

総説：腫瘍学

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	5
スクリーニング	7
血漿中の癌由来DNAのスクリーニング	8
血漿中のRNAマーカーのスクリーニング	9
診断	10
全ゲノムリシーケンス	13
全エクソームシーケンス	14
ターゲットシーケンス	15
発現解析	17
FFPE試料	18
治療効果	19
転移および再発	21
抗癌剤開発	23
臨床試験	24
参考文献一覧	25

はじめに

癌の理想的な治療とは、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、かつ患者の寛容性が高い治療とされます。しかし、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ること、また患者の癌治療に対する寛容性には大きな個人差があることが、癌治療において困難な課題となっています。最近の文献からは、癌の遺伝学、テクノロジー、および治療開発における進歩により、癌の臨床判断が試行錯誤的な予測からエビデンスに基づくものへと変化している様子がうかがえます¹。

癌が進行するに従い、体細胞変異およびゲノム内の転座や再構成が蓄積します。このゲノム再構成の大部分は、癌細胞中の遺伝機構の機能障害による付随的な結果として生じるものです。このような変異は疾患の進行に重大な影響を与えるものではなく、よくパッセンジャー変異（2次におこる変異）と称されることがあります。一方、変異のうち少数のものは、薬剤耐性または転移を引き起こす可能性のあるドライバー変異であり、患者の予後に大きな影響を与える可能性があります²。ドライバー変異は有益な情報が得られるバイオマーカーであり、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。治療中のモニターを継続することで、治療効果および再発リスクを評価することも可能です³。

次世代シーケンサーは変異を決定するための非常に感度の高いツールであり、最近では利用しやすく、価格も手頃で強固な手法となっています。残された課題としては、特定の治療に対する感受性または耐性に関わる変異プロファイルを調べるために、綿密な臨床試験を行っていく必要性があります²。今後の研究では、さらに大規模なコホートにおける解析により、統計学的に強固な関連性が示され、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。究極的な目標は、これらの知識の蓄積により、臨床医が患者に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。

¹ 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 18: 382-384

² Dancy J. E., Bedard P. L., Onetto N. and Hudson T. J. (2012) The genetic basis for cancer treatment decisions. Cell 148: 409-420

³ Mardis E. R. (2012) Genome sequencing and cancer. Curr Opin Genet Dev 22: 245-250

レビュー

- Arnedos M., Andre F., Farace F., Lacroix L., Besse B., et al. (2012) The challenge to bring personalized cancer medicine from clinical trials into routine clinical practice: the case of the Institut Gustave Roussy. *Mol Oncol* 6: 204-210
- Blake P. M., Decker D. A., Glennon T. M., Liang Y. M., Losko S., et al. (2011) Toward an integrated knowledge environment to support modern oncology. *Cancer J* 17: 257-263
- Cancer Genome Atlas N. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490: 61-70
- Dancey J. E., Bedard P. L., Onetto N. and Hudson T. J. (2012) The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 148: 409-420
- Godley L. A. (2012) Profiles in leukemia. *N Engl J Med* 366: 1152-1153
- Longo D. L. (2012) Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N Engl J Med* 366: 956-957
- Mardis E. R. (2012) Genome sequencing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 22: 245-250
- 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
- Yap T. A., Gerlinger M., Futreal P. A., Pusztai L. and Swanton C. (2012) Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med* 4: 127ps110
- Yates L. R. and Campbell P. J. (2012) Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13: 795-806

リスクの予測

各腫瘍細胞ゲノムには、癌発症の可能性を増大させることが分かっている遺伝的なゲノム変異を背景として、ポイント変異から染色体転座まで様々な個々に特有の体細胞変異の蓄積が含まれています⁴。次世代シーケンサーではこれらの変異を一塩基対レベルの分解能で決定することが可能であり、その結果、新たに発見されるマーカーの数が著しく増加しています。マーカーおよび癌変異のリストは、癌ゲノムアトラス (TCGA)⁵、国際癌ゲノムコンソーシアム (ICGC)⁶ および癌における体細胞突然変異カタログ (COSMIC)⁷ 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。

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⁸ および結腸癌⁹ 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となります¹⁰。

De novo変異は、正常な核型においても存在する可能性があります。最近の研究により、急性骨髄性白血病 (AML) 遺伝子に見られる変異の大部分が、実際には造血前駆細胞 (HSPC) 中において癌の原因となる誘発変異が獲得される以前にランダムに発生する事象であることが示唆されています¹¹。

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があります¹²。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。さらに詳しい情報に関しては、本誌の診断セクションをご参照ください。

⁴ Mardis E. R. (2012) Genome sequencing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 22: 245-250

⁵ <http://cancergenome.nih.gov/>

⁶ <http://www.icgc.org/>

⁷ <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

⁸ Antoniou A. C., Wang X., Frederickson Z. S., 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

⁹ Pineda M., Gonzalez S., Lazaro C., Blanco I. and Capella G. (2010) Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res* 693: 19-31

¹⁰ 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

¹¹ Welch J. S., Ley T. J., Link D. C., Miller C. A., Larson D. E., et al. (2012) The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 150: 264-278

¹² 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

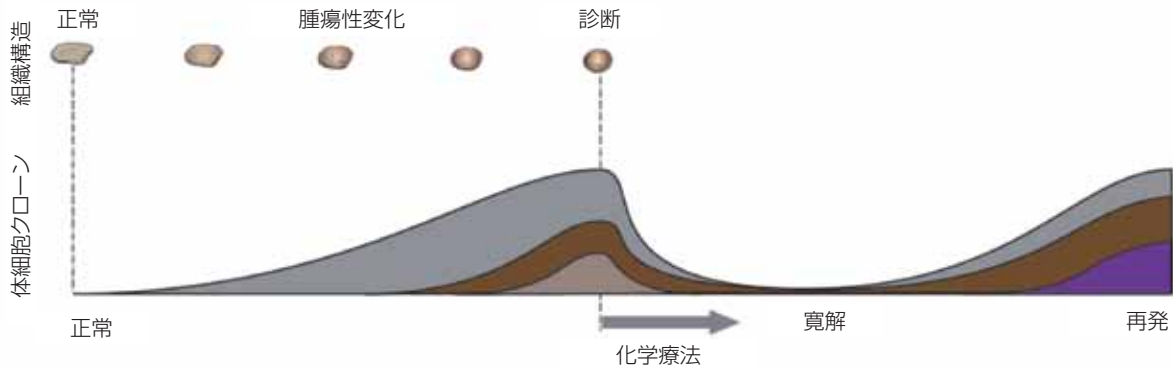
参考文献

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

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、一つの興味深い知見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。技術的な問題以外の要素も関係します。例えば、癌検出手法においては、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を示すことが必要となります。

