

「ミクロゲノミクス」から、がんheterogeneityの 分子基盤を解明する

江角眞理子¹⁾, 山口裕美¹⁾, 栄永直樹¹⁾, 中山裕貴¹⁾, 高山忠利¹⁾, 杉谷雅彦¹⁾,
野田博子¹⁾, 増田しのぶ¹⁾, 末光正昌²⁾, 久山佳代²⁾, 吉田明生¹⁾, 徳橋泰明¹⁾

Molecular basis of cancer heterogeneity determined by ‘microgenomics’

Mariko ESUMI¹⁾, Hiromi YAMAGUCHI¹⁾, Naoki EINAGA¹⁾, Yuki NAKAYAMA¹⁾,
Tadatoshi TAKAYAMA¹⁾, Masahiko SUGITANI¹⁾, Hiroko NODA¹⁾, Shinobu MASUDA¹⁾,
Masaaki SUEMITSU²⁾, Kayo KUYAMA²⁾, Akio YOSHIDA¹⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾

要旨

がんのheterogeneityの分子基盤とは、がんの分子進化を明らかにすることにある。そのためには、1つの癌症例にみられる多彩な病理組織像を顕微鏡下で採取し、それぞれにある遺伝子変異を明らかにしなければならない。本研究では、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から、次世代シーケンサー解析ができるように、組織の処理方法とDNAの抽出方法を確立した。さらに肝癌症例、乳癌症例、舌癌症例、転移癌症例を対象に、各がんのheterogeneityと前癌病変を材料として、次世代シーケンサー解析結果から分子進化の解明を試みた。ラット自然発症肝癌モデルでは、生来の遺伝子変異が複数見つかると易発がん性の遺伝素因が示唆された。乳癌の多様性や、舌癌の浸潤度の違いには、複数の特徴的な遺伝子変異が関与する可能性が示された。肺小細胞癌の多臓器転移の様式も、各臓器に特徴的な変異の付加が観察され、それぞれに転移クローンの起源が異なることも示唆された。

1. はじめに

次世代シーケンサーの急速な進歩により、がんゲノム全体像が明らかとなってきた。一つの腫瘍をとっても10~200個の遺伝子突然変異が見つかる¹⁾。一塊の腫瘍から数カ所とってみると、変異が異なることもわかってきた²⁾。もはや臨床癌は切除された時点では単一クローンではない、多様な変異パターンをもつがん細胞のヘテロな集団と理解される。転移に至っては、原発腫瘍とはさらに異なる変異パターンを示し、がんのゲノム進化が個々の症例で理解されるようになってきた²⁾。このように予想以上のがんheterogeneityが明確になったものの、何ががん発生のdriver mutationで、何が転移のdriver mutationか、また転移腫瘍の臓器親和性は何で決まるのかは、まだわかっていない。本研究では、この新たな問題を解明すべく、新たな手法でがんのゲノ

ム進化を明らかにする。それは、病理組織像から多彩ながん組織像や前癌病変をとらえ、これらを個別に対象としゲノム進化を解析することである。具体的にはホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) を対象とし、レーザーマイクロダイセクションにより標的細胞集団を採取し、網羅的変異解析をする。ここでは、これを「ミクロゲノミクス」と呼ぶ。FFPE DNAは新鮮凍結組織DNAとは異なり、ホルマリン固定によるDNAの損傷が新たな問題となっている。そこで本研究では、ミクロゲノミクスが可能な次世代シーケンシングプロトコルを確立する。その上で、同一症例内にみられる肝癌の前癌病変と肝癌の比較、乳癌症例にみられる多様な癌組織像の比較、口腔癌と前癌病変との比較、多臓器転移腫瘍と原発腫瘍との比較を、研究課題として実施する。

