

iPS細胞における造腫瘍性リスク評価に関して

国立がん研究センター
がんゲノミクス研究分野
柴田 龍弘

課題

iPS細胞治療による悪性腫瘍発生のリスクをgeneticな点から評価し、現時点のベストサイエンスの知識の中で、リスクを最小限にするには？

- 1. iPS細胞作製、維持の過程で発生するde novo somatic changesの評価**
- 2. iPS細胞を樹立するソースにおけるpre-existing variants riskの評価**
- 3. iPS細胞におけるgenetic instability (ゲノム不安定性) の評価**

課題

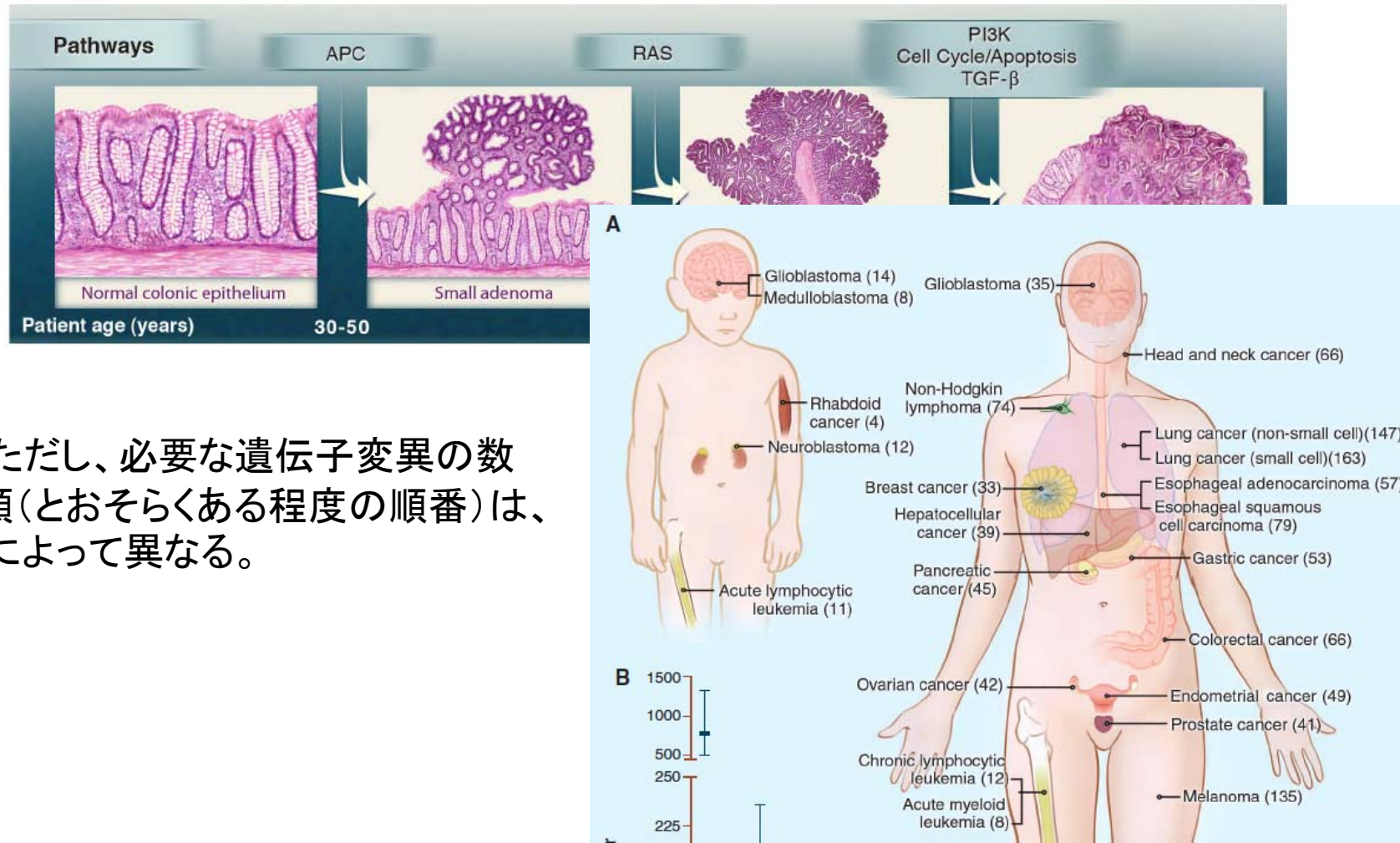
iPS細胞治療による悪性腫瘍発生のリスクをgeneticな点から評価し、現時点のベストサイエンスの知識の中で、リスクを最小限にするには？

- 1. iPS細胞作製、維持の過程で発生するde novo somatic changesの評価**
- 2. iPS細胞を樹立するソースにおけるpre-existing variants riskの評価**
3. iPS細胞におけるgenetic instability (ゲノム不安定性) の評価

iPS細胞作製、維持の過程で発生する *de novo* somatic changes の評価

1. がんの発生における遺伝子異常の意義

1-1. がんはゲノムの病気であるが、その発生過程には複数の遺伝子蓄積が必要である。



1-2. ただし、必要な遺伝子変異の数と種類(とおそらくある程度の順番)は、臓器によって異なる。

がんに関連する遺伝子異常の分類

最近よく使用されるのが、「ドライバー変異」と「パッセンジャー変異」という概念。

A driver mutation is **causally implicated in oncogenesis**. It has conferred growth advantage on the cancer cell and has been **positively selected** in the microenvironment of the tissue in which the cancer arises. A driver mutation need not be required for maintenance of the final cancer (although it often is) but it must have been selected at some point along the lineage of cancer development.

