



22世紀医療センター

22nd Century Medical and Research Center

次世代プレジジョンメディシン開発

Next-Generation Precision Medicine Development Laboratory

多機能がん遺伝子パネル検査の開発 ~DNA/RNA Twinパネルの実用化~

鹿毛秀宣、国田朱子、牛久綾、牛久哲男、織田克利

背景

- 精確な遺伝子パネル検査を実施する為には病理組織検体の品質の確保が不可欠である。
- 既存のがん遺伝子パネル検査の保険適用に準じたTodai OncoPanel (TOP) の有効性は不明である。

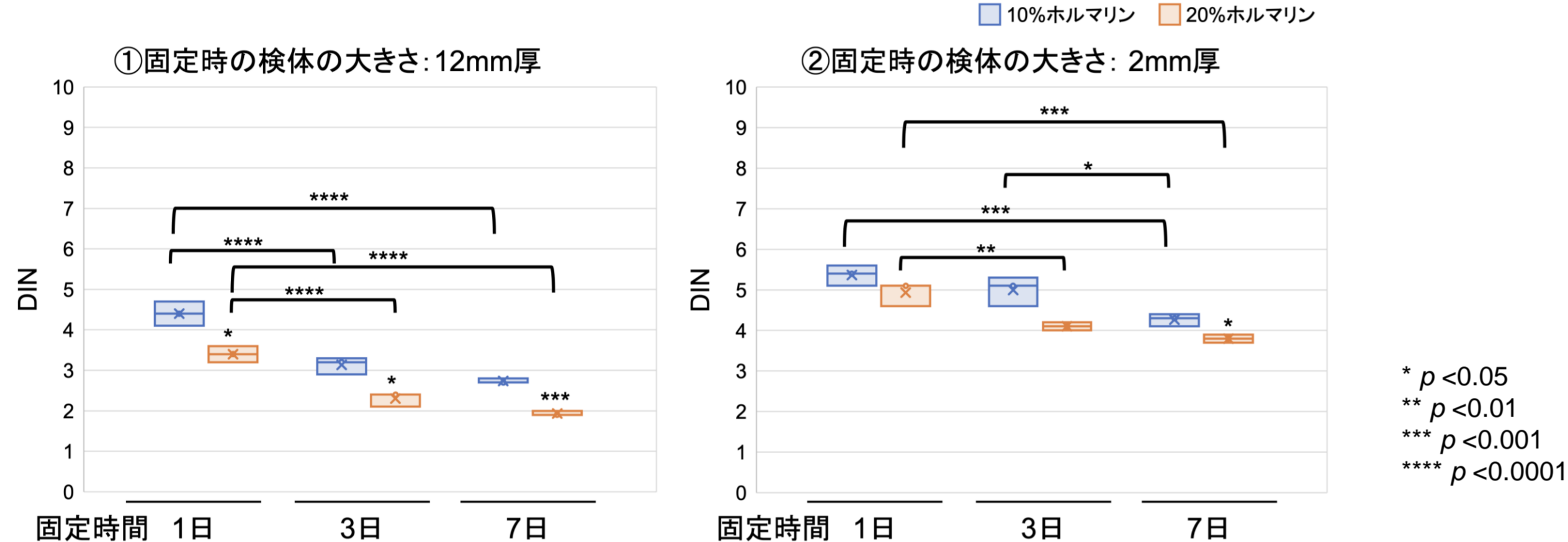
目的

- DNA・RNA双方の品質を高く保持するホルマリン固定パラフィン包埋標本作製方法を決定する。
- TOPを先進医療Bとして保険適用と同じ適格基準で実施して有効性を検証する。

