

臨床検査からみた大腸癌診療における BRAF遺伝子検査

**BRAF gene testing for precision medicine of colorectal cancer:
From a viewpoint of clinical laboratory and clinical genetics**

まつ した かず ゆき
松 下 一 之
Kazuyuki MATSUSHITA

I. 大腸癌の診断・治療の現状

大腸癌は結腸（盲腸）から直腸・肛門管の下部消化管に発生する上皮性腫瘍である。肥満、運動不足などで結腸がんのリスクが高くなるといわれ、飲酒や喫煙、肉製品が大腸がんの高リスク要因とされている¹⁾。2016年のがん登録・統計（国立がん研究センター）によると、女性ではがん死亡率第1位、男性では第3位であり本邦にとっては重要な癌腫である。大腸癌は発生部位によって結腸癌と直腸癌に分けられる¹⁾。大腸癌では他の癌腫と同様に家族歴がリスク要因になる²⁾。大腸癌では発現メカニズムが遺伝子レベルで解析されており、保険収載された臨床検査も多い³⁾。臨床検査として行われる遺伝子関連検査に基づく、分子標的薬のコンパニオン診断として行われる検査が増加している。大腸癌は遺伝子関連検査による「個別化医療」が実臨床で行われており、正確な診断技術や解釈をわかりやすく伝えるために臨床検査の果たす役割は大きい。さらに医療法や臨床検査技師法の改正が平成30年12月1日に施行され遺伝子関連検査の品質保証が法律上も義務付けられるようになった⁴⁾。

本稿では、大腸癌におけるコンパニオン診断を概観し、特に *BRAF* 遺伝子検査の現状について中心にまとめた。加えて医療法や臨床検査技師法の改正を踏まえた本邦における病院、登録衛生検査所の遺伝子関連検査フローについての課題にも簡単に触れた。

II. 大腸癌診療における遺伝子 関連検査の現状

大腸癌のコンパニオン診断としては、MSI (microsatellite instability) 検査、*KRAS*/*NRAS* 遺伝子検査、*BRAF* 遺伝子検査が臨床重要である^{5,6)}。MSI (microsatellite instability) 検査は2015年のノーベル化学賞が授与された遺伝子における繰り返し配列の遺伝子修復を担う MMR (mismatch repair) タンパク質の異常により惹起される MSI (繰り返し配列の不安定性) を調べるものである (図1)⁷⁾。これらの遺伝子関連検査の意義についての詳細は他の解説書⁸⁾に譲るが、臨床検査の分野では、これらの遺伝子関連検査の組み合わせにより予後予測や分子標的薬の選択などのコンパニオン診断として保険収載されるなど新しい知見が集積されている⁹⁾。*KRAS*, *KRAS minor*, *NRAS*, *NRAS minor*, *PTEN*, *PIC3CA* などは癌細胞の増殖シグナル EGFR (epidermal growth factor receptor) のシグナル伝達経路上にある。*BRAF* は Ras-Raf-MAPK 経路を構成するセリンスレオニンキナーゼである。*BRAF* 遺伝子変異は大腸癌の5-10%に認められ、その90%以上が、codon 600のバリンからグルタミン酸への変異(V600E)である³⁾。一方、大腸癌、子宮癌などが高頻度で合併する常染色体優性遺伝病のリンチ症候群のスクリーニング検査として MSI 検査 (図1) が保険収載されている¹⁰⁾。千葉大学病院では、大腸癌診療において *BRAF* 遺伝子検査、MSI 検査、*KRAS*, *KRAS minor*, *NRAS*, *NRAS minor* 遺伝子検査、*MLH1* 遺伝子のプロモーターのメチル化を院内検査として行っている (図2)。

Mismatch repair

When DNA is copied during cell division, mismatching nucleotides are sometimes incorporated into the new strand. Out of a thousand such mistakes, mismatch repair fixes all but one.

