

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10784

研究課題名(和文) 分子バーコードを用いた高感度遺伝子変異解析と機能解析

研究課題名(英文) Gene mutation analysis using molecular-barcoding next-generation sequencer

研究代表者

富田 秀太 (Tomida, Shuta)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：10372111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子バーコード技術を用いた次世代シーケンサー(分子バーコードNGS)解析手法の有用性を検討した。技術的再現性を確認した後、上皮成長因子受容体(EGFR)変異陽性の肺腺がん64症例を解析したところ、7症例において、E709G/K、D761Y、G598V、R776Hの副たるEGFR遺伝子変異の複合変異(compound mutation)を検出した。また、治療に抵抗性を示したALK融合遺伝子陽性の肺腺癌症例を対象に、治療前と治療後の試料の解析を実施した。治療前のサンプルからはALK融合遺伝子を検出し、治療後のサンプルからALK阻害剤に耐性を示す遺伝子変異を高感度に検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFRのG719Xを有する症例で統計学的に有意に複合変異(compound mutation)が検出されることが分かった。またTCGAのPan-Lung cancerデータセットから660症例の肺腺癌症例を抽出・解析したところ、同様の傾向が確認されたことから、G719X遺伝子変異陽性の肺腺癌症例に対する診断への応用が期待される。ALK阻害剤治療に耐性を示し、急激に増悪した症例のサンプルの解析を実施したところ、治療後のサンプルからはALK阻害剤への耐性を示すALK G1202R変異を引き起こす遺伝子変異が検出されており、ALK融合遺伝子陽性の肺腺癌症例に対する診断への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we examined the clinical usefulness of the next-generation sequencer analysis method using molecular barcode technology (molecular-barcoding NGS). After confirming the technical reproducibility of molecular-barcoding NGS, we applied it for 64 cases of lung adenocarcinoma with epithelial growth factor receptor (EGFR) mutation, and found that in 7 cases, the minor EGFR gene mutations, such as E709G/K, D761Y, G598V, and R776H, were detected. We also applied the molecular-barcoding NGS method for a lung adenocarcinoma case with ALK fusion gene mutation, who showed resistance to the ALK inhibitor treatment. The ALK fusion gene mutation was detected in the sample obtained before treatment, and the gene mutation causing resistance to the ALK inhibitor was also detected in the sample obtained after treatment. Altogether these results showed clearly the clinical beneficial for the diagnosis of lung adenocarcinoma cases with EGFR and/or ALK mutation.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：分子バーコード 次世代シーケンサー 遺伝子変異解析 非小細胞肺癌 EGFR ALK



複合変異 (compound mutation) が見つかった 7 症例の分布を解析したところ、統計学的に有意に G719X を有する症例で複合変異が検出されることが分かった。この結果をふまえて、TCGA の Pan-Lung cancer データセットから 660 症例の肺腺癌症例を抽出したところ、G719X を有する症例で高頻度に複合変異が検出されることが確認され、我々の解析結果を支持する結果が得られた (図2)。

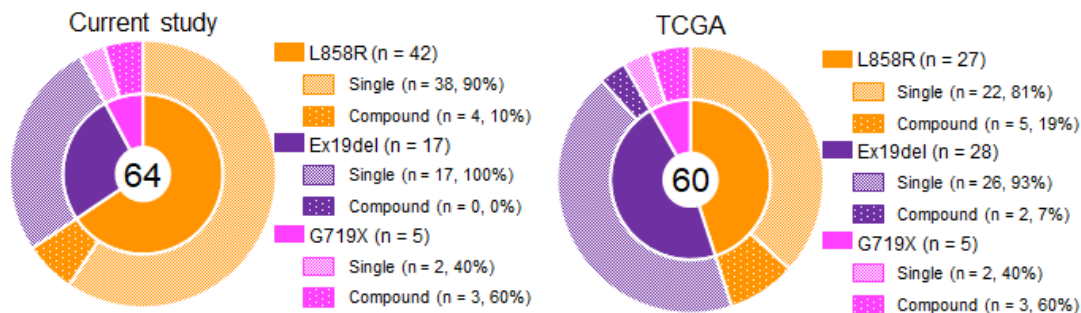


図2 代表的案 EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌における co-mutation の分布

(2) ALK 融合遺伝子陽性の肺腺癌症例を対象に、分子バーコード NGS 解析を実施した。ALK 阻害剤治療に耐性を示し、急激に増悪した症例の治療前の原発巣と治療後の原発巣と転移巣の組織サンプルから DNA を抽出し、ALK 遺伝子を含む 47 遺伝子の変異解析を実施した (図3)。治療後のサンプルからは ALK 阻害剤への耐性を示す ALK G1202R 変異を引き起こす c. 3604 G>A の遺伝子変異とともに、同じく ALK G1202R 変異を生じる (c. 3604 G>C) 遺伝子変異が検出されており、複数の治療耐性遺伝子変異獲得メカニズムが生じていたことが明らかになった (参考文献2)。

