

サブテーマC SIPAIH22C03

「AI技術の支援を取り入れたリキッドバイオプシーによる超高精度
がん診断システムの標準化・実装化」

成果発表シンポジウム2022 プロジェクト成果報告



株式会社ビー・エム・エル

公益財団法人 がん研究会

1. 採血後の血漿分取手順の標準化

- ・ 標準作業手順書 (SOP) の作成
- ・ 採血管センサーの考案、プロトタイプ製造、特許申請

2. 血漿検体の保管条件、搬送体制の確立

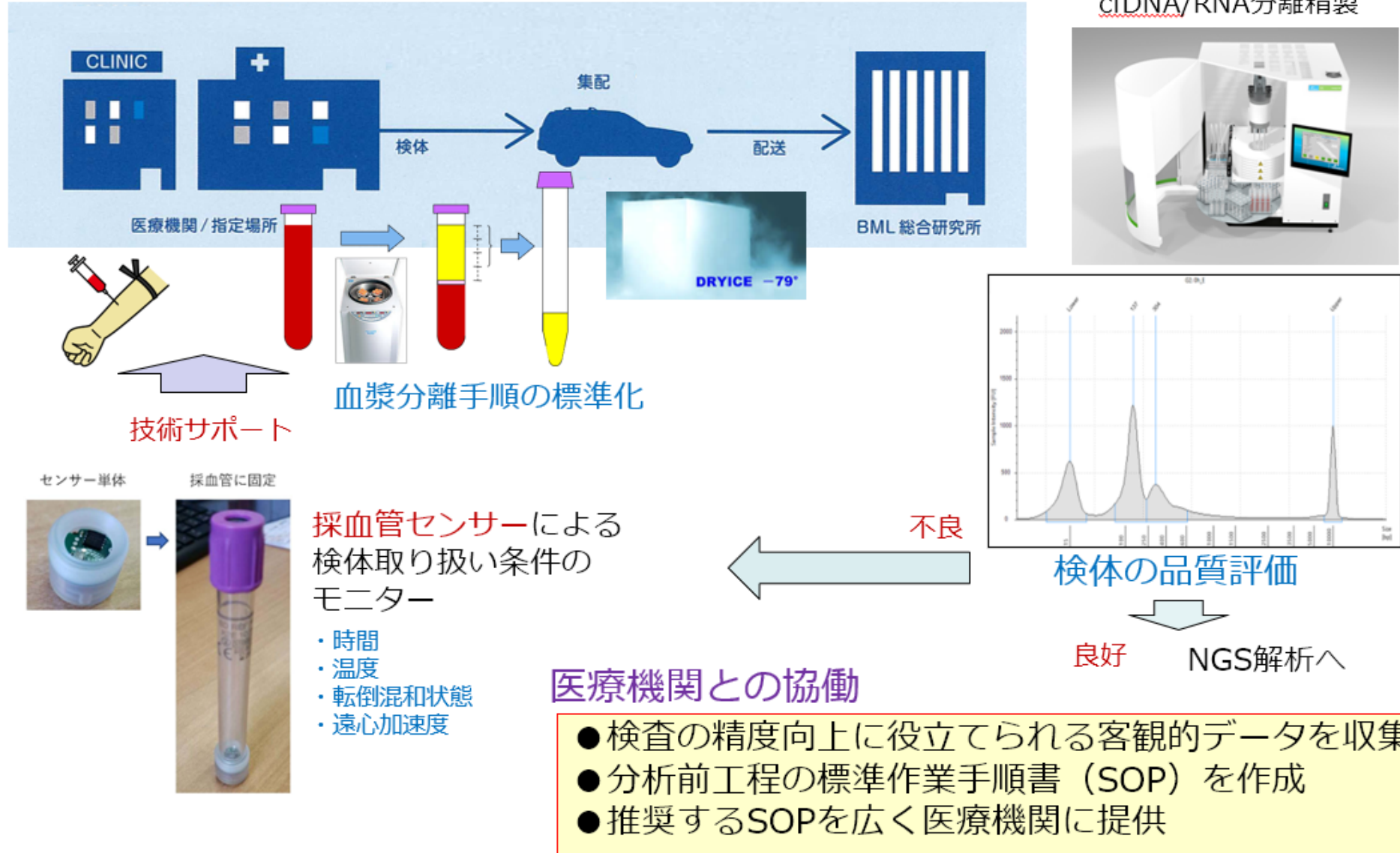
- ・ 初期からの評価協力施設： 札幌医科大学病院、北海道大学病院
- ・ 実地検証施設： 仙台厚生病院、東北大学病院、金沢大学病院、徳島大学病院

3. 分離精製したcfDNA・RNAの品質評価

- ・ 日本IBMとの連携によりAIプログラムを開発

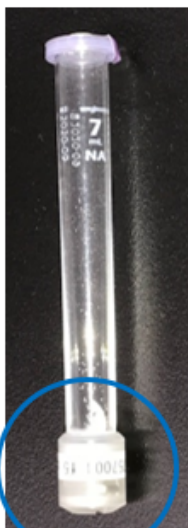
4. 異なる種類のセルフリーサンプル (血漿 vs 血清) での解析結果の評価

- ・ Serum vs plasma samples (Pittella-Silva F, et al., *Clin Chem.* 66(7):946-957, 2020)

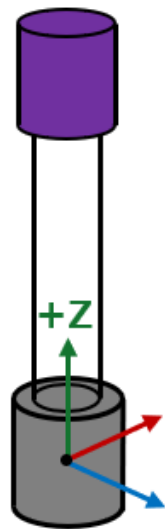


採血管センサーの開発

市販の真空採血管（EDTA管2タイプ）の底部に着脱でき、採血時からの経過時間、転倒混和度合い、保存温度、遠心分離と凍結保管まで所要時間などをモニターできるデバイスを開発



