



〔雑報〕 腫瘍内科医が分子生物学を学んでみたら ～ *in silico* の壁～

関 根 郁 夫

(2018年2月9日受付, 2018年3月20日受理)

要 旨

臨床腫瘍学の分野では、遺伝子変異や遺伝子発現の程度に応じて治療方針を決めることが当たり前になりつつあるが、分子生物学に基づく医学の進歩は極めて速く、臨床医にとって遅れずについて行くのは容易なことではない。新規の分子標的治療薬を使いこなすには、がん細胞の発生、増殖、生存を司っているドライバーがん遺伝子についての理解が不可欠である。そこでそれらの基礎研究論文を読んで、実験方法を理解することを試みた。

比較的最近に発見された非小細胞肺癌のドライバーがん遺伝子に *ALK* 融合遺伝子, *ROS1* 融合遺伝子, *RET* 融合遺伝子がある。これらのがん遺伝子を見つけるに至った実験を理解するにはアメリカの分子生物学教科書がきれいな図が豊富で大変役に立ったが、縦列質量分析や次世代シーケンサーなどの網羅的解析技術は理解が困難であった。そして壁になっていたのは、*in vitro* や *in vivo* の実験手技よりも、得られた大量の実験データを *in silico* でどのように処理するかというバイオインフォマティクスの領域であることに気がついた。

がんゲノム医療の時代を控えて、腫瘍内科医には次世代シーケンサーで得られた膨大な情報を取捨選択し、担当医や患者が理解できるように上手くまとめることが早晚求められるようになるであろう。これをキュレーションと呼ぶが、そこには数多のハードルが横たわっていることが予想される。

Key words: 質量分析, ショットガンシーケンス, バイオインフォマティクス, プレジジョン・メディシン, キュレーション

I. 背 景

臨床腫瘍学の分野では、遺伝子変異や遺伝子発現の程度に応じて治療方針を決めることが当たり前になりつつある。しかし、分子生物学に基づく医学の進歩は極めて速く、常に知識を更新していかなければ早晚理解が及ばなくなる。さらに、我々は既に事実に基づかない情報発信が虚報 fake ではなく、「もう一つの事実 alternative truth」などと正当化されてしまう時代に生きている[1]。従って、医師は基礎医学を含めた医学

情報の真偽を批判的に評価できる力を維持していかなければならない。

他方で、このような医学についてのリテラシー literacy を維持するというのは強制されるものではなく、むしろ自由人としての学び *artes liberales* の一環であるから、学ぶべき内容を定めるのは本質的に無理がある。しかし、新しい医学情報は何らかの実験や観察などの研究結果に基づいているはずで、その方法を学ぶということ – 我々臨床医が最も苦手とすること – は意味があると思う。実験手技は日進月歩でその条件まで含めて精通する

筑波大学医学医療系臨床腫瘍学

Ikuo Sekine. When a medical oncologist learned molecular biology – the wall of *in silico* – .
Department of Medical Oncology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8575.
Phone: 029-853-3014. Fax: 029-853-6387. E-mail: isekine@md.tsukuba.ac.jp
Received February 9, 2018, Accepted March 20, 2018.

のは無理があるし意味もないが、実験の原理はそれほど大きく変わるわけではないので、それを理解していればその研究全体を把握するのが遙かに容易になると思われる。

がんに対する分子標的治療薬を使いこなすには、がん細胞の発生、増殖、生存を司っているドライバーがん遺伝子 driver oncogene についての理解が不可欠である。そこでそれらの発見を報告した論文を読んで、実験方法を理解することを試みた。「理解する」とはどういうことかという考察も必要だが、とりあえず「絵を描いて医学生に説明できる」というレベルを目標にした。さらに網羅的解析技術を理解するのに必要となったバイオインフォマティクス bioinformatics との格闘と、がんゲノム医療を目前に控えた腫瘍内科医の戸惑いについて述べてみた。

