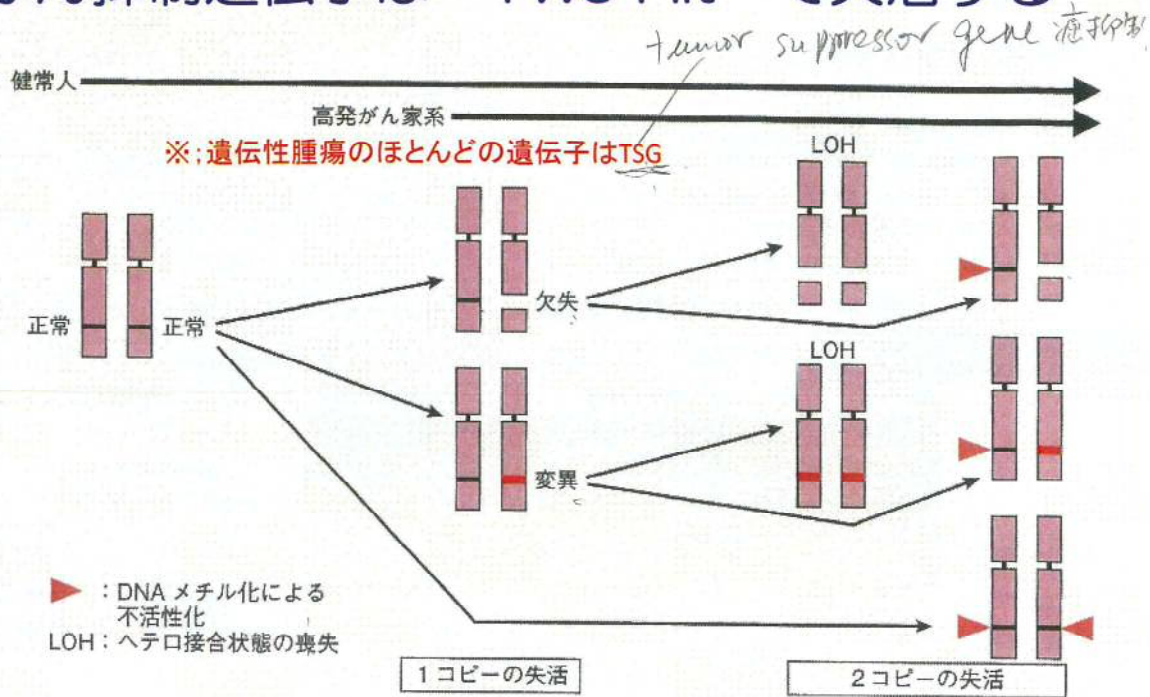


# がん抑制遺伝子は” Two Hit ” で失活する

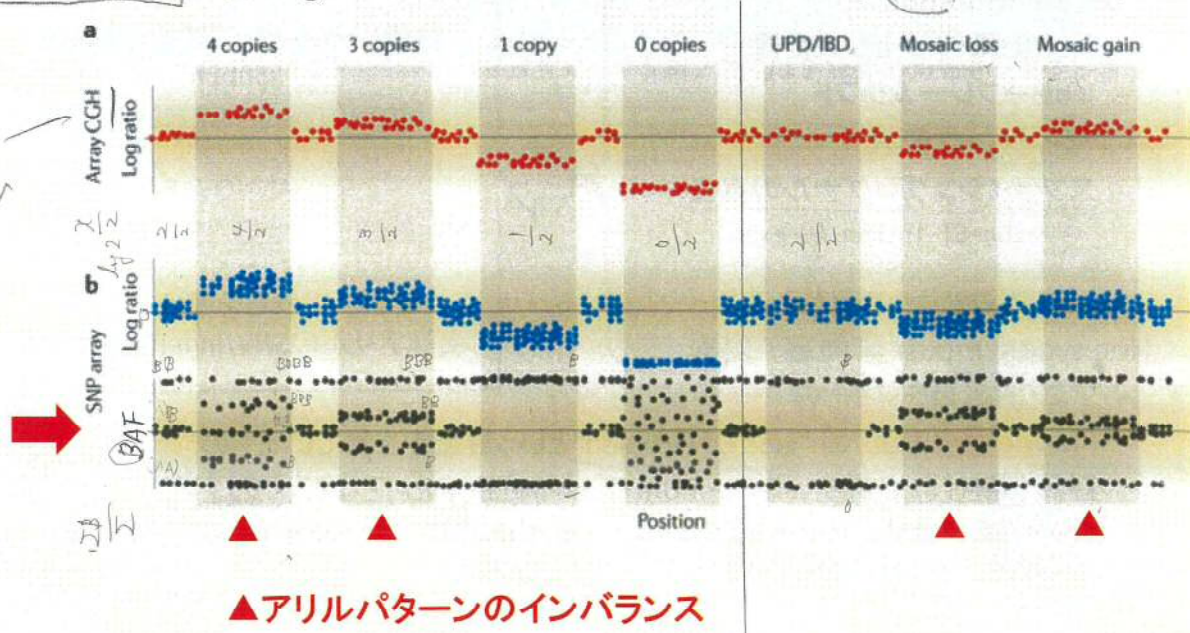


注意: DNA-Seq法においてはメチル化は検出できないため、すべての2コピー失活を検出することは困難である。

## LOHをどうやって判定するのか?

マイクロアレイでは、Log RatioとBAFのパターンによりMosaic, UPDを判定する。

2色法 competitive genomic hybridization



