

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

Liquid Biopsyのゲノムシーケンス解析によ
る

がんの変異プロファイル
に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 藤本 明洋

平成27(2015)年 3月

目 次

I . 委託業務成果報告（総括） ----- 1

Liquid Biopsyのゲノムシーケンス解析によるがんの変異プロファイルに関する研究

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 副チームリーダー 藤本 明洋

. 委託業務成果報告 ----- 6

ゲノムシーケンス解析に関わる技術開発に関する研究

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 中川 英刀

. 委託業務成果報告 ----- 9

血漿からのDNA抽出に関わる研究開発に関する研究

国立大学法人広島大学 講師 川上 由育

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（総括）

Liquid Biopsyのゲノムシーケンス解析によるがんの変異プロファイル
に関する研究

藤本 明洋

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 副チームリーダー

研究要旨：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血液循環 DNA (cell-free DNA: cfDNA)のゲノムシーケンス解析を試み、切除標本から腫瘍の変異プロファイルとの比較検討を行って cfDNA シーケンス解析により変異診断方法を確立することを目的とする。広島大学にて採取された3例の肝がん患者の血漿より cfDNA を抽出し、同患者の切除腫瘍標本およびリンパ球からの DNA とともに、全エクソンのシーケンス解析を施行し、血漿 cfDNA と腫瘍で同定した体細胞変異の比較検討を行った。1例については、血漿 cfDNA シーケンスにて43%の腫瘍体細胞変異を同定できたが特異性が低く、2例については10%の体細胞変異しか検出できず感度に問題があった。シーケンス深度および変異検出のアルゴリズムの改善が必要と考えられる。

プロジェクトの総合推進

独立行政法人理化学研究所 副チームリーダー 藤本 明洋

ゲノムシーケンス解析に関わる技術開発

独立行政法人理化学研究所 チームリーダー 中川 英刀

血漿からの DNA 抽出に関わる研究開発

国立大学法人広島大学 講師 川上 由育

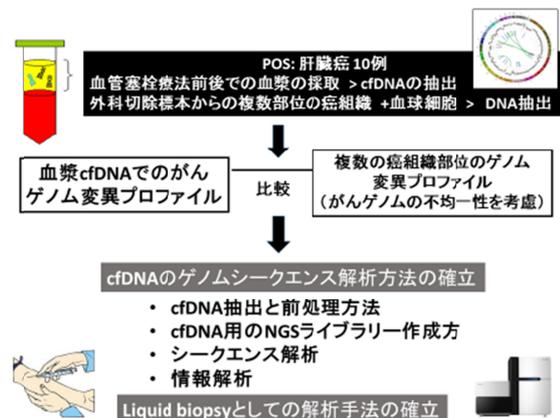
A. 研究目的

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、個別化治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、がんの個別化治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ものである。この比較検討にて、情報解析も含めた、cfDNA でのゲノム変異プロファイルを作成するための技術基盤の改善、構築を行うことを目的とする(図1)。

liquid biopsy としてのがんの cfDNA シーケンス解析方法が確立されれば、手術不能または生検採取が困難な進行・再発がんの網羅的ながんゲノム変異解析が多数の

症例において可能となる。cfDNA からのがんゲノム変異情報、経時的变化とがんの臨床病理学的特性(治療感受性、再発、予後など)との関連解析を多数の症例にておいて行い、がんの臨床的特性に関連する新たながんゲノム変異、ゲノムバイオマーカーの探索も可能とある。本研究によって確立される liquid biopsy により、がん組織を採取できない難治性・再発性がんのゲノムプロファイルを経時的に作成することができ、きめ細やかながんの個別化医療、ゲノム医療を実践し、発展させることが可能となる、と考えられる。

図1 肝臓がんの plasma cfDNA シーケンス解析の概要



B. 研究方法

進行・再発肝臓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り、多数の肝がんの治療にあたっている広島大学消火器内科と共同でがん由来のcfDNAが含まれる血漿および腫瘍組織を収集した。本年度は、10例の肝臓が

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 キットを用いて、血漿 cfDNA の抽出を行った。

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、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、NGS でのシーケンスを行い、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

10 例の肝臓がん症例について、広島大学にて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 キットを用いて試みた。すべての血漿より 10ng 以上の cfDNA が抽出できた。

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、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。NGS によりシーケンス解析の結果、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。

