

REVIEW ARTICLE

臨床医のための分子病理診断の基礎

谷田部恭¹

A Basis of Molecular Pathology for Clinicians

Yasushi Yatabe¹

¹Department of Pathology and Molecular Diagnostics, Aichi Cancer Center, Japan.

ABSTRACT — It has been a part of daily practice to select patients for targeted therapies according to the results of genetic testing analyses. A basis of tumor molecular pathology is required to understand the advantages and disadvantages of the methods for the proper evaluation of the results. There are two types of cancer-associated genes: oncogenes and tumor suppressor genes. Currently, most molecular targeted therapies are developed for oncogenes, which can be categorized into four major genetic alterations. In this review, the four major genetic alterations, including gene mutation, gene amplification, gene rearrangement and protein overexpression, are reviewed and the detection methods and tissues types to be examined are discussed.

(JLCC. 2015;55:986-990)

KEY WORDS — Molecular pathology, Gene mutation, Gene amplification, Gene rearrangement, Protein overexpression

Reprints: Yasushi Yatabe, Department of Pathology and Molecular Diagnostics, Aichi Cancer Center, 1-1 Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya 464-8681, Japan (e-mail: yyatabe@aichi-cc.jp).

要旨 — 遺伝子テストによる分子標的薬のための患者選択が日常的に行われるようになってきている。その結果を正しく評価するためには分子病理学的な基礎を理解するとともに、それぞれで用いられる手技の長短所を正しく理解する必要がある。腫瘍を形作るがん関連遺伝子変化には、がん遺伝子、がん抑制遺伝子の2種類が存在する。現在、標的となる遺伝子変異のほとんどはがん遺伝子で

あり、それらの変化は遺伝子変異、遺伝子増幅、遺伝子再構成、タンパク過剰発現に大別される。本稿ではそれぞれの遺伝子変化について概説し、その検出方法・検体について説明を加えた。

索引用語 — 分子病理学、遺伝子変異、遺伝子増幅、遺伝子再構成、タンパク過剰発現

はじめに

遺伝子テストによる分子標的薬のための患者選択が、日常的に行われるようになってきている。その結果を正しく評価するためには分子病理学的な基礎を理解するとともに、それぞれで用いられる手技の長短所を正しく理解する必要がある。腫瘍を形作るがん関連遺伝子変化には、がん遺伝子、がん抑制遺伝子の2種類が存在する (Table 1)。特にチロシンキナーゼ活性の阻害に対する薬剤の開

発が進む現在では、治療のターゲットは主にがん遺伝子であり、がん抑制遺伝子についての治療法としては、p53 遺伝子治療などが試みられているのみである。このがん遺伝子を中心に、臨床試験も含めて実際の臨床の現場で用いられる遺伝子変化は4つに大別される (Table 2)。それぞれの変化について適切な検出方法や対象組織が異なっており、その結果を正しく評価するためには分子病理学的な基礎を理解するとともに、それぞれで用いられる手技の長短所を正しく理解する必要がある。それぞれ

¹愛知県がんセンター遺伝子病理診断部。

別刷請求先：谷田部恭，愛知県がんセンター遺伝子病理診断部，〒464-8681 名古屋市千種区鹿子殿 1-1 (e-mail: yyatabe@aichi-cc.jp)。

jp)。

※第55回日本肺癌学会学術集会シンポジウム12「新しい肺癌病理分類〈学術委員会企画〉」。

Table 1. Cancer-associated Gene Alterations

Oncogenes
<ul style="list-style-type: none"> • Oncogenes are genes that promote cancerization. An alteration of one allele is sufficient to have a promoting effect. • Most mutations are located in the tyrosine kinase domain. • EGFR, KRAS, ALK, HER2, BRAF
Tumor suppressor genes
<ul style="list-style-type: none"> • Tumor suppressor genes are genes that suppress cancerization. • Two allelic involvements are required to promote cancerization. • It is rare to use tumor suppressor genes for cancer treatment. • p53, p16, RB

Table 2. Four Major Types of Gene Alterations That Are Used in Clinical Practice

Gene alterations	Major genes involved in lung cancer	Detection methods	Required samples
Gene mutation	EGFR, KRAS, BRAF, HER2	PCR direct sequencing Mutation specific PCR	FFPE, frozen, unfixed tissues
Gene amplification	FGFR2, MET	FISH	FFPE tissues
Gene rearrangement	ALK, ROS1, RET	FISH RT-PCR direct sequencing	FFPE tissues Frozen tissues
Protein overexpression	EGFR, MET, PD-1, PD-L1	IHC ELISA	FFPE tissues Unfixed, frozen tissues

