

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編

肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

(2024年4月改訂版)

1. 序文	池田 徳彦
2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査	枝園 和彦
3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い	宗 淳一, 畑中 豊
4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常	
4-1. EGFR	枝園 和彦
4-2. ALK	朝重 耕一
4-3. ROS1	松本 慎吾
4-4. BRAF	阪本 智宏
4-5. MET	横内 浩, 谷田部 恭
4-6. RET	阪本 智宏
4-7. KRAS	清水 淳市
4-8. HER2	須田 健一, 畑中 豊
4-9. NTRK	三窪 将史
4-10. PD-L1	清水 淳市

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

委員長 豊岡 伸一

副委員長 清水 淳市

委員 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗 淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩

1. 序文

この度、「肺癌学会バイオマーカー委員会編 肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き」を公開する運びとなった。さかのぼれば、肺癌学会によるバイオマーカー手引きの作成は 2009 年 3 月に公開された「肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の解説（日本肺癌学会 EGFR 解説作成委員編）」に始まる。その後、様々なドライバー遺伝子が発見されるとともに、対応する治療薬剤が開発され臨床実装された。同時に、これらの遺伝子異常を的確に検出するための検査方法の開発が進んだ。これら肺癌診療の進歩を受けて、肺癌学会バイオマーカー委員会を中心に *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET* Exon14 skipping, *RET*, *KRAS*, PD-L1 それぞれのバイオマーカーに関する手引きを作成し、肺癌学会のホームページ上に公開してきた。そして今回、これらの手引きを統合するとともに、近年開発が目覚ましいマルチプレックス検査に関する手引き、バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱いに関する手引き、および *HER2* および *NTRK* に関するそれぞれの手引きを新たに作成した。さらに、検査に関する保険点数と、検査ごとの報告対象バリエーションに関する項目を追加し、全てを 1 冊にまとめて公開する運びとなった。

本手引きには、肺癌診療に欠かすことのできないバイオマーカー検査の詳細のみならず、各遺伝子異常がもたらす臨床病理学的特徴や、対応する治療薬の開発についてもまとめられている。これらの客観的・網羅的情報は、肺癌診療のガイドとしてのみでなく、この分野の知識の整理に最適なものとなっていると確信している。本手引きが、肺癌診療ガイドラインと共に臨床現場における適正な診断治療提供の一助となることを祈念する。

末筆ながら、忙しい日常業務の傍ら、本手引きの作成にご尽力いただいた日本肺癌学会バイオマーカー委員の諸氏には深甚なる敬意と感謝の意を表明したい。

2024 年 4 月吉日
日本肺癌学会理事長
池田徳彦

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査

(2024年4月改訂版)

目次

(1) はじめに	2
(2) 非小細胞肺癌に対するバイオマーカー検査の流れ	2
1. 分子標的治療薬とコンパニオン診断薬 (CDx)	2
2. 進行・再発非小細胞肺癌におけるマルチ CDx のアルゴリズム	3
(3) マルチコンパニオン診断薬 (マルチ CDx) の特徴	4
1. AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル	5
2. NGS を用いたマルチ CDx	6
2-1. オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム (オンコマイン DxTT)	8
2-2. 肺がんコンパクトパネル Dx マルチコンパニオン診断システム	8
(4) がんゲノムプロファイリング検査 (CGP)	8
1. FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル (F1CDx) / FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル (F1LiquidCDx)	9
2. OncoGuide™ NCC オンコパネルシステム (NCC オンコパネル)	10
3. その他の CGP	10
(5) おわりに	10
参考文献	11

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

枝園 和彦, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 須田 健一, 宗 淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査

(1) はじめに

非小細胞肺癌（NSCLC）では複数のドライバー遺伝子異常が同定され、各々のドライバー遺伝子を標的とした分子標的治療が高い治療効果を示す¹。2024年2月現在、表1に記載したドライバー遺伝子に対して、分子標的治療薬が承認されている。進行・再発NSCLCでは、初回治療前にこれらのドライバー遺伝子異常の有無およびPD-L1の発現を確認し、その結果に基づいて初回治療または二次治療以降で対応する分子標的治療薬等を選択することが推奨されている²。周期期においても、EGFR変異やALK融合遺伝子の有無およびPD-L1の発現状況に応じて術前・術後補助療法が検討されるようになった。また、表に記した以外のドライバー遺伝子を標的とする治療薬の開発も進んでおり、今後さらに診断すべき遺伝子が増えることが予想される。

従来、NSCLCの遺伝子診断は、個々の遺伝子を1つずつ検査する単一（シングルプレックス）遺伝子検査を用い

て行われていたが、診断すべき遺伝子数の増加に伴い、複数の遺伝子を同時に検査するマルチプレックス（マルチ）遺伝子検査が主流となった。本項では、NSCLCに対するバイオマーカー検査の流れと、マルチ遺伝子検査について概説する。なお、単一遺伝子検査の詳細については、各遺伝子の手引きに詳細を記載したのでそれぞれ参照されたい。

(2) 非小細胞肺癌に対するバイオマーカー検査の流れ

1. 分子標的治療薬とコンパニオン診断薬（CDx）

進行・再発NSCLCにおいては、様々な分子標的治療薬が承認されているが、各々の分子標的治療薬を使用する際にはコンパニオン診断が必須である。表1に、2024年2月現在承認されている分子標的治療薬と、対応するコンパニオン診断薬（CDx）を示す³。従来、NSCLCに対するコンパニオン診断は、Polymerase chain reaction（PCR）法、免疫組織化学染色（IHC）法、fluorescence *in situ* hybridization（FISH）法などの単一遺伝子検査を用いて

表1. 非小細胞肺癌に対する分子標的薬とコンパニオン診断薬（2024年4月現在）

遺伝子異常	分子標的治療薬	マルチCDx					単一遺伝子検査			
		AmoyDx	オンコマイン DxTT	コンバクト パネル	F1 CDx	F1 Liquid CDx	PCR法	IHC法	FISH法	NGS法
EGFR 変異	ゲフィチニブ	●	●	●	●	●	コバスEGFR (組織・血漿) therascreen EGFR			EGFRリキッド (組織・血漿)
	エルロチニブ	●	●	●	●	●	コバスEGFR (組織・血漿) therascreen EGFR			EGFRリキッド (組織・血漿)
	アファチニブ	●	●	●	●	●	コバスEGFR (組織・血漿) therascreen EGFR			EGFRリキッド (組織・血漿)
	ダコミチニブ		●		●		コバスEGFR (組織) therascreen EGFR			
	オシメルチニブ	●	●	●	●	●	コバスEGFR (組織・血漿)			
ALK 融合遺伝子	クリソチニブ	●	●	●	●	●		ベンタナ OptiView ヒストファインAEP	Vysis	
	セリチニブ				●	●		ベンタナ OptiView ヒストファインAEP		
	アレクチニブ	●	●	●	●	●		ベンタナ OptiView ヒストファインAEP	Vysis	
	ブリグチニブ	●	●	●	●			ベンタナ OptiView ヒストファインAEP	Vysis	
	ロルラチニブ		●					ベンタナ OptiView ヒストファインAEP		
ROS1 融合遺伝子	クリソチニブ	●	●	●			AmoyDx ROS1			
	エヌトレクチニブ	●	●		●	●	AmoyDx ROS1			
BRAF V600E	ダブラフェニブ + トラメチニブ	●	●	●						
MET ex14 skipping	カプマチニブ				●	●				
	テボチニブ	●		●						
RET 融合遺伝子	セルベルカチニブ	●	●	●						
KRAS G12C	ソトラシブ	●		●			therascreen KRAS			Guadant360
HER2 変異	トラスツマブ デルクステカン		●							Guadant360
NTRK1/2/3 融合遺伝子 (固形癌が対象)	エヌトレクチニブ				●	●				
	ラロトレクチニブ				●					

行われていた。そのような状況下で、2019年6月に、次世代シーケンス解析（NGS）法を用いたマルチCDxとして、「オンコマイン Dx Target Test マルチCDx システム（オンコマイン DxTT）」および「FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル（F1CDx）」が保険収載された。2022年1月には、PCR法を用いたマルチCDxである「AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル（AmoyDx）」が、2023年2月には、NGSを用いたマルチCDxである「肺がんコンパクトパネルDx マルチコンパニオン診断システム（肺がんコンパクトパネル）」が保険収載された。加えて2021年8月には、血液検体を用いたマルチCDxとして「FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル（F1LiquidCDx）」が保険適用となっている。これらのマルチCDxについては、対応可能な遺伝子数が既に追加または今後追加される見込みとなっており、最新の承認状況は医薬品医療機器総合機構（PMDA）のホームページ「コンパニオン診断薬等の情報」³等にて確認されたい。また、本邦における単一遺伝子検査からマルチ遺伝子検査に至る変遷の詳細については、「4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常 4-1. EGFR」に記載した。

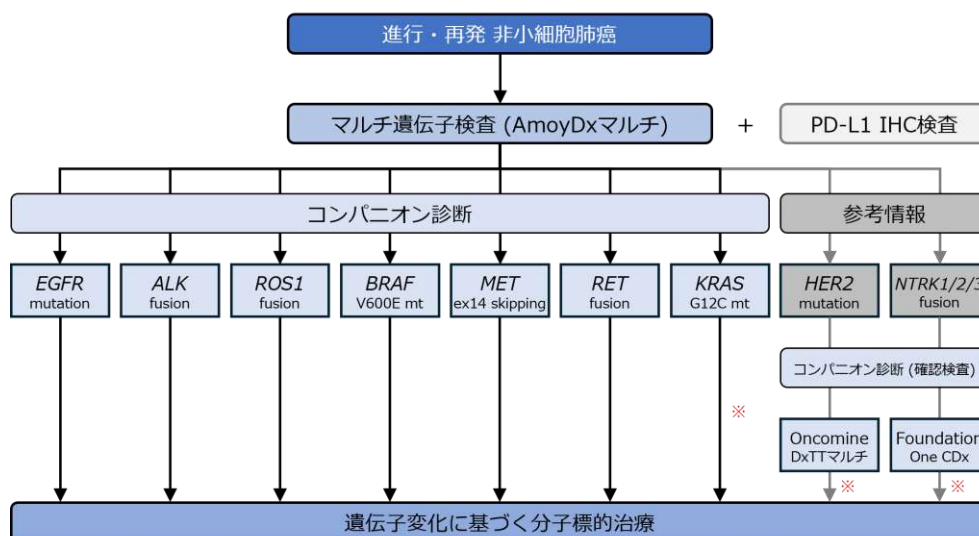
2. 進行・再発非小細胞肺癌におけるマルチCDxのアルゴリズム

日本肺癌学会編「肺癌診療ガイドライン 2023年版」²において、IV期NSCLCのドライバー遺伝子の診断は、初回治療前にすべての対象遺伝子について優先順位をつけずに行うように推奨されている。従来、複数遺伝子の診断は単一遺伝子検査を組み合わせで行われていたが、検体や費用、時間を浪費することや、RETなどでは単一遺伝子検査が存在しないことから、進行・再発NSCLCにおける初回治療前の遺伝子診断は、マルチCDxを用いることが強く推奨される。検体量が少ないなどの理由で、やむを得ずマルチCDxが行えない場合は、単一遺伝子検査を考慮する。図1に、2024年2月現在における進行・再発NSCLCに対するマルチCDxを用いた検査のアルゴリズムを、PCR法（①AmoyDx）を用いた場合と、NGS法（②オンコマイン DxTT および③肺がんコンパクトパネル）を用いた場合に分けて示す。図に示した通り、進行・再発NSCLCの初回治療前には、いずれかのマルチCDxおよびPD-L1のIHC検査を行い、結果に応じて治療方針を決定することが求められる。これらのマルチCDxを使いこなすためには、肺癌の診断目的に検体採取を行う時点から、遺伝子診断を念頭に置いた検体の採取や管理を行うことが重要である。それぞれの検体の取り扱いについては、「3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取り扱い」や、日本病理学会から出版されている「ゲノム診療用病理組織検体取り扱い規定」⁴などを参照されたい。

マルチ遺伝子検査法を用いた検査アルゴリズム

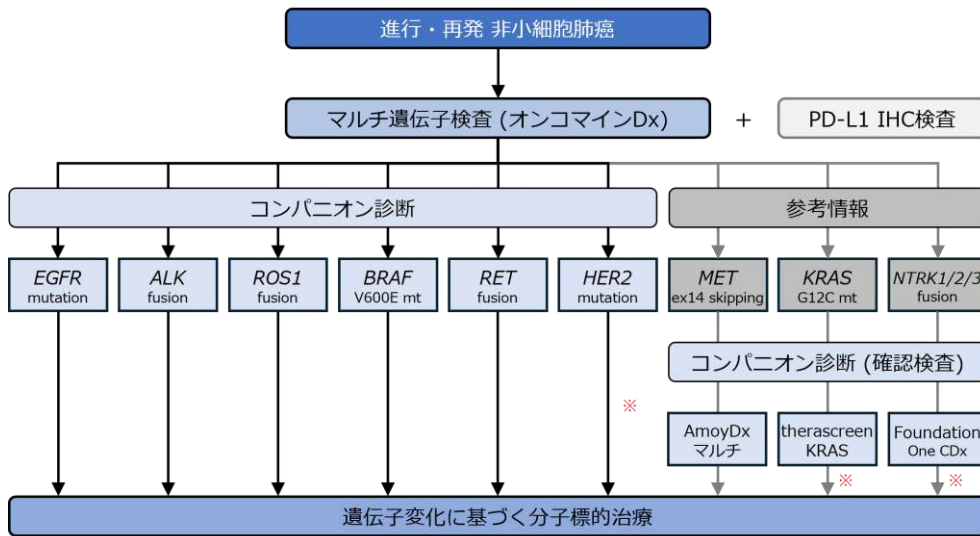
【PCR法】

① 初回遺伝子検査として**AmoyDx肺癌マルチ遺伝子PCRパネル**を用いる場合



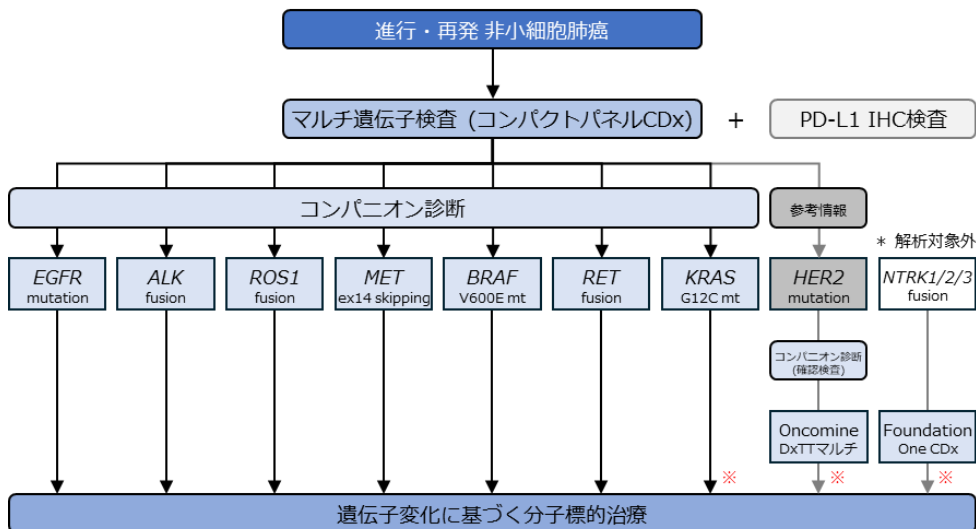
【NGS法】

② 初回遺伝子検査として**オンコマインDx Target Test マルチCDxシステム**を用いる場合



【NGS法】

③ 初回遺伝子検査として**肺がんコンパクトパネルCDx**を用いる場合



* : 分子標的薬は二次治療以降で投与可能

図 1. 進行・再発肺癌に対するマルチ CDx を用いた検査アルゴリズム

(3) マルチコンパニオン診断薬 (マルチ CDx) の特徴

NGS を用いたマルチ CDx として、オンコマイン DxTT と肺がんコンパクトパネルの他に、F1CDx および F1LiquidCDx が承認されているが、保険診療上 F1CDx/F1LiquidCDx を NSCLC の初回治療前にコンパニオン診断目的に用いることは想定され難いため、本項では AmoyDx とオンコマイン DxTT、肺がんコンパクトパネ

ルについて記載する (表 2)。表 1 および図 1 に示した通り、それぞれの検査において、コンパニオン診断対象遺伝子・薬剤が異なる点には注意が必要である。PCR 法をベースとした AmoyDx は、NGS 法を用いて行われるオンコマイン DxTT と比較して解析する遺伝子数 (参考情報も含む) が少ないが、検体提出から結果返却までの時間 (Turn-around time: TAT) が短いことや遺伝子変異の最小検出感度 (Limit of detection: LOD) が高いことが特徴であ

表2. マルチ CDx の特徴

	AmoyDx	オンコマインDxTT	肺がんコンパクトパネル
検査原理	リアルタイムPCR法	NGS法 (アンプリコン法)	NGS法 (アンプリコン法)
解析対象遺伝子数 (CDx対象)	11遺伝子 (7遺伝子)	46遺伝子 (6遺伝子)	8遺伝子 (7遺伝子)
外注時の検査TAT	4-7日	6-11日	6-12日
検査に使用する核酸量 (FFPE検体)	DNA ・ 3か月以内 : 67.5ng ・ 3か月-1年以内 : 90ng ・ 1-2年以内 : 112.5-135ng RNA : 120-1200ng (吸光度法)	DNA : 10ng RNA : 10ng (蛍光法)	DNA : 10ng RNA : 10ng (DNA:蛍光法, RNA:吸光度法)
提出する未染標本 (5 μ m)	FFPE : 7-10枚	手術検体 : 2枚 生検検体 : 10枚 僅少検体 : 15-20枚 (2x2mm以下)	手術検体 : 2-5枚 生検検体 : 5-10枚 僅少検体 : 15-20枚 (2x2mm以下)
細胞診検体の扱い	細胞ペレット、セルブロック等	細胞ペレット、セルブロック等	GM管等
腫瘍細胞含有割合	20%以上	30%以上	5%以上
遺伝子変異の最小検出感度 (LOD)	1%	4.4-6.4%	1%

※各ホームページ、添付文書等に基づき作成

る。したがって、組織の腫瘍細胞含有割合が少ないときや診断を急ぐときなどは、AmoyDx が考慮される。一方で、いずれの検査においても組織量が極端に少ない場合は、検査が成功しても結果が偽陰性になる可能性があるため、できるだけ大きな検体を提出することが望ましい。また、MET エクソン 14 スキッピングは他のドライバー遺伝子と比較して、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫様癌などの非腺癌でも検出される頻度が高いことが知られており⁵、これらの組織型ではMET変異の検出が可能なマルチCDxの使用が推奨される。以下の項において、それぞれのマルチ遺伝子検査に関する詳細を記載する。

1. AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル

AmoyDx は、腫瘍検体から抽出した核酸 (DNA および RNA) を用いて、リアルタイム PCR 法により遺伝子異常を検出する (図 2)。DNA の解析では、解析原理として ARMS (amplification refractory mutation system) 法が用いられ、一塩基置換や欠失/挿入などの遺伝子変異を検出する。RNA の解析では、RT-PCR (reverse transcription PCR) 法によって融合遺伝子やエクソンスキッピングを検出する。PCR は NGS と比較して簡便であり、TAT が 5 日前後と迅速に検査可能であることが特徴

である。また、NGS と比較して検査成功割合が高いと考えられている。LOD は、遺伝子変異の場合、変異アレル 1-5%で、融合遺伝子またはエクソンスキッピングの場合、1 反応あたり 150 コピーとされている⁶。リアルタイム PCR 装置としては、QuantStudio5 (Thermo Fisher Scientific 社)、LightCycler480II およびコバス z480 (いずれも Roche Diagnostics 社) が承認されており、これらを病院内に設置して自施設で検査することも可能である。

AmoyDx では、DNA と RNA を用いて、11 遺伝子 (*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*BRAF*、*MET*、*RET*、*KRAS*、*HER2*、*NTRK1/2/3*) における計 167 バリエントを一度に同時に解析する。DNA を用いた解析では、*EGFR* エクソン 18-21 変異、*BRAF* V600E、*HER2* エクソン 20 変異、*KRAS* コドン 12 および 13 の変異を検出する。RNA を用いた解析では、*ALK*、*ROS1*、*RET*、*NTRK1/2/3* の各融合遺伝子と *MET* エクソン 14 スキッピングを検出する。それぞれの遺伝子異常検出のための判定基準 (Ct 値) は添付文書⁶を参照されたい。また、CDx 対象以外の遺伝子の結果も、担当医師の希望があれば参考情報として返却されるが、CDx 対象でないため、これらの情報だけで治療薬を投与することはできない。例えば、AmoyDx で *HER2* 変異が検出されて

① 検体からの核酸抽出



② 本キットによる検査



図2. AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネルによる測定フロー

も、現時点ではコンパニオン診断の対象ではないことから、トラスツズマブ デルクステカンを用いて治療するためには、CDxであるオンコマイン DxTTで *HER2* 変異を確認する必要がある。

検査に用いる検体は、腫瘍細胞の存在が確認されたホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織あるいは新鮮凍結組織である。検査に用いる推奨核酸量を表 2 に示すが、いずれも腫瘍細胞含有割合が 20%以上あることが推奨される。FFPE 組織は厚さ 5 μ m の切片 7-10 枚を提出する。新鮮凍結組織を用いる場合は、気管支鏡下の鉗子生検検体や針生検検体であれば組織片 2-3 個、手術検体であれば 5mm³ 以上の組織を提出する。提出検体から抽出された DNA/RNA の濃度は吸光度法 (NanoDrop) を用いて測定する。

2. NGS を用いたマルチ CDx

NSCLC のドライバー遺伝子異常を同定するための

NGS を用いたマルチ遺伝子検査としては、マルチ CDx に加えて、後述の通り包括的がんゲノムプロファイリング検査 (comprehensive genome profile: CGP) が 2019 年に保険適用となっている。NGS を用いた遺伝子解析には、網羅的に遺伝子を解析する全ゲノムシーケンス、全エクソームシーケンスに加え、特定の遺伝子を解析するターゲットシーケンスがある (図 3)。さらにターゲットシーケンスは、アンプリコンシーケンス法 Hot Spot パネル検査と 100 以上の遺伝子を網羅的に解析するキャプチャーシーケンス法に大別される (図 4)⁷。それぞれの特徴について表 3 にまとめた⁸。以下では、NGS を用いたマルチ CDx として承認されている、オンコマイン DxTT と肺癌コンパクトパネルについて記載する。

