

令和元年6月23日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19592

研究課題名（和文）ロングリードシーケンスによるフェージング解析に基づく複数遺伝子変異の役割の解明

研究課題名（英文）Role of multiple mutations in oncogenes revealed by long-read sequencing

研究代表者

片岡 圭亮（Kataoka, Keisuke）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90631383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：10X Genomics社やOxford Nanopore Technologies社のロングリードシーケンスを用いて、ATLを含む悪性腫瘍における複数変異の解析を行った。さらに、フェージング解析を行うためのCisCheckerというプログラムを作成し、同じ遺伝子に複数変異を認める場合に、それらがcisまたはtransに存在するか判定できる方法を確立した。これらの方法を用いて、ATLを含むいくつかの悪性腫瘍のがん遺伝子を検証したところ、多くがcisに存在していることを明らかにした。さらに、これらの機能解析を行い、がん遺伝子の複数変異により細胞増殖や下流シグナルが亢進することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の結果から、複数変異は様々ながん遺伝子に認められる比較的頻度が高い遺伝学的イベントであり、それらがcisに起こることで、がん遺伝子の機能増強に繋がる可能性が示唆された。この結果は、個別のがん遺伝子の機能の解明に繋がるだけでなく、「同一遺伝子における複数の活性型変異の獲得」の意義を示している。さらに、本研究で用いたロングリードシーケンス技術は、フェージング以外に、これまでのショートリードシーケンスでは困難であった「大きな欠失・挿入部位の解析」や「転座・融合部位の解析」を可能とする。そのため、今後のがんゲノム解析に必須の技術であり、その最新技術の応用方法の一つを示すことが出来た点に意義がある。

研究成果の概要（英文）：We analyzed multiple mutations in oncogenes across various cancers using long-read sequencing technology of 10X Genomics and Oxford Nanopore Technologies. In addition, we developed an algorithm called CisChecker to investigate whether multiple mutations are present in cis or trans. Using these methods, we found that, in many cancers including ATL, a variety of oncogenes were affected by multiple mutations, the majority of which existed in cis. In addition, we performed a functional analysis of these oncogenic multiple mutations and found that they enhanced cell proliferation/survival and downstream signaling activation in stable cell lines. These results demonstrate the biological importance of multiple mutations in oncogenes.

研究分野：血液内科学

キーワード：癌 ゲノム 遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究構想に至った背景と経緯

成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)はHTLV-1ウイルス感染を原因とする予後不良なT細胞性腫瘍である。申請者は世界に先駆けて400例を超えるATL患者について、全エクソン・全ゲノム解析、RNAシーケンス、SNPアレイによるコピー数解析、メチル化アレイを含む包括的な遺伝子解析を行い、ATLにおける遺伝子異常の全体像を明らかにしてきた(K Kataoka, Nat Genet, 2015)。その結果、ATLではTCR/NF- $\kappa$ B経路に遺伝子異常の高度の集積を認め、この経路では*PLCG1*や*PRKCB*などの活性型変異、*CTLA4-CD28*融合遺伝子など多数の機能獲得型の異常が認められることが明らかとなった。

この研究の延長として、TCR/NF- $\kappa$ B経路における鍵分子であるホスホリパーゼC1をコードし、最も高頻度に変異が認められる*PLCG1*遺伝子の変異パターンを詳細に解析することにより、

- (1) *PLCG1*変異は活性型変異であるにもかかわらず、同一症例内で複数の異なる変異が認められる場合が高頻度に存在する
- (2) 時系列のエクソン解析(同一検体における慢性型と急性型の時点の解析)にて異なる*PLCG1*変異が段階的に獲得される症例が認められる

ことが明らかとなった(未発表)。

この結果は、ATL発症・進展過程において、段階的に異なる部位に*PLCG1*活性型変異が生じ、ドライバー異常として機能することを示唆している。さらに、これまでに全がん解析を行ってきた過程で(K Kataoka, Nature, 2016)「同一遺伝子における複数の活性型変異の獲得」という現象が、ATLの*PLCG1*変異のみならず、様々な遺伝子で認められることを見出した(未発表)。しかし、複数生じる*PLCG1*などの変異がcisあるいはtransのどちらで存在するか、また、異なる活性型変異が同時に生じることによりどのような機能的変化が生じるかは明らかではない。

最近、10X Genomics社やOxford Nanopore Technologies社より、Illuminaシーケンサーなどによって得られるショートリードと比較してはるかに長いロングリードをシーケンス可能な画期的技術が開発された。申請者はこの技術を用いてフェージングシーケンスを行うことにより、同一症例内の異なる*PLCG1*などの変異がcisあるいはtransのどちらで生じているか決定することができると考えた。さらに、その結果を元に、複数変異を導入して機能解析を行うことにより、同時に複数の活性型変異が獲得されることの機能的意義も明らかになると考え、本研究の構想に至った。