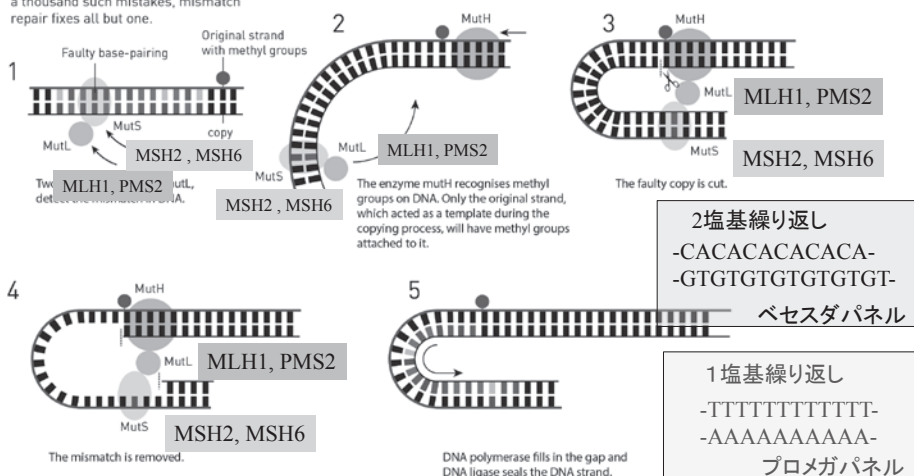


図1 MSI (microsatellite instability) 検査

ゲノム上の Microsatellite 部位における Mismatch repair (MMR) 機序と microsatellite instability 検査の原理。Mismatch repair (MMR) タンパク質の機能低下により、ゲノム上の Microsatellite 部位 (1 塩基や 2 塩基の繰り返し配列) に変化が起こる。この microsatellite instability を調べる検査が MSI 検査である。

2015 年ノーベル化学賞受賞講演より (ノーベル財団ホームページより)

[https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fig_ke_en_15_mismatchrepair.pdf]

Illustration: ©Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

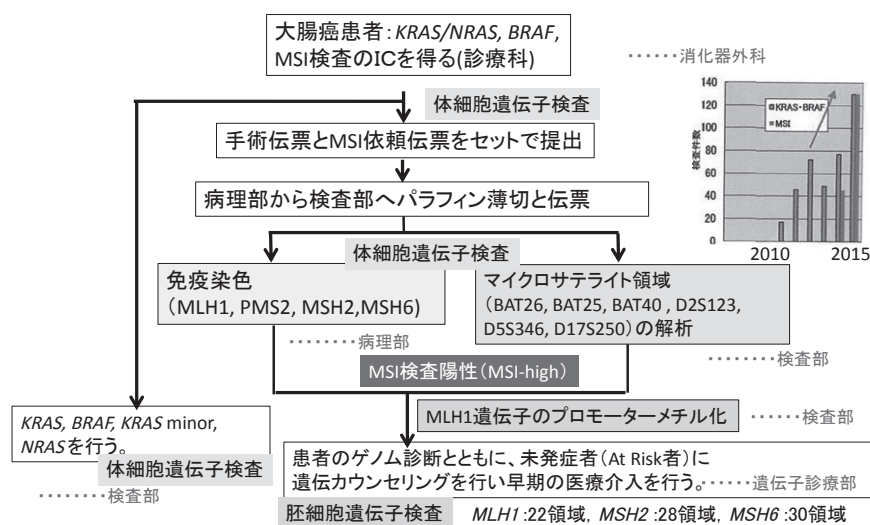


図2 大腸癌における MSI 検査と KRAS/NRAS/BRAF 遺伝子変異スクリーニング

千葉大学病院における大腸癌患者のコンパニオン診断のフロー (食道胃腸外科、検査部、病理部、遺伝子診療部で協力)。

MSI 検査は従来リンチ症候群のスクリーニングとしてのみ保険収載されていたが、わが国でも 2018 年 12 月 21 日にブンプロリズマブ (キートルーダ™) のコンパニオン診断として「がん化学療法後に増悪した進行・再発の高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-High) を有する固形癌」の新適応が追加さ

れた。これにより、MSI 検査が遺伝性疾患 (リンチ症候群) のスクリーニングとペンブロリズマブのコンパニオン診断の両方で保険適用となり、大腸癌診療のみならず、切除不能の再発進行の全ての固形癌における重要性が高まった。同時に癌治療の現場で遺伝性疾患が 2 次的所見として経験されることが想定

されるようになった。一方散発性 MSI-H 大腸癌においては約 40%と高率に *BRAF* 変異を認める³⁾。大腸癌診療における切除不能進行再発結腸・直腸癌では、*BRAF* 遺伝子変異陽性症例は一般に予後不良でありベバシズマブ + FOLFOXIRI の使用が考慮される³⁾。この際に留意することは、*BRAF* 変異有無の臨床的意義は MSI 検査の結果によって異なることである。抗 EGFR 抗体医薬であるセツキシマブを大腸癌患者に投与するに際しては、*KRAS* 遺伝子変異の検索がコンパニオン診断として必須の状況となっている¹⁰⁾。*BRAF* 変異を認める大腸癌ではほとんど全て *KRAS* 変異を認めず、相互排他に関係にある。

Ⅲ. 大腸癌診療における *BRAF* 遺伝子検査の意義

大腸癌における *BRAF* 遺伝子について最近の知見をまとめると次のようになる。

Ⅲ-A リンチ症候群の除外診断

大腸癌全体の 5%前後が遺伝性（家族性）と考えられている。常染色体優性遺伝の家族性大腸腺腫症（*APC* 遺伝子が原因遺伝子）とリンチ症候群（遺伝性非ポリポーシス性大腸がん）は原因遺伝子（主に *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* の 4 種類）が同定されている²⁾。家族性大腸腺腫症は *APC* 遺伝子変異により大腸全体に 100 個以上のポリープが発生し 20

～30 歳代で高率にがん化する。家族性大腸腺腫症のうち、軽症型（attenuated type）ではリンチ症候群と鑑別が難しい場合もある。一方リンチ症候群では大腸癌、胃癌、子宮体癌（内膜癌）、腎盂癌、小腸がんなどのリンチ関連癌が発生する²⁾。MSI 検査には MMR 免疫染色（*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*）とマイクロサテライト領域の multiplex PCR 法解析の 2 つの方法が用いられている^{9, 10)}。さらに *MLH1* 遺伝子のプロモーターのメチル化（CIMP）^{11, 12)} や *BRAF* 遺伝子変異陽性はリンチ症候群の除外診断に用いられている（リンチ症候群では通常 *BRAF* 遺伝子変異は陰性である。ただし例外として *PMS2* 変異の一部では *BRAF* 変異が陽性となる）。*MLH1* 遺伝子のプロモーターのメチル化により MSI-high となる大腸癌（CIMP）は *BRAF* 遺伝子変異が陽性であっても予後は比較的良好である（図 3, 4）。

Ⅲ-B 治療反応性の予測（コンパニオン診断）

通常の孤発大腸癌では *BRAF* 変異例は野生型に比べて極めて予後不良である³⁾。一方 CIMP（CpG island methylator phenotype）^{11, 12)} と分類される MSI 陽性の大腸癌では、*BRAF* 変異陽性例は逆に予後良好（予後不良ではない）なため注意が必要である。CIMP とは、体細胞における *MLH1* 遺伝子のメチル化により *MLH1* タンパク質の発現低下から MSI-high となった病態である（図 3, 4, 5）。CIMP は MSI-high だがリンチ症候群の関連癌（大腸癌、子宮がん、

症例：85歳、女性、大腸癌（回盲部）。

Neuroendocrine carcinoma, *KRAS*; wild, *BRAF* V600E

Chromogranin A陽性細胞少数、Signet-ring cell 様細胞5%

pT4a(SE), N0, ly2, CEA高値、high risk Stage II

がん細胞（体細胞）変異の検索

① 免疫組織学的検討

MLH1 発現低下
PMS2 発現低下
MLH2 発現陽性
MSH6 発現陽性

② MSI検査 (Multiplex PCR→Fragment解析)

