

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

次世代型コンパニオン診断薬の
創出に向けた橋渡し研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 尾 和 人

平成 26 (2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

次世代型コンパニオン診断薬の

創出に向けた橋渡し研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西尾 和人

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

次世代型コンパニオン診断薬の創出に向けた橋渡し研究	1
西尾 和人	

II. 分担研究報告書

4

1. LungFusion /LungCarta における Feasibility 試験・キットデザインの
確定・基本性能試験に関する研究
西尾 和人、坂井 和子、中川 和彦、富田 秀太、武田 真幸
2. PGM Fusion Panel における Feasibility 試験・キットデザインの確定に
関する研究
西尾 和人、坂井 和子、中川 和彦、富田 秀太、武田 真幸
3. NCCE パネルの設計、基本・臨床性能試験に関する研究
土原 一哉、山中 竹春、後藤 功一、松本 慎吾、葉 清隆

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

10

IV. 研究成果の刊行物・別刷

11

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

次世代型コンパニオン診断薬の創出に向けた橋渡し研究

研究代表者 西尾 和人
近畿大学医学部ゲノム生物学教室 教授

研究要旨

次世代型コンパニオン診断薬の創出に向け、MassARRAY を用いた LungFusion キット、IonPGM を用いた PGM Fusion Panel、NCCE Panel の 3 種のキットについてのキットデザインの確定と feasibility 試験を実施し、いずれも良好な結果を得た。これらの結果を受けて、計画通り次年度の実施項目への取り組みを進める。

土原 一哉（国立がん研究センター 早期・探索
臨床研究センター 分野長）
山中 竹春（国立がん研究センター 早期・探索臨
床研究センター 生物統計部門長）
坂井 和子（近畿大学医学部ゲノム生物学教室
助教）
後藤 功一（国立がん研究センター東病院呼吸器
内科 外来医長）
中川 和彦（近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門
教授）
松本 慎吾（国立がん研究センター 早期・探索
臨床研究センター 医師）
富田 秀太（近畿大学医学部ゲノム生物学教室
講師）
葉 清隆（国立がん研究センター 早期・探索
臨床研究センター 医師）
武田 真幸（近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門
講師）

A. 研究目的

近年の非小細胞肺癌における事例は *EGFR* 変異や *ALK* 融合遺伝子陽性をバイオマーカーとして患者選択を行うことにより、著しい治療成績の改善が得られることを示している。コンパニオン診断薬の課題として、特に肺癌においては診断に供する検体が限られる場合が多く、微量検体から高精度に診断する技術が求められる。また、複数の遺伝子異常を個別に順次診断していくことは時間と検査費用を要する。ターゲットとなる遺伝子異常と薬剤開発が増えるほど、この問題は深刻さを増す。そこで、本研究では、次世代型コンパニオン診断薬として、複数の遺伝子異常を同時に測定可能な Multiplex 体細胞変異診断薬の feasibility 試験、

基本性能試験、GMP 製造、SOP 整備の工程による開発を進め、最終年度（平成 27 年度）に臨床性能試験を実施し、薬事承認申請することを目標とする。

B. 研究方法

平成 25 年度は、次世代型コンパニオン診断薬として、*ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子を検出する 3 種類のキット（LungFusion キット, PGM Fusion Panel, NCCE Panel）について、開発の第一段階であるキットデザインの確定と feasibility 試験を実施した。LungFusion キットと PGM Fusion Panel については、近畿大学が主体となり、それぞれの開発企業であるシーケノム社ならびにライフテクノロジーズ社と共同で実施した。キットの feasibility 試験では、融合遺伝子陽性の細胞株とホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた検討を行った。NCCE Panel については、国立がん研究センターが主体となり、同様の feasibility 試験を実施した。3 種のキットの中で、先行して進められている LungFusion キットについては、シーケノム社と近畿大学とが共同で PMDA の薬事戦略相談事前面談を受けた。また、上記開発に際して、近畿大学とシーケノム社では共同研究契約を締結した。

（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた体細胞変異解析は、「疫学研究に関する倫理指針」（平成 14 年 6 月制定、平成 25 年 4 月 1 日一部改正）を遵守して実施した。近畿大学では、近畿大学医学部遺伝子倫理委員会において承認された研究計画書（受付番号 24-071、24-075）に則り行った。国立がん研究センターでは、国立がん研究センター研究倫理審査委員会において承認された研究計画（研究課題番号 17-109）に則り行った。

C. 研究結果

(1) LungFusion キットに関する研究

LungFusion キットでは、*ALK* 融合遺伝子 (*EML4-ALK*, *KIF5B-ALK*)、*RET* 融合遺伝子 (*KIF5B-RET*, *CCDC6-RET*)、*ROS1* 融合遺伝子 (*EZR-ROS1*, *SDC4-ROS1*, *SLC34A2-ROS1*, *TPM3-ROS1*, *CD74-ROS1*, *LRIG3-ROS1*)、*ALK* 遺伝子変異 (*ALK_pL1196M*, *ALK_pC1156Y*, *ALK_pL1196M*) を検出する構成としている。この LungFusion キットを用いて、融合遺伝子陽性の肺がん細胞株 (H3122, H2228, HCC78) を用いて、*ALK* ならびに *ROS1* 融合遺伝子の検出を確認した。また、FISH (蛍光 in situ ハイブリダイゼーション) 法により *ALK* 融合遺伝子陽性であったホルマリン固定パラフィン包埋検体からも、*ALK* 融合遺伝子が検出されることを確認した。シーケノム社ならびに近畿大学において、50 例のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた feasibility 試験を実施し、良好なアッセイクオリティが認められた。RNA 抽出後から解析結果の取得までに要する時間は約 2 日であった。また、開発企業であるシーケノム社と近畿大学の間で、2013 年 12 月 12 日付で共同研究契約を締結し、LungFusion キットの開発に向けて、2014 年 3 月 17 日に医薬品医療機器総合機構にて薬事戦略相談事前面談を受けた。同面談において、LungFusion キットの全体構成を示したうえで、再度事前面談により性能試験等の助言を得るとよいとの指摘を受けた。この助言に従い、シーケノム社でキットの全体構成、仕様書の作成に着手した。

(2) PGM Fusion Panel に関する研究

PGM Fusion Panel は、次世代シーケンサー IonPGM (ライフテクノロジーズ社) を用いて、*ALK* 融合遺伝子 (*EML4-LK*, *KIF5B-ALK*, *KCL1-ALK*)、*RET* 融合遺伝子 (*KIF5B-RET*, *CCDC6-RET*)、*ROS1* 融合遺伝子 (*EZR-ROS1*, *GOPC-ROS1*, *LRIG3-ROS1*, *SDC4-ROS1*, *SLC34A2-ROS1*, *TPM3-ROS1*, *CD74-ROS1*) を検出するキットである。この PGM Fusion Panel の検出動作確認として、融合遺伝子陽性の肺がん細胞株 (H3122, H2228, HCC78) を用いて、*ALK* ならびに *ROS1* 融合遺伝子の検出を確認した。また、FISH 法により *ALK* 融合遺伝子陽性であったホルマリン固定パラフィン包埋検体からも、*ALK* 融合遺伝子が検出されることを確認した。Feasibility 試験として、OncoNetwork コンソーシアムと共同で、56 検体のホルマリン固定パラフィン包埋検体から抽出された RNA を用いて検討を行ったところ、FISH 法、免疫染色法およびリアルタイム PCR 法による測定結果との一致率は 90%以上であった。RNA 抽出後から解析結果の取得までに要する時間は約 3 日であった。この結果は 2014 年米国癌研究学会 (AACR Annual Meeting) で発表された。また、開発企業であるライフテクノロジーズ社と近畿大学の間で、2013 年 12 月 11 日付で秘密保持契約を締結した。

(3) NCCE panel に関する研究

ALK, *RET*, *ROS1* 遺伝子融合を有する肺がん細胞株 (H2228, LC2/ad, HCC78) のゲノム DNA 3 μ g から、それぞれの遺伝子逆位・転座の検出に成功した。また、LC2/ad 細胞のマウス移植片をホルマリン処理後、抽出したゲノム DNA 100 ng から遺伝子逆位が検出可能であることを確認した。さらに、FISH、RT-PCR で *ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子が確認された臨床検体 15 例 (胸水 1 例、切除検体 14 例/*ALK*, *RET*, *ROS1* それぞれ 5 例) のゲノム DNA 50 ng から、各々の遺伝子構造異常の検出も可能であった。同定された遺伝子融合点はすべての症例で異なっていた。点突然変異を含む一塩基置換については、過去のエクソームシーケンスの結果と 97%の一致率で検出可能であった。さらに治療効果との相関が示唆されている *EGFR*, *KRAS* などの一塩基置換、挿入欠失変異を有することがすでに示されている肺腺癌および大腸癌細胞株 5 株のゲノム DNA 250 ng を用いたシーケンスの結果、予想された変異がすべて検出可能であった。DNA 抽出後シーケンスデータの解析までに要する時間は約 7 日であった。

D. 考察

(1) LungFusion キットに関する研究

MassARRAY を用いた *ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子の検出が可能な LungFusion キットの開発に向けて、良好な feasibility が確認された。LungFusion キットは、RNA を鋳型として合成された cDNA (complementary DNA) を用いて測定するため、融合遺伝子の検出に際しては DNA を用いた測定に比べて融合部位が限定され安価に測定できる利点を有する反面、核酸の品質についての注意が必要である。PMDA の事前面談では、RNA 抽出と cDNA 化の工程については、現在の LungFusion キットの工程に含まれないため、試料の質のマネジメントなどのキット外の管理項目についての検討が不足していることが指摘された。開発企業であるシーケノム社とは、すでに共同研究契約を締結し、次年度以降の GMP 製造、SOP 整備、最終年度の計画している臨床性能試験の実施に向けて協力して各項目を進めている。

(2) PGM Fusion Panel に関する研究

IonPGM を用いた *ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子の検出が可能な PGM Fusion Panel の開発に向けて、開発企業であるライフテクノロジーズ社と秘密保持契約を締結し、ライフテクノロジーズ社が協力する OncoNetwork コンソーシアムと共同で、キットデザインの確定ならびに良好な feasibility を確認した。この結果を受けて、ライフテクノロジーズ社と近畿大学で、共同研究契約の締結準備を進めている。また、平成 26 年度にキット開発に関する PMDA の薬事戦略相談事前面談を受けるべく、キットの構成と仕様に関する取りまとめを進めている。本年度の進捗を受けて、平成 26 年度は、計画通り、基本性能試験と GMP 製造を進めることが可能で

あると考えられる。

(3) NCCE panel に関する研究

日常診療で得られる微量のホルマリン固定組織を用いたゲノム診断のためには100 ng以下のゲノムDNAから正確に遺伝子変異、構造異常が検出できることが必須である。今回作成したターゲットキャプチャーシーケンスシステムおよび遺伝子融合点検出プログラムはこの条件をほぼ満たしていることが示された。今後2年以内の薬事承認申請を目指すために具体的な取り組みを開始する。本研究で開発された遺伝子融合点検出プログラムの知財化を図り、共同研究を実施している診断薬企業などとともにキットのGMP製造、SOP整備に向けた準備を開始する。臨床性能試験の実施時には本研究の分担研究者が参画している全国規模の肺癌検体を収集しているLC-SCRUMとの連携を密にする。現在LC-SCRUMにおける遺伝子解析ではRT-PCRによる融合遺伝子のスクリーニングに加え、ゲノムDNAを用いた50遺伝子のマルチプレックス変異解析を200例以上実施しており、ここで得られているノウハウをもとに新規分子標的薬の臨床試験とカップリングした性能試験が実施できるよう調整を進めている。

E. 結論

平成25年度は、次世代型コンパニオン診断薬として、*ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子を検出する3種類のキット(LungFusionキット, PGM Fusion Panel, NCCE Panel)について、開発の第一段階であるキットデザインの確定とfeasibility試験を実施し、いずれのキットについても良好な結果を得た。次年度以降の計画遂行に向けて、順調に進んでいると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

1. Okamoto, I., Sakai, K., Morita, S., Yoshioka, H., Kaneda, H., Takeda, K., Hirashima, T., Kogure, Y., Kimura, T., Takahashi, T., Atagi, S., Seto, T., Sawa, T., Yamamoto, M., Setouchi, M., Okuno, M., Nagase, S., Takayama, K., Tomii, K., Maeda, T., Oizumi, S., Fujii, S., Akashi, Y., Nishino, K., Ebi, N., Nakagawa, K., Nakanishi, Y., Nishio, K. Multiplex genomic profiling of non-small-cell lung cancers from the LETS phase III trial of first-line S-1/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin: results of a west Japan oncology group study. *Oncotarget*, in press, 2014.

2. Kimura, H., Ohira, T., Uchida, O., Matsubayashi, J., Shimizu, S., Nagao, T., Ikeda, N., Nishio, K. Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 83(3): 329-33, 2014.

3. Sakai, K., Horiike, A., Darryl, I., Keita, K., Fujita, Y., Tanimoto, A., Sakatani, T., Saito, R., Kaburaki, K., Noriko, Y., Ohyanagi, F., Nishio, M., Nishio, K. Detection of EGFR T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci.*, 104(9): 1198-204, 2013.

4. 土原一哉. 次世代シーケンス技術を応用したがん薬物療法最適化への試み. *癌と化学療法*, 1(1):1-6, 2014.

H. 知的財産等の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1. 次世代DNAシーケンスデータを用いた融合遺伝子融合点検出プログラム(予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

LungFusion /LungCarta における Feasibility 試験・キットデザインの確定・基本性能試験に関する研究

研究代表者	西尾和人	近畿大学医学部ゲノム生物学教室・教授
研究分担者	坂井和子	近畿大学医学部ゲノム生物学教室・助教
研究分担者	中川和彦	近畿大学医学部腫瘍内科・教授
研究分担者	富田秀太	近畿大学医学部ゲノム生物学教室・講師
研究分担者	武田真幸	近畿大学医学部腫瘍内科・講師

研究要旨

平成 25 年度は、MassARRAY を用いた LungFusion の IVD 化を目指し、開発企業であるシーケノム社と近畿大学との間で共同研究契約を締結し、基本デザインの確定、ならびに PMDA との薬事戦略相談事前面談を実施し、申請に向けての助言を受けた。平成 27 年度の申請を目指し、基本性能試験を進めている。

A. 研究目的

MassARRAY を用いたマルチプレックスコンパニオン診断薬として、LungFusion /LungCarta による複数の遺伝子異常を同時に測定可能な診断薬の開発を目的とする。研究を通じて、feasibility 試験、基本性能試験、GMP 製造、SOP 整備、臨床性能試験を行い、最終年度での承認申請を目標としている。平成 25 年度には、キットデザインの確定と基本性能試験の実施を行う。

B. 研究方法

(1) LungFusion キットの feasibility 試験

シーケノム社と共同で、既承認および臨床開発が進行中の肺腺癌分子標的薬の効果予測に有用と考えられている ALK, RET, ROS1 融合遺伝子を MassARRAY により検出するキットデザインを行った。本キットは、各融合遺伝子の融合ポイントを含む特定領域を PCR によって増幅した後、融合ポイントを挟む領域に伸長用プライマーをハイブリダイズ、一塩基伸長反応を行い、生成された DNA 断片をマトリクスチップに塗布し、MALDI-TOF 質量分析計によって DNA 断片の質量数から一塩基伸長反応により生成された遺伝子の型を決定することにより、融合遺伝子、遺伝子変異の有無を同定するものである。PCR 反応における増幅領域の塩基長は 120 bp 以下のため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出された断片化核酸においても測定が可能である。本年度は、シーケノム社ならびに近畿大学において、融合遺伝子陽性の肺がん細胞株（H3122, H2228, HCC78）およびホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出した RNA を鋳型として feasibility 試験を実施した。

(2) 共同研究契約の締結

LungFusion キットの開発に当たり、開発企業である

シーケノム社と近畿大学の間で共同研究契約を締結した。

(3) PMDA の薬事戦略相談事前面談

LungFusion キットの開発に向けて、シーケノム社と共同で PMDA の薬事戦略相談事前面談を受けた。

（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた体細胞変異解析は、「疫学研究に関する倫理指針」（平成 14 年 6 月制定、平成 25 年 4 月 1 日一部改正）を遵守して実施した。同研究は、近畿大学医学部遺伝子倫理委員会において承認された研究計画書（受付番号 24-071、24-075）に則り実施した。

C. 研究結果

(1) LungFusion キットの feasibility 試験

LungFusion キットでは、ALK 融合遺伝子（*EML4-ALK*, *KIF5B-ALK*）、RET 融合遺伝子（*KIF5B-RET*, *CCDC6-RET*）、ROS1 融合遺伝子（*EZR-ROS1*, *SDC4-ROS1*, *SLC34A2-ROS1*, *TPM3-ROS1*, *CD74-ROS1*, *LRIG3-ROS1*）、ALK 遺伝子変異（*ALK_pL1196M*, *ALK_pC1156Y*, *ALK_pL1196M*）を検出する構成としている。この LungFusion キットを用いて、融合遺伝子陽性の肺がん細胞株（H3122, H2228, HCC78）を用いて、ALK ならびに ROS1 融合遺伝子の検出を確認した。また、FISH（蛍光 in situ ハイブリダイゼーション）法により ALK 融合遺伝子陽性であったホルマリン固定パラフィン包埋検体からも、ALK 融合遺伝子が検出されることを確認した。シーケノム社ならびに近畿大学において、50 例のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた feasibility 試験を実施し、良好なアッセイクオリティが認められた。RNA 抽出後から解析結果の取得まで要する時間は約 2 日であった。

(2) 共同研究契約の締結

開発企業であるシーケノム社と近畿大学の間で、2013年12月12日付で共同研究契約を締結した。

(3) PMDA の薬事戦略相談事前面談

LungFusion キットの開発に向けて、2014年3月17日に医薬品医療機器総合機構にて薬事戦略相談事前面談を受けた。同面談において、LungFusion キットの全体構成を示したうえで、再度事前面談により性能試験等の助言を得るとよいとの指摘を受けた。この助言に従い、シーケノム社と共にキットの全体構成、仕様書の作成に着手した。

D. 考察

MassARRAY を用いた *ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子の検出が可能な LungFusion キットの開発に向けて、feasibility が確認された。LungFusion キットは、RNA を鋳型として合成された cDNA (complementary DNA) を用いて測定するため、融合遺伝子の検出に際しては DNA を用いた測定に比べて融合部位が限定され、安価に測定できる利点を有する反面、核酸の品質についての注意が必要である。PMDA の事前面談では、RNA 抽出と cDNA 化の工程については、現在の LungFusion キットの工程に含まれないため、試料の質のマネジメントなどのキット外の管理項目についての検討が不足していることが指摘された。開発企業であるシーケノム社とは、すでに共同研究契約を締結し、次年度以降の GMP 製造、SOP 整備、最終年度の計画している臨床性能試験の実施に向けて協力して各項目を進めている。

E. 結論

MassARRAY を用いた *ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子の検出が可能な LungFusion キットの開発に向けて、Feasibility 試験を実施し、有用性を確認した。また、シーケノム社との共同研究契約の締結ならびに LungFusion キット開発に関する PMDA の薬事戦略相談事前面談を受け、次年度以降に必要な実施項目について再確認した。平成 25 年度における計画はほぼ達成したと考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

(1) Okamoto, I., Sakai, K., Morita, S., Yoshioka, H., Kaneda, H., Takeda, K., Hirashima, T., Kogure, Y., Kimura, T., Takahashi, T., Atagi, S., Seto, T., Sawa,

T., Yamamoto, M., Setouchi, M., Okuno, M., Nagase, S., Takayama, K., Tomii, K., Maeda, T., Oizumi, S., Fujii, S., Akashi, Y., Nishino, K., Ebi, N., Nakagawa, K., Nakanishi, Y., Nishio, K. Multiplex genomic profiling of non-small-cell lung cancers from the LETS phase III trial of first-line S-1/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin: results of a west Japan oncology group study. Oncotarget, in press, 2014.

(2) Kimura, H., Ohira, T., Uchida, O., Matsubayashi, J., Shimizu, S., Nagao, T., Ikeda, N., Nishio, K. Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer. Lung Cancer, 83(3): 329-33, 2014.

(3) Sakai, K., Horiike, A., Darryl, I., Keita, K., Fujita, Y., Tanimoto, A., Sakatani, T., Saito, R., Kaburaki, K., Noriko, Y., Ohyanagi, F., Nishio, M., Nishio, K. Detection of EGFR T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to EGFR tyrosine kinase inhibitor. Cancer Sci., 104(9): 1198-204, 2013.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

PGM Fusion Panel における Feasibility 試験・キットデザインの確定に関する研究

研究代表者	西尾和人	近畿大学医学部ゲノム生物学教室・教授
研究分担者	坂井和子	近畿大学医学部ゲノム生物学教室・助教
研究分担者	中川和彦	近畿大学医学部腫瘍内科・教授
研究分担者	富田秀太	近畿大学医学部ゲノム生物学教室・講師
研究分担者	武田真幸	近畿大学医学部腫瘍内科・講師

研究要旨

平成 25 年度は、IonPGM を用いた PGM Fusion Panel の IVD 化を目指し、開発企業であるライフテクノロジーズ社が協力する OncoNetwork コンソーシアムに参画し、PGM Fusion Panel の基本デザインの確定と feasibility 試験を実施し、良好な中間結果を得た。

A. 研究目的

IonPGM を用いたマルチプレックスコンパニオン診断薬として、PGM Fusion Panel による複数の遺伝子異常を同時に測定可能な診断薬の開発を目的とする。研究を通じて、feasibility 試験、基本性能試験、GMP 製造、SOP 整備、臨床性能試験の実施を目標としている。平成 25 年度には、キットデザインの確定と feasibility 試験の実施を行う。

B. 研究方法

(1) PGM Fusion Panel のキットデザイン

PGM Fusion Panel のキットデザインのは、ライフテクノロジーズ社が協力する OncoNetwork コンソーシアムの主要メンバーとして実施した。OncoNetwork コンソーシアムは、ヨーロッパを中心とするライフテクノロジーズ社が協力する組織である。PGM Fusion Panel は、RNA を鋳型として、①reverse transcription による cDNA (complementary DNA) 化、②各融合遺伝子の融合ポイントを含む特定領域の PCR 増幅によるライブラリー調製、③IonPGM によるシーケンス反応、④解析ソフトによる融合遺伝子の検出、の工程が含まれるキット構成となっている。PCR 反応における増幅領域の塩基長は 100~150 bp のため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出された断片化核酸においても測定が可能である。本年度は、OncoNetwork コンソーシアムならびに近畿大学において、融合遺伝子陽性の肺がん細胞株 (H3122, H2228, HCC78) およびホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出した RNA を鋳型として feasibility 試験を実施した。

(2) 秘密保持契約の締結

PGM Fusion Panel の開発に当たり、開発企業であるライフテクノロジーズ社と近畿大学との間で秘密保持

契約を締結した。現在、共同研究契約の締結の協議を実施

した。現在、締結に向けて準備中である。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた体細胞変異解析は、「疫学研究に関する倫理指針」（平成 14 年 6 月制定、平成 25 年 4 月 1 日一部改正）を遵守して実施した。同研究は、近畿大学医学部遺伝子倫理委員会において承認された研究計画書（受付番号 24-071、24-075）に則り行った。

C. 研究結果

(1) PGM Fusion Panel のキットデザイン

PGM Fusion Panel は、次世代シーケンサー IonPGM (ライフテクノロジーズ社) を用いて、*ALK* 融合遺伝子 (*EML4-ALK*, *KIF5B-ALK*, *KCL1-ALK*)、*RET* 融合遺伝子 (*KIF5B-RET*, *CCDC6-RET*)、*ROS1* 融合遺伝子 (*EZR-ROS1*, *GOPC-ROS1*, *LRIG3-ROS1*, *SDC4-ROS1*, *SLC34A2-ROS1*, *TPM3-ROS1*, *CD74-ROS1*) を検出するキットである。この PGM Fusion Panel の検出動作確認として、融合遺伝子陽性の肺がん細胞株 (H3122, H2228, HCC78) を用いて、*ALK* ならびに *ROS1* 融合遺伝子の検出を確認した。また、FISH (蛍光 in situ ハイブリダイゼーション) 法により *ALK* 融合遺伝子陽性であったホルマリン固定パラフィン包埋検体からも、*ALK* 融合遺伝子が検出されることを確認した。Feasibility 試験として、OncoNetwork コンソーシアムと共同で、56 検体のホルマリン固定パラフィン包埋検体から抽出された RNA を用いて検討を行ったところ、FISH 法、免疫染色法およびリアルタイム PCR 法による測定結果との一致率は 90% 以上であった。RNA 抽出後から解析結

果の取得までに要する時間は約3日であった。この結果は2014年米国癌研究会議(AACR Annual Meeting)で発表された。

(2) 秘密保持契約の締結

開発企業であるライフテクノロジーズ社と近畿大学の間で、2013年12月11日付で秘密保持契約を締結した。

D. 考察

IonPGMを用いた *ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子の検出が可能な PGM Fusion Panel の開発に向けて、開発企業であるライフテクノロジーズ社と秘密保持契約を締結し、ライフテクノロジーズ社が協力する OncoNetwork コンソーシアムと共同で、キットデザインの確定ならびに良好な feasibility を確認した。この結果を受けて、ライフテクノロジーズ社と近畿大学で、共同研究契約の締結準備を進めている。また、平成26年度にキット開発に関する PMDA の薬事戦略相談事前面談を受けるべく、キットの構成と仕様に関する取りまとめを進めている。本年度の進捗を受けて、平成26年度は、計画通り、基本性能試験と GMP 製造を進めることが可能であると考えられる。また、コンパニオン診断の観点から、製薬企業との連携を含めた協議も重要な項目として位置づけられると考えられる。

E. 結論

IonPGMを用いた *ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子の検出が可能な PGM Fusion Panel の開発に向けて、ライフテクノロジーズ社が協力する OncoNetwork コンソーシアムと共同で、キットデザインの確定ならびに良好な feasibility を確認した。また、ライフテクノロジーズ社との共同研究契約の締結に向けて準備を進めており、平成25年度における計画はほぼ達成したと考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

なし

H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

NCCE パネルの設計、基本・臨床性能試験に関する研究

研究分担者	土原一哉	国立がん研究センター早期・探索臨床研究センターTR 分野長
研究分担者	山中竹春	国立がん研究センター生物統計学部門長
研究分担者	後藤功一	国立がん研究センター東病院呼吸器内科外来医長
研究分担者	松本慎吾	国立がん研究センター早期・探索臨床研究センターTR 分野医員
研究分担者	葉清隆	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター先端医療科医員

研究要旨

次世代シーケンス技術を応用し肺癌分子標的療法の治療効果を予測する 10 遺伝子の異常を同時に測定可能な Multiplex 体細胞変異診断薬（NCCE Panel）の基本設計と feasibility 試験を行った。100 ng の微量ゲノム DNA から正確に遺伝子変異、融合が検出可能であり、今後早期の薬事承認申請を目指し診断キットの GMP 化と臨床性能試験に向けた取り組みを加速する。

A. 研究目的

次世代型コンパニオン診断薬として次世代シーケンス技術を応用し肺癌分子標的療法の治療効果を予測する複数の遺伝子異常を同時に測定可能な Multiplex 体細胞変異診断薬（NCCE Panel）の feasibility 試験、GMP 製造、SOP 整備の工程による開発を進め、最終年度（平成 27 年度）に臨床性能試験を実施し、薬事承認申請することを目指す。第 1 年度においてキットデザインの基本設計と feasibility 試験を行う。

B. 研究方法

既承認および臨床開発が進行中の肺腺癌分子標的薬の効果予測に有用と考えられている 10 遺伝子の一塩基置換、挿入欠失変異、遺伝子転座・逆位が生じるゲノム DNA を特異的に濃縮し、原理が異なる 2 種類の次世代シーケンサー（ライフテクノロジー社 Ion PGM およびイルミナ社 MiSeq システム）による解析が可能なターゲットキャプチャーシステムを設計した。またゲノム DNA 上の逆位・転座を自動的に検出する独自のコンピュータープログラムを設計した。国立がん研究センターに保有する希少ドライバー変異陽性の肺がん細胞株 8 株およびバイオバンク試料 15 検体のゲノム DNA を用いてターゲットキャプチャーシーケンス及び変異検出を行った。

（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた体細胞変異解析は国立がん研究センター研究倫理審査委員会において承認された研究計画（研究課題番号 17-109）に則り行った。

C. 研究結果

ALK, *RET*, *ROS1* 遺伝子融合を有する肺がん細胞株（H2228, LC2/ad, HCC78）のゲノム DNA 3 µg から、それぞれの遺伝子逆位・転座の検出に成功した。また、LC2/ad 細胞のマウス移植片をホルマリン処理後、抽

出したゲノム DNA 100 ng から遺伝子逆位が検出可能であることを確認した。さらに、FISH、RT-PCR で *ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子が確認された臨床検体 15 例（胸水 1 例、切除検体 14 例／*ALK*, *RET*, *ROS1* それぞれ 5 例）のゲノム DNA 50 ng から、各々の遺伝子構造異常の検出も可能であった。同定された遺伝子融合点はすべての症例で異なっていた。点突然変異を含む一塩基置換については、過去のエクソームシーケンスの結果と 97% の一致率で検出可能であった。さらに治療効果との相関が示唆されている *EGFR*, *KRAS* などの一塩基置換、挿入欠失変異を有することがすでに示されている肺腺癌および大腸癌細胞株 5 株のゲノム DNA 250 ng を用いたシーケンスの結果、予想された変異がすべて検出可能であった。DNA 抽出後シーケンスデータの解析までに要する時間は約 7 日であった。

D. 考察

日常診療で得られる微量のホルマリン固定組織を用いたゲノム診断のためには 100 ng 以下のゲノム DNA から正確に遺伝子変異、構造異常が検出できることが必須である。今回作成したターゲットキャプチャーシーケンスシステムおよび遺伝子融合点検出プログラムはこの条件をほぼ満たしていることが示された。今後 2 年以内の薬事承認申請を目指すために具体的な取り組みを開始する。本研究で開発された遺伝子融合点検出プログラムの知財化を図り、共同研究を実施している診断薬企業などとともにキットの GMP 製造、SOP 整備に向けた準備を開始する。臨床性能試験の実施時には本研究の分担研究者が参画している全国規模の肺癌検体を収集している LC-SCRUM との連携を密にする。現在 LC-SCRUM における遺伝子解析では RT-PCR による融合遺伝子のスクリーニングに加え、ゲノム DNA を用いた 50 遺伝子のマルチプレックス変異解析を 200 例以上実施しており、ここで得られてい

るノウハウをもとに新規分子標的薬の臨床試験とカップリングした性能試験が実施できるよう調整を進めている。

E. 結論

肺腺癌生検材料など微量組織から抽出したゲノム DNA を用い分子標的療法の治療効果予測に有用な遺伝子変異、構造異常を同時に検出可能な診断キットのプロトタイプを作成し、良好な基本性能を確認した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

(1) 土原一哉. 次世代シーケンス技術を応用したがん薬物療法最適化への試み. 癌と化学療法, 41(1):1-6,2014.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1.特許取得

次世代 DNA シーケンスデータを用いた融合遺伝子融合点検出プログラム(予定)

2.実用新案登録

なし

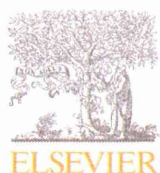
3.その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamoto, I., Sakai, K., Morita, S., Yoshioka, H., Kaneda, H., Takeda, K., Hirashima, T., Kogure, Y., Kimura, T., Takahashi, T., Atagi, S., Seto, T., Sawa, T., Yamamoto, M., Setouchi, M., Okuno, M., Nagase, S., Takayama, K., Tomii, K., Maeda, T., Oizumi, S., Fujii, S., Akashi, Y., Nishino, K., Ebi, N., Nakagawa, K., Nakanishi, Y., Nishio, K.	Multiplex genomic profiling of non-small-cell lung cancers from the LETS phase III trial of first-line S-1/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin: results of a west Japan oncology group study.	Oncotarget	In press		2014
Kimura, H., Ohira, T., Uchida, O., Matsubayashi, J., Shimizu, S., Nagao, T., Ikeda, N., Nishio, K.	Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer.	Lung Cancer	83(3)	329-33	2014
Sakai, K., Horiike, A., Darryl, I., Keita, K., Fujita, Y., Tanimoto, A., Sakatani, T., Saito, R., Kaburaki, K., Yanagitani, N., Ohyanagi, F., Nishio, M., Nishio, K.	Detection of EGFR T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to EGFR tyrosine kinase inhibitor.	Cancer Sci.	104(9)	1198-204	2013
土原一哉	次世代シーケンス技術を応 用したがん薬物療法最適化 への試み	癌と化学療法	1(1)	1-6	2014



Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer



Hideharu Kimura^a, Tatsuo Ohira^b, Osamu Uchida^c, Jun Matsubayashi^d, Shinichiro Shimizu^e, Toshitaka Nagao^d, Norihiko Ikeda^b, Kazuto Nishio^{a,*}

^a Department of Genome Biology, Kinki University Faculty of Medicine, 337-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama, Osaka 589-8511 Japan

^b Department of Surgery, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

^c Department of Respiratory Surgery, Funabashi Municipal Medical Center, 1-21-1 Kanasugi, Funabashi, Chiba 273-8588, Japan

^d Department of Anatomic Pathology, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

^e Department of Pathology, Funabashi Municipal Medical Center, 1-21-1 Kanasugi, Funabashi, Chiba 273-8588, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2013

Received in revised form

11 December 2013

Accepted 20 December 2013

Keywords:

Non-small-cell lung cancer

EGFR mutation

EGFR-TKI treatment

cobas[®] EGFR Mutation Test

Companion diagnostics

Personalised healthcare

ABSTRACT

Introduction: Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations have been reported to be correlated with the use of EGFR-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs). Therefore, it is essential to confirm the presence of EGFR mutations using highly sensitive testing methods. In this study, we compared the performance of the cobas[®] EGFR Mutation Test (cobas EGFR assay) and the *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit (*therascreen* EGFR assay) for use as an *in vitro* diagnostic (IVD) product.

Methods: We extracted DNA from 150 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from 150 patients diagnosed with NSCLC, and performed a comparative study of the cobas EGFR and *therascreen* EGFR assay methods. All discordant results were re-analyzed by direct sequencing.

Results: The concordance rate between the cobas EGFR assay and the *therascreen* EGFR assay was 98.0% (145/148). EGFR mutations were detected at a frequency of 40.9% (61/149) in NSCLC specimens using the cobas EGFR assay and 40.2% (60/149) using the *therascreen* EGFR assay. Three discrepant results were found in this study. Two double mutations were detected by the cobas EGFR assay but only one in the *therascreen* EGFR assay. No invalid results resulted from sample analysis by the cobas EGFR assay.

Conclusions: Our results show a high concordance rate (98.0%) of cobas EGFR assay with an existing IVD product, the *therascreen* EGFR assay. Since they are IVD diagnostic products, both assays proved to be simple, validated methods in detecting the most common, clinically significant EGFR mutations and proved to be helpful for appropriate treatment guidance for NSCLC patients.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients frequently have activating EGFR mutations and respond well to treatment with small molecule EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as gefitinib and erlotinib [1–4]. Both the American Society of Clinical Oncology and the Japan Lung Cancer Society recommend EGFR mutation testing in patients being considered for EGFR-TKI treatment as a first-line therapy [5]. Similar guidelines recommending testing for EGFR mutations were established by the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology [6]. Patients' EGFR mutation status prior to the commencement of treatment impacts outcomes and, as a result, EGFR testing has been

developed as a companion diagnostic; this relationship between therapeutic and diagnostic agents contributes to personalized healthcare. Recently, it was reported that about half of patients who are initially sensitive to EGFR-TKIs may acquire resistance to EGFR-TKIs [7] following a period of therapy, mainly as a result of the appearance of EGFR mutations associated with resistance to treatment, such as T790M. Indeed, a recent study suggested that the T790M mutation may be present in a small proportion of tumor cells prior to treatment, with the proportion of mutant alleles increasing gradually during treatment [8]. Similar findings were observed for exon 20 insertions; that they are usually associated with primary or de novo resistance to EGFR-TKI therapy [9]. Thus, it is important to re-assess EGFR mutation status during treatment to determine the most appropriate treatment regimens for patients.

A number of PCR-based techniques are used in the clinic for the assessment of EGFR mutations. In Japan, the "Scorpion-ARMS" *therascreen*[®] EGFR Rotor-Gene Q (RGQ) PCR Kit (*therascreen* EGFR

* Corresponding author. Tel.: +81 72 366 0221; fax: +81 072 367 6369.

E-mail address: knishio@med.kinki.ac.jp (K. Nishio).

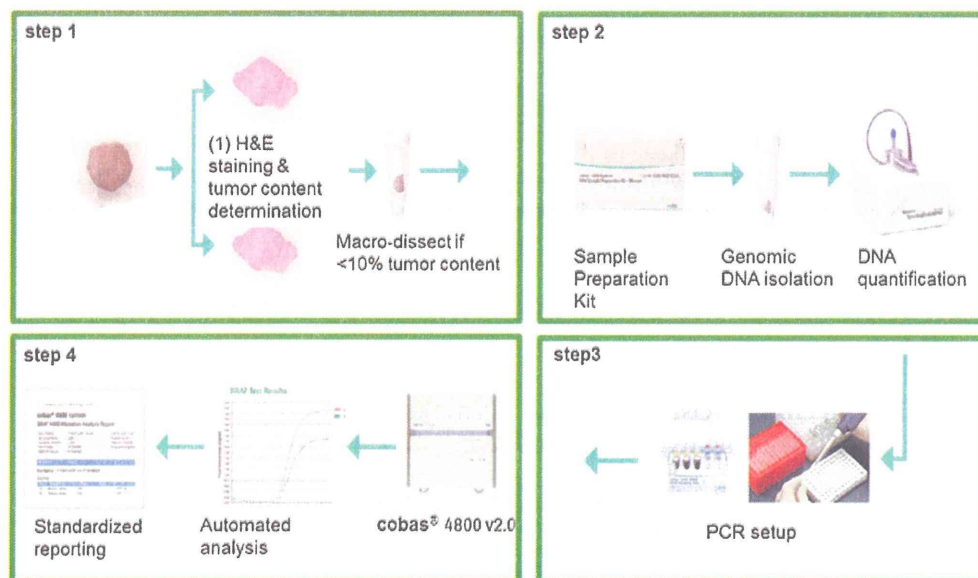


Fig. 1. Assay flow for the cobas EGFR mutation assay. The assay is composed of four steps. Step 1: 5- μ m sections are prepared from FFPE tissue. One section is used for H&E staining to assess tumor content and the other section is used for DNA isolation. Step 2: Genomic DNA is isolated using the cobas® DNA Sample Preparation Kit. Step 3: DNA is mixed with reagents after quantification. Step 4: DNA is amplified using the cobas z 480 system. Results are automatically reported.

assay; Qiagen, Hilden, Germany) is the only available *in vitro* diagnostic (IVD) test.

In this study, we compared the performance of the cobas EGFR assay and the *therascreen* EGFR assay using formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens from NSCLC patients.

2. Materials and methods

2.1. Tissue samples

A series of archived 150 FFPE tissue samples which was surgically resected from 150 Japanese patients diagnosed with NSCLC, collected between March 2011 and December 2012, was obtained from Tokyo Medical University (Tokyo, Japan) and Funabashi Medical Hospital (Funabashi, Japan). All patients enrolled in the study provided informed consent for the use of resected tissue. The study was approved by the ethics committee of each participating institute and conducted according to Institutional Review Board guidelines.

2.2. cobas EGFR Mutation Test

The cobas EGFR assay is an allele-specific real-time PCR system (Figure, Supplemental Digital Content 1; Fig. 1) that qualitatively measures the amplification of DNA to identify 41 mutations in exons 18–21 of the *EGFR* gene from 50 ng of DNA derived from human FFPE NSCLC tissues (Table, Supplemental Digital Content 2). Within each reaction mixture, exon 28 was amplified as an internal control. DNA isolation, amplification/detection, and result reporting can be performed in less than 8 h with up to 30 specimens processed simultaneously. The cobas EGFR assay has fully automated results reporting.

2.3. Specimen preparation for cobas EGFR assay

Two FFPE tissue sections of 5 μ m thickness were prepared for this assay. One was used for DNA extraction and the other was used to confirm the presence of tumor content by hematoxylin and eosin

(H&E) staining, which was performed by a pathologist. Any specimen containing <10% tumor content by area was macrodissected.

2.4. DNA extraction

FFPE tissue specimens were deparaffinized and then DNA extraction was performed according to the standard procedure described in the cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche Molecular Systems, Inc., USA) package insert. Briefly, the sample was incubated for 1 h at 56 °C and then for additional one hour at 90 °C in the presence of a protease and chaotropic lysis/binding buffer that causes the release of nucleic acids but protects released genomic DNA from degradation by DNase. The amount of genomic DNA was spectrophotometrically determined and adjusted to a fixed concentration of 2 ng/ μ L.

2.5. PCR amplification and detection

A total of 150 ng of DNA is required for the cobas EGFR assay. Target DNA was amplified and detected using the cobas® z480 analyzer (Roche Molecular Systems Inc.) according to the instructions for the cobas® EGFR Mutation Test, which measures the fluorescence generated by specific PCR products. All results were automatically performed by cobas® 4800 software.

2.6. *therascreen*® EGFR RGQ PCR Kit

The *therascreen* assay is a real time-PCR assay that combines the Amplification Refractory Mutation System (ARMS) and Scorpions fluorescent primer/probe system. It can detect 29 somatic mutations in exons 18–21 of *EGFR*. A maximum of 7 results can be obtained from one run. The *therascreen* EGFR assay was performed according to the manufacturer's guidelines (Qiagen). Briefly, DNA was isolated from FFPE tissue samples and the total sample DNA assessed by amplifying a region of exon 2 from *EGFR* by PCR. Next, the DNA samples were tested for the presence or absence of *EGFR* mutations by real-time PCR using a Scorpion probe and primers specific for wild type and mutant *EGFR* DNA. The difference

Table 1
Clinical characteristics of the patients providing surgically resected FFPE samples in NSCLC.

	N = 149
Gender	
Male	75
Female	74
Age	
Younger than 65 years	42
Older than 65 years	107
Histology	
Adenocarcinoma or adeno-squamous cell carcinoma (Ad)	126
Squamous cell carcinoma (Sq)	17
Large cell carcinoma (La)	2
Other	4
Smoking history	
Smoker	18
Ever smoker	73
Never smoker	56
ND	2

ND, not determined; N, number.

between the mutation assay cycle threshold (C_T) and control assay C_T from the same sample was used to calculate sample ΔC_T values. Samples designated mutation positive if the ΔC_T was less than the cutoff ΔC_T value.

2.7. Sanger sequencing

DNA samples obtained from specimens that were discordant between cobas EGFR and *therascreen* EGFR assays were amplified using the following site-specific primers: Exon 18 Forward, 5'-TGGAGCCTCTTACACCCAGT-3', Reverse, 5'-ACAGCTTGAAGGACTCTGG-3'; Exon 19 Forward, 5'-TCTGGA-TCCCAGAAGGTGAG-3', Reverse, 5'-CAGCTGCCAGACATGAGAAA-3'; Exon 20 Forward, 5'-CATTCATGCGTCTTCACCTG-3', Reverse, 5'-GTCTTTGTGTTCCTGGACAT-3'; Exon 21 Forward, 5'-GATCTGTCCCTCACAGCAGGGTC-3', Reverse, 5'-GGCTGACCTAAAGCCACCTCC-3'. The fragments were subcloned into the Zero Blunt TOPO vector (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit; Life Technologies, USA). Direct sequencing was performed with 100 colonies from one specimen by ABI3100 Genetic Analyzer (ABI) using the BigDye® Terminators v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). One mutation detected in 100 results was classed as "Mutation Detected" in this study. This assay required 1 µg of genomic DNA from specimens. Sanger sequencing was performed with the specimen that resulted double mutation (L858R and M790M) from cobas EGFR assay but single mutation (L858R) from *therascreen* EGFR assay at Mitsubishi Chemical Medicine Corporation followed by daily routine. The sequencing result was used as Golden standard.

3. Results

3.1. Study population

A series of 150 FFPE tissue samples from patients diagnosed with NSCLC was examined. One specimen was excluded owing to a lack of a completed consent form, leaving 149 samples available for analysis. The clinical and pathological characteristics of the patients providing the evaluable specimens are summarized in Table 1.

3.2. EGFR mutation types

EGFR mutations were identified in 63 NSCLC specimens (42.3%) using the cobas EGFR assay and 61 specimens (40.9%) using the

Table 2
Methods correlation between mutation findings using the cobas EGFR and *therascreen* EGFR assays.

		<i>therascreen</i>			Total
		MD	MND	Invalid	
cobas	MD	59	2	0	61
	MND	1	86	1	88
	Invalid	0	0	0	0
	Total	60	88	1	149

MD, mutation detected; MND, mutation not detected.

Table 3
Detailed concordant rate between cobas EGFR and *therascreen* EGFR assays.

Mutation	MD concordance	MND concordance	Total concordance
G719X	100% (3/3)	100% (145/145)	100% (148/148)
exon19del	95.7% (22/23)	100% (125/125)	99.3% (146/147)
S768I	100% (1/1)	99.3% (146/147)	99.3% (147/148)
T790M	–	99.3% (147/148)	99.3% (147/148)
exon20ins	–	100% (148/148)	100% (148/148)
L858R	100% (34/34)	99.1% (113/114)	99.3% (147/148)

Del, deletion; Ins, insertion; MD, mutation detected; MND, mutation not detected.

therascreen EGFR assay (Table, Supplementary Digital Content 4). Exon 19 deletions (Ex19del) and a point mutation (L858R) accounted for 90.5% (57/63) and 93.4% (57/61) of all mutations identified using the cobas EGFR assay and *therascreen* EGFR assay, respectively (Table, Supplementary Digital Content 3). This confirms the findings of a previous study [10], which found that Ex19del and L858R mutations accounted for 90% of NSCLC EGFR activating mutations. The exon 20 insert mutation (Ex20Ins) was not observed in any of the samples tested in this study. A T790M point mutation was detected by the cobas EGFR assay (0.68%) but not by the *therascreen* EGFR assay.

3.3. Invalid test rate

Mutation analysis of exons 18–21 of the EGFR gene was successfully performed in all 149 specimens (100%) using the cobas EGFR assay. In contrast, in experiments using the *therascreen* EGFR assay, two test specimens initially gave invalid test results. In those cases, DNA was extracted from new FFPE tissue samples. However, because one sample gave an invalid result again, this case was excluded from the analysis, resulting in an invalid rate of 0.68% (1/148) for the *therascreen* EGFR assay (Table 2). In addition, one invalid control occurred in the *therascreen* EGFR assay (data not shown).

3.4. Method correlation agreement analysis

The correlation rate between cobas EGFR assay and *therascreen* EGFR assay was 98.0%. Of the 149 evaluable samples tested, only three discordants between the two EGFR mutation assays were observed (Table 3).

3.5. Re-analysis of discordants by direct sequencing

Test specimens that gave discordant results between the cobas EGFR and *therascreen* EGFR assays were retested using direct sequencing from sub-cloned samples (Table 4). A discordant MND by *therascreen* EGFR assay was observed by direct sequencing to be an L858R point mutation, confirming the MD result assessed by cobas EGFR assay. In addition, an Ex19del mutation identified as MD by *therascreen* EGFR assay was shown to be MND by direct sequencing, again confirming the cobas EGFR assay result. The cobas EGFR assay identified one case with a double mutation, L858R and T790M

Table 4
Re-analysis of discordants by direct sequencing.

	<i>therascreen</i>		Cobas		Sequencing (reanalysis)
Sample 1	MND	–	MD	L858R	MD
Sample 2	MD	EX19Del	MND	–	MND
Sample 3	MND	–	MD	S768I	MND
Sample 4	MD	L858R	MD	L858R,T790M	L858R

Del, deletion; Ins, insertion; MD, mutation detected; MND, mutation not detected.

Table 5
Re-analysis: combined *therascreen* EGFR assay and Sanger sequencing for resolution of discordant results.

		<i>therascreen</i> and/or Sanger sequencing	
		MD	MND
cobas	MD	60	1
	MND	0	87

MD, mutation detected; MND, mutation not detected.

(Table 4). However, only the L858R mutation was identified by the *therascreen* EGFR assay and only the T790M mutation was detected by direct sequencing. We then performed a re-analysis using a combination of the *therascreen* EGFR assay and Sanger sequencing for resolution of the discordant results (Table 5). This demonstrated an MD concordance rate of 100% (60/60), an MND concordance rate of 98.9% (87/88) and a total concordance rate of 99.3% (147/148) between the tests.

4. Discussion

The overall correlation results of the cobas EGFR assay, an existing EGFR mutation screening method (the *therascreen* EGFR assay) plus direct sequencing was 99.3% (147/148) (Table 5). It also indicated that the cobas assay is at least as robust method to detect the most common clinically significant EGFR mutations as the existing *therascreen* EGFR assay.

Although we identified 3 discordant results among 149 (2.0%) specimens in this study, retesting by direct sanger sequencing confirmed that two of the three discordant results were in fact correctly called by the cobas EGFR assay. Although both assays share similar characteristics in terms of amplification methods and detection principles, the slight differences (e.g. probe and primer construction) between the two of them, influenced their sensitivities to the mutations. Also, the remaining discordant result analysis highlighted the importance of the purity of the extracted DNA for the PCR amplification. In fact, an Ex 20 S768I mutation identified as Mutation Detected (MD) by the cobas EGFR assay but not the *therascreen* EGFR assay, was not detected by direct sequencing, either. In this case, direct sequencing failed more than two times to detect the EGFR gene when using the extracted DNA from the QIAmp DNA FFPE Tissue extraction kit (Qiagen) suggesting that the quality of the DNA was not adequate for the testing (data not shown). This potential difference in DNA quality might be the reason why we have experienced discordant results in some cases.

One T790M mutation was detected together with L858R by the cobas EGFR assay in this study. As there is known heterogeneity with regard to the T790M mutation within tumor cells, it is difficult to mention that the extracted DNA was completely the same, even if we used serial sections. However the raw data from the cobas system showed high enough signals to robustly detect the mutation (data not shown). According to the package insert, cobas EGFR needs at least 3.13 ng DNA which includes 5% mutated DNA to detect the mutation. Therefore it appears that the cobas test might

be more sensitive than the *therascreen* test because, according to the *therascreen* package insert, it needs 7.02% mutated DNA within the input DNA [11,12].

About half of the patients who are initially sensitive to EGFR-TKIs may acquire resistance to EGFR-TKIs [7] following a period of therapy, mainly because of the selection for the cells with the T790M mutation in EGFR. In addition, the correlation between the presence of intrinsic T790M mutations and patient outcomes has been shown [8], and is probably related to the slow growth of tumors bearing the T790M mutation. Thus, it is important to re-assess EGFR mutation status during treatment in order to determine the most appropriate treatment regimens for patients.

For IVD products, it is important to have rapid and simple testing. The cobas EGFR assay has two advantages over the *therascreen* assay in this regard. One is that the process consists of easily performed and stable methods. Additionally, it takes only 8 h to go from tumor specimen to results using the semi-automated system. Thus, patients assessed using the cobas EGFR assay can begin the most appropriate treatment within a shorter time period. The other advantage is that only a very small amount of DNA (150 ng) is required to detect the tumor mutation status using the cobas EGFR assay. Moreover, it confirms the accuracy of the results by co-amplification of an internal control (i.e. exon 28). One of the issues associated with detecting EGFR mutations in advanced NSCLC patients is not obtaining a sufficient quantity of specimen to confirm the presence/absence of several biomarkers. It is important to be able to perform tests using just a small amount of DNA; thus, the cobas EGFR assay is suitable and reliable for the detection of targeted common EGFR mutations. In this study, we had high concordance with surgically resected specimens which had enough tumors. However, at clinical practice, minimal invisible samples such as pleural effusion or bronchial wash would be used from advanced NSCLC patients having difficulty of collecting tissue. To access this difficulty, even if the samples are small enough, at least confirming the amount of tumor cells by pathologist is required to have appropriate test result. Under the condition, it might be able to provide reliable result even if using either FFPE samples or cytology samples. It is important to accumulate the data with cytology samples which makes improvement of suitable testing for advanced NSCLC patients in the future.

5. Conclusion

In the near future, more mutations that can serve as predictive markers for molecular-targeted treatments will be discovered, and mutation detection tests will play an increasingly important role in the clinical setting. The benefits of treatment will be maximized only if used together with clinically validated and accurate companion diagnostics. The cobas system offers the possibility of detecting additional mutations, not only mutations of EGFR. The combination of the cobas system with molecular-targeted treatments represents an important tool for physicians, supporting their efforts to effectively treat tumors.

Conflict of interest

Hideharu Kimura, Tatsuo Ohira, Osamu Uchida, Jun Matsubayashi, Shinichirou Shimizu, Toshitaka Nagao, Kazuto Nishio, Norihiko Ikeda was funded by Roche Diagnostics K.K. (Tokyo, Japan). There was no other financial support for the investigators.

Acknowledgements

This study was sponsored by Roche Diagnostics K.K. This means that the publication of this study is written by investigators and has no relative value of the cobas EGFR test for the promotion.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.12.012>.

References

- [1] Zhou C, Wu YL, Chien G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011;12: 735–42.
- [2] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947–57.
- [3] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239–46.
- [4] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380–8.
- [5] Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, Beasley MB, Johnson DH, McShane LM, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. *J Clin Oncol* 2011;29: 2424–7.
- [6] Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013;(April) [Epub ahead of print].
- [7] Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer* 2009;10:281–9.
- [8] Fujita Y, Suda K, Kimura H, Matsumoto K, Arai T, Nagai T, et al. Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. *J Thorac Oncol* 2012;7:1640–4.
- [9] Yasuda H, Kobayashi S, Costa DB. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol* 2012;13:e23–31.
- [10] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber D. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7: 169–81.
- [11] Roche Molecular System Inc. cobas EGFR Mutation Test CE-IVD [Package Insert]. Branchburg, NJ, USA: Roche Molecular Systems Inc.; 2011.
- [12] QIAGEN Manchester Ltd. *therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook*; 2012.

Detection of epidermal growth factor receptor T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor

Kazuko Sakai,¹ Atsushi Horiike,² Darryl L. Irwin,³ Keita Kudo,² Yoshihiko Fujita,¹ Azusa Tanimoto,² Toshio Sakatani,² Ryota Saito,² Kyohei Kaburaki,² Noriko Yanagitani,² Fumiyoshi Ohyanagi,² Makoto Nishio² and Kazuto Nishio^{1,4}

¹Department of Genome Biology, Kinki University Faculty of Medicine, Osaka; ²Thoracic Oncology Center, Cancer Institute Hospital, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan; ³Sequenom Inc, Brisbane, Queensland, Australia

(Received February 11, 2013/Revised May 23, 2013/Accepted May 29, 2013/Accepted manuscript online May 31, 2013)

A secondary epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation, the substitution of threonine 790 with methionine (T790M), leads to acquired resistance to reversible EGFR-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs). A non-invasive method for detecting T790M mutation would be desirable to direct patient treatment strategy. Plasma DNA samples were obtained after discontinuation of gefitinib or erlotinib in 75 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). T790M mutation was amplified using the SABER (single allele base extension reaction) technique and analyzed using the Sequenom MassARRAY platform. We examined the T790M mutation status in plasma samples obtained after treatment with an EGFR-TKI. The SABER assay sensitivity using mixed oligonucleotides was determined to be 0.3%. The T790M mutation was detected in 21 of the 75 plasma samples (28%). The presence of the T790M mutation was confirmed by subcloning into sequencing vectors and sequencing in 14 of the 21 samples (66.6%). In this cohort of 75 patients, the median progression-free survival (PFS) of the patients with the T790M mutation ($n = 21$) was not statistically different from that of the patients without the mutation ($n = 54$, $P = 0.94$). When patients under 65 years of age who had a partial response were grouped according to their plasma T790M mutation status, the PFS of the T790M-positive patients ($n = 11$) was significantly shorter than that of the T790M-negative patients ($n = 29$, $P = 0.03$). The SABER method is a feasible means of determining the plasma T790M mutation status and could potentially be used to monitor EGFR-TKI therapy. (*Cancer Sci*, doi: 10.1111/cas.12211, 2013)

