

## I. 基礎情報

設置期間 2017年4月1日～2020年3月31日

所属教員 加藤菊也（特任教授）、久木田洋児（特任准教授）

寄附者 合同会社ジーンメトリックス

## II. 研究

### 1. 研究の背景

#### 1) 新しい抗がん剤 ～ 分子標的薬

がん治療において薬物療法は大きな柱であるが、通常の抗がん剤（化学療法剤）はがん細胞だけではなく正常な細胞にも作用するため毒性が強く、患者は強い副作用に悩まされる。2000年代になって新しい作用原理に基づく抗がん剤、分子標的薬が登場した。普通の細胞と異なりがん細胞は際限なく増殖する、という特徴があるが、これは遺伝子の異常により起こる。分子標的薬は、この異常な遺伝子を標的とした薬剤であり、遺伝子異常のあるがん細胞にしか作用しないため副作用が少ない。

遺伝子異常のあるがんにのみ効果がある分子標的薬があり、その場合は遺伝子検査でがん患者を選択して投与する。代表的なものはイレッサ（肺がん）とハーセプチン（乳がん）である。イレッサはEGFRの遺伝子変異のある肺がん患者にしか効果がないため、検査で変異陽性患者を同定して投与する。ハーセプチンの場合は遺伝子増幅のある乳がん患者にしか効果がないので、遺伝子検査で増幅のある患者を同定して投与する。これらの体外診断薬は、各々の薬剤専用に開発使用されるためコンパニオン診断薬と呼ばれている。

進行肺がん治療は、コンパニオン診断の典型的な例である。肺がんの遺伝子異常にはEGFR（陽性患者は約40%）、ALK（5-7%）、ROS1, BRAF, RET,

MET(それぞれ2-3%以下)などの遺伝子がある。この中で EGFR, ALK, ROS1, BRAF については承認薬があり、投薬のためにこれらの遺伝子検査は必ず行われる。ただし現時点では検査は別々に行われている。

遺伝子検査には肺がん組織が必要だが、そのための肺生検は他のがん腫と比べると侵襲性が高いため、血液等を使ったより低侵襲の検査が望まれていた。がん組織ではなく血液を行う検査法をリキッド・バイオプシーといい、現在研究が盛んに行われている。

## 2) ヒトゲノムの解析

ヒトの遺伝子は約2万個あり、その総体をゲノムと呼ぶ。遺伝子は A, C, G, T の4つの塩基によってコードされており、ヒトゲノムは約30億塩基からなるが、国際共同チームにより1990年代後半から2000年代初頭にかけて全配列が決定された。

2003年のヒトゲノム全配列決定後、塩基配列決定法において次世代シーケンサーと云われている画期的な革新があった。一人のゲノムの配列決定に必要なコストは2000年代初頭には約1000億円であったが、現在約10万円で決定することができる。

最近マスコミでも取り上げられているゲノム医療は、次世代シーケンサーによりがん関連遺伝子異常を調べて治療法を決定する、というものである。先の述べた肺がんのコンパニオン診断がモデルであり、複数の遺伝子検査を同時に実施することを目指している。

## 2. 研究内容

### 1) 寄附講座設置前の研究

2004年大阪府立成人病センター（現・大阪国際がんセンター）研究所に赴任以降、微量の遺伝子異常の検出をテーマとして研究開発を行ってきた。2005年にイレッサとEGFR遺伝子変異の関連性が発見されたので、以降EGFR変異検出を対象として研究開発を行ってきた。

2010年に肺がん患者の血液中に肺がん由来のDNAが混在していることを確認した（血液中がん由来DNAは1970年代に発見されているが、安定して測定できるようになったのは2000年代後半以降である）。以降血液検体を用いたEGFR変異検出が研究の焦点となる。イレッサなどEGFR阻害剤の治療選択には2つの変異、すなわちエクソン19欠失とL858Rが重要である。またEGFR阻害剤でも耐性は不可避で約1年で効果がなくなる。耐性症例の約半数はT790MというEGFR耐性変異が原因である。私達は初めてT790Mを血液で検出することにより、イレッサ耐性を追跡できることを示した。

2011年にデスクトップ型次世代シーケンサーを導入して、血液中の微量EGFR変異を検出できる測定系を開発した。この測定系は大阪府立成人病センター（現・大阪国際がんセンター）が中心となった臨床試験により、実地臨床に十分使用可能な性能があることがわかった。

現在の次世代シーケンサーには塩基配列の読み取り精度に問題がある。私達は分子バーコード技術を用いた高精度塩基配列決定システム”非重複統合リード塩基配列決定システム（non-overlapping integrated read sequencing system, NOIR-SS）を開発した。同様の技術は複数のグループからほぼ同時期に発表されたが、NOIR-SSは読み取り精度向上とともに配列決定したDNAの分子数を計測できる、という特徴がある。

## 2) 寄附講座における研究

寄附講座では、成人病センターでの研究成果の実用化を行うとともに新しいがん遺伝子診断法の開発を行った。

### ① 血液検体を用いた EGFR 変異検査法

前述した血液中の微量 EGFR 変異測定系の分析性能試験・臨床性能試験を株式会社 DNA チップ研究所との共同研究で行った。分析性能試験については試験計画立案及び指導、臨床性能試験は寄附講座で行った。これらの成果をもとに同測定系（検査システム）を2019年7月11日に厚生労働省へ医療機器の承認申請を行った。2020年3月末までに承認の予定である。

