

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16847

研究課題名（和文）肺がん患者の血漿中細胞外遊離DNA/RNA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 cfDNA and resistant mutation cfRNA in plasma EVs from patients with lung cancer

研究代表者

関 好孝（Yoshtiaka, Seki）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00733213

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）：まずcfDNAによる変異の定量的検出、融合遺伝子の検出法の確立を試みた。その結果、融合遺伝子の検出についてはGuardant Health社のコマーシャルベースの解析法が有用である事が判明した。そこで、院内研究倫理審査委員会で承認されている研究プロトコルを用い、他の関連遺伝子からの耐性機序の推定を同社の解析方法をもとに進める方針とした。融合遺伝子陽性患者TKI耐性化時の血液サンプルを収集し解析した上で耐性機序の遺伝学的検索に成功した。結果として融合遺伝子・耐性の候補遺伝子が血液検体から検出できること、今後のさらなる解析の積み重ねにより臨床応用も可能となりうるについて学会で報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cfDNAによる変異の定量的検出、融合遺伝子の検出法の確立を試みた。その結果、融合遺伝子の検出についてはGuardant Health社のコマーシャルベースの解析法が有用である事が判明した。融合遺伝子陽性患者TKI耐性化時の血液サンプルを収集し解析した上で耐性機序の遺伝学的検索に成功した。融合遺伝子・耐性の候補遺伝子が血液検体から検出できること、今後のさらなる解析の積み重ねにより臨床応用も可能となりうるについて学会で報告した。

研究成果の概要（英文）：At first, we attempted to establish a method for quantitative detection of mutations by cfDNA and detection of fusion genes. As a result, we found that Guardant Health's commercial-based analysis method was useful for detecting fusion genes. Therefore, we decided to proceed with the estimation of resistance mechanisms from other related genes based on the company's analysis method, using a research protocol approved by the hospital research ethics review committee. A genetic search for resistance mechanisms was successfully conducted after collecting and analyzing blood samples from fusion gene-positive patients at the time of TKI resistance. As a result, he reported at the conference that candidate genes for fusion genes and resistance can be detected in blood samples, and that further analysis could lead to clinical applications.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：治療耐性因子探索 融合遺伝子陽性肺がん cfDNA チロシンキナーゼ阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当グループはdigital PCR法を用いた研究で、EGFR-TKI治療耐性化後の患者血漿中のcfDNA中では感受性変異は9割以上で検出が可能であり、T790M点変異率の評価も可能であった。このため、実臨床で用いられるT790M標的治療の治療効果が予測し得る可能性が考えられた。同様にして、EML4-ALKなどの融合遺伝子を標的とした治療についても、このようにドライバー遺伝子と標的遺伝子を定量化できれば臨床的有用性が高いと考えられる。しかしながら、融合遺伝子の検出については、融合遺伝子を含む配列が症例ごとに全く異なるため、通常は免疫染色やFISH法で定性的に測定されている。こうした融合遺伝子と耐性点変異を同時に定量する解析ができれば、現時点で臨床応用されていない融合遺伝子標的の治療耐性化時の治療選択がオーダーメイドできると考えられる。

さらに、この方法で各種の検体から変異の定量的な測定が可能となれば、現在の診療で行われる、高侵襲の肺生検・組織採取を行わずとも、治療抵抗性となった腫瘍の耐性機序を判定できる。さらに、感受性因子を分母として耐性化変異であるさまざまな点変異を定量できれば、治療の有効期間や、他の殺細胞性抗がん剤へ移行、さらに現在開発が進んでいる各種ALK-TKIについて、耐性変異ごとの治療効果を想定した治療薬選択への応用が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

この解析技術とbreakpointsの座標情報を応用し、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cfDNAおよびexoNAの解析による定量的評価を目指す。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。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。

3. 研究の方法

細胞株を用いた予備検討に基づき、融合遺伝子と各種の耐性点変異が報告されている部位の配列について、cfDNAおよびexoNAを用いてシーケンシング・定量解析を行う。同時に、すでに院内研究倫理審査委員会で承認されている研究プロトコルを用いたサンプル(胸水サンプル・血液サンプル)を収集する。1年間でおよそ20例の融合遺伝子陽性患者の登録が見込まれるため、得られた血漿を用いて、治療耐性化後の感受性変異と耐性変異の定量的計測を試みる。

4 . 研究成果

まずcfDNAによる変異の定量的検出、融合遺伝子の検出法の確立を試みた。その結果、融合遺伝子の検出についてはGuardant Health社のコマーシャルベースの解析法が有用である事が判明した。そこで、院内研究倫理審査委員会で承認されている研究プロトコルを用い、他の関連遺伝子からの耐性機序の推定を同社の解析方法をもとに進める方針とした。融合遺伝子陽性患者TKI耐性化時の血液サンプルを収集し解析した上で耐性機序の遺伝学的検索に成功した。結果として融合遺伝子・耐性の候補遺伝子が血液検体から検出できること、今後のさらなる解析の積み重ねにより臨床応用も可能となりうることについて学会で報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Seki Yoshitaka, Yoshida Tatsuya, Kohno Takashi, Masuda Ken, Okuma Yusuke, Goto Yasushi, Horinouchi Hidehito, Yamamoto Noboru, Kuwano Kazuyoshi, Ohe Yuichiro	4. 巻 60
2. 論文標題 Liquid biopsy for the detection of resistance mutations to ROS1 and RET inhibitors in non-small lung cancers: A case series study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 852 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2022.08.002	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Seki Yoshitaka, Yoshida Tatsuya, Masuda Ken, Horinouchi Hidehito, Shinno Yuki, Okuma Yusuke, Goto Yasushi, Yamamoto Noboru, Kuwano Kazuyoshi, Takashi Kohno, Ohe Yuichiro	4. 巻 33
2. 論文標題 P37-1 Liquid biopsy for the detection of the resistant mutation to ROS1 and RET inhibitors: A case series study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Oncology	6. 最初と最後の頁 S528 ~ S528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.annonc.2022.05.292	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関 好孝
2. 発表標題 Liquid biopsy for the detection of the resistant mutation to ROS1 and RET inhibitors: A case series study
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	河野 隆志 (Kohno Takashi) (80280783)	国立研究開発法人国立がん研究センター・ゲノム生物学研究分野・分野帳 (82606)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	吉田 達哉 (Yoshida Tatsuya) (10729338)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院 呼吸器内科・医員 (82606)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関