

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