### ② リキッド・バイオプシーによる肺がん早期発見法の開発

大阪国際がんセンターの肝胆膵内科と共同して血液検体からリキッド・バイオプシー技術を用いて膵がんを検出する技術の開発を行なった。検出率は37%であり、単独使用での早期診断は少し困難な性能であった。

### ③ 血液中ALK変異遺伝子検出法の開発

EGFR変異陽性肺がん同様に、ALK変異陽性肺がんに対して奏功する承認分子標的薬がある。ALKに関しても血液検査可能な検出法を開発を行った。前述の高精度塩基配列決定システム”非重複統合リード塩基配列決定システム (non-overlapping integrated read sequencing system, NOIR-SS) を応用している。感度 (生検陽性検体の陽性率) 及び特異度 (生検陰性検体の陰性率) は50%及び100%であった。感度がEGFRの場合 (70%) よりやや低いが、実用化が可能な結果であった。

### ④ 肺がん用高感度遺伝子検査パネルの開発

進行性肺がんに対してはEGFR, ALK, ROS1, BRAFについて遺伝子異常に奏功する薬剤がそれぞれある。これらの遺伝子検査は別々に行われているが、一度の検査で調べたい、という強い要望がある。次世代シーケンサーを用いて多数の遺伝子異常を同時に調べることができるが、そのような検査システムを遺伝子検査パネルと呼ぶ。

現在「オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム」が使われているが、これは米国で開発された検査システムであり、日本の医療環境に最適化されていない。米国では外部からの穿刺生検や開胸生検の頻度が高いが、日本では侵襲的生検は好まれず、ほとんどが気管支鏡生検である。そのため検体量が少なく感度の高い検査法が必要となる。ところが「オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム」は既存の遺伝子検査と比較して感度が悪く医療サイドの負担が増大している。このため当寄附講座では国内医療環境に適した遺伝子検査パネルの開発を2019年度から開始した。

## III. 教育

大阪府立成人病センターでは連携講座として奈良先端科学技術大学院大学のバイオサイエンス研究科の学生教育を担当してきた。当寄附講座でも修士課程学生の教育を行った。

ヒトゲノム計画終了後に行われた国際大型プロジェクトにより、ヒト集団のゲノム情報及びがんのゲノム情報の大規模なデータベースが構築されてきている。現在のゲノム科学はこれらのビッグデータを中心に、次世代シーケンサーを用いた疾患研究及び臨床への使用が中核をなしている。しかし国内での研究者育成は米国と比較して大きく遅れており、バイオサイエンスの重要領域であるにもかかわらず教育できる人材がほとんどいない。

当寄附講座は2019年度から当該分野の講義を担当しており、2020年度以降も積極的な貢献を考えている。

#### IV. 業績

##### <原著論文>

1. Kunimasa, K., Kato, K., Imamura, F. and Kukita, Y. (2019) Quantitative detection of ALK fusion breakpoints in plasma cell-free DNA from patients with non-small cell lung cancer using PCR-based target sequencing with a tiling primer set and two-step mapping/alignment. PLOS ONE 14(9): e0222233
2. Kondo, J., Ekawa, T., Endo, H., Yamazaki, K., Tanaka, N., Kukita, Y., Okuyama, H., Okami, J., Imamura, F., Ohue, M., Kato, K., Nomura, T., Kohara, A., Mori, S., Dan, S. and Inoue, M. High-throughput screening in colorectal cancer tissue-originated spheroids. Cancer Science. 110 (2019)1345–355.
3. Kukita, Y. Ohkawa, K., Takada, R., Uehara, H., Katayama, K. and Kato, K. (2018) Selective identification of somatic mutations in pancreatic cancer cells through a combination of next-generation sequencing of plasma DNA using molecular barcodes and a bioinformatic variant filter. PLOS ONE 13(2): e0192611.
4. Segawa, H., Kukita, Y. and Kato, K. HLA genotyping by next-generation sequencing of complementary DNA. BMC Genomics. 18 (2017) 914.

##### <特許>

日本国特許第6125731号. 核酸分子数計測法. 発明者：加藤菊也，久木田洋児、  
的場亮. 特許権者：大阪府立病院機構、株式会社DNAチップ研究所，発行日：2017  
年4月14日，出願日：2015年7月2日.

<邦文総説>

1. 加藤菊也. リキッドバイオプシーによるがん遺伝子変異検出. 臨床検査 第  
62巻 第11号、1434-1441、2018.
2. 上田由美、加藤菊也. EGFR-NGSチェック ～次世代シーケンシングによ  
る非侵襲性肺がん検査法. リキッドバイオプシー -体液中腫瘍マーカーの検出  
解析技術 - 落谷孝広（監修）シーエムシー出版、2017.
3. 久木田洋児. 塩基配列決定法 NOIR-SeqS. リキッドバイオプシー -体液中  
腫瘍マーカーの検出解析技術 落谷孝広（監修）シーエムシー出版、2017.
4. 加藤菊也. 血中腫瘍DNA ～ 研究開発の現状. リキッドバイオプシー -体  
液中腫瘍マーカーの検出解析技術 - 落谷孝広（監修）シーエムシー出版、20  
17.

<その他>

EGFRリキッド（医療機器プログラム）の厚生労働省への承認申請  
申請者 株式会社DNAチップ研究所  
申請日 2019年7月11日