### 挑戦的研究としての意義

本研究構想は、10X GenomicsやOxford Nanopore Technologiesのロングリードシーケンスという新規技術の応用方法の開発、および、同一遺伝子における複数の活性型変異の獲得による段階的な発がん、という新しい概念の確立、を目指すという2点において挑戦的研究として意義を有すると考える。

#### 1. ロングリードシーケンスという新規技術の応用方法の開発

本研究では、まず10X GenomicsやOxford Nanopore Technologiesのロングリードシーケンスという最新技術の応用方法の確立を目指す。本技術では、本研究で対象とするフェージング以外に、これまでのショートリードシーケンスでは解析が困難であった「大きな欠失・挿入部位の解析」や「転座・融合部位の解析」を可能とする。そのため、今後の次世代シーケンスを用いたがんゲノム解析に必須の技術であると考えられる。本研究は、その最新技術の応用を世界に先駆けて目指す点が挑戦的研究として意義がある。

#### 2. 同一遺伝子における複数の活性型変異の獲得による段階的な発がん、という新規概念の確立

近年、次世代シーケンス技術の発達により、数多くの悪性腫瘍で遺伝子異常の全体像が解明されてきた。その過程で、悪性腫瘍の遺伝子変異に関する様々な知見がもたらされてきた。本研究が対象とする、「同一遺伝子における複数の活性型変異の獲得」もその一つと考えられる。申請者は、これまでに30種類以上のがん腫を含む10,000例以上に渡る全がん解析を行ってきたが(K Kataoka, Nature, 2016)同様の現象がATLの*PLCG1*変異や肺がんの*EGFR*変異のみならず、様々な遺伝子で認められることを見出している(未発表)。そのため、本研究における遺伝子変異の解析を通して、「同一遺伝子における複数の活性型変異の獲得」の意義が明らかになることが期待され、挑戦的研究として意義があると考えられる。

#### 2. 研究の目的

本研究では、このような同一遺伝子に複数生じた活性型変異の意義を解明するために、最新

の技術である 10X Genomics や Oxford Nanopore Technologies のロングリードシーケンス技術を用いて、複数生じる *PLCG1* などの活性型変異が cis (同じアレル) あるいは trans (異なるアレル) のどちらで存在するか明らかにし、その結果に基づいて、異なる活性型変異が複数生じることによりどのような機能的変化が生じるか明らかにすることを旨とする。同時に、その過程で 10X Genomics や Oxford Nanopore Technologies のロングリードシーケンス技術の遺伝子変異解析への応用方法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1. ロングリードシーケンス技術の変異解析への応用

10X Genomics や Nanopore のロングリードシーケンス技術では、ハプロタイプレベルで長い配列 (10 ~ 100 kb) を決定 (=フェージング) することができる。本研究では、同方法にて変異のフェージング解析が可能であるか検証するために、まず異なる変異が cis に生じていることが他の方法で確認できた BT-20 (PIK3CA P539R と H1047R 変異) や HEC-1 (ERBB2 T798I と V842I 変異)、NCI-H1048 細胞株 (PIK3CA K111R と H1047R 変異) を用いて検証した。同時に、フェージング解析を行うための CisChecker というプログラムを作成した。

#### 2. 複数の異なるがん遺伝子変異のフェージング解析

次に、ATL 症例で認められる複数の異なる *PLCG1* 変異のフェージング解析を行い、*PLCG1* 変異が cis あるいは trans のどちらで存在するかを決定した。*PLCG1* 変異の主なホットスポットは、PH1 ドメインの R48W、X-box ドメインの S345F、PH2 ドメインの S520F、SH2 ドメインの R748C、P867R、C2 ドメインの E1163K および D1165H であり、これまでの研究により様々な組み合わせの変異が同時に生じることを確認している (K Kataoka, Nat Genet, 2015)。本解析の対象では、申請者のこれまでの遺伝子解析により、このような複数の *PLCG1* 遺伝子変異が存在していることを確認済みの ATL 症例 (5 ~ 10 例) を対象とした。

さらに、上記の CisChecker を用いて、10,000 例を超える様々な腫瘍からなる TCGA データを用いて様々ながん遺伝子の cis/trans のアレル構成の評価を行った。同時に、腫瘍抑制遺伝子と比較することにより、その特異性を評価した。

#### 3. 異なる複数のがん遺伝子変異がもたらす機能的変化の検証

複数の変異を同時に持つ *PLCG1* 変異体を作成し、レンチウイルスを用いてドキシサイクリン誘導性の J.gamma1 (*PLCG1* 欠損細胞株) 安定細胞株を作成し、1 種類の *PLCG1* 変異体を導入した細胞株を比較することにより、異なる複数の *PLCG1* 変異がもたらす影響を検証した。具体的には、細胞増殖や生存、アポトーシスなどの表現型に加えて、ウェスタンブロットやルシフェラーゼアッセイなどを用いて PLC-1 リン酸化や下流シグナル伝達分子のリン酸化状態およびプロモーター活性などのシグナル伝達状態を評価した。同時に CD3/CD28 刺激の有無による違いも検討した。