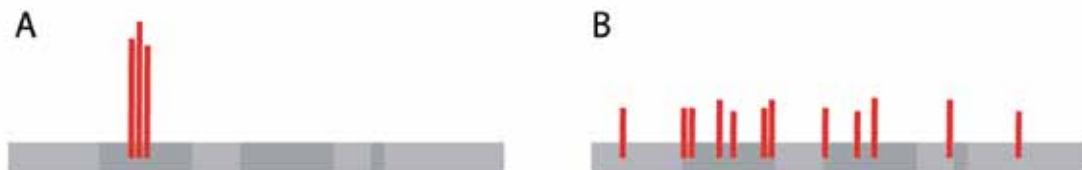
スクリーニング

多くの癌が致死性に進行するまでには数年、時には数十年もの時間の経過があり、このことは、形質転換した細胞を検出し根絶するのに多くの機会が存在することを意味しています¹³。形質転換した細胞の初期における特徴はわずかな新形態の発現ですが、このような変化は既存の病理学的方法では識別が困難です。このように確定的な診断方法が欠如している状況が治療を遅らせている可能性もあります¹⁴。次世代シーケンサーにより、癌特異的な変異を極めて初期の腫瘍細胞において、形態学的変化が現れる以前に正確に検出することができることが示されています¹⁵。



多くの場合、細胞の形態学的変化に先行して体細胞変異の蓄積が生じます。
化学療法を生き延びた細胞は、従来の病理学的方法では検出されず、再発時に主要なクローンとなる可能性があります。
上図中の灰色、茶色、薄茶色および紫色の部分はそれぞれ異なる変異を有するクローンを示しています。

いくつかの遺伝子においては、変異が同一位置において頻繁に生じることから、特定の機構が存在している可能性が示唆されます。しかし、大部分の遺伝子においては、変異が遺伝子の全域にわたってランダムに生じ得ることから、これらの変異は複製および修復機構の異常を反映している可能性があります。マイクロアレイでは変異の生じる位置をあらかじめ把握しておく必要があるため、このような*de novo*変異を見逃してしまう可能性があります。シーケンス解析では、これらいずれの変異も同じく容易に検出することができます。



2種類の異なる変異を有する2種類の仮想的遺伝子モデルを示しています。
濃色部分はエクソームを示し、赤色の棒線は変異の起こる場所を示しています。
パネルA: 特定の位置における変異の繰り返しは、変異の生成に生物学的機構が関与している可能性を示しています。
パネルB: 変異がP53等の遺伝子全域にわたって分散していることから、これらの変異が複製および修復機構の異常に起因している可能性が示されます。シーケンス解析ではいずれの場合の変異も検出することが可能です。

¹³ Brooks J. D. (2012) Translational genomics: the challenge of developing cancer biomarkers. *Genome Res* 22: 183-187

¹⁴ Godley L. A. (2012) Profiles in leukemia. *N Engl J Med* 366: 1152-1153

¹⁵ Walter M. J., Shen D., Ding L., Shao J., Koboldt D. C., et al. (2012) Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 366: 1090-1098

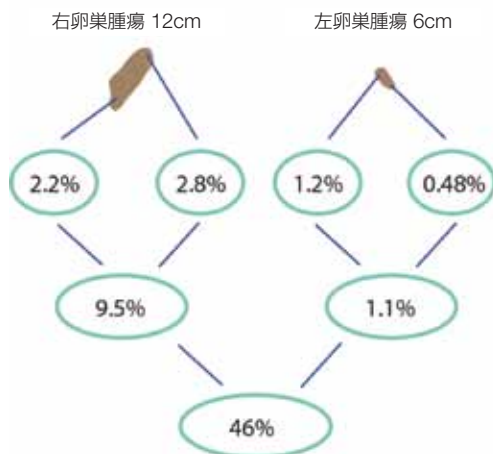
癌患者の血漿中における腫瘍由来のDNAの存在により、癌の非侵襲的な検出およびモニタリングが可能となります¹⁶⁻¹⁷。この方法は、検出およびアクセスが困難な腫瘍においては特に有用です¹⁸。

参考文献

Chan K. C., Jiang P., Zheng Y. W., Liao G. J., Sun H., et al. (2012) Cancer Genome Scanning in Plasma: Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single-Nucleotide Variants, and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. Clin Chem

著者らは、癌患者の血漿中におけるコピー数異常およびポイント変異の全ゲノムプロファイリングを報告しています。血漿中における腫瘍由来のDNAの濃度分画は、腫瘍サイズおよび外科的治療結果と相関していました。2種類の同期癌を有する患者の解析により、この手法の潜在的な有用性が示されています。

イルミナ技術：TruSeq® SBS Kit v2を使用した、HiSeq® 2000による51bpまたは76bpのペアエンドリード解析。
アダプターをライゲートしたDNAは、12サイクルPCRで増幅しました。



2種類の卵巢腫瘍の4つの領域からサンプルを採取しました。腫瘍由来の血漿DNAの濃度分画は、各卵巢腫瘍領域に関するSNVに基づいて推定しました。算出された血漿中の腫瘍DNAの濃度分画は、複数の腫瘍領域に関するSNVに基づいて推定した場合には増加しています。

Forshe T., Murtaza M., Parkinson C., Gale D., Tsui D. W., et al. (2012) Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. Sci Transl Med 4: 136ra168

著者らは、タグ付きアンプリコンのディープシーケンス (TAm-Seq) の癌パネルを使用して5995のゲノム塩基に関して低頻度変異のスクリーニングを行いました。その結果、循環血中DNAにわずか2%のアリル頻度で存在する癌変異が十分な感度と97%を超える特異度で同定されました。著者らは、複数の一次腫瘍が存在する患者における転移再発の起源をTAm-Seqを使用することにより非侵襲的に同定できることを示しました。さらに別の例において、著者らは初期の卵巢生検では発見されなかったEGFR変異を血漿中に検出しました。2%の感度は診断には十分ではありませんが、治療および再発の非侵襲的モニタリングに利用できる可能性があります。モニターアプリケーションにおいては、一次腫瘍由来のマーカー変異が既知であることが、データ解析およびターゲットパネルデザインを大きく簡略化します。

イルミナ技術：96種類のバーコード付きサンプルに関する平均深度3250リードでのGenome Analyzer_{IIx}による解析

¹⁶ Schwarzenbach H. (2012) Circulating nucleic acids and protease activities in blood of tumor patients. Expert Opin Biol Ther 12 Suppl 1: S163-169

¹⁷ Schwarzenbach H., Hoon D. S. and Pantel K. (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer 11: 426-437

¹⁸ Brooks J. D. (2012) Translational genomics: the challenge of developing cancer biomarkers. Genome Res 22: 183-187

最近の研究により、miRNAおよびmRNAが癌患者の血清およびその他の体液から単離可能であることが示されています。癌患者の無細胞循環体液中の特徴的なmiRNAプロファイルは、癌を検出およびモニタリングするための新しいクラスのバイオマーカーとなる可能性があります。

参考文献

Anindo M. I. and Yaqinuddin A. (2012) Insights into the potential use of microRNAs as biomarker in cancer. *Int J Surg* 10: 443-449

