Copy number estimation algorithms and fluorescence in situ hybridization to describe copy number alterations in human tumors

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 雅也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/801

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第　５３９号	学位授与年月日	平成２１年　３月１８日
氏　　名	鈴　木　雅　也		
論文題目	Copy number estimation algorithms and fluorescence *in situ* hybridization to describe copy number alterations in human tumors (コピー数推定アルゴリズムおよび蛍光分子交雑法を用いたヒト腫瘍におけるコピー数変化の記述)		

博士（医学） 鈴 木 雅 也

論文題目

Copy number estimation algorithms and fluorescence in situ hybridization to describe copy number alterations in human tumors

（コピー数推定アルゴリズム及び蛍光分子交雑法を用いたヒト腫瘍におけるコピー数変化の記述）

論文内容の要旨

［はじめに］

腫瘍組織と正常組織の間で腫瘍化に伴いコピー数が変化することが知られている。腫瘍化に伴う遺伝子変化を解析する際、そのコピー数変化を同定することは極めて重要である。近年、高解像度のゲノム網羅的マイクロアレイプラットホームを使用して、腫瘍におけるコピー数の変化を全ゲノム領域において評価することが行われ始めた。膨大な各染色体部位のシグナル強度データから、正常組織と比較した腫瘍組織における相対的な染色体領域の変化を推定する数学的手法が必要であり、いくつかのコピー数推定アルゴリズムが開発されている。本研究の目的は、2 つのコピー数推定アルゴリズムの特徴を比較し、腫瘍組織のゲノムコピー数を推定する際の留意点を明らかにすることである。さらに、またゲノム網羅的なコピー数解析の結果の確認に使用されることが多い蛍光分子交雑法 (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) 法を多数の染色体部位について施行し、その部位における腫瘍組織のコピー数変化を精査した。2 つのコピー数推定アルゴリズムは、いずれも比較的汎用されているものであるが、その推定能力の特徴には違いがあり、両者を実際に用いて腫瘍細胞中の染色体増幅、欠失などを同定する場合、重要な情報となると期待される。

［材料ならびに方法］

今回使用したアルゴリズムは本邦で開発され、比較的汎用されている GEnotyping Microarray based CNV Analysis (GEMCA) と Copy Number Analyzer for Affymetrix GeneChip mapping (CNAG) であり、いずれも、アフィメトリクス社の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) マイクロアレイによるデータを利用して開発されたアルゴリズムである。ともに、開発者などから、ダウンロードをする許可を得て使用した。対象にした症例は、胃組織における印環細胞がん症例（47 歳、女性）の腫瘍組織及び正常胃組織、及び気管支における悪性黒色腫（47 歳、男性）の腫瘍組織及び正常末梢血で、定法に従って各組織の DNA を抽出した。各症例における腫瘍組織及び非腫瘍組織の DNA について、アフィメトリクス社の NSP 250 K マイクロアレイを用い、ゲノム網羅的に 262, 217 箇所の各 SNP 多型の 2 つのアレルのシグナル値を測定した。各アレルにおいて、生のシグナル値にはノイズが含まれているため、ノイズの除去機能を有する GEMCA アルゴリズム及び CNAG アルゴリズムを用いてノイズを除去した。ノイズを除去したシグナル値から増幅（3 コピー以上、GEMCA: ＞ 1.197、CNAG: ＞ 0.365）、欠失 （1 コピー以下、GEMCA: ＜ 0.754、CNAG: ＜ -0.490）及び変化なし（2 コピー, GEMCA: ≥ 0.754 かつ ≤ 1.197、CNAG: ≥ -0.490 かつ≤ 0.365）の 3 つの範囲に分類し、ゲノム網羅的にアルゴリズム間のシグナル値及びコピー数推定値の変化を比較した。上記症例の腫瘍組織に対して、代表的な 84 箇所の常染色体のゲノム領域に対応する Bacterial Artificial Chromosome (BAC) プローブを選択して FISH 解析を行った。BAC プローブ上の SNP について 2 つのアルゴリズムのシグナル値及びコピー数推定値の変化を比較した。