さらに、ATL の *PLCG1* 変異よりも高頻度に、多様ながん腫において主要ながん遺伝子に複数変異が認められることが明らかになったので、その一部において同様に安定細胞株を作成して、細胞増殖や下流シグナル伝達分子のリン酸化状態などの機能解析を行った。さらに、TCGA や CCLE データを利用して、reverse phase protein array (RPPA) による下流シグナル伝達分子のリン酸化状態や、CRISPR スクリーニングによる遺伝子依存性の評価などを行った。これらを通して、多角的に異なる複数のがん遺伝子変異がもたらす機能的変化の検証を試みた。

### 4. 研究成果

#### 1. ロングリードシーケンス技術の変異解析への応用:

まずは、10X Genomics の合成ロングリード技術を用いて変異解析を行い、フェージングが可能であることを検証した。同方法でもこれらの解析は可能であると考えられたが、シーケンスおよびマッピングエラーが数多く認められたため、精度は十分でないと考えられた。そのため、同じくロングリードシーケンス技術である、Oxford Nanopore Technologies 社の PromethION を検証し、より精度が高く変異解析が可能であることが明らかとなった。さらに、複数変異間に存在する SNP および体細胞変異を用いてフェージングを可能とする方法を開発した。その結果、他の方法で cis にあると確認できている BT-20 の PIK3CA P539R と H1047R 変異、HEC-1 の ERBB2 T798I と V842I 変異、NCI-H1048 細胞株の PIK3CA K111R と H1047R 変異が cis に存在することが確認できた。

また、フェージング解析を行うための CisChecker というプログラムを作成した。本プログラムによりロングリードシーケンスのみならず、ショートリードの RNA シーケンスによっても cis/trans のアレル構成を評価可能となった。

#### 2. 複数の異なるがん遺伝子変異のフェージング解析

複数の *PLCG1* 遺伝子変異が存在していることを確認済みの ATL 症例において、上記の方法などを用いて cis に存在していることを明らかにした。さらに、TCGA データに登録されている多くのがん腫において様々ながん遺伝子で同様の解析を行い、ATL の *PLCG1* で認められたような複数変異が主要な 14 個のがん遺伝子 (*EGFR*, *ERBB2*, *CTNNB1* など) で 2~11%程度の頻度で繰り返し認められることを見出した。また、少なくともその一部は上記のロングリードシーケンスにより、複数変異が cis に存在していることを明らかにした。さらに、TCGA の RNA シーケンスを CisChecker により解析することで、上記 14 個のがん遺伝子の多くで複数変異が cis に存在していることを明らかにした。逆に腫瘍抑制遺伝子では多くの複数変異で trans に存在していたことから、がん遺伝子に特徴的な現象と考えられた。

### 3. 異なる複数のがん遺伝子変異がもたらす機能的変化の検証

ATL の *PLCG1* 変異体の J.gam1 安定細胞株を作成して機能解析を行った結果、単独変異を導入した場合において、変異の種類により PLC- 1 リン酸化や下流シグナル伝達分子 (PKC や MEK/EKR など) のリン酸化状態が変化することが明らかになった。さらに、複数変異の場合には、それらが組み合わせさったと考えられる表現型を呈することが明らかとなった。

さらに、多様ながん腫において認められた主要ながん遺伝子の機能解析を行ったところ、複数変異を導入した安定細胞株において、単独変異よりも細胞増殖能や生存率が増加し、下流シグナルの亢進が起こることが明らかとなった。さらに、患者検体における reverse phase protein array (RPPA) においても、複数変異がある場合に、単独変異よりも下流シグナルの亢進が起こることが明らかとなった。さらに、細胞株の CRISPR スクリーニングの結果、複数変異がある細胞株が最も当該がん遺伝子に対する依存性が高くなることが判明した。

これらの結果は、「同一遺伝子における複数の活性型変異の獲得」という現象の意義を示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等: [https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/molecular\\_oncology/index.html](https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/molecular_oncology/index.html)  
(国立がん研究センター研究所分子腫瘍学分野)

## 6. 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 白石友一  
ローマ字氏名: Yuichi Shiraiishi

研究協力者氏名: 古屋淳史  
ローマ字氏名: Junji Koya

研究協力者氏名: 木暮泰寛  
ローマ字氏名: Yasunori Kogure

研究協力者氏名: 斎藤優樹  
ローマ字氏名: Yuki Saito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。