

The 30th Lung Cancer Workshop

マルチ診断薬による肺癌最適化医療に向けての取り組み

西尾和人¹

Multiplexed Diagnostics for Precision Medicine in Lung Cancer

Kazuto Nishio¹

¹Department of Genome Biology, Kinki University Faculty of Medicine, Japan.

ABSTRACT — The clinical implementation of genetic profiling for lung cancer is warranted to allow precision medicine for individual lung cancer patients. We currently apply next-generation sequencing (NGS)-based clinical sequencing to detect driver mutations that may inform treatment recommendations in lung cancer. We prospectively applied amplicon sequencing panels and assays to determine variants of *ALK*, *RET*, *ROS1*, and *NTRK1* fusion transcripts in patients with lung cancer. We then determined the proportion of patients who received genotype-directed therapy and their overall survival (OS). Tumor FFPE specimens were successfully analyzed by NGS. The OS of patients with advanced or recurrent cancer who had driver mutations followed by targeted therapy was significantly longer than that of patients with no mutations or those with a mutation not treated with targeted therapy. This Kindai Clinical Sequencing for lung cancer patients can assist physicians in matching patients with approved or experimental targeted treatments.

(JLCC. 2016;56:48-54)

KEY WORDS — Next-generation sequencer, Clinical sequencing, FFPE, Liquid biopsy, Driver oncogene

要旨 — **背景・目的.** 肺癌薬物療法において、遺伝子異常を特定し治療選択を行う最適化医療が進んでいる。たとえば *ALK* 融合遺伝子の検出などの診断キットは、*ALK* 阻害剤の適否に必須であり、コンパニオン診断薬と呼ばれる。今後複数のドライバー遺伝子の検出を行う必要があり、マルチ診断技術を用いたクリニカルシーケンスの実施が重要である。我々は、クリニカルシーケンスの実施可能性、臨床的有用性を検討した。近畿大学医学部およびゲノムセンターにおいて、次世代シーケンサーを用い、マルチ診断薬のプラットフォームを構築し、その非臨床性能試験の後、臨床的な実施可能性を探るため、同附属病院受診の患者のうち、同意を得た患者のホ

ルマリン固定パラフィン包埋腫瘍薄切を用いて、抽出した核酸を用い、各種ターゲットリーシーケンスを実施、標的となり得るドライバー遺伝子が陽性の患者は適応となる分子標的薬治療を受けた。**結果.** クリニカルシーケンスによりドライバー遺伝子陽性で、対応する分子標的薬の治療を受けた患者は、そうでない患者に比し生存率が良好であった。**結論.** 非小細胞肺癌患者において、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍薄切を用いたクリニカルシーケンスの有用性が示された。

索引用語 — 次世代シーケンサー、クリニカルシーケンス、ホルマリン固定パラフィン包埋、リキッドバイオプシー、ドライバー遺伝子

はじめに

肺癌薬物療法の変遷を振り返ってみると、2004年に epidermal growth factor receptor (*EGFR*) 遺伝子変異がドライバー遺伝子として発見され、*EGFR* チロシンキ

ナーゼ阻害剤 (*EGFR*-tyrosine kinase inhibitor ; *EGFR*-TKI) が上市された。また anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) 融合遺伝子が2007年に発見され、*ALK* 阻害剤が既に臨床の現場で使用されるようになった。今は分子標的薬の時代とされる所以である。また今後は免疫チェッ

¹近畿大学医学部ゲノム生物学。

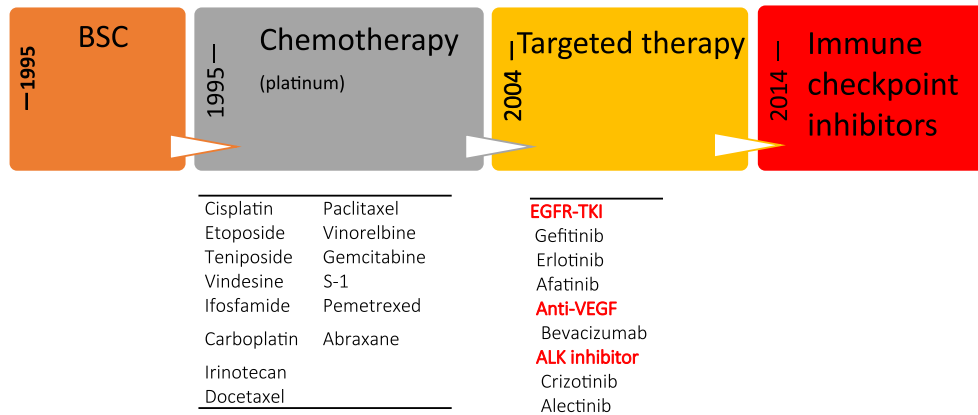


Figure 1. Historical tradition of lung cancer treatment.