［結果］

マイクロアレイの多型同定成功率を示すコールレートは、印環細胞がん組織と正常胃組織ではそれぞれ 97.67 %及び 97.22 %、悪性黒色腫組織と末梢血ではそれぞれ 94.41 %及び 97.0 %であった。この結果は SNP マイクロアレイ実験データが信頼に足ることを示す。2 つの症例において、各コピー数推定アルゴリズムの結果を増幅、欠失及び変化なしで分類した場合、χ^2 検定結果では有意な違い (P <0.05)が見られた。アルゴリズム間の一致率は印環細胞がん症例では 85.4%（増幅: 1.4%、欠失: 0.0%、変化なし: 84.0%）、悪性黒色腫症例では 75.1%（増幅: 7.0%、 欠失: 1.1%、 変化なし: 67.0%）であった。各コピー数推定アルゴリズムでともに同等な変化を示した領域についても複数同定可能であった。BAC プローブ上の SNP のなかで、一つでもコピー数推定アルゴリズム間で完全に異なるコピー数変化を示した BAC プローブの頻度は、印環細胞がん症例では 5/19 (26.3 %)及び悪性黒色腫症例では、14/65 (21.4 %)であった。FISH 法と各コピー数推定アルゴリズム間の一致率は、印環細胞がん症例では GEMCA:5/19 (26.3 %)及び CNAG:12/19 (63.2 %) 悪性黒色腫症例では GEMCA:32/65 (49.2%)及び CNAG:39/65 (60.0 %)であり、総計: 37/84 (44.0%) 及び 51/84 (60.7 %)であった。

［考察］

GEMCA は最低一つの SNP についてコピー数変化を鋭敏に検出することができ、一方 CNAG は連続した SNP のコピー数の同一な変化をクラスター状に検出することができることが分かった。また、GEMCA の方が CNAG よりも狭いゲノム領域の欠失については鋭敏に検出できる特徴を持っていると考えた。アルゴリズム間のコピー数の違いは、①回帰モデル式の項目数及び次数の構成及び決定法、②推定法、③ノイズ除去の際に使用している共変量、④増幅及び欠失を定義するシグナル値の範囲の違いに起因するものと考えた。FISH 法の結果とコピー数アルゴリズムの不一致領域は、体細胞再配列化などが起こっている可能性、あるいは BAC プローブの感度の問題と考えた。従来のアレイ comparative genomic hybridization 研究で比較された FISH 法との一致率に比べて、今回の一致率の方が高く、250K SNP マイクロアレイの高解像度の優位性が示された。今回使用したコピー推定アルゴリズムの特徴を理解しながら使用していき、双方のアルゴリズムで異なるコピー数が推定された領域については、FISH 法を併用することによって、腫瘍細胞のゲノム状態の変化をより正確に把握することが可能になり医療現場でも有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

［はじめに］

腫瘍病理学の分野では近年、腫瘍ゲノムを網羅的に解析し、そこでの変化をもとに治療戦略を構築する作業が行われている。その際、網羅的に何万ものシグナルを得るばかりでなく、それを数学的に処理して、得たい情報を明確にするという作業が必要になる。腫瘍におけるコピー数の変化を全ゲノム領域において評価するわけであるが、膨大な各染色体部位のシグナル強度データから、正常組織と比較した腫瘍組織における相対的な染色体領域の変化を推定するための複数のコピー数推定アルゴリズムが開発されている。本研究の目的は、よく使用されるが、いままで比較されたことのない、二つのコピー数推定アルゴリズムの特徴を比較し、腫瘍組織のゲノムコピー数を推定する際の留意点を明らかにすることである。さらに、またゲノム網羅的なコピー数解析の結果の確認に使用されることが多い蛍光分子交雑法 (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH)法を多数の染色体部位について施行し、その部位における腫

