

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K10855
 研究課題名(和文)脳腫瘍クリニカルシーケンスの基盤作成

 研究課題名(英文)Clinical Sequence Platform for Brain Tumor

 研究代表者
 西原 広史(NISHIHARA, Hiroshi)

 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

 研究者番号：50322805
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以下の3つのテーマについて、それぞれ研究成果を得た。1)クリニカルシーケンスのための脳腫瘍検体の処理、保管方法の検証 DIN3.0以上でシーケンス成功率100%という品質管理基準の設定に成功 2)神経膠腫の標的遺伝子パネルの選定と、LOH検出方法の確立 Target amplicon sequenceにて1p19q codeletionの検出が可能なCN計測アルゴリズムの作製に成功 3)診療情報との統合解析によるクリニカルシーケンス解析パイプラインの構築 PleSSisionシステムの開発に成功
 研究目的は100%達成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、脳腫瘍を病理診断時に同時にゲノム解析を行うシステムを完成させた。また、このPleSSisionシステムは、脳腫瘍のみならず、他の悪性腫瘍のゲノム診断にも応用可能である。これは、これからの統合病理遺伝子診断システム開発において、大きな一歩となる。このことにより、悪性腫瘍の質的診断の向上と、個別化治療の均てん化に大きく貢献することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We performed 3 themes of research. 1) Sequence quality parameter : DIN value over 3.0 is the critical cut off for successful clinical sequence. 2) CN detection algorithm: We have developed original pipeline which enable us to detect 1p19q codeletion in glioma using even amplicon target sequence. 3) Clinical sequence pipeline integrated clinical information: We have ranched original clinical sequence system "PleSSision" which are already installed in more than 25 hospitals in Japan.
 We have achieved initial goals in almost 100 %.

研究分野：ゲノム病理学

キーワード：脳腫瘍 子病理 クリニカルシーケンス ゲノム解析 個別化診断 がんゲノム医療 次世代シーケンサー 分

1. 研究開始当初の背景

【研究の学術的背景・研究動向】

脳腫瘍の分野においては遺伝子発現・変異プロファイリングが患者の正確な予後予測、治療効果予測、さらには治療法選択に必須となりつつある。実際、2016年に改訂された脳腫瘍 WHO 分類では、従来の組織像を基本とした分類から、遺伝子プロファイルを基本とした分類に劇的に変更され、クリニカルシーケンス体制を通常検査に近いレベルで確立することが喫緊の課題である。しかし、日本の診療現場では、研究用検体を用いた腫瘍の NGS 解析は進んでいるが、検体の品質や腫瘍含有量が一定しない臨床病理検体による実際のクリニカルシーケンスについては、その方法論、技術、パイプライン構築が著しく遅れている。

診療現場でのクリニカルシーケンス態勢の確立には、クリニカルシーケンスを行うために必要な検体管理と検体品質の担保、腫瘍の個別化診断に必要な次世代シーケンサー (NGS) アンプリコン遺伝子パネルの選定と方法論の確立、クリニカルシーケンス解析パイプライン構築、迅速な最終診断報告作成のためのワークフロー確立、人材の確保と育成、以上の5つの大項目をクリアする必要がある。このうち の項目については基礎研究レベルでの技術・方法論確立が必要不可欠であるため、本研究で応募するに至った。

2. 研究の目的

2016年に改訂された脳腫瘍 WHO 分類では、従来の組織像を基本とした分類から、遺伝子プロファイルを基本とした分類に劇的に変更され、クリニカルシーケンス体制を通常検査に近いレベルで確立することが喫緊の課題である。本研究では、低出力デスクトップシーケンサーを用いて最低限の標的遺伝子の検索を行うことで、2週間で神経膠腫の治療・予後判定に必要な遺伝子プロファイルが取得可能なクリニカルシーケンス基盤を作成する。脳腫瘍検体の適切な取扱い手順書の作成から、最終的には遺伝子プロファイルに臨床情報を加味して遺伝子診断報告書を作成する解析ソフトウェアの開発を行うことで、臨床検査室で実施可能な解析パイプラインを樹立することで、脳腫瘍の個別化診断・治療の推進を行う。

3. 研究の方法

1) クリニカルシーケンスのための脳腫瘍検体の処理、保管方法の検証

脳腫瘍検体の処理・解析の技術的な方法論の確立のために、以下の情報を収集し、解析する。

検体の固定方法 (ホルマリン及び PAXgene) 固定時間 (2時間 ~ 10日) 核酸抽出方法

病理標本の形態情報との整合性の検証を含む病理検体処理の手順書の作成

2) 神経膠腫の標的遺伝子パネルの選定と、LOH 検出方法の確立

遺伝子診断に必要な最低限な遺伝子変異・発現 (SNV, CNV) の検出、迅速かつ正確な解析結果の導出、Target panel での LOH 検出を可能にする解析系の開発を行う。