A passenger mutation has **not been selected**, has **not conferred clonal growth advantage** and has therefore **not contributed to cancer development**. Passenger mutations are found within cancer genomes because somatic mutations without functional consequences often occur during cell division.

(Stratton MR et al)

ドライバー変異とは、がんの発生(クローナルな増殖優位性)に寄与し、正に選択されているもの。

がんに関連する遺伝子異常の分類

「ドライバー変異」と「パッセンジャー変異」

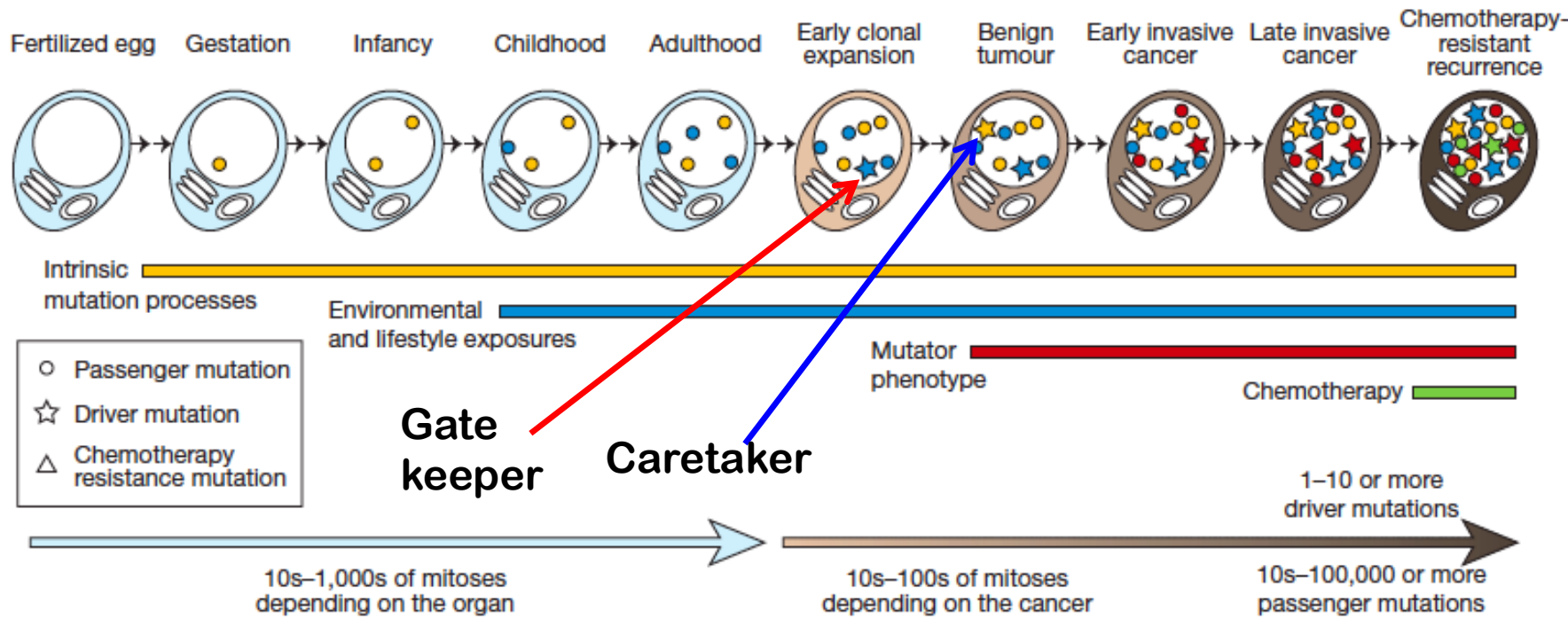
がんゲノム解読によって、たくさんの変異が同定されることから、こうした概念による分類が必要になってきた。ただしドライバー変異とは、概念的に非常に広い範囲の遺伝子を含むため、今回の評価の基準とするにはあいまい過ぎる
と考える。

やや古い別な分類: **Gate keeper gene** と **Care taker gene**

発がんリスクの高い家系(がん多発家系)の原因遺伝子(**Cancer susceptibility gene**)の発見からできた概念

Gatekeeper: 細胞の増殖・生存や分化を制御する遺伝子であり、その異常によって変異を蓄積する細胞が増える(細胞増殖促進、細胞死抑制、未分化状態の維持など: 腺腫のような前癌病変の原因ともなる): 具体例: **APC, BRAF**