クポイント阻害剤の登場が期待されている (Figure 1)。

分子標的薬の登場により肺癌薬物療法は、個別化医療、最適化医療の時代になったと考えられている。ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する ALK 阻害剤の適応など、遺伝子異常を標的とした分子標的薬の使用に当たっては、適応基準として遺伝子異常を有する肺癌であることが必要となる。このように分子標的薬と診断薬が一体となって申請・承認を受けること、すなわち、バイオマーカーを利用して医薬品の投与患者を特定することが必要となり、それらが医薬品の適応となる場合には、原則体外診断薬により適応の可否を判定することとなる。医薬品医療機器総合機構では、疾患などに関連するバイオマーカーを利用して医薬品の投与患者を特定する場合、当該医薬品使用の前提として、体外診断用医薬品を使用することとなるが、このような治療の選択などに用いられることにより個別化医療に資する体外診断薬を「コンパニオン診断薬」と呼ぶとし、当該医薬品の有効性および安全性は、コンパニオン診断薬の性能に直接的な影響を受けるものであるとしている。肺癌における最適化医療の進展に伴い、バイオマーカーにより適応を決定するコンパニオン診断薬が増加していくとも考えられている。現時点では、EGFR 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子の存在、ROS1、RET 融合遺伝子の存在などが、同一患者由来腫瘍組織で検査することが必要であると考えられている。もとより、生検肺癌組織サンプルの採取は侵襲的で、量的にも限られており、困難さを伴うことから、希少なサンプルを効率的、有効的に用い、複数の遺伝子異常を解析する方法の開発も望まれている。これらの診断技術はマルチ診断薬 (multiplexed diagnostics) と呼ばれる。このマルチ診断薬を可能にするテクノロジーとして、種々のものが開発されている。本ワークショップでは肺癌最適化医療に向けた、マルチ診断薬開発への我々の取り組みを報告した。

1. 次世代シーケンシング技術

国際ヒトゲノム計画 (1990~2004 年) で、ヒトゲノムが解読された。2004 年に米国 NIH (National Institutes of Health) の NHGRI (National Human Genome Research Institute) が発表した「1000 ドルでヒトゲノムを解析する」技術への研究資金により、次世代シーケンサー (next-generation sequencer ; NGS) の普及をもたらした。最近では“第二世代”、“第三世代”といった技術も開発されている。技術の進歩に伴い、がんの全ゲノム解読が実現可能となり、これまで明らかにされていなかった新しいがん関連遺伝子の発見が急激な勢いで進んでいる。

従来使われてきた塩基配列決定法は、サンガー法 (ジデオキシ法) という方法を原理とするシーケンサーである。通常は ATCG の 4 種類のヌクレオチドにそれぞれ蛍光標識したものをを用いて DNA の伸長反応を行い、標識した蛍光の違いにより配列を決めることができる。1 ランで約 1000 塩基程度を解読できる。一方で、サンガー法を原理としない方法でシーケンスを行うシーケンサーを総称して NGS と呼んでいる。30 億塩基の長さのあるヒトゲノム配列を安価に速く決定したいという目標に向かって開発され、数十~百塩基ぐらいの短い配列を大量 (数億~十数億個) に決定できる技術が開発された。

NGS は大量に短い配列を決定するという特性が故に、エラーの問題が必ず存在する。エラーの問題も含めて、NGS 解析からは膨大な情報量が得られるため、これらのデータから意味を抽出し、データと情報処理を直接行うバイオインフォマティクスに加えて、生物学的な意味づけ、医学的な情報を加味した解析技術が必要である。

一方、IonPGM system, MiSeq (Illumina 社) などのベンチトップマシンの登場により、汎用性・スループット性が向上し、多検体のシーケンシングが可能となっている。これらの機器の解析では、ホルマリン固定パラフィ

