

令和元年6月20日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07155

研究課題名(和文) 口腔粘膜における超低頻度の点突然変異頻度解析による口腔・食道発がんの総合リスク評価

研究課題名(英文) Quantification of ultra-rare somatic mutations using molecular barcode and risk assessment of cancer

研究代表者

山下 聡 (Yamashita, Satoshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：80321876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が新規に開発した超低頻度の点突然変異頻度解析法の改良を進め、変異を検出するアルゴリズムについて検討した。分子バーコード法との組み合わせによるライブラリの最適な作製条件を特定した。さらに口腔、食道がん因子曝露歴(飲酒・喫煙)のある健常人1例・3箇所の口腔粘膜から抽出したゲノムDNAについて点突然変異頻度を解析し、食道粘膜と同等の変異頻度であることを確認した。点突然変異頻度解析法については、両ストランドに同一の変異が存在する真の変異を検出することが可能で、かつ大量のリードを必要としないさらに新しい解析法が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では申請者が新規に開発した超低頻度の点突然変異頻度解析法(Yamashita et al. Cancer Letters 2017, 特願2015-199342)の改良を進めた。さらに口腔、食道がん因子曝露歴(飲酒・喫煙)のある健常人の口腔粘膜から抽出したゲノムDNAについて点突然変異頻度を解析し、食道粘膜と同等の変異頻度であることを確認した。点突然変異頻度解析法については、両ストランドに同一の変異が存在する真の変異を検出することが可能で、かつ大量のリードを必要としないさらに新しい解析法が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Somatic mutations with very low frequency, consisting of mostly passenger, are present even in normal tissues without expansion of clonal patches, and form a cancerization field. Recently, methods to measure such ultra-rare mutations have been developed. We established a simple method using sequencing libraries prepared from 100 copies of genomic DNA as template [Cancer Lett. 403: 152, 2017]. In this study, we analyzed normal oral tissues, and found that their mutation frequencies were similar to those of esophageal tissues. In addition, we combined the method with the molecular barcode technology to achieve more accurate analysis. We prepared sequencing libraries with molecular barcodes using a targeted DNA panel for human genomic DNA. We optimized parameters to score true mutations present only in both strands of DNA. To isolate true mutations more efficiently, further improvement in the preparation of the sequencing libraries is in progress.

研究分野：分子生物学

キーワード：点突然変異

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

### 1. 研究開始当初の背景

一見正常に見える非がん組織においても突然変異が蓄積しているとされ、そのレベルが発がんリスクと相関していると考えられる。しかし、非がん組織における突然変異の蓄積の程度はこれまでほとんど明らかになっていない。その理由は、非がん組織における突然変異頻度が非常に低く( $10^{-5}$ 程度)、正確な測定法が無かったためである。申請者らは、100 コピーの DNA をシーケンシングのテンプレートとして用いる方法を新規に開発して  $10^{-6} \sim 10^{-4}$  程度の突然変異頻度の測定を可能にした (Yamashita et al. Cancer Letters 2017, 特願 2015-199342)。申請者らは、上記の方法を用いて、食道粘膜(タバコ、酒などの発がん因子曝露歴の無い食道粘膜(低リスク)、曝露歴のある食道粘膜(中リスク)、食道がん患者の非がん部(高リスク))における突然変異頻度を解析した結果、段階的に突然変異頻度が有意に上昇することを明らかにした。食道粘膜の突然変異頻度を用いると高い正確性 (AUC = 0.790) で食道がん患者と非がん患者を区別できた (Yamashita et al. PNAS 2018)。これらは、突然変異頻度が食道発がんリスクをよく反映していることを示している。食道粘膜の突然変異頻度は高性能な食道がんリスクマーカーになり得ると考えられる。一方、食道粘膜における突然変異頻度の測定には内視鏡的に食道粘膜を採取する必要があり、被験者への負担は大きい。一方、口腔粘膜の突然変異頻度を用いれば、材料は容易に採取可能で、かつ、口腔・食道等のリスクを総合判定できるのではないかと申請者は着想した。

### 2. 研究の目的

正常組織における突然変異頻度が発がんリスクをよく反映することを、申請者は新規の突然変異頻度測定法を開発、実証した。食道粘膜における突然変異頻度は高い正確性で食道がん患者と非がん患者を区別可能で、食道発がんリスクマーカーとして有望と考えられた。しかし、食道粘膜における突然変異頻度の測定には内視鏡的な採取が必要であり被験者への負担が大きい。一方、口腔粘膜の突然変異頻度を用いれば、材料は容易に採取可能で、かつ、口腔・食道等のリスクを総合判定できると期待される。そこで本研究では、口腔粘膜の突然変異頻度の測定により、口腔がんのみならず食道がんのリスクも総合的に判定できることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