Mo M. H., Chen L., Fu Y., Wang W. and Fu S. W. (2012) Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer* 3: 432-448

Mosig R. A., Lobl M., Senturk E., Shah H., Cohen S., et al. (2012) IGFBP-4 tumor and serum levels are increased across all stages of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* 5: 3

Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., Li R., Deng Q., et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777-782

ゲノムDNA単離に使用されるすべての腫瘍片には、間質細胞、血管および免疫細胞のような正常細胞が含まれており、このため腫瘍細胞由来のDNAには正常なゲノムDNAが含まれます。従来の病理学的推定に基づいて、ほとんどの研究では腫瘍核が60%を超える頻度で存在する腫瘍に焦点を当てています¹⁹。正常なゲノムDNAが混在していることに加え、さらに腫瘍自体が異種性である可能性もあります。このようなケースは特に進行期の癌において多く見られ、変異の蓄積によって、それぞれ独特の薬剤反応性を有する複数の腫瘍からなるポリクローナルな腫瘍が形成されます。腫瘍が高度に異種性である場合には、すべての細胞型を同定するために複数回の生検が必要となる場合もあります²⁰。

ポリクローナルな腫瘍

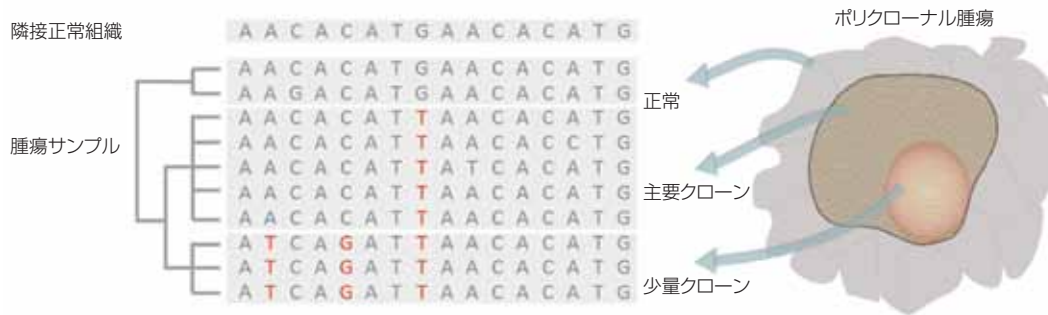


正常組織をバックグラウンドとする仮想的なポリクローナル腫瘍。
ほとんどすべての腫瘍サンプルには腫瘍細胞と正常細胞の混合体が含まれています。
腫瘍自体が複数の異なるクローンタイプを含んでいる可能性もあり、
それぞれのクローンタイプが異なる治療反応性および再発可能性を有する場合があります。

次世代シーケンサーによるディープシーケンスとは、同一領域を複数回、時には数百回シーケンスすることを意味しています。すべてのシーケンスは単一のDNA分子から生成されるため、ディープシーケンスでは本来のサンプルの含有量がわずか1%であるクローンの検出が可能となります。同一個人からの腫瘍組織および正常組織のシーケンスを比較することにより、正常組織の同定が容易となります。現在、正常ゲノムに関しては最低40倍のカバレッジが、癌ゲノムに関しては80倍のカバレッジが一般的に推奨されています。最適なリード深度は癌のタイプおよび必要とされる感度によって異なります。

¹⁹ Mardis E. R. (2012) Genome sequencing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 22: 245-250

²⁰ 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



2種類の癌クローンを有し、隣接組織に浸潤している腫瘍の仮想例です。
 腫瘍サンプル中の正常細胞により生成されるシーケンス(腫瘍サンプルの上部2段のシーケンス)は、隣接する正常細胞から生成されるシーケンスと比較することにより同定することが可能です。
 腫瘍サンプル中の残りのシーケンスは、主要な腫瘍クローンおよび少量の腫瘍クローンの2つのグループに分けることができます。少量クローンは、治療を施さずに放置すると、再発時に腫瘍の主要成分となる可能性があります。実際の解析では、腫瘍サンプルには最低40倍のカバレッジを用い、ターゲット遺伝子、全エクソームまたは全ゲノムをカバーします。

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下表に簡潔にまとめてあります。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タセットの取り扱いや解析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。当面は、癌パネルなどターゲットシーケンスによってすでに市販されている薬剤を患者にマッピングすることが可能で、これにより患者は薬剤の恩恵を直接受けることができるようになります²¹⁻²²。癌パネルを使用したスクリーニングで診断できなかった患者については、全ゲノムシーケンスまたは全エクソームシーケンスを使用してより包括的にスクリーニングすることが可能となります。

²¹ 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

²² 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 18: 382-384

方法	利点	欠点
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 • 疾患に関する予備知識を必要としない 	<ul style="list-style-type: none"> • 高価 • 膨大なデータセットの解析が困難 • 知見が実用不可能な場合もある • 偶発的発見の危険性 • 深度の低いシーケンスはターゲットアプローチよりも低感度
全エクソームシーケンス	<ul style="list-style-type: none"> • 全ゲノムシーケンスの約半分のコスト • データセットが小さく解析が容易 • 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 • インデルおよびSNPを検出 • 疾患に関する予備知識を必要としない • レアクローンに関する高感度なディープシーケンス 	<ul style="list-style-type: none"> • ゲノムのわずか1%~1.5%しかシーケンスされない • 融合遺伝子および癌遺伝子を見落とす可能性がある²³ • 知見が実用不可能な場合もある • 偶発的発見の危険性
ターゲットシーケンス	<ul style="list-style-type: none"> • 高い費用効率 • 結果の解析が容易 • 知見を癌関連遺伝子に実用可能 • 低頻度クローンに関する超高感度な超ディープシーケンス 	<ul style="list-style-type: none"> • 多くの変異の見落とし • 対象とする遺伝子の予備知識が必要 • パネルに含まれない稀な腫瘍の患者の診断を遅らせる

²³ 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

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異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、仮設を必要としない発見を可能とする優れた方法です。

参考文献

Berger M. F., Hodis E., Heffernan T. P., Deribe Y. L., Lawrence M. S., et al. (2012) Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. Nature 485: 502-506

ここでは、全ゲノム次世代シーケンサーを候補遺伝子の発見に利用し、続いて大規模コホートのターゲットシーケンスを行う例が示されています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx} およびHiSeq 2000を使用した、32~65bpのハプロイドカバレッジによる、101bpのペアエンドリード解析

Zhang J., Ding L., Holmfeldt L., Wu G., Heatley S. L., et al. (2012) The genetic basis of early Tcell 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_{IIx} による101bpペアエンドリード解析

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

Ellis M. J., Ding L., Shen D., Luo J., Suman V. J., et al. (2012) Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. Nature 486: 353-360

Govindan R., Ding L., Griffith M., Subramanian J., Dees N. D., et al. (2012) Genomic landscape of nonsmall cell lung cancer in smokers and never-smokers. Cell 150: 1121-1134