ン包埋切片を用いた測定に対応可能であり、必要検体量も少量であることから、診断機器としての実現化に向けた取り組みが進んでいる。既に欧米では、診断機器としてのNGSが承認されつつある。

NGSは配列決定ができるだけでなく、多数のDNA断片を同時にシーケンシングし、ゲノム配列決定だけでなく様々な用途にNGSが使用される。新規のゲノム配列決定のみならず、ゲノム配列の差異（変異）の同定、RNAの配列決定、RNA量（発現）の決定、修飾を受けているゲノム部位の同定とその頻度の定量、タンパク質核酸複合体に含まれる核酸の配列と量の決定、ゲノムのコピー数解析（増幅・欠損）など、様々に広がってきている。

全ゲノムの中でも、タンパク質をコードしているエクソンをすべて解読することを全エクソン解読（エクソーム解読）と呼び、現在がんゲノム解析研究では最も汎用されている手法である。¹ 全ゲノム解読はゲノム全体をシーケンスすることでタンパク質非コード領域も含めたすべての変異、転座、逆位、染色体再構成およびコピー数変化を検出できる方法である。RNAseqと呼ばれるトランスクリプトーム解析では、RNAを解読することで、新規転写産物の同定や既知遺伝子を含めた転写量を定量することができ、融合遺伝子の探索にも利用できる。miRNAのような非常に短いRNAのシーケンスや、特殊な方法でより多様な非コードRNAを同定することも可能である。NGSではメチル化異常についても広く解析することができる。NGSを用いて診断・治療に有用な既知の遺伝子変異（EGFR遺伝子変異やBRAF遺伝子変異など）に焦点を絞って解析を行うことをターゲットリーシーケンスと呼ぶ。特に臨床への応用が期待されているため、クリニカルシーケンスとも呼ばれている。

上記のRET融合遺伝子の報告には、NGSによる発見も含まれている。他にもここ数年の間に受容体型チロシンキナーゼであるNTRK1の融合遺伝子、RASスーパーファミリーに属するRIT1というキナーゼ遺伝子や、RAFのファミリーであるARAF・CRAFの遺伝子変異などが新規ドライバー遺伝子として低頻度ながらも報告されており、治療標的として期待されている。またinvasive mucinous typeの腺癌でドライバー遺伝子となる新たな融合遺伝子として、HERファミリーのリガンドであるNRG1の融合遺伝子やHER4、BRAFの融合遺伝子も見つかっている。しかしながらこれら遺伝子異常は肺癌全体で見ると数%と稀であると考えられており、ドライバー遺伝子の多くは既に同定された可能性がある。

2. 遺伝子発現解析としてのRNAseq

腫瘍検体を用いた遺伝子発現解析はmicroarrayによ

りその実施が可能であったが、ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた網羅的な解析には限度があった。しかし、NGSの登場によりRNAシーケンス（transcriptome）が可能となった。我々は、日赤グループとの共同で、肝細胞癌の生検サンプルのホルマリン固定標本から微量RNAを抽出し、その遺伝子発現解析を実施し、sorafenibの効果に関連する遺伝子候補を特定することに成功した。² これらホルマリン固定パラフィン包埋を用いた実施成功率は高く、十分に日常診療の範囲で実施可能である。

臨床現場においても遺伝子発現解析を用いたOnco-type DxやMammaprintなどは、パラフィン切片からRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて何種類かの遺伝子発現を測定解析する検査である。これらの遺伝子発現プロフィールから「低リスク」「中間リスク」「高リスク」に分類することで、術後化学療法 of 適否を判断することができる。

同様の遺伝子発現解析に基づく予後予測モデルは肺癌においても開発されており、NGSを用いた、ホルマリン固定標本を用いたRNAseqも十分に可能であり、今後のバイオマーカー研究の進展が期待される。

3. マルチ診断薬の開発

がんの分子標的薬のコンパニオン診断の重要性は、広く議論されている。発展に向けた課題の一つは、マルチ（multiplexed）診断技術の早期診断薬化であると考えられる。NGSなどを用いた解析技術は急速に進歩しており、現在ではホルマリン固定パラフィン包埋サンプルから抽出した微量DNAおよびRNAの解析が可能となっている。現在では10 ng程度の核酸でターゲットリーシーケンシングすることが可能となった。限られた臨床サンプルで複数回にわたり別々に遺伝子検査を実施することは、時間的、サンプル量、費用などの面において非効率的である。

