

試料解析研究計画のために臨床医が知っておくべき 最低限のゲノムに関する基礎知識

国立がん研究センター・研究所
基盤的臨床開発研究コアセンター(FIOC)
市川 仁

本日の講義の概要

1. 発がん分子機構の基礎知識
2. 次世代シーケンサーゲノム解析の基礎知識
3. がん遺伝子パネル検査
4. FFPE検体の取り扱い
5. 臨床試験に付随した試料の解析事例

本日の講義の概要

1. 発がん分子機構の基礎知識
2. 次世代シーケンサーゲノム解析の基礎知識
3. がん遺伝子パネル検査
4. FFPE検体の取り扱い
5. 臨床試験に付随した試料の解析事例

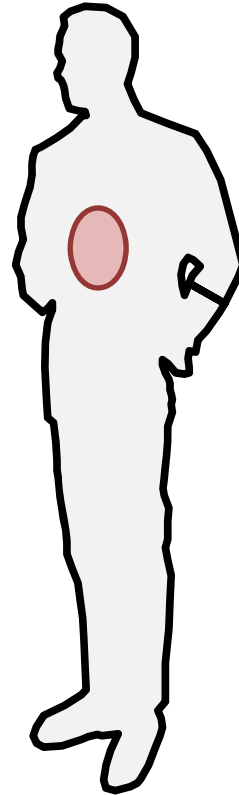
1-1. 発がんの要因

外的要因

化学的因子:
発がん物質

物理的因子:
放射線・紫外線

生物学的因子:
ウイルス・細菌

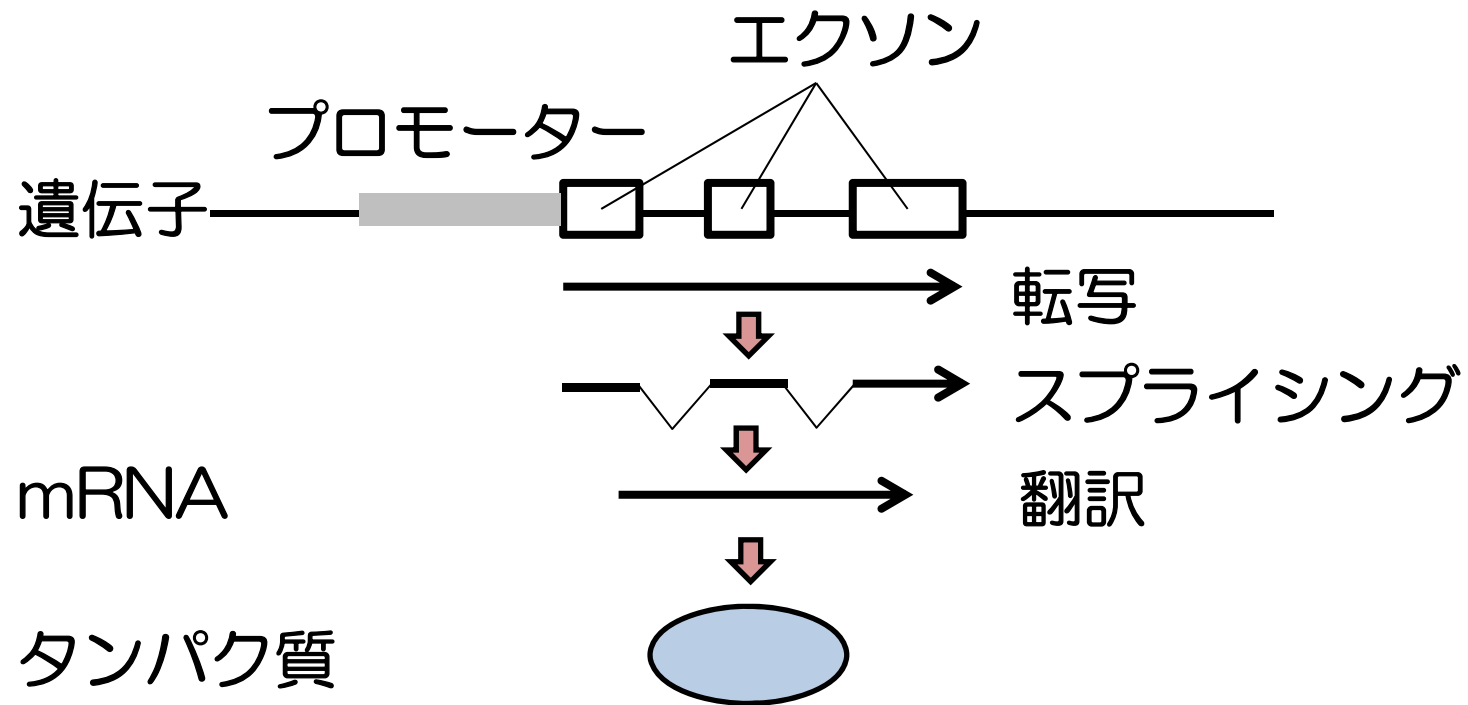


内的要因

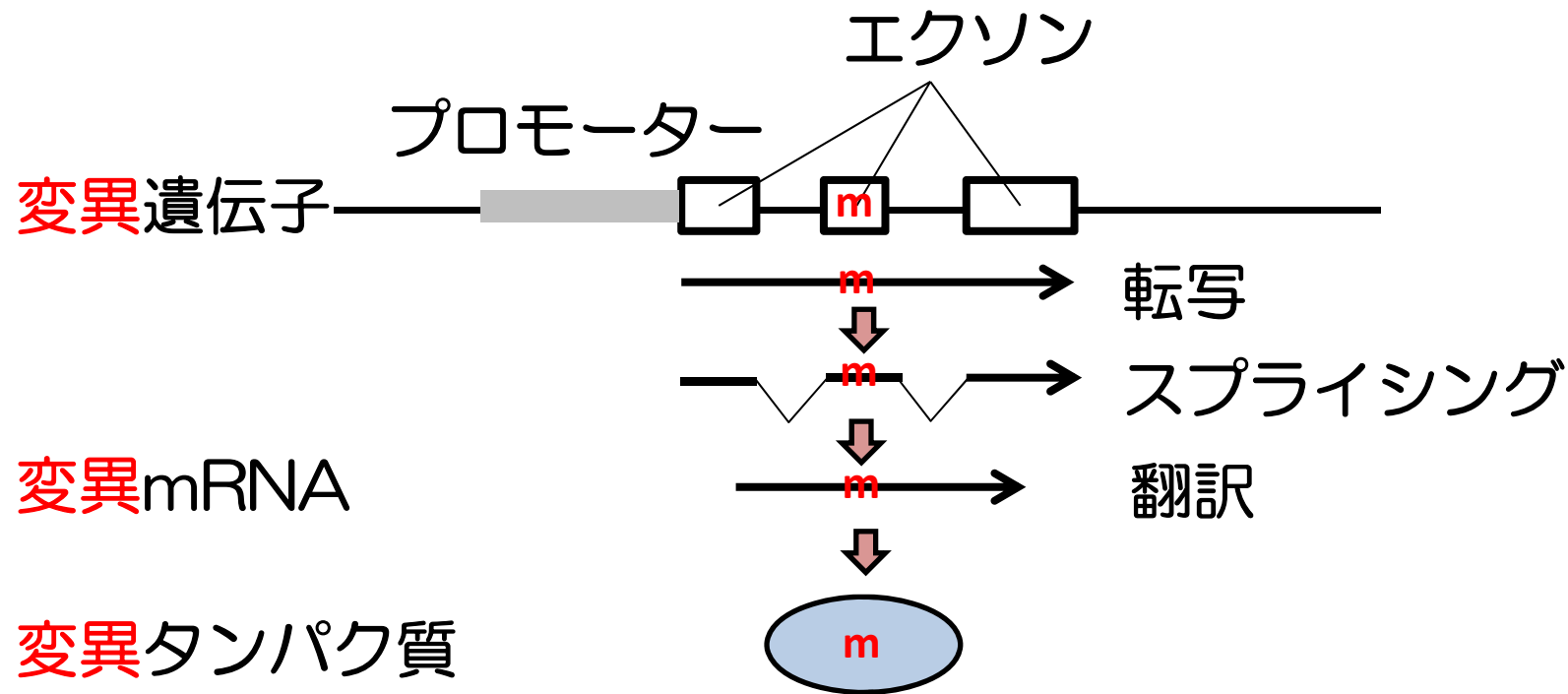
遺伝的素因:
遺伝子の個人差
(生殖細胞系列変異・
遺伝子多型)

発がんの要因には、
外界から与えられる外的要因と生体がもつ内的要因とがあり、
その組み合わせにより、がんが発生する。

1-2. 遺伝子の構造と転写・翻訳

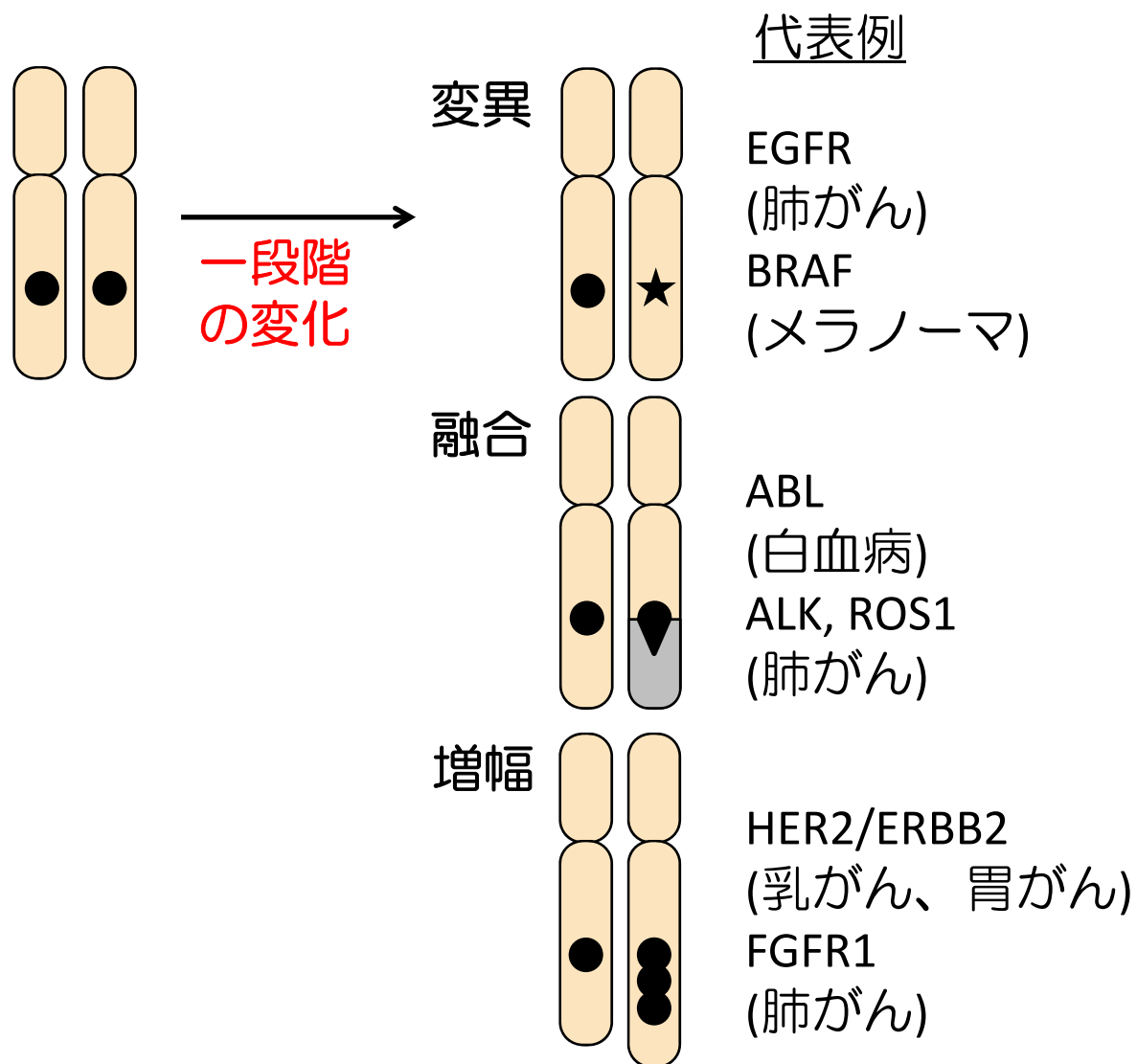


1-3. 遺伝子の構造と転写・翻訳と遺伝子変異



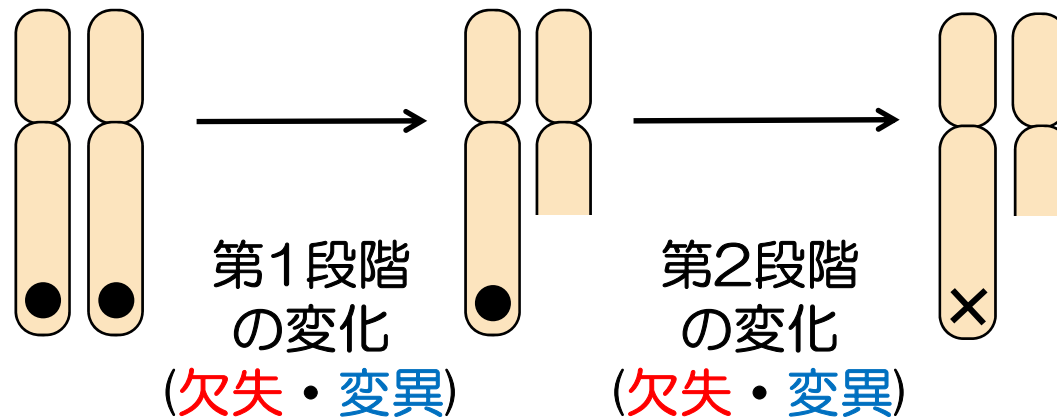
m: がん細胞で起きた体細胞遺伝子変異

1-4. がん遺伝子の活性化



1-5. がん抑制遺伝子の不活性化

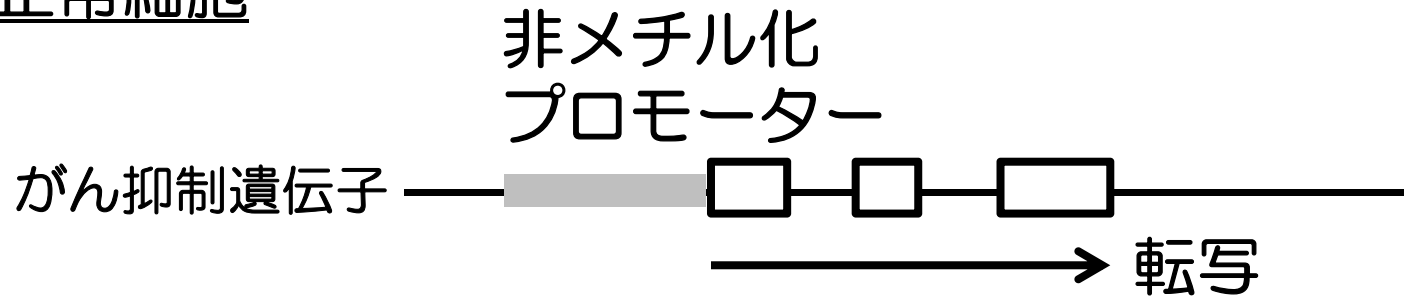
普通のがんでは2段階の変化が必要



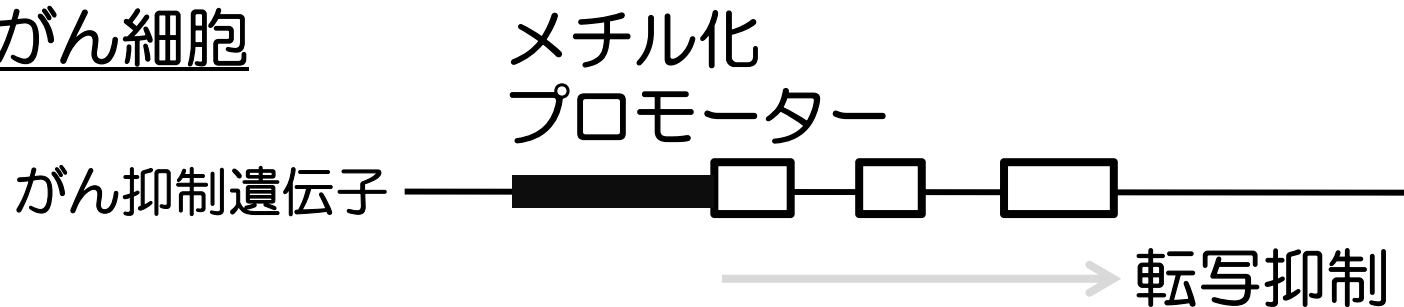
がん抑制遺伝子の不活性化には相同遺伝子の**双方**の異常が必要

1-6. プロモーター領域のメチル化による がん抑制遺伝子の不活性化

正常細胞



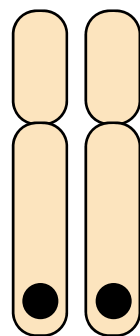
がん細胞



エピゲノム異常（遺伝子配列の変化を伴わない）
プロモーターメチル化による転写抑制

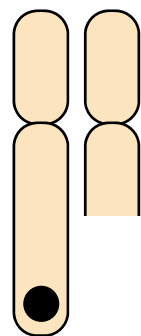
1-7. がん抑制遺伝子の不活性化

非遺伝性腫瘍

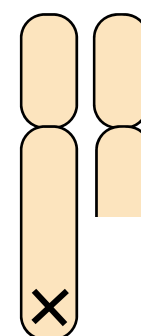


第1段階
の変化
(欠失・変異
・メチル化)

