

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、reverse transcriptionによるcDNA (complementary DNA)化、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、IonPGMによるシーケンス反応、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*, *ROS*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*, *ROS*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