

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指す。

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 年米国癌研究会議 (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