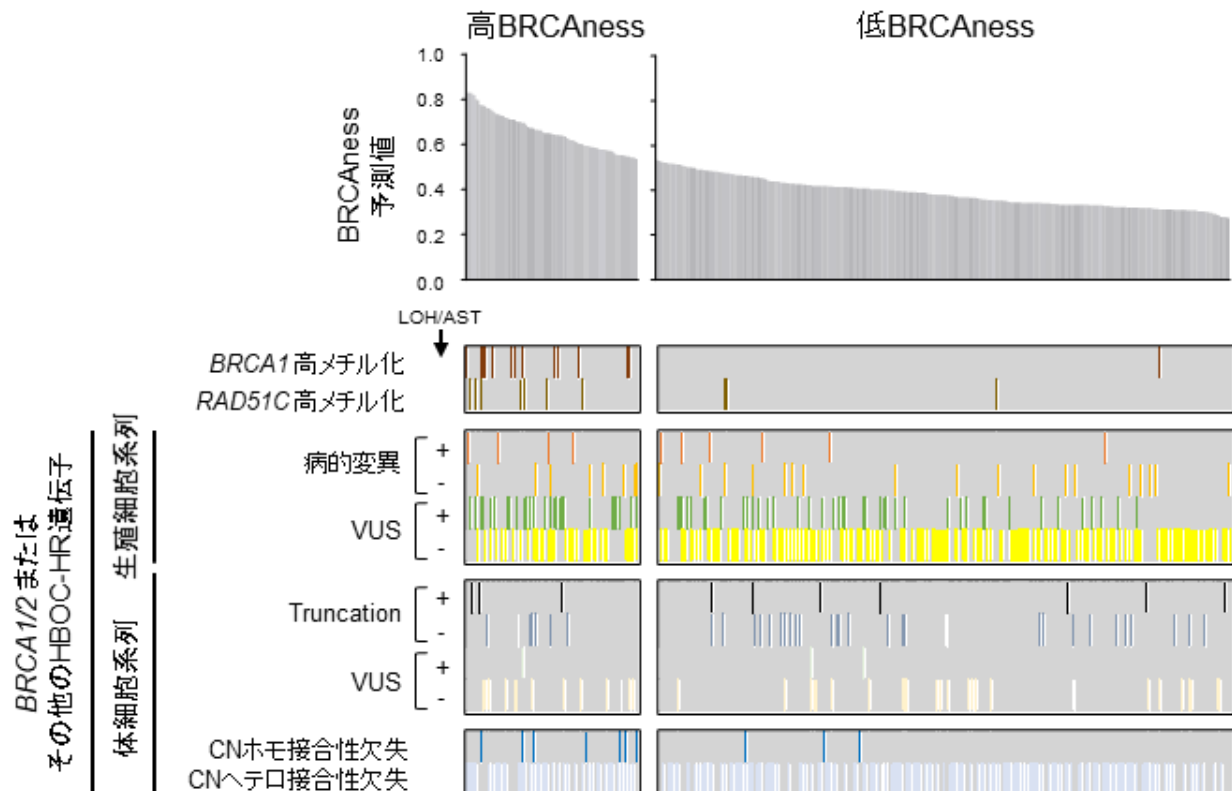


図 30. 遺伝型の BRCAness 予測値に対する群間比較

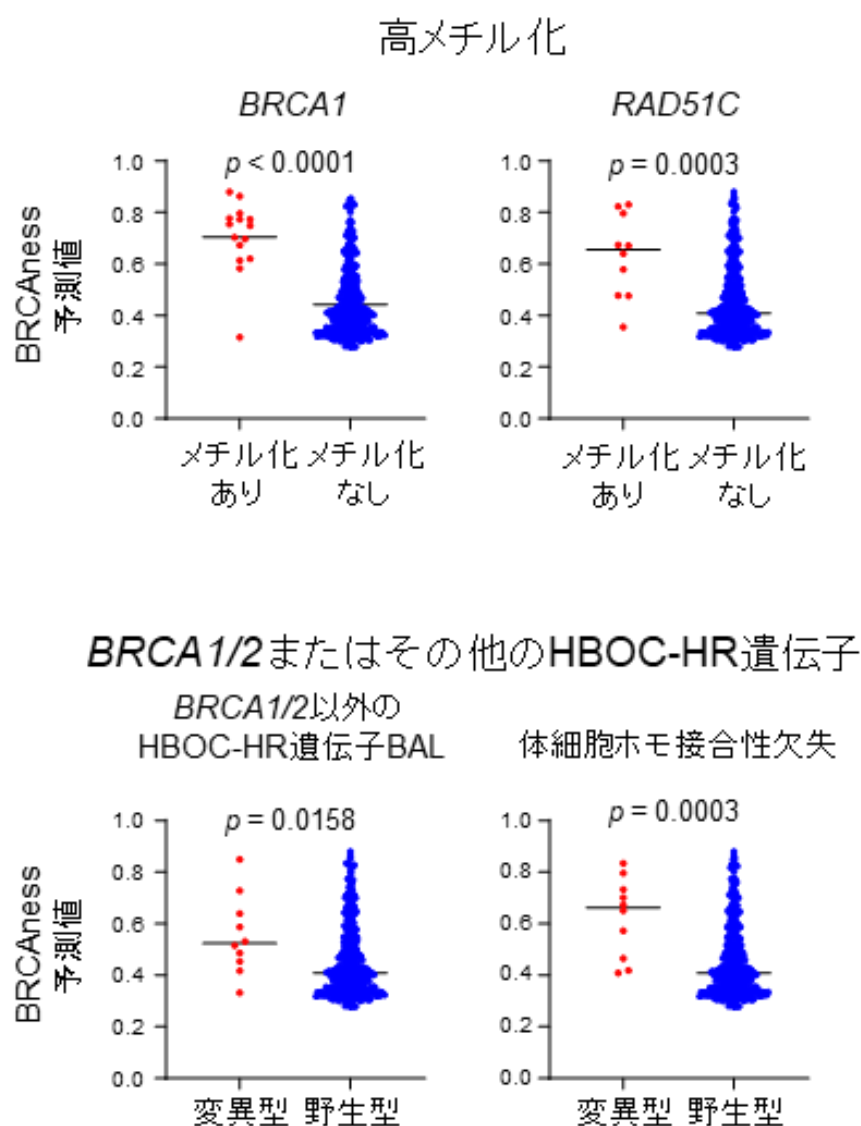


図 31. 高 BRCAness および低 BRCAness 腫瘍の臨床病理学的特徴

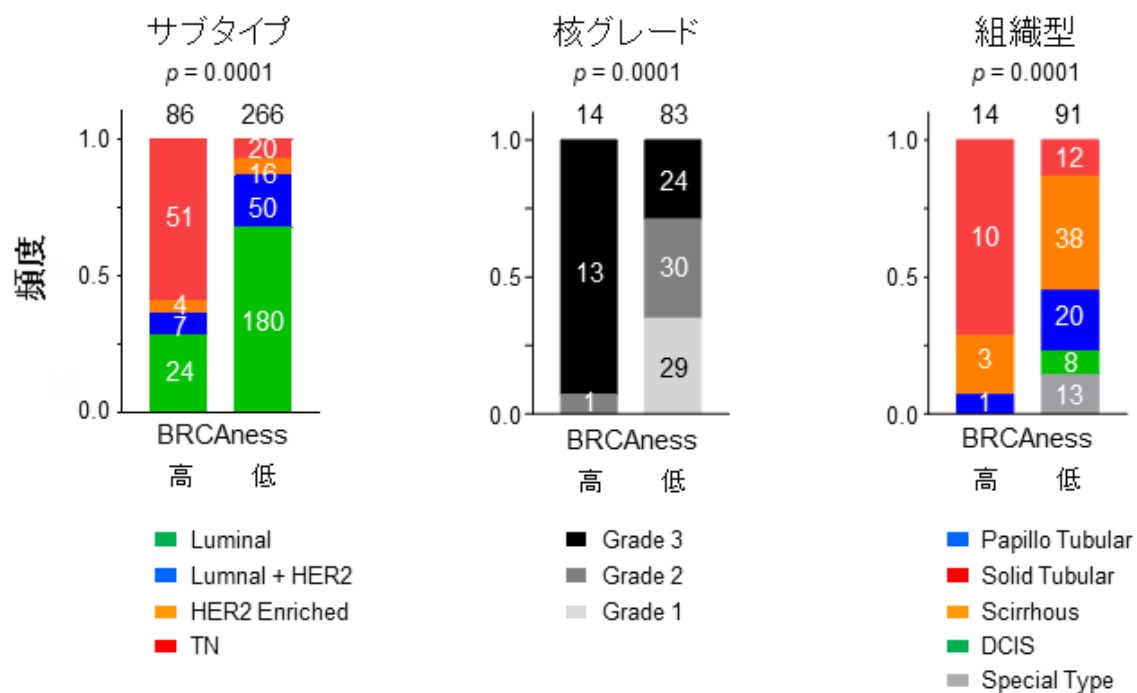


図 32. BRCAness 予測値と臨床病理学的特徴を照合した VUS の病原性評価のフローチャート