1) 日本大学医学部

2) 日本大学松戸歯学部

江角眞理子: esumi.mariko@nihon-u.ac.jp

2. 材料と方法

(1) 固定包埋条件とDNA抽出方法

①ホルマリン濃度と固定時間

3頭のラット肝臓組織を用いて、それぞれ新鮮凍結およびホルマリン固定を行った。固定については、更に組織を分割し、ホルマリン濃度及び固定時間を変えて固定を行った。各条件固定後、更に組織を半割し、半分をパラフィン包埋した。ヒト生検のFFPE組織については、20%ホルマリン固定7例と10%ホルマリン中性緩衝液固定20例を用いて比較した。

②DNA抽出条件

ラット肝臓FFPE薄切組織について、DNA抽出キット4社とマニュアルプロトコル法（界面活性剤/proteinase Kによる55℃一晩溶解>フェノール/クロロフォルム抽出>RNase A処理>フェノール/クロロフォルム抽出）により、DNAを抽出した。ラット肝臓新鮮凍結組織からも、マニュアル法でDNAを抽出した。どの抽出方法も、DNA溶液は最後エタノール沈殿にて精製した。FFPE DNA収量は、組織切片面積あたりで評価した。質については、ラット及びヒトの *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh or GAPDH)* 遺伝子の定量PCR (qPCR) を行い、凍結組織由来のDNAを1とする相対値で表記した。

③FFPEによる人工変異

3頭のラット肝臓組織を10%ホルマリン中性緩衝液で4日間固定したFFPE組織と新鮮凍結組織とからDNAを抽出し、比較した。4例のヒト大腸癌の肝転移切除例の非癌部正常肝組織を同様に固定したFFPE組織とその新鮮凍結組織とからDNAを抽出し、比較した。KRASコドン12および13の3箇所のG>A変異について、ラット *Kras* はSYBR green allele-specific qPCRを構築し、ヒト *KRAS* はTaqMan mutation detection assayにより定量評価した。同じヒト肝臓組織については、409がん関連遺伝子のアンプリコンについても、次世代シーケンサーを用いて変異解析を行った。

(2) 肝臓癌と前癌病変

①ラット肝臓癌自然発症モデル

Long Evans Cinnamon (LEC) ラット4週齢, 13週

齢, 25週齢, 73週齢, 97週齢より各臓器を採取し、凍結及びホルマリン固定し保存した。コントロールとして4週齢正常肺, 4週齢の肝炎のない肝臓, 73週齢の肝内胆管癌, 及びその非癌部慢性肝炎組織, 97週齢の肝細胞癌の5検体からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行った。

②ヒト肝細胞癌早期再発症例の非癌部と癌組織

C型肝炎ウイルス陽性の初期肝細胞癌で、2年以上早期再発例3例を対象に、初発癌切除時の癌部および非癌部FFPEを用いた。薄切切片からレーザーマイクロダイセクションにて標的部位（前癌病変様組織部位及び癌部）を採取し、DNAを抽出する。409がん関連遺伝子のアンプリコンから、次世代シーケンサーによる変異解析を行う。

(3) 多様な乳癌および増殖性病変

48歳乳癌症例で、乳管癌と小葉癌が同時発生していた症例を対象とした。組織病理学的検討から、主要な腫瘍部位には隣接して浸潤性小葉癌 (ILC), 非浸潤性小葉癌 (LCIS), 浸潤性乳管癌 (IDC), 非浸潤性乳管癌 (DCIS) がみられ、8cm離れた摘出辺縁部には非浸潤性乳管癌 (DCIS-2) が、また乳房全体には乳管内上皮増殖性変化 (AT) が観察された。各部位及び正常乳管上皮 (NB) をFFPEからレーザーマイクロダイセクションにて採取し、また乳房正常皮膚 (S) 及び正常腋窩リンパ節 (LN) はFFPE薄切切片を採取し、DNAを抽出した。上記のうち、ILC, IDC, DCIS-2, LNの4部位について409がん関連遺伝子のアンプリコンシーケンスを行った。