Caretaker: ゲノム安定性に寄与する遺伝子。その異常によって、ゲノム不安定性が増し、遺伝子変異の蓄積が加速される。具体例: **BRCA1, MLH1**



iPS細胞造腫瘍性における*de novo* somatic changesの評価に関する考え

Somatic mutation/germline variationについて

評価すべき遺伝子について、リスクに応じて Tier 1, Tier 2...と分類し、それぞれのグループの遺伝子を検索するのがよいと考えます。

Tier 1: 発がんリスクが高いことが判明している遺伝子 (gate keeper/care takerなど家族性がんの原因遺伝子):

各段階で必ず変異の有無を確認する

Tier 2: 統計的にも確実ながん遺伝子、がん抑制遺伝子 (臓器横断的がんゲノム解析において、各臓器がんのトップ10~20に入るもの :Myc, KRAS, EGFRなど)

最初のクローン選別の段階で必ず確認する。その後のステップにおいても可能な限り検討する。

Tier 3: データベース上で確認されるがん関連遺伝子のうち、Tier1/2を除外したもの (long tail部分)。

現時点では対象としない。今後重要性が確立したものはTier2に格上げする。

iPS細胞造腫瘍性における*de novo* somatic changesの評価に関する考え

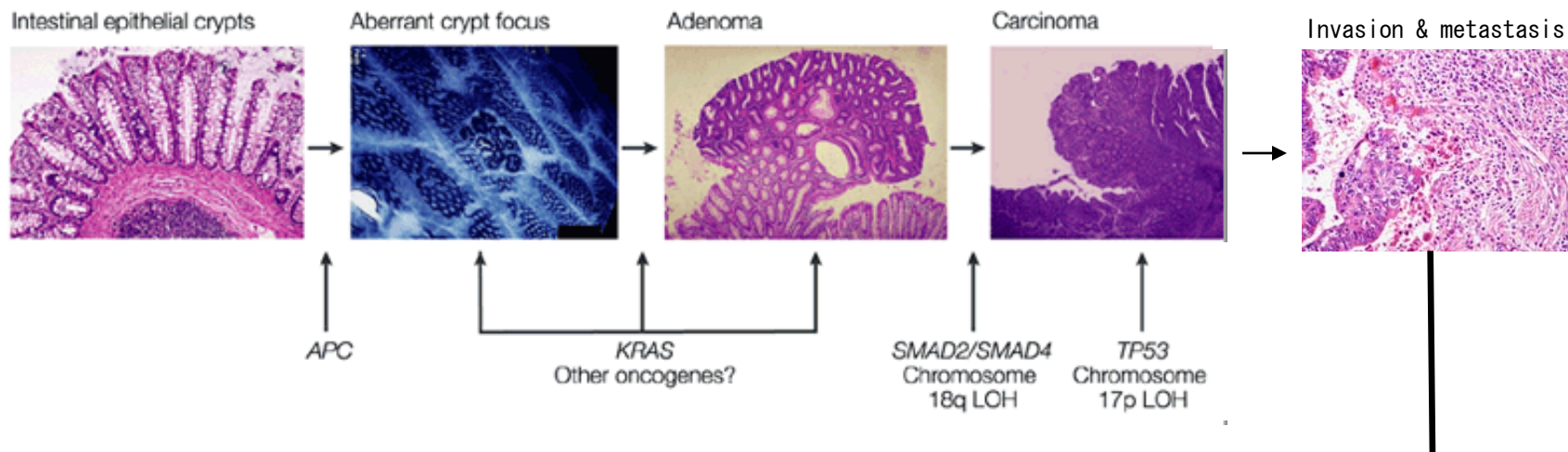
Somatic mutation/germline variation

評価すべき遺伝子について、リスクに応じて Tier 1, Tier 2...と分類し、それぞれのグループの遺伝子を検索するのがよいと考えます。

どのくらい徹底して調べるべきか？

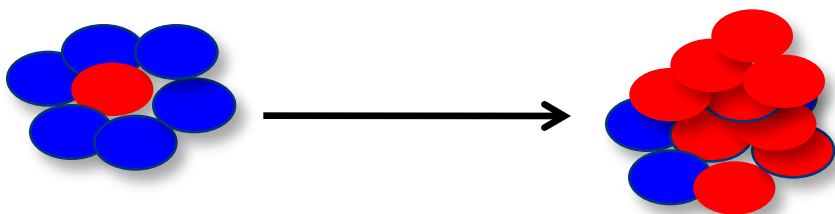
多様性の問題

多段階発がんとは、ゲノム異常蓄積とそれによる適者生存過程であり、腫瘍内には多様な異常を持つクローンが共存している。



がんの多様性・がんの進化の促進因子

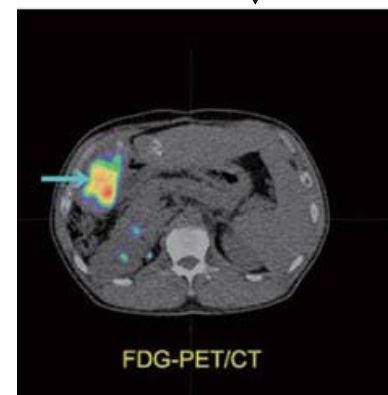
1. Intra-tumoral competition (to survive my genome)