神経膠腫に対して必要な遺伝子の選定と Cover 領域の設定

標的遺伝子のコピー数変化 (CNV) データから、LOH を検出する解析アルゴ

リズムを検討

3) 診療情報との統合解析によるクリニカルシーケンス解析パイプラインの構築

患者の治療データと、得られた遺伝子プロファイルを照合し、どの程度正確に予後、治療反応性を予測できたかを検証し、その結果を踏まえて、最終的な解析パイプラインを構築する。

治療反応性、RFS (無再発生存期間) と、SNV, LOH データの臨床統計解析を行う

報告書のアウトプットとして有用なアノテーションを確定させる

4. 研究成果

1) クリニカルシーケンスのための脳腫瘍検体の処理、保管方法の検証

客観的な病理標本由来 DNA の品質指標として、DIN (DNA integrity number) による検討を行った (図 1)。

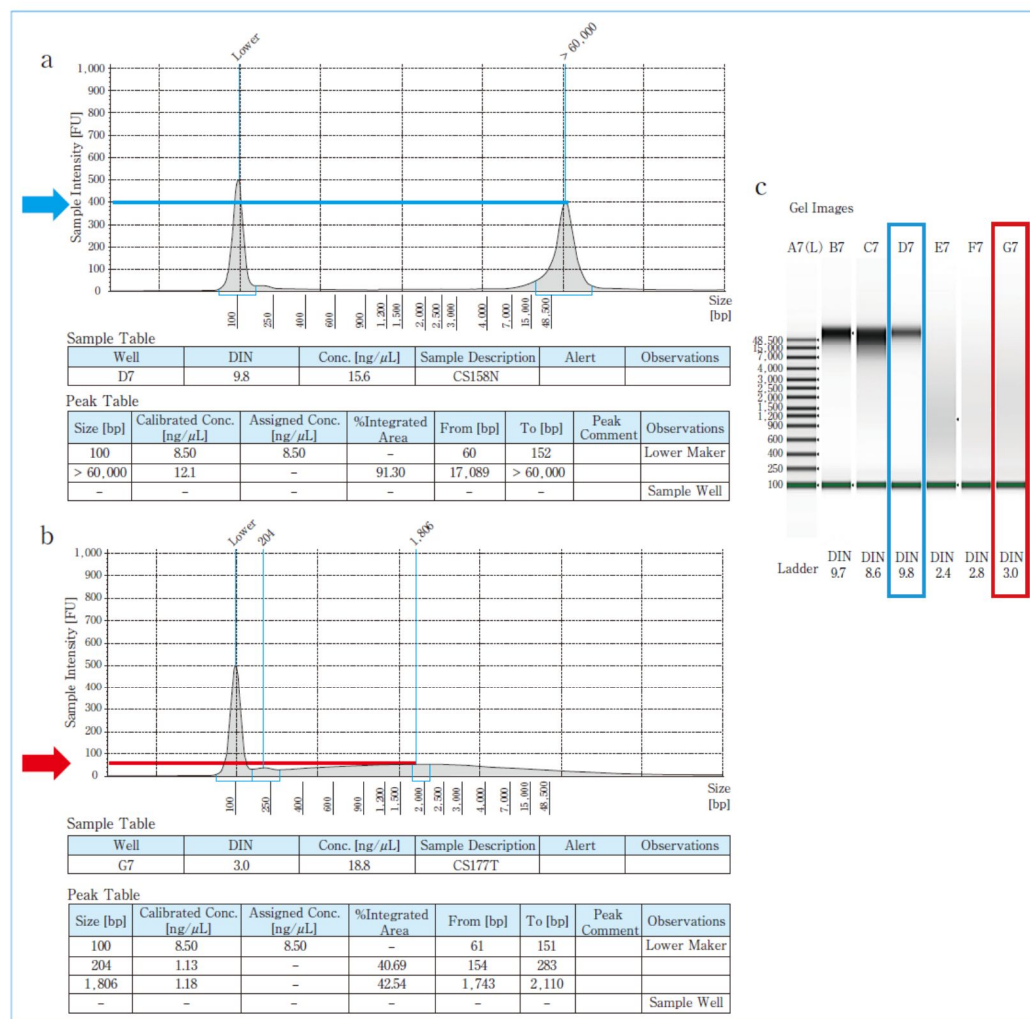


図 1 Tape Station 2200 による DIN 値測定の実際

脳腫瘍を含む病理検体から抽出した DNA を用いて DIN を測定し、シーケンス成功率 (ライブラリ作成成功率) との相関を検討した。その結果、DIN3.0 以上であれば、ほぼ 100% の成功率となるが、2.0-3.0 では 50%、2.0 以下ではほぼ 0% となることが示された。この結果から、DNA の品質指標として DIN 3.0 が設定された (図 2)。

DIN値、input DNA量とシーケンス成功率の相関

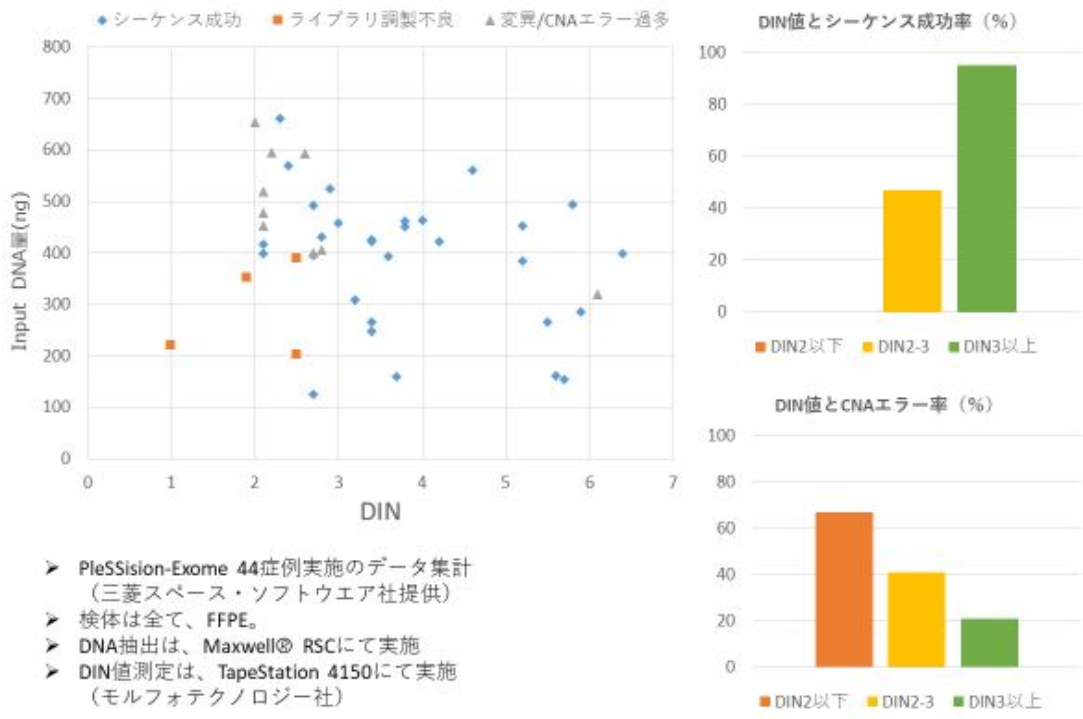


図2 DIN とシーケンス成功との相関

2) 神経膠腫の標的遺伝子パネルの選定と、LOH 検出方法の確立

160 遺伝子を対象とした Target amplicon sequence を用いて、独自のコピー数計測アルゴリズムを開発し、これを元に神経膠腫のコピー数解析を行った。その結果、LOH を正確に判定し、図3のように、1p19q codeletion を正確に判定できるパイプラインを完成させた。この詳細については、論文執筆中である。

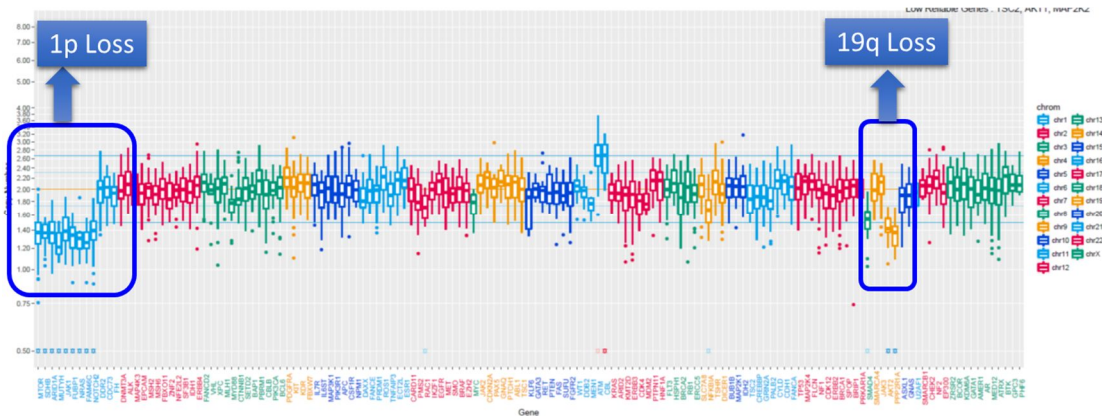


図3 70歳 男性、神経膠腫のシーケンス結果
 Final Diagnosis: Oligodendroglioma, IDH mutant and 1p/19q co-del, ATRX, WT, p53 WT