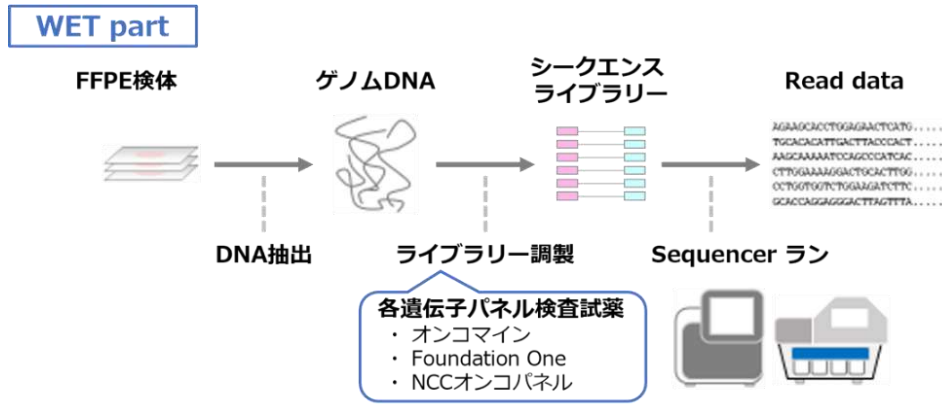


図3. ターゲットシーケンスにおける次世代シーケンサーの解析フローの概略

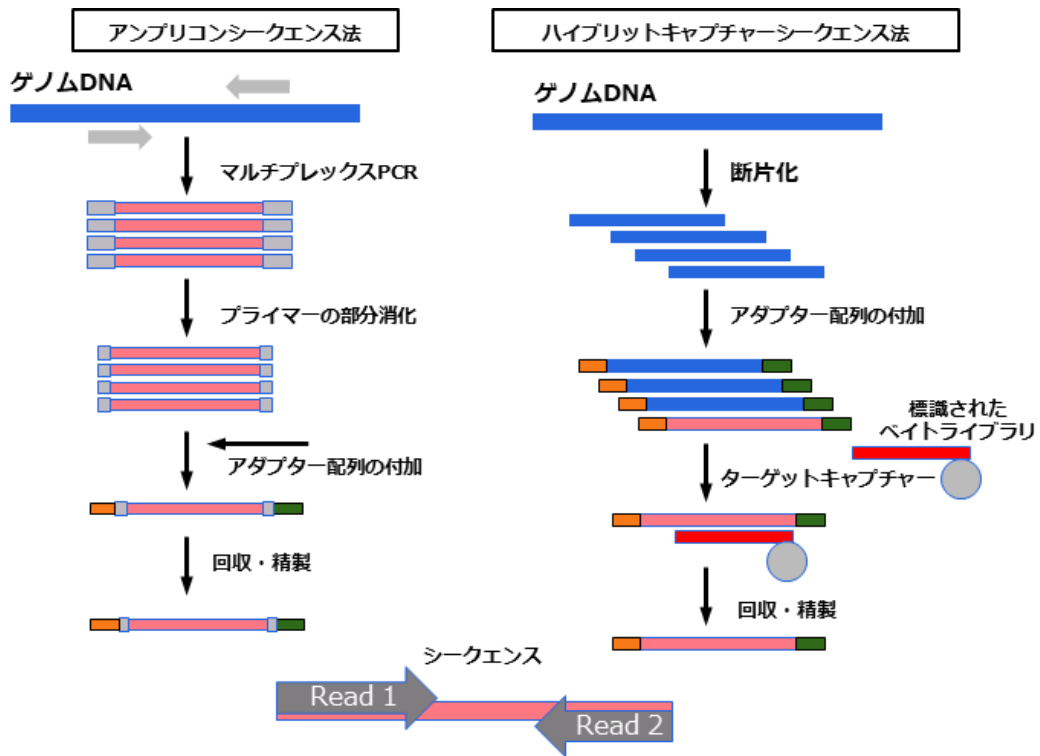


図4. アンプリコンシーケンスとハイブリットキャプチャーシーケンスの原理
 (久保ら, 病理と臨床 35, 653 (2017), 一部改変)
 文光堂より転載許諾取得済み (2021)

表 3. アンブリコンシーケンスとハイブリットキャプチャーシーケンスの特徴の比較

特徴	アンブリコンシーケンス法	ハイブリットキャプチャーシーケンス法
代表的なパネル	オンコマイン Target Test マルチCDx システム	OncoGuide NCCオンコパネルシステム FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル
特徴	少数で特定の遺伝子の変異ホットスポットなどを手早く簡便にスクリーニングするのに向いている	コピー数の変化や融合遺伝子を含む多くの遺伝子の包括的な情報を得るのに向いている
PCR反応による増幅	あり	なし
必要とされるDNA量	より少ない	より多い
Gene copy number	難しい	得ることができる
情報処理	それほど必要ではない	必要
報告までの時間	より短い	より長い
シーケンスエラー	より多い	より少ない
未知の融合遺伝子	シーケンス不可	シーケンス可能

2-1. オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム (オンコマイン DxTT)

オンコマイン DxTT は、アンブリコンシーケンス法を用いた Hot Spot パネル検査である。腫瘍検体由来 DNA を用いて 46 遺伝子の hot-spot についての変異の有無を解析するとともに、腫瘍検体由来 RNA を用いて 21 遺伝子について融合遺伝子を解析する。これらのうち、表 1 および図 1 に示した遺伝子について CDx として承認されている。オンコマイン DxTT による解析結果の報告範囲は徐々に拡大され、CDx として機能する *EGFR* 変異 (エクソン 19 の欠失変異およびエクソン 21 の L858R 変異)、*ALK* 遺伝子融合、*ROS1* 遺伝子融合、*BRAF* V600E 変異に加え、2019 年 10 月の一部変更によって T790M を含む *EGFR* 遺伝子の稀な変異 (uncommon mutation) が追加された⁹。さらに 2021 年 9 月には *RET* 融合遺伝子、2023 年 8 月には *HER2* 変異についても医薬品適応判定の補助として追加された。必要核酸量や LOD 等については表 2 の通りである¹⁰。

2-2. 肺がんコンパクトパネル Dx マルチコンパニオン診断システム

肺がんコンパクトパネルは、NSCLC に特化した NGS 法を用いた CDx で、本邦で開発された。解析する遺伝子を小単位 (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検出感度を向上させている¹¹。解析に必要な DNA および RNA 量は 10 ng 以上とされ、腫瘍含有割合は 5%以上が推奨されている (表 2)¹²。FFPE 検体の他に、細胞診検体についても比較的容易に検査提出が可能となっている。細胞診検体を用いる場合は、病理細胞診評価用と検査提出用のペア検体を準備し、病理細胞診評価により悪性細胞を確認した後、確認できたペア検体を提出する。細胞診検体の提出には、GM 管と呼ばれる核酸底液剤入りの検体採取容器を用いる。肺がんコンパクトパネルは、2023 年 2 月に 4 遺伝子 (*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*MET*) に、2024 年 2 月には追加で 3 遺伝子 (*BRAF*、*KRAS*、*RET*) について保険適用となった (表 1 および図 1)。

(4) がんゲノムプロファイリング検査 (CGP)

NSCLC の臨床で用いられるマルチ遺伝子検査 (遺伝子パネル検査) には、大きく分けて二つの機能がある。一つ

2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査

は、CDx としての分析学的・臨床的妥当性が示されたコンパニオン診断機能、もう一つは特定のバイオマーカーの有無ではなく、検出された遺伝子異常を総合的に判断して治療選択につなげるがんゲノムプロファイリング (CGP) 機能である。保険収載されているマルチ遺伝子検査は、どちらか片方または両方の機能を有する。CGP のためのマルチ遺伝子検査 (遺伝子パネル検査) としては、2019 年 6 月に F1CDx および「OncoGuide NCC オンコパネルシステム (NCC オンコパネル)」が保険適用となった。その後 2021 年 8 月および 2023 年 7 月には、血漿検体を用いた F1LiquidCDx および「Guardant360 CDx がん遺伝子パネル」が、それぞれ保険適用となった。さらに 2023 年 8 月には「GenMineTOP がんゲノムプロファイリングシステム」についても保険適用となり、検査の選択肢が増えつつある。

NSCLC の臨床検体を用いてマルチ遺伝子検査を行う場合の留意点として、現在の我が国の保険診療の枠組みにおいては、CDx は NSCLC の診断時から使用できるが、CGP は標準治療の終了時 (あるいは終了見込み時) の使用に限られる。また後者は、ゲノム異常の包括的理解に基づき治療方針を決定する検査であるため、ゲノム医療やがん薬物療法の専門家による解釈や、遺伝性疾患に対応できる遺伝医療の専門家の関与が必須となる¹³。現在のところ、がんゲノム医療中核拠点病院およびがんゲノム医療拠点病院において、各分野の専門家による検討会 (エキスパートパネル) により治療方針の検討を行う必要があり、CGP によるがんゲノム医療の実施は、これらにがんゲノム医療連携病院を加えた施設でのみ可能となっている。一方で、標準治療が終了 (あるいは終了見込み) の症例に対して CGP を行った場合に、治療薬に到達できる可能性は 10% 前後との報告もあり¹⁴、CGP の結果をいかに治療に結び付けていくかが今後の課題と言える。以下に、本邦で使用される代表的な CGP の特徴をそれぞれ記す。

1. FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル (F1CDx) / FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル (F1LiquidCDx)

F1CDx はハイブリッドキャプチャーシーケンス法を用いたマルチ遺伝子検査である。F1CDx は腫瘍組織由来 DNA を、F1LiquidCDx は血漿中 ctDNA (circulating

tumor DNA: 血中循環腫瘍 DNA) を解析対象とする。324 遺伝子を搭載し、309 遺伝子の塩基置換・挿入/欠失変異と遺伝子増幅、36 遺伝子の遺伝子融合に加え、F1CDx ではマイクロサテライト不安定性 (MSI) および腫瘍変異負荷 (tumor mutation burden: TMB) の測定ができる。F1LiquidCDx については、コピー数変化は薬事承認範囲外となっている点には留意が必要である。F1CDx は、CGP 機能に加えて CDx としての機能を持つ (表 1)。NSCLC 以外の癌腫についても、*NTRK1/2/3* 融合遺伝子を有する固形癌 (NSCLC を含む)、*HER2* コピー数異常を有する乳癌や *BRAF V600E/K* 変異陽性の悪性黒色腫、*KRAS/NRAS* 野生型の大腸癌の他、*BRCA1/2* 遺伝子変異陽性の卵巣癌および前立腺癌、*FGFR2* 融合遺伝子を有する胆道癌に対し、それぞれの対象となる医薬品の CDx としての使用が認められている。また、MSI-high を有する結腸・直腸癌および固形癌に対する免疫チェックポイント阻害薬 (ニボルマブおよびペムブロリズマブ) の CDx としても承認されている。F1LiquidCDx は、組織検査が困難な症例に対するマルチ遺伝子検査で、F1CDx と同様にごがん CGP 機能および CDx としての機能を有している。表 1 に示した通り、F1CDx とは対象となる医薬品が異なる点には注意が必要である。

融合遺伝子に関して、*ALK*、*NTRK1*、*NTRK2* 遺伝子については融合パートナーが搭載遺伝子以外でも検出可能だが、*NTRK3* 遺伝子については *NTRK3* 自体の搭載はなくパートナー遺伝子側から検出するため、搭載遺伝子がパートナーであった場合のみ検出可能である。搭載 36 遺伝子の中ではこれまでに *ETV6-NTRK3* 融合が多く報告されている¹⁵⁻¹⁷。

なお、F1CDx および F1LiquidCDx では、検体はすべて米国 FMI 社 (Foundation Medicine, Inc.) に送付され、DNA 抽出からシーケンス、データ解析、バイオインフォマティクスによるデータ確認と臨床的意義付けされたレポート作成まですべて米国で行われる。F1CDx のレポートは、最初に「Companion Diagnostics (CDx) Associated Findings」というタイトルでコンパニオン診断に関わる遺伝子変異の検出結果と各変異に対する薬剤が記載される。CDx として用いる場合でも全ての遺伝子についての解析結果も返却されるが、この「Companion

2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査

Diagnostics (CDx) Associated Findings」に記載された結果のみ診療に使うことが、保険上認められている。それ以外の結果を診療に用いるためには、現状の保険診療制度では、標準治療が終了（見込み）となった時点で、エキスパートパネルでの議論を経る必要がある。

2. OncoGuide™ NCC オンコパネルシステム (NCC オンコパネル)

ハイブリッドキャプチャーシーケンス法を用いた CGP 検査で、NSCLC に関しては CDx としての機能は有しない。2021 年 2 月の変更承認によって、がん関連 124 遺伝子の塩基置換・挿入／欠失変異と遺伝子増幅、*NTRK3* を加えた 13 遺伝子の遺伝子融合、TMB および MSI が検査可能となった。融合遺伝子はパートナー遺伝子にかかわらず検出可能である。腫瘍組織由来 DNA だけでなく、正常コントロールとして非腫瘍細胞（末梢血）由来 DNA を用いることで、まれな遺伝子多型も含め完全に除外でき、体細胞遺伝子変異と生殖細胞系列遺伝子変異も区別できるといった特徴がある。

DNA ライブラリー調整試薬キットと遺伝子異常解析プログラムからなるコンビネーション医療機器で、NextSeq™ 550Dx システムを用いることで、品質保証において ISO15189 等の第三者認証を受けている検査機関またはがんゲノム医療中核拠点病院で検査実施可能である。

3. その他の CGP

上記以外にも、様々な特徴を有する CGP が承認され使

用されるようになった。血液検体を用いて行う「Guardant360 CDx がん遺伝子パネル」では、固形癌患者の ctDNA を解析対象とし、74 遺伝子について塩基置換や挿入・欠失、遺伝子増幅、融合遺伝子及び MSI-High を検査可能である。また、肺癌における *KRAS G12C* および *HER2* 変異に対して CDx 機能を有する（表 1）。「GenMineTOP がんゲノムプロファイリングシステム」では、固形癌患者の腫瘍組織検体から抽出した DNA と RNA の他に、同一患者由来の非腫瘍細胞（血液検体）から抽出した DNA を用いて解析を行う。737 遺伝子および *TERT* のプロモーター領域の変異等（塩基置換、挿入・欠失、コピー数異常）、TMB スコア、遺伝子融合（455 遺伝子）およびエクソンスキッピング（5 遺伝子）あるいは遺伝子発現量（27 遺伝子）を検出可能である。

(5) おわりに

進行・再発非小細胞肺癌においては、ドライバー遺伝子を標的とする分子標的治療は有効性が高く、長期生存が期待できる薬物治療である。したがって、ドライバー遺伝子陽性例を確実に診断できるかどうかは患者の予後に大きく影響する。診断すべき複数のドライバー遺伝子を、すべて初回治療前に迅速に診断するためには、マルチ CDx の使用が強く推奨される。それぞれのマルチ CDx の特徴を理解し、臨床経過に応じて適切に検査を選択する必要がある。また、さらなる分子標的治療薬の承認と並行して、コンパニオン診断の対象となる遺伝子が次々と追加承認される見込みである。肺癌診療医は、最新の治療薬および診断薬の情報を確認しながら、診療にあたっていただきたい。

2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査

参考文献

1. Wang M, Herbst RS, Boshoff C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2021;27(8):1345-1356.
2. 日本肺癌学会. 肺癌診療ガイドライン 2023年版. 2023年.
3. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構ホームページ コンパニオン診断薬等の情報. <https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/review-information/cd/0001.html>
4. 日本病理学会. 「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」
https://pathology.or.jp/genome_med/pdf/textbook.pdf
5. Schrock AB, Frampton GM, Suh J, et al. Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *J Thorac Oncol*. 2016;11(9):1493-502.
6. AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル添付文書
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/ivdDetail/ResultDataSetPDF/850278_30300EZX00076000_A_01_07
7. 久保ら, 病理と臨床 35, 653 (2017)
8. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2018;13:323-358.
9. 日本肺癌学会. オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システムのまれな EGFR 遺伝子変異に関する取扱いについて.
https://www.haigan.gr.jp/uploads/files/%E3%82%AA%E3%83%B3%E3%82%B3%E3%83%9E%E3%82%A4%E3%83%B3_EGFR%20uncommon%20mutation%E5%8F%96%E6%89%B1%E3%81%84%E3%83%AC%E3%82%BF%E3%83%BC_20190712_%E7%A4%BE%E5%8D%B0_r%281%29.pdf.
10. オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム添付文書.
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/kikiDetail/ResultDataSetPDF/840863_23000BZX00089000_B_01_16
11. Kato K, Okami J, Nakamura H, et al. Analytical performance of a highly sensitive system to detect gene variants using nextgeneration sequencing for lung cancer companion diagnostics. *Diagnostics*. 2023;13:1476
12. 肺がんコンパクトパネル® Dx マルチコンパニオン診断システム 添付文書
https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/md/PDF/471589/471589_30400BZX00263000_1_01_01.pdf
13. 枝園和彦, 豊岡伸一. 外科治療における肺がんゲノム医療の現状と今後. *肺癌*. 2022;62:173-179
14. 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*. 2019;110:1480-1490.
15. Pinto A, Nose V, Rojas C, et al. Searching for mammary analogue [corrected] secretory carcinoma of salivary gland among its mimics. *Mod Pathol* 2014;27:30-37.
16. Schram AM, Chang MT, Jonsson P, et al. Fusions in solid tumours: diagnostic strategies, targeted therapy, and acquired resistance. *Nature reviews Clinical oncology* 2017;14:735-748.
17. Skalova A, Vanecek T, Majewska H, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands with high-grade transformation: report of 3 cases with the ETV6-NTRK3 gene fusion and analysis of TP53, beta-catenin, EGFR, and CCND1 genes. *Am J Surg Pathol* 2014;38:23-33.

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い

(2024年4月改訂版)

目次

(1) ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織に関する注意事項	2
1. 手術検体取扱いにおける注意事項 (術中からホルマリン固定まで)	2
2. 生検検体取扱いにおける注意事項 (採取からホルマリン固定まで)	2
3. パラフィン包埋後の取扱いについて	4
(2) 新鮮凍結組織検体の取扱いに関する注意事項	4
(3) 細胞検体の取扱いに関する注意事項	4
(4) 血漿検体の取扱いに関する注意事項	5
(5) 遺伝子パネル検査を行う際の検体取り扱い上の注意点	5
1. 腫瘍細胞含有割合	5
2. 標本組織量	8
(6) 検査精度の確保	10
参考文献	11
付表 検査対象となる検体*	12

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

宗 淳一, 畑中 豊, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 朝重 耕一, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い

進行期非小細胞肺癌症例において、コンパニオン診断を目的としたバイオマーカー検査の実施が不可欠となっており、近年その範囲は周術期まで拡大している¹。使用する検体種は、組織、細胞、血漿検体の3つに大別されるが、主として組織検体、とくにマルチプレックスコンパニオン診断（マルチ検査）やがんゲノムプロファイリング検査といった遺伝子パネル検査では、ホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin fixed and paraffin-embedded；FFPE）組織検体が用いられている²。最近の患者還元型の臨床研究において、全エクソームシーケンス解析や全トランスクリプトーム・シーケンス解析ではFFPE組織検体が、全ゲノムシーケンス解析では新鮮凍結組織検体が、それぞれ用いられるようになっており、これらを視野にいれた組織検体の取り扱いも日常診療上重要になりつつある。細胞検体については、セルブロックはFFPE組織検体に準じ運用されている。一方、未固定検体もしくはアルコール固定検体は単一遺伝子を対象としたコンパニオン診断（シングル検査）では比較的良好に用いられてきたものの、マルチ検査が主流となってから以降は、その使用は減少していた。しかし細胞検体での使用を念頭に開発されたディープレシーケンシングによる高感度なマルチ検査システムの臨床導入により、2023年より徐々に使用が増加しつつある。ここではバイオマーカー検査に用いる検体とその取扱いに関する基本的事項について記す（章末の付表も参照されたい）。

（1）ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織に関する注意事項

1. 手術検体取扱いにおける注意事項（術中からホルマリン固定まで）

手術検体では、固定前プロセスの煩雑さなどから、一般に、生検検体に比べて、核酸品質や単位体積・面積当たりの核酸収量が低くなる場合が多いといわれる。手術中の切除組織と交通する脈管、特に栄養する動脈の結紮が開始点とされ、体外に摘出されるまで時間は「温虚血時間（warm ischemia time）」と呼ばれ、“低酸素をはじめとするストレス応答開始”に加えて、“酵素活性が保たれる体温下にある”ことから、組織試料の質に大きな影響を与えるとされ

る。次に、体外に摘出された組織が、凍結またはホルマリンなどで固定されるまでの間は、「冷虚血時間（cold ischemia time）」と呼ばれ、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程³では、ゲノム解析結果に影響が少ない摘出後の管理法として、摘出後は速やかに冷蔵庫など4℃下で保管し、遅くとも3時間以内に固定を行うことが望ましいとしている⁴。また、手術により切除された組織においては、摘出後30分以上室温で保持することは極力回避することが推奨されている。慣習として、手術終了時に家族の目前で腫瘍に割を入れて術後説明を行う場合があるが、ゲノム診療や感染症対策などを考えると、これらの術後標準操作手順（standard operating procedure：SOP）はいち早く“正しいゲノム診断”を重視したSOPに見直す時期に来ていると言える。手術検体に割を入れる際は、“最大割面をずらして割を入れる”、“胸膜変化を有する部分、特に、最も胸膜が嵌入した部分は避けて割を入れる”、“ホルマリン注入時の漏れを少なくするため、必要最小限の割にする”、などの注意が必要である⁵。

ホルマリン固定液は、10%中性緩衝ホルマリンを用い、サンプル量の10倍で固定することが推奨されている。固定推奨時間は、6～48時間（72時間まで許容）であり、一般的なホルマリンの浸透速度は1mm/時間程度であることを考慮して、必要時切り出しまでに十分な固定が行える程度の厚みまで固定前に適切に入割すること³、気道（脈管）からホルマリン液をシリンジなどで十分に注入することが推奨される。ホルマリン固定による核酸品質への影響として、核酸の断片化や核酸塩基の化学修飾が知られ、特に「C>T置換（シトシン（C）の加水分解に伴う脱アミノ化によりウラシル（U）に置換し、PCR増幅反応によってチミン（T）が生成すること）」が報告されている^{6,7}。なお手術による切除組織の取り扱いや固定方法については肺癌取扱い規約第8版補訂版を参照されたい⁸。

2. 生検検体取扱いにおける注意事項（採取からホルマリン固定まで）

病変の局在・大きさや、施設で実施可能な手技に応じて、超音波内視鏡下穿刺吸引法（EUS-FNA）、肝・骨生検、外科的生検などの適当な検体採取方法を選択する必要がある。

3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い

気管支内視鏡検査では特に検体が微小であり、様々な工夫が必要である。末梢肺結節に対する腫瘍生検では、仮想気管支鏡画像やナビゲーションの併用は病変への確実な到達を容易にし、気管支腔内超音波断層法（EBUS）にガイドシース法（EBUS-GS 法）もしくは細径気管支鏡（EBUS-UT 法）を併用することで再現性が高まり、数多くの検体の採取が可能になる。ただし同一部位で生検を重ねると、後半になるにつれて出血によるアーチファクトが発生する可能性を考慮する必要があり、採取部位を少しずつ変更するなどの工夫をする。一度の生検で大きな検体を採取するために、可能であれば大型の生検鉗子やガイドシースキットを用いる。関与気管支が腫瘍辺縁にしか到達しないような病変では、末梢での経気道的針穿刺後に鉗子生検を行うことでより腫瘍細胞割合の高い検体が採取される。また、経気道的生検方法のクライオバイオプシーでは、大きな検体が採取可能で、DNA・RNA 量は鉗子生検の約3倍で、NGS 解析成功割合は有意に高いとの報告がある⁹。

超音波ガイド下経気管支針生検（EBUS-TBNA）では、19～25G 穿刺針が使用可能で、22G 針で NGS 解析が十分に可能であったとする報告がある¹⁰。腫瘍細胞含有割合の低下を回避するためには、エラストグラフィを含めた超

音波所見による穿刺部位の決定（図 1A）、slow pull 法（図 2B）や迅速細胞診（ROSE 法）の併用が有効である¹¹。

胸水貯留例においては、胸水細胞診検体やセルブロックが確定診断やその後の遺伝子検査に提出されていることが多かったが、腫瘍細胞割合は低いことに注意が必要である。胸腔鏡下に壁側胸膜を生検することで質の高い検体が多く採取可能で、局所麻酔下に安全に施行できるので、可能であれば考慮してもよい。

（本項目については、国立がん研究センター東病院 呼吸器内科の桐田圭輔先生の協力を得た）

生検検体では、周囲環境により検体全体が即座に影響を受ける可能性があるため、採取後は、速やかに固定液に浸着し固定をすることが推奨されている。固定液は、サンプル量の 10 倍量の 10%中性緩衝ホルマリン液を用い、固定時間を 6～48 時間以内にするのが推奨されている³。