2. Environmental stresses

Hypoxia, inflammation/immune system, therapy etc

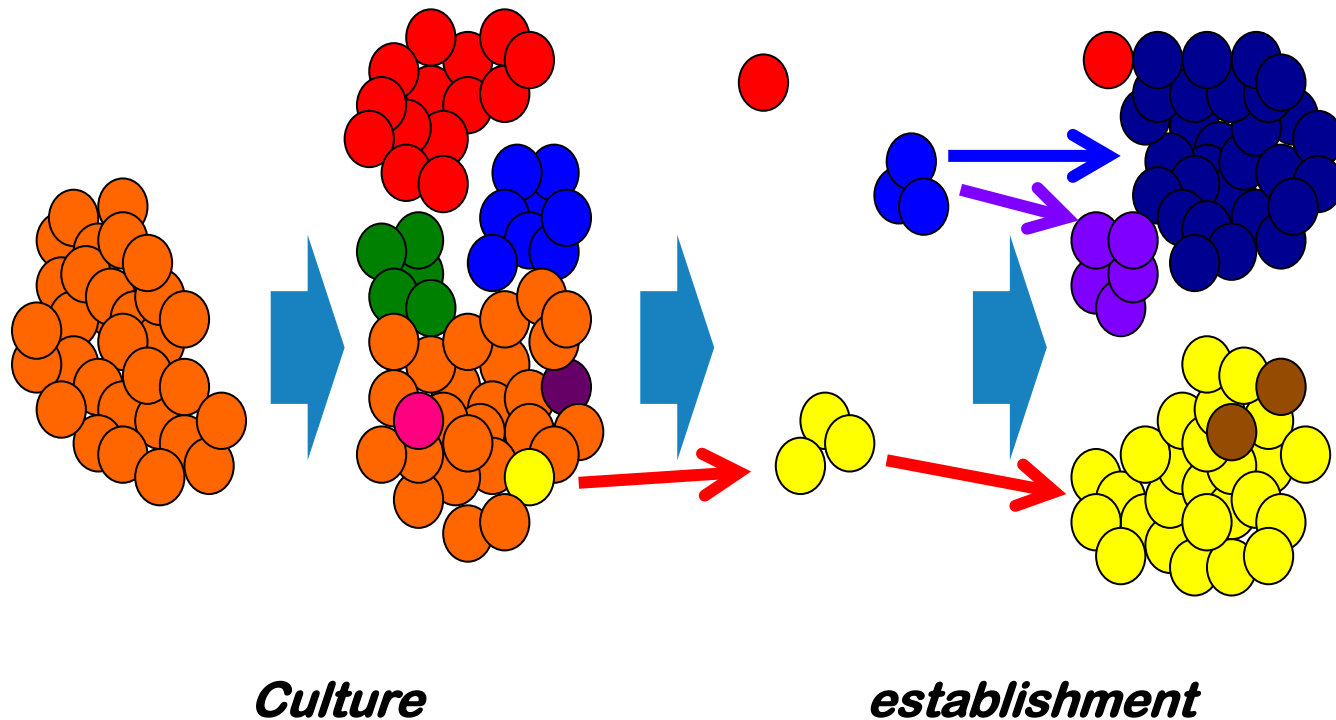
Therapy (chemo, radiation, etc)



relapse

おそらくiPS細胞作製、樹立の過程で、必ず培養条件による選択圧があり、それに適合したメジャークローンと適合しないマイナークローンが共存していると推測される。

どこまでマイナーなクローンにおける変異を重視すべきかを決定するのは困難であるが、可能な限り低頻度な (1~5%) 変異まで検出し、評価するのが望ましい。



iPS細胞造腫瘍性における*de novo* somatic changesの評価に関する考え

Somatic mutation/germline variation

評価すべき遺伝子について、リスクに応じて Tier 1, Tier 2...と分類し、それぞれのグループの遺伝子を検索するのがよいと考えます。

樹立クローン内の多様性を考えると、Tier1/2遺伝子については、Ultra deep sequencingによりマイナーなpopulationにおける変異まで検索しておく必要がある。

