

INVITED REVIEW ARTICLE

肺癌の病理コンパニオン診断 update

橋本大輝¹・元井紀子¹

An Update of Companion Diagnostics for Lung Cancer

Taiki Hashimoto¹; Noriko Motoi¹

¹Division of Pathology and Clinical Laboratories, National Cancer Center Hospital, Japan.

ABSTRACT — With the recent progress in medical science, precision medicine is being implemented in cancer treatment to tailor medical treatments to individual characteristics. In the lung cancer field, several target therapies, including tyrosine kinase inhibitors for the treatment of *EGFR*, *ALK*, and *ROS1*-mutant non-small cell lung cancer, as well as PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors, have been administered to selected patients, based on the results of companion diagnostics. In this review, we provide an overview of the companion diagnostics for lung cancer in Japan and possible problems—mainly regarding quality control—from the perspective of pathologists.

(JLCC. 2018;58:77-82)

KEY WORDS — Lung cancer, Companion diagnostics, *EGFR*, *ALK*, PD-L1

Corresponding author: Noriko Motoi.

要旨 — 近年の生命科学の発展により、疾患の特性に基づく精密医療 precision medicine が実装されつつある。肺癌は EGFR 分子標的薬を端緒に ALK, ROS1 そして PD-L1 と治療薬開発・導入が日進月歩であり、対応するコンパニオン診断薬・体外診断薬の結果に基づいた医療

が行われている。本稿では、肺癌の病理検体を用いるコンパニオン診断の現状と、病理医から見た注意点について概説する。

索引用語 — 肺癌, コンパニオン診断, *EGFR*, *ALK*, PD-L1

1. はじめに

近年、生命科学の進歩により、患者の遺伝的背景や疾患の特性を考慮して最適な治療方法を選択するという、個別化医療・精密医療 (precision medicine) が実用化されつつある。個別化医療の中で、治療対象となる患者を層別化する検査薬は、特定の治療薬と対を成すという意味で「コンパニオン診断薬 (companion diagnostics: CoDx)」と呼ばれる。肺癌治療の分野では、2012年に Vysis ALK Break Apart FISH プローブキットが承認されてから現在までに複数の品目が CoDx として承認され、日常的にコンパニオン診断に基づいた医療が行われている。本稿では、肺癌分野におけるコンパニオン診断の現状と、病理医から見た精度管理上の問題点・注意点

について概説する。

2. コンパニオン診断薬 (CoDx) とは

CoDx とは、特定の医薬品の有効性や安全性を一層高めるために、その使用対象患者に該当するかどうかなどをあらかじめ検査する目的で使用される診断薬のことである。“Companion diagnostics” という用語は、1990年代後半から存在していたものの、2011年に米国食品医薬品局 (FDA) が、CoDx の開発に関するドラフト・ガイダンスを公表したことをきっかけに広まった。¹ その概念はすぐに本邦にも輸入され、2013年に医薬品医療機器総合機構 (PMDA) から厚生労働省医薬食品局審査管理課長名で「コンパニオン診断薬等及び関連する医薬品の承認申請に係る留意事項について」(薬食審査発 0701 第 10

¹国立がん研究センター中央病院病理・臨床検査科。

論文責任者: 元井紀子。

Table 1. Social Insurance-approved Companion Diagnostics for Lung Cancer in Japan (February 2018)

名称	製造販売元	検査法	対象	対応する薬剤	承認年
コバス EGFR 変異検出キット v2.0	ロシュ・ ダイアグノスティックス	アレル特異的 リアルタイム PCR	DNA	オシメルチニブ	2016
Vysis ALK Break Apart FISH プローブキット	アボット ジャパン	FISH 法	DNA	アレクチニブ, クリゾチニブ	2012
ヒストファイン ALK iAEP キット	ニチレイ バイオサイエンス	免疫組織学的検査	タンパク質	アレクチニブ	2014
ベンタナ OptiView ALK (D5F3)	ロシュ・ ダイアグノスティックス	免疫組織学的検査	タンパク質	クリゾチニブ, セリチニブ	2017
OncoGuide AmoyDx ROS1 融合遺伝子検出キット	理研ジェネシス	Reverse Transcription (RT)- PCR	RNA	クリゾチニブ	2017
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」	アジレント・ テクノロジー	免疫組織学的検査	タンパク質	ペムプロリズマブ	2016