Can A. et al. Nat Rev Gen 12, 363-376 (May 2011)

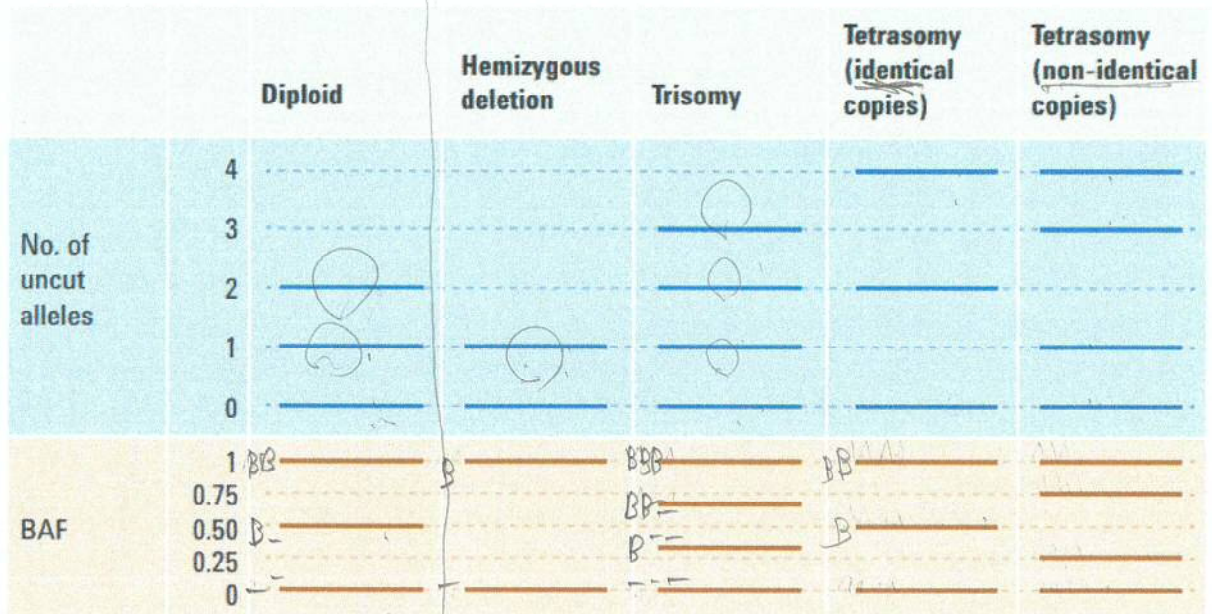
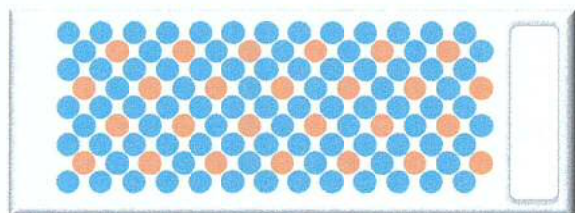


図 1. uncut allele 数と B アレル頻度 (BAF) の比較

$0.9 \quad 0.1$   
 $BBB$   
 $ABB$   
 $AAB$   
 $AAA$

$\frac{3}{3} = 1$   
 $\frac{2}{3} = 0.666$   
 $\frac{1}{3} = 0.33$   
 $\frac{0}{3}$

