

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14864

研究課題名(和文) イヌの悪性腫瘍のゲノム解析による臨床ゲノム診断法の確立に向けた先駆的研究

研究課題名(英文) Pioneering study of genome analysis in canine malignant tumors to establish a clinical genome-based diagnostics

研究代表者

渡邊 学 (Watanabe, Manabu)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：70376606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、イヌのがんゲノム解析により臨床ゲノム診断検査の構築、イヌのがん体質・がん化の解明を目的とした。その成果として、微量のDNAとマルチプレックスPCR法を組み合わせ、次世代型シーケンサーを用いて、DNA抽出後最短24時間でがんゲノムデータ取得を可能にし、迅速がんゲノム解析プラットフォームを構築した。7種類のがん52症例を解析した結果、ヒト遺伝性乳がんの原因遺伝子であるBRCA2のゲノム変化が26種類検出され、遺伝子タイピングより乳がん好発するチワワ固有のゲノム多型であることや、がんの悪性化等に関連することが示唆された。今後、イヌのがんの理解や医療への貢献が可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the study, we performed clinical cancer genome analysis to reveal the molecular mechanisms of canine tumors, and establish clinical diagnosis using multiple genotyping system. As the results of the study, we could detect a lot of genomic alteration from a trace of a DNA sample using multiplex PCR methods and next-generation sequencer. In a genomic coding region of BRCA2, which is responsible gene of a human hereditary breast/ovarian cancer syndrome, we detected 26 regions in 7 kinds of tumors including 52 tumor bearing patients, and some of the detected BRCA2 mutations might be related to tumor malignancies. In SNP genotyping analysis, we demonstrated that one of the BRCA2 variant could be a chihuahua breed unique genomic variants. These results suggested that the understanding of canine tumors and contribution to clinical applications.

研究分野：分子診断治療学

キーワード：臨床がんゲノム診断 イヌ トランスレーショナルリサーチ ゲノム治療 オーダーメイド医療 がん体質 マルチプレックスPCR 診断型シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

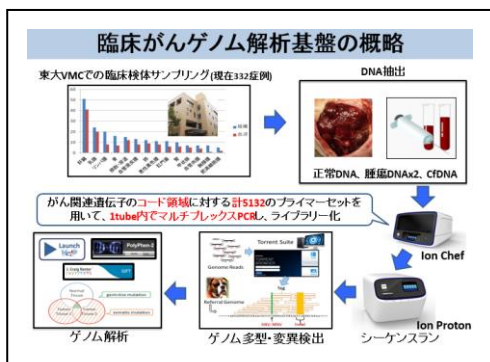
次世代型シーケンサー(NGS)の開発により、革新的なゲノム解析が促進され、様々な疾患が大規模シーケンシング技術によってその分子病態が明らかにされている、一方、疾患に関与するゲノム多型・変異の解明により、疾患関連領域を効率よくパネル化し、短時間でゲノム解析結果が取得できる診断型 NGS が開発されている。加えて、がんをはじめとする疾患では血液中に存在するエクソソーム、血中循環腫瘍細胞 cell free DNA (cfDNA) の検出を行う liquid biopsy は新しい側面から病態を理解する上での解析対象であるとともに、将来的な非侵襲性の診断方法として注目されている。比較疾患モデル学の観点より、イヌ・ネコはマウス・ラットに代表される人工発症型の疾患モデル動物とは異なる自然発症型の次世代型疾患モデル動物として注目されている。多くのヒトの疾患が自然発症することより、イヌ・ネコの臨床研究はヒト疾患へ外挿するうえでより適切なモデルとして考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、イヌ腫瘍の臨床検体、liquid biopsy を用いた臨床がんゲノム解析プラットフォームの構築、様々ながん種を対象にしたがんゲノム解析により分子病態を解明することで獣医師医療へ貢献を行うとともに、ヒトのがんと比較解析によりヒトがん研究領域へのトランスレーショナルリサーチを目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