①固定方法の検証:DNA品質への影響

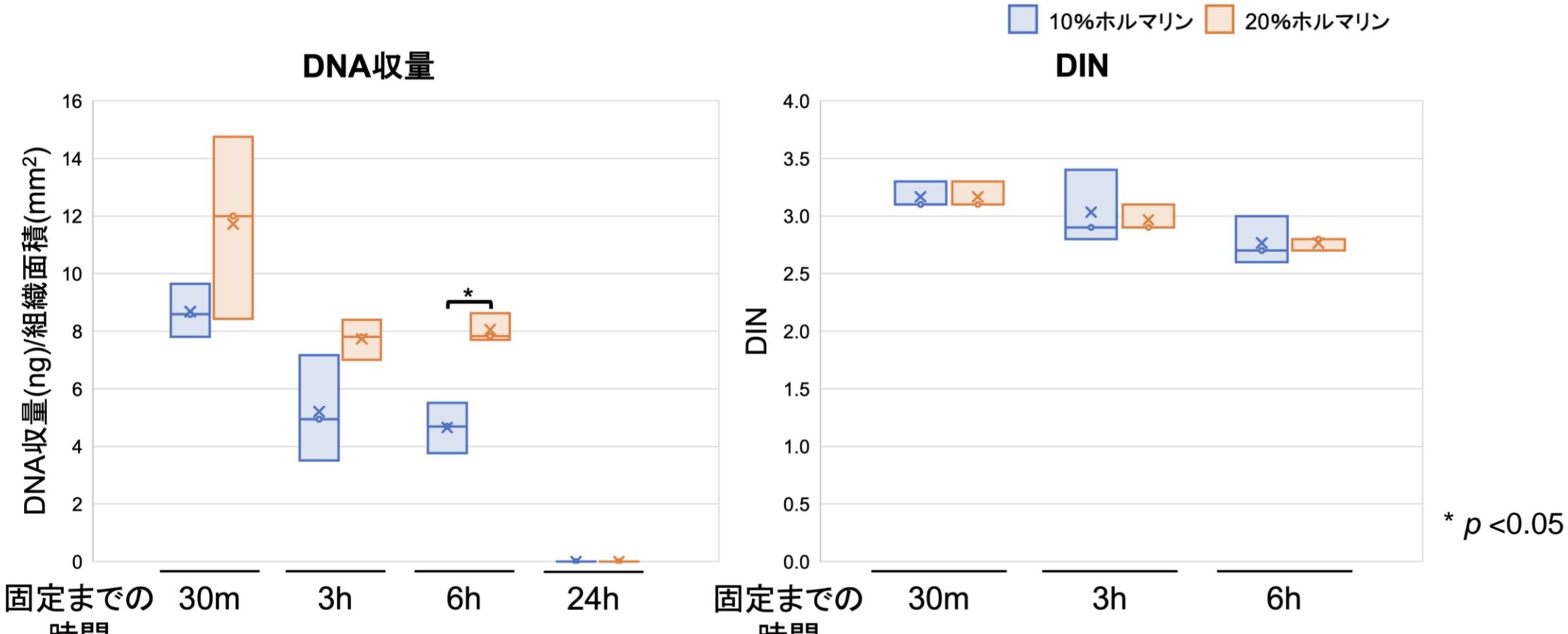
摘出後30分以内の新鮮ブタ組織(肝臓・脾臓)を用いてホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)標本作製した。肝臓はトレンを用い12 mm厚(12 mm x 10 mm)及び2 mm厚(2 mm x 15 mm)に大きさを揃え3片ずつ(n=3)脾臓は12 mm厚を3片ずつ標本作製した(n=3)。10 μm切片1枚から、QIAamp DNA FFPE Advanced Kit (Qiagen)によりDNAを抽出し、4200 TapeStation (Agilent Technologies)を用いてDINを測定しDNA品質を評価した。ホルマリンは10%または20%中性緩衝ホルマリン(武藤化学)を使用した。

検証1:ホルマリン濃度・固定時間のDNA品質に対する影響 (ブタ肝臓/12 mm厚・2 mm厚)



