

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461179

研究課題名(和文) ターゲットキャプチャーシーケンスによる臨床肺がんゲノム診断の確立

研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic system using next-generation sequencing for targetable gene alterations in lung cancer

研究代表者

松本 慎吾 (MATSUMOTO, SHINGO)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・医員

研究者番号：10392341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺がん個別化医療の確立のために、マルチプレックス肺癌標的遺伝子診断法の開発が必須である。本研究では、ターゲットキャプチャー法と次世代シーケンサーを用いて、複数の肺がん標的遺伝子を一度に解析する方法を開発した。肺がん細胞株や臨床試料を用いて、本方法により様々な標的遺伝子の異常(変異、融合)が検出可能であることが確認された。また、本方法での遺伝子異常の検出限界は、がん由来DNA5%以上であった。末梢血遊離DNAからの解析では遺伝子変異は検出可能であったが、融合遺伝子の検出には更なる検討が必要であった。本診断法は、新たな肺がん遺伝子診断法として臨床導入に資するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Establishment of a multiplex gene diagnostics is necessary for the development of precision medicine in lung cancer. We have generated a novel multiplex gene diagnostics by next-generation sequencing technology with a target enrichment system capturing genomic DNA. A variety of targetable gene alterations such as gene mutations and fusions occurring in lung cancer were successfully detected by our sequencing system. The detection sensitivity of targetable gene alterations by our diagnostic method was revealed to be more than 5% of cancer-derived genomic DNA. Further examination and evaluation for the clinical validity and utility are needed to establish this diagnostics. Additionally, the application of this method to gene diagnoses with peripheral blood samples; i.e., liquid biopsy, is an important issue to be essentially addressed.

研究分野：がんゲノミクス

キーワード：肺がん マルチプレックス遺伝子診断 次世代シーケンス NGS診断 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治がんである肺がんの予後改善のために、適切なバイオマーカーに基づくがん個別化治療が望まれる。近年、臨床導入されつつある分子標的治療にその期待がよせられるが、がん個別化治療にむけた分子標的薬の効果の最大化のためには適切な肺がん遺伝子診断が必須である。

(2) 現在のがん関連の遺伝子診断の多くは一遺伝子ごとに高感度 PCR 法、FISH 法、免疫染色法などを用いるいわゆるシングルプレックス診断である。肺がんでは、個々の患者で異なる複数の標的遺伝子が知られており、シングルプレックス診断では、検体量、時間、費用に限界があることは明らかである。そのため、今後の肺がん個別化医療の確立のためには、マルチプレックス遺伝子診断法の開発が必須である。

2. 研究の目的

本研究は、既存の肺がん遺伝子診断の問題を克服すべく、ターゲットキャプチャー法と次世代シーケンサーを用いて、微量サンプルから治療標的となり得る肺がん関連遺伝子群を一度にかつ迅速にシーケンスする方法を確立し、肺がん分子標的治療のための有用な遺伝子診断法を開発すること、さらには治療反応性、抵抗性と相関する遺伝子異常パターンを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肺がん細胞株ゲノム DNA での解析

EGFR, KRAS などの遺伝子変異、ALK, ROS1, RET などの融合遺伝子を有する肺がん細胞株からゲノム DNA を抽出し、ターゲットキャプチャーパネルを用いて標的ゲノム DNA 領域 (1.8Mb) を選択的に濃縮した。次世代シーケンサーを使って濃縮されたゲノム DNA の塩基配列解読を行い、既知の遺伝子異常が検出可能か検討した。また、細胞株由来ゲノム DNA を健常人由来ゲノム DNA で希釈し、この方法でのがんゲノム DNA の検出限界割合を検討した。

(2) 既知のドライバー変異陽性肺がん症例での解析

あらかじめ遺伝子変異や融合遺伝子を有することが分かっている肺がん症例の生検 FFPE サンプルからゲノム DNA を抽出し、上記の方法により既知の遺伝子異常が検出可能か検討した。

(3) 遺伝子情報が未知の肺がん症例での解析

変異解析未施行の肺がん症例の保存 FFPE サンプルから同様の方法で遺伝子異常を解析する。新規のドライバー変異候補が検出された場合には、サンガーシーケンス法など他の方法で再現性を確認した。

(4) 治療耐性に寄与する遺伝子異常の探索

EGFR 遺伝子変異陽性例、ALK 融合遺伝子陽性例で、それぞれ EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤投与前後で本シーケンス解析を行い、治療薬耐性に寄与する遺伝子異常を探索した。

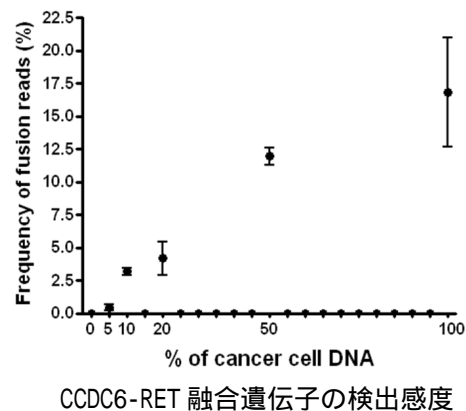
(5) 末梢循環血液中ゲノム DNA から遺伝子異常の検出

肺がん症例の末梢循環血液からゲノム DNA (末梢血遊離 DNA) を抽出し、本シーケンス解析により遺伝子異常の検出を試みた。同一症例の同時期の生検試料からの解析結果と比較し、異同を検討した。