--- 普通のがんでは2段階の変化が必要



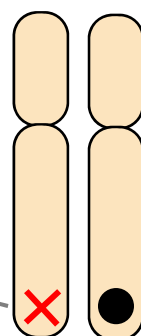
第2段階
の変化
(欠失・変異
・メチル化)



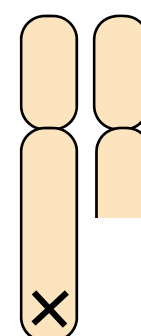
家族性（遺伝性腫瘍）

--- 1段階の変化しか必要としない

遺伝的素因:
遺伝子の個人差
(生殖細胞系列変異)



1段階の変化
(欠失・変異
・メチル化)

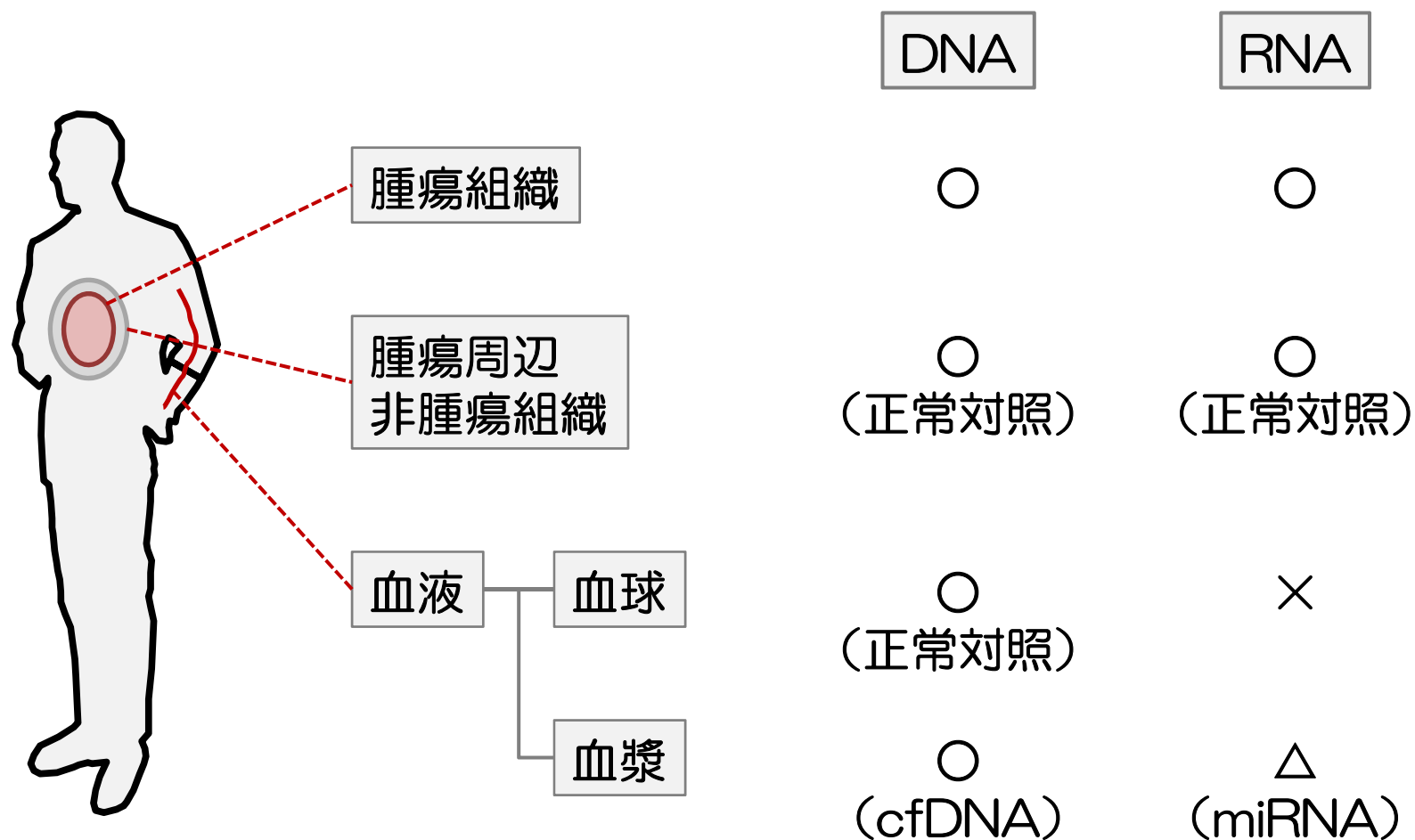


BRCA1, BRCA2（遺伝性乳がん・卵巣がん）

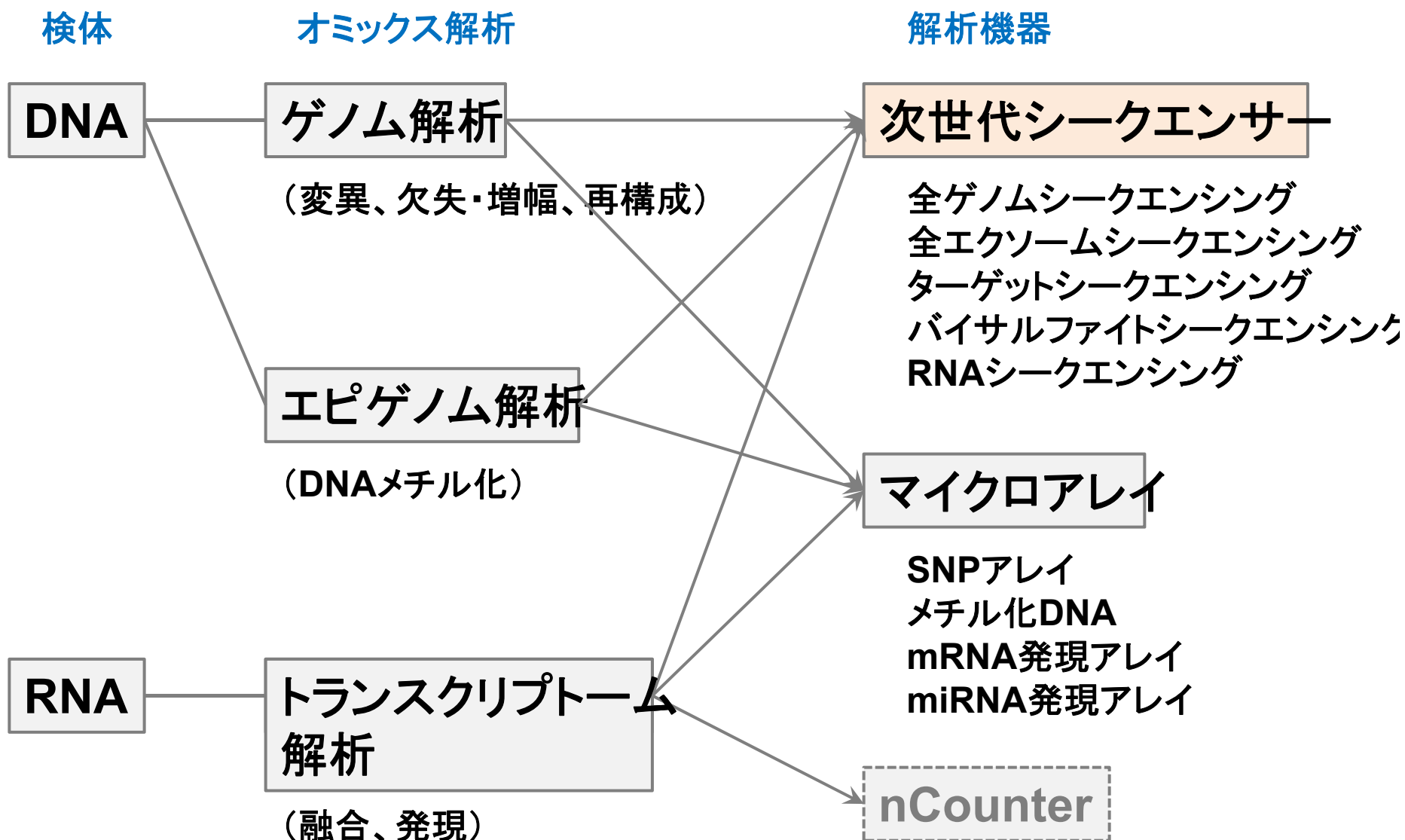
APC（家族性大腸ポリポーシス）

TP53（Li-Fraumeni症候群）

1-8. ゲノム系解析に一般に使われる患者検体



1-9. ゲノム系解析に一般に使われる測定機器



本日の講義の概要

1. 発がん分子機構の基礎知識
- 2. 次世代シーケンサーゲノム解析の基礎知識**
3. がん遺伝子パネル検査
4. FFPE検体の取り扱い
5. 臨床試験に付随した試料の解析事例

2-1. 次世代シーケンサー（NGS）

イルミナ社



HiSeq 4000

<https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>



NovaSeq

<https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>

オックスフォードナノポア社



MinION

<https://nanoporetech.com/jp/products>

医療機器として登録されている次世代シーケンサー

サーモフィッシャー社



Ion PGM Dx

<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/clinical/diagnostic-testing.html>

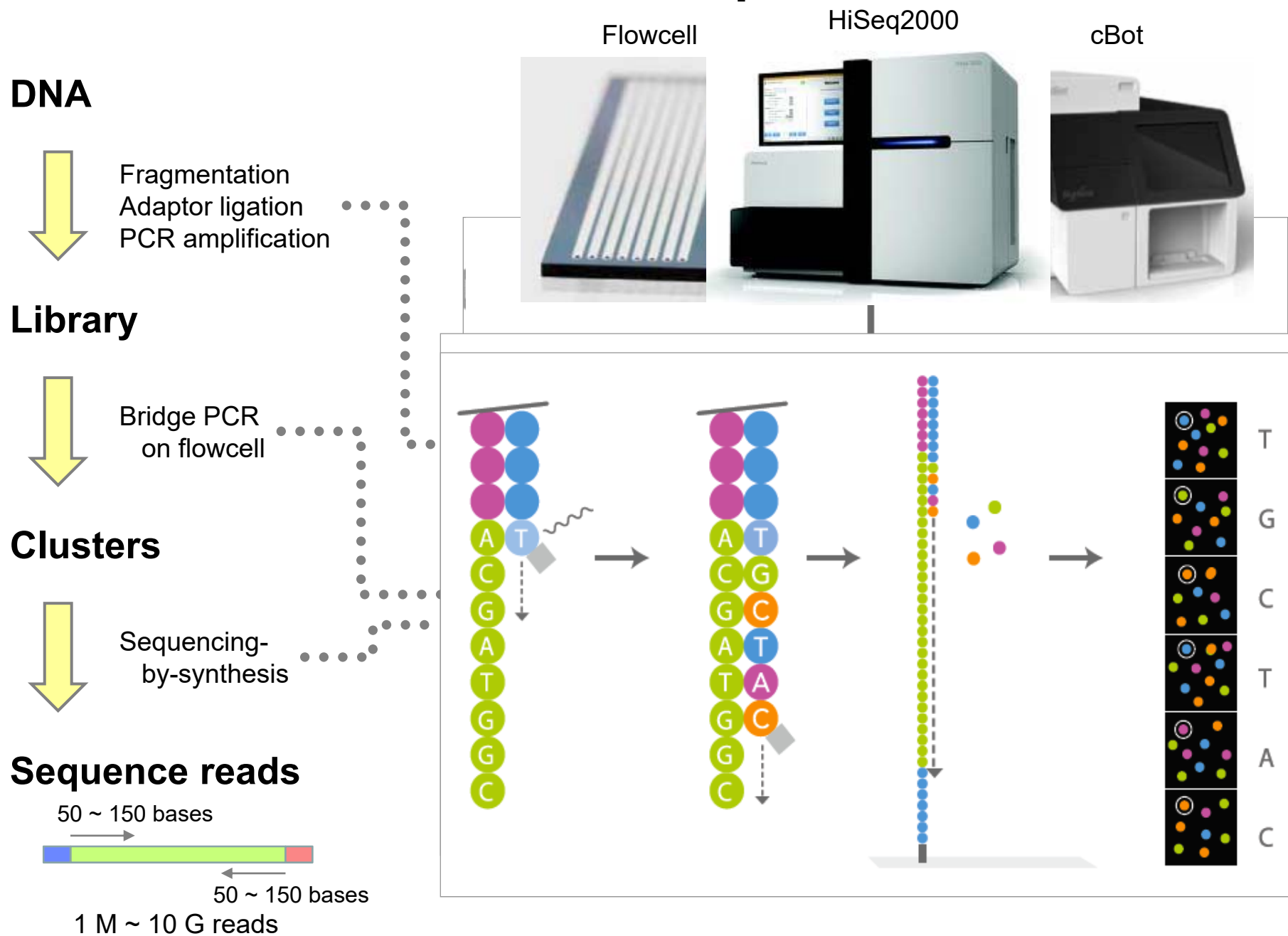
イルミナ社



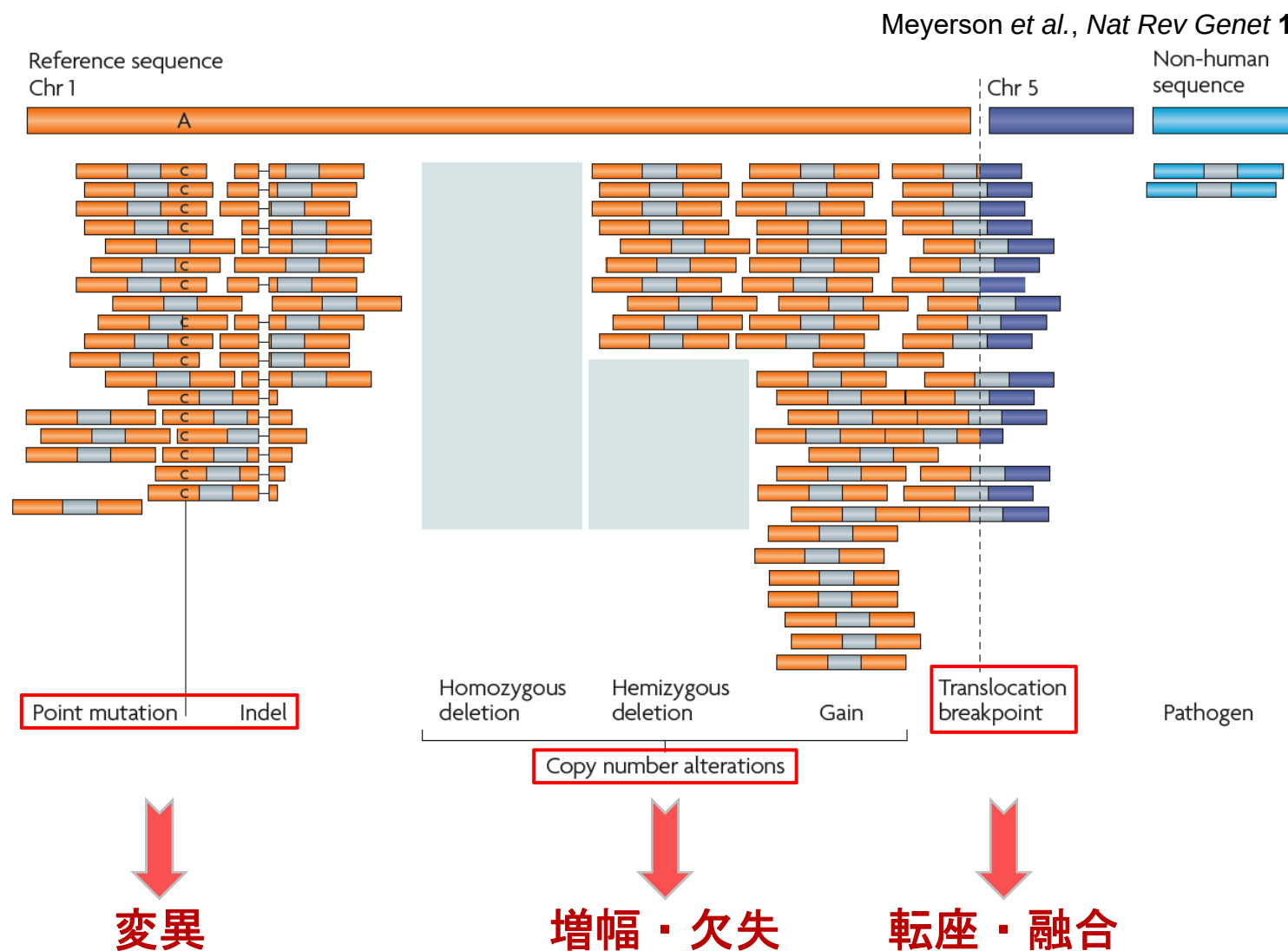
NextSeq 550Dx

<https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/comparison-tool.html>