固定時間の経過によりDNA品質低下が認められた。ホルマリン濃度は10%と比較し20%でDNA品質低下が認められた。

検証2:ホルマリン濃度・固定までの時間のDNA品質に対する影響 (ブタ脾臓/12 mm厚)

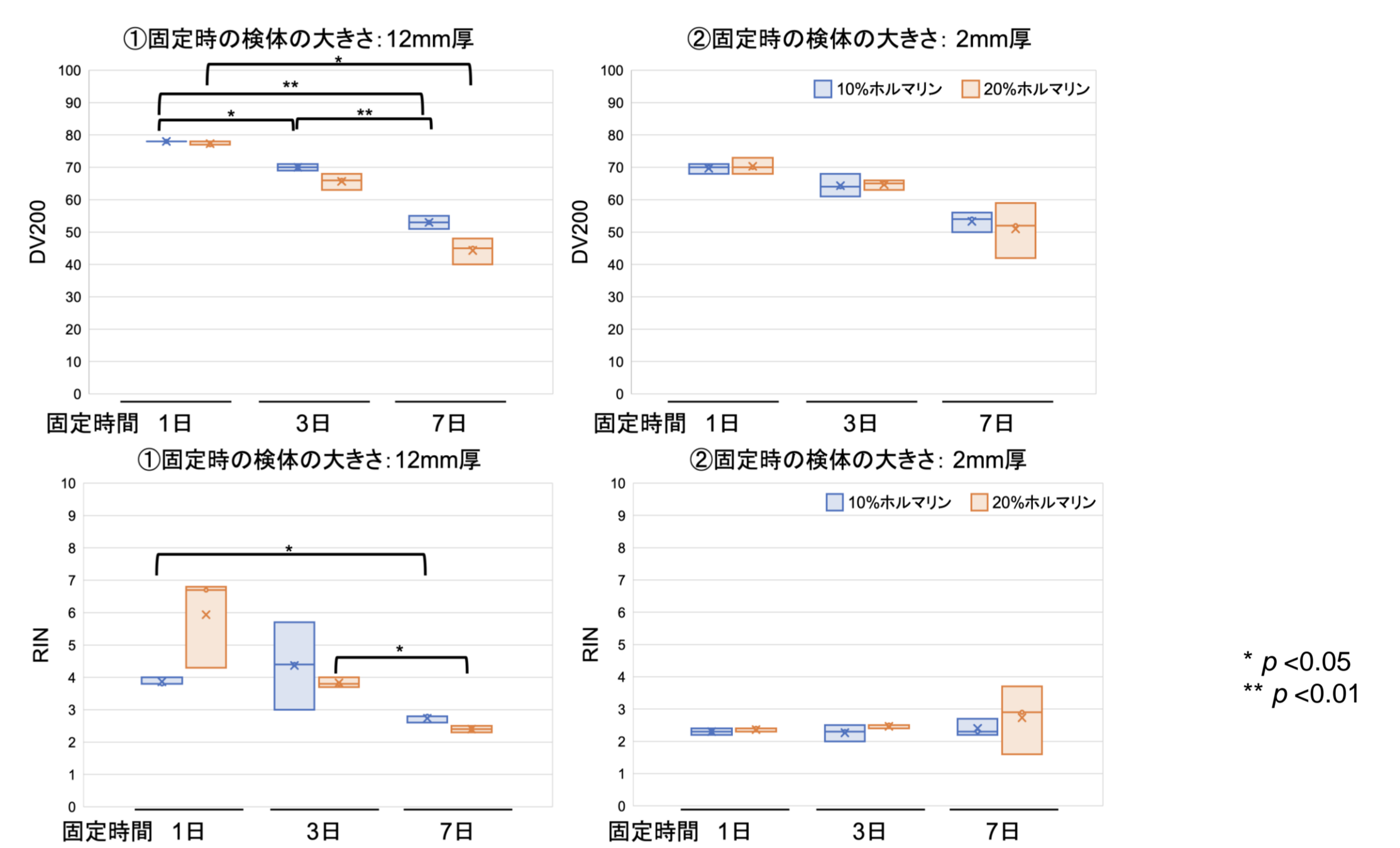


24時間固定後FFPE標本作製し、DNAを抽出後Qubit蛍光光度計により定量した。固定までの時間が経過するに従いDNA収量が低下する傾向が認められ、固定まで24時間室温放置した検体からはDNAは抽出されなかった(検出限界以下)。ホルマリン濃度によるDNA品質変化は脾臓では認められなかった。

②固定方法の検証:RNA品質への影響

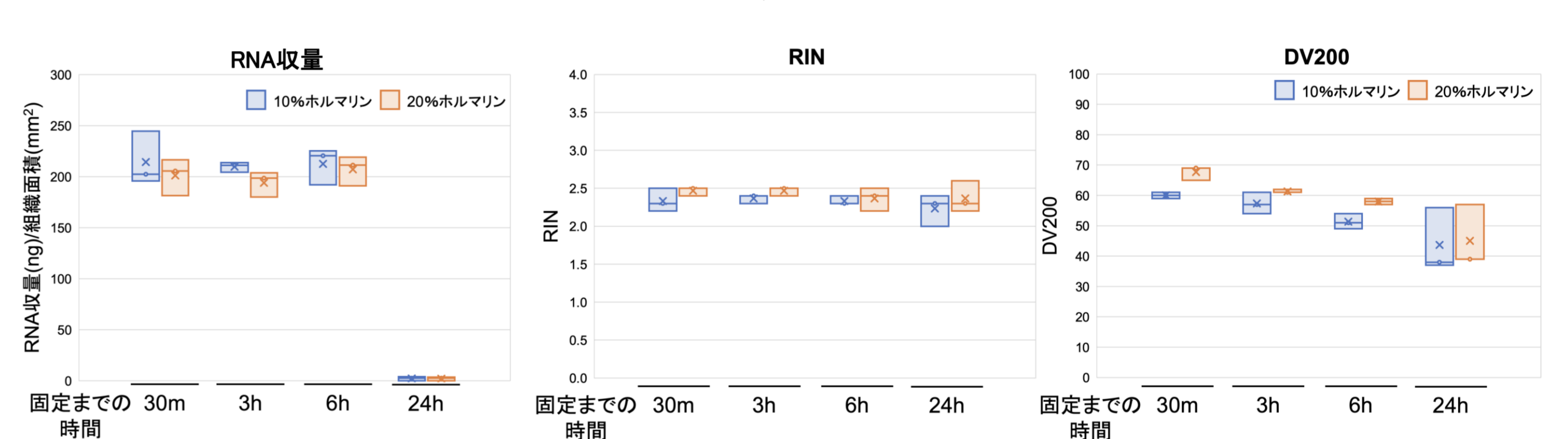
①と並行して10 μm切片1枚からRNeasy FFPE Kit (Qiagen)によりRNAを抽出し2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)によりDV200, RINを測定しRNA品質を評価した。

検証3:ホルマリン濃度・固定時間のRNA品質に対する影響 (ブタ肝臓/12 mm厚・2 mm厚)



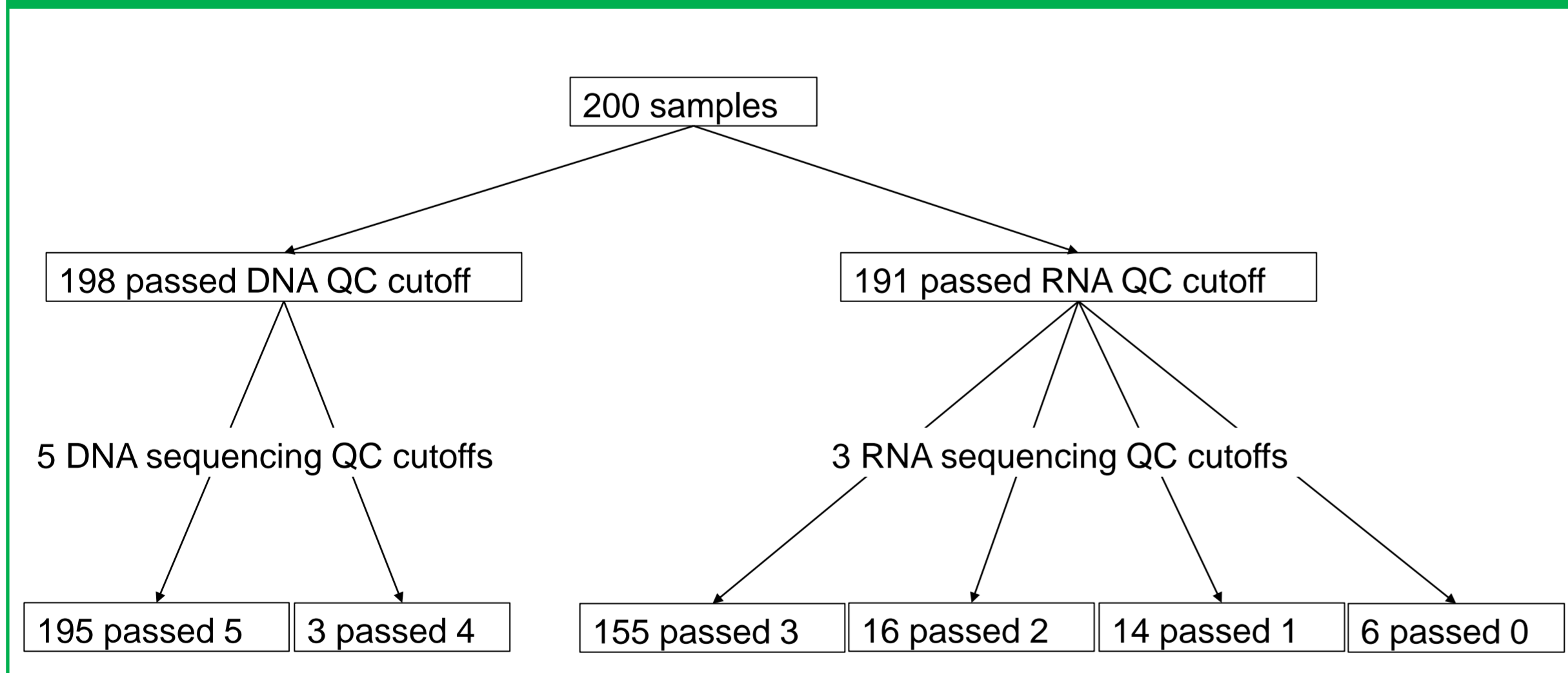
固定時間の経過によりRNA品質低下が認められた。ホルマリン濃度によるRNA品質変化は認められなかった。

検証4:ホルマリン濃度・固定までの時間のRNA品質に対する影響 (ブタ脾臓/12 mm厚)

