

総説：癌研究

イルミナテクノロジーを使用した研究論文の概要

目次

はじめに	3
リスクの予測	3
検出	4
全ゲノムリシーケンス	6
エクソームシーケンス	8
ターゲットシーケンス	8
予後および治療効果	9
転移	10
抗癌剤開発	11
癌生物学	11
遺伝子融合	13
ゲノム突然変異	14
染色体粉砕 (Chromothripsis)	15
染色体再配列	15
ゲノム異常およびコピー数多型 (CNV)	16
遺伝子発現	17
マイクロRNA (miRNA)	18
エピジェネティクス	19
技術的問題点	20
FFPEサンプル	21
最小単位サンプル	21
培養組織	22
参考文献一覧	23

はじめに

癌はゲノムの異常に起因する疾患であり、極めて大きな個人差があります。ヒトが生まれ持つゲノムはそれぞれ異なり、各個人の癌発症リスクもそれぞれ異なります。そしていったん疾患が引き起こされると、それが引き金となって別のゲノム異常へと瞬く間に発展します。さらに同一腫瘍内で異なる細胞種が混在することや、典型的な臨床検体に腫瘍細胞と正常細胞が混在するという複雑性が加わることを考慮すると、癌の標準的な診断法が明確な表現型および大規模コホートに依存する複雑なものであることは容易に理解することができます。癌研究における真の発展は、これらのゲノム異常を検出し、データを迅速かつ確実に解析することを可能とするツールの存在にかかっています。

次世代シーケンサーは、一塩基対レベルの分解能でのゲノム解析が可能であり、ゲノム異常検出に最適な汎用ゲノム解析ツールとなっています。さらに次世代シーケンサーにより、発現量、スプライスバリエーション、ノンコーディングRNA、DNAメチル化、およびタンパク質と核酸の相互作用も同一装置で測定することが可能です。これらすべての情報を組み合わせることにより、腫瘍の分子生物学を包括的に理解することが初めて実現するのです。

次世代シーケンサーは今や利用しやすく、価格も手頃で強力な手法となっています。これまでに注目を浴びた研究成果が公表されてきていますが、これらの研究成果も、次世代シーケンサー技術の真の可能性のほんの一部を表しているに過ぎません。今後の研究では、さらに大きなコホートにおける解析により、統計学的に信頼性の高い関連解析結果、さらに完全性の高い変異のデータベースが構築されることが期待されます。残された課題は、マーカーの解釈法を確立し、臨床医が患者に対し適切な薬剤を適切なタイミングで処方することを可能にすることです。



癌はゲノムの異常に起因する疾患であり、次世代シーケンサーは癌管理のすべてのステップに影響を与える可能性を秘めています。

参考文献:

- Longo, D. L. (2012) Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N Engl J Med* 366: 956–957
- Weigelt, B., Pusztai L., Ashworth A. and Reis-Filho J. S. (2012) Challenges translating breast cancer gene signatures into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 9: 58-64
- Green, E. D., Guyer M. S. and National Human Genome Research I. (2011) Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature* 470: 204-213
- McDermott, U., Downing J. R. and Stratton M. R. (2011) Genomics and the continuum of cancer care. *N Engl J Med* 364: 340-350
- Stricker, T., Catenacci D. V. and Seiwert T. Y. (2011) Molecular profiling of cancer--the future of personalized cancer medicine: a primer on cancer biology and the tools necessary to bring molecular testing to the clinic. *Seminars in oncology* 38: 173-185

リスクの予測

癌バイオマーカーの発見に関しては、数多くの報告が存在します。次世代シーケンサーの出現により、新たに発見されるバイオマーカーの数は急激な増加傾向を示しています。マーカーおよび癌変異のリストは、癌ゲノムアトラス (TCGA)¹、国際癌ゲノムコンソーシアム (ICGC)² および、癌における体細胞突然変異カタログ (COSMIC)³ などの国際コンソーシアムにより、これまでに類を見ない包括的なデータにまとめられています。

¹ <http://cancergenome.nih.gov/>

² <http://www.icgc.org/>

³ <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

リスクマーカーは、遺伝的要因であり、生殖細胞系に保存されています。生殖細胞系とは、個人が両親から受け継ぎ、さらに子へと伝えていく遺伝物質のことを指しています。一部の癌の要因は受け継がれることがあり、そのような癌は早期発症の特徴を有していることが多くあります。その例として、ある種の乳癌⁴および結腸癌⁵が挙げられます。アレイベースの全ゲノム関連解析 (GWAS) また連鎖解析により、これらのマーカーの存在する領域を効率よく把握することが可能ですが、原因となる遺伝子を見つけるためには一般にはシーケンスが必要です⁶。生殖細胞系マーカーの決定は、個人の生涯において一度だけ実行すればよく、早期スクリーニングの優れた選択肢となります。

予後マーカーは、疾患の進行過程において腫瘍中に発現する体細胞性の変異です。それゆえ患者は新たな変異のスクリーニングのために、治療期間中に数回の検査を受けなければならない場合もあります。さらに、進行癌は不均一であるため、良好な予後のマーカーと不良な予後のマーカーが、同一腫瘍内の異なる部位に存在する可能性も考えられます⁷。治療期間中の再検査は、再発および薬剤耐性の可能性を判断するために特に有用です。ターゲットシーケンスおよび全ゲノムシーケンスには、それぞれ利点と欠点が存在します。

今日までに発見されている数千もの癌変異のうち、日常的臨床診断での利用に成功しているマーカーの数は非常に少ないものです。マーカー検出の技術的および科学的課題に関しては本書において考察していますが、臨床診断用マーカーの開発を成功させるためには、経済的および法的な課題をも克服する必要があることに留意することが必要です。

Brooks, J.D. (2012) Translational genomics: The challenge of developing cancer biomarkers. Genome Res 22: 183-187

この文献で著者らは癌バイオマーカーの課題と将来について考察しています。また多くの癌が致死性に進行するまでには数年、時には数十年も経過しているという、一つの興味深い観察が報告されています。このことは、形質転換した細胞を検出し根絶できる機会が多い可能性を示唆しています。これだけ多くの機会があれば、癌の検出に十分な時間が与えられているように思われますが、これらの癌の転移時における平均サイズは直径が約9mmに達しています。さらに重要なことに、卵巣癌における致死率を50%低下させるためには、腫瘍をその直径が5mmの段階で検出する必要があると推定されています。直径5mmの腫瘍から生じるタンパク質を、体重が60kgの女性の血液量である5L中に希釈された状態で検出することは、現在使用可能なタンパク質検出技術の検出感度をはるかに超えています。その他、技術的ではない因子も影響を与えています。例えば、癌検出手法には、高額な費用のかかる大規模無作為臨床試験を実施して罹患率や死亡率の改善の結果として示すことが必要となります。

検出

癌ゲノム中の体細胞変異の検出法としては、一般的に全ゲノムシーケンス、全エクソームシーケンスおよびターゲットシーケンスの3種類の方法が存在します。各方法の利点および欠点を次ページの表に簡潔にまとめました。全ゲノムシーケンスとエクソームシーケンスの比較において、Chapmanらは、多発性骨髄腫におけるタンパク質コーディングの全変異の半数は転座などの染色体異常を介して発現しており、これらの変異の大部分はエクソームシーケンスのみでは発見されなかったであろうと述べています⁸。長期的観点では、ゲノムに関する知識が発展し膨大なデー

⁴ Antoniou, A., Wang, X., Fredericksen, Z., McGuffog, L., Tarrell, R., et al. (2010) A locus on 19p13 modifies risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers and is associated with hormone receptor-negative breast cancer in the general population. *Nat Genet* 42: 885-892

⁵ Pineda, M., González, S., Lázaro, C., Blanco, I. and Capellá, G. (2010) Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res* 693: 19-31

⁶ Stacey, S. N., Sulem, P., Jonasdottir, A., Masson, G., Gudmundsson, J., et al. (2011) A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat Genet* 43: 1098-1103

⁷ Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366: 883-892

⁸ Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., et al. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471: 467-472

タセットの取り扱いや解釈能力が向上するのに伴い、全ゲノムシーケンスが最適な方法になることは明らかですが、当面はターゲットシーケンスによりすでに市販されている薬剤を、薬剤効果が得られるであろう患者への処方ができます^{9,10}。

方法	利点	欠点	例
全ゲノムシーケンス	<ul style="list-style-type: none"> 全ゲノムの包括的解析 全タイプの変異を検出可能 全患者および全腫瘍タイプに標準化された処理および解析が可能 	<ul style="list-style-type: none"> 高価 膨大なデータセットの解釈が困難 知見が実用不可能な場合もある 	Welch, J. S. et al ¹¹ Bass, A. J. et al ¹² Berger, M. F. et al ¹³
全エクソームシーケンス	<ul style="list-style-type: none"> 高い費用効率でゲノムのわずか1~1.5%のシーケンスを解析 全ゲノムシーケンスの約半分のコスト インデルおよびSNPを検出 	<ul style="list-style-type: none"> データセットが小さく解釈が容易 融合遺伝子および癌遺伝子の見落とし（一部の癌変異の約50%） 知見が実用不可能な場合もある 	Agrawal N. et al ¹⁴ Wei, X. et al ¹⁵ Varela, I. et al ¹⁶ Leidenroth, A. et al ¹⁷ Gerlinger, M. et al ¹⁸
ターゲットシーケンス	<ul style="list-style-type: none"> 高い費用効率 結果の解釈が容易 発見を癌関連遺伝子に実用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 多くの変異の見落とし 対象とする遺伝子に関する予備知識が必要 恩恵を受けるのは少数の患者のみ 	Lipson, D. M. et al ¹⁹ Holbrook, J. D. et al ²⁰ Wesolowska, A. et al ²¹

注:上表では、すべての方法が同等のシーケンスカバレッジを有すると仮定しています。

参考文献:

