

肺がん分子診断の最前線

Recent advances in the molecular diagnosis of lung cancer

わた なべ こう すけ
渡 邊 広 祐
Kousuke WATANABE

<キーワード>

原発性肺がん、ドライバー遺伝子変異、コンパニオン診断、がん遺伝子パネル検査

<Key words>

lung cancer, driver mutation, companion diagnostics, cancer multi-gene panel testing

はじめに

非小細胞肺がんの治療では、2004年にEGFR遺伝子変異が、2007年にALK融合遺伝子が発見され、その後も発がんの直接的な原因となる遺伝子変異

(ドライバー変異)が数多く同定されてきた。ドライバー変異のうち一部のがん遺伝子の活性型変異は、がん細胞の生存にとって必須であり、阻害薬を用いることでがん細胞にアポトーシスを誘導することが可能である。このように、がん細胞の生存が特定の遺伝子の活性化に依存している状態は oncogene addiction と呼ばれ、治療上で極めて重要である。

非小細胞肺がんでは、チロシンキナーゼ (EGFR、ALK、ROS1、MET、RET) やセリンスレオニンキナーゼ (BRAF) を標的とした分子標的薬が保険適応となっており、これらの遺伝子異常を有する IV 期非小細胞肺がんでは、一次治療で分子標的薬を使用することが、診療ガイドラインで推奨されている¹⁾。また、長年阻害薬の開発が困難とされてきた KRAS 遺伝子においても KRAS G12C 変異に対するソトラシブが承認された (図 1)。

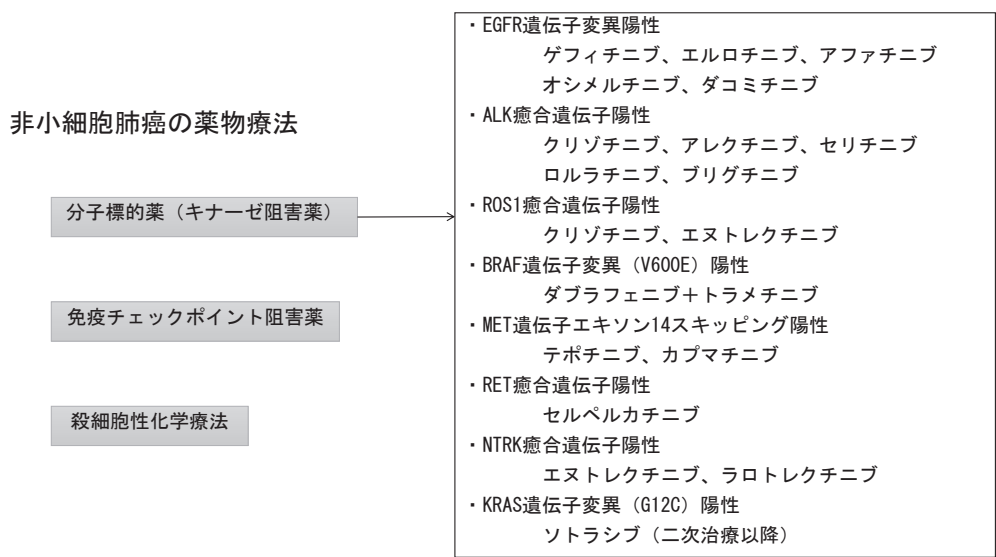


図 1 IV期非小細胞肺がんの分子標的薬

このように、非小細胞肺がんの分子標的薬を選択する上では分子診断が必須であり、分子標的薬に対応する多くのコンパニオン診断薬が承認されている(表1)。従来は、一つの遺伝子に対応して一つの検査を行うことが一般的であったが、解析対象遺伝子の増加に伴い、複数の遺伝子をまとめて解析するマルチコンパニオン診断検査の使用が増えてきている。また、標準治療終了後もしくは終了見込みを条件に、包括的がんゲノムプロファイリング検査として、がん遺伝子パネル検査を保険診療で行うことも可能となっている。