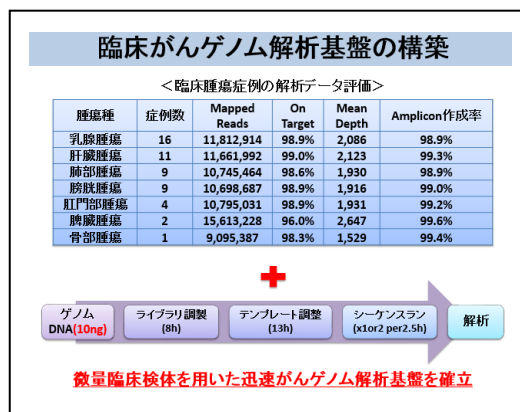
東京大学農学部附属動物医療センター(東大 VMC)において、外科手術時に摘出された生検サンプル等を採取し、同一症例の正常組織、腫瘍組織および血液よりゲノム DNA の抽出を行った。マルチプレックス PCR 法に基づいた Ampliseq™ を用いて約 180 種類のがん関連遺伝子ゲノムコード領域を標的として 5132 のプライマーセットを作成し、各症例の正常・腫瘍組織および cfDNA 由来のゲノム DNA10ng をテンプレートとして、IonChef、IonProton にてゲノム解読を行い、Torrent Suite™ にてがんゲノム解析を行った。



4. 研究成果

(1) 臨床がんゲノム解析プラットフォームの構築

2017年3月現在、332例の腫瘍組織を採取保存し、その内、腫瘍7種52例(乳腺腫瘍16例、肝臓腫瘍11例、肺部腫瘍9例、膀胱腫瘍9例、肛門部腫瘍4例、脾臓腫瘍2例、骨部腫瘍1例)を本研究のがんゲノム解析に供した。臨床がんゲノム解析の結果、平均マップ数11,375,454、平均 on target 率98.7%、平均カバレッジ2,020、平均 uniformity88.7%、平均アンプリコン増幅率99.2%(5091/5132セット)であった。これらの結果より、本研究で構築したがんゲノム解析基盤プラットフォームは十分なゲノム解読結果を得られることが考えられた。



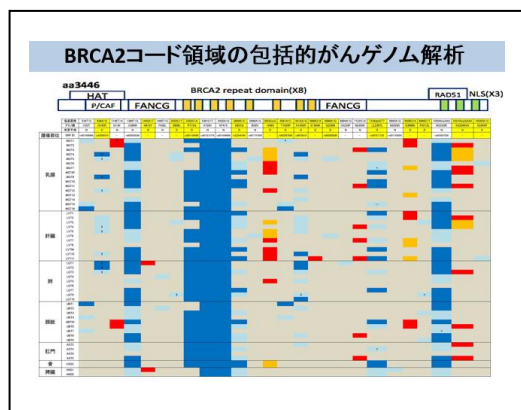
(2) 臨床乳腺腫瘍症例のがんゲノム解析

臨床乳腺腫瘍16症例を対象としたがんゲノム解析の結果、総ゲノム変異コール数は正常組織において3244カ所、腫瘍組織2ヶ所において3953カ所、cfDNAにおいて3546カ所であった。乳腺腫瘍9症例におけるゲノム変異の共通分布解析の結果、正常組織、腫瘍組織2ヶ所、cfDNAのセットで検出されたものは55.6%、腫瘍組織特異的に検出されたものは10.7%、cfDNA特異的に検出されたものは16.6%であった。また腫瘍組織とcfDNAで共通して検出された平均ゲノム変異は14.9%であり、一定の割合でがん組織由来のゲノムDNAが血中に遊離していることが推測された。ゲノム多型・変異検出の結果、ゲノム多型・変異両方が検出された遺伝子はBRCA2とNOTCH3の2遺伝子であり、BRCA2では症例の半数(8/16症例)で確認されたがNOTCH3に関しては1症例のみであった。

(3) BRCA2 遺伝子コードゲノム領域の包括的がんゲノム解析

本研究の乳腺腫瘍症例において検出され

た BRCA2 のゲノム多型・変異と他の 7 種類のがん種との包括的比較解析を行った結果、総計 26 種類のミスセンス変異のゲノム多型・変異が確認された。ゲノム多型頻度解析において、2 部位は 90%以上の症例においてゲノム多型が検出され、その他に高頻度でゲノム多型を検出する 4 部位が確認された。一方、ゲノム変異は 4 部位にて中頻度で検出された。これらの結果より、ゲノム多型とゲノム変異が混在して塩基置換が導入されるといよりは、ゲノム多型を示す部位とゲノム変異が検出された部位には特異性があることが考えられた。また、SNP genotyping の結果より、本研究で検出された、ある多型は、チワワ固有のゲノム多型であることが実証された。チワワは乳腺腫瘍の好発犬種であることより、同多型はチワワにおける乳がん発症のリスク多型としてのがん体質を担うことが示唆された。また、ClinVar 等のヒトゲノム annotation data を用いて BRCA2 とのゲノム変異比較解析を行った結果、本研究にて検出された複数のゲノム多型・変異がヒトにおいても pathogenic allele と判断されており、ゲノム変化が種を通して有害な影響を有することが示唆された。



