

遺伝子パネル検査の展望と課題

松井 啓隆

2019年6月にいよいよがんゲノムプロファイリング検査が保険収載され、今後、標準治療終了後のがん患者さんの治療選択肢を拡大することを目的とした検査が広く展開されることになった。この検査は、過去の手術や生検などによって採取された組織標本からゲノムDNAを抽出し、治療薬決定の参考となる遺伝子を中心に、数百程度の遺伝子を対象として変異解析を行うものである。これは、様々な分子標的治療薬が開発・実用化されていることと強く紐づいて実施される検査ということになるが、保険診療として行われる以上、他のあらゆる臨床検査と同じく、検査精度の確保が重要である。とりわけ、検査前プロセスと称される、組織の採取やホルマリン固定、および核酸の精製過程が検査精度の良否を決めることになるため、多職種が協力して高品質な試料の準備に努めなくてはならない。

一方、がんプロファイリング検査において、分子標的治療薬の感受性ないし抵抗性の参考となる遺伝子変異の検出率は高いものの、治療に結び付く症例、とくに保険診療下での治療が実施できる例は、現状ではごく限られている。この点をどう解決していくかが、この検査の有用性を高めるためのこれからの課題になる。

キーワード：がんゲノム医療、がんゲノムプロファイリング検査、遺伝子パネル検査、次世代シーケンサー

はじめに

全国がん登録のデータ¹⁾によれば、2016年に国内で新たに診断されたがんは995,132例で、一方、人口動態統計によるがん死亡データ²⁾によれば、2017年のがん(悪性新生物)の死亡率(人口10万人あたりの粗死亡率)は男性363.2、女性239.1であり、がんが日本人の死亡原因のトップである。このようななか、2018年3月には第3期がん対策推進基本計画³⁾が閣議決定され、1)がん罹患する国民を減らし、かつがん罹患した場合であっても早期発見・早期治療につなげるため、予防施策を充実させること、2)がん種や世代に応じたがん対策を施し、患者さんごとに最適ながん治療を受けられるよう、ゲノム医療を推進すること、3)患者さんが尊厳を持って社会との交わりを継続できるよう支援する仕組みを構築すること、が全体目標として述べられている。

このうちここでは、ゲノム医療の推進の一環として急ピッチで整備されつつある、がんゲノムプロファイリング検査(遺伝子パネル検査)の現状を紹介する。2017年に3月に開催された第1回がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会⁴⁾において、国民皆保険のもとでのゲノム医療を実現することが宣言され、実際2019年6月には、ふたつのがんゲノムプロファイリング検

査が保険収載されるに至った。また、同様の検査は2017年頃より自由診療や先進医療として実施されており、すでに多くのがん患者さんがこれらの検査を受けている。本稿では、こうしたなかで見えてきた課題や展望を概説する。

分子標的治療薬の実用化

近年開発が盛んに行われている分子標的治療薬は、大きく低分子薬と抗体療法薬の二つに分類することができる。がんゲノムプロファイリング検査やコンパニオン診断が行われることと、分子標的治療薬の充実とは、相互に深い関係にある。

低分子薬として最初に実用化されたものは、慢性骨髄性白血病(CML)治療薬として開発されたイマチニブである⁵⁾。低分子薬の多くは、腫瘍細胞が特異的に獲得した遺伝子変異により産生される異常たんぱく質の機能を阻害する目的で開発されており、イマチニブも、CML細胞だけが持つBCR-ABL融合タンパク質のATPase活性を抑える薬剤として用いられている。また最近では、腫瘍細胞が内在的に抱えている機能障害を更に助長させることで細胞死を誘導する、「合成致死」という概念も治療に取り入れられ⁶⁾、そのための低分子薬も実用化されている。例えば、ポリADPリボースポ

リメラーゼ(PARP)酵素の阻害剤であるオラパリブは、卵巣がんおよびBRCA 遺伝子変異陽性乳がんに対して効果を発揮する薬剤である⁷⁾。PARPは、DNAの片側の鎖が切断(一本鎖切断)された際の修復に関与する分子であり、これに対し、BRCAタンパク質は、相同組み換え(Homologous recombination, HR)を介してDNA二重鎖切断が生じた際の修復に働く分子のひとつである⁸⁾。ごく単純に記せば、HRは、1)切断された断端を加工し、2)相同DNAと対合させ、3)相同DNAを鋳型に修復を行う、という手順で元の配列にはほぼ忠実に切断箇所が修復されるという巧妙な機構であるが、BRCA遺伝子に変異がある細胞ではこのシステムが上手く働かず、ゲノム損傷の蓄積が起こるためがん化につながる。

ところが、BRCA遺伝子変異によってDNA二重鎖切断修復に障害のある細胞に対してPARPも阻害すると、一本鎖修復もできなくなることで、細胞のDNA損傷修復機能が完全に失われるため、細胞死が誘導される。このように、遺伝子変異を持つことによってもともと機能が損なわれている細胞に、外部からさらに別の機能障害を与えることで細胞の生存能を断つことを合成致死といい、PARP阻害薬がBRCA変異獲得細胞に効果を発揮するメカニズムとして理解されている。

一方、分子標的治療薬のもう一つのグループである抗体療法薬は、遺伝子変異により産生される異常タンパク質を標的にするのではなく、腫瘍細胞が細胞表面に過剰に発現する分子をターゲットに用いられるものが多い⁹⁾。HER2の過剰発現が認められる乳がんや胃がんを用いられるトラスツズマブ¹⁰⁾や、多くの悪性腫瘍に対し適応を得ているPD-1抗体のニボルマブ¹¹⁾などが典型的な例である。

分子マーカーとしての遺伝子変異検査の意義

さて、上記のような分子標的治療薬が使用されるには、薬剤が効くことが期待できる症例とそうでない例とを区別する必要がある。そのために行われるのが、コンパニオン診断や、がんゲノムプロファイリング検査と呼ばれるものであり、最大限の薬剤効果を最小限の副作用出現率で得るために、これらの検査が実施されることになる。

コンパニオン診断は、ある患者さんに特定の薬剤を使うことが計画された際に、その薬剤の適応が有るか否かを確認するために行われる検査で、多くの場合、一つの薬剤と一つの検査が一对一対応で紐づけられている。例えば、非小細胞肺がんの腫瘍細胞ではEGFR遺伝子変異が高率に検出され、変異のある手術不能または再発症例の場合には、ゲフィチニブ・エルロチニブ・アファチニブ・オシメルチニブ等のEGFRチロシ

ンキナーゼ阻害剤の投与が考慮されるが、その際には事前にEGFR遺伝子変異検査を実施することが求められている¹²⁾。そのため、EGFR遺伝子のうち、臨床的に重要な遺伝子変異が生じる部位を調べるための検査試薬(コバス[®]EGFR変異検出キット¹³⁾、therascreen[®]EGFR変異検出キットRGQ¹⁴⁾)が、体外診断薬として保険収載されている。最近になって、複数の遺伝子変異と複数の分子標的治療薬とを同時に紐づけて検査する試薬(オンコマイン[™]Dx TargetマルチCDxシステム¹⁵⁾)も実用化され保険収載されているが、これらをどのように効率的に活用するかという点については、今しばらくの議論が必要かもしれない。

一方、ごく最近になって、がんゲノムプロファイリングという、コンパニオン診断とは異なる側面からの遺伝子変異解析も医療に取り入れられた。2019年6月には、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リングのふたつが保険収載され、本稿執筆の2019年8月現在、実施に向け体制整備が進められているところである。これらの検査は基本的に、標準治療終了後の悪性腫瘍の患者さんが対象となり、分子標的治療薬を中心に、患者さんごとの遺伝子変異を考慮に入れた治療方針の決定に役立てるための参考情報として用いられるものである。先に述べた通り、コンパニオン診断は、予め候補となる治療薬剤が決まっており、それら薬剤の適応の有無を確認するために行われるが、がんゲノムプロファイリングの方は、逆に遺伝子変異の方を先にスクリーニングし、そのなかから治療に活用できるものがないか検討するために行われる検査ということになる。

むろん、希少がんや原発不明がんにおいて、多くの遺伝子の変異を同時に調べることによって原発組織の推定に役立つ場合もあるし、現在開発が進んでいる造血器腫瘍の遺伝子パネルでは、どちらかといえば疾患の分類や予後予測にウエイトが置かれるなど、必ずしも分子標的治療だけを念頭に置いて遺伝子パネル検査が行われるとは限らないことを付け加えておく。

がんゲノムプロファイリング検査の手順と、検査精度確保の必要性

次に、がんゲノムプロファイリング検査の実施手順を概説する。先にも述べたように、この検査は複数の遺伝子変異を同時に調べ、そのなかから治療に役立てられそうなものを選別するためのものであるため、対象とする遺伝子は、悪性腫瘍のドライバー変異として知られているものが中心となる。このため、用いる遺伝子パネルによっても異なるが、最大でおよそ数百程度の遺伝子がパネルに含まれるのが一般的である。

検査では、まず腫瘍細胞が十分に含まれる組織標本

を用意し、ここからゲノム DNA を抽出する。ホルマリン固定されたパラフィン組織標本 (FFPE 標本) では、ホルマリンの作用で DNA が切断されるためその後の DNA 増幅に影響が及び、ホルマリン固定時間が 72 時間を超えるとシーケンス・ライブラリー (シーケンスに用いる、増幅された DNA) の作成効率が顕著に低下するとされている¹⁶⁾。またホルマリンは、ランダムに塩基置換も起こす。特に、シトシンを脱アミノ化してウラシルに変換する作用を持ち、ウラシルに置き換わった箇所は DNA を増幅してシーケンスすると、チミンとして検出されることになる¹⁷⁾。従来、がんゲノムプロファイリング検査目的で組織標本が作成・保存されてきたわけではないことから、過去に作成された標本を検査に用いる場合には、一定の割合で検査に適さないものがあることに注意が必要である。また、今後がんゲノムプロファイリングを念頭に置いて標本を作成する場合には、日本病理学会が策定した「ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程」¹⁶⁾に記載の手順を遵守することが望ましい。

加えて、十分量の腫瘍組織が含まれた標本を検査に用いることも重要である。標本中の正常組織の混在割合が高いと、当然そこから抽出される DNA においても正常 DNA の混入割合が高くなり、がん細胞だけが持つ遺伝子変異の検出感度が低下する。仮に腫瘍組織割合 20% で、片側アレルの遺伝子変異であったとすると、標本中の変異遺伝子含有率は 10% ということになる。次世代シーケンサーを用いたがんゲノムプロファイリングの遺伝子変異検出感度は、対象遺伝子や部位にもよるがおよそ 2~10% 程度であるから、確実に変異を検出するためには腫瘍細胞含有率 20% 以上の組織標本を用いることが望ましい。しかしながら、組織によっては、その構成上腫瘍細胞含有率を高めるのが難しい場合もあるし、炎症細胞浸潤が強い場合にも非腫瘍組織の割合が高くなることから、慎重な対応が望まれる。いずれにしても、いかに良質な組織を採取し標本を作成できるかというところで検査自体の出来不出来が決まってくるわけで、検査前プロセスが結果の良否を左右するという点において、他のあらゆる臨床検査となんら変わりはない。

さて、がんゲノムプロファイリングとしての遺伝子パネル検査では、おもにキャプチャー法とアンプリコン法のいずれかにより、対象遺伝子領域の濃縮や増幅が行われる。このうち、現在国内で保険収載されているふたつの遺伝子パネル検査では、キャプチャー法が採用されている。これは、病理組織標本や血液検体から抽出されたゲノム DNA を、いったん超音波などによってランダムに切断し、そのうえで対象遺伝子領域に相補的なプローブ (ベイト) を用いて対象領域を集めて

くる方法である。もう一つのアンプリコン法は、対象領域に対応する多くの PCR プライマーを設定し、マルチプレックス PCR 形式で増幅する方法である。後者のアンプリコン法の方が、比較的シンプルな手順でシーケンス・ライブラリーを作成できるが、頻度の少ない体細胞変異を検出することを念頭に置いた場合、対象領域全体を比較的満遍なくバイアス無しに増幅できるキャプチャー法の方が望ましい。

なお、遺伝子パネルによって対象とする遺伝子は様々であるし、単純な遺伝子の変異だけでなく、Tumor mutational burden (TMB, ゲノム 100 万塩基あたりの変異数で表される数値¹⁸⁾) や Microsatellite Instability (MSI, マイクロサテライト領域の増幅パターンを解析することで導き出される DNA ミスマッチ修復能¹⁹⁾) を算出することをうたっている検査 (FoundationOne CDx) もあるし、腫瘍組織と血液検体のペアで遺伝子解析を行うことで、体細胞変異と生殖細胞系列変異との区別をより明確にすることを可能としている検査 (NCC オンコパネル) もあるなど、それぞれが独自の特徴を持つ。また、現在はまだ保険収載されておらず先進医療として評価中の遺伝子パネルではあるが、東京大学が開発した Todai Oncopanel²⁰⁾ では、DNA だけでなく RNA も解析対象に組み入れることにより、転座による融合遺伝子の検出能力を高めている。生殖細胞系列の割合が高いとされる婦人科系腫瘍では腫瘍・血液のペア解析を使用し、免疫チェックポイント阻害薬の使用も考慮される場合には TMB/MSI を解析可能なパネルを用いるなどの使い分けが必要であろう。この辺りの使い分けについては、今後がんゲノムプロファイリング検査が保険診療として多数行われていく中で、コンセンサスが得られていくことが期待される。

がんゲノムプロファイリング検査の活用によるがん治療成績向上への期待と現状

このように、悪性腫瘍の治療成績を向上させることに繋がるのが期待されているがんゲノムプロファイリング検査ではあるが、海外で行われた大規模な検証でその有用性に対して否定的な結果が出るなど²¹⁾、必ずしも多くの患者さんが恩恵を被るわけではないことが課題である。国立がん研究センターが主導し国内で行われたがんゲノムプロファイリング検査の評価 (先進医療 B: 個別化医療に向けたマルチプレックス遺伝子パネル検査)²²⁾ では、遺伝子変異解析の行われた 187 症例中 156 例 (83.4%) で何らかの遺伝子変異が検出され、そのうち 109 症例 (58.2%) においてアクションブル変異が認められた (ここでいうアクションブル変異とは、既存もしくは評価中の分子標的治療薬に対する感受性ないし抵抗性を規定する遺伝子変異のことと定義され

ている)。一方で、試験登録終了から約1年間の追跡期間中に、遺伝子変異に基づいた分子標的治療が実施された症例は25例(13.4%)と限定的であり、かつ、保険診療として治療がなされたのは6症例に過ぎなかった。すなわち、がんゲノムプロファイリング検査によりアクションナブルな遺伝子変異が検出される割合は高いものの、当該がん種が適応となっていない薬剤であったり、治験に組み込まれる条件を満たさなかったりなどの様々な理由で、遺伝子変異に基づく治療にまで到達する可能性は決して高くないということである。こうしたことを受け、特定の遺伝子変異(分子マーカー)が存在していることを条件として、がん種に関わらず登録可能な形式とした臨床試験(バスケット試験)が行われるなど、治療ストラテジーの改善を図った試みもなされている。しかしながら、がんゲノムプロファイリング検査の一部が保険収載され、これに寄せる期待の大きいなか、この検査が治療につながり効果が得られる患者さんは、現状ではごく一部にとどまるということは理解しておかなくてはならない。むしろ、治療を安全に行うことは何より優先されるべきで、慎重な対応が要求されることは言うまでもないが、検査とそれを基に行われる治療に大きな期待を寄せる患者さんからの多数の問い合わせを受ける現状を鑑み、この検査の性質を社会に十分に理解させるための取り組みも必要であろう。

また、がんゲノムプロファイリング検査は、検査を受ける患者さんのがんの発症や進展に関わる遺伝子変異を検出し、これを治療につなげることに主眼を置いていることは、先に述べた通りである。すなわち、基本的には体細胞遺伝子変異を検出することを念頭に行われるものではあるが、一定の割合で生殖細胞系列変異が見出されることは無視できない。NCCオンコパネルを用いた先行研究では、全体の3.2%(6例)に病的な意義が明らかな生殖細胞系列変異が認められ、主な遺伝子はBRCA1/2(計4例)、TP53、MSH2(各1例ずつ)であった。BRCA1/2変異の検出が最多であるが、実際、卵巣がんを遺伝子パネル検査の対象とした場合には、生殖細胞系列変異の検出率は17.8%であったという報告²³⁾、また人種によっては20%に近いとする報告²⁴⁾もあるので、がんゲノムプロファイリング検査を行う際には、このことも踏まえたパネルの選択が必要となるし、生殖細胞系列変異が認められた場合の、遺伝カウンセリングの実施をはじめとするサポート体制も十分に整えておかなくてはならない。まさに多職種が連携して推進すべき医療であり、全体をシステムとして育成するための土壌の熟成が望まれる。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 厚生労働省：全国がん登録の概要。
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000468976.pdf> (2019年9月8日現在)。
- 2) 厚生労働省：人口動態統計(厚生労働省大臣官房統計情報部編)。
[https://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/dl/cancer_mortality\(1958-2017\).xls](https://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/dl/cancer_mortality(1958-2017).xls) (2019年9月8日現在)。
- 3) 厚生労働省：がん対策推進基本計画。
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/000183313.html> (2019年9月8日現在)。
- 4) 厚生労働省：がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会。
https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/other-kenkou_423605.html (2019年9月8日現在)。
- 5) Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2(5): 561—566, 1996.
- 6) O'Neil NJ, Bailey ML, Hieter P: Synthetic lethality and cancer. *Nat Rev Genet*, 18(10): 613—623, 2017.
- 7) Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*, 361(2): 123—134, 2009.
- 8) Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, et al: Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov*, 7(1): 20—37, 2017.
- 9) Pento JT: Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer. *Anticancer Res*, 37(11): 5935—5939, 2017.
- 10) Ingthorsson S, Andersen K, Hilmarsdottir B, et al: HER2 induced EMT and tumorigenicity in breast epithelial progenitor cells is inhibited by coexpression of EGFR. *Oncogene*, 35(32): 4244—4255, 2016.
- 11) Prasad V, Kaestner V: Nivolumab and pembrolizumab: Monoclonal antibodies against programmed cell death-1 (PD-1) that are interchangeable. *Semin Oncol*, 44(2): 132—135, 2017.
- 12) 日本肺癌学会：肺癌診療ガイドライン2018年版、第5版、金原出版、2018。
- 13) Malapelle U, Sirera R, Jantus-Lewintre E, et al: Profile of the Roche cobas(R) EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 17(3): 209—215, 2017.
- 14) Syed YY: theascreen(R) EGFR RGQ PCR Kit: A Companion Diagnostic for Afatinib and Gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol Diagn Ther*, 20(2): 191—198, 2016.

- 15) Yu TM, Morrison C, Gold EJ, et al: Multiple Biomarker Testing Tissue Consumption and Completion Rates With Single-gene Tests and Investigational Use of Oncomine Dx Target Test for Advanced Non-Small-cell Lung Cancer: A Single-center Analysis. *Clin Lung Cancer*, 20 (1): 20—29 e8, 2019.
- 16) 日本病理学会：ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 羊土社, 2019.
- 17) Do H, Dobrovic A: Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*, 61 (1): 64—71, 2015.
- 18) Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al: Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*, 9 (1): 34, 2017.
- 19) Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, et al: Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem*, 60 (9): 1192—1199, 2014.
- 20) 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*, 110 (4): 1464—1479, 2019.
- 21) Le Tourneau C, Delord JP, Goncalves A, et al: Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 16 (13): 1324—1334, 2015.
- 22) Sunami K, Ichikawa H, Kubo T, et al: Feasibility and utility of a panel testing for 114 cancer-associated genes in a clinical setting: A hospital-based study. *Cancer Sci*, 110 (4): 1480—1490, 2019.
- 23) Hirasawa A, Imoto I, Naruto T, et al: Prevalence of pathogenic germline variants detected by multigene sequencing in unselected Japanese patients with ovarian cancer. *Oncotarget*, 8 (68): 112258—112267, 2017.
- 24) Arts-de Jong M, de Bock GH, van Asperen CJ, et al: Germline BRCA1/2 mutation testing is indicated in every patient with epithelial ovarian cancer: A systematic review. *Eur J Cancer*, 61: 137—145, 2016.

PROSPECTS AND CHALLENGES OF CANCER GENOMIC PROFILING TEST

Hirotsuka Matsui

Department of Molecular Laboratory Medicine, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

Keywords:

Cancer genomics, Cancer genome profiling test, Gene panel testing, Next generation sequencer