について解説を進めていくこととする。

1. 遺伝子変異

遺伝子配列の変化をきたし、点突然変異、遺伝子挿入、遺伝子欠失などがある。この変化をきたす遺伝子としては、肺癌ではEGFR, KRAS, BRAF, HER2が知られており、KRAS, BRAFは点突然変異であるのに対し、HER2は遺伝子挿入、EGFRでは点突然変異、遺伝子挿入、遺伝子欠失のいずれの変異も呈する。

EGFR 遺伝子変異は、チロシンキナーゼ領域に生じ、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の効果予測因子として広く臨床の現場で用いられている。その変異の90%以上はホットスポットと呼ばれるエクソン19、エクソン21に集中し、それぞれのエクソンで変異タイプが異なる。エクソン19では遺伝子欠失が生じるが、3の倍数の塩基が欠失し、欠失部以外のタンパク配列は保たれるため、in-frame 欠失と称される。これは、通常の遺伝子欠失とは異なり、タンパク質の大きな質的变化を伴うことはない。これに対して、エクソン21ではL858Rの点突然変異を示し、コドン858の配列CTG(Leu)の配列がCGG(Arg)に変化する。

検出方法：いずれの変異でも2対の遺伝子の1対に変異が生じるため、腫瘍細胞：正常細胞=1：1の場合、少なくとも25%の変異DNAを検出する感度が求められる(Figure 1)。直接塩基決定法の感度は20%にとどま

り、この方法は推奨されていない。EGFRにおいては少なくとも2つの変異タイプを検出する必要がある点で工夫が必要であり、特にエクソン19の欠失パターンには多くの種類があり、方法によっては欠失パターンによって検出できなかったり、検出感度が大きく異なる場合がある。EGFR 変異が検索されたEGFR チロシンキナーゼ阻害薬の主だった第III相試験におけるEGFR 検査方法をTable 3にまとめた。

検体：病理組織標本は腫瘍の確定診断に用いられることからほとんどの肺癌症例で施行され、変異検査はそれを用いて行われることがほとんどである。そのため、生検組織、細胞診標本、手術標本が主な検査対象組織である。組織標本はホルマリン固定の際に断片化され、長時間の固定を行うとPCRによる増幅ができない場合があるため、6~48時間での固定が推奨されている。これに対して細胞診標本ではアルコール固定を用いており、核酸の保持に優れている。しかしながら、組織型の決定に免疫染色が施行困難で、腫瘍細胞含有量の確認が難しいなど偽陰性が起こりやすいことも念頭に置く必要がある。低侵襲な細胞診の利点を最大限利用する方法としてセルブロックがあり、積極的な運用が推奨されている。