なお、各種生検検体の特徴や取扱いの留意点については、章末の付表ならびに肺癌診療ガイドライン 2023 年版¹を、ホルマリン固定後からパラフィン包埋における注意事項については、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程³をご参考いただきたい。

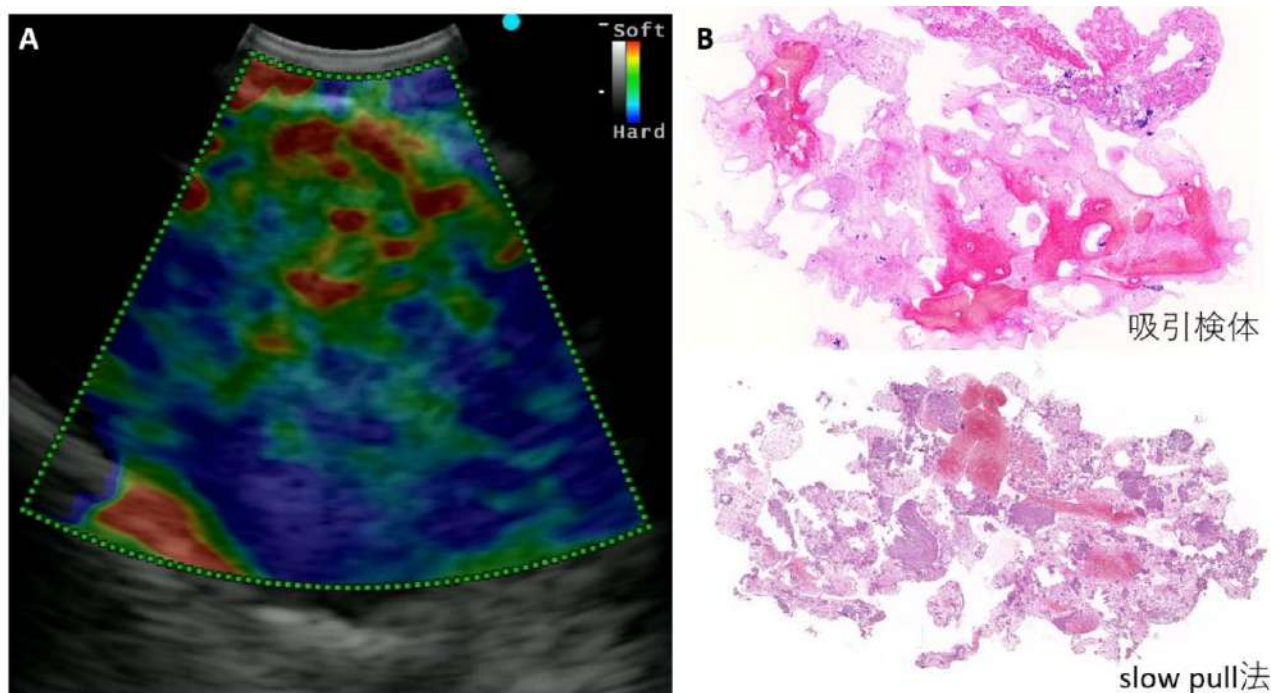


図 1. 生検採取の注意点

A. エラストグラフィではリンパ節内での硬さが評価可能であり、硬い部位（青）から穿刺を行うことで良質な検体が採取できる。

B. EBUS-TBNA 検体での吸引検体（上段）と slow pull 法（下段）の比較。吸引検体では血液の混入が多く、腫瘍細胞が十分採取されていない。

3. パラフィン包埋後の取扱いについて

パラフィン包埋後の検体（FFPE ブロック）の保管は、室温でよいが、多湿を避け冷暗所が推奨されている。ただ、ゲノム診断を目的として作製された FFPE ブロックは、冷蔵下の保存が望ましいとの意見もある¹²。経年により FFPE ブロックは劣化するが、その次世代シーケンス（NGS）検査に対する影響は、使用する遺伝子パネルで異なるが、作製後 3 年以内の使用が望ましいとされる^{3,13}。

FFPE ブロックを薄切した組織切片は、スライドガラスにマウントさせて提出する。各バイオマーカー検査において規定されている必要枚数の未染色標本作製し、そのうちの 1 枚を HE 染色し腫瘍細胞の存在を確認することが推奨される。特に微小な生検検体では、病理診断の後に再薄切した場合には、腫瘍部分あるいは組織そのものがなくなってしまうことがあるので注意を要する。病理診断時にバイオマーカー検査の実施が予定されている場合は、標本作製前に行うトリミングによるロスを最小限にするために、あらかじめ病理診断用の未染色標本作製時にバイオマーカー検査用標本を余分に作製しておくことも有用である⁵。

検体中の腫瘍細胞の存在状態は様々であるため、病理診断報告書に腫瘍量や腫瘍含有割合を記録しておくことが推奨される。またマクロダイセクションを実施した場合は、その旨と実施後の腫瘍量や腫瘍含有割合を記録することが推奨される。また検査センターへ外注する場合、検査に供した検体の HE 染色標本（マクロダイセクションを行う際に、腫瘍部のマーキングを行った HE 染色標本）は、可能な限り検査後にも再確認できるようにしておくことが望ましい⁵。

(2) 新鮮凍結組織検体の取扱いに関する注意事項

新鮮凍結組織検体は、最も高品質の DNA や RNA を抽出可能であるが、同時に DNase や RNase の酵素活性も保持されており、検体の取扱いを迅速に行わなければ、核酸品質を急速に低下させるおそれがあるため、注意を要する。手術室などで割を入れ採取する場合も多いが、腫瘍細胞含有量が不明なため、顕微鏡的に確認する必要がある。

周囲の炎症が強い腫瘍、粘液産生が高度な腫瘍、中心部線維化巣が広範な腫瘍では、腫瘍細胞が採取されず偽陰性になることがある。腫瘍細胞を確認する手段としては、「①凍結腫瘍組織を薄切し、HE 標本作製し、その標本で腫瘍細胞の存在および占有割合を確認する」②採取時に割を入れ、その片割れを凍結組織とし、残りの割面で FFPE 組織標本作製し確認する」などの方法がある¹⁴。

(3) 細胞検体の取扱いに関する注意事項

細胞検体は、組織の穿刺吸引・擦過等により採取される非液状検体と、体腔液・洗浄液などの液状検体に大別され、検体採取後は可及的速やかに検体処理を行うことが推奨されている。非液状検体は、塗抹法や液状化検体細胞診（liquid-based cytology: LBC）法で処理され、液状検体は、塗抹法・LBC 法に加えてセルブロック法で処理されることが多い。検体採取エリアと検体処理エリアが離れている場合など、処理に時間を要すならば、検体を氷冷、もしくは冷蔵保管（4℃）することが望ましいとされる（LBC 保存液の場合は、常温保存も可能だが、直射日光を避け、高温・多湿環境を回避する）。

セルブロック以外の液状検体は、採取検体が十分量あれば、ペア検体として二つに分けることが推奨される。一つは、通常の細胞診として用い、形態学的診断に加えて、腫瘍含有量の評価を行う。もう一つは、核酸抽出用として保管しておく。保管の際は、遠心分離後に上清を廃棄した細胞成分を-80℃で凍結保存するか、冷蔵で長期間保蔵可能な細胞診検体保存容器（GM 管など）を用いることも可能である。

セルブロック作製では、採取～検体処理（遠心分離・上清廃棄）までできるだけ冷蔵（4℃）保存を行い、可及的速やかにホルマリン固定（10%中性緩衝ホルマリンが推奨）し、6～24 時間程度の固定を行うことが推奨されている⁵。セルブロック作製法は複数知られており、遠心分離細胞収集法と細胞固合法に大別される。前者では遠心管法が、後者ではアルギン酸ナトリウム法が、比較的多くの施設で用いられているが、本邦ではそれぞれ 4～5 程度の作製法が用いられていることがこれまでの調査研究で明らかとなっている⁵。セルブロックの包埋やブロック保

3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い

管については、前述の FFPE 組織の取扱いに関する注意事項と同様である。

なお、一般に NGS パネル検査に必要な DNA 最低量は 10ng である。ただし必要な量は使用する遺伝子パネルや NGS 機器の種類によって異なる⁵。1つの有核細胞から得られる DNA 収量は 6 pg 程度と見積もられる。NGS パネル検査に必要な DNA 最低量である 10 ng を得る場合には約 2000 細胞(未染色標本上では腫瘍細胞が豊富なエリアが少なくとも 60~100 mm²程度)からの抽出が必要とされている^{5,15}。

(4) 血漿検体の取扱いに関する注意事項

血漿検体は、組織検体と異なり、腫瘍細胞の割合や DNA の質、量に基づいて評価できないため、血液採取、血漿の分離、血漿検体の保管に至るプレアナリシスの段階において適切に扱われた検体を使用すべきである(付表)。血液採取(採血)手技が血液成分に大きな影響を及ぼすため、日本臨床検査標準協議会から出されている「標準採血法ガイドライン」改訂版(GP4-A3)などのガイドラインに基づいた正しい採血法を用いることが重要である。採血管は、血漿用採血管である EDTA 採血管が用いられることが多いが、血漿 CGP 検査では、医療機器認証を受けた指定のセルフリーDNA 抽出用採血管を原則使用する(FoundationOne Liquid がんゲノムプロファイルでは「Roche セルフリーDNA 抽出用採血管」、Guradant360 CDx がん遺伝子パネルでは「 Streck 採血管 (cell-free DNA BCT)」が採用されている)。特に採血後の検体を長時間室温で放置すると、血球成分の崩壊や DNA の分解の原因につながる¹⁶。また、血漿成分を分離する際に血球成

分が混入すると、有核細胞由来のゲノム DNA が混入するため、腫瘍由来のゲノム DNA が希釈され、偽陰性となる可能性があることは注意しなければならない。通常の EDTA-2K の採血管を使用した場合、血漿の分離は、採血後 6~8 時間以内に行うことが推奨される。血漿分離後の血漿検体は、15~30℃で 1 日間、2~8℃で 3 日間、-25~-15℃で 12 カ月、そして-70℃以下の場合は 12 カ月保管可能である。

(5) 遺伝子パネル検査を行う際の検体取り扱い上の注意点

遺伝子パネル検査に用いられる検体はいずれも FFPE 標本が推奨されている。新鮮凍結組織や凍結細胞診検体からの解析も可能であるが、腫瘍細胞含有割合を評価することが必要である³。FFPE 標本であれば、手術切除標本、生検検体、セルブロック検体を用いることが可能であるが、解析に適しているかどうかについては腫瘍細胞含有割合および標本組織量によって決定される(日本肺癌学会。肺癌診療ガイドライン 2023 年版:CQ16 の表 1~2 参照)¹。

1. 腫瘍細胞含有割合

次世代シーケンサー(NGS)等の臨床導入を契機に、より重要性が高まった評価項目であり、解析対象となる組織における有核細胞のうち、腫瘍細胞の核が占める割合を意味する。ダイセクションを行って提出組織の一部を解析に用いる場合は、ダイセクションする領域における有核腫瘍細胞割合となる。この腫瘍細胞含有割合が重要になる理由としては、図 1 に示すように、腫瘍細胞含有割合が低い

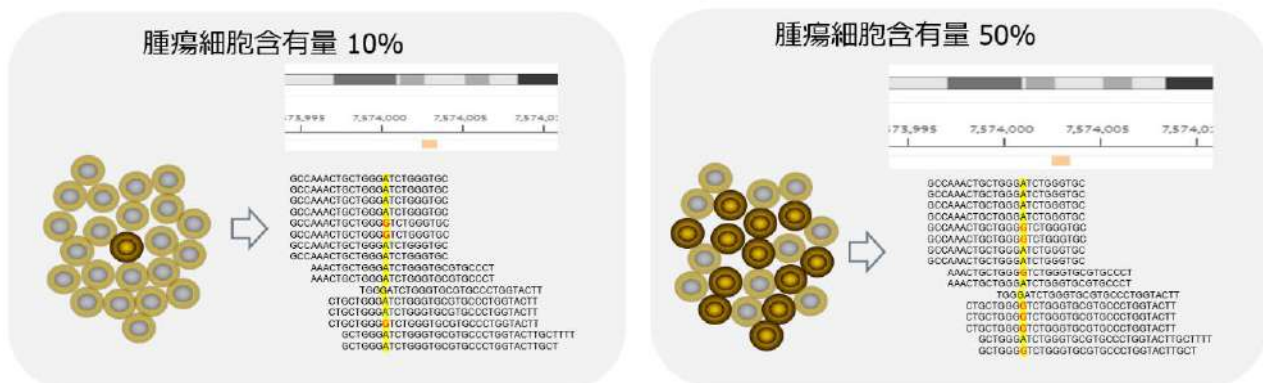


図 1. 腫瘍細胞含有割合の違いによる変異アリル頻度の違い

3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い

と得られるシークエンスデータにおける変異アリル頻度が低くなるためである。変異の検出はシークエンスされるリード数と関連し、シークエンスエラーなどで発生する偽陽性と区別するため、カットオフ値は統計学的に安全域を設けて設定されている(図2)。そのため、規定以下の腫瘍細胞量以下であった場合は、変異アリル頻度がカットオフ値より低くなる場合があり、偽陰性を示す場合もある。公表されている最小検出限界(Limit of Detection, LOD)をもとに考えると、オンコマイン DxTT では、EGFR 変異 L858R は 10.6%、Ex19Del は 8.8%の腫瘍細胞含有割合がないと検出できず、BRAF V600E 変異は 12.8%以上の腫瘍細胞含有割合が必要となる。

腫瘍細胞含有割合は、腫瘍細胞を正確に同定することができる病理診断医の評価が必須となる。しかしながら、遺伝子パネル検査では厳密に求められる指標であり、腫瘍細胞占有率(面積での割合)と混同される場合もあることから注意が必要である(図3)。

また、病理診断医の評価は、これまでの経験をもとに判断されることが多く、その場合過剰評価する傾向があることが知られている¹⁷⁻¹⁹。その一つの原因として、具体的に

どのように計測すべきについての詳細な説明に乏しいことが挙げられ、その方法についての解説を受けることで改善することが報告されている¹⁹。代表的な例を以下(図4-7)に提示したので参照されたい。

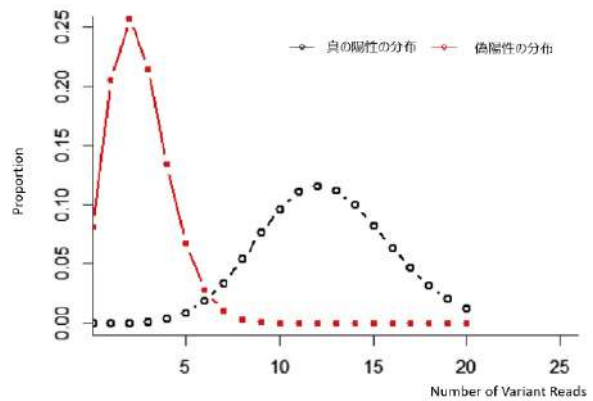


図2. シークエンスエラー1%とした場合の偽陽性の2項分布および腫瘍細胞10%で250リードシークエンスした場合の真の陽性についての2項分布。低い変異アリル頻度の場合、真の陽性と偽陽性が重なるところがある。(J Mol Diagn 2017;19:341-365より引用) Reproduced with permission from Elsevier (2021)

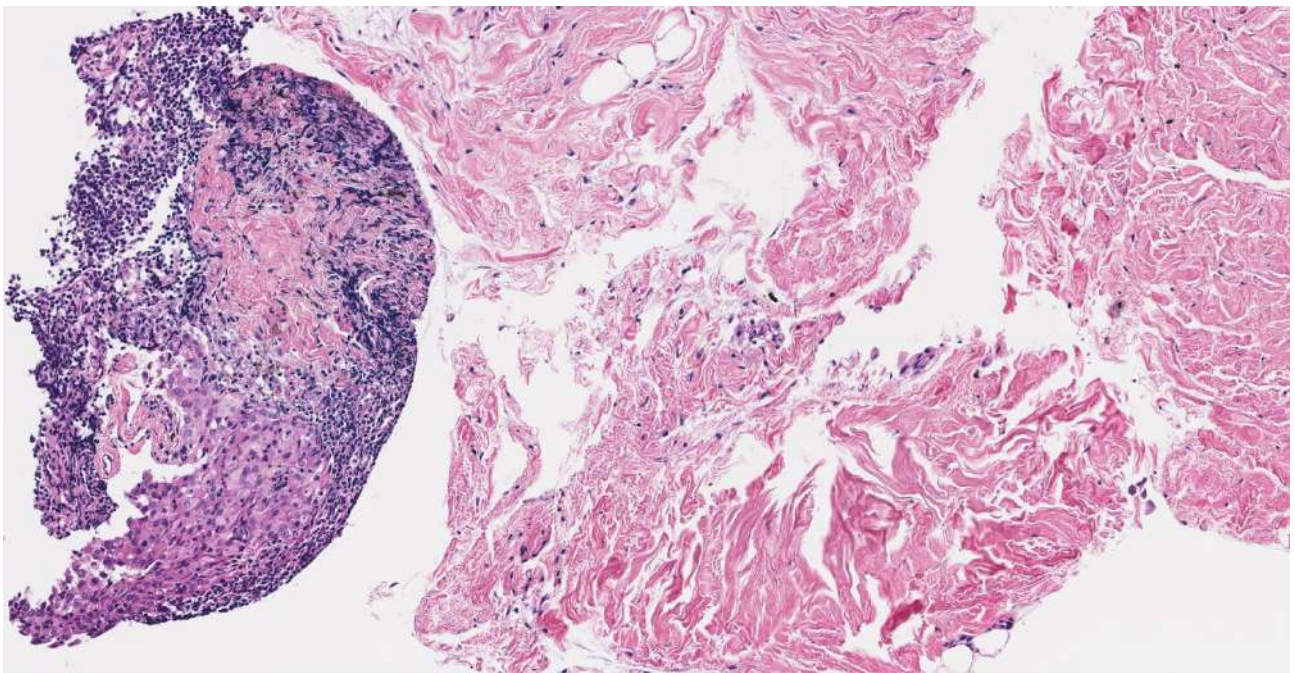


図3. 肺扁平上皮癌リンパ節転移巣の針生検組織の例。面積としては線維性結合組織が70%を占めているが、左断片(リンパ球浸潤と腫瘍細胞からなる)に対し、線維性結合組織の有核細胞数は無視できるほど少ない。また、リンパ球は小さな面積しか持たないため、単位面積としては、腫瘍細胞1つあたり3~7つのリンパ球が占めることになる。遺伝子パネル検査ではDNAでの比較となるため、占有面積ではなく、有核細胞比率で考える必要がある(この写真では有核腫瘍細胞含有割合は15%となる)。

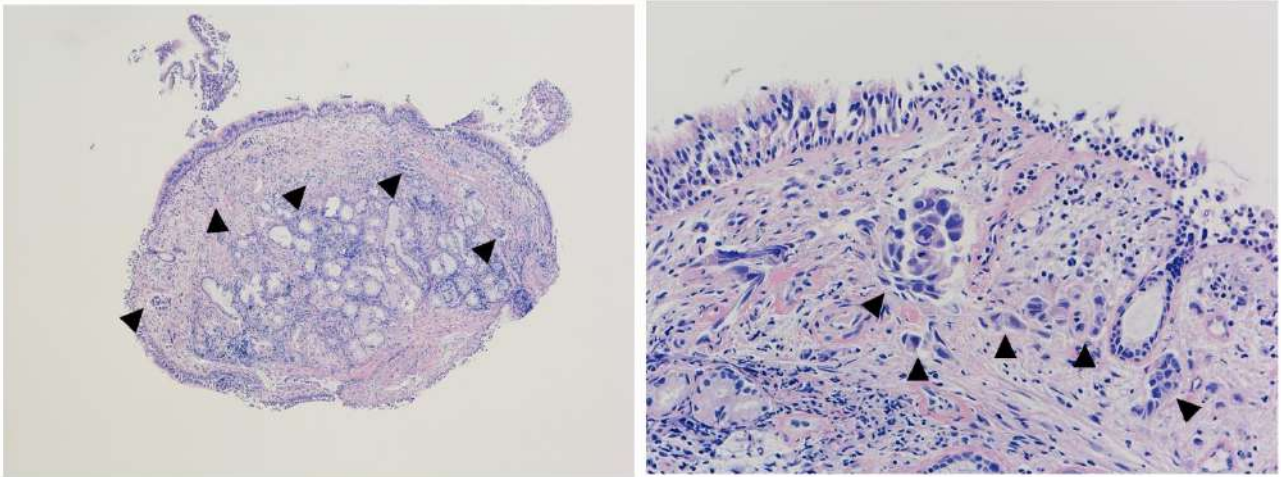


図 4. TBLB 生検組織の例。主としてリンパ管内に存在する腫瘍細胞を▲で示した。このような場合においても診断としては腺癌とされるため、腫瘍細胞含有割合の確認は重要である。

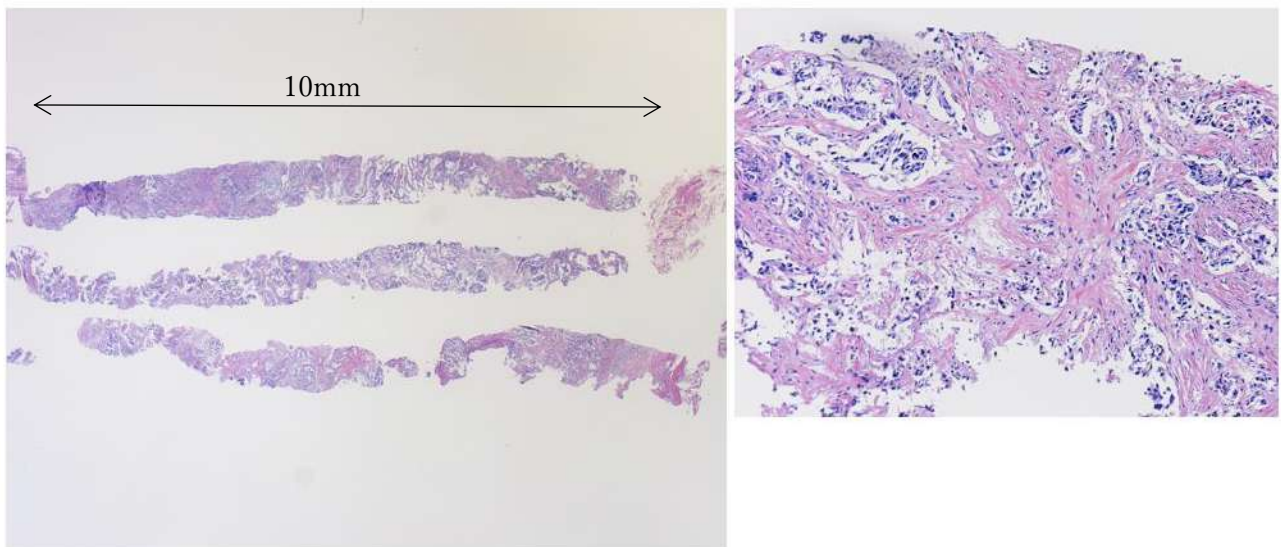


図 5. 肺腫瘍針生検組織の例。ほぼ均一に右拡大像のように腫瘍細胞が分布している。おおむね 30%程度の腫瘍細胞含有割合である。また、組織量としても $10\text{mm} \times 1\text{mm} \times 3\text{本} = 30\text{mm}^2$ となり、5mm 厚未染標本 10 枚で、オンコマイン DxTT, NCC オンコパネル、F1CDx のいずれに対しても解析に適した検体と言える。