号)が公表された。² この通知の中で、コンパニオン診断薬等とは、(1) 医薬品の効果がより期待される患者を特定する、(2) 医薬品の特定の副作用について、それが発現するおそれの高い患者を特定する、(3) 医薬品の用法・用量の最適化または投与中止の判断を適切に実施する、ことのいずれかを目的とし、特定の医薬品の使用に不可欠な体外診断用医薬品または医療機器と定義された。特に、「当該医薬品の使用に不可欠」という点が重要で、現在、コンパニオン診断は特定の薬剤を使用する際に必須の検査となっている。

3. 肺癌領域での承認済みコンパニオン診断薬

2018年1月現在、肺癌領域で承認されている CoDx は Table 1 の通りである。以下に各 CoDx について検査の適応、検査法、対応する薬剤、検体、注意点などについて説明する。

a. EGFR 遺伝子変異

コバス EGFR 変異検出キット v2.0 (製造販売元: ロシュ・ダイアグノスティックス)

2016年に承認された EGFR 遺伝子検査で初の CoDx である。リアルタイム PCR 法により腫瘍細胞における EGFR 遺伝子のエクソン 18, 19, 20 および 21 中の変異を検出する。適応は EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査で、オシメルチニブ(商品名: タグリッソ)治療の適否を判断する。測定サンプルは、ホルマリン固定パラフィン包埋組織または血漿から抽出したゲノム DNA である。細胞診やセルブロック検体を測定に用いて良いかどうかについては添付文書に記載がないが、日本肺癌学会作成の肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引きでは、細胞検体、FFPE 細胞検体(セルブロック)、新鮮凍結検体を用いた検査についても実施に際する注意点が記載されており、FFPE 組織以外の検体も

検査可能とされている。³ FFPE 組織をサンプルとして使用する場合、検査に用いられた DNA の 5% 以上に遺伝子変異が含まれる場合に陽性と判定されるように設計されている。癌細胞において、EGFR 変異は通常 2 アレルのうち 1 アレルのみに見られるため、組織中に 10% 以上癌細胞が存在する必要がある。したがって、FFPE 組織中の腫瘍の割合が 10% 未満の場合はマクロダイセクションを行い、腫瘍の割合を高めた後 DNA 抽出を行うよう推奨されている (Figure 1)。自家調製検査法 (LDT) での解析の場合、保存状態が良好であれば 1 年以上前の組織でも検査可能であるが、添付文書には、「FFPE 組織は室温 (15~30°C) で保存したとき作製後 12 ヶ月以内、薄切後 60 日以内のものを使用」することが明記され、厳密な品質管理が求められている。なお、このキットは EGFR-TKI 投与前の初回検査での使用も可能であるが、これは体外診断薬 (IVD) としての適応で、CoDx として承認されているのは、「EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査」での使用である。

b. ALK 遺伝子再構成

Vysis ALK Break Apart FISH プローブキット (製造販売元: アボット ジャパン)

2012年承認。FISH 法により腫瘍細胞における ALK 遺伝子再構成を検出する。FISH には融合法 (fusion assay) と分離法 (split assay) があるが、本法は ALK 遺伝子の切断点を挟んで隣接した両側に位置する 2 つのプローブを用いてハイブリダイゼーションを行う分離法である。遺伝子再構成により ALK 遺伝子が切断されている場合 5' 側の緑色と 3' 側のオレンジ色が分離して観察される。このため、ALK 遺伝子が未知の遺伝子と融合している場合でも遺伝子再構成を検出可能である。腫瘍細胞の 50% 以上に、あるいは再検により 15% 以上に陽性細胞が認められた際に ALK 遺伝子再構成陽性と判断する。

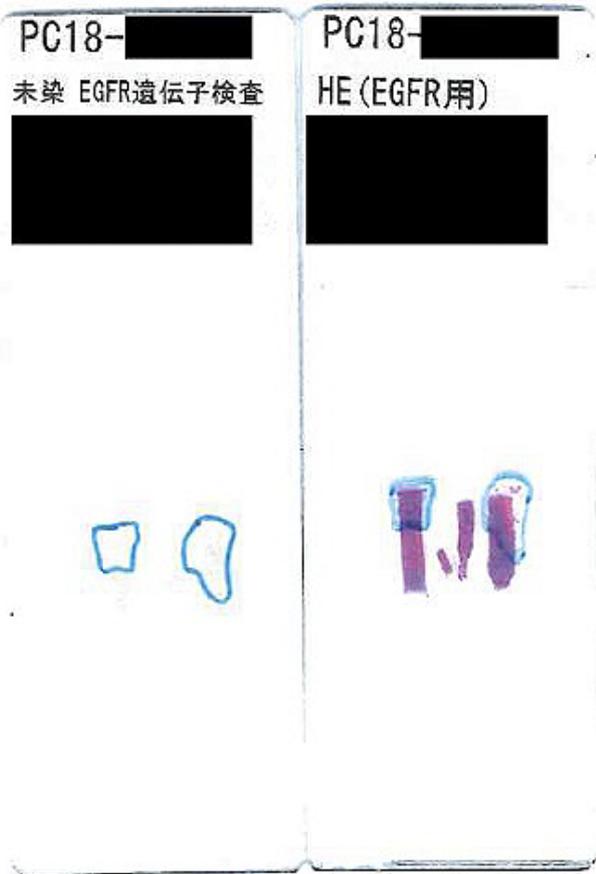


Figure 1. The macrodissection procedure for the EGFR molecular test in our hospital. On an unstained glass slide (left), the tumor area was marked according to the serial-cut hematoxylin-eosin-stained slide (right), and was then scraped off for DNA extraction. This step condensed the tumor cell proportion, generating an appropriate sample for further processing, even in specimens with a low proportion of tumor cells. EGFR, epidermal growth factor receptor; DNA, deoxyribonucleic acid.

適応はクリゾチニブ（商品名：ザーコリ）ないしアレクチニブ（商品名：アレセンサ）投与の適否の判定である。測定サンプルは「外科的切除，針生検，FFPE 細胞ペレット（例：穿刺吸引細胞診）などによる NSCLC 患者の FFPE 組織検体用」とされており，細胞診検体でもホルマリン固定したセルブロックは検査可能と明示されている。

c. ALK タンパク質発現

ヒストファイン ALK iAEP キット（製造販売元：ニチレイバイオサイエンス）

2014 年承認。免疫組織化学染色法により腫瘍細胞における ALK タンパク質の発現を検出する。一次抗体は抗 ALK モノクローナル抗体（マウス，IgG1，クローン 5A4）で，ポリマー試薬の前に抗マウス IgG ポリクローナル抗

体（ウサギ）を介在させることで感度を高めている（iAEP 法）。⁴ 本抗体は ALK タンパク質のキナーゼドメインを認識するため，ALK 融合タンパク質だけでなく全長の ALK タンパク質にも反応する。全長 ALK タンパク質の発現は正常組織では神経細胞でしか認められないため，神経系以外の細胞で ALK 免疫染色陽性となった場合は異常細胞である可能性が高い。判定は，80% を超える腫瘍細胞が染色された際に陽性，80% 以下 0% 以外を境界域として，0%（陰性）以外で FISH による確認を行う。適応はアレクチニブ投与の適否の判定である。用手法およびニチレイの自動免疫染色装置（ヒストステイナー）用が承認されている。測定サンプルは FFPE 切片で，細胞診やセルブロック検体を測定に用いて良いかどうかについては添付文書に記載がないが，肺癌学会作成の肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引きや肺癌における ALK 免疫染色プラクティカルガイドでは，細胞診検体ではセルブロックを作製し免疫染色を行うことが推奨されている。^{5,6} なお，5A4 という同じクローンの抗 ALK 抗体は他のメーカーからも多数販売されているが，本邦で CoDx として承認を受けているのは本製品のみである。

ベンタナ OptiView ALK (D5F3)（製造販売元：ロシュ・ダイアグノスティックス）

2017 年承認。免疫組織化学染色法により腫瘍細胞における ALK タンパク質の発現を検出する。一次抗体は抗 ALK モノクローナル抗体（ウサギ，IgG，クローン D5F3）であるが，本法は iAEP 法よりもさらに複雑な増感法を用いており，一次抗体＋リンカー＋二次抗体の後にタイラミドという増感剤を加えるキットとなっている。⁷ このためクローンに違いがあるものの，ニチレイの抗体と比較して DAB の茶色の発色が強い（Figure 2）。判定は，腫瘍細胞数にかかわらず，腫瘍細胞の細胞質において強い顆粒状の染まりが認められる際に陽性とする。判定上の注意点は，アーチファクトとして肺胞マクロファージにおける細胞質への薄い染まり，神経由来細胞への染まり，腺上皮細胞への染まり，リンパ球浸潤による散在性リンパ球への染まりが見られることがあることである。現在（2018 年 2 月）のところ，適応はクリゾチニブおよびセリチニブ（商品名：ジカディア）投与の適否の判定である。ただし，2018 年 1 月 31 日に一部承認変更申請が行われており，アレクチニブに対する適応追加の承認が得られれば，現在販売されているすべての ALK 阻害剤の CoDx となる。⁸ 染色はベンタナ社の自動免疫染色装置のみ適応となっている。測定サンプルは FFPE 切片で，細胞診やセルブロック検体を測定に用いて良いかどうかについては添付文書に記載がないが，ニチレイの抗体と同様に細胞診検体のセルブロックに対する免疫

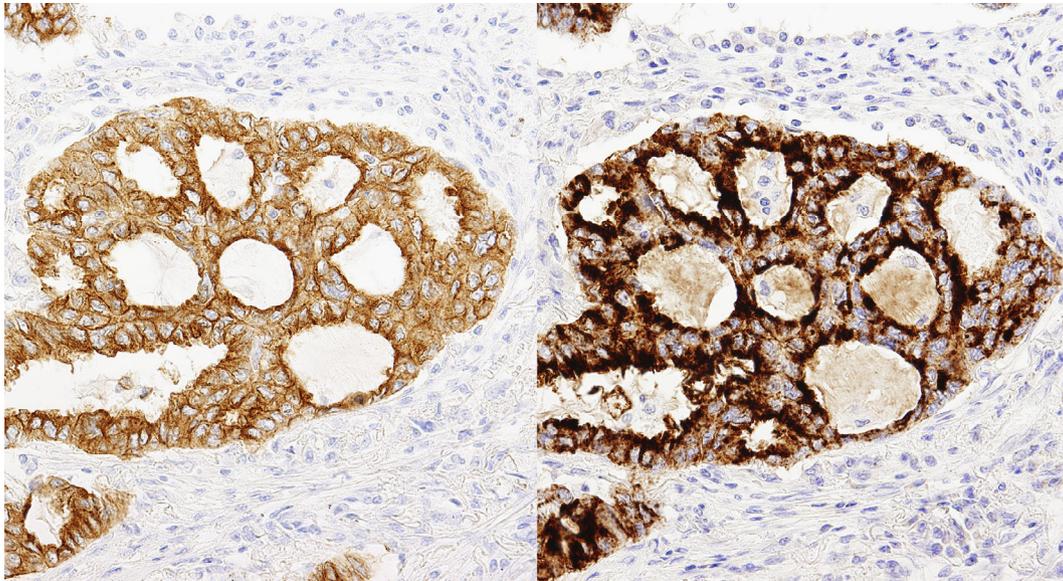


Figure 2. The ALK-IHC test: a comparison of immunohistochemical staining with different antibodies. A case of lung adenocarcinoma showed moderate positivity for 5A4 clone (Dako; left) and strong immunoreactivity for D5F3 clone (Ventana; right). D5F3 shows a more distinct brownish color in comparison to 5A4. ALK, anaplastic lymphoma kinase; IHC, immunohistochemistry.

染色の結果を使用することは許容されると思われる。

d. *ROS1* 融合遺伝子

OncoGuide AmoyDx *ROS1* 融合遺伝子検出キット（製造販売元：理研ジェネシス）

2017年承認。RT-PCR法により腫瘍細胞における*ROS1*融合遺伝子を検出する。14種類の*ROS1*融合遺伝子mRNAを検出する。未知の融合遺伝子や低頻度で存在する14種類以外の*ROS1*融合遺伝子は検出できない。適応はクリゾチニブ投与の適否の判定である。測定サンプルは「ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織、新鮮凍結組織、細胞診検体、または細胞診検体由来FFPEセルブロックなどの各種ヒト非小細胞肺癌検体」と記載されており、様々な材料で検索が可能なが明瞭に示されている。ただし、本法はDNAよりも不安定とされているRNAを用いる検査法であり、FFPE検体の場合、2年以内、腫瘍細胞率30%以上のものを用いることが推奨されている。

e. PD-L1 タンパク質

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（製造販売元：アジレント・テクノロジー）

2016年承認。免疫組織化学染色法により腫瘍細胞におけるPD-L1タンパク質の発現を検出する。一次抗体はPD-L1タンパク質の細胞外ドメインを認識する抗PD-L1モノクローナル抗体（マウス、IgG1、クローン22C3）で、iAEP法と同様ポリマー試薬の前に抗マウスIg抗体（ウサギ、ポリクローナル）を介在させることで感度を高

