

ORIGINAL ARTICLE

細胞診検体を用いた肺がんコンパクトパネルによる
次世代シーケンシングの有用性南 大輔^{1,2}・瀧川奈義夫^{3,4}・多田陽郎¹・中島康博¹・宮原信明³・
水守康之⁵・植田充宏⁶・佐藤慶治⁷・森川 慶⁸・金廣有彦³Usefulness of the High-sensitivity Lung Cancer Compact Panel™
with Cytological SpecimensDaisuke Minami^{1,2}; Nagio Takigawa^{3,4}; Akio Tada¹; Yasuhiro Nakajima¹; Nobuaki Miyahara³;
Yasuyuki Mizumori⁵; Mitsuhiko Ueda⁶; Yoshiharu Sato⁷; Kei Morikawa⁸; Arihiko Kanehiro³

¹Department of Respiratory Medicine, Himeji Saint Mary's Hospital, Japan; ²Department of Respiratory Medicine, Hosoya Hospital, Japan; ³Department of Internal Medicine, Himeji Saint Mary's Hospital, Japan; ⁴Department of Internal Medicine 4, Kawasaki Medical School, Japan; ⁵Department of Respiratory Medicine, ⁶Department of Thoracic Surgery, National Hospital Organization Himeji Medical Center, Japan; ⁷DNA Chip Research Inc., Japan; ⁸Division of Respiratory Medicine, Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine, Japan.

ABSTRACT — **Objective.** We verified the usefulness of a new next-generation sequencing modality with the Lung Cancer Compact Panel™ using cytological specimens. **Study Design.** From December 2021 to February 2022, the wash fluid of lung tumors from 10 patients obtained using endobronchial ultrasonography (EBUS) with a guide sheath (GS), EBUS transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA), and pleural effusion puncture was examined with the Lung Cancer Compact Panel™. We examined the patients' medical records to obtain information on the analysis success rate and detection rate of gene mutations in consecutive cases searched for driver gene mutations. **Results.** Ten patients (6 lung adenocarcinoma, and 1 each of lung squamous cell carcinoma, small-cell lung cancer, renal cell carcinoma, and organizing pneumonia) and 12 samples (7 from brushing, 2 from EBUS-TBNA, 1 from a transbronchial biopsy [TBB] plus brushing, 1 from a TBB, and 1 from brushing) were examined using the Lung Cancer Compact Panel™. We successfully analyzed all tests in all 10 patients (100%). *EGFR* L858R, *KRAS* G12D, or *KRAS* G12V was detected in lung adenocarcinoma patients. *KRAS* G12V was detected in the lung squamous cell carcinoma patient. The amounts of nucleic acids from the pleural effusion puncture and EBUS-TBNA were sufficient for the analyses. **Conclusion.** The Lung Cancer Compact Panel™ was useful for detecting gene mutations using cytological specimens.

(JLCC. 2022;62:989-995)

KEY WORDS — Lung Cancer Compact Panel™, Next-generation sequencing, Cytological specimen

Corresponding author: Daisuke Minami.

Received June 2, 2022; accepted August 2, 2022.

要旨 — **目的.** 細胞診検体で次世代シーケンシング (NGS) が可能な肺がんコンパクトパネルの有用性を検討する. **研究方法.** 2021年12月から2022年2月までに肺癌疑い症例に気管支鏡, 胸水穿刺を行い肺がんコンパクトパネルでNGSを施行した10例を後方視的に検討した. **結果.** 10例12検体の内訳は, 肺腺癌6例, 肺扁平

上皮癌1例, 小細胞肺癌1例, 腎細胞癌1例, 器質性肺炎1例であった. 検体は気管支擦過7検体 (気管支擦過1回, 生検鉗子洗浄1回), EBUS-TBNA2検体 (穿刺1回), 胸水1検体 (穿刺1回) で1例は同一病変に対して生検1回+気管支擦過1回, 生検1回, 気管支擦過1回の3検体を提出した. 遺伝子解析は10例すべてで成功

¹社会医療法人財団聖フランシスコ会姫路聖マリア病院呼吸器内科; ²医療法人ほそや医院呼吸器内科; ³社会医療法人財団聖フランシスコ会姫路聖マリア病院内科; ⁴川崎医科大学総合内科学4; ⁵独立行政法人国立病院機構姫路医療センター ⁵呼吸器内科, ⁶呼吸器

外科; ⁷DNAチップ研究所; ⁸聖マリアンナ医科大学病院呼吸器内科.