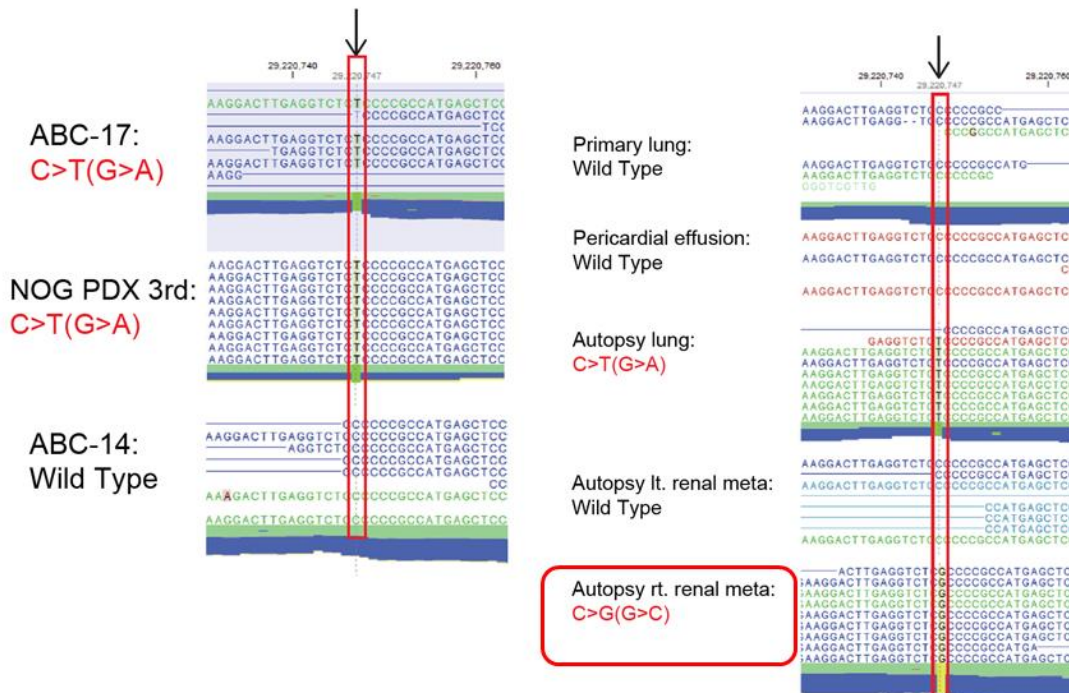


図3 分子バーコードを用いた ALK 遺伝子変異陽性肺腺癌のサンプル解析

【参考文献】

- Namba K, Tomida S, Matsubara T, Takahashi Y, Kurihara E, Ogoshi Y, Yoshioka T, Takeda T, Torigoe H, Sato H, Shien K, Yamamoto H, Soh J, Tsukuda K, Toyooka S. *BMC Cancer*. 2019 Feb 26;19(1):175. doi: 10.1186/s12885-019-5374-1.
- Makimoto G, Ohashi K, Tomida S, Nishii K, Matsubara T, Kayatani H, Higo H, Ninomiya K, Sato A, Watanabe H, Kano H, Ninomiya T, Kubo T, Rai K, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Toyooka S, Takata M, Maeda Y, Kiura K. *J Thorac Oncol*. 2019 Nov;14(11):2009–2018. doi: 10.1016/j.jtho.2019.07.017.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Makimoto Go, Ohashi Kadoaki, Tomida Shuta, Nishii Kazuya, Matsubara Takehiro, Kayatani Hiroe, Higo Hisao, Ninomiya Kiiichiro, Sato Akiko, Watanabe Hiromi, Kano Hirohisa, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Rai Kammei, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Toyooka Shinichi, Takata Minoru, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Rapid Acquisition of Alectinib Resistance in ALK-Positive Lung Cancer With High Tumor Mutation Burden	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 2009 ~ 2018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2019.07.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Namba Kei, Tomida Shuta, Matsubara Takehiro, Takahashi Yuta, Kurihara Eisuke, Ogoshi Yusuke, Yoshioka Takahiro, Takeda Tatsuaki, Torigoe Hidejiro, Sato Hiroki, Shien Kazuhiko, Yamamoto Hiromasa, Soh Junichi, Tsukuda Kazunori, Toyooka Shinichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Application of amplicon-based targeted sequencing with the molecular barcoding system to detect uncommon minor EGFR mutations in patients with treatment-naive lung adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12885-019-5374-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Namba Kei, Shien Kazuhiko, Takahashi Yuta, Torigoe Hidejiro, Sato Hiroki, Yoshioka Takahiro, Takeda Tatsuaki, Kurihara Eisuke, Ogoshi Yusuke, Yamamoto Hiromasa, Soh Junichi, Tomida Shuta, Toyooka Shinichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Activation of AXL as a Preclinical Acquired Resistance Mechanism Against Osimertinib Treatment in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 499 ~ 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Chiemi, Yamamichi Nobutake, Tomida Shuta, Takahashi Yu, Kageyama-Yahara Natsuko, Sakurai Kouhei, Takeuchi Chihiro, Inada Ken-ichi, Shiogama Kazuya, Nagae Genta, Ono Satoshi, Tsuji Yosuke, Niimi Keiko, Fujishiro Mitsuhiro, Aburatani Hiroyuki, Tsutsumi Yutaka, Koike Kazuhiko	4. 巻 109
2. 論文標題 Transduced caudal-type homeobox (CDX) 2/CDX1 can induce growth inhibition on CDX-deficient gastric cancer by rapid intestinal differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3853 ~ 3864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/cas.13821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yuta, Shien Kazuhiko, Tomida Shuta, Oda Shinsuke, Matsubara Takehiro, Sato Hiroki, Suzawa Ken, Kurihara Eisuke, Ogoshi Yusuke, Namba Kei, Yoshioka Takahiro, Torigoe Hidejiro, Yamamoto Hiromasa, Soh Junichi, Toyooka Shinichi	4. 巻 109
