

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21644

研究課題名(和文) 肺がん患者の血漿中cell freeDNAを用いた融合および耐性遺伝子の定量

研究課題名(英文) Quantification of fusion alleles and resistant mutation alleles in plasma of patients with lung cancer

研究代表者

関 好孝 (Yoshitaka, Seki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員

研究者番号：00733213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムDNAからの検出が困難とされているEML4-ALK融合遺伝子変異につき、次世代シーケンサーを用いた血漿中のcell-free DNA(cfDNA)解析での定量的解析を試みた。まず新規ゲノムDNA濃縮法を用い、融合遺伝子と耐性遺伝子を中心としたターゲット配列を含むカスタムパネルを作製した。この技術により、対象融合遺伝子を含む配列を分子毎に定量でき、これにより複数のEML4-ALK融合遺伝子を持つ細胞株のブレイクポイントが特定され、定量性も再現性を持って確認できた。

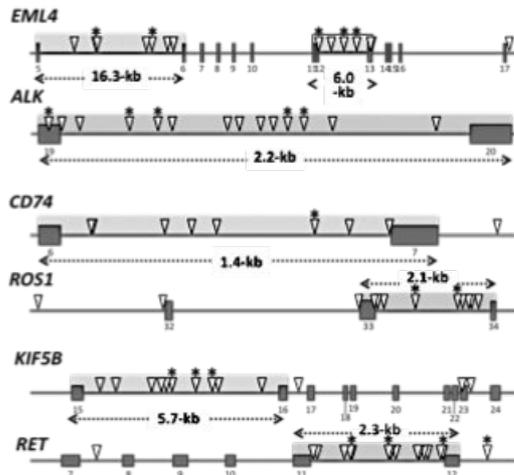
研究成果の概要(英文)：Detection of EML4-ALK fusion gene and resistant mutation from genomic DNA is useful for clinical application. We aimed to quantify EML4-ALK fusion alleles and resistant mutation alleles in plasma of patients with lung cancer harboring EML4-ALK fusion. Our group tried quantitative analysis of EML4-ALK fusion gene in plasma cell-free DNA(cfDNA) using the next-generation sequencer. At first, with the new genomic DNA concentration method, we developed a custom panel including the target sequence mainly on a fused gene and the resistant gene. Using this technique, every alleles with sequence including the target fusion gene could be quantified, and sequence including breakpoints were identified from cell lines. The quantifiability and reproducibility were also confirmed.

研究分野：血中循環細胞外DNA

キーワード：リキッドバイオプシー 血中循環細胞外DNA ドライバー遺伝子変異 チロシンキナーゼ阻害薬 薬剤耐性診断 次世代シーケンシング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 当グループでは血漿中の cell-free DNA(cfDNA)を用いた EGFR 遺伝子変異の定量的解析法、及び ALK、ROS1、RET の融合遺伝子の解析によるゲノム DNA 上の breakpoints 好発部位を報告している。



(2) ゲノム DNA から臨床的に検出が困難とされている EML4-ALK 融合遺伝子について、この解析技術と breakpoints の座標情報を応用し cfDNA から遺伝子融合を検出できる可能性を案出した。

## 2. 研究の目的

(1) 当グループの解析技術と breakpoints の座標情報を応用し、EML4-ALK 融合遺伝子変異につき、次世代シーケンサーを用いた cfDNA 解析での定量的解析を目標とした。

(2) さらに、チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)での感受性融合変異と耐性変異の比率を算出することで、TKI の治療効果バイオマーカーとして応用可能か明らかにすることを目標とした。

(3) また同様に、RET・ROS1 などの融合遺伝子変異など、新たに特定されたドライバー遺伝子変異についても、TKI 感受性融合変異と耐性変異の定量、治療効果予測のコンパニオン診断ツールとして開発することを目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) EML4-ALK 融合遺伝子変異につき、次世代シーケンサーを用いた遺伝子融合の定量的解析を試みた。新規ゲノム DNA 濃縮法(Single Primer Enrichment Technology)を用い、融合遺伝子と耐性遺伝子を中心としたターゲット配列を含むカスタムパネルを作製した。プライマーは 1 方向であるため、融合遺伝子の予想される切断座標がカバーされていれば、今まで困難と考えられていた、ゲノム DNA からの融合遺伝子の検出も可能であると考えられる。さらに、アダプターに分子バーコードが含まれるキットを用いるため、対象融合遺伝子を含む配列を分子毎に定量することが可能である。