(4) 口腔内扁平上皮癌と異形成病変

62歳男性の舌扁平上皮癌症例を対象とした。腫瘍部には浸潤度分類が異なる癌組織像YK-2, YK-3, YK-4Cが混在し、周囲には異形成病変 (DP) が観察された。これら癌部及びDP, 健常舌上皮 (NE) をFFPEからマイクロダイセクションにて採取し、また健常結合組織 (C) をコントロールとしてFFPE薄切切片より採取し、DNAを抽出した。このうち、YK-2, YK-3, DP, NE, Cの5検体について、409がん関連遺伝子のアンプリコンシーケンスを行った。

(5) 多臓器転移腫瘍

77歳男性, 入院時生検にて肺小細胞癌と診断さ

れ治療を開始したが、2ヶ月後死亡。剖検にて肺小細胞癌の多臓器転移が認められた症例を対象とした。原発生検肺癌組織と剖検肺癌組織、転移癌組織として肺門リンパ節、縦隔、肝臓の右葉と左葉、胸骨、腰椎の6カ所について、FFPE薄切切片からレーザーマイクロダイセクションにて材料を採取した。コントロールとして健常な腎組織を、FFPE薄切切片から採取した。各材料からDNAを抽出し、50個のがん体細胞変異のホットスポットについてアンプリコンシーケンスを行った。得られた結果についての検証は、直接塩基配列決定で定性評価し、TaqMan SNP genotyping assay、及びTaqMan mutation detection assayを用いたqPCRで定量評価した。

なお当該遺伝子解析研究については、医学部及び松戸歯学部倫理委員会にて承認を受け実施している。また動物実験についても、日本大学動物実験実施規程に基づき実施している。

3. 結果と考察

(1) FFPE DNAの特徴³⁾

①ホルマリン濃度と固定時間

ラット肝臓組織を10%および20%ホルマリン中性緩衝液で1日固定した結果、抽出DNAの質をqPCR値で評価すると、凍結組織DNAを1とした場合平均0.17および0.06となった。DNAの質はかなり低下し、20%固定ではその低下が著しいことがわかった。また10%ホルマリン中性緩衝液で1日、2日、3日、4日の固定を比較すると、平均0.22, 0.20, 0.17, 0.15と徐々に低下し、パラフィン包埋ではそれぞれ、0.10, 0.06, 0.05, 0.03と更に質は悪化した。

病院病理検査室のヒト生検組織FFPEでも、10%ホルマリン中性緩衝液固定では平均0.18に対し、20%ホルマリン固定では平均0.004と、著しく質は低下していた。以上のように、遺伝子検索には組織固定液として、10%ホルマリン中性緩衝液を用いる必要性が示された。

②DNA抽出条件

FFPE DNA抽出法をDNA収量とqPCR値で評価した結果、マニュアル法が最も優れていた。キット4社のうち2社は、マニュアル法と変わらないqPCR値を示したが、DNA収量が約60%と低かった。他の1社はプロトコルを改変することにより、qPCR値に改善がみられ、量質ともにマニュアル法に匹敵

する方法であった。マニュアル法に比べ、短時間でできることから、以後、FFPE DNAの抽出には、このキットを改変プロトコル下で使用した。その改善点は、マニュアル法と同様、組織溶解後、95°C 30分処理を追加することである。この熱処理を行った後DNAを抽出した場合は、行わずに抽出した場合に比べ、ラット組織で平均2.8倍、ヒト組織でも平均2.2倍のqPCR値の上昇を認めた。回収されるDNA量には、熱処理の有無で変化はなかった。

③FFPEによる人工変異

ラット肝臓組織及びヒト肝臓組織について、それぞれ3例と4例のFFPE DNA：新鮮凍結組織DNAのペア解析をした。KRAS変異で知られるコドン12および13の3箇所のG>A変異は、1%以上の頻度では起こっていなかった。FFPEによるKRAS人工変異については、大腸癌症例で報告がある⁴⁾。平均4.6回の反復検査を行うと、4.7% (53サンプル) で再現性のない結果がでるといえる。アンプリコンサイズを変えると消えてしまうことより、人工変異と言っている。本研究のように一定の固定条件下で、変異頻度を測定した報告はない。10%ホルマリン中性緩衝液で4日間までの固定であれば、1%の頻度では起こらないといえる。但し、ごく限られたピンポイント遺伝子での検討で限界はある。そこで、更に網羅的に調べるため、同じヒト肝臓組織4ペアについて409がん関連遺伝子のアンプリコンを次世代シーケンサーで読んでみた。約200万塩基配列を約500回カバーするように読んでみた。FFPE側に優位に検出される変異—single nucleotide variant (SNV) /insertion and deletion (INDEL) /multiple nucleotide variant (MNV)—は数十見つかった。そのうち6個は2例もしくは3例に共通の変異であった。頻度も3%—30%と高かった。100—400回読んで3%—4%の頻度で見つかる変異も5個見つかった。T>C (3), C>A (4), A>T (2), G>C (1), G>A (1)と置換の種類は様々で、遺伝子座位も染色体1, 3, 5, 6, 7, 14, 19, Xと散在していた。一方コピー数変化 (CNV) も複数箇所見付き、すべて増幅であった。中には2例で共通する箇所もあった。新鮮凍結組織DNAでは増幅しにくいところでも、FFPE DNAでは他の領域同様に、平均的に増幅できる変化が起きている可能性がある。

以上より、FFPE DNAはホルマリン固定の段階

で、明らかに質の低下を起こすことがわかった。150bpサイズのPCRでも約1/10近くにまで、効率は下がっていた。断片化や化学修飾による変化がその原因と考えられる。一方でそのようなDNAを鋳型に次世代シーケンシングすることは、可能であることが示された。しかしミスリードする可能性も示唆された。今後、これらを検証し、ミスリードの頻度や特徴を明らかにする必要がある。

(2) 肝臓癌と前癌病変

①ラット肝臓癌自然発症モデルにおける前癌病変と肝細胞癌と胆管癌の全ゲノム比較⁵⁾

LECラットは、銅輸送ポンプ*Atp7b*遺伝子の一部欠失による、ヒトウィルソン病のモデル動物である。と同時に、肝臓癌自然発症モデル動物でもある。肝への銅異常蓄積が、慢性肝障害とその再生の繰り返しを促し、高率に肝臓癌をもたらしと考えられている。しかし、LECラットにおける癌の発生・進展に関わる遺伝子変異はまだ明らかになっていない。本研究では、LECラットの様々な病態の新鮮凍結肝組織からDNAを抽出し、全ゲノムシーケンス解析により遺伝子変異候補を明らかにする。さらにこれら候補遺伝子のマイクロゲノミクス解析から、前癌病変の有無、その局在と組織像を明らかにする。今回は、5検体—正常肺、肝炎のない肝組織、慢性肝炎のある非癌部肝組織、肝細胞癌、肝内胆管癌—の比較ゲノミクスを行った。

平均リード数1,075,293,298、平均マップ率97.9%で変異解析を行ったところ、5検体でそれぞれ約440万ヶ所のhomozygousなSNVが検出された。INDELは平均43万個、structural variantは平均14万個に及んだ。これら変異の数は、検体間で大きな差はなかった。LECラットはレファレンスであるBrown Norway (BN)ラットに対し、大きな系統間の差を有していると思われた。これらの変異のうち5検体に共通した変異が、既知の癌関連遺伝子3つに見つかった。染色体安定性、DNA二本鎖切断修復に必要な遺伝子、細胞増殖や癌への形質転換に関わる遺伝子、DNAのメチル化に関与する遺伝子である。これらの変異は、いずれも機能変化をもたらす変異であった。更には、細胞増殖制御やDNA修復などが癌抑制的な遺伝子5つで、ナンセンス変異またはノンストップ変異が見られた。このように、LECラッ

