

令和元年5月27日現在

機関番号：82606
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K18446
研究課題名(和文)ホルマリン固定検体での遺伝子融合の検出及び薬剤感受性/耐性遺伝子発現診断系の開発

研究課題名(英文) Developing multiplex testing for detecting oncogenic fusion of formalin-fixed paraffin embedded tissue samples by using molecular counting system

研究代表者
角南 久仁子 (Sunami, Kuniko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：70766823
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子カウンティング法を用いて、有効な治療標的となり得る既報の肺がん融合遺伝子(対象遺伝子：ALK・RET・ROS1・NRG1, BRAF融合遺伝子およびMET exon14 skipping)にEGFRチロシンキナーゼ阻害薬耐性と関連が報告されている8遺伝子および免疫チェックポイント関連3遺伝子の発現量が測定可能な遺伝子パネルを作成した。実際の肺がん患者検体を用いてこの遺伝子パネルの性能を検証し、正確に融合遺伝子が検出できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
複数のがん種で治療標的として有用な遺伝子融合やエクソスキッピングなど遺伝子のリアレンジメントが知られているが、いずれのがん種においてもその頻度は低い。そのため、一度に複数の遺伝子リアレンジメントが検出できる検査系が求められている。本研究では、日常診療で用いられるホルマリン固定パラフィン包埋検体から遺伝子リアレンジメントが検出できるマルチプレックス診断薬を作成した。実臨床での実用化を目指してさらなる検証を続けることを予定している。

研究成果の概要(英文)：We have developed multiplex diagnostic methods of druggable oncogene aberrations in FFPE tissues with a high degree of accuracy and robustness in a single assay by using molecular counting (MC) assay. This assay is also possible to measure the expression levels of eight genes that have been reported to be related to EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance and three genes related to immune checkpoints inhibitors.

研究分野：分子診断学

キーワード：分子診断 肺がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

複数のがん腫でドライバー遺伝子異常として融合遺伝子やエクソンスキッピングといった遺伝子リアレンジメントが同定されている。これらは有効な治療標的となり得るが、それぞれの頻度は低く、これら遺伝子異常を迅速かつ一度に検出する検査法が求められている。一方で、日常臨床で汎用されるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体からのマルチプレックスな遺伝子リアレンジメントの検出は困難であった。

分子カウティング法は nCounter (NanoString 社) を用いて、蛍光色素のバーコードが付いたプローブをターゲットとなる RNA に直接 hybridize させ、1 バーコードを 1 分子として分子数をカウントすることで遺伝子発現を定量的に測定する法である。PCR 法が不要なため FFPE 検体由来の質の悪い RNA でも測定が可能であり、複数のプローブを同時にアッセイすることで、最大 800 遺伝子までマルチプレックスに発現定量ができる。

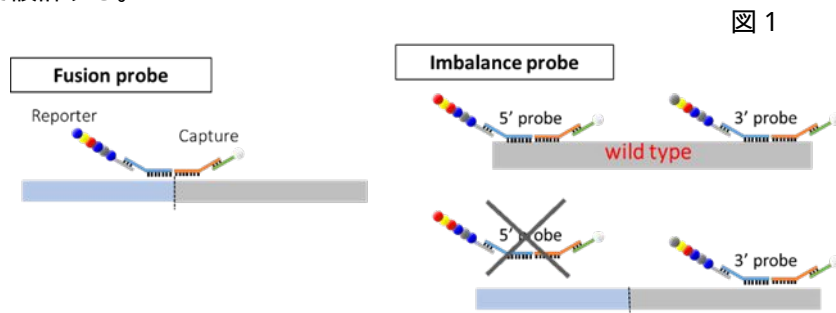
また、ドライバー遺伝子異常に対する分子標的薬や、免疫チェックポイント阻害薬の感受性や耐性には関連する遺伝子の発現量が関連しているという報告があるが、前述の FFPE 検体由来を用いた遺伝子発現量定量は困難であり、日常診療への応用はされていなかった。

2. 研究の目的

がんの個別化治療には、治療標的または予後予測因子となる融合遺伝子や RNA スプライシング異常の迅速な診断、および治療感受性/耐性遺伝子の正確な発現定量が重要であるが、FFPE 検体ではこれらをマルチプレックスに診断することは困難である。そこで、PCR 法を用いずに遺伝子定量が行える分子カウティング法を用いて、遺伝子融合及び RNA スプライシング異常の検出と、感受性及び耐性関連遺伝子の発現測定を同時にできるパネルを開発する。既に開発済みである肺がん融合検出パネルに、血液腫瘍や骨軟部腫瘍などの複数のがん腫において融合遺伝子や RNA スプライシング異常を同定できるように診断プローブを追加設計する。また、耐性/感受性遺伝子発現については定量 PCR (qPCR) 法など既存の発現測定法との相関を検証すると共に、奏効期間や最大治療効果といった臨床情報を用いて、薬剤感受性/耐性の予測を回帰分析を用いて検証する。

3. 研究の方法

既に開発済みである肺がん融合遺伝子・エクソンスキッピング診断パネルを基盤として、新規肺がんドライバー融合遺伝子や他がん腫で診断や予後予測に有用な融合遺伝子を検出するためのプローブを追加設計する。作成するプローブは 2 種類あり、融合点を検出するプローブ (fusion probe) と wild type の対象遺伝子の 5' 側と 3' 側を認識し、融合によっておこる 3' 側の overexpression を検出するプローブ (imbalance probe) からなる (図 1)。5' 側の融合パートナー遺伝子が共通の場合は、fusion probe だけでは区別がつかないため imbalance probe を合わせて設計する。



RNA シークエンスで解析済みのサンプルから融合遺伝子が検出された症例をポジティブコントロールとして抽出し、各融合遺伝子毎のカットオフ値を設定に用いる。

感受性/耐性関連遺伝子発現については qPCR 法や免疫染色と分子カウティング法との発現値相関を確認するとともに、治療効果に関する臨床情報と照合し、回帰分析を用いて、分子カウティング法での発現値が耐性及び治療効果を反映しているかどうかを回帰分析を用いて検証する。また、手術検体以外の内科検体 (生検検体や液状検体) でも同様のカットオフ値での融合遺伝子の検出、及び遺伝子発現の定量化が可能かどうかを確認する。

4. 研究成果

分子カウティング法を用いて、肺がん融合遺伝子 (対象遺伝子: ALK・RET・ROS1・NRG1, BRAF 融合遺伝子および MET exon14 skipping) に EGFR-TKI 耐性関連遺伝子 (AXL, GAS6, MET, HGF, BIM, NOXA, PUMA, CD133) および免疫チェックポイント関連遺伝子 (PD-1, PD-L1, PD-L2) を加えた新規の遺伝子パネルを作成した。検出可能な融合遺伝子バリエーションの一覧を表 1 に示す。

表 1

Target oncogene	Fusion or aberrant transcripts	fusion specific probe			
ALK	EML4-ALK	E13:A20 E18:A20	E20:A20	E6:A20	E2:A20
	KIF5B-ALK	K17:A20	K24:A20	K15:A20	
	TFG-ALK	T6:A20			
RET	KIF5B-RET	K15:R12 K24:R8	K16:R12 K24:R11	K22:R12 K15:R11	K23:R12
	CCDC6-RET	C1:R12			
ROS1	CD74-ROS1	C6:R32	C6:R34		
	EZR-ROS1	E10:R34			
	SDC4-ROS1	S2:R32	S2:R34	S4:R32	S4:R34
	SLC34A2-ROS1	S4:R32	S2:R34	S13del:R32	
	GOPC-ROS1	G8:R32	G8:R34		
	TPM3-ROS1	T8:R35			
BRAF	LRIG3-ROS1	L16:R35			
	TRIM24-BRAF	T5:B8	T9:B9		
NRG1	CD74-NRG1	C8:N6	C6:N6		
MET	Exon 14 skip	M13:M15			

解析対象は肺腺がん検体 95 例（凍結検体 22 例、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体 73 例）で、凍結検体 22 例については、AXL, GAS6, MET, HGF, BIM, NOXA, PUMA, CD133, PD-1, PD-L1, PD-L2 に対してリアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現測定に実施し、両者に高い相関関係があることを示した（中央値：0.90, 範囲：0.65-0.96）。

肺がんの融合遺伝子検出については、RNA シークエンス等で、融合遺伝子陽性であることが判明している 22 例に対して、新規遺伝子パネルで検証を行い、先行研究で定義したカットオフ値（バックグラウンドの平均値 + 5SD）で判定が可能であることを確認した。その後、FFPE 73 検体に対して、同様の検証を行い全例、正しく融合遺伝子が検出可能であることを示した。臨床的に汎用されている FFPE 検体で融合遺伝子がマルチプレックスに検出できることを確認できたため、他がん種への応用として融合遺伝子が診断に有用な肉腫を対象とした新規遺伝子パネルを検討したが 5' 側, 3' 側それぞれで共通する遺伝子が多い場合は、分子カウティング法を用いたプローブ設計が困難であることが示された。一方で、手術検体以外の内科検体として、肺生検検体 2 例（CCDC6-RET, CD74-ROS1 融合症例）および液状検体 1 例（EML4-ALK 症例）について、検証を行い同様のカットオフ値で融合遺伝子の検出が可能であることを示した。

ゲフィチニブ奏効期間情報を有する 120 例（凍結検体 80 例、FFPE 検体 40 例）について、これらの遺伝子発現量とゲフィチニブ奏効期間の検証を実施し、PUMA (HR: 0.55, 95%CI. 0.31-0.94, $P=0.028$), CD133 (HR: 0.56, 95%CI. 0.33-0.99, $P=0.045$) でゲフィチニブ長期奏効症例とそれ以外の症例で有意差があることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：河野隆志

ローマ字氏名：(KOHNO, Takashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。