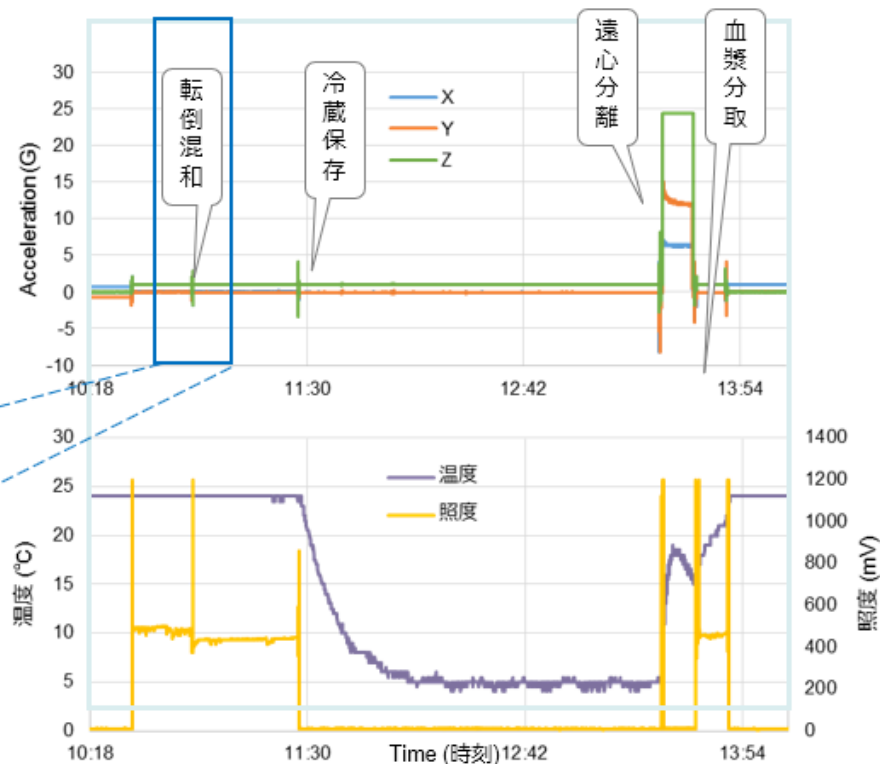
採血管センサー



- 取得情報
- ・ X軸
 - ・ Y軸
 - ・ Z軸
 - ・ 温度 (-20°C <)
 - ・ 照度

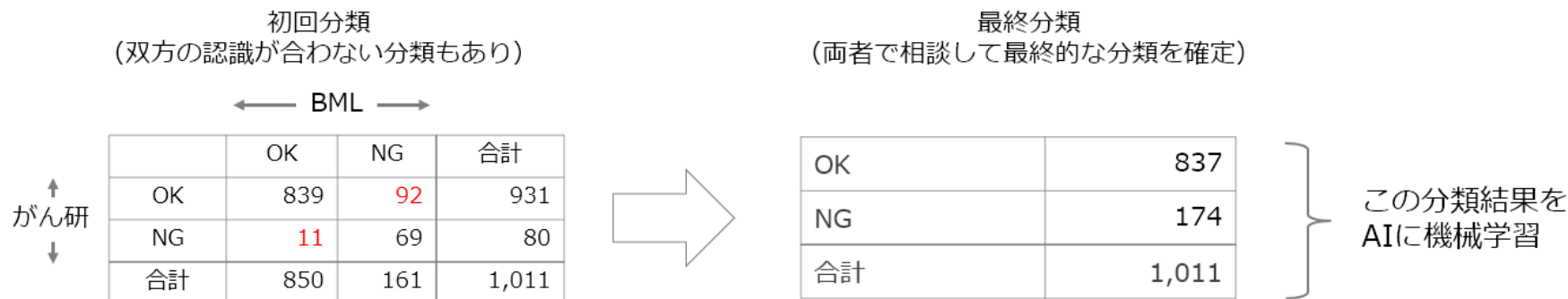


模擬試験データ



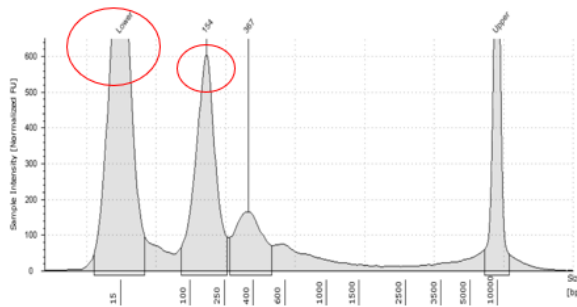
AIによるcfDNAの品質評価プログラムの開発 (日本IBM社と連携)

- がん研とBMLで個々にcfDNAの電気泳動波形を分類し、AIに機械学習

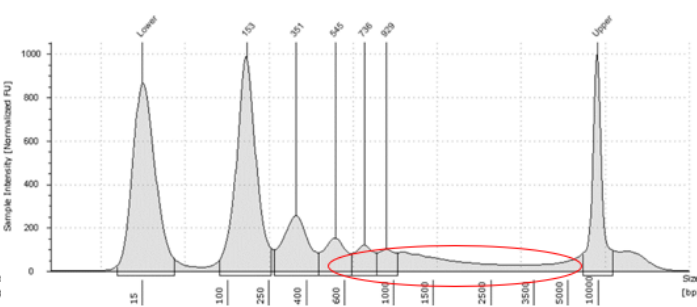


- 実際に下記のような例をNGとして分類

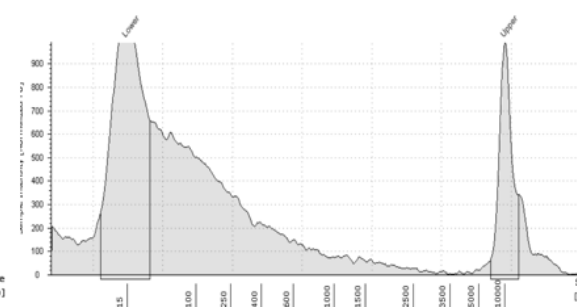
cfDNAの量が少ない



高分子DNAのコンタミ



明らかな異常 (cfDNAのピーク無し)



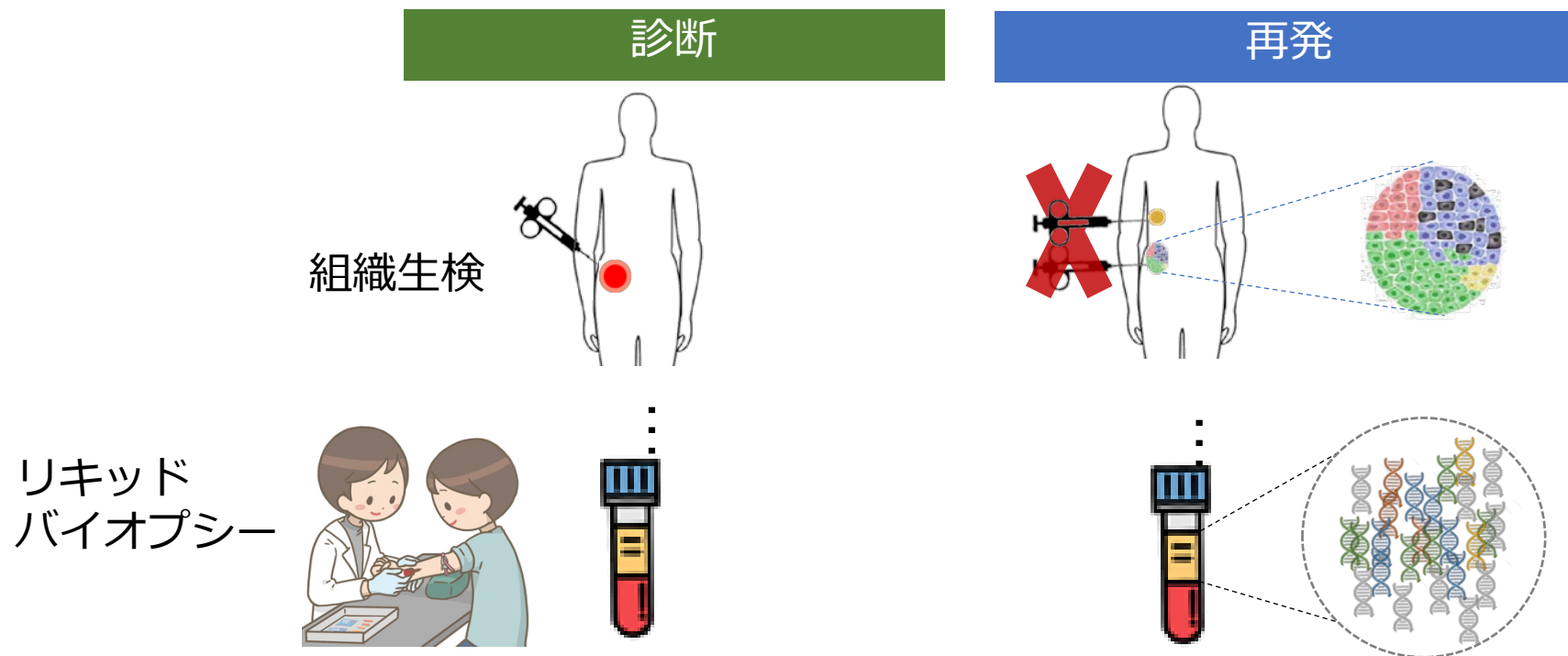
《最終年度》
 リキッドバイオプシー
 検査を実施するラボで
 広く利用できる品質判定
 アプリを作成する。

組織生検の課題 (=リキッドバイオプシーの重要性)

- ・ 患者によって組織生検ができないことがある
- ・ 再発時、複数回の組織生検は困難 (現実的ではない)