Roychowdhury, S., Iyer M. K., Robinson D. R., Lonigro R. J., Wu Y. M., et al. (2011) Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. *Sci Transl Med* 3: 111ra121

Lizardi, P. M., Forloni M. and Wajapeyee N. (2011) Genome-wide approaches for cancer gene discovery. *Trends Biotechnol* 29: 558-568

実験デザインに関する注意事項:

腫瘍は、極めて不均一である可能性もあり、進行癌におけるすべてのマーカーに関する知見を得るには、生検を複数回行うことが必要となる場合があります²²。

⁹ Holbrook, J. D., Parker, J. S., Gallagher, K. T., Halsey, W. S., Hughes, A. M., et al. (2011) Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. *J Transl Med* 9: 119

¹⁰ Lipson, D., Capelletti, M., Yelensky, R., Otto, G., Parker, A., et al. (2012) Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*

¹¹ Welch, J. S., Westervelt, P., Ding, L., Larson, D. E., Kicco, J. M., et al. (2011) Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA* 305: 1577-1584

¹² Bass, A. J., Lawrence, M. S., Brace, L. E., Ramos, A. H., Drier, Y., et al. (2011) Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. *Nat Genet* 43: 964-968

¹³ Berger, M. F., Lawrence, M. S., Demichelis, F., Drier, Y., Cibulskis, K., et al. (2011) The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 470: 214-220

¹⁴ Agrawal, N., Frederick, M. J., Pickering, C. R., Bettegowda, C., Chang, K., et al. (2011) Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333: 1154-1157

¹⁵ Wei, X., Walia, V., Lin, J. C., Teer, J. K., Prickett, T. D., et al. (2011) Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 43: 442-446

¹⁶ Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C. K., et al. (2011) Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* 469: 539-542

¹⁷ Leidenroth, A., Sorte, H. S., Gilfillan, G., Ehrlich, M., Lyle, R., et al. (2012) Diagnosis by sequencing: correction of misdiagnosis from FSHD2 to LGMD2A by whole-exome analysis. *Eur J Hum Genet*

¹⁸ Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366: 883-892

¹⁹ Lipson, D., Capelletti, M., Yelensky, R., Otto, G., Parker, A., et al. (2012) Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*

²⁰ Holbrook, J. D., Parker, J. S., Gallagher, K. T., Halsey, W. S., Hughes, A. M., et al. (2011) Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. *J Transl Med* 9: 119

²¹ Wesolowska, A., Dalgaard, M. D., Borst, L., Gautier, L., Bak, M., et al. (2011) Cost-effective multiplexing before capture allows screening of 25 000 clinically relevant SNPs in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 25: 1001-1006

²² Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366: 883-892

いくつかの研究では、新たな変異の発見段階に全ゲノムシーケンスを利用し、その後、第二段階において当該変異の確認および大規模コホートにおける頻度決定を行うために、全エクソームシーケンスまたはターゲットシーケンスを採用しています。

癌体細胞変異は、生殖細胞系の正常なレファレンスゲノムには存在しません。このため、実験ノイズおよび混在する正常細胞のため、新たな体細胞変異を正確に検出することは困難です。新たな体細胞変異を検出するためには、極めてカバレッジの高いシーケンスが必要です。現在一般的に推奨されているカバレッジは、正常ゲノムにおいては最低40倍のカバレッジ、癌ゲノムにおいては80倍です。最適なリードカバレッジは癌の型および必要とされる感度により異なります。

全ゲノムリシーケンス

腫瘍細胞と正常細胞のペアの全ゲノムシーケンスは、腫瘍中に存在するすべての特徴的な変異に関して包括的に解析することができます。全ゲノムのシーケンスは、比較的安価に、しかも迅速に行えるようになってきており、仮説を必要としない発見を可能とする優れた方法です。

Zhang, J., Ding L., Holmfeldt L., Wu G., Heatley S. L., et al. (2012) The genetic basis of early T-Cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481: 157-163

初期T細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病（ETP ALL）は、遺伝的根拠が不明な稀有で侵襲性の強い悪性腫瘍です。著者らは、12例のETP ALL患者からの白血病性サンプルと、対応する正常サンプルの全ゲノムシーケンスを行い、52例のETPおよび42例の非ETP小児T-ALLの各コホートにおける体細胞変異の頻度を同定しました。変異スペクトルは骨髄性腫瘍と類似しており、ETP ALLの全体的転写プロファイルは、正常細胞および骨髄性白血病造血幹細胞の転写プロファイルとも類似していました。これらの結果から、骨髄に対する治療を加えることで、治療成績の低いETP ALLを改善できる可能性があることが示唆されています。このようにサンプル数が少なく遺伝子変化が未知である場合には、全ゲノムシーケンスが遺伝子変化を見出すための優れたツールとなります。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{ix}による101bpペアエンドリード解析

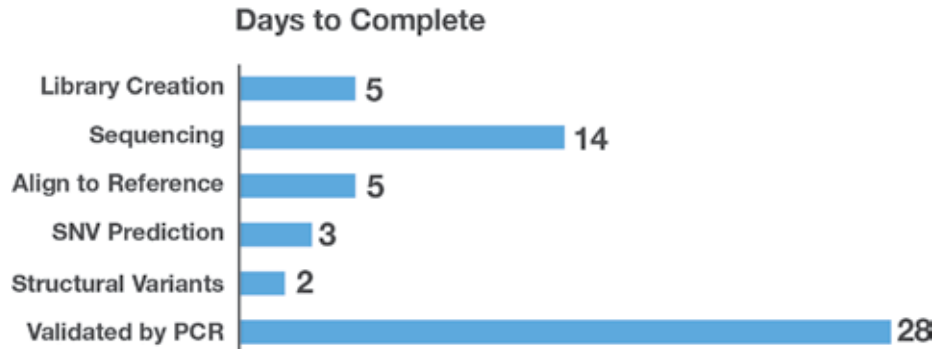
Welch, J. S., Westervelt P., Ding L., Larson D. E., Klco J. M., et al. (2011) Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. JAMA 305: 1577-1584

この文献で著者らは、ペアエンドリードの全ゲノムシーケンスを使用したリアルタイムの癌診断について報告しています。著者らはライブラリー構築、シーケンスおよびデータ解析の工程を25日以内で完了させています。標準的なPML-RARA bcr3変異を生成する新規の挿入融合の直交バリデーションにはさらに27日を要しています。

患者はその複雑な細胞遺伝学的所見から予後不良と推定されたため、この患者が認識されたPML-RARA融合遺伝子を有しているかどうかを決定することが重要でした。しかしFISHおよびPCRに基づいた以前の診断では、はっきりとした診断を下すことは不可能でした。シーケンスの結果によりこの患者の治療法は変更され、同種幹細胞移植に代わってATRA強化療法が施されました。発症から15ヵ月後において、患者は第一寛解期にあります。

疾患を発症する可能性があるRARA再配列の検出には、他の臨床検査を使用することも可能でしたが、それらの方法は煩雑で、大量の出発物質、個人的なデザインおよび反復トラブルシューティングを必要とする場合があります。それとは対照的に、ペアエンドライブラリーによる全ゲノムシーケンスは、出発物質としてわずか10ngのDNAしか必要とせず、自動化「パイプライン」戦略に組み込み、一塩基多型 (SNV)、小さな挿入および欠失、構造変異およびクローン性などの結果を一貫して得ることが可能です。さらに、この方法はカスタム化試薬を必要とせず、正確な診断のために検査する必要のあるゲノム領域をあらかじめ把握しておく必要もありません。

イルミナ技術：HiSeq® 2000システム



Time required to complete various phases of the test.

Chapman, M. A., Lawrence M. S., Keats J. J., Cibulskis K., Sougnez C., et al. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. Nature 471: 467-472

この文献は、癌変異発見実験の興味深い一例を示しています。著者らは23人の患者に対する全ゲノムシーケンスおよび16人の患者に対する全エクソームシーケンス (164,687エクソン) を行い、1人の患者に関しては両方の方法を用いて解析しました。各腫瘍サンプルは対応する正常サンプルと比較しました。この方法により、仮説を必要としない、新しい変異および遺伝子再配列のスクリーニングが可能となります。複数のゲノムを使用することにより、ドライバーとなる変異と二次的なパッセンジャー変異の識別が実現しています。著者らは全エクソームシーケンスにより顕著に変異している遺伝子の大部分が明らかになったと述べています。しかし、タンパク質コーディングの全変異の半数は転座などの染色体異常を介して発現しており、これらの変異の大部分はエクソームシーケンスのみでは発見されなかったと考えられます。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}による、全ゲノムシーケンス (101bpペアエンドリード解析, 30xカバレッジ) および全エクソームシーケンス (76bpペアエンドリード) 解析。

全ゲノムシーケンス研究の成功例：

Bass, A. J., Lawrence M. S., Brace L. E., Ramos A. H., Drier Y., et al. (2011) Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. Nat Genet 43: 964-968

エクソームシーケンス

エクソームシーケンスは、タンパク質をコードする、ゲノムの1~2%に相当する領域のみに焦点を当てるため、より安価であり、解析はより簡単です。エクソームシーケンスをメンデル遺伝病の研究に使用し、優れた成果を得ている例がすでに多数存在しています^{23,24}。エクソームシーケンスの産生する情報量が、全ゲノムシーケンスの50分の1であるにもかかわらず、そのコストが半分にまでしか削減されないのは、エクソームシーケンス用の遺伝子材料の調製がより高価で煩雑な処理を必要とするためです²⁵。また、癌研究においては、ゲノム全体に再配列が生じていることが多いため、エクソームシーケンスでは重要な変異を見落とす可能性があることに留意しておく必要があります²⁶。

エクソームシーケンスの成功例：

Gerlinger, M., Rowan A. J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregional sequencing. *N Engl J Med* 366: 883-892 (See Prognosis and Response to Therapy for a detailed discussion of this paper)

Kumar, A., White T. A., MacKenzie A. P., Clegg N., Lee C., et al. (2011) Exome sequencing identifies a spectrum of mutation frequencies in advanced and lethal prostate cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17087-17092

Lilljebjorn, H., Rissler M., Lassen C., Heldrup J., Behrendtz M., et al. (2011) Whole-exome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*

Quesada, V., Conde L., Villamor N., Ordonez G. R., Jares P., et al. (2011) Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44: 47-52

Spector, M. S., Iossifov I., Kritharis A., He C., Koltz J. E., et al. (2011) Mast-cell leukemia exome sequencing reveals a mutation in the IgE mast-cell receptor beta chain and KIT V654A. *Leukemia*

Varela, I., Tarpey P., Raine K., Huang D., Ong C. K., et al. (2011) Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* 469: 539-542

Wang, K., Kan J., Yuen S. T., Shi S. T., Chu K. M., et al. (2011) Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet* 43: 1219-1223

Wei, X., Walia V., Lin J. C., Teer J. K., Prickett T. D., et al. (2011) Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 43: 442-446

ターゲットリシーケンス

ターゲットリシーケンスでは、予備知識に基づき、限られたセットの遺伝子にのみ焦点を当てた手法です。癌関連の遺伝子のみを使用することにより、結果の解釈は比較的容易で、実用化できる可能性があります。適切な遺伝子を含むパネルを、異なる癌タイプに応用することで実験の処理およびデータの解釈を効率化することが可能です。将来、さらに大規模な研究においては、疾患の進行度、遺伝子プロファイル、環境曝露またはその他の要因による患者の層別化が行われる可能性があります。今日までの研究から、このようなアプローチが、診断ツールとして極めて大きな可能性を秘めていることが示されています。

²³ Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. and Veltman, J. A. (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet*

²⁴ Majewski, J., Schwartzenuber, J., Lalonde, E., Montpetit, A. and Jabado, N. (2011) What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48: 580-589

²⁵ Waters, H. (2012) New NIH genetics center focuses its lens on exome, despite doubts. *Nat Med* 18: 8

²⁶ Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., et al. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471: 467-472

Lipson, D., Capelletti M., Yelensky R., Otto G., Parker A., et al. (2012) Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. Nat Med

この研究において著者らは、40例の結腸直腸癌および24例の非小細胞肺癌のFFPE試料において、145の癌関連遺伝子を標的としています。検査した試料のうち、59%がこのパネルに含まれる変異を生じていました。パネルに含まれる遺伝子に変異を生じていない残りの患者は、癌関連遺伝子パネルを拡大するための全ゲノムシーケンスの最適な対象となり得ます。変異の大部分を担うのはごく一部の遺伝子ですが、その他の変異には顕著な多様性が存在します。この結果は、患者一人ひとりに適切な治療を施すためには分子診断が有益であることを明確に示しています。

イルミナ技術：HiSeq® 2000システムによる36bpペアエンドリード解析（229x 平均カバレッジ）

Harismendy, O., Schwab R. B., Bao L., Olson J., Rozenzhak S., et al. (2011) Detection of low prevalence somatic mutations in solid tumors with ultra-deep targeted sequencing. Genome Biol 12: R124

著者らは、42の癌遺伝子の変異ホットスポットを含む71.1kbのシーケンスをスクリーニングするために、超高深度の標的シーケンスを使用しています。混合実験において、頻度の低い変異に関する感度および特異性はそれぞれ94%および99%を超えていました。この解析法の性能および有用性の評価は、当該解析法を臨床癌試料およびマウス異種移植試料の変異プロファイルの解析に使用することにより実行されています。サンガーシーケンスにおいては、複雑なDNA混合試料中で検出できるのは約20%の頻度で存在する変異に限られています。一方、ここに示されている解析の感度では、5%の頻度で存在する変異の検出が可能となっています。このため、臨床サンプルに頻繁に見られる、レアな変異を生じたクローン、低細胞数およびストロマまたは免疫細胞浸潤による汚染等を含む、不均一または低品質試料中における変異の検出が可能となります。

イルミナ技術：MiSeq® システムによる151bpペアエンドリード解析

参考文献：

Holbrook, J. D., Parker J. S., Gallagher K. T., Halsey W. S., Hughes A. M., et al. (2011) Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. J Transl Med 9: 119

Wagle, N., Berger M. F., Davis M. J., Blumenstiel B., DeFelicis M., et al. (2011) High-Throughput Detection of Actionable Genomic Alterations in Clinical Tumor Samples by Targeted, Massively Parallel Sequencing. Cancer Discovery 2: 82-93

予後および治療効果

理想的な癌治療とは、腫瘍の特異的な分子機構を標的としてデザインされたプロトコールに基づき、しかも患者の寛容性が高い治療です。複数の異なる分子機構が、同一の臨床的症候として現れる可能性があり、また患者の癌治療に対する寛容性には大きな個人差が存在します。癌が進行するに従い、体細胞変異およびゲノム再配列が蓄積するため、薬剤耐性または転移の可能性が生じ、患者の予後に大きく影響します。有益な情報が得られるバイオマーカーは、特定の患者に合った処置を選択する治療決定に役立つ可能性を示すエビデンスが増えています。治療中のモニタリングを継続することで、治療効果および再発リスクを評価することも可能です。

Ding, L., Ley T. J., Larson D. E., Miller C. A., Koboldt D. C., et al. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. Nature 481: 506-510

この研究では、急性骨髄性白血病（AML）の再発の原因について検討しています。著者らは、（1）一次腫瘍に存在する初期クローンの変異と再発クローンへの進化、および（2）初回治療を生き延びた初期クローンのサブクローンのさらなる変異と再発時の増殖という、二種類の一般的機構を見出しています。一つの症例では、初期腫瘍においてわずか5.1%を占めていたサブクローンが再発後には主要クローンとなっていました。いずれの症例も、化学療法で初期クローンを消滅させることはできませんでした。この研究は、診断後および初期治療後に存在数の少ない細胞集団を検出して消滅させることの重要性を強調するものです。存在数が極めて少ない細胞集団における*de novo*変異を検出することが可能な次世代シーケンスは、このようなアプリケーションには特に最適な方法です。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}による101bpペアエンドリード解析

Gerlinger, M., Rowan A. J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med 366: 883-892

この研究において、著者らは全ゲノムシーケンスを使用して2名の患者の一次性腎癌および関連転移部位における空間的に分離した領域からの複数の試料を解析しました。その結果、一次腫瘍が著しく不均一であることを見出し、体細胞の全変異のうち63%～69%はすべての腫瘍領域で検出されないと述べています。また、良好な予後および不良な予後の遺伝子発現の特徴が同一の腫瘍の異なる領域に検出されました。この結果は、変異が蓄積する前に初期診断を行うことの重要性、およびより大きな腫瘍においては複数の部位の生検が必要であることを強調するものです。同一の患者からの複数の試料を使用することにより、著者らは疾患の進行を復元することに成功しています。これは非常に強力な方法であり、腫瘍の誘発イベントを明らかにするのみならず、平行進化を示す遺伝子を明らかにするものです。平行進化は一般に進化的圧力の指標であり、これらの遺伝子は効果的な治療標的となることが示唆されます。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx} およびHiSeq® 2000システム

追加参考文献：

Blackburn, E. H. (2011) Cancer interception. Cancer Prev Res (Phila) 4: 787-792

Van Schaeybroeck, S., Allen W. L., Turkington R. C. and Johnston P. G. (2011) Implementing prognostic and predictive biomarkers in CRC clinical trials. Nat Rev Clin Oncol 8: 222-232

転移

転移は複雑なプロセスであり、癌細胞が原発腫瘍から分離し、血流またはリンパ系循環によって身体の他の部位に広がります。転移した部位において癌細胞は増殖を続け、さらに新しい腫瘍を形成します。膀胱癌やブドウ膜癌などの腫瘍は、その転移能が致死性の高さに大きく寄与しています。転移癌のクローン構造、転移の系統発生的関係、転移部位および原発部位における平行進化のスケール、および腫瘍の広がり方など、多くの基本的な研究テーマがまだまだ存在します。

Hsieh, A. C., Liu Y., Edlind M. P., Ingolia N. T., Janes M. R., et al. (2012) The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. Nature

著者らは、発癌性mTORシグナリングによる、前立腺癌ゲノム特有な翻訳を報告していますが、これらは細胞の増殖、代謝および侵襲に関する極めて特異的な遺伝子のレパートリーとなっています。さらに、前立腺癌の侵襲および転移を統合する、翻訳制御された前侵襲性メッセンジャーRNAの機能的分類も行っています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}を用いたmRNA-SeqおよびRIBO-Seq解析

参考文献：

Gerlinger, M., Rowan A. J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366: 883–892

Sethi, N. and Kang Y. (2011) Unraveling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer* 11: 735–748

Turajlic, S., Furney S. J., Lambros M. B., Mitsopoulos C., Kozarewa I., et al. (2012) Whole genome sequencing of matched primary and metastatic acral melanomas. *Genome Res* 22: 196–207

抗癌剤開発

薬剤開発の観点で、癌は他の疾病とは大きく異なります。一般的な腫瘍サンプルには、両親から受け継いだ生殖細胞系および疾患の進行中に蓄積される体細胞変異の、二種類のゲノムが存在します。腫瘍ゲノムはまた非常に動的でもあり、迅速に*de novo*変異を蓄積し、薬剤耐性を獲得します。腫瘍は不均一であることが多く、一つの腫瘍に、それぞれ異なる薬剤感受性または耐性を有する複数の細胞種が含まれることもあります。この癌ゲノムの動的な特性は、癌が本質的に個別の疾患であることを示すものであり、このことが、大規模コホートを対象に薬剤を開発し試験するという治療パラダイムに根本的な疑問を投げかけています。このため、仮説を必要とせず、ゲノムの高分解能解析が可能な次世代シーケンサーが、抗癌剤の発見・開発過程に急速に取り入れられるようになったのは、当然のことと考えられます。

参考文献：

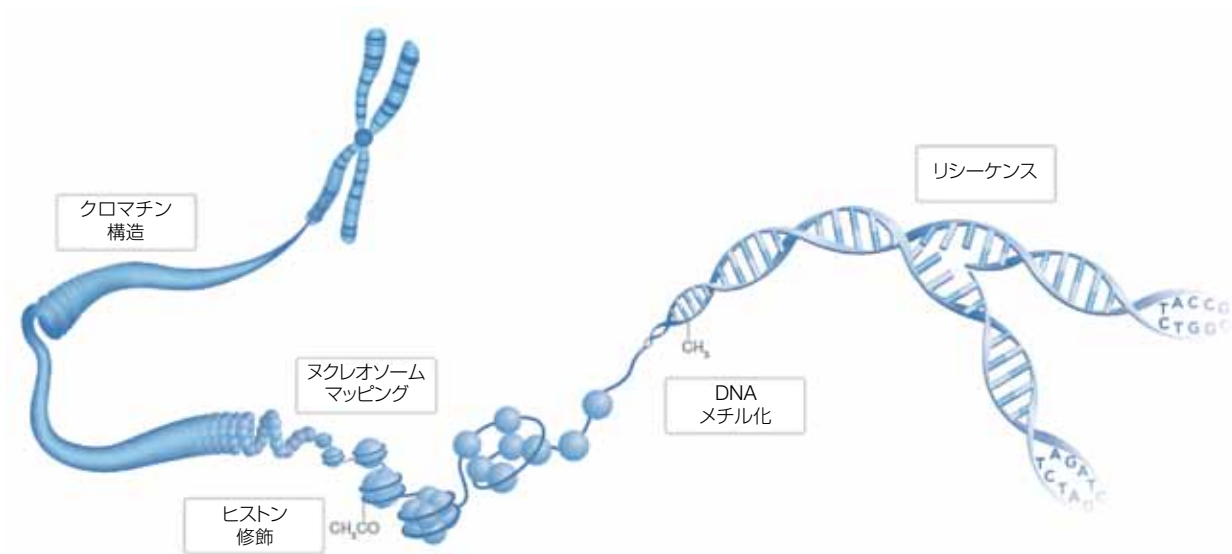
Woollard, P. M., Mehta N. A., Vamathevan J. J., Van Horn S., Bonde B. K., et al. (2011) The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development. *Drug Discov Today* 16: 512-519

Mills, G. B. (2012) An emerging toolkit for targeted cancer therapies. *Genome Res* 22: 177-182

癌生物学

次世代シーケンサーは前例のない手法として、癌の原因と機構の解明に利用されています。全ゲノムのシーケンスは、癌のすべての変異を見つけ出すための究極的で厳密な方法です。カバレッジが十分であれば、変異の検出漏れはなく、貴重なサンプルを将来リシーケンスに使用する必要もありません。全ゲノムシーケンスデータは、ChIP-Seqなどのデータと統合することも可能で、それにより解析能力が大幅に向上します。mRNA-Seqは、遺伝子変異が主要遺伝子の発現量に影響を与えているかどうか、または融合遺伝子が転写されているかどうかを確認するための強力な補足的技術です。遺伝子融合の検出は、仮説に基づいた方法であり、いくつかの特徴的な利点があります。全ゲノムシーケンスと比較すると、mRNA-Seqに必要とされるシーケンス量ははるかに少なくすみます。さらに、そのライブラリーには、反復領域やホモポリマー領域など、シーケンスが困難な要素がそれほど多く含まれていないという利点もあります。しかし本技術の持つ根本的な弱点は、サンプル採取時に発現していた遺伝子融合しか検出されないことです。これは乳癌など、ホルモン刺激に反応する癌においては特に重要です。薬物ターゲット

探索のような研究においては、発現している遺伝子しか疾患の結果に影響を与えないと仮定しているため、この技術は、多数の患者をスクリーニングする費用効率の高い方法となり得ます。



方法	適用	考察	例
全ゲノムシーケンス	<ul style="list-style-type: none"> 全ゲノムの包括的解析 すべてのタイプの変異を検出可能 	<ul style="list-style-type: none"> 大量のシーケンスの産生、解析および解釈が必要 遺伝子配列の検出に、ペアエンドおよびメイトペアが必要 	Schweiger, M. R. et al ²⁷
mRNA-Seq	<ul style="list-style-type: none"> 発現している遺伝子を確認 変異のスプライスバリエントおよび発現量に対する影響を測定 	<ul style="list-style-type: none"> サンプル取得時に発現している遺伝子のみが検出可能 発現量は組織特異的であるため、コントロールの適合に注意が必要 	Edgren, H. et al ²⁸ Pflueger, D. et al ²⁹ Asmann, Y. W. et al ³⁰
ChIP-Seq	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝的変化の、DNA結合タンパク質に対する影響の決定 クロマチン構造および遺伝子の空間的相互作用の決定 	<ul style="list-style-type: none"> 特異的な抗体が必要 三次元クロマチン構造の解析は、未解決のテーマ 	Hakim, O. ³¹

²⁷ Schweiger, M. R., Kerick, M., Timmermann, B. and Isau, M. (2011) The power of NGS technologies to delineate the genome organization in cancer: from mutations to structural variations and epigenetic alterations. *Cancer metastasis reviews* 30: 199-210

²⁸ Edgren, H., Murumagi, A., Kangaspeka, S., Nicorici, D., Hongisto, V., et al. (2011) Identification of fusion genes in breast cancer by paired-end RNA-sequencing. *Genome Biol* 12: R6

²⁹ Pflueger, D., Terry, S., Sboner, A., Habegger, L., Esgueva, R., et al. (2011) Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. *Genome Res* 21: 56-67

³⁰ Asmann, Y. W., Hossain, A., Necela, B. M., Middha, S., Kalari, K. R., et al. (2011) A novel bioinformatics pipeline for identification and characterization of fusion transcripts in breast cancer and normal cell lines. *Nucleic Acids Res* 39: e100

³¹ Hakim, O., Resch, W., Yamane, A., Klein, I., Kieffer-Kwon, K. R., et al. (2012) DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature*

Schweiger, M. R., Kerick M., Timmermann B. and Isau M. (2011) The power of NGS technologies to delineate the genome organization in cancer: from mutations to structural variations and epigenetic alterations. Cancer metastasis reviews 30: 199–210

著者らは、現在の統合的ゲノム法および腫瘍学における平行性の高いシーケンスの使用を精査し、臨床研究および基礎研究の将来について考察しています。考察の基盤として、10人の患者に由来する複数の病変において206の再配列の遺伝子型を解析しています。多くの再配列は、転移が発生する以前に一次腫瘍において生じており、そのためすべての転移において観察されることが見出されています。しかし、一部の患者では、転移性細胞のうちの一次腫瘍でクローン進化が常に生じていることを示すエビデンスが存在する一方、他の患者ではクローンの進化の兆候は転移部位において観察されており、転移部位における臓器特異的な変異のエビデンスとなっています。

臓器特異的な変異には二つの理由が考えられます。まず第一に、特定の遺伝子型が特定の臓器への転移を引き起こす可能性があります。2人の患者における肺転移にはドライバー変異（MYCまたはCCNE1の増幅）の追加が関与しており、このことから、これらの再配列を含むサブクローンに由来する腫瘍細胞は肺において生存する確率が高いということが示唆されます。第二の理由としては、転移の拡散が段階的な過程であり、臓器間よりも臓器の境界内において起こり易いものである可能性があります。これらの説明は相互に排他的なものではありません。特定の臓器に定着するための障害の克服は、特定な適応変化を有する癌細胞のサブクローンに依存しており、いったん定着すると比較的容易に臓器中に広がっていくという可能性があります。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}

融合遺伝子

融合遺伝子は極めて頻繁に起こり、一部の癌タイプでは顕著な特徴となっています。融合遺伝子は、もともと分離していた2つの遺伝子が融合することにより生じ、この2種類の融合パートナーとは異なる新しい機能を有する遺伝子産物の生成につながる可能性があります。強いプロモーターと、下流の機能的な遺伝子（癌原遺伝子）は、一部の癌に共通した組み合わせです。融合遺伝子の生成メカニズムは様々であり、生成した融合遺伝子の機能も様々です。前立腺癌の半数は、TMPRSS2とETS転写因子ファミリーのメンバーとの遺伝子融合が背景にあると推定されています³²。シーケンスを用いた融合遺伝子の研究法としては、腫瘍の全ゲノムシーケンスやmRNA-Seqなど、いくつかの方法が存在します。

融合遺伝子研究の成功例：

融合遺伝子は、イルミナの標準プロトコールにより容易に検出できます。特にペアエンド(PE)シーケンスの使用は、融合遺伝子検出の成功の鍵となる要因です。PEリードを使用した全ゲノムシーケンスは、最も正確で包括的なツールであり、重複、逆位、リードスルー、一塩基インデルなどのすべての融合遺伝子を検出することが可能です。

全ゲノムシーケンスは、融合分断点の*de novo*解析において有用です。シーケンスカバレッジおよび長いリードにより、融合接合点におけるマイクロホモロジーの一塩基レベルでの分解能が達成され、融合生成に関与する機構のフットプリントが得られます。これは、シーケンスの特徴的な性能です。

mRNA-Seqは非常に効率的な方法であり、比較的費用効率の高い大量サンプルのスクリーニング法となります。mRNA-Seq研究は、高発現している融合遺伝子が、最も大きい生物学的影響を与えるという仮定に基づいています。mRNA-Seqは、高発現している癌遺伝子の検出には特に効果的ですが、解析対象はポリAテールを有する発現遺伝子に限られ、遺伝子間領域および非翻訳領域に関する情報は得られません。ほとんどのmRNA-Seq配列比較アルゴリズムでは、mRNA-Seq中のすべてのシーケンスフラグメントが同一の染色体に由来すると仮定しています。このため、切断融合架橋サイクルにより生成する融合遺伝子のように、異なる二組の染色体に由来する遺伝子の融合により生成する融合遺伝子は検出されないか、もしくは正しく構築されません。

多くの研究では培養細胞を利用しています。確立された腫瘍細胞株は汎用研究ツールですが、これらの細胞株がどの程度に原発腫瘍を再現しているかは明らかではありません。長期にわたり培養され続けている本質的に不安定な細胞株は、突然変異を蓄積することが予想されます。また、培養過程における細胞数減少により生じる遺伝的ボトルネックによっても、突然変異の蓄積は著しく加速されます。

³² Pflueger, D., Terry, S., Sboner, A., Habegger, L., Esgueva, R., et al. (2011) Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. *Genome Res* 21: 56-67

最新の研究報告においても、使用されているサンプル数は極めて少ないものです。現段階では、ほとんどのシーケンス研究は、仮説構築の段階に過ぎません。シーケンス実験のデザインには、多くの未解決問題が残されています。例えば、シーケンス実験において多重検定補正をどのように適用するべきかは、まだ明らかになっていません。さらに多くのシーケンス情報が入手されるにつれ、ほとんどの癌タイプは、分子的表現型によっていくつかのサブpopulationに分類されると考えられます。このため、実験の必要性は著しく軽減され、代わりに精度高い解析のために必要なサンプル数が増加します。将来、統計学的に精密なシーケンス実験を行うためには、何千という単位の大量のサンプルが必要になると考えられます。

ゲノム突然変異

すべての癌は、その進行過程において体細胞性変異を蓄積します。ドライバー変異は癌の進行において決定的な体細胞性の変化であり、それ以外の2次的な変異はパッセンジャーとよばれています。様々な癌タイプに関する体細胞性変異の包括的な一覧表が作成されています³³。

Berger, M.F., Lawrence M. S., demichelis F., Drier Y., Cibulskis K., et al. (2011) The genomic complexity of primary human prostate cancer. Nature 470: 214-220

この文献では、7例のヒト一次前立腺癌および対応する正常サンプルによる全ゲノムシーケンス解析が示されています。一部の腫瘍においては、既知の癌遺伝子内あるいはその隣接領域に、安定した（コピーニュートラルな）再配列の複雑な鎖が存在します。切断点の中には、エクソンを標的とした方法では見逃してしまう可能性のある、遺伝子間領域に存在しているものもあります。全症例の88%においては、融合点は一塩基対レベルの分解能でマップすることが可能となっています。最も一般的なタイプの融合は正確な接合であり、再配列接合部にオーバーラップあるいは介入するシーケンスは含まれません。この結果は、最も一般的な接合に2~3塩基対のマイクロホモロジーを含む、乳癌に見られるパターンとは異なっており、これらの接合の生成に関する機構が前立腺癌と乳癌において異なっていることを示唆しています。この文献は、全ゲノムシーケンスによってのみ検出可能な変異の一例を示すものです。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{ix}による101bpペアエンドリード解析（30xカバレッジ、約400bpのインサートサイズ）

³³ Pleasance, E. D., Cheetham, R. K., Stephens, P. J., McBride, D. J., Humphray, S. J., et al. (2010) A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. Nature 463: 191-196

染色体粉碎 (Chromothripsis)

Chromothripsisとは、一度に数十～数百もの遺伝子再配列が起こる現象です³⁴。この壊滅的な事象により、複雑な局所再配列および0～2コピーの範囲に限られたコピー数多型が引き起こされます。この一回限りの壊滅的事象モデルは、変異の蓄積により進行する従来の典型的な癌進行モデルとは異なっています。変異の蓄積が生じる癌進行モデルにおいては、コピー数には上限が存在しないため、一般に幅広い範囲のコピー数が観察されます。Chromothripsisは、多くのサブタイプに見られ、癌全体において2～3%の頻度で発症し、骨癌においては約25%の頻度で発症していると推定されています^{35,36}。

実験デザインに関する注意事項：

染色体再配列は、複雑で確率的であるため、研究が困難な現象です。このため、ペアエンドおよびメイトペアの両者を利用する、高いカバレッジの全ゲノムシーケンス（ロングインサートのペアエンドマッピング）プロトコールが有用です。

Rausch, T., Jones D. T., Zapatka M., Stutz A. M., Zichner T., et al. (2012) Genome Sequencing of Pediatric Medulloblastoma Links Catastrophic DNA Rearrangements with TP53 Mutations. *Cell* 148: 59–71

著者らは、生殖細胞系TP53の変異（リー・フラウメニ症候群）を有する患者からのSonic-Hedgehog髄芽細胞腫（SHH-MB）脳腫瘍において、広範で複雑な染色体再配列を報告しています。より規模の大きい、11例のリー・フラウメニ症候群患者のスクリーニングにおいては、36%の腫瘍にchromothripsisと一致する再配列が観察されています。これは一般の腫瘍患者群におけるchromothripsisの発現率である2%よりはるかに高い値です。P53における生殖細胞系の変異は、一部の腫瘍におけるchromothripsisの要因がアポトーシス不全であるとする仮説と一致するものです。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx} およびHiSeq® 2000システムによるペアエンドおよびメイトペア解析

参考文献：

Stephens, P. J., Greenman C. D., Fu B., Yang F., Bignell G. R., et al. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144: 27–40

染色体再配列

染色体再配列には、2本鎖DNAの切断および接合が必要です。このような現象はゲノムの整合性を阻害し、その多くが白血病、リンパ腫および肉腫の発症に関与します³⁷。特定の遺伝子間の遺伝子融合が、複数の患者に繰り返し発現する場合、それらの遺伝子が細胞周期のある段階において、物理的に近接している可能性が高いことが示唆されています。

³⁴ Tubio, J. M. and Estivill, X. (2011) Cancer: When catastrophe strikes a cell. *Nature* 470: 476–477

³⁵ Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., et al. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144: 27–40

³⁶ Chiang, C., Jacobsen, J. C., Ernst, C., Hanscom, C., Heilbut, A., et al. (2012) Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet* advance online publication:

³⁷ Klein, I. A., Resch, W., Jankovic, M., Oliveira, T., Yamane, A., et al. (2011) Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell* 147: 95–106

Hakim, O., Resch W., Yamane A., Klein I., Kieffer-Kwon K. R., et al. (2012) DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. Nature

著者らは、染色体転座の発生において核構造およびDNA損傷の頻度が果たす役割について検討するため、これらのパラメータをマウスBリンパ球培養細胞において同時に測定しました。DNA損傷が再発しない場合には、IghまたはMycと、他のすべての遺伝子の間での転座は、相互の接触頻度に直接関連しています。一方で、再発性の位置特異的DNA損傷に関連した転座は、損傷部位における複製タンパク質Anの蓄積により測定される、DNA切断形成の速度に比例しています。この結果から、非標的再配列は核組織を反映し、DNA切断形成はB細胞悪性腫瘍を引き起こす転座を含む、再発性転座の位置と頻度に影響を与えているといえます。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}による36bpまたは54bpのペアエンドリード解析

ゲノム異常およびコピー数多型 (CNV)

ゲノム異常は癌の特徴でもあります。多くのタイプの癌には、疾患の原因および予後を理解する上での手掛かりとなる特徴的な異常が存在します。ゲノム異常は癌の進行に伴って蓄積するため、同一腫瘍内において、クローン型とも称される癌ゲノム内不均一性が観察されることがよくあります。このような過程の大部分は以前から観察されていましたが、実験技術が煩雑で、研究室内の小規模なデータセットに限られていました。次世代シーケンサーを使用することで、これらの異常を大規模コホートにおいて一塩基レベルの分解能で迅速に決定することが可能となりました。大規模なサンプルセットにより、ゲノム異常の頻度を決定することができ、疾患の進行を引き起こす主要遺伝子およびその過程についての見識が得られます。これらの技術を利用した初期の研究報告から、将来的に解明が期待される膨大な量の情報を垣間見ることができます。最も驚くべき知見の一つは、個々の癌がそれぞれいかに個性的であるかということです。

構造変異性は、転写に利用可能な遺伝子の機能的コピー数を表す遺伝子量に影響を与えます。一般的に、腫瘍の進行および薬剤耐性は、内在性の遺伝子増幅および遺伝子欠損により引き起こされます。これらのゲノム異常は、異数性と呼ばれる染色体全体または一部の欠損のような、大きな変異に分類することが可能です。小さな変異は、点突然変異およびインデルのように、一塩基のみに起こる異常です。遺伝子発現が転写因子によって厳密に制御されている健常なゲノムとは異なり、癌ゲノムは、遺伝子の重複および欠損により適応します。薬剤耐性の獲得は、この適応の速度と効率を示す良い例と言えます。

実験デザインに関する注意事項：

解析において一塩基多型 (SNP) のみに重点を置いていると、重要なゲノム再配列の大部分を見逃してしまうことになります。SNP以外の変異は、ヒトゲノム当たり合計約50メガベースの割合で存在すると推定されています³⁸。

個々のアルゴリズムは、特定のサイズおよびタイプの変異の検出に特化しているものが多く、研究では多くの場合、複数のアルゴリズムを同時に使用しています³⁹。

参考文献：

Navin, N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., et al. (2011) Tumor evolution inferred by single-cell sequencing. Nature 472: 90-94

Schweiger, M. R., Kerick M., Timmermann B., Albrecht M. W., Borodina T., et al. (2009) Genome-wide massively parallel sequencing of formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues for copy-number- and mutation-analysis. PLoS ONE 4: e5548

³⁸ Pang, A. W., MacDonald, J. R., Pinto, D., Wei, J., Rafiq, M. A., et al. (2010) Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. Genome Biol 11: R52

³⁹ Mills, R. E., Walter, K., Stewart, C., Handsaker, R. E., Chen, K., et al. (2011) Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. Nature 470: 59-65

遺伝子発現解析により、細胞内の分子的機構についての知見が得られます。癌研究における遺伝子発現研究には、マイクロアレイベースのmRNA解析が主に利用されてきました。しかし、シーケンスベースのmRNA解析 (mRNA-Seq) の出現により、遺伝子発現による産物の測定、解釈が飛躍的に進歩しました。修飾RNAおよび極めて発現量の低いRNAを検出できるmRNA-Seqは、癌研究には極めて適しています。転写時の極めて迅速な変異の検出法、および他のポリアデニル化部位の使用法も開発されています⁴⁰。

実験デザインに関する注意事項：

mRNA-Seqは、すでに一般的に使用される方法となっており、研究を発表している著者の多くは、メーカーの提供するプロトコルを使用しています。

癌における体細胞性変異は基本的には新規 (*de novo*) の現象と考えます。シーケンスには変異に関する予備知識は必要なく、変異を転写産物と共に正確にマップすることが可能です。

スプライスバリエーションおよび融合遺伝子は、ある種の癌において重要な役割を担っています。ペアエンドmRNA-Seqでは、融合が不完全な場合でもスプライスバリエーションおよび融合遺伝子をマップすることが可能です。

腫瘍には様々な細胞が含まれていることが多く、mRNA-Seqの広いダイナミック領域および正確さが、発現のわずかな変化を検出するために欠かせない要素となっています。特徴的な体細胞性変異またはスプライスバリエーションが腫瘍転写に含まれていれば、正常の細胞とは区別されます。

遺伝子融合をペアエンドの大規模並行シーケンスにより検出するための感度は、発現量、転写長およびcDNAライブラリのフラグメント長などの多くの因子に依存しています。

大部分のプロトコルは、ポリAを多く含むRNA試料を使用しています。しかし、ポリA-(rRNA欠損)RNAも、細胞の生物学において重要な役割を果たしている可能性があり、現在のプロトコルで容易に解析することができます。

RNA発現は組織特異的および細胞特異的であり、腫瘍と正常のコントロールを選択する際にはこのことを考慮に入れる必要があります。

培養組織は、組織中での真の発現量を反映するわけではないので、注意して使用する必要があります。

参考文献：

- Eswaran, J., Cyanam D., Mudvari P., Reddy S. D., Pakala S. B., et al. (2012) Transcriptomic landscape of breast cancers through mRNA sequencing. *Sci Rep* 2: 264
- Ren, S., Peng Z., Mao J.-H., Yu Y., Yin C., et al. (2012) RNA-seq analysis of prostate cancer in the Chinese population identifies recurrent gene fusions, cancer-associated long noncoding RNAs and aberrant alternative splicings. *Cell Res*
- Garber, M., Grabherr M. G., Guttman M. and Trapnell C. (2011) Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods* 8: 469–477
- Nacu, S., Yuan W., Kan Z., Bhatt D., Rivers C. S., et al. (2011) Deep RNA sequencing analysis of read through gene fusions in human prostate adenocarcinoma and reference samples. *BMC Med Genomics* 4: 11
- Hah, N., Danko C. G., Core L., Waterfall J. J., Siepel A., et al. (2011) A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. *Cell* 145: 622–634
- Fu, Y., Sun Y., Li Y., Li J., Rao X., et al. (2011) Differential genome-wide profiling of tandem 3' UTRs among human breast cancer and normal cells by high-throughput sequencing. *Genome Res* 21: 741–747

⁴⁰ Shepard, P. J., Choi, E. A., Lu, J., Flanagan, L. A., Hertel, K. J., et al. (2011) Complex and dynamic landscape of RNA polyadenylation revealed by PAS-Seq. *RNA* 17: 761–772

マイクロRNA (miRNA)

成熟したmiRNAは、翻訳抑制またはmRNAの分解促進により遺伝子発現を制御します。多くのmiRNAは、様々なタイプの癌において、欠失または増幅されたゲノム領域に位置しています。ほとんどの癌細胞では、miRNA発現の全体量の減少が観察されます。癌研究におけるmiRNA研究は、大きく2つのカテゴリーに分類されます。一つは、癌の進行において役割を果たすmiRNAの発見と機能アノテーションであり、もう一つは、癌の診断および治療を改善する目的で癌の検出およびステージ決定にmiRNAをマーカーとして使用する可能性を追求する研究です。

参考文献：

Persson, H., Kvist A., Rego N., Staaf J., Vallon-Christersson J., et al. (2011) Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Res* 71:78-86

Ostling, P., Leivonen S. K., Aakula A., Kohonen P., Makela R., et al. (2011) Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 71: 1956-1967

測定の容易さ、比較的優れた安定性および膨大な数のmRNAの制御のため、miRNAは癌を含めた多くの疾患のマーカーとして魅力的な存在です。新たに発見された候補マーカーが、適格なバイオマーカーとなるまでの道のりは長いものであり、今日までの研究はバイオマーカー発見において極めて初期の段階にあります。以下に挙げる文献には、急速に成長している本分野の技術およびその進歩が示されています。

参考文献：

Hou, J., Lin L., Zhou W., Wang Z., Ding G., et al. (2011) Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 19: 232-243

Farazi, T. A., Horlings H. M., Ten Hoeve J. J., Mihailovic A., Halfwerk H., et al. (2011) MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res* 71: 4443-4453

実験デザインに関する注意事項：

miRNAの調製および検出は、すでに一般的な実験となっています。マーカーの提供する標準プロトコールでも、極めて高い感度および特異性を期待することができます。しかし、この技術によって生成される高品質のデータに見合った実験デザインおよびデータ解析法を使用することが重要です。

シーケンスカバレッジは検出感度と直接関連します。一般的な実験では、1サンプルに1レーンのフローセルを使用しており、シーケンスカバレッジは非常に高く、極めて高感度な検出が可能です。このため、miRNAリードカバレッジが問題となることはほとんどありません。スクリーニング実験や、あまり高い検出レベルを必要としない実験においては、サンプルをインデックスし、フローセルの1レーンに複数のサンプルを流すことが可能です。カバレッジを決定する際には、miRNA制御遺伝子の発現およびmiRNA量のわずかな変化がタンパク質をコードする多くの遺伝子に影響を与える可能性があることに留意する必要があります。

新たに発見されたmiRNAは、Ago2結合⁴¹ またはノックアウト実験などの機能的アッセイにより確認する必要があります。

実験には、統計学的信頼性を確立するのに十分なサンプルが含まれていることが必要です。2~3人の患者の腫瘍にmiRNAが存在すれば、miRNAがその疾患に関連している可能性があるという仮説を立てるには十分です。しかし、仮説を検証し、統計学的信頼性を確立するためには、一般に多数の患者が必要です。現時点では、シーケンス研究において、統計学的信頼度および複数の試験の相関を確立するための普遍的に認められている方法は存在しません。シーケンススペースのmiRNAプロファイリングは、miRNA発現の絶対的測定値を提供するものではなく、腫瘍と正常組織のペアのような、異なるmiRNAの相対値を提供するものです。

⁴¹ Persson, H., Kvist, A., Rego, N., Staaf, J., Vallon-Christersson, J., et al. (2011) Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Res* 71: 78-86

癌サンプルにおいては、サンプルの層別化が問題となります。特定の癌の表現型が複数の異なる病因および機構に起因する可能性もあります。厳密な解析のためには、各腫瘍サブタイプを代表するのに十分な量のサンプルが必要です。miRNAの発現は、腫瘍の進行と共に変化する可能性があるため、腫瘍のステージの確立が実験デザインに組み込まれていることが必要です。バイオマーカーの発見に関しては、実験の必要事項および実験デザインは十分に確立されています。新たに発見されたマーカーは、大規模な独立したコホートにおいて検証される必要があります。

エピジェネティクス

エピジェネティクスとは、DNA配列の変化を伴わない、遺伝子発現における遺伝的变化を意味します。遺伝的に同一の一卵性双生児間に見られるわずかな差異は、ほとんどがエピジェネティクスによるものです。さらに異常なエピジェネティクスイベントが、癌のような疾患に寄与していることを示すエビデンスも増えてきています。エピジェネティクスは、DNAメチル化、ヒストン修飾およびヌクレオソーム再構築などの多段階の過程により制御されています。

Zhang, J., Benavente C. A., McEvoy J., Flores-Otero J., Ding L., et al. (2012) A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature* 481: 329-334

網膜芽細胞腫は、発生中の網膜における侵襲性の強い小児癌であり、RB1の不活性化によって誘発されますが、その発症機序は不明です。このように高度に侵襲的な癌においては、多くの遺伝子が関与していますが、変異が解明されている癌遺伝子はRB1のみです。この腫瘍では、体細胞変異の数が限られているにも関わらず、正常な網膜芽細胞と比較してメチル化プロファイルに重大な変化が見られます。最も衝撃的な結果の一つは、ヒト網膜芽細胞腫における脾臓チロシンキナーゼ（SYK）癌原遺伝子の発現誘導でした。SYKは腫瘍細胞の生存に必要とされます。研究者はさらに、低分子性阻害物質によるSYKの阻害が、網膜芽細胞腫の細胞死を引き起こすことを、培養細胞および*in vivo*で示しました。

イルミナ技術：HumanMethylation27アレイ、Genome Analyzer_{ix}による101bpペアエンドリードを用いたターゲットシーケンスおよび全ゲノム解析

参考文献：

- Leidenroth, A., Sorte H. S., Gilfillan G., Ehrlich M., Lyle R., et al. (2012) Diagnosis by sequencing: correction of misdiagnosis from FSHD2 to LGMD2A by whole-exome analysis. *Eur J Hum Genet*
- Ntziachristos, P., Tsigros A., Vlierberghe P. V., Nedjic J., Trimarchi T., et al. (2012) Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 18: 298–303
- Kobayashi, Y., Absher D. M., Gulzar Z. G., Young S. R., McKenney J. K., et al. (2011) DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer. *Genome Res* 21: 1017–1027
- Chu, X., Pan C. M., Zhao S. X., Liang J., Gao G. Q., et al. (2011) A genome-wide association study identifies two new risk loci for Graves' disease. *Nat Genet* 43: 897–901
- Yan, H., Choi A. J., Lee B. H. and Ting A. H. (2011) Identification and functional analysis of epigenetically silenced microRNAs in colorectal cancer cells. *PLoS One* 6: e20628

ヒストンメチル化の測定により、メチル化状態を直接知ることができ、多くの研究によって、メチル化に関与している酵素における変異が次々と見出されてきています。このような研究により、メチル化の過程を制御する機構に関する有用な知見が得られています。

Morin, R. D., Mendez-Lago M., Mungall A. J., Goya R., Mungall K. L., et al. (2011) Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. Nature 476: 298-303

著者らは、13例のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）および1例の濾胞性リンパ腫（FL）からの腫瘍性DNAおよび対応する正常DNAのシーケンスを行い、B細胞非ホジキン型リンパ腫（NHLs）において変異を生じている遺伝子を同定しました。著者らは研究の第二相において、これらの試料およびさらに113例のNHLからのmRNA-seqデータを解析しています。その結果、DLBCL例の32%およびFL例の89%において、ヒストンメチルトランスフェラーゼをコードするMLL2に体細胞変異が生じていることが見出されています。この結果および他の変異は、リンパ腫形成においてクロマチン生物学に顕著な阻害が生じていることを示唆しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{ix} およびHiSeq® 2000システムによる36~100bpのリード長の解析。使用した細胞の50%以上は腫瘍細胞です。

実験デザインに関する注意事項：

各組織および細胞種にはそれぞれ特有のメチル化パターンが存在します。このため、解析には対象組織の入手が必要です。対象組織および隣接する正常組織のペアの利用は、解析の簡略化に有用です。

BS-Seq（Bisulfite Sequence）により産生された、極めて多数のCpG マーカーの解釈は困難で、信頼性の高い統計解析法はまだ確立されていません。しかし、解析の簡略化には、以下のような実用的方法が利用可能です。

- Reduced representation bisulphite sequencing (RRBS-Seq)は、カバレッジを限定することで解析を簡略化できます。
- 統合解析は、結果の解釈を著しく向上させます。例えば、発現解析をメチル化解析と組み合わせることで、発現量が変化した遺伝子に焦点を当てることが可能となります。
- 解析を研究対象の遺伝子または領域に限定する手法は、GWAS研究のフォローアップを実施する場合や、研究対象の領域に遺伝子制御またはクロマチン再構築を示す実験的エビデンスが存在する場合に効果的です。Reduced representation法とは異なり、この方法では解析領域を追加することが可能であり、より多くの情報を入手することができます。

培養組織の使用には注意が必要です。時間経過と共に、また組織増殖を繰り返すことにより、培養組織はメチル化のレベルが変化し、本来の組織サンプルの性質が失われていく可能性があります。

技術的問題点

癌研究における実験デザインには、いくつかの特有な問題が存在します。代表的な腫瘍サンプルには、両親から受け継いだ生殖細胞系、および疾患の進行過程において蓄積される体細胞性変異の2種類のゲノムが存在します。サンプル中の腫瘍細胞の含有率は、10%から100%まで様々です。また、腫瘍ゲノムは動的であり、*de novo*変異を迅速に蓄積することができます。その結果、腫瘍は複数のクローン型が混在する場合があります⁴²。イルミナの技術なら、仮説なしで高分解能のゲノム解析を行うことが可能です。優れた実験デザインにより、技術の性能が最適化され、最も解釈が容易でロバストな結果が得られます。このセクションでは、実験をデザインする際に留意すべき生物学的および技術的な特性に焦点を当てています。

⁴² Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med 366: 883-892

FFPEサンプル

臨床の現場において検体はホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルとして保存されます。これらのサンプルからは比較的短鎖のDNAフラグメントが得られますが、次世代シーケンサーでは解析可能であり、良好な結果が得られます⁴³。

参考文献：

Corless, C. L. and Spellman P. T. (2012) Tackling formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue with next-generation sequencing. *Cancer Discovery* 2: 23-24

イルミナのシーケンス技術を、FFPEサンプルを用いた種々のアプリケーションに応用した成功例を下表にまとめています。

文献	試料	ターゲット
Fanelli et al.	全ゲノム	ChIP-Seq
Gu et al. ⁴⁴	全ゲノム	メチル化(BS-Seq)
Kerick et al. ⁴⁵	ターゲット領域	一塩基変異(SNV)
Lipson et al. ⁴⁶	ターゲット領域	エクソームシーケンス
Schweiger et al. ⁴⁷	全ゲノム	コピー数変異(CNV)
Wagle et al. ⁴⁸	ターゲット領域	エクソームシーケンス
Weng et al. ⁴⁹	RNA	miRNA

最小単位サンプル

通常、腫瘍には変異の蓄積されるため、複数のクローン集団が存在します⁵⁰。単一細胞のゲノム解析では、このように複雑な細胞混合物を解析することができます。組織の分子的アッセイでは、細胞集団の平均的なシグナルが実験結果に反映するか、あるいは最も多数を占めるクローンのシグナルのみが反映されることもあります。そのクローンが腫瘍中に存在するクローンの中で必ずしも最も悪性であるとは限りません。

臨床の現場における単一細胞のゲノム解析の価値は、臨床サンプル中に少数しか存在数しない癌細胞のプロファイリング、化学療法に耐性を示す可能性のある希なクローンのモニタリングおよびその検出にあります。これらのアプリケーションは、腫瘍学の3大課題である、検出、進行および治療効果予測のすべてを改良することが期待されます。

⁴³ Corless, C. L. and Spellman, P. T. (2012) Tackling Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Tissue with Next-Generation Sequencing. *Cancer Discovery* 2: 23-24

⁴⁴ Gu, H., Bock, C., Mikkelsen, T. S., Jager, N., Smith, Z. D., et al. (2010) Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution. *Nat Methods* 7: 133-136

⁴⁵ Kerick, M., Isau, M., Timmermann, B., Sultmann, H., Herwig, R., et al. (2011) Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC Med Genomics* 4: 68

⁴⁶ Lipson, D., Capelletti, M., Yelensky, R., Otto, G., Parker, A., et al. (2012) Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*

⁴⁷ Schweiger, M. R., Kerick, M., Timmermann, B., Albrecht, M. W., Borodina, T., et al. (2009) Genome-wide massively parallel sequencing of formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues for copy-number- and mutation-analysis. *PLoS ONE* 4: e5548

⁴⁸ Wagle, N., Berger, M. F., Davis, M. J., Blumenstiel, B., DeFelice, M., et al. (2011) High-Throughput Detection of Actionable Genomic Alterations in Clinical Tumor Samples by Targeted, Massively Parallel Sequencing. *Cancer Discovery* 2: 82-93

⁴⁹ Weng, L., Wu, X., Gao, H., Mu, B., Li, X., et al. (2010) MicroRNA profiling of clear cell renal cell carcinoma by whole-genome small RNA deep sequencing of paired frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Pathol* 222: 41-51

⁵⁰ Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., et al. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144: 27-40

Navin, N. and Hicks J. (2011) Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med* 3:31

この文献において著者らは、単一細胞を単離し、そのゲノムプロファイルを解析するための現行法および開発中の方法に関して、特にゲノムコピー数のプロファイリングに焦点を当てて概説しています。イルミナHiSeq® 2000を使用した現在のスループットにおいては、単一のフローセルレーンにおいて最高25個の単一細胞のシーケンスが可能ですので、一回のランで200個の単一細胞のプロファイリングが可能で

Navin, N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., et al. (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472: 90-94

この文献において著者らは、フローでソートした核、全ゲノム増幅およびSBSを使用して、単一の核内のゲノムコピー数を正確に定量しています。2例のヒト乳癌患者から単離した100個の単一細胞の解析により、三種類の異なるクローンサブpopulationが明らかにされました。この研究により、単一細胞のSBSから、ロバストで高分解能のコピー数プロファイルを得ることが可能であるということが示されています。同一の癌からの複数の細胞を解析すると、癌の進化および転移を推測することができます。さらに、他の方法ではこれまで検出できなかった、擬二倍体細胞の大きな集団が、著者らにより発見されたことも注目に値します。

イルミナ技術：全ゲノム増幅とそれに続く、Genome Analyzer_{II} フローセルの1レーンを使用した76bpのシングルエンド解析。この方法により通常、核1個当たり9百万の特徴的なマッピングリードが得られます。

培養組織

確立された腫瘍細胞株は汎用研究ツールですが、これらの細胞株がどの程度に原発腫瘍を再現しているかは明らかではありません。長期にわたり培養され続けている、本質的に不安定な細胞株では、突然変異が蓄積されることが予想されます。また、培養過程における細胞数の一時的な減少が遺伝的ボトルネックとなり、突然変異の蓄積が著しく促進される可能性があります⁵¹。

参考文献：

Gisselsson, D., Lindgren D., Mengelbier L. H., Ora I. and Yeger H. (2010) Genetic bottlenecks and the hazardous game of population reduction in cell line based research. *Exp Cell Res* 316: 3379–3386

⁵¹ Gisselsson, D., Lindgren, D., Mengelbier, L. H., Ora, I. and Yeger, H. (2010) Genetic bottlenecks and the hazardous game of population reduction in cell line based research. *Exp Cell Res* 316: 3379-3386