4. 研究成果

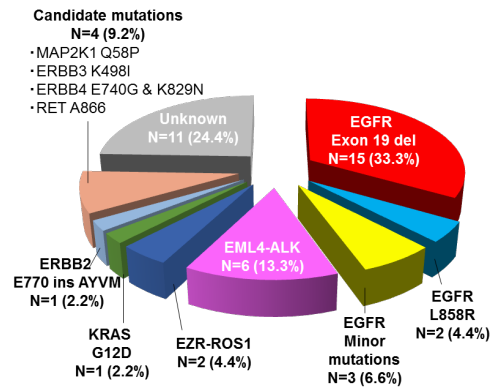
(1) EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA の各遺伝子変異株、ALK, RET, ROS1 の各遺伝子融合変異株から抽出したゲノム DNA で、ターゲットキャプチャーシーケンス解析を行い、いずれの遺伝子異常も正確に検出可能であることが確認された。

また RET 遺伝子融合株を用いて、本方法におけるがんゲノム DNA の検出限界割合を検討したところ、癌細胞由来 DNA5%以上で遺伝子異常が検出可能であった (下図)。



(2) ALK 特異的免疫染色、FISH、あるいは RT-PCR で ALK 融合遺伝子が確認された肺がん生検組織 FFPE を用いて本シーケンス解析をしたところ、全例で ALK 遺伝子の融合が確認された。また、それぞれの融合遺伝子のゲノム切断点は全て異なることが明らかにされた。

(3) ドライバー変異が多いと考えられる 40 歳以下の肺腺がん患者の腫瘍由来 FFPE で本シーケンス解析を行い、EGFR, KRAS, ERBB2 遺伝子変異、ALK, ROS1 融合遺伝子など、様々な遺伝子異常が検出された。また、この世代での肺腺がんでは、特徴的な遺伝子異常プロファイルをもつことが明らかにされた (下図、論文投稿準備中)。



40歳以下肺腺がんの遺伝子プロファイル

(4) 複数の EGFR 阻害剤 (第一世代、第三世代) で治療された EGFR 遺伝子変異陽性の肺がん症例で、治療前後の腫瘍組織を用いて本シーケンス解析を行ったところ、既知の耐性変異は確認されたが、新規の耐性変異は同定されなかった。

(5) EGFR 遺伝子変異陽性例、ALK 融合遺伝子陽性例の末梢血遊離 DNA から本シーケンス解析を行ったところ、EGFR 遺伝子変異例では全例で腫瘍から検出されたものと同様の変異が検出されたが、ALK 融合遺伝子は末梢血から本方法によって検出できなかった。今後の課題として残された。

以上より、本研究によって、新たな肺がん標的遺伝子診断法を開発した。進行肺がんから得られる微量試料においても、様々な標的遺伝子の異常が一度に迅速に、かつ正確に解析可能であった。本方法は、今後の肺がん臨床で必須となる、肺がん遺伝子診断のマルチプレックス化に対応しており、近い将来、臨床導入が期待されるものである。今後、臨床導入の実現化に向けて、さらなる臨床性能試験や、臨床応用可能なプラットフォームの開発が必要と思われる。また、治療薬耐性の克服にも重要とされる liquid biopsy への応用が課題として残されており、さらなる研究の推進が必要であると考えられる。

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)

Suzuki M, Makinoshima H, Matsumoto S, Suzuki A, Mimaki S, Matsushima K, Yoh K, Goto K, Suzuki Y, Ishii G, Ochiai A, Tsuta K, Shibata T, Kohno T, Esumi H, Tsuchihara K. Identification of a lung adenocarcinoma cell line with CCDC6-RET fusion gene and the effect of RET inhibitors in vitro and in vivo. Cancer Sci, 査読有, 104(7):896-903, 2013
DOI: 10.1111/cas.12175

[学会発表](計 5 件)

Shingo Matsumoto, Establishment of a diagnostic system using next-generation sequencing for RET rearrangements, European Cancer Congress 2013, 2013 年 9 月 29 日、Netherlands

松本慎吾, 非小細胞肺癌における ALK/RET/ROS1 融合遺伝子のシーケンス診断システムの開発、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、横浜

松本慎吾, ゲノムシーケンスによる ALK/RET/ROS 融合遺伝子診断法の開発、第 54 回日本肺癌学会総会、2013 年 11 月 22 日、東京

Katsuya Tsuchihara, Development and Validation of a DNA based test for guiding therapy in lung cancer by semiconductor-based next-generation sequencer, AMP 2014 Annual Meeting, 2014 年 11 月 14 日、USA

杉山栄里, Prevalence of driver gene alterations in younger adult patients with lung adenocarcinoma, 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術総会、2015 年 7 月 17 日、札幌

Eri Sugiyama, Mutational profile of targetable oncogenes in younger adult patients with lung adenocarcinoma, ECCO/ASMO 2015 Congress, 2015 年 9 月 26 日、Austria

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 慎吾 (MATSUMOTO SHINGO)
独立行政法人国立がん研究センター先端医療開発センター・医員
研究者番号: 10392341

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者

土原 一哉 (TSUCHIHARA KATSUYA)
独立行政法人国立がん研究センター先端医療開発センター・分野長
研究者番号: 00415514

大江 裕一郎 (OHE YUICHIRO)
独立行政法人国立がん研究センター中央病院・副院長
研究者番号: 20233041

後藤 功一 (GOTO KOICHI)
独立行政法人国立がん研究センター東病
院・科長
研究者番号：90435719

河野 隆志 (KOHNO TAKASHI)
独立行政法人国立がん研究センター研究
所・分野長
研究者番号：80280783

加藤 護 (KATOH MAMORU)
独立行政法人国立がん研究センター研究
所・研究員
研究者番号：40391916

(4)研究協力者

杉山 栄里 (SUGIYAMA ERI)
独立行政法人国立がん研究センター先端
医療開発センター・外来研究員
研究者番号：50775385