

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

**I. 基本情報**

事業名： (日本語) 再生医療実用化研究事業  
(英語) **Research Project for Practical Application of Regenerative Medicine**

研究開発課題名： (日本語) 染色体構造異常、造腫瘍性関連遺伝子解析の効率的なパイプラインの構築と、社会実装に向けたゲノム解析標準手法及びゲノム評価基準案の策定に関する研究  
(英語) **Research on establishment of an effective pipeline for analysis on chromosomal abnormality and genes involved in tumorigenesis and on proposal for standard gene analysis technique and criteria for gene mutation evaluation to be used at clinical trial level.**

研究開発担当者 (日本語) 東京医科歯科大学大学院 教授 森尾友宏  
所属 役職 氏名： (英語) **Tomohiro Morio Professor, Tokyo Medical and Dental University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences**

実施期間： 平成 28 年 04 月 01 日 ～ 平成 29 年 03 月 31 日

分担研究 (日本語) 1) iPS 細胞及び iPS 細胞由来増幅・培養加工細胞のゲノム情報収集と蓄積  
2) ゲノム基盤情報の共有、新規技術を用いたデータとの比較と全データの統合  
3) 造腫瘍性関連遺伝子解析の効率的なパイプラインの提言と基準案策定

開発課題名： (英語) 1) **Collection and storage of genome data on iPS cells, expanded iPS cells, and cultured and processed iPS cells**  
2) **Sharing information on the essential genome data, comparison of data obtained from a novel technique used in this project, and integration of all the genome data on iPS cells and iPS-derived cells.**  
3) **Proposal of an effective pipeline for analysis of genes related to tumorigenesis and formulation of the standardized technique for the evaluation**

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科分子生命情報解析学分野  
教授 赤澤智宏

所属 役職 氏名 : (英 語) Chihiro Akazawa, MD, PhD Professor  
Department of Biochemistry and Biophysics,  
Graduate School of Health Care Sciences,  
Tokyo Medical and Dental University

分担研究 (日本語) 1) iPS 細胞及び iPS 細胞由来増幅・培養加工細胞のゲノム情報収集と蓄積  
2) ゲノム基盤情報の共有、新規技術を用いたデータとの比較と全データの統合  
3) 造腫瘍性関連遺伝子解析の効率的なパイプラインの提言と基準案策定

開発課題名 : (英 語) 1) Collection and storage of genome data on iPS cells, expanded iPS cells, and cultured and processed iPS cells  
2) Sharing information on the essential genome data, comparison of data obtained from a novel technique used in this project, and integration of all the genome data on iPS cells and iPS-derived cells.  
3) Proposal of an effective pipeline for analysis of genes related to tumorigenesis and formulation of the standardized technique for the evaluation

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所  
教授 高須直子

所属 役職 氏名 : (英 語) Professor Naoko Takasu,  
Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University

## II. 成果の概要（総括研究報告）

本年度はデジタル染色体解析系の検証と、分子バーコード法/定量造腫瘍関連遺伝子解析系を用いた CiRA から供与される iPS 細胞及び増幅細胞の実検証を課題として研究を行った。

まず、かずさ DNA 研究所からの技術供与を受け、高精度 CNV 解析法に基づく Digital Karyotyping の実験系を立ち上げた。Digital Karyotyping は従来法である G バンド法や array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) と比較して、解像度と検出感度の高さ、微量試料での解析可能性、簡便性等の点において優れているが、一方で、①検出感度の高さから、結果の信頼度にばらつきを認め、且つそれを評価する明確な基準が存在しないこと、また、②転座のような構造異常の検出が困難であることが問題点として挙げられる。当該年度は、①の問題点解決に取り組み、基準確立を目指した。同解析系の信頼度は Genome profile の振幅 (Median Absolute Divergence: MAD) 値に依存するため、MAD 値を減少させる条件検討を試みた。その結果、ライブラリー作成後の試料量・濃度を十分に確保して PCR 増幅を省略することで、有意な MAD 値の減少が見られた。次年度以降は、①の進行状況に伴い、②の問題点解決に向けた解析を試み、また、iPS 細胞及び iPS 細胞由来増幅・培養加工細胞のゲノム情報収集と蓄積を行い、CiRA へのデータ提供を進める。

また iPS 細胞と比較した造腫瘍性関連遺伝子の変化を定量的に解析し、どのデータを収集するために、CiRA によって検証された iPS 細胞及び iPS 細胞由来増幅・培養加工細胞について、技術開発個別課題で開発した技術で解析した。用いた検体は、CiRA からは 1 5 B9x series の 3 検体で passage 13, passage20 の核酸の提供を受けた (計 6 検体)。対象とした遺伝子は COSMIC Cancer Gene Census (以後 COSMIC) + PMDA 柴田 list(以後造腫瘍性遺伝子リスト)であるが、新たにキャプチャーパネルを作成した。パイロット検討では poor quality と low coverage の領域が 1.3% 存在した。その原因の 1 つが類似配列領域や偽遺伝子の存在であり、アラインメントエラー、データ解析上のノイズとなって現れることが明らかになった。

