

## 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－

鈴木孝昌<sup>#</sup>

### Creation of next-generation reference materials －Preparation of reference materials for cancer gene panel tests by genome editing－

Takayoshi Suzuki<sup>#</sup>

Reference materials for the evaluation of next-generation medicines, which are increasingly complex and important, are defined as next-generation reference materials (NGRM). Developments of cell standards for the cancer gene panel test (NCC OncoPanel) are introduced as an example of such NGRM. By using existing cell lines based on mutation information in public databases (COSMIC and CCLE) and creating new mutant cell lines by genome editing, we have developed a NGRM which comprehensively covers the cancer gene panel. For the creation of standards by genome editing with CRISPR/Cas9, we introduced the point mutations by the replacement of mutated oligo and created translocated fusion genes by simultaneous cleavage of target genes. The development and maintenance of NGRM will again be highlighted as one of the important roles of the National Institute of Health Sciences in regulatory science.

Keywords: reference material, genome editing, mutation, translocation, next-generation sequencer

#### 1. はじめに

かつて国立医薬品食品衛生研究所、特に国立衛生試験所時代は局方等に関連する各種標準品の整備と配布が重要な業務となっていた。しかし、時代の流れと研究的業務への移行もあり、その役割は医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団（旧日本公定書協会）等の外部機関に移譲されてきた。

この背景には、かつての標準品は単一の化学物質であったり、その作製には特殊な技術が必要でなかったという標準品の単純性があったと考えられるが、遺伝子・細胞治療医薬品、核酸医薬、分子標的薬などのいわゆる次世代型の医薬品の登場に伴い、必要とされる標準品はより複雑なものとなっており、そもそも何を標準品とするかというデザインの部分からより高度な専門知識が必

要とされている。

私が関与する体外診断薬の分野においても、コンパニオン診断薬やがん遺伝子パネル検査等の分子診断薬の登場により、最新技術を応用した試験法の多様化と複雑化が起きている。それに伴い、それらの信頼性評価が重要な課題となっているが、そこで必須なツールとなる標準品の役割が増している。こうした標準品を次世代型医薬品のための標準品という観点から、“次世代型標準品”と呼ぶことにしたい。

規格やデザイン及び製法を含めた次世代型標準品の複雑性は、従来型の標準品とは全く異なる性質を持ち、研究的な要素を含んでいる。レギュラトリーサイエンスにおける重要な課題の一つとして位置づけ、標準品に対する当研究所の果たす役割が再び重要になっているとの認識のもと、本研究を行ってきた。

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Takayoshi Suzuki; Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa, 210-9501, Japan; Tel: +81-44-270-6538; Fax: +81-44-270-6539; E-mail: suzuki@nihs.go.jp

#### 2. 背景<sup>1-4)</sup>

##### 2.1 分子標的薬とコンパニオン診断薬

医薬品はすべての人に同等に作用するわけではない。もともと意識はされていたことではあるが、分子標的薬の登場とともにそれが鮮明となり、いわゆる個別化医療

の促進へとつながっている。骨髄性白血病の特効薬としてのイマチニブ（商品名グリベック）の開発は、がん治療における新たな治療標的の重要性をクローズアップし、以降分子標的薬の開発が一般化した。これに伴い、ターゲットとなる分子標的の有無が、その医薬品の有効性や安全性を規定する重要な要素となる。よってその診断が対象となる医薬品の投与に不可欠になるという必然的な流れから、いわゆるコンパニオン診断薬が登場した。そして日米の規制において、コンパニオン診断薬が対象となる医薬品との同時承認を原則とすることになったことから、診断薬の重要性が一気に高まった。（コンパニオン診断薬に関する詳細はほかの総説を参照ください<sup>4)</sup>）

### 2.2 がん遺伝子パネル検査

次世代シーケンサー（NGS）の導入により、がん関連遺伝子の変異に関する情報が爆発的に蓄積し、がんの個性に関する遺伝子レベルでの理解が進んだ。同時に、NGSによる遺伝子解析に関するスループットが高まったことから、個々の遺伝子の異常を網羅的に解析できる、いわゆるがん遺伝子パネル検査が登場した。従来型の特定の遺伝子異常に対する検査と比較して、マルチマーカー検査であるパネル診断における信頼性の確保は難しく、さらに病理検体からの核酸試料調製からNGS用のライブラリー調製、診断機器としてのNGSの性能、解析ソフトウェアのアルゴリズム等一連の複雑な各ステップのバリデーションは困難となる。この問題を解決するための最も効率的な手法は、適切な標準品を用いた工程全体のバリデーションと考えられる。

### 3. がん遺伝子パネル検査用標準品の作製

#### 3.1 がん遺伝子パネル検査用標準品の要件とその開発戦略

がん遺伝子パネル検査用の標準品としては、なるべく臨床材料に近いものが望ましいという観点から、病理組織サンプルの利用が理想ではあるが、必要量と安定供給といった問題点がある。そこで我々は、安定供給可能で品質管理のしやすい培養細胞株に着目し、目的がん遺伝子の変異を有する細胞株の利用を検討した。複数の細胞株を混合することにより、より網羅的な標準品の作製が可能であり、細胞数の調整により変異頻度に関して定量的な標準品を作製することも可能となる。当時国産初のがん遺伝子パネルとして、NCCオンコパネルの実用化が進んでいたため、ここに搭載された90遺伝子（ver2）を対象とした。

COSMIC及びCCLEといった公共データベースより取得した変異情報を元にJCRB細胞バンク登録細胞株に関するスクリーニングを行い、既存の細胞株でカバーできる遺伝子を検索した。その結果、大半の遺伝子がカバーできることが分かったものの、一部の遺伝子に関しては変異の存在する細胞株がなく、人為的に作製する必要があることが分かった。そこで、頻度が高く臨床的に重要そうな遺伝子を含めて、既存細胞で変異を賅えない遺伝子に対して、ゲノム編集の技術を用いて目的変異を導入した細胞株を作製することを計画し、最終的にNCCオンコパネル搭載遺伝子のすべてを網羅できる変異の標準品としての細胞株Mixtureを作製することを計画した（図1）。ここでは、ゲノム編集による変異の導入を中心

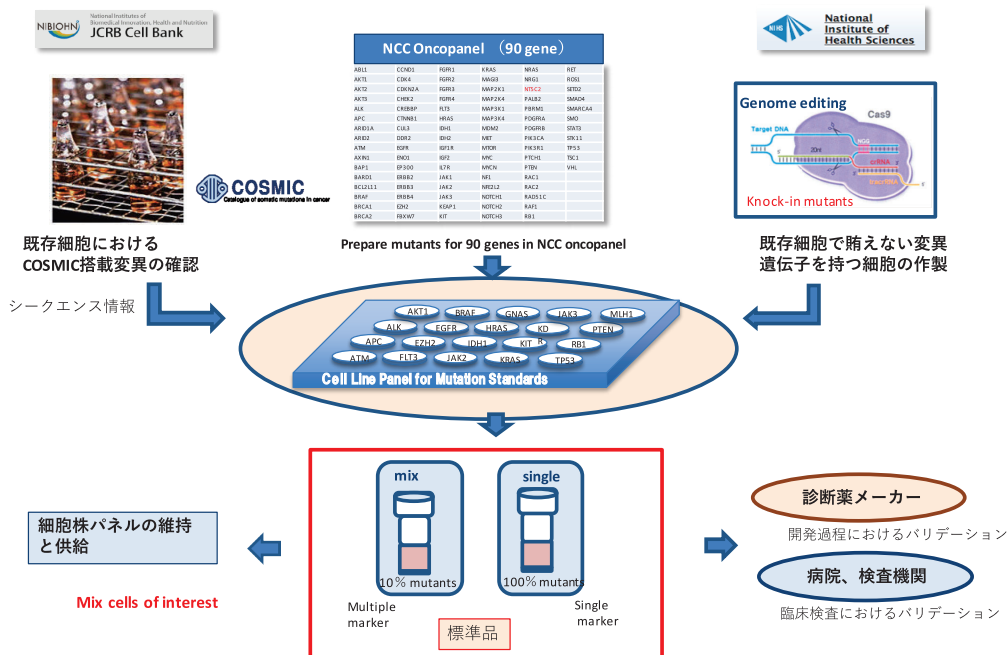


図1 がん遺伝子パネルに対する標準変異細胞株パネルの作製の戦略

に解説する。

### 3.2 NCCオンコパネル用点変異標準品の作製

NCCオンコパネル用標準品の作製に向け、表1に示した遺伝子とその代表的変異に対してゲノム編集用の single guide RNA (sgRNA) と置換用オリゴDNAをデザインした。ゲノム編集としては、標準的なCRISPR/Cas9法を用い、各sgRNAとCas9タンパクの発現プラスミド (Prngen\_U6\_SG, Prngen-Cas9-CMV)) を変異オリゴDNAと一緒にHEK293T/17細胞にTransIT-X2試薬を用いてトランスフェクションした。標準品としてはなるべく正常に近い細胞株の利用が望まれたが、トランスフェクション及び組み換え効率が低いという問題から、ゲノム編集のしやすいHEK293T/17細胞株を選択した。sgRNAの有効性に関しては、T7E1アッセイを用いて目的箇所が切断されることを確認した後、変異導入細胞の選択を行った。変異導入の確認は、遺伝子当たり約150クローンをサンガー法にてダイレクトシークエンスすることにより行った。

幸いHEK293T/17細胞では、変異導入効率が数パーセント程度と比較的高かったことから、一部の遺伝子(3/34)を除くすべての遺伝子に関して、目的とする変異導入クローンを得ることができた(表1)。

HEK293T/17細胞は近3倍体であり、通常3本の相同染色体を持つためホモ変異体に関しては3アレルが置換する必要があるが、ホモ変異体も一部の遺伝子に関して得られている。また、ゲノム編集の性質として、切断箇所の欠失変異が起きやすいため、点変異と併せて、1塩基から100塩基を超える大きな欠失変異も同時に得られており、欠失変異用の標準品としての利用も可能となっている。なお、サンガー法による欠失変異の確認は非常に波形が複雑となり困難を極めたため(一例を図2に示す)、利用に際してはNGSを用いた欠失箇所の確認が必要であることを申し添える。

こうして、ゲノム編集による変異導入細胞の構築に成功し、既存の細胞株に変異が存在しない遺伝子(IDH2, NRAS, MDM2, IGF2, MYCN)をゲノム編集株にてカバーすることにより、最終的に表2に示す27細胞株(うちゲノム編集株4株)にて90遺伝子の点変異をカバーする標準品を作製した。

NCCオンコパネルの90遺伝子を網羅する点変異標準品が完成したが、この時既にNCCオンコパネルは「OncoGuide™ NCCオンコパネルシステム(シスメックス社)」として承認を取得するとともに、搭載遺伝子は114遺伝子に増えていた。そこで、追加された24遺伝子に関しての対応が迫られたが、データベースの見直しと既存細胞株の追加により逆に必要細胞数を減らすこと

Table 1 HEK293T/17 cell lines with targeted mutations introduced by genome editing

Gene	JCRB Cell Name	Mutation*	COSMIC ID	Mutation Status
AKT1	293T-AKT1-1	42-3delTG	-	Homo
	293T-AKT1-2	49G>A+55insT&49G>A	33765	Hetero
AKT3	293T-AKT3-1	232C>A+del231-8+226delG&235T>A	242802	Hetero
	293T-AKT3-2	232C>A	242892	Hetero
ALK	293T-ALK-1	3824G>A	28056	Homo
	293T-ALK-2	3824G>A	28056	Hetero
BAP1	293T-BAP1-1	178C>T	110721	Hetero
	293T-BAP1-2	178C>T&160-173duplicate	110721	Hetero
BIM	293T-BIM-1	585G>C+5940insT	389356	Homo
	293T-BIM-2	585G>C	389356	Hetero
BRAF	293T-BRAF-1	1817G>A	1137	Hetero
	293T-BRAF-2	1817G>A	1137	Hetero
	293T-BRAF-3	1817G>A+1820delC&1817G>A	1137	Hetero
	293T-BRAF-4	1817G>A+1811insG	1137	Hetero
	293T-BRAF-5	1817G>A(COSM1137)Homo	1137	Homo
CDKN2A	293T-CDKN2A-1	238C>T	12475	Hetero
	293T-CDKN2A-2	238C>T	12475	Homo
CTNNB1	293T-CTNNB1-1	121A>G+del116-9&112G>A+del114-9	5664	Homo
	293T-CTNNB1-2	121A>G	5664	Homo
DNMT3A	293T-DNMT3A-1	2643insC	-	Homo
	293T-DNMT3A-2	2645G>A	52944	Hetero
ERBB3	293T-ERBB3-1	306insC	-	Homo
	293T-ERBB3-2	310G>A	20710	Hetero
EZH2	293T-EZH2-1	1937A>T+1821T>C	37028	Homo
	293T-EZH2-2	1937A>T	37028	Homo
FBXW7	293T-FBXW7-1	1518insT	-	Homo
	293T-FBXW7-2	1518insT+1518insCA	-	Hetero
FGFR3	293T-FGFR3-1	752insA	-	Homo
	293T-FGFR3-2	746C>G	715	Hetero
HRAS	293T-HRAS-1	183G>T	502	Homo
	293T-HRAS-2	183G>T	502	Hetero
IDH2	293T-IDH2-1	515G>A+512G>A(COSM86960)	33733	Hetero
	293T-IDH2-2	515G>A	33733	Hetero
IGF2	293T-IGF2-1	293C>T&del276-289+294-5insCA+270-283del(14bp)	1561457	Hetero
	293T-IGF2-2	293C>T	1561457	Hetero
JAK2	293T-JAK2-1	1849G>T	12600	Homo
	293T-JAK2-2	1849G>T	12600	Hetero
KIT	293T-KIT-1	2447A>T	1314	Homo
	293T-KIT-2	2447A>T	1314	Hetero
KNSTRN	293T-KNSTRN-1	71C>T	140056	Homo
	293T-KNSTRN-2	71C>T+del67-9	140056	Homo
KRAS	293T-KRAS-1	32insC(Homo)&35G>A+del30-8	521	Hetero
	293T-KRAS-2	35G>A+33delT	521	Hetero
	293T-KRAS-3	35G>A	521	Hetero
	293T-KRAS-4	35G>A&30-33AGCT>CGTA+32insC	521	Hetero
	293T-KRAS-5	35G>A&del20-34(15bp)+32insC+32insC	521	Hetero
MAGOH	293T-MAGOH-1	410T>C	535605	Hetero
	293T-MAGOH-2	410T>C&407delT	535605	Hetero
MAP2K1	293T-MAP2K1-1	370C>T&376insA+358-377duplicate	235614	Hetero
	293T-MAP2K1-2	376insA	-	Homo
MAPK1	293T-MAPK1-1	960insG	-	Homo
	293T-MAPK1-2	del962-8(7bp)+del962-9&4bp(12bp)+del926-69&69bp(113bp)	-	Hetero
MDM2	293T-MDM2-1	995insG	-	Homo
	293T-MDM2-2	994C>T	431747	Hetero
MET	293T-MET-1	3029C>T	707	Hetero
	293T-MET-2	3029C>T	707	Homo
MTOR	293T-MTOR-1	6644C>A	20417	Hetero
	293T-MTOR-2	6644C>A	-	Homo
MYCN	293T-MYCN-1	1132G>A	229914	Homo
	293T-MYCN-2	1132G>A+1126delG	229914	Hetero
NOTCH1	293T-NOTCH1-1	4799T>C	12771	Hetero
	293T-NOTCH1-2	4797insG	-	Homo
NRAS	293T-NRAS-1	35G>A	564	Homo
	293T-NRAS-2	35G>A	564	Homo
	293T-NRAS-3	34G>T	562	Hetero
	293T-NRAS-4	35G>A+30-1AG>GAAA	564	Hetero
	293T-NRAS-5	35G>A+del30-44(15bp)	564	Hetero
PDGFRA	293T-PDGFRA-1	2525A>T	736	Homo
	293T-PDGFRA-2	2525A>T	736	Hetero
PIK3CA	293T-PIK3CA-1	3140A>G+3143insA	775	Hetero
	293T-PIK3CA-2	3144T>G	27157	Homo
	293T-PIK3CA-3	3140A>G+del3131-42(12bp)	775	Hetero
	293T-PIK3CA-4	3140A>G(COSM775)Hetero	775	Hetero
	293T-PIK3CA-5	3140A>G+del3102-47(46bp)	775	Hetero
PTEN	293T-PTEN-1	63-4 CG>T,C,G(T,C,G(A,G))	-	Hetero
	293T-PTEN-2	697C>T	5154	Hetero
	293T-PTEN-3	697C>T+697insA+697-8CG>TT	5154	Hetero
	293T-PTEN-4	697insGorA	-	Hetero
SMO	293T-SMO-1	697C>T+del 546-672(127bp)&ins535-9(5bp)+del697-715(19bp)+WT	5154	Hetero
	293T-SMO-2	1234C>T	216037	Homo
STAT3	293T-STAT3-1	1921insA	-	Homo
	293T-STAT3-2	1919A>T	1155743	Hetero
TP53	293T-TP53-1	743G>A+746G>A(COSM44091)	44091	Homo
	293T-TP53-2	743G>A	10662	Hetero
	293T-TP53-3	743G>A	10662	Homo
	293T-TP53-4	743G>A	10662	Homo
	293T-TP53-5	743G>A&746delG	10662	Homo

\*&:mutations in the same allele +; other complex mutations

targetted hetero mutation  
targetted homo mutation  
un-targetted COSMIC mutation

Table 2 27 cell lines and their mutations which cover 90 genes on NCC OncoPanel (ver2)

Cell Line	Genes	Gene Name
A3-KAW	2	IL7R MYC
A549	1	STK11
CCK-81	11	BRAF JAK1 BRCA1 SMARCA4 CHEK2 EGFR PIK3CA MAP3K1 FBXW7 ABL1 CTNNB1
CCRF-CEM	5	FGFR3 ALK CCND1 NOTCH2 DDR2
HCT-15-Luc#1	4	RAC1 JAK3 PALB2 KIT
HEC-1	16	AKT2 CUL3 KEAP1 PDGFRB ERBB3 NOTCH1 HRAS ARID1A RAC2 SMAD4 ATM FLT3 KRAS BAP1 NOTCH3 ERBB2
HEL	2	APC JAK2
K562	1	AKT3
KOSC-2_c3-43	3	AKT1 MTOR CDKN2A
KURAMOCHI	2	TP53 AXIN1
LJ-2	3	BCL2L1 ROS1 NFE2L2
LJ99A	3	CREBBP ENO1 EP300
Mewo	9	SMO PDGFRA FGFR1 FGFR2 MET NRG1 RET VHL
no-10	1	RAF1
NUGC-3	4	PBRM1 EZH2 ARID2 CDK4
NY	1	PIK3R1
P30-OHK	2	PTEN NT5C2
SBC-3	2	TSC1 RAD51C
SCC-3	3	FGFR4 MAP2K1 MAP3K4
TGW	2	STAT3 ERBB4
SKM-1	6	BRCA2 RB1 PTCH1 NF1 SETD2 MAP2K4
HL60	7	IDH1 BIRD1 ALK ERBB2 FLT3 NOTCH1 CDKN2A
HEK293T/IDH2	1	IDH2
HEK293T/NRAS	1	NRAS
HEK293T/MDM2	1	MDM2
HEK293T/IGF2	1	IGF2
HEK293T/MYC	1	MYCN

27 cell lines can cover all 90 gene's mutations

Confirmed mutations in JCRB cell lines registered in COSMIC database  
 Created mutations in missing genes by genome editing in HEK293T/17 cell

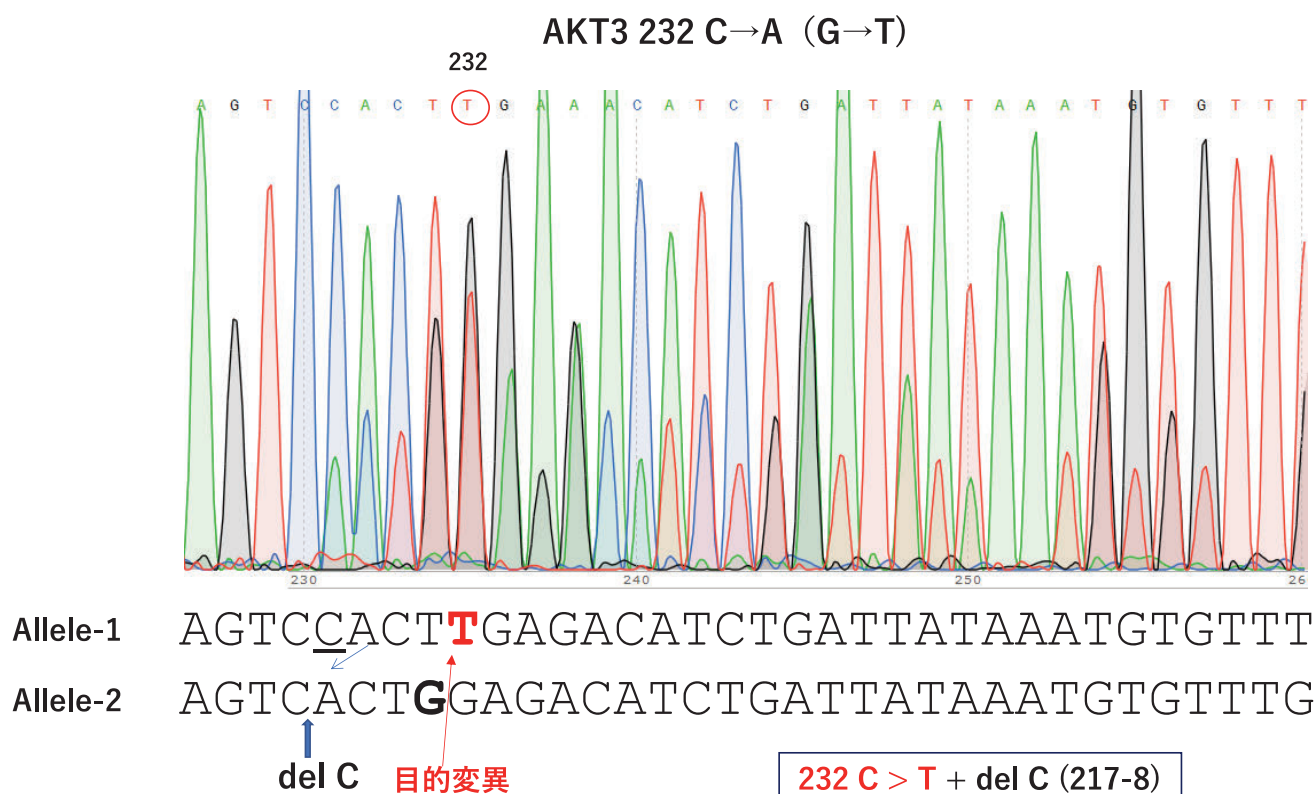


図2 サンガーシーケンスによる変異の確認例

ができ、最終的にゲノム編集2株を含む16細胞株により全114遺伝子を網羅する標準細胞株Mixtureが完成した(表3)。この16細胞株のNGSによるエクソームシーケンス解析により、本標準品はNCCオンコパネルの114遺伝子上の493個の変異をカバーすることが明らかとなった。(2021年2月にさらに10遺伝子が追加されたが、これらについても既存細胞の組み合わせを変えることにより適応可能とする予定である。)

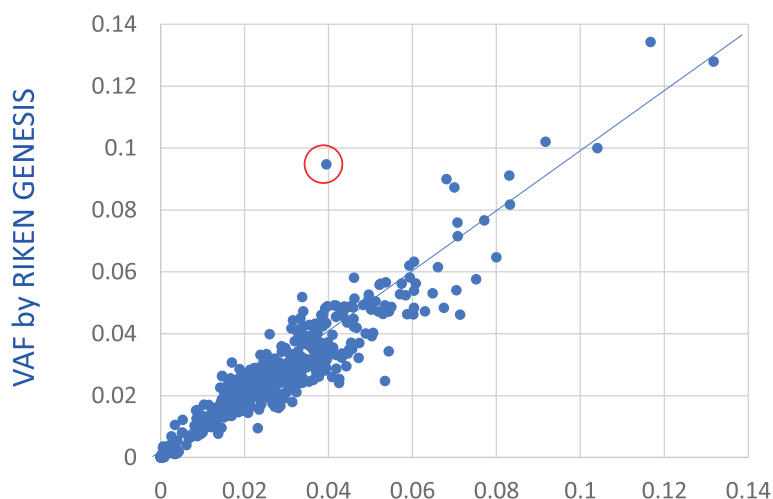
### 3.3 開発した16細胞MixtureのNCCオンコパネルを用いた評価

完成した16標準細胞株Mixtureより調製したゲノムDNAを用いて、実際にNCC OncoPanelを用いて変異検出を評価した結果、114遺伝子すべて(計493変異)について十分なリードが得られ、すべての遺伝子(447変異)について変異の存在が確認された。変異アリル頻度(VAF)の平均値は約3%で、1%~13%の範囲に分布していた。さらに施設間差(機種間差)を見るため同一

Table 3 16 cell lines which cover point mutations in 114 genes on the NCC OncoPanel (ver4)

Cell Line	Genes	Gene Name
<b>A3-KAW</b>	11	ARID1A BAP1 CREBBP FGFR4 IL7R MAP3K4 MSH2 MYC NTRK1 NTRK2 ROS1
<b>CCK-81</b>	23	ABL1 APC BAP1 BRAF BRCA1 BRCA2 CHEK2 CTNNB1 EGFR ERBB2 ERBB4 FBXW7 JAK1 MAP3K1 MTOR NOTCH1 NOTCH2 NOTCH3 PALB2 PDGFRA PIK3CA SMARCA4 TP53
<b>CCRF-CEM</b>	13	ALK ARID1A CCND1 DDR2 EGFR EZH2 FLT3 HRAS IGF1R KRAS NOTCH2 PBRM1 TP53
<b>HCT-15</b>	56	ALK APC ARID1A ARID2 AXIN1 AXL BAP1 BARD1 BRCA1 BRCA2 CHEK2 CREBBP DDR2 ENO1 EP300 ERBB3 ERBB4 EZH2 FBXW7 FGFR1 FGFR2 FGFR3 FGFR4 FLT3 GNAS IDH1 IGF1R JAK2 JAK3 KEAP1 KIT KRAS MAP3K1 MAP3K4 MDM4 MLH1 MYCN NF1 NFE2L2 NOTCH1 NOTCH2 NOTCH3 NTRK1 NTRK2 PDGFRA PIK3CA PIK3R2 POLD1
<b>HEC-1</b>	42	ABL1 AKT2 ARID1A ARID2 ATM AXL BAP1 BRCA2 CD274 CUL3 ERBB2 ERBB3 ERBB4 ERBB4 FLT3 HRAS JAK1 JAK3 KDM6A KEAP1 KRAS MAP2K2 MAP3K1 MDM4 MET NF1 NFE2L2 NOTCH1 NOTCH3 NRG1 PBRM1 PDGFRB PIK3CA PIK3R2 POLD1 POLE PTCH1 RAC2 SETBP1 SMAD4 TP53 TSC1 VHL
<b>HL-60</b>	2	BARD1 NRAS
<b>Jurkat</b>	38	ABL1 ACTN4 ARID1A AXIN1 AXL BRAF BRCA1 BRCA2 CREBBP CRKL DDR2 EP300 ERBB3 ERBB4 FBXW7 FGFR1 FGFR3 GNAS IL7R KEAP1 MDM4 MET MSH2 NOTCH1 NOTCH2 NRG1 NTRK2 PIK3R2 POLE PRKCI PTEN RAD51C RAF1 RHOA SMARCA4 STK11 TP53 TSC1
<b>K562</b>	6	AKT3 NFE2L2 NOTCH1 PDGFRA ROS1 TP53
<b>KMRC-1</b>	7	AXIN1 ERBB3 PBRM1 POLE PTEN SMARCB1 VHL
<b>KON</b>	10	ABL1 GNAQ KEAP1 MDM4 MSH2 NOTCH1 PDGFRB SETBP1 TP53 TSC1
<b>KURAMOCHI</b>	7	ATM BRCA2 GNAS NOTCH1 NTRK3 RAF1 TP53
<b>LK-2</b>	9	APC BCL2L1 CDK4 CDKN2A MAP2K1 NFE2L2 NOTCH1 PDGFRB TP53
<b>Mewo</b>	35	ACTN4 ALK ARID1A ARID2 AXIN1 BRAF EP300 ERBB4 ESR1 FGFR1 FGFR2 FGFR4 GNAS IGF1R KIT MAP3K4 MET MLH1 MTOR NF1 NFE2L2 NOTCH1 NOTCH3 NRG1 NTRK1 PDGFRA PDGFRB POLD1 PTCH1 ROS1 SETBP1 SETD2 SMO TP53 VHL
<b>NUGC-3</b>	14	AKT1 ARAF ARID2 BARD1 CDK4 ERBB3 EZH2 MAP3K1 NOTCH1 PBRM1 PIK3R2 POLE PTCH1 TP53
<b>HEK293/IDH2</b>	2	IDH2 TRS3
<b>HEK293/MDM2</b>	2	MDM2 TP53

● Cells for 4Mix



Variant Allele Frequency by NIHS

図3 変異コール率 (VAF) の施設間比較

サンプルを用いて委託解析を行った結果、当研究室にて保有するMiniSeqと委託先のNextSeq500/550を用いたデータの間には、VAFにおいて非常に良好な一致が見られた(図3)。ここで一部差異の見られたデータ(赤丸)については、その変異部位にGが複数連続する配列(ホモポリマー)が存在し、機種間で近傍のエラーレートに差があったことが原因であることが判明した。

### 3.4 高頻度のVAFを有する標準品の開発

NCCオンコパネルの遺伝子を網羅する点変異標準品

が作製できたが、16個の細胞を混ぜている関係で個々の遺伝子変異についてはそのVAFが数パーセント程度と低いという問題があった。一般的にNGSのエラー率は0.1-1%程度といわれており、この程度のVAFはカットオフ値に近い。変異があることを前提とした感度検査としては有効ではあるが、偽陽性を考慮した判定では検出しづらいという課題もあった。そこで、全遺伝子をカバーすることはあきらめ、ほかのがん遺伝子パネルを含めた汎用性も考慮して、より各変異のVAFの高い標準品のデザインを行った。使用した16細胞株の変異情報を

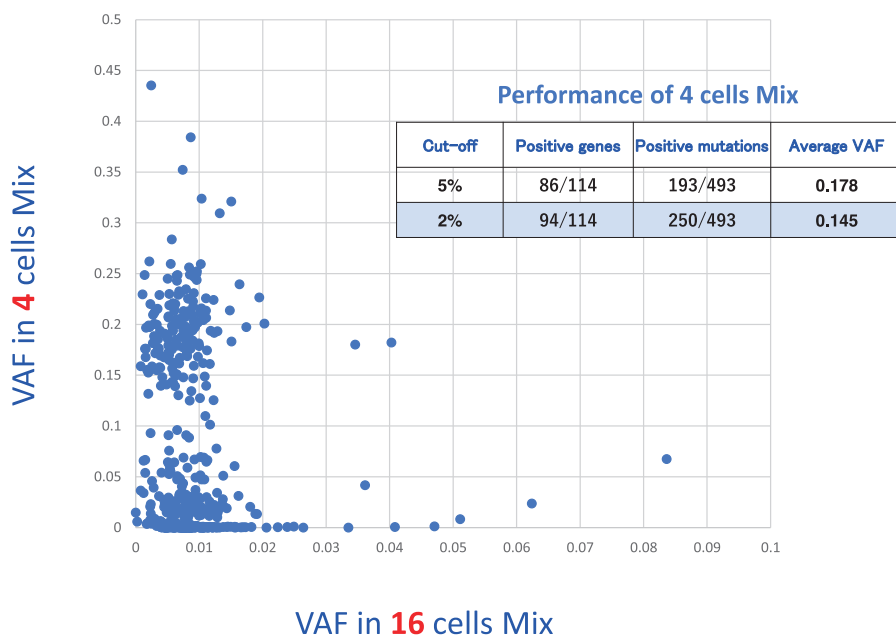


図4 4細胞Mixと16細胞Mixと4細胞MixのVAFの比較

元に、比較的多くの遺伝子変異を含む細胞株を選択した結果、HCT-15, HEC-1, Jurkat, Mewoの4種の細胞株を用いることで、10%以上のVAFを持つ標準品が作製できた。この4細胞MixtureをNCC OncoPanelで検査したところ、カットオフ値2%にて、94の遺伝子の250個の変異が検出され、その平均VAFはが14.5%であった(図4)。この4細胞標準品はNCCオンコパネル以外にも包括的なスタンダードとして使用できる。

### 3.5 点変異標準品と構造異常(転座融合遺伝子)標準品

こうして、点変異については有益な標準品が完成し、JCRB細胞バンクからの供給体制を整えることができたが、NCCオンコパネルに関しては既に承認を取得していたことから、残念ながらそのバリデーションに活用されることはなかった。また、既に点変異に関しては商業的にもある程度の標準品が利用可能であったことから、普及を図ることができなかつた。一方、転座融合遺伝子を代表とする構造型の変異に対しては、世界的に見ても標準品が不足しており、その普及が課題となっていた。そこで我々は転座融合遺伝子をターゲットとして、点変異と同様の戦略で標準品の作製を行った。

### 3.6 既存細胞株における転座融合遺伝子のスクリーニング

COSMIC及びCCLEデータベースの転座遺伝子に関する情報を元に、JCRB細胞バンクの既存細胞株をスクリーニングし、有用と考えられる標準品候補細胞株として、表4に示す12細胞株を選択した。また点変異用に選

択した16細胞株についても、NGSによる全ゲノム解析を行い、転座融合遺伝子の検索を行った。現在NGSデータの解析中であるが、今後はロングリードシーケンサー(MinION)のデータも追加しながら転座型変異標準品として有効な細胞株を絞り込みたい。

一方で、やはり既存の細胞のみでは賅いきれない融合遺伝子も存在することが予想されたため、これらに関しては点変異と同様にゲノム編集にて作製することにした。

### 3.7 ゲノム編集による転座融合遺伝子のカスタム合成

ゲノム編集を使った点変異の導入に関しては、目的箇所を切断後、変異を含むオリゴDNAと置換させることにより合成可能で、技術的にも既に確立されていたが、転座融合遺伝子の作製についてはオリゴDNAが使えず、手法は確立されていなかった。そこで、その手法の開発から着手したわけであるが、ごく単純に転座融合している遺伝子どうしを目的箇所切断すれば、頻度は低いながらもある確率で切断点どうしが繋がった融合遺伝子が取れるはずであると考え、検討を開始した(図5)。点変異用に作製した各種sgRNA発現ベクターが利用可能であったため、それらのうちから、2番染色体上にあるALK, DNMT3A遺伝子と7番染色体上にあるMET, SMO遺伝子をペアに選びこれらの遺伝子間での転座の作製を試みた。2番染色体と7番染色体は間期核において比較的近傍に存在する(クロモソームテリトリー)ことが知られていることと、ALK遺伝子は転座融合遺伝子として有名なため、これらの遺伝子を選択した。

これらの遺伝子に対するsgRNAとCas9発現ベクター

Table 4 List of candidate JCRB cell lines for standrds of translocated fusion genes

Cell Name	Cell ID	Origin	Translocated Fusion Genes						
NCI-H2228-Luc	JCRB1492	Lung	CSGALNACT1-NCBP1	STXBP5L-PTPN3	SEN7-CSGALNACT1	SEN7-CSGALNACT1	SEN7-TNC	DCBLD2-TNC	CPOX-PTPN3
			MAP4K3-NCBP1	ALK-PTPN3	NPL-USP20	STXBP5L-PALM2	DCBLD2-LPAR1	ALK-SHC3	EML4-ALK
KYSE-520	JCRB1439	Oesophagus	CUX1-GINS3	COMMD10-KCNB2	HHLA2-TAF4	TANC1-SYT7	LAMC2-CASP10	UBE2J2-EGFR	KCNB2-KCNMA1
			CABIN1-VSTM2A	NDFIP2-MLLT10	AKT3 -CEP170				
KNS81	IFO50359	Central Nervous	IL34-SLC47A1	LAMC3-LAMA3	GPBP1-GAPDH	ERBB4-PPP1R12A	ASXL2-MSI2	KPNA6-GNG7	RAD18-EML6
KATOIII	JCRB0611	Stomach	PIBF1-ANXA2	DUX4L2-CPXM2	GABRB1-EIF3F	MRPS22-BCAS1	RHOA-BRAT1	E2F5-DLST	KCNB2-RNGTT
			CTNNB1-FGFR2						
HEPG2	JCRB1054	Liver	ESRRG-MYA5						
SBC5	JCRB0819	Lung	STK11-PPP4R1L	NRG1-TAF4B	FIP1L1-GPALPP1	ERBB4-WDR60	C2orf80-SPECC1	FAM168B-SIL1	FAM168B-SIL1
			LRRC53-TDG	AGBL4-DLG2	STK11-KAZN				
JHH-1	JCRB1062	Liver	XPO7-AATF	TMCC1-INTS10	CCDC148-CIC	KPNA6-TNFRSF10A	MECOM-SCN9A	AGO2-STRN3	CNKS2-SIK2
			PAX5-ZSWIM5	TANC1-CRLF1	TMEM241-CATSPER1	PARP12-BRAF			
8305C	JCRB0824	Thyroid	SCFD2-PDGFRA						
THP-1	JCRB0112.1	Hematopoietic	DDX39B-CSNK2A1	ZMPSTE24-ATF1	SNAPC3-KMT2A				
BT-474/CMV-Luc	JCRB1450	Breast	IKZF3-VAPB	STAR3-DOK5	KCNK10-GABRB3	FCSD2-OCA2	NUMA1-OCA2	RNF141-ARL5C	SLC2A8-TSHZ2
			BMP2K-TSHZ2	SLC9A9-TTC28	PLEKHA6-BMP2K	ZC3H11A-CNOT6L	FMOD-SCARB2	NAV1-CXCL13	TOX2-DAB2IP
			TMEM68-POLA2	XKR4-POLA2	NEIL3-CACNB1				
OVSAHO	JCRB1046	Ovary	FDXR-GARNL3	RNF8-GRID1	SNED1-STARD9	STARD9-SNED1	MARK2-TONSL	MGAM-NOL4	HIVEP3-NMT1
			HIVEP3-FMNL1	PRKCE-FBXO24	OSBPL10-SCAMP5	CNOT10-CCDC33	C7orf50-LASP1	MAD1L1-LASP1	BTBD16-ANKS3
			PAN3-FBXO27	SCAMP5-APOL3					
HCC-1937/CMV-Luc	JCRB1508	Breast	ANO10-PROM1	SGK3-RP11-724016.1	FHAD1-HADHB	CTNNA2-KCNK2	NFIA-EHF	DERL1-FKBP5	FKBP5-DERL1
			FBXO38-ATG4C	ATG4C-FBXO38	PROM1-ANO10	RYR2-SLITRK5	ANKRD35-ICOSLG	RYR2-SLITRK5	SDCCAG8-LRRN1
			ODF2-ARNTL2	GUCY1A2-ANXA2	WNT5B-CPEB1	SNX29-ZNF331	ZNF490-GRIA3		

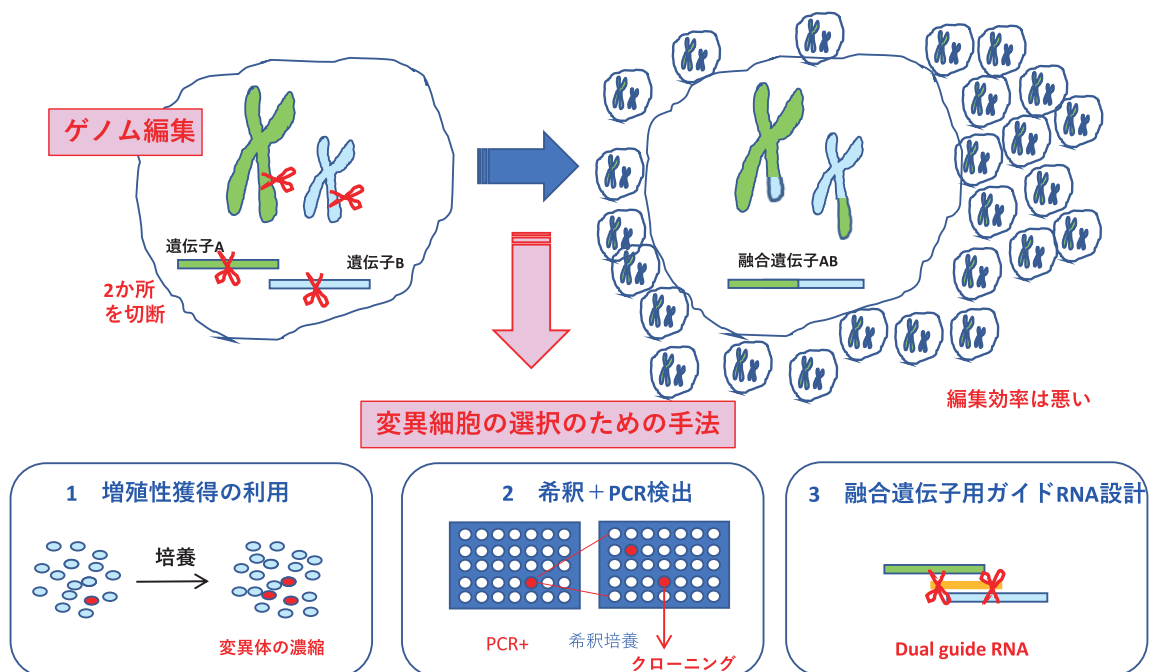
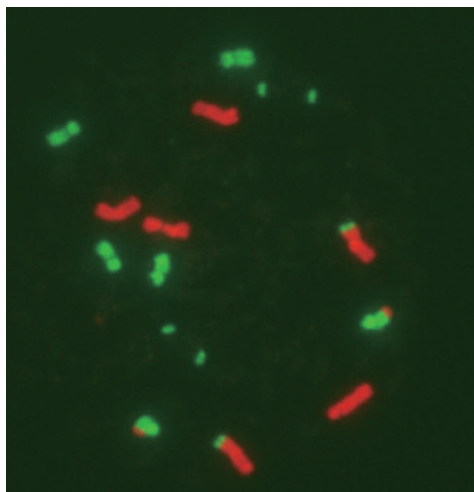


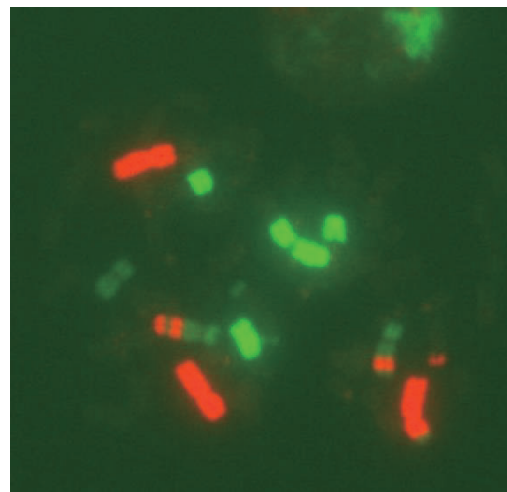
図5 ゲノム編集による構造変異（融合遺伝子）創出の戦略

転座クローン # 1



赤; 2番染色体、緑; 7番染色体

転座クローン # 2



赤; 2番染色体、薄緑; 7番染色体  
緑; 10番染色体

図6 ALK/SMO融合遺伝子を持つHEK293T/17細胞クローンのクロモソームペインティングによる転座染色体の確認

を、トランスフェクション用試薬 (TransIT-293) にて HEK293T/17細胞に導入し、融合遺伝子特異的PCRにて融合遺伝子の存在を確認した。このうち、ALK/MET、ALK/SMOの組み合わせに関して、PCR陽性クローンのクローニングを試みた。細胞集団をフラクショネーションしながら、PCR陽性集団を絞り込んでいき、限界希釈によるシングルセルクローニングを行い目的のクローンの取得を試みたが、最終的にPCR陽性のクローンは得られなかった。編集直後には確かにPCR陽性を示し、細胞数の推定から数パーセント程度目的の融合遺伝子をもつ細胞が存在することが期待でき、2番/7番染色体を染め分けるクロモソームペインティングによる染色体解析においてもそれが裏付けられたため、途中のセレクションステップを排除し、直接シングルセルクローニングを行った。その結果、今度はALK/MET、ALK/SMOの組み合わせともにPCR陽性クローンを得ることができた。またPCR産物のシーケンス解析においても、融合遺伝子配列が確認できた。

そこで、得られたクローンに転座融合遺伝子が存在することを染色体レベルで確認するため、2番/7番染色体特異的プロブを使ったクロモソームペインティング法を行ったところ、ALK/MET融合遺伝子に関しては期待に反して染色体転座が全く見られなかったが、ALK/SMO融合遺伝子に関しては、染色体転座を示すクローンが2種類取得できた (図6)。このうち1種類は目的箇所での均衡型相互転座が観察されたが、もう1クローンについては、さらに複雑な転座が観察された。この結果は、染色体転座の生成メカニズムを探るうえでも重要な手がかりを与える可能性があり、今後の研究の展

開が期待される。また、この結果は“ゲノム編集のオンターゲット毒性”を考える上でも、貴重なデータとなる。

#### 4. 標準品作製の副産物

以上、体外診断薬の標準品の開発という立場からこれまでの研究を紹介させていただいたが、最後に少し別の角度からこれまでの研究を振り返ってみたい。これまで本研究所においては、トキシコゲノミクスやプロテオミクスといったいわゆるオミックス研究にもかかわってきた。その性質として、初めから起承転結の筋道が立っている研究ではなく、とりあえずデータを取ってみて、そこから何らかの真理を導き出すという帰納的な特徴を伴い、研究興味が多岐にわたり脇道に逸れがちな性格に合っていた。本研究も、もともとゲノム編集を使って標準品を作製することが目的であったが、そこにはほかの目的にも利用できる成果が含まれていた。

一つはゲノム編集の安全性、そしてもう一つはPCRプライマーの非特異的増幅 (プライマー部位の変異の影響) の理解につながるデータである。前者はゲノム編集後の細胞の染色体異常解析、後者は転座特異的PCRにおける非特異的増幅産物のシーケンス解析から得られた成果であるが、その公表は別の機会に譲る。

さらには、NGSによるシーケンスエラー要因の検討から生まれたPECC-Seq (Paired-End and Complementary Consensus Sequencing) というエラー低減法は、ショートリードシーケンスにおけるペアエンドと相補鎖由来リードのコンセンサスを取ることでより、シーケンスエラーを $10^{-7}$ 以下に抑えることに成功し、超高感度変異検出法として貴重な副産物となった<sup>6)</sup>。



## 5. 新規がん遺伝子変異の機能解析への応用

ゲノム編集により目的の遺伝子変異を人為的に作製できるという技術は、標準細胞の作成のみならず、その機能解析への応用が期待される。今回同一のHEK293T/17という細胞をバックグラウンドに、特定の遺伝子に特定の変異（転座）を持つ細胞株を樹立したことから、これら細胞株の機能解析を行うことにより、それぞれの変異（転座）の持つ病原性のメカニズムに迫ることができる。また、今後がん遺伝子パネル検査にて新規の変異が見つかった際に課題となる、臨床的な意義付けに対する実験的な検証ツールの開発へとつながることが期待できる。これにより、ドラッグブルな変異が増えることにより、がん遺伝子パネルの有用性をさらに高められる。ひょっとすると、標準品としてよりも、その利用価値は高いかもしれない。

## 6. 今後の次世代型標準品の開発に向けた展望と国立医薬品食品衛生研究所の役割

遺伝子・細胞治療、核酸医薬、分子標的薬等の新規モデルに基づく次世代型の医薬品の開発が進み、それらの品質、有効性の評価がより複雑化している。こうした複雑化する医薬品の評価において、標準品の役割はより重要となることが予想される。そもそも何を標準品とするかというデザインの部分を含めて、レギュラトリーサイエンス研究において重要な課題となっている。今回はがん遺伝子パネル検査を例にその標準品の開発について紹介したが、今後様々な分野において、次世代型標準品の需要が高まると予想される。またその開発に際しては、最新のゲノム科学や細胞生物学、分子生物学的手法、人工知能（AI）などの情報科学といった最新技

術が要求される。こうした標準品を開発、整備する機関として、国立医薬品食品衛生研究所の役割が再び注目されることを期待している。

## 参考文献

- 1) 鈴木孝昌：進む個別化医療への道ーがん治療は変わるのかー現代化学 2020;586 42-47
- 2) 鈴木孝昌：第5章オミクス解析の役割と今後 第3節 診断薬開発における課題と有用性、医薬品開発におけるオミクス解析技術ーゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームー 2020;165-173
- 3) 鈴木孝昌：遺伝子パネル検査によって変わる今後の医療と医薬品開発 PHARM STAGE 2020;20(6):1-6
- 4) 築茂由則, 鈴木孝昌, 井上貴雄：コンパニオン診断薬の現状と今後の展望, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2020;51:638-648
- 5) Suzuki T, Tsukumo Y, Furihata C, Naito M, Kohara A Preparation of the standard cell lines for reference mutations in cancer gene-panels by genome editing in HEK 293 T/17 cells. Genes Environ. 2020;42:8, DOI: 10.1186/s41021-020-0147-2
- 6) You X, Thiruppathi S, Liu W, Cao Y, Naito M, Furihata C, Honma M, Luan Y, Suzuki T. Detection of genome-wide low-frequency mutations with Paired-End and Complementary Consensus Sequencing (PECC-Seq) revealed end-repair-derived artifacts as residual errors. Arch Toxicol. 2020;94:3475-3485, DOI: 10.1007/s00204-020-02832-0