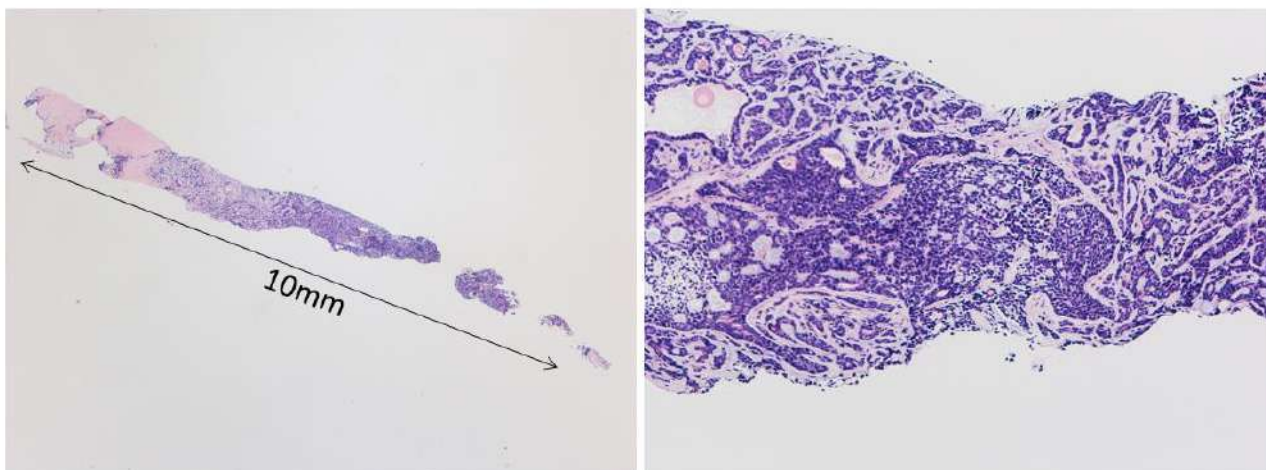


図 6. 肺腫瘍針生検組織の例。唾液腺腺様嚢胞癌の転移。10mm 大の針生検組織であり、太さ 1mm と考えると 10mm^2 の面積を有することになる。間質成分には有核細胞が少ないため、ほぼ右図の腫瘍組織からなっており、腫瘍細胞含有割合は 70% と評価される。このような例では、5um 厚未染 10 枚でオンコマイン DxTT, NCC オンコパネルは解析可能であるが、F1CDx の場合は基準である 1mm^3 の組織量を満たすため、20 枚の未染標本が必要となる。

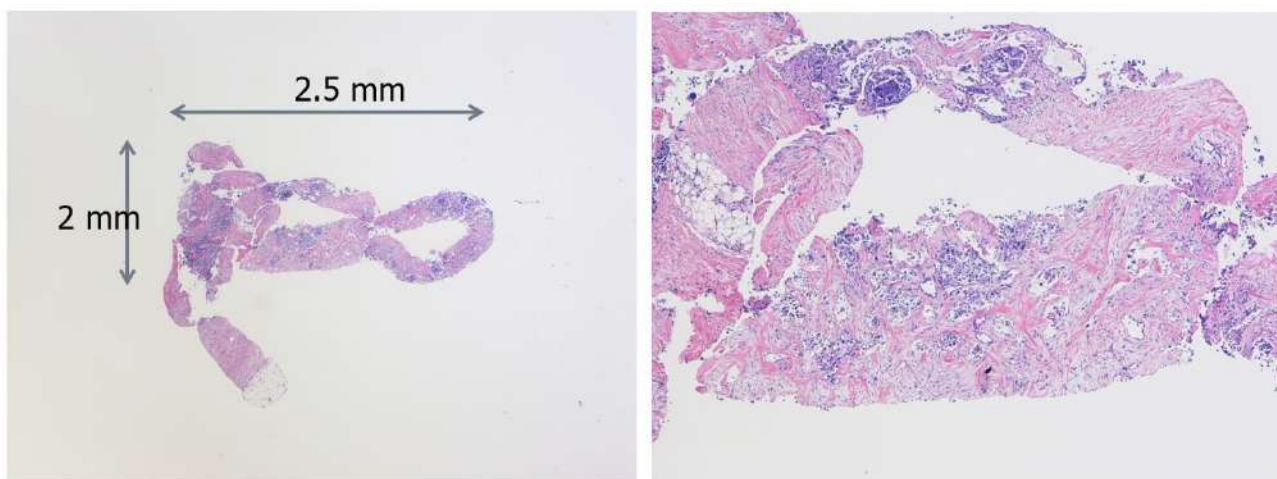


図 7. 肺腫瘍針生検組織の例。組織量としては 5mm^2 であるが、腫瘍細胞含有割合は 15% であり、オンコマイン DxTT, NCC オンコパネル, F1CDx いずれも解析に適さない。単一遺伝子検査が推奨されるが、30%以上の腫瘍細胞含有割合が求められる ROS1 AmoyDx 融合遺伝子キットにおいても不適切検体となり、ROS1 のコンパニオン診断においてもこの検体は不可能と評価される。

2. 標本組織量

それぞれの検査法によって必要とされる組織量が異なる。また、手術切除標本、生検検体、セルブロック検体など検体によって腫瘍サイズが大きく異なっており、実際に未染標本何枚を提出すべきかは腫瘍含有割合ともあわせて症例ごとに判断する必要がある。一部の例を以下(図 8-10)に示したので参照されたい。

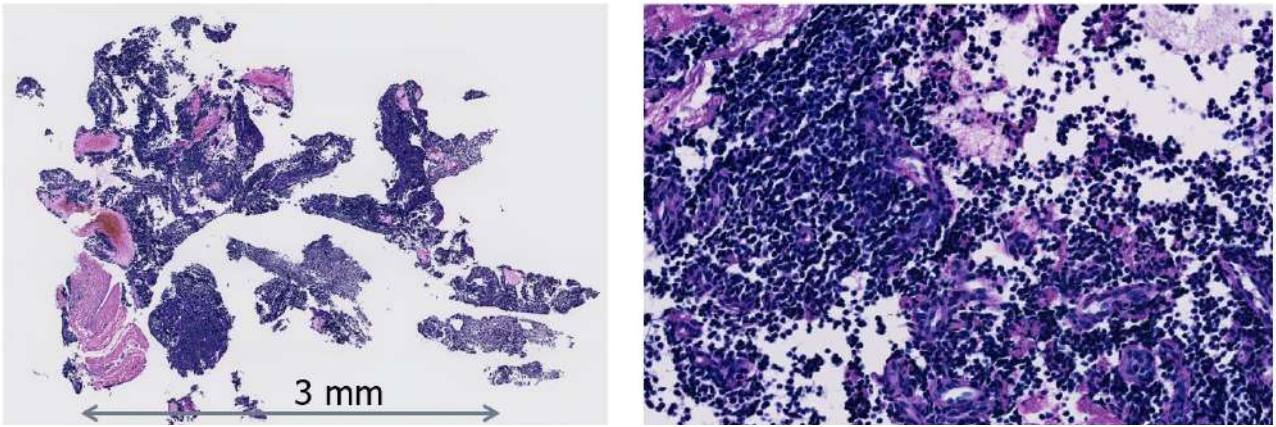


図8. 軟部転移巣針生検組織の例。3mm 大の小さな組織であり、6mm²大のサイズしかないが、80%の腫瘍細胞含有割合で腫瘍細胞が密に集簇している。そのため、1288ng の DNA が抽出され、いずれの遺伝子パネル検査も施行可能である。

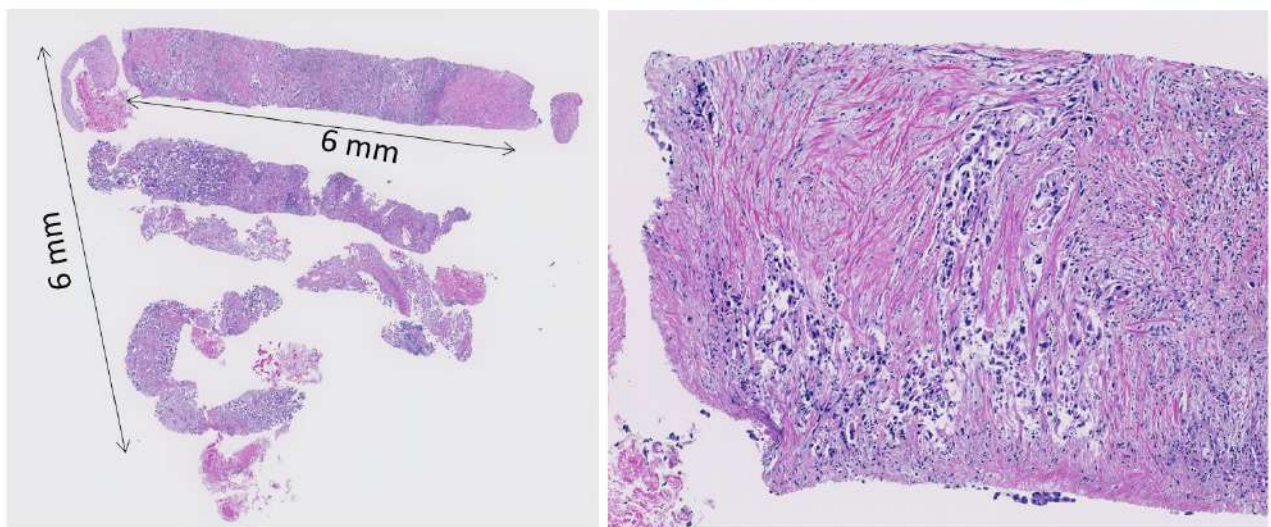


図9. 肺腫瘍針生検組織の例。組織量としては20mm²程度、腫瘍細胞含有割合は30%であり、オンコマイン DxTT, NCC オンコパネル, F1CDx いずれも解析可能である。しかしながら、腫瘍細胞に変性傾向が見られ、DNA としては10.3ng しか抽出されず、解析に足りる DNA が得られなかった。

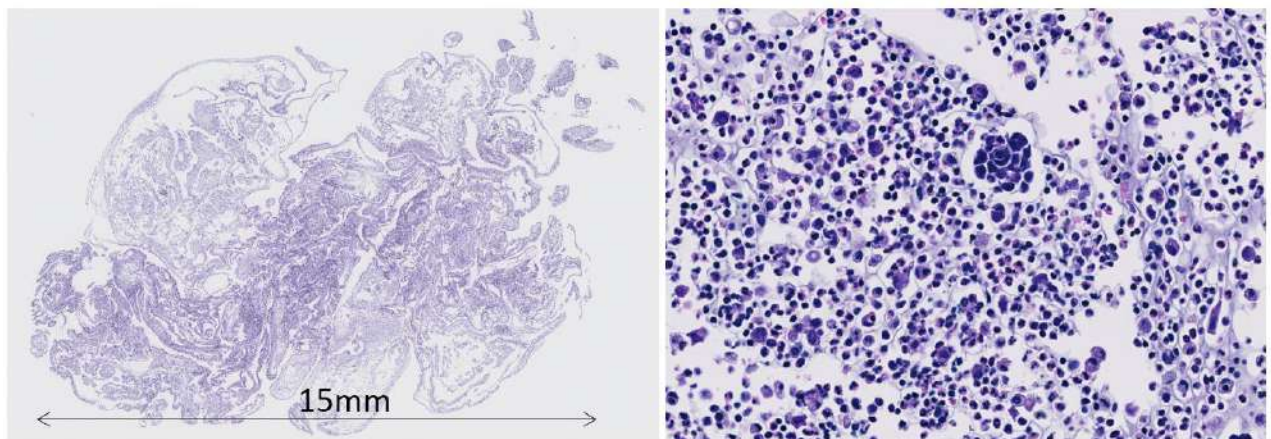


図10. 小細胞癌の悪性胸水に対してのセルブロックの例。細胞量としては十分にあり、DNA も408.5ng 抽出されたが、腫瘍細胞含有割合は1%以下であり、パネル検査には適さない。胸水ではしばしば多数の炎症細胞やマクロファージが混在し、マイクロダイセクションもできないことから、適切な腫瘍細胞含有割合を得るのが難しい。

(6) 検査精度の確保

医療法等の一部を改正する法律の一部の規定が、平成30年12月1日に施行され、医療機関、衛生検査所等における遺伝子関連・染色体検査の精度の確保が医療法の枠組みに組み入れられた。これに伴い、この確保のために設けるべき以下の基準として示された。

- 1) 遺伝子関連検査・染色体検査の責任者の配置
- 2) 内部精度管理の実施、適切な研修の実施義務
- 3) 外部精度管理調査の受検

これに加え、検査施設の第三者認定を取得することを当面、勧奨することになった。第三者認定としては、国際規格である ISO15189 や米国病理学会（College of American Pathologists ; CAP）の臨床検査室認定プログ

ラム(Laboratory Accreditation Program; LAP) などが知られている。また、がんゲノム医療中核拠点病院等の指定要件では、がんゲノム医療中核拠点病院・拠点病院の診療機能として第三者認定を受けた臨床検査室、病理検査室を有することとされていることを受け、本邦においては、ISO15189 認定を取得する施設が増加しており、2023年10月時点で、肺癌バイオマーカー検査で最も多く供される FFPE 組織検体を取り扱う病理検査室で認定を取得している医療機関は全国で約 200 施設にまで広がっている。これら多くの施設では「病理組織標本作製」に係る項目の認定を取得しているが、院内においてバイオマーカー検査、体細胞遺伝子検査を実施する場合は、上記に加え「遺伝子関連検査・染色体検査」に係る項目の認定取得が求められる。

参考文献

1. 日本肺癌学会. 肺癌診療ガイドライン 2023 年版. 2023.
2. 畑中 豊, 菊地 順子, 畑中 佳奈子. がんゲノム診療における組織・細胞・血漿検体の取扱いと使い分け. 肺癌. 2022;62(Suppl):5.
3. 日本病理学会. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 2018.
Hatanaka Y, Kuwata T, Morii E, Kanai Y, Ichikawa H, Kubo T, et al. The Japanese Society of Pathology Practical Guidelines on the handling of pathological tissue samples for cancer genomic medicine. *Pathol Int.* 2021; 71(11): 725-740.
4. Hammond M. E., Hayes D. F., Dowsett M., Allred D. C., Hagerty K. L., Badve S., 他. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:2784-2795.
5. 日本臨床細胞学会. がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針 第 1.0 版. 2021.
Morii E, Hatanaka Y, Motoi N, Kawahara A, Hamakawa S, Kuwata T, et al. Guidelines for Handling of Cytological Specimens in Cancer Genomic Medicine. *Pathobiology.* 2023; 90(5): 289-311.
6. Williams C., Pontén F., Moberg C., Söderkvist P., Uhlén M., Pontén J., 他. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol.* 1999;155:1467-1471.
7. Do H., Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61:64-71.
8. 日本肺癌学会. 臨床・病理 肺癌取扱い規約 第 8 版補訂版. 2021.
9. Udagawa Hibiki, Kirita Keisuke, Naito Tomoyuki, Nomura Shogo, Ishibashi Masayuki, Matsuzawa Reiko, 他. Feasibility and utility of transbronchial cryobiopsy in precision medicine for lung cancer: Prospective single-arm study. *Cancer Science.* 2020;111:2488-2498.
10. Dooms Christophe, Vander Borgh Sara, Yserbyt Jonas, Testelmans Dries, Wauters Els, Nackaerts Kristiaan, 他. A Randomized Clinical Trial of Flex 19G Needles versus 22G Needles for Endobronchial Ultrasonography in Suspected Lung Cancer. *Respiration.* 2018;96:275-282.
11. He X., Wu Y., Wang H., Yu G., Xu B., Jia N., 他. Slow-pull capillary technique versus suction technique in endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for diagnosing diseases involving hilar and mediastinal lymph node enlargement. *Ther Adv Respir Dis.* 2020;14:1753466620907037.
12. von Ahlfen Silke, Missel Andreas, Bendrat Klaus, Schlumpberger Martin. Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. *PLOS ONE.* 2007;2:e1261.
13. Jennings L. J., Arcila M. E., Corless C., Kamel-Reid S., Lubin I. M., Pfeifer J., 他. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19:341-365.
14. 日本病理学会. ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程. 2014.
Kanai Y, Nishihara H, Miyagi Y, Tsuruyama T, Taguchi K, Katoh H, et al. The Japanese Society of Pathology Guidelines on the handling of pathological tissue samples for genomic research: Standard operating procedures based on empirical analyses. *Pathol Int.* 2018; 68(2): 63-90.
15. Chen H., Luthra R., Goswami R. S., Singh R. R., Roy-Chowdhuri S. Analysis of Pre-Analytic Factors Affecting the Success of Clinical Next-Generation Sequencing of Solid Organ Malignancies. *Cancers (Basel).* 2015;7:1699-1715.
16. Merker Jason D., Oxnard Geoffrey R., Compton Carolyn, Diehn Maximilian, Hurley Patricia, Lazar Alexander J., 他. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36:1631-1641.
17. Smits Alexander J. J., Kummer J. Alain, de Bruin Peter C., Bol Mijke, van den Tweel Jan G., Seldenrijk Kees A., 他. The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Modern Pathology.* 2014;27:168-174.
18. Viray H., Li K., Long T. A., Vasalos P., Bridge J. A., Jennings L. J., 他. A prospective, multi-institutional diagnostic trial to determine pathologist accuracy in estimation of percentage of malignant cells. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:1545-1549.
19. Mikubo M., Seto K., Kitamura A., Nakaguro M., Hattori Y., Maeda N., 他. Calculating the Tumor Nuclei Content for Comprehensive Cancer Panel Testing. *J Thorac Oncol.* 2020;15:130-137.

付表 検査対象となる検体*

検体種	検体説明
組織検体	<p>【ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織検体】</p> <p>薄切した組織切片はスライドガラスにマウントさせて提出する。各バイオマーカー検査において規定されている必要枚数の未染色標本作製し、そのうちの1枚をHE染色し腫瘍細胞の存在を確認することが推奨される。特に微小な生検検体では、病理診断の後に再薄切した場合には、腫瘍部分あるいは組織そのものがなくなってしまうことがあるので注意を要する。病理診断時にバイオマーカー検査の実施が予定されている場合は、あらかじめ病理診断用の未染色標本作製時にバイオマーカー検査用標本を余分に作製しておくことも有用である。</p> <p>検体中の腫瘍細胞の存在状態は様々であるため、病理診断報告書に腫瘍量や腫瘍含有割合を記録しておくことが推奨される。またマクロダイセクションを実施した場合は、その旨と実施後の腫瘍量や腫瘍含有割合を記録することが推奨される。また検査センターへ外注する場合、検査に供した検体のHE染色標本（マクロダイセクションを行う際に、腫瘍部のマーキングを行ったHE染色標本）は、可能な限り検査後にも再確認できるようにしておくことが望ましい。ホルマリン固定には、10%中性緩衝ホルマリン液が標準的に用いられており、固定時間は6～48時間が推奨されている。[1, 2]</p> <p>※各種生検材料の取扱い [1]</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 病変の局在・大きさや、施設で実施可能な手技に応じて、適切な検体採取方法を選択する必要があり、肝・骨生検や超音波内視鏡下穿刺吸引法（EUS-FNA）、外科的生検を考慮する場合は、他科との連携が重要である。気管支内視鏡検査では特に検体が微小であり、様々な工夫が必要である。 ✓ 末梢肺結節に対する腫瘍生検では、仮想気管支鏡画像やナビゲーションの併用は病変への確実な到達を容易にし、気管支腔内超音波断層法（EBUS）にガイドシース法（EBUS-GS法）もしくは細径気管支鏡（EBUS-UT法）を併用することで再現性が高まり、数多くの検体の採取が可能になる。ただし同一部位で生検を重ねると、後半になるにつれて出血によるアーチファクトが発生する可能性を考慮する必要があり、採取部位を少しずつ変更するなどの工夫をする。一度の生検で大きな検体を採取するために、可能であれば大型の生検鉗子やガイドシースキットを用いる。関与気管支が腫瘍辺縁にしか到達しないような病変では、末梢での経気道的針穿刺後に鉗子生検を行うことでより腫瘍細胞割合の高い検体が採取される。 ✓ 近年国内承認された経気道的生検方法のクライオバイオプシーでは、大きな検体が採取可能で、採取組織から得られたDNA・RNA量は鉗子生検の約3倍であった。 ✓ 超音波ガイド下経気管支針生検（EBUS-TBNA）では、19～25G穿刺針が使用可能で、22G針でNGS解析が十分に可能であったとする報告がある。腫瘍細胞含有率の低下を回避するためには、エラストグラフィを含めた超音波所見による穿刺部位の決定、slow pull法や迅速細胞診（ROSE法）の併用が有効である。

	<p>✓ 胸水貯留例では、胸水検体やセルブロック検体が、バイオマーカー検査に提出されていることが多いが、腫瘍細胞割合は低く、注意が必要である。胸腔鏡下に壁側胸膜を生検することで質の高い検体が多く採取可能で、局所麻酔下に安全に施行できるので、可能であれば考慮してもよい。</p> <p>【新鮮凍結組織検体】 最も高品質の DNA や RNA を抽出可能であるが、同時に DNase や RNase の酵素活性も保持されており、検体の取扱いを迅速に行わなければ、核酸品質を急速に低下させるおそれがあるため、注意を要する。手術室などで割を入れ採取する場合も多いが、腫瘍細胞含有量を顕微鏡的に確認する必要がある。周囲の炎症が強い腫瘍、粘液産生が高度な腫瘍、中心部線維化巣が広範な腫瘍では、腫瘍細胞が採取されず偽陰性になることがある。腫瘍細胞を確認する手段としては以下の方法がある：① 凍結腫瘍組織を薄切し、HE 標本作製し、その標本で腫瘍細胞の存在および占有割合を確認する。② 採取時に割を入れ、その片割れを凍結組織とし、残りの割面で FFPE 組織標本作製し確認する。[3]</p>
細胞検体	<p>【体腔液細胞検体】 胸水などの体腔液細胞検体は、腫瘍細胞含有割合が低い場合があり、細胞診標本上での確認が必須である。後述のセルブロック検体およびその HE 標本の作製も考慮されたい。</p> <p>【擦過細胞および穿刺吸引細胞検体】 当該検体では適切に腫瘍から採取されれば腫瘍細胞に富んだ検体を採取することができることが報告されている。これら検体については塗抹標本（スメア標本）からの核酸抽出が可能であるが、腫瘍細胞含有割合の確認が必須である。</p> <p>【その他細胞検体】 気管支洗浄液（BAL）などの検体では、正常細胞が混入することが多く、腫瘍細胞に富んだ検体を採取することが比較的困難な検体であり、通常感度のバイオマーカー検査法での使用はあまり推奨されない。</p> <p>【セルブロック検体 (FFPE 細胞検体)】 胸水などの細胞検体からのセルブロックの検査使用の重要性が増している。セルブロックでの保管により、FFPE 組織検体同様、CDx や鑑別診断などを目的とした IHC 法や FISH 法による解析が、繰り返し可能となる。また腫瘍細胞の含有割合の確認も容易となる。セルブロック作製法は複数知られており、遠心分離細胞収集法と細胞固化法に大別される。本邦ではそれぞれ 4～5 種程度の作製法が用いられていることがこれまでの調査研究で明らかとなっている [4]。前者では遠心管法が、後者ではアルギン酸ナトリウム法が、比較的多くの施設で用いられている [4]。</p>

血漿検体	<p>血漿検体は、組織検体と異なり、腫瘍細胞の割合や DNA の質、量に基づいて評価できないため、血液採取、血漿の分離、血漿検体の保管に至るプレアナリシスの段階において適切に扱われた検体を使用するべきである [5]. 特に採血後の検体を長時間室温で放置すると、血球成分の崩壊や DNA の分解の原因につながる。また、血漿成分を分離する際に血球成分が混入すると、有核細胞由来のゲノム DNA が原因で、偽陰性となる可能性があることは注意しなければならない。通常のEDTA-2Kの採血管を使用した場合、血漿の分離は、採血後8時間以内安定である。血漿分離後の血漿検体は、15～30℃で1日間、2～8℃で3日間、-25～-15℃で12カ月、そして-70℃以下の場合には12カ月保管可能である。血漿 CGP 検査では、医療機器認証を受けた指定のセルフリー DNA 抽出用採血管を原則使用する（FoundationOne Liquid がんゲノムプロファイルでは「Roche セルフリー DNA 抽出用採血管」、Guradant360 CDx がん遺伝子パネルでは「 Streck採血管（cell-free DNA BCT）」が採用されている）。</p>
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 日本肺癌学会「肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の手引き（第 2.0 版）」 Yatabe Y, Sunami K, Goto K et al., Multiplex gene panel testing for lung cancer patients. Pathol Int. 2020;70(12):921-931. 2. 日本病理学会「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」 Hatanaka Y, Kuwata T, Morii E et al., The Japanese Society of Pathology Practical Guidelines on the handling of pathological tissue samples for cancer genomic medicine. Pathol Int. 2021;71(11):725-740. 3. 日本病理学会「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程」 Kanai Y, Nishihara H, Miyagi Y et al., The Japanese Society of Pathology Guidelines on the handling of pathological tissue samples for genomic research: Standard operating procedures based on empirical analyses. Pathol Int. 2018;68(2):63-90. 4. 日本臨床細胞学会「がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針（初版）」 5. ASCO/CAPジョイントレビュー：Merker JD, Oxnard GR, Compton C et al., Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. J Clin Oncol. 2018 1;36(16):1631-1641.