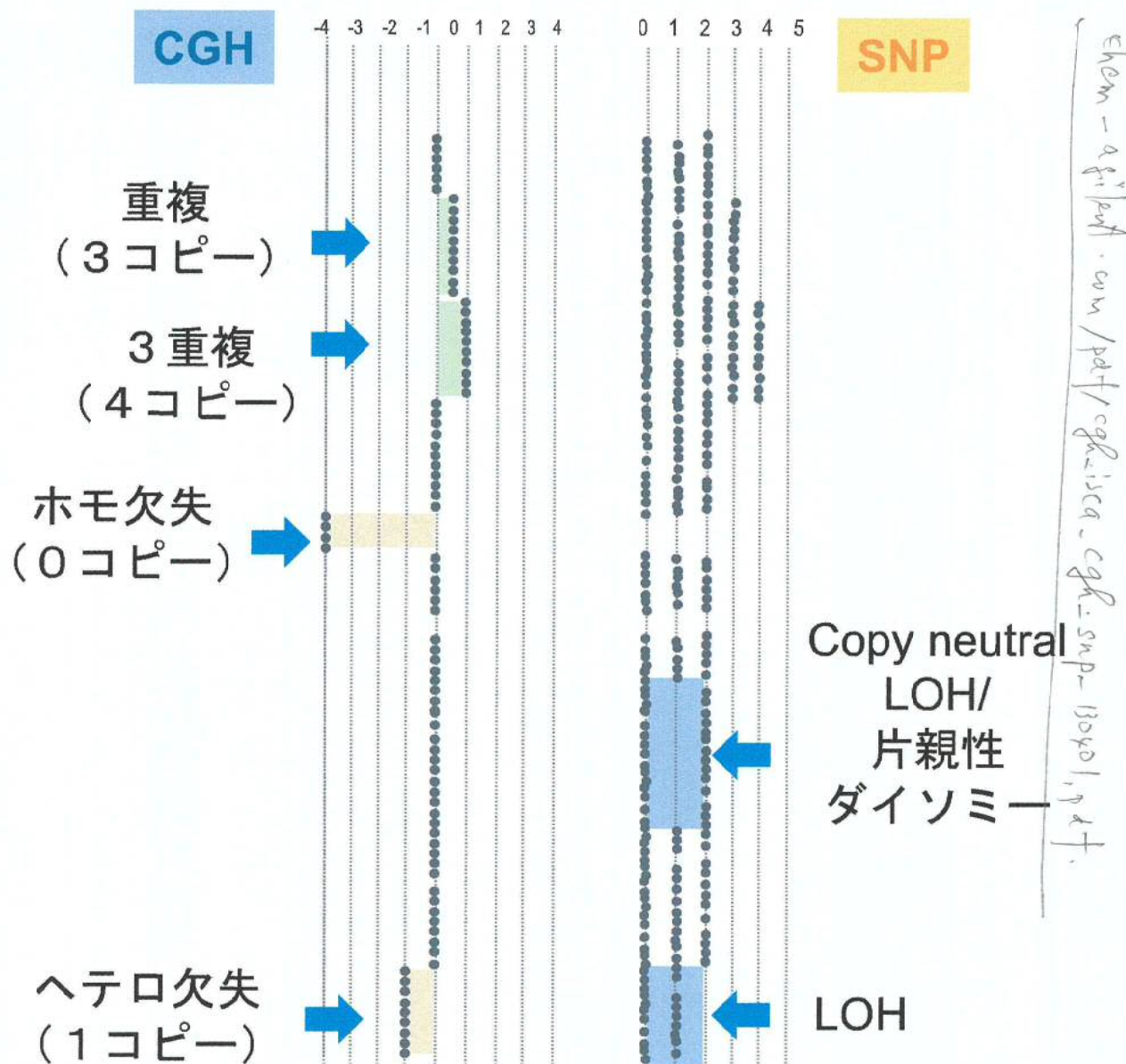
# CGH+SNP データ原理



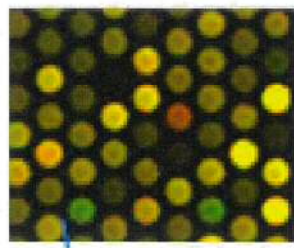
イメージ図

- : CGHプローブ
- : SNP領域 プローブ

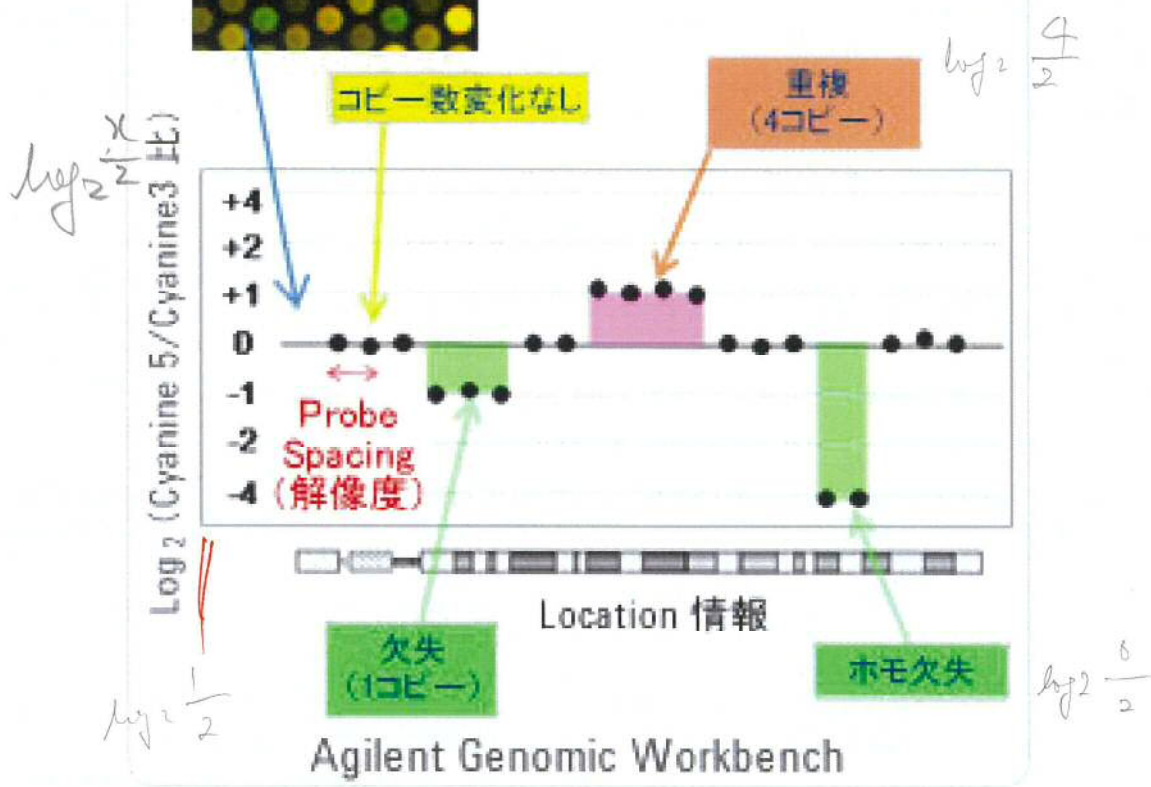
- CGHプローブとSNPプローブの両方を搭載。
- 染色体全体から選ばれた約60,000 SNP領域にSNPプローブを設計。
- 各SNPの片方のアレルのコピー数の情報を取得し、(copy neutral) LOHや片親性ダイソミーの領域を検出します。



### CGH データ解析



マイクロアレイ画像



PLA  
CGH

# アレル頻度 (LOH)

1 copy

がん細胞において CNA loss (コピー数が 1) が生じた場合、ヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity : LOH) と呼ばれる現象が発生する。LOH が発生した場合、残存したアレルに異常があれば、