参考文献一覽

- Agrawal, N., Frederick, M. J., Pickering, C. R., Bettgowda, C., Chang, K., et al. (2011) Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333: 1154-1157
- Antoniou, A., Wang, X., Fredericksen, Z., McGuffog, L., Tarrell, R., et al. (2010) A locus on 19p13 modifies risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers and is associated with hormone receptor-negative breast cancer in the general population. *Nat Genet* 42: 885-892
- Asmann, Y. W., Hossain, A., Nece-la, B. M., Middha, S., Kalari, K. R., et al. (2011) A novel bioinformatics pipeline for identification and characterization of fusion transcripts in breast cancer and normal cell lines. *Nucleic Acids Res* 39: e100
- Bass, A. J., Lawrence, M. S., Brace, L. E., Ramos, A. H., Drier, Y., et al. (2011) Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. *Nat Genet* 43: 964-968
- Berger, M. F., Lawrence, M. S., Demichelis, F., Drier, Y., Cibulskis, K., et al. (2011) The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 470: 214-220
- Blackburn, E. H. (2011) Cancer interception. *Cancer Prev Res (Phila)* 4: 787-792
- Brooks, J. D. (2012) Translational genomics: The challenge of developing cancer
- Hou, J., Lin, L., Zhou, W., Wang, Z., Ding, G., et al. (2011) Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 19: 232-243
- Kerick, M., Isau, M., Timmermann, B., Sultmann, H., Herwig, R., et al. (2011) Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input Amount and tumor heterogeneity. *BMC Med Genomics* 4: 68
- Biomarkers. *Genome Res* 22: 183-187
- Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., et al. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471: 467-472
- Corless, C. L. and Spellman, P. T. (2012) Tackling Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Tissue with Next-Generation Sequencing. *Cancer Discovery* 2: 23-24
- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., et al. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 481: 506-510
- Edgren, H., Murumagi, A., Kangas-peska, S., Nicorici, D., Hongisto, V., et al. (2011) Identification of fusion genes in breast cancer by paired-end RNA-sequencing. *Genome Biol* 12: R6
- Farazi, T. A., Horlings, H. M., Ten Hoeve, J. J., Mihailovic, A., Halfwerk, H., et al. (2011) MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res* 71: 4443-4453
- Fu, Y., Sun, Y., Li, Y., Li, J., Rao, X., et al. (2011) Differential genome-wide profiling of tandem 3' UTRs among human breast cancer and normal cells by high-throughput sequencing. *Genome Res* 21: 741-747
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M. and Trapnell, C. (2011) Computational methods
- Kobayashi, Y., Absher, D. M., Gulzar, Z. G., Young, S. R., McKenney, J. K., et al. (2011) DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer. *Genome Res* 21: 1017-1027
- Kumar, A., White, T. A., MacKenzie, A. P., Clegg, N., Lee, C., et al. (2011) Exome sequencing identifies a spectrum of mutation frequencies in advanced and lethal prostate cancers. *Proc for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. Nat Methods* 8: 469-477
- Gillissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. and Veltman, J. A. (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet*
- Gisselsson, D., Lindgren, D., Mengelbier, L. H., Ora, I. and Yeger, H. (2010) Genetic bottlenecks and the hazardous game of population reduction in cell line based research. *Exp Cell Res* 316: 3379-3386
- Green, E. D., Guyer, M. S. and National Human Genome Research, I. (2011) Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature* 470: 204-213
- Gu, H., Bock, C., Mikkelsen, T. S., Jager, N., Smith, Z. D., et al. (2010) Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution. *Nat Methods* 7: 133-136
- Hah, N., Danko, C. G., Core, L., Waterfall, J. J., Siepel, A., et al. (2011) A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. *Cell* 145: 622-634
- Holbrook, J. D., Parker, J. S., Gallagher, K. T., Halsey, W. S., Hughes, A. M., et al. (2011) Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. *J Transl Med* 9: 119
- Natl Acad Sci U S A 108: 17087-17092
- Lilljebjorn, H., Rissler, M., Lassen, C., Heldrup, J., Behrendtz, M., et al. (2011) Whole-exome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*
- Lipson, D., Capelletti, M., Yelensky, R., Otto, G., Parker, A., et al. (2012) Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*
- Lizardi, P. M., Forloni, M. and Wajapeyee, N. (2011) Genome-wide approaches for cancer gene discovery. *Trends Biotechnol* 29: 558-568

- Majewski, J., Schwartzenuber, J., Lalonde, E., Montpetit, A. and Jabado, N. (2011) What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48: 580-589
- McDermott, U., Downing, J. R. and Stratton, M. R. (2011) Genomics and the continuum of cancer care. *N Engl J Med* 364: 340-350
- Mills, G. B. (2012) An emerging toolkit for targeted cancer therapies. *Genome Res* 22: 177-182
- Morin, R. D., Mendez-Lago, M., Mungall, A. J., Goya, R., Mungall, K. L., et al. (2011) Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476: 298-303
- Nacu, S., Yuan, W., Kan, Z., Bhatt, D., Rivers, C. S., et al. (2011) Deep RNA sequencing analysis of readthrough gene fusions in human prostate adenocarcinoma and reference samples. *BMC medical genomics* 4: 11
- Navin, N. and Hicks, J. (2011) Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med* 3: 31
- Navin, N., Kendall, J., Troge, J., Andrews, P., Rodgers, L., et al. (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472: 90-94
- Ostling, P., Leivonen, S. K., Aakula, A., Kohonen, P., Makela, R., et al. (2011) Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 71: 1956-1967
- Persson, H., Kvist, A., Rego, N., Staaf, J., Vallon-Christersson, J., et al. (2011) Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Res* 71: 78-86
- Pflueger, D., Terry, S., Sboner, A., Habegger, L., Esgueva, R., et al. (2011) Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. *Genome Res* 21: 56-67
- Pineda, M., González, S., Lázaro, C., Blanco, I. and Capellá, G. (2010) Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res* 693: 19-31
- Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordonez, G. R., Jares, P., et al. (2011) Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44: 47-52
- Rausch, T., Jones, D. T., Zapatka, M., Stutz, A. M., Zichner, T., et al. (2012) Genome Sequencing of Pediatric Medulloblastoma Links Catastrophic DNA Rearrangements with TP53 Mutations. *Cell* 148: 59-71
- Roychowdhury, S., Iyer, M. K., Robinson, D. R., Lonigro, R. J., Wu, Y. M., et al. (2011) Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. *Sci Transl Med* 3: 111ra121
- Schweiger, M. R., Kerick, M., Timmermann, B., Albrecht, M. W., Borodina, T., et al. (2009) Genome-wide massively parallel sequencing of formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues for copy-number and mutation-analysis. *PLoS ONE* 4: e5548
- Schweiger, M. R., Kerick, M., Timmermann, B. and Isau, M. (2011) The power of NGS technologies to delineate the genome organization in cancer: from mutations to structural variations and epigenetic alterations. *Cancer metastasis reviews* 30: 199-210
- Shepard, P. J., Choi, E. A., Lu, J., Flanagan, L. A., Hertel, K. J., et al. (2011) Complex and dynamic landscape of RNA polyadenylation revealed by PAS-Seq. *RNA* 17: 761-772
- Spector, M. S., Iossifov, I., Kritharis, A., He, C., Kollitz, J. E., et al. (2011) Mast-cell leukemia exome sequencing reveals a mutation in the IgE mast-cell receptor beta chain and KIT V654A. *Leukemia*
- Stacey, S. N., Sulem, P., Jonasdotir, A., Masson, G., Gudmundsson, J., et al. (2011) A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat Genet* 43: 1098-1103
- Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., et al. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144: 27-40
- Stricker, T., Catenacci, D. V. and Seiwert, T. Y. (2011) Molecular profiling of cancer—the future of personalized cancer medicine: a primer on cancer biology and the tools necessary to bring molecular testing to the clinic. *Seminars in oncology* 38: 173-185
- Van Schaeuybroeck, S., Allen, W. L., Turkington, R. C. and Johnston, P. G. (2011) Wang, K., Kan, J., Yuen, S. T., Shi, S. T., Chu, K. M., et al. (2011) Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet* 43: 1219-1223
- Waters, H. (2012) New NIH genetics center focuses its lens on exome, despite doubts. *Nat Med* 18: 8
- Wei, X., Walia, V., Lin, J. C., Teer, J. K., Prickett, T. D., et al. (2011) Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 43: 442-446
- Weigelt, B., Pusztai, L., Ashworth, A. and Reis-Filho, J. S. (2012) Challenges translating breast cancer gene signatures into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 9: 58-64
- Welch, J. S., Westervelt, P., Ding, L., Larson, D. E., Klco, J. M., et al. (2011) Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA* 305: 1577-1584
- Weng, L., Wu, X., Gao, H., Mu, B., Li, X., et al. (2010) MicroRNA profiling of clear cell renal cell carcinoma by whole-genome small RNA deep sequencing of paired frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Pathol* 222: 41-51
- Wesolowska, A., Dalgaard, M. D., Borst, L., Gautier, L., Bak, M., et al.

(2011) Cost-effective multiplexing before capture allows screening of 25 000 clinically relevant SNPs in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 25: 1001-1006

precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481: 157-163
Zuo, T., Liu, T. M., Lan, X., Weng, Y. I., Shen, R., et al. (2011) Epigenetic Silencing

Woollard, P. M., Mehta, N. A., Vamathevan, J. J., Van Horn, S., Bonde, B. K., et al. (2011) The

application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development. *Drug Discov Today* 16: 512-519

Yan, H., Choi, A. J., Lee, B. H. and Ting, A. H. (2011) Identification and functional analysis of epigenetically silenced microRNAs in colorectal cancer cells. *PLoS One* 6: e20628

Zhang, J., Benavente, C. A., McEvoy, J., Flores-Otero, J., Ding, L., et al. (2012) A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigen-

etic analyses. *Nature* 481: 329-334

Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S. L., et al. (2012) The genetic basis of early T-cell

Mediated through Activated PI3K/AKT Signaling in Breast Cancer. *Cancer research* 71: 1752-1762

イルミナ株式会社

www.illumina.co.jp

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は Illumina, Inc. の商標または登録商標です。その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. 073-2012-J007 26JUL2013

illumina[®]