2. 遺伝子増幅

正常細胞では遺伝子コピー数は通常2であるが、それががん細胞では増加することがある。ゲノムワイドのコ

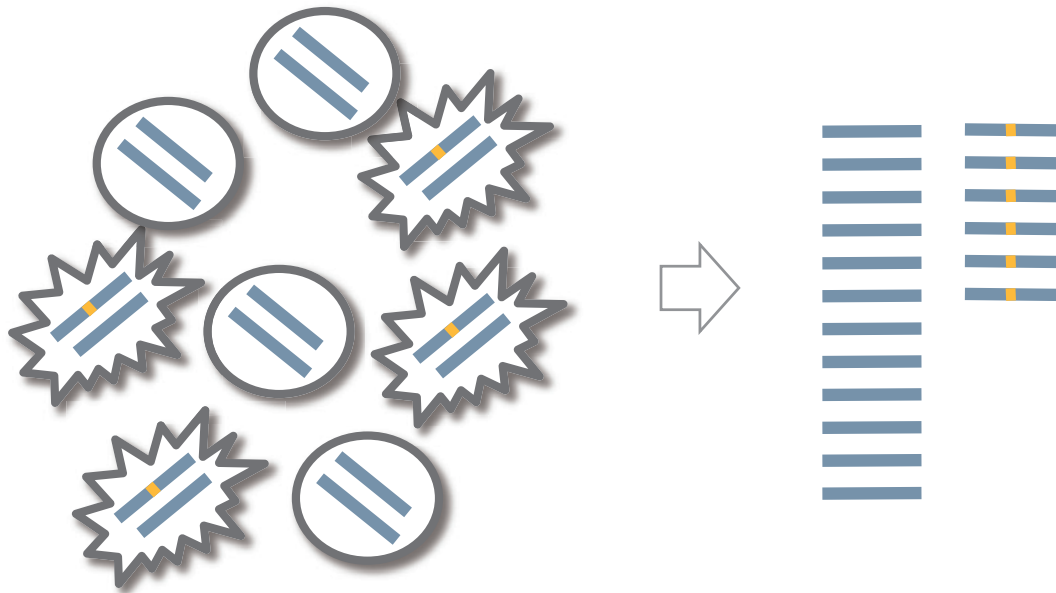


Figure 1. Detection of an oncogene in a clinical sample. It is common to mix the tumor cells with normal cells in the clinical samples, and an oncogene may affect one of the alleles. Therefore, to detect the mutation in clinical samples admixed at a 1:1 ratio of tumor to normal cells, a sensitivity of at least 25% is required.

Table 3. EGFR Mutation Detection Methods in Major Clinical Phase III Trials

Phase III trial	Methods	Sensitivity	Targets
IPASS	Therascreen EGFR	1%	Most known mutations
First-SIGNAL	Direct sequencing	20%	Any mutations
WJTOG 3405	Cycleave PCR	1%	Most known mutations
NEJGSG002	PNA-LNA PCR clamping	1%	Most known mutations
OPTIMAL	Cycleave PCR	1%	Most known mutations
EURTAC	Cobas EGFR	5%	Known mutations
Lux-Lung 3, 6	Therascreen EGFR	1%	Most known mutations

ピー数上昇はプロイディパターンとして表記され、遺伝子増幅といった場合は特定の領域での増加を示す。通常の遺伝子増幅では、そのコピー数が20倍以上に増加した状態を指すが、5~6倍の増加も含めることもある。乳癌、胃癌におけるHER2遺伝子増幅はトラスツズマブに対する効果予測因子として知られているが、肺癌では扁平上皮癌におけるFGFR2遺伝子増幅 (Figure 2) などが検索されている。

検出方法と検体：腫瘍組織においては、腫瘍細胞は常に正常細胞と混在し、たとえ腫瘍細胞に遺伝子増幅があったとしても、その正常細胞の混在程度に応じてコピー数の増加を正確に検出することは難しくなる。そのため、腫瘍組織から抽出した核酸では検出することは難しく、腫瘍細胞を同定可能なFISH法による解析が行われている。FISH法では、核酸を熱変性により一本鎖にす

る必要があり、熱に強い組織が必要とされる。そのため、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織が好んで用いられる。

3. 遺伝子再構成

染色体転座、染色体逆位などにより異なる遺伝子間で融合タンパク質が形成され、それが増殖促進などに働くことで、がん化を促す。ALK遺伝子再構成などがその代表例であり、EML4との融合の場合は遺伝子逆位、KIF5Bでは遺伝子転座で融合タンパク質が生じる。逆位は、“内臓逆位”と同様に単なる逆転現象とのニュアンスがあり、欠失を伴うことの多い転座とは異なると考えられていることから、その構造変化はALK遺伝子再構成と総称される。これらの遺伝子融合によって、ALKキナーゼが異なるプロモーター下で発現をきたし、腫瘍原性を示す。

