

平成 26 年度 第一回班会議

平成26年7月24日

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

「高速シークエンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システムの構築」

(H25-創薬-一般-011)

研究分担者 各位

平成26年度第1回萩原班 班会議のご案内

平素より格別のご高配を賜り、厚く御礼申し上げます。

標記について、下記の通りご案内申し上げます。ご多忙の折とは存じますが、ご出席を賜ります様お願い申し上げます。

記

日時：平成26年8月30日（土曜日） 16：00～17：00

場所：横浜桜木町ワシントンホテル ローズ1

住所：神奈川県横浜市中区桜木町1-101-1 TEL：(045) - 683- 3111

(別紙の案内図参照)

班会議内容

16:00-16:30 「高速シークエンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システムMINtSシステムの開発
現況と今後の臨床試験に関して」 萩原弘一

16:30-17:00 総合討論

※ 別紙の出欠連絡票をご記入いただき、FAX またはE-mail にて平成26年7月28日（月）までに下記事務局へご返信下さいます様お願い致します。

なお、研究分担者の班会議旅費につきましては、配分致しました研究費から支出をお願いいたします。

その他ご不明な点がございましたら、下記担当者までお願い致します。

以上

問い合わせ先

〒350-0495埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38

埼玉医科大学 呼吸器内科

研究代表者： 萩原 弘一

事務局担当： 江頭 博

TEL/FAX : 049-276-1192

e-mail: 萩原班 事務局 hagiwara-saitama@hotmail.co.jp

平成26年度厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

「コンパニオン診断薬としての薬事承認を目指した臨床試験への橋渡し研究」

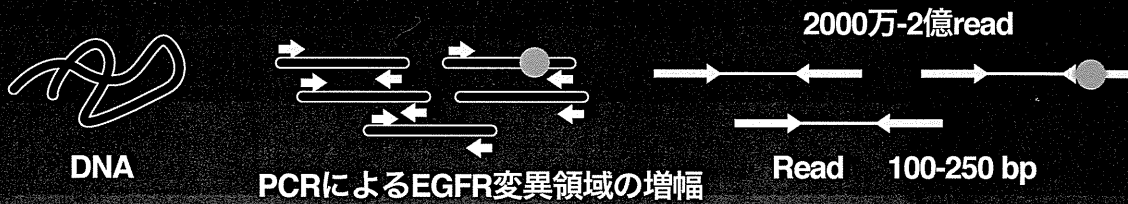
高速シーケンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システムの構築

平成26年度第一回班会議

萩原弘一

2014年8月30日 横浜桜木町ワシントンホテル

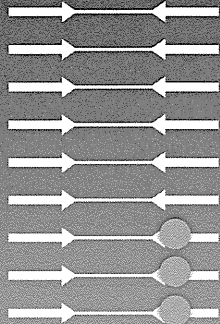
高速シーケンサーによる変異解析



参照配列

↓ L858R

CAGCATGTC AAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAAC TGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAA TACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTAAGGAGGTGGCTTTAGGTCAGCCAG



正常配列

70%

L858R

30%

検体中15%がL858R陽性癌細胞です

10000 readすれば、1%の感度の検出は確保できる

高速シーケンサーにはいろいろ癖があり、結構大変です

- 正常な配列を変異配列と読み間違ふ
→ 偽陽性
- 前回流した検体がわずかに機械に付着して残る
→ 偽陽性
- 同時に流した複数の検体の選別を間違ふ
→ 偽陽性

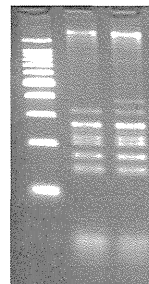
一つ一つクリアして行くのにかなりの時間がかかりました



高速シーケンサーによる変異解析—DNA部分



100 bp ladder
marker



378 bp	BIM mutant
319 bp	BIM wild type
259 bp + 239 bp	EGFR ex 20 + BRAF ex 15
218 bp	EGFR ex 21
203 bp	EGFR ex 19
170 bp + 169 bp	EGFR ex 18 + KRAS ex 2
141 bp + 138 bp	KRAS ex 3 + BRAF ex 11