めている。自動染色装置「ダコ Autostainer Link 48」での染色のみ染色結果の信頼性が保証されており、手法や他の染色装置を用いた染色は推奨されない。適応はペムプロリズマブ（商品名：キイトルーダ）投与の適否の判定である。測定サンプルはFFPE切片で、脱灰処理した組織検体やホルマリン固定以外の固定方法は推奨されていない。また、ホルマリン固定のセルブロック検体の使用については添付文書に記載がないが、肺癌学会作成の肺癌患者におけるPD-L1検査の手引きでは、セルブロック検体での検査については、これまでの臨床試験でも使用されておらず、その染色性と治療効果に関する検証がなされていないこととされており、その運用は今後の研究成果を取り入れつつ慎重に対応する必要がある。⁹判定には、スライド中に100個以上の腫瘍細胞が存在することが必須で、100個未満の場合は評価対象外となるため十分量の検体採取が望まれる。腫瘍細胞のPD-L1発現率（tumor proportion score：TPS、細胞膜が染色される陽性腫瘍細胞の割合）を測定する。PD-L1は正常免疫細胞にも陽性となるため、経験を積んだ病理医が腫瘍細胞を正しく判定する必要がある。未治療の非小細胞肺癌（一次治療）ではTPSが50%以上で、既治療の非小細胞肺癌（二次治療）ではTPSが1%以上で、ペムプロリズマブ投与の適応となる。なお、同時期に保険収載されたPD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」はニボルマブ（商品名：オプジーボ）に対する一般IVDであるが、22C3と28-8は結果の相関性が高いことからニボルマブ使用時に

22C3の結果を使用することは許容されている。しかし、28-8の結果はペムプロリズマブの適応判定には使用できない点に注意が必要である。

4. コンパニオン診断の精度管理上の注意点・問題点

病理検体を用いるコンパニオン診断は、DNA、RNA、タンパク質と対象が多岐にわたるため、その再現性と信頼性を保証するために精度管理は極めて重要である。治療選択に直結しているコンパニオン診断において、不適切なプロセスで誤った結果がもたらされた場合は、治療機会の損失あるいは不適切な薬剤投与につながり、患者は大きな不利益を被ることとなる。コンパニオン診断の工程を、プレアナリシス段階、アナリシス段階、ポストアナリシス段階の3つの工程に分け、各工程における精度管理上の注意点・問題点を以下に挙げる。

a. プレアナリシス段階

検体採取から病理標本作製までの段階では、臨床医、看護師、検査技師などの連携が重要である。

(i) 検体量

現在承認されているCoDxは、1つの試薬につき1つの分子や遺伝子の状態しか検索できない。このため治療にあたっては複数の検査を行うことになるが、多数の切片を薄切すると微小な生検組織検体などでは腫瘍がなくなってしまうことがある。当院を例にとると、EGFR変異検査(院内)でHE1枚+未染5枚、ALK免疫染色(院外)で未染4枚、PD-L1免疫染色(院内)で未染3枚、ROS1融合遺伝子検査(院外)で未染5枚(5μm厚)が要求され、ALK FISHを行うとなるとさらに未染3枚が必要となる。生検検体で腫瘍量が僅少の場合は、薄切時に消失しないように複数ブロックを作製する、診断用免疫染色と同時にコンパニオン診断用の未染も薄切し面出しによる消耗を避ける、検体が途中で消失した場合の優先順位をつけるなどの工夫が望まれる。

(ii) 検体採取直後の取扱い

血流停止から摘出までの時間、摘出から固定までの検体保存状態はコンパニオン診断結果に大きく影響するが、病理部門のみでは管理できない部分であり、検体採取、搬送を含めた関係部署の連携が非常に重要である。

(iii) 固定

コンパニオン診断では、10%中性緩衝ホルマリンを十分量用いた6~48時間の固定が基本である。ホルマリンの種類、濃度、量、固定時間の差は、検体品質に極めて大きな影響を与える。¹⁰ 固定不良(固定不足・過固定)は核酸・タンパク質の品質劣化を起こすため、注意すべきである。特に大きな切除検体や、週末・連休前の検体には注意が必要である。