2-2. NGS 解析: イルミナ社 HiSeq 等



2-3. NGS 解析による変異、増幅・欠失、融合の検出



2-4. 全エクソームシーケンシング (WES) 解析

Genome DNA (T/N)

Fragmentation
Adaptor ligation
PCR amplification
Target capture
PCR amplification

Captured library

Sequencing
(Paired-end read)

Read data

Data QC
Exclude identical reads

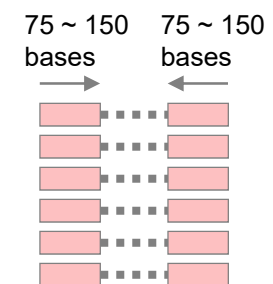
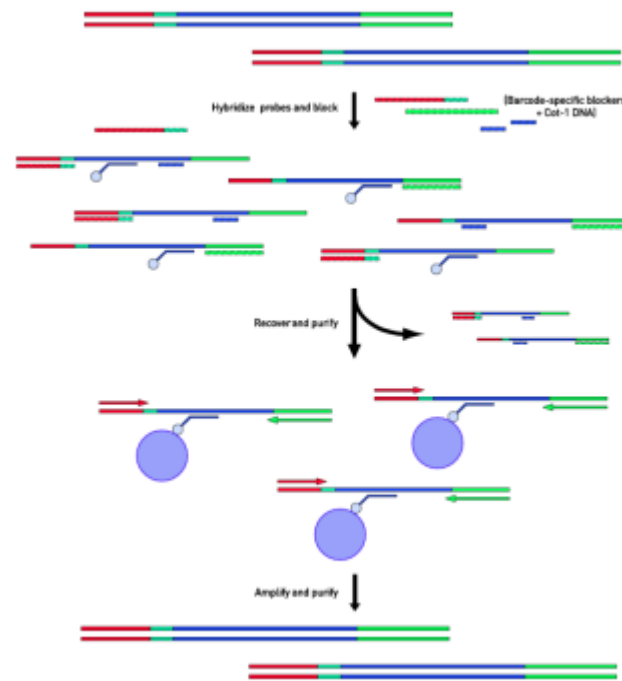
Qualified read data

--- Av. depth: ≥ 80

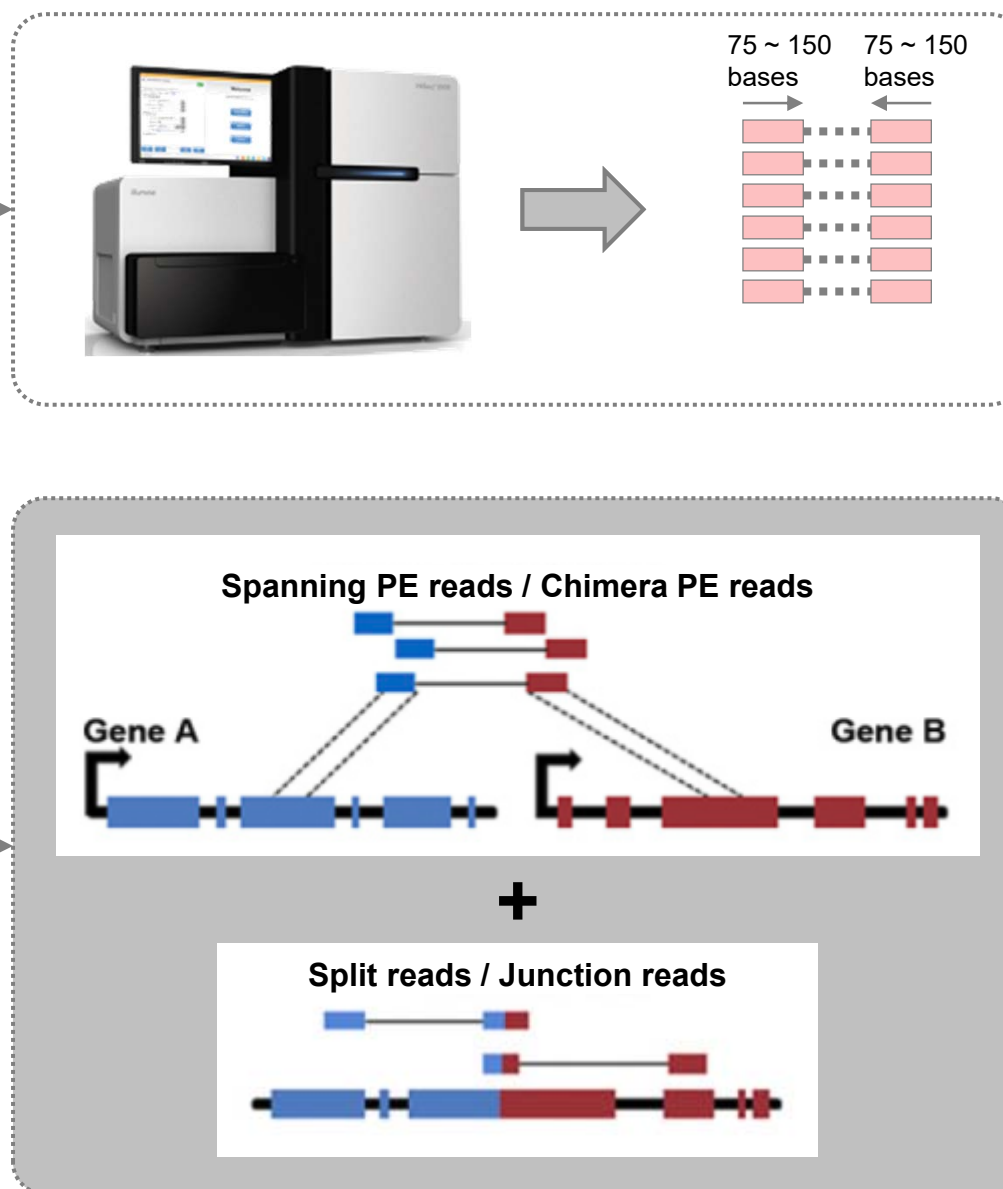
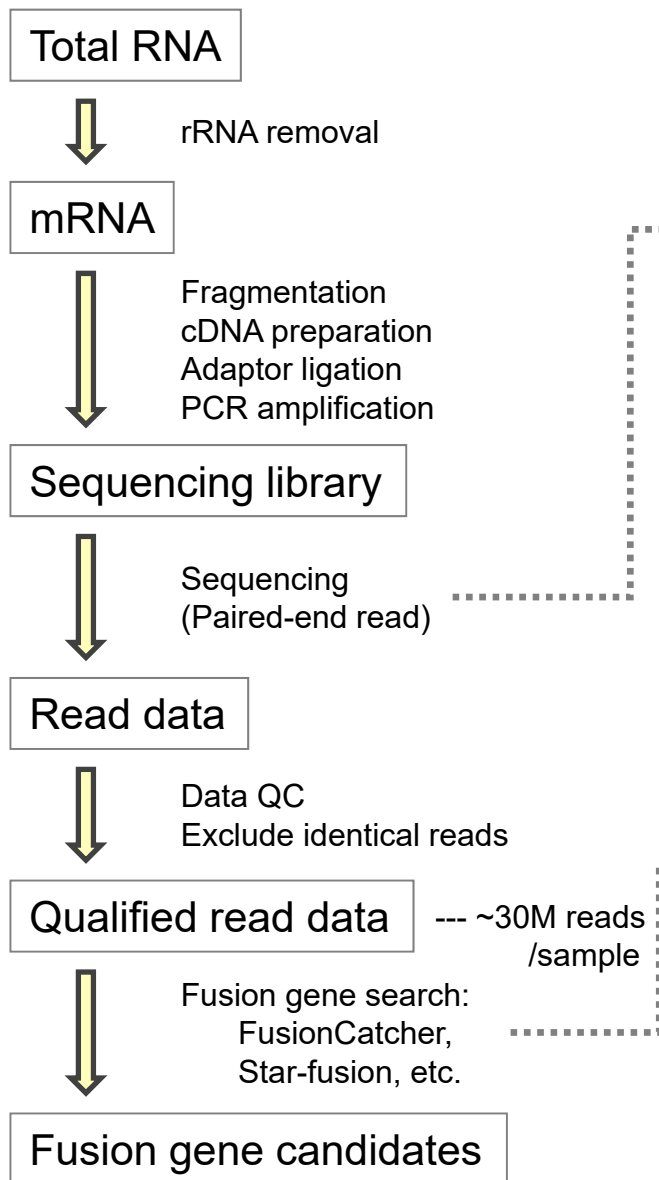
Mutation search:
MuTect, etc.

Mutation candidates

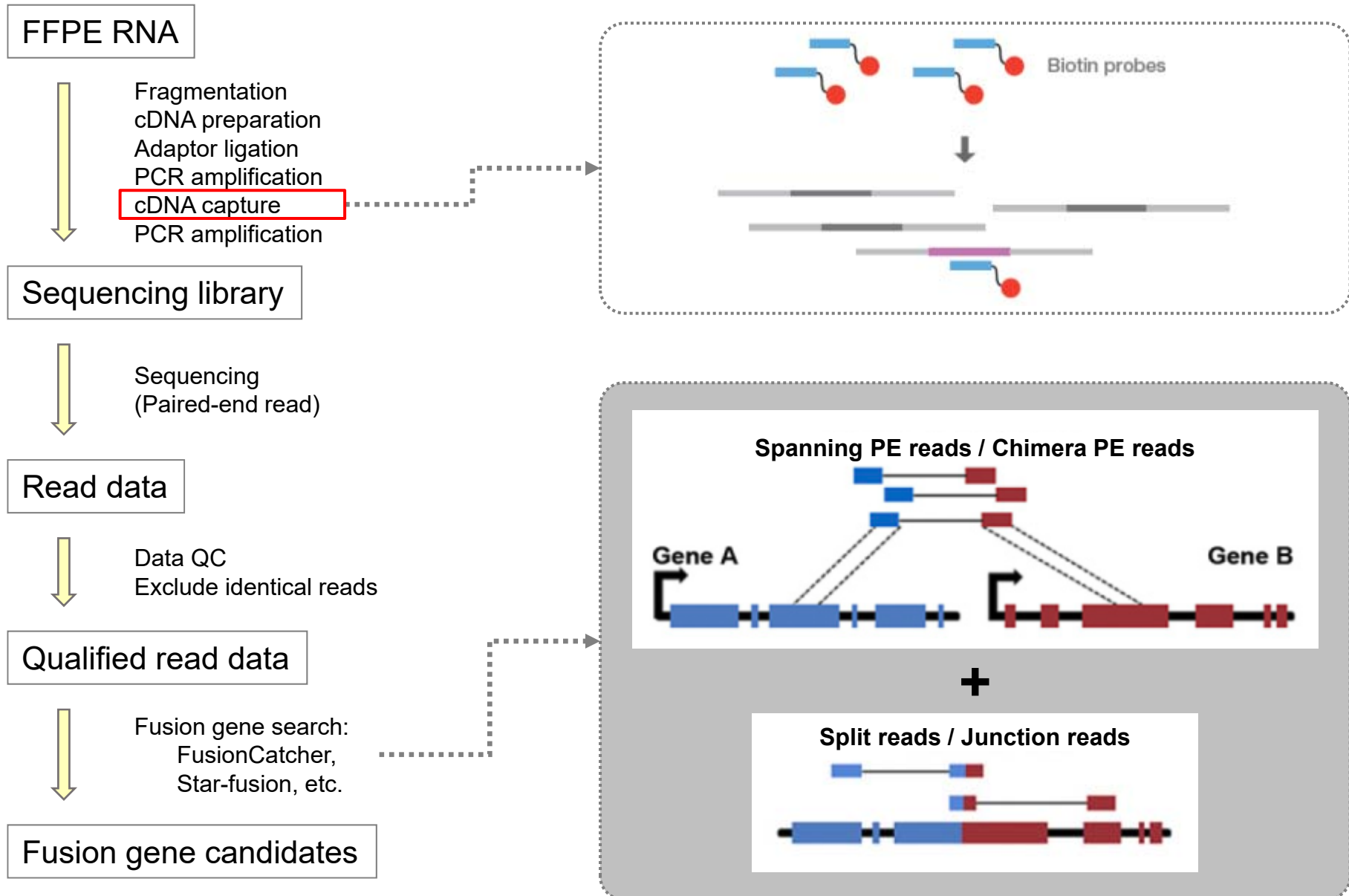
Exon capture



2-5. RNA シーケンシング (RNA-seq) 解析



2-6. Target RNA sequencing 解析



2-7. シーケンスの手法の比較

手法	全ゲノム	全エクソーム	RNA	ターゲット
対象遺伝子	すべて	すべて	すべて (発現遺伝子のみ)	数十から数百
読取深度	30-100	100前後	遺伝子毎に異なる	500～数千
均一性	良い	悪い	不均一	良い (バイト調整による)
検出できる ゲノム変化				
変異	OK	OK	OK	OK
増幅	OK	苦手	不可	OK
融合	OK	不可	OK	OK
腫瘍変異負荷	OK	OK	不可	パネルによりOK
特長	再構成の検出に強い エクソン外の変化も検出	全遺伝子をカバー	融合の検出に強い	腫瘍内不均一性に強い
短所	腫瘍内不均一性に弱い	融合、増幅が見れない	変異、増幅が見れない	特定の遺伝子の変化しか 見れない

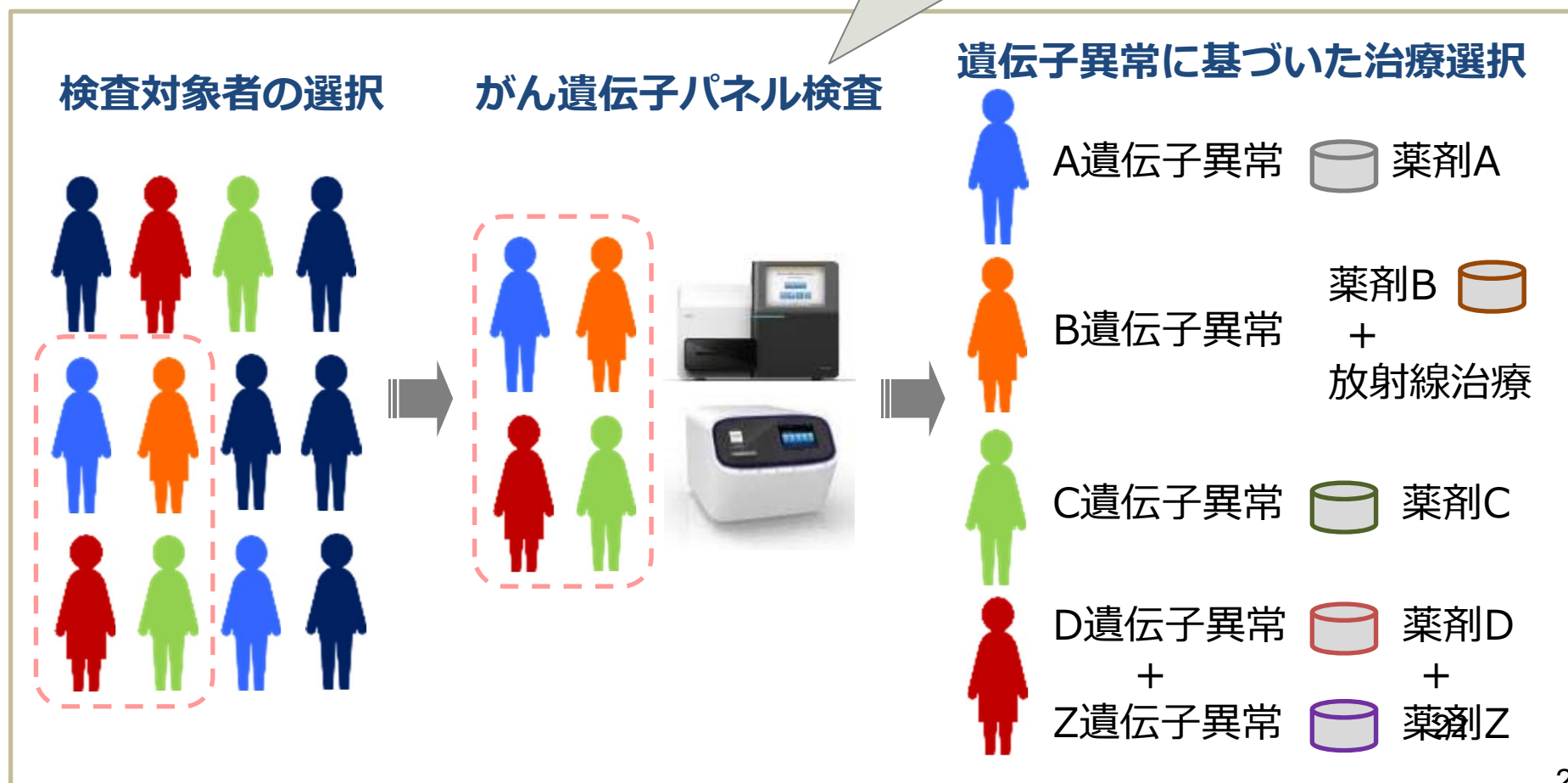
本日の講義の概要

1. 発がん分子機構の基礎知識
2. 次世代シーケンサーゲノム解析の基礎知識
- 3. がん遺伝子パネル検査**
4. FFPE検体の取り扱い
5. 臨床試験に付随した試料の解析事例

