

メラノーマにおける *BRAF* V600 変異の検出Detection of *BRAF*<sup>V600</sup> in melanomaう はら ひさし  
宇 原 久  
Hisashi UHARA

## はじめに

2014 年 12 月にコンパニオン診断薬「コバス® *BRAF* V600 変異検出キット」が根治切除不能な悪性黒色腫患者に対する検査法として承認され、本年 2 月より発売された。ほぼ同時に発売された *BRAF* 阻害剤ベムラフェニブは進行した悪性黒色腫に対する初めての分子標的薬であり、これまでの標準薬であったダカルバジンの 10% に対して数十%と高い奏効率を示し、生存期間の延長も望める。しかし、*BRAF* 阻害剤は *BRAF* 変異のある患者のみに有効性を発揮する薬剤であるため、*BRAF* 変異の検出は根治切除不能なメラノーマ患者の治療薬を決める際に必須の検査となる。本稿では、メラノーマの疫学、メラノーマと *BRAF* の関係、コバス® *BRAF* V600 変異検出キットの概要と検査の注意点、*BRAF* 阻害剤の有効性について解説する<sup>1)</sup>。

## I. メラノーマとは

メラノーマはメラノサイトの悪性腫瘍である。本邦における年間新規発症例は 10 万人あたり 1-2 人程度である。メラノーマは表皮内癌と悪性リンパ腫を含めた皮膚悪性腫瘍全体の 10% と皮膚がんのなかでも稀少であるが、皮膚がんによる死亡者の半数弱はメラノーマによる。白人に多い疾患であり、豪州のクイーンズランドでは年間 10 万人あたり数十名の患者が発生している。また米国では年間約 6 万人の患者が発生し、約 9000 人が死亡しており、白人においては重要な位置を占めている疾患である。メラノーマは転移を起こしやすい腫瘍であるが、進

行した症例に対する治療薬の効果は限られていた。しかし、2011 年以後、高い有効性を示す新薬が続々と登場し始め、メラノーマの治療が大きく変わってきた。

メラノーマの最も重要な誘因は紫外線であり、前述のように白人が最もその影響を受けている。皮膚にある程度の色素をもつ黄色人種や黒人では紫外線によるメラノーマの発症は白人に比べて少ない。日本人のメラノーマの半数を占める手足指趾の発症例は外傷と関連している可能性がある。

メラノーマは予後の悪い疾患として知られているが、早期病変であれば切除のみで完治が望める。本腫瘍の予後因子は原発巣の厚みと病理組織学的な潰瘍の有無、所属リンパ節転移の状態、原発巣と所属リンパ節領域の間の皮膚皮下転移の有無、遠隔転移の有無と血清 LDH 値である。特に原発巣の厚みと潰瘍の有無が予後因子として重要であり、水平方向にどれだけ大きくても薄い病変の予後は良好であり、厚みが 1mm 以下で潰瘍がないときの 5 年生存率は 96% である。逆に 1cm 大の小型の病変でも、厚みが 4mm 以上で潰瘍があれば 5 年生存率は 61% に下がる<sup>2)</sup>。所属リンパ節転移や in transit 転移（原発巣から所属リンパ節までの皮膚軟部組織転移）がある場合は 39-74%、遠隔転移は 21% である。白人に比べて日本人では初回診断時の進行例が多い。

メラノーマは放射線に対する感受性が低いため、脳転移に対する定位放射線療法（ガンマナイフなど）や脊髄や骨転移による神経症状や痛みに対する緩和的な目的に限られる。また、殺細胞性抗がん剤による治療については、過去数十年間さまざまなレジメンが試されてきた。しかし奏効率は上がっても生存期間はダカルバジン単剤を超えることはできなかった。

## II. メラノーマの遺伝子変異

さまざまな研究の中で最も注目されたのは Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路である (図 1)。メラノーマの 90% に MAPK 経路の活性化が起きており、白人のメラノーマ数十%程度に *BRAF* 変異が認められる<sup>3)</sup>。*BRAF* 変異の 90% はコドン 600 のバリン (V) がグルタミン酸 (E) に変わる点突然変異 (V600E) で、この変異によって活性化された BRAF が MAPK 経路を活性化させて異常な細胞増殖を惹起する。*BRAF* 変異には V600E 以外に、V600K, V600D, V600R も認められ、同様に BRAF の活性を上げる作用を持つ。BRAF の上流に位置する NRAS については、白人では 15-30% に変異があり、変異の存在部位はエクソン 1 (コドン 12, 13) とエクソン 2 (コドン 61) である。さらに上流にある KIT にも数%程度の変異が認められる。MAPK 経路以外では PI3K/AKT/mTOR の経路もメラノーマの増殖にかかわっている。これらの分子や下流の CDK4/6 などに対して多数の薬剤が開発され、臨床試験が行われている。

上記の変異率に関するデータは白人のものである。われわれの検討では、日本人患者における *BRAF* 変異率は 25-30% (内 95% は V600E、残り 5% が V600K)、*NRAS* の変異は 7-10%、*c-KIT* の変異は数% であり、白人に比べて低率であった<sup>4,5)</sup>。この値は中

国人のデータとも似ており、黄色人種における変異率と理解してよいと思われる<sup>6)</sup>。黄色人種のメラノーマの *BRAF* 変異率が白人に比べて低いのは、*BRAF* 変異の多い表在拡大型 (SSM) が黄色人種では少なく、*BRAF* 変異がまれな末端黒子型の比率が高いことによる。

V600E は、年齢が若く、体幹や四肢 (手掌足底を除く) に発症した症例に高頻度に認められる。黄色人種においてもこの傾向は同じで、われわれの検討でも *BRAF* 変異を認める症例はそうでない症例より中央値で 20 歳程度若く、被髪頭部、体幹下肢の発症例が多かった。一方 V600K は男性、高齢者に多いと報告されている。

## III. *BRAF* 変異の検出

遺伝子検査にはさまざまな分子生物学的手法が存在するが、ここでは *BRAF* 変異の検出を例に、ルーチンに利用されているホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) を用いた方法について解説する。なお、ホルマリン固定から HE 染色標本の作製までは、通常の病理標本の作成過程と同じであり、実際は分子標的薬の使用を検討する際に、保存してあった FFPE 組織を用いて遺伝子検査を行うことになる。

遺伝子検査に用いる検体は、メラノーマの原発巣または転移巣の FFPE 組織から薄切切片を作製し、

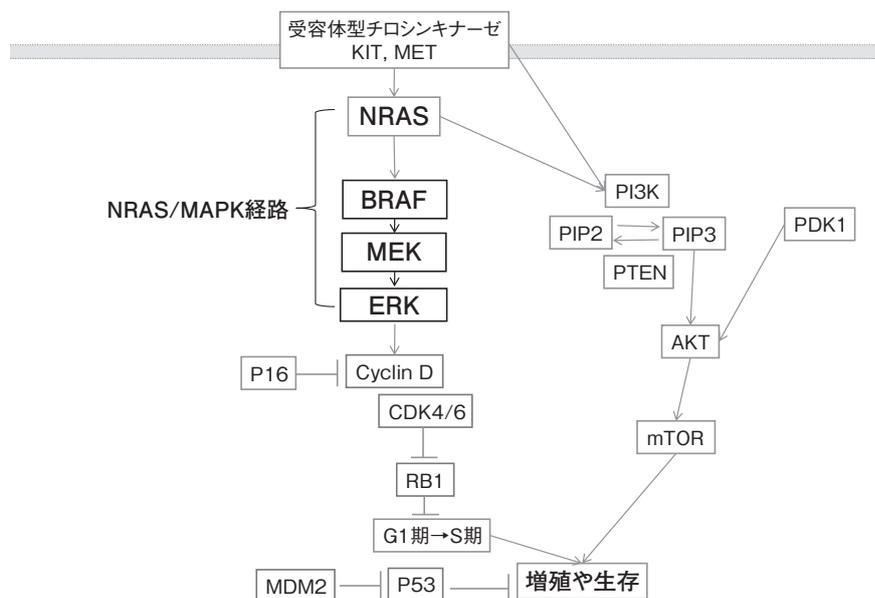


図 1 MAPK経路とその他のシグナル伝達経路

スライドガラスに載せたものを用いる。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を参照し、遺伝子変異の検出に最も適した (固定不良がなく、なるべく壊死が少なく、腫瘍細胞の多い) ブロックを選ぶ。これは、腫瘍以外の組織や細胞が多く混入すると、目的とする変異遺伝子が正常の遺伝子 (野生型) によって薄められ感度が下がってしまうためである。HE 染色標本を見ながら薄切無染色標本の腫瘍部分にマーキングしておき、マーキングに沿って腫瘍部分を徒手的に削り取る。

体細胞遺伝子変異の検索方法としては、主にダイレクトシーケンス法と real-time PCR 法などが用いられている。ダイレクトシーケンス法 (サンガー法など) は目的のエクソン部分を PCR で増幅し、PCR 増幅産物について直接塩基配列を明らかにし、得られた解析波形チャートから専用のソフトウェアで変異を検出する。サンガー法による変異の検出感度は 10-25% 以上である。real-time PCR 法は目的遺伝子の変異部位をデザインしたプライマーと蛍光プローブを用いて解析する。特定の変異を高感度かつ迅速に検出することが可能で、さまざまな方法が実用化されている。変異の検出感度は前述のサンガー法より高い。real-time PCR 法を用いた V600E の検査キット [cobas<sup>®</sup>4800 BRAFV600 Mutation kit (ベムラフェニブ用)、The THxID<sup>®</sup>-BRAF test (dabrafenib 用)] が対応する BRAF 阻害剤の承認に合わせて米国 FDA に認可され、本邦でも本年 2 月にコバス<sup>®</sup> BRAF V600 変異検出キットが承認された。データシートによれば本検出キットの検出感度は 5% 以上であり、サンガー法よりも高感度であり、V600E 以外の V600K, V600D も検出できる。

ある薬剤の使用に際して、最も効果が期待できる患者を選択するための検査を「コンパニオン診断」という。BRAF 阻害剤のベムラフェニブに対しては V600E の変異を確認するためのコンパニオン診断薬としてコバス<sup>®</sup> BRAF V600 変異検出キットが開発され、ベムラフェニブと対で承認された。このように、最近では臨床試験の段階から、コンパニオン診断薬を準備して対象患者を選別する傾向がある。前述のように遺伝子変異の検出法にはさまざまな手法があり、検出感度にも差が存在する。このため現在は薬剤とセットになったコンパニオン診断薬による変異検出が薬剤の使用条件になっている。

繰り返しになるが、遺伝子変異の検査に用いる検体は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から切り出した標本である。したがって、将来の転移に備え、遺伝子変異の検索に適した DNA を抽出することを前提に手術検体の適切な固定や保管が極めて重要である。特に組織の固定時に脱灰操作を行うと DNA が劣化し、変異の検出ができなくなる。脱灰する可能性が高い爪のメラノーマは日本人に多い病型であるため、とくに注意が必要である。骨を含む手術検体は、軟部組織と骨を離して別々に処理しなければならない。今後、多くの分子標的薬が使えるようになれば、アジュバント療法や再発時の薬剤選択に際し、*BRAF* に限らず複数の遺伝子検査が必須となる可能性がある。したがって初回の手術検体は適切に固定し、大切に保管されなければならない。

#### IV. *BRAF* 変異がある患者に対する治療薬

*BRAF* V600 に変異があれば BRAF 阻害剤 (ベムラフェニブ) と MEK 阻害剤 (本邦未承認、臨床試験中) の効果が期待できる。米国で最初に認可されたのがベムラフェニブである。2011 年に報告されたダカルバジンとの比較試験で、奏効率 48% 対 5%、無増悪生存期間 (PFS) 中央値 5.3 カ月対 1.6 カ月だった<sup>7)</sup>。免疫チェックポイント阻害剤の ipilimumab に続いて、ダカルバジンを上回る生存期間の延長効果が確認された試験結果であった。V600E と V600K に分けた解析も行われており、臨床効果に差がなかったと報告されている<sup>8)</sup>。また、効果発現までにかかる期間の中央値はベムラフェニブ群で 1.4 カ月、ダカルバジンで効果が得られずベムラフェニブに cross over した群では 3 カ月と報告されている。つまり BRAF 阻害剤の効果の発現は早い。2 番手として登場した dabrafenib もダカルバジンとの比較試験 (BREAK-3) で、PFS 中央値が dabrafenib 5.1 カ月、ダカルバジン 2.7 カ月と有意差を認めた<sup>9)</sup>。Dabrafenib は、脳転移にも効果があることが報告されている<sup>10)</sup>。また 3 番手の BRAF 阻害剤である encorafenib (LGX 818) については日本を含む世界同時治験が進行中である。

*BRAF* の下流 (図 1) に存在する MEK を阻害する薬剤としては、trametinib が 2013 年、米国 FDA に認可された。trametinib 単剤での奏効率は 20% 程度で、

表1 メラノーマに対する BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用試験

薬 剤	症例数	奏効率 (%)	無増悪 生存期間(月)
<b>Dabrafenib + trametinib 対 dabrafenib</b>			
2012			
Dabrafenib + trametinib	54	75.9	9.4
Dabrafenib	54	53.7	5.8
2014			
Dabrafenib + trametinib	211	67	9.3
Dabrafenib	212	51	8.8
<b>Vemurafenib + Cobimetinib 対 Vemurafenib</b>			
Vemurafenib + Cobimetinib	247	68 (CR: 10)	9.9
Vemurafenib	248	45 (CR: 4)	6.2
<b>Dabrafenib + trametinib 対 vemurafenib</b>			
Dabrafenib + trametinib	352	64	11.4
Vemurafenib	352	51	7.3
<b>Vemurafenib + Cobimetinib (phase I)</b>			
Vemurafenib で悪化した症例	66	15	2.8
未治療例	63	87	13.7
<b>Dabrafenib + trametinib</b>			
Dabrafenib 単剤で進行した症例	45	13	3.6

BRAF 阻害剤に比べて低く、また、BRAF 阻害剤に耐性となった症例に対する効果は低い<sup>11)</sup>。したがって、単剤としての利用価値は乏しい。しかし BRAF 阻害剤と併用すると奏効率が上がり、BRAF 阻害剤の副作用である皮膚腫瘍の発生が減る。BRAF 阻害剤 dabrafenib に MEK 阻害剤の trametinib を併用した臨床試験が行われ、奏効率は単剤の 50% から併用で 70% に上がり、奏効期間も延長した<sup>11)</sup>。ベムラフェニブと cobimetinib の併用についても、ベムラフェニブ単剤に対して奏効率と PFS 中央値共に併用効果が確認されている<sup>8, 12~14)</sup>。ただし、dabrafenib/trametinib、ベムラフェニブ/cobimetinib の両方ともまだ全生存期間についてのデータが出ていない。なお、BRAF 阻害剤単剤での治療に耐性を示した患者に対するセカンドラインとして BRAF 阻害剤に MEK 阻害剤を併用した場合の効果は低い<sup>15~17)</sup> (表 1)。

BRAF 変異の有無にかかわらず有効性が確認されている薬剤は腫瘍免疫を作動させる抗体薬であり、免疫チェックポイント阻害剤と呼ばれている、本邦では 2014 年 7 月に抗 PD-1 抗体であるニボルマブと 2015 年 7 月に抗 CTLA-4 抗体であるイピリムマブが承認された。これらの抗体薬は BRAF 阻害剤にくらべて奏効率は低いが、効果持続期間が長いという特徴をもっている。BRAF 変異がない場合に本邦で使用できる治療薬 (2015 年 8 月現在) はダカルバジンなどの殺細胞性抗がん剤かニボルマブで、

BRAF 変異がある場合はベムラフェニブかニボルマブか殺細胞性抗がん剤となる (イピリムマブは発売前)。いずれにしても、何らかの全身療法が必要になった場合は BRAF 変異の有無を確認することが必須である。

## おわりに

世界的には 2011 年から、本邦でも 2014 年より進行したメラノーマ患者に対する新薬が続々と登場してきた。薬剤の選択の際には標的分子の遺伝子情報を調べる必要がある。メラノーマ治療にもやっと個別化医療の時代が来たことになる。今後は効果を予測する検査や薬剤の選択法を確立していく必要がある。

## 文 献

- 1) 宇原 久. 【最新がん薬物療法学—がん薬物療法の最新知見—】臓器別がんの薬物療法 皮膚悪性腫瘍. *日本臨床*. 2014. 02 2014; 72(増刊2 最新がん薬物療法学): 431-435.
- 2) 藤澤康弘, 藤本学. 悪性黒色腫全国統計調査: 2005-2013 年度の集計結果. *Skin Cancer*. 2014; 29: 189-194.
- 3) Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. Jun 27 2002; 417 (6892): 949-954.
- 4) Ashida A, Uhara H, Kiniwa Y, et al. Assessment of BRAF and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci*. Jun 2012; 66(3): 240-242.
- 5) Uhara H, Ashida A, Koga H, et al. NRAS mutations in primary and metastatic melanomas of Japanese patients. *Int*

- J Clin Oncol.* Jun 2014 ; **19**(3) : 544-548.
- 6) Si L, Kong Y, Xu X, et al. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *Eur J Cancer.* Jan 2012 ; **48**(1) : 94-100.
  - 7) Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* Jun 30 2011 ; **364**(26) : 2507-2516.
  - 8) McArthur GA, Chapman PB, Robert C, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* Mar 2014 ; **15**(3) : 323-332.
  - 9) Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* Jul 28 2012 ; **380**(9839) : 358-365.
  - 10) Long GV, Trefzer U, Davies MA, et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* Nov 2012 ; **13**(11) : 1087-1095.
  - 11) Flaherty KT, Infante JR, Daud A, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med.* Nov 2012 ; **367**(18) : 1694-1703.
  - 12) Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N Engl J Med.* Sep 29 2014.
  - 13) Larkin J, Del Vecchio M, Ascierto PA, et al. Vemurafenib in patients with BRAF(V600) mutated metastatic melanoma: an open-label, multicentre, safety study. *Lancet Oncol.* Apr 2014 ; **15**(4) : 436-444.
  - 14) Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* Sep 29 2014.
  - 15) Ribas A, Gonzalez R, Pavlick A, et al. Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAF(V600)-mutated melanoma: a phase 1b study. *Lancet Oncol.* Aug 2014 ; **15**(9) : 954-965.
  - 16) Johnson DB, Flaherty KT, Weber JS, et al. Combined BRAF(Dabrafenib) and MEK Inhibition (Trametinib) in Patients With BRAFV600-Mutant Melanoma Experiencing Progression With Single-Agent BRAF Inhibitor. *J Clin Oncol.* Oct 6 2014.
  - 17) Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N Engl J Med.* Nov 16 2014.