比較的多くの cfDNA が抽出でき、また、該当する肝臓がんの切除凍結組織が確保できた 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 SureSelect 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 (SureSelect Human Exome V5) 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。cfDNA-リンパ球 DNA、腫瘍-リンパ球 DNA のシーケンスデータの対比を行い、Mutect を基本とした変異検出アルゴリズムを用いて、それぞれの cfDNA と腫瘍での体細胞変異の検出を行い、対比を行った。

RK258

全エクソンレベルで 964 個の体細胞変異が腫瘍 DNA において検出され、そのうち 417 個 (43%) の体細胞変異が血漿 cfDNA のシーケンス解析で検出できた (図 2)。これら共通する体細胞変異の VAF (variant allele frequency) は、腫瘍と cfDNA のシーケンスデータ間で $r=0.61$ と高い相関がみられ (図 3)、この血漿 cfDNA には腫瘍由来の DNA が豊富にあると考えられる。しかしながら、他に約 10000 個の体細胞変異が血漿 cfDNA において検出されており、解析パイプラインの特異性の問題、および腫瘍内のゲノム不均一性が影響していると考えられる。

図 2 RK258 における血漿 cfDNA と腫瘍 DNA の exome による体細胞変異

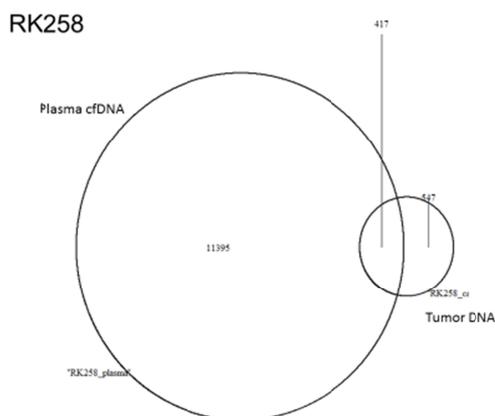
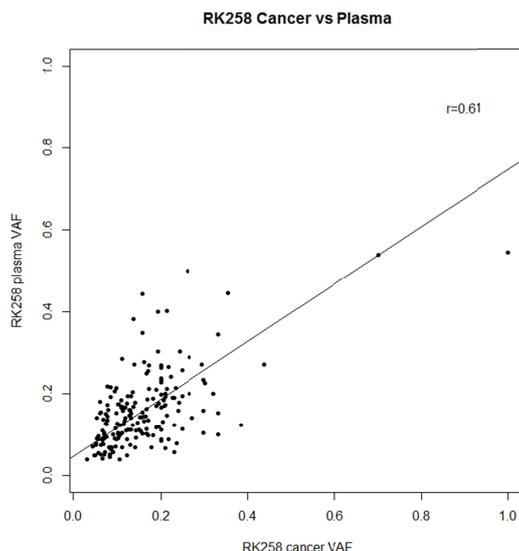


図 3 RK258 の血漿 cfDNA と腫瘍 DNA で共通する体細胞変異の VAF

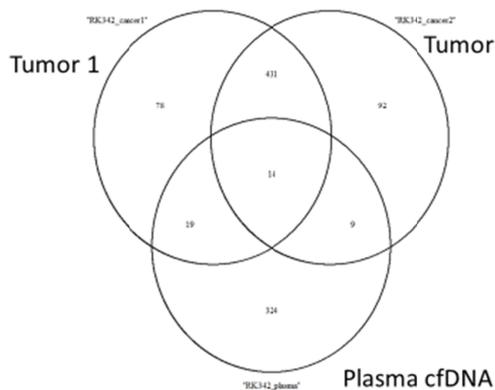


RK342

2 つの腫瘍部分 (Tumor 1 と 2) 及び血漿 cfDNA での体細胞変異の検出を行った。腫瘍部分の体細胞変異は 532 個、腫瘍部分は 546 個で、とに共通は 445 個で 80% 以上の体細胞変異が共通していた (腫瘍内のゲノム不均一性)。一方、cfDNA においては、366 個の体細胞変異が検出され、またはと共通するのは 42 個の体細胞変異であり、血漿 cfDNA において、腫瘍の体細胞変異の約 10% を検出した (図 4)。