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%に相当する領域にのみ焦点を当てるため、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多数存在しています²⁴⁻²⁵。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²⁶。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ります²⁷。

参考文献

Curtis C., Shah S. P., Chin S. F., Turashvili G., Rueda O. M., et al. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486: 346-352

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

Grasso C. S., Wu Y. M., Robinson D. R., Cao X., Dhanasekaran S. M., et al. (2012) The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487: 239-243

Koboldt D. C., Zhang Q., Larson D. E., Shen D., McLellan M. D., et al. (2012) VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 22: 568-576

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* 20: 999-1003

Lohr J. G., Stojanov P., Lawrence M. S., Auclair D., Chapuy B., et al. (2012) Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3879-3884

Zang Z. J., Cutcutache I., Poon S. L., Zhang S. L., McPherson J. R., et al. (2012) Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. *Nat Genet* 44: 570-574

²⁴ Gilissen C., Hoischen A., Brunner H. G. and Veltman J. A. (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 20: 490-497

²⁵ Majewski J., Schwartztruber J., Lalonde E., Montpetit A. and Jabado N. (2011) What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48: 580-589

²⁶ Waters H. (2012) New NIH genetics center focuses its lens on exome, despite doubts. *Nat Med* 18: 8

²⁷ 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

ターゲットシーケンス

ターゲットシーケンスでは、予備知識に基づき、限られたセットの遺伝子のみを焦点を当てます。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²⁸⁻²⁹。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。

癌パネルの例³⁰

遺伝子マーカー	アプリケーション	薬剤
BCR-ABL	Ph+CML ; Ph+ALL	イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ
BCR-ABL/T315I	抗BCR-ABL薬への耐性	イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ
BRAF V600E	転移性黒色腫	ベムラフェニブ
BRCA1/2	BRCA1/2変異を有する、転移性卵巣癌および乳癌	オラパリブ、ベリパリブ、イニパリブ
c-Kit	Kit (CD117) 陽性の悪性GIST	イマチニブ
EGFR	局所進行性、切除不能または転移性NSCLC	エルロチニブ、ゲフィチニブ
EGFR T790M	進行性NSCLCにおけるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性	エルロチニブ、ゲフィチニブ
EML4-ALK	本融合遺伝子を有する転移性NSCLCに関するALKキナーゼ阻害剤	クリゾチニブ
HER2増幅	HER2陽性乳癌または転移性胃腺癌あるいは胃食道接合部腺癌	トラスツズマブ
KRAS	転移性結腸直腸癌におけるEGFR抗体に対する耐性	セツキシマブ、パニツムマブ
PML/RAR	急性前骨髄球性白血病	ATRA、三酸化ヒ素
TPMT	欠損は骨髄毒性のリスク上昇に関連	メルカプトプリン、アザチオプリン
UGT1A1	UGT1A1*28に関するホモ接合性は毒性のリスクと関連	イリノテカン
DPD	欠損は重篤な毒性のリスクに関連	5-フルオロウラシル

ATRA、オールトランスレチノイン酸; Ph+, フィラデルフィア染色体陽性; DPD、ジヒドロピリジンデヒドロゲナーゼ; EGFR、上皮増殖因子受容体; EML4-ALK、棘皮動物微小管関連タンパク質様4-未分化リンパ腫キナーゼ融合遺伝子; HER2、ヒト上皮成長因子受容体2; GIST、消化管間質腫瘍; ALL、急性リンパ性白血病; NSCLC、非小細胞肺癌; TPMT、チオプリンS-メチルトランスフェラーゼ。

²⁸ 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

²⁹ Govindan R., Ding L., Griffith M., Subramanian J., Dees N. D., et al. (2012) Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. Cell 150: 1121-1134

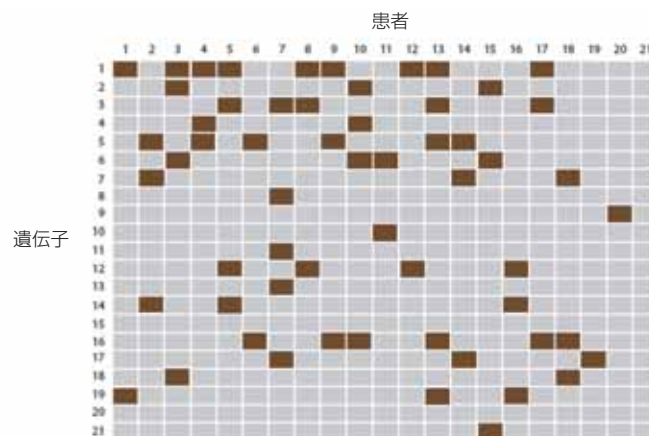
³⁰ Dancey J. E., Bedard P. L., Onetto N. and Hudson T. J. (2012) The genetic basis for cancer treatment decisions. Cell 148: 409- 420

参考文献

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* 18: 382-384

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（NSCLC）のホルマリン固定パラフィン包埋（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）



仮想的癌パネル。茶色部分は変異遺伝子を示しています。同一の癌タイプにおいて、異なる遺伝子が影響を受けています。

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度はそれぞれ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、稀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

Gerstung M., Beisel C., Rechsteiner M., Wild P., Schraml P., et al. (2012) Reliable detection of subclonal single-nucleotide variants in tumour cell populations. *Nat Commun* 3: 811

Govindan R., Ding L., Griffith M., Subramanian J., Dees N. D., et al. (2012) Genomic landscape of nonsmall cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* 150: 1121-1134

Pritchard C. C., Smith C., Salipante S. J., Lee M. K., Thornton A. M., et al. (2012) ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. *J Mol Diagn* 14: 357-366

Wagle N., Berger M. F., Davis M. J., Blumenstiel B., Defelice M., et al. (2012) High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov* 2: 82-93

発現解析

遺伝子発現パターンの動的性質に加え、組織処理中のRNAの不安定さのため、RNAベースの診断の開発は困難な課題となっています³¹。しかし、癌の診断および治療において、遺伝子変異の解釈の向上に発現解析が重要な役割を果たす可能性についての認識は高まっています。例えば：

パッセンジャー変異とドライバー変異の識別。発現されていない遺伝子における変異は疾患の進行に影響を与える可能性が低く、恐らくパッセンジャー変異であると考えられます。反対に、高度に発現されている異常または融合遺伝子は、疾患の進行に影響を与えるドライバー変異である可能性が非常に高くなります³²。

活性化変異と不活性化変異の識別。ある種の遺伝子変異においては、治療薬の選択が遺伝子の活性化状態に大きく依存する可能性があります³³⁻³⁴。高度に発現されているターゲット遺伝子が阻害性薬剤を必要とする一方で、同一のターゲット遺伝子でも機能損失の変異が生じている場合には活性化薬剤が必要となります。

参考文献

Lee C. H., Ou W. B., Marino-Enriquez A., Zhu M., Mayeda M., et al. (2012) 14-3-3 fusion oncogenes in high-grade endometrial stromal sarcoma. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 929-934

著者らは、従来の細胞遺伝学的手法および全トランスクリプトームシーケンスにより、形質転換している14-3-3腫瘍性タンパク質を同定しました。臨床的に侵襲的な子宮肉腫である、高悪性度の子宮内膜間質肉腫（ESS）における再発遺伝子機構が同定されました。これは、mRNA Seqによる融合遺伝子の同定を示す好例です。

イルミナ技術：Genome Analyzer II

Curtis C., Shah S. P., Chin S. F., Turashvili G., Rueda O. M., et al. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486: 346-352

Fountzilias E., Markou K., Vlachtsis K., Nikolaou A., Arapantoni-Dadioti P., et al. (2012) Identification and validation of gene expression models that predict clinical outcome in patients with early-stage laryngeal cancer. *Ann Oncol* 23: 2146-2153

Ju Y. S., Lee W. C., Shin J. Y., Lee S., Bleazard T., et al. (2012) A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res* 22: 436-445

Rudin C. M., Durinck S., Stawiski E. W., Poirier J. T., Modrusan Z., et al. (2012) Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet* 44: 1111-1116

Scrima M., De Marco C., Fabiani F., Franco R., Pirozzi G., et al. (2012) Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS ONE* 7: e30427

³¹ Rodriguez-Gonzalez F. G., Mustafa D. A., Mostert B. and Sieuwerts A. M. (2012) The challenge of gene expression profiling in heterogeneous clinical samples. *Methods*

³² Schwartzenuber J., Korshunov A., Liu X. Y., Jones D. T., Pfaff E., et al. (2012) Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482: 226-231

³³ Cancer Genome Atlas N. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490: 61-70

³⁴ Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R. A., et al. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139

臨床サンプル、特に針生検および針吸引により得られるサンプルは、一般的にそのサイズが限られています。試験に使用することができる組織の量が限られている場合には、病理学用の組織スライドの調製が先ず行われます。このため、シーケンスに利用することのできる唯一のサンプルはFFPE試料由来のサンプルとなります³⁵。新鮮なFFPE試料は、適切な採集および保存条件が使用されている場合には、優れた結果を与えることが可能です³⁶。

参考文献

Wagle N., Berger M. F., Davis M. J., Blumenstiel B., Defelice M., et al. (2012) High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov* 2: 82-93

著者らは、FFPE腫瘍試料における遺伝子変異の同定法として、シーケンスベースの方法を報告しています。これらの研究により腫瘍学におけるターゲットシーケンスの実行可能性および臨床的利用性が確認されています。

イルミナ技術：HiSeqシステムによる100bpペアエンドリード解析

Adams M. D., Veigl M. L., Wang Z., Molyneux N., Sun S., et al. (2012) Global mutational profiling of formalin-fixed human colon cancers from a pathology archive. *Mod Pathol* 25: 1599-1608

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

Frankel A. (2012) Formalin fixation in the '-omics' era: a primer for the surgeon-scientist. *ANZ J Surg* 82: 395-402

Gravendeel L. A., de Rooij J. J., Eilers P. H., van den Bent M. J., Sillevius Smitt P. A., et al. (2012) Gene expression profiles of gliomas in formalin-fixed paraffin-embedded material. *Br J Cancer* 106: 538-545

How Kit A., Nielsen H. M. and Tost J. (2012) DNA methylation based biomarkers: Practical considerations and applications. *Biochimie* 94: 2314-2337

Kotorashvili A., Ramnauth A., Liu C., Lin J., Ye K., et al. (2012) Effective DNA/RNA co-extraction for analysis of microRNAs, mRNAs, and genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *PLoS ONE* 7: e34683

Ma R., Yan W., Zhang G., Lv H., Liu Z., et al. (2012) Upregulation of miR-196b confers a poor prognosis in glioblastoma patients via inducing a proliferative phenotype. *PLoS ONE* 7: e38096

Rentoft M., Coates P. J., Laurell G. and Nylander K. (2012) Transcriptional profiling of formalin fixed paraffin embedded tissue: pitfalls and recommendations for identifying biologically relevant changes. *PLoS ONE* 7: e35276

Sinicropi D., Qu K., Collin F., Crager M., Liu M. L., et al. (2012) Whole transcriptome RNA-Seq analysis of breast cancer recurrence risk using formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue. *PLoS ONE* 7: e40092

Vui-Kee K., Mohd Dali A. Z., Mohamed Rose I., Ghazali R., Jamal R., et al. (2012) Molecular markers associated with nonepithelial ovarian cancer in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens by genome wide expression profiling. *Kaohsiung J Med Sci* 28: 243-250

Wagle N., Berger M. F., Davis M. J., Blumenstiel B., Defelice M., et al. (2012) High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov* 2: 82-93

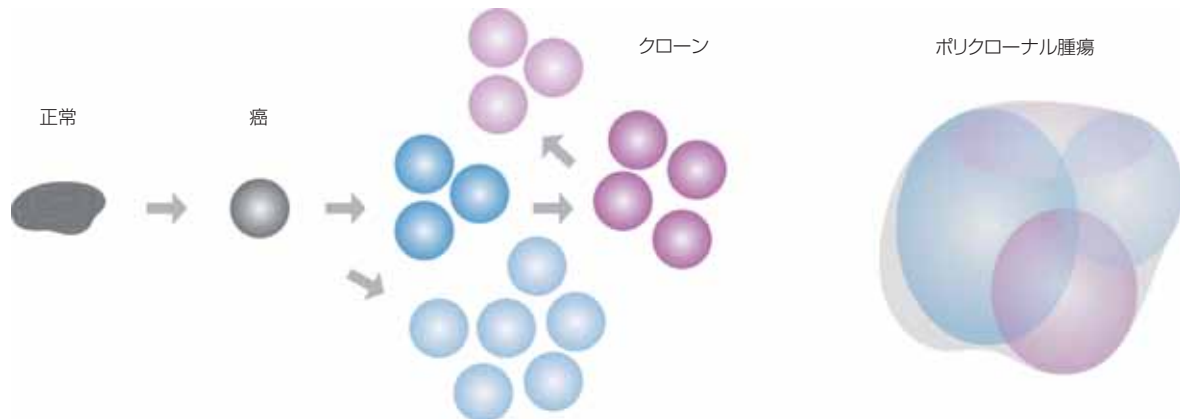
Yost S. E., Smith E. N., Schwab R. B., Bao L., Jung H., et al. (2012) Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Res* 40: e107

³⁵ Corless C. L. and Spellman P. T. (2012) Tackling formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue with next-generation sequencing. *Cancer Discov* 2: 23-24

³⁶ Yost S. E., Smith E. N., Schwab R. B., Bao L., Jung H., et al. (2012) Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Res* 40: e107

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法です。異なる薬剤感受性を有する複数の分子機構が、同一の臨床的症状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³⁷。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きます。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³⁸。