瘍組織のコピー数変化を精査し、あわせて、腫瘍のゲノム変化の評価法について論じたものである。

［材料ならびに方法］

今回使用したアルゴリズムは本邦で開発され、比較的汎用されているGEnotyping Microarray based CNV Analysis (GEMCA) とCopy Number Analyzer for Affymetrix GeneChip mapping (CNAG) であり、いずれも、アフィメトリクス社のSingle Nucleotide Polymorphism (SNP) マイクロアレイによるデータを利用して開発されたアルゴリズムである。ともに、開発者などから、ダウンロードをする許可を得て使用した。対象にした症例は、胃組織における印環細胞がん症例（47歳、女性）の腫瘍組織および正常胃組織、および気管支における悪性黒色腫（47歳、男性）の腫瘍組織および正常末梢血で、定法に従って各組織のDNAを抽出した。各症例における腫瘍組織および非腫瘍組織のDNAについて、アフィメトリクス社の*NSP* 250 Kマイクロアレイを用い、ゲノム網羅的に262, 217箇所の各SNP多型の2つのアレルのシグナル値を測定した。各アレルにおいて、生のシグナル値にはノイズが含まれているため、ノイズの除去機能を有するGEMCAアルゴリズムおよびCNAGアルゴリズムを用いてノイズを除去した。ノイズを除去したシグナル値から増幅（3コピー以上、GEMCA: ＞ 1.197、CNAG: ＞ 0.365）、欠失（1コピー以下、GEMCA: ＜ 0.754、CNAG: ＜ -0.490）および変化なし（2コピー, GEMCA: ≥0.754かつ≤ 1.197、CNAG: ≥-0.490かつ≤ 0.365）の3つの範囲に分類し、ゲノム網羅的にアルゴリズム間のシグナル値およびコピー数推定値の変化を比較した。上記症例の腫瘍組織に対して、代表的な84箇所の常染色体のゲノム領域に対応するBacterial Artificial Chromosome (BAC) プローブを選択してFISH解析を行った。BACプローブ上のSNPについて2つのアルゴリズムのシグナル値およびコピー数推定値の変化を比較した。

［結果と考察］

マイクロアレイの多型同定成功率を示すコールレートは、印環細胞がん組織と正常胃組織ではそれぞれ97.67 %および 97.22 %、悪性黒色腫組織と末梢血ではそれぞれ94.41 %および 97.0 %であった。この結果はSNPマイクロアレイ実験データが信頼に足ることを示す。2つの症例において、各コピー数推定アルゴリズムの結果を増幅、欠失および変化なしで分類した場合、χ^2検定結果では有意な違い (P <0.05) が見られた。アルゴリズム間の一致率は印環細胞がん症例では85.4%（増幅: 1.4%、欠失: 0.0%、変化なし: 84.0%）、悪性黒色腫症例では75.1%（増幅: 7.0%、 欠失: 1.1%、 変化なし: 67.0%）であった。各コピー数推定アルゴリズムで共に同等な変化を示した領域についても複数同定可能であった。BACプローブ上のSNPのなかで、一つでもコピー数推定アルゴリズム間で完全に異なるコピー数変化を示したBACプローブの頻度は、印環細胞がん症例では5/19 (26.3 %)および悪性黒色腫症例では、14/65 (21.4 %)であった。FISH法と各コピー数推定アルゴリズム間の一致率は、印環細胞がん症例ではGEMCA:5/19 (26.3 %)およびCNAG:12/19 (63.2 %) 悪性黒色腫症例ではGEMCA:32/65 (49.2%)およびCNAG:39/65 (60.0 %)であり、総計: 37/84 (44.0%) および51/84 (60.7 %)であった。

［結論］

申請者は、GEMCAの方がCNAGよりも狭いゲノム領域の欠失については鋭敏に検出できる特徴を持っていると結論した。コピー推定アルゴリズムの特徴を理解しながら使用していき、双方のアルゴリズムで異なるコピー数が推定された領域については、FISH法を併用することによって、腫瘍細胞のゲノム状態の変化をより正確に把握することが可能になり医療現場でも有用であると考えられた。

審査委員会は申請者の網羅的方法を病理現場で使用する際の問題点を明らかにした点を高く評価した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

1) この研究の際の被験者への同意の取り方について
2) この方法によるコピー数解析を医療現場へどのように応用するのか
3) 一致度の指標としてよく使用されるカッパ係数を用いなかったのはなぜか
4) 印環細胞がんの病理学的特徴について
5) なぜ、気管支原発の黒色腫例を用いたのか
6) コピー数変化のすでに知られている検体で評価をしたほうがいいのではないか
7) この研究の波及効果について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　　主査　木村　通男
　　副査　尾島　俊之　　蓑島　伸生