Theme●分子標的薬の新しいバイオマーカー

分子標的薬耐性研究における次世代シーケンス解析

Next generation sequencing for the research on resistance to molecular targeted agents

大坪 孝平[1,3]／岩間 映二[1,4]／岡本 勇[2]
Kohei Otsubo　Eiji Iwama　Isamu Okamoto
九州大学大学院医学研究院胸部疾患研究施設[1]／診療准教授[2]
九州大学病院がんセンター外来化学療法室助教[3]
九州大学大学院医学研究院九州連携臨床腫瘍学講座助教[4]

KEY WORDS
◆次世代シーケンス next generation sequencing
◆デジタルPCR digital PCR
◆分子標的薬 molecular targeted agents
◆耐性 resistance

SUMMARY 近年の次世代シーケンス(NGS)解析の進歩により，さまざまながんのドライバー変異や薬剤耐性機序に関する研究が進んでいる。非小細胞肺がんにおいては，NGSはデジタルPCR(dPCR)と同様，血中循環腫瘍DNA(ctDNA)のモニタリングや耐性変異の検出に有用であることが報告されている。さらに，CAPP-SeqやMANO法など，NGSを用いた新たな解析手法も登場しており，薬剤耐性研究が今後さらに加速することが期待される。本稿では，NGSを用いた分子標的薬耐性に関する遺伝子解析の現状と今後の展望について紹介する。

With the development of next generation sequencing (NGS) analysis in recent years, research on driver mutations for various cancers and mechanisms of drug resistance has advanced. NGS, as well as digital PCR, is reportedly useful for monitoring circulating tumor DNA and detecting drug resistance mutations, in particular, in non-small-cell lung cancer. In addition, as new analytical methods for NGS such as CAPP-Seq and MANO method have emerged, research on drug resistance is expected to further progress in the future. Here, we introduce the current status and future prospects of gene analysis on molecular targeted agent resistance.

はじめに

近年の次世代シーケンス(next generation sequencing；NGS)解析技術の進歩により，全ゲノムレベルでの体細胞変異の解析が可能となった[1)]。低価格化も進み，今後臨床医にとってさらに身近な遺伝子解析手法となるであろう。特に，がん領域において，ドライバー変異の発見や薬剤耐性獲得機序の解明に大きく貢献することが期待されている。

遺伝子変異解析におけるデジタルPCRとNGSの特徴

がんにおける遺伝子変異の解析には，PCRアッセイとNGSアッセイが有用である。従来のエンドポイントPCRは増幅した核酸をプラトーな状態で測定していたため，反応速度のばらつきによって結果にばらつきが生じていた。リアルタイムPCRは指数フェーズで測定することで，より正確な定量が可能となった。これら従来のPCRとは異なり，デジタルPCR(dPCR)はサンプルに含まれる個々の分子の数をカウントして絶対定量を行う。多数のウェルにDNAやcomplementary DNA(cDNA)を分配し，個々のウェルで同時にエンドポイントPCRを行い，PCR終了後に各ウェルの増幅の有無を解析し，増幅があったウェルはポジティブ反応，増幅がなかったウェルはターゲットを含まないネガティブ反応として数をカウントする(**図1 A**)。これにより，dPCRでは正常サンプル中にわずかに含まれる遺伝子変異を同定することができるため，血液サンプル中に存在する腫瘍由来DNAの遺伝子解析を行う際や，より高い精度でサンプル間のターゲット量の比較を行う際に適している。

NGSは，無作為に切断されたDNA断片から数百万～数十億もの膨大なシーケンシング反応を同時並行で行うことができる手法である。NGSによる解析では，まずアダプター配列を利用して増幅(またはライゲーション)させたDNAライブラリーの調製を行う。次にDNAリンカーをライブラリーアダプターにハイブリダイズし，各ライブラリー断片を増幅させ，増幅時の核酸取り込みにおいて産生される蛍光シグナルを視覚的に検出してデータ化する。このRawデータをバイオインフォマティクス解析し，最終的に目的とする結果が得られる(**図1 B**)。NGSは，特定の遺伝子をプライマーで増幅させるPCRベースの解析法と異なり，複数の遺伝子を同時に解析することが可能である。さらに，点突然変異や挿入欠失変異のみならず，コピー数増加や融合遺伝子の同定も可能であるため，網羅的な薬剤耐性機序の検索に適している。

NGSによるがん関連遺伝子の解析には，主に全エクソームシーケンスとターゲットシーケンスが用いられ

SAMPLE

Copyright(c) Medical Review Co.,Ltd.