

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) NGS パネル検査精度管理用構造変異型リファレンス細胞標準品の開発と整備
(英語) Development and maintenance of structurally variant reference cell standards for accuracy control of the NGS panel tests.

研究開発実施期間: 令和2年7月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 鈴木 孝昌
(英語) Takayoshi Suzuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・室長
(英語) Section chief, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

(和文)

次世代シーケンサー (NGS) を用いるがん遺伝子パネル検査は、がんの個性に応じた分子標的治療へと結びつくがんゲノム医療の切り札として期待されている。一度に大量のがん関連遺伝子の異常を調べることができことからその有用性は高いが、データ解析を含めた試験系の複雑さとマルチプレックス検査がゆえに、その信頼性確保が重要な課題となっている。我々は、複雑な試験系全体の評価には標準品の利用が有用であると考え、臨床検体に近く安定供給可能な培養細胞株を用いて、各種変異の標準品を作成した。点突然変異に対しては、既にこれまでのAMED研究にて、NCC オンコパネル 114 遺伝子(ver4)を網羅する変異標準品を、ゲノム編集株を含めた16細胞株にて完成させた。本研究では、点変異に比べて標準品が不足している構造異常型変異に対する標準品を作成するため、同様の検討を行った。

新たな転座融合遺伝子を人為的に合成するため、ゲノム編集の技術を用いて目的とする標的遺伝子を同時に切断し、わずかに存在すると考えられる両者が再結合した転座融合遺伝子を持つ細胞のクローニングを試みた。目的細胞のクローニングに際しては、転座融合遺伝子配列特異的に設計したPCRプライマーを用い、PCR陽性の細胞群を絞り込むことによって、陽性細胞の選択を行った。まず、クロモソームテリトリーが近接すると考えられる2番染色体と7番染色体に注目し、点変異標準品の作製に用いたガイドRNA(sgRNA)ベクターのうち、2番染色体上のALK、DNMT3A遺伝子及び7番染色体上の/SMO、MET遺伝子を選択し、Cas9発現ベクターと2

種の sgRNA をゲノム編集の容易な HEK293T/17 細胞にトランスフェクション試薬を用いて導入した。転座融合遺伝子特異的な PCR 反応により転座の生成を確認し、陽性な細胞集団から希釈による陽性細胞の濃縮を行い、最終的に目的とする転座を有する細胞のクローニングを行った。その結果、検討した組み合わせのうち、ALK/SMO 転座に関しては転座陽性のクローンが 2 株取得できた。2 番/7 番染色体特異的クロモソームペインティング法により、1 株は目的とする均衡型の転座染色体の生成が確認でき、もう一株についてはより複雑な転座染色体を持つことが確認された。この複雑な転座遺伝子の生成については、その構造から染色体の Breakage-Fusion-Bridge サイクルを経て生成したことが示唆され、ゲノム編集によるクロモソームリプシスの誘発を支持する結果となった。一方、ALK/MET 転座に関しても最終的に転座特異的 PCR 陽性クローンが取得でき、シーケンスレベルで転座融合遺伝子の存在が確認できたが、クロモソームペインティングでは転座染色体の存在が確認できなかった。がん遺伝子パネル検査における標準品として利用することは可能であると考えられるが、その存在様式は今のところ不明である。

ALK/SMO 転座において、クロモソームリプシスの関与を示唆する結果が得られ、ゲノム編集におけるオンターゲット毒性に興味を持たれたことから、ゲノム編集時に誘発される染色体異常誘発性についても検討した。クロモソームリプシスと関与することが知られる小核の誘発についてまず検討を行ったが、導入したベクター自身が小核様の疑似シグナルを示すという事実が判明したことに加え、HEK293T/17 細胞自身が高い自然小核誘発頻度を持つ事から解析を断念し、分裂中期像を用いたクロモソームペインティング法による染色体異常解析を行った。その結果、目的とする転座染色体が約 2% 観察された他、別の染色体との転座、及び標的染色体の切断を含めた染色体異常全体の頻度は約 20% とかなり高かった。この結果は、Cas9 を用いるゲノム編集のオンターゲット毒性の重要性を示唆するものであり、本研究における貴重な副産物となった。今後はこのオンターゲット毒性についてもさらに検討を深めたい。

以上の検討により、既存のゲノム編集用ベクターを用いて転座融合遺伝子が作製できることがわかったため、同様の手法で臨床報告のある有用性の高い転座融合遺伝子のデザイン合成を試みた。臨床報告のある ALK/KIF5B 遺伝子転座に対して、その切断点の情報を元にゲノム編集用 sgRNA をデザインし、Cas9 タンパク質と共に HEK293T/17 細胞に導入することにより、目的とする転座融合遺伝子を人工合成し、転座特異的 PCR を指標にして、転座を有する細胞をクローニングすることに成功した。そして、クロモソームペインティング法にてこの細胞株が目的とする 2 番/10 番染色体転座を持つことを確認した。これにより、臨床上有用な新規転座融合遺伝子に対する標準品作製の手法を確立することができた。

HEK293T/17 細胞では転座融合遺伝子の作製法を確立できたが、この細胞が商業利用に制限がかかるという問題から、より正常に近い核型を持ち商業利用にも制限のかからないヒトリンパ芽球由来 TK6 細胞を用いて転座融合遺伝子の作製を試みた。トランスフェクションの効率の低い浮遊細胞である TK6 細胞での編集効率を高めるため、融合遺伝子の切断点近傍の配列を両腕として持つ転座特異的置換用 Piggy-Back ベクターを用いて、薬剤選択によりわずかに存在すると考えられる ALK/MET 及び ALK/SMO 転座遺伝子を有する細胞の取得を試みたが、選択された細胞に転座融合遺伝子は確認できなかった。これは、目的配列以外への薬剤選択遺伝子の非特異的挿入が原因であると考えられ、転座を持たない細胞が薬剤選択されたためと推察される。そこで、薬剤選択を用いない従来の方法にて直接転座融合遺伝子の作製を試みることにした。

その結果、頻度は低いものの転座特異的 PCR にて目的融合遺伝子が一部の細胞で生成されていることが確認でき、PCR 産物のシーケンス解析により目的融合遺伝子配列が確認できたが、残念ながら研究期間内に細胞のクローニングまでには至らなかった。研究は終了したが、今後も転座細胞のクローニングの試みは継続し、得られた転座細胞クローンに関しては一括して JCRB 細胞バンクに寄託する予定である。

ゲノム編集を用いて新規に標準品を作製する一方で、既存細胞株を利用した転座標準品の作製についても検討を行った。はじめに、NCC オンコパネルに搭載された転座融合遺伝子標準品の作製に関して、COSMIC や CCLE などの公共データベースの変異情報を元に候補となる既存細胞をリストアップした。このうち JCRB 細胞バンク

が所有する細胞株を入手しシーケンス解析を行った。

変異遺伝子の多く見られた HCT-15、HEC-1、Jurkat、Mewo の 4 細胞株 Mixture のホールゲノム解析データを元に MapCaller ソフトウェアにより構造異常の解析をした結果、6 か所の転座切断点が検出された。このうち 2 番染色体上の 2 か所は何れも NCC オンコパネル及び Todai Oncopanel の転座融合標的遺伝子である PDGFRA 遺伝子上にあり、標準品として利用可能なことがわかった。また、12 番染色体上の切断点は NAV3 遺伝子上にあり、この融合相手は Todai Oncopanel の融合対象遺伝子である JAK3 であることがわかった。これら 4 種の細胞株については、HEK293T/17 細胞のような利用制限がないことから、点変異と転座融合遺伝子標準品として有用である。

今回発見された転座融合遺伝子はいずれもデータベース上には登録されていない新規のものであった。一方、候補細胞のうち KATOIII, SBC-5, NCI-H2228 細胞株について、マルチカラー FISH 法を用いた染色体解析を行ったところ、多くの染色体転座が観察できたが、その位置はデータベース上の転座融合遺伝子とは一致しなかった。データベース上にある転座融合遺伝子を持つ同一の JCRB 既存細胞株において、その転座が確認できなかったことより、転座融合遺伝子の生成は細胞オリジン及び培養ロット間差が大きいことが示唆された。即ち、標準品の作製に当たっては、実際に使用する細胞株で直接変異を確認する必要があることがわかった。今後は、JCRB 細胞バンク所有の細胞株に対して網羅的に全ゲノム解析が行われることにより、リファレンス細胞の選択に有益な情報が付加されることを期待する。特に構造異常型変異の検出には、ロングリード型シーケンサーの併用が望まれる。

最後に、本研究を通じて行ってきた標準品作製の経験を踏まえて、ゲノム編集の技術を応用した標準品作製に関する総説*をまとめたが、その中で多様化する新規医薬品や診断薬の評価のために必要となる新しいタイプの標準品を従来の標準品と区別して「次世代型標準品」と呼ぶことを提唱した。新規モダリティの登場により複雑化する医薬品や診断薬の信頼性評価において、そもそも何を標準品とすべきかというデザインから始まり、標準品に求められる品質の設定や、作製法の開発を含めた実際の標準品作製とそれを用いた評価法の確立までを含めた多角的な“次世代型標準品”に関する研究が、今後レギュラトリーサイエンスにおける重要な課題となることが予想され、本研究がその方向性を示す端緒となることを期待したい。

* 鈴木孝昌：次世代型標準品の創出 —ゲノム編集を用いたがん遺伝子パネル検査用標準品の作製—, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 2022:140:1-9.

(英文)

Cancer gene panel tests using next-generation sequencers (NGS) have great potential in cancer genome medicine, which lead to molecular targeted therapy. We considered that using standards would be useful for evaluating the entire complex test system and created standards for various mutations using cultured cell lines that are close to clinical samples and can be stably supplied. We have already completed a mutation standard covering the NCC Oncopanel 114 gene (ver4) by 16 cell lines, including genome-edited cell lines, in a previous AMED study. In this study, we conducted a similar approach to create standards for structurally aberrant mutations, for which standards are lacking compared to point mutations. To artificially synthesize a new fusion gene, we introduced two target sgRNAs and Cas9 vectors into HEK293T/17 cells and tried to clone a cell with the targeted translocations based on the translocation-specific PCR.

We could succeed in obtaining two clones for ALK/SMO fusion genes. One clone showed the targeted reciprocal translocations confirmed by chromosome painting. Another clone showed more complex translocations that can be explained by a Breakage-Fusion-Bridge cycle of chromosomes, supporting the

involvement of chromothripsis by genome editing. Then we examined the induction of chromosomal aberration after genome editing using chromosome painting and obtained a frequency of around 20 %. This result suggests the importance of on-target toxicity of genome editing by Cas9, which is a valuable by-product of this study.

Then we attempted to design and synthesize novel fusion genes that have been clinically reported. For the clinically reported ALK/KIF5B translocation, we designed sgRNAs for ALK/KIF5B translocation and introduced them with Cas9 into HEK293T/17 cells. Using translocation-specific PCR as an indicator, we succeeded in cloning cells with the translocation.

On the other hand, we also examined the use of existing cell lines for the preparation of standards for translocations. Based on the information in databases such as COSMIC and CCLE, we have listed the candidate cell lines for translocation standards. Among them, cell lines available in the JCRB cell bank were obtained and sequenced. The WGS data of four cell line mix (HCT-15, HEC-1, Jurkat, and Mewo) were analyzed by MapCaller, and six translocations were detected. Two of them on chromosome 2 located in PDGFRA, the translocation target gene of NCC Oncopanel and Todai Oncopanel. The breakpoint on chromosome 12 was located in NAV3, and its fusion partner was found to be JAK3, the target gene for Todai Oncopanel. These cell lines are useful as standards for both point mutations and translocations with less restriction for use. Because all of the fusion genes discovered were not registered in the database and, inversely, registered translocations could not be confirmed in the same existing cell line, it suggests that the fusion genes vary between different cell origins, and, therefore, a direct confirmation in the cell lines for use is necessary.

A recent review article* summarized our experience in the preparation of reference standards and proposed the new term "next-generation reference standards" for the new types of reference standards required for the evaluation of increasingly diverse new drugs and diagnostics. Research on next-generation reference standards, including the design of what should be used as standard, as well as their preparation and evaluation, is expected to become an important task in regulatory science, and we hope that this study will provide a starting milestone in that direction.

* T. Suzuki: Creation of next-generation reference materials –Preparation of reference materials for cancer gene panel tests by genome editing–, Bull. Natl. Inst. Health Sci., 140, 1-9(2022)