論文責任者: 南 大輔.

受付日: 2022年6月2日, 採択日: 2022年8月2日.

し、肺腺癌で *EGFR* L858R 1 例、*KRAS* G12D 1 例、*KRAS* G12V 1 例、肺扁平上皮癌 1 例で *KRAS* G12V の遺伝子変異を認めた。肺腺癌の癌性胸水 5 ml (class V) と EBUS-TBNA 1 回の穿刺でも NGS に十分量の核酸が得られ

た。結語。細胞診検体を用いた肺がんコンパクトパネルで高精度な NGS が可能である。

索引用語——肺がんコンパクトパネル、次世代シーケンシング、細胞診検体

目的

2019 年 6 月に複数の遺伝子を同時に解析するマルチプレックス検査である遺伝子パネル検査が本邦において保険取載され、実地臨床で使用可能となった。¹

オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム (ODxTT) は、腫瘍由来の DNA を用い 46 遺伝子の hot-spot での変異解析および腫瘍由来 RNA を用い 21 遺伝子の融合遺伝子を解析し検出できる遺伝子パネルで、*EGFR* 遺伝子変異、*ALK* 融合遺伝子、*ROS1* 融合遺伝子、*RET* 融合遺伝子、*BRAF* 遺伝子変異を含む複数の遺伝子変異に対するコンパニオン診断薬の承認を得ている。² ODxTT は *EGFR*、*ALK* 遺伝子のシングルプレックス検査よりも検査成功率で劣るため、これまでよりも大きなサイズの検体を採取する必要がある。³ 組織中の腫瘍細胞割合や、腫瘍のサイズが ODxTT の検査成功率に影響することが報告されており、実地臨床においては全例で使用されているとはいえない。^{4,5}

肺がんコンパクトパネルは株式会社 DNA チップ研究所が奈良先端科学技術大学院大学、大阪国際がんセンターと共同で開発した遺伝子パネル検査である。がん遺伝子パネル検査の検体として多く利用されているホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin fixed paraffin embed-

ded: FFPE) 検体だけでなく、気管支擦過、気管支洗浄液などの細胞診検体での遺伝子解析が可能であることが報告されており、⁶ 2020 年 5 月からは聖マリアンナ医科大学呼吸器内科において前向き検証試験が先行的に実施されており、高い検査成功率と遺伝子変異の検出率が報告されている。⁷ また同手法を用いた稀少遺伝子変異およびアレル頻度の検出に関する報告も存在する。⁸ 本研究ではその有用性を姫路聖マリア病院で検証した。

研究方法

2021 年 12 月から 2022 年 2 月までに、肺癌疑い症例に対して気管支鏡検査および胸水穿刺を行い、得られた細胞診検体で肺がんコンパクトパネルによる次世代シーケンシング (next-generation sequencing: NGS) を行った 10 症例について後方視的に検討した。肺がんコンパクトパネルは *EGFR*、*BRAF*、*KRAS*、*HER2*、*ROS1*、*ALK*、*MET*、*RET* の 8 遺伝子を解析対象としたコンパクトなパネル設計としている。アンプリコンベースでマルチプレックスに遺伝子ターゲット領域を増幅し、アダプターを付加し Illumina MiSeq (150 bp paired end) で配列を読み取り Trimmomatic v0.33 でアダプター配列をトリミングする。その後 FLASh v1.2.11 で paired-end リードを統合し BWA v0.7.17 アラインメントツールでリファレンス配列にアラインメントを実施する。カスタムプログラミングツールでバリエーションコール解析を実施したのちに、Table 1 に挙げるアレル頻度を越えた場合に陽性と判定した。検体採取方法は、ガイドシースを用いた気管支腔内超音波断層法 (endobronchial ultrasonography with a guide sheath: EBUS-GS) による経気管支生検 (transbronchial biopsy: TBB)、超音波気管支鏡ガイド下針生検 (endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: EBUS-TBNA)、気管支擦過、胸水穿刺であった。なお、検体採取には下記を用いた。内視鏡用超音波プローブ (UM-S20-17S, オリンパス株式会社, 日本)、ディスプレイガイドシースキット (K-201, オリンパス株式会社, 日本)、アクワイヤー超音波内視鏡下穿刺針 22 G、25 G (Acquire™, ポストン・サイエンティフィックジャパン, 日本)、気管支ビデオスコープ (BF-290/BF-UC290F, オリンパス株式会社, 日本)。検体に提出する際の腫瘍細胞の有無は気管支擦過検体の迅速細胞診を呼