その遺伝子座における正常機能の完全な喪失を意味する。がん細胞における LOH の検出例を 図 21 に示す。

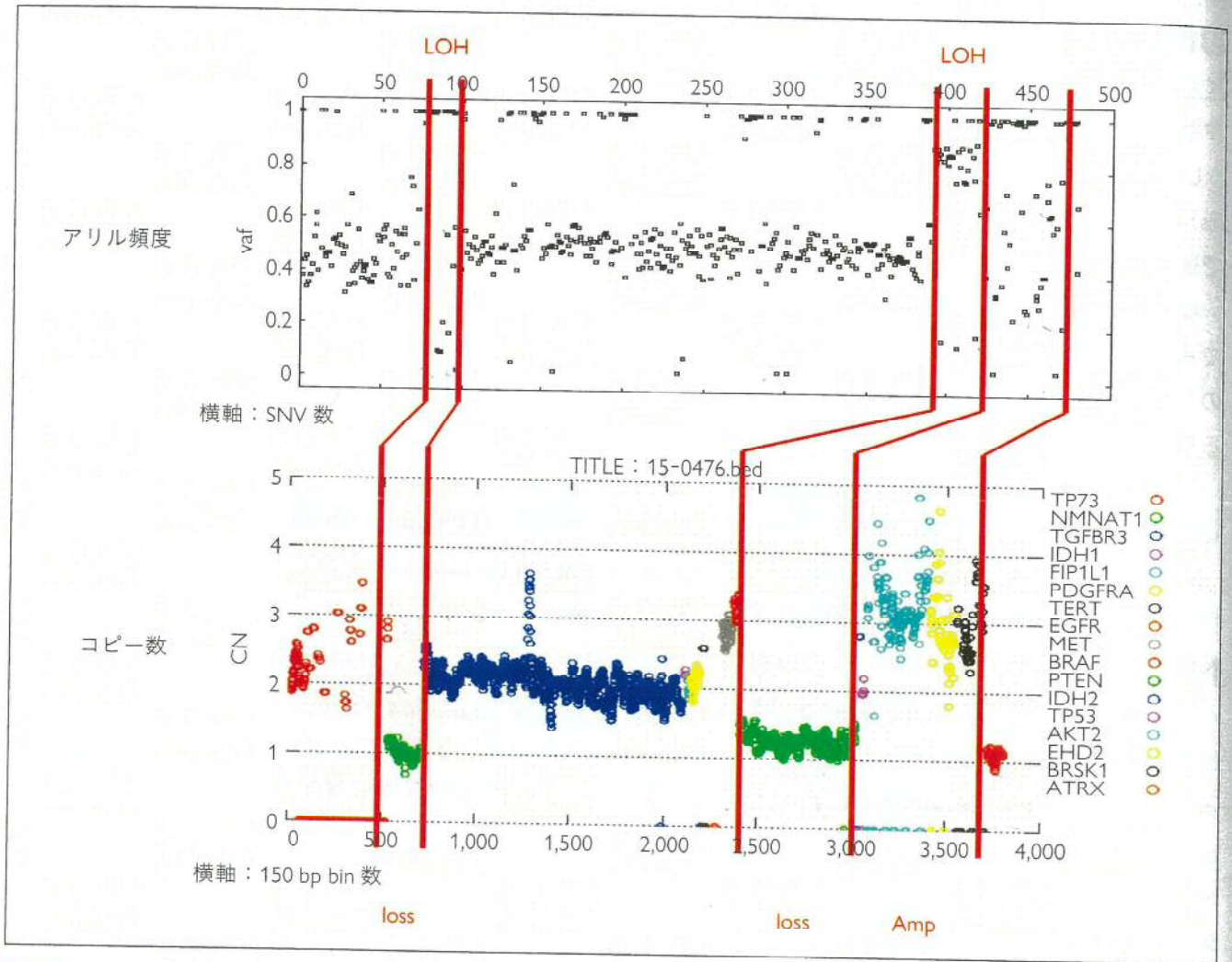


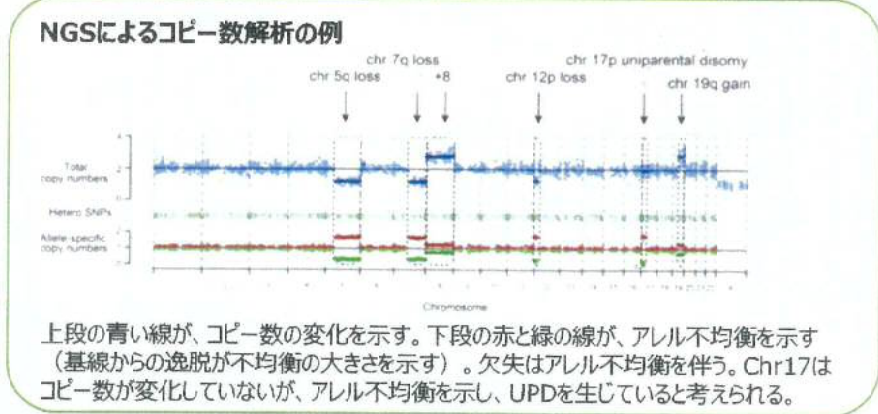
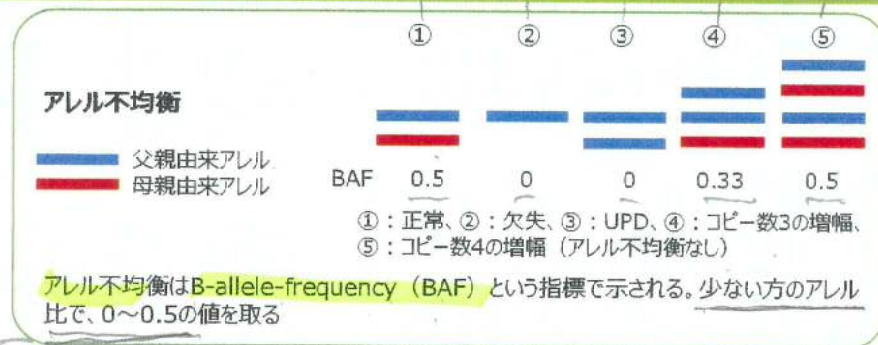
図 21 LOH とアレル頻度の関係