DNA検索システム作成

1. 増幅



Multiplex PCRで複数の標的領域を同時増幅

2. Tag付加



高速シーケンサーに乗せるためのtagと複数患者判別のためのindexを付加

3. シークエンス



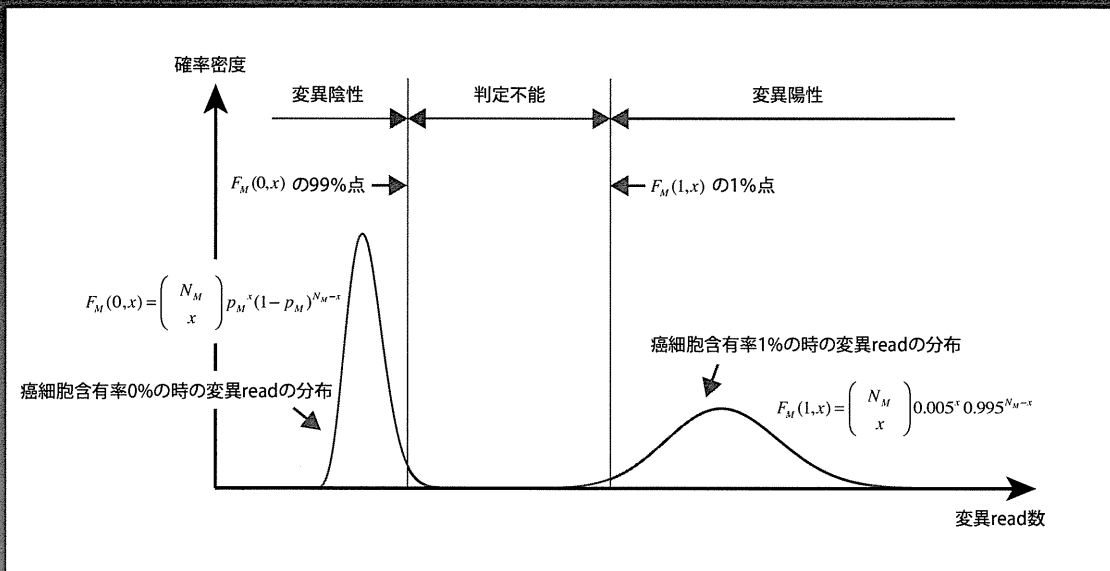
両DNA鎖をシーケンス。この手法でシーケンサーエラーは極めて小さくなる。

・エラー率

EGFR exon 18 G719X	0.000079
EGFR exon 19 deletions	0.000017
EGFR exon 20 T790M	0.000172
EGFR exon 21 L858R	0.000017
EGFR exon 21 L861Q	0.000030
KRAS Codon 12	0.000128
KRAS Codon 13	0.000107
KRAS Codon 61	0.000187

DNA部分の確率計算と結果の判定

癌細胞含有率1%の検体で感度・特異度0.99<



解析ソフトウェア

Fastq files 1_553_L001_R1_001.fastq.gz
1_553_L001_R1_001.fastq.gz

Reads: 0 0% Compensate
Overlapped reads: 0 RNA control
Reads mapped: 0 0.1
Reads failed to be mapped: 0 copies/reaction

Each Patient's Data Summary of Reads

DNA	Patient #	Area Searched	Diagnosis	Mutant Cell Ratio	Detection
18	18	EGFR_ex18	wt/Fluor	0.2%	0.2%
		EGFR_ex19	Negative	0.06%	0.06%
		EGFR_T790M_Area	Negative	0.4%	0.4%
		EGFR_S768I_Area	Negative	0.4%	0.4%
		EGFR_ex21	Negative	0.1%	0.1%
		KRAS_G12V	Positive	16.1%	16.1%

RNA	Patient #	Species	Diagnosis	No. Reads	Detection
1	1	OAZ1	Not Detected	0	0
		OAZ1Mut	Not Detected	0	0
		E_ALK_v1	Not Detected	0	0
		E_ALK_v3b	Not Detected	0	0
		E_ALK_others	Not Detected	0	0

1_553_L001_R1_001.fastq.gz
1_553_L001_R1_001.fastq.gz
TotalNumberOfReads 296906
totalNumberOfOverlappedReads 276457
ReadsMapped 191737

Fastq files 1_548_L001_R1_001.fastq.gz
1_548_L001_R1_001.fastq.gz

Reads: 300849 0% Compensate
Overlapped reads: 282450 RNA control
Reads mapped: 165504 0.1
Reads failed to be mapped: 135345 copies/reaction