3) 診療情報との統合解析によるクリニカルシーケンス解析パイプラインの構築

160 遺伝子の解析パイプライン (PleSSision-Rapid) を完成させた。

これはインハウスでも完結可能なクリニカルシーケンスパイプラインであり、現在既に 25 以上の国内医療機関にて導入されている。特に脳腫瘍の診断が可能となっており、今後は院内ゲノム病理診断システムとして利用が進むことが期待される。

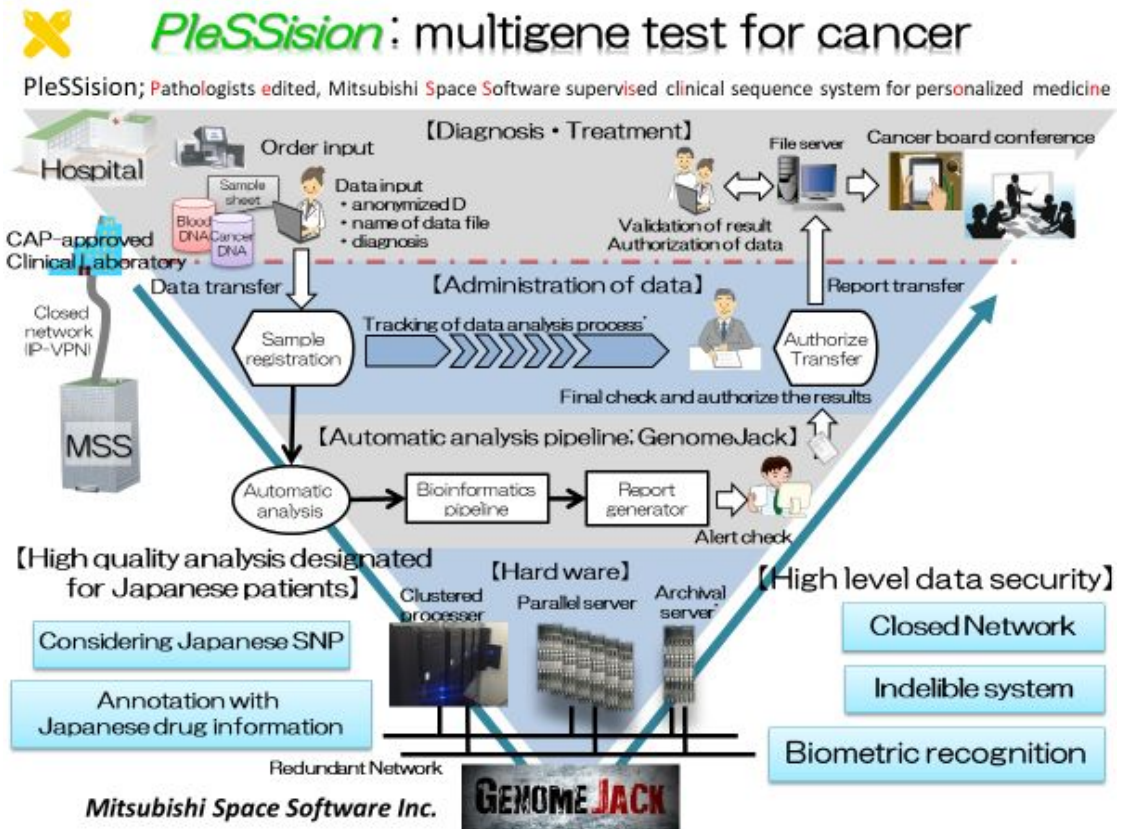


図4 PleSSision システムの概要

臨床情報とリンクさせ、必要な治療に関する情報のアノテーションも可能となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa Marin, Hayashi Hideyuki, Sakamoto Naoya, Tanaka Shinya, Nishihara Hiroshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Cancer gene profiling explores the possible precision medicine for diffuse-type gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12032-019-1327-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Nishihara
2. 発表標題 “PleSSision” ; a Pathologist edited Multigene Genomic Test promotes Cancer Precision Medicine.
3. 学会等名 The 11th International Conference of Clinical Laboratory Automation and Robotics; Cherry Blossom Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西原 広史
2. 発表標題 ゲノム診断における病理医の関与(遺伝子パネル検査における病理医の重要性)
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西原広史
2. 発表標題 ターゲットシーケンスによる神経膠腫の1p19q code1検出
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 腫瘍別シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西原広史 (編集; 廣瀬 隆則、小森 隆司)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 240
3. 書名 脳腫瘍	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----