*本表は、日本肺癌学会ホームページ「各種検査の手引き」「肺癌バイオマーカー検査全般に関するお知らせ」に掲載 (https://www.haigan.gr.jp/modules/tebiki/index.php?content_id=16)。

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-1. EGFR

(2024年4月改訂版)

目次

(1) EGFR 分子とその遺伝子異常	3
1. はじめに	3
2. EGFR によるシグナル伝達	3
3. EGFR 遺伝子変異	4
(2) EGFR 変異陽性肺癌に対する治療	5
1. EGFR 低分子チロシンキナーゼ阻害薬	5
2. EGFR 遺伝子変異と EGFR-TKI 感受性	6
2-1. EGFR 活性型遺伝子変異 (common mutation) : エクソン 19 欠失変異 (Del 19) と L858R 変異	6
2-2. EGFR エクソン 20 挿入変異	6
2-3. 稀な EGFR 遺伝子変異 (uncommon mutation)	6
3. EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC に対する治療	7
3-1. 初回治療における EGFR-TKI vs. 化学療法の臨床試験	7
3-2. EGFR-TKI vs. EGFR-TKI の臨床試験	8
3-3. EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法	9
3-4. 手術期における EGFR-TKI	10
4. EGFR エクソン 20 挿入変異に対する治療	10
5. EGFR 遺伝子野生型における EGFR-TKI	10
(3) EGFR-TKI に対する獲得耐性	10
1. 獲得耐性メカニズム	10
2. 獲得耐性への治療戦略	11
2-1. 第三世代 EGFR-TKI 登場以前および T790M 変異陰性あるいは不明症例に対して	11
2-2. 第三世代 EGFR-TKI	12

2-3. オシメルチニブ	12
2-4. オシメルチニブの CNS 転移に対する効果	13
2-5. オシメルチニブに対する耐性機序	13
2-6. 免疫チェックポイント阻害剤およびその他の新規治療薬	14
(4) EGFR-TKI 治療とその他の効果予測因子	14
1. リガンドレベルの変化	14
2. EGFR 遺伝子増幅	15
3. 他の HER ファミリー	15
4. その他の遺伝子変化と TKI 感受性	15
(5) EGFR 変異の診断	16
1. EGFR 遺伝子変異検査の対象患者	16
2. EGFR 遺伝子変異検査に用いる検査法	16
2-1. 組織検査	18
2-1-1. EGFR-TKI 投与前の初回組織検査	18
2-1-2. EGFR-TKI 治療耐性後の T790M 変異検査	19
2-2. 血漿検査 (リキッドバイオプシー検査)	19
2-2-1. EGFR-TKI 投与前の初回リキッドバイオプシー検査	20
2-2-2. EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査	21
3. 対象となる検体とその適正性について	22
3-1. 組織・細胞検体	22
3-1-1. FFPE 組織検体	22
3-1-2. FFPE 細胞検体 (セルブロック検体)	22
3-1-3. 細胞検体	23
3-1-4. 新鮮凍結検体	23
3-2. 血漿検体	23
4. 薬事承認および保険診療の観点からみた本検査のあり方	23
4-1. T790M 血漿検査の検査回数について	24
4-2. 同一月中の T790M 血漿検査・組織検査の実施について	24
5. おわりに	24
参考文献	25

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

枝園 和彦, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 須田 健一, 宗 淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

(1) EGFR 分子とその遺伝子異常

1. はじめに

上皮成長因子受容体 (EGFR) 特異的なチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) であるゲフィチニブ (イレッサ®) が、世界に先駆けて本邦で手術不能又は再発の非小細胞肺癌 (NSCLC) に対して 2002 年 7 月に承認され、化学療法の不応例にもしばしば劇的な臨床症状および画像上の改善をもたらした。2004 年に EGFR 遺伝子変異 (以下 EGFR 変異) を有する NSCLC においてゲフィチニブの感受性が高いことが発見され、これを機に EGFR-TKI の研究はおおいに加速することとなった^{1,2}。2007 年にはエルロチニブ (タルセバ®) が、2014 年には第二世代の EGFR-TKI であるアファチニブ (ジオトリフ®) が承認された。

一方で、EGFR-TKI は EGFR 変異陽性 NSCLC に優れた抗腫瘍効果を示すものの、その後治療抵抗性 (耐性) となり、EGFR-TKI 耐性例の約半数に T790M 変異を認めることが明らかとなった^{3,4}。2016 年には、「EGFR-TKI に抵

抗性の EGFR T790M 変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌」に対し、オシメルチニブ (タグリッソ®) が承認された。これに伴い、EGFR-TKI 耐性時の再生検や、耐性時の T790M 変異および初回診断時 EGFR 変異の血漿検査の承認など様々な変化が起きた。オシメルチニブについては、2018 年に EGFR 変異陽性 NSCLC に対する一次治療に、2022 年には EGFR 変異陽性 NSCLC に対する術後補助療法として適応拡大が承認された。また、2019 年にはダコミチニブ (ビジンプロ®) が承認されている。

この手引きは、肺癌診療に携わる医療従事者のために 2009 年に作成され、以降の急速な進歩にあわせ日本肺癌学会バイオマーカー委員会によって版改訂を重ねてきた。

2. EGFR によるシグナル伝達

EGFR は HER ファミリーと呼ばれる 4 つのレセプター分子族の一員で、EGFR/HER1/erbB1、HER2/neu/erbB2、HER3/erbB3、HER4/erbB4 の 4 つの分子からなる。HER ファミリーの増殖因子 (リガンド) は 11 種知られているが、EGFR に特異的に結合するグル

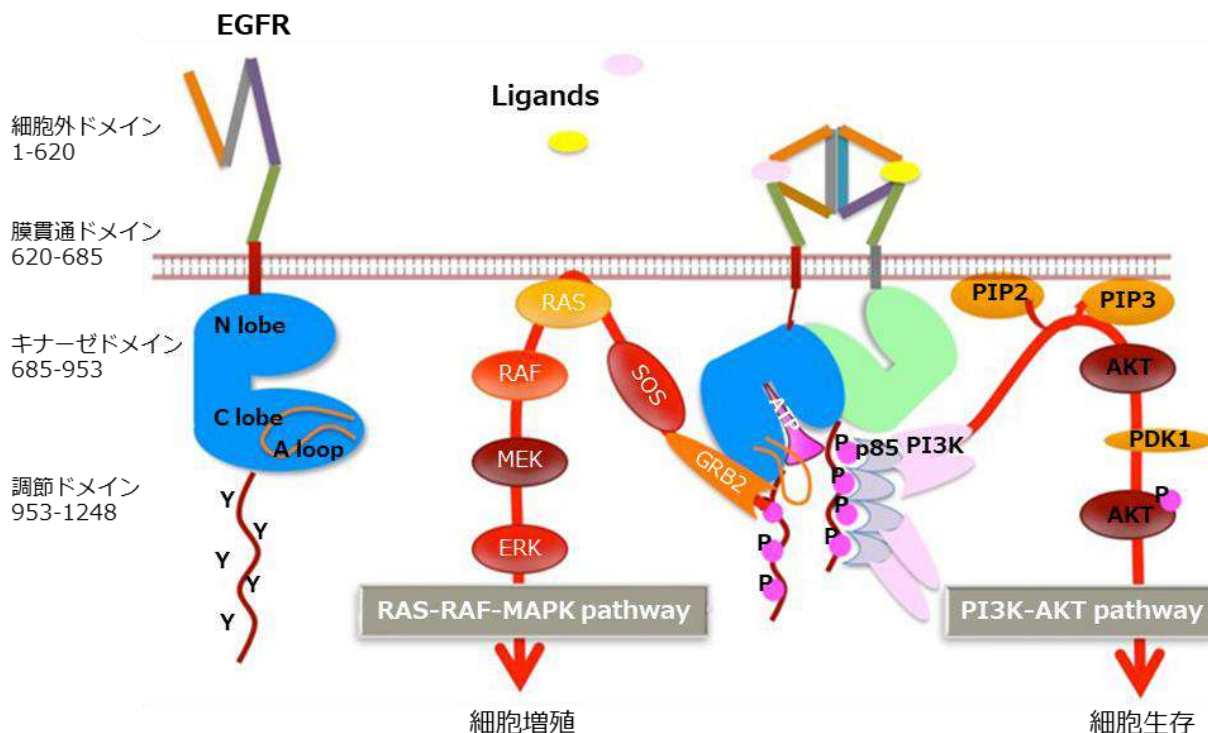


図1. EGFR 経路

上皮増殖因子受容体 (EGFR) は細胞膜を貫通する受容体タンパク質である。チロシンキナーゼは N lobe と C lobe よりなり 2 つの lobe の間の cleft に ATP が結合する。EGFR-TKI はこの部において ATP と競合阻害する。受容体に増殖因子 (リガンド) が結合すると、図に示すような非対称的な二量体 (ダイマー) 形成が起こり、ATP のリン酸が調節ドメインのチロシン残基に移される。このリン酸化チロシンに種々のタンパク質が結合していき次々と下流のタンパク質が活性化されていく。特に重要なのが図に示した RAS-RAF-MAPK 経路と PI3K-AKT 経路である。

Reproduced with permission from [10] © Wiley (2016).

ープ〔EGF, TGF α , amphiregulin (AR)〕, EGFR と HER4 に結合するグループ〔betacellulin (BTC), heparin-binding EGF (HB-EGF), epiregulin〕, HER3, HER4 に結合するグループ〔neuregulin (NRG) (heregulin)〕の3つに大別できる。HER2 には対応するリガンドがないが、常にリガンドが結合して活性化した状態に類似の構造をとっており、後述するダイマーの相手として選ばれやすい。一方、HER3 はアミノ酸の置換によってチロシンキナーゼ活性を失っているが、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の調節サブユニットである p85 の結合部位を多く有しており、ダイマーの相手として特に細胞生存に関わるシグナル伝達に重要である^{5,6}。

リガンドが細胞外ドメインに結合すると、同一分子間でホモダイマーを形成したり、他の HER ファミリー分子とヘテロダイマーを形成したりする。この場合 EGFR や HER4 どちらのホモダイマーの活性は低く、ヘテロダイマー特に HER2 とのヘテロダイマーの活性が高い。この細胞内ドメインのチロシンキナーゼはお互いのチロシン残基をリン酸化して活性化される。するとそのリン酸化部位に特異的に種々のアダプタータンパク (PLC γ , aCBL, GRB2, SHC, p85 など) が結合し、さらに下流の RAS-MAPK 経路, PI3K-AKT 経路, STAT 経路などに伝えられる。そして、増殖やアポトーシスの回避, 血管新生, 転移など, 癌細胞にとって重要な表現型に寄与すると考えられている^{5,6}。EGFR の過剰発現は肺癌を含む種々の腫瘍で高頻度に認められ⁷⁻⁹, 予後にも関連するため, 標的分子として注目されることとなった (図1)。

3. EGFR 遺伝子変異

2002 年 7 月に本邦で初めて承認された EGFR-TKI であるゲフィチニブは, NSCLC に対して優れた抗腫瘍効果を示すが, その抗腫瘍効果の詳細な機序について当初不明であった。2004 年に, EGFR チロシンキナーゼドメインの変異がゲフィチニブの奏効率が高い NSCLC に多くみられることが報告され, *in vitro* でもゲフィチニブの感受性との関連が証明された^{1,2}。肺癌における EGFR 変異のほとんど (93%) が, 細胞内のチロシンキナーゼドメインの中でもエクソン 18-21 の領域に集中している。特に頻度が高いものは, エクソン 19 のコドン 746-750 の5つのアミノ酸 (ELREA) を中心とする部位の欠失変異

(Del 19) とエクソン 21 のコドン 858 においてロイシンからアルギニンに変化する (L858R) 点突然変異である (図2)¹⁰。Del 19 には欠失アミノ酸の個数や, アミノ酸置換を伴うものなど非常に多くのバリエーションがあるが, E746-A750 の単純欠失が最も多く, L747-E753 欠失に S が挿入されたもの, L747-E751 欠失, L747-E750 欠失に P が挿入されたものなどが続く。その他, エクソン 18 のコドン 719 の点突然変異 (G719X: アミノ酸が A, C, S の場合があり, まとめて X と表す), E709X, エクソン 20 の挿入変異, S768I, エクソン 21 の L861Q などの稀な遺伝子変異 (uncommon mutation) が認められる。これらの EGFR 変異型のうち, 機能的に EGF や TGF α などのリガンドの刺激がない場合でも下流の増殖シグナル経路にリン酸化シグナルを送り続けるタイプは, 活性型変異と呼ばれる。

EGFR 変異は東洋人, 女性, 非喫煙者, 腺癌に多くみられる^{11,12}。2013 年のメタアナリシス (mutMap) によると, その頻度はアジア人腺癌の 47.9%, 扁平上皮癌の 4.6%, 西洋人腺癌の 19.2%, 扁平上皮癌の 3.3%, 既-重喫煙者の 8.4-35.9% および非-軽喫煙者の 37.6-62.5% であった¹³。2015 年にはさらに大規模なメタアナリシスの結果 (mutMapII: a global EGFR mutMap) が報告され, 日本人の腺癌の EGFR 変異の頻度は 45% (21-68%) であった¹⁴。このように, EGFR 変異は組織学的には腺癌に多いが, 未分化な腺癌で大細胞癌とも見なされるような症例や腺扁平上皮癌, 小細胞癌 (特に腺癌との combined type) などでもしばしば検出される。腺癌の亜型別にみると TTF-1 やサーファクタントを発現しているような肺癌に頻度が高い (50-65%)¹⁵。腺癌 200 例の解析において, EGFR 変異陽性腺癌の IASLC/ATS/ERS 分類によるサブタイプでは, acinar predominant (43/77; 55.8%) と papillary predominant (26/49; 53.1%) が多いと報告されている。また 200 例中 3 例が lepidic predominant で, 全例が EGFR 変異陽性であった¹⁶。

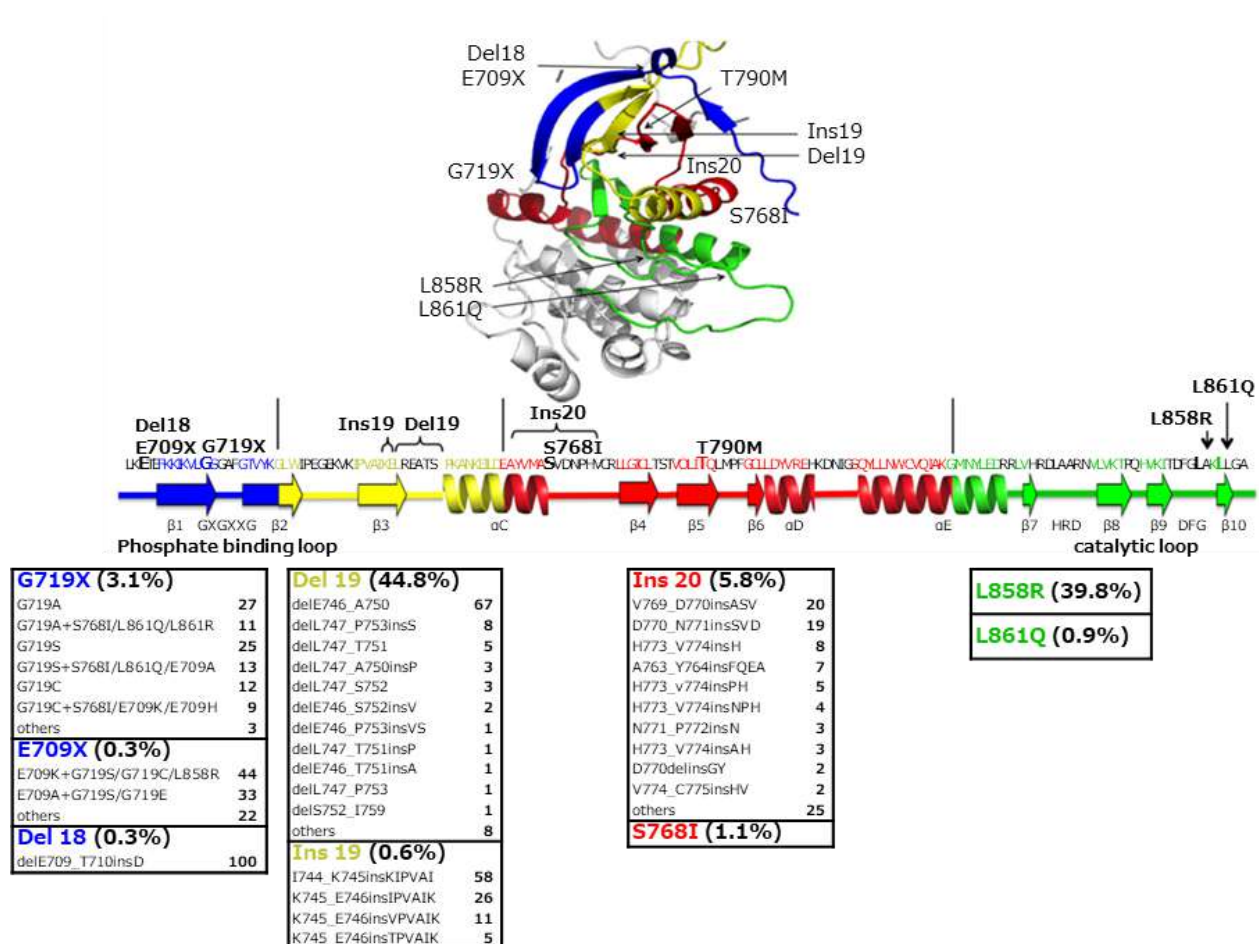


図 2. EGFR 遺伝子変異の種類と頻度

最近の大規模な研究の編集による肺癌における上皮増殖因子受容体 (EGFR) タンパク質の構造と EGFR 遺伝子変異の頻度。代表的な遺伝子変異の各コドンは、EGFR キナーゼドメインのタンパク質配列にマッピングしている。エクソン 18, 19, 20 及び 21 のコドンは、それぞれ青色、黄色、赤色と緑色で示している。スパイラル構造は、 α -ヘリックスを、太い矢印は、 β -シートを示している。

Reproduced with permission from [10] © Wiley (2016).

(2) EGFR 変異陽性肺癌に対する治療

1. EGFR 低分子チロシンキナーゼ阻害薬

現在本邦で使用されている EGFR-TKI には、第一世代の EGFR 特異的可逆的 TKI であるゲフィチニブおよびエールロチニブと、EGFR/HER2/HER4 を不可逆的に阻害する第二世代のアファチニブおよびダコミチニブ、そして第三世代のオシメルチニブがある。オシメルチニブは、EGFR 活性型変異および EGFR T790M 変異に対して選択的かつ不可逆的に作用する¹⁷。

第一および第二世代の EGFR-TKI の副作用としては、皮膚障害、爪囲炎、下痢などが多い¹⁸。一方で、オシメルチニブは EGFR 活性型変異と T790M 変異に対しても作用するが、野生型 EGFR への作用は限定的となるよう開

発された薬剤であるため、皮膚障害や爪囲炎、下痢は発現しても軽度である^{19,20}。EGFR-TKI の重篤な副作用として、薬剤性の間質性肺疾患 (Interstitial Lung Disease; ILD) があげられる。EGFR-TKI 関連 ILD に関するメタアナリシスでは、ILD 発現頻度は初回 EGFR-TKI 治療で 1.12%、再投与で 1.13%であった。しかし、日本人コホートでの ILD 発現率は日本人以外と比較して高く、重篤であった〔日本人 vs. 日本人以外: (全グレード) 4.77% vs. 0.55%, $p < 0.001$, (高グレード) 2.49% vs. 0.37%, $p < 0.001$ 〕²¹。また、タグリッソ®の使用成績調査の結果から、オシメルチニブの ILD 発現頻度は 6.8% (245 症例/3,578 症例) で、ILD 発現に関する多変量ロジスティック回帰モデル解析結果では「間質性肺疾患の病歴」と「ニボルマブ前治療歴」が有意なリスク因子とされた²²。一方で、オシメルチニブ治療中の 20 例中 7 例 (30%) に一過性無症候性肺陰影 (transient asymptomatic pulmonary

opacities ; TAPOs) が出現し, 治療継続中に改善したとの報告もあり, ILD かどうかの判断は臨床症状も含めて慎重になされるべきである²³.

2. EGFR 遺伝子変異と EGFR-TKI 感受性

一般に, EGFR 変異が起こると EGFR チロシンキナーゼの ATP 結合部位に構造変化が生じ, リガンドの刺激がなくても恒常的に活性化することで, 癌細胞の増殖や生存がこの経路に依存した状態となる (oncogene addiction). EGFR-TKI は, EGFR チロシンキナーゼ領域において ATP の結合を競合的に阻害し, EGFR の自己リン酸化を抑制する. その結果, 下流へのシグナル伝達を遮断し, 抗腫瘍効果を示す²⁴.

2-1. EGFR 活性型遺伝子変異 (common mutation) : エクソン 19 欠失変異 (Del 19) と L858R 変異

EGFR 活性型変異 (common mutation) の頻度は, Del 19 が 44.8% (2,573 症例/5,741 症例), L858R 変異が 39.8% (2,283 症例/5,731 症例) と報告されている^{10,25-29}. いずれも EGFR-TKI に高い感受性を示すが, 変異のサブタイプによって有効性が異なる. EGFR 変異を有する進行 NSCLC 患者を対象とした 12 の臨床試験の統合解析において, EGFR-TKI 治療による無増悪生存期間 (PFS), 全生存期間 (OS) および奏効割合 (ORR) に関して, Del 19 が L858R 変異に比べ有意に良好であった: PFS [hazard ratio (HR) =0.69; 95% 信頼区間 (CI), 0.57-0.82; $p<0.001$], OS (HR=0.61; 95% CI, 0.43 – 0.86; $p=0.005$), ORR (odds ratio=2.14; 95% CI, 1.63-2.81; $p<0.001$). また, EGFR 変異別の臨床的背景との関連については, L858R 変異と比較して Del 19 のほうが有意に若年者に多く, 喫煙歴のある割合が高かった³⁰.