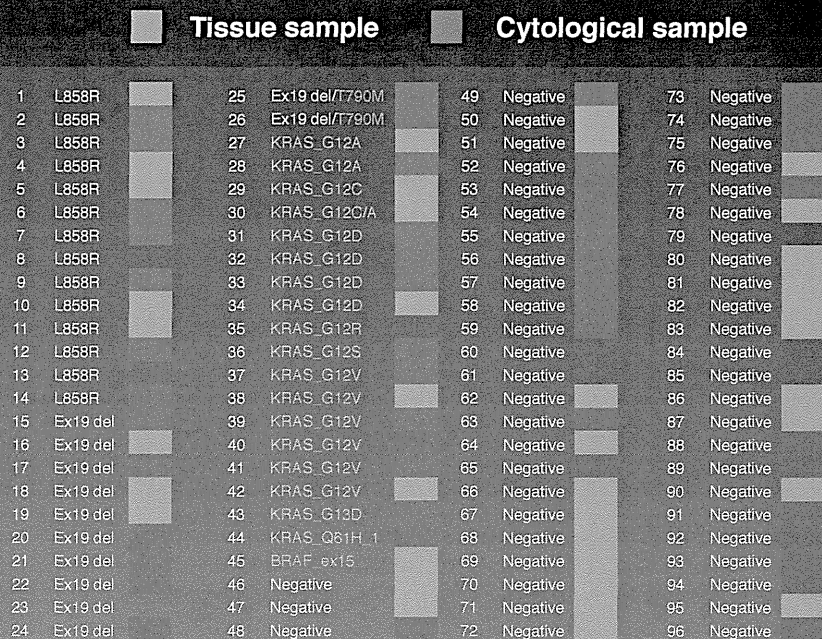
Each Patient's Data Summary of Reads

DNA	Patient #	Area Searched	Diagnosis	Mutant Cell Ratio	Detection
1	1	EGFR_ex18	Not Detected	0	0
		EGFR_ex19	Not Detected	0	0
		EGFR_T790M_Area	Not Detected	0	0
		EGFR_S768I_Area	Not Detected	0	0
		EGFR_ex21	Not Detected	0	0
		KRAS_ex2	Not Detected	0	0

RNA	Patient #	Species	Diagnosis	No. Reads	Detection
1	1	E_ALK_others	Not Detected	0	0
		KIF5B_ALK_K21	Not Detected	0	0
		KIF5B_ALK_others	Not Detected	0	0
		NFYSB_RET_K11	Positive	178043	178043
		RET_others	Not Detected	0	0

1_548_L001_R1_001.fastq.gz
1_548_L001_R1_001.fastq.gz
TotalNumberOfReads 154826
totalNumberOfOverlappedReads 148284
ReadsMapped 81847
ReadsFailedToBeMapped 72776

埼玉医大国際医療センターの臨床検体96検体の検索結果



EGFR mutation = 27%, KRAS mutation = 18%, BRAF mutation = 1%

EGFR mutationの結果はPNA-LNA PCR clampと一致

RNAは、OAZ1をinternal controlとして検出

全てのfusion遺伝子 + OAZ1を増幅できるようなmultiplex RT-PCR

OAZ1 — 細胞間での発現差が小さいhouse keeping gene

どの程度までOAZ1が検出されれば検体不良でないかはまだ経験不足

新潟手術材料を用いた検討

検体番号(新潟DNA判定)	RNA結果判定	BIM	検体番号(新潟DNA判定)	RNA結果判定	BIM	
19A-1	陰性	陰性	20A-1	陰性	陰性	
19A-3	陰性	陰性	20A-3	陰性	KIF5B_RET_K15_R12	
19A-5	陰性	陰性	20A-5	陰性	陰性	
19A-7	陰性	陰性	20A-7	陰性	陰性	
19A-9	陰性	陰性	20A-9	EGFR_L858R	陰性	
19B-1	EGFR_L858R	陰性	20B-1	陰性	陰性	
19B-3	EGFR_L810	陰性	20B-3	EGFR_L858R	陰性	
19B-5	KRAS_G12D	陰性	20B-6	陰性	陰性	
19B-7	EGFR_19del	陰性	20B-9	陰性	陰性	
19B-9	陰性	陰性	20B-10	EGFR_L858R	陰性	
19C-3	KRAS_G12D	陰性	20C-2	KRAS_G12D	陰性	
19C-5	陰性	KIF5B_RET_K15_R12	20C-3	陰性	陰性	
19C-7	EGFR_L858R	陰性	wt/mut	20C-5	陰性	陰性
19C-9	EGFR_19del	陰性	20C-7	陰性	陰性	
19D-1	EGFR_L858R	陰性	wt/mut	20C-9	陰性	陰性
19D-3	陰性	陰性	20C-3	陰性	陰性	
19D-5	陰性	EML4_ALK_v1	20C-5	EGFR_19del	陰性	
19D-7	KRAS_G12V	陰性	wt/mut	20C-7	KRAS_G12V	陰性
19D-9	検体不良	検体不良	20C-9	陰性	陰性	
19E-1	検体不良	陰性	20E-1	KRAS_G12D	陰性	
19E-3	KRAS_G12D	陰性	20E-3	BRAF_G469A	陰性	
19E-5	EGFR_19del	陰性	wt/mut	20E-5	陰性	陰性
19E-7	陰性	陰性	20E-7	陰性	陰性	
19E-9	陰性	EML4_ALK_v1	20E-9	陰性	陰性	
19F-1	陰性	陰性	20F-1	陰性	陰性	
19F-3	EGFR_L858R	陰性	20F-3	陰性	陰性	
19F-5	陰性	陰性	20F-5	EGFR_L858R	陰性	
19F-7	検体不良	陰性	20F-7	陰性	陰性	
19F-9	EGFR_19del	mut/mut	20F-9	陰性	陰性	
19G-1	EGFR_T790M	陰性	20G-1	陰性	陰性	
19G-3	EGFR_G719A	陰性	20G-3	EGFR_19del	陰性	
19G-5	EGFR_L858R	陰性	20G-5	EGFR_G719A	陰性	
19G-7	EGFR_L858R	陰性	20G-7	陰性	陰性	
19G-9	EGFR_L858R	陰性	20G-9	EGFR_L858R	陰性	
19H-1	陰性	陰性	20H-1	陰性	陰性	
19H-3	陰性	陰性	20H-3	EGFR_L858R	陰性	
19H-5	陰性	陰性	20H-5	KRAS_G12V	陰性	
19H-7	陰性	陰性	20H-7	検体不良	陰性	
19H-9	陰性	陰性	wt/mut	20H-9	EGFR_T790M	陰性
19I-1	EGFR_L858R	陰性	20I-1	KRAS_G12D	陰性	
19I-3	KRAS_G12D	陰性	20I-3	陰性	陰性	
19I-5	KRAS_G12V	陰性	20I-5	陰性	陰性	
19I-7	陰性	陰性	20I-7	KRAS_G12D	陰性	
19I-9	陰性	陰性	20I-9	陰性	陰性	
19J-1	陰性	陰性	20J-1	陰性	陰性	
19J-3	EGFR_L858R	陰性	20J-3	陰性	陰性	
19J-5	検体不良	検体不良	20J-5	EGFR_L858R	陰性	
19J-7	陰性	陰性	20J-7	陰性	陰性	
19J-9	陰性	陰性				

EGFR変異 26/93 = 28%
 KRAS変異 12/93 = 13%
 EML4-ALK 2/95
 KIF5B-RET 2/95
 BIM変異型 6/49 = 12%

今後の予定

来年度への継続のために、NEJ021をスタートしたい

- NEJ021を倫理委員会に通してください
- NEJ021が通るまではNEJ012で
→ 結果返却まで、最初は一ヶ月程度かかると思いますが、お許し下さい

よろしくおねがいします

第73回日本癌学会発表内容

Establishment of a laboratory test employing MiSeq for testing the genetic alterations of fusion genes in non-small cell lung cancer (NSCLC), and its clinical use.

Saitama Med. Univ.¹ Respiratory Medicine,
Saitama Med. Center² General Thoracic Surgery

