

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリング、
血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究に関わる研究開発

担当責任者 西尾和人 近畿大学医学部ゲノム生物学講座 教授

研究要旨

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究、血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究、Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発の計画書の倫理委員会の承認を得、測定の為のアッセイ系の確立、カットオフ値の決定等を実施した。

A. 研究目的

本研究では、臨床施設(がん研有明病院、九州大学、東京医科大学)と連携し、liquid biopsy による遺伝子診断、すなわち liquid sequencing を実施する。第一の目標は、血漿・血清検体からの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の二次的耐性変異である T790M 検出による耐性モニタリングであり、検出系として digital PCR および次世代シーケンサーを用いる。第二の目標は、liquid biopsy による ALK, RET, ROS1 等の融合遺伝子の検出とチロシンキナーゼ阻害剤に対する新規耐性機序の解明である。代表者は、主に、同プロジェクトの総合推進を実施する。

B. 研究方法

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、探索的臨床研究の計画立案し、倫理委員会の承認を得る。血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究に関わる研究開発および Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管を行う。測定の為のアッセイ系の確立、cut-off 値の決定を行う。

(倫理面への配慮)

主たる研究機関として、近畿大学医学部において倫理委員会の承認を得た後、各施設の倫理委員会の承認を得る。

C. 研究結果

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、探索的臨床研究の計画立案し、倫理委員会の承認を得た。血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究に関わる研究開発および Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺

伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管を行った。測定の為のアッセイ系の確立、cut-off 値の決定を行なった。腫瘍組織と血清のペア検体を用いた EGFR 二次的変異 T790M の測定のための研究計画の倫理委員会での承認を得て、東京医大で収集されたレトロスペクティブなペア検体の測定を開始した。

D. 考察

Liquid biopsy のアッセイ系の確立の過程で、採取する血漿サンプル中から 1000 コピー以上の核酸 (DNA) が抽出されることが必要と知れた。その為には血漿 2 ml の採取を、核酸の吸着性が低く、EDTA 入り採血管を用いることが重要であると知れた。また、核酸抽出の過程が重要であることが明らかになった。今後の収集過程では、上記条件での収集を実施する。

E. 結論

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発、血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究、Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発のいずれにおいても倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管が順調に開始された。測定の為のアッセイ系の確立、cut-off 値の決定も行われ、一部測定が開始されている。

F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

1. Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, Yoneshige A, Ito A, Togashi Y, Develasco MA, Terashima M, Fujita Y, Tomida S,

Tamura T, Nakagawa K, Nishio K.
Extended RAS and BRAF mutation
analysis using next-generation sequencing.
PLOS ONE, in press.

2. Kim H, Terazono H, Nakamura Y, Sakai K,
Hattori A, Odaka M, Girault MA, Arao T,
Nishio K, Miyagi K, Yasuda K.
Development of On-Chip Multi-Imaging
Flow Cytometry for Identification of
Imaging Biomarkers of Clustered
Circulating Tumor Cells. PLOS ONE, 9(8):
e104372, 2014.
3. 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.

2. 学会発表
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