



講座名 次世代プレシジョンメディシン開発

英文講座名 Next-Generation Precision Medicine Development Laboratory

がん遺伝子パネル検査「Todai OncoPanel」の多機能化

鹿毛秀宣、国田朱子、牛久綾、織田克利

背景

- ・ 保険承認されているRNAパネルではなく、パネル検査に適した核酸抽出方法は不明である
- ・ 遺伝子変異量(TMB)が免疫チェックポイント阻害薬の効果予測に有用と報告されている

目的

RNAパネル検査に適した病理組織検体の取り扱い方法を改良する
Todai OncoPanelで測定したTMBと免疫チェックポイント阻害薬の効果を解析する

①核酸抽出方法の検証

2018-2021年の当院手術症例FFPE検体(表1)より3種類の方法(表2)により核酸(DNA/RNA)抽出を実施し、品質を評価した(①)。また薄切検体は室温、4°C、-80°Cにて1週間及び1ヶ月間保存後各方法によりDNA/RNAを抽出し、薄切当日抽出した核酸との品質を比較した(②)。

表1:核酸抽出対象14症例

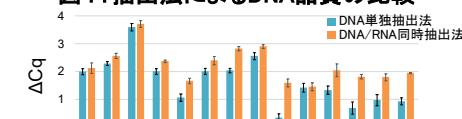
Sample #	部位	プロック作成年
1	脳	2018
2	脳	2018
3	卵巣	2019
4	肝	2019
5	肝	2020
6	卵巣	2020
7	肝	2020
8	脳	2020
9	子宮(体部)	2020
10	子宮(頸部)	2021
11	大腸	2021
12	大腸	2021
13	大腸	2021
14	大腸	2021

ホルマリン固定・パラフィン包埋(FPPF)
組織10 μm厚1枚を使用した。

表2:核酸抽出に用いた3種類の方法

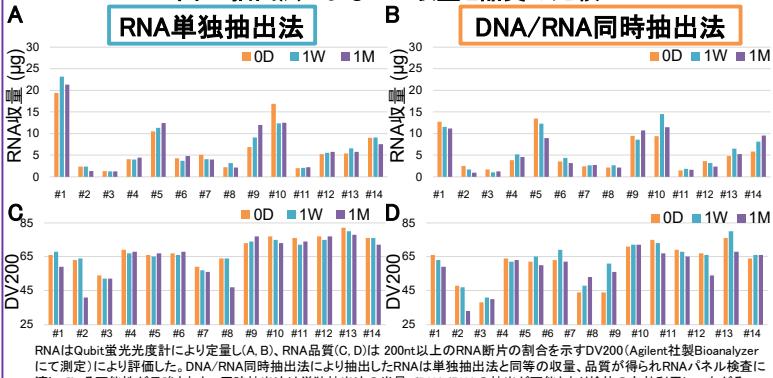
方法	抽出装置	機器抽出キット	会社名
DNA単独抽出法	DNA	QIAamp DNA FFPE Advanced LNC Kit	Qiagen
RNA単独抽出法	RNA	NEasy FFPE Kit	Qiagen
DNA/RNA同時抽出法	DNA/RNA	AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	Qiagen

図1:抽出法によるDNA品質の比較



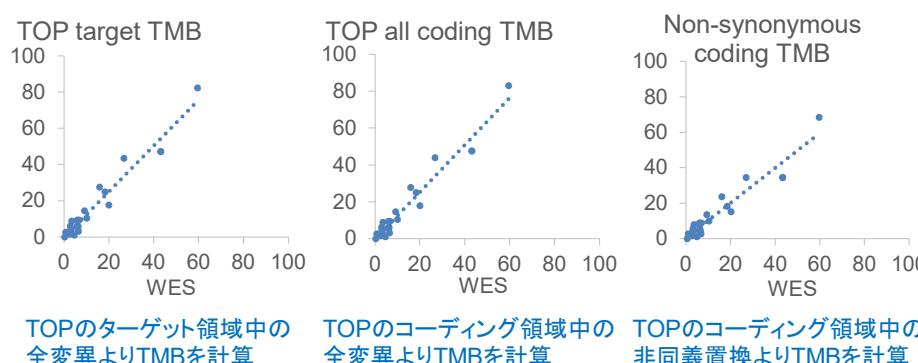
DNA品質はイルミナ社のInfinium HD FFPE QC Assay付属のprimerを用いてqPCRを実施し付属のQC templateに対する ΔCq 値により評価した。イルミナ社指標: $\Delta Cq < 5$

図2:抽出法によるRNA収量と品質の比較



RNAはQubit蛍光光度計により定量し(A, B)、RNA品質(C, D)は200nt以上のRNA断片の割合を示すDV200(Agilent社製Bioanalyzerにて測定)により評価した。DNA/RNA同時抽出法により抽出したRNAは単独抽出法と同等の収量、品質が得られRNAパネル検査に適している可能性が示唆された。同時抽出法は単独抽出法の半量でDNA/RNAの抽出が可能となり検体の有効利用につながる。

③全エクソームシークエンスとTOPによるTMBの相関



TOPのターゲット領域中の全変異よりTMBを計算

TOPのコーディング領域中の全変異よりTMBを計算

TOPのコーディング領域中の非同義置換よりTMBを計算

	R値	正確度	感度	特異度
target TMB	0.97	96%	100%	93%
all coding TMB	0.96	96%	100%	93%
non-synonymous coding TMB	0.96	91%	88%	93%

全エクソームシークエンスのTMB ≥ 10 を真の陽性とした際のTOP TMBの成績

④免疫チェックポイント阻害薬の効果を予測するための非小細胞肺癌症例における各バイオマーカーの比較

	PD-L1 免疫染色	TOP Target TMB	TOP Non-synonymous coding TMB	CD274 mRNA 発現	Aneuploidy スコア
PR/SD (n=13)	40%	9.2	6.7	59.7	7.9
PD (N=3)	3%	2.4	1.6	32.0	10.5
P値	0.01	0.09	0.02	0.26	0.85

結論

DNA/RNA同時抽出法により抽出したDNA/RNAがパネル検査に適している可能性が示唆された
検体保存温度や保存期間によるRNA品質への影響は認められなかったが今後更なる検証が必要である
Todai OncoPanelで測定したTMBは全エクソームシークエンスで測定したTMBと良好な相関、感度、特異度を示し、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測に有用であることが示唆された