(2) ドライバー遺伝子の配列が既知の細胞株について予備検討を行った。前述の Single Primer Enrichment Technology を用い作製したカスタムパネルを用いて、EML4-ALK 遺伝子融合のある細胞株 DNA から融合遺伝子の breakpoint の特定と融合遺伝子と耐性遺伝子を中心としたターゲットシーケンシングを行うことで、遺伝子変異、遺伝子融合、非融合遺伝子の定量ができるようカスタマイズを行った。

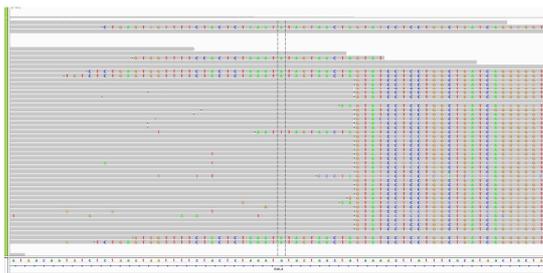
(3)また、現在も継続中である下記のプロトコールを利用し、血漿検体・情報を収集し当研究室に保管した。

承認済み臨床試験の ID : UMIN 000017581  
 試験名 : EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺がん患者における EGFR-TKI 治療経過時の cell-free DNA を用いた遺伝子変異の定量的追跡研究

#### 4 . 研究成果

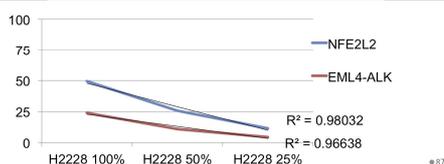
(1)対象融合遺伝子を含む配列を分子毎に定量でき、これにより複数の EML4-ALK 融合遺伝子を持つ細胞株のブレイクポイントが特定され、定量性も再現性を持って確認できた。

H2228 (fusionあり)EML4側

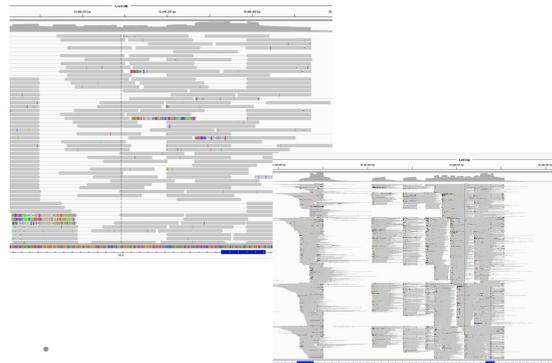


(2)これにより、融合遺伝子のリード数を分子にとって、各種耐性遺伝子のリード数を分子とした定量が可能となり、耐性機序の趨勢が解析できることが判明した。

sample ID	Chr	Start	End	Variant-Rate	Ratio	Depth-BG
H2228_100	2	178098953	178098953	49.3	1.00	1479
H2228_050	2	178098953	178098953	25.7	0.52	1427
H2228_025	2	178098953	178098953	11.4	0.23	1156
total_count						
H2228_100	2	EML4 42493956	ALK 29448092	23.8	1.00	124
H2228_050	2	EML4 42493956	ALK 29448092	10.9	0.49	61
H2228_025	2	EML4 42493956	ALK 29448092	4.3	0.18	22



(3)しかし、シーケンシングにおいてエラーリードが多く、cfDNA を用いた解析には支障を来す可能性が高いと考えられたため、特定した遺伝子融合のブレイクポイント部分を中心に、デジタルPCR および別のキャプチャーシーケンシング法を用いての正確な定量法を検証中である。



(4)さらに検証が終了した段階で EML4-ALK 遺伝子融合陽性の肺腺がん患者の血漿検体を用いて、確立したシーケンシングを行うことにより、血漿からの融合変異/耐性変異の同定・定量と耐性機構判定法の確立を試みる予定である。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Seki Y, Fujiwara Y, Kohno T, et al: Circulating cell-free plasma tumour DNA shows a higher incidence of EGFR mutations in patients with extrathoracic disease progression. ESMO Open 3:e000292, 2018 (<http://dx.doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000292>).

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

関 好孝 (SEKI, Yoshitaka)

国立がん研究センター研究所

ゲノム生物学研究分野 外来研究員

研究者番号： 00733213

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし