

論文の内容の要旨

論文題目 胃癌のターゲットディープシーケンシング

氏名 吉川 修平

本研究では、臨床における診療の一環としてゲノム解析を行うクリニカルシーケンシングにおいて、全ゲノムや全エクソンを対象とするのではなく、特定の関連遺伝子に絞ってより高精度にシーケンシングする目的で使用されているターゲットパネルの評価を目的として、胃癌切除症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを用いたターゲットシーケンシングと新鮮凍結 (FF) サンプルを用いた全エクソームシーケンシング(WES)の解析結果の比較を行った。

胃癌は世界においても本邦においても死亡数3位と高頻度である。ステージ別に分けるとステージ1では5年生存率95%であるにも関わらず、ステージ4では5年生存率9%と非常に低く、進行癌の診断や治療においてはまだ課題を残している。進行癌の治療である化学療法としては、近年分子標的治療薬が用いられるようになり、一次治療では抗HER2阻害剤、二次治療では抗VEGFR阻害剤、三次治療で抗PD-1阻害剤の適応がある。このうち、現状ではこれら分子標的治療薬の適応の有無の判断根拠としては、腫瘍組織でのHER2タンパクの発現が免疫組織学的に評価されるのみであるが、分子標的治療役の作用機序を考えれば、個々の腫瘍のゲノム解析に基づいて治療戦略を立てることは今後ますます重要になると考えられる。抗PD-1阻害剤は免疫チェックポイント阻害剤とも言われており、ミスマッチ修復遺伝子の異常のある症例において有意に効果があるという報告もあり、抗PD-1阻害薬使用の判断にあたっては、ミスマッチ修復遺伝子の異常によるマイクロサテライト不安定性の評価が有用であると考えられる。

一方、胃癌のゲノム解析については、米国のNational Institutes of HealthによるThe Cancer Genome Atlasをはじめとして大規模な解析が行われており、特徴的なゲノム変異が明らかになってきている。さらに最近では米国のFOUNDATION MEDICINEからの報告でFFPEサンプルからのターゲットシーケンシングによるゲノム解析が十分な信頼性があるという報告から、現在では多くの施設でクリニカルシーケンシングとして臨床検体のFFPEサンプルを使用したターゲットシーケンシングが行われている。しかし、報告は質量分析を応用したMassARRAY®とFFPEサンプルとのゲノム変異の比較による結果が検討されているが、以前から行われている大規模解析はFFサンプルからの次世代シーケンサー解析であり、それらの解析とFFPEサンプルのターゲットシーケンシングとの比較が重要と考えられる。

今回、東京大学医学部附属病院において、胃癌の診断で外科的切除を行った検体について、東京大学先端科学技術研究センターで FF サンプルから WES の解析が行われた 51 症例について、同じ症例の FFPE サンプルからターゲットシーケンシングを行い、両者の解析結果について比較検討を行なった。なお、ターゲットシーケンシングにおいては、東京大学大学院医学系研究科細胞情報学講座において設計された、464 の癌関連遺伝子を含むもの (Todai Onco Panel) を使用した。

全 51 症例の腫瘍部・非腫瘍部の計 102 サンプルのうち 6 サンプルは FFPE から DNA が抽出不能であり解析から除外し、また 8 サンプルについては DNA 抽出後、シーケンシング用のライブラリ調製反応が不良であったため除外とし、残り 37 症例についてターゲットシーケンシングを行った。シーケンス結果は、パネルに含まれる 464 の遺伝子のうちタンパクをコードするコーディング領域の平均深度は、37 症例において 14~730 リード(全体の平均は 335 リード)にわたっており、このうち平均深度 100 以下の症例は 5 症例あった。

ターゲットシーケンシングにおけるアミノ酸置換を伴う非同義変異のコール数は、37 症例の合計で 535 箇所認めたが、平均深度 100 以下の症例において有意に変異数が多くみられ、また平均深度 100 以上の症例と比較して WES における変異との一致率は低かった (図 1)。

ターゲットシーケンシングにおける全変異について変異コールを変異パターンで分類すると、全サンプルで総変異数 1529 箇所であり、1 症例平均 41 箇所の変異あった。平均の半数以上の 20 箇所以上 C:G>T:A の変異があり、かつ各症例内で認めた変異の半数以上が C:G>T:A の変異である症例は 12 症例認めた。平均深度が 100 以下の 5 症例はいずれも C:G>T:A の変異パターンが多かった。C:G>T:A の変異の部位については Single Nucleotide Polymorphism (SNP) の部位は除外されているにも関わらず、非腫瘍部の解析においても変異のリードを認めており、FFPE サンプルによるシトシンの脱アミノ化によるアーティファクトの可能性が考えられた。さらに C:G>T:A の変異が多い症例について、ターゲットシーケンシングにおける変異塩基のパターンに加え、変異部位の前後の 1 塩基を加えた 96 通りの変異パターンで分類すると CpG 配列の C:G>T:A の変異パターンが多くみられた。それらは FFPE サンプルによるアーティファクトを低減する目的で使用した Uracil-N-Glycosylase (UNG) による修復 (シトシンが脱アミノ化したウラシルを除去する修復) ができず、メチル化したシトシンの脱アミノ化による影響が考えられた。また、その変異パターンは年齢による aging signature と類似しており、年齢によりメチル化の増加も認められることから加齢による影響も考えられた。

C:G>T:A の変異パターンが多いサンプルはアーティファクトによるものが考えられたため、こ

それらを除外した上で、アミノ酸置換を伴う非同義変異についてリストアップした。既報の主要な遺伝子について WES では同定されなかった変異が新規に同定されているサンプルがあり、また分子標的治療薬の標的となりうる遺伝子変異も複数認めており、今後シーケンスを行うことにより患者毎に分子標的治療薬の標的となりうる遺伝子変異を同定することが可能と考えられた。また、ターゲットシーケンシングでのマイクロサテライト不安定性 (MSI) の評価方法の検討では、ターゲットシーケンスと WES の mutation rate は必ずしも一致するわけではないが、平均深度が高い症例については相関関係があるという報告もあり、今回の症例についてターゲットシーケンスと WES の mutation rate の相関関係の確認を行った。すると症例全体では相関係数は 0.52 であったが、平均深度が 100 以上の症例に限ることにより相関係数は 0.81、さらに平均深度が 300 以上の症例に限ると相関係数は 0.88 と平均深度が高い症例ほど正の相関が強くなることが認められた。

さらに、反復配列の解析による MSI を判定する方法の検討を行った。WES データに基づいた MSI 解析プログラムである MSIsensor、MANTIS による評価を WES およびターゲットシーケンスの結果を用いて解析を行った。結果はいずれの解析プログラムにおいても hypermutator の症例においては全症例をカバーすることは出来なかったものの、MLH1 などのミスマッチ修復遺伝子に異常のあるサンプルにおいてはすべて MSI 陽性と判定することができており、古典的なパネルのポジションのみの解析よりも特異的に陽性と判定できており MSI の評価方法として有用と考えられた (図 2)。

以上の結果より、FFPE サンプルを使用した胃癌のターゲットシーケンスを行い、FF サンプルを使用した WES と比較することにより、FFPE サンプルを使用した場合の解析データでは C:G>T:A が多くみられるという特徴的な変異が見られ、FFPE によるアーティファクトが原因の一つとして考えられた。また、ターゲットシーケンスと WES の mutation rate は正の相関関係を認め、ターゲットシーケンスの mutation rate から WES の mutation rate を推測することは可能と考えられた。さらにターゲットシーケンスのデータを使用した解析において、MSI の評価が可能であることを示すことができ、今後の免疫チェックポイント阻害剤の適応の判断において有用であると考えられた。FFPE サンプルを使用したターゲットシーケンスにおいては、ゲノム変異解析・MSI 判定のいずれにおいても平均深度 100 以下のサンプルにおいては解析結果のエラーが多くみられたため、信頼性の高い情報を得るためには平均深度が 100 より多くのリードになるようにシーケンシングする必要があると考えられ、臨床の現場で行われるクリニカルシーケンシングにおける解析結果の質の判断基準として提示することができたものとする。