2. 論文標題 Comparative mutational evaluation of multiple lung cancers by multiplex oncogene mutation analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3634 ~ 3642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/cas.13797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yuka, Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Tomida Shuta, Makimoto Go, Watanabe Hiromi, Kudo Kenichiro, Matsumoto Shingo, Umemura Shigeki, Goto Koichi, Ichihara Eiki, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Sato Akiko, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Toyooka Shinichi, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 109
2. 論文標題 Combined effect of cabozantinib and gefitinib in crizotinib-resistant lung tumors harboring ROS1 fusions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3149 ~ 3158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/cas.13752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Makimoto Go, Tomida Shuta, Higo Hisao, Kayatani Hiroe, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 MET or NRAS amplification is an acquired resistance mechanism to the third-generation EGFR inhibitor naquotinib	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20326-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hiroki, Sakaguchi Masakiyo, Yamamoto Hiromasa, Tomida Shuta, Aoe Keisuke, Shien Kazuhiko, Yoshioka Takahiro, Namba Kei, Torigoe Hidejiro, Soh Junichi, Tsukuda Kazunori, Tao Hiroyuki, Okabe Kazunori, Miyoshi Shinichiro, Pass Harvey I., Toyooka Shinichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Therapeutic potential of targeting S100A11 in malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-017-0017-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kotani Hiroshi, Adachi Yuta, Kitai Hidenori, Tomida Shuta, Bando Hideaki, Faber Anthony C., Yoshino Takayuki, Voon Dominic C., Yano Seiji, Ebi Hiromichi	4. 巻 37
2. 論文標題 Distinct dependencies on receptor tyrosine kinases in the regulation of MAPK signaling between BRAF V600E and non-V600E mutant lung cancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1775 ~ 1787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-017-0035-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Hiromasa, Toyooka Shinichi, Ninomiya Takashi, Matsumoto Shigemi, Kanai Masashi, Tomida Shuta, Kiura Katsuyuki, Muto Manabu, Suzawa Ken, Desmeules Patrice, Kris Mark G., Li Bob T., Ladanyi Marc	4. 巻 23
2. 論文標題 Therapeutic Potential of Afatinib for Cancers with ERBB2 (HER2) Transmembrane Domain Mutations G660D and V659E	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Oncologist	6. 最初と最後の頁 150 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1634/theoncologist.2017-0345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otani Yoshihiro, Ishida Joji, Kurozumi Kazuhiko, Oka Tetsuo, Shimizu Toshihiko, Tomita Yusuke, Hattori Yasuhiko, Uneda Atsuhito, Matsumoto Yuji, Michiue Hiroyuki, Tomida Shuta, Matsubara Takehiro, Ichikawa Tomotsugu, Date Isao	4. 巻 7
2. 論文標題 PIK3R1Met326Ile germline mutation correlates with cysteine-rich protein 61 expression and poor prognosis in glioblastoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07745-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 難波圭、畠田秀太、枝園和彦、山本寛斉、宗淳一、佃和憲、豊岡伸一
2. 発表標題 分子バーコード技術を用いた低頻度多重変異の同定
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	豊岡 伸一  (Toyooka Shinichi)  (30397880)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授   (15301)	
研究 分担者	宗 淳一  (Soh Junichi)  (90559890)	近畿大学・医学部・准教授   (34419)	