分子構造上, Del 19 は ATP 結合部位のループから 3-8 残基が欠失しており, 一方で L858R 変異は ATP 結合部位から離れて存在しているために EGFR-TKI に対する効果が異なると考えられている³¹. Del 19 は α -ヘリックスで残基が欠失した結果, チロシンキナーゼドメインの必須残基の構造変化が起こり, EGFR-TKI に対する感受性が L858R 変異と比べてより高いと考えられる³². また L858R 変異は二量体を形成しないと活性化しないが, Del

19 は単体の状態でも下流シグナルが活性化されるという報告³³ や二量体形成後の自己リン酸化部位が異なり, それに続く下流へのシグナル伝達が異なるという報告もある³⁴. これらの, 分子生物学的な違いが, EGFR-TKI に対する効果に影響している可能性が考えられる.

2-2. EGFR エクソン 20 挿入変異

EGFR エクソン 20 の挿入変異の頻度は EGFR 変異の 5.8-12% で^{10,35-39}, ORR は第一世代 EGFR-TKI に対し 17%^{37,38,40-42}, アファチニブに対して 10% と効果が乏しい^{36,44}. 一方で, EGFR A763_Y764insFQEA は各世代の EGFR-TKI に対する感受性が報告されている^{43,45}. 近年, エクソン 20 の挿入変異を対象とした薬剤開発が進められている (「4. EGFR エクソン 20 挿入変異に対する治療」を参照)^{46,47}.

2-3. 稀な EGFR 遺伝子変異 (uncommon mutation)

その他の稀な EGFR 変異として, エクソン 18 のコドン 719 の点突然変異 (G719X), E709X, エクソン 18 欠失変異, エクソン 19 の挿入変異, S768I, エクソン 21 の L861Q などがある. EGFR G719X は第一世代 EGFR-TKI に対する ORR が 32% であるのに対し, LUX-Lung 2, 3, 6 試験の統合解析ではアファチニブに対する ORR は 78% と良好であった^{10,44}. S768I および L861Q は, 第一世代 EGFR-TKI に対する ORR がそれぞれ 42% および 39%¹⁰, アファチニブに対する ORR がそれぞれ 100% および 56% であった⁴⁴. Uncommon mutation に対するオシメルチニブの第 II 相試験では, ORR は 50% (18/36; 95% CI, 33- 67) で PFS 中央値は 8.2 カ月 (95% CI, 5.9-10.5) であった⁴⁸.

EGFR の多くの意義不明の変異 (variants of unknown significance; VUS) に関して, 形質転換能力および EGFR-TKI に対する感受性の検討において, エクソン 19 内のゲフィチニブおよびエルロチニブ非感受性ミスセンス変異, ならびに L833V, A839T, V851I, A871T および G873E など, EGFR-TKI 耐性に関わる変異が同定された⁴⁹. また, L858R 変異の 12.8% が EGFR 内に複合変異 (compound mutations) を有し, ゲフィチニブの初期耐性に関与している可能性が示されている⁴⁹. 一方で,

L833V に関しては活性化およびゲフィチニブへの感受性に関する報告もある^{50,51}。

3. EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC に対する治療

EGFR 変異陽性に限定しない NSCLC に対する EGFR-TKI の第Ⅲ相比較試験では、negative な結果が続いた。まず、EGFR-TKI の標準化学療法への上乗せ効果および延命効果をみた 4 つの臨床試験 (TALENT⁵², INTACT1⁵³, INTACT2⁵⁴, TRIBUTE⁵⁵) ではいずれも negative な結果であった。次いで、既治療進行 NSCLC に対するゲフィチニブ (ISEL 試験⁵⁶) あるいはエルロチニブ (BR.21 試験⁵⁷) と best supportive care の比較試験が行われたが、BR.21 試験のみエルロチニブの延命効果を示した。セカンドライン以降でのドセタキセルとの比較試験において、国内の V15-32 試験はゲフィチニブの非劣性が証明されず⁵⁸、海外での INTEREST 試験ではゲフィチニブのドセタキセルに対する非劣性が証明された⁵⁹。

これらの混沌とした状況に終止符を打ったのは、アジアで行われたカルボプラチン+パクリタキセル対ゲフィチニブの第Ⅲ相試験 (IPASS)⁶⁰ である。本試験では、非-軽喫煙歴の腺癌症例を対象にゲフィチニブの PFS における優越性が検証されたが、試験全体において統計学的にはゲフィチニブの優越性が示されたものの、両群の PFS

曲線が交差する解釈が難しい結果が示された。しかし、EGFR 変異別のサブセット解析にて、EGFR 変異陽性群ではゲフィチニブ群が明らかに化学療法群に勝り (HR=0.48)、一方の EGFR 変異陰性群では全く逆の結果となったことから (HR=2.85)、EGFR-TKI の効果予測因子が EGFR 変異である可能性が示唆された (表 1)。

3-1. 初回治療における EGFR-TKI vs. 化学療法の臨床試験

IPASS や韓国で行われた First-SIGNAL 試験⁶¹ のような臨床的背景因子 (腺癌、非喫煙者) ではなく、EGFR 変異陽性 NSCLC に対するゲフィチニブの効果を検証する第Ⅲ相臨床試験が、まず本邦から世界に先駆けて 2 つ報告された。NEJ002 試験⁶² と WJTOG3405 試験⁶³ は、ともにゲフィチニブを試験治療群とし、標準治療群を前者はカルボプラチン+パクリタキセル、後者はシスプラチン+ドセタキセルとした。いずれの試験においても、PFS ではゲフィチニブ群が優越性を示し、OS については両群間で差を認めなかった。これは二次治療以降のクロスオーバーによるもので、WJTOG3405 試験の生存期間中央値 (MST) は 36 カ月を超える長いものであった (表 1)。その後、エルロチニブとプラチナ併用療法との比較試験として中国から OPTIMAL 試験⁶⁴、欧州からは EURTAC 試験⁶⁵ が報告され、PFS および ORR とともにエルロチニブ

表 1. EGFR 遺伝子変異陽性患者に対するファーストライン EGFR-TKI とプラチナ併用化学療法の比較

Study (n)	レジメン	適格条件	ORR (%)	mPFS (月)	HR (95% CI)	mOS (月)	HR (95% CI)
IPASS (n=261) †	Gefitinib vs. CBDCA/PTX	Ex19/L858R+ Others	71 vs. 47	9.5 vs. 6.3	0.48 (0.36-0.64) p<0.0001	21.6 vs. 21.9	1.00 (0.76-1.33) p=0.990
First-SIGNAL (n=42) †	Gefitinib vs. CDDP/GEM	Ex19/L858R	85 vs. 38	8.0 vs. 6.3	0.54 (0.27-1.1)	27.2 vs. 25.6	1.04 (0.50-2.2)
NEJ002 (n=228)	Gefitinib vs. CBDCA/PTX	Ex19/L858R +others (6%)	74 vs. 31	10.8 vs. 5.4	0.30 (0.22-0.41) p<0.001	27.7 vs. 26.6	0.89 (0.63-1.24) p=0.483
WJTOG3405 (n=172)	Gefitinib vs. CDDP/DTX	Ex19/L858R	62 vs. 32	9.6 vs. 6.6	0.56 (0.41-0.77) p<0.0001	34.9 vs. 37.3	1.25 (0.88-1.78) p=0.207
EURTAC (n=174)	Erlotinib vs. CDDP or CBDCA/DTX or GEM	Ex19/L858R	61 vs. 18	9.7 vs. 5.2	0.37 (0.25-0.54) p<0.0001	22.9 vs. 19.6	0.92 (0.63-1.35) p=0.68
OPTIMAL (n=165)	Erlotinib vs. CBDCA/GEM	Ex19/L858R	83 vs. 36	13.7 vs. 4.6	0.16 (0.11-0.26) p<0.0001	22.8 vs. 27.2	1.19 (0.83-1.71) p=0.2663
ENSURE (n=217)	Erlotinib vs. CDDP/GEM	Ex19/L858R	63 vs. 34	11 vs. 5.6	0.42 (0.27-0.66) p=0.0001	26.3 vs. 25.5	0.91 (0.63-1.31) p=0.607
LUX-lung 3 (n=345)	Afatinib vs. CDDP/PEM	Ex19/L858R+ Others (11%)	56 vs. 23 (61 vs. 22)*	11.1 vs. 6.9 (13.6 vs. 6.9)*	0.58 (0.43-0.78) [0.47 (0.34-0.65)]* p=0.001	28.2 vs. 28.2	0.88 (0.66-1.17) p=0.39
LUX-lung 6 (n=363)	Afatinib vs. CDDP/GEM	Ex19/L858R+ Others (11%)	74 vs. 31	11.0 vs. 5.6	0.28 (0.20-0.39) p<0.0001	23.1 vs. 23.5	0.93 (0.72-1.22) p=0.61

† サブグループ解析, * exon 19 欠失変異と L858R 変異のみ (n=308), CBDCA; carboplatin, CDDP; cisplatin, PTX; paclitaxel, GEM; gemcitabine, DTX; docetaxel, PEM; pemetrexed, ORR; objective response rate, mPFS; median progression free survival, HR; hazard ratio, mOS; median overall survival

の優越性が示された。さらにアファチニブとプラチナ併用療法との第Ⅲ相臨床試験が行われた。LUX-Lung 3 試験⁶⁶ではシスプラチン+ペメトレキセド群と LUX-Lung 6 試験⁶⁷ではシスプラチン+ゲムシタピン群との比較が行われ、主要評価項目の PFS では、両試験において化学療法群に対するアファチニブ群の有意な延長効果を認めた(表1)。2015年にLUX-Lung 3 試験とLUX-Lung 6 試験のOSの統合解析の結果が報告され、EGFR 活性型変異 (common mutation) においてアファチニブ群が化学療法群に対して有意に OS を延長することが示された (HR=0.81)⁶⁸。この統合解析において、EGFR 変異のサブタイプにより治療効果が異なることが注目された。Del 19 においてはアファチニブ群で有意な OS の延長 (HR=0.59) を認めた。一方、L858R 変異では有意差はないものの、化学療法群で良い傾向がみられた⁶⁸。LUX-Lung 3 試験の日本人サブグループ解析でも同様に Del 19 ではアファチニブ群で有意な OS の延長を認めた⁶⁹。いずれの臨床試験も EGFR 変異陽性例に対しては EGFR-TKI が初回治療として有意に優れた PFS の延長効果を示し、オシメルチニブの一次治療適応拡大承認までは第一および二世 EGFR-TKI が初回標準療法とされていた。

3-2. EGFR-TKI vs. EGFR-TKI の臨床試験

第一および二世 EGFR-TKI の効果の優劣は 2017 年までは明らかではなく、皮疹や下痢などの有害事象の頻度としてはゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブの順で多くなることが知られている。一方、肝機能障害はゲフィチニブに多い¹⁸。それらの有効性と安全性のバランスを含めた優劣の判断には head to head の前向き比較試験での結果が重要とされた。

腺癌を対象に二次治療以降でエルロチニブとゲフィチニブを比較する第Ⅲ相比較試験 (WJOG5108L 試験) が行われ、主要評価項目である PFS においてゲフィチニブのエルロチニブに対する非劣性は証明されず、EGFR 変異全体、Del 19, L858R 変異いずれのサブグループ解析においても有意差を認めなかった⁷⁰(表2)。ゲフィチニブとアファチニブとの第Ⅱb 相比較試験 (LUX-Lung 7 試験) の結果が報告された。LUX-Lung 7 試験では主要評価項目である PFS と time-to-treatment failure がアファチニブ群において有意に延長したが⁷¹、OS には差がなかった⁷²(表2)。この試験においてはLUX-Lung 3 試験とLUX-Lung 6 試験の統合解析結果⁶⁸と異なり、L858R 変異を有する患者においても、アファチニブ群において PFS や奏効率は Del 19 と同様に良好な結果であったが、あくまでも第Ⅱb 相比較試験のサブグループ解析である。

また二世 EGFR-TKI であるダコミチニブとゲフィチニブとの第Ⅲ相比較試験 (ARCHER 1050) においては主要評価項目である PFS と副次評価項目である OS がダコミチニブ群において有意に延長した^{73,74}(表2)。しかし中枢神経系 (CNS) 転移を除外した患者集団の結果で、66%の患者にダコミチニブの減量が必要となり、有害事象が課題と考えられた。この試験の結果、ダコミチニブは本邦において 2019 年 1 月に 5 番目の EGFR-TKI として承認された。当初、therascreen[®] EGFR 変異検出キット RGQ「キアゲン」のみがコンパニオン診断薬 (CDx) であったが、2019 年 9 月にコバス[®] EGFR 変異検出キット v2.0 も追加承認された。

表 2. EGFR 遺伝子変異陽性患者に対する EGFR-TKI と EGFR-TKI の比較

Study (n)	Phase	line	レジメン	適格条件	ORR (%)	mPFS (月)	HR (95% CI)	mOS (月)	HR (95% CI)
WJOG 5108L (n=561, *EGFR 変異; n=401)	III	2 nd 以降	Gefitinib vs. Erlotinib	腺癌 -E *Ex19/L858R + Others	*58.9 vs. 55.0	*8.3 vs. 10.0	*1.093 (0.879-1.358) p=0.424	*26.5 vs. 31.4	*1.189 (0.900-1.570) p=0.221
LUX-Lung 7 (n=319)	Iib	1 st	Afatinib vs. Gefitinib	Ex19/L858R	72.5 vs. 56.0	11.0 vs. 10.9	0.74 (0.57-0.95) p=0.0178	27.9 vs. 24.5	0.86 (0.66-1.12) p=0.2580
ARCHER 1050 (n=452)	III	1 st	Dacomitinib vs. Gefitinib	Ex19/L858R	75 vs. 72	14.7 vs. 9.2	0.59 (0.47-0.74) p<0.0001	34.1 vs. 26.8	0.76 (0.582-0.993) p=0.044
FLAURA (n=556)	III	1 st	Osimertinib vs. Gefitinib/Erlotinib	Ex19/L858R	80 vs. 76	18.9 vs. 10.2	0.46 (0.37-0.57) p<0.001	38.6 vs. 31.8	0.799 (0.641-0.997) p=0.0462

* EGFR 変異陽性の 401 名の解析、ORR; objective response rate, mPFS; median progression free survival, HR; hazard ratio, mOS; median overall survival

これら EGFR-TKI 同士の臨床試験に決定打を放ったのが、第三世代のオシメルチニブと第一世代 EGFR-TKI のゲフィチニブあるいはエルロチニブとの第Ⅲ相比較試験 (FLAURA 試験) である。オシメルチニブ群において PFS が有意に延長し、脳転移症例にも有効で、Grade3 以上の毒性も有意に少なかった^{20,75}。この試験でのオシメルチニブの有効性および忍容性から、オシメルチニブは EGFR 変異陽性 NSCLC の初回標準治療となった (表 2)⁷⁶。また 2019 年 9 月にはオシメルチニブ群において OS も有意に延長したことが報告された (HR=0.799; 95%CI, 0.641-0.997; $p=0.0462$, OS 中央値; 38.6 カ月 vs. 31.8 カ月)⁷⁷。

3-3. EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法

EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法を検討した臨床試験の結果が報告されている。エルロチニブ+ベバシズマブ併用療法の JO25567 試験⁷⁸では PFS は良好であったが OS には差がなかった⁷⁹。ゲフィチニブ+ベバシズマブ併用療法の OLCSG1001 試験⁸⁰、ゲフィチニブ+ペメトレキセド併用療法の JMIT 試験⁸¹、ゲフィチニブ+カルボプラチン+ペメトレキセド併用療法の NEJ005/TCOG0902 試験⁸²などで、EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法について報告されている。アファチニブ単剤に対するアファチニブ+セツキシマブ併用療法の効果を検証する第Ⅱ相試験 (ACE-Lung) ではセツキシマブの上乗せ効果は認められなかった⁸³。

しかしこれらの試験はすべて第Ⅱ相臨床試験である。EGFR-TKI と他の薬剤との併用療法を検討した第Ⅲ相臨床試験として EGFR 変異を有する未治療進行 NSCLC に対するゲフィチニブ単剤療法とゲフィチニブ+カルボプラチン+ペメトレキセド併用療法とを比較する NEJ009 試験では、併用療法群において PFS と OS ともに有意に延長し、併用療法群の OS 中央値が 50.9 カ月であった⁸⁴。エルロチニブ+ベバシズマブ併用療法とエルロチニブ単剤療法を比較する NEJ026 試験では、併用療法群において PFS は有意に延長したが⁸⁵、OS では差を認めなかった (HR=1.007; 95%CI, 0.681-1.490; $p=0.973$, OS 中央値; 50.7 カ月 vs. 46.2 カ月)⁸⁶ (表 3)。中国で行われた同様の ARTEMIS-CTONG1509 試験も同様の結果であった⁸⁷。活性型 EGFR 変異を有し、CNS 転移のない未治療の進行 NSCLC 患者を対象とした第Ⅲ相国際共同二重盲検無作為化試験である RELAY 試験では、エルロチニブと抗 VEGFR-2 抗体薬ラムシルマブの併用が、エルロチニブ単剤と比較して PFS を大きく延長した (HR=0.59; 95%CI, 0.46-0.76; $p<0.001$, PFS 中央値; 19.4 カ月 vs. 12.4 カ月)⁸⁸。中間解析時点での OS 中央値は両群ともに未到達である (表 3)。また、ゲフィチニブとラムシルマブ併用での RELAY+試験において、主要評価項目の 1 年 PFS 率が 65%であり、エルロチニブとラムシルマブの併用と同等の有効性と安全性が評価された⁸⁹。これらの試験結果に基づき、2020 年 11 月に EGFR 変異陽性の切除不能な進行・再発 NSCLC に対して、エルロチニブまたはゲフィチニブとラムシルマブの併用療法が適応追加された。

表 3. EGFR 遺伝子変異陽性患者に対するファーストライン EGFR-TKI+ 抗 VEGF (R) 抗体と EGFR-TKI 単剤の比較

Study (n)	Phase	レジメン	CNS転移	ORR (%)	mPFS (月)	HR (95% CI)	mOS (月)	HR (95% CI)
JO25567 (n=154)	II	Erlotinib± bevacizumab	無	69 vs. 64	16.0 vs. 9.7	0.54 (0.36-0.79) $p=0.0015$	47.0 vs. 47.4	0.81 (0.53-1.23) $p=0.3267$
ALLIANCE (n=88)	II	Erlotinib± bevacizumab	E+B: 26% E: 31%	81 vs. 83	17.9 vs. 13.5	0.81 (0.5-1.31) $p=0.39$	32.4 vs. 50.6	1.41 (0.71-2.81) $p=0.33$
NEJ026 (n=228)	III	Erlotinib± bevacizumab	E+B: 32% E: 32%	72 vs. 66	16.9 vs. 13.3	0.605 (0.417-0.877) $p=0.016$	50.7 vs. 46.2	1.007 (0.681-1.490) $p=0.973$
ARTEMIS (n=311)	III	Erlotinib± bevacizumab	E+B: 28% E: 31%	87 vs. 85	17.9 vs. 11.2	0.55 (0.41-0.73) $p<0.001$	36.2 vs. 31.6	0.92 (0.69-1.23) $p=0.581$
RELAY (n=449)	III	Erlotinib± ramucirumab	無	76 vs. 75	19.4 vs. 12.4	0.59 (0.46-0.76) $p<0.0001$	NR	—

CNS; central nervous system, ORR; objective response rate, mPFS; median progression free survival, HR; hazard ratio, mOS; median overall survival

E; erlotinib, B; bevacizumab, NR; not reached

第3世代 EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法についても試験結果が報告されつつある。EGFR 変異を有する未治療進行 NSCLC に対するオシメルチニブ単独療法とオシメルチニブ+化学療法の併用療法を比較した第Ⅲ相 FLAURA2 試験では、オシメルチニブ+化学療法の併用療法が、オシメルチニブ単独療法と比較して病勢進行または死亡リスクを 38%低下させた (HR=0.62; 95%CI, 0.49-0.79; $p<0.001$)⁹⁰。また、第3世代 EGFR-TKI である Lazertinib と EGFR および MET の二重特異性抗体である Amivantamab 併用療法の有効性も報告されるなど (MARIPOSA 試験)⁹¹、今後さらに治療薬の開発が進むことが予想される。

3-4. 術後期における EGFR-TKI

完全切除後の EGFR 変異 (Del 19 または L858R) 陽性 NSCLC に対して、術後補助化学療法後のオシメルチニブ (3 年間内服) とプラセボを比較した無作為化比較試験 (ADAURA 試験) が行われた。主要評価項目であるⅡ期およびⅢA 期 (第7版) 症例の無病生存期間 (DFS) において、オシメルチニブ群で統計学的に有意な延長が示され (HR=0.17; 99.06%CI, 0.11-0.26; $p<0.001$)⁹²、オシメルチニブは 2022 年 8 月に EGFR 変異陽性の NSCLC における術後補助療法についても適応が追加された。5 年 OS に関して、オシメルチニブ群 85%に対しプラセボ群 73%とオシメルチニブ群で有意な延長を認めている (HR=0.49; 95.03%CI, 0.33-0.73; $p<0.001$)⁹³。また、オシメルチニブを術前療法に用いる NeoADAURA 試験 (NCT04351555, jRCT2080225229) なども行われており、より早期の症例に対する EGFR-TKI 使用の有効性が検証されている。

4. EGFR エクソン 20 挿入変異に対する治療

従来 EGFR エクソン 20 の挿入変異は、ごく一部のサブタイプ (EGFR A763_Y764insFQEA 変異) を除いては EGFR-TKI 治療抵抗性と考えられてきた。近年、エクソン 20 の挿入変異に対する薬剤開発が進み、臨床試験の結果が報告されつつある。EGFR エクソン 20 挿入変異を伴う進行 NSCLC に対し、EGFR-MET 二重特異性抗体 Amivantamab の効果を検証する第Ⅰ相試験 (CHRYSALIS 試験) において、ORR は 40% (95%CI,

29-51), PFS 中央値は 8.3 カ月 (95% CI, 6.5-10.9) であった⁴⁶。また、EGFR エクソン 20 挿入変異を伴う NSCLC を対象に、化学療法 (カルボプラチン+ペメトレキセド) 単独と Amivantamab+化学療法の併用療法を比較した第Ⅲ相 PAPPILLON 試験では、併用療法が化学療法単独と比較して病勢進行または死亡のリスクを 60%低減させた (HR=0.40; 95%CI, 0.30-0.53; $p<0.001$)⁴⁷。これらの結果は、長らく有効な治療法がなくアンメットニーズの高い EGFR エクソン 20 挿入変異に対して、新たな可能性を示すものと期待されている。

5. EGFR 遺伝子野生型における EGFR-TKI

2005 年頃は、BR.21 試験の結果からは EGFR 変異陰性例 (野生型) であっても EGFR-TKI の有用性があると認識され⁵⁷、エルロチニブが EGFR 野生型 NSCLC の二次治療以降の選択肢の 1 つとされていた。しかし 2013 年に EGFR 野生型 NSCLC を対象とした第Ⅲ相試験 (TAILOR 試験) において、エルロチニブがドセタキセルより明らかに劣る結果が示された⁹⁴。また本邦でも、プラチナ製剤治療歴のある進行 NSCLC を対象とした 2, 3 次治療でのドセタキセルとエルロチニブを比較する第Ⅲ相試験 (DELTA 試験) の結果が 2014 年に報告され、サブセット解析ではあるが EGFR 野生型 NSCLC に対してドセタキセル群で有意に PFS が良好であった⁹⁵。このため、EGFR 変異陰性もしくは不明におけるエルロチニブ単剤は有効性とILDのリスクなどから推奨されない。