BAT25	陽性
BAT26	陽性
BAT40	陽性
D2S123	陰性
D5S346	陰性
D17S250	陰性

MSI-high症例

③ *MLH1* promoter methylation (-238~-158) メチル化陽性。

白血球ゲノムDNAおよび非癌部組織はメチル化陰性。

図3 リンチ症候群との鑑別が必要な MSI-high の大腸癌症例（CIMP）

MLH1 遺伝子のプロモーターのメチル化により *MLH1* の発現低下がみられた。そのため、MSI-high となったと考えられる。本症例は *BRAF* 遺伝子の V600E 変異が検出された。MSI-high で *BRAF* 遺伝子変異陽性ではリンチ症候群ではなく、CIMP (CpG island methylator phenotype) を考慮する。

尿路系の癌、脳腫瘍など) がみられないこと、家族歴や患者本人の発症年齢(高齢女性に多い) などからリンチ症候群とは区別される。*BRAF* 遺伝子変異を認めかつ MSI-high を示す CIMP 型大腸癌^{11, 12)} は、MSS/MSI-low の *BRAF* 変異型大腸癌は野生型と比較して、高齢女性に多くみられ、右側結腸原発、低分化型等の臨床病理学的特徴を持つことが知られている(図 3, 4, 5)²⁾。

EGFR を発現する切除不能再発進行大腸癌のうち、*KRAS* および *NRAS* 遺伝子変異が認められると抗 EGFR 抗体薬の効果が認められない。そのため *KRAS* および *NRAS* 遺伝子変異を調べて、セツキシ

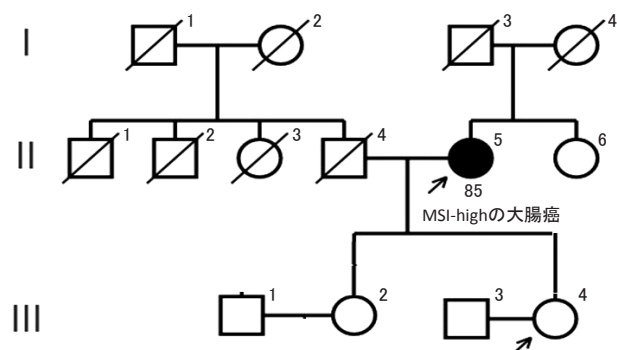


図 4 CIMP-H, MSH-H

図3症例の家系図。発端者以外にリンチ症候群の関連癌は見られない。

マブやバニツムマブの適応を判定する補助診断として用いられる。*BRAF* 変異(V600E)陽性の切除不能、再発の進行大腸癌は予後不良であり FOLFOXIRI (5FU/LV, オキワリプラチン、イリノテカン) + ベバシズマブの併用の有効性が認められている⁸⁾。

MSI-high の大腸癌は約半数は *MLH1* 遺伝子のプロモーターのメチル化が原因(CIMP)である(図 5)。リンチ症候群は *BRAF* 遺伝子変異が陰性であるがこのような CIMP 症例は通常 *BRAF* 遺伝子変異が陽性である。しかし *PMS2* 遺伝子変異陽性のリンチ症候群の一部では *BRAF* 変異が陽性となることが知られており注意が必要である。*BRAF* 遺伝子変異陽性で MSS/MSI-low の大腸癌の無再発生存期間は有意に短い、*BRAF* 変異陽性で MSI-high ではあれば予後良好であり臨床的に重要である(図 6)。

IV. *BRAF* 遺伝子の検査法

IV-A 保険収載された検査

PCR-rSSO 法を用いて D004-2「悪性腫瘍組織検査」として 1 悪性腫瘍遺伝子検査、ハ *KRAS* として遺伝子検査 2,100 点の保険点数が認められた。MEBGEN RASKET-B キットは癌組織から抽出したゲノム DNA 中の *BRAF* 遺伝子変異 (V600E) の検出するもので

