

平 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) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) クリニカルシーケンスのための実用的なバイオインフォマティクスプログラム
の開発および情報解析に関する研究
(英語) Development of bioinformatics programs for practical use in clinical sequencing, and the information analysis
- 研究開発担当者 (日本語) 国立がん研究センター研究所 バイオインフォマティクス部門
部門長 加藤 護
- 所属 役職 氏名： (英語) National Cancer Center Research Institute, Department of
Bioinformatics, Head, Mamoru Kato
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 臨床シーケンスへの適用、およびアルゴリズムで検出された変異の
ウェット実験確認
- 開発課題名： (英語) Experimental validation of alterations detected by the programs, and
application to clinical sequencing
- 研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野 分野長 河野隆志
- 所属 役職 氏名： (英語) National Cancer Center Research Institute, Division of Genome
Biology, Chief, Takashi Kohno

II. 成果の概要（総括研究報告）

臨床シーケンスとは、患者のがん組織試料を次世代シーケンサーによって配列決定し、検出されたがん変異に対する作用薬の知識と突き合わせて、より適切な治療法の提案や臨床試験のよりよい層別化を行うことである。本研究の目的は、1) 臨床シーケンスで使われる低腫瘍率かつホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）がん組織用の変異検出バイオインフォマティクス・アルゴリズムを開発し、2) 申請者の所属する国立がん研究センターが独自に実施基盤を構築しつつある臨床シーケンスに適用し、3) その結果をもって臨床シーケンスの変異データベースおよび医療情報システムを構築し、4) 情報解析を行って日本人のがん変異に関する特徴を調べることで、である。

平成 26 度における目的は、低腫瘍率かつ FFPE 用の点変異 (SNV/indel)、融合遺伝子、コピー数異常検出のアルゴリズム群を開発する事であり、当初の予定通り、それらを開発し、コンピュータ・プログラムとして実装することに成功した。その後、点変異には質量分析法、融合遺伝子には PCR およびサンガー配列決定、コピー数異常には量的 PCR を用いて、少数のサンプルで検証を行い、我々の開発したツールが、低腫瘍率条件下で Sensitivity、Specificity とともに非常に高い水準にあることを確認した。

平成 27 年度においては、アルゴリズムを実装したプログラムの機能改良・追加、性能評価、そして前年度より規模を拡大した実験的検証を実施した。改良後の点変異検出及びコピー数異常検出のプログラムは、研究用として広く使用されている既存アルゴリズムと比較して高い性能を示し、検証においても高水準の Sensitivity、Specificity を示した。加えて、検出された変異データを臨床情報と統合し、患者情報・集計情報を提示する医療情報システムを開発した。開発された変異検出プログラムは、国立がん研究センター中央病院の患者試料の臨床シーケンスのデータに適用され、FFPE がん組織から抽出したゲノム DNA 80 例のターゲットシーケンスでプログラムが稼働することが確認された。ここで変異の検出された一部の症例について、質量分析法、量的 PCR、FISH、免疫染色などの結果と突合せを行ったところ、遺伝子変異や遺伝子増幅は一致していたが、遺伝子融合については、一部、不一致も認められ、更なる改修が課題として残った。

平成 28 年度においては、開発した変異検出プログラム群の機能、使用性及び移植性を向上させ、臨床シーケンス用変異検出ソフトウェアとして改良を継続した。このソフトウェアは 1) SNV/indel 検出モジュール、2) 融合遺伝子検出モジュール、3) コピー数変異検出モジュール、4) 複雑な既知変異検出モジュールの、4 つのモジュールを含む。機能面での改良としては、昨年度の融合遺伝子検出の問題を解決し、また、実験データを用いたパラメータ最適化を実施した。使用性向上のための改良としては、使用方法を詳述したドキュメント作成とコマンドラインインターフェースの改善を実施した。移植性向上のための改良としては、インストールの簡易化及び実行環境仮想化を実施した。当該年度での臨床シーケンスでは、これまでに開発した 1) 体細胞変異検出プログラム、2) 体細胞変異と胚細胞変異を検出するパイプライン、3) 検出された変異情報と臨床情報とを統合してレポートを出力するプログラムを導入し、品質管理の下、約 120 例の臨床シーケンスを実施した。ここで得られたデータを医療情報システムで集計した結果、ある遺伝子では、欧米人主体の COSMIC データベースとは異なる変異の集積が観察され、これが日本人特有の傾向であることが示唆された

In clinical sequencing, gene alterations in cancer patients are detected from the next-generation sequencing data for identifying appropriate molecularly targeted drugs, by which patients are better treated or stratified put into clinical trials. The objective of this research is as follows: 1) to develop bioinformatics algorithms that detect alterations in FFPE samples with low tumor purities for clinical sequencing; 2) to apply the programs to clinical sequencing for which National Cancer Center (NCC) Japan set up its original system; 3) to develop a medical information database system that can store data on detected alterations and basic clinical information; 4) to perform informatics analysis that investigates the features of Japanese specific alterations.

The objective of 2014 was to develop algorithms that detect SNVs/indels, fusion genes, and copy number alterations (CNAs) in FFPE samples with low tumor purities. As planned, we developed them and implemented them into computer programs. We then validated detected alterations, using mass spectrometry for SNVs/indels, PCR and Sanger sequencing for fusion genes, and quantitative PCR for CNAs. Our programs attained high sensitivities and specificities in small samples, some of which had low tumor purities.

In 2015, we improved the programs and added several functions. We performed validation analysis using more samples. In both sensitivities and specificities, the programs greatly outperformed other programs, which were widely used but originally developed for research purposes. In addition, we developed a medical information database system that combines information on detected variants with clinical information to show the information of each patient and also statistics. The programs for alteration calling were applied to clinical sequencing in NCC Hospital and successfully worked for 80 FFPE samples. The detected alterations of some selected patients were all confirmed by other methods such as mass spectrometry, quantitative PCR, FISH, and IH except some fusion genes, which remained to be improved.

In 2016, we overcame this fusion issue and also optimized the parameters of the programs. We also added the module that detects complex but known alterations. We improved the utility and availability of the programs by preparing documents, improving the user interface, and virtualizing the programs. These alteration-calling programs, a pipeline to detect somatic alterations and germline variants, a reporting program that combines detected alterations with clinical information were applied to clinical sequencing conducted in NCC under quality insurance for 120 clinical samples. We analyzed the data by the medical information database system. The statistics told that some genes with alterations were found specifically in Japanese, differing from those listed in COSMIC, which were originally developed based on European data.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 5 件、国際誌 16 件)

1. Yasushi Totoki, Kenji Tatsuno, Kyle R Covington, Hiroki Ueda, Chad J Creighton, Mamoru Kato, Shingo Tsuji, Lawrence A Donehower, Betty L Slagle, Hiromi Nakamura, Shogo Yamamoto, Eve Shinbrot, Natsuko Hama, Megan Lehmkuhl, Fumie Hosoda, Yasuhito Arai, Kim Walker, Mahmoud Dahdouli, Kengo Gotoh, Genta Nagae, Marie-Claude Gingras, Donna M Muzny, Hidenori Ojima, Kazuaki Shimada, Yutaka Midorikawa, John A Goss, Ronald Cotton, Akimasa Hayashi, Junji Shibahara, Shumpei Ishikawa, Jacfranz Guiteau, Mariko Tanaka, Tomoko Urushidate, Shoko Ohashi, Naoko Okada, Harsha Doddapaneni, Min Wang, Yiming Zhu, Huyen Dinh, Takuji Okusaka, Norihiro Kokudo, Tomoo Kosuge, Tadatoshi Takayama, Masashi Fukayama, Richard A Gibbs, David A Wheeler, Hiroyuki Aburatani & Tatsuhiro Shibata. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nature Genetics*. 2014, 46, 1267-1273.
2. Tatsuji Mizukami, Kouya Shiraishi, Yoko Shimada, Hideaki Ogiwara, Koji Tsuta, Hitoshi Ichikawa, Hiromi Sakamoto, Mamoru Kato, Tatsuhiro Shibata, Takashi Nakano, Takashi Kohno. Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*. 2014. 9, 622-630.
3. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe SI, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clin Cance Res*. 2014, 20(12), 3087- 3093.
4. Saito M, Ishigame T, Tsuta K, Kumamoto K, Imai T, Kohno T. A mouse model of KIF5B-RET fusion-dependent lung tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2014, 35(11), 2452-2456.
5. Saito M, Shiraishi K, Matsumoto K, Schetter AJ, Ogata-Kawata H, Tsuchiya N, Kunitoh H, Nokihara H, Watanabe SI, Tsuta K, Kumamoto K, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC, Kohno T. A Three-microRNA signature predicts responses to platinum-Based doublet chemotherapy in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014, 20(18), 4784-93.
6. 翻訳: 加藤 護. 発がんドライバー変異の同定 by David Tamborero, Abel Gonzalez-Perez and Nuria Lopez-Bigas. *実験医学*. 2014, 32, 213-219.

7. Erina Takai, Yasushi Totoki, Hiromi Nakamura, Chigusa Morizane, Satoshi Nara, Natsuko Hama, Masami Suzuki, Eisaku Furukawa, Mamoru Kato, Hideyuki Hayashi, Takashi Kohno, Hideki Ueno, Kazuaki Shimada, Takuji Okusaka, Hitoshi Nakagama, Tatsuhiro Shibata, and Shinichi Yachida. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Scientific Reports*. 2015, 5, 18425.1-10.
8. Hiromi Nakamura, Yasuhito Arai, Yasushi Totoki, Tomoki Shirota, Asmaa Elzawahry, Mamoru Kato, Natsuko Hama, Fumie Hosoda, Tomoko Urushidate, Shoko Ohashi, Nobuyoshi Hiraoka, Hidenori Ojima, Kazuaki Shimada, Takuji Okusaka, Tomoo Kosuge, Shinichi Miyagawa, Tatsuhiro Shibata. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nature Genetics*, 2015, 47, 1003-1010.
9. Masataka Takenaka, Motonobu Saito, Reika Iwakawa, Nozomu Yanaihara, Misato Saito, Mamoru Kato, Hitoshi Ichikawa, Tatsuhiro Shibata, Jun Yokota, Aikou Okamoto, Takashi Kohno. Profiling of actionable gene alterations in ovarian cancer by targeted deep sequencing. *International Journal of Oncology*. 2015, 46, 2389-2398.
10. Yagishita S, Horinouchi H, Sunami K, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, Yamamoto N, Sumi M, Shiraishi K, Kohno T, Furuta K, Tsuta K, Tamura T, Ohe Y. Impact of KRAS mutation on response and outcome of patients with stage III non-squamous non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2015, 106(10):1402-7.
11. Yagishita S, Horinouchi H, Katsui Taniyama T, Nakamichi S, Kitazono S, Mizugaki H, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, Yamamoto N, Sumi M, Shiraishi K, Kohno T, Furuta K, Tsuta K, Tamura T. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Is Associated With Longer Local Control After Definitive Chemoradiotherapy in Patients With Stage III Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 91(1):140-8, 2015.
12. Yuko Tanabe, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Hiroshi Yoshida, Takashi Kubo, Mamoru Kato, Satoru Iwasa, Atsushi Ochiai, Noboru Yamamoto, Yasuhiro Fujiwara, and Kenji Tamura. Comprehensive screening of target molecules by next-generation sequencing in patients with malignant solid tumors: guiding entry into phase I clinical trials. *Molecular Cancer*. 2016, 15, 73-77.
13. Koichi Ichimura, Shintaro Fukushima, Yasushi Totoki, Yuko Matsushita, Ayaka Otsuka, Arata Tomiyama, Tohru Niwa, Hirokazu Takami, Taishi Nakamura, Tomonari Suzuki, Kohei Fukuoka, Takaaki Yanagisawa, Kazuhiko Mishima, Yoichi Nakazato, Fumie Hosoda, Yoshitaka Narita, Soichiro Shibui, Akihiko Yoshida, Akitake Mukasa, Nobuhito Saito, Toshihiro Kumabe, Masayuki Kanamori, Teiji Tominaga, Keiichi Kobayashi, Saki Shimizu, Motoo Nagane, Toshihiko Iuchi, Masahiro Mizoguchi, Koji Yoshimoto, Kaoru Tamura,

Taketoshi Maehara, Kazuhiko Sugiyama, Mitsutoshi Nakada, Keiichi Sakai, Yonehiro Kanemura, Masahiro Nonaka, Akio Asai, Kiyotaka Yokogami, Hideo Takeshima, Nobutaka Kawahara, Tatsuya Takayama, Masahiro Yao, Mamoru Kato, Hiromi Nakamura, Natsuko Hama, Ryuichi Sakai, Toshikazu Ushijima, Masao Matsutani, Tatsuhiro Shibata, Ryo Nishikawa, The Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium. Recurrent neomorphic mutations of MTOR in central nervous system and testicular germ cell tumors may be targeted for therapy. *Acta Neuropathologica*. 2016, 131, 889–901.

14. Akihiro Fujimoto, Mayuko Furuta, Yasushi Totoki, Tatsuhiko Tsunoda, Mamoru Kato, Yuichi Shiraishi, Hiroko Tanaka, Hiroaki Taniguchi, Yoshiiku Kawakami, Masaki Ueno, Kunihito Gotoh, Shun-ichi Ariizumi, Christopher P Wardell, Shinya Hayami, Toru Nakamura, Hiroshi Aikata, Koji Arihiro, Keith A Boroevich, Tetsuo Abe, Kaoru Nakano, Kazuhiro Maejima, Aya Sasaki-Oku, Ayako Ohsawa, Tetsuo Shibuya, Hiromi Nakamura, Natsuko Hama, Fumie Hosoda, Yasuhito Arai, Shoko Ohashi, Tomoko Urushidate, Genta Nagae, Shogo Yamamoto, Hiroki Ueda, Kenji Tatsuno, Hidenori Ojima, Nobuyuki Hiraoka, Takuji Okusaka, Michiaki Kubo, Shigeru Marubashi, Terumasa Yamada, Satoshi Hirano, Masakazu Yamamoto, Hideki Ohdan, Kazuaki Shimada, Osamu Ishikawa, Hiroki Yamaue, Kazuki Chayama, Satoru Miyano, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiro Shibata, and Hidewaki Nakagawa. Whole genome mutational landscape and characterization of non-coding and structural mutations in liver cancer. *Nature Genetics*. 2016, 48, 500-509.
15. Kamata T, Sunami K, Yoshida A, Shiraishi K, Furuta K, Shimada Y, Katai H, Watanabe S, Asamura H, Kohno T, Tsuta K. Frequent BRAF or EGFR Mutations in Ciliated Muconodular Papillary Tumors of the Lung. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016, 11(2), 261-265.
16. Sunami K, Furuta K, Tsuta K, Sasada S, Izumo T, Nakaoku T, Shimada Y, Saito M, Nokihara H, Watanabe S, Ohe Y, Kohno T. Multiplex Diagnosis of Oncogenic Fusion and MET Exon Skipping by Molecular Counting Using Formalin-Fixed Paraffin Embedded Lung Adenocarcinoma Tissues. *Journal of Thoracic Oncology* 2016, 11(2), 203-212.
17. 角南 久仁子, 河野 隆志, 市川 仁. がん診療における治療選択のためのクリニカルシーケンシング～院内遺伝子検査ラボにおける Laboratory Developing Test 運用について～. *病理と臨床*. 34, 2016.
18. 加藤 護. バイオインフォマティクス解析によるがんバイオマーカー探索の現状と今後の展望. *Pharma Medica*. 2016, 34, 45-51.
19. 加藤 護. 最新がん個別化医療—臨床シーケンスのバイオインフォマティクス. *癌と化学療法*. 2016, 43 (4), 391-397.

20. Hideyuki Hayashi, Takashi Kohno, Hideki Ueno, Nobuyoshi Hiraoka, Shunsuke Kondo, Motonobu Saito, Yoko Shimada, Hitoshi Ichikawa, Mamoru Kato, Tatsuhiro Shibata, Chigusa Morizane, Yasunari Sakamoto, Kazuaki Shimada, Yoshito Komatsu, Naoya Sakamoto, and Takuji Okusaka. Utility of Assessing the Number of Mutated KRAS, CDKN2A, TP53, and SMAD4 Genes Using a Targeted Deep Sequencing Assay as a Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2017, 46, 335-340.
21. 河野隆志、角南久仁子：がんのゲノム医療 -進行がんの治療選択のためのクリニカルシーケンシング- *Medical Science Digest* (2017-2月号), 2017.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. A bioinformatics system developed for cancer clinical sequencing in National Cancer Center, Japan, 口頭 (招待講演), 加藤 護, European Society for Medical Oncology, Madrid, Spain, September 26-30, 2014, 国外.
2. Development of a computational system in cancer clinical sequencing, 口頭 (招待講演), 加藤 護, 2014 Cancer Symposium, Mokpo, Korea, April 15-19, 2014, 国外.
3. A bioinformatics system developed for clinical sequencing in National Cancer Center, Japan (Symposia), 口頭, 加藤 護, 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, September 25-27, 2014, 国内.
4. Lung invasive mucinous adenocarcinoma(IMA)における治療標的となる新規遺伝子融合, 中奥敬史, 蔦幸治, 渡邊俊一, 軒原浩, 金永学, 三嶋理晃, 横田淳, 河野隆志, 第 55 回日本肺癌学会学術総会, 京都, 第 55 回日本肺癌学会学術総会抄録集, P116, 2014/11, 国内.
5. Bioinformatics in Cancer Clinical Sequencing, 口頭 (招待講演), Kato M, The 53rd Annual Meeting of Japan Society of Clinical Oncology, Kyoto, Japan, October 29-31, 2015, 国内.
6. Bioinformatics for cancer personalized medicine, Kato M, Kato Memorial Foundation Session in BioJapan 2015, Yokohama, Japan, October 15, 2015, 国内.
7. Informatics for cancer clinical sequencing in National Cancer Center, Japan, Kato M, 74rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, Japan, October 8-10, 2015, 国内.
8. Bioinformatics for clinical sequencing and single-cell sequencing, Kato M, Mathematics in Cancer Genome Analysis, Mathematical Cooperation Program 2015, Tokyo, Japan,

September 30, 2015, 国内.

9. Cancer omics analysis and clinical sequencing, Kato M, CREST International Symposium on Big Data Application, Tokyo, Japan, March 4-5, 2016, 国内.
10. Adolescent and young adult (AYA) oncology: current management and future collaborative approaches, 河野隆志. 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
11. ゲノム情報に基づいた進行がんの個別化治療, 河野隆志, 日本オミックス医療学会シンポジウム, 2016/9/23, 国内.
12. 次世代シーケンサーゲノム検査システム用がん遺伝子パネルの開発と評価, ポスター, 久保崇, 吉田 裕, 三谷 幸代, 篠原 静佳, 荒川 えりか, 加藤 護, 河野 隆志, 市川 仁. 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, 2016, 国内.
13. In-house Clinical Sequencing with Quality Assurance in Academic Institution, Kuniko Sunami, Hitoshi Ichikawa, Mamoru Kato, Takashi Kubo, Takashi Kohno, Atsushi Ochiai, 口頭, 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, 2016, 国内.
14. Biomarker exploration by cancer big-data analysis and clinical sequencing, Mamoru Kato, CREST International Symposium on Big Data Application, Tokyo, Japan, January 11-12, 2017, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 市民公開講座「基礎研究からプレジジョンメディシンへ：現状と未来」, 河野隆志, 第 28 回日本癌学, 2016/10/8, 国内.

(4) 特許出願