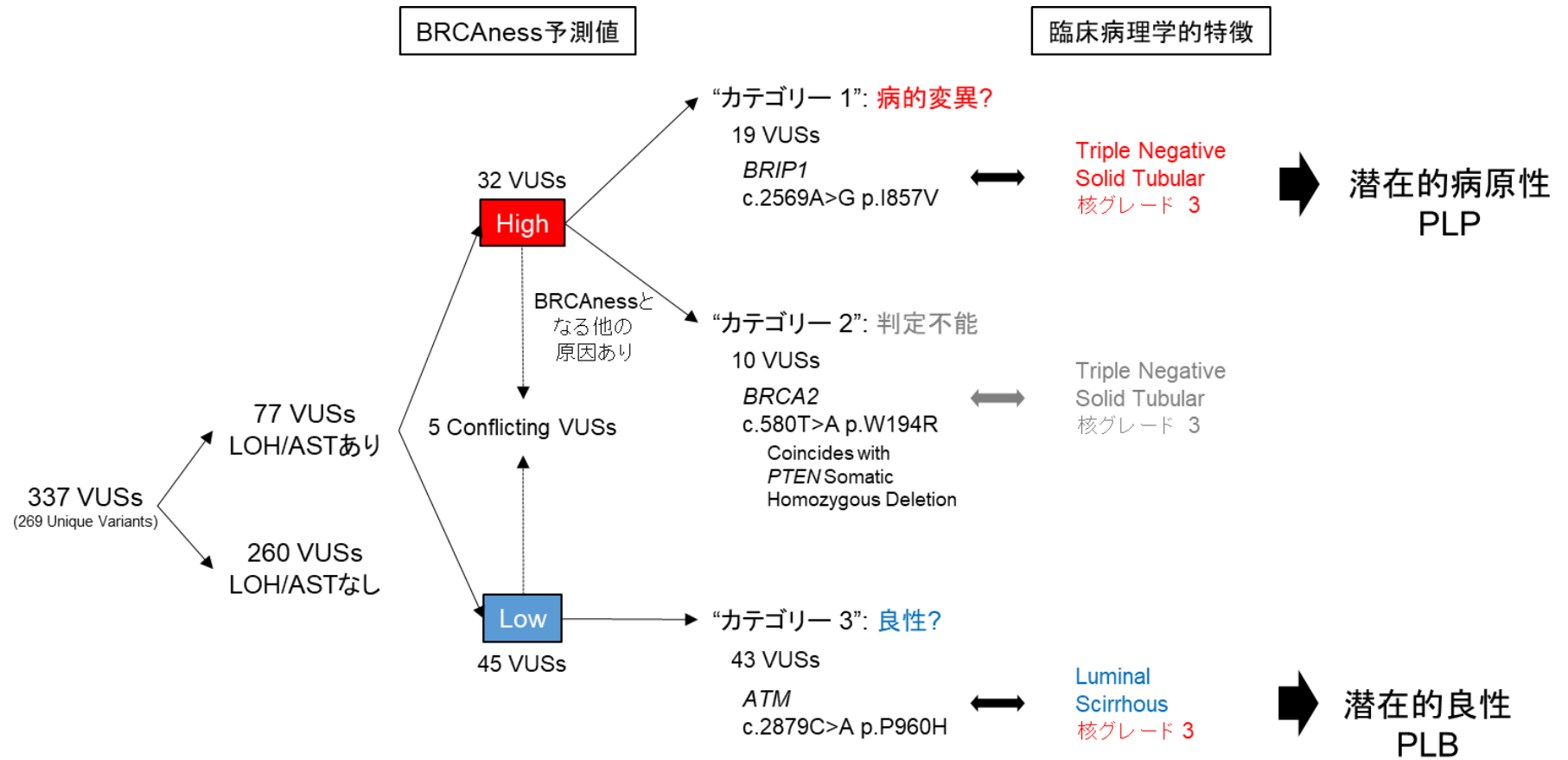


図 33. TCGA 検体の人種別 BRCAness 予測値

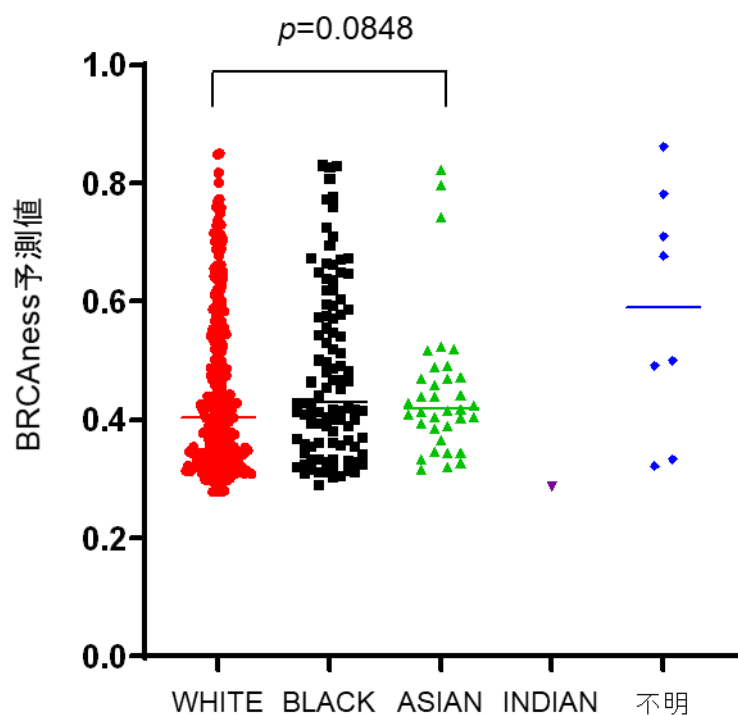
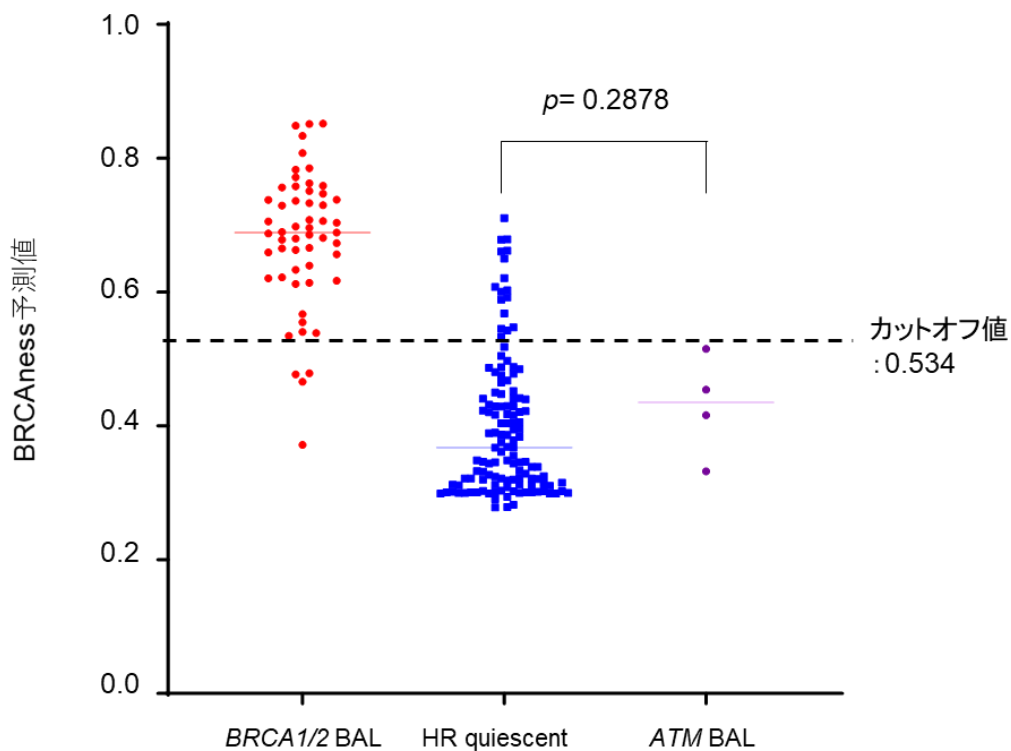


図 34. *ATM* 両アレル機能消失腫瘍 (BAL) と、*BRCA1/2* BAL (陽性コントロール)、HR-quiescent (陰性コントロール) の BRCAness 予測値の群間比較