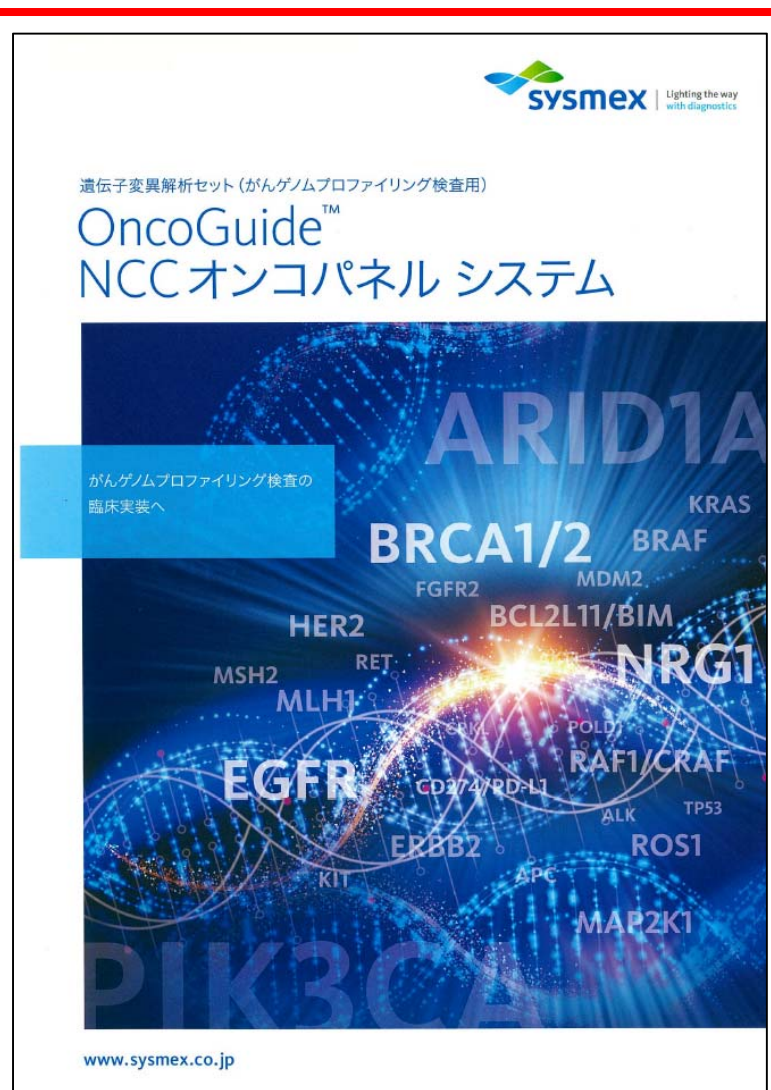
3-1. がんのゲノム医療： 患者のゲノム情報に基づく医療（治療・診断・予後予測）

次世代シーケンサー(NGS)を用いて
多数の遺伝子を一度に調べる検査

治療



3-2. 保険適用されたがん遺伝子パネル検査



sysmex | Lighting the way with diagnostics

遺伝子変異解析セット (がんゲノムプロファイリング検査用)

OncoGuide™
NCC オンコパネル システム

がんゲノムプロファイリング検査の臨床実装へ

ARID1A, KRAS, BRAF, MDM2, FGFR2, BCL2L1/BIM, NRG1, EGFR, HER2, RET, MSH2, MLH1, CD374/PD-L1, RAF1/CRAF, ALK, TP53, ERBB2, ROS1, APC, MAP2K1, PIK3CA

www.sysmex.co.jp

2018/12/25 薬事承認
2019/6/1 保険収載(56,000点)



FoundationOne® CDx
がんゲノムプロファイル
総合製品ガイド

発売準備中

遺伝子変異解析プログラム (がんゲノムプロファイリング検査用)
体細胞調和遺伝子変異解析プログラム (抗がん剤選択薬適応判定用)

FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル

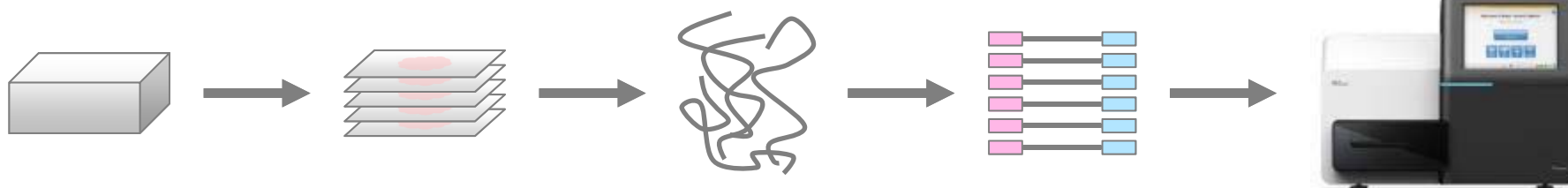
【警告】
本品による検査を実施する際には、関連する指針等に提示される施設要件を満たすことを確認するとともに、関連学会が作成したガイドライン等の最新の情報を参考にする。

すべての薬剤は患者さんのために
CHUGAI 中外製薬
Daiichi Sankyo グループ

2018/12/27 薬事承認
2019/6/1 保険収載(56,000点)

3-3. NCCオンコパネル検査

- 固形腫瘍の治療選択に有用な、114遺伝子の変異と増幅、12遺伝子の融合を検出
- 幅広い品質のFFPE検体が解析可能
- 10%以上の腫瘍細胞を含む検体であれば解析可能

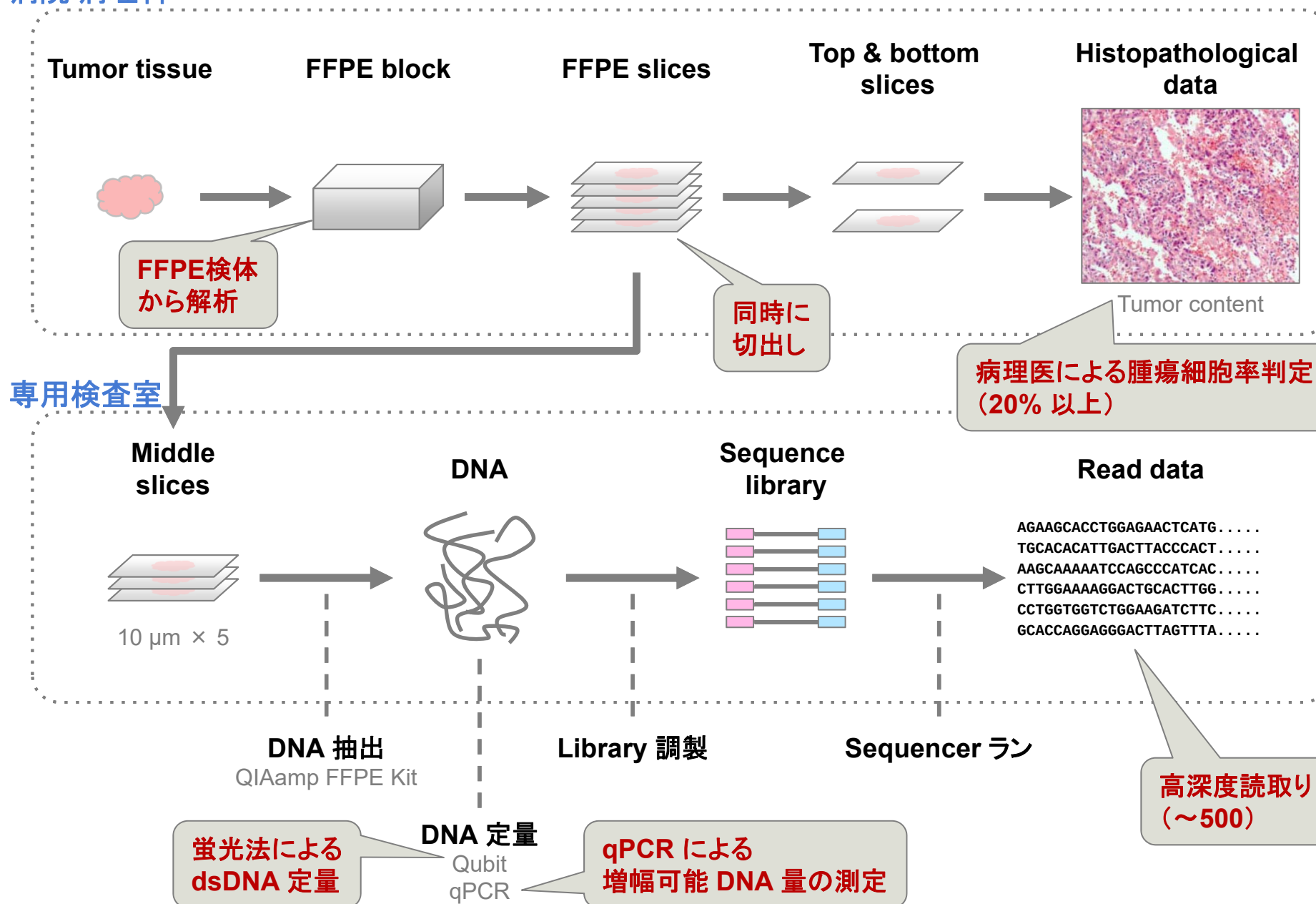


NCC oncopanel v4

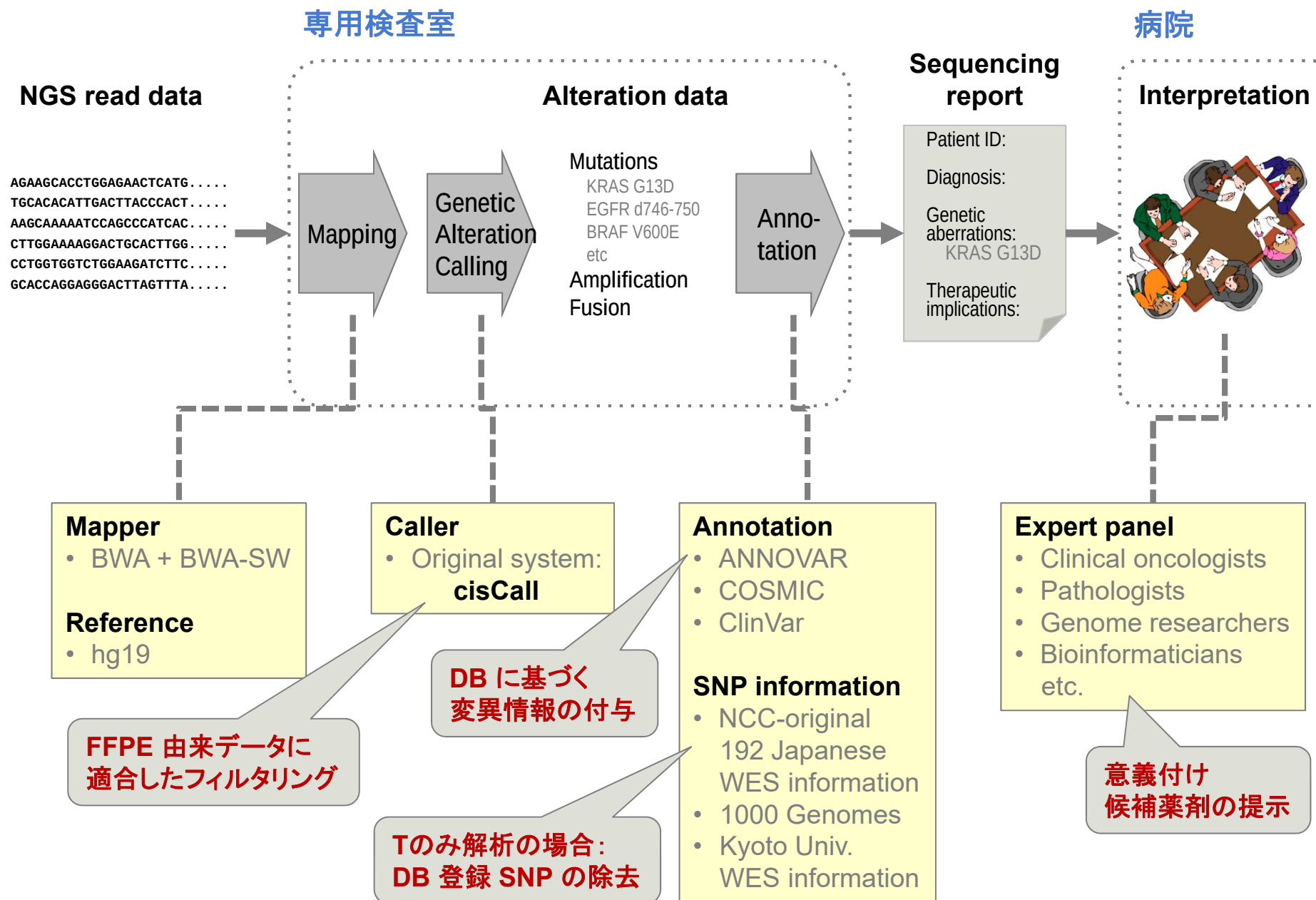
変異・増幅 (114)				遺伝子融合 (12)	
ABL1	CRKL	IDH2	NF1	RAC2	ALK
ACTN4	CREBBP	IGF1R	NFE2L2/Nrf2	RAD51C	AKT2
AKT1	CTNNB1	IGF2	NOTCH1	RAF1/CRAF	BRAF
AKT2	CUL3	IL7R	NOTCH2	RB1	ERBB4
AKT3	DDR2	JAK1	NOTCH3	RET	FGFR2
ALK	EGFR	JAK2	NRAS	RHOA	FGFR3
APC	ENO1	JAK3	NRG1	ROS1	NRG1
ARAF	EP300	KDM6A/UTX	NTRK1	SETBP1	NTRK1
ARID1A	ERBB2/HER2	KEAP1	NTRK2	SETD2	NTRK2
ARID2	ERBB3	KIT	NTRK3	SMAD4	PDGFRA
ATM	ERBB4	KRAS	NT5C2	SMARCA4/BRG1	RET
AXIN1	ESR1/ER	MAP2K1/MEK1	PALB2	SMARCB1	ROS1
AXL	EZH2	MAP2K2/MEK2	PBRM1	SMO	
BAP1	FBXW7	MAP2K4	PDGFRA	STAT3	
BARD1	FGFR1	MAP3K1	PDGFRB	STK11/LKB1	
BCL2L11/BIM	FGFR2	MAP3K4	PIK3CA	TP53	
BRAF	FGFR3	MDM2	PIK3R1	TSC1	欠失多型 (1)
BRCA1	FGFR4	MDM4	PIK3R2	VHL	BCL2L11/BIM
BRCA2	FLT3	MET	POLD1		
CCND1	GNA11	MLH1	POLE		
CD274/PD-L1	GNAQ	MTOR	PRKCI		
CDK4	GNAS	MSH2	PTCH1		
CDKN2A	HRAS	MYC	PTEN	青字 : v3 で新たに搭載された遺伝子	
CHEK2	IDH1	MYCN	RAC1	赤字 : v4 で新たに搭載された遺伝子	

