

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07745

研究課題名(和文) ヒト正常組織での変異シグネチャー解析実現による個人別発がん要因特定

研究課題名(英文) Identification of individual carcinogenic factors by mutation signature analysis in normal human tissues

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：変異の特徴(シグネチャー)は、発がん要因への暴露状態と関連していることが明らかになっており、発がん要因の同定やがんの予防・治療の研究に重要である。本研究では、次世代シーケンサーを用いて両ストランドに同一の変異が存在する真の変異のみを検出する新規の超低頻度の点突然変異頻度解析法を開発した。BamHI制限酵素を利用してゲノム上の特定の領域を解析することで低リード数での効率のよい解析を実現した。モデルサンプルを作製し、想定した変異頻度とよく相関した変異頻度を得ることができることを確認した。寛解後の小児がん患者末梢血DNAには治療に用いた薬剤に起因する変異シグネチャーが認められることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により実現した次世代シーケンサーを用いた両ストランドに同一の変異が存在する真の変異のみを検出する新規の超低頻度の点突然変異頻度解析法は効率がよいため、多数の検体の解析が実現可能である。そのため多くの臨床検体、正常組織を用いた解析への応用が今後期待できる。また、寛解後の小児がん患者末梢血DNAには化学治療の程度と相関する変異頻度と、治療に用いた薬剤に起因する変異シグネチャーが認められることを示したことは、治療による二次がん発生と変異との関係を強く示唆するものあり、今後の多数の検体を用いた解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mutation signatures have been shown to be associated with exposure to carcinogens, and are important for cancer research. In this study, we have developed a novel ultra-low frequency point mutation frequency analysis method by a next-generation sequencer. It can detect only true mutations in which the same mutation exists in both strands. By using a restriction enzyme, BamHI, efficient analysis with a low read number was realized. A model sample was prepared, and it was used to confirm that the mutation frequency was well correlated with the expected mutation frequency. It was shown that the peripheral blood DNA of pediatric cancer patients after treatment has a mutation signature due to the drug used for the treatment.

研究分野：分子生物学

キーワード：変異 次世代シーケンサー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、正常組織においても DNA の変異の蓄積の存在が明らかになってきており、その変異の特徴(シグネチャー)は、発がん要因への暴露状態と関連していることが明らかになった。そのため、正常組織の変異測定は、発がん要因の同定やがんの予防・治療の研究に重要である。しかしながら正常組織における超低頻度の点突然変異の解析を行う既存の方法では、サンプル採取時に微小な領域のみを採取することで特定の変異を持つ細胞の頻度を上げる(サンプルの工夫)か、次世代シーケンサーのライブラリ作成時にエラーを除く仕組み(シーケンシングの工夫)が必要であった。次世代シーケンサーで超低頻度の点突然変異を解析する場合、両ストランドに同一の変異が存在する真の変異のみを検出する必要があるが従来の方法では効率に問題があり、1サンプルあたりに必要なリード数が多く、多数のサンプルの解析は事実上不可能であった。申請者が以前に開発した超低頻度の点突然変異頻度解析法(特願 2015-199342)は効率こそよかったが、両ストランドに同一の変異が存在する真の変異のみを検出することができないため、本研究ではまず改良を進めることとした。

### 2. 研究の目的

本研究では、非がん組織の突然変異を測定し、各個人の組織における変異シグネチャーを解明することで個人別発がん要因特定につなげることを目的とした。そのために、次世代シーケンサーを用いて両ストランドに同一の変異が存在する真の変異のみを検出する方法の確立を必要とした。そこで、申請者が以前に開発した、次世代シーケンサーを用いた超低頻度の点突然変異頻度解析法の改良として、(1)二鎖に同一の分子バーコードが付与される Duplex 法の改良、(2)両ストランドを分離させないで増幅する新規の方法の開発、を進めた。

### 3. 研究の方法

申請者が以前に開発した超低頻度の点突然変異頻度解析法の改良として、(1)二鎖に同一の分子バーコードが付与される Duplex 法の改良としては、ゲノム DNA を制限酵素で処理することにより測定するゲノム領域を限定することで効率を向上させる改良を導入した。確かに変異が解析可能であることを確認するために、既知の SNP を変異と見なした低頻度突然変異モデルサンプルを 2 種類の培養細胞由来ゲノム DNA (HPDE4, TK6) を適宜混合することで作製し、想定した変異頻度が再現性良く実際に得られるかどうかを解析した。用いたアダプターは従来のオリゴ DNA 2 種類を混ぜるものではなく、長鎖オリゴ DNA 1 種類でループを作らせることで作成した。そのためアダプター保管時、ライブラリ作成時などにおいて不測の分解においても復元し得るアダプターとなり、効率向上が期待できた。(2)両ストランドを分離させないで増幅する新規の方法の開発としては、鎖置換型ポリメラーゼを用いての増幅をモデルオリゴ DNA を用いて検討した。

### 4. 研究成果

次世代シーケンサーを用いた超低頻度の点突然変異頻度解析法の改良として、(1)二鎖に同一の分子バーコードが付与される Duplex 法の改良、(2)両ストランドを分離させないで増幅する新規の方法の開発、を進めた結果、(2)については増幅産物が得られたものの、均一のものではなく、求めていた産物が得られる率が低いことがわかった。耐熱性鎖置換型ポリメラーゼにより選択性を向上させても均一の増幅産物が得られなかったことから本方法の検討の継続を断念した。

(1)について制限酵素 BamHI を用いることで効率よい変異解析が可能であり、 $10^{-8}$  レベルの変異頻度でも解析可能であることが示された。このモデル実験で適切な測定条件(初期テンプレート量など) 変異解析条件(一つの UMI 中の最低リード数など)も決定することができた。併せて変異解析アルゴリズムを調整し、スクリプトの作成を進めた。その結果、実際にサンプルが解析可能な状況となった。

本法を用いて、健常人末梢血 DNA の解析を行った結果、その変異頻度が年齢とよく相関することが確認できた。また、寛解後の小児がん患者末梢血 DNA の解析を行った結果、がん細胞が存在しない小児がん患者末梢血 DNA においては化学治療の程度と相関する変異頻度と、治療に用いた薬剤、特にプラチナ製剤に起因する変異シグネチャーが認められることを示した。

本研究により実現した次世代シーケンサーを用いた両ストランドに同一の変異が存在する真の変異のみを検出する新規の超低頻度の点突然変異頻度解析法は効率が良いため、多数の検体の解析が比較的容易に実現可能である。そのため多くの臨床検体、正常組織を用いた解析への応用

が今後期待できる。また、寛解後の小児がん患者末梢血 DNA の変異解析結果は、治療による二次がん発生と変異との関係を強く示唆するものであり、今後の多数の検体を用いて解析し、追跡することで、治療による二次がん発生のメカニズムの解析と、将来的な二次がん発生を考慮した治療法の選択による二次がん発生率の低下が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下聡, 飯田直子, 永野玲子, 牛島俊和
2. 発表標題 分子バーコードを用いた超低頻度点突然変異の定量解析
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田翔, 山下聡, 飯田直子, 白石友一, 野口雅之, 牛島俊和
2. 発表標題 濃縮DNAとDuplex sequencing法を用いた肺がんの素地解明のための正常組織に蓄積した低頻度体細胞変異の定量
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------