どのような方法で？

iPS細胞造腫瘍性における*de novo* somatic changesの評価に関する考え

Somatic mutation/germline variation

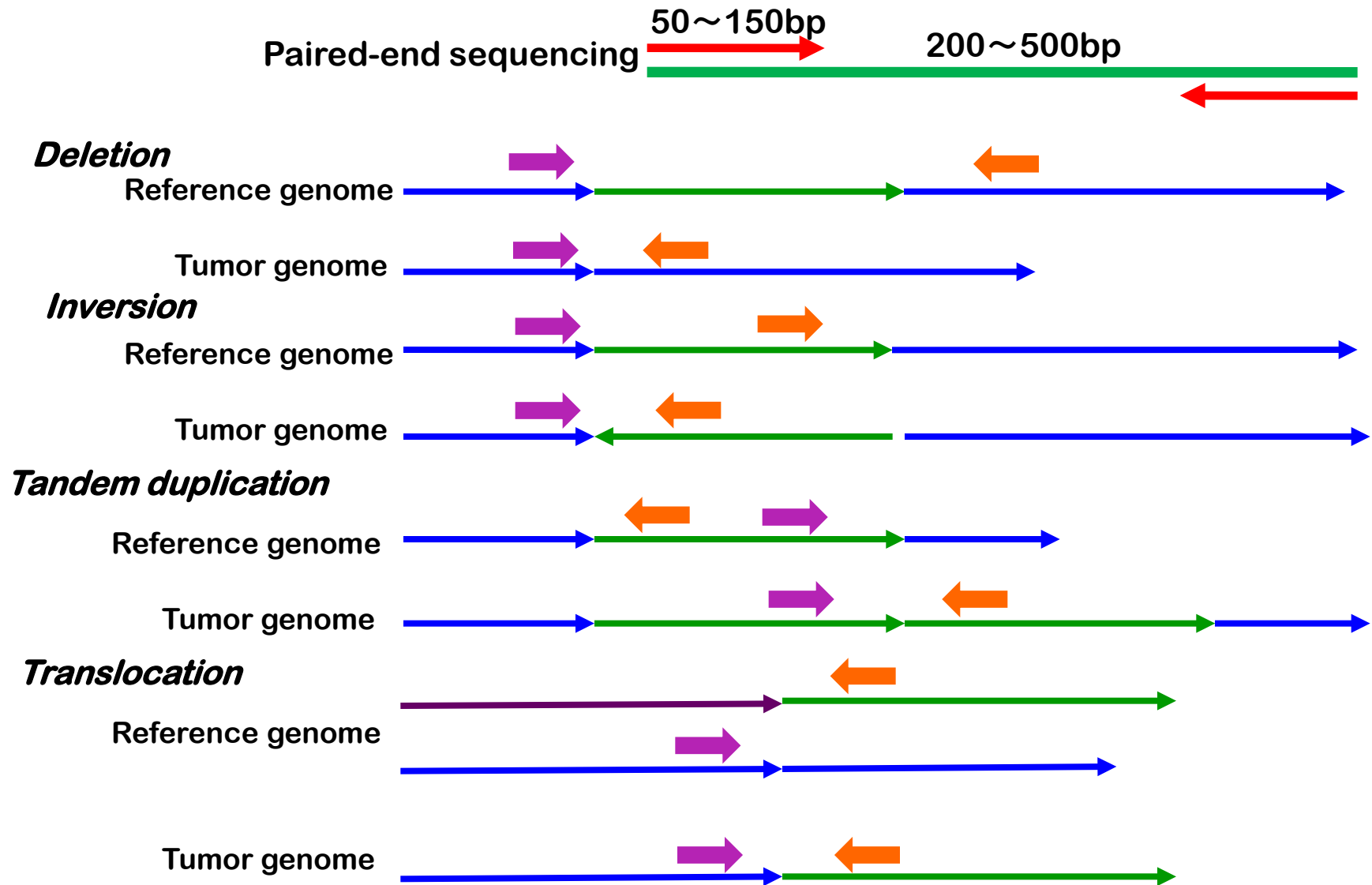
評価すべき遺伝子について、リスクに応じて Tier 1, Tier 2...と分類し、それぞれのグループの遺伝子を検索するのがよいと考えます。

樹立クローン内の多様性を考えると、Tier1/2遺伝子については、Ultra deep sequencingによりマイナーなpopulationにおける変異まで検索しておく必要がある。

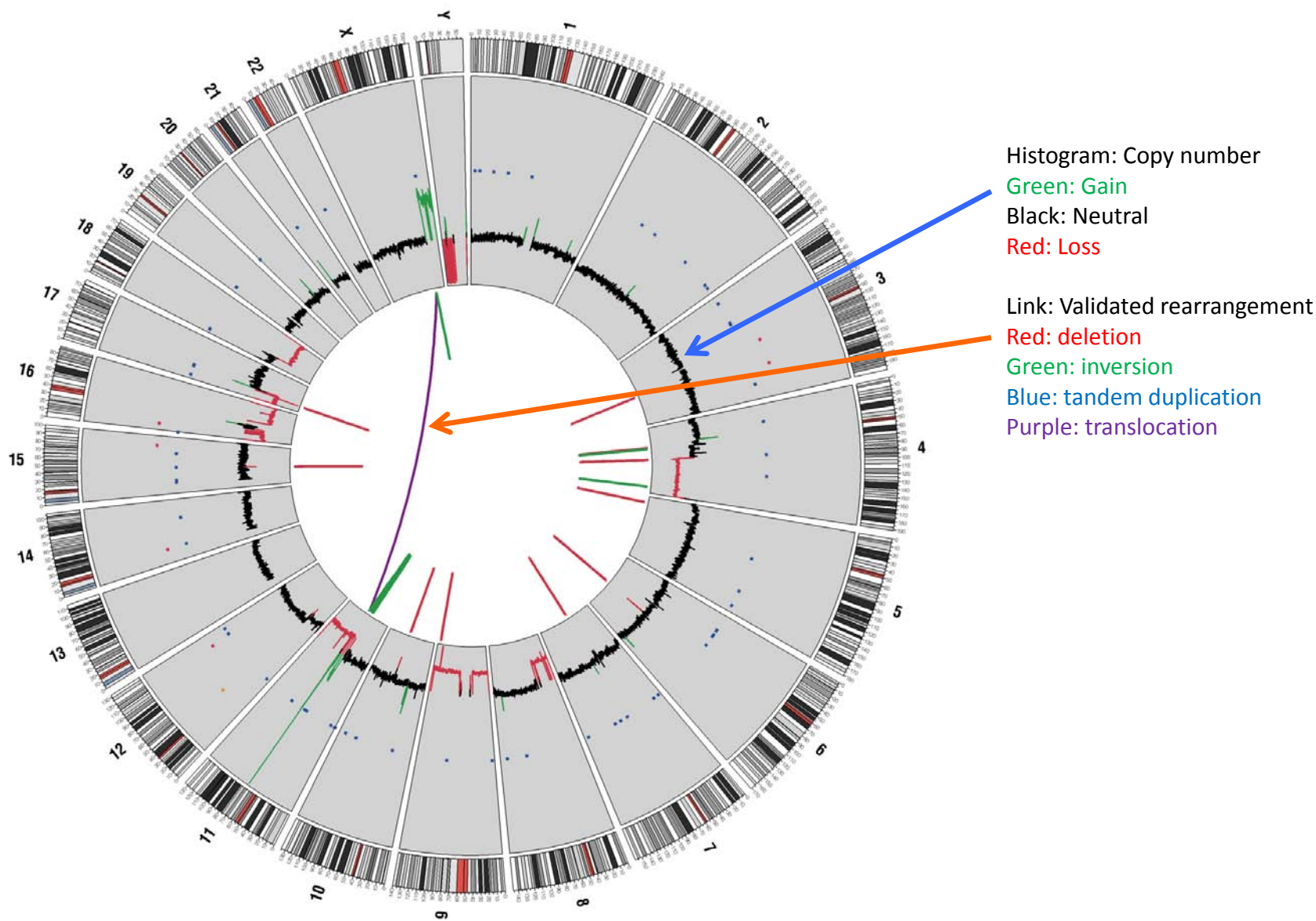
今回の検索にマッチしたカスタム遺伝子パネルについて、Ultra deep sequencingを行う。シーケンスの読み取り深度については、シミュレーション並びに実際のサンプルを用いて、ある程度の基準を決めていく必要がある（まずはx10,000程度から検討、1%の存在と仮定すると、10,000のうち変異を含むものが平均100リード見られる）。