一方、マルチ診断薬化に向けては、実例がなく手探り状態である。官民学一体となって新たなガイドラインの選定を含めた早急な整備が必要である。マルチ診断薬の場合、従来のコンパニオン診断の枠に当て嵌まらない点について、一定のコンセンサスを得ていくことも必要と考えられる。具体的には、解析する対象遺伝子などが多数であり、必ずしも一対一対応でない点、非常に稀な遺伝子変異の臨床的有用性をすべて網羅すべきなのか、incidental findingsにも関わる問題であるが、一対一対応以外の遺伝子の解析はどのように許容されるのか、といった点などが挙げられる。これらの点は、MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, and MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assayの米国食品医薬品局

Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Research Panel v2

Colon and Lung Cancer related 22 genes

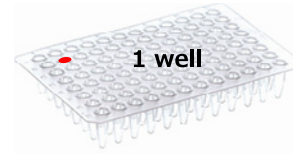
AKT1	CTNNB1	ERBB2	FGFR1	KRAS	NOTCH1	PTEN	TP53
ALK	DDR2	ERBB4	FGFR2	MAP2K1	NRAS	SMAD4	
BRAF	EGFR	FBX7	FGFR3	MET	PIK3CA	STK11	

92 amplicons

Run: 10 samples/318v2 chip

Total reads per sample: 200000 – 500000

Read counts per amplicon : 2000 – 5000



RNA Fusion Lung Cancer Research Panel

Lung Fusion

ALK	RET	ROS1	NTRK1
-----	-----	------	-------

85 amplicons

Run: 16 samples/318v2 chip

Total reads per sample: 150000 – 400000

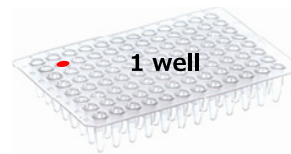


Figure 2. Amplicon sequencing and RNA Fusion Panel for lung cancer. Somatic mutations are detected using -10 ng DNA obtained from FFPE samples. Fusion genes are detected by RNA sequencing.

(Food and Drug Administration ; FDA)承認のように、海外では遺伝病の検査の領域で一定の進捗があるように見受けられる。またそれが我が国における申請・承認の迅速化に追い風となると期待できる。ただし、マルチ診断薬開発に当たっては、従来にも増して、より高い検査精度、臨床的有用性など、診断薬として妥当な性能を示すことが、今後の発展には重要である。その高い信頼性を担保するために、臨床性能試験において大規模な前向き試験が必要であるのか、アーカイブサンプルでの解析が許容されるのかといったことも気になる点である。このような議論は、実際の申請作業あるいは事前相談の中で深めていくということも重要である。その際、コンパニオン診断薬であるから、治療薬開発側とも密に協力することが必要と考えられる。開発スピードも重要な点である。診断薬の開発の遅れが、治療薬の承認の遅れを引き起こすことがあってはならない。スムーズな協力開発体制を整備しておくことが、コンパニオンラグを少なくすることにつながると思われる。

コンパニオン診断薬の開発において、診断薬の標準化も重要な点であると思われる。分子標的薬のコンパニオン診断は、既に希少フラクションを対象とするものが多くなっている。また、国際共同試験が実施されることも多く、共通プラットフォームを用いた診断薬開発も重要

となる。我々は、OncoNetwork Consortium に参画し、Colon and Lung Cancer Genes Hot Spot Panel, ALK, RET, ROS1 fusion を検出する NGS panel の開発を行ってきた (Figure 2)。肺癌分野においては、必要検体量や測定項目の臨床的意義から、上記のマルチプレックスパネルは、診断薬化に向けての可能性が高いと期待されている。一方、海外からの技術導入だけではなく、我が国発の技術が海外でも標準的に用いられることも期待したい。

一方、臨床試験のためのデザイン、稀な遺伝子異常を有する肺癌に対しての特異的な分子標的薬の臨床試験は、その対象患者をリクルートすることが一番のキーとなる。UMBRELLA Trial や、BASKET Trial, NCI-MATCH といった、遺伝子異常により対象薬剤を振り分ける研究が欧米では盛んであるが、我が国では、薬剤側のラインナップに困難さを伴う。急速にそのような体制を構築する必要がある。我が国においても既に、LC-SCLUM, SCRUM JAPAN などのアプローチが注目されている。近畿大学では NGS を用いて、特定の薬剤に対してのスクリーニングがはじまっている。

