126 ナノポアシーケンサーによる希少がんの統合病理診断

千葉県がんセンター 臨床病理部　　牧瀬　尚大

【目的】希少がんの病理診断は難しい。その希少さゆえに一般の病理医がそれらの病理形態について習熟することが難しく、例えば骨軟部腫瘍の病理診断において、専門の病理医と非専門の病理医との不一致率は 40%、治療方針に関わる重大な乖離は 8%に及ぶと報告されている。診断困難の原因の一つとして遺伝子検索へのアクセスの悪さが挙げられる。網羅的遺伝子検索へのアクセスの悪さを解決するために、我々はナノポアシーケンサーに着目した。ナノポアシーケンサーの長所として、簡便さ、迅速さ、ポータビリティ、融合遺伝子の同定、メチル化シトシンの同定、などが挙げられる。本研究では①Adaptive sampling の標的領域、②ライブラリ調整法、③データ解析法、それぞれ複数種類を試行、比較し最適化を図る。ナノポアシーケンサーの日常病理診断への実装、ナノポアシーケンサーによる希少がんの統合診断を目指す。

【方法】後方視的に 22 例、前方視的に 9 例の肉腫症例を用いた。新鮮／凍結検体から DNA を抽出し、Ligation sequencing kit でライブラリを作成した。約 300 遺伝子、10,000 CpG を含むような標的領域を設定し、MinION Mk1b と GPU 搭載 PC を用いて 46-98 時間 Adaptive sampling を行った。SVIM、Clairs-TO、QDNAseq などを用いてデータ解析を行った。

【結果】データ解析には約12時間を要した。31例中16例で腫瘍特異的／特徴的融合遺伝子を同定できた。Chromoplexy、chromothripsis、染色体外環状 DNA など複雑な構造異常も同定できた。3 例では腫瘍特異的／特徴的一塩基置換を同定できたが、2 例では偽陰性であった。2 例では腫瘍特異的／特徴的遺伝子増幅が同定できた。24 例では trisomy や monosomy を同定できた。大部分の症例でメチル化解析が診断を支持した。融合遺伝子、遺伝子変異、コピー数変化、メチル化解析、いずれも 100%の精度ではないが、組織像や臨床像と統合することで、31 例中 27 例でナノポアシーケンシングが診断を補助した。24 時間のシーケンシングデータにおいてもこれらの遺伝子異常とメチル化分類を確認できた。安価、簡便、迅速な Nano-RAPID 法は肉腫診断に対する有用な補助ツールとして期待できる。

【発表】

1) 2024 年 3 月 29 日 第 113 回日本病理学会総会 口演
2) 2025 年 4 月 18 日 第 114 回病理学会総会 口演
3) Takeda N, **Makise N**, Lin J, et al. Metastasizing aneurysmal dermatofibroma initially diagnosed as angiosarcoma confirmed by CD63::PRKCD fusion gene detection with nanopore sequencing. Genes Chromosomes Cancer. 2024 May;63(5):e23246. doi: 10.1002/gcc.23246. PMID: 38747331.
4) **Makise N**, Lin J, Kageyama H, et al. Nanopore DNA Sequencing Detected Chromothripsis-Induced PAFAH1B1::USP6 Rearrangement in Periosteal Solid Aneurysmal Bone Cyst Initially Diagnosed as Osteosarcoma. Genes Chromosomes Cancer. 2024 Jul;63(7):e23254. doi: 10.1002/gcc.23254. PMID: 38979775.
5) **Makise N**, Lin J, Kageyama H, et al. Fluorescence in situ hybridization-negative intra-articular myxoid liposarcoma with complex rearrangements involving EWSR1::DDIT3 detected using nanopore sequencing. Pathol Int. 2024 Oct;74(10):604-610. doi: 10.1111/pin.13468. Epub 2024 Jul 29. PMID: 39073367.
6) **Makise N**, Lin J, Kageyama H, et al. Sporadic Breast Angiosarcoma With MYC Amplification on Extrachromosomal Circular DNA Detected Using Nanopore Sequencing in an Adolescent Female. Genes Chromosomes Cancer. 2024 Nov;63(11):e70004. doi: 10.1002/gcc.70004. PMID: 39508373.