図 4 RK258 における血漿 cfDNA と腫瘍 DNA (Tumor1 と 2) の exome による体細胞変異

RK342



RK350

2つの腫瘍部分及び血漿 cfDNA での体細胞変異の検出を行った。腫瘍部分 の体細胞変異は 305 個、腫瘍部分 は 299 個で、と に共通は 178 個で約 60%の体細胞変異が共通していた(腫瘍内のゲノム不均一性)。一方、cfDNA においては、349 個の体細胞変異が検出され、または と共通するのは、33 個の体細胞変異であり、血漿 cfDNA において、腫瘍の体細胞変異の約 10%を検出した。

D. 考察

TACE の後であっても、腫瘍由来の cDNA の濃縮程度にばらつきが認められた。今回の cfDNA シークエンス解析では 10-40%の腫瘍の体細胞変異が検出できると考えられるが、これをもって腫瘍ゲノムのプロファイルを推定することは困難である。TACE 後とはいえ、腫瘍由来の cDNA の濃縮程度が低い症例もあり、多くの変異アレルが検出感度以下のため、さらに深度の高いシーケ

ンス解析が必要であると考えられる。今回は x200 であったが、target シークエンスにて x3000-x5000 の深度が目標となる。また、腫瘍内のゲノム不均一性があるものの、cfDNA で変異検出の特異性がまだ低いものと考えられ、さらなる変異同定のアルゴリズムの改良も必要であると考えられる。

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

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個所採取した腫瘍 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））。

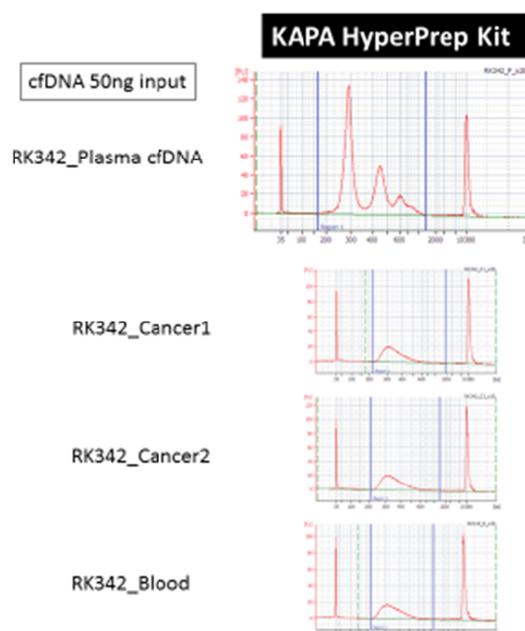
C. 研究結果

血漿中の cfDNA の性質として、微量かつ 150-200bp の大きさに断片化をしており、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）。

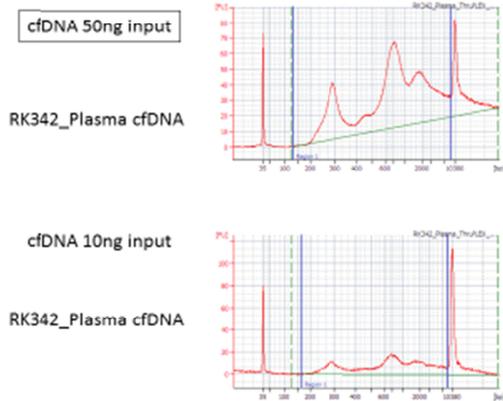
多くの cfDNA が抽出でき、また、該当する肝がんの切除組織が確保できた 3 症例（RK258, RK342, RK350）について、cfDNA、腫瘍組織から抽出した DNA、およびリンパ球由来の DNA より NGS 用のライブラリー構築を行った。cfDNA については、上記の KAPA HyperPrep kit を用いて NGS ライブラリー構築を行い、腫瘍およびリンパ球由来の DNA は、通常の方法で NGS ライブラリー構築を行った。次に、それぞれのライブラリーについて、全エクソンを標的とした配列約 50Mb を

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。

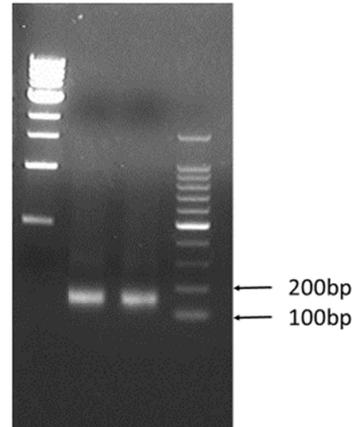
B．研究方法

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

