

# RAS遺伝子変異血漿検査

## Plasma-based RAS mutation test

にし お かず と  
西尾 和人  
Kazuto NISHIO

### はじめに

RAS 遺伝子変異血漿検査である OncoBEAM™ RAS CRC キットが、大腸癌患者の血漿中の ctDNA 中の RAS (*KRAS* および *NRAS*) 遺伝子変異の検出を行い、抗 EGFR 抗体薬セツキシマブまたはパニツムマブの結腸・直腸癌患者への適応を判断するための補助に用いるものとして、体外診断用医薬品として製造販売承認、保険収載された。RAS 遺伝子に変異があると、抗 EGFR 抗体薬による治療効果が得られないので、抗 EGFR 抗体薬使用により、不要な有害事象や費用負担を回避することができる。

### I. OncoBEAM™ RAS CRC キットの概要

本キットは、BEAMing (Beads, Emulsions, Amplification and Magnetics) 法により測定する。BEAMing 法は高感度デジタル PCR 法の一つであり、高い最小検出感度を有する<sup>1)</sup>。

測定原理としては、血漿から抽出した cfDNA を検体として、ターゲット領域を DNA 合成酵素でブレ増幅し、油中水滴型エマルジョン中の磁性ビーズ上で検出対象領域を増幅させる (図 1)<sup>2)</sup>。水滴状のエマルジョンを破壊し、磁性ビーズ上で増幅された DNA と野生型検出用、変異型検出用、およびエマルジョン PCR によるビーズ上での増幅確認用 (共通領域) に、それぞれ異なる蛍光色素で標識されたコドン毎の蛍光プローブとハイブリダイゼーションさせる。蛍光標識されたビーズをフローサイトメトリー法で測定する。測定には OncoBEAM™ 用フロー

サイトメーター OF-500 と、OncoBEAM™ 用前処理自動化装置 OL-10 が必要である。本法により野生型遺伝子中に存在するごくわずかな変異型遺伝子を検出することが可能となる。本キットは、*KRAS* および *NRAS* 遺伝子のエクソン 2、3、4 領域の変異を検出する。本検査は、D004-2 悪性腫瘍遺伝子検査の〈留意事項〉に追加され、高感度デジタル PCR 法とフローサイトメトリー法による RAS 遺伝子変異 (血漿) について 7,500 点が算定される。

### II. 測定時の留意点

採血は、医療機器製造販売認証を受けた、Streck 採血管 (cell-Free DNA BCT® CE)、セルフリー DNA 抽出用採血管 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) が指定されている。

血漿検体の場合には、一般的に組織検体と比べて、検体の保管期間が短く経年劣化の恐れは低い。血漿検体は -30 ~ -15°C もしくは -70°C 以下で保存した場合、長期間安定であるとされる。血漿 (推奨の血漿量; 3 mL) から市販キット (QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit 等) のプロトコルに従って DNA 抽出を行った場合、DNA は、2 ~ 8°C で 24 時間、-30 ~ -15°C で 30 日間安定であるとされる。血液検体を用いる場合、一般的には、反応にはヘモグロビン、ビリルビンや乳びの混入等により反応を受ける。測定時には、血漿中より抽出・精製された DNA を用いることから、その影響はないと考えられている。ただし、溶血した血液から血漿を調製した場合、測定結果に影響を与えることがある。本法は、超高感度検出法であり、コンタミネーションを防ぐために、

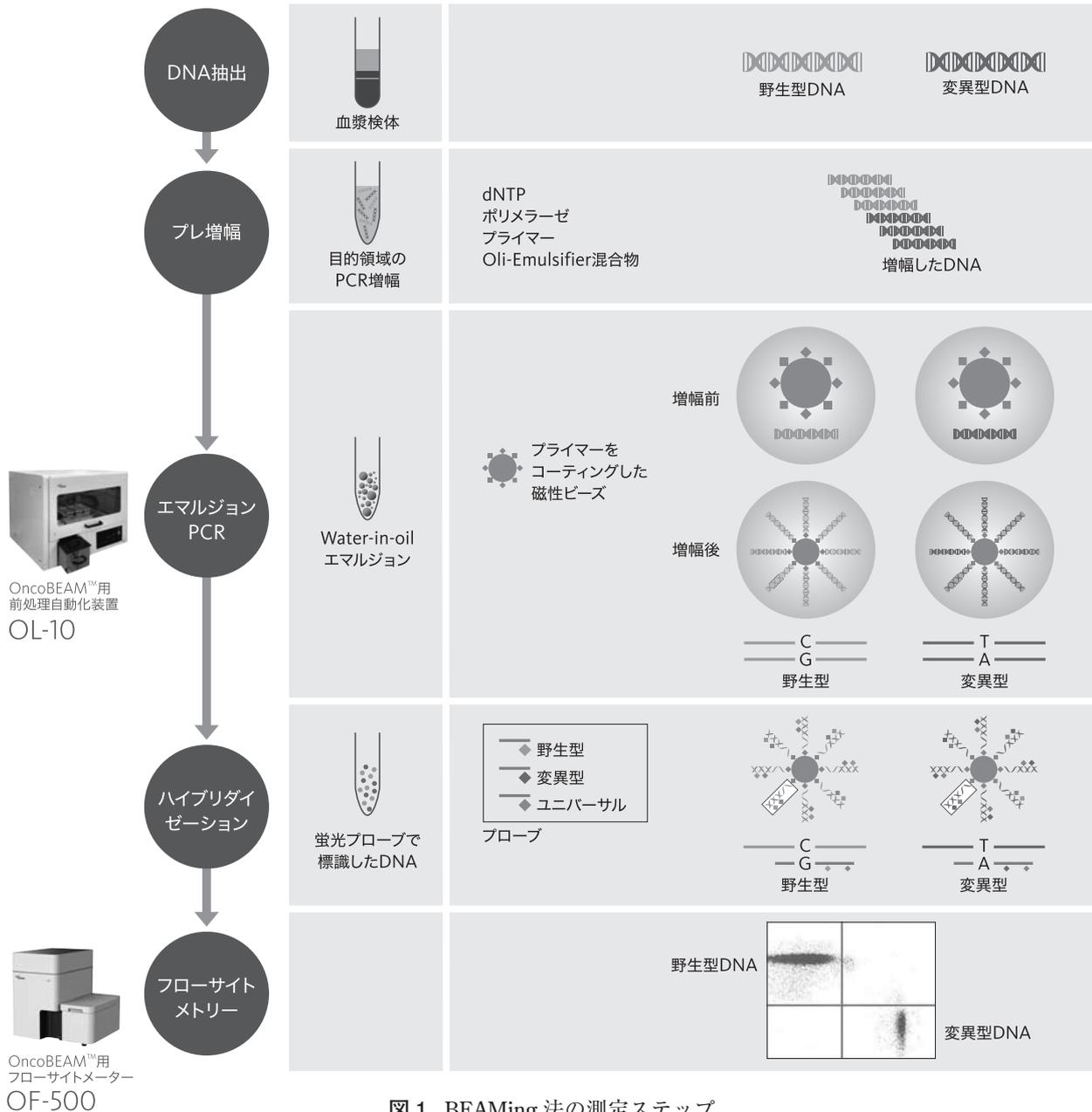


図1 BEAMing法の測定ステップ  
(文献2)より

増幅と検出するエリアは、別にすることが求められている。検体量としては、血漿 3mL が推奨されている。血漿分離の遠心条件は 15 ~ 25℃、1,600 ± 150 × g、10 分間遠心を行い、上清を回収後、15 ~ 25℃、3,000 ± 150 × g または 6,000 ± 150 × g、10 分間遠心を行う。

### Ⅲ. 検査回数

保険適用の内容としては、E3 測定項目に区分され、ア. 本検査は、大腸癌患者の血漿を検体とし、

抗悪性腫瘍剤による治療法の選択を目的として、高感度デジタル PCR 法とフローサイトメトリー法を組み合わせた方法により行った場合に、患者 1 につき、1 回に限り算定できる。ただし、再度治療法を選択する必要がある場合にも算定できる。ただし、本検査の実施は、医学的な理由により、大腸癌の組織を検体として、「1」の「イ」処理が容易なもののうち、「2」のイに規定する大腸癌における RAS 遺伝子検査又は「3」のイに規定する大腸癌における KRAS 遺伝子検査を行うことが困難な場合に限るとあることから、複数回の検査が許容されるものと考

えられる<sup>3)</sup>。

臨床的には、血漿検体を用いた RAS 遺伝子検査で変異が検出されない症例では、抗 EGFR 抗体薬再投与で臨床的な効果が再度得られることが報告されている<sup>4)</sup>。臨床上的リチャレンジの意義から、大腸癌では治療ラインを変更する毎に複数回 OncoBEAM™ の検査をするのがよいとも考えられている。

#### IV. 臨床病理学的特徴別の OncoBEAM™ RAS CRC 使用に関する文献的考察

OncoBEAM™ RAS 突然変異解析を日常的に実施しているスペイン国内の 10 の病院検査施設において、大腸癌 (CRC) 患者の血漿中の OncoBEAM™ RAS 突然変異解析の総合的な性能を評価する論文が発表された<sup>5)</sup>。同試験では、各病院の検査室で、血漿からの循環無細胞 DNA を OncoBEAM™ による RAS 変異の有無を調べ、同じ患者の腫瘍組織から抽出した DNA から得られた結果と比較した。236 人の参加者の血漿ベースと組織ベースの RAS 突然変異検査の全体的な一致率は 89% (210/236 ;  $\kappa$ , 0.770 (95% CI : 0.689-0.852)) であった。

BEAMing によるすべての不一致症例の組織の再解析では、2つの偽陰性と 5つの偽陽性の腫瘍組織 RAS 結果が得られ、最終的な一致率は 92% であった。血漿偽陰性の結果は、肺転移性局所疾患を有する患者でより頻繁に認められた。本論文の結論は、血漿サンプルと組織サンプルから得られた結果の間に、高い全体的な一致が観察されたという点であった。

García-Foncillas Jesús らは、リアルワールドデータとして、OncoBEAM™ による血漿 RAS 変異診断と組織 RAS 変異ステータスを比較した<sup>6)</sup>。臨床病理学的特徴との関連性の解析では、肺転移のみの症例において、最大病変径と病変数が不一致の結果に影響を与えていた。

解析した症例数は限られていたが、肺病変の最長径が 20mm、病変数が 10 個というのは、不一致症例を識別するためのカットオフ値であるとした。不一致の理由としては、クローンの進化や腫瘍の不均一性も考えられる。実際、彼らのコホートでは、検体採取間隔と不一致の程度とが関連する傾向が見られ、血漿採取と組織採取の間隔の乖離が長い間に生

じるクローンの進化を示唆している。不均一な腫瘍を有する症例は、血漿陽性集団と組織陰性集団にも含まれる可能性があり、結果の解釈には上記点を踏まえて解釈する必要がある。

また、不一致例を含む、血漿採取と組織採取の間隔が長い症例において抗 EGFR 抗体薬の有効性を検討することで、OncoBEAM™ RAS CRC キットの真価が明らかになると考えられる。

また、国立がん研究センター坂東らは、8施設から合計 280 名の患者を対象とした検討結果を報告した。OncoBEAM™ と組織ベースの解析の RAS 変異解析の全体的な一致率は 86.4% で、正の一致率は 82.1%、負の一致率は 90.4% であった<sup>7)</sup>。ロジスティック回帰分析では、肺転移のみが不一致に関連する最も有意な因子であった。肺転移のみの症例 (n=31) では、血漿ベースと組織ベースの解析の一致率は 64.5% であり、ctDNA の量が少ないことが示唆された。肺転移のみの患者を除いた場合の全体一致率は 89.2% (222/249) であった。肺転移のみの症例では、最大病変径が 20mm 以上、病変数が 10 個以上の症例では、血漿ベースと組織ベースの解析結果が完全に一致した。同論文では、OncoBEAM™ RAS CRC キットの臨床的妥当性が確認された。肺転移のみで転移が少ない、あるいは病変径が小さい mCRC 患者では、偽陰性に対する注意が必要であったと結論づけた。同研究では、350 人が最初に登録されたが、そのうち 70 人が以下の理由で一次解析のために除外された。適格な血漿または組織の利用可能性がない (n=18)、組織-BEAMing による結果が無効、血漿-BEAMing による結果が無効 (n=8)、除外基準に合致した (n=15) と報告され、血漿検査においても、検体の品質に注意する必要がある。

Vessies らは、転移性 CRC 患者の血漿サンプル中の KRAS 変異を検出するための 2つの液体生検法の感度を比較した。OncoBEAM™ RAS CRC アッセイで RAS 変異陽性の結果が得られ、変異アレル率 (MAF) が 5% 未満のサンプルを、Idylla ctKRAS 変異検査 (n=116) でペア分析した。Idylla は、OncoBEAM™ KRAS-MUT+ 検体のうち、MAF 値が 5% 未満の検体 81/116 例、MAF 値が 1% 未満の検体 48/79 例で KRAS 変異を検出した。OncoBEAM™ と Idylla の一致度は MAF 値が高いほど良好であった。6 か月後と 12 か月後の PFS 率は、MAF 値が 1%

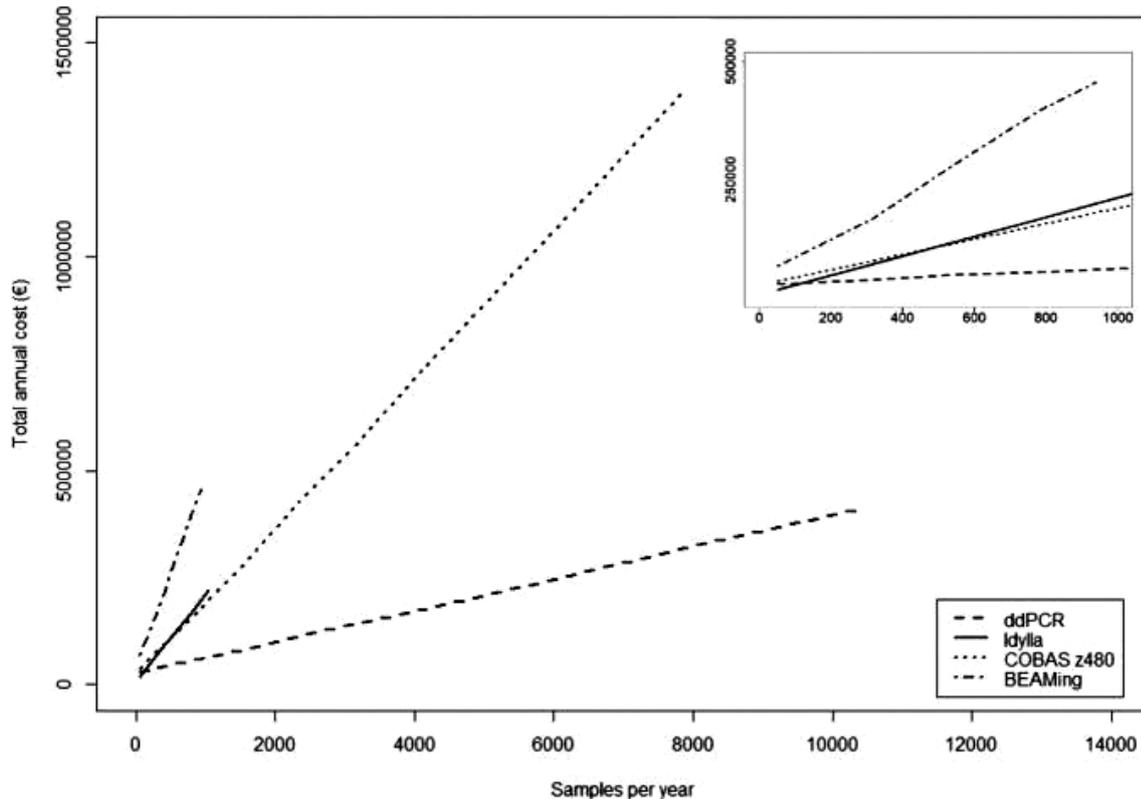


図2 年間に分析されるサンプル数の関数としての年間総コスト。X軸の幅は、最適なプラットフォームの占有率に基づいて、年間に分析できる最大サンプル数によって決定される。

(文献8)より

未満の患者よりも1～5%の患者の方が低い傾向にあった。OncoBEAM™は、KRAS変異の血漿中検出においてIdyllaよりも高い感度を示した。

海外では、血漿中のctDNAの検出には、複数のアッセイが用いられている。Vessiesらの研究では、KRAS ctDNAホットスポット変異を検出する4つの市販プラットフォームBio-Rad droplet digital PCR (ddPCR)、BioCartis Idylla、Roche COBAS z480、Sysmex OncoBEAM™を比較した<sup>8)</sup>。プラットフォームの感度は、転移性大腸癌(mCRC)患者の血漿サンプルと合成標準サンプルを使用して決定され、それにより用いる血漿量やctDNA分離方法のばらつきを排除した上で比較した。ddPCRとBEAMingはIdyllaとCOBAS z480よりもmCRC患者のKRAS変異をより高頻度に出検することが明らかになった。最大サンプルスループットは、ddPCRとCOBAS z480が最も高かった(図2)<sup>8)</sup>。年間の総コストは、BEAMingが最も高く、IdyllaとddPCRが最も低かった。彼らの結論として、ctDNAホットスポット変異検出のためのプラットフォームを選択する際に

は、希望する検査感度、ターゲットの幅、最大サンプルスループット、および年間の総コストを考慮する必要があると推察した。将来、複数のプラットフォームが本邦でも使用できるようになれば、検査室はそれぞれのニーズに最適な検査を選択することができるようになるだろう。

## おわりに

本邦においてRAS遺伝子変異血漿検査であるOncoBEAM™ RAS CRCキットが、大腸癌患者に対して承認された。本キットを用いた血漿検査による治療経過中の複数回検査が許容され、リキッドバイオプシーによるモニタリングを可能にした点はリキッドバイオプシーの活用において大きな進展である。

## 文献

- 1) OncoBEAM™ RAS CRCキット添付文書  
[https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/30100EZK00010000\\_A\\_04\\_01/](https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/30100EZK00010000_A_04_01/)(引用2021/1/13)

- 2) シスメックス株式会社 遺伝子測定技術「現在取り組んでいる遺伝子測定技術Beaming法」  
<https://www.sysmex.co.jp/rd/technologies/gene.html>  
 (引用2021/1/13)
- 3) 厚生労働省保険局医療課長、厚生労働省保険局歯科医療管理官「診療報酬の算定方法の一部改正に伴う実施上の留意事項について」(令和2年3月5日付け保医発0305第1号)  
<https://kouseikyoku.mhlw.go.jp/chugokushikoku/gyomu/gyomu/tsuchi/000158724.pdf>(引用2021/1/13)
- 4) Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S, et al: JAMA Oncol, 2018; 4: 529-536.
- 5) Grasselli J, Elez E, Caratù CG et al. Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2017; 28: 1294-1301.
- 6) Jesús G-F, Tabernero Josep T, Elena É, et al. Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2018; 119: 1464-1470.
- 7) Bando H Kagawa Y, Kato T, et al. A multicentre, prospective study of plasma circulating tumour DNA test for detecting RAS mutation in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2019; 120: 982-986
- 8) Vessies D C L, Greuter M J E, van Rooijen KL, et al. Performance of four platforms for KRAS mutation detection in plasma cell-free DNA: ddPCR, Idylla, COBAS z480 and BEAMing. *Sci Rep*. 2020; 10: 8122-8231.  
 ([http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/))