Structural changesについては？

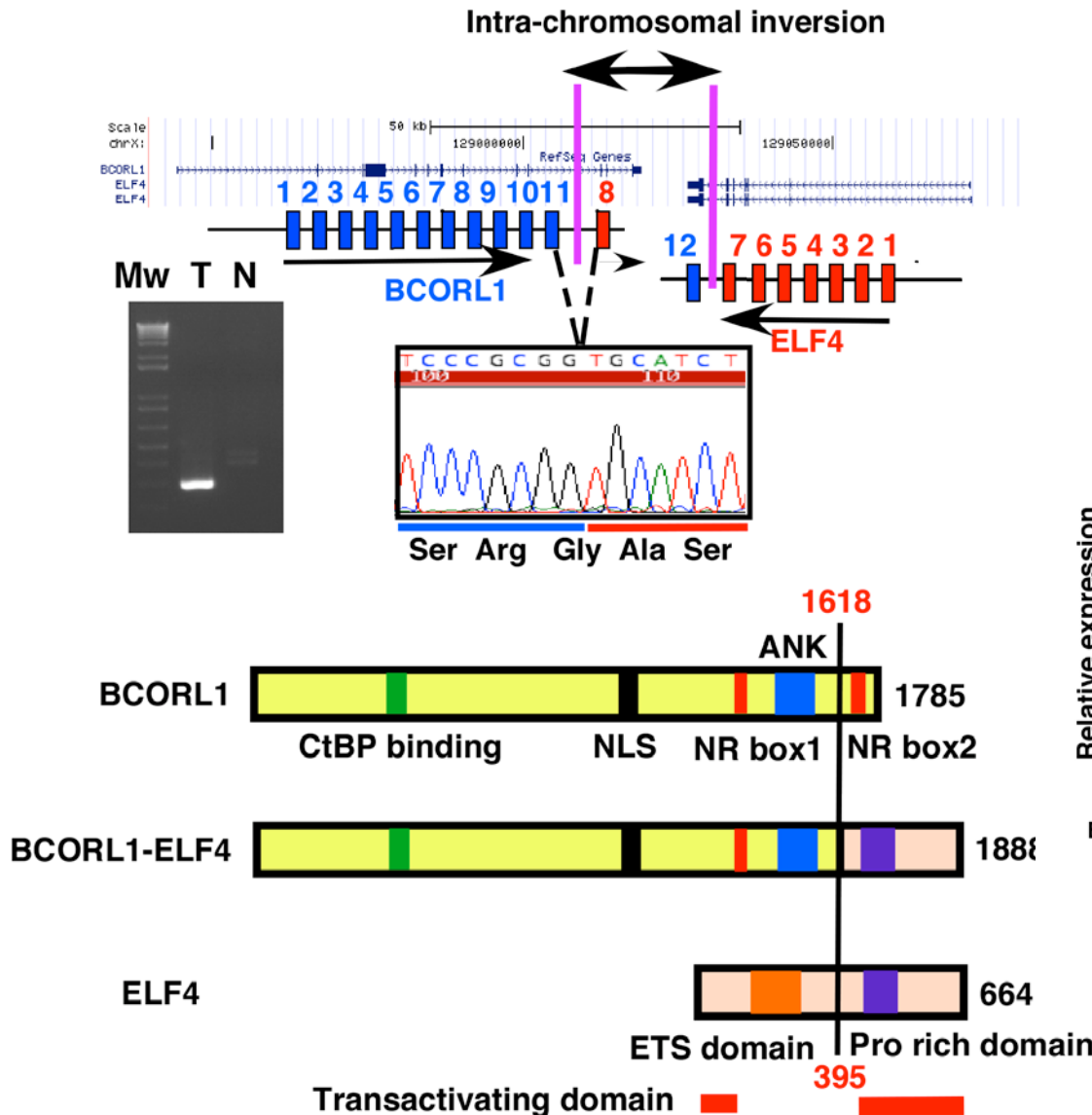
全ゲノム解読による染色体構造異常の検索



全ゲノム解読で同定した肝臓がん(1例)における染色体構造異常

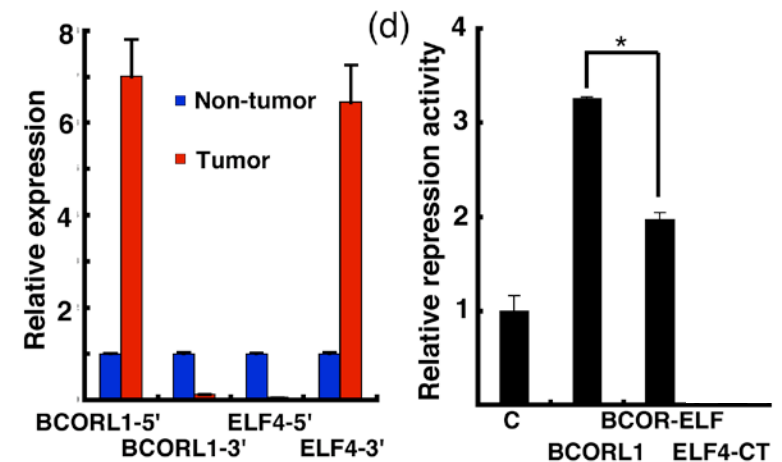


Xq25 領域の逆位によって形成された BCORL1-ELF4 融合遺伝子の同定



BCORL1: 転写を負に抑制する分子
 ELF4: DNAに結合して、転写を正に促進する分子

BCORL1-ELF4: 野生型BCORL1の転写抑制能が阻害されている。



iPS細胞造腫瘍性における*de novo* somatic changesの評価に関する考え(まとめ)

Somatic mutation/germline variation

評価すべき遺伝子について、リスクに応じて Tier 1, Tier 2...と分類し、それぞれのグループの遺伝子を検索するのがよいと考えます。

樹立クローン内の多様性を考えると、Tier1/2遺伝子については、Ultra deep sequencingによりかなりマイナーなpopulationにおける変異まで検索しておく必要がある。

実際の方法としては、今回の検索にマッチしたカスタム遺伝子パネルについて、Ultra deep sequencingを行う。シーケンスの読み取り深度については、シミュレーション並びに実際のサンプルを用いて、ある程度の基準を決めていく必要がある

Structural changes (somatic and germline)

染色体構造異常についても除外しておく必要があると考える。微細な構造異常についてはkaryotypingによる検出は困難であることから、low depth whole genome sequencing (x10程度)が望ましい。

シーケンス技術の現状と展望（より速く・より長く・より安く）

第2世代型(大量解読用: 解読塩基長は100~250bp)