#### (4) ラパチニブ臨床治験結果とがんゲノム比較解析

東大 VMC にて渡邊らの主導によりイヌ乳腺腫瘍症例 5 例へラパチニブ臨床治験実施例のうち、完全寛解 1 例および治験中断 2 例を用いてがんゲノム比較解析を行った結果、中断例に共通してラパチニブの標的分子のファミリー分子である HER3 の kinase domain 内にて有害なゲノム多型を検出した。同多型は、ヒト乳がんにおいてアミノ酸置換による電荷へ変化により HER2 とのヘテロ二量体形成の親和性が上昇することが報告されている HER3\_E909G 変異に近位に位置することより、同様な機序でラパチニブへ抵抗性を示す可能性が予想された。

#### (5) 結語と今後の展望

本研究において、臨床生検組織、血液、cfDNA 対象とした臨床がんゲノム解析プラットフォームの構築に成功し、同解析系を用いて乳腺腫瘍症例でのゲノム多型・変異解析、BRCA2 ゲノムコード領域での包括的がんゲノム解析、ラパチニブ抵抗性に関与するゲノム多型を検出した。今後、本研究で確立したがんゲノム解析プラットフォームを実際に臨床ゲノム検査として活用するとともに、臨床検体を用いた研究成果をダイレクトにがん患者の診断・治療へのトランスレーショナルでできることが、本研究の最終的な目標である”がんを克服する”ために必要であると考えられた。また、イヌのがんゲノムデータをヒトのがんの適切なモデルとして比較解析することは、新しい研究領域としてヒトのがんの理解・医療に貢献することが可能であると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 渡邊 学、イヌゲノム研究の現状と課題と展望 -イヌと起源、形質、遺伝病、がん- 動物遺伝育種研究 査読有 44 巻 2016、69-85

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yuiko TANAKA, Manabu WATANABE, Tetsugo TASAKA, Kohei SAEKI, Masaya TSUBOI, Takayuki NAKAGAWA, Ryohei NISHIMURA, Sumio SUGANO, Genomic Analysis on Tissues and Plasma of Canine Hepatocellular Tumors The Sixth Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery (国際学会) 2016 年 12 月 3 日 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ② Yuiko TANAKA, Manabu WATANABE, Tetsugo TASAKA, Masaya TSUBOI, Kohei SAEKI, Takayuki NAKAGAWA, Ryohei NISHIMURA, Sumio SUGANO, Cancer Genome Analysis using Diagnostic Next Generation Sequencer (NGS) in Canine Hepatic Tumors, Veterinary Cancer Society (国際学会) 2016 年 10 月 22 日 Florida USA
- ③ Yuiko TANAKA, Manabu WATANABE, Tetsugo TASAKA, Yasuyuki KAWABATA, Kohei SAEKI, Masaya TSUBOI, Takayuki NAKAGAWA, Ryohei NISHIMURA, Sumio SUGANO, Genomic Sequencing of Canine Hepatocellular Carcinoma 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 14 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- ④ 渡邊学、田中由依子、田坂徹悟、坪井誠也、内田和幸、中川貴之、辻本元、西村亮平、菅野純夫、ラパチニブ投与により長期生存を示した臨床乳腺腫瘍症例とその分子病態解析 第159回日本獣医学会学術集会 2016年09月06日~2016年09月09日 日本大学藤沢キャンパス（神奈川県藤沢市）

[その他]

ホームページ：<http://ssmgs.net/lab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 学 (WATANABE, Manabu)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科  
・准教授  
研究者番号：70376606

### (3) 連携研究者

坪井 誠也 (TSUBOI Masaya)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科  
・助教  
研究者番号：20721963

中川 貴之 (NAKAGAWA Takayuki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科  
・准教授  
研究者番号：40447363

辻本 元 (TSUJIMOTO Hajime)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科  
・教授  
研究者番号：60163804

西村 亮平 (NISHIMURA Ryohei)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科  
・教授 研究者番号：80172708

菅野 純夫 (SUGANO Sumio)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科  
・教授  
研究者番号：60162848