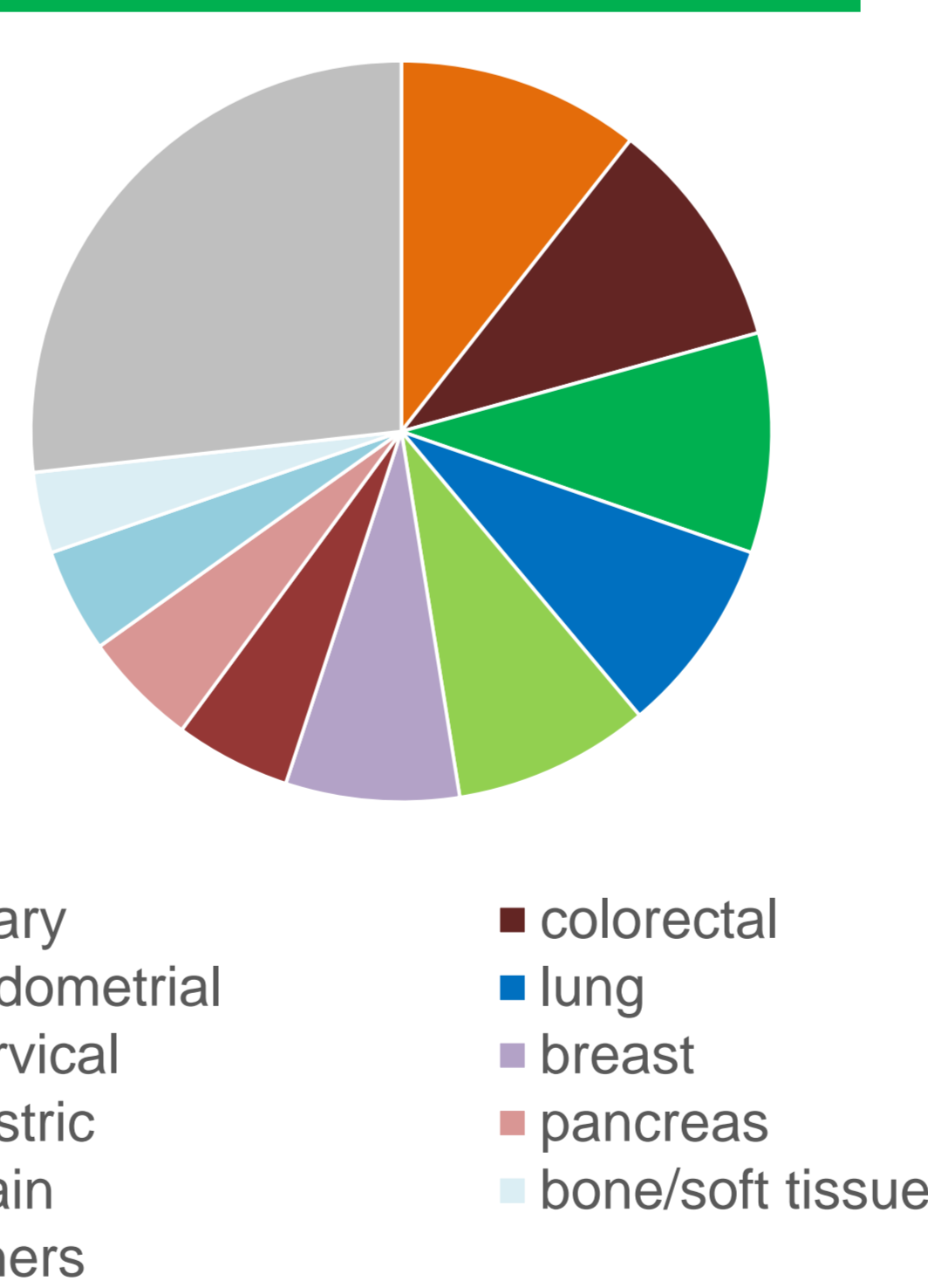


RNAはQubit蛍光光度計により定量し、RNA品質は200nt以上のRNA断片の割合を示すDV200により評価した。DV200の結果から、固定までの時間が経過するに従いRNA品質が低下する傾向が認められ、固定まで24時間室温放置した検体からはRNAがごく微量しか抽出されなかった。ホルマリン濃度によるRNA品質変化は認められなかった。

