



# Captured!

snapshots of success



## 分子バーコードを利用した NGS 解析が体細胞モザイク現象を明らかに

### Jiannis Ragoussis 博士

McGill 大学で人類遺伝学の准教授を務める Ragoussis 博士が、稀少な DICER1 症候群に関連する小児がんの研究論文を共同執筆しました。

#### Introduction

Ragoussis 博士は、McGill 大学でがん遺伝学のプログラムディレクターを務める Will Foulkes 教授と共同で、DICER1 症候群に関連する複数の原発腫瘍を持つ 4 名の小児患者について研究を行いました。



この 4 名の患者の腫瘍と正常組織のディープシーケンシングにより、DICER1 RNase IIIb の変異を明らかにしました。稀少な DICER1 関連腫瘍の原因が DICER1 RNase IIIb のモザイク現象であるという仮説を裏付けるために、分子バーコードに対応した HaloPlex HS が使用されました。

### Zooming In: 研究について

**Q1: 先生のご研究内容を教えてください。**私は、Innovation Center のゲノミクス研究におけるプラットフォーム戦略を統括しています。我々のラボでは、シーケンシング技術の開発および新たなアッセイの開発を重点的に取り組んでおり、特にがんに関連するアプリケーションや、腫瘍の不均一性に関連する体細胞変異の検出のような困難な課題に着目しています。また、シングルセルにおけるゲノミクス技術にも取り組んでいます。

我々は McGill 大学の William Foulkes 教授のグループと協力し、一般に DICER1 のヘテロ接合性生殖細胞変異により発症する DICER1 症候群の研究を行っています。この遺伝子は、miRNA 前駆体から成熟 miRNA へのプロセッシングを担う small RNA エンドリボヌクレアーゼをコードしており、DICER1 の変異は、様々な稀少がんや発達表現型と関連しています。

**Q2: どのような経緯でこの研究を始められたのですか?**私が DICER1 の研究に興味を持ったのは、DICER1 症候群のいくつかの症例で、発症原因となる生殖細胞変異がまったく同定されず、体細胞変異の同定がいかに難しいかが裏付けられたためです。これは技術的に困難な問題でした。このことから非常に低い頻度で存在する原因変異を検出するという問題の解決に大きな関心を持つようになり、特に興味深い DICER1 症候群の 4 つの症例を研究しました (1)。

**Q3: これまでにどのような問題に直面しましたか?**我々はまず、発症原因となる体細胞変異を検出するためにディープシーケンシングを試みました。シーケンシングの読み取り深度を、可能性のある変異を同定するまで徐々に深くしましたが、同定した変異がシーケンシングのアーチファクトではなく真の変異であることを証明するのはきわめて困難でした。このような状況で我々が着目したのが、分子バーコードを用いた次世代シーケンシングです。非常に低頻度で存在する変異を高い精度で同定するための手段として、HaloPlex HS を使用しました。また、HaloPlex HS と他のプラットフォームとの比較も行いました。



CANCER



Agilent Technologies

## Q4: この問題の解決に分子バーコードがどのように役立ちましたか?

HaloPlex HS では、対象領域に対し制限酵素で切断された最大 8 種類のフラグメントでカバーし、キャプチャされた DNA 分子には 10 塩基の分子バーコードが付加されます。この複数のフラグメントで対象領域がカバーされることにより、低頻度な変異の検出の精度と感度が高まります。解析時にはバーコード配列情報をもとに、アーチファクトやエラーを除外したコンセンサス配列が作成されます。プラットフォームの比較では、重複リードを除去する機能を備えた HaloPlex HS が、最も高い精度を示し、より正確にベースコールを行えることがわかりました。さらに我々のワークフローにも全く問題なく適用できるのも利点です。

実際に、HaloPlex HS は、我々が直面していたあらゆる問題の解決に役立ちました。分子バーコード技術と効率的なキャプチャを用いることで、解析したすべての腫瘍サンプルにおいて低頻度で存在していた変異をすべて確認でき、非腫瘍サンプルでは陰性の結果が得られることも確認しました。さまざまな DNA サンプルをきわめて高い精度と感度で解析する必要があり、低頻度で存在する変異の検出に関心のあるすべての方に、HaloPlex HS をおすすめします。

## Q5: バーコードを用いたシーケンシングによりどんなことが解明されましたか?

生殖細胞の truncating mutation が関与する DICER1 症候群についてこれまで報告されている多くの症例とは異なり、3 つの症例で判明したのは体細胞モザイク現象でした。また、ほとんどの DICER1 関連腫瘍で見られるような two-hit 腫瘍形成もこの症例にも作用している可能性があるという仮説を立て、実際、我々は体細胞で second mutation を発見しました。

## Q6: 低頻度のアリの検出ががんの理解にどのように役立つのでしょうか?

HaloPlex HS は、腫瘍の不均一性を非常に詳細に高い精度で理解するうえで役立っています。腫瘍における第 1 レベルの変異、すなわち「hit」だけでなく、腫瘍形成との関連性が疑われる次の hit も同定が可能となりました。

## Zomming Out: 次に目指している研究について教えてください。

我々は Will Foulkes 教授とともに、HaloPlex HS を用いて組織の DNA をさらに深く掘り下げて研究し、DICER1 だけでなく他の多くの症候群についても、first hit だけでなく、腫瘍発生との関連性が疑われる second hit も同定したいと考えています。

また、私自身、腫瘍の不均一性に大きな関心を持っており、その解明のために、HaloPlex HS のような高分解能の技術を応用しようと考えています。不均一性をより詳細に精度高く理解するうえで役立つだけでなく、シングルセルでのアプローチとしても活用できるためです。不均一性の解明を焦点とした研究は非常に重要です。これは、治療に対する反応という観点で変異がどう変化するかを研究し、理解することが、未来の治療方針を導くことになるからです。

Kock, LD et al. High sensitivity sequencing reveals multi-organ somatic mosaicism causing DICER1 Syndrome. J Med Genet (2016) 53:43-52.

### [ お問い合わせ窓口 ]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email\_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品は全て研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://AgilentGenomics.jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2016

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan, April 26, 2016

5991-6886JAJP



**Agilent Technologies**