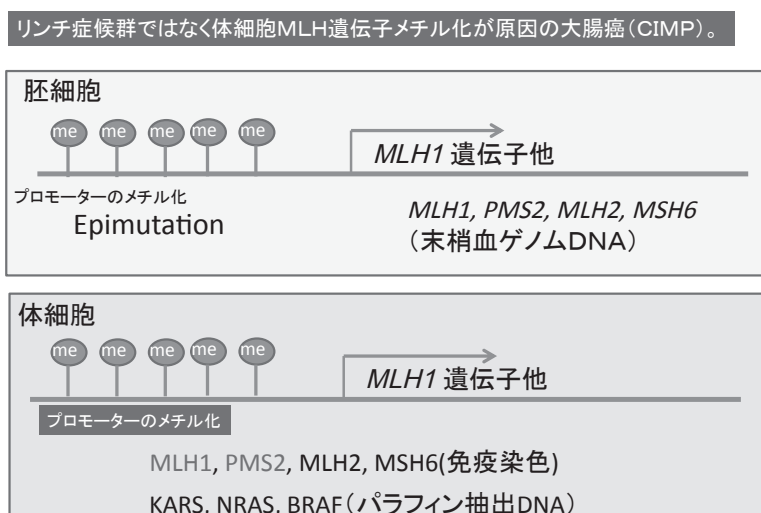


図 5 高齢女性、右側大腸癌、神経内分泌癌

MLH1 遺伝子のプロモーターのメチル化により *MLH1* の発現低下がみられた。大腸癌(体細胞)の *MLH1* 遺伝子のプロモーターのメチル化が認められた場合には CIMP の診断となる。一方、極めてまれに胚細胞系列遺伝子の *MLH1* 遺伝子のプロモーターのメチル化が減数分裂でもリセットされずに次世代に継承されることが報告されている。この場合には遺伝子のメチル化が次世代に継承されることから、Epimutationと呼ばれている。

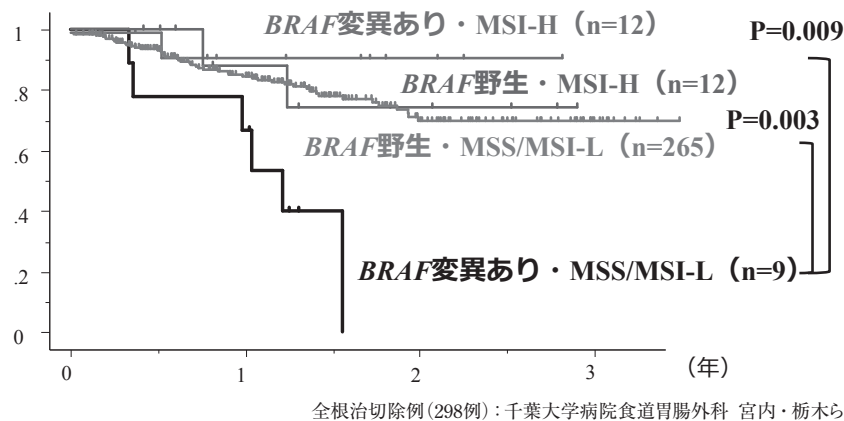


図6 BRAF 変異の有無と MSI status による比較
無再発生存期間 (recurrence free survival: RFS)

BRAF 変異陽性で MSS/MSI-low の大腸癌の無再発生存期間は有意に短い、
BRAF 変異陽性で MSI-high ではあれば予後良好である (千葉大学病院食道胃腸
外科症例: 宮内、栃木ら)。

あり、「切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌における治療選択の補助」と「大腸癌におけるリンチ症候群の診断の補助」の2つの別の目的で保険適用がある。