この図は、ある腫瘍細胞においてアレル頻度の分布と CNA コピー数の関係を示している。上のグラフは、腫瘍細胞で検出された SNP のアレル頻度をプロットしたものである。1つのドットは SNP に対応する。下のグラフは、計測されたコピー数で、1つのドットは 150 塩基対の平均コピー数を示しており、左から 1 番染色体～22 番染色体、X 染色体の順番に並んでいる。ドットの色は遺伝子を示している。アレル頻度のプロットとコピー数のプロットの横軸が異なるため、赤線で LOH が発生した遺伝子の領域を示した。この図から、LOH が発生した遺伝子の領域ではコピー数が減るとともに、アレル頻度の分布が 50% を挟んで上下に分割されている。これは、ヘテロ接合性が喪失していることを示している。  
LOH : loss of heterozygosity, Amp : amplification.

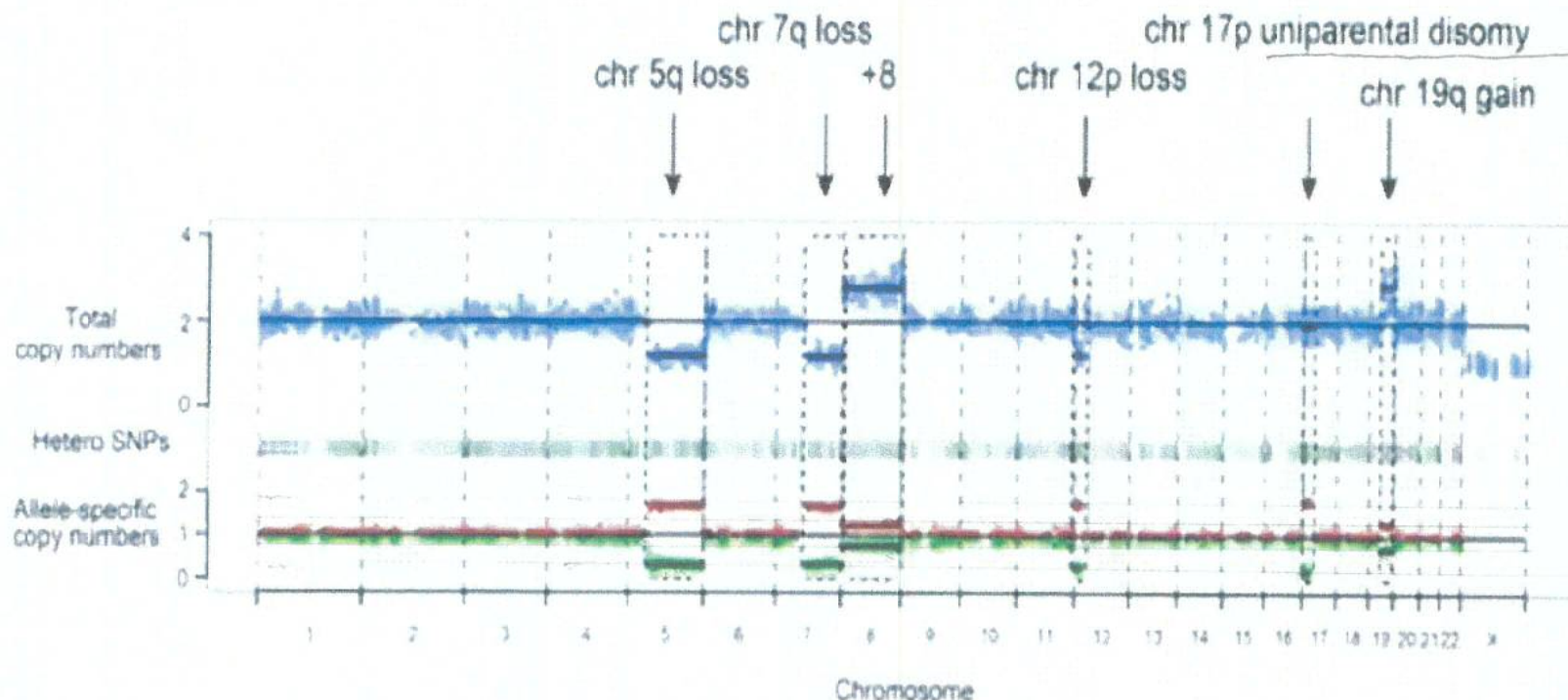
# コピー数変化の検出

## NGSによるコピー数解析の原理を理解する

- NGSを利用したコピー数変化の検出
  - ✓ NGSでは、シーケンス深度を利用してコピー数の変化を検出する
  - ✓ コピー数の変化部位には構造異常を伴う事が多い
- アレル不均衡とその検出
  - ✓ 常染色体と女性のX染色体は父親由来のアレルと母親由来のアレルが1本ずつ存在するため、正常な状態ではその構成比は1：1である