腫瘍内の異種性。体細胞変異が蓄積され続ける結果、異種性のポリクローナル腫瘍が形成され、同一腫瘍内において異なるクローンが異なる治療反応性を示す可能性が生じます。

参考文献

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）初期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サーは、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 *ix* による100bpペアエンドリード解析

³⁷ Caldas C. (2012) Cancer sequencing unravels clonal evolution. *Nat Biotechnol* 30: 408-410

³⁸ Dancy J. E., Bedard P. L., Onetto N. and Hudson T. J. (2012) The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 148: 409- 420

Walter M. J., Shen D., Ding L., Shao J., Koboldt D. C., et al. (2012) Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. N Engl J Med 366: 1090-1098

二次性急性骨髄性白血病（AML）は、骨髄異形成症候群を発症している患者において、約3人に1人の割合で発症します。この研究では、AMLへの進行を予測することを可能とする、骨髄異形成症候群における変異の同定に焦点を当てています。著者らは7人の二次性AML患者から採取した7対の皮膚および骨髄サンプルと、先行する骨髄異形成症候群からの対応する骨髄サンプルの全ゲノムシーケンスを行いました。その結果、すべてのケースにおいて主要な二次性AMLクローンは骨髄異形成症候群に存在する創始クローンに由来していることが明らかとなりました。このことから、骨髄異形成症候群サンプル中には予後に重要な影響を与える変異が含まれており、これらの変異を標的とする治療が治療成績を向上させる可能性があることが示唆されています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx} およびHiSeq® 2000による100倍カバレッジでの、2 x 75bp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

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、一次腫瘍が極めて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。これら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

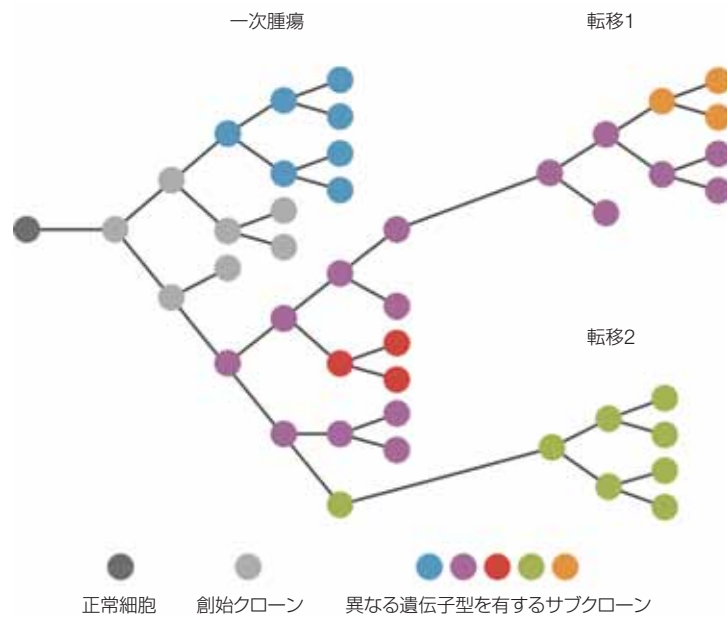
Yap T. A., Gerlinger M., Futreal P. A., Pusztai L. and Swanton C. (2012) Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. Sci Transl Med 4: 127ps110

転移および再発

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分に広がります。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。肺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残されています。

総説

Caldas C. (2012) 癌シーケンスによるクローン進化の解明 Nat Biotechnol 30: 408-410



転移は、一次腫瘍の主要クローンに由来する場合と(転移1)、少量のクローンに由来する場合(転移2)があります。
転移はまた、転移1に示すようにクローン進化を生じる可能性もあります。

参考文献

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 485: 55-61

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与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 II を用いたmRNA-Seqおよびribo-Seq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

Nickel G. C., Barnholtz-Sloan J., Gould M. P., McMahon S., Cohen A., et al. (2012) Characterizing mutational heterogeneity in a glioblastoma patient with double recurrence. PLoS ONE 7: e35262

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

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

抗癌剤開発

剤開発の観点で、癌は他の疾患とは大きく異なっています³⁹。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。腫瘍ゲノムは動的であるため、治療に反応して迅速に薬剤耐性を獲得します。進行性の腫瘍においては、変異の蓄積の結果、それぞれ独自の薬剤感受性または耐性を有する複数のクローンが含まれる可能性があります。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で、分子表現型を確立する能力を持つ次世代シーケンサーが、抗癌剤の発見・開発過程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。

総説

Mills G. B. (2012) 標的癌治療のための新たなツールキット Genome Res 22: 177-182

参考文献

Prahallad A., Sun C., Huang S., Di Nicolantonio F., Salazar R., et al. (2012) Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. Nature 483: 100- 103

低分子薬物であるPLX4032（ベムラフェニブ）によるBRAF（V600E）腫瘍性タンパク質の阻害は、黒色腫の治療において非常に効果的です。しかし、同一のBRAF（V600E）腫瘍遺伝子障害を持つ大腸癌患者の8%~10%においては予後が不良で、本剤に対する反応は非常に限られています。この文献においては、これらの患者に対してはBRAFおよびEGFR阻害剤を含む併用治療が効果的である可能性があることを示すエビデンスが報告されています。

イルミナ技術：Genome Analyzer™

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

著者らは、エピジェネティクスと遺伝子発現解析を組み合わせることにより、SYKを網膜芽細胞腫の重要な腫瘍性遺伝子であると同定しました。これは網膜芽細胞腫の生物学に関する理解を広めるために重要であるのみならず、BAY 61-3606またはR406の使用等、以前には考えられなかった直接治療オプションを進歩させるためにも重要な発見です。この研究では、腫瘍ゲノムの遺伝子学的およびエピジェネティックな特性に関する全ゲノムシーケンス解析の組み合わせが、網膜芽細胞腫などの癌の治療法発見において有用であると強調しています。

イルミナ技術：Genome Analyzerによる、100bpペアエンドおよびHumanMethylation27 BeadChip解析

Astanehe A., Finkbeiner M. R., Krzywinski M., Fotovati A., Dhillon J., et al. (2012) MKNK1 is a YB-1 target gene responsible for imparting trastuzumab resistance and can be blocked by RSK inhibition. Oncogene 31: 4434-4446

Luo Y., Ellis L. Z., Dallaglio K., Takeda M., Robinson W. A., et al. (2012) Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance. J Invest Dermatol 132: 2440-2450

³⁹ 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

高スループットテクノロジーの出現により、最も一般的な疾患をその分子表現型に基づいたサブセグメントに層別化することが可能となっています。特徴となる分子表現型は、疾患総集団のわずか2%~10%にしか相当しない場合も存在します。このような大きな変化により、層別化医療という概念が出現し、薬剤の標的となる集団の規模が縮小化し、各薬剤に期待される有効性レベルが非常に高くなっています。このような部分集団の同定とこれらの低頻度の変化を標的とした新しい薬剤は、すでに臨床試験の実施方法に影響を与えています⁴⁰⁻⁴¹。

参考文献

Arnedos M., Andre F., Farace F., Lacroix L., Besse B., et al. (2012) The challenge to bring personalized cancer medicine from clinical trials into routine clinical practice: the case of the Institut Gustave Roussy. *Mol Oncol* 6: 204-210

この文献では、Gustave Roussy研究所において、現在進行中および今後予定されている前向き試験が示されています。これらの試験の長期的な目標は、ハイスループットテクノロジーおよび個別化医療の利点を検証するための大規模試験の準備をすることであり、その第一段階として、第1相および第2相臨床試験の対象に特定の分子変化を示す患者が選択されています。

Ellis M. J., Ding L., Shen D., Luo J., Suman V. J., et al. (2012) Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 486: 353-360

著者らは、体細胞変化を有するエストロゲン受容体陽性乳癌の様々な臨床的特徴間の関連性を明らかにするために、腫瘍免疫賦活薬アロマターゼ阻害剤療法2つの試験の被験者から採取した治療前の腫瘍生検試料を調べました。その結果エストロゲン受容体陽性乳癌に特異的な表現型は、特定の体細胞変異パターンと関連していることが見出されました。これらの変異パターンは腫瘍生物学に関連した細胞経路に対応していますが、再発する変異のほとんどは比較的低頻度です。これらの知見に基づいた前向き臨床試験には包括的なゲノムシーケンスが必要となります。

イルミナ技術：Genome Analyzerによる、75bpまたは100bpペアエンドリード解析

Falchook G. S., Lewis K. D., Infante J. R., Gordon M. S., Vogelzang N. J., et al. (2012) Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose escalation trial. *Lancet Oncol* 13: 782-789

この文献に示されているデータからは、黒色腫におけるトラメチニブの実質的臨床活性が示されており、MEKが有効な治療標的であることが示唆されています。変異プロファイルの差による奏効率の差から、変異解析が将来重要になることが示されています。

イルミナ技術：GoldenGate®カスタム化ジェノタイプングアレイ⁴²

Iyer G., Hanrahan A. J., Milowsky M. I., Al-Ahmadie H., Scott S. N., et al. (2012) Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. *Science* 338: 221

著者らは、第2相臨床試験であるClinicalTrials.gov NCT00805 129に参加した患者の転移性の膀胱癌ゲノムを解析しました。臨床試験はPFS評価項目の達成には成功しませんでした。患者はエベロリムスに対して、持続的な（2年以上）完全治療奏効を達成しました。シーケンスにより、患者の癌にはTSC1体細胞変異が含まれていることが明らかとなっており、これが治療の効果を向上させた可能性があります。この研究により、臨床において全ゲノムシーケンスを使用して、標的抗癌剤が奏効する可能性が最も高い患者を同定するのに役立つ薬剤感受性のバイオマーカーを同定することが可能であることが示されました。

イルミナ技術：HiSeqによる、腫瘍 - 正常ペアの100bpペアエンド全ゲノムシーケンスの40倍カバレッジまでの解析

⁴⁰ Arnedos M., Andre F., Farace F., Lacroix L., Besse B., et al. (2012) The challenge to bring personalized cancer medicine from clinical trials into routine clinical practice: the case of the Institut Gustave Roussy. *Mol Oncol* 6: 204-210

⁴¹ 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

⁴² Moy C., Aziz M. U., Greshock J., Szabo S., McNeil E., et al. (2011) Mutation and copy number detection in human cancers using a custom genotyping assay. *Genomics* 98: 296-301

参考文献一覽

- Adams M. D., Veigl M. L., Wang Z., Molyneux N., Sun S., et al. (2012) Global mutational profiling of formalin-fixed human colon cancers from a pathology archive. *Mod Pathol* 25: 1599-1608
- Anindo M. I. and Yaqinuddin A. (2012) Insights into the potential use of microRNAs as biomarker in cancer. *Int J Surg* 10: 443-449
- Antoniou A. C., Wang X., Fredericksen Z. S., 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
- Arnedos M., Andre F., Farace F., Lacroix L., Besse B., et al. (2012) The challenge to bring personalized cancer medicine from clinical trials into routine clinical practice: the case of the Institut Gustave Roussy. *Mol Oncol* 6: 204-210
- Astanehe A., Finkbeiner M. R., Krzywinski M., Fotovati A., Dhillon J., et al. (2012) MKNK1 is a YB-1 target gene responsible for imparting trastuzumab resistance and can be blocked by RSK inhibition. *Oncogene* 31: 4434-4446
- Berger M. F., Hodis E., Heffernan T. P., Deribe Y. L., Lawrence M. S., et al. (2012) Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 485: 502-506
- Blake P. M., Decker D. A., Glennon T. M., Liang Y. M., Losko S., et al. (2011) Toward an integrated knowledge environment to support modern oncology. *Cancer J* 17: 257-263
- Brooks J. D. (2012) Translational genomics: the challenge of developing cancer biomarkers. *Genome Res* 22: 183-187
- Caldas C. (2012) Cancer sequencing unravels clonal evolution. *Nat Biotechnol* 30: 408-410
- Cancer Genome Atlas N. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490: 61-70
- Chan K. C., Jiang P., Zheng Y. W., Liao G. J., Sun H., et al. (2012) Cancer Genome Scanning in Plasma: Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single- Nucleotide Variants, and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. *Clin Chem*
- 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 Discov* 2: 23-24
- Curtis C., Shah S. P., Chin S. F., Turashvili G., Rueda O. M., et al. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486: 346-352
- Dancey J. E., Bedard P. L., Onetto N. and Hudson T. J. (2012) The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 148: 409-420
- 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 wholegenome sequencing. *Nature* 481: 506-510
- Ellis M. J., Ding L., Shen D., Luo J., Suman V. J., et al. (2012) Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 486: 353-360
- Falchook G. S., Lewis K. D., Infante J. R., Gordon M. S., Vogelzang N. J., et al. (2012) Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 13: 782-789
- Forshe T., Murtaza M., Parkinson C., Gale D., Tsui D. W., et al. (2012) Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4: 136ra168
- Fountzilias E., Markou K., Vlachtsis K., Nikolaou A., Arapantoni-Dadioti P., et al. (2012) Identification and validation of gene expression models that predict clinical outcome in patients with earlystage laryngeal cancer. *Ann Oncol* 23: 2146-2153
- Frankel A. (2012) Formalin fixation in the '-omics' era: a primer for the surgeon-scientist. *ANZ J Surg* 82: 395-402
- 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
- Gerstung M., Beisel C., Rechsteiner M., Wild P., Schraml P., et al. (2012) Reliable detection of subclonal singlenucleotide variants in tumour cell populations. *Nat Commun* 3: 811
- Gillissen C., Hoischen A., Brunner H. G. and Veltman J. A. (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 20: 490-497
- Godley L. A. (2012) Profiles in leukemia. *N Engl J Med* 366: 1152-1153
- Govindan R., Ding L., Griffith M., Subramanian J., Dees N. D., et al. (2012) Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* 150: 1121-1134
- Grasso C. S., Wu Y. M., Robinson D. R., Cao X., Dhanasekaran S. M., et al. (2012) The mutational landscape of lethal castrationresistant prostate cancer. *Nature* 487: 239-243
- Gravendeel L. A., de Rooij J. J., Eilers P. H., van den Bent M. J., Sillevius Smitt P. A., et al. (2012) Gene expression profiles of gliomas in formalin-fixed paraffin-embedded material. *Br J Cancer* 106: 538-545