II. ドライバーがん遺伝子の発見論文

II-1. ALK 融合遺伝子の発見

Soda らは、相補的 DNA (cDNA) ライブラリーを用いた形質転換焦点形成分析法 transformed focus formation assay で新しいドライバーがん遺伝子の一つである *EML4-ALK* 融合遺伝子を同定した[2]。彼らはまず、62歳の男性肺腺癌患者の切除標本検体から抽出した全 RNA を鋳型に逆転写酵素を用いて合成した cDNA をベクタープラスミドに組み込み、パッケージングプラスミド packaging plasmid、ウイルスコートプラスミド virus coat plasmid と一緒に BOSC23 細胞に導入した。その培養上清から精製した組み換えレトロウイルスベクターを NIH3T3 に感染させ、盛んに増殖した形質転換細胞から mRNA を取り出し、シーケンスして *EML4-ALK* 融合遺伝子を同定した (図 1)。*EML4* 遺伝子と *ALK* 遺伝子の融合点を含むゲノム DNA 断片の PCR 産物のシーケンスから、*EML4* 遺伝子の第13エクソンと *ALK* 遺伝子の第21エクソンの間に欠損があり、そこに *EML4* 遺伝子が逆向きに入り込んで融合していることが判明した。次に *EML4* 遺伝子、*ALK* 遺伝子、*EML4-ALK* 融合遺伝子を発現ベクターに組み込んでマウス線維芽細胞に導入し、*EML4-ALK* 融合遺伝子にのみ形質転換

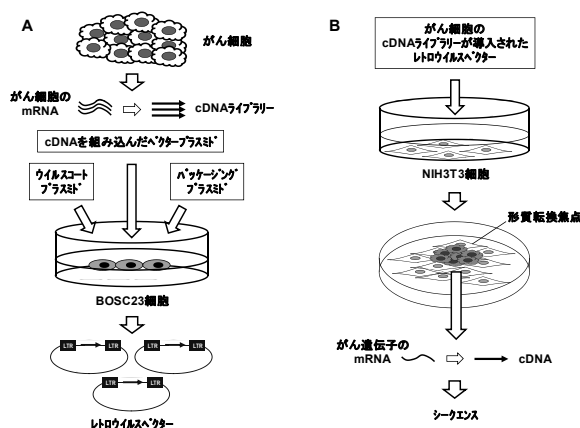


図 1 形質転換焦点形成分析法によるがん遺伝子の同定

がん細胞から mRNA を抽出して cDNA ライブラリーを作成し、それらを導入したレトロウイルスベクターを作成する (A)。それを NIH3T3 に感染させ、盛んに増殖した細胞 (形質転換細胞) から mRNA を取り出し、シーケンスしてがん遺伝子を同定する。LTR: long terminal repeat

能 transforming potential があることを確認した。さらに *EML4-ALK* 融合遺伝子を導入したマウスリンパ球細胞株 BA/F3 の自律性増殖を ALK 阻害剤が抑制することを観察し、*EML4-ALK* 融合遺伝子が薬剤標的になる可能性を示した[2]。

II-2. ROS1 融合遺伝子の発見

Rikova らは、蛋白質活性化の指標であるチロシン残基リン酸化を持つ蛋白質を網羅的に検索して、*ROS1* 融合遺伝子を発見した[3]。まず、非小細胞肺癌切除標本150検体と非小細胞肺癌細胞株41株から尿素バッファー液を用いて作成した細胞溶解産物 cell lysates を超音波破碎した後にトリプシン消化をしてペプチドを得た。それをプロテイン G・アガロースビーズに連結したリン酸化チロシン特異抗体と共に免疫沈降してリン酸化ペプチド・ライブラリーを作成した。そのライブラリーを液体クロマトグラフィー・縦列質量分析 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) でペプチド配列を決定し、さらにプロテオームデータベース検索を行って蛋白質を同定した (PMF 蛋白質同定法 peptide mass fingerprinting) (図 2)。蛋白質のうちで高度にチロシン残基がリン酸化されていたのは、チロシンキナーゼ、セリン・スレオニン

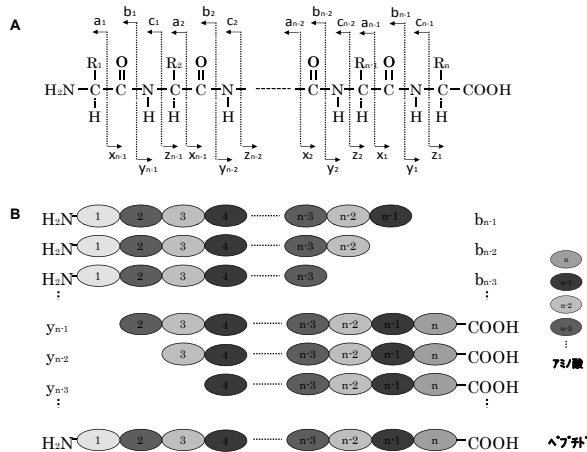


図2 質量分析によるペプチドのアミノ酸配列決定

各共有結合が開裂して生成したイオン化ペプチドは、ペプチドのN末端側を含むa系列、b系列、c系列とC末端側を含むx系列、y系列、z系列の各イオンに整理できる (A)。b系列、y系列毎にペプチドを分子量の順に並べ、隣り合わせのペプチドの質量差からアミノ酸の種類を判別することによって蛋白質のアミノ酸配列が分かる (B)。

キナーゼ，接着分子，細胞骨格蛋白質であった。各リン酸化シグナルからリン酸化シグナルの平均を差し引くとリン酸化が異常亢進しているチロシンキナーゼが多数同定された。さらに，各チロシンキナーゼの平均リン酸化シグナルの順序付けを見て，非常に高いリン酸化シグナルを持った受容体チロシンキナーゼとして，MET，ALK，ROS1，PDGFRa，DDR1とEGFRが同定された。さらにこれらの蛋白質の発現を細胞株で調べ，ALK蛋白質は肺癌細胞株H2228で，ROS1蛋白質はHCC78で高発現していることを突き止めた。そこで，これらの細胞株で発現しているmRNAを抽出しcDNAを作成してシーケンシングし，*EML4-ALK*融合遺伝子と*SLC34A2-ROS1*融合遺伝子を同定した。さらに，*ALK*遺伝子と*ROS1*遺伝子に対するsiRNAsを作成してこれらの遺伝子発現を抑制すると，H2228は増殖が維持されたが，HCC78はアポトーシスに陥った。この結果から，HCC78のドライバー遺伝子は*ROS1*融合遺伝子であることが確認された[3]。

II-3. *RET*融合遺伝子の発見

Kohnoらは，トランスクリプトーム解析transcriptome sequencingを行って，*KIF5B-RET*

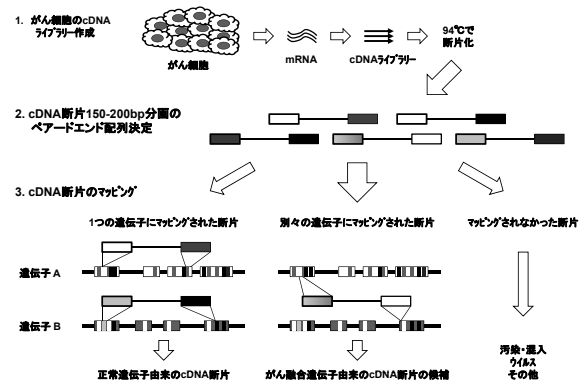


図3 ペアードエンド配列決定法によるがん融合遺伝子候補の探索

融合遺伝子を発見した[4]。まず肺腺がん切除標本30検体より抽出した全RNAからpoly-A (+) RNAを精製し，断片化してからcDNAを合成した。ペアードエンドアダプター paired-end adapterを付けてから250-300 bp (cDNA挿入部150-200 bp) の分画をゲルで精製しPCRで増幅した後，cDNAライブラリーの両端50 bpを次世代シーケンサーで配列決定した (ペアードエンド配列決定法paired-end sequencing)。これらの配列をヒトRNAリファレンス配列上にマッピングし，両端の配列が適切と思われる距離と向きを持って同じRNA配列上にマッピングされた配列，ゲノム上沢山の部位にマッピングされた配列，およびどこにもマッピングされなかった配列は除外し，残りのペア配列から融合遺伝子の候補配列を7つ選択した (図3)。その中から既知の融合遺伝子*EML4-ALK*配列および蛋白質に翻訳される構造を持たない融合配列out of frame fusionを除外して，染色体10p11.2にコードされている*KIF5B*遺伝子と10q11.2にコードされている*RET*遺伝子の融合遺伝子配列を同定した。この配列についてRT-PCRとサンガー法によるcDNAシーケンシングを肺腺がん切除標本319標本について施行したところ，6標本 (1.9%) において*KIF5B-RET*融合RNAが検出され，さらにPCRゲノムDNA解析とFISH解析によって*KIF5B-RET*融合遺伝子を確認した[4]。

III. 実験の原理を学ぶ

上記論文を読むに当たり，まず本文，増補と引

用文献の孫引きを読んだが、「理解」のレベルにはほど遠い気がした。最初に躰いたのは質質転換焦点形成分析法である。良く引用される原著論文[5]は手順の図も描かれていて実験を組み立てるにはいいが、概念を掴むにはむしろ教科書[6]や総説[7]の方が分かりやすいと思う。縦列質量分析は、トリプシンで分解して生じたペプチドを液体クロマトグラフィーで分画し、第一質量分析室でアミノ酸配列を決定すべきシグナル強度が高いペプチドを選択し、第二質量分析室でペプチドをイオン化して生じた分子の全ての質量を測定するが、定評のある分子生物学の教科書[8,9]にある多彩な図を眺めているうちに理解できた。さらに、イオン化するときペプチドは共有結合が開裂し短い分子から長い分子に至る多数の分子が生成するが、それらはペプチドのN末端側を含むa系列、b系列、c系列とC末端側を含むx系列、y系列、z系列の各イオンに整理できる(図2A)。b系列、y系列毎にペプチドを分子量の順に並べ、隣り合わせのペプチドの質量差からアミノ酸の種類を判別することによって蛋白質のアミノ酸配列が分かるという仕組みは、サンガー法によるDNAシーケンスと似ている(図2B)[10]。蛋白質のリン酸化修飾については、原著論文[11]と単行本の1章が役に立った[12]。

昨今の分子生物学の発展に次世代シーケンサーは欠かせないので、まずその原理から学ぶ必要がある。塩基配列を高速に読み取る方法は、分子生物学の教科書の図を眺めていると何となく理解出来た気になる[8,9,13]。決定された短いDNA断片の塩基配列をヒト全ゲノムの配列に統合する方法としては、数百塩基対のDNA配列情報の中から末端の重なる部分を探して直接統合する全ゲノムショットガン法 whole-genome shotgun sequencing と、まず1.5 MbのDNA断片から細菌人工染色体 bacterial artificial chromosome (BAC) ライブラリーを作成し、各BACクローンの遺伝子物理地図上の位置を確定してからショットガン法で配列決定する階層化ショットガン法 hierarchical shotgun sequencing がある[13]。インフルエンザ桿菌の塩基配列決定に全ゲノムショットガン法が用いられたが、原核細胞のゲノムは多くが蛋白質をコードしている配

列で占められており、シーケンス・カバレッジ sequencing coverage (読んだ塩基配列の総延長/ゲノムの長さ)あるいはリード深度 read depth (平均的にDNAの各塩基は何回読まれたか)は6程度でも信頼性の高い塩基配列が得られた[14]。真核細胞のゲノムはサイズが大きく、反復配列、イントロン、偽遺伝子などに富んでいるため、ヒトゲノム国際コンソーシアムによるプロジェクトでは階層化ショットガン法が用いられた。7,000の連鎖遺伝子マーカー(平均0.7 Mbに1つ)、35,000の物理遺伝子マーカー(平均100 kbに1つ)によって30万のBACクローンライブラリーの位置決めが為され、シーケンス・カバレッジ7.5で配列を解読した[15,16]。一方、全ゲノムショットガン法も試され、シーケンス・カバレッジ5.1でヒト全ゲノムを解析した結果が同じ年に報告された[17]。

トランスクリプトーム解析には、DNAマイクロアレイ microarray などのハイブリッド形成 hybridization を用いる技術が発達してきたが、感知できる mRNA の特異性の問題から、未知の変異 mRNA や融合遺伝子から転写された mRNA を検出するのには全く不向きである。現在このような目的には網羅的 RNA シーケンスが行われる[18]。さらに未知の融合遺伝子を同定する手順については原著論文を参照した[19,20]。

このように、アメリカの分子生物学教科書はきれいな図が豊富で読んでいて楽しいが、核酸や蛋白質の網羅的解析技術は臨床医には分かりにくい。しかしよくよく考えてみると、壁になっているのは *in vitro* や *in vivo* の実験手技よりも、寧ろ得られた大量の実験データを *in silico* でどのように処理するかということで、これはバイオインフォマティクスの領域であると気がついた。

IV. バイオインフォマティクスを囁る

バイオインフォマティクスを「生物学と情報学の両者にまたがる研究領域」というように大きく捉えることが最近の動向であるが[21]、「ゲノムの構造・機能などの生命現象を計算科学による情報処理によって理解する学問分野」という当初の定義くらいが臨床医には取っつきやす

い[22]。今までに収集されたDNA, RNA, 蛋白質などの配列は、コンピューター／データベースで扱いやすいデータ形式でNational Center for Biotechnology Information (NCBI), European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) 協同で構築されている国際塩基配列データベースInternational Nucleotide Sequence Database (INSD) に保存され、アクセッション番号accession numberで管理されている[23]。実験によって新しい配列を収集したら、今までに蓄積された配列と比較しなければならない。この手続きを配列アラインメントsequence alignmentと言ひ、その技術の発達バイオインフォマティクス黎明期の発展とほぼ同義なので、雰囲気だけでも知っておいて損は無いと思う。2つの比較する配列を上下に重ねて左から右に書き、上下の配列が異なる時に不一致とするかギャップを入れてスコア化し、全スコアの和の最大値（最適化）を得る動的計画法dynamic programmingは、数学的な定式化に相性が良く発展の原動力となった[24]。しかしこの方法は計算に配列長の2乗から3乗の時間がかかるため、より高速に配列の比較が出来るようにk-mer法が考案された。k-mer法では配列を長さkの固定長配列断片に区切り、一致する、あるいはスコアがある閾値以上の類似性を持った配列断片を検索する。そのような配列断片が見つかったら、スコアが最大になるまで配列を両方向に伸ばして高スコア領域ペア high score segment pairを求める。Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ではDNA配列アラインメントのk値は11, アミノ酸では3に設定されている[25]。配列アラインメントによって完全に一致する配列が見つければその遺伝子を同定出来たことになるが、未知の遺伝子の位置を決定し、機能の分かっている遺伝子と相同性homologyを比べる等をして機能を解明していくこと（遺伝子情報の基本的注釈付け、アノテーションannotation）が本来の目的である。

V. がんゲノム医療の時代へ

2015年1月30日、ゲノム医学に基礎をおくプレ

シジョン・メディシン precision medicineが、アメリカ市民を代表するオバマ大統領（当時）によって打ち上げられた[26]。日本に於いてもがんゲノム医療を推進することになり[27]、医療の専門家である医師にはゲノム医学についての深い理解が求められることになった。実際のがんゲノム医療は図4のようなステップを踏むと考えられる。体細胞（がん細胞）遺伝子変異variantを見つけるには、得られた腫瘍検体のDNA配列をヒトゲノムリファレンス配列reference sequences NC_000023.10 (Homo sapiens build GRCh37/hg19) に貼り付けて比較する[28]。その後見つかった遺伝子変異の情報が整理され、最終的に適合する治療薬がないかを臨床試験で評価中の薬剤も含めて検討する[29-32]。これらの各ステップをどのように管理するかはこれから各医療施設で検討されていく事項であるが、おそらくステップ5）が完了した時点でシーケンス報告書が作られるであろう。そこにどのような情報が書かれるべきかは定まっていなが、Variant