Despite responses to epidermal growth factor receptor (EGFR)-tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as gefitinib and erlotinib, in the majority of lung cancer patients carrying an EGFR mutation, most of these patients eventually become resistant to EGFR-TKIs.⁽¹⁾ The most common known mechanisms of acquired resistance are MET amplification, increased levels of hepatocyte growth factor, and secondary mutations in EGFR.^(2–5) The substitution of threonine 790 with methionine (T790M) leads to acquired resistance to reversible EGFR-TKIs. The frequency of this secondary mutation is 30–50% among patients who are resistant to EGFR-TKIs. Understanding the mechanisms of resistance to EGFR-TKIs is important because second and third generations EGFR-TKIs, including irreversible EGFR inhibitors, are presently under clinical development with the goal of conquering resistance mechanisms to EGFR-TKIs.

Here, we report the development of a highly sensitive single allele base extension reaction (SABER) method capable

of detecting low levels of T790M mutation. We used this method to assess the T790M mutation status of plasma samples from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients to clarify (i) the frequency of tumor samples carrying the T790M mutation after EGFR-TKI treatment; and (ii) the association between the T790M mutation status and the clinical outcome. The detection of the T790M mutation in plasma samples could enable the clinical response to EGFR-TKIs to be monitored.

Materials and Methods

Patients. A total of 75 NSCLC patients with progressive disease (PD) after undergoing EGFR-TKI treatment (gefitinib or erlotinib) at the Thoracic Oncology Center, Cancer Institute Hospital, Japanese Foundation for Cancer Research between 2006 and 2011 were included in this study. Progressive disease was defined as the appearance of a new lesion or a 20% increase in the size of a primary tumor. The period between the detection of PD and the collection of the plasma sample used to determine the T790M mutation status varied (median 44 days; range, 0–803 days). Epidermal growth factor receptor mutation status in tumor samples obtained before treatment with an EGFR-TKI were identified using direct sequencing. Table 1 shows the clinical characteristics of the patients. Plasma samples obtained after discontinuation of EGFR-TKI were used to examine the T790M mutation status. All the patients provided informed written consent, and the study was approved by the Institutional Review Board at the Cancer Institute Hospital and the Kinki University Faculty of Medicine.

Sample processing. Plasma DNA was purified using a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The extracted DNA was stored at -80°C until analysis.

Assay design. The assay was designed using MassARRAY Assay Design 4.0 software (Sequenom, San Diego, CA, USA) with a slight modification to enable use with the SABER method; the assay was intentionally designed so that it would only include terminators for the mutated nucleotide, and not the terminator for the wild-type nucleotide. A schematic diagram of the assay is shown in Figure 1. An amplification control assay was incorporated into each reaction using a conserved sequence in the amplified EGFR transcript so that

⁴To whom correspondence should be addressed.
E-mail: knishio@med.kindai.ac.jp

Table 1. Clinical characteristics of patients with progressive disease (PD) after epidermal growth factor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) treatment (n = 75)

EGFR-TKI-treated Patients	All patients (n = 75) No. (%)	Post-treatment T790M mutation positive patients (n = 21)	Post-treatment T790M mutation negative patients (n = 54)	P†
Age, years(mean, 61.6 ± 8.5 years)				
≤65	47 (62.7)	11	36	0.294
>65	28 (37.3)	10	18	
Sex				0.573
Male	21 (28.0)	7	14	
Female	54 (72.0)	14	40	
Smoking				1.000
No	44 (58.7)	12	32	
Yes	31 (41.3)	9	22	
Histology				0.311
Ad	71 (94.7)	19	52	
Large/Sq	4 (5.3)	2	2	
EGFR mutation (pre-treatment, tumor)				0.535
Activating mutation	60 (80.0)	18	42	
Wild type/unknown	15 (20.0)	3	12	
Response to EGFR-TKI				0.053
PR	60 (80.0)	20	40	
SD/PD/NE	15 (20.0)	1	14	

†Fisher's exact test. Ad, adenocarcinoma; Large, large cell carcinoma; NE, not evaluable; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease; Sq, squamous cell carcinoma.

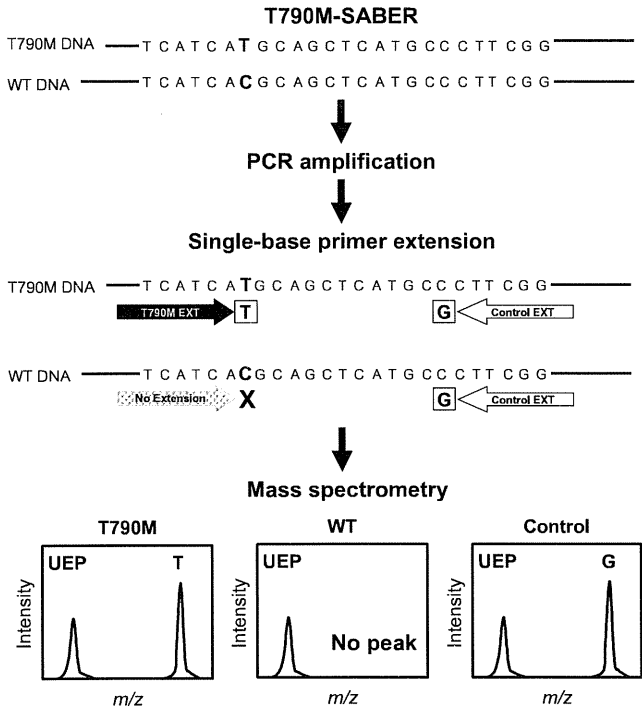


Fig. 1. Schematic diagram of the T790M-SABER method, based on MassARRAY assays. The DNA samples were first amplified using polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were then subjected to a single base extension reaction. The T790M-SABER reaction only included terminators for the mutated nucleotide, and not the terminators for the wild-type nucleotide. An internal amplification control was designed to prevent false-negative results caused by PCR inhibitors. The primer extension products were analyzed using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectroscopy (MALDI-TOF MS). UEP, unextended primer.

Table 2. Primers used in the T790M SABER (single allele base extension reaction) method

Sequences	
PCR	
Forward	5'- ACGTTGGATGATCTGCCTCACCTCCACCGT -3'
Reverse	5'- ACGTTGGATGTGTTCCCGACATAGTCCAG -3'
Extension	
T790M	5'- CACCGTGCAGCTCATCA -3'
Internal control	5'- GTCCAGGAGGCAGCCGAAG -3'

PCR, polymerase chain reaction.

amplification would always occur in the presence of input template DNA. The PCR and extension primer sequences are listed in Table 2.

SABER method. The SABER method, where the primer extension was restricted to the mutant-specific allele, was performed using Sequenom iPlex Pro biochemistry with resultant products detected with the MassARRAY platform. The PCR reactions were performed in 5-μL volumes containing 1.5 μL of eluted serum DNA, 200 nM of each primer, 50 μM of dNTPs (Sequenom), 0.2 U of PCR Taq DNA polymerase (Sequenom), 2.0 mM of MgCl₂, and 1 × PCR buffer (Sequenom). The thermal cycling for the PCR was performed as follows: 2 min at 94°C, followed by 45 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min. The program was terminated after a final incubation at 72°C for 5 min. After the completion of the PCR, 2 μL (0.5 U) of shrimp alkaline phosphatase (Sequenom) was added to each reaction and the resulting mixture was incubated for 40 min at 37°C before enzyme inactivation by incubating the sample for 5 min at 85°C. The single-base primer extension reaction (SABER) was then performed in a final volume of 9 μL, containing 1 μmol of each extension primer, a mixture of three iPLEX mass-modified terminators (Sequenom), and 2.56 U of