トは、*Atp7b*の欠失だけでなく、複数の遺伝子の変化をもち、易発がん性の背景をもつ可能性が示された。

肝細胞癌に特異的な変異として、26.1%の頻度で細胞周期関連遺伝子が1つ見つかった。G2/M期への移行に必要な遺伝子であるが、一方他のタンパク質と複合体形成し、他遺伝子の発現制御や癌抑制の役割も担っている。更に、ヒトの複数の癌でその発現が低下しているとの報告もあり、肝細胞癌の発現にこの遺伝子変異が関与している可能性が示された。一方、肝内胆管癌においては非癌部と共通して、約50%の頻度で、変異がある遺伝子が見つかった。が、機能は未だに不明である。肝内胆管癌特異的な遺伝子変異は見つかっていない。

このように、LECラットの発癌メカニズムは特定の遺伝子のSNVだけでは説明できず、遺伝子の転座や欠失、重複など、よりダイナミックな変異が関与する可能性がある。また高メチル化に関与する遺伝子が、5検体共通の変異をもっていたことより、エピジェネティックなレベルで癌に関連する遺伝子の発現量変化が、易発がん性に関与しているかもしれない。

②ヒト肝細胞癌早期再発症例の非癌部前癌病変様組織と癌組織における変異比較

C型肝炎ウイルス陽性の初期肝細胞癌で早期再発例では、初発癌切除時の非癌部および癌部周囲にCK19陽性細胞の増生がみられる。これは前癌病変様領域と思われる部位で、これらの領域および癌部領域を、FFPE薄切切片からレーザーマイクロダイセクションにて採取し、変異解析を行う。これによって、前癌病変に特徴的な変異を明らかにする。今回は、対象症例3例のFFPE DNAが、次世代シーケンサー解析の対象となりうるかを検討した。3つの癌部FFPE DNAについて、10%以上の頻度で見つかる変異は、各9個、9個、5個で、そのうち3個は共通変異であった。対象3症例のFFPE DNAは今後解析可能であること、候補となる遺伝子変異が複数あること、また頻度は低い共通変異が存在する可能性も示唆された。今後、対照となる各症例の非癌部と比較し、変異候補を明確にする必要がある。またマイクロゲノミクスを実施すれば、非癌部の詳細な解析により、前癌病変における変異の有無も明確にできる。

(3) 多様な乳癌および増殖性病変⁶⁾

乳管癌と小葉癌が同時発生した乳癌の乳房全摘症例から、ILC, IDC, DCIS-2, LNの4部位について、409がん関連遺伝子のアンプリコンを平均470回(429-514回)の深さで読んだ。LNを対象としてペア解析し、3つの癌の変異を比較した。合計74個のSNV/INDEL/MNVと4箇所のCNVが見いだされた。100回以上読んで変異頻度10%以上のもので、かつLNでは変異0であった遺伝子は、5個となった。ILCに2個、IDCに1個、DCIS-2に3個見つかった。IDCの1個はILCと共通であった。またコピー数変化については、3つの癌に共通する増幅が1か所、ILCとDCIS-2に共通の欠失が1か所、ILCにはさらに単独の欠失が2か所見出された。

これらの変異から癌の分子進化を予測することができる。IDCは最も初期の癌クローンを維持し、第一変異をもつ。が、それ以上の進化はみつからない。一方ILCは、同じ第一変異をもつが、その変異部位を含む染色体領域を欠失する。その際、変異型アレルと野生型アレルは、ランダムに欠失するため、2種類の細胞クローンが生じる。半分は変異のない欠失クローンとなり、その一部がDCIS-2へと進化するとも考えられる。DCIS-2は独自の変異を獲得しその細胞クローンは多様である。その3変異のうち2変異は、癌にみられる典型的な変異で、同じポジションのアミノ酸変異は、変異陽性例の中の6割から9割を占める。これらの変異が第2の場所へ住処を変えるきっかけになったかもしれない。ILCは、IDCのそばではあるが、さらに染色体2カ所の欠失および遺伝子変異を起こす。これらの3つの癌の起源は1つであるとも考えられ、多様な変異により多様ながん細胞クローンを生み出していると思われる。IDCとILCの分岐点で、ILCとDCIS-2の分岐点で、それぞれに特異的な変異がこれらの進化を決めている可能性がある。今後、これらの変異を検証するとともに、他のDCIS部位、散在するATについてもこれらの変異についてqPCR系を構築し検討する。多様な組織像がみられたこの症例について、前癌病変から癌への進化を明確にすることができると思われる。

(4) 口腔内扁平上皮癌と異形成病変⁶⁾

浸潤度分類が異なる癌組織像が混在する舌扁平上

皮癌症例について、YK-2癌、YK-3癌、DP異形成病変、NE健常上皮、C健常結合組織の5検体DNAを対象に、409がん関連遺伝子のアンプリコンを平均440回(323-565回)の深さで読んだ。Cを対象としてペア解析し、2つの癌とDP、NEの変異を比較した。合計178個のSNV/INDEL/MNVと15箇所のCNVが見いだされた。100回以上読んで変異頻度10%以上のもので、かつCでは変異0であった遺伝子は、9個となった。DPに1個、YK-2癌部に5個、YK-3癌部にも5個の変異を見つけた。癌部2領域に共通の変異は2個見つかった。コピー数変化CNVもYK-2癌部に9領域、YK-3癌部に8領域見つかり、そのうち2領域は共通であった。YK-2では欠失が7領域と多く、YK-3では増幅が5領域と多かった。

これらの変異から各部位の細胞クローンの分子進化を予測することができる。今回のDPはYK-3に隣接するが、独自の変異をもち、癌部と共通する変異はなかった。他の部位のDPを検討する必要がある。1.5 cmしか離れていない2つの癌部でも、単一クローン性と他クローン性の両者をもち合わせていた。2つの共通変異も、中心部のYK-2では0.64と0.37の頻度であるのに対し、舌先端に近い部位のYK-3では0.41と0.28の頻度となっていた。独自の変異3つについては、それぞれ、YK-2では0.38, 0.30, 0.17であるのに対し、YK-3では0.28, 0.21, 0.15であった。変異の頻度の高い順から、変異が蓄積されていったと考えると、中央部YK-2の近くに、共通変異2つと共通領域の増幅と欠失をもつ細胞が起源となり、YK-2とYK-3が進化して生じたと思われる。途中で獲得する変異が異なり、同時期に別の遺伝子変異を生じて進化していったと考えられる。それら独自の変異の中には、浸潤度の違いを説明できる遺伝子変異があるかもしれない。今後、これらの変異を検証すると同時に、YK-4C癌部や他の部位の癌部、DPも検討すれば、同一症例内の癌および前癌病変について、分子進化を明らかにすることができる。

(5) 生検原発腫瘍と剖検時の多臓器転移腫瘍⁷⁾

多臓器に転移を示した肺小細胞癌症例について、2つの原発癌組織と6カ所の転移癌組織、そして健常腎組織からDNAを抽出した。qPCR値は、生検原発腫瘍が0.08に対し、剖検転移腫瘍は、0.001-0.02

と著しく低下していた。それでも、生検原発腫瘍に加え肝転移腫瘍、健常腎組織からのDNAでアンブリコンシーケンスをすることができた。qPCRにて検証した結果、検出された変異候補には擬陽性もあったが、全ての癌組織で *TP53* の点突然変異を認めた。しかもヘテロ接合型よりホモ接合型の異変がメジャーとなっていた。更に *KIT*, *PDGFRA*, *KDR*, *FLT3* の4遺伝子に mono-allelic loss を認めた。また、これらの4遺伝子5領域に bi-allelic loss を認め、その頻度と組み合わせは癌組織により異なっていた。なお *PDGFRA* 遺伝子内では2カ所のSNPで個別に allelic loss を検出したので、それぞれを *PDGFRA* (c), *PDGFRA* (g) と区別した。以下にその bi-allelic loss パターンを示す。