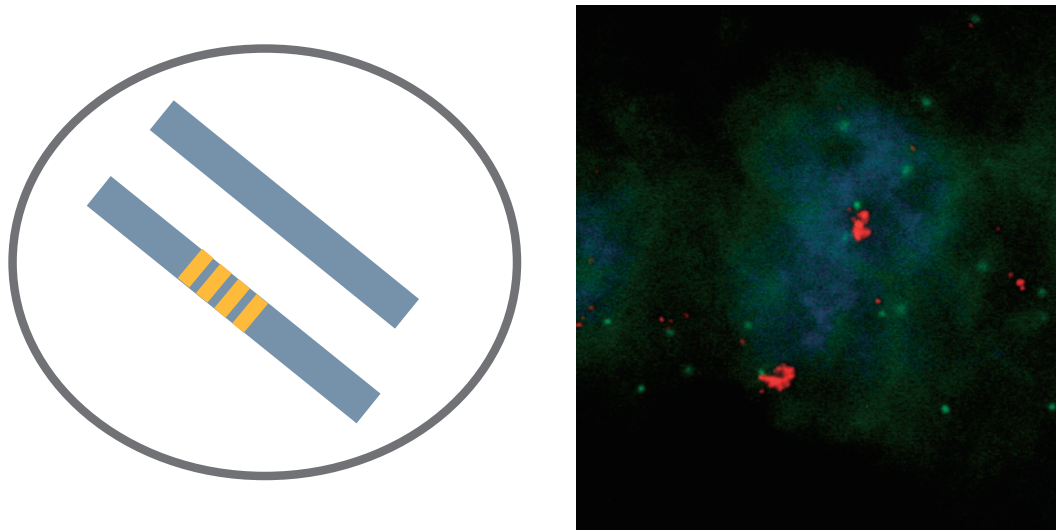


Figure 2. Schematic illustration of gene amplification (left) and FGFR2 amplification in lung adenocarcinoma (right). Clusters of red signals denote amplified signals.

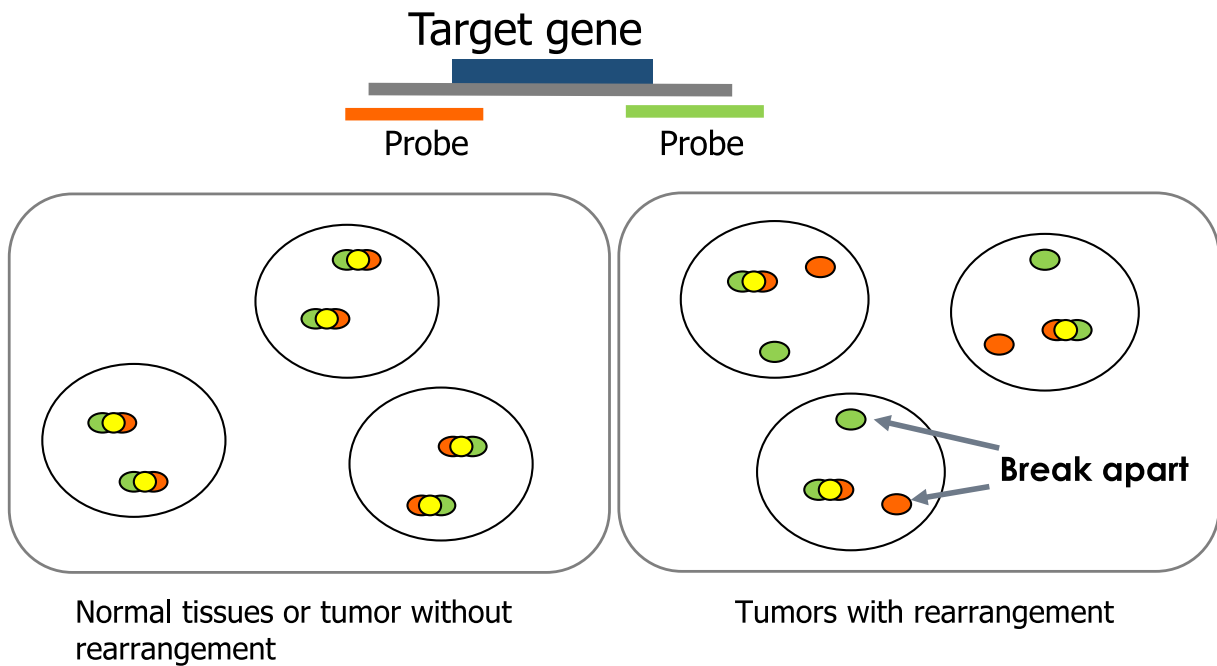


Figure 3. Schematic illustration of break apart FISH. In the normal tissues and tumors without gene rearrangement, tandem signals were seen with a portion of merged yellow signals. In contrast, during gene rearrangement the gene is located separately in the nuclei, thus the two signals were separated (break apart signals).

