

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告

ゲノムシーケンス解析に関わる技術開発に関する研究

中川 英刀

独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
ゲノムシーケンス解析研究チーム チームリーダー

A．研究目的

がんゲノムは、がんの進行や治療反応に伴って変化する高い柔軟性と、個々のがん細胞が異なった変異をもつという不均一性を有し、ゲノム情報を指標としてがんの個別化治療やゲノム医療を実践していくには大きな障害となっている。その柔軟性に対応していくためには、治療の過程においてがんゲノムを随時モニターしていかなければならないが、造血系腫瘍と異なり、固形腫瘍においては病態の変化に伴って経時的に連続して生検を行うことは不可能である。また、個別化医療やゲノム医療の適応となるのは主に切除不能の進行・再発症例であり、分子プロファイル作成のためのがん組織の採取を生検にて行うのは浸襲性が高く困難なことが多く、採血によってがんの分子プロファイルを作成するという「liquid biopsy」の概念が、がんの個別化医療やゲノム医療において注目されている。本研究は、これまで我々が取り組んできた肝臓がんゲノム(Nature 497, 108, 2013)を対象に、次世代シーケンサーを駆使して、容易に採取できる血液循環DNA (cell-free DNA: cfDNA)のゲノムシーケンス解析を試み、同じ症例の切除標本から複数箇所採取した腫瘍 DNA でのゲノムシー

ケンス解析も行って、腫瘍の変異プロファイルとの比較検討を行う。理化学研究所には、cfDNA 特有の問題（微量で断片化）を考慮にいた、網羅的ゲノムシーケンス解析を行うための、次世代シーケンサー(NGS)用のライブラリー構築の方法の確立を試みる。

B．研究方法

血漿中の cfDNA の性質として、微量かつ 150-200bp の大きさに断片化をしており、通常の NGS のライブラリー構築の方法では解析ができない。そこで、Illumina Nano DNA sample Prep kit、Nextera DNA Sample Prep Kit、Rubicon ThriPLEX-FD、新規でリリースされた KAPA HyperPrep Kit を用いて、50ng の血漿 cfDNA より NGS ライブラリーを構築し、シーケンスを行い、それぞれの NGS ライブラリーの評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究の実施に当たっては、平成 25 年 2 月 8 日改正告示の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて、インフォ

ームドコンセントが得られた連結可能な匿名化された検体のみを用い、患者のプライバシーが守られることに配慮した実験計画に基づいて行われた。臨床検体採取を行う広島大学医学部および理化学研究所の倫理委員会にて承認された（横浜 H20-11（11））。

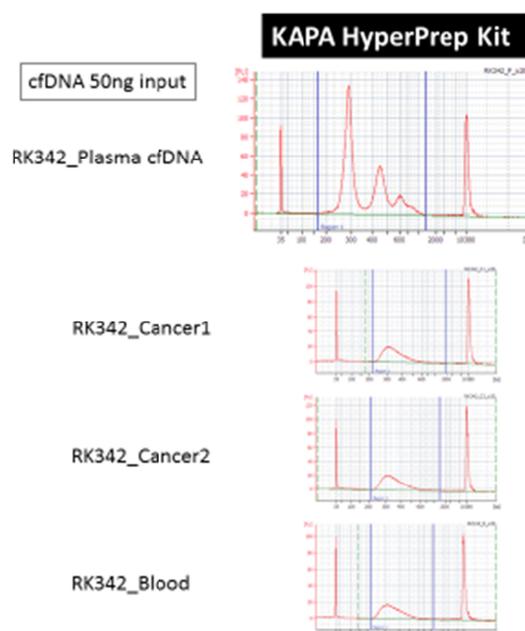
C . 研究結果

血漿中の cfDNA の性質として、微量かつ 150-200bp の大きさに断片化しており、現在の NGS のライブラリー構築の方法では解析ができない。アダプター結合能力を向上させた NGS ライブラリー構築キット KAPA HyperPrep Kit を新規に導入して、アダプター濃度や PCR などの条件検討を行い、10-50ng の cfDNA 用に最適化した NGS ライブラリー構築方法を確立した。この方法が、他の NGS ライブラリー構築方法と比べて、PCR 重複が少ない複雑性が高く、最良であった。Illumina Nano DNA sample Prep kit、Nextera DNA Sample Prep Kit には、50ng の cfDNA から NGS ライブラリーの作成ができず、Rubicon ThriPLEX-FD には効率が悪く、エクソーム標的捕捉できる十分なライブラリー量が得られなかった（図 1）。

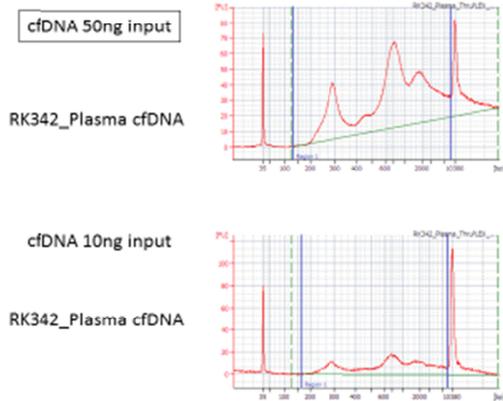
多くの cfDNA が抽出でき、また、該当する肝がんの切除組織が確保できた 3 症例（RK258, RK342, RK350）について、cfDNA、腫瘍組織から抽出した DNA、およびリンパ球由来の DNA より NGS 用のライブラリー構築を行った。cfDNA については、上記の KAPA HyperPrep kit を用いて NGS ライブラリー構築を行い、腫瘍およびリンパ球由来の DNA は、通常の方法で NGS ライブラリー構築を行った。次に、それぞれのライブラリーについて、全エクソンを標的とした配列約 50Mb を

hybridization にて濃縮を行い、NGS にて全エクソンシーケンスを行った。cfDNA については、x200、腫瘍およびリンパ球由来の DNA については x100 でのシーケンス深度が得られた。微量 cfDNA でのシーケンスの PCR 重複度は 20% と比較的良好であった。

図 1 NGS ライブラリーの構築 50ng の cfDNA より、KAPA HyperPrep Kit が最も効率より NGS ライブラリーの構築ができた



Rubicon ThriPLEX-FD



D. 考察

微量（10-50ng）で断片化した血漿 cfDNA からの NGS 用ライブラリーの構築方法を確立した。これにて、cfDNA からの全エクソン、全ゲノムを含む網羅的変異解析が可能であ

る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告

血漿からのDNA抽出に関わる研究開発に関する研究

川上 由育
国立大学法人広島大学
講師

A．研究目的

がんゲノムは、がんの進行や治療反応に伴って変化する高い柔軟性と、個々のがん細胞が異なった変異をもつという不均一性を有し、ゲノム情報を指標としてがんの個別化治療やゲノム医療を実践していくには大きな障害となっている。その柔軟性に対応していくためには、治療の過程においてがんゲノムを随時モニターしていかなければならないが、造血系腫瘍と異なり、固形腫瘍においては病態の変化に伴って経時的に連続して生検を行うことは不可能である。また、個別化医療やゲノム医療の適応となるのは主に切除不能の進行・再発症例であり、分子プロファイル作成のためのがん組織の採取を生検にて行うのは浸襲性が高く困難なことが多く、採血によってがんの分子プロファイルを作成するという「liquid biopsy」の概念が、がんの個別化医療やゲノム医療において注目されている。本研究は、肝がんを対象に、次世代シーケンサーを駆使して、容易に採取できる血液循環 DNA (cell-free DNA: cfDNA) のゲノムシーケンス解析を試み、同じ症例の切除標本から複数箇所採取した腫瘍 DNA でのゲノムシーケンス解析も行って、腫瘍の変異プロファイルとの比較検討を行う。

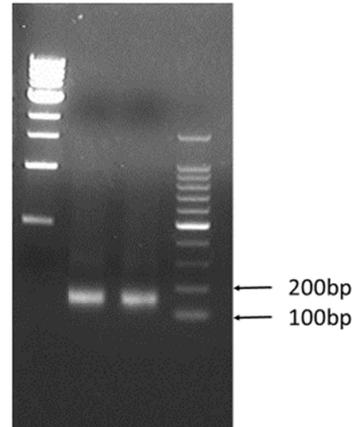
B．研究方法

がん患者の血漿 cfDNA の解析を行う最大の問題点は、血球などからの正常組織由来の cfDNA が圧倒的に多い背景のもと、腫瘍由来の cfDNA がわずかしか存在しないことである。これまでの cfDNA の解析では、血球由来 DNA のバックグラウンドを減らす目的で、EDTA 採血直後の血漿-血球分離のための遠心後に、2 回目の遠心を行ってきているが、臨床への導入を考えた場合、一回の遠心分離操作での試料の確保が望ましい。そこで、この 2 回目の遠心分離の必要性の評価を、2 回目の遠心分離後の沈殿物を顕微鏡にて観察した。

進行・再発肝がんにおいては術前に血管塞栓療法 (TACE) を行うことが多く、その際に大量の腫瘍由来の cfDNA の検出が期待され、cfDNA のゲノム解析に非常に適したがん種である。広島大学消化器内科において、治療抵抗性が予測される進行肝臓がん患者より、cfDNA が含まれる血漿、および外科的切除より腫瘍組織を収集した。本年度は、10 例の肝がん症例について、適切なインフォームドコンセントを得たうえで、TACE 後の血漿を採取した。これらの血漿より QIAGEN キットおよび NORGEN キットを用いて、血漿 cfDNA の抽出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に当たっては、平成 25 年 2 月 8 日改正告示の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて、インフォームドコンセントが得られた連結可能な匿名化された検体のみを用い、患者のプライバシーが守られることに配慮した実験計画に基づいて行われた。臨床検体採取を行う広島大学医学部および理化学研究所の倫理委員会にて承認された(横浜 H20-11(11))。



C. 研究結果

2 回目

広島大学において、10 例の肝臓がん症例の血漿の採取が行われ、これら 1 mL の血漿より cfDNA の抽出を QIAGEN キットおよび NORGEN キットを用いて試みた。QIAGEN キットと NORGEN キットとでは、ほぼ同量の cfDNA が抽出されたが、安価で操作がより簡便な QIAGEN キットを今後の血漿からの cfDNA 抽出の方法とした。血漿 cfDNA は、図のように、予想通り 170-200bp に断片化しており(図 1) すべての血漿より 10ng 以上の cfDNA が抽出できた。

また、このうち 4 例については、外科切除による凍結標本およびリンパ球(全血)の採取が行われ、高品質の DNA が抽出された。

図 1 血漿 cfDNA は 170-200bp に断片化していた

D. 考察

cfDNA の量は、TACE の後であっても、ばらつきが認められ、少量の症例もあった。今後、TACE 後の血漿採取のタイムポイントの設定およびさらなる血漿と腫瘍組織の採取と臨床情報の取得が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

3. その他