(3) EGFR-TKI に対する獲得耐性

1. 獲得耐性メカニズム

EGFR 変異陽性進行 NSCLC の一次治療において、EGFR-TKI 投与後約 1 年で多くの患者に耐性獲得が認められる。耐性メカニズムとしては、EGFR 内に耐性機序が存在する On-target 耐性の他に、EGFR 以外に耐性化の原因がある Off-target 耐性が報告されており、それぞれ耐性克服についても検討されてきた。第一および第二世代 EGFR-TKI に対し耐性化した症例の 50-60%で、EGFR 遺伝子エクソン 20 領域の T790M 変異 (コドン 790 におけるスレオニンからメチオニンへの変異) を認める^{3,4,96-98}。このような阻害剤の結合部位に生じる変異はゲートキー

パー変異と呼ばれ、EGFR の ATP 親和性が高まり相対的に EGFR-TKI 結合性が低下することで下流シグナルが阻害されなくなり、耐性化を来す。一方で、癌細胞の EGFR 依存性はまだ保たれており、異なる結合プロファイルをもった EGFR-TKI は有効であることが期待される (図 3)。

その他の耐性メカニズムとして、*MET* 増幅^{96,98-100}、*HGF* 過剰発現¹⁰¹、*HER2* 増幅¹⁰²、*CRKL* 遺伝子増幅¹⁰³、*PIK3CA* 変異⁹⁸、*BRAF* 変異¹⁰⁴、*MAPK1* 増幅¹⁰⁵、*PTEN* 発現喪失^{106,107} などがある。さらに、5-10%の頻度で小細胞肺癌 (SCLC) 形質転換^{96,98} も報告されており、EGFR-TKI 治療前に Rb と p53 の両方に不活化のある *EGFR* 変異陽性 NSCLC の場合、SCLC 形質転換リスクが 43 倍高いとされる¹⁰⁸。また上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition; EMT)^{98,109-112} の関与も示され、そのメカニズムとしては、*AXL* 活性化¹¹³、*MED12* 発現低下¹¹⁴、*TGFβ-IL6*¹¹⁵ 等が報告されている (図 3)。

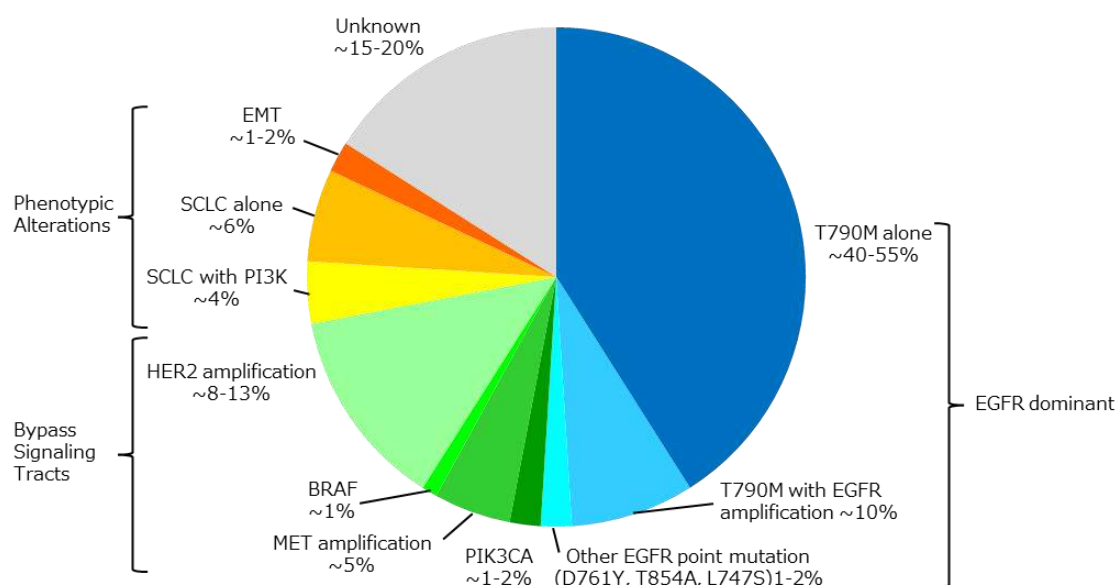
2. 獲得耐性への治療戦略

2-1. 第三世代 EGFR-TKI 登場以前および T790M 変異陰性あるいは不明症例に対して

1-2 レジメンの化学療法歴があり、第一世代 EGFR-TKI を 12 週以上投与されて PD となった患者を対象として、第二世代 EGFR-TKI のアファチニブとプラセボを比

較した第 II b/III 相試験 (LUX-Lung 1) では、主要評価項目の OS はプラセボ群と比較して有意な延長は認められなかった¹¹⁶。

増悪後も EGFR-TKI を継続しながら化学療法を併用する治療戦略 (Beyond PD) が理論上は有効とされており¹¹⁷、ゲフィチニブ治療中の増悪時にシスプラチン+パメトレキセドを追加することの意義を検証する第 III 相試験 (IMPRESS 試験) が実施された。結果は両群とも PFS は変わらず、OS はゲフィチニブの Beyond PD を行わないほうが良いというものであった¹¹⁸。また IMPRESS 試験の血漿バイオマーカー解析で、血漿 T790M 陽性の患者に対しては、二次治療でプラチナ併用療法を行う際に、ゲフィチニブは併用すべきではないことが示された¹¹⁹。一方で、PD 時点で血漿 T790M 変異陰性の患者に対しては、化学療法にゲフィチニブを併用することでベネフィットが得られる可能性も示唆されている¹¹⁹。一次治療としてエルロチニブを投与中に RECIST PD と判定された後にもエルロチニブを継続投与することの臨床的意義を検討する目的で実施された第 II 相試験 (ASPIRATION 試験) では、PFS の差は 3.1 カ月であった¹²⁰。Beyond PD 継続により次治療に移行できない可能性を回避するためにも、RECIST PD より 3 カ月以内での次治療への切り替えを検討する必要があるかもしれない。



日本肺癌学会バイオマーカー委員会作成

図 3. EGFR-TKIs に対する獲得耐性のメカニズム

日本の多施設共同前向きコホート試験である CSPOR LC-02 試験において、EGFR-TKI の一次治療を受けた EGFR 変異陽性の進行・再発 NSCLC 患者での RECIST PD 後の治療の実態と、EGFR-TKI 治療中止後の臨床経過が調査された。進行によって何らかの臨床症状を有する場合や複数個所での増大、主要臓器を脅かすものを臨床的悪化 (clinical PD) と定義して、それに至るまでの期間を評価した。RECIST PD から clinical PD まで継続した患者と RECIST PD の時点で中止した患者では RECIST PD 後の OS に大きな差はみられなかった。ただし多変量解析にて、RECIST PD 後も臨床症状が安定している患者の中で女性、PS 良好、そして Del 19 の患者などは beyond PD でも EGFR-TKI を継続することで良好な OS を認めた¹²¹。

現時点では、一次治療で EGFR-TKI を投与されて耐性または増悪後、T790M 変異陰性の症例には、二次治療として「ドライバー遺伝子変異/転座陰性」に準じた細胞傷害性抗癌薬を用いた治療が勧められる⁷⁶。

2-2. 第三世代 EGFR-TKI

T790M 変異を標的とした第三世代 EGFR-TKI が開発され、EGFR-TKI 耐性後の T790M 変異陽性例に対する有用性が報告されてきた。中でも、オシメルチニブが EGFR 変異陽性の EGFR-TKI 耐性後の T790M 変異陽性 NSCLC に対し、2015 年 11 月に FDA (アメリカ食品医薬品局) で、2016 年 2 月に EMA (欧州医薬品庁) で承認された。本邦においても、2016 年 3 月に「EGFR-TKI に抵抗性の EGFR T790M 変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌」に対し、オシメルチニブが承認されている。

その他の第三世代 EGFR-TKI として、Rociletinib は効果と毒性の問題で Clovis Oncology 社が欧米での承認申請を撤回し、開発を中止した。Olmotinib は EGFR-TKI 耐性後 T790M 変異陽性 EGFR 変異陽性 NSCLC に対する第 I / II 相試験で ORR 56%、PFS 中央値 8.3 カ月と良好な結果であった¹²²。Olmotinib は 2016 年に韓国でいったん承認されたが、開発段階での 2 例の中毒性表皮壊死症 (TEN) と 1 例のステーブンス・ジョンソン症候群の重症皮疹の有害事象について報告が適切にされず、すでに開発は中止され、保険償還リストからも除外された。Naquotinib (ASP8273) も毒性のために開発が中止され

た。Lazertinib については、前述の通り Amivantamab との併用療法 (MARIPOSA 試験)⁹¹ 等において検証中である。その他の第三世代 EGFR-TKI として、Avitinib、Nazartinib、Mavelertinib などが開発されている。

2-3. オシメルチニブ

オシメルチニブは、EGFR キナーゼドメインの ATP 結合部位の C797 に共有結合によって不可逆的に結合する¹⁷。オシメルチニブは特徴的な分子構造を有することで従来の EGFR-TKI とは異なる EGFR への阻害プロファイルを発揮するようデザインされており、EGFR 活性型変異および T790M 変異の両方を有する EGFR に選択的に作用するが、野生型 EGFR への作用は限定的である¹²³。このため、T790M 変異を有する EGFR 変異陽性 NSCLC に対する高い効果と毒性の軽減が証明された。オシメルチニブの半減期は 48.3 時間で、食事や人種 (アジアと非アジア)、性別、体重や年齢の影響は受けにくく安定しており、1 日 1 回 80mg の固定用量が推奨された¹²⁴。

2015 年に、EGFR-TKI 耐性となった EGFR 変異陽性 NSCLC に対するオシメルチニブの第 I / II 相臨床試験 (AURA1/AURA2 試験) にあたる dose escalation 試験と dose expansion 試験の結果が報告された。T790M 変異陽性症例の ORR は 61%、PFS 中央値は 9.6 カ月に対し、陰性症例の ORR は 21%、PFS 中央値は 2.8 カ月であった¹⁹。AURA 試験の extension コホートにおいても、PFS および ORR とともに良好であり、サブグループ解析で CNS 転移症例に対するオシメルチニブの高い効果が示唆された¹²⁵。第 II 相試験 (AURA2 試験) でも同様の結果であった¹²⁶。AURA extension 試験と AURA2 試験の併合解析の結果、ORR は 66%、PFS 中央値は 9.9 カ月で OS 中央値は 26.8 カ月であった¹²⁷。

EGFR-TKI に抵抗性の T790M 変異陽性 NSCLC 患者を対象としてオシメルチニブとプラチナ併用化学療法を比較する第 III 相 AURA3 試験では、オシメルチニブで有意に PFS の延長を認め (HR=0.30, PFS 中央値; 10.1 カ月 vs. 4.4 カ月)、ORR もオシメルチニブが有意に良好 (71% vs. 31%) であった。オシメルチニブ群で 4% に ILD を認めた¹²⁸。その他、下痢、皮疹、皮膚乾燥や爪囲炎などの有害事象を認めたが、いずれも軽微であった。

EGFR-TKI 未治療の EGFR 変異陽性 NSCLC の中で、治療前より T790M 変異を認める de novo T790M は 22-80% にみられ、EGFR-TKI の初期耐性に関与している¹²⁹⁻¹³⁶。オシメルチニブを EGFR 変異陽性 NSCLC の一次治療に使用することで、この de novo T790M 耐性を克服できると考えられた。第 I 相の AURA 試験では、未治療の EGFR 変異陽性 NSCLC に対するオシメルチニブ一次治療において、ORR が 77%、OS は 20.5 カ月と良好な結果であった¹³⁷。この結果は、一次治療での第一世代 EGFR-TKI の有効性と比較しても有益であり、de novo T790M の発現に関係ないことから、オシメルチニブの一次治療としての第 III 相試験 (FLAURA 試験) が行われた。局所進行あるいは転移性 EGFR 変異陽性 NSCLC 患者を対象とし、オシメルチニブと標準治療であるゲフィチニブまたはエルロチニブとを比較した第 III 相試験で、オシメルチニブにおいて PFS と OS が有意に延長し (表 2)、脳転移症例にも有効で⁷⁵、Grade3 以上の毒性も有意に少なかった^{20,77,138}。この試験結果から、治療効果と毒性のバランスを考慮し、EGFR 変異 (Del 19 または L858R 変異) 陽性 NSCLC の一次治療としては、オシメルチニブ単剤療法が推奨されている⁷⁶。

2-4. オシメルチニブの CNS 転移に対する効果

EGFR 変異陽性 NSCLC 患者での CNS 転移の頻度は 31% と多い¹³⁹。ゲフィチニブ⁷¹ やエルロチニブ¹⁴⁰、アファチニブ¹⁴¹ の CNS 内での活性は極めて低いが、プレクリニカルなデータでは、オシメルチニブはゲフィチニブやアファチニブよりも高い CNS 移行率が示された¹⁴²。AURA3 試験での CNS 転移症例に対するオシメルチニブの効果は、CNS ORR が 70% で CNS PFS 中央値は 11.7 カ月であった¹⁴³。FLAURA 試験においても、オシメルチニブの CNS ORR は 91%、CNS PFS 中央値は未到達であるのに対し、ゲフィチニブまたはエルロチニブでは 13.9 カ月 (HR=0.48) であった⁷⁵。がん性髄膜炎に対する高い効果も報告されている^{144,145}。

2-5. オシメルチニブに対する耐性機序

T790M 耐性変異を有する NSCLC に対するオシメルチニブ投与例においても、約 10 カ月程度で耐性変異が発現することが報告されている¹²⁸。耐性獲得メカニズムの 1 つに、オシメルチニブの共有結合部位である C797 がセリンにかわる変異 (C797S) が報告されている^{146,147}。それ以外にも MET 増幅¹⁴⁸ や ERBB2 (HER2) 増幅¹⁴⁹、BRAF V600E 変異^{150,151}、SCLC 形質転換¹⁵² などが報告されて

Mechanisms of resistance to first-line osimertinib Mechanisms of resistance to second-line osimertinib

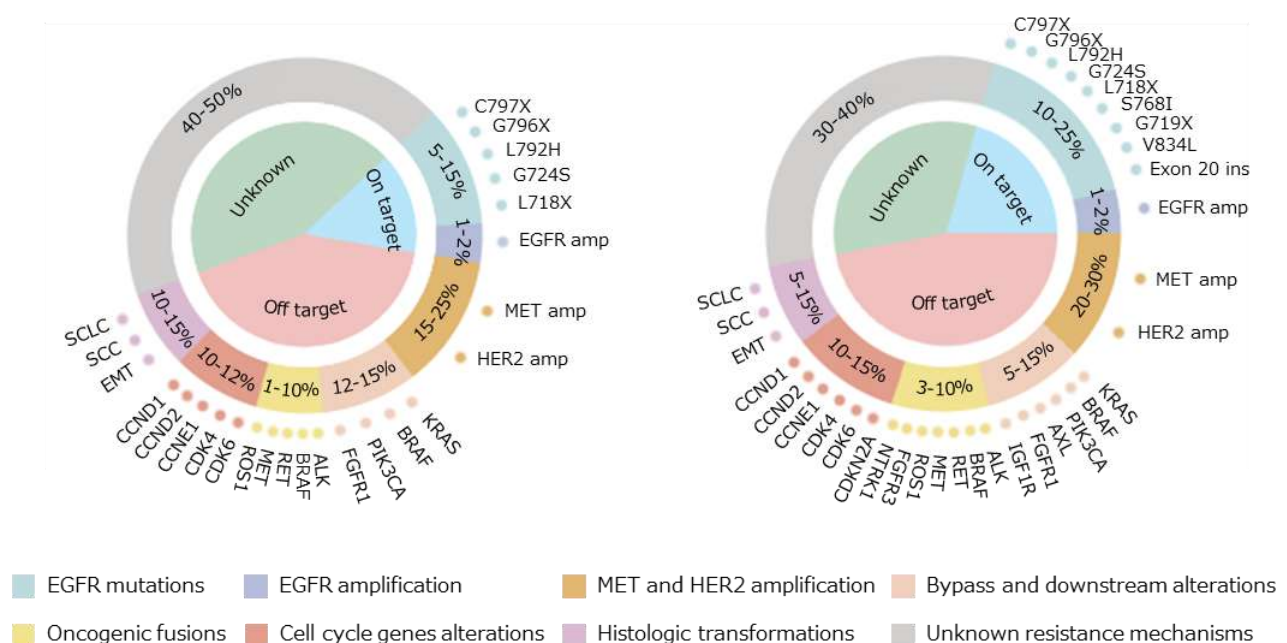


図 4. 初回および二次治療オシメルチニブ投与に対する耐性機序 [153]

いる(図4)¹⁵³。T790M耐性変異患者のオシメルチニブ耐性後の腫瘍組織を用いた検討では、T790M/C797S変異が22%に、T790M変異消失(T790M loss)が68%にみられた¹⁵⁴。T790M lossの耐性機序にはSCLC形質転換、MET増幅、BRAF V600E変異などがみられ、T790M lossのほうがおシメルチニブの治療期間が短いことより、もともとヘテロな耐性クローンが存在している可能性が示唆される¹⁵⁴。

初回オシメルチニブの耐性機序に関して、少数の血漿検体での解析ではMEK1, KRAS, PIK3CA変異など様々な変異を認めているが、T790M変異は認められなかった¹³⁷。FLAURA試験での血漿検体による初回オシメルチニブ耐性機序の検討においても、T790M変異はなく、最も多い耐性機序はMET増幅の16%で、EGFR内の変異は10%(C797S変異は6%)であった¹⁵⁵。血漿検体ではMET増幅が過少評価されることや、SCLC形質転換などは検出できないことなどから、結果の解釈には注意が必要である。初回オシメルチニブの耐性機序に関しては、積極的に再生検を行って詳細を明らかにしていくことが望まれる。

2-6. 免疫チェックポイント阻害剤およびその他の新規治療薬

EGFR変異陽性NSCLCに対する一次治療での免疫チェックポイント阻害剤(immune checkpoint inhibitor; ICI)単独療法については、明確な有効性が示されていない⁷⁶。PD-L1発現陽性のEGFR変異陽性NSCLCに対する一次治療としてのペムブロリズマブの第II相試験では、奏効例がなかったことより試験は無効中止となっている¹⁵⁶。

EGFR変異陽性肺癌に対し、二次治療でのICI(ニボルマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ)とドセタキセルを比較した第III相試験の統合解析では、ICIはドセタキセルに対してOSを改善しなかった¹⁵⁷。また、ICIとEGFR-TKIの併用療法では、有効性よりも重篤な肝機能障害、ILDや皮疹などの有害事象が報告され¹⁵⁸、EGFR変異陽性例へのICIとEGFR-TKIの併用療法は推奨されない。

一次治療における非扁平上皮NSCLCに対する、アテゾリズマブ+ペバシズマブ+カルボプラチン+パクリタキセルの併用療法(ABCP)とペバシズマブ+カルボプラチン+パクリタキセルの併用療法(BCP)を比較した第III相試験(IMpower150試験)のサブグループ解析において、EGFR変異陽性患者のOSのHR=0.61(95%CI: 0.29-1.28, 中央値:未到達 vs. 18.7カ月)、PFSのHR=0.61(95%CI: 0.36-1.03, 中央値: 10.2カ月 vs. 6.9カ月)とABCP群が良好な傾向を示した¹⁵⁹。さらに活性型EGFR変異(Del 19およびL858R変異)のみを対象としたEGFR-TKI治療後の患者におけるOSの更新された解析では、OSのHR=0.74(95%CI: 0.38-1.46, 中央値: 29.4カ月 vs. 18.1カ月)とABCP群で良好な傾向を示した¹⁶⁰。韓国においても、IV期非扁平上皮NSCLCでEGFR変異またはALK転座陽性かつTKI治療歴を有する患者を対象として、ABCPとペメトレキセド+カルボプラチンあるいはシスプラチン(CP)併用療法を比較した第III相試験(ATLAS, KCSG-LU19-04)が行われ、ORRおよびPFSはABCP群で有意に良好であった(OSは両群で同等)¹⁶¹。現状では、一次治療EGFR-TKI耐性または増悪後例に二次治療で化学療法とICI併用療法を行うよう勧めるだけの根拠は明確でない⁷⁶。

その他、オシメルチニブ後に病勢進行したEGFR変異陽性NSCLCに対するAmivantamabと化学療法の併用療法を検証した第III相試験(MARIPOSA-2)¹⁶²など、EGFR-TKI耐性後の治療薬開発が進んでいる。

(4) EGFR-TKI治療とその他の効果予測因子

EGFR変異以外にもEGFR-TKIの感受性にかかわる因子がいくつか報告されている。その中には間接的にEGFR変異の存在と関連を示すものもある。

1. リガンドレベルの変化

ゲフィチニブの奏効例と非奏効例で発現が異なる遺伝子を発現プロファイリングで検討したところ、非奏効例でリガンドであるAmphiregulinとTGFαの発現が高いことが示された¹⁶³。また、血中のこれらのリガンド濃度の上昇はゲフィチニブの感受性と逆相関していた。

HER ファミリーのリガンドは細胞表面に結合した形で合成され、shedase といわれる蛋白分解酵素で切り出される。ErbB リガンドの shedase は ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリーに属し、特に ADAM10 と 17 の関与が強い。多くの肺癌細胞株が ADAM17 を発現しており、このような細胞では ERBB3 のリガンドである heregulin が増加している¹⁶⁴。ADAM の阻害薬である INCB4298 はこの autocrine ループを切ることでゲフィチニブの感受性を高くすることから、ADAM17 は EGFR-TKI の効果を抑制していると考えられる¹⁶⁴。

2. EGFR 遺伝子増幅

Cappuzzo らは EGFR 変異よりも Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) によって検索された EGFR のコピー数の増加の方がゲフィチニブの有効性の予測に有効であると報告した (全生存期間に対する *p* 値は EGFR 変異で 0.09 に対して EGFR 増幅は 0.03)¹⁶⁵。ここで注意すべきは、遺伝子増幅の他に 40%以上の腫瘍細胞がテトラソミー (4 染色体性) 以上となっている場合 (high polysomy) を含めて FISH 陽性としている点である。8 研究の 663 例の結果をまとめてみると、コピー数増加症例の奏効率は 35%、増加のない症例では 9%であった¹²。BR.21 試験においてはコピー数のみが効果予測因子であり、遺伝子変異は無関係であったと報告されている¹⁶⁶。また ISEL 試験においてもコピー数が生存の予測因子であったと報告されている¹⁶⁷。一般に、EGFR 変異が起こった後、腫瘍の進展により遺伝子増幅が起こると考えられるため¹⁶⁸、増幅 (high polysomy ではない) がある場合は変異も同時にあることが多く、このことも種々の結果をもたらす原因と考えられる。2010 年に前述の IPASS 試験のバイオマーカー解析において、EGFR 遺伝子コピー数が増幅した群においても EGFR 変異の有無によって明らかに EGFR-TKI の効果が異なることが示され、EGFR 変異のほうが FISH よりも優れたバイオマーカーであるとの結論に至り、FISH の意義は否定された¹⁶⁹。

3. 他の HER ファミリー

EGFR 変異がある症例において、HER2 の FISH が陽性の場合では陰性の場合とくらべて有意にゲフィチニブ投与後の生存期間が長いと報告されているが¹⁷⁰、前述のよ

うに HER2 増幅は EGFR-TKI 獲得耐性のメカニズムでありこの両知見は矛盾する。また、EGFR 変異の有無にかかわらずゲフィチニブの感受性の細胞では ERBB3 の発現が増加しており、ERBB3 を介して PI3K-AKT 経路が活性化されているが、耐性細胞では ERBB3 を介していないことが示されている¹⁷¹。

4. その他の遺伝子変化と TKI 感受性

KRAS, EGFR, ERBB2 変異, ALK 転座, ROS1 転座は相互排他的関係があるため、これらの遺伝子異常の存在は EGFR 変異の存在を否定することになる。従って、これらの症例における EGFR-TKI の奏効は期待できない。