EML4, KIF5B の他にも融合パートナーが知られている上、EML4-ALK の変異でも 18 を超えるパターンが報告されている。

検出方法と検体：融合転写物を検出する RT-PCR 法、遺伝子再構成による DNA 構造の違いを捉える FISH 法、遺伝子再構成に伴うタンパク発現を検出する免疫組織化学 (IHC) 法が知られている。RT-PCR 法は、正常で

は存在し得ない融合転写物の検出を試みるため、抽出された RNA 品質が保たれていることが必要条件となる。そのため、FFPE 組織での解析は困難であり、新鮮組織が得られる細胞診検体などでの検索が必要である。FISH 法では、再構成切断点の前後の遺伝子領域をカバーするプローブを用いてシグナルの分離を見る break apart 法 (Figure 3) が用いられることが多い。対象となる組織検

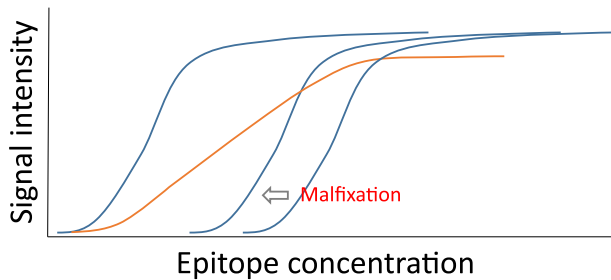


Figure 4. Schematic illustration of the relationship between the signal intensity and epitope concentration in the tissues. The color indicates IHC detection methods; the slope angles are associated with the sensitivity of the methods. As the epitope concentration can be decreased due to malfixation, the signal intensity may be altered according to the fixation status, in addition to the intrinsic epitope concentration.

体は遺伝子増幅と同様である。ALK 再構成を検出するための IHC 法では、ALK タンパクは正常肺組織では発現しないため、肺組織で ALK タンパクが発現していれば何らかの異常があることを利用している。すなわち、遺伝子再構成により異なるプロモーター下で発現をきたし、ALK キナーゼ領域のタンパク質を発現する現象を検出している。検索対象としては生検、手術検体、セルブロックなどの FFPE 組織標本が用いられる。細胞診検体にも応用可能であるが、FFPE 組織用の染色条件とは異なり、至適条件を細かく設定する必要がある。

4. タンパク過剰発現

タンパクの同定には、IHC 法、ELISA 法、質量分析法などが存在する。肺癌診療においては、血清中の CEA、proGRP、NSE などの腫瘍マーカーの多くは ELISA 法を原法とする方法で計測している。また、細菌の同定に質量分析器を用いた迅速同定システムなども実臨床で用いられている。これに対して、腫瘍細胞におけるタンパク発現を効果予測に用いることも行われている。EGFR 抗

体薬であるセツキシマブを上乗せする FLEX スタディでは、大腸癌と同様に IHC 法による EGFR 発現陽性の進行非小細胞癌を対象にし、セツキシマブの上乗せ効果を示したが、そのサブセット解析で、EGFR 高発現群と低発現群では有意に効果の差が観察されたことが示されている。また、MET 抗体薬である METmab においても、第 II 相試験のサブセット解析での IHC による MET 高発現群に有意な効果が認められ、高発現群に第 III 相試験も施行されたが陰性の結果が見られた (METLung 試験)。現在、抗 PD-1/PD-L1 薬による新しい治療が注目を集めているが、PD-L1 発現腫瘍により高い治療効果が認められることが報告されており、効果予測を行う方法の 1 つと目されている。

検出方法と検体：実際の臨床の場で用いることのできる組織は FFPE 組織であり、上記の臨床研究・試験では生検や手術標本が用いられた。また、上記の臨床試験のように IHC 法による定量評価を試みる臨床試験/研究も行われているが、多施設共同試験における IHC 定量評価は理論上難しいとされている。組織内に含まれる抗原エピトープ量は固定操作によって変化することが知られている。そのため、同一の免疫染色システムを用いてもその発現強度は固定状況によって異なることになる (Figure 4)。そのため、固定状況の近似している単一施設では IHC 法による定量評価は可能であっても、複数施設間では固定状況の差を見ているにすぎない可能性もある。

まとめ

分子病理学的な基礎を理解するため、臨床で用いられる 4 つの遺伝子変化について、その概要と検出方法・検体を述べた。遺伝子というとりつきにくい点もあるかもしれないが、臨床の現場ではすでに多くの遺伝子テストが施行され、新規発見遺伝子の臨床応用も試みられている。それらの理解につながれば幸いである。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし