

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：高速シーケンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システムの構築
2. 研究開発代表者： 自治医科大学附属さいたま医療センター 教授 萩原弘一
3. 研究開発の成果

分子標的薬の標的となる遺伝子異常を、複数、同時に測定可能なシステムを構築することが、本研究の目的である。日常臨床で使用可能な臨床検体が使用可能で、多数の検体を同時検索でき、安価であることを目標とする、既承認の分子標的薬のみならず、将来承認される薬剤に対応する標的分子の診断薬を容易に開発可能になる。本研究は肺癌が対象だが、他臓器悪性腫瘍に容易に応用できる。

システムの名称はMINtSであり、以下の過程により開発している。

1. DNA解析部分の作成：肺癌臨床検体は癌細胞の他に多数の正常細胞を含む。多数の正常細胞の存在下で、癌細胞のみ有する体細胞変異を検索する必要がある。一般に臨床で癌と診断される検体は、全細胞の1%以上が癌細胞である。1%の癌細胞を含む検体から、遺伝子変異を感度0.99、特異度0.99で検出するシステムを設計、構築した。検出する変異遺伝子は、EGFR、KRAS、BRAF、HER2変異遺伝子、ALK融合遺伝子、ROS1融合遺伝子、RET融合遺伝子である。
2. RNA解析部分の作成：RNAは不安定であり、臨床検体からの抽出は難しいと推定されている。しかし、細胞診検体なら、採取後20分以内にRNA保存液中に懸濁することで、実臨床サンプルでも安定的なRNA採取が可能になる。RNAの品質保証のため、遺伝子発現量が低く、さらに多種の細胞間で発現量の差異の少ない内部標準としてOAZ-1遺伝子を用いた
3. MINtSソフトウェアの作成：上記DNA解析部分、RNA解析部分に適合し、高速シーケンサー出力ファイルを直接解析可能なMINtSソフトウェアを作成した。一検体の解析時間は10秒程度であり、多数の検体の同時解析に適している。
4. DNA検索部分の臨床性能試験：実臨床で採取されたサンプルを100例、後ろ向きに収集し、臨床性能試験を行った。全検体は、肺癌臨床で広く使用されているPNA-LNA PCR clamp法によりEGFR遺伝子の解析が行われており、MINtSとの結果比較が可能である。99検体で両者の結果は一致した。不一致例は、追加解析によりEGFR遺伝子変異が1%程度の細胞で陽性であること判明し、MINtSの良好な性能が示された。
5. 外科手術切除検体を用いた臨床性能試験：MINtSの性能を、外科手術切除検体200例を用いて検証した。PCR増幅が困難であった数症例を除き、MINtSの検索する全遺伝子で、変異遺伝子を有する検体が検出された。頻度は、従来報告されている頻度とほぼ同等であった。MINtSは外科切除検体に対し、良好に働くと考えられた。
6. DNA検索部分、RNA検索部分の双方を使用した臨床性能試験：本研究で作成したシステムの妥当性を、500例の実際の患者検体を用いて現在検証している。2016年3月までで約300例が終了、結果報告している。残りの200例も収集は終了しているが、3月に使用機器の故障があり、修理のため当初の終了目標より3-4か月程度の遅延が発生する見込みである。収集検体は細胞診検体が中心だが、心配されたRNA内部標準のOAZ-1遺伝子は、ほぼ全例で良好に検出されている。MINtSシステムは、DNA検索、RNA検索の両方に関し、実臨床で採取される多くの検体に適応できると考えている。