

山梨県立中央病院ゲノム解析センター 研修報告書

研修期間；2019年6月1日～10月31日

研修者；大阪国際がんセンター 呼吸器内科 医長 國政啓

1. 山梨県立中央病院について

山梨県立中央病院は明治9年5月に開設され、山梨県の基幹病院として発展してきた。山梨県内の医療の中核を担い、高度救命救急センター、総合周産期母子医療センター、がん診療拠点病院、がんゲノム医療連携拠点病院（東京大学医学部附属病院連携）としての機能を果たしている。病床数は640床で、医師数は190名である。また全国で21施設しか認定されていない日本遺伝性腫瘍学会の研修施設の1つである。

2009年から山梨県立病院機構の理事長として小侯政男先生（東京大学名誉教授）が着任された。小侯政男先生は米国イェール大学病理学教室にて一般病理について学ばれ、その後、肝臓病理について専門的に修められた。帰国後は千葉大学にてアヒルモデルを用いたB型肝炎ウイルスの感染経路の解明、その核酸を用いた検出系の確立などの多大なる業績を残され、1992年に東京大学第二内科教授に就任された。当時、学外からの臨床講座教授就任は初めてのことであった。東京大学では肝細胞癌に対するRFA治療の導入を中心として肝臓疾患の病態解明、治療法の革新を目指した基礎研究を遂行され、2009年に東京大学を退官後、山梨県立病院機構の理事長に就任された。理事長就任後は同院の経営基盤の立て直しに取り組まれた。東大時代から続く、患者さんを『早く、きれいに治す』をモットーに、病院診療方針の刷新・改革を行い、就任初年度から9年連続で増収のうえ106億円の増益となっている。そしてその慧眼のもと、ゲノム診療の到来を見据え、2013年4月から同院にゲノム解析センターを設置された。山梨県立中央病院ゲノム解析センターはこうした背景のもと設立された。小侯政男先生のご略歴を以下に示す。

小侯政男（おまた・まさお）

東京大学名誉教授

地方独立行政法人 山梨県立病院機構 理事長

1970年 千葉大学医学部卒業

1973年 アメリカ イェール大学病理学教室留学

1976年 アメリカ 南カリフォルニア大学肝臓研究所

1984年 千葉大学医学部第一内科 講師

1992年 東京大学医学部第二内科 教授就任

1997年 東京大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授

1998年 東京大学医学部附属病院 副院長

2009年 山梨県立中央病院 特別顧問 国際医療福祉大学 教授

2010年 地方独立行政法人 山梨県立病院機構 理事長》

2. 山梨県立中央病院 ゲノム解析センターについて

山梨県立中央病院ゲノム解析センターは、以下の構成メンバーを中心として2013年4月に同院通院加療がんセンター内に併設された。

小俣政男 理事長

望月仁 (消化器内科) ゲノム解析センター長

弘津陽介 研究員 (チーフ)

雨宮健司 (臨床検査科)

同センター内の設置機器を以下に示す

次世代シーケンサー



Ion Torrent Proton



Ion Torrent PGM



Ion Torrent PGM
(Oncomine Dx™ target test)

キャピラリーシーケンサー



ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer

自動ライブラリ調製機



Ion Chef™ system

マイクロダイセクション



Arcturus LCM System

自動核酸精製機



KingFisher Duo Prime

自動核酸精製機



QIA cube

PCR機



リアルタイムPCR機



ViiA™ real time PCR system

2017年5月からはゲノム診療センターとなり、2018年4月からはゲノム検査部が新設のうえ、がんゲノム医療連携病院に指定された。遺伝子解析における精度管理については、現時点で本邦では制度化されていないが、米国病理学会（CAP; College of American Pathologists）での精度評価に参加のうえ、次世代シーケンス解析、遺伝学的検査データにおける精度管理、検査技能に対し評価を獲得している。

ゲノム検査部では活動の一環として保険収載された遺伝子検査を外注委託から院内検査へ移行することを行っている。遺伝子解析検査は外注業者への支払率が高く、院内検査に切り替えることで外注業者への支払い削減につながる事が試算されている。院内化した外注遺伝子検査には感染症関連検査として、結核菌（LAMP法）、マイコプラズマニューモニエ（LAMP法）、FilmArray法があり、がん関連検査として、RAS/BRAF検査（大腸癌）、マイクロサテライト不安定性検査（MSI検査）、UGT1A1多型検査、JAK2検査、CALR/MPL検査がある。2019年11月より本邦初のがん遺伝子パネル検査であるオンコマイン Dx検査も院内実装された。

ゲノム診療においては、2013年10月から遺伝性乳がん・卵巣がん症候群（HBOC）の原因と考えられている *BRCA1/2* 遺伝子のフルシーケンスを院内解析することに成功し、その結果、国内で一早く婦人科がんと *BRCA1/2* 遺伝子異常との関連データを蓄積、解析してきた（下記論文にて成果の一端を報告）。

BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients with ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer.

Sakamoto I, Hirotsu Y, Nakagomi H, Ouchi H, Ikegami A, Teramoto K, Amemiya K, Mochizuki H, Omata M. *Cancer*. 2016 Jan 1;122(1):84-90.

本論文は日本人における *BRCA* 遺伝子変異と 340 例の婦人科がんの関連について解析したもので、日本人のデータベースとして広く引用されている。研修者が参加した第 22 回前期遺伝性腫瘍セミナー（2019年8月、がん研有明病院）でも同論文が引用の上、紹介されていた。これらの活動の成果の一端として 2016年1月には、*BRCA* 変異を有する卵巣がん患者を対象とした分子標的薬剤である「オラパリブ」の日本初の使用症例が山梨県立中央病院・婦人科から生まれている。同薬剤は 2018年に日本でも再発卵巣がん患者を対象に保険適応となった。またこれらのデータベースに対して、海外からの共同研究の申し出もあり、2019年7月に京都で行われた臨床腫瘍学会ではドイツから以下の演題が発表されている（oral）。

Udo Schmidt-Edelkraut、Yosuke Hirotsu、Xiaoyue Wang、Regina Bohnert、Markus Hartenfeller、Peter Koch、Andreas Werner、Ram Narang、Sajo Kaduthanam、Francesca Diella、Martin Stein、Josef Hermanns、Stephan Brock、Stephan Hettich、David Jackson、

BRCA variant classification is improved by Japanese SNP data and correlate with response to PARP inhibition in MH GUIDE 第 17 回臨床腫瘍学会、2019/7/18-20、京都

こうした BRCA 遺伝子変異解析、MSI 検査などの結果を診療に還元するべく、遺伝カウンセリング外来を併設のうえ、遺伝性腫瘍の診療の充実につながっている。これらの活動により、前述の遺伝子腫瘍学会研修施設の認定につながったものと考えられる。

同センターでは日々の診療の中で同意を得られた患者さんから血液、体液(胸水、腹水、十二指腸液、胆汁、気管支洗浄液など)、腫瘍組織というあらゆる臨床検体からゲノム抽出を行い、保存のうえ、臨床研究として各種がん関連の遺伝子解析を行っている。

ゲノム解析センターの活動として 2013 年 4 月から現在に至るまで、英文論文 43 報を上梓しており、以下の受賞歴がある。論文はすべて単施設内でのデータに基づくものである。

弘津陽介 研究員

第 55 回 日本癌治療学術集会 優秀演題賞

JDDW 2018 若手奨励賞

第 17 回 日本臨床腫瘍学会 奨励賞

雨宮健司 臨床検査技師

第 26 回 日本遺伝子診療学会 奨励賞

3. 研修者が山梨県立中央病院ゲノム解析センターでの研修を希望した理由

研修者は 2018 年の第 16 回日本臨床腫瘍学会にて山梨県立中央病院ゲノム解析センターの演題のひとつ;『3 種臓器の横断的ゲノム解析による Multiple Cancers の診断』(発表者; 弘津陽介研究員)を拝聴し、その活動に興味をもった。2018 年 11 月に当科の熊谷融部長の許可を得て、同センターの見学に行かせて頂いた。その後、月 1 回行われる山梨県立中央病院内でのプレゲノムミーティング (Pre G-MTG) に参加のうえ、同院での研究データを供覧させていただき、ゲノム解析の実際を学ばせて頂いた。

同センターの活動はベッドサイドでのゲノム解析と言うべく、臨床現場と近い活動であることが大きな特徴と思われる。実際の幅広い臨床検体から患者さんの診療にあたっている医師が自分の手で核酸を抽出し、次世代シーケンサーにて遺伝子情報を解析するという現場に強く惹かれた。また、大阪国際がんセンターで眠っているオンコマイン Dx は山梨県立中央病院ゲノム解析センターで扱っている Thermo Fisher 社の次世代シーケンサーと同じ原理で動いており、同センターでの研修を通じて大阪国際がんセンターの次世代シーケンサーを動かし、臨床ゲノム情報を自施設内で抽出することができれば、診療に大きな奥行きが生まれるのではないかと感じた。これらの理由から山梨県立中央病院ゲノム解析センターでの研修活動を希望した。