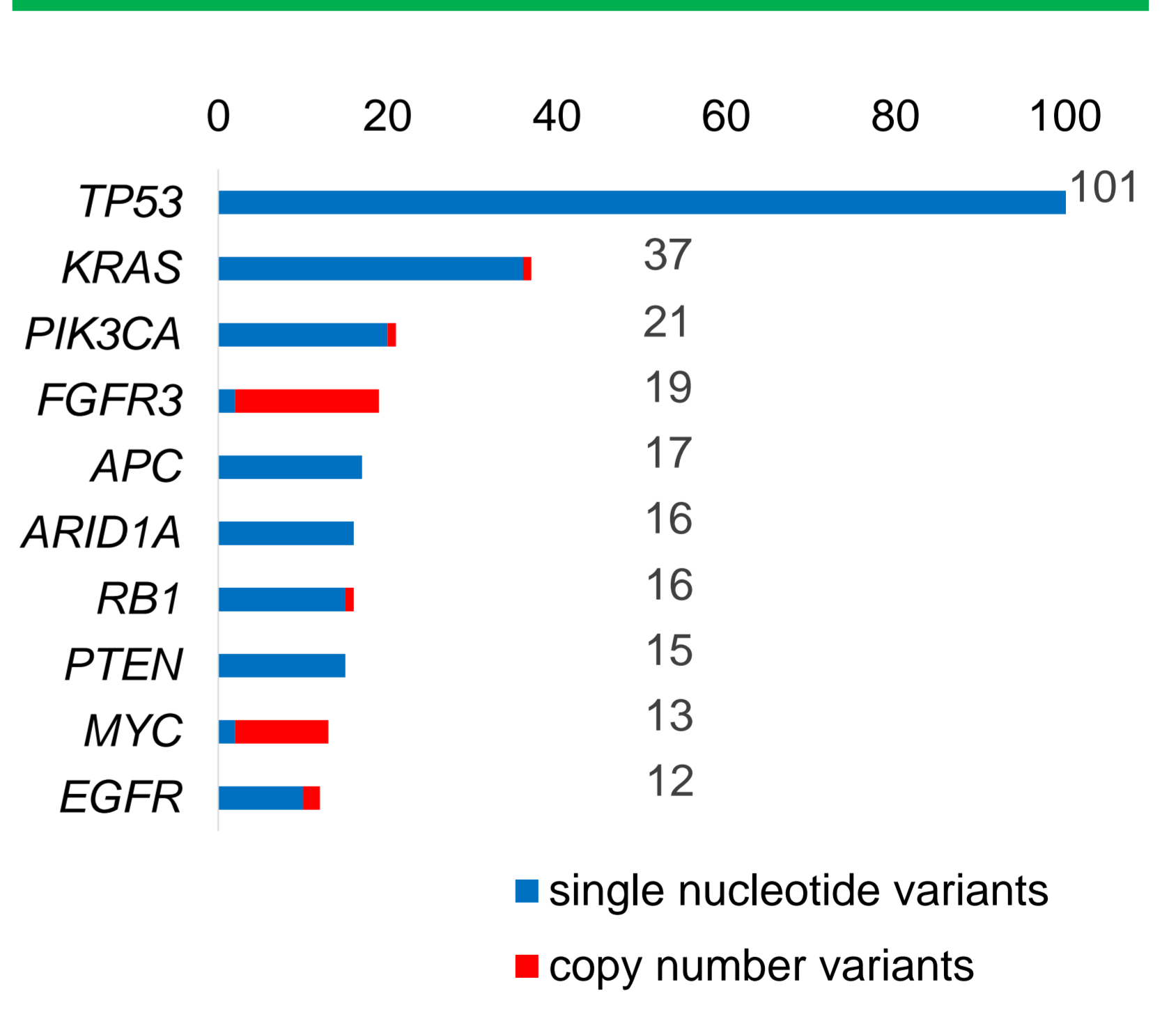
③200検体から抽出したDNA、RNAの質



④がん種の内訳



⑤頻度の高い遺伝子変異



⑥診断的意義

がん種	診断的意義
卵巣癌	遺伝子変異のプロファイルは類内膜癌より高異型度漿液性を示唆
軟部腫瘍	MYOD1 変異が胎児型横紋筋肉腫を示唆
甲状腺癌	PTEN変異とハプロイドタイプは膨大細胞型乳頭癌を示唆
腎癌	FH変異はFH欠損腎細胞癌を示唆①
軟部腫瘍	NF2変異は悪性中皮腫を示唆
前立腺癌	AR増幅はホルモン抵抗性を示唆
脳腫瘍	TERT 変異、TP53 変異、IDH 変異、1p/19q共欠損は膠芽腫を示唆
腎癌	FH変異はFH欠損腎細胞癌を示唆②
乳癌	ESR1変異はホルモン抵抗性を示唆
乳癌	PIK3CA変異は粘液線維肉腫を示唆
原発不明癌	ERBB2変異は胃癌を示唆
脳腫瘍	PTEN変異、TERT変異は膠芽腫を示唆
十二指腸癌	BAP1変異は胆管由来を示唆
子宮頸癌	PGR変異、PTEN変異は類内膜癌を示唆
原発不明癌	BCOR変異は腎細胞癌を示唆

⑦融合遺伝子

がん種	融合遺伝子	意義	既報	病的意義
卵巣癌	FGFR1-SET	治療	なし	可能性
外陰癌	BRCA1-EFCAB5	治療	なし	可能性
	PAX3-FOXO1		あり	可能性
前立腺癌	ZC3HAV1-BRAF	治療	あり	病的
	BRD4-CALR3		なし	不明
軟部腫瘍	SNRNP70-NTRK3	治療	なし	可能性
	ERCC1-URI1		なし	不明
脳腫瘍	CIC-DUX4	診断	なし	病的
膵臓癌	NAB2-STAT6	診断	あり	病的
膵臓癌	AIP-SETD2	診断	なし	可能性
唾液腺癌	MYB-NFIB	診断	あり	病的