肺生検：*PDGFRA* (c)

縦隔と肝臓：低頻度で *KIT*+*PDGFRA* (c)

肺門リンパ節：*KIT*+*PDGFRA* (c) +*PDGFRA* (g)

胸骨：*KIT*

腰椎：*KIT*+ *PDGFRA* (c) +*PDGFRA* (g) + *FLT3*

肺剖検時：*KIT*+*PDGFRA* (c) +*PDGFRA* (g)

+*FLT3*+*KDR*

この結果からがんの進化について、以下のように考察できる。肺で発生した原発腫瘍は、4遺伝子5領域の mono-allelic loss と *TP53* 点突然変異をヘテロおよびホモ接合型でもち、一部は *KIT* および *PDGFRA* (c) の bi-allelic loss も起こっていたと思われる。縦隔、肝臓、胸骨には、これら bi-allelic loss 頻度の低い段階で、腫瘍細胞が転移した。その後、原発肺腫瘍を含め、各臓器で独自のクローン選択があり、bi-allelic loss が加わっていた。肺の原発巣では剖検に至るまでに、*PDGFRA* の2領域と *KIT*, *FLT3*, *KDR4* を加えた計5領域に bi-allelic loss をもつ変異が蓄積し、各発生途中段階のクローンが、肺門リンパ節や腰椎に転移したと考えられる。

以上のように、原発腫瘍と転移腫瘍の、多領域での bi-allelic loss パターンを比較することにより、本症例でのがんの進化過程が示唆された。

4. 結 語

FFPE DNA について、評価方法を確立し、次世代シーケンサー解析できる条件を見つけた。これは、

FFPE DNA が PCR を基礎とするあらゆる解析に応用できることを示す。今後、病理検体を用いた遺伝子診断に、大いに利用できる技術を確立したことになる。また、がんの heterogeneity から分子進化を導き出すことも、生検例だけでなく、剖検例からも可能であることを示した。

今回、目的半ばとなっている癌症例については、見いだした変異について qPCR 系を構築し、複数の前癌病変や部位の異なる複数の癌について変異定量することになる。最終的には、検索組織内に分布する多様な病変の分子進化を明らかにし、各癌の形質にかかわる driver mutation を導き出し、今後の診断、治療に役立つ分子を明らかにする。

文献及び学会発表

- 1) Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW: Cancer genome landscapes. *Science* **339**:1546-1558, 2013.
- 2) Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C: Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**:883-892, 2012.
- 3) Einaga N, Yamaguchi H, Yoshida A, Suemitsu M, Noda H, Kawaji Y, Hirofumi Y, Esumi M: Mutation analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 11月, 2014.
- 4) Lamy A, Blanchard F, Le Pessot F, Sesboue R, Di Fiore F, Bossut J, Fiant E, Frebourg T, Sabourin JC: Metastatic colorectal cancer KRAS genotyping in routine practice: results and pitfalls. *Mod Pathol* **24**:1090-1100, 2011.
- 5) Yamaguchi H, Einaga N, Nakayama Y, Esumi M: Liver cancer genomics of Long Evans Cinnamon (LEC) rat. 第74回日本癌学会総会学術集会, 名古屋, 10月, 2015.
- 6) Esumi M, Noda H, Suemitsu M, Kuyama K, Masuda S: Molecular evolution of cancer and cancer-related regions investigated by genomics of microdissected FFPE samples. 第74回日本癌学会総会学術集会, 名古屋, 10月, 2015.
- 7) Yoshida A, Obana Y, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Esumi M: Cancer genomics in multiple metastatic tumors of small cell lung cancer by using microdissected FFPE samples. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 9月, 2014.