©Yoshiaki Inoue^{1,2} Ato Sugiyama² Kohei Aoki² Hiroki Fukuda² Masatoshi Gika²

Yotaro Izumi² Jun Shiihara¹ Hitoshi Miyazawa¹ Hiromitsu Oota¹ Mitsuo Nakayama²

Koichi Hagiwara¹

73th annual meeting of the Japanese Cancer association
2014.9.27

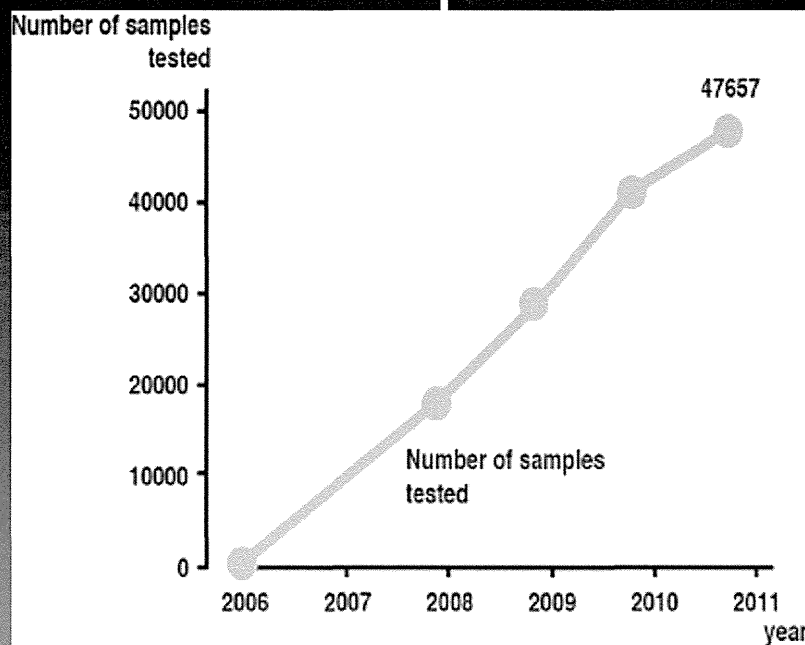
INTRODUCTION

- Therapeutic regimens for advanced Non-Small Cell Lung Carcinoma(NSCLC) are determined depending on the genetic alteration.
- The lists of mutations are becoming longer(ex:EGFR/ALK fusion gene /ROS fusion gene).
- A longer list of mutations inevitably leads to an increase in the medical cost as well as amount of the cancer tissue required for the test.
- Tissue samples required for the IHC or FISH analyses are often hard to obtain.

PURPOSE

- Provide an inexpensive system that is capable of testing all genetic mutations relevant to the treatment of NSCLC.
- We have established a mutation test system that employs a massive parallel sequencer(MiSeq®), and named it as MINtS(Mutations Investigation System using Next-era Sequence).
- MINtS is able to simultaneously test multiple cancer-related genes even from cytological specimens.
- We report the data demonstrating the performance of MINtS and discuss its future possibilities.

Annual change in the number of EGFR mutation samples tested



Use cytological specimen enabled to test EGFR mutation in most of NCSLC patients in Japan.

MATERIALS

- Cancer sample: 96 samples surgically resected from NSCLC patients and immediately stocked frozen.

- Genes tested : EGFR_(G719/ex19del/T790/S768/L858/L861)

KRAS_(Cod12/Cod13/Cod61)

BRAF_(G466/G469/D594/G596/V600)

ALK/RET/ROS fusion genes

METHODS

- 1st step: Purify genomic DNA and total RNA.



- 2nd step: Indexes that enable discrimination of multiple samples are added to each amplicon.
- 3rd step: Determine nucleotide sequence using MiSeq®.
- 4th step: Statistically analyze the output and exclude data that fails to attain both specificity and sensitivity > 0.99. False positive / False negative are 0.1~1%.

RESULTS 1

Patients=up to 96

target areas

Number of Normal / Mutation read

housekeeping gene

Patient #	EGFR_ex18 norm	EGFR_ex18 mut	EGFR_ex19 norm	EGFR_T790M	OAZ1	OAZ1Mut	E_ALK_v1 control	E_ALK_v1
1	20395	2	26693	0	73206	0	0	0
2	18013	2	23984	0	69182	0	0	0
3	23643	5	33782	0	69772	0	0	0
4	29616	1	39583	0	114308	0	0	0
5	28661	2	39186	0	106381	0	0	0
6	24967	4	32403	0	103170	0	0	0
7	24801	1	34725	0	106373	0	0	0
8	33652	2	41399	0	118695	0	0	0
9	17599	2	16162	7511	120382	0	0	0
10	25906	0	33006	0	163806	0	0	0
11	32696	2	42981	0	170278	0	0	0
12	29326	3	39708	0	136494	0	0	0
13	24673	3	34091	12	154403	0	0	0
14	15540	2	19020	2378	143969	0	0	0
15	27245	4	37014	0	131274	0	0	0
16	24241	2	30896	0	137346	0	0	0
17	22017	2	27968	0	119756	0	0	120241

DNA

RNA

RESULTS 2

ex) patient of KRAS_G12D

DNA				
Patient #	Area Searched	Diagnosis	Mutant Cell Ratio	Detection Limit
	EGFR_ex18	Negative		0.08%
	EGFR_ex19	Negative		0.04%
	EGFR_T790M_Area	Negative		0.2%
	EGFR_S768I_Area	Negative		0.2%
	EGFR_ex21	Negative		0.08%
	KRAS_G12D	Positive	63.9%	
	KRAS_ex3	Negative		0.1%

ex) patient of EML4-ALK-v1

RNA				
Patient #	Species	Diagnosis	No. Reads	Detecti...
17	OAZ1	RNA not degraded	119756	
	OAZ1Mut	Not Detected	0	
	EML4_ALK_v1	Positive	120241	
	E_ALK_v3b	Control Not Working		
	E_ALK_others	Not Detected	0	

RESULTS 3

The numbers of

EGFR positive: 26/96

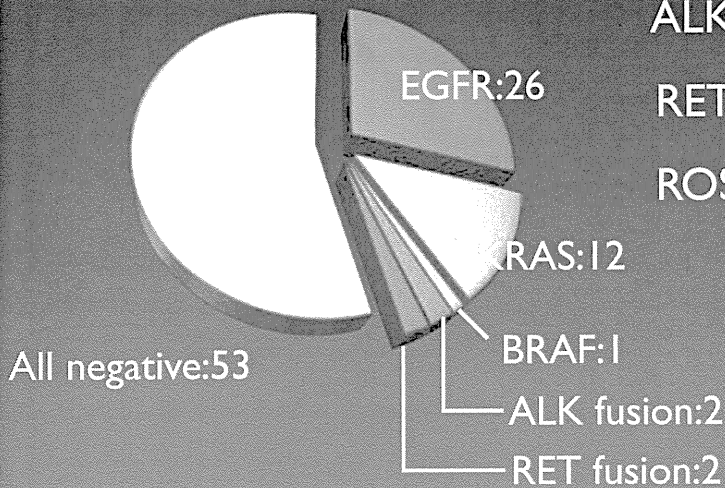
KRAS positive: 12/96

BRAF positive: 1/96

ALK fusion genes positive: 2/96

RET fusion genes positive: 2/96

ROS fusion genes positive: 0/96



We proved following content about MINtS-DNA-, so far.

- Sensitivity, wild type: Mutation = 100% > 1.
- False positive / False negative are 0.1~1%.
- Cost of the consumables, ~2,000Yens.
- Turn-around time is one week.

RESULTS 4

- RNA-based detection on the ALK/RET/ROS fusion genes worked fine for surgically resected samples.
- Use of a low-expression housekeeping gene, OAZ-1, allows a sensitive monitoring of the RNA-based monitoring.
- Cost of the consumables, 2,500Yens.

CONCLUSIONS

- MINtS is a sensitive, and cost-effective system for the mutation testing in the clinical practice.
- Clinical trials utilizing both tissue and cytological samples are planned.
- MINtS provides a prototype of mutation test applicable to cancers originating from organs other than lung.