EGFR 以外の遺伝子に生じた変異が EGFR 変異と同時に存在する (共変異, co-mutation) ことで、EGFR-TKI 感受性に影響を与えることも知られている。PTEN 変異¹⁷² の他に TP53 変異^{172,173}、HER2 増幅¹⁷³、MET 増幅^{173,174}、MDM2 増幅¹⁷²、RB1 変異¹⁷²、CDK4/6 変異¹⁷⁴、WNT/ β カテニン異常¹⁷⁴ などが報告されており、通常はこれら共変異の存在によって EGFR-TKI 感受性が低下する。

PI3K (ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ) の触媒サブユニット p110 α をコードする遺伝子が PIK3CA であり、この遺伝子の変異は肺癌では 1-4%に認められる。PIK3CA 変異は EGFR 変異との排他的な関係はなく、ゲフィチニブ奏効ともあまり関連しないようであった。一方、PI3K の逆の作用をもつのが PTEN 腫瘍抑制遺伝子であり、PTEN 発現低下があると相対的に AKT が活性化され EGFR-TKI 感受性が低くなるとされている。リン酸化 AKT の陽性率が高いとゲフィチニブの感受性が高いとの報告もあるが¹⁷⁵、一定の結論は得られていない。間接的に変異を含む EGFR の活性化をみている場合と、一次的な異常が PTEN にあって AKT が活性化している場合とで結果が異なると解釈できる。

その他に、接着分子である E-カドヘリンは EGFR と相互作用があることが知られているが、この蛋白発現と EGFR-TKI の感受性に相関があることが報告されている¹⁷⁶。また、BIM (BCL2-like 11, BCL2 interacting modulator of cell death) はアポトーシスを促進する分

子で、EGFR-TKI で起こる細胞死に必要とされている。アジア人の 10-20%は BIM のイントロンの欠失多型をもち、これらの症例では EGFR-TKI の奏効が悪いことが報告されている¹⁷⁷。

(5) EGFR 変異の診断

1. EGFR 遺伝子変異検査の対象患者

EGFR 変異は肺腺癌特異的に認められる EGFR-TKI の効果予測因子であるので、基本的には EGFR 変異検査は薬物治療を考慮している腺癌患者が対象となる。非喫煙者、女性などの臨床背景をもつ患者に相対的に高頻度であるが絶対的なものではなく、男性や喫煙者という理由で検査を施行しないことは適切でない。組織型については、腺扁平上皮癌や大細胞癌と診断される可能性がある低分化な腺癌、小細胞肺癌においても報告例があるが、標本の一部に腺癌成分がある場合がほとんどであるため、腺癌成分のある肺癌は検査の対象となる。したがって、外科切除標本でどこにも腺癌成分のない扁平上皮癌などについては EGFR 変異がある可能性は極めて低く、適応から外すことは妥当である。一方で、小さな生検や細胞検体では腫瘍全体の評価はできておらず、これらが扁平上皮癌や小細胞肺癌であっても EGFR 変異検査を施行することは妥当である。

また、1つの検体の中の不均一性の有無については様々な報告があるが、Yatabe らの詳細な解析により基本的にはないと考えてよいであろう¹⁷⁸。すなわち、EGFR 変異は発がん過程の極めて早期に獲得されると考えられており、EGFR-TKI による治療前であれば、一般に腫瘍細胞に均一に分布している。原発巣と転移巣、原発巣と再発病巣における EGFR 変異状態が異なることも稀であることが示されている^{178,179}。原発巣/再発巣のいずれも EGFR 変異検査が可能であれば、腫瘍細胞量、DNA の保持状態でどちらを用いるか判断すべきである。ただし、多発性で明らかに別々の肺腺癌については多発癌の可能性を考慮し、それぞれの腫瘍について検討を行うことは意味がある。

EGFR-TKI 治療後に出現した腫瘍に対しては、オシメルチニブを用いた治療対象選択のため、特定の CDx を用いた T790M 耐性変異の有無の確認が必要となる。なお、初回の EGFR 変異検査については、2013年に College of American Pathologists (CAP)、International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) および Association for Molecular Pathology (AMP) の三学会から EGFR および ALK 遺伝子検査ガイドライン¹⁸⁰が発出されている。また、2016年7月に EGFR-TKI 耐性患者およびその T790M 変異検査を含めた EGFR 変異陽性 NSCLC の診療に関する IASLC の合意声明¹⁸¹が公表され、2017年には The IASLC Atlas of EGFR Testing in Lung Cancer¹⁸²が発出されているので、参照されたい。

2. EGFR 遺伝子変異検査に用いる検査法

2004年の EGFR 変異の発見以降、その検出法が相次いで報告され、本手引ではそれらの解説を行ってきた。当初は、質保証体制が整備された主要検査センターによって、薬事未承認検査法〔米国 CLIA 認証ラボで実施されている laboratory developed test (LDT) 法に相当する位置付けの検査法 (LDT 相当法)〕を用いて、その運用が進められていた。その後、2012年には体外診断用医薬品 (*in vitro* diagnostics ; IVD) として承認された検査法が上市された。さらに2016年には、EGFR 変異検査としては国内初となる CDx として IVD 承認された検査法が登場した。一般に、実臨床でおこなっている腫瘍組織を用いた EGFR 変異検査の検出感度は 1-5%程である。2018年に発出された2013年の CAP/IASLC/AMP の EGFR および ALK 遺伝子検査ガイドライン¹⁸⁰のアップデートガイドラインでは、20%程度の腫瘍細胞を含む検体で検出可能な検査法 (すなわち検出感度が 10%以上の検査法) を用いるべきとしている¹⁸³。

EGFR 変異検査は、特許/ライセンス取得の対応や検査の質保証体制への整備状況に鑑みて、これらをクリアできる特定の実施機関での LDT 相当法を除き、IVD 法の利用が推奨される。また、近年は次世代シーケンシング (next-generation sequencing ; NGS) 法などを用いたマルチプレックス検査が登場し、米国では CLIA/CAP 認

	Technique	Sensitivity (%Mutant DNA)	Mutations Identified	Detection of co-mutations	Potential Applications
CDX	Cobas	3%-5%	known only	No	Tissue, Plasma
	therascreen	1%-10%	known only	No	Tissue, Plasma
	AmoyDx® Pan Lung Cancer Panel	1%-5%	known only	Yes	Tissue
	Oncomine™ Dx Target Test	6%-8%*	known & new	Yes	Tissue
	FoundationOne CDx®	2%-5%**	known & new	Yes	Tissue
	EGFR liquid	0.3%	known & new	Yes	Tissue [#] , Plasma
	FoundationOne® Liquid CDx	0.27%-0.34%***	known & new	Yes	Plasma
RUO	Direct sequencing	10%-25%	known & new	No	Tissue
	Pyrosequencing	5%-10%	known only	No	Tissue
	Multiplex PCR (Snapshot)	5%	known only	Yes (hotspots)	Tissue
	WAVE-surveyor	2%	known only	No	Tissue, Plasma
	High-depth NGS (at least 1000x depth)	1%-10%	known & new	Yes	Tissue, Plasma
	MassARRAY Dx Lung Panel	1%-10%	known only	Yes (hotspots)	Tissue
	Scorpion ARMS	1%	known only	No	Tissue, Plasma
	Locked nucleic acid clamp	1%	known only	No	Tissue, Plasma
	TAm-Seq	2%	known & new	Yes	Tissue, Plasma
	BEAMing	<0.1%	known only	No	Tissue, Plasma
	Digital droplet PCR	<0.1%	known only	No	Tissue, Plasma
	CAPP-Seq	~0.02%	known & new	Yes	Plasma

EGFR; epidermal growth factor receptor gene, PCR; polymerase Chain reaction, NGS; next-generation sequencing, ARMS; amplification refractory mutation system, CAPP; cancer personalized profiling by deep sequencing, RUO; research use only, IVD; in vitro diagnostics, MS; multiple studies, Ref(s); reference(s)

*,**,***; Data from FDA SSED document (*; https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/P160045B.pdf, **; https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf, ***; https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190032B.pdf) *; Only available for fresh frozen tissue

証を受けた医療機関や検査センターで、LDT 法として利用が進んできた (表 4) ^{133,134,182,184-193}. 2017 年 6 月には Thermo Fisher Scientific 社の Oncomine™ Dx Target Test が CDx として FDA 承認され、さらに 2018 年 5 月には Medicare による保険償還がされたことをきっかけに、薬事承認薬の運用も徐々に広まった。同システム (オンコマイン™ Dx Target Test CDx システム)

は、本邦では 2018 年 4 月に *BRAF* V600E 変異のみを対象とした CDx として承認された。その後 2019 年 2 月に「オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム」が *EGFR* 変異 (Del 19 および L858R 変異) を含む 4 遺伝子に対するマルチプレックス CDx として承認された。また、2019 年 10 月には *EGFR* uncommon mutation ならびに T790M 変異に対して追加承認された。一方で、

2018年12月に「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」が、EGFR 変異(Del 19, L858R 変異, T790M 変異)と ALK 融合遺伝子の2遺伝子について承認された。2020年9月にはEGFR 変異のCDx 対象となる変異が拡大され、EGFR uncommon mutation を含む活性型EGFR 変異に対して適応となった。2021年3月には、FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイルと同様に複数のCDx 機能をもつ血漿検査(リキッドバイオプシー検査)として、「FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル」が承認された。また、2022年11月にはNGS法を用いた「肺がんコンパクトパネル® Dx マルチコンパニオン診断システム」が、NSCLC に対するEGFR 変異を含むマルチプレックスCDx として承認された。

上記のようなNGS法に加えて、リアルタイムPCR法を原理としたマルチプレックスCDx として、「AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子PCRパネル」が2021年6月に承認されている。これらのCDx では、いずれも最も重要なバリエーション(Del 19, L858R 変異)の検出は可能となっているが、その他重要度の高いとされるバリエーション〔病的変異(pathogenic)もしくは病的である可能性の高い変異(likely pathogenic)〕では、検査法間でレポートされる内容に差があるため、検査法の選択にあたっては注意が必要である。「オンコマイン™ Dx Target Test マルチCDx システム」では、エクソン20挿入変異は当初は報告されなかったが、2020年5月より解析対象に追加され、シークエンスレポート(薬事非対象報告書)には記載されるようになった(詳細は「(付録)各コンパニオン診断法における報告対象バリエーション」の項を参照)。

NGSを用いたマルチプレックスCDx の保険償還について、「オンコマイン™ Dx Target Test マルチCDx システム」では、患者1人につき1回に限り算定できるが、本検査とは別に実施された肺癌におけるEGFR 変異検査、ROS1 融合遺伝子検査、BRAF 変異検査、ALK 融合タンパク検査及びALK 融合遺伝子検査に係る費用は別に算定できない。ただし、EGFR 変異検査については、再発や増悪により、二次的遺伝子変異が疑われ、再度治療法を選択する必要がある場合には2回に限り算定できる(2020年4月の診療報酬改定においても変更なし)。一方で、

「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」および「FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル」をCDx に用いる場合は、算定可能な保険点数と検査センターに支払う検査費用の間の乖離が大きいため、利用困難な状況となっている。

なお現在、医薬品医療機器総合機構(PMDA)では、同一の効能・効果を有する医薬品(EGFR-TKI)の適応判定に用いるCDx 間の互換使用に関する検討が進んでおり、すでに複数のCDxが存在するEGFR 変異検査については、その対象となっている。今後、同一の効能・効果を有するEGFR-TKIのいずれかに対応したCDx であれば、これら薬剤のCDx に互換使用が可能となる見込みである¹⁹⁴。

2-1. 組織検査

2007年にEGFR 変異検査が保険適用対象となって以降は、主要検査センターで採用された3つのLDT相当法(PNA LNA PCR-Clamp法、PCR-Invader法、Cycleave法)が、検査法として国内では主流となった。その後、Scorpion-ARMS法を用いたリアルタイムPCR法(therascreen® EGFR 変異検出キット)が2012年2月に、またTaqMan-probe法を用いたリアルタイムPCR法(コパス® EGFR 変異検出キット)が2014年1月にそれぞれIVD承認された。その後LDTについては、2022年度(令和4年度)診療報酬改定において削除となっている。

2-1-1. EGFR-TKI 投与前の初回組織検査

EGFR 変異は約90%がDel 19かL858R 変異であり、特定の変異に的を絞った検索が行われてきた。EGFR-TKI 投与前の初回検査において検索対象となる変異は、IVD法を用いる場合、主要なDel 19, L858R 変異, T790M 変異の他、稀なG719X 変異, L861Q 変異, エクソン20挿入変異, S768I 変異が対象となる。IVD法によって検索可能な稀な変異のうち、G719X 変異, L861Q 変異, S768I 変異はアファチニブに対し感受性を示すことが、LUX-Lung 2, Lung 3, Lung 6の統合解析で示された⁴⁴。またエクソン20挿入変異は、第一および第二世代のEGFR-TKI に対し効果が乏しいことが報告されている^{37,38,40-44}。

2-1-2. EGFR-TKI 治療耐性後の T790M 変異検査

第一および第二世代の EGFR-TKI が初回の EGFR-TKI として投与され、その後増悪した場合でオシメルチニブの投与を考慮する際には、増悪後の検体を用いて、T790M 変異陽性であることを確認する必要がある。EGFR-TKI 耐性になった NSCLC に対するオシメルチニブの第 II 相国際共同試験 (AURA2 試験) で実施された患者データに基づき、米国では 2015 年 11 月に、本邦では 2016 年 3 月に「コバス®EGFR 変異検出キット v2.0」がホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin embedded; FFPE) 組織検体から抽出したゲノム DNA を検査対象にオシメルチニブの CDx として承認された。FFPE 組織検体を用いた本法の承認申請データにおける他の IVD 法との検査結果の一致率は 95.6%, NGS 法との一致率は 91.0%となっている。その後 2018 年 12 月に、「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」が、また 2019 年 10 月に「オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム」が、さらに 2021 年 3 月に「FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル」が、オシメルチニブの CDx として承認された。

なお、日本国内 30 施設における EGFR-TKI 耐性進行 NSCLC の再生検の実態を調査した多施設共同後ろ向き観察研究によると、再生検成功率 (癌細胞が採取できた症例数/再生検症例数) は 79.5% (314 症例/395 症例) であった¹⁹⁵。再生検時の検体採取部位は原発巣 55.7%, 転移巣 30.6%で、転移巣を採取部位とする割合は初回診断時の 9.1%と比べ大きく増加していた。再生検の採取方法は、経気管支アプローチが 62.0%, 経皮的アプローチが 29.1%で、経皮的アプローチは診断時の 7.6%から大幅に増加していた。採取部位と採取方法による成功率の差はみられず、再生検時の合併症は 5.8%で多くは気胸であった。一方で、国内 49 施設において 2017 年に EGFR-TKI 投与中に病勢増悪を認めた 236 例を対象に行われた前向き観察研究 (REMEDY 試験) の結果、T790M 変異検査のための検体採取率は 87%, T790M 検査実施率は 84%, T790M 変異陽性率は 26%, T790M 変異陽性でオシメルチニブが使用された割合は 24%であった¹⁹⁶。しかしながら、血漿検体が全体の 58%を占めていたために T790M 変異陽性率が低かった可能性も考えられる。

再生検の問題として、確定診断時の原発巣に比べ奏効後の原発巣は腫瘍が小さく、周囲が線維化しており、鉗子での組織採取が困難になることである。また CT 上は腫瘍陰影であっても活動性病変でないこともあり、可能であれば生検前に PET/CT を行い FDG 集積の強い部分を生検するなどの工夫が必要である。再発部位 (新規病変) が末梢肺に生じた場合には、気管支鏡でのアプローチが困難になる。また、肺以外の臓器に再発した際には、消化器内科、整形外科や脳神経外科など他科との連携が必要になる。特に再増悪部位が脳である場合は再生検が困難で、骨に関しては脱灰処理により遺伝子検査が困難になることもあるため、採取部位や脱灰方法にも工夫が必要である。脱灰方法については、EDTA 溶液を用いた処理が推奨され、強酸溶液などによる処理は避けるべきである¹⁸⁰。

再生検からの組織検体に加えて、血中遊離 DNA (cell-free DNA; cfDNA) を対象とした検査 (リキッドバイオプシー検査) では、主として血漿検体が用いられる (後述)。

2-2. 血漿検査 (リキッドバイオプシー検査)

リキッドバイオプシー検査は、患者の負担も少なく、組織検体採取困難な患者対しても比較的容易に検査できるため、様々ながん種の変異検査での利用に期待が高まっている。NSCLC 患者における血中 cfDNA を用いた EGFR 変異検査のメタアナリシスでは、組織検体の結果を参考基準とした場合、cfDNA 検体の特異性は 0.96、感度は 0.62 と報告されている¹⁹⁷。本メタアナリシスの解析対象となった 27 研究では、cfDNA の抽出に血漿と血清の両方が用いられているが、現在では血漿が推奨されている。血中 cfDNA 検体を用いる検査法は、高感度の BEAMing 法や droplet digital PCR 法を含め組織検体で使用されている方法が IVD 承認されていないが、臨床研究では広く使われている (表 4)。

現在、本邦で薬事承認されているリキッドバイオプシーによる検査では、cfDNA を用いている。リキッドバイオプシー検査は、米国において 2016 年 6 月にエルロチニブの、また 9 月にオシメルチニブの CDx として「Cobas® EGFR Mutation Test v2」が FDA 承認を取得している。本邦においても、オシメルチニブの CDx として「コバス

® EGFR 変異検出キット v2.0」による T790M 変異検査が 2016 年 12 月に承認された。また、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブに対する EGFR-TKI 投与前の初回検査は 2017 年 8 月に承認されている。2018 年 7 月からは、オシメルチニブの EGFR-TKI 投与前の初回検査に対しても薬事承認・保険適用された。その後 2020 年 7 月には、「EGFR リキッド遺伝子解析ソフトウェア」が、癌組織または血漿を用いたゲフィチニブ、エルロチニブおよびアファチニブの CDx として承認を得た。また、2021 年 3 月には、324 のがん関連遺伝子を対象とした包括的がんゲノムプロファイリング (CGP) と、複数の分子標的治療薬に対する CDx の 2 つの機能を併せ持つリキッドバイオプシー検査として、「FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル」が承認された。

血漿検査では、使用する検出法の検出感度の把握が重要となる。「コバス® EGFR 変異検出キット v2.0」を用いた血漿検査における最小検出感度については、同キットの添付文書にデータが示されている (表 5)。血漿検体へ約 220 bp に断片化した細胞株 DNA をスパイクインした際の野生型 DNA 約 100,000 コピー/mL 中における変異型 DNA の検出限界 (コピー数) が記載されており、最低で 100 コピー (25~100) とされている。ここから各バリエーションの最小検出感度を計算すると、0.025% (S768I およびエクソン 20 挿入) -0.1% (L858R および T790M) となることから、血漿検体を用いた際の最小検出感度は 0.1% 程度と考えられる。なお、表 4 に EGFR 変異の検出法とその特性が記載したが、本記載は組織検体を用いた場合の感度である。

2-2-1. EGFR-TKI 投与前の初回リキッドバイオプシー検査

リキッドバイオプシー検査による初回 EGFR 変異検査の承認は、ⅢB/Ⅳ期 NSCLC の第一選択薬としてエルロチニブとシスプラチン+ゲムシタビンの有効性と安全性を評価するための多施設オープンラベル無作為化第Ⅲ相試験 (ENSURE 試験)¹⁹⁸ に基づいている。「コバス® EGFR 変異検出キット v2.0」による組織での検査を規準とした場合の陽性一致率 (感度) は 76.7%にとどまるが、陰性

一致率 (特異度) は 98.2%と極めて高いため (表 6)、この検査で陽性である場合は組織での EGFR 変異が陽性とほぼ同等の EGFR-TKI の奏効が期待できるといえる。なお、「コバス® EGFR 変異検出キット v2.0」は、NSCLC と病理組織診断または細胞診断された患者において、何らかの理由で組織検体や細胞検体を用いて EGFR 変異検査を実施できない場合に血漿検体を用いて検査することを目的としている。また、EGFR 変異が血漿検体中に検出されない患者は、偽陰性 (組織検査において変異陽性であった血漿検査で変異が検出されないこと) の可能性が少なくないことを考慮して、再生検の可能性について検討し、採取可能となれば組織検体や細胞検体で EGFR 変異検査を行うことが推奨される。

表 5. コバス®EGFR 変異検出キット v2.0 の感度 (最小検出感度)

EGFR変異型	Sheared* cell line DNA (コピー/ml)
G719X (G719A)	100
エクソン19欠失	75
S768I	25
T790M	100
エクソン20挿入	25
L858R	100
L861Q	30

コバス®EGFR 変異検出キット v2.0 の添付文書より引用
*約 220 bp に断片化、バックグラウンドとして野生型 DNA を約 100,000 コピー/mL を含む。

表 6. ENSURE 試験に登録された NSCLC 患者の EGFR 遺伝子変異 (エクソン 19 欠失変異と L858R 変異) における血漿検査 (コバス®EGFR 変異検出キット v2.0) と FFPE 組織検体検査 (コバス®EGFR 変異検出キット v1.0) との一致率

エクソン19欠失変異 およびL858R変異		コバス®EGFR変異検出キットv1.0 (FFPE組織検体)		
		陽性	陰性	合計
コバス®EGFR変異検出 キットv2.0 (血漿検体)	陽性	161	4	165
	陰性	49	217	266
	合計	210	221	431
		陽性一致率 76.7% (161/210)		
		陰性一致率 98.2% (217/221)		
		全体一致率 87.7% (378/431)		

「cobas®EGFR Mutation Test v2」米国 FDA Summary of Safety and Effectiveness Data (SSED) より

2-2-2. EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査

T790M 変異は EGFR-TKI に対する耐性獲得の過程で出現することが多く、T790M 変異陽性の腫瘍細胞数は耐性獲得後、臨床経過とともに増加することも知られている。それにつれて、血液中の腫瘍細胞由来漏出 DNA が出現・増加し、血漿検査による T790M 変異の検出率が上昇する。したがって、同一患者において最初の血漿検査で T790M 変異が検出されない場合でも、tumor burden の増加に伴って、後日再度の血漿検査で T790M 変異が検出される場合がある。EGFR-TKI に対する耐性獲得後に臨床経過とともに T790M 変異血漿検査の陽性率も上昇することが報告されている^{199,200}。検査結果が血漿検査の時期に大きく依存することが示されているが、最適な血漿検査の時期については未だ明らかな知見はない。

オシメルチニブの第 II 相国際共同試験 (AURA2 試験) に登録された NSCLC 患者の検体のうち、T790M 変異検出における血漿検体 (コバス® EGFR 変異検出キット v2.0) と FFPE 組織検体 (コバス® EGFR 変異検出キット v1.0) 間、および血漿検体を用いた NGS 法とコバス® EGFR 変異検出キット v2.0 間の一致率解析結果を示す (表 7)。「コバス® EGFR 変異検出キット v2.0」における血漿検査と組織検査の全体一致率は 65.9%であったが、血漿を検体とし「コバス® EGFR 変異検出キット v2.0」と NGS 法による一致率を評価したところ、全体一致率は 91.3%であった。

オシメルチニブの第 I 相試験 (AURA I 試験) で使用された検査検体の後ろ向き解析では、血漿検体および組織検体による T790M 変異陽性患者の ORR (63% vs. 62%) と PFS 中央値 (9.7 カ月 vs. 9.7 カ月) の比較では、両者は同等であった。一方で、組織検体で T790M 変異陽性であった 158 例のうち、47 例 (29.7%) が血漿検体での T790M 変異が陰性であり、その PFS は 16.5 カ月と、組織検体および血漿検体で T790M 変異陰性であった症例の 2