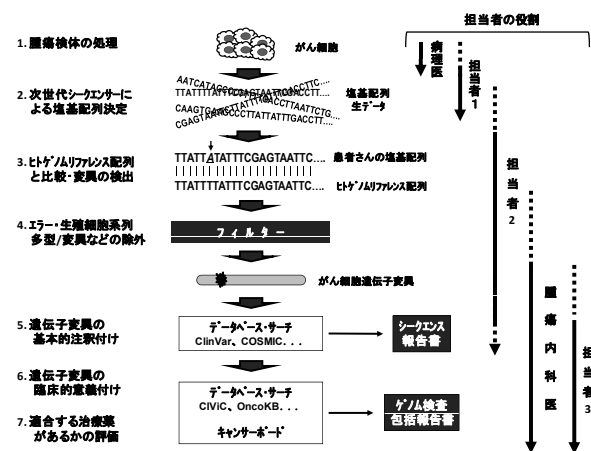


図4 がんゲノム医療のステップ

1. 腫瘍検体からDNAを抽出し、2. 次世代シーケンサーによってDNA配列を決定する。3. ヒトゲノムリファレンス配列と比較して (alignment), リファレンスと異なる配列 (変異) を検出する (variant call)。次に4. エラーや生殖細胞系列多型・変異などを除外して (filtering), 体細胞 (がん細胞) 遺伝子変異を同定する。さらに5. 遺伝子変異のゲノム上の位置、構造および機能等の基本的注釈付け (annotation) をした後、6. 遺伝子変異の臨床的意義付けとして i. 臨床的意義が高い, ii. 潜在的に臨床的意義がある, iii. 臨床的意義不明, iv. 病的意義なし, の4つに分類する。最後に7. 適合する治療薬があるかをがんサージカルボードで総合的に評価する。

Call Format (VCF) という形式が提案されている[33]。従って、腫瘍内科医に最低限求められることは、以上のステップとVCFを理解し、ゲノム検査包括報告書を書いて患者に説明することである。そのための勉強はWeb上のデータベースを駆使するに限る。腫瘍関連遺伝子バリエーションの情報はClinVar (NCBI)[34,35]やCOSMIC (Wellcome Sanger Institute)[36,37]などに集積されているし、抗がん剤も含めた情報はCIViC (Washington University School of Medicine)[38,39]やOncoKB (Memorial Sloan Kettering Cancer Center)[40,41]から集めることができる。

また、このようながんゲノム医療を実施するためには様々な職種の担当者を養成する必要があることが分かる(図4)。担当者1は検体を扱うので、臨床検査技師が担うのが良いと思う。担当者3は患者さんに遺伝子検査結果を説明する役割を担うので、看護師、薬剤師、遺伝子カウンセラーなどが関わることになるであろう。問題は担当者2で、現時点では適切な人材を思い浮かべることが出来ない。特定の企業に外注する、人工知能を用いたシステムを構築するなどいろいろな考え方があると思うが、いずれにせよこの部分がブラックボックスのままになって、医師が自動的に出てきたシーケンス報告書を鵜呑みにするような事態は避けたいと思う。

* * *

以上、臨床腫瘍学に関連した分子生物学の実験、バイオインフォマティクスからがんゲノム医療まで学んだ雑感を述べた。次世代シーケンサーで得られたDNA配列には膨大な情報が含まれており、それを取捨選択し担当医や患者が理解できるように上手くまとめることが早晩腫瘍内科医に求められるようになるであろう。これをキュレーションcurationと呼ぶが、この単語の動詞型curateはcuratorから転じて出来た単語で“to act as curator”という意味である。curatorの語源を辿っていくと中世ラテン語*cūrātus*に行き着き、“one entrusted with the cure of souls”, “a clergyman who has the spiritual charge of a parish”と説明されている[42]。イエスやパウロの言葉がキリスト教の教義へと発展していく中で解釈の違いや異端が生まれて複雑化し、それを上

手くまとめて信者にキリスト教の教えを導くのは、特別に教育された聖職者にのみ許された行為ではなかったかと想像する。人の遺伝子情報を解読して患者に伝えるキュレーションは、すでに神の領域に足を踏み入れているのかもしれない。

利益相反

著者は、この文章の内容について財務的および非財務的な利益相反を有しないことを表明する。

謝 辞

本原稿を書くに当たり、田川雅敏先生(千葉県がんセンターがん治療開発グループ)、吉田輝彦先生(国立がん研究センター研究所遺伝医学研究分野)、河野隆志先生(国立がん研究センター研究所ゲノム生物学研究分野)、および的場美希さん(オックスフォード大学出版局)に貴重な意見を賜りました。この場を借りてお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 西田亮介. (2017) わたしの紙面批評. 偽ニュース対策. 朝日新聞 (2017年2月18日).
- 2) Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561-6.
- 3) Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. (2007) Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131, 1190-203.
- 4) Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. (2012) KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 18, 375-7.
- 5) Onishi M, Kinoshita S, Morikawa Y, et al. (1996) Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp Hematol* 24, 324-9.
- 6) 関谷剛男. (1993) がん遺伝子の分離法. In: 日本生化学会学会 editor 新生化学実験講座 2 核酸V細胞工学的技. 東京: 化学同人社, 199-208.
- 7) Mano H. (2008) Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci* 99, 2349-55.
- 8) Albert B, Johnson A, Lewis J, et al. (2017) 細胞, 分子, 生体システムを解析する. In: 細胞の分子生物学第6版. 東京: 株式会社ニュートンプレス, 439-528.