  - ✓ コピー数の変化に伴い、アレルの構成比が1：1からずれることをアレル不均衡という
  - ✓ 特に片方のアレルが欠失することをヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity: **LOH**) とよび、特に片親由来のアレルが2本に増幅し他方のアレルが欠失することを片親性ダイソミー (uniparental disomy: **UPD**) とよぶ。UPDは必然的にLOHを伴う
  - ✓ LOHは、癌抑制遺伝子の正常アレルの欠失を通じてがん化過程によくみられる現象である
  - ✓ NGSにおけるアレル不均衡の検出には、SNPsを利用することが一般的である
- 全ゲノム解析におけるコピー数変化の検出特有の問題点
  - ✓ 特に非コード領域や繰り返し配列には、個人差が大きいことに留意し、個人差が大きき場所を解析から除外するか、同一患者の正常対照検体と比較することが望ましい



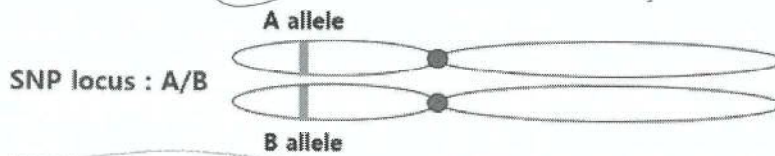
## NGSによるコピー数解析の例



上段の青い線が、コピー数の変化を示す。下段の赤と緑の線が、アレル不均衡を示す（基線からの逸脱が不均衡の大きさを示す）。欠失はアレル不均衡を伴う。Chr17はコピー数に変化していないが、アレル不均衡を示し、UPDを生じていると考えられる。

AAA  
AAB  
ABB  
BBB

# Calculation of B Allele Frequency (BAF)

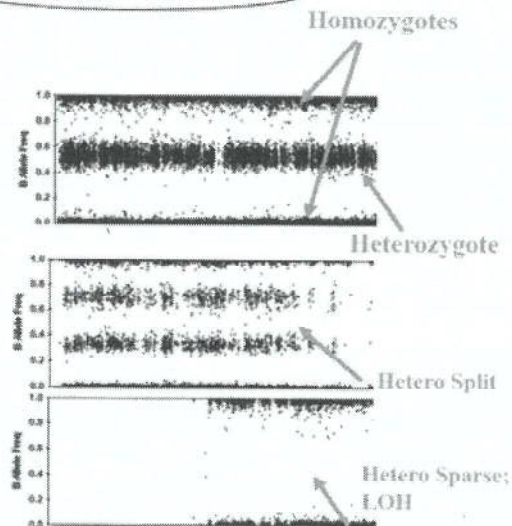


A=0 B=1 *273k*

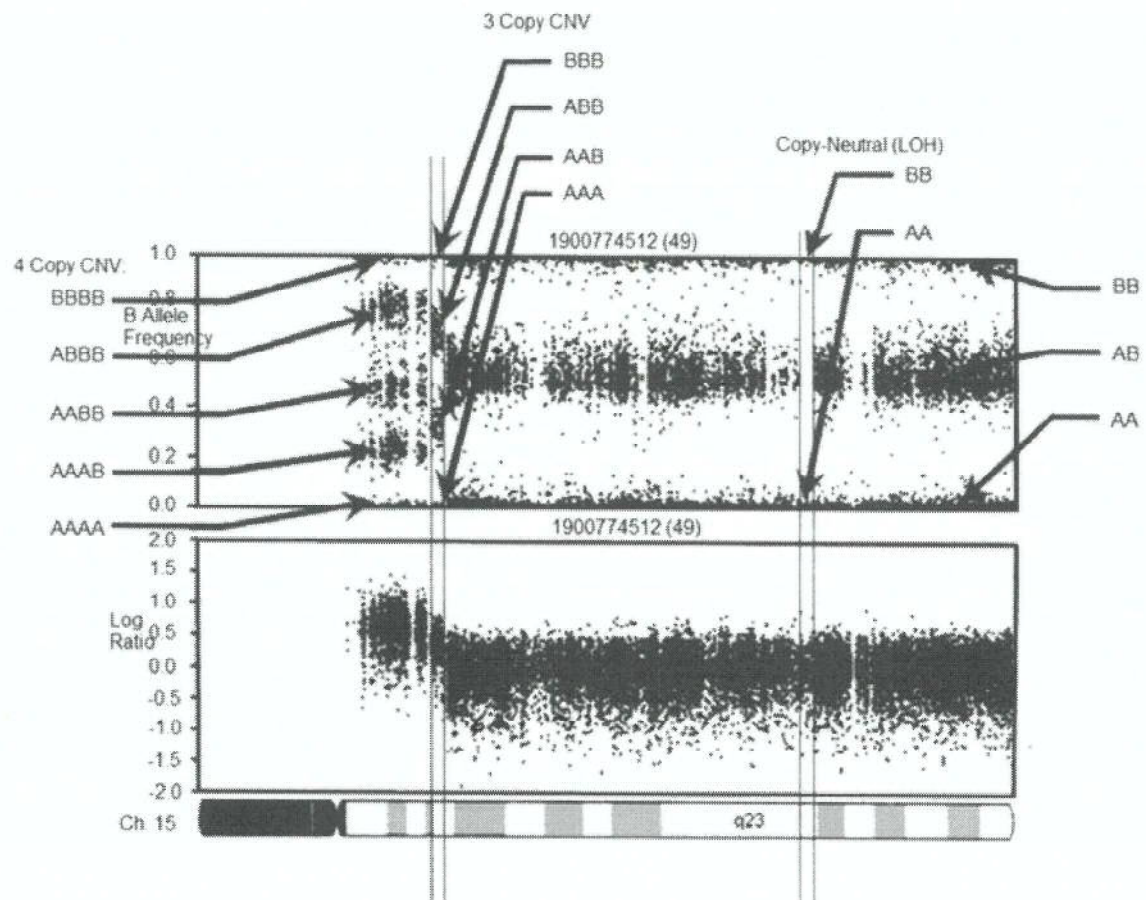
*2 copy*  
Normal:  
 AA =  $0+0 / 2 = 0$   
 AB =  $0+1 / 2 = 0.5$   
 BB =  $1+1 / 2 = 1$

*3 copy*  
Duplication:  
 AAA =  $0+0+0 / 3 = 0$   
 BBB =  $1+1+1 / 3 = 1$   
 AAB =  $0+0+1 / 3 = 0.33$   
 ABB =  $0+1+1 / 3 = 0.67$

*1 copy*  
Deletion:  
 A =  $0 / 1 = 0$   
 B =  $1 / 1 = 1$







CNV detection in SNP-array data using PennCNV: example log R ratio (LRR) and B Allele Freq (BAF) values for the chromosome 15 q-arm of an individual. Three normal chromosomal BAF genotype clusters (AA, AB, and BB genotypes) have LRR values around zero. The copy-neutral loss-of-heterozygosity (LOH) region has normal LRR values, but no AB cluster. Increased copy number can be observed in the increased number of peaks in the BAF distribution and increased LRR values. LRR and BAF patterns are different for different CNV regions, and can be used to generate CNV calls. Adapted from Wang et al. (2007).