Acknowledgement

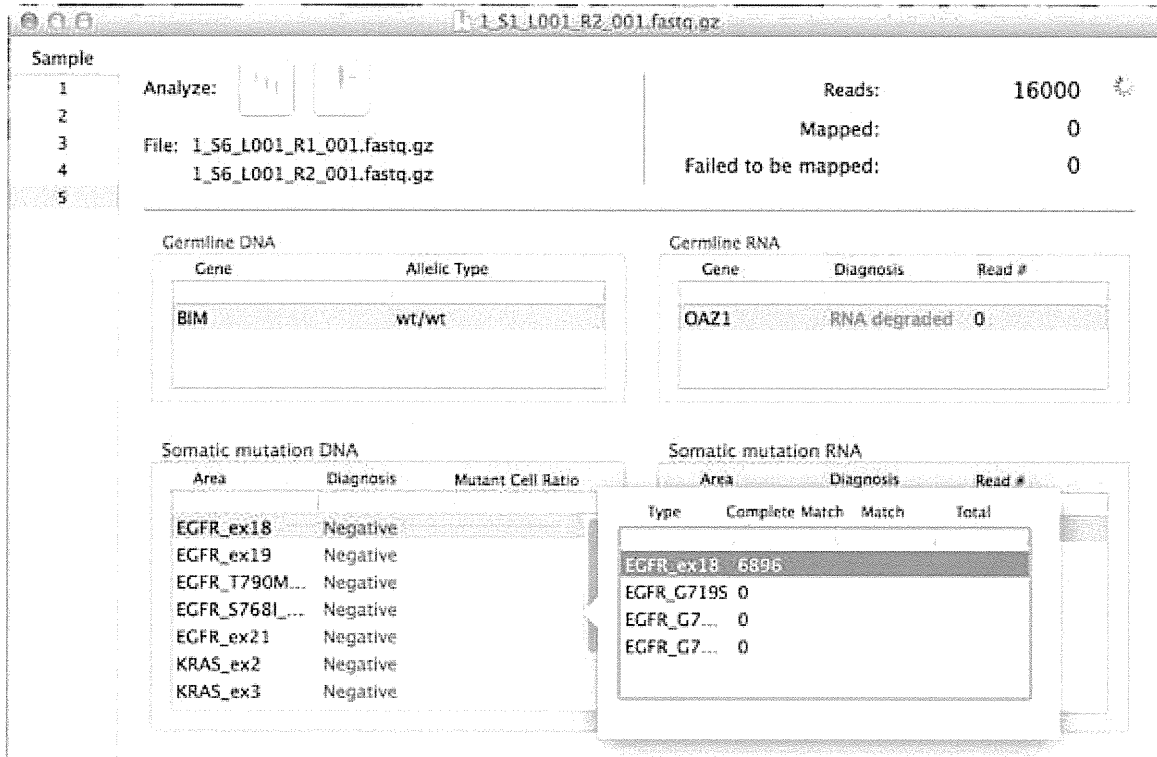
Niigata University Medical & Dental Hospital

Dr. Yasuo Saijyo

MINtS analyzer

MINtS analyzer

MINtS analyzer は高速シーケンサーから出力される fastq.gz より、ターゲットシーケンスを抽出し、統計解析を行い、結果を表示するプログラムである。Objective C 言語によって書かれており、Mac OS X 上で動作する。Grand Central Dispatch を用いて Multithread 化されているため、コンピュータ CPU の全コアを使用するため、コア数が多くなるほど高速になる。コアのルーチンは C99 言語で記載されているため、Objective C のみのプログラムより、さらに早いと考えられる。MiSeq から出力される患者データを、同時に 999 名分まで解析可能である。解析中のユーザーインターフェースを示す。



多数の Version up を経て現在 Version は 1.1a である。現在までの history で記録のあるものを示す。

- 0.9a 2013/11/3
- 0.91a 2013/11/7 Added preference window
- 0.92a 2013/11/21
- 0.937a
- 0.94a 2014/1/7
- 0.941a 2014/1/9
- 0.96a 2014/1/20 Multithreaded
- 0.961a 2014/2/7 Enable detection of OAZ1 artificial plasmid
- 0.971a Fixed bugs in the user interface. .mints files is now double clickable.
- 0.972a 2014/5/22 Enable setup for the ND1 and ND2 threshold
- 0.974a 2014/6/30 Corrected errors in the database. KRAS G13V_1 -> G13A, KRAS G13V_2 -> G13V, Q61H_1 -> Q61H(183A>C), Q61H_2 -> Q61H(183A>T)
- 0.975a 2014/7/29
- 0.980a Added routine for the BIM detection
- 0.981a 2014/8/15 Corrected the reference sequence for BRAF G466V
- 0.99a 2014/5/20 Employed the algorithm described in the manuscript

0.991a	2014/11/9	Extend the deployment target to Mac OS X 10.7
0.992a	2014/11/11	Increased the number of sample that can be handled
0.993a	2014/11/14	Bug fix when calculating binomial function where k is large
ND1 revived		
0.9931a	2014/11/17	Set a check box that controls whether false positive rate should be calculated
1.0a	2014/12/23	Completely changed the user interface, reflecting the improvements in the algorithm
1.1a	2015/3/6	Revised matching algorithm. Corrected some bugs

MINtS の性能を検証する前臨床試験
および後ろ向き臨床試験 (NEJ012)