4. 研修した内容・実績

研修の指導は小俣政男理事長、弘津陽介研究員、雨宮健司臨床検査技師の先生方に主にいただいた。実際の臨床検体の扱い、保存の仕方について弘津先生、雨宮先生から指導を頂いた。以下に研修した内容を個別に記載する。各種手順はそれぞれのプロトコルに従った。

- ・マイクロダイセクション法の実践（雨宮先生）

Arcturus LCM system を用いたパラフィン切片からのマイクロダイセクション法について習熟し、マイクロダイセクション法を取得した。

- ・臨床検体の扱い（雨宮先生）

液性検体として末梢血からの **buffy coat**、血漿の分離保存、各種体液の沈査、上清の分離保存について習熟した。また検体保存にあたり、匿名化のうえ、保存ソフトを用いて管理する方法を学んだ。

- ・各種検体からの核酸抽出（雨宮先生）

Buffy coat、体液沈査からは **QIAmp® DNA Blood Mini Kit** を用いて DNA を抽出し、血漿、上清からは **KingFisher Duo Prime** を使用して DNA を抽出し、パラフィン包埋切片については **Gene Read™ DNA FFPE Kit** を使用して DNA を抽出した。

- ・DNA の品質評価（雨宮先生）

DNA の濃度については **Buffy coat**、体液沈査からのものは **NanoDrop2000** を用い、血漿、上清からのものは **Qubit® assay** を用い、パラフィン包埋切片については **TaqMan® RNase P detection Kit** を用いて、ホルマリンによる DNA への障害の程度も含め検討した。

- ・次世代シーケンサーへのライブラリ作成（弘津先生）

十分な濃度と DNA が得られた検体に対して、ゲノム解析センターで作成した癌遺伝子パネルを用いて **multiplex PCR** を行い、プライマー配列の除去、アダプタライゲーションを行ったうえで、ライブラリ作成を行った。

- ・Ion Chef を用いたエマルジョン PCR（弘津先生）

Ion Chef を用いたエマルジョン PCR の原理について習熟し、次世代シーケンサーのための **Chip** 準備を行った。

- ・Ion Proton, PGM の準備、シーケンスまで（弘津先生）

次世代シーケンサーの作動準備を行い、シーケンスにかけるまでを行った。シーケンスデータの解析についてはゲノム解析センター内のサーバーで行い、その手順については今回の研修では習得には至らなかった。

・データの解釈（弘津先生）

弘津先生に解析していただいたデータを基に OncoKB, COSMIC などのデータベースを用いて、癌との関連性の評価法などを習熟した。また variant allele frequency の意味や正常組織（buffy coat）などを reference として用いることの意義を習熟した。

上記の指導内容を通じて研修期間中に以下の作業・工程を行った

細胞診検体からの DNA 抽出、ライブラリ作成 78 検体

Buffy coat、体液沈査からの DNA 抽出、ライブラリ作成 96 検体

血漿・体液上清からの DNA 抽出、ライブラリ作成 38 検体

パラフィン包埋切片からの DNA 抽出、ライブラリ作成 212 検体

DNA は全てゲノム解析センター内に保存し、ライブラリはシーケンスが成功した例については破棄している。

5. 研修内容の発表・論文文化について

小侯先生の御指導のもと、以下のプロジェクトを研修期間中に行った。またそれぞれについて学会発表・論文報告を行うように御指導頂き、それぞれについて現時点での予定を記載する。

1. 保存細胞診検体を用いた次世代シーケンサー解析の可の検討

→肺癌診療において、組織検体が使用できない場合に保存細胞診検体から癌細胞を引きはがし（peeling off）、そこからの DNA 抽出のうえ、次世代シーケンサー解析が行えるかどうかを検討した。

『Genome analysis of peeling archival cytology specimens successfully detects driver mutations in lung cancer』