このように肺がんでは多くの遺伝子検査が承認されているが、測定原理によって検査の特性は大きく異なる。必要とされる腫瘍細胞の量や、腫瘍細胞含有率、核酸(DNA、RNA)の量や質が異なっており、適切な結果を得るためには、特性を十分理解する必要がある。本稿では、肺がんでも最も頻度の高いEGFR遺伝子変異検査を例に、測定原理による検査の特徴について考察する²⁾。また、多数の遺伝子をまとめて解析する検査として、AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子PCRパネル、オンコマイン™ Dx Target Test マルチCDx システム、包括的がんゲノムプロファイリング検査を解説する。

I. EGFR遺伝子検査

1. 肺がん組織を用いたEGFR検査

2004年にEGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺がんでは、EGFR阻害薬ゲフィチニブが著効すること

が発見された。以後、EGFR阻害薬の適応判定のために、EGFR遺伝子検査が多く開発されてきた。最も基本的な検査方法としては、肺がん組織からDNAを抽出して、Sanger法で塩基配列を決定する方法があり、新規の遺伝子変異を検出することも可能であるが、DNAの中に含まれる変異アレル頻度が低い場合には検出出来ず(感度が悪い)、現在、臨床検査としては用いられていない。

EGFR遺伝子変異検査としては、PCRを用いて高感度に特定の変異を増幅・検出する検査法が多く開発された。がん組織の検体には、がん細胞以外にも正常細胞が含まれており、腫瘍細胞含有率(全有核細胞に占める腫瘍細胞の割合)が低い場合には、DNAの中で変異アレルの頻度が低下する。PCRを用いた検査は変異アレルのみを効率よく増幅・検出することが出来るようにデザインされており、検査法によっても異なるが、概ね1~5%以上の変異アレルを検出可能である。

一方、近年NGSを利用した検査も広く臨床応用されている。腫瘍細胞含有率が低い検体でNGSを用いて変異アレルを検出しようとする場合、変異アレル頻度が低くなりシーケンスエラーと区別することが困難となるため(図2)、PCRよりも検出感度が低くなってしまいう可能性に注意が必要である。このため、がん組織のDNAを用いたNGS検査では、一般的に腫瘍細胞含有率が20-30%以上あることが必要である。検査に必要な腫瘍細胞含有率は添付文書に記載されており、例えばオンコマインDx Target Test マルチCDx システムでは30%以上が必要である。このように、がんの遺伝子検査では、必要とさ

表1 肺がんにおけるコンパニオン診断薬

遺伝子	コンパニオン診断薬	測定原理
EGFR	コバスEGFR変異検出キットv2.0(組織、血漿)	qPCR
	therascreenEGFR変異検出キットRGQ	qPCR
	EGFRリキッド遺伝子解析ソフトウェア(組織、血漿)	NGS
ALK	ヒストファイブALKiAEPキット	IHC
	ベントナOptiViewALK(D5F3)	IHC
	VysisALKBreakApartFISHプローブキット	FISH
ROS1	OncoGuideAmoyDxROS1融合遺伝子検出キット	RT-PCR
MET	ArcherMETコンパニオン診断システム(組織、血漿)	NGS
KRAS	therascreenKRAS変異検出キットRGQ	qPCR
5遺伝子(EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET)	AmoyDx肺癌マルチ遺伝子PCRパネル	qPCR
5遺伝子(EGFR, ALK, ROS1, BRAF, RET)	オンコマインDx Target Test マルチCDx システム	NGS
324遺伝子のうち一部がコンパニオン機能あり*	FoundationOne®CDxがんゲノムプロファイル	NGS
	FoundationOne®LiquidCDxがんゲノムプロファイル	NGS

*検査費用が高額でコンパニオン診断としての算定では医療機関に赤字が生じるため、初回治療前の実施は極めて困難。



図2 腫瘍組織を用いたNGS検査における腫瘍細胞含有率

れる腫瘍細胞の量や、腫瘍細胞含有率を意識することが重要であり、病理部門との連携が重要となる。

2. 血漿を用いた EGFR 検査

循環血液中の cell free DNA (cfDNA) には、腫瘍細胞由来の DNA が含まれており ctDNA (circulating tumor DNA) と呼ばれる。cfDNA からがん細胞由来の遺伝子変異を検出する検査はリキッドバイシーと呼ばれ、コンパニオン診断や、がん遺伝子パネル検査に広く用いられている。通常は血清ではなく血漿が検体として用いられるが、これは血清では白血球由来の DNA が増加しており、cfDNA の中に占める ctDNA の割合が低下するためである。