#### 14. 表

表1. 本研究で使用したメチル化プローブ

遺伝子	染色体	Start	End	Probe ID	CpGアイランドとの関係	遺伝子との位置関係	JFCR	TCGA 450K	TCGA 27K	
<i>BRCA1</i>	chr17	41277006	41277007	cg12984107	N_Shore	Body;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277059	41277060	cg19531713	N_Shore	Body;5'UTR;TSS1500	✓	✓	✓	①
<i>BRCA1</i>	chr17	41277213	41277214	cg19088651	N_Shore	Body;5'UTR;TSS1500	✓	✓	✓	②
<i>BRCA1</i>	chr17	41277274	41277275	cg08386886	N_Shore	Body;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277322	41277323	cg08993267	N_Shore	1stExon;Body;5'UTR;TSS1500	✓	✓	✓	③
<i>BRCA1</i>	chr17	41277364	41277365	cg24806953	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277381	41277382	cg20187250	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277389	41277390	cg15419295	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277392	41277393	cg16963062	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277394	41277395	cg16630982	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277426	41277427	cg21253966	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277428	41277429	cg04110421	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277444	41277445	cg04658354	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR;TSS1500	✓	✓	✓	④
<i>BRCA1</i>	chr17	41277462	41277463	cg17301289	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277487	41277488	cg09441966	N_Shore	1stExon;TSS200;5'UTR	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277541	41277542	cg26891576	N_Shore	TSS200;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277580	41277581	cg20760063	N_Shore	TSS200;TSS1500	✓	✓	✓	⑤
<i>BRCA1</i>	chr17	41277694	41277695	cg10893007	N_Shore	TSS200;Body;TSS1500	✓	✓	✓	⑥
<i>BRCA1</i>	chr17	41277707	41277708	cg11126247	N_Shore	Body;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277730	41277731	cg12182452	N_Shore	Body;TSS1500	✓	✓		
<i>BRCA1</i>	chr17	41277847	41277848	cg09831010	N_Shore	Body;TSS1500	✓	✓		
<i>RAD51C</i>	chr17	58692469	58692470	cg23436779	N_Shore	5'UTR;Body;TSS1500	✓	✓		
<i>RAD51C</i>	chr17	58692543	58692544	cg27221688	Island	5'UTR;Body;TSS1500	✓	✓		
<i>RAD51C</i>	chr17	58692642	58692643	cg02118635	Island	5'UTR;Body;TSS1500	✓	✓		⑦
<i>RAD51C</i>	chr17	58692647	58692648	cg14837411	Island	5'UTR;Body;TSS1500	✓		✓	⑧
<i>RAD51C</i>	chr17	58692649	58692650	cg10487724	Island	5'UTR;Body;TSS1500	✓	✓		⑨
<i>RAD51C</i>	chr17	58692828	58692829	cg24099023	Island	5'UTR;Body;TSS1500	✓	✓		

chr; クロモソーム, N\_Shore; CpG アイランドの周辺部(<2kb), Island; CpG アイランド, TSS200; 転写開始部位 (Transcription start site: TSS) から 0~200 塩基上流の領域, TSS1500; TSS から上流 200~1500bp, 5' UTR (Untranslated region); TSS と開始部位との間の領域, 1stExon; 第1エクソン内の CpG, Body; 停止コドンまでのイントロン領域を含む第1エクソンの下流の CpG, 3' UTR; polyA までの停止コドンの下流に位置する CpG

表 2 WGA の影響を受けるゲノム変数 ( $p < 0.05$ )

変数名	$p$ 値
Indel数	1.03E-11
CNV増幅数	1.90E-05
CCT>CTT	0.000506
ACT>AAT	0.000675
シグネチャー #8	0.001222
ACC>ATC	0.0016
SNV数	0.006426
HRD-NtAI	0.006976
TTC>TGC	0.012317
ACA>AAA	0.013446
ACC>AAC	0.015384
CTA>CGA	0.023086
TCG>TTG	0.024197
ACT>ATT	0.02585
CCC>CTC	0.026619
GCA>GAA	0.035317

表 3. JGCR コホート

Tumor ID	初発乳がん発症年齢	乳がん発症回数	組織型	核異型度	ER	PgR	HER2	サブタイプ	採取年	家族性乳がん研究
MBC852	39	単発	充実腺管がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	1993	
MBC862	33	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	1993	
YP141T1	47	単発	乳頭腺管がん	3	陰性	陰性	陽性	HER2	1994	
YP062T1	51	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陽性	Luminal+HER	1995	
AZ07T1	28	両側	特殊型	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2004	✓
AZ12T1	35	両側	乳頭腺管がん	3	陽性	陰性	陰性	Luminal	2004	✓
YP067T1	50	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	HER2	1995	
YP140T1	55	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	1995	
MBC072	52	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1995	
YP063T1	47	単発	特殊型	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1995	
YP065T1	57	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1995	
AZ30T1	43	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2013	✓
YP064T1	45	単発	特殊型	2	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	1995	
YP073T1	55	単発	乳頭腺管がん	3	陰性	陰性	陽性	HER2	1996	
YP070T1	50	単発	乳頭腺管がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	1996	
YP068T1	49	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陽性	Luminal	1996	
YP072T1	47	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1996	
YP071T1	60	単発	特殊型	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1996	
YP074T1	47	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	1996	
YP069T1	37	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陽性	Luminal+HER	1996	
YP076T1	45	単発	充実腺管がん	1	陽性	陰性	陰性	Luminal	1997	
AZ37T1	50	両側	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	2012	✓
YP078T1	46	単発	乳頭腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	1997	
YP080T1	60	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	1997	
MBC092	47	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	1997	
MBC902	60	単発	硬がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	1997	
YP079T1	46	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1997	
MBC872	52	単発	充実腺管がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	1997	
YP077T1	58	単発	硬がん	2	陽性	陰性	陰性	Luminal	1997	
YP082T1	44	単発	充実腺管がん	2	陰性	陰性	陽性	HER2	1998	
AZ38T1	31	単発	硬がん	2	陽性	陰性	陽性	Luminal+HER	2010	✓
MBC062	52	両側	特殊型	2	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	1998	
AZ39T1	55	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2014	✓
YP083T1	56	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1998	
YP081T1	47	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1998	
YP139T1	48	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	1998	
MBC882	57	単発	充実腺管がん	2	陽性	陰性	陽性	Luminal+HER	1999	
MBC892	47	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	1999	
YP084T1	48	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	1999	
AZ40T1	36	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	不明	不明	2015	✓
AZ42T1	49	両側	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	2014	✓
AZ47T1	43	両側	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2012	✓
MBC022	40	単発	特殊型	3	陽性	陰性	陽性	Luminal+HER	2000	
AZ50T1	46	一側多発	硬がん	2	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2011	✓
AZ51T1	43	単発	乳頭腺管がん	2	陽性	陰性	陰性	Luminal	2004	✓
AZ64T1	67	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2014	✓
MBC912	70	単発	乳頭腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2001	
AZ65T1	61	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2011	✓
AZ67T1	74	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	2015	✓
MBC082	65	単発	特殊型	2	陽性	陰性	陰性	Luminal	2002	
MBC602	72	単発	特殊型	2	陽性	陰性	陰性	Luminal	2002	
AZ78T1	50	両側	乳頭腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2010	✓
MBC1102	50	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
AZ78T3	50	両側	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2010	✓
MBC1062	57	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陽性	HER2	2003	
MBC1362	43	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陽性	Luminal+HER	2003	
AZ80T1	35	両側	乳頭腺管がん	1	陽性	陰性	陰性	Luminal	2008	✓
MBC1082	60	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2003	



表 3. JGCR コホート(続き 1)

Tumor ID	初発乳がん発症年齢	乳がん発症回数	組織型	核異型	ER	PgR	HER2	サブタイプ	採取年	家族性乳がん研究
AZ81T1	27	一側多発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2000	✓
AZ91T1	36	両側	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	2015	✓
MBCL072	75	単発	硬がん	3	陽性	陰性	陰性	Luminal	2003	
MBCL052	50	単発	硬がん	3	陽性	陰性	陽性	Luminal+HER	2003	
AZ92T1	36	単発	乳頭腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2018	✓
MBCL112	52	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2003	
MBCL132	54	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
MBCL022	73	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
MBCL032	50	単発	乳頭腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	HER2	2003	
MBCL122	46	単発	乳頭腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
MBCL342	52	単発	硬がん	2	陰性	陽性	陰性	Luminal	2003	
AZ97T1	47	両側	硬がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	1995	✓
AZ94T1	47	両側	硬がん	3	陽性	陰性	陰性	Luminal	1998	✓
MBC032	41	単発	乳頭腺管がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
MBCL042	50	単発	乳頭腺管がん	1	陰性	陽性	陰性	Luminal	2003	
MBCL012	34	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
AZ95T1	34	単発	充実腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2015	✓
AZ97T1	70	単発	充実腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2014	✓
MBCL252	54	単発	特殊型	3	陰性	陰性	陽性	HER2	2004	
AA03T1	37	一側多発	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	2006	✓
MBCL242	60	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2004	
MBC052	54	単発	硬がん	3	陽性	陰性	陰性	Luminal	2004	
MBCL262	35	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2004	
AA05T1	49	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2016	✓
AA13T1	41	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	✓
MBC112	57	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2004	
MBCL282	51	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal+HER	2004	
MBCL292	55	単発	乳頭腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2004	
MBCL222	41	単発	硬がん	3	陽性	陰性	陰性	Luminal	2004	
AA22T1	70	両側	充実腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2014	✓
AA25T1	43	単発	特殊型	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2013	✓
MBCL302	72	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	2004	
AA27T1	37	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2017	✓
MBCL272	55	単発	硬がん	1	陽性	陰性	陰性	Luminal	2004	
MBCL322	63	単発	充実腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2004	
AA39T1	44	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2011	✓
AA41T1	60	単発	硬がん	2	陽性	陰性	陰性	Luminal	2013	✓
AA42T1	44	両側	特殊型	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2007	✓
AA43T1	57	単発	硬がん	1	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	✓
MBC042	30	単発	充実腺管がん	1	陽性	陰性	陰性	Luminal	2007	
AA45T1	43	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2016	✓
AA49T1	40	両側	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2013	✓
AA52T1	45	両側	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	2001	✓
AA57T1	45	単発	乳頭腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2017	✓
AA67T1	42	両側	充実腺管がん	2	陽性	陽性	陽性	Luminal+HER	2016	✓
AA67T3	42	両側	乳頭腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2016	✓
AA69T1	50	両側	充実腺管がん	2	陽性	陰性	陰性	Luminal	2018	✓
AA70T1	66	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	✓
AA73T1	35	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	2017	✓
AA78T1	49	単発	特殊型	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2017	✓
AA82T1	28	一側多発	乳頭腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	✓
AA84T1	55	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2017	✓
AA86T1	72	単発	充実腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2017	✓
AA87T1	42	単発	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	2018	✓
AA89T1	49	単発	特殊型	2	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	✓
AA90T1	52	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2012	✓
AA92T1	49	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2017	✓
AA93T1	42	単発	特殊型	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2015	✓
AA95T1	48	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2011	✓