3-4. NCCオンコパネル検査における検体の流れ

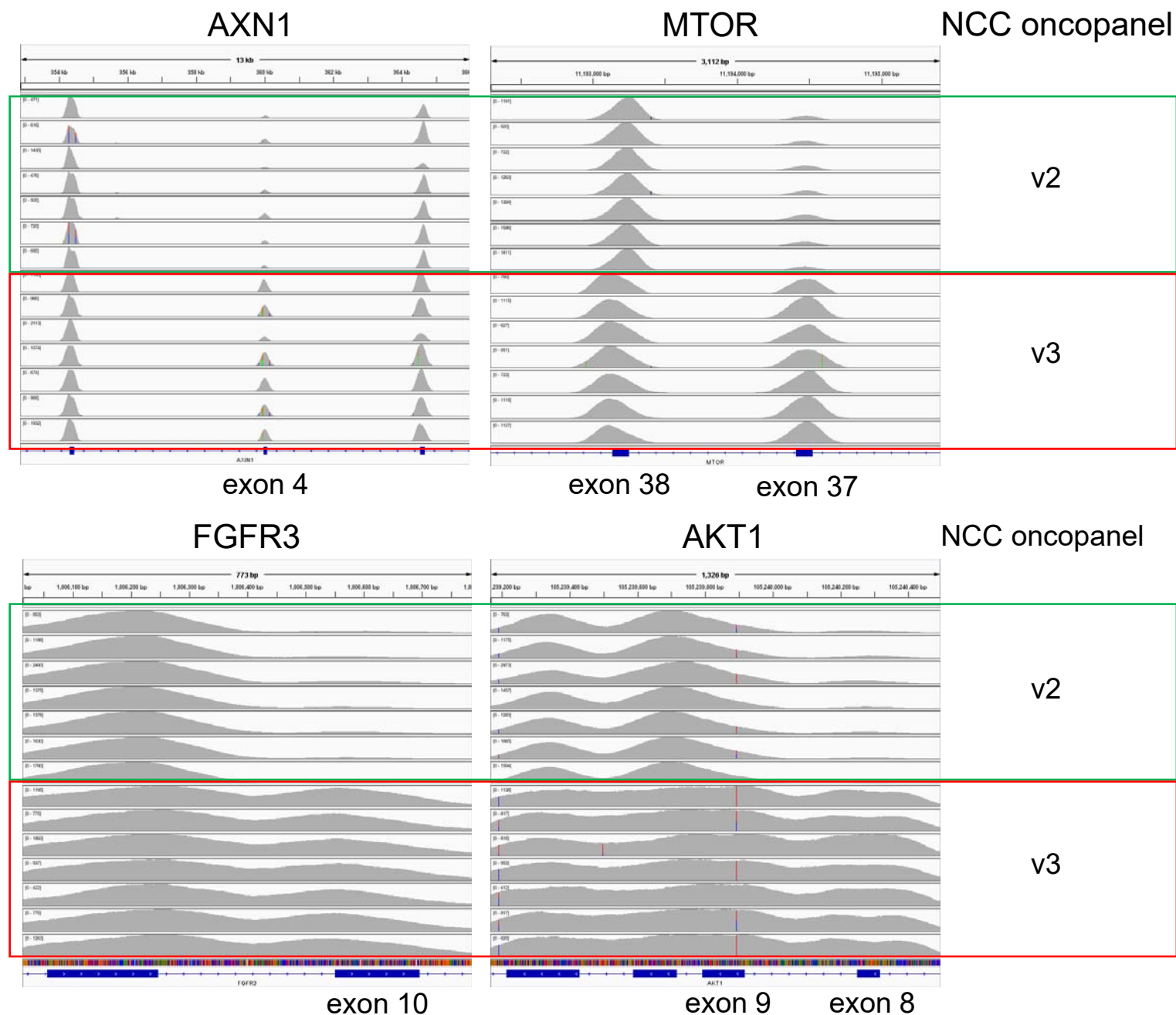
病院 病理科



3-5. NCCオンコパネル検査におけるデータ解析の流れ



3-6. バイトの増強による読取り深度の平均化

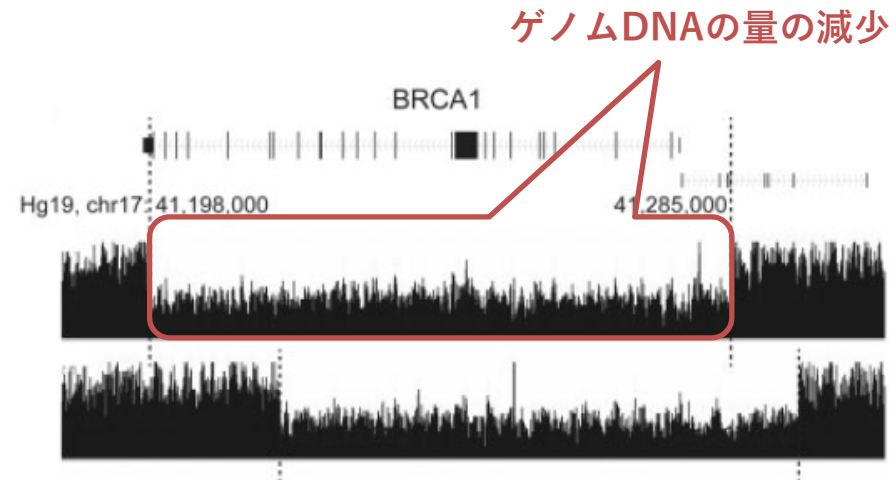


3-8. 全ゲノムシーケンス（検査）

他のゲノム検査では見つからないゲノム異常が判明する

がん抑制遺伝子の不活性化

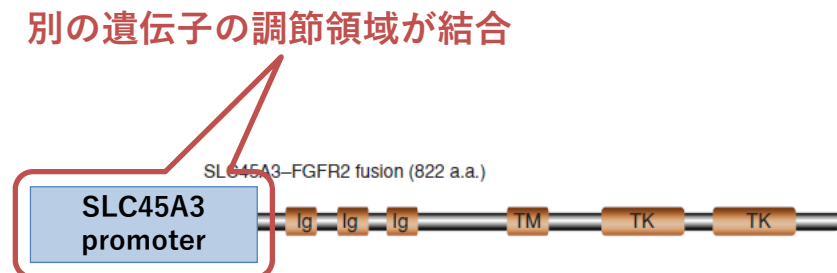
遺伝子全体や遺伝子の一部の欠失：
遺伝性乳・卵巣がんの診断
PARP阻害薬適応のバイオマーカー



Guo et al., Hum Mol Genet (2018)

がん遺伝子の活性化

エクソン以外の領域の転座：
分子標的治療のバイオマーカー



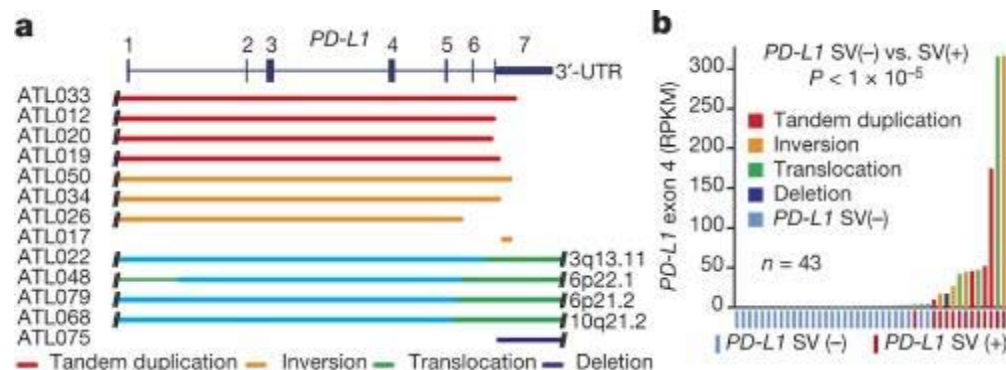
Wu et al., Cancer Discov (2013)

3-9. 全ゲノムシーケンス（検査）

他のゲノム検査では見つからないゲノム異常が判明する

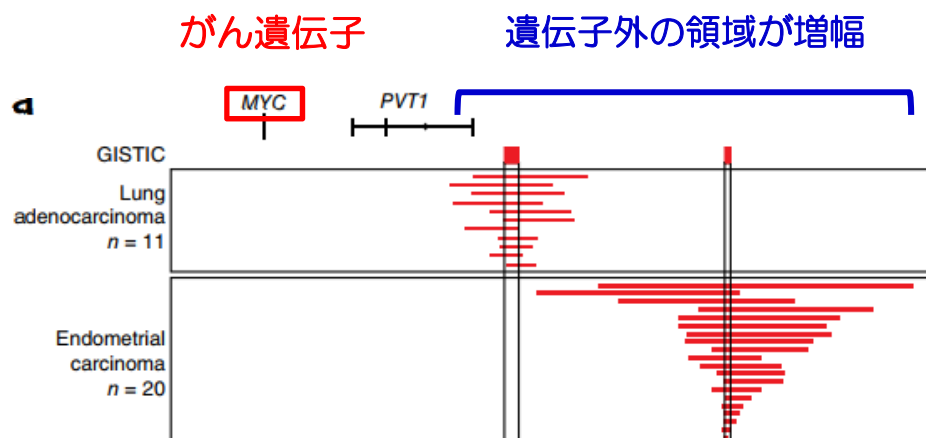
免疫治療標的遺伝子の高発現

非コード領域のゲノム再構成
PD-L1遺伝子の高発現
免疫チェックポイント治療効果
の予測バイオマーカー



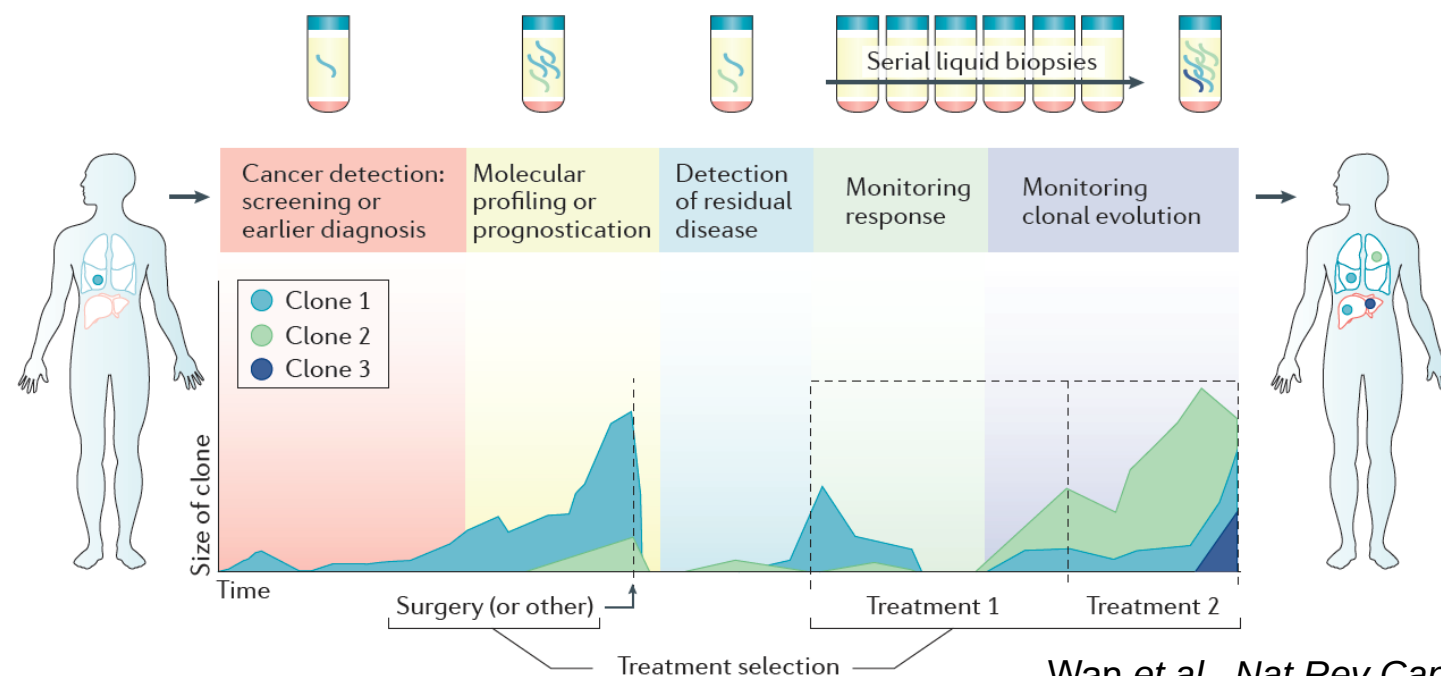
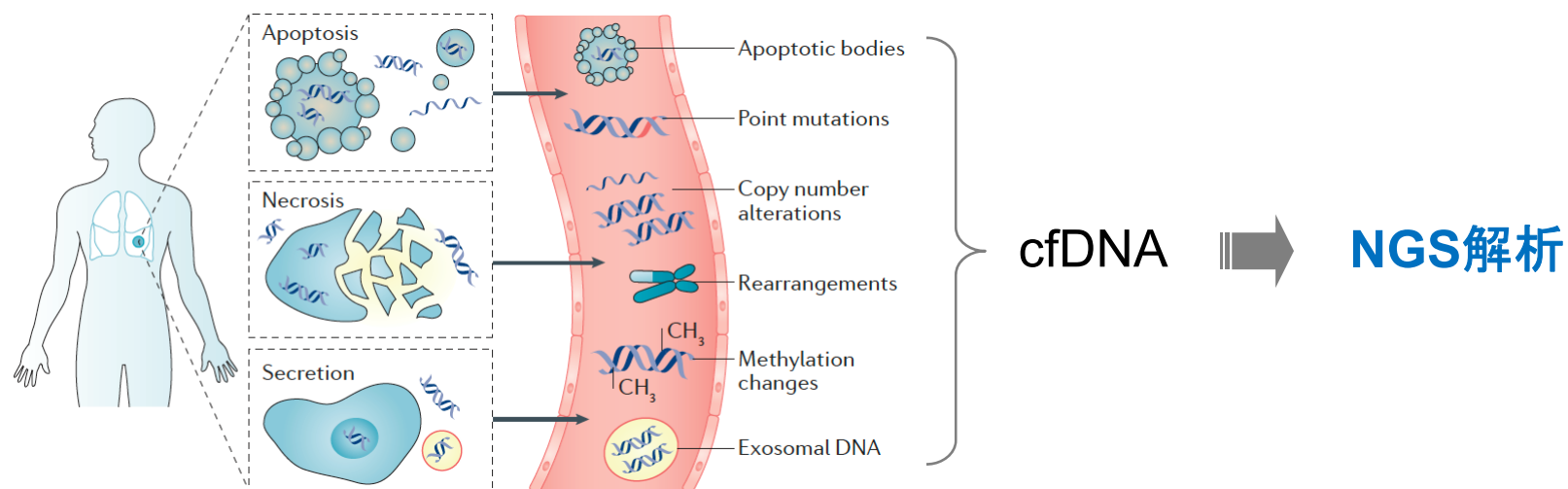
Kataoka et al., Nature (2016)

遺伝子外領域の増幅によるがん遺伝子の活性化



Zhang et al., Nat Genet (2016)

3-10. 血中循環DNA (cfDNA) 検査



Wan *et al.*, *Nat Rev Cancer* (2017)

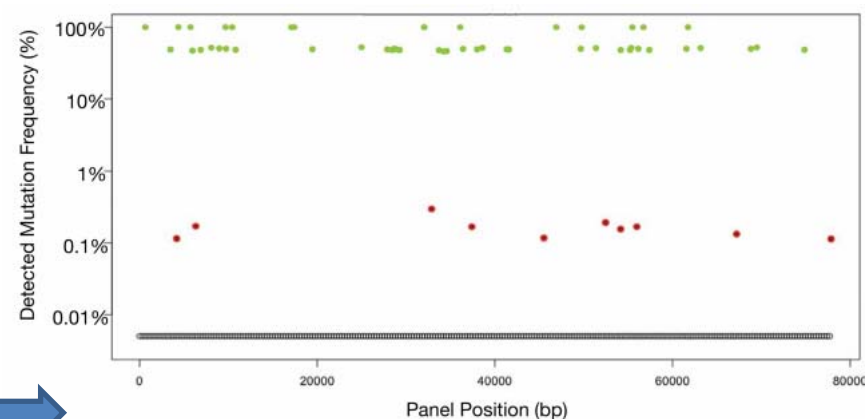
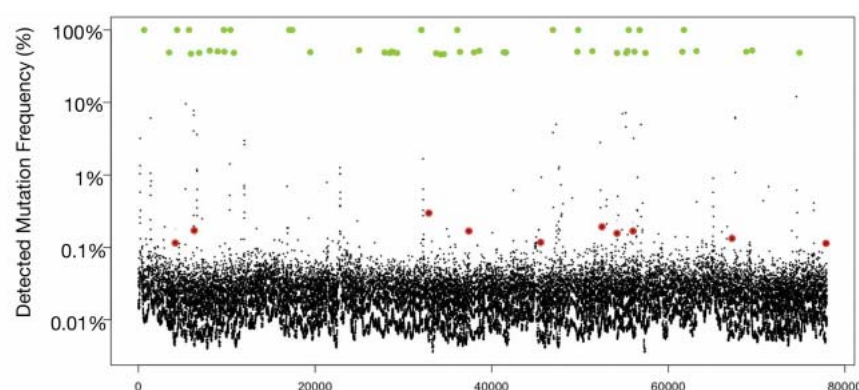
3-11. 血中循環DNA (cfDNA) 検査