造腫瘍関連遺伝子 (約 6 0 0 遺伝子) の解析はかずさ DNA テクノロジー(KDT 社)に外注する形で短時間で行われた。KDT 社からは生データを供与され、データ解析は東京医科歯科大学で行った。解析においては duplex barcoding が特許化されていることから、single barcoding 法、high fidelity PCR 増幅にて解析を行った。解析の結果、同一バーコードが 3 回以上解析され ( $r \geq 3$ )、NGS エラーを判定可能なものの中で、同一遺伝子が 200 回以上読まれ、少なくとも数個/200 の変異 (2 - 3 % の頻度の変異) は判定できるものが 90% 程度であることが明らかになった。今回は全エクソン解析の 1/3-1/5 程度の負荷で行っているが、全エクソン解析と同程度の read 数で 1% の変異は検出できることが予想される。変異出現に関するデータ解析はまずバーコードが 1 回以上解析されたもの ( $r \geq 1$ ) で行った。B92, B93 では P13→P20 での新たな変異の出現を認めなかった。B94 では 2 遺伝子でそれぞれ intronic, 3'UTR に変異の出現を検出し、ある遺伝子では synonymous 変異の出現を 4.7% の頻度で検出した。  $r \geq 3$  で解析したところ synonymous 変異のみが残る形となった。

定量性の検証はコントロール DNA に 100% 変異を有する iPS 細胞を様々な割合で混じるものをサンプルとして分子バーコード法で検討された。また実際に元検体に戻って PCR アンプリコンを用いて頻度を決定しその値とも比較した。異なるコントロールサンプルに iPS 細胞が 1.5% 混じたものでは、分子バーコーディング法にて検出不能であった。本検討は isogenic iPS 細胞に変異細胞を混じる形で再検証される予定である。

CiRA とは email などの形で、検体や解析状況について定期的に情報共有を行っている。次年度以降に CiRA の全ゲノム、全エクソン、RNASeq データなどと比較を行う予定とした。

We carried out research on this project mainly focusing on evaluation and sophistication of digital karyotyping and examination of iPS cells and expanded iPS cells using molecular barcoding-based quantitative mutation detection analysis on the genes involved in tumorigenesis.

We established the NGS based digital karyotyping system with the basic technique transferred from Kazusa DNA Research Institute (KDRI). Digital karyotyping has several advantages over conventional karyotyping or array comparative genomic hybridization; these include high resolution, high sensitivity, requirement of smaller samples, and simplicity (easy to perform). On the other hand, high resolution may lead to pick-up of false-negative CNV. There exist no standard criteria to evaluate the CNV using the system. In addition the system cannot detect structural abnormality such as chromosomal translocation. This year, we tried to increase specificity of the detection system. We first attempted to decrease “Median Absolute Divergence: MAD) for consistent and accurate measurement. Our study demonstrated that adequate amount of sample after library construction is one of the important elements to improve MAD. We will accumulate more data on iPS cells, expanded iPS cells, and iPS derived cells next year.

We also studied the genes involved in tumorigenesis (tumorigenesis-related genes), a combination of COSMIC Cancer Gene Census listed genes and genes in PMDA Shibata list, by barcode-based NGS-error-reduced technique. CiRA provided us (TMDU) with iPS cells of different passages from three different subclones (15B9x series); and TMDU analyzed total of the six samples. To that end, we re-constructed a new capture panel. In our pilot study, 1.3% of the regions listed in tumorigenesis-related genes was not captured or poorly captured, most probably do to similar sequences in other unrelated genes and the presence of pseudogenes.

Actual analyses for the genes by HiSeq2500 were carried out at Kazusa DNA Technology, which provided us researchers at TMDU all the raw data. In these analyses, single barcoding system with using high fidelity polymerase for amplification was employed simply because double barcoding was patented and not suitable for the outsourcing test. Our data showed that 90% of the tumorigenesis-related genes was satisfactory covered and analyzed this time; the region with the same barcoding read more than twice ( $r \geq 3$ ) and the region with more than 200 different barcodes was read was close to 90% in approximately 600 genes (tumorigenesis-related). This indicates that if read count were increased five-fold, 1% accuracy could be secured. Data analysis with our pipeline were performed for the genes with ( $r \geq 1$ ). There was no increase of new mutation in B92 and B93 series. Mutations in two non-exonic regions were detected in B94; however the call was canceled when focusing on  $r \geq 3$  data. Synonymous mutation was detected in low frequency in one gene. In any event, frequency estimation using the initial barcoded-genes (before capturing) is necessary for precise and reliable quantification.

We also tried to estimate the detection limit with using iPS cells with a known gene mutation mixed in control DNA. Our preliminary data suggested that it would be difficult to detect the presence of mutated gene in 1.5% with read count at this point, but the detection sensitivity can be improved with several techniques. TMDU and CiRA teams contacted frequently through email and are planning to have several meetings to compare the quantitative gene analysis with extensive gene analysis data accumulated in CiRA next year.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

### III. 成果の外部への発表

1. Endo A, Tomizawa D, Aoki Y, Morio T, Mizutani S, Takagi M. EWSR1/ELF5 induces acute myeloid leukemia by inhibiting p53/p21 pathway. *Cancer Sci.* 2016, **107**, 1745-1754.
2. Sato T, Okano T, Tanaka-Kubota M, Kimura S, Miyamoto S, Ono S, Yamashita M, Mitsuiki N, Takagi M, Imai K, Kajiwara M, Ebato T, Ogata S, Oda H, Ohara O, Kanegane H, Morio T. Novel compound heterozygous mutations in a Japanese girl with Janus kinase 3 deficiency. *Pediatr Int.* 2016, **58**, 1076-1080.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 移植医療応用のためのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と品質評価、口頭、高山和雄、秋田尚毅、関口清俊、森尾友宏、小原 収、櫻井文教、水口裕之、**第 16 回日本再生医療学会学術集会**、山形、2017/03/07、国内。
2. ゲノム解析技術を用いた品質・安全性管理の今後の課題、口頭、森尾友宏、**日本環境変異原学会 第 45 回大会**、茨城、2016/11/18、国内

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

#### (4) 特許出願