cfDNA からの変異検出には PCR や NGS が用いられ、PCR を用いた EGFR 検査の例としては、コバス EGFR 変異検出キット v2.0 が挙げられる。血漿検査のメリットは低侵襲であること、生検部位のみならず腫瘍の全体を反映した情報が得られることにあるが、血漿中に ctDNA が少ない場合には目的の変異が偽陰性となる可能性が少なからずあるというデメリットに注意が必要である。

II. AmoyDx肺癌マルチ遺伝子PCRパネル

肺がん組織から抽出した DNA の遺伝子変異、並びに RNA の融合遺伝子および MET 遺伝子エクソン 14 スキッピングを検出することが出来る。測定原理は PCR で解析対象は 11 遺伝子 (EGFR、ALK、ROS1、KRAS、BRAF、ERBB2、RET、MET、NTRK1、

NTRK2、NTRK3) で、非小細胞肺がんのドライバー変異を網羅的に解析可能である。11 遺伝子のうち薬事承認を受けているのは 5 遺伝子 (EGFR、ALK、ROS1、BRAF、MET) のみであり、その他の遺伝子について検査の妥当性が確認されていないため、たとえ病的バリエーションが検出されたとしても、薬剤の投与を行うことは出来ないことに注意する。

非小細胞肺がんの分子診断では、従来 EGFR、ALK など、単一遺伝子の検査を複数行うことが一般的で、変異の頻度が低い遺伝子については検査が施行出来ないケースもあったものと考えられる。AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネルのようなマルチコンパニオン診断薬が保険適応となることで、初回診断時に網羅的な分子診断が可能となり、頻度の低いドライバー変異を有する患者さんに対しても、適切な分子標的薬を投与できる可能性が高まるものと期待される。

III. オンコマイン™ Dx Target Test マルチCDxシステム

NGS を用いて、がん関連遺伝子が位置する標的領域の配列を解析する方法は遺伝子パネル検査 (ターゲットシーケンス) と呼ばれる。ゲノム DNA から標的領域を濃縮する方法として、PCR を用いるアンプリコンシーケンス法と、キャプチャープローブを用いるキャプチャーシーケンス法が挙げられる。本検査は、肺がん組織由来の DNA・RNA を材料として、アンプリコンシーケンスを用いて、

遺伝子変異や融合遺伝子の有無を判定する検査である。解析対象は46遺伝子であるが、薬事承認を受けているのは5遺伝子（EGFR、ALK、ROS1、BRAF、RET）である。5遺伝子以外において、治療標的となるドライバー変異が同定されたとしても治療薬を投与することは出来ず、薬剤を投与するためには、別のコンパニオン診断、もしくは包括的がんゲノムプロファイリング検査が必要である。実際に、MET遺伝子エクソン14スキッピングに関して、本検査とコンパニオン診断薬（ArcherMET）とを比較した研究では30%の擬陽性が報告されており³⁾、5遺伝子以外については検査の妥当性が担保されていないことを認識する必要がある。

AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子PCRパネルとの比較では、薬事承認外の遺伝子を含めると、より多くの遺伝子の情報を得られることがメリットだが、デメリットはTurn Around Time (TAT) が長いことである。腫瘍の進行が速く治療を急ぐ場合はTATが短い検査を優先するなど、臨床背景を踏まえて検査を選択する必要がある。

IV. 包括的がんゲノムプロファイリング検査

標準治療終了後もしくは終了見込みを条件に、包括的がんゲノムプロファイリング検査を保険診療で行うことが可能である。現在、組織を用いた検査として、OncoGuide™ NCC オンコパネルシステムとFoundationOne® CDx がんゲノムプロファイルが、血漿を用いた検査としてFoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイルが行われており、いずれもキャプチャーシークエンス法による遺伝子パネル検査である。包括的がんゲノムプロファイリング検査は基準を満たした施設（がんゲノム医療中核拠点病院・拠点病院・連携病院）のみで行うことが可能であり、結果返却の前に専門家によるエキスパートパネルが必要である。

