

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

IonPGM および MassArray を応用した Multiplex 体細胞変異診断薬の基本設計を完了し、良好な基本性能試験成績ならびに良好な feasibility 試験結果を得た。申請に向けた当局との事前相談の結果を踏まえて、臨床性能試験の実施、承認申請に向け、準備している。

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（横浜市立大学大学院医学研究科・臨
床統計学 教授）
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 科長）
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東病院呼吸器
内科 医長）
武田 真幸（近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門
講師）

シーケノム社（現アジェナ・バイオサイエン社）による MassArray を用いた Lung Fusion kit およびライフテクノロジー社（現サーモフィッシュアサイエンティフィック社）による IonPGM を用いた PGM Fusion Panel について、Feasibility 試験終了後、速やかにキットデザイン等につき PMDA の助言を受け、その助言に基づき基本性能試験、GMP レベルでの製造移管、診断薬企業との連携により迅速に実施し、承認プロセスに関するデータ整備、資料整備を進めた。ライフテクノロジー社（現サーモフィッシュアサイエンティフィック社）による IonPGM を用いた NCCE Panel について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な 10 遺伝子のゲノム DNA 断片を特異的に濃縮し、ライフテクノロジー社 Ion PGM 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。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。

A．研究目的

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するテクノロジーを共同開発し、当該企業による薬事承認申請を行うこと。

平成 26 年度の目標は LungFusion /LungCarta) については、GMP 製造移管（近大、臨床検査薬企業）SOP 整備（近大、臨床検査薬企業）を行う。PGM Fusion Panel については、基本性能試験（近大）GMP 製造移管（近大、臨床検査薬企業）を行う。NCCE Panel については 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）に臨床性能試験を開始することを目標とする。

B．研究方法

（倫理面への配慮）

Feasibility 試験の実施に当たっては、各実施機関の倫理委員会の承認を得た後、個人情報保護等に配慮し実施した。

C．研究結果

近畿大学による Lung Fusion kit(MassARRAY, アジェナ・バイオサイエン社との共同研究)、PGM Fusion Panel (IonPGM, サーモフィッシュアサイエンティフィック社)、および国立がん研究センターによる NCCE Panel (IonPGM, サーモフィッシュアサイエンティフィック社)について、キットデザインの確定と細胞株および臨床検体を用いた feasibility 試験を実施し、いず

れのキットも良好な結果を得た。

Lung Fusion kit については、アジェナ・バイオサイエンス社と近畿大学とが共同研究契約を締結し、PMDAの薬事戦略相談事前面談での助言に基づき、MassArrayの feasibility 試験を実施し、オーストラリアでの feasibility 試験と連携し、データの取り纏めを行った。それを基に、アジェナ社と基本性能試験を開始した。事前相談内容を踏まえた対応としては、1対1対応が基本であるとの認識から、マルチ診断薬においても、対応する分子標的薬とのコンパニオン診断としての可能性を、当該製薬企業と協議した。また、事前面談での指摘を踏まえて、機器を含むキットの全体の構成を示すこととし、下記 1-3 に示す項目の整備を行った。

1. 診断キットの工程の明確化: RNA 抽出から cDNA 化の工程について検証、最適化を行った。
2. 基本性能試験の実施: 臨床サンプル 450 例での基本性能試験をブリスベンにて実施し、最終版のパフォーマンスデータを取得、現在、ドキュメントを作成中である。本データは first priority として、日本における承認申請に用いる。
3. 医療機器申請: FDA 申請を行い、承認済みである。

次世代シーケンサー IonPGM を用いた PGM Fusion Panel の feasibility 試験では実臨床レベルのサンプルでの実施成功率は 96% と良好であった。海外アカデミアと共同での feasibility 試験の結果は、2014 年アメリカ癌学会で報告され、この結果を基に、キットデザインの確定、SOP の確定を行った。また企業との共同による基本性能試験、キットの GMP 製造移管を行った。これらの結果を基に、サーモフィッシュアサイエントフィック社は、PGM Fusion Panel の欧州 CE-IVD の承認を得た。また、遺伝子解析装置として Ion PGM Dx の医療機器化を完了した。

NCCE Panel については、培養細胞株 8 株 (PC9, H1-18, H1075, HT-29, H1048, HCC78, H2228, LC2/ad) のゲノム DNA 各 250 ng から、*RET*, *ALK*, *ROS1* 融合遺伝子、*EGFR*, *KRAS*, *ERBB2*, *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT*, *MAP2K1* の活性型点変異周辺計 26,183 bp を特異的にハイブリダイゼーションによって濃縮し、Ion 318 chip を用いた Ion PGM シークエンサー上で 8 サンプルを同時解析した。平均 depth は 1500 以上、On target rate は 60% 以上と良好なシーケンシング性能を示した。独自に開発した融合遺伝子探索プログラムを併用して変異解析を行ったところ各細胞株における既知の変異を正確に診断できた。前年度に実施した細胞株及び臨床検体の融合遺伝子探索の予備検討結果とあわせ、NCCE Panel の基本設計が完成した。診断薬化を図るため(株)理研ジェネシスと共同研究契約を結び、NCCE Panel プロトタイプの基本性能試験を行った。これらの結果をふまえて医療機器、体外診断薬の承認の可能性について(独)医薬品医療機器総合機構と薬事戦略相談の事前相談に臨

み、助言を得た。

D. 考察

次世代シーケンシング技術、MassArray の利用により Multiplex 体細胞変異の診断は十分に実施可能であった。マルチ診断薬については、薬事法上の規制およびコンパニオン診断に関するガイダンスとの整合性につき、議論の最中である。本プロジェクトの進捗に伴い、規制上との整合性については、規制当局との綿密な連携により進めていく必要があり、次年度にも事前相談、対面助言を受ける予定である。

本研究で実施している、feasibility 試験の実績は、当該企業における日本での承認申請に対する重要な動機づけとなると考えられる。今後、計画内容を忠実に実行し、キット開発に関する PMDA の薬事戦略相談事前面談・対面助言を今後も継続的に行い、平成 27 年度におけるマルチプレックス診断薬の臨床性能試験の実施に向け積極的に推進する。

E. 結論

3つのマルチ診断薬について、いずれも良好な基本性能試験成績と良好な feasibility 試験結果を得た。

申請に当たって、当局との事前相談を実施し、有益な助言を得た。これらを踏まえて、臨床性能試験の実施に向け、準備を継続する。

F. 健康危険情報

特記なし。

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, Satouchi 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*, 5(8): 2293-304, 2014.

2. 学会発表

1. Magdaleno SS, Nishio K, et al. The OncoNetwork Consortium: A global

collaborative research study on the development and verification of an Ion AmpliSeq RNA gene lung fusion panel. American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2014, San Diego, 2014.4.5-9.

2. Cienfuegos J, Nishio K, et al. Verification of an Ion AmpliSeq™ RNA Fusion Lung Cancer Research Panel, workflow, and analysis solution: an OncoNetwork collaborative research study. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, 2014.10.18-22.
3. Tsuchihara K, et al, Development and Validation of a DNA Based Test for Guiding Therapy in Lung Cancer by Semiconductor-based Next Generation Sequencer. AMP 2014 Annual Meeting, National Harbor, MD., 2014.11.15.

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 シークエ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. 融合遺伝子探索プログラム(特願 2015-007103)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