Hiseq 2000



600Gb/10日

信頼性高い。シーケンス時間が長い。

Ion Proton



10~100Gb/7時間

シーケンス時間早い。Indelのエラー率が高い。PE技術が未熟。

臨床導入用小型高速シーケンサー（解読塩基長は100~250bp）

Miseq



~6Gb/27時間

Ion Torrent PGM



1Gb/2.4時間

第3世代型(高速で長い: 解読塩基長は3kb~数10kb)

PacBio RS



解読長3-20kb
0.8Gb/90分

リード長は長いがエラー率が高い。Short readとのhybridが現実的。DNAメチル化などの修飾を直接感知できる。

Oxford Nanopore
(リリース未定)



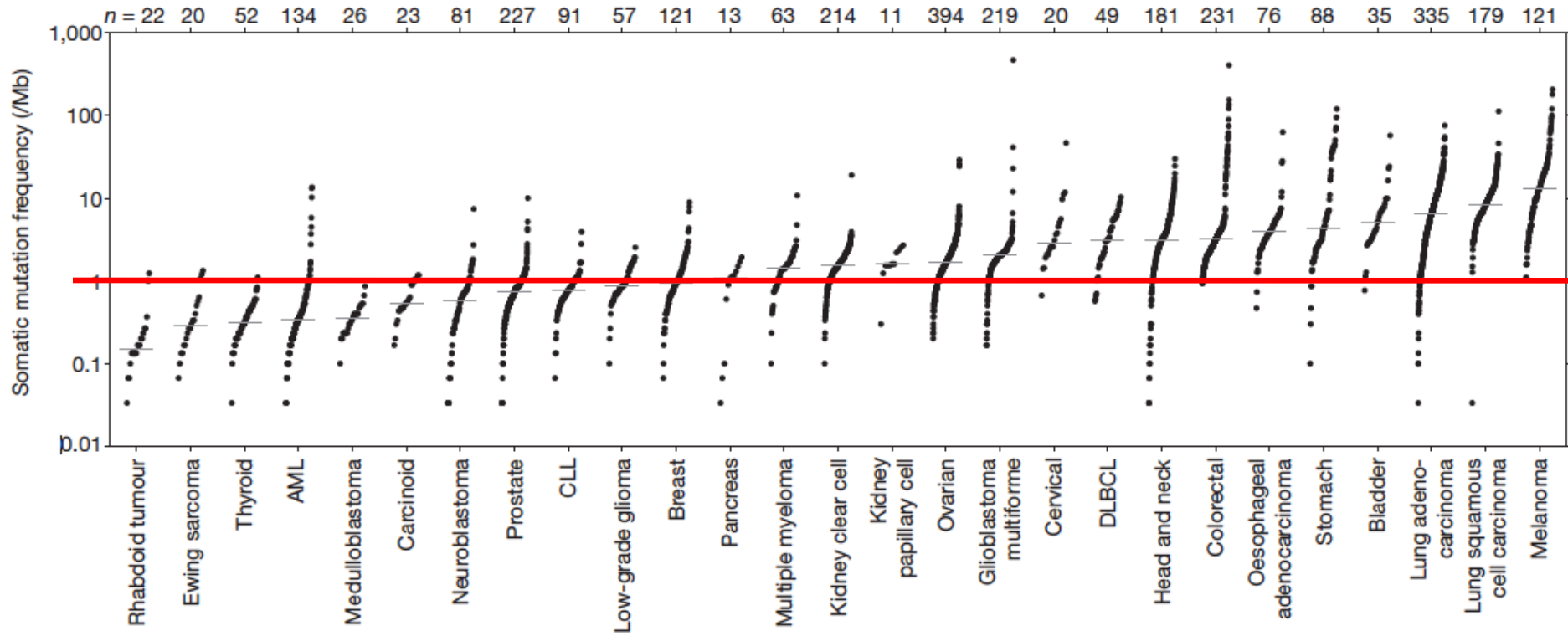
解読長10-40kb
>100Gb/日

課題

iPS細胞治療による悪性腫瘍発生のリスクをgeneticな点から評価し、現時点のベストサイエンスの知識の中で、リスクを最小限にするには？

1. iPS細胞作製、維持の過程で発生するde novo somatic changesの評価
2. iPS細胞を樹立するソースにおけるpre-existing variants riskの評価
3. **iPS細胞におけるgenetic instability (ゲノム不安定性) の評価**

様々ながんにおける変異率



Coding 領域に10個のnon-synonymous mutationがあった場合、synonymous mutationを加えると大体20~30個程度、genome全体では20~30X100=3000個、1Mb当たり1個程度と推測できる。

(エクソン領域:ゲノム全体の1%、ヒトゲノム=3Gb=3000Mb、nonsynonymous/synonymous ratio=1~2として)

正確な評価のためには全ゲノム解読が望ましいが、傾向をつかむための代用としてエクソン領域のデータを使用することも可能。