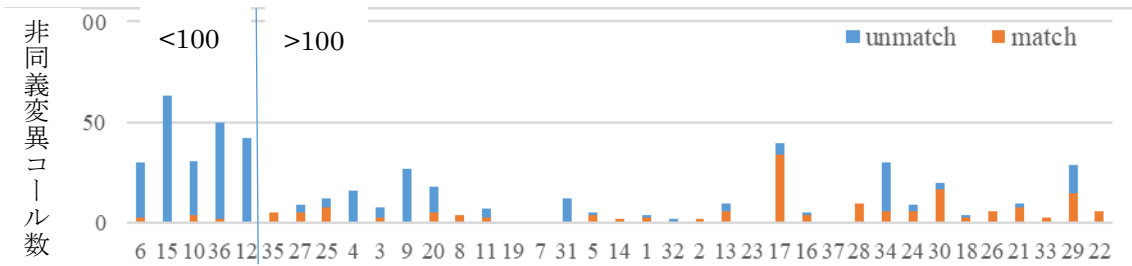


図1. ターゲットシーケンスのアミノ酸置換を伴う非同義変異
 横軸は左から平均深度が少ないサンプルから順に並んでおり、左から5症例は平均深度100以下である。縦軸は非同義変異コール数を表示しており、棒グラフの総数はターゲットシーケンスの非同義変異の総コール数を表示しており、WESとターゲットシーケンスの両方で変異コールされた遺伝子を”match”、ターゲットシーケンスのみで変異コールされた遺伝子を”unmatch”として表示している。

サンプル番号	Hypermutator (WES)	MLH1 low (Mehtyl. RNA)	MSIsensor (WES)	MANTIS (WES)	古典的パネル (TOP)	MSIsensor (TOP)	MANTIS (TOP)	平均深度
6	○	●	○	○		○	○	14
15	○	●	○	○	MSI-L	○	○	30
10	○	●	○	○				42
36	○	●	○	○		○		55
12	○	●	○	○	MSI-L	○	○	56
35	○	●	○	○				101
27	○	●	○	○		○		131
25	○	●	○	○				150
4	○	●	○	○		○		189
3	○	●	○	○				214
9	○	●	○	○	MSI-H	○	○	224
20	○	●	○	○	MSI-H	○	○	233
8	○	●	○	○	MSI-L			262
11	○	●	○	○				278
19	○	●	○	○				279
7	○	●	○	○				297
31	○	●	○	○		○	○	319
5	○	●	○	○				326
14	○	●	○	○				327
1	○	●	○	○				336
32	○	●	○	○	MSI-H			340
2	○	●	○	○				348
13	○	●	○	○				349
23	○	●	○	○				419
17	○	●	○	○	MSI-H	○	○	421
16	○	●	○	○				427
37	○	●	○	○				444
28	○	●	○	○				447
34	○	●	○	○	MSI-H	○		463
24	○	●	○	○				514
30	○	●	○	○	MSI-H	○	○	514
18	○	●	○	○				553
26	○	●	○	○				577
21	○	●	○	○				645
33	○	●	○	○	MSI-L			668
29	○	●	○	○				674
22	○	●	○	○				730

図2. hypermutator および MSI 判定の結果

WES の mutation rate で hypermutator と判定した症例、メチル化解析または RNA-seq でミスマッチ修復遺伝子である MLH1 の発現低下を確認できた症例、WES での MSIsensor と MANTIS の判定、ターゲットシーケンスの古典的パネルのポジション、MSIsensor、MANTIS の判定をそれぞれ左から順に、サンプルは上から平均深度が少ない症例から多い症例にかけて並んでいる。hypermutator で MLH1 の発現低下もある症例を判定したものを濃い緑、hypermutator で MLH1 の機能低下のない症例を判定したものを薄い緑、hypermutator でない症例を陽性と判定したものを黄色で表示している。