OncoGuide™ NCC オンコパネルシステムは124遺伝子を搭載しており、正常検体（末梢血）と悪性腫瘍検体の両方を用いるマッチドペアの検査である。一方、FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル、FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイルは324遺伝子を搭載しているが、悪性腫瘍検体のみ、もしくは血漿を用いており、体細胞変異

と生殖細胞系列変異を区別することが出来ない。

包括的がんゲノムプロファイリング検査には、分子標的薬が承認されている遺伝子に限らず、がん遺伝子やがん抑制遺伝子が多数搭載されている。また、遺伝子変異や融合遺伝子、構造異常に加えて、Tumor Mutation Burden (TMB) と Microsatellite Instability (MSI) の判定が可能であり、免疫チェックポイントの奏功予測マーカーとして有用である。

FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル、FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイルは、一部の遺伝子においてコンパニオン診断機能を有している。しかしながら、検査費用が高額でコンパニオン診断としての算定では医療機関に赤字が生じるため、コンパニオン診断としてこれらの検査を行うことは事実上困難である。一方、包括的がんゲノムプロファイリング検査として、OncoGuide™ NCC オンコパネルシステム、FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル、FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイルを行い、当該がん種で国内承認薬が存在する遺伝子変異が検出された場合、エキスパートパネルでの推奨があれば、改めてコンパニオン診断を行うことなく当該承認薬を投与して差し支えない、との事務連絡が厚生労働省より出されている。例えば、非小細胞肺癌において、OncoGuide™ NCC オンコパネルシステムでMET遺伝子エクソン14スキッピングが検出された場合は、エキスパートパネルでの議論を経たうえで、コンパニオン診断を行うことなく承認薬（カブマチニブもしくはテポチニブ）の投与が可能である。

非小細胞肺癌では、初回診断時にEGFRやALKなど多くの遺伝子についてのコンパニオン診断が行われていることが多いが、標準治療終了後に包括的がんゲノムプロファイリング検査を行って、これまで診断されていなかったドライバー変異が明らかになる可能性があるし、新たな治療標的の同定に伴い臨床試験に参加できる可能性もある。例えば、EGFR阻害薬では分子標的薬投与後の耐性化の分子メカニズムが数多く明らかになっており、耐性化した症例を対象に新規薬剤の臨床試験が行われている。EGFR阻害薬で耐性化した後に本検査で耐性機序が明らかになれば、こうした臨床試験に参加できる可能性がある。なお、包括的がんゲノムプロファイリング検査で得られたゲノム情報や臨床情報は、

国立がん研究センターのがんゲノム情報管理センターに集約されており、研究開発への利活用も期待されている。

おわりに

非小細胞肺がんの薬物療法では、初回診断時に分子診断がルーチン検査として広く行われている。従来はEGFR、ALKなど、単一遺伝子の検査を複数項目提出することが一般的であったが、マルチコンパニオン診断検査の導入により、より効率的に網羅的な分子診断が可能となり、頻度の低いドライバー変異を有する患者さんに対しても適切な分子標的薬を投与できるようになることが期待される。

また、標準治療終了後もしくは終了見込みを条件に行われる包括的がんゲノムプロファイリング検査では、可能性は高くないものの、これまで診断され

ていなかったドライバー変異が同定されて承認薬が投与可能となったり、新規薬剤の臨床試験に結び付けられたりする可能性があり、さらにはゲノム情報の研究開発への利活用も期待される。

文 献

- 1) 日本肺癌学会 肺癌診療ガイドライン2021年版
<https://www.haigan.gr.jp/guideline/2021> (引用2022年5月21日)
- 2) 日本肺癌学会、肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き
https://www.haigan.gr.jp/modules/tebiki/index.php?content_id=5 (引用2022年5月21日)
- 3) Teishikata T, Shiraishi K, Shinno Y et al. An Alert to Possible False Positives With a Commercial Assay for MET Exon 14 Skipping. J Thorac Oncol. 2021 Dec; 16(12): 2133-2138.