4. 近大クリニカルシーケンス

上記のような状況を踏まえ、個々の患者の最適化治療を選択することを可能にするクリニカルシーケンスを開

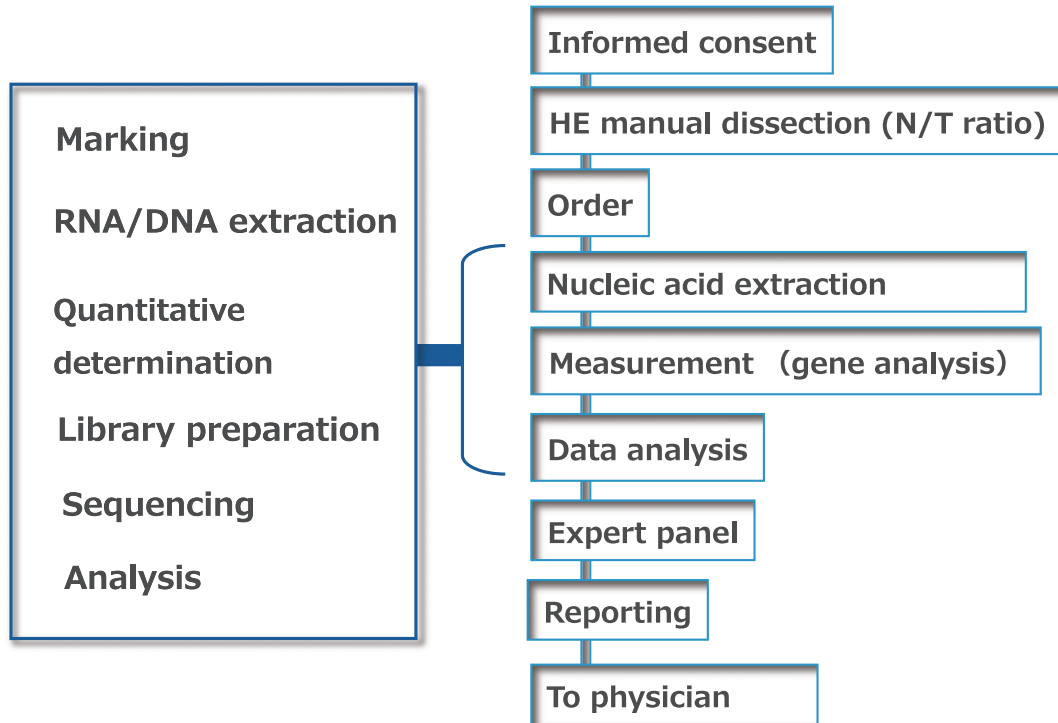


Figure 3. Process of Kindai Clinical Sequencing.

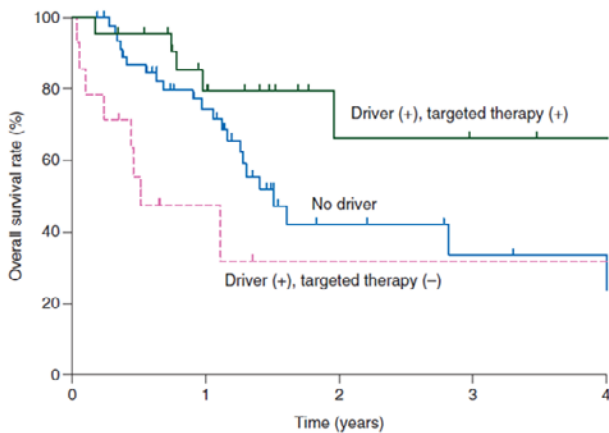


Figure 4. Effect of therapy targeted to genetic alterations on the overall survival (OS) of lung cancer patients. Patients with advanced or recurrent lung cancer were examined for the OS according to the absence or presence of an actionable genetic alteration (oncogenic driver) and treatment (or no treatment) with a corresponding targeted agent (Reference 3).