として、論文作成完了し、投稿予定。

第 60 回呼吸器学会総会、第 109 回病理学会総会にてそれぞれ発表予定

2. 気管支液状検体を用いた次世代シーケンサー解析の検討

→肺癌診療ではいち早くドライバー変異を同定することが求められており、一度に複数のドライバー変異を同定できる癌遺伝子パネルとして、2019 年 10 月からオンコマイン Dx が臨床で初めて保険収載された。腫瘍組織の病理学診断を待たずに悪性細胞が含まれる気管支鏡液性検体で次世代シーケンサー解析が可能かどうかを検討した。

山梨県立中央病院の症例を対象に気管支鏡洗浄液の上清、沈査、腫瘍組織、細胞診検体からそれぞれ DNA を抽出し、次世代シーケンサー解析結果の一致率を検討した。

目標症例数 40 例としており、現在、21 例まで登録完了している。40 症例を目標に研修終了後も引き続き症例集積・解析を行っていく。

2020年4月頃に論文投稿を目標とする。

第60回呼吸器学会総会、第109回病理学会総会にてそれぞれ発表予定

3. EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者における Co-occurrence mutation の EGFR-TKI 効果への影響の検討

→山梨県立中央病院にて第1世代 EGFR-TKI で治療された症例を対象に肺癌遺伝子パネルで解析した Co-occurrence mutation が EGFR-TKI の効果にどのように影響するかを解析した。

2011～2018年の山梨県立中央病院で EGFR-TKI の治療を受けた症例 71 症例のうち、遺伝子パネル解析が可能であった 42 症例を対象に解析した。

現時点で 28 症例解析終了しており、EGFR 遺伝子変異のほかに Oncogenic mutation を有する症例では EGFR-TKI の効果が有意に低下していることがわかった。

残りの症例の解析を行ったうえで、報告する。

2019年内に論文投稿予定。

第60回肺癌学会学術集会にて後藤先生から、第111回肺癌学会関西支部学術集会にて研修者が内容を報告する予定。

4. EGFR 遺伝子変異陽性肺癌における PD-L1 高低でのドライバー変異の違いの検討

→大阪国際がんセンター、山梨県立中央病院の EGFR 遺伝子変異を有し、PD-L1 の染色性に大きな差がある検体 10 検体をマイクロダイセクションし、PD-L1 の染色性の違いの背景に遺伝子変異の違いが存在するかどうかを解析した。

*同研究については大阪国際がんセンター内倫理委員会にて承認済

10 症例、20 検体の肺癌遺伝子パネル（肺癌関連 53 遺伝子）の解析を終了しており、PD-L1 の発現の差の背景に遺伝子変異の違いは存在しなかった。各部位におけるリンパ球浸潤を解析したところ、PD-L1 高発現部位で優位にリンパ球浸潤が高い傾向があった。遺伝子変異の解析については全エクソンシーケンスは行っていないが、major なドライバー変異については差は存在せず、リンパ球浸潤が癌抗原の違いによるものかどうかはわからないが、その影響により PD-L1 発現に差が生じている可能性が示唆された。

上記内容にて論文作成中。2019年内に論文投稿予定。

5. De novo 肺小細胞癌を有した EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の一症例の解析

→大阪国際がんセンターにて EGFR 遺伝子変異 (Ex.19 del) を有し、EGFR-TKI 投与がない状況下で腫瘍内に肺小細胞癌成分を有した症例を経験した。

肺小細胞癌化は EGFR-TKI 耐性機序として報告されているが、稀に de novo で小細胞癌成分を有する症例があることが報告されている。

本症例では肺小細胞癌部をマイクロダイセクションし、肺腺癌部との遺伝子変異の違いを肺癌遺伝子パネルで解析を行った。遺伝子パネルの解析では肺小細胞癌部、肺腺癌部共に *EGFR*, *TP53* の 2 つの遺伝子変異を認めるのみであり、その違いは認めなかった。更に全エクソームシーケンスを行ったところ、肺小細胞癌部にて遺伝子変異を 81 変異、肺腺癌部にて 57 変異認めた。これらの変異のうち、共通した変異は 17 変異であり、その中に *EGFR*, *TP53* の変異を認めた。

全ての変異のうち、OncoKB に登録されている遺伝子変異を検索したところ、肺腺癌部では登録された遺伝子変異はなく、肺小細胞癌部では *SMG1*, *CDK8*, *RUFY1* の変異を認めた。中でも *SMG1* は癌抑制遺伝子としての機能が知られており、同遺伝子変異が肺小細胞癌化にかかわった可能性が示唆された。