リキッドバイオプシーは

- ・ 非侵襲的で、リアルタイムに患者のがんの状況を把握することが可能

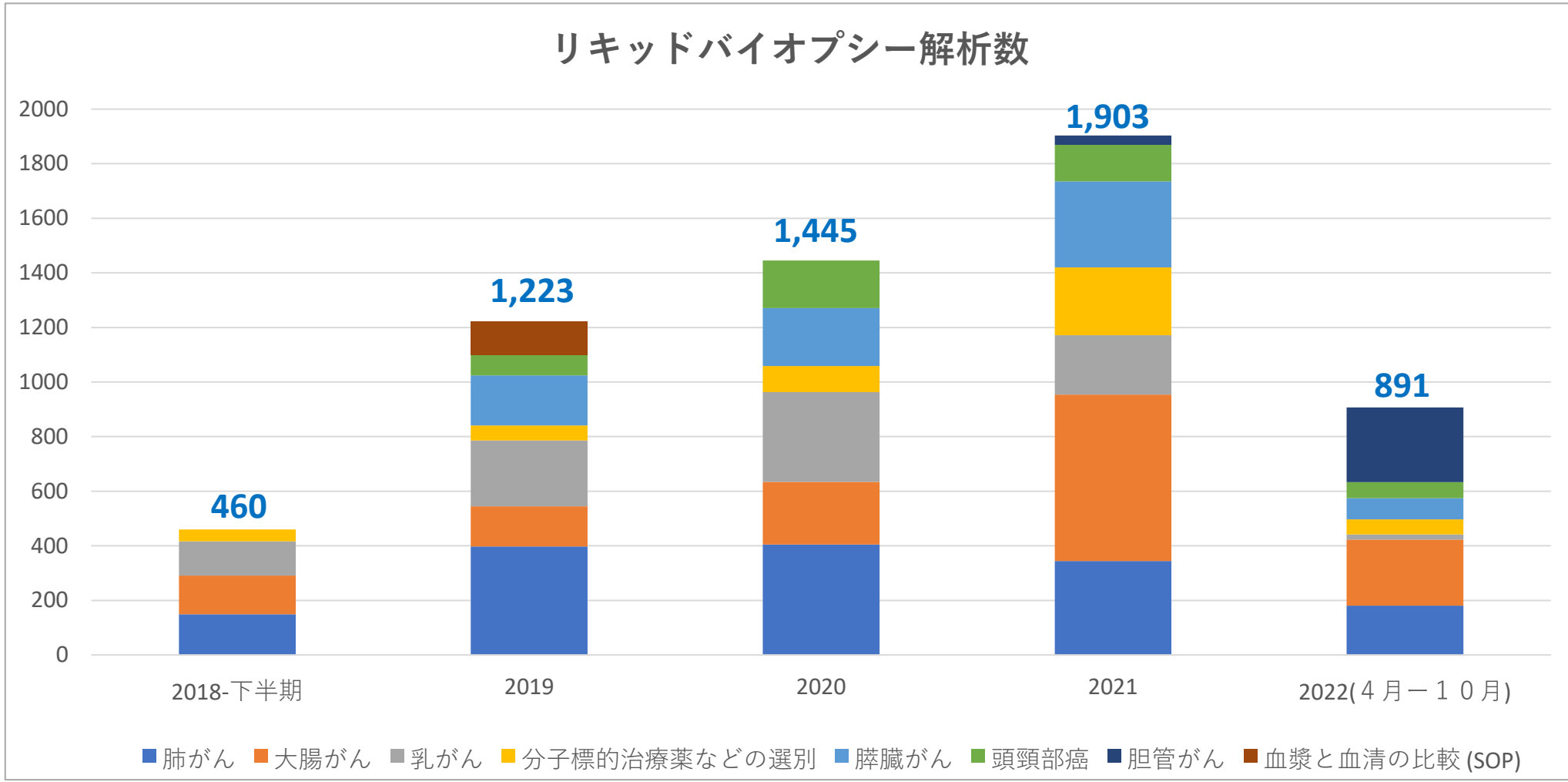


- 年間1,000検体以上のNGSによるリキッドバイオプシー解析処理システムの構築
- リキッドバイオプシーに関わる報告

論文発表：13、国際学会での発表：13、国内学会での発表：15

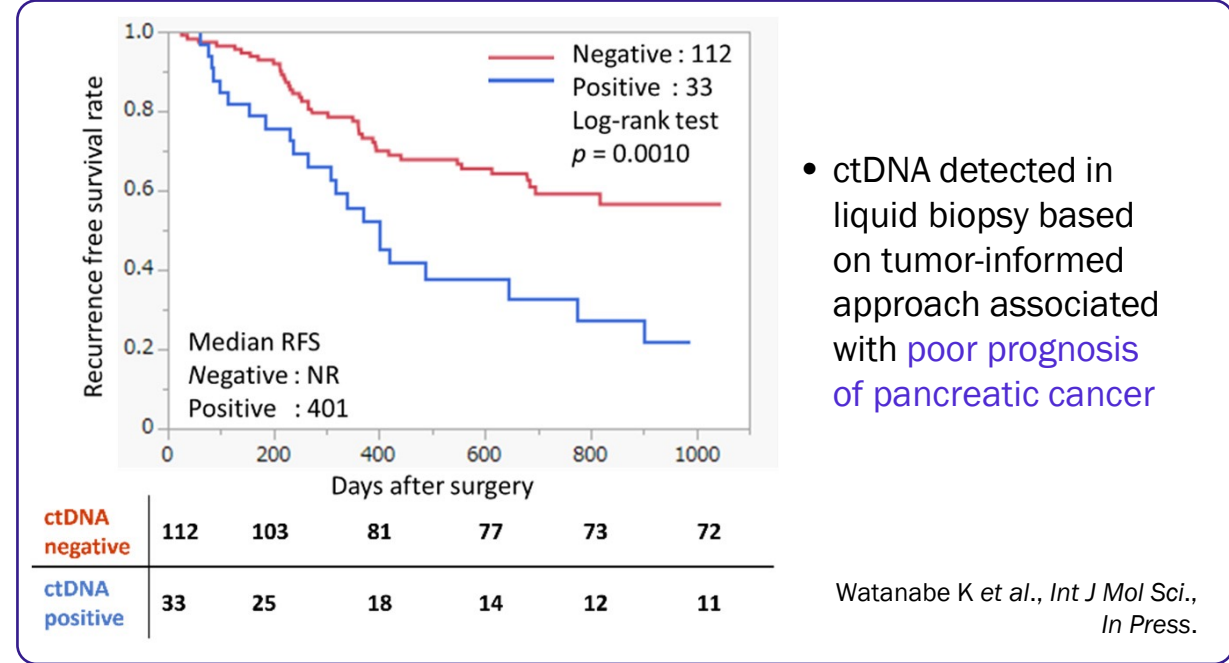
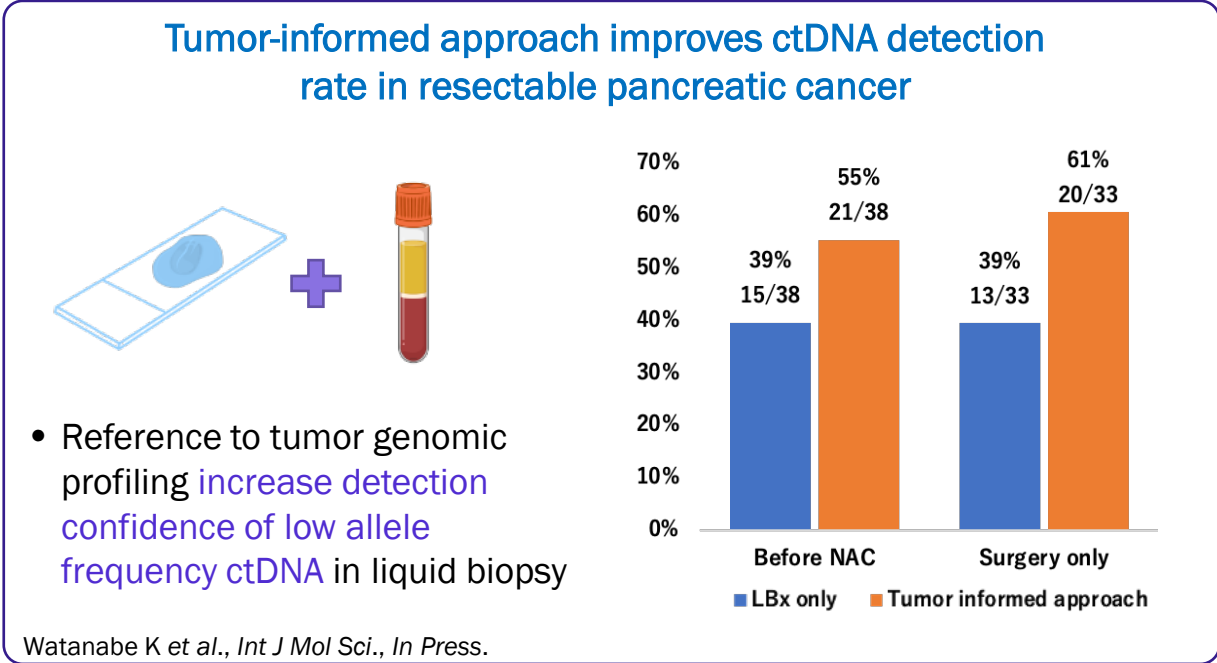
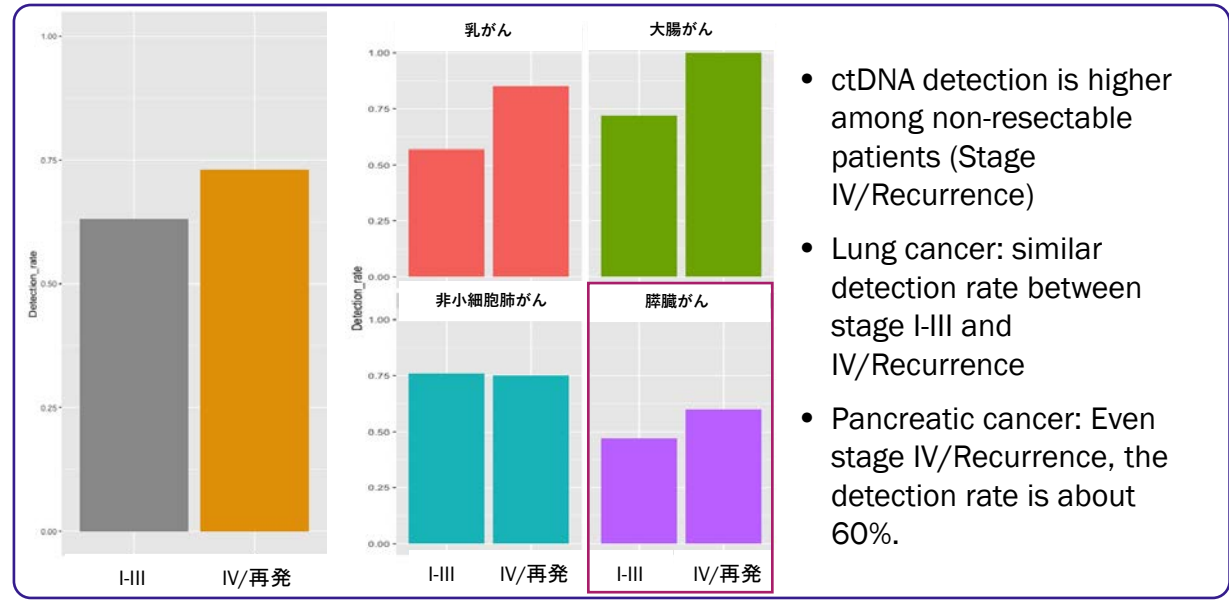
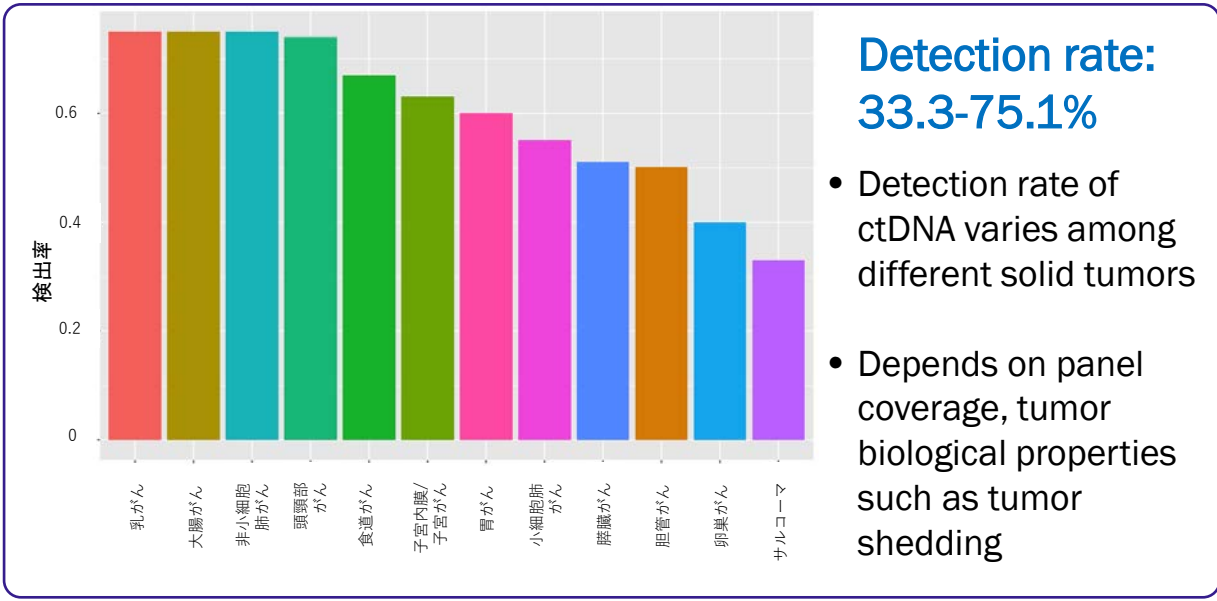
【主な報告】

1. リキッドバイオプシーのNGS解析において、クローン性造血は偽陽性の原因となり得る
(Chan HT, et al., *Cancers (Basel)*. 12(8):2277, 2020)
2. がん治療におけるリキッドバイオプシーの臨床的有用性
 - 様々な固形がんでのctDNA検出率
(Chan HT, et al., *Mol Oncol*. 14(8):1719-1730, 2020; Chin YM, et al., *Cancer Sci*. 112(1):454-464, 2021; Watanabe K et al., *Int J Mol Sci*, In Press.)
 - 治療反応性を確認するためのctDNAモニタリング
(Chin YM, et al., *Cancer Sci*. 113(5):1808-1820, 2022.)
 - 再発の早期発見のためのMRD検出
 - リキッドバイオプシーによる分子プロファイリング
(Low SK, et al., *Transl Lung Cancer Res*. 11(5):711-721., 2022.)

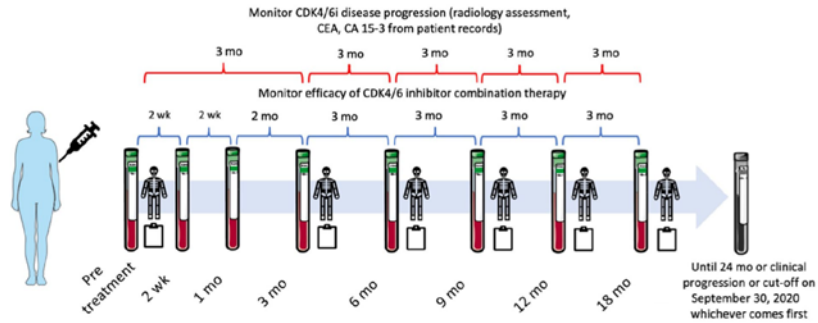


リキッドバイオプシー解析に必要な、血液ゲノムDNA、組織ゲノムDNAの結果も含む

様々な固形がんにおけるctDNA検出率 (JFCR)



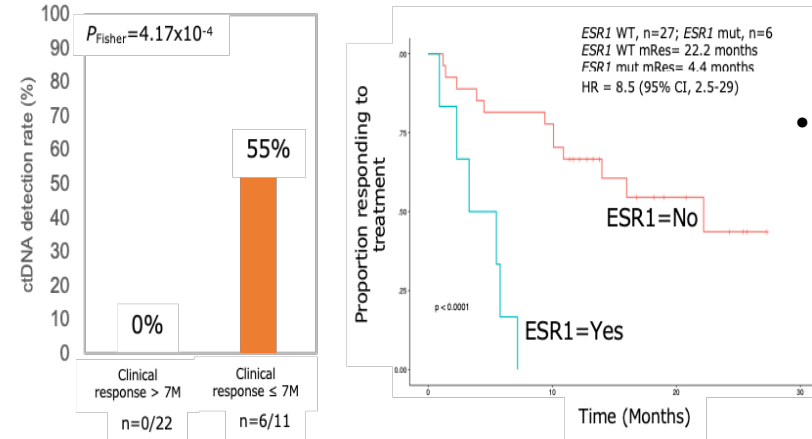
Objectives: monitoring targeted therapy effectiveness using liquid biopsy profiling



Cell-free DNA targeted NGS
 Oncomine Pan-Cancer Cell-free assay
 Unique molecular tags (UMT)
 52 genes, 272 amplicons, 20 ng input cfDNA

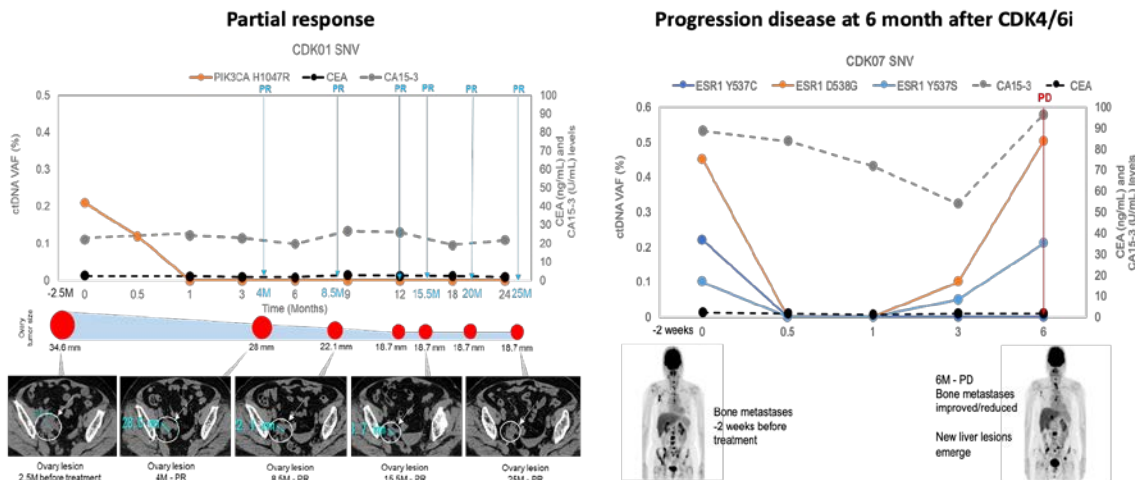


Prognostic role of *ESR1* alteration at pre-treatment



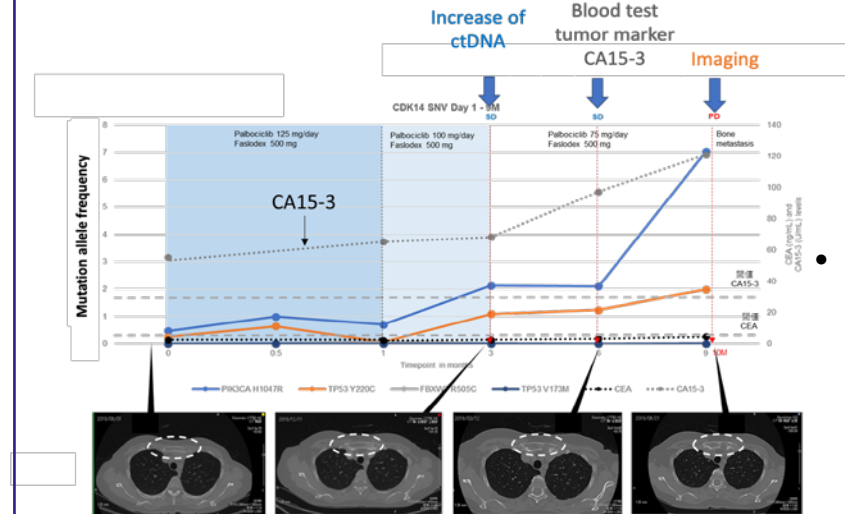
- ESR1変異を有する患者はCDK4/6阻害剤に反応しない可能性があるため、CDK4/6阻害剤の予後バイオマーカーとして重要であると考えられる。

Liquid biopsy reflects treatment responsiveness



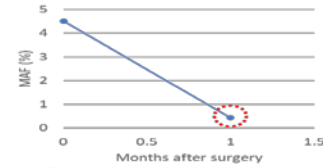
Partial response: Reduced -> undetectable
 Progression disease: detect before clinical recurrence

Liquid biopsy profiling complement to radiological imaging

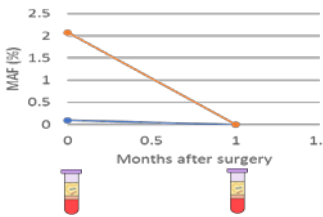


- 骨転移やRECISTサイズ以下の画像解析での診断が困難な症例では、ctDNAでのモニタリング解析は腫瘍の現況を評価する上で画像解析を補完できる場合がある。

Objectives: Detection of MRD after curative intent surgery using liquid biopsy

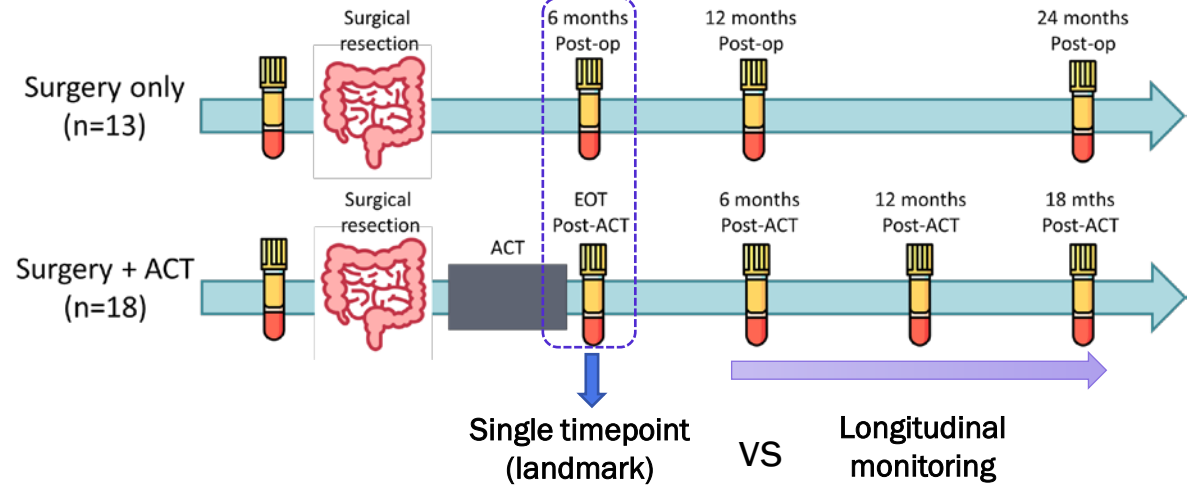


腫瘍細胞残存のあり

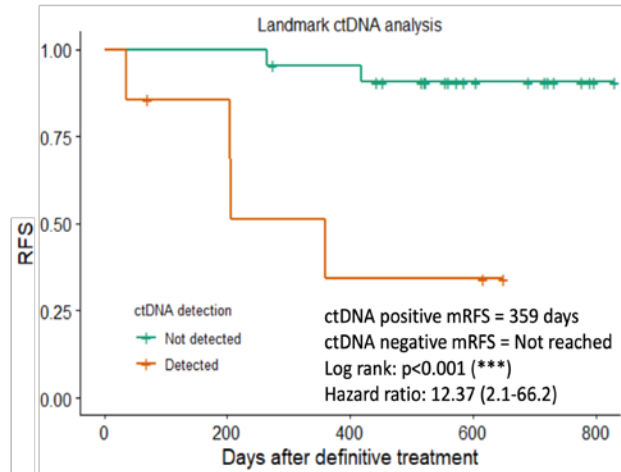
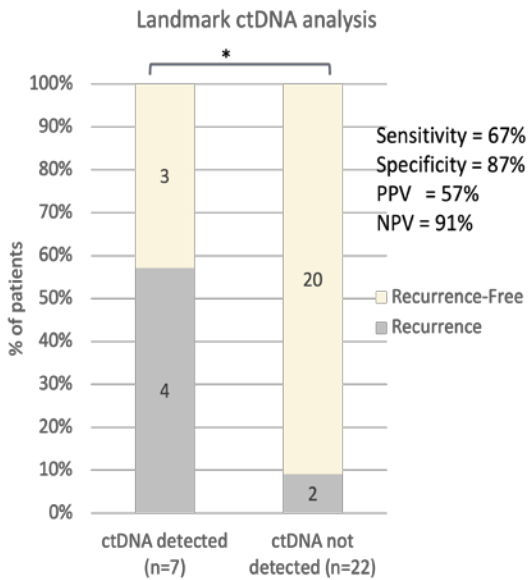


腫瘍細胞残存のなし

Colorectal cancer feasibility study: single time point (landmark) vs longitudinal monitoring for recurrence prediction

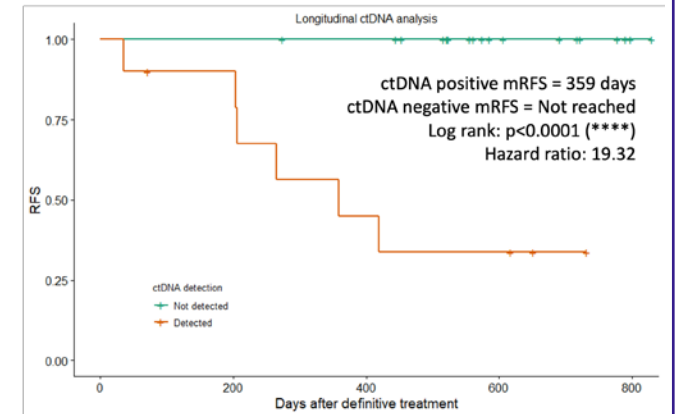
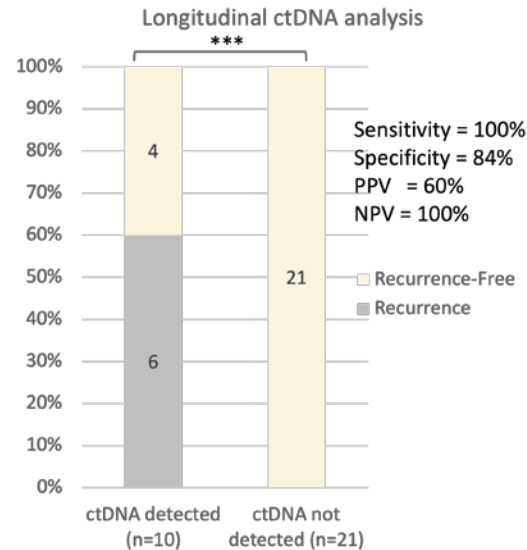


Landmark ctDNA analysis for recurrence risk assessment



* 2 patients removed from the analysis as no sample collected at the landmark timepoint

Longitudinal monitoring improved sensitivity in detecting recurrence



* Detection of ctDNA at any serial plasma samples until the development of clinical recurrence would be considered as ctDNA-positive.

Genexus NGS system & Oncomine Precision Assay:
 新型全自動シーケンサーによるビッグデータ解析



ターンアラウンドタイム

- ✓ 全自動化により僅か**1日**
 (検体採取 → レポート)
- ✓ 臨床医へ迅速に情報を提供

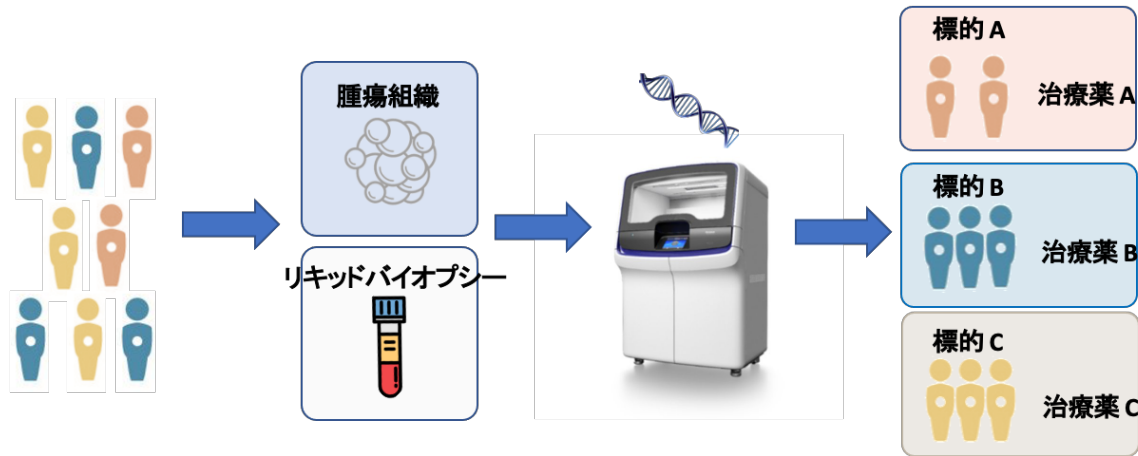
僅か1日のターンアラウンド時間 (測定開始からレポートまでに要する時間)

測定開始からレポートまでに要する時間	1週間	2週間	3週間	4週間	5週間	6週間	7週間	8週間
従来：組織検体を海外で解析	← 8週間 →							
従来：組織検体を国内で解析	← 4週間 →							
リキッドバイオプシー Genexus / OPA	← 1日間 →							

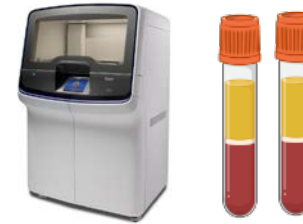
検査後直ちに投薬が可能

早期治療に貢献！

Objectives: Detection of actionable alterations for targeted therapy selection using liquid biopsy (when tumor biopsy is unavailable)

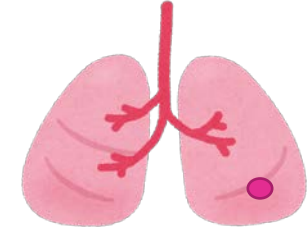


Feasibility study: liquid biopsy profiling of lung cancer using Genexus Integrative system



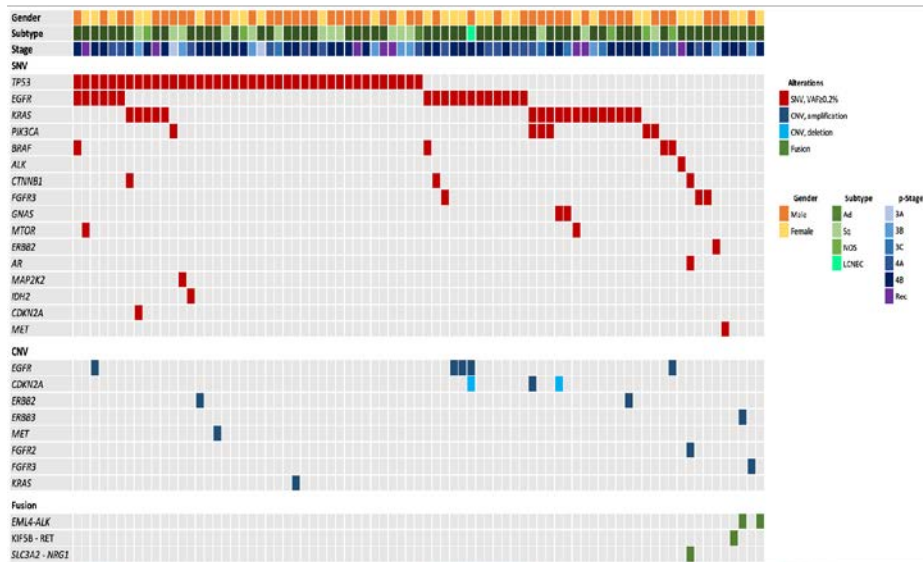
Oncomine Precision assay (55 cancer-focused panel) + Genexus Integrative system
Automated, TAT within a day

VS



SOC Clinical Diagnostic Test:
(1) EGFR mutation screening: **Cobas EGFR test**
(2) ALK fusion assessment with **ALK-IHC**
(3) **Oncomine Dx target test**
(9 major genes; EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, KRAS, ERBB2, NTRK and RET)

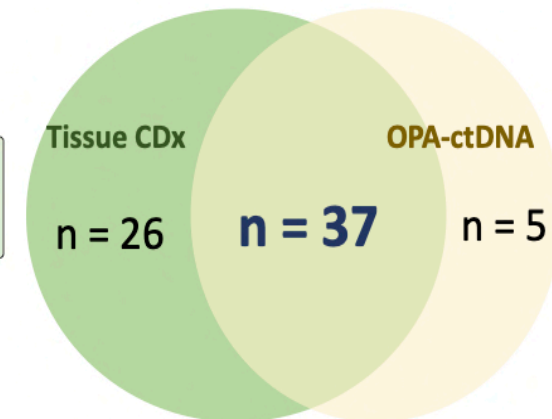
Alteration detection in 119 NSCLC patients



- Detection rate: 79/119 (66%) of NSCLC patients detected to carry at least one alteration.
- A total of 130 genomic alterations were detected (SNV: 111, CNV: 15, Fusion: 4)
- Actionable mutations (EGFR, fusions (ALK, RET), KRAS, BRAF, ERBB2, MET): 47/119, **39%** patients

59% (37/63) of genomic alterations detected from tumor tissues were concordantly detected from plasma ctDNA
17 EGFR, 14 KRAS, 2 BRAF, 1 ERBB2, 2 ALK fusion, 1 RET fusion.

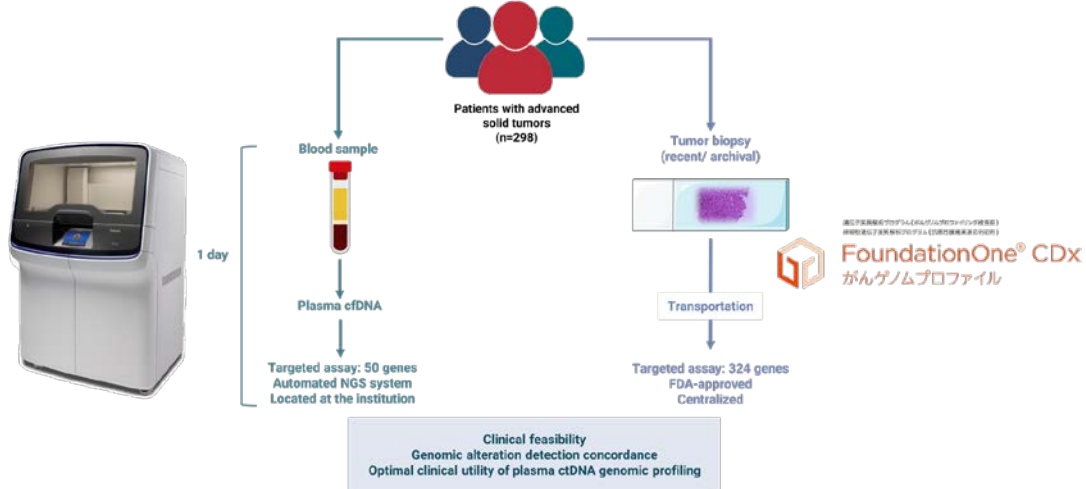
Tissue only
18 EGFR, 3 KRAS, 2 RET fusions, 2 ALK fusion, 1 ROS fusion.



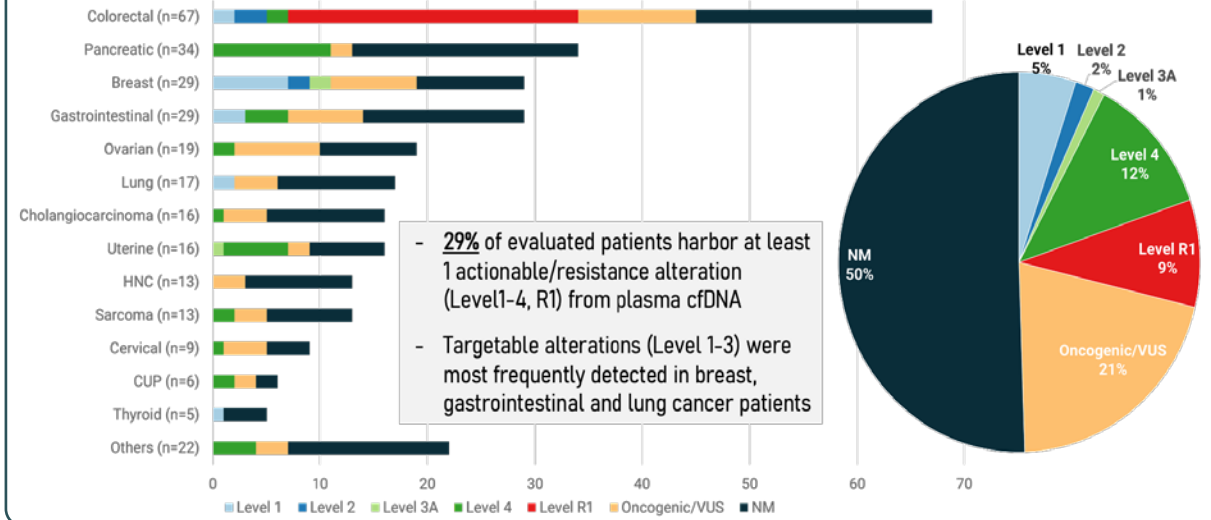
ctDNA only
3 KRAS, 1 EGFR, 1 MET
1. Clonal-hematopoiesis related mutations
2. Tumor heterogeneity

*EGFR*p.L858R, *KRAS*p.G12C and *MET*p.D1028N were on level 1 evidence based on OncoKB Therapeutic Level of Evidence V2.

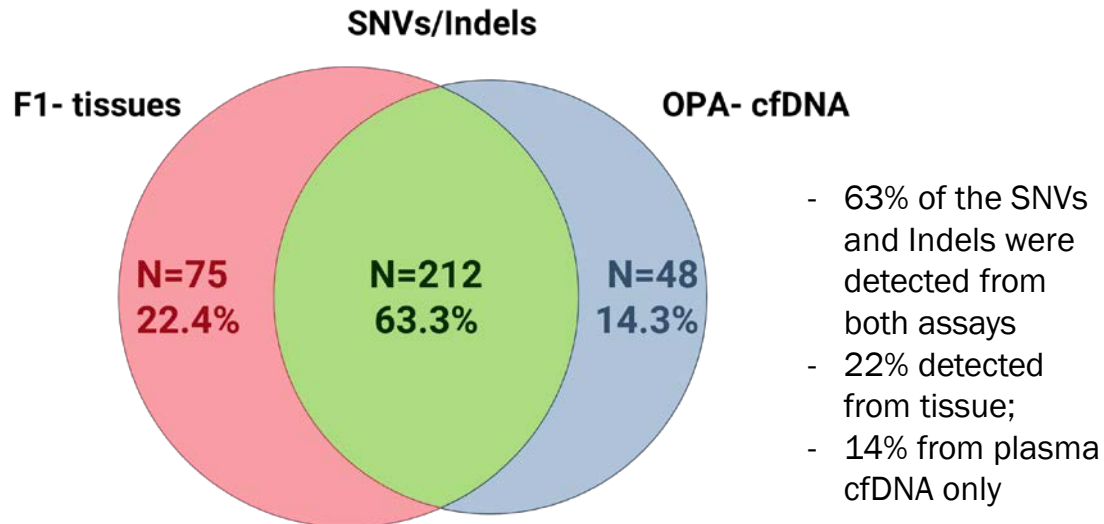
Objectives: Detection of actionable alterations for targeted therapy selection using liquid biopsy (when tumor biopsy is unavailable)



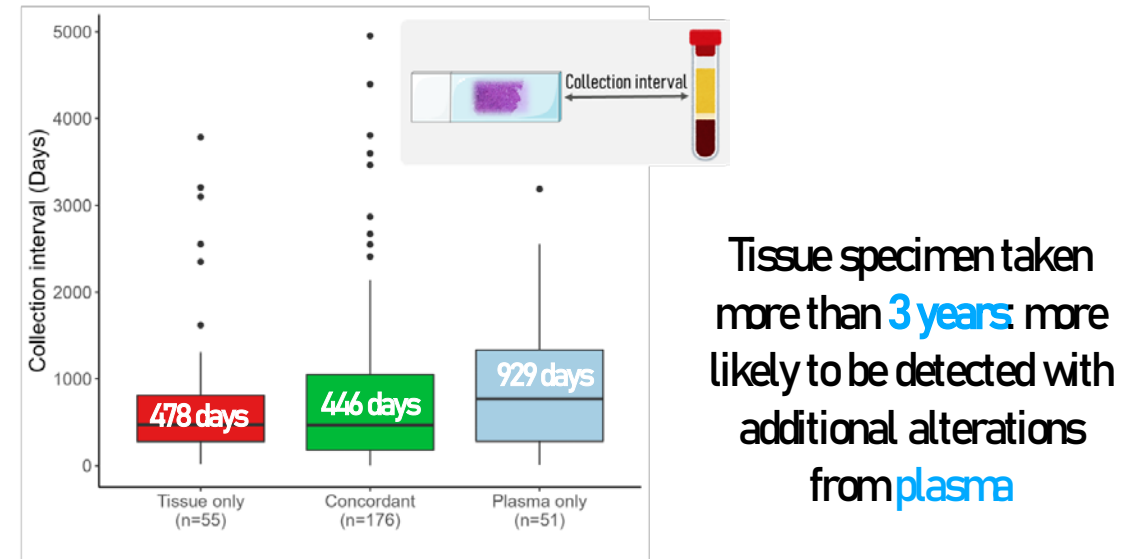
Detection of targetable biomarkers from cfDNA



Overall concordance between plasma cfDNA and tumor tissues



Sample collection interval between tumor tissue and plasma

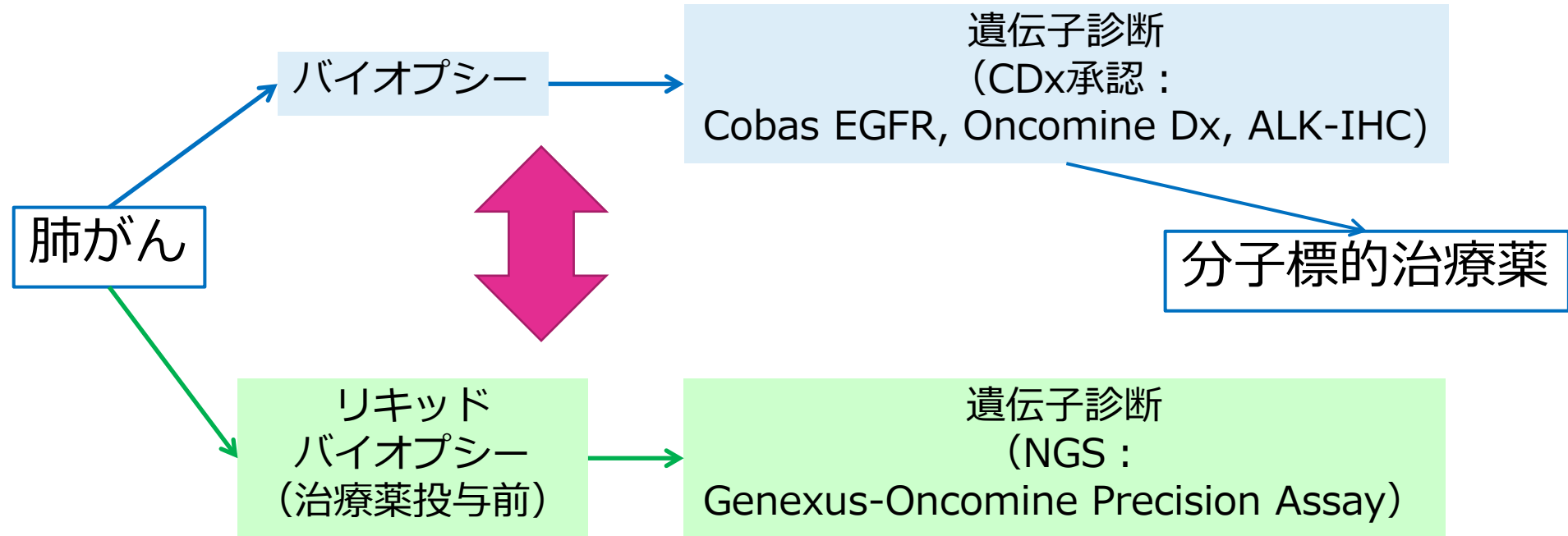


【目的】

進行期の非小細胞肺がんの診断・初回治療が予定される症例において血漿検体を用いたNGS解析により分子標的薬治療の導入根拠となるドライバー遺伝子を検出可能かについて検証する

【共同研究施設】

- ・ がん研究会有明病院
- ・ 仙台厚生病院
- ・ 東北大学病院
- ・ 北海道大学病院
- ・ 金沢大学病院
- ・ 徳島大学病院



予定登録患者数
500-700



BML

Pre-analytical SOPを提供

- ・ 各参加機関での血漿分離条件の均一化
- ・ 検体保管と中央ラボまでの搬送条件(温度/時間)の均一化

cfDNA/cfRNA検査のためのサンプル調製手順

《1検体あたりに必要な資材》



- ① EDTA採血管：2本
ベソジェクトII 真空採血管 EDTA-2Na 7mL (テルモ cat No.VP-NA070K)
- ② 遠沈管 (15mL)：2本
Eppendorf Conical Tubes 15mL (エッペンドルフ cat No.0030122151)
または
遠沈管スーパーシールキャップ 15mL (イナ・オプティカ cat No.3131-345)

《サンプル調製手順》

1) 採血

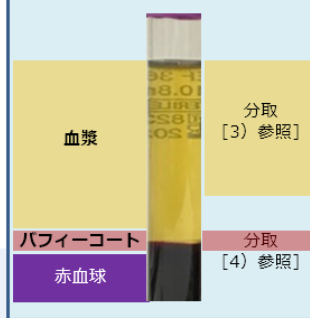
指定のEDTA採血管を2本使用します。
採血後、直ちに4-5回
ゆっくりと十分に転倒混和します。

2) 遠心分離操作

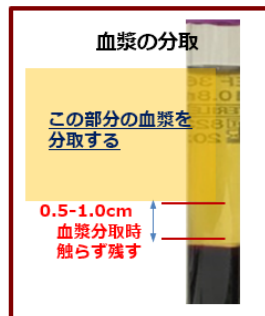
2)-1
採血・転倒混和後、室温30分以内
若しくは冷蔵2時間以内に
以下の条件にて遠心分離操作
を行い血漿を分離します。
2000xg, 10分間, 4℃

2)-2
分離した界面を揺らさないように慎重に
遠心分離器から採血管を取出してください。
遠心後、
全血は血漿・バフィーコート・赤血球の
各層に分離されています。[参考1参照]

【参考1】遠心分離後の採血管



3) 血漿の分取

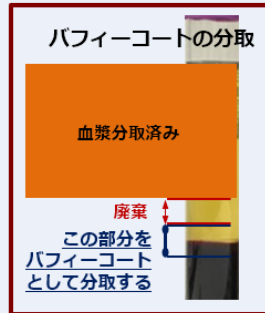


3) -1
ピペットや滅菌スポイトを用いて血漿を分取します。この際、バフィーコートの混入を避けるため、血漿の分取には細心の注意を払い、バフィーコートとの境界から0.5-1.0cmまでを限度として分取を行ってください。[参考2参照]

3) -2
分取した血漿は指定の遠沈管に移してください。この際、同じ検体は1本にまとめてください。



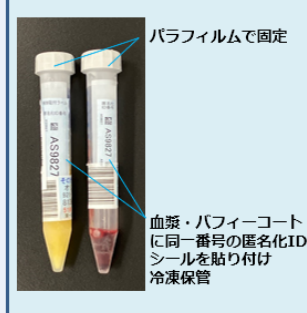
4) バフィーコートの分取



4) -1
ピペットや滅菌スポイトを用いてバフィーコートを吸い込まない程度に余剰の血漿を分取し
廃棄します。

4) -2
約0.5mLのバフィーコートを含む画分を分取し、
指定の遠沈管に移してください。この際、同じ検
体は1本にまとめてください。

【参考3】検体の保管



5) サンプルの凍結

3)、4)で血漿および血球細胞を分取した遠沈管は、それぞれの蓋をパラフィルムで固定した後、
検体提出まで-80℃の保管庫にて凍結保存してください。[参考3参照]