始している。その実施拠点として、近畿大学ライフサイエンス研究所ゲノムセンターを設立し、稼働を開始した。本プロジェクトでは、倫理委員会の承認を得て、同意を得た上で、近畿大学医学部附属病院における患者の、主にホルマリン固定パラフィン包埋生検サンプルを用いた

ターゲットリーシーケンシングを実施している。

非小細胞肺癌においては、Figure 3のように、研究事務局に解析レポートを提出し、専門家によるレビューを経て、検体提出者に解析結果をフィードバックしている。同時に個々の腫瘍に適切と考えられる薬剤の候補を提示し、それらが未承認薬剤の場合には現在進行中の臨床試験の情報をレポート内容に組み込んでいる。

2014年度に近畿大学において実施した肺癌の生検サンプルを用いたNGSによる遺伝子異常解析では、ドライバー遺伝子陽性でそれに対応する分子標的薬を実施した群が、そうでない群に比べて生存率の向上が認められた (Figure 4)。³ このことは同クリニカルシーケンシングの実施の意義を示したものと考え、最適化医療に貢献し得ることを示している。

同クリニカルシーケンシングの対象を非小細胞肺癌以外に拡大した。既に、卵巣癌、乳癌、大腸癌、肉腫、原発不明癌など多種多様な腫瘍を有する患者の希望に対応している (Figure 5)。同クリニカルシーケンシングの実施が、治療成績の向上につながるか否かを検討したいと考えている。

5. リキッドバイオプシーへの展開

血中遊離DNA (cfDNA) はがんの遺伝子異常を検出する手段として、非侵襲的でありモニタリング可能な方法として注目されている。特に分子標的薬に対して耐性と

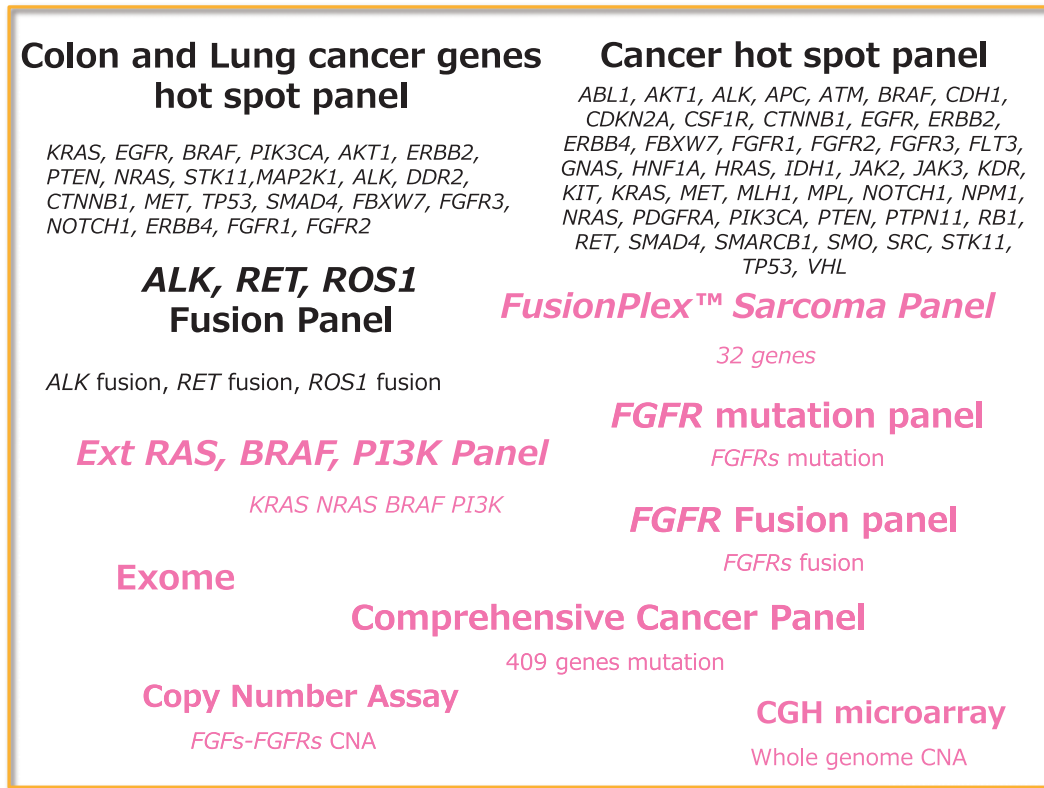


Figure 5. Kindai Clinical Sequencing II. Clinical sequencing has been developed for various types of solid tumors. The current assay platform for clinical sequencing II includes the NGS system, CGH array, and copy number assay.