D004-2「1」の悪性腫瘍遺伝子検査の算定留意事項については、(1) 固形腫瘍の腫瘍細胞を検体とし、PCR法、SSCP法、RFLP法等を用いて、悪性腫瘍の詳細な診断及び治療法の選択を目的として悪性腫瘍患者本人に対して行った、以下の遺伝子検査について、患者1人につき1回に限り算定できる(ただし、肺癌におけるEGFR遺伝子検査については、再発や増悪により、2次的遺伝子変異等が疑われ、再度治療法を選択する必要がある場合にも算定できる。また、早期大腸癌におけるリンチ症候群の除外を目的として実施した場合にあっては、KRAS遺伝子検査又はRAS遺伝子検査を併せて算定できないこととし、マイクロサテライト不安定性検査を実施した年月日を、診療報酬明細書の摘要欄に記載する必要がある)。

V. BRAF 遺伝子検査精度 (内部精度管理、外部精度評価) の必要性

近年、NGS (next generation DNA sequencer : 次世代DNAシーケンサー) の性能の進歩とコストダウンは目覚ましい。そのため臨床検査 (LDT : laboratory developed test) としてNGSが使用されつつある。現在、LDTとしてNGSを実用化するための

「精度保証」の「具体的な方法・基本的考え方」の作成が臨床検査振興協議会などで進行している^{4, 6, 13)}。国内の衛生検査所 (検査受託企業) が受け入れ可能な精度保証がISO15189の技術委員会などで検討されている⁴⁾。例えば現在のクリニカルシーケンスでは10%を越える症例で、十分な解析データが得られない低品質の標本が問題となっており、全疾患で診断に耐えうる高品質な標本を収集・保存・運搬するための標準規格やそれを可能にする保冷库などの開発が望まれている。国内の大学病院 (臨床研究中核病院など) や大規模な衛生検査所においても遺伝子一括検査 (遺伝子パネル検査) を一般診療として行うための準備が進んでいる (図7)。

VI. がん遺伝子パネル検査における BRAF 遺伝子検査とその精度保証

2018年度にはがん遺伝子パネル検査が先進医療Bとしてがんゲノム医療中核病院を中心に開始され2019年以降にがん遺伝子パネル検査が保険償還される予定である。がん遺伝子パネル検査の精度保証 (標準核酸物質、標準凍結乾燥細胞などを用いた遺伝子パネルの標準化)、高難易度検査とそれを行う検査室の認定方法、実際の遺伝子パネルの検査方法の管理 (院内・外注検査を含む)、個人情報保護に関する倫理・法律の整備と遵守、JAB (日本適合性認定協会)、ISO15189、CLIA等の国際標準との整合などの議論が進んでいる^{4, 8)}。検査前試料 (FFPE,

リキッドバイオプシーなど)の精度保証は今後の国の統合データベース事業、人工知能研究などに発展することが期待される⁹⁾。

参考：オンコマイン Dx Target Test CDx システム
体細胞遺伝子変異解析システム（抗悪性腫瘍薬適応判定用）

平成 29 年 5 月 29 日（製造販売承認申請）

がん組織から抽出したゲノム DNA 中の *BRAF* 遺伝子変異 (V600E) の検出 (ダブルフェニブメシル酸塩及びトラメチニブジメチルスルホキシド付加物の併用投与の非小細胞肺癌患者への適応を判定するための補助)。

VII. 病院や登録衛生検査所 *BRAF* 遺伝子検査を含む遺伝子関連検査のフローと精度管理

冒頭にも述べたとおり、医療法や臨床検査技師法が改正 (平成 30 年 12 月 1 日に施行) され遺伝子関連検査の品質保証が法律上も義務付けられるようになった⁴⁾。しかし実際の病院や登録衛生検査所での *BRAF* 遺伝子検査を含む遺伝子関連検査のフローと精度管理についての具体的な運用は今後の課題である。がん遺伝子パネル検査をはじめ、高度な遺伝子

関連検査は外注化 (登録衛生検査所や病院組織内の検査部外の検査センターなど) が進んでいる。このような検査フローの場合に遺伝子関連検査の精度管理 (内部精度管理と外部精度評価) をどのように行ったらよいか、JAB (Japan Accreditation Board: 公益財団法人 日本適合性認定協会) がゲノム版を作成し、平成 31 年にはパイロット的な運用が行われる予定である (図 7)。*BRAF* 遺伝子検査はリンチ症候群の除外診断に用いられることは前述したが、遺伝子関連検査を行う上で遺伝性疾患や遺伝医療の考え方の基礎的な知識を持つことが不可欠となる^{13, 14)}。例えば、遺伝学的検査の検査精度は患者のみならず、その家族にも遺伝的に影響するため分析前、分析、分析後の全てのプロセスにおいて通常の検体検査以上の精度管理が求められる¹³⁾。特に、最近のがん医療におけるコンパニオン診断や、遺伝性腫瘍などの 2 次的所見への対応は臨床検査を担当する臨床検査技師にも遺伝医療の素養 (基本的な考え方の理解) が必要となっている^{15, 16)}。そのためには診療科医師、臨床検査医、遺伝子関連検査を臨床検査技師が遺伝医療の専門家 (臨床遺伝専門医や認定遺伝カウンセラー) との意思疎通ができるように検査精度の管理と同様に遺伝医療や遺伝情報の最新の取扱い方法に留意する必要がある¹⁶⁾。

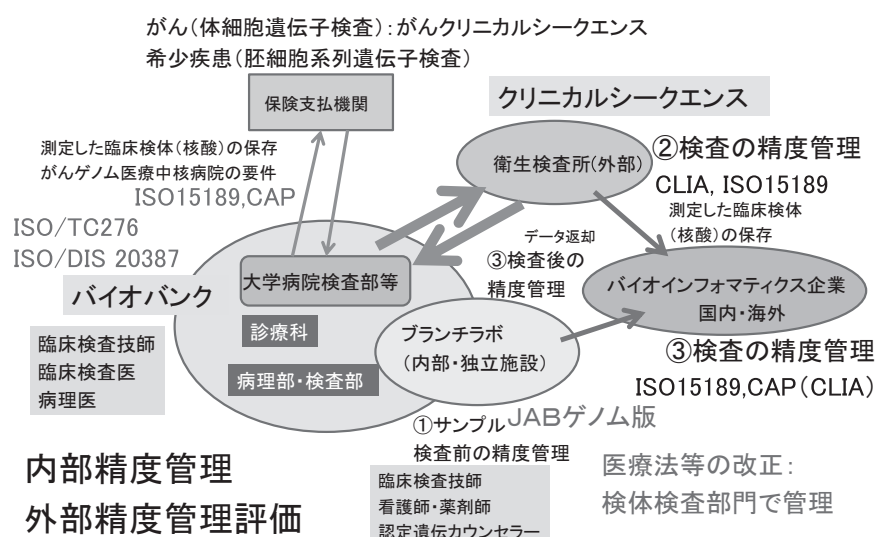


図 7 遺伝子関連検査の委託と検体検査部門の連携

医療法や臨床検査技師法が改正 (平成 30 年 12 月 1 日に施行) され遺伝子関連検査の品質保証が法律上も義務付けられるようになった。しかし実際の病院や登録衛生検査所 *BRAF* 遺伝子検査を含む遺伝子関連検査のフローと精度管理についての具体的な運用は今後の課題である。このような検査フローの場合に遺伝子関連検査の精度管理 (内部精度管理と外部精度評価) をどのように行ったらよいか、JAB (Japan Accreditation Board: 公益財団法人 日本適合性認定協会) がゲノム版を作成し、令和元年度にはパイロット的な運用が行われる予定である。

謝 辞

本稿を書くにあたり、千葉大学病院の検査部遺伝子検査室、遺伝子診療部のスタッフに日頃から多くの協力を得ている。また大腸癌の遺伝子関連検査と臨床的な解析においては、同病院食道胃腸外科の宮内英聡診療教授、栃木 透医師、松原久裕教授との共同研究である。この場をお借りして感謝を申し上げる。

利益相反

本稿を書くにあたり、利益相反関係にある企業等はありません。

文 献

- 1) 大腸癌治療ガイドライン。大腸癌研究会編。金原出版。2016年版。
- 2) 遺伝性大腸癌診療ガイドライン。大腸癌研究会編。金原出版。2016年版。
- 3) 大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイダンス。日本臨床腫瘍学会編。金原出版。第3版2016年11月。
- 4) 検体検査の品質・精度確保の基準の手引き(2018年12月施行の改正医療法等対応)。Medical technology臨時増刊2018 vol.46, No13. 医歯薬出版株式会社。
- 5) Stintzing S. Recent advances in understanding colorectal cancer. F1000Res. 2018 Sep 24;7. pii: F1000 Faculty Rev-1528. doi: 10.12688/f1000research.14604.1. eCollection 2018.
- 6) Bond CE, Whitehall VLJ. How the *BRAF* V600E Mutation Defines a Distinct Subgroup of Colorectal Cancer: Molecular and Clinical Implications. Gastroenterol Res Pract. 2018 Nov 26; 2018: 9250757. doi: 10.1155/2018/9250757. eCollection 2018. Review.
- 7) 2015年ノーベル化学賞受賞(Mismatch repair)。2015年ノーベル化学賞受賞講演より(ノーベル財団ホームページより)。
[https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fig_ke_en_15_mismatchrepair.pdf].
- 8) 谷口浩也、山崎健太郎。大腸癌のバイオマーカー。切除不能進行大腸癌の化学療法におけるバイオマーカー。医学出版社。
- 9) 松下一之, 他: リンチ症候群とマイクロサテライト不安定(microsatellite instability : MSI)検査ー コンパニオン診断としての最近の動向ー。日臨検自動化会誌. 2017; 42(suppl-2): 183-90.
- 10) 松下一之, 他: コンパニオン診断の基礎知識ー概念, 関連するガイドライン, 最近の情勢など. 臨検. 2014; 58(8): 889-901.
- 11) Advani SM, Advani P, DeSantis SM, Brown D, VonVille HM, Lam M, Loree JM, Mehrvarz Sarshekeh A, Bressler J, Lopez DS, Daniel CR, Swartz MD, Kopetz S. Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. Transl Oncol. 2018 Oct; 11(5): 1188-1201. doi: 10.1016/j.tranon.2018.07.008. Epub 2018 Jul 30.
- 12) Kim JH, Bae JM, Cho NY, Kang GH. Distinct features between MLH1-methylated and unmethylated colorectal carcinomas with the CpG island methylator phenotype: implications in the serrated neoplasia pathway. Oncotarget. 2016 Mar 22; 7(12): 14095-111. doi: 10.18632/oncotarget.7374.
- 13) 臨床検査標準協議会医療施策委員会 ゲノム検査に関する小委員会編。「がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方」(2018年10月)
[<https://www.jslm.org/committees/gene/20181030panel.pdf>].
- 14) 松下一之。「In silico創薬におけるスクリーニングの高速化・高精度化技術」In silico創薬におけるシステム・データベース構築とビッグデータ活用の実例ー遺伝子関連検査と医療ビッグデータ構築の現状と今後。技術情報協会・発行書籍(2018.1.31発刊)407-416.
- 15) Kalia SS, et al: Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med. 2017; 19(2): 249-55.
- 16) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構: ゲノム医療における情報伝達プロセスに関する提言ーがん遺伝子パネル検査と生殖細胞系列全ゲノム/全エクソーム解析について【初版】(2018年3月21日)[AMEDゲノム創薬基盤推進研究事業. ゲノム情報研究の医療への実利用を促進する研究(ゲノム創薬研究の推進に係る課題解決に関する研究)A-②:ゲノム情報患者還元課題「医療現場でのゲノム情報の適切な開示のための体制整備に関する研究」]. 2018.
[<https://www.amed.go.jp/content/000031253.pdf>]