- 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
- 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
- How Kit A., Nielsen H. M. and Tost J. (2012) DNA methylation based biomarkers: Practical considerations and applications. *Biochimie* 94: 2314-2337
- 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* 485: 55-61
- Iyer G., Hanrahan A. J., Milowsky M. I., Al-Ahmadie H., Scott S. N., et al. (2012) Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. *Science* 338: 221
- Ju Y. S., Lee W. C., Shin J. Y., Lee S., Bleazard T., et al. (2012) A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res* 22: 436-445
- Koboldt D. C., Zhang Q., Larson D. E., Shen D., McLellan M. D., et al. (2012) VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 22: 568-576
- Kotorashvili A., Ramnauth A., Liu C., Lin J., Ye K., et al. (2012) Effective DNA/RNA coextraction for analysis of microRNAs, mRNAs, and genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *PLoS ONE* 7: e34683
- Lee C. H., Ou W. B., Marino- Enriquez A., Zhu M., Mayeda M., et al. (2012) 14-3-3 fusion oncogenes in high-grade endometrial stromal sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 929-934
- 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* 20: 999-1003
- 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* 18: 382-384
- Lohr J. G., Stojanov P., Lawrence M. S., Auclair D., Chapuy B., et al. (2012) Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3879-3884
- Longo D. L. (2012) Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N Engl J Med* 366: 956-957
- Luo Y., Ellis L. Z., Dallaglio K., Takeda M., Robinson W. A., et al. (2012) Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance. *J Invest Dermatol* 132: 2440-2450
- Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R. A., et al. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139
- Ma R., Yan W., Zhang G., Lv H., Liu Z., et al. (2012) Upregulation of miR-196b confers a poor prognosis in glioblastoma patients via inducing a proliferative phenotype. *PLoS ONE* 7: e38096
- Majewski J., Schwartzentruber J., Lalonde E., Montpetit A. and Jabado N. (2011) What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48: 580-589
- Mardis E. R. (2012) Genome sequencing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 22: 245-250
- Mills G. B. (2012) An emerging toolkit for targeted cancer therapies. *Genome Res* 22: 177-182
- Mo M. H., Chen L., Fu Y., Wang W. and Fu S. W. (2012) Cellfree Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer* 3: 432-448
- Mosig R. A., Lobl M., Senturk E., Shah H., Cohen S., et al. (2012) IGFBP-4 tumor and serum levels are increased across all stages of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* 5: 3
- Moy C., Aziz M. U., Greshock J., Szabo S., McNeil E., et al. (2011) Mutation and copy number detection in human cancers using a custom genotyping assay. *Genomics* 98: 296-301
- Nickel G. C., Barnholtz-Sloan J., Gould M. P., McMahon S., Cohen A., et al. (2012) Characterizing mutational heterogeneity in a glioblastoma patient with double recurrence. *PLoS ONE* 7: e35262
- Pineda M., Gonzalez S., Lazaro C., Blanco I. and Capella G. (2010) Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res* 693: 19-31
- Prahallad A., Sun C., Huang S., Di Nicolantonio F., Salazar R., et al. (2012) Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483: 100-103
- Pritchard C. C., Smith C., Salipante S. J., Lee M. K., Thornton A. M., et al. (2012) ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. *J Mol Diagn* 14: 357-366
- Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., Li R., Deng Q., et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777- 782
- Rentoft M., Coates P. J., Laurell G. and Nylander K. (2012) Transcriptional profiling of formalin fixed paraffin embedded tissue: pitfalls and recommendations for identifying biologically relevant changes. *PLoS ONE* 7: e35276

- Rodriguez-Gonzalez F. G., Mustafa D. A., Mostert B. and Sieuwerts A. M. (2012) The challenge of gene expression profiling in heterogeneous clinical samples. *Methods* Rudin C. M., Durinck S., Stawiski E. W., Poirier J. T., Modrusan Z., et al. (2012) Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet* 44: 1111-1116
- Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X. Y., Jones D. T., Pfaff E., et al. (2012) Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodeling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482: 226-231
- Schwarzenbach H., Hoon D. S. and Pantel K. (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11: 426-437
- Schwarzenbach H. (2012) Circulating nucleic acids and protease activities in blood of tumor patients. *Expert Opin Biol Ther* 12 Suppl 1: S163-169
- Scrima M., De Marco C., Fabiani F., Franco R., Pirozzi G., et al. (2012) Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS ONE* 7: e30427
- Sethi N. and Kang Y. (2011) Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer* 11: 735-748
- Sinicropi D., Qu K., Collin F., Crager M., Liu M. L., et al. (2012) Whole transcriptome RNA-Seq analysis of breast cancer recurrence risk using formalin-fixed paraffinembedded tumor tissue. *PLoS ONE* 7: e40092
- 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
- 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
- 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
- Vui-Kee K., Mohd Dali A. Z., Mohamed Rose I., Ghazali R., Jamal R., et al. (2012) Molecular markers associated with nonepithelial ovarian cancer in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens by genome wide expression profiling. *Kaohsiung J Med Sci* 28: 243-250
- Wagle N., Berger M. F., Davis M. J., Blumenstiel B., Defelice M., et al. (2012) High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov* 2: 82-93
- Walter M. J., Shen D., Ding L., Shao J., Koboldt D. C., et al. (2012) Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 366: 1090-1098
- Waters H. (2012) New NIH genetics center focuses its lens on exome, despite doubts. *Nat Med* 18: 8
- Weigelt B., Puztai 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., Ley T. J., Link D. C., Miller C. A., Larson D. E., et al. (2012) The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 150: 264-278
- 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
- Yap T. A., Gerlinger M., Futreal P. A., Puztai L. and Swanton C. (2012) Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med* 4: 127ps110
- Yates L. R. and Campbell P. J. (2012) Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13: 795-806
- Yost S. E., Smith E. N., Schwab R. B., Bao L., Jung H., et al. (2012) Identification of highconfidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Res* 40: e107
- Zang Z. J., Cutcutache I., Poon S. L., Zhang S. L., McPherson J. R., et al. (2012) Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. *Nat Genet* 44: 570-574
- 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
- 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

イルミナ株式会社

〒108-0014

東京都港区芝5-36-7 三田ベルジュビル22階

Tel (03)4578-2800 Fax (03)4578-2810

www.illumina.co.jp

代理店

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, CSPro, 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. 773-2012-J007 14MAY2013

illumina[®]