なった場合に、cfDNAによりモニタリングすることにより、耐性克服を目指すアプローチが進められている。最近ではNGS、デジタルPCRなどの高感度、multiplexedのアッセイ系がcfDNA解析に導入され、臨床試験が進んでいる。NGSを用いても検出が可能である⁴が、ただし低頻度で存在する変異DNAの検出については、NGSの場合、DNA増幅時のエラーや配列同定エラーなどの可能性を考慮しなければならない点や、絶対的定量を行うことが困難である点がある。一方、変異DNAの検出におけるデジタルPCR機器の欠点は、特定の変異/DNAしか分析できない点である。これらの超高感度アッセイ技術を用いた、臨床有用性を証明する研究が進んでいる。

6. 肺癌におけるリキッドバイオプシー診断薬化へ向けての取り組み

临床上EGFR変異陽性肺癌に対し、ゲフィチニブに初期には奏効したほとんどすべての症例が、後には抵抗性となる。これらの耐性例の約半数にもととの欠失やL858RなどのEGFR遺伝子変異に加えて、コドン790のスレオニンからメチオニンへの変異(T790M)が二次

的に加わっている。⁵したがって、EGFR変異陽性肺癌のEGFR-TKI耐性例に対する治療戦略が重要であり、次世代EGFR-TKIの使用が注目されている。T790M変異の発現に対して、野生型の抑制なく同変異を特異的に阻害する複数の第三世代のEGFR-TKIの開発が進んでいる。EGFR-TKI耐性出現時に再び遺伝子検査を実施することにより、そのメカニズムに応じた治療選択が可能となることが期待される。ひいては、個別化医療の推進につながる。しかし、実施上、再生検(re-biopsy)が困難なことが多く、cfDNAにおける二次変異の検出が注目されている。我々はScorpion-Arms(感度1%程度)、MassArrayを用いたSABER法(感度0.3%程度)を用いて、血漿中のT790M変異を含むEGFR遺伝子変異の検出の検討を行ってきた。⁶最近では我々も含めて、BEAMing法やデジタルPCR法、NGSを用いた検出が行われている。同様のアプローチでは、ALK融合遺伝子などを血中で検出を試みるアプローチも開始している。たとえば久留米大学との共同研究では、久留米大学病院でEGFR-TKI後にPDとなった非小細胞肺癌患者から得た血清1~2mlを用い、cfDNAを抽出し、耐性に関与

するゲートキーパー遺伝子 T790M をデジタル PCR を用いて検出した。すなわち re-biopsy とリキッドバイオプシーの一致率を見た。結果、感度 81.8%、特異度 85.8%、一致率 83.3% の良好な成績を得ている。⁷ また、NGS を用いても、同様に cfDNA を用いた検出が可能であることを示しており、日常診療への応用は近いと考えている。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

REFERENCES

1. Nagai H, Oiso N, Tomida S, Sakai K, Fujiwara S, Nakamachi Y, et al. Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation with noncicatrical alopecia: Identification of a recurrent p.P25L mutation in KRT5 in four affected family members. *Br J Dermatol*. 2015 [Epub ahead of print]
2. Sakai K, Takeda H, Nishijima N, Orito E, Joko K, Uchida Y, et al. Targeted DNA and RNA sequencing of fine-needle biopsy FFPE specimens in patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Oncotarget*. 2015;6:21636-21644.
3. Takeda M, Sakai K, Terashima M, Kaneda H, Hayashi H, Tanaka K, et al. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26:2477-2482.
4. Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, Yoneshige A, Ito A, Togashi Y, et al. Extended RAS and BRAF Mutation Analysis Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One*. 2015;10:e0121891.
5. Suda K, Murakami I, Sakai K, Mizuuchi H, Shimizu S, Sato K, et al. Small cell lung cancer transformation and T790M mutation: complimentary roles in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Sci Rep*. 2015;5:14447.
6. Sakai K, Horiike A, Irwin DL, Kudo K, Fujita Y, Tanimoto A, et al. Detection of epidermal growth factor receptor T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci*. 2013;104:1198-1204.
7. Ishii H, Azuma K, Sakai K, Kawahara A, Yamada K, Tokito T, et al. Digital PCR analysis of plasma cell-free DNA for non-invasive detection of drug resistance mechanisms in EGFR mutant NSCLC: Correlation with paired tumor samples. *Oncotarget*. 2015;6:30850-30858.