- 9) Watson JD, Baker TA, Bell SP, et al. (2017) 分子生物学の研究技術. In: ワトソン遺伝子の分子生物学第7版. 東京: 東京電機大学出版局, 147-91.
- 10) 吉野健一. (2012) 2.2 質量分析法によるシーケンシング. In: 日本分析化学会 editor タンパク質分析. 東京: 丸善出版, 33-52.
- 11) Rush J, Moritz A, Lee KA, et al. (2005) Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 23, 94-101.
- 12) 石濱 泰, 若林真樹. (2012) 4 翻訳後修飾 4.1 リン酸化. In: 日本分析化学会 editor タンパク質分析. 東京: 丸善出版, 121-9.
- 13) Brown TA. (2018) Sequencing genomes. In: Brown TA editor *Genomes 4*. New York: Garland Science, 87-117.
- 14) Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496-512.
- 15) Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- 16) International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-45.
- 17) Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-51.
- 18) Brown TA. (2018) Genome annotation. In: Brown TA editor *Genomes 4*. New York: Garland Science, 119-34.
- 19) Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, et al. (2009) Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 458, 97-101.
- 20) Maher CA, Palanisamy N, Brenner JC, et al. (2009) Chimeric transcript discovery by paired-end transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12353-8.
- 21) 岩崎 渉. (2017) バイオインフォマティクス. 実験医学 35 (増刊), 713-9.
- 22) Mount DW. (2005) (岡崎康司, 坊農秀雅訳) バイオインフォマティクスの歴史と全貌. In: バイオインフォマティクス. 東京: メディカル・サイエンス・インターナショナル, 1-26.
- 23) International Nucleotide Sequence Database Collaboration. <http://www.insdc.org/>: Access date Jan 24, 2018.
- 24) Mount DW. (2005) (岡崎康司, 坊農秀雅訳) 対にした配列のアラインメント. In: バイオインフォマティクス. 東京: メディカル・サイエンス・インターナショナル, 61-108.
- 25) Mount DW. (2005) (岡崎康司, 坊農秀雅訳) 類似配列のデータベース検索. In: バイオインフォマティクス. 東京: メディカル・サイエンス・インターナショナル, 211-256.
- 26) The White House. (2015) The Precision Medicine Initiative. <https://obamawhitehouse.archives.gov/node/333101>.
- 27) がん治療 オーダーメイドめざす. 朝日新聞 (2017年12月26日).
- 28) Human Genome Variation Society. Sequence Variant Nomenclature. <http://varnomen.hgvs.org/>. Access date Jan 24, 2018.
- 29) Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. (2017) Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 19, 4-23.
- 30) Good BM, Ainscough BJ, McMichael JF, et al. (2014) Organizing knowledge to enable personalization of medicine in cancer. *Genome Biol* 15, 438.
- 31) Van Allen EM, Wagle N, Levy MA. (2013) Clinical analysis and interpretation of cancer genome data. *J Clin Oncol* 31, 1825-33.
- 32) 加藤 護. (2016) 最新がん個別化医療. 癌と化学療法 43, 391-7.
- 33) Danecek P, Auton A, Abecasis G, et al. (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27, 2156-8.
- 34) ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>: Access date Jan 30, 2018.
- 35) Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. (2016) ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res* 44, D862-868.
- 36) COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>: Access date Jan 30, 2018.
- 37) Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, et al. (2017) COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* 45, D777-D783.
- 38) CIViC. <https://civic.genome.wustl.edu/home>: Access date Jan 30, 2018.
- 39) Griffith M, Spies NC, Krysiak K, et al. (2017) CIViC is a community knowledgebase for expert crowdsourcing the clinical interpretation of variants in cancer. *Nat Genet* 49, 170-4.
- 40) OncoKB. <http://oncokb.org/>: Access date Jan 30, 2018.
- 41) Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. (2017) OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* 2017.
- 42) Oxford English Dictionary. <http://www.oed.com/>: Access date Jan 30, 2018.