	NFIB-MYB		なし	不明
十二指腸癌	PTPRK-RSPO3		あり	病的
卵巣癌	CCDC6-ANK3		あり	可能性
軟部腫瘍	SS18-SSX2		あり	可能性
大腸癌	TANC2-CA4		あり	可能性
卵巣癌	RB1-FBXO28		なし	可能性
後腹膜癌	HMGGA2-C12orf29		なし	不明
頭頸部癌	HMGGA2-DPYD		なし	不明
	NF1A-METAP1D		なし	不明
	NF1A-SLC38A11		なし	不明
	RAVER2-MDM2		なし	不明
卵巣癌	IMPDH1-KMT2C		なし	不明
子宮頸癌	E1F3E-EMC2		なし	不明
胆管がん	PTPRK-BRSK2		なし	不明
皮膚癌	IPP-MAST2		なし	不明
十二指腸癌	B2M-RABGAP1L		なし	不明
	PTPRK-SNX3		なし	不明

⑧遺伝性腫瘍

遺伝子	患者数とがん種
BRCA1	4 (全例卵巣癌)
BRCA2	3 (乳癌、膵癌、盲腸癌)
TP53	3 (膠芽腫、肺癌、骨肉腫)
PALB2	1 (乳癌)
RET	1 (脂肪肉腫)
VHL	1 (腎明細胞癌)

結論

- パネル検査に適したDNA・RNAを得る為のFFPE標本作製法としては、臓器摘出後速やかに(3時間以内)10%中性緩衝ホルマリンにより固定し、固定時間は1日とする方法が適切である。
- Todai OncoPanel (TOP)を先進医療Bとして保険適用と同じ適格基準で実施した結果、DNAパネル、RNAパネル、正常細胞の解析を通じて治療的意義、診断的意義、遺伝的意義が得られた。(Cancer Sci 2023 Online ahead of print. PMID: 36601953)

(研究協力者: 人体病理学 南雲吉代)