Table 1. Sensitivity Test of the Lung Cancer Compact Panel

	Threshold of detection DNA (% allele frequency) /RNA (TM score)
DNA module	
<i>EGFR</i> exon 19 del	0.14
<i>EGFR</i> L858R	0.20
<i>EGFR</i> T790M	0.48
<i>BRAF</i> V600E	0.24
<i>KRAS</i> G12C	0.20
RNA module	
<i>ALK</i> fusion	188
<i>ROS1</i> fusion	32
<i>RET</i> fusion	18
<i>MET</i> exon 14 skipping	28

TM score, a size-independent metric to quantify RNA structure.

吸器内科医および細胞検査士で行った。また核酸の保存にはジーンメトリックス核酸保存液封入容器 (GM 管) を用いた。GM 管は硫酸アンモニウムを主成分とした核酸安定化溶液であり、5 ml のコンテナチューブに 2 ml の溶液が充填されている。細胞診検体の処理は気管支擦過した後のブラシを GM 管に 1 回直接懸濁し、その後に TBB をして採取した検体を取り除いた後の生検鉗子を GM 管に 1 回直接懸濁した。EBUS-TBNA においては穿刺 1 回分の検体を GM 管に 1 回直接懸濁した。得られた検体の核酸の抽出には Maxwell[®] RSC Blood DNA Kit および Maxwell[®] RSC simplyRNA Cells Kit (Promega, WI, USA) を用いた。DNA シーケンスに提出する核酸のカットオフ値は 10 ng 以上とした。なおシーケンスは ampli-con sequence 法を用いて行い DNA のコンパニオン対象ターゲット領域について DNA モジュール 1 では 5000 リード以上の最低リード深度、DNA モジュール 2 では 2000 リード以上の最低リード深度、RNA のコントロール遺伝子が 300 リード以上検出された場合に、ライブラリ構築およびシーケンス成功と判定した。本研究は姫路聖マリア病院倫理審査委員会承認された (2021 年度 No. 42)。

Table 2. Patient Characteristics

Characteristic	Value
Number of patients	10
Male/female, <i>n</i>	8/2
Median age (range), years	77 (67-92)
Pathological and/or clinical diagnosis, <i>n</i>	
Lung adenocarcinoma	6
Lung squamous cell carcinoma	1
Small-cell lung cancer	1
Renal cell carcinoma	1
Organizing pneumonia	1

結果

肺がんコンパクトパネルで遺伝子解析を行った 10 症例の内訳は、肺腺癌 6 例、肺扁平上皮癌 1 例、小細胞肺癌 1 例、腎細胞癌 1 例、器質化肺炎 1 例であった (Table 2)。12 検体の内訳は気管支擦過 7 検体 (気管支擦過 1 回、生検鉗子洗浄 1 回)、EBUS-TBNA 2 検体 (穿刺 1 回)、胸水 1 検体 (穿刺 1 回) であり、気管支擦過を行った 1 症例においては同一病変に対して生検 1 回 + 気管支擦過 1 回、生検 1 回、気管支擦過 1 回の 3 検体を提出した。検体採取のためにアプローチした肺病変、リンパ節、胸水を Table 3 に示す。