上記内容にて論文作成中（症例報告）。2019 年内に投稿予定。

6. 卵巣転移巣にて *EGFR* C797S 変異による耐性をきたした *EGFR* G719S 変異陽性肺癌患者の解析

→山梨県立中央病院における症例で、*EGFR*G719S 変異を有し Afatinib を投与された症例で、2 年の投与の後に卵巣転移巣の増大をきたし、同病変を切除した症例において、肺原発巣と卵巣転移巣においてそれぞれ **multiregional sequence** を行い、遺伝的腫瘍内不均一性(ITH)を評価した。それにより、肺原発巣内の *SMARCA4*R1192C 変異を有するクローンが卵巣に転移し、そこで *EGFR*C797S 変異を獲得したものと考えられた。

上記内容にて論文を投稿中(Ann Oncol, JTO reject)。引き続き投稿を続ける

同内容は第 60 回呼吸器学会総会にて発表を予定

現在のところ、上記 6 演題をそれぞれ論文発表、学会報告予定である。

また、呼吸器グループの後藤先生より研修期間中に invited review 執筆と肺癌ゲノムデータベース解析の機会を頂き、それぞれ論文を作成している。

指導教官の小俣先生より、10 報の論文作成目標課題を頂いており、研修終了後も引き続き、週末などを利用して研究に取り組み、山梨県立中央病院ゲノム解析センターでの活動を 10 報残したいと思っている。

6.大阪国際がんセンターでの診療にいかにかかすか

研修期間を通じて Ion Proton を中心とした次世代シーケンサーの解析について習熟した。2019 年 11 月から大阪国際がんセンター呼吸器内科に復帰するが、この研修で得たものを

活かして、同センターでのオンコマイン Dx の院内運用の可能性を検討したい。臨床検査科の山崎主任部長、呼吸器内科の熊谷主任部長と相談のうえ、大阪国際がんセンター内でオンコマイン Dx を運用していくことの経済的メリット、臨床的メリットを検討したいと思っている。今後、他の保険収載される次世代シーケンサーを用いた検査も生まれてくると思われる。院内での運用が難しいとしても、癌診療においてゲノムを扱っていくことは今後、必要になっていくものと考えます。

山梨県立中央病院の小俣先生からは、データベースの作成、バイオバンクの作成の重要性についてもご指導いただいた。大阪国際がんセンターには豊富な肺癌症例があり、それらの臨床検体を保存していき、将来の解析、研究に役立てるようなバイオバンク、データベースの構築を呼吸器内科、呼吸器外科、病理細胞診断科と連携のうえ行っていきたいと考えている。

更に小俣先生からは論文執筆についてその必要性を強くご指導を頂いた。臨床検体を用いて検査・解析を行い、その結果を少数であっても、そこから導かれる所見を論文として残すことが大切だと強く指導していただいた。これまでよりもより熱心に論文執筆を行い、日々の臨床活動の中から得られた発見を形にしていきたいと思っている。

7.謝辞

今回、休職のうえ山梨県立中央病院での研修機会を与えてくださった、大阪国際がんセンター 松浦成昭 総長、左近賢人 院長、熊谷融 呼吸器内科主任部長に心より感謝を申し上げます。休職期間中、私の患者さんを代診してくださった、呼吸器内科 西野和美 副部長、久原華子 副部長、田宮基裕 医長、井上貴子 医長、河内勇人 レジデント、九野貴華 レジデント、腫瘍内科 大塚倫之 医長、西野美奈子 医長には多大な負担をかけたこと、診療面での負担を増やしたことをお詫び申し上げます。

研修を受け入れてくださり、格別の御指導、院内に宿泊室を準備してくださるという御高配をいただいたことに対して、小俣政男 理事長、神宮寺禎巳 院長、中込博 副院長に心より感謝申し上げます。ゲノム解析センター 弘津陽介 研究員、雨宮健司 臨床検査技師には懇切丁寧に核酸の扱い方、次世代シーケンサーの扱い方を御指導頂きました。呼吸器病センター 後藤太一郎 センター長、宮下義啓 センター統括部長をはじめ、呼吸器病センターのスタッフの先生方には臨床検体の使用に際し、並々ならぬご協力を頂いたこと、こころより感謝申し上げます。

これらの恩顧に報いるためにも、大阪国際がんセンターでのゲノム診療の礎を築き、山梨県立中央病院での成果を論文として報告するよう努力いたします。ありがとうございました。