収集した口腔粘膜症例について、申請者らが新規に開発した方法 (特願 2015-199342) を用いて突然変異頻度を解析する。

- 1) ゲノム DNA のコピー数の定量を正確に行う。
- 2) 100 コピーの DNA をテンプレートにして、multiplex PCR により 291 領域、計 48,587 塩基 (Cancer panel によるターゲットシーケンシングと同等の領域) について増幅する。
- 3) 作製したライブラリについて Ion Proton および PI chip を用いて平均深度 10,000 でシーケンシングを行う。特にシーケンシングエラーの少ない領域 (合計 15,724 塩基) における、点突然変異を算出する。理論値 1% の頻度を示す変異体の個数を算出するため、頻度 0.8% - 10% を示す変異体を検索する。頻度 0.8% 以下はシーケンシングエラーの可能性を考慮し、頻度 10% 以上は SNP の可能性を考慮して除外する。
- 4) 得られた変異体の個数から各サンプルの突然変異頻度を計算する。(突然変異頻度 = 変異体の数 / (15,724 x 100))

### 4. 研究成果

#### (1) 超低頻度の点突然変異頻度解析法の改良

申請者が新規に開発した超低頻度の点突然変異頻度解析法 (Yamashita et al. Cancer Letters 2017, 特願 2015-199342) の改良を行い、シーケンシングエラーの少ない領域として解析に用いる領域を 15,552 塩基に修正した。

この点突然変異頻度解析法が、(1) 分子バーコードに比べて変異検出の正確性に劣る (2) テンプレート DNA の正確なコピー数測定を必要とする、点に問題があることから、簡便で低コストである利点を維持しつつ上記の問題点を克服するために、分子バーコード法との組み合わせ (100 コピー・バーコード法) を考案、方法として確立するため、ライブラリ作製条件について検討を進めた。その結果、2ng のテンプレートを用いたときに分子バーコード数と 1 個の分子バーコードあたりのリード数において理想的な結果が得られることが明らかとなった。

改良法においてシーケンサーから得られた配列情報から変異を検出するアルゴリズムについて検討を進めた。両ストランドに同一の変異が存在する場合を真の変異、片側にのみ存在する場合は pre-mutagenic lesion と考えられるので、真の変異のみを検出する必要がある。先に Watson 鎖と Crick 鎖のリードを分離し、別々に解析して変異を検出して、後で変異情報を統合することにより真の変異のみを検出することができた。一方で、本方法では同一 DNA 二本鎖に由来する Watson 鎖と Crick 鎖は別の分子として増幅されてライブラリを形成する。そのために同一バーコードを持つ両方のストランドからリードを得るには大量のリード数を必要とした。この問題は、本方法を含む既存の方法に共通する問題であり、検体あたりのコストに直結し、想定以上に大きな問題であることが明らかになった。

#### (2) 口腔粘膜の点突然変異頻度の解析

口腔、食道がん因子曝露歴のある健常人1例の舌背部、右側口腔、左側口腔の各粘膜から抽出したゲノム DNA について点突然変異頻度を前述(1)の方法で解析した。その結果、点突然変異頻度はそれぞれ 2.5, 2.4, 2.1 ( $\times 10^{-5}/\text{bp}$ ) を示した。これらは食道がん患者の食道がん非がん部の突然変異頻度である  $2.4 \times 10^{-5}/\text{bp}$  と同等の高値であった。また、口腔粘膜の塩基置換のプロファイルについて解析したところ、90%以上が Transition 変異であり、食道粘膜の塩基置換のプロファイルとよく類似していた。口腔粘膜は外界や食物などによるストレスに食道の前に晒されることから、点突然変異は食道粘膜より高レベルで同様のプロファイルを示すと予想されたが、その予想を支持する結果が示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Satoshi Yamashita, Takayoshi Kishino, Taichi Shimazu, Hadrien Charvat, Takeshi Nakajima, Yi-Chia Lee, Masahiro Maeda, Naoko Iida, Reiko Nagano, Shoichiro Tsugane, Ming-Shiang Wu and Toshikazu Ushijima. Normal tissue burden by mutation and methylation provides precision cancer risk diagnosis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2016 年 10 月
2. Satoshi Yamashita, Takayoshi Kishino, Taichi Shimazu, Hadrien Charvat, Takeshi Nakajima, Yi-Chia Lee, Masahiro Maeda, Naoko Iida, Reiko Nagano, Shoichiro Tsugane, Ming-Shiang Wu and Toshikazu Ushijima. Contribution of genetic and epigenetic alteration to cancer risk is different in different tissues. The 39th Annual Meeting of The Molecular Biology Society of Japan 2016 年 11 月
3. 山下聡 正常組織におけるメチル化異常および変異は環境要因への曝露と発がんリスクを提示する 第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会 2017 年 5 月
4. 石原弘喜, 山下聡, 天野良亮, 木村健二郎, 平川弘聖, 上田貴子, 村上善基, 田守昭博, 河田則文, 萩原淳司 and 牛島俊和 DNA メチル化を用いた膵癌組織中の膵癌細胞含有率の測定 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会 2018 年 5 月
5. 山下聡, 永野玲子 and 牛島俊和 分子バーコードと少コピー数のテンプレート DNA を用いた超低頻度変異の定量 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月
6. 山下聡, 永野玲子 and 牛島俊和 分子バーコードと少量の鋳型 DNA を用いた超低頻度点突然変異の定量解析 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 12 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。