表 3. JGCR コホート(続き 2)

Tumor ID	初発乳がん発症年齢	乳がん発症回数	組織型	核異型	ER	PgR	HER2	サブタイプ	採取年	家族性乳がん研究
AB01T1	43	単発	乳頭腺管がん	2	陽性	陰性	陰性	Luminal	2011	✓
AB02T1	46	単発	特殊型	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2000	✓
AB03T1	42	両側	非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん						2017	✓
AB03T3	42	両側	非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん						2017	✓
AB06T1	34	単発	硬がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2018	✓
AB09T1	48	単発	充実腺管がん	3	陽性	陽性	陽性	Luminal+HER	2018	✓
AB16T1	39	単発	乳頭腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2018	✓
AC31T1	40	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2009	✓
AC42T1	72	単発	充実腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2017	✓
AI45T1	43	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2004	✓
MC882T1	39	単発	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2014	
AI46T2	60	両側	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2003	✓
AI46T1	47	両側	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2003	✓
AI47T1	46	両側	硬がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2018	✓
AI50T1	43	単発	硬がん	1	陽性	陰性	陰性	Luminal	2009	✓
AI51T1	26	両側	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2011	✓
AI54T1	41	両側	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2011	✓
AI55T1	62	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2011	✓
AI58T1	48	単発	充実腺管がん	2	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2012	✓
AI59T1	28	両側	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2012	✓
AI60T1	51	両側	硬がん	不明	陽性	陽性	陽性	Luminal+HER	2013	✓
AI61T1	33	両側	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2013	✓
AI62T1	38	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	2014	✓
5M529T1	49	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	
AI63T1	32	両側	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2015	✓
AI64T1	35	単発	硬がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2015	✓
AI65T1	33	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2015	✓
AI66T1	37	両側	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	✓
5M600T1	40	両側	乳頭腺管がん	2	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	
AI67T1	32	両側	硬がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	✓
AI68T1	49	単発	硬がん	2	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	✓
AI69T1	35	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2016	✓
AI71T1	86	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	1998	
AI72T1	86	単発	乳頭腺管がん	3	陰性	陰性	陽性	HER2	2002	
AI73T1	85	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陰性	不明	不明	2003	
8M260T1	54	単発	硬がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2017	
8M367T1	34	単発	充実腺管がん	3	陽性	陰性	陰性	Luminal	2017	
AI74T1	84	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	1995	
8M214T1	39	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2017	
AI75T1	83	単発	充実腺管がん	3	陽性	陽性	陽性	Luminal+HER	1995	
AI76T1	83	単発	充実腺管がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	1997	
AI77T1	83	単発	硬がん	2	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
AI78T1	83	単発	充実腺管がん	1	不明	不明	不明	不明	2004	
8M145T1	32	両側	乳頭腺管がん	3	陽性	陽性	陽性	Luminal+HER	2017	
AI80T1	82	単発	充実腺管がん	3	不明	不明	不明	不明	2000	
AI81T1	82	単発	充実腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
AI82T1	81	単発	硬がん	2	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2003	
AI83T1	80	単発	乳頭腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2004	
AI84T1	80	単発	硬がん	1	陰性	陽性	陰性	Luminal	2000	
AI86T1	81	単発	硬がん	3	不明	不明	不明	不明	2005	
AI87T1	80	単発	乳頭腺管がん	1	不明	不明	不明	不明	2003	
AI88T1	81	単発	硬がん	3	陽性	陽性	陰性	Luminal	2003	
AI90T1	79	単発	特殊型	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2004	
8M452T1	40	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2018	
AI91T1	79	単発	充実腺管がん	1	陽性	陽性	陰性	Luminal	2001	
AI92T1	79	単発	充実腺管がん	3	陰性	陰性	陰性	Triple Negative	2001	
AI94T1	80	単発	充実腺管がん	2	不明	不明	不明	不明	2003	

表 4. TCGA コホート

症例 ID	乳がん発症年齢	サブタイプ	人種	症例 ID	乳がん発症年齢	サブタイプ	人種
TCGAARA0TU	35	Triple Negative	不明	TCGALLA7T0	70	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAAOA124	38	Triple Negative	WHITE	TCGABHA0C7	48	Luminal+HER2	WHITE
TCGAA7A0DA	62	Triple Negative	WHITE	TCGAS3AA14	47	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAB6A400	43	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGABHA0E9	53	Luminal	WHITE
TCGALLA8F5	61	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAWTAB41	55	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAS3AA10	65	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAARA1AN	46	Luminal	WHITE
TCGAC8A27B	48	Triple Negative	ASIAN	TCGABHA18H	63	Luminal+HER2	WHITE
TCGAE2A14N	37	Triple Negative	WHITE	TCGAC8A137	34	HER2	ASIAN
TCGAA7A4SE	54	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGABHA0B0	56	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAB6A0X1	48	不明	WHITE	TCGAE2A150	89	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAC8A134	52	不明	ASIAN	TCGAC8A1HF	48	Luminal+HER2	ASIAN
TCGAHNA2NL	56	Triple Negative	不明	TCGAB6A0RL	60	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAA7A6VY	48	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGABHA0DQ	42	Luminal	WHITE
TCGAARA0U1	36	Triple Negative	WHITE	TCGAE9A22B	71	Luminal	WHITE
TCGABHA0AV	52	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAB6A0RH	51	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGABHA0WA	82	Triple Negative	WHITE	TCGABHA0DX	62	Luminal	WHITE
TCGALLA73Y	67	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAC8A12M	70	Luminal	ASIAN
TCGAARA1AQ	49	Triple Negative	WHITE	TCGAC8A12O	50	Luminal	ASIAN
TCGAE9A22G	47	HER2	WHITE	TCGAE9A1RD	67	不明	WHITE
TCGAEWA1P4	43	Triple Negative	WHITE	TCGAE2A155	58	Luminal	WHITE
TCGAARA0TP	43	Luminal	WHITE	TCGAD8A1XY	74	Luminal+HER2	WHITE
TCGAC8A12K	80	不明	ASIAN	TCGALLA5YL	64	Luminal+HER2	WHITE
TCGAD8A1XQ	69	Triple Negative	WHITE	TCGAA2A04W	50	HER2	WHITE
TCGAE2A158	43	Triple Negative	WHITE	TCGAE9A1R6	63	不明	WHITE
TCGABHA0BZ	59	Luminal	WHITE	TCGAE2A14V	53	Luminal+HER2	WHITE
TCGAD8A1XW	53	Luminal	WHITE	TCGAC8A1HN	56	不明	ASIAN
TCGAACA6IW	73	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGALLA5YN	46	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAACA5E1	88	Luminal	WHITE	TCGAAOA12D	43	HER2	WHITE
TCGAD8A143	51	Triple Negative	WHITE	TCGAACA7VB	51	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGABHA0BP	76	Luminal	WHITE	TCGAEWA6SA	59	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGABHA5IZ	51	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE2A14Y	35	Luminal+HER2	WHITE
TCGAE2A1LA	59	Luminal	不明	TCGAE2A152	56	Luminal+HER2	WHITE
TCGAE9A5FL	65	Triple Negative	WHITE	TCGAE9A5UO	41	不明	WHITE
TCGAARA24Q	49	Luminal	WHITE	TCGAANA0XV	67	Luminal+HER2	WHITE
TCGAARA0TS	46	Triple Negative	WHITE	TCGAE2A10C	54	Luminal	WHITE
TCGAE2A1II	51	Luminal	WHITE	TCGA3CAALI	50	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAD8A147	45	Triple Negative	WHITE	TCGAC8A8HQ	53	Luminal	ASIAN
TCGAANA0XU	54	Triple Negative	WHITE	TCGAE2A9RU	90	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGALLA5YP	49	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAC8A130	52	不明	ASIAN
TCGAD8A1XK	55	Triple Negative	WHITE	TCGABHA8FY	87	Luminal	WHITE
TCGAE2A14W	78	Luminal+HER2	WHITE	TCGABHA42U	80	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAA2A04U	47	HER2	WHITE	TCGAD8A1XO	56	Luminal	WHITE
TCGAA8A075	42	Luminal+HER2	不明	TCGAACA30D	68	Luminal	WHITE
TCGAACA3W5	65	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAEWA6S9	34	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAOLA5RW	40	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE9A1R5	63	不明	WHITE
TCGAA2A3Y0	57	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAARA1AK	70	Luminal	WHITE
TCGAPLA8LV	54	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAC8A1HI	40	Luminal	ASIAN
TCGAPLA8LZ	29	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGABHA0DL	64	Luminal	WHITE
TCGAAOA128	61	Triple Negative	WHITE	TCGAACA4ZE	63	Luminal+HER2	WHITE
TCGAA2A0YE	48	Triple Negative	WHITE	TCGA3CAAAU	55	Luminal	WHITE
TCGAD8A142	74	Triple Negative	WHITE	TCGAE2A154	68	Luminal	WHITE
TCGAE9A22E	56	Luminal+HER2	WHITE	TCGAS3AA15	51	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAD8A1J8	77	Luminal	WHITE	TCGAANA0XW	36	Luminal+HER2	WHITE
TCGAPEA5DC	72	Luminal+HER2	WHITE	TCGAE9A22D	38	Luminal+HER2	WHITE
TCGAACA5EH	76	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGABHA0DE	62	Luminal	WHITE
TCGAE2A14P	79	HER2	WHITE	TCGAXXA89A	68	Luminal	WHITE
TCGABHA0BW	71	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAA2A25C	50	Luminal	WHITE
TCGAE2A1L7	40	Triple Negative	WHITE	TCGAB6A0RV	42	不明	WHITE
TCGAOLA6VO	43	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAPEA5DE	41	Luminal	WHITE
TCGAARA1AY	65	Triple Negative	WHITE	TCGAA7A13F	44	Luminal	WHITE
TCGAE9A1RF	68	不明	WHITE	TCGAB6A40C	51	Luminal	WHITE
TCGAANA0XN	68	Luminal	WHITE	TCGAE9A5FK	60	Luminal	WHITE
TCGAB6A0RU	40	不明	WHITE	TCGAE2A1IG	45	Luminal	WHITE
TCGAA2A25E	34	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAACA62X	72	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAD8A13Z	51	Triple Negative	WHITE	TCGAARA5QN	68	Luminal+HER2	WHITE
TCGAOLA5D7	70	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE2A15H	38	Luminal+HER2	WHITE
TCGAE9A1N8	48	Triple Negative	WHITE	TCGAA1A0SJ	39	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAEW1PD	61	Luminal+HER2	WHITE	TCGAE2A15G	76	Luminal	WHITE
TCGAGMA3XL	49	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAA1A0SE	56	Luminal	WHITE
TCGAACA8OQ	72	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGALDA74U	79	Luminal	WHITE
TCGAE9A244	54	不明	WHITE	TCGAA1A0SF	54	Luminal	WHITE

表 4. TCGA コホート (続き 1)

症例 ID	乳がん発症年齢	サブタイプ	人種	症例 ID	乳がん発症年齢	サブタイプ	人種
TCGAD8A13Y	52	Luminal	WHITE	TCGAEWA11X	48	Luminal	ASIAN
TCGAEWA1PA	59	Luminal	WHITE	TCGAS3AA12	82	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAA7A6VW	48	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGA3CAALJ	62	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAARA1AI	47	Triple Negative	WHITE	TCGAPLA8LX	35	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAE2A150	48	Triple Negative	WHITE	TCGABHA6R8	46	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAARA1AH	51	Luminal	WHITE	TCGABHA0BC	60	Luminal	WHITE
TCGAA7A26G	50	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAACA62V	58	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAE9A1R2	51	Luminal	WHITE	TCGAE2A1B5	46	Luminal	WHITE
TCGAS3AA17	64	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAOLA5RZ	57	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAD8A1X6	80	Luminal	WHITE	TCGABHA0W7	49	Luminal	WHITE
TCGAD8A1Y3	61	Luminal	WHITE	TCGA5TA9QA	52	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAE9A1RG	62	不明	WHITE	TCGAD8A1XM	57	Luminal	WHITE
TCGAE2A573	48	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAAOA03V	41	Luminal	WHITE
TCGAE2A159	50	Triple Negative	WHITE	TCGAD8A1JJ	54	Luminal	WHITE
TCGAD8A1XT	61	HER2	WHITE	TCGAARA5QP	54	不明	WHITE
TCGAA2A0YM	67	Triple Negative	WHITE	TCGAD8A140	62	Luminal+HER2	WHITE
TCGAAOA1KR	51	Triple Negative	WHITE	TCGAE2A15K	58	Luminal	WHITE
TCGAA7A6VX	68	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAA2A0YG	63	Luminal+HER2	WHITE
TCGAUUU93S	63	HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAZ7A8R6	46	Luminal	WHITE
TCGAA7A6VV	51	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAANA0XS	63	Luminal	WHITE
TCGAE2A1B6	44	Triple Negative	WHITE	TCGAARA1AS	54	Luminal	ASIAN
TCGAE2A574	44	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAOLA66J	80	Luminal	WHITE
TCGAE2A140	76	Luminal	WHITE	TCGAARA0TR	68	Luminal	WHITE
TCGAE9A1NE	28	Luminal	WHITE	TCGAE9A6HE	45	Luminal	WHITE
TCGABHA0AZ	47	Luminal	WHITE	TCGAB6A0RP	73	不明	WHITE
TCGAAOA12F	36	Triple Negative	WHITE	TCGAACA23E	50	不明	WHITE
TCGAOLA5S0	66	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAA2A0EN	70	Luminal	WHITE
TCGAE2A15S	34	Luminal	WHITE	TCGAOLA5DA	61	Luminal	WHITE
TCGALLA6FP	90	Luminal	WHITE	TCGABHA18I	53	Luminal+HER2	WHITE
TCGAD8A1JD	41	Luminal	WHITE	TCGAD8A1XB	62	Luminal	WHITE
TCGAA2A0YJ	39	Luminal	WHITE	TCGAB6A0X0	54	不明	WHITE
TCGAARA0TW	50	Luminal	WHITE	TCGAC8A1HL	38	不明	ASIAN
TCGABHA8FZ	58	不明	WHITE	TCGAE2A56Z	69	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAB6A409	44	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAC8A12Y	44	不明	ASIAN
TCGAE2A1AZ	63	Triple Negative	WHITE	TCGAAQA7U7	55	Luminal	WHITE
TCGAEWA1PH	52	Triple Negative	WHITE	TCGAA1A0SM	77	Luminal+HER2	WHITE
TCGAARA5QQ	68	Triple Negative	WHITE	TCGABHA0B6	47	Luminal+HER2	WHITE
TCGAS3AA0Z	63	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAS3A6ZG	71	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAB6A0WX	40	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAACA62Y	79	Luminal	WHITE
TCGAARA1AP	80	Luminal	WHITE	TCGABHA0H5	45	Luminal	WHITE
TCGAE9A1NA	58	Luminal+HER2	WHITE	TCGABHA0HI	78	Luminal	WHITE
TCGAA2A0T4	62	Luminal	WHITE	TCGAE2A15C	61	Luminal	WHITE
TCGAA2A1G1	85	HER2	WHITE	TCGAEWA1OX	43	Luminal	WHITE
TCGALLA6FR	50	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAA2A0YC	59	Luminal	WHITE
TCGAE2A1B0	50	HER2	WHITE	TCGAE2A1L6	44	Luminal	WHITE
TCGAB6A0WY	40	不明	WHITE	TCGAA2A0T6	50	Luminal	WHITE
TCGAC8A12U	46	Luminal	ASIAN	TCGAD8A1JN	80	Luminal	WHITE
TCGAC8A1HM	74	Luminal	ASIAN	TCGAANA0XP	69	Luminal+HER2	WHITE
TCGAA2A04R	36	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGABHA0HP	65	Luminal	WHITE
TCGAD8A1XA	64	不明	WHITE	TCGAE2A1BC	63	Luminal	不明
TCGAD8A1X5	81	Luminal+HER2	WHITE	TCGAOLA66N	59	Luminal	WHITE
TCGAC8A12Q	78	HER2	ASIAN	TCGAV7A7HQ	75	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAE2A15A	45	Luminal	WHITE	TCGALDA7W6	54	Luminal	WHITE
TCGAD8A1XU	56	Luminal	WHITE	TCGAJLA3YX	46	Luminal+HER2	ASIAN
TCGAEWA6SB	62	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE2A14T	52	Luminal	WHITE
TCGAE2A15R	64	Luminal	WHITE	TCGAD8A73W	79	Luminal	WHITE
TCGAARA1AR	50	Triple Negative	WHITE	TCGAD8A27L	49	Luminal	WHITE
TCGAA2A0SX	48	Triple Negative	WHITE	TCGAARA24P	47	Luminal	WHITE
TCGAARA0TT	53	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE9A3X8	48	Luminal+HER2	WHITE
TCGAA1A0SP	40	Triple Negative	不明	TCGAOLA66L	71	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAE2A15M	66	Luminal	WHITE	TCGAE2A14X	55	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAOLA66I	36	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAEWA6SC	60	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAARA0TV	66	Luminal	不明	TCGA4HAAK	50	不明	WHITE
TCGAC8A8HR	49	不明	ASIAN	TCGAXXA899	46	Luminal	WHITE
TCGAEWA1OZ	56	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE2A15I	44	Luminal	WHITE
TCGAC8A1HG	50	Luminal	ASIAN	TCGABHA0C1	61	Luminal	WHITE
TCGALLA5YM	88	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGA3CAALK	52	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAA2A1FX	71	Luminal	WHITE	TCGAE2A570	47	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAACA3QP	69	Luminal	WHITE	TCGAA2A0ST	62	Triple Negative	WHITE
TCGAARA1AU	39	Luminal	WHITE	TCGAC8A3M7	60	Triple Negative	ASIAN

表 4. TCGA コホート (続き 2)

症例 ID	乳がん発症年齢	サブタイプ	人種	症例 ID	乳がん発症年齢	サブタイプ	人種
TCGAC8A9FZ	49	不明	WHITE	TCGAOLA5D8	40	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGABHA18G	81	Triple Negative	WHITE	TCGAE9A1R3	70	不明	WHITE
TCGALDA7W5	52	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAW8A86G	66	Luminal	WHITE
TCGAARA0U0	73	不明	WHITE	TCGAARA1AV	68	Luminal	WHITE
TCGALLA73Z	55	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAOLA660	39	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAB6A0RO	71	不明	WHITE	TCGA5LAAT1	63	不明	WHITE
TCGABHA1FN	34	不明	WHITE	TCGALLA9Q3	69	Luminal+HER2	WHITE
TCGAD8A1XF	45	Luminal	WHITE	TCGAE2A1BD	53	Luminal	WHITE
TCGABHA202	60	Luminal+HER2	WHITE	TCGAACA3QQ	54	Luminal+HER2	WHITE
TCGAA2A0T3	37	Luminal	WHITE	TCGAOKA5Q2	59	Luminal	不明
TCGAC8A12P	55	HER2	ASIAN	TCGAD8A73U	88	Luminal	WHITE
TCGAC8A8HP	59	HER2	ASIAN	TCGAA2A0YL	48	Luminal	WHITE
TCGAC8A12X	62	Luminal	ASIAN	TCGAARA2LN	65	Luminal	WHITE
TCGAE2A10A	41	Luminal+HER2	WHITE	TCGAD8A141	40	Luminal	WHITE
TCGAULAAZ6	73	Luminal+HER2	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAARA1AL	60	Luminal	WHITE
TCGAEWA6SD	32	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE2A15T	65	Luminal	WHITE
TCGAA2A0CW	67	Luminal	WHITE	TCGAACA5XU	74	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAA1A0SH	39	Luminal	WHITE	TCGAC8A12T	43	Luminal+HER2	ASIAN
TCGABHA5J0	63	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAEWA3E8	60	Luminal	WHITE
TCGALLA7SZ	49	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE9A1R0	58	不明	WHITE
TCGAB6A0WV	67	不明	WHITE	TCGABHA0EA	72	Luminal	WHITE
TCGAAQA04H	61	Luminal+HER2	WHITE	TCGAD8A4Z1	68	Luminal	WHITE
TCGAC8A138	54	不明	ASIAN	TCGALLA740	61	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAARA0T2	43	Luminal	WHITE	TCGAOA12H	69	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAB6A0WW	58	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAC8A12N	58	Luminal	ASIAN
TCGAD8A1JC	59	Luminal	WHITE	TCGAA2A04N	66	Luminal	WHITE
TCGAOLA97C	67	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAB6A0RN	60	不明	WHITE
TCGABHA0B7	42	Luminal+HER2	WHITE	TCGAE2A15L	65	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAA1A0SD	59	Luminal	WHITE	TCGALDA66U	44	Luminal	WHITE
TCGAEWA423	75	Luminal	WHITE	TCGAD8A1XZ	81	Luminal	WHITE
TCGAE2A576	69	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAA2A0SY	62	Luminal+HER2	WHITE
TCGAEWA1J5	59	Luminal	WHITE	TCGAE2A1B4	74	Luminal	WHITE
TCGAC8A135	64	HER2	ASIAN	TCGA5LAAT0	42	Luminal	WHITE
TCGAARA0U2	47	Luminal	WHITE	TCGAGMA4E0	67	Luminal	WHITE
TCGAC8A132	56	不明	ASIAN	TCGAAT7A5ZW	47	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAANA0XR	55	Luminal	WHITE	TCGAACA6NO	43	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAE2A14Q	50	Luminal	WHITE	TCGAE2A153	51	Luminal	WHITE
TCGAC8A12W	49	Luminal	ASIAN	TCGAE2A15D	47	Luminal	WHITE
TCGAE2A15E	40	Luminal+HER2	WHITE	TCGABHA42V	41	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAEWA1OV	56	Triple Negative	WHITE	TCGAE2A1B1	45	Luminal+HER2	WHITE
TCGAE9A1N4	41	Luminal+HER2	WHITE	TCGAOLA66K	72	Luminal	WHITE
TCGAA1A0SI	52	Luminal	WHITE	TCGABHA0BQ	39	Luminal+HER2	WHITE
TCGAACA5XS	74	Luminal	WHITE	TCGAD8A1JS	77	Luminal	WHITE
TCGAA2A0CS	73	Luminal	WHITE	TCGAB6A0WZ	50	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAC8A26Z	59	Luminal	ASIAN	TCGABHA0EI	51	Luminal	WHITE
TCGAA7A56D	84	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGABHA201	64	Luminal	WHITE
TCGAACA6IX	49	不明	WHITE	TCGAA2A1FZ	63	Luminal	WHITE
TCGABHA0HN	67	Luminal	WHITE	TCGAARA0TQ	27	Luminal+HER2	WHITE
TCGAA7A26F	55	Triple Negative	WHITE	TCGAB6A0X5	61	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGABHA0W4	46	Luminal	WHITE	TCGAOLA5RX	51	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAS3A6ZF	64	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAOLA6VQ	49	Luminal	WHITE
TCGAS3AA11	67	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAE2A156	61	Luminal	WHITE
TCGAE9A1R4	66	不明	WHITE	TCGAA7A5ZX	48	Luminal	WHITE
TCGAE9A1RC	56	不明	WHITE	TCGAA7A425	70	Luminal	WHITE
TCGAC8A131	82	Triple Negative	ASIAN	TCGAA2A0D3	42	Luminal	WHITE
TCGAE2A15P	61	Luminal	WHITE	TCGAACA8OR	75	Luminal	WHITE
TCGAD8A1J9	48	Luminal+HER2	WHITE	TCGAD8A27K	47	Luminal	WHITE
TCGAACA8OS	71	Luminal+HER2	WHITE	TCGAD8A73X	53	Luminal	WHITE
TCGAD8A145	80	Luminal	WHITE	TCGAD8A1XV	84	Luminal	WHITE
TCGAA2A25D	90	Luminal	WHITE	TCGAE2A15J	51	Luminal	WHITE
TCGAACA8OP	72	不明	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAA2A0YK	61	Luminal	WHITE
TCGAOLA66P	75	Triple Negative	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAACA3YJ	66	不明	WHITE
TCGABHA0DH	63	Luminal	WHITE	TCGAEWA1PE	56	Luminal	WHITE
TCGAS3A6ZH	29	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN	TCGAOLA5RU	63	Luminal	BLACK OR AFRICAN AMERICAN
TCGAE9A247	59	不明	WHITE	TCGAA2A0T1	55	HER2	AMERICAN INDIAN OR ALASKA NA
TCGAC8A12Z	45	HER2	ASIAN	TCGAC8A133	65	不明	WHITE
TCGAARA1AT	62	Luminal+HER2	WHITE	TCGAA2A0YD	63	Luminal	WHITE
TCGAPEA5DD	64	Luminal+HER2	ASIAN	TCGAB6A0X4	62	不明	WHITE
TCGAAMA5PV	63	Luminal	WHITE	TCGAB6A0RQ	68	不明	WHITE
TCGAA2A0YH	53	Luminal	WHITE				

表 5. 同じ患者由来の腫瘍における遺伝子変異の共通性

		腫瘍1だけに 見られた SNV/INDEL数	腫瘍1と腫瘍2に 共に見られた SNV/INDEL数	腫瘍2だけに 見られた SNV/INDEL数	BRCAness予測値
AI46	腫瘍1 腫瘍2	128	4	140	陽性コントロールとして モデルの構築に使用
AZ78	腫瘍1 腫瘍2	76	2	76	陰性コントロールとして モデルの構築に使用
AB03	腫瘍1 腫瘍2	27	0	45	0.322074957
AA67	腫瘍1 腫瘍2	95	2	45	0.303534746
					0.466688835
					0.508683338

表 6. ラッソロジスティック回帰および従来の多変量ロジスティック回帰の統計モデルの精度

	選択変数	係数	平均	標準偏差	正答率 (トレーニング)	正答率 (バリデーション)
ラッソロジスティック回帰による予測式	HRD-LOH	0.507	12.0	10.1	95.8%	86.7%
	シグネチャー #3	0.359	0.326	0.24		
	Indel数	0.021	7.0	5.3		
	( Intercept )	0.169				
多変量ロジスティック回帰による予測式	Indel数	4.25	7.0	5.3	95.5%	77.9%
	HRD-LOH	2.62	12.0	10.1		
	SNV数	-1.82	101.4	81.1		
	( Intercept )	1.06				

表 7. 116 ゲノム変数のうち相関が強い変数上位 10 変数

変数1	変数2	相関係数
TCA>TTA	シグネチャー #2	0.965594155
TCT>TGT	シグネチャー #13	0.928738713
TCA>TGA	シグネチャー #13	0.910857057
ACG>ATG	シグネチャー #1	0.892325913
HRD-NtAI	CNV増幅数	0.766433238
HRD-NtAI	HRD-LOH	0.761243024
TCT>TTT	シグネチャー #2	0.759244918
TCA>TGA	TCT>TGT	0.759110637
TCG>TTG	シグネチャー #10	0.712867783
GCG>GTG	シグネチャー #6	0.712584272

表 8. BRCAness の原因となる体細胞変異をもつ腫瘍と BRCAness

遺伝子	ゲノムの変化	Tumor ID	BRCAness 予測値	BRCAness	臨床病理学的特徴				
					発症年齢	サブタイプ	発症回数	組織型	核異型度
BRCA1	メチル化	AB09T1	0.879	High	48	Luminal+HER2	単発	充実腺管がん	3
BRCA1	メチル化	TCGAARA0TU	0.862	High	35	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAC8A134	0.796	High	52	不明	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAA7A6VY	0.777	High	48	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAARA0U1	0.773	High	36	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGABHA0AV	0.772	High	52	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	AB06T1	0.754	High	34	Triple Negative	単発	硬がん	3
BRCA1	メチル化	TCGAARA0TP	0.748	High	43	Luminal	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAARA0TS	0.702	High	46	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAANA0XU	0.696	High	54	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAOLA5RW	0.673	High	40	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAGMA3XL	0.62	High	49	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAD8A13Y	0.614	High	52	Luminal	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAA2A0YM	0.582	High	67	Triple Negative	不明	不明	不明
BRCA1	メチル化	TCGAAOA12H	0.315	Low	69	Luminal	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	TCGAB6A400	0.83	High	43	Triple Negative	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	TCGAC8A27B	0.823	High	48	Triple Negative	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	TCGAC8A134	0.796	High	52	不明	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	TCGAACA3W5	0.674	High	65	Luminal+HER2	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	TCGAA2A3Y0	0.671	High	57	Luminal	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	TCGAANA0XN	0.64	High	68	Luminal	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	TCGAA7A6VX	0.578	High	68	Luminal	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	AA52T1	0.477	Low	45	非浸潤性乳管がん	両側	非浸潤性乳管がん	不明
RAD51C	メチル化	TCGAD8A1XF	0.476	Low	45	Luminal	不明	不明	不明
RAD51C	メチル化	TCGA5TA9QA	0.355	Low	52	Luminal	不明	不明	不明
PTEN	体細胞ホモ接合性消失	5M529T1	0.834	High	49	Triple Negative	単発	充実腺管がん	3
PTEN	体細胞ホモ接合性消失	TCGAC8A134	0.796	High	52	不明	不明	不明	不明
PTEN	体細胞ホモ接合性消失	MBC892	0.733	High	47	Triple Negative	単発	充実腺管がん	3
PTEN	体細胞ホモ接合性消失	AI51T1	0.701	High	26	Triple Negative	両側	充実腺管がん	3
BRIP1	体細胞ホモ接合性消失	TCGAOLA5RW	0.673	High	40	Triple Negative	不明	不明	不明
XRCC2	体細胞ホモ接合性消失								
BRCA2	体細胞ホモ接合性消失	TCGAPEA5DC	0.651	High	72	Luminal+HER2	不明	不明	不明
PTEN	体細胞ホモ接合性消失	TCGAA7A6VV	0.572	High	51	Triple Negative	不明	硬がん	不明
PTEN	体細胞ホモ接合性消失	MBCL012	0.465	Low	34	Luminal	単発	硬がん	3
PTEN	体細胞ホモ接合性消失	MBCL102	0.418	Low	50	Luminal	単発	硬がん	2
RAD50	体細胞ホモ接合性消失	YP141T1	0.409	Low	47	HER2	単発	乳頭腺管がん	3



表 9. *BRCA1/2* 以外の生殖細胞系列病的変異（両アレル機能消失）腫瘍と BRCAness

遺伝子名	変異型	塩基置換	アミノ酸置換	Tumor ID	BRCAness 予測値	BRCAness	臨床病理学的特徴				
							年齢	サブタイプ	発症回数	組織型	核異型度
<i>RAD51C</i>	Stopgain	c.C577T	p.R193X	TCGAA7A0DA	0.849	High	62	Triple Negative	不明	不明	不明
<i>PALB2</i>	Deletion	c.509_510del	p.R170fs	TCGAD8A1XW	0.727	High	53	Luminal	不明	不明	不明
<i>BARD1</i>	Insertion	c.1954_1955ins	p.E652fs	TCGAB6A0RU	0.639	High	40	不明	不明	不明	不明
<i>RAD51B</i>	Stopgain	c.C22T	p.R8X	TCGAE2A573	0.586	High	48	Triple Negative	不明	不明	不明
<i>FANCM</i>	Insertion	c.1506_1507ins	p.I502fs	TCGALLA6FR	0.531	Low	50	Luminal+HER2	不明	不明	不明
<i>ATM</i>	Deletion	c.5546delT	p.I1849fs	TCGAD8A1XU	0.515	Low	56	Luminal	不明	不明	不明
<i>XRCC2</i>	Deletion	c.96delT	p.F32fs	TCGAC8A9FZ	0.486	Low	49	不明	不明	不明	不明
<i>ATM</i>	Deletion	c.8440delG	p.E2814fs	TCGAD8A1JC	0.454	Low	59	Luminal	不明	不明	不明
<i>ATM</i>	Stopgain	c.G5932T	p.E1978X	TCGAPEA5DD	0.416	Low	64	Luminal+HER2	不明	不明	不明
<i>ATM</i>	Stopgain	c.G5932T	p.E1978X	TCGA4HAAAK	0.332	Low	50	不明	不明	不明	不明

表 10. BRCAness 予測値と臨床病理学的所見による VUS カテゴリー判定

カテゴリー	遺伝子名	変異型	塩基置換	アミノ酸置換	Tumor ID	BRCAness 予測値	BRCAness	BRCAness の要因	サブタイプ	核グレード	組織型	判定
カテゴリー-1	<i>ATM</i>	Missense	c.T1229C	p.V410A	TCGAE9A1NA	0.535	High	無し	Luminal+HER2	不明	不明	VUS
	<i>BLM</i>	Missense	c.T11C	p.V4A	TCGAD8A13Z	0.639	High	無し	Triple Negative	不明	不明	PLP
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.C4682T	p.T1561I	TCGAAOA128	0.663	High	無し	Triple Negative	不明	不明	PLP
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.T4951C	p.S1651P	MBCL242	0.711	High	無し	Triple Negative	3	充実腺管がん	PLP
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.C5095T	p.R1699W	TCGAC8A12K	0.742	High	無し	不明	不明	不明	VUS
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.C4682T	p.T1561I	TCGABHA5IZ	0.712	High	無し	Luminal	不明	不明	VUS
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.C2477A	p.T826K	TCGAE9A1RF	0.642	High	無し	不明	不明	不明	VUS
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.A5216G	p.D1739G	TCGAPLA8LV	0.665	High	無し	不明	不明	不明	VUS
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.A4039G	p.R1347G	TCGAARA1AQ	0.761	High	無し	Triple Negative	不明	不明	PLP
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.A2167G	p.N723D	TCGABHA5IZ	0.712	High	無し	Luminal	不明	不明	VUS
	<i>BRCA2</i>	Missense	c.A865G	p.N289D	TCGABHA0AZ	0.567	High	無し	Luminal	不明	不明	VUS
	<i>BRCA2</i>	Inframe Insertion/deletion	c.10093insTGAATTATA	p.V3365delinsVNYI	TCGAE9A1NA	0.535	High	無し	Luminal+HER2	不明	不明	VUS
	<i>BRIP1</i>	Missense	c.A2569G	p.I857V	AA13T1	0.592	High	無し	Triple Negative	3	充実腺管がん	PLP
	<i>FANCC</i>	Missense	c.A745G	p.S249G	TCGAACA8OQ	0.62	High	無し	不明	不明	不明	VUS
	<i>FANCM</i>	Missense	c.G3469A	p.E1157K	TCGAEWA1PA	0.611	High	無し	Luminal	不明	不明	VUS
	<i>FANCM</i>	Missense	c.C1576G	p.L526V	TCGAARA1AI	0.603	High	無し	Triple Negative	不明	不明	PLP
	<i>FANCM</i>	Missense	c.A491C	p.H164P	TCGALLA5YP	0.695	High	無し	Luminal+HER2	不明	不明	VUS
	<i>RAD51B</i>	Missense	c.C904T	p.H302Y	MBCL222	0.546	High	無し	Luminal	3	硬がん	VUS
<i>RAD51D</i>	Missense	c.G205A	p.G69R	TCGAEWA1PA	0.611	High	無し	Luminal	不明	不明	VUS	
カテゴリー-2	<i>ATM</i>	Missense	c.G320A	p.C107Y	TCGAA7A6VY	0.777	High	有り	Triple Negative	不明	不明	VUS
	<i>ATM</i>	Missense	c.C7313T	p.T2438I	TCGAA7A6VY	0.777	High	有り	Triple Negative	不明	不明	VUS
	<i>BRCA1</i>	Missense	c.C3448T	p.P1150S	TCGAC8A27B	0.823	High	有り	Triple Negative	不明	不明	VUS
	<i>BRCA2</i>	Missense	c.G9628A	p.G3210S	5M529T1	0.835	High	有り	Triple Negative	3	充実腺管がん	VUS
	<i>BRCA2</i>	Missense	c.G8702A	p.G2901D	TCGAC8A27B	0.823	High	有り	Triple Negative	不明	不明	VUS
	<i>BRCA2</i>	Missense	c.T580A	p.W194R	MBC892	0.733	High	有り	Triple Negative	3	充実腺管がん	VUS
	<i>FANCM</i>	Missense	c.G5440A	p.E1814K	TCGAA7A6VY	0.777	High	有り	Triple Negative	不明	不明	VUS
	<i>FANCM</i>	Missense	c.A2859C	p.K953N	TCGAPEA5DC	0.651	High	有り	Luminal+HER2	不明	不明	VUS
	<i>NBN</i>	Missense	c.G1036A	p.V346M	TCGAC8A134	0.796	High	有り	不明	不明	不明	VUS
	<i>RAD51D</i>	Missense	c.C647T	p.T216I	TCGAA2A3Y0	0.671	High	有り	Luminal	不明	不明	VUS

PLP; Potentially Likely Pathogenic (潜在的病原性), PLB; Potentially Likely Benign (潜在的良性), VUS; Variant of Uncertain Significance (病的意義不明)

表 10. BRCAness 予測値と臨床病理学的所見による VUS カテゴリー判定 (続き 1)

カテゴリー	遺伝子名	変異型	塩基置換	アミノ酸置換	Tumor ID	BRCAness 予測値	BRCAness	BRCAness の要因	サブタイプ	核グレード	組織型	判定
	ATM	Missense	c.T2861C	p.L954P	AI88T1	0.517	Low	無し	Luminal	3	硬がん	PLB
	ATM	Missense	c.G8968A	p.E2990K	TCGAD8A1XU	0.515	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	ATM	Missense	c.T1838G	p.V613G	TCGAS3A6ZF	0.428	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	ATM	Missense	c.T8717C	p.V2906A	TCGAE2A15P	0.424	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	ATM	Missense	c.T7912G	p.W2638G	TCGAC8A137	0.415	Low	無し	HER2	不明	不明	PLB
	ATM	Missense	c.T7271G	p.V2424G	TCGAC8A1HN	0.402	Low	無し	不明	不明	不明	VUS
	ATM	Missense	c.C7841T	p.V2424G	TCGAWTAB41	0.415	Low	無し	不明	不明	不明	VUS
	ATM	Missense	c.C7841T	p.P2614L	TCGABHA0DQ	0.408	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	ATM	Missense	c.G6784C	p.A2262P	TCGAEWA6SA	0.4	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	ATM	Missense	c.A2608G	p.N870D	TCGAS3A6ZG	0.343	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	ATM	Missense	c.C2879A	p.P960H	AI71T1	0.333	Low	無し	Luminal	3	硬がん	PLB
	BLM	Missense	c.A2839G	p.I947V	YP080T1	0.419	Low	無し	Luminal	2	硬がん	PLB
	BLM	Missense	c.A968G	p.K323R	TCGAPEA5DE	0.378	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	BLM	Missense	c.C731T	p.A244V	TCGAE2A14X	0.333	Low	無し	Triple Negative	不明	不明	VUS
	BRCA1	Inframe Deletion	c.1846del3	p.616del	TCGA3CAALI	0.394	Low	無し	Luminal+HER2	不明	不明	PLB
	BRCA1	Missense	c.G4535T	p.S1512I	TCGABHA0BC	0.358	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	BRCA2	Missense	c.G8356A	p.A2786T	TCGAC8A1HG	0.49	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	BRCA2	Missense	c.G9634C	p.G3212R	TCGAS3A6ZF	0.428	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	BRCA2	Missense	c.A125G	p.Y42C	TCGALLA7T0	0.416	Low	無し	Luminal+HER2	不明	不明	PLB
	BRCA2	Missense	c.A179G	p.N60S	TCGABHA6R8	0.36	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	BRCA2	Missense	c.C5495G	p.S1832C	TCGAOLA5D8	0.326	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
カテゴリー3	BRIP1	Missense	c.C2830G	p.Q944E	MBC912	0.46	Low	無し	Triple Negative	3	乳頭腺管がん	VUS
	CHEK2	Missense	c.C1036T	p.R346C	TCGAE2A15A	0.516	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	CHEK2	Missense	c.G683A	p.S228N	AA67T3	0.509	Low	無し	Luminal	2	乳頭腺管がん	PLB
					AA67T1	0.467	Low	無し	Luminal+HER2	2	充実腺管がん	PLB
	FAM175A	Missense	c.G755A	p.R252Q	TCGAA2A0YG	0.351	Low	無し	Luminal+HER2	不明	不明	PLB
	FANCM	Missense	c.C5141T	p.A1714V	TCGABHA5J0	0.465	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	FANCM	Missense	c.C119G	p.A40G	TCGABHA18H	0.415	Low	無し	Luminal+HER2	不明	不明	PLB
	FANCM	Missense	c.G2696A	p.R899K	AI71T1	0.333	Low	無し	Luminal	3	硬がん	PLB
	MRE11A	Missense	c.G1718A	p.G573E	TCGAE2A14V	0.403	Low	無し	Luminal+HER2	不明	不明	PLB
	NBN	Missense	c.A511G	p.I171V	TCGAE9A247	0.419	Low	無し	不明	不明	不明	VUS
	NBN	Missense	c.G940A	p.V314M	TCGAACA3QQ	0.322	Low	無し	Luminal+HER2	不明	不明	PLB
	PALB2	Missense	c.G2509A	p.E837K	AI72T1	0.504	Low	無し	HER2	3	乳頭腺管がん	PLB
	PALB2	Missense	c.C2135T	p.A712V	TCGAANA0XR	0.44	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	PALB2	Missense	c.A1379G	p.Q460R	AZ37T1	0.34	Low	無し	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	非浸潤性乳管がん	VUS
	PTEN	Missense	c.T882G	p.S294R	TCGABHA5J0	0.465	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	RAD50	Missense	c.C2750T	p.T917I	TCGAPEA5DE	0.378	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	RAD50	Missense	c.A3122G	p.H1041R	TCGAA1A0SJ	0.368	Low	無し	Luminal	不明	不明	PLB
	RAD51D	Missense	c.G454A	p.V152I	TCGALLA5YM	0.489	Low	無し	Luminal+HER2	不明	不明	PLB
	RAD51D	Missense	c.G196A	p.V66M	AZ12T1	0.48	Low	無し	Luminal	3	乳頭腺管がん	PLB
	RAD51D	Missense	c.G26C	p.C9S	TCGAE2A14V	0.403	Low	無し	Luminal+HER2	不明	不明	PLB
	RAD51D	Missense	c.T251A	p.L84H	TCGAACA62X	0.37	Low	無し	不明	不明	不明	VUS
	RECQL	Missense	c.A1795G	p.R599G	AB01T1	0.458	Low	無し	Luminal	2	乳頭腺管がん	PLB

表 10. BRCAness 予測値と臨床病理学的所見による VUS カテゴリー判定 (続き 2)

カテゴリー	遺伝子名	変異型	塩基置換	アミノ酸置換	Tumor ID	BRCAness 予測値	BRCAness	BRCAness の要因	サブタイプ	核グレード	組織型	判定
Conflicting	BRCA2	Missense	c.T5640G	p.N1880K	TCGAB6A400	0.831	High	有り	Triple Negative	不明	不明	VUS
					TCGAA7A6VW	0.603	Low	無し	Triple Negative	不明	不明	VUS
					TCGAB6A0RL	0.408	High	無し	不明	不明	VUS	
	RECQL	Missense	c.G1483C	p.D495H	TCGAE9A5FL	0.709	High	無し	Triple Negative	不明	不明	VUS
					TCGAE2A14T	0.334	Low	無し	Luminal	不明	不明	VUS

PLP; Potentially Likely Pathogenic (潜在的病原性), PLB; Potentially Likely Benign (潜在的良性), VUS; Variant of Uncertain Significance (病的意義不明)

表 11. 本研究で VUS の再判定を行った結果

遺伝子名	変異型	塩基置換	アミノ酸置換	病原性判定	既報
BRCA1	Missense	c.T4951C	p.S1651P	LP	Findlay 2018 <sup>50</sup>
ATM	Missense	c.C2879A	p.P960H	LB	Momozawa 2018 <sup>49</sup>
BRCA1	Missense	c.G4535T	p.S1512I	LB	Caligo 2009 <sup>54</sup> , Anantha 2017 <sup>53</sup>
BRCA2	Missense	c.A125G	p.Y42C	LB	Kuznetsov 2008 <sup>55</sup> , Farrugia 2008 <sup>52</sup> , Wu 2005 <sup>56</sup> , Momozawa 2018 <sup>49</sup>
PALB2	Missense	c.G2509A	p.E837K	LB	Momozawa 2018 <sup>49</sup>
PALB2	Missense	c.C2135T	p.A712V	LB	Thompson 2015 <sup>51</sup>

LP; Likely Pathogenic (病原性疑い), LB; Likely Benign (良性疑い)