

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標とする。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ズ社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からも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