GUARDANT360 COVERS ALTERATIONS IN OVER 70 GENES RELEVANT TO MULTIPLE SOLID TUMORS INCLUDING MSI-HIGH

Point Mutations (SNVs) (73 Genes)						Indels (23 Genes)		Amplifications (18 Genes)		Fusions (6 Genes)
AKT1	ALK	APC	AR	ARAF	ARID1A	ATM	APC	AR	BRAF	ALK
ATM	BRAF	BRCA1	BRCA2	CCND1	CCND2	ARID1A	BRCA1	CCND1	CCND2	FGFR2
CCNE1	CDH1	CDK4	CDK6	CDKN2A	CTNNB1	BRCA2	CDH1	CCNE1	CDK4	FGFR3
DDR2	EGFR	ERBB2 (HER2)	ESR1	EZH2	FBXW7	CDKN2A	EGFR	CDK6	EGFR	NTRK1
FGFR1	FGFR2	FGFR3	GATA3	GNA11	GNAQ	ERBB2	GATA3	ERBB2	FGFR1	RET
GNAS	HNF1A	HRAS	IDH1	IDH2	JAK2	KIT	MET	FGFR2	KIT	ROS1
JAK3	KIT	KRAS	MAP2K1/MEK1	MAP2K2/MEK2	MAPK1/ERK2	MLH1	MTOR	KRAS	MET	
MAPK3/ERK1	MET	MLH1	MPL	MTOR	MYC	NF1	PDGFRA	MYC	PDGFRA	
NF1	NFE2L2	NOTCH1	NPM1	NRAS	NTRK1	PTEN	RB1	PIK3CA	RAF1	
NTRK3	PDGFRA	PIK3CA	PTEN	PTPN11	RAF1	SMAD4	STK11			
RB1	RET	RHEB	RHOA	RIT1	ROS1	TP53	TSC1			
SMAD4	SMO	STK11	TERT [†]	TP53	SC1	VHL				
VHL										

Critical or all exons* completely sequenced and all four major classes of alterations

NSCLC guideline-recommended genes shown in bold / *Exons selected to maximize detection of known somatic mutations / [†] Includes TERT promoter region

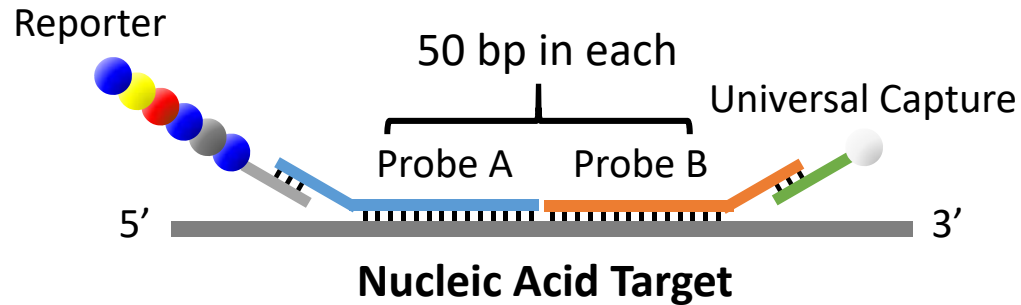


ノイズクリーニング

Lanman et al., PLoS One (2015)

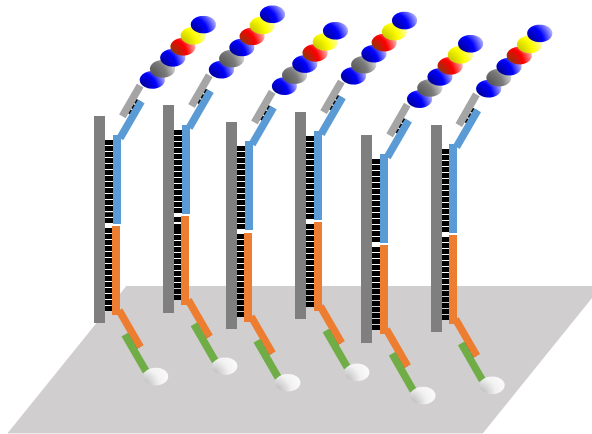
3-12. nCounter 解析

① 目的のmRNAとprobeをhybridizeさせる (67°Cで16時間)

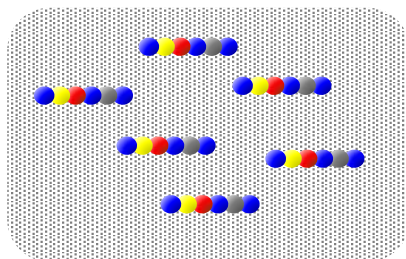


- 蛍光色素のバーコードが付いたプローブをRNAに直接hybridizeさせて分子数をカウントする。
- PCRを用いないのでFFPE由来など質の悪いRNAでも測定が可能である。
- Multiplexに融合遺伝子の検出や、遺伝子発現量の定量化ができる。

② カートリッジにcapture tagをhybridizeし、整列させる (3時間)



③ リポーター数のカウント (5時間)



1 レポーター = 1 核酸

reporter	Count	Identity
	6	KIF5B-RET



本日の講義の概要

1. 発がん分子機構の基礎知識
2. 次世代シーケンサーゲノム解析の基礎知識
3. がん遺伝子パネル検査
- 4. FFPE検体の取り扱い**
5. 臨床試験に付随した試料の解析事例

4-1. 検体の種類とNGS、マイクロアレイ解析の可否

DNA

	NGS			マイクロアレイ	
	全ゲノム	全エクソーム	ターゲット	SNP	メチル化
新鮮凍結検体	◎	◎	◎	◎	◎
FFPE検体	×	△	○	△	△

RNA

	NGS		マイクロアレイ 発現	nCounter
	全トランスクリプトーム	ターゲット		
新鮮凍結検体	◎	◎	◎	◎
FFPE検体	△	○	×	◎

4-2. プレアナリシス段階での検体管理・選択



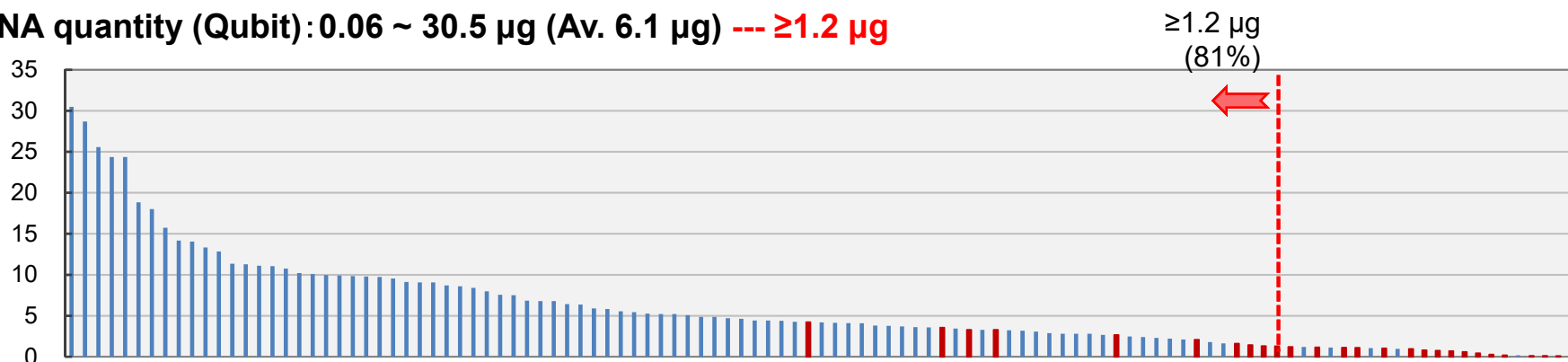
抜粋：

- ・中性緩衝ホルマリン溶液を使用
- ・3時間以内に固定
- ・固定時間は6～48時間
- ・脱灰はEDTA脱灰
- ・ミクロトームの刃を症例毎に交換
- ・DNAの品質評価法
 - Ct値/ Δ Ct値
 - DIN
 - Q-value

出典：病理学会HP「ゲノム診断用病理組織検体取り扱い規程」
http://pathology.or.jp/news/pdf/genome_kitei_170915.pdf

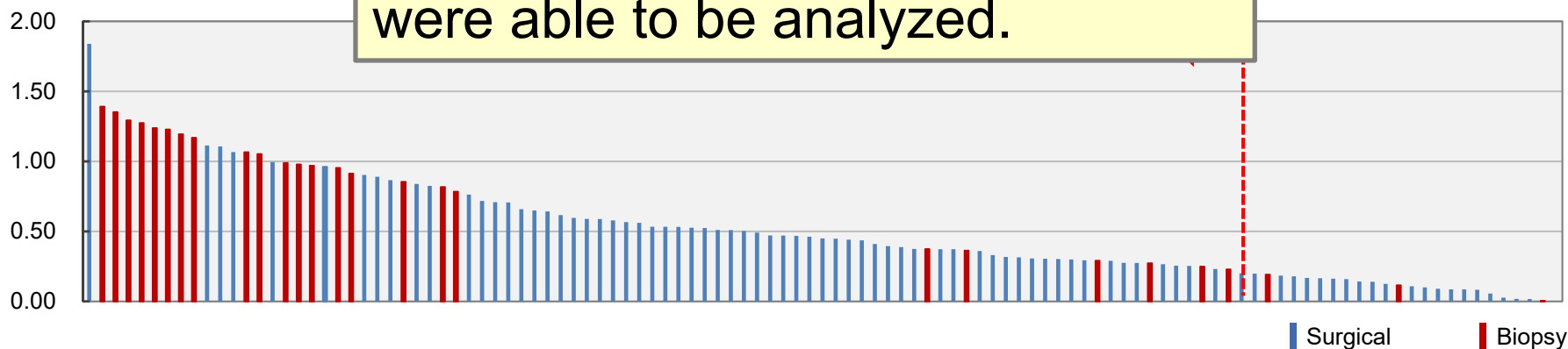
4-3. アーカイブFFPE組織から抽出されたDNAの量と質 (TOP-GEAR研究初期)

DNA quantity (Qubit): 0.06 ~ 30.5 µg (Av. 6.1 µg) --- ≥ 1.2 µg



DNA quality (Q-value):

**~60% of archived FFPE samples
were able to be analyzed.**



$$\begin{aligned}
 \text{Q-value} &= \frac{\text{DNA quantity evaluated by qPCR}}{\text{dsDNA quantity evaluated by Qubit}} \\
 &= \text{content of PCR-active DNA}
 \end{aligned}$$

4-4. FFPE DNA の質と量が NGS データに与える影響

Q-value

L12: 0.465

L40: 0.115

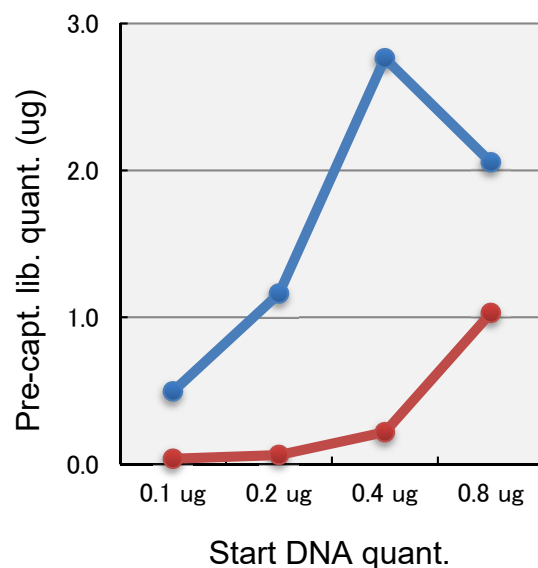


開始DNA量を0.1～0.8 ugで振って
NCC oncopanelライブラリーを調製
(標準0.2 ug)

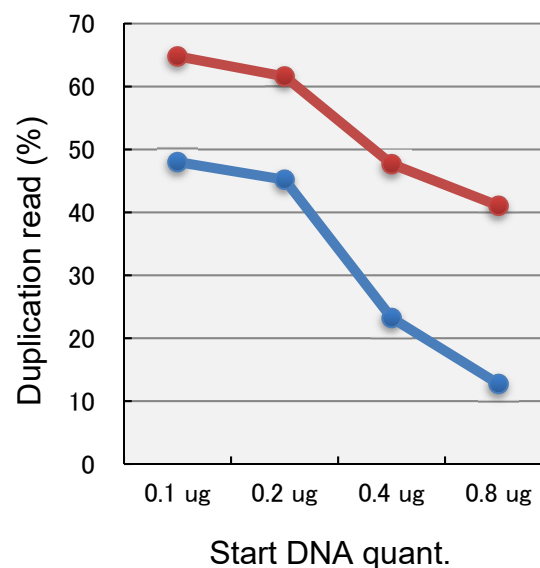


NGSラン

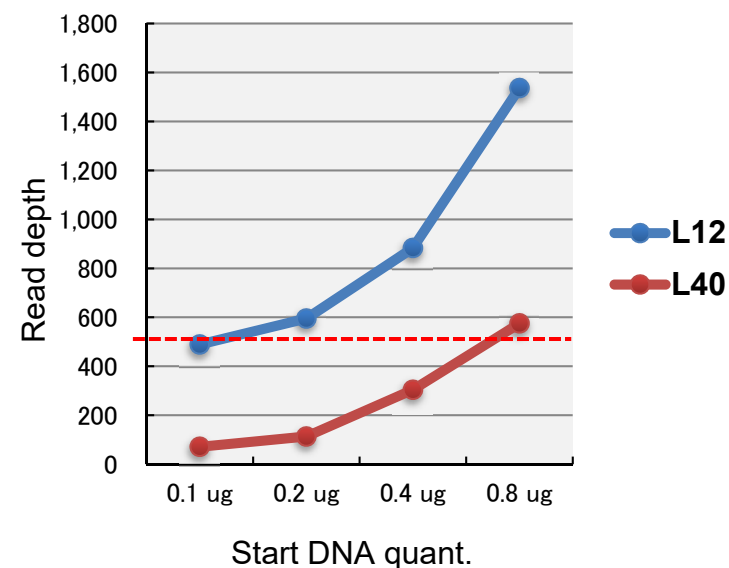
一次ライブラリー収量



リード重複率



読取深度

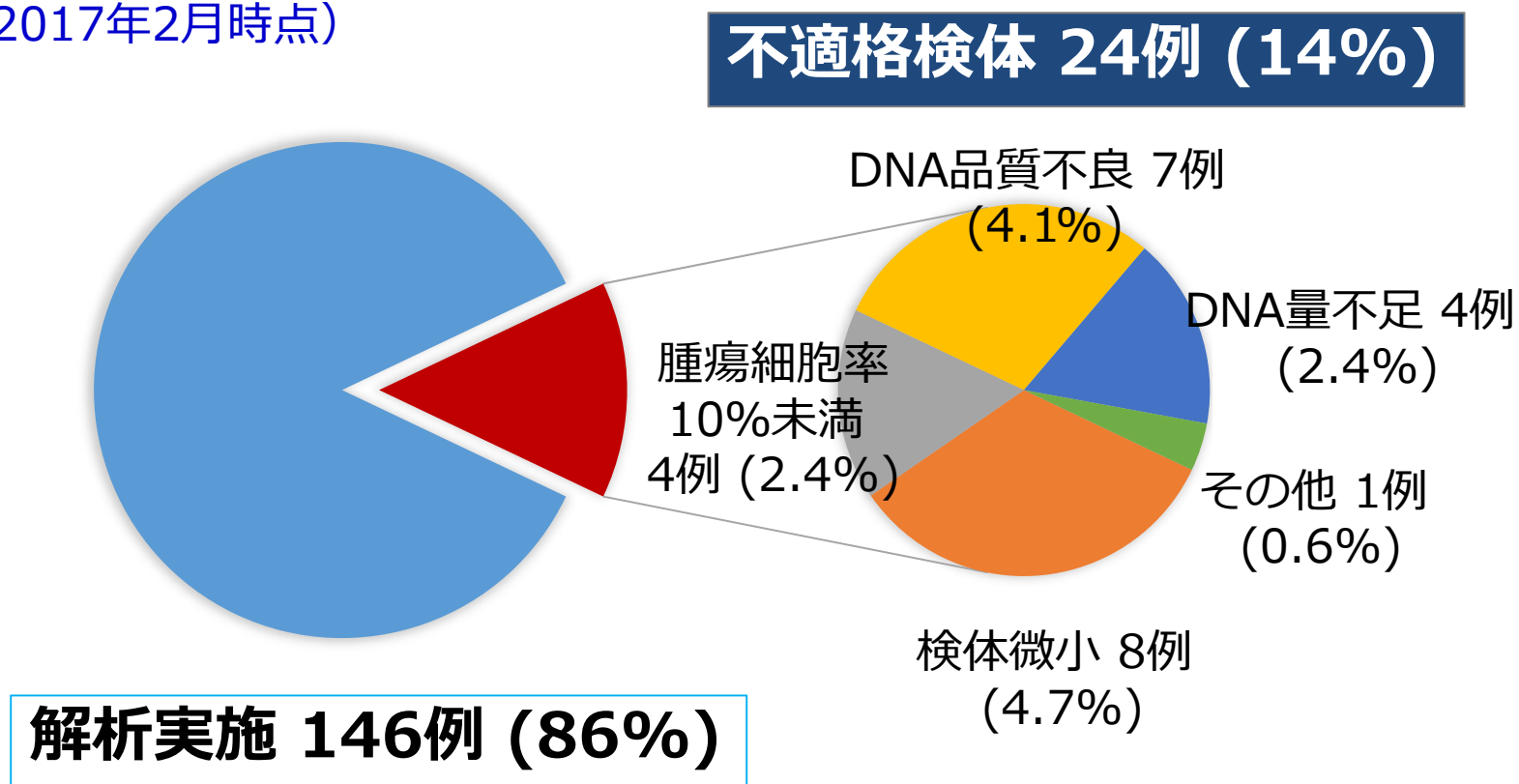


- 低品質のDNAであっても、開始DNA量を増やすことで、解析に十分なNGSデータが得られる場合がある。
- 高品質のDNAであれば、開始DNA量を減らしても、解析に十分なNGSデータが得られる場合がある。

4-5. TOP-GEAR研究における解析不適格検体について

➤ 登録症例数 170例

(2017年2月時点)



→ **コンタミネーション疑い 4件 (2.7%)**

4-6. コンタミネーションの問題

TOP-GEAR変異コール結果

染色体	塩基位置	アレル		変異アレル頻度(%)		遺伝子	アミノ酸変化	判定
		正常	変異	Matched	Unmatched			
5	35,875,593	T	A	10.7	-	IL7R	Intron	コンタミネーション？
8	32,441,235	A	C	9.1	-	NRG1	Intron	コンタミネーション？
8	32,449,785	T	G	10.3	-	NRG1	Intron	コンタミネーション？
10	61,570,411	A	T	8.1	-	CCDC6	Intron	コンタミネーション？
11	108,158,134	T	C	10.0	-	ATM	Intron	コンタミネーション？
12	25,398,284	C	A	39.7	39.7	KRAS	G12V	体細胞変異



結果検証

検証1 (再検査) 検証2 (他検体のSNP型と照合)

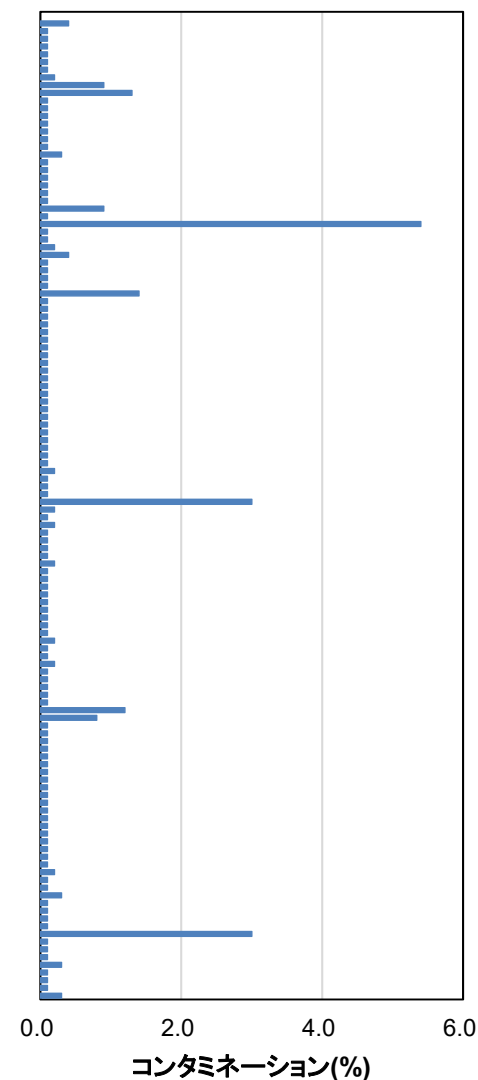
染色体	塩基位置	遺伝子	初回検査		再検査	混入予想	検体1	検体2	検体3	検体4
			血液	腫瘍	腫瘍					
5	35,875,593	IL7R	T	T/A	T/A	A	A	A/T	A	A/T
8	32,441,235	NRG1	A	A/C	A/C	C	A/C	A	A	A/C
8	32,449,785	NRG1	T	T/G	T	G	T	T	T	T
10	61,570,411	CCDC6	A	A/T	A/T	T	A/T	A/T	A	A/T
11	108,158,134	ATM	T	T/C	T/C	C	C	T	C/T	C/T

残FFPE検体からの再検査で、コンタミネーションの再現性あり
既解析検体には、同一遺伝子型の検体なし
5.8% (6/104) の検体で、1.0%以上のコンタミネーションの疑い



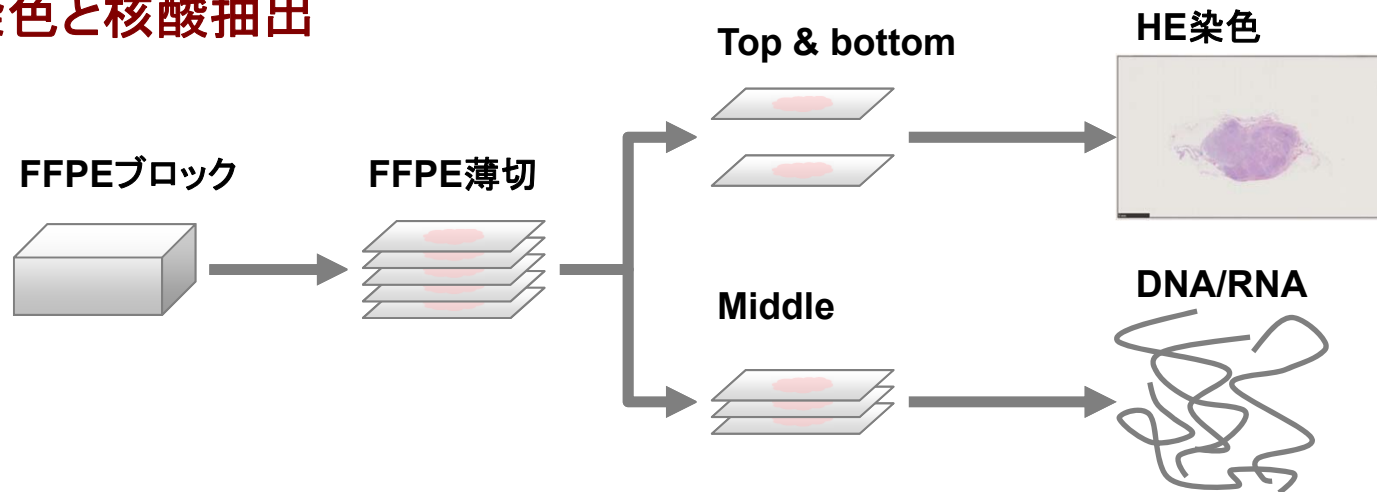
DNA抽出・NGS解析工程ではなく、
FFPE試料自体に他症例由来の細胞が混入

ContEstによるコンタミネーション推定

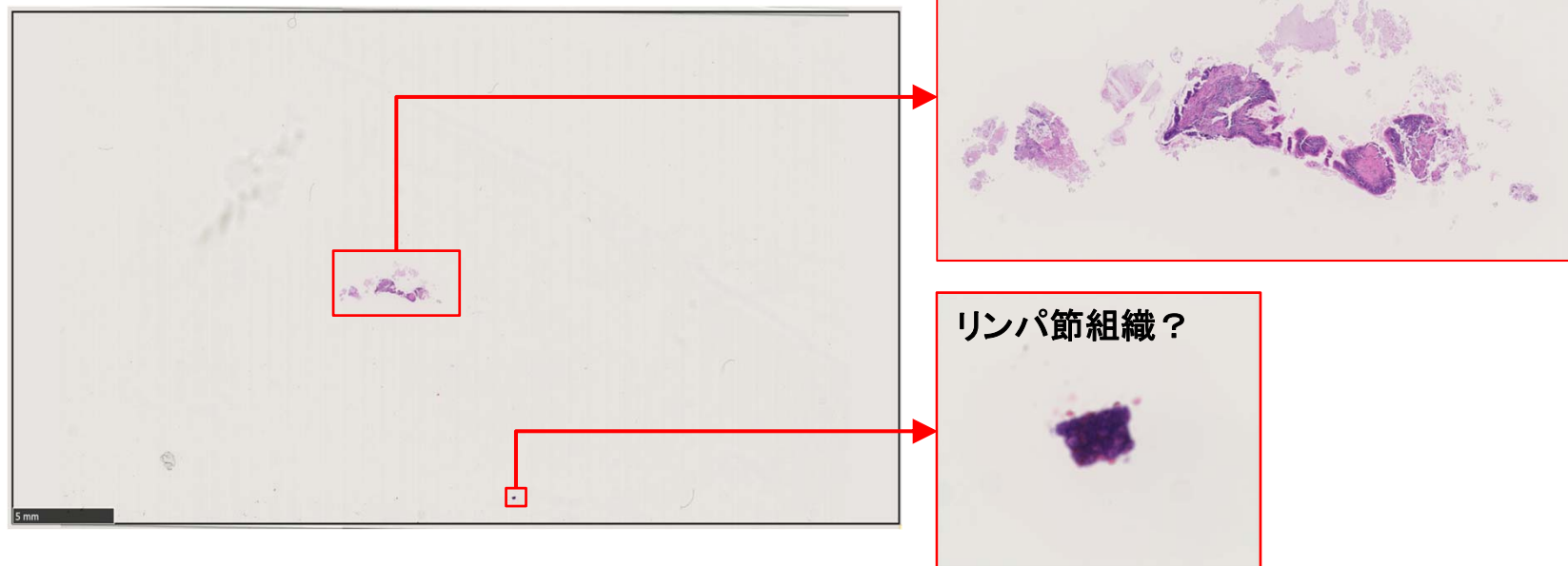


4-7. コンタミネーションの問題

HE染色と核酸抽出



コンタミネーションの見られたHE染色像

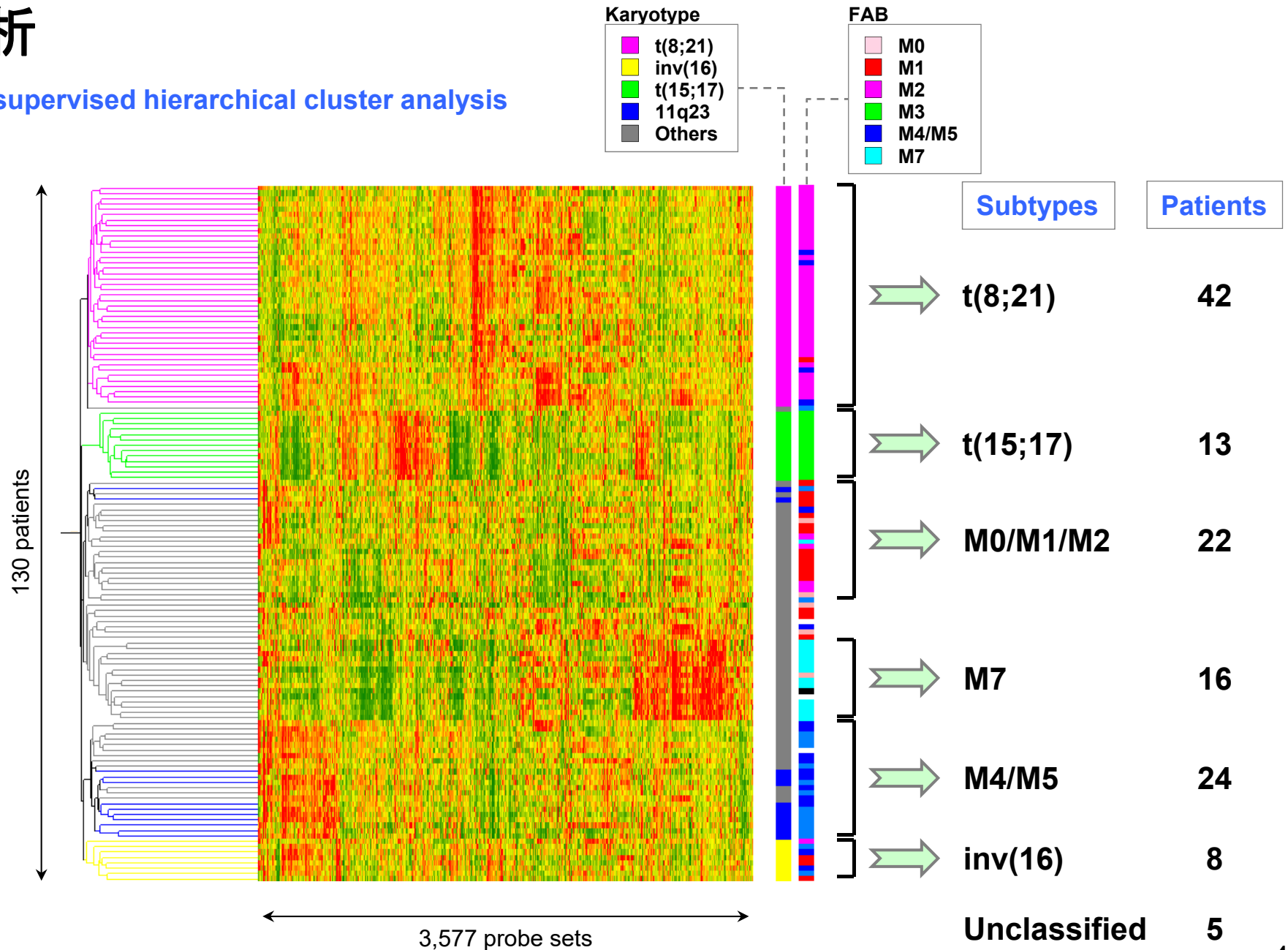


本日の講義の概要

1. 発がん分子機構の基礎知識
2. 次世代シーケンサーゲノム解析の基礎知識
3. がん遺伝子パネル検査
4. FFPE検体の取り扱い
- 5. 臨床試験に付随した試料の解析事例**

5-1. AML99研究検体を用いた小児AMLのマイクロアレイ解析

Unsupervised hierarchical cluster analysis



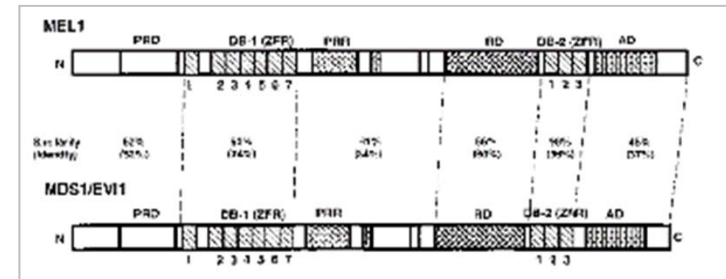
5-2. AML99研究検体を用いた小児AMLの予後因子探索

Leukemia (2015) 29, 1076–1083

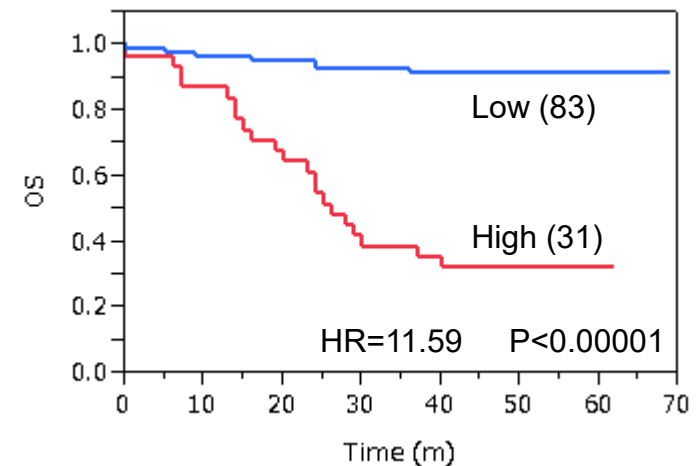
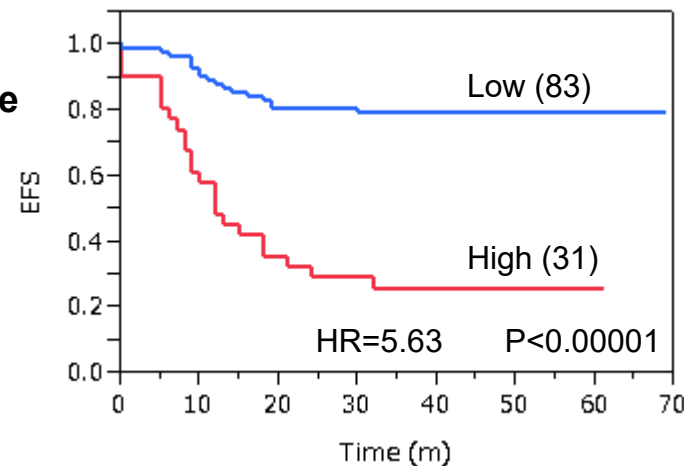
ORIGINAL ARTICLE

High expression of *EVII* and *MEL1* is a compelling poor prognostic marker of pediatric AML

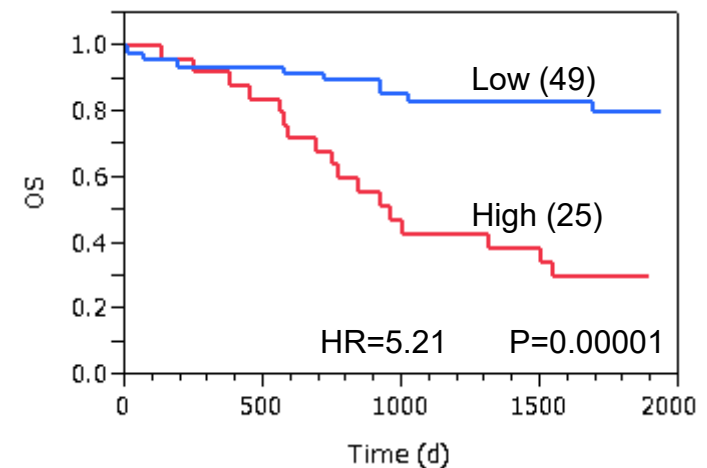
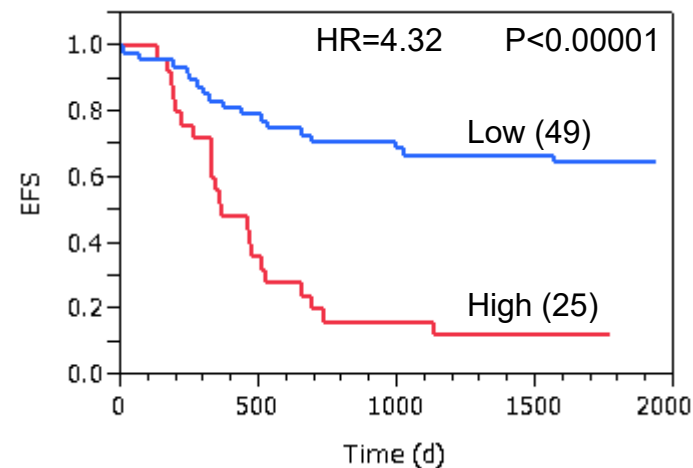
A Jo^{1,13}, S Mitani¹, N Shiba^{2,3}, Y Hayashi², Y Hara^{2,3}, H Takahashi⁴, I Tsukimoto⁵, A Tawa⁶, K Horibe⁷, D Tomizawa⁸, T Taga⁹, S Adachi¹⁰, T Yoshida¹ and H Ichikawa^{1,11,12}



AML99 patients excluding e-M7 subtype



AML-05 patients excluding M7 subtype



5-3. AML99研究検体を用いた小児AMLの予後因子探索

Table 3. Therapies and outcomes of *EVI1/MEL1*-overexpressed patients who obtained CR

	Total (n = 25)	Allo-SCT (n = 11)	Chemotherapy (n = 14)	P-value
Relapse				0.0051
CR	10 (40%)	8 (73%)	2 (14%)	
Relapsed	15 (60%)	3 (27%)	12 (86%)	
Survival				0.049
Alive	10 (40%)	7 (64%)	3 (21%)	
Dead	15 (60%)	4 (36%)	11 (79%)	

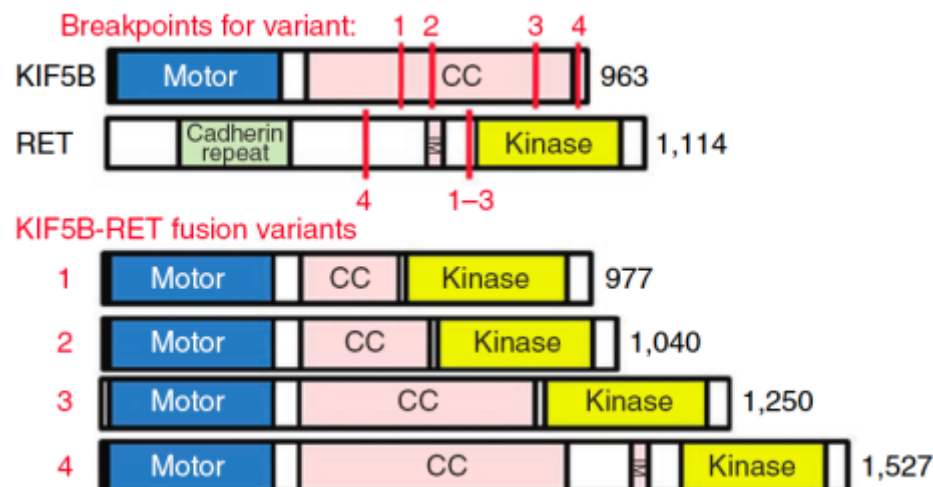
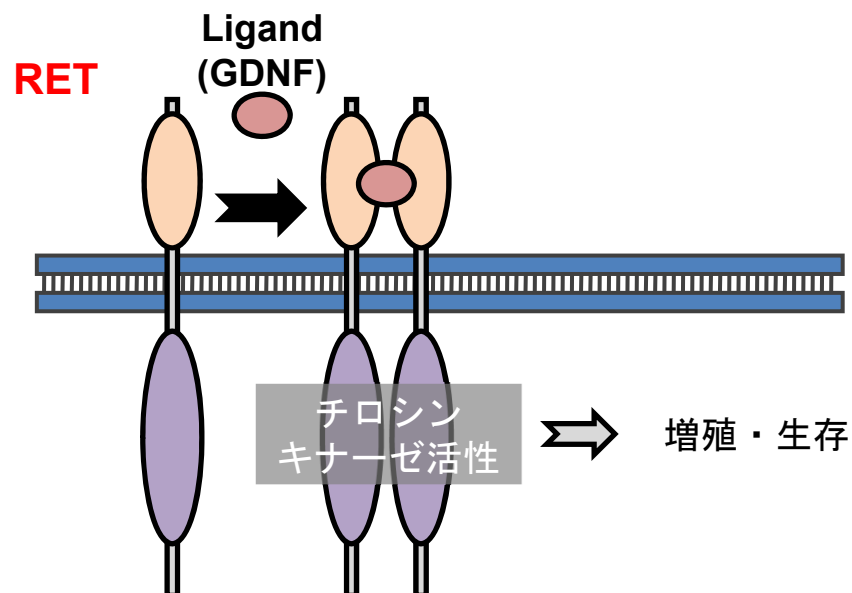
Abbreviations: allo-SCT, allogenic stem cell transplantation; CR, complete remission.

5-4. 肺腺がんにおける *KIF5B-RET* 融合遺伝子の同定

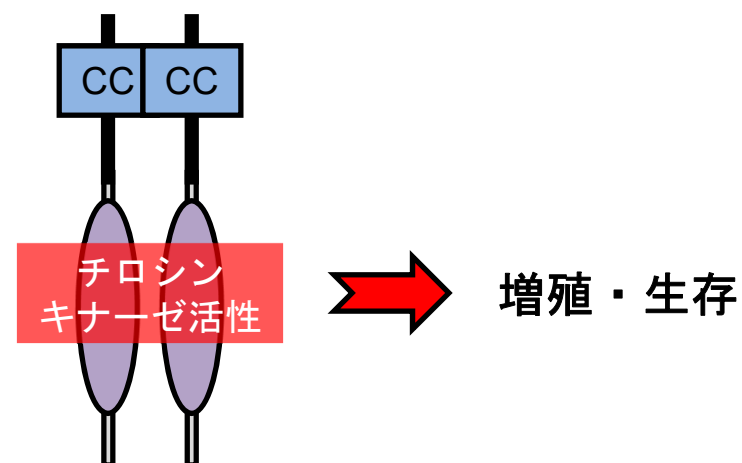
NATURE MEDICINE VOLUME 18 | NUMBER 3 | MARCH 2012

KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma

Takashi Kohno^{1,15}, Hitoshi Ichikawa^{2,15}, Yasushi Totoki³, Kazuki Yasuda⁴, Masaki Hiramoto⁴, Takao Nammo⁴, Hiromi Sakamoto², Koji Tsuta⁵, Koh Furuta⁵, Yoko Shimada¹, Reika Iwakawa⁶, Hideaki Ogiwara¹, Takahiro Oike⁶, Masato Enari⁷, Aaron J Schetter⁸, Hirokazu Okayama^{6,8}, Aage Haugen⁹, Vidar Skaug⁹, Suenori Chiku¹⁰, Itaru Yamanaka¹¹, Yasuhito Arai³, Shun-ichi Watanabe¹², Ikuo Sekine¹³, Seishi Ogawa¹⁴, Curtis C Harris⁸, Hitoshi Tsuda⁵, Teruhiko Yoshida², Jun Yokota⁶ & Tatsuhiro Shibata³

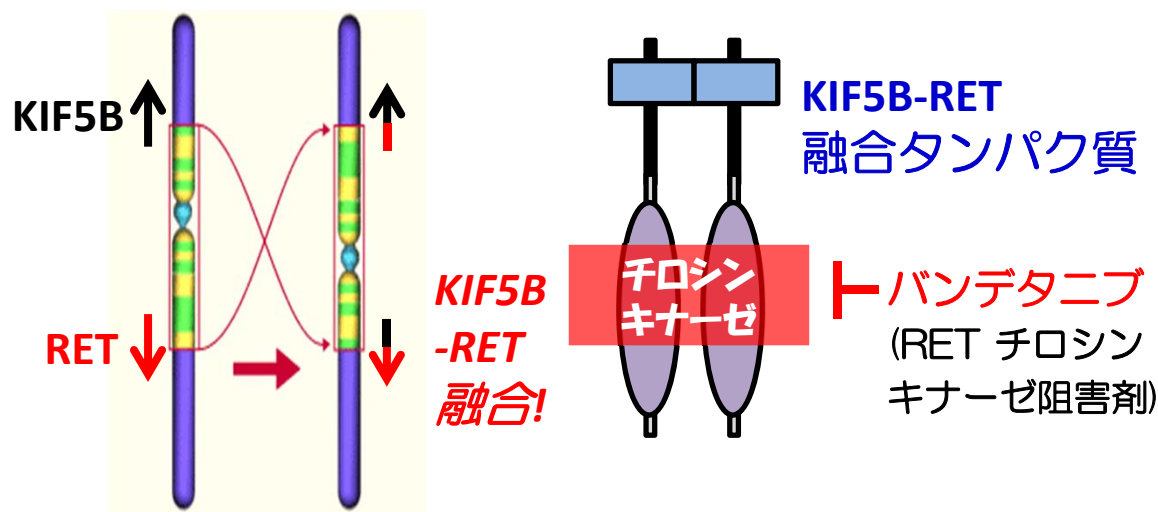


KIF5B-RET



5-5. RET 融合遺伝子を標的とした臨床試験

2%の肺腺がん中存在するRET融合遺伝子を発見 (Kohno et al., Nat Med, 2012)



5/29/2012 日本経済新聞



バンデタニブの治療効果を明らかにするための臨床試験 (2013年1月開始)

「RET融合陽性肺がんに対する第II相バンデタニブ医師主導治験」

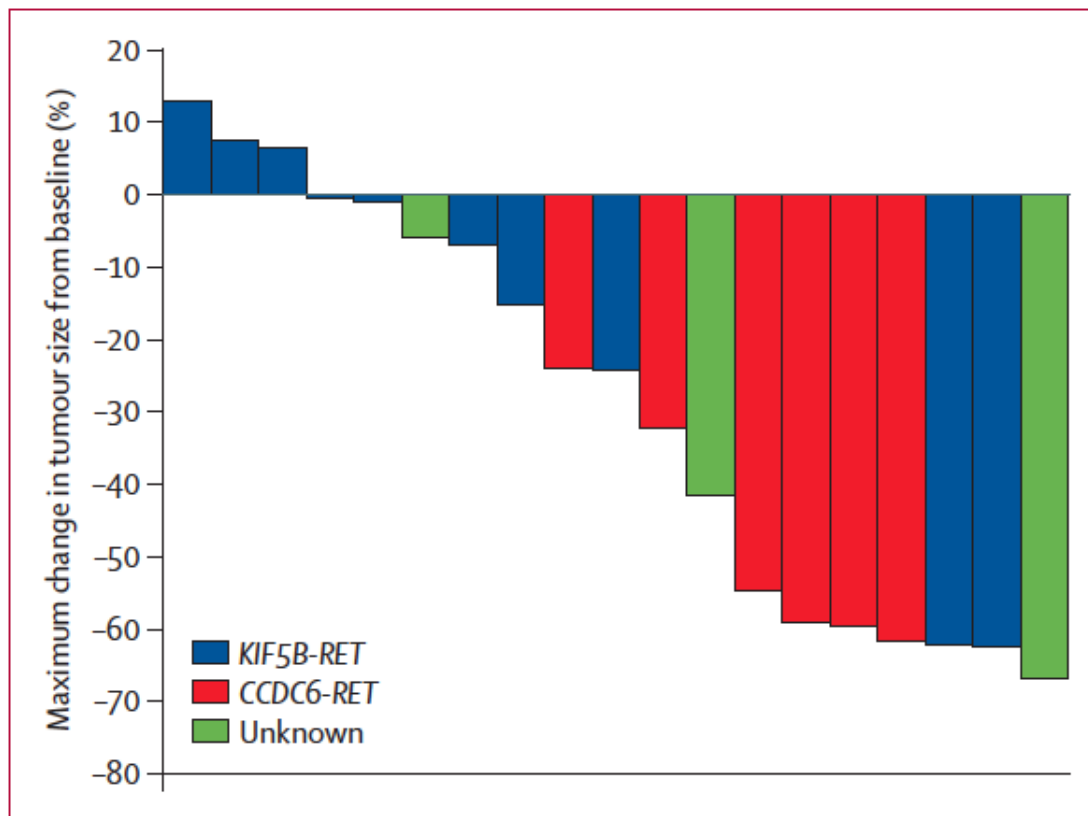
国立がん研究センター東病院 呼吸器内科 後藤功一グループ

薬剤無償提供：アストラゼネカ社

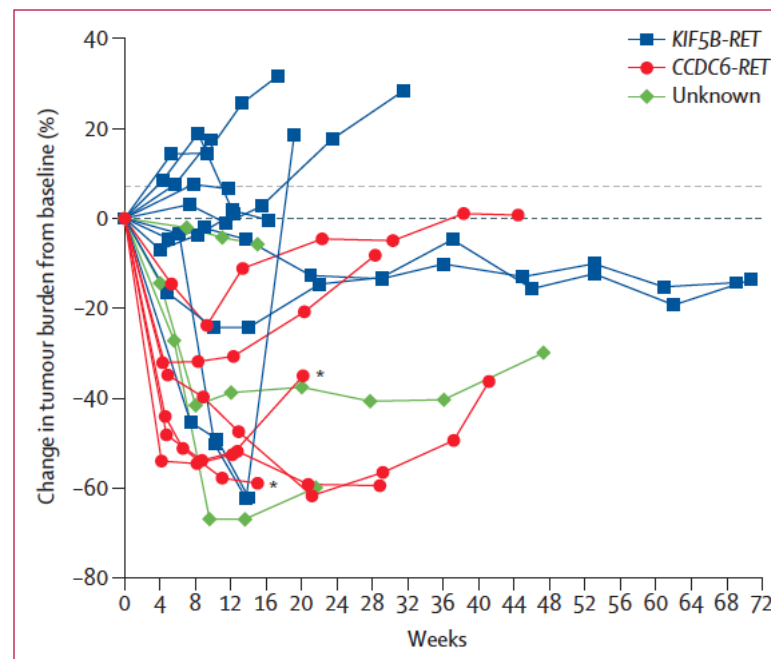
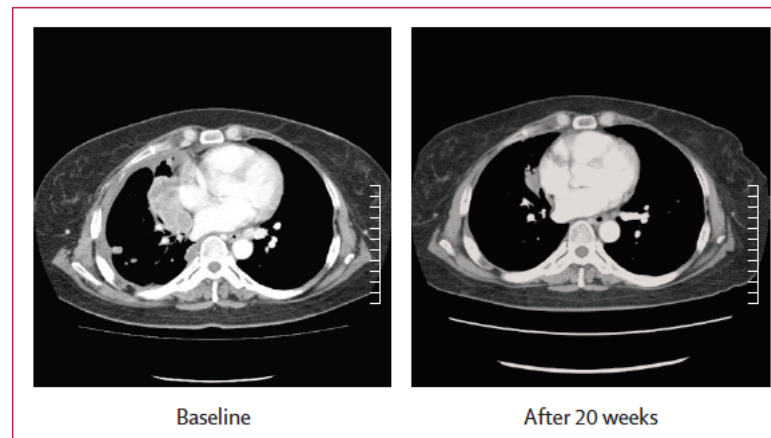
厚生労働省 医療技術実用化総合研究事業



5-6. LURET試験： RET融合陽性肺がんに対するバンデタニブ治療



**9 PR and ORR 53% (90% CI, 31 to 74)
in 17 eligible cases**



Yoh K et al., *Lancet Respir Med* (2017)

5-6. RET耐性変異の検出

A secondary *RET* mutation in the activation loop conferring resistance to vandetanib

Takashi Nakaoku¹, Takashi Kohno^{1,2}, Mitsugu Araki^{3,4}, Seiji Niho⁵, Rakhee Chauhan⁶, Phillip P. Knowles⁶, Katsuya Tsuchihara², Shingo Matsumoto^{2,5}, Yoko Shimada¹, Sachiyo Mimaki², Genichiro Ishii⁷, Hitoshi Ichikawa², Satoru Nagatoishi⁸, Kouhei Tsumoto⁸, Yasushi Okuno⁴, Kiyotaka Yoh⁵, Neil Q. McDonald^{6,9} & Koichi Goto⁵

NATURE COMMUNICATIONS | (2018)9:625