(ii) (iii)について詳しい解説として、日本病理学会ホームページのゲノム診療用病理組織検体取扱い規程¹¹およびゲノム研究用病理組織検体取扱い規程¹²などを参照されたい。

b. アナリシス段階

コンパニオン診断を行うためには、それぞれのCoDxに対応した自動免疫染色装置や遺伝子解析装置を設置する必要があることから、外部検査会社に委託(外注検査)している医療機関も多いが、自施設で実施する場合には、検査の妥当性を保証する手段として、内部精度管理の実施、外部精度管理への参加などが推奨される。CoDxはキット化されているため、一般的にはこの段階での問題は少ない。

c. ポストアナリシス段階

(i) 結果判定の不一致

免疫染色やFISHの結果判定では、主観的判断を必要とする部分があるため、評価法間・評価者間の差が生じる可能性がある。

ALKの場合には、免疫染色とFISHの結果に稀に不一致が生じるが、ALK遺伝子再構成の状態(極めて近接した逆位)や正常ALKの過剰発現などの機序が報告されている。また、検体が微小である場合などに偽陰性となる場合も念頭に置く必要がある。

PD-L1発現の評価は定量的な評価が必要とされるため、評価者間の判定結果の差は宿命的な課題と考えられる。TPSに比較し、3段階判定結果(陰性、低発現、高発現)の一致率は高いが、現実的には1%、50%付近で迷う症例はありうる。病理医が行う判定を均質化するためには判定トレーニングが不可欠であり、各試薬のウェブサイトでのEラーニング、講習会・セミナーなどを活用した自己研鑽が求められる。自施設で実施する際には、ダブルチェック体制の構築、外注検査の場合にも自施設の病理医によるダブルチェックを行うことが望ましく、特にコメント付きの判定には結果の解釈に注意が必要であり、臨床医にも注意を喚起したい。

(ii) 検体種による限界

上記の各CoDxの項での説明の通り、各試薬によってどのような検体で使用可能であるのか、添付文書の記載が異なっている。実臨床では、FFPE組織以外にも、新鮮凍結検体、迅速戻し検体(一度凍結・融解したものをホルマリン固定したもの)、脱灰検体(骨生検など)、クライオバイオプシー検体、細胞診検体、セルブロック検体(ホルマリン固定)、液状検体など、様々な検体が採取・保管される。これらのFFPE組織以外の検体を用いて検査を行った際に、検査自体は可能であったとしても、その結果に基づいて適応判断することの妥当性が保証されている試薬は少ない。したがって、推奨された方法で作

製された FFPE 組織を検査に供すべきであるが、実臨床では患者の状態によっては難しい場合もある。たとえば、生検の FFPE 組織には癌細胞が含まれず、アルコール固定した細胞診検体のみ腫瘍細胞が認められる状況や、骨生検からしか腫瘍細胞を採取できないという状況にしばしば遭遇する。こういった状況では、検査結果の妥当性が 100% 保証されているわけではないということを理解の上で検査を行い、その限界を理解した上で結果を解釈する必要がある。

5. おわりに

肺癌治療分野におけるコンパニオン診断の現状と、病理医から見た精度管理上の問題点・注意点について概説した。この分野では、科学的正しさよりも特許や保険の問題が優先される点が多々あり、取り巻く環境の変化も急速でキャッチアップが大変である。当原稿の内容もすぐに使い物にならなくなってしまう可能性があるが、少しでも読者の皆様の参考になれば光栄である。

本論文内容に関連する著者の利益相反：元井紀子 [委受託研究 (治験等)] Roche Diagnostics (施設代表), [専門的助言・証言] MSD Japan

REFERENCES

1. Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry and FDA Staff—In Vitro Companion Diagnostic Devices. 2011.
2. 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. コンパニオン診断薬等及び関連する医薬品の承認申請に係る留意事項について (<https://www.pmda.go.jp/files/000213148.pdf>). 2013.
3. 日本肺癌学会. 肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き 第 3.05 版 (<https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/1329.pdf>). 2016.
4. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokininase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3143-3149.
5. 日本肺癌学会. 肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引き 第 2.1 版 (<https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/1039.pdf>). 2015.
6. 日本肺癌学会. 肺癌における ALK 免疫染色プラクティカルガイド 第 1.2 版 (<https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/1341.pdf>). 2016.
7. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2010;16:1561-1571.
8. ロシュ・ダイアグノスティックスのプレスリリース (<https://www.roche-diagnostics.jp/news/18/02/01.html>). 2018.
9. 日本肺癌学会. 肺癌患者における PD-L1 検査の手引き 第 1.0 版 (<https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/1400.pdf>). 2017.
10. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:1520-1530.
11. 日本病理学会. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程初版 (http://pathology.or.jp/news/pdf/genome_kitei_170915.pdf). 2017.
12. 日本病理学会. ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 (<http://pathology.or.jp/genome/>). 2016.