肺がんコンパクトパネルによる遺伝子解析は 10 例すべてで成功し、肺腺癌で *EGFR* L858R 1 例 (Figure 1)、*KRAS* G12D 1 例、*KRAS* G12V 1 例、肺扁平上皮癌 1 例で *KRAS* G12V の遺伝子変異が検出された (Table 4)。またすべての症例において DV200 は 30% 以上であり十分量の核酸の採取が可能であった (Table 5)。オーダーから結果返却までの日数 (turn around time) の中央値 9 日 (8~14 日) であり、全例で迅速細胞診を行い、検査翌日に検体を株式会社 DNA チップ研究所に郵送した。EBUS-TBNA ではアクワイヤー超音波針を使用した⁹、22 G あるいは 25 G 針 1 回の穿刺のみで、腎細胞癌、小細胞癌の転移リンパ節からそれぞれ DNA 952 ng と RNA 240 ng、DNA 1652 ng と RNA 429 ng の核酸が検出された。Case 7 では右 S⁸ の長径 21 mm 大の結節影に対して EBUS-GS 下に TBB を施行したところ、細胞診検体のみで悪性細胞が検出された。組織採取のための再生検を検討したが気胸を合併したため断念した。そこで細胞診の洗浄液を肺がんコンパクトパネルに提出した。DNA 756 ng と RNA 536 ng の核酸が得られ、NGS により *EGFR* L858R が検出された (Figure 1、腫瘍含有量 3.4%)。Case 4 は画像検査で肺癌を強く疑い、細胞診も class III でありパネル検査を行ったが、その後の臨床経過から器質化

Table 3. Characteristics of the Pulmonary Nodule, Lymph Nodes, and Pleural Effusion Obtained Using EBUS-GS, EBUS-TBNA and a Puncture Needle

Characteristic	Value (range)
Number	10
Pulmonary nodule station ^a (Rt S ⁶ /S ⁸ /Lt S ¹⁺² /S ⁶ /S ⁸ /S ¹⁰), <i>n</i>	1/2/1/1/1/1
Enlarged lymph node stations ^b (4R/7), <i>n</i>	1/1
Pleural effusion, <i>n</i>	1
Longest median diameter in pulmonary nodule (range), mm	45.0 (14-75)
Longest median diameter in lymph node (range), mm	37.5 (30-45)

The pulmonary nodule^a and lymph node^b stations are defined as follows: 4R, right lower paratracheal node; 7, subcarinal nodes; S⁶, segment 6; S⁸, segment 8; S¹⁺², segment 1 + 2; S¹⁰, segment 10; Lt, left; Rt, right.

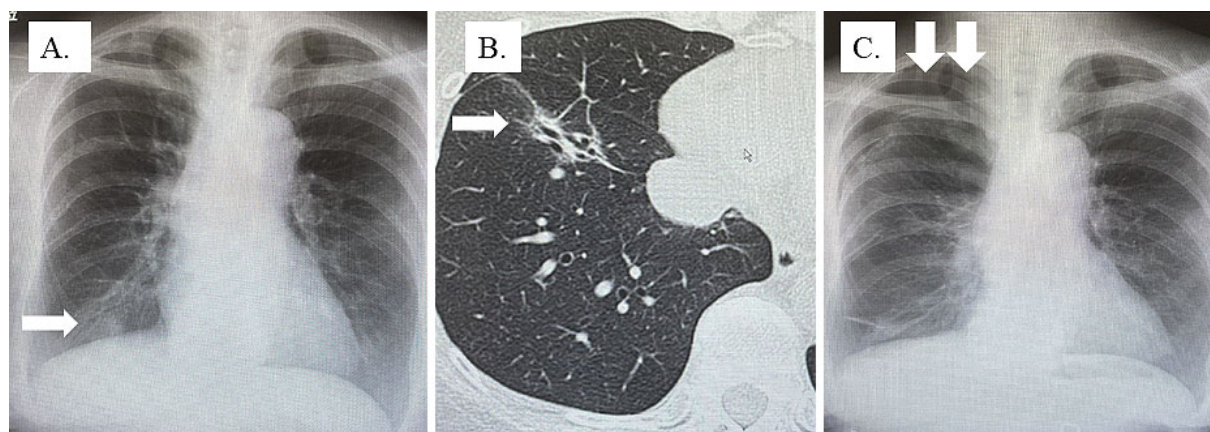


Figure 1. A, B. Chest X-ray and computed tomography images showed abnormal shadows in the right lower lobe. The longest diameter in the pulmonary nodule was 21 mm. C. Pneumothorax was detected in the right lung after the transbronchial biopsy.

Table 4. Results of Genetic Analyses of the Lung Cancer Compact Panel

	Clinical diagnosis	Target lesions	Methods	Tumor cell content (%) /Cytology	Mutation (Allele frequency)
Case 1	Renal cell carcinoma	LN#7	EBUS-TBNA	80-90 /class V	none
Case 2	Lung adenocarcinoma	Lt S ¹⁺²	EBUS-GS	80-90 /class V	none
Case 3	Small-cell lung cancer	LN#4R	EBUS-TBNA	80-90 /class V	none
Case 4	Organizing pneumonia	Rt S ⁶	EBUS-GS	0 /class III	none
Case 5	Invasive mucinous adenocarcinoma	Lt S ¹⁰	EBUS-GS	0-10 /class II	KRAS G12D (1.3%)
Case 6	Lung adenocarcinoma	Pleural effusion	Pleural puncture	80-90 /class V	none
Case 7	Lung adenocarcinoma	Rt S ⁸	EBUS-GS	0-10 /class V	EGFR L858R (1.7%)
Case 8	Lung squamous cell carcinoma	Lt S ⁸	EBUS-GS	90-100 /class V	KRAS G12V (48.0%)
Case 9	Lung adenocarcinoma	Lt S ⁶	EBUS-GS	70-80 /class V	none
Case 10	Lung adenocarcinoma	Rt S ⁸	EBUS-GS	90-100 /class V	KRAS G12V (74.5%)

EBUS-TBNA, endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration; EBUS-GS, endobronchial ultrasonography with a guide sheath

Lymph node stations and pulmonary nodule are defined as follows: LN#4R, right lower paratracheal node; LN#7, subcarinal nodes; S⁶, segment 6; S⁸, segment 8; S¹⁺², segment 1+2; S¹⁰, segment 10; Lt, left; Rt, right.

肺炎と診断した。Case 6 では癌性胸水は細胞診で class Vであることを確認後に 5 ml を排液して GM 管に保存し遺伝子解析を行った。遺伝子変異は検出されなかったが DNA 1100 ng, RNA 172 ng と解析に十分量の核酸が検出された (Figure 2)。Case 2 は同一病変に対して生検

1 回 + 気管支擦過 1 回, 生検 1 回, 気管支擦過 1 回の 3 検体を提出した。TBB で得られた組織を GM 管にいた抽出液中の DNA は吸光度法で 10 ng 未満と解析不能であったが, その他の検体では NGS に十分量の核酸が採取された (Table 6)。

Table 5. Nucleic Acid Extraction

	dsDNA [ng]	DIN	Nanodrop [ng/μl]	RNA [ng]	RIN	DV200 (%)
Case 1	952	9.1	6.00	240	5.0	76.3
Case 2	16	1.5	1.71	68	2.7	73.2
Case 3	1652	8.6	10.72	429	3.9	75.6
Case 4	3528	9.1	39.83	1593	5.5	79.3
Case 5	16.48	4.1	4.92	197	3.5	77.5
Case 6	1100	5.7	4.31	172	4.9	77.8
Case 7	756	8.0	13.41	536	6.7	82.6
Case 8	564	6.9	10.55	422	4.6	86.4
Case 9	46.8	1.3	4.94	197	5.2	64.8
Case 10	173.2	5.5	9.14	366	5.8	82.1

dsDNA, double-stranded deoxyribonucleic acid; DIN, DNA integrity number; RNA, ribonucleic acid; RIN, RNA integrity number; DV200, Ratio of RNA fragments over 200 nt

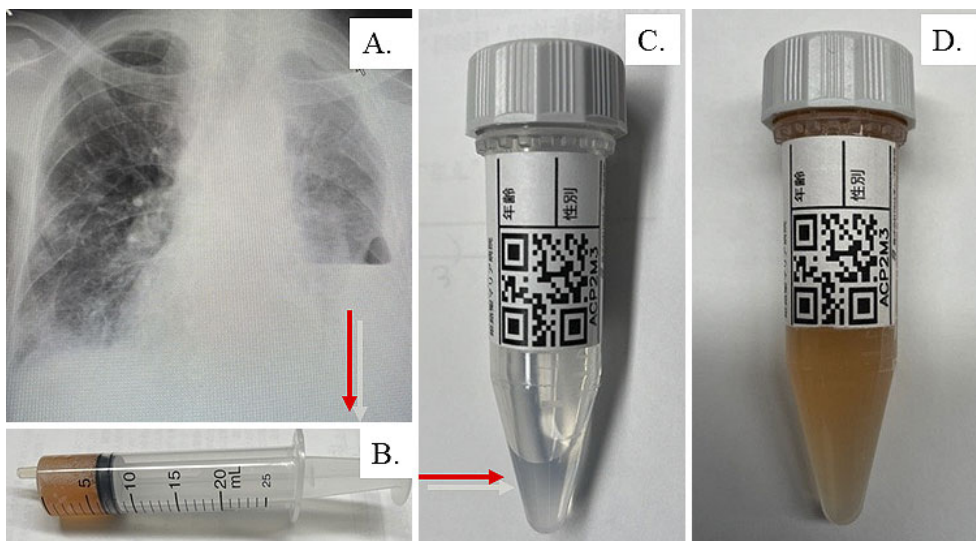


Figure 2. A, B. The pleural effusion (5 ml) from the lung adenocarcinoma patient. C. Gene metrics (GM) tube. D. The pleural effusion (5 ml) was collected in the GM tube.

Table 6. Amount of Nucleic Acid Derived from Transbronchial Biopsy Samples and Brushing

	Methods	Clinical diagnosis	DNA (ng) RNA (ng)	Mutation
Case 2	TBB	Lung	3104	none
	Brushing ^a	adenocarcinoma	856	
Case 2	TBB	Lung	Unmeasurable ^b	none
		adenocarcinoma	280	
Case 2	Brushing ^a	Lung	620	none
		adenocarcinoma	300	

TBB: transbronchial biopsy (one biopsy); Brushing^a, brushing and washing once each (forceps washing after the biopsy); Unmeasurable^b, under the detection sensitivity.

考 察

肺がんコンパクトパネルは、解析する遺伝子を絞り小グループ（モジュール）に分けて分割処理し、十分な深度でシーケンス解析することで、従来法は5～10%の検出感度のところを本システムでは10倍以上の検出感度の改善を達成している（DNAは吸光度法、RNAは蛍光分析法において10 ng以上で解析可能）⁶。株式会社DNAチップ研究所は2021年10月に本パネル検査の医療機器製造販売承認申請を行い、2022年度中での薬事承認および市場への普及を目指している。本研究ではCase 8, 10においてアレル頻度がそれぞれ48.0%, 74.5%のKRAS G12Vが検出されたが、Case 5ではアレル頻度1.3%でKRAS G12Dが検出され、Case 7ではアレル頻度1.7%でEGFR L858Rが検出された。Case 7はEBUS-GSによるアプローチにおいてwithinの超音波所見を確認後にTBB、気管支擦過を行ったがTBB検体には十分量の悪性細胞が採取できておらず、気管支鏡検査後に気胸を合併したことから気管支鏡検査やCTガイド下針生検による再生検が難しく細胞診検体による肺がんコンパクトパネルによるNGSが有用であった（Figure 1）。また、EBUS-TBNAによる検体でNGS解析を行うためには4～6回の生検が必要と報告されている¹⁰。本研究ではアクワイヤー超音波針22 G, 25 G針を用いたEBUS-TBNA 1回の穿刺で、腎細胞癌、小細胞癌の転移リンパ節よりそれぞれDNA 952 ngとRNA 240 ng, DNA 1652 ngとRNA 429 ngの核酸が得られた。本研究においてアプローチした肺病変は中央値45.0（範囲14～75）mm、リンパ節病変37.5（30～45）mmであったが（Table 3）、小型病変においても本パネル検査は有用であると考えられる。

NGSの際に使用する細胞診検体はGM管により保存される。GM管はジーンメトリックス社が開発した組織検体内の核酸を室温または冷蔵で長期にわたり安定的に保存する溶液管であり、本研究においても細胞診検体の保存に使用した。Case 6では胸水穿刺によってclass Vを確認後に5 mlをGM管に保存し、DNA 1100 ng, RNA 172 ngとNGSに十分であった。Case 2ではTBBにより得られた組織検体をGM管に入れて攪拌するのみではNGSに十分量のDNAが得られなかったが、気管支擦過検体においては7例すべての症例でNGS解析が可能であった。本研究では細胞診検体の腫瘍割合が5～10%以上かつ細胞検査士によるclass IV以上の判定であれば肺がんコンパクトパネルにおける遺伝子検査は十分可能であると考えられた。肺がんコンパクトパネルによるNGSは気管支鏡下に採取されたEBUS-GS下のTBB、EBUS-TBNAによる細胞診検体以外にも、癌性胸水や体表リン

パ節（腋窩リンパ節、鎖骨上窩リンパ節など）での検証試験が聖マリアンナ医科大学で実施されている。現在は多施設共同研究（UMIN000047215）が実施されており、日本国内における症例の集積が望まれる。

結 論

肺がんコンパクトパネルは細胞診検体で高精度なNGSが可能であった。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

謝辞：本論文にあたり病理診断にご助言頂きました藤井将義先生、細胞検査士の前田晴美先生、橋本眞実先生、中本美香先生、気管支鏡検査および遺伝子解析にご尽力頂いた長野昭近先生、亀井裕子先生に深謝致します。

REFERENCES

1. 日本肺癌学会, 編集. 肺癌診療ガイドライン—悪性胸膜中皮腫・胸腺腫瘍含む—2020年版. 第6版. 金原出版; 2020.
2. König D, Savic Prince S, Rothschild SI. Targeted Therapy in Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. An Update on Treatment of the Most Important Actionable Oncogenic Driver Alterations. *Cancers*. 2021; 13:804.
3. Ariyasu R, Uchibori K, Ninomiya H, Ogusu S, Tsugitomi R, Manabe R, et al. Feasibility of next-generation sequencing test for patients with advanced NSCLC in clinical practice. *Thorac Cancer*. 2021;12:504-511.
4. Murakami S, Yokose T, Nemoto D, Suzuki M, Usui R, Nakahara Y, et al. Suitability of Bronchoscopic Biopsy Tissue Samples for Next-Generation Sequencing. *Diagnosics*. 2021;11:391.
5. Takeyasu Y, Yoshida T, Motoi N, Teishikata T, Tanaka M, Matsumoto Y, et al. Feasibility of next-generation sequencing (OncoPrint™ DX Target Test) for the screening of oncogenic mutations in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2021;51:1114-1122.
6. Kato K, Okami J, Nakamura H, Honma K, Sato Y, Nakamura S, et al. Analytical performance of a highly sensitive system to detect gene variants using next-generation sequencing for lung cancer companion diagnostics. *medRxiv*. 2021. doi: 10.1101/2021.10.13.21264976.
7. 森川 慶, 木田博隆, 半田 寛, 西根広樹, 井上健男, 峯下昌道. 気管支鏡検体等の細胞診検体を使用した肺癌コンパクトパネルの有用性. *気管支学*. 2022;44:S251.
8. Morikawa K, Inuma M, Shinozaki Y, Nishine H, Inoue T, Mineshita M. A case of advanced adenocarcinoma genetically confirmed with EGFR/BRAF co-mutation in both primary and metastatic lesions. *Ther Adv Med Oncol*. 2021;13:17588359211053420.
9. 井上匡央, 奥村文浩, 佐野 仁, 水島隆史, 塚本宏延, 藤田恭明, 他. 消化管粘膜下腫瘍に対するEUS-FNBの有用性の検討：A propensity score-matching analysis. *日本消化器内視鏡学会雑誌*. 2020;62:85-92.

10. Xie F, Zheng X, Mao X, Zhao R, Ye J, Zhang Y, et al. Next-Generation Sequencing for Genotyping of Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration Samples in Lung Cancer. *Ann Thorac Surg*. 2019;108:219-226.