

進化するがんゲノムプロファイリング検査: 血漿検査とRNAパネルの臨床応用

Evolving Comprehensive Genome Profiling Tests:
Clinical Application of Plasma Testing and RNA Panel

わた なべ こう すけ お だ かつ とし
渡 邊 広 祐: 織 田 克 利
Kousuke WATANABE Katsutoshi ODA

<キーワード>

がんゲノムプロファイリング検査、循環腫瘍 DNA、
RNA パネル

< Key words >

comprehensive genomic profiling, circulating
tumor DNA, RNA panel

はじめに

がんゲノムプロファイリング (comprehensive genomic profiling: CGP) 検査は、2019 年 6 月に保険適用となり、これまでの約 5 年間で 7 万件を超える検査が行われ、現在は毎月 2,000 件程度の検査が実施されている¹⁾。当初は、腫瘍組織検体由来の DNA を解析する検査のみであったが、血漿中の循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) を解析する検査として、2021 年に FoundationOne® Liquid CDx、2023 年に Guardant360® CDx が承認され、同年 8 月には RNA パネルも搭載した初めての CGP 検査として GenMineTOP が承認された。本稿では、血漿 CGP 検査と RNA パネルに注目し検査の特性を解説する。

I. CGP検査の全体像

2024 年 6 月現在、腫瘍組織を用いた CGP 検査が

3 種類 (うち正常血液検体とのペアで解析するもの 2 種類)、末梢血を用いた CGP 検査が 2 種類保険適用となっている。測定原理は何れもキャプチャーシーケンス法で、キャプチャープローブを用いて標的配列を選択し次世代シーケンサー (NGS) で配列決定しており、ホットスポットに限らないゲノム異常の検出が可能である。保険適応の条件は、標準治療がないもしくは終了 (見込みも含む) の進行再発固形がんに限られており、生涯で 1 回のみ検査可能である。

検査の第一の目的は、ゲノム異常にマッチした薬剤を選択することである。基本的に、標準治療の選択肢がほとんど残されていない人が対象であり、新たな治療法が見つかることへの期待が大きい。例えば、C-CAT のデータベースを用いた非小細胞肺癌の解析では、診断時に実施したコンパニオン診断薬でドライバー変異が陰性だった 330 症例のうち 81 例 (24.5%) で、ドライバー変異が同定されたと報告されている²⁾。そのほかにも、脳腫瘍や肉腫をはじめとして、組織学的な診断等に有用なゲノム異常が検出されることがしばしばあり、遺伝性腫瘍に関わる生殖細胞系列病的バリエーション (いわゆる二次的所見) が検出され、血縁者を含めた健康管理に生かせる場合がある。

検査によって必要な検体量、解析対象遺伝子、正常コントロールを用いたマッチドペアの解析か否かなどに加えて、レポートの薬事承認の範囲も異なっており (表 1)³⁾、患者背景や検査の目的に応じて選択する。またわが国の保険診療では検査結果を適切に解釈するため、エキスパートパネル (専門家会議) が全例で求められており、必要な構成員が定められている。

表 1 薬事承認の範囲の比較（2024 年 6 月現在）

	Guardant360	F1 liquid	F1 CDx	Oncoguide	GenMineTOP
SNV/indel	○	○	○	○	○
amplification	○	○	○	○	○
fusion	○	○	○	○	○
TMB	—	○	○	○	○
MSI	○	△	○	○	—
Germline Pathogenic Variant (by paired-normal DNA)	—	—	—	124 genes	40 genes (pathogenic/likely pathogenic)
RNA expression	—	—	—	—	○ 27 genes
Liquid			Tumor tissues		

SNV: single nucleotide variant
indel: insertion/deletion
TMB: tumor mutation burden
MSI: microsatellite instability

○ 薬事承認あり
△ 結果が返却されるが薬事承認外（参考値）
— 結果が返却されない

文献 3）より転載、一部改変

II. 血漿CGP検査

末梢血の血漿中には、cell free DNA（cfDNA）と呼ばれる 150-200 bp 程度の長さの DNA が存在し、大半は血球（白血球）に由来するが、腫瘍由来の ctDNA も含まれる。cfDNA を用いてがん細胞由来のゲノム異常を検出する検査は、リキッドバイオプシーと呼ばれ、CGP 検査以外でも例えば、非小細胞肺がんの *EGFR* 遺伝子、大腸がんの *KRAS/NRAS* 遺伝子の検査で用いられている。血清ではなく血漿を用いる理由は、血清では白血球由来の DNA が増加し、cfDNA の中に占める ctDNA の割合が低下するためである。

血漿と組織の CGP 検査のメリット・デメリットを表 2 に示す。血漿 CGP 検査は検体採取が容易で、結果返却までの時間が短く、また腫瘍全体のゲノム異常を反映するというメリットがある一方で、組織の CGP と比較して検出感度が低いデメリットがある。感度が低い理由として、血漿中の ctDNA が乏しいケースが少ないことが挙げられる。血漿中の ctDNA の割合は、増殖速度の遅い腫瘍や早期病変では低く、また、がん種による違いも報告されている⁴⁾。FoundationOne[®]

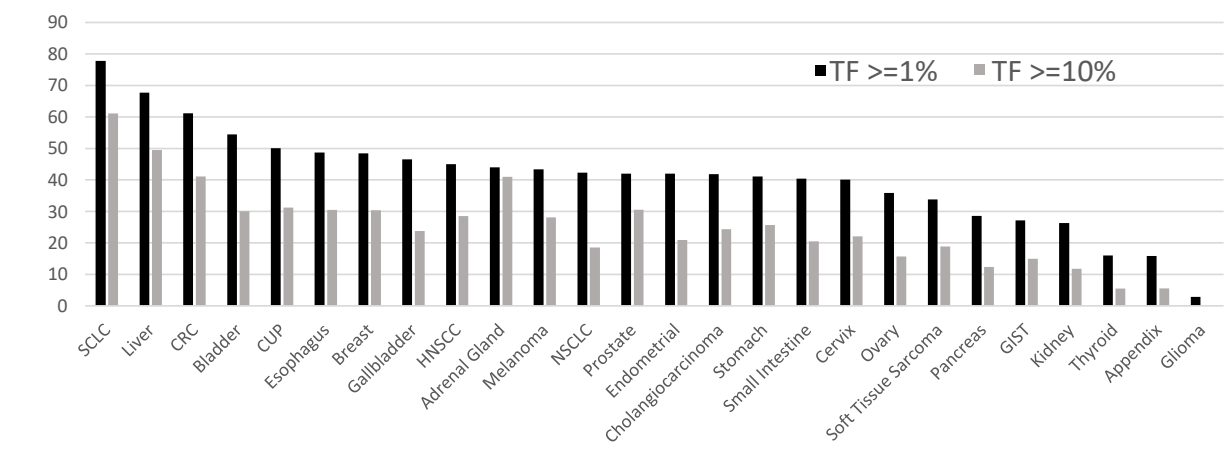
Liquid CDx ではレポートに NGS データから推定された ctDNA の割合が ctDNA tumor fraction (TF) として記載されており、48,521 検体のまとめが報告されている⁵⁾。TF が 1% 以上となる症例の割合は、小細胞肺がんでは最も高く 77.8%であり、神経膠芽腫では最も低く 2.9%とがん種による違いが大きい（図 1）⁵⁾。

また血漿 CGP 検査では、遺伝子変異（エクソン内の SNV: Single Nucleotide Variant や indel: insertion/deletion）と比較して、融合遺伝子やエクソンスキッピングの検出感度が低いことが報告されている。1,062 例の非小細胞肺がんに対して、Guardant360[®] CDx と組織の解析（Oncomine Comprehensive Assay、融合遺伝子とエクソンスキッピングは RNA を用いて解析）を比較した報告があり、遺伝子変異（*EGFR*、*KRAS*、*BRAF*、*ERBB2*）の陽性一致率 77%に対して、融合遺伝子・エクソンスキッピングの陽性一致率は 47%と偽陰性が多かった⁶⁾。後述するように DNA の解析では、RNA の解析と比較して理論上、融合遺伝子やエクソンスキッピングの検出を行いにくく、ctDNA の割合が低いことや、ctDNA の長さが短いことと相まって偽陰性が増えると考えられる。

さらに血漿 CGP 検査では、コピー数変化の検出感度が低いことが知られている。FoundationOne[®]

表 2 血漿 CGP 検査と組織 CGP 検査の比較

	血漿CGP	組織CGP
メリット	検体採取が容易でがん全体の病勢（空間的・時間的な腫瘍の不均一性）を反映 耐性変異など新規に獲得したゲノム異常を同定できる可能性がある 結果返却までの時間が短い	検査オーダー前に腫瘍細胞割合（腫瘍含有率）を確認できる 融合遺伝子の検出率が高い（RNAパネルも考慮能） 検出感度が高い
デメリット	血漿中にctDNAが乏しい場合がある 検出感度が低い（特にfusionとコピー数異常） クローン性造血の影響を受ける（ctDNA由来かの評価が難しい場合が多い）	古い検体では核酸の品質が劣化する リアルタイムで検体を得るのが難しい場合が多い 腫瘍の不均一性が反映されない



SCLC: small cell lung cancer, CRC: colorectal cancer, CUP: carcinoma of unknown primary, HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma, NSCLC: non-small cell lung cancer, GIST: gastrointestinal stromal tumor

図 1 がん種別の ctDNA の割合の分布

FoundationOne® Liquid CDx において cfDNA 中の ctDNA の割合（TF：tumor fraction）が 1% 以上もしくは 10% 以上であった症例の割合（%）を示す。

文献 5) を基に図を作成

Liquid CDx の分析的妥当性の報告⁷⁾によれば、SNV/indel の検出限界はアリル頻度 0.4%であり、片アリの体細胞変異と仮定すれば、0.8%の TF で検出が可能な計算となるが、コピー数増加の検出限界は TF 21.7%、ホモ欠失の検出限界は TF 30.4%とされており、ctDNA が十分量存在する場合のみに検出が可能である。

免疫チェックポイント阻害薬の奏功予測マーカーとして、MSI (microsatellite instability) は Guardant360® CDx において、以前よりコンパニオン診断 (CDx) として薬事承認を受けている。また、2024 年 5 月に FoundationOne® Liquid CDx において、コピー数異常と TMB (tumor mutation burden) が新たに薬事承認を受けた。同じ患者に対して、組織 CGP 検査

(FoundationOne® CDx) での TMB と、血漿 CGP 検査 (FoundationOne® Liquid CDx) での blood TMB (bTMB) を測定した 5,756 例の報告では、血漿 CGP 検査の TF が 1% 未満の場合、bTMB は TMB を過小評価していた。一方、血漿 CGP 検査の TF が 1% 以上の場合には、両者に強い相関が認められ、bTMB は TMB を過大評価も過小評価もしなかった。TMB ≥ 10 のうち bTMB ≥ 10 となる症例の割合は、TF が 1% 未満、1～10%、10% 以上で、それぞれ 8%、80%、90%であった⁵⁾。免疫チェックポイント阻害薬の有用性を判定するための bTMB のカットオフは定まったものがなく、今後のデータ集積が待たれるが、後ろ向きの解析において bTMB ≥ 14 かつ TF ≥ 10 以上の症例で、免疫チェックポイント阻害薬が有効であっ

たとの報告もある⁵⁾。

なお保険診療上、血漿 CGP 検査の適応は、①医学的な理由により固形腫瘍の腫瘍細胞を検体として、がんゲノムプロファイリング検査を行うことが困難な場合（組織検体の腫瘍細胞割合が低いなど）、②固形腫瘍の腫瘍細胞を検体として実施したがんゲノムプロファイリング検査において、包括的なゲノムプロファイルの結果を得られなかった場合、に限定されている。エキスパートパネルでは、ctDNA 不足と検査の特性（融合遺伝子、エクソンスキッピング、コピー数異常が偽陰性となりやすい）に留意した解釈が重要である。

Ⅲ. RNAを用いたCGP検査（GenMineTOP）

GenMineTOP は、DNA に加えて RNA を用いた解析も行う CGP 検査である。DNA パネルは正常コントロールを用いたマッチドペアの解析であり、737 遺伝子を対象としている。RNA パネルでは、455 遺伝子の融合遺伝子、5 遺伝子のエクソンスキッピング、27 遺伝子の遺伝子発現量が報告される。例えば、*NTRK* 融合遺伝子はがん種横断的に ROS1/TRK 阻害薬（エヌトレクチニブ）や TRK 阻害薬（ラロトレクチニブ）が保険適用となっており、MET エクソン 14 スキッピング変異の非小細胞肺癌では、MET 阻害薬（カプマチニブ、テポチニブ）が保険適用となっているが、こ

うした融合遺伝子やエクソンスキッピングは DNA パネルよりも高い感度で検出されることが期待される。また、融合遺伝子の解析対象遺伝子数が多く、診断に有用な融合遺伝子（*EWSR1-FLI1*、*CIC-DUX4*、*BCOR* など）も含まれている。RNA パネルにより、融合遺伝子とエクソンスキッピングの検出感度が高くなると期待される理論的背景を以下に解説する。

融合遺伝子の DNA 上の切断点（ブレイクポイント）の多くは、イントロンに存在しており、DNA パネルでは、イントロン内に融合遺伝子検出用のキャプチャプローブが設計される。ヒトゲノムでは、エクソンが 1.5% を占めるのに対して、イントロンは 25% と長く、またイントロン内にしばしば認められるリピート配列により特異的なキャプチャプローブの設計が困難な場合も多く、DNA パネルでは全ての切断点を網羅することが不可能である。一方 RNA パネルのキャプチャプローブは、イントロンよりも短くリピート配列も比較的少ないエクソン上に設計されており、DNA 上の切断点の部位によらず RNA レベルで融合遺伝子を検出可能である（図 2）。

また、エクソンスキッピングについて、DNA パネルではスプライス部位の変異を検出しているが、エクソン単位の広範囲な欠失やディープイントロンの変異（イントロン上にある変異で、エクソンの近傍にないもの）によるスプライシング異常などは検出が困難である。一

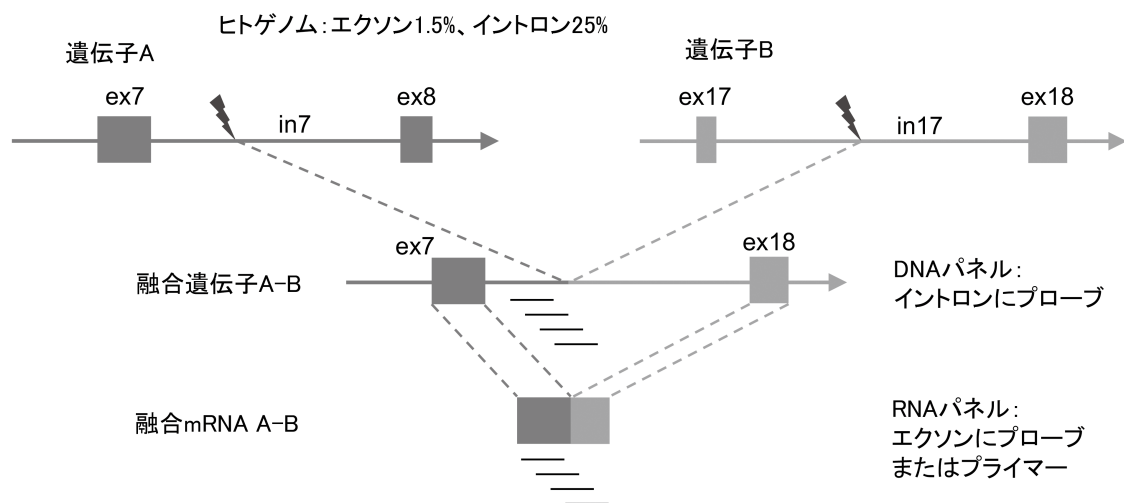


図2 融合遺伝子の検出原理

DNA パネルではヒトゲノムの 25% を占める長いイントロン内にプローブを設計することになり、すべての切断点を網羅することが不可能である。

方 RNA パネルでは、エクソンスキッピングの原因によらず RNA レベルで転写されるエクソンを直接的に検出するため、感度が上昇することが期待される (図 3)。

RNA パネルの臨床的有用性について、Memorial Sloan Kettering Cancer Center から報告がある。米国で承認されている DNA パネル (MSK-IMPACT) で、ドライバー遺伝子異常が検出されなかった非小細胞肺癌 589 例のうち 254 例に対して、RNA パネル (MSK-Fusion) を実施したところ、232 例で解析が成功し、36 例 (15%) で承認薬が存在する融合遺伝子、もしくは *MET* エクソン 14 スキッピングが検出された⁸⁾。

GenMineTOP は、FFPE (formalin-fixed paraffin embedded) 検体を用いるため RNA の分解について留意が必要であるが、高い割合で解析可能であることが示されている。RNA の品質指標として DV200 (RNA 断片のうち 200 塩基以上のものの割合を%で示したもの) が用いられ、DV200 はシーケンスの品質指標と相関する⁹⁾。RNA が 200ng 以上かつ DV200 が 40% 以上であれば、シーケンスは 100% 可能であったと報告されており¹⁰⁾、これを受けて RNA 500ng 以上、DV200 40% 以上にカットオフを設定し、FFPE 検体 (採取から提出までの保存期間に制限を設けていない) を前向きに先進医療 B で解析したところ、200 検体中 191 検体 (96%) で RNA の品質基準が満たされていた¹¹⁾。

以上より、FFPE 検体を用いた RNA パネルの解析

は十分可能であり、治療や診断に有用な融合遺伝子が高頻度ながん種 (非小細胞肺癌、甲状腺がん、肉腫、小児がんなど) においては、特に臨床的有用性が高いことが期待される。また、その他のがん種においても頻度は低いながら治療に直結する融合遺伝子は存在する。例えば、非小細胞肺癌を除く *ALK* 融合遺伝子陽性の進行再発固形腫瘍に対する *ALK* 阻害薬のバスケット試験「WJOG15221M (ALLBREAK)」が行われている。Precision Medicine 推進のためには、頻度の低い融合遺伝子をいかに効率的に検出し、出口戦略につなげていけるかが重要であり、今後さまざまながん種において RNA パネルを活用し、リアルワールドで融合遺伝子検出率を検証していくことが重要である。

遺伝子発現量については、遺伝子増幅や融合遺伝子により高発現となることが報告されているが¹⁰⁾、発現量のカットオフ値は定まっておらず、データの蓄積が期待される。また、455 種類の融合遺伝子以外にも発現が重要な遺伝子に対してプローブの設定、開発を進めており、詳細な発現データの蓄積により、予後予測や原発不明がんの原発巣推定にも活用できる可能性がある。

おわりに

CGP 検査の新しい技術として、血漿 CGP 検査と

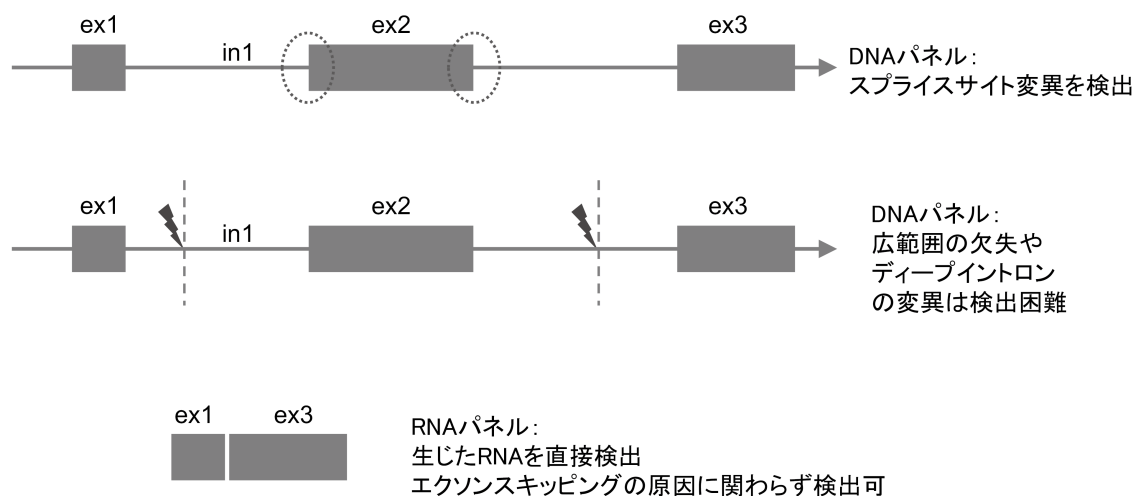


図3 エクソンスキッピングの検出原理

スプライスサイト変異以外の原因で生じたエクソンスキッピングはDNAパネルでは検出することができない。

RNA パネルの特性を解説した。CGP 検査の臨床的有用性をさらに高めるためには、このような検査の高機能化だけではなく、検体採取からエキスパートパネルに至るまで、すなわち分析前プロセスと分析後プロセスを含めた全工程の品質管理と標準化を推進することも重要である¹²⁾。また、エキスパートパネルについては、医療従事者の負担軽減が大きな課題となっており、効率的な運用を目指した制度の見直しが議論されており、人工知能を活用した診断支援システムの開発も期待される。

利益相反

コニカミノルタ株式会社 (社会連携講座)、渡邊広祐
コニカミノルタ株式会社 (共同研究費、講演料)、中外製薬株式会社 (講演料)、織田克利

文 献

- 1) C-CAT
<https://for-patients.c-cat.ncc.go.jp/>
(2024年6月21日閲覧)
- 2) Ishida M, Iwasaku M, Doi T, et al. Nationwide data from comprehensive genomic profiling assays for detecting driver oncogenes in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2024;115(5):1656-1664.
- 3) 渡邊広祐 がんゲノム医療における品質管理と正確な情報提供の重要性～治療可能な遺伝子異常を見落とさないために～、日本臨床検査医学会誌
第69回中国・四国支部総会 シンポジウム1：がんゲノム医療における検査室の役割と課題(4)JJSLM72:496-500,2024.
- 4) Zhang Q, Luo J, Wu S, et al. Prognostic and Predictive Impact of Circulating Tumor DNA in Patients with Advanced Cancers Treated with Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov.* 2020;10(12):1842-1853.
- 5) Mishima S, Nakamura Y, Tukachinsky H, et al. Validity and utility of blood tumor mutational burden (bTMB) is dependent on circulating tumor DNA (ctDNA) shed: SCRUM-Japan MONSTAR-SCREEN. *J Liquid Biopsy.* 2023;1:100003.
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
- 6) Sugimoto A, Matsumoto S, Udagawa H, et al. A Large-Scale Prospective Concordance Study of Plasma- and Tissue-Based Next-Generation Targeted Sequencing for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (LC-SCRUM-Liquid). *Clin Cancer Res.* 2023;29(8):1506-1514.
- 7) Woodhouse R, Li M, Hughes J, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PLoS One.* 2020;15(9):e0237802.
- 8) Benayed R, Offin M, Mullaney K, et al. High Yield of RNA Sequencing for Targetable Kinase Fusions in Lung Adenocarcinomas with No Mitogenic Driver Alteration Detected by DNA Sequencing and Low Tumor Mutation Burden. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4712-4722.
- 9) Watanabe K, Kohsaka S, Tatsuno K, et al. Analysis of quality metrics in comprehensive cancer genomic profiling using a dual DNA-RNA panel. *Pract Lab Med.* 2024;39:e00368.
- 10) Kohsaka S, Tatsuno K, Ueno T, et al. Comprehensive assay for the molecular profiling of cancer by target enrichment from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Cancer Sci.* 2019;110(4):1464-1479.
- 11) Kage H, Shinozaki-Ushiku A, Ishigaki K, et al. Clinical utility of Todai OncoPanel in the setting of approved comprehensive cancer genomic profiling tests in Japan. *Cancer Sci.* 2023;114(4):1710-1717.
- 12) 前川 真人 臨床検査における遺伝子解析の現状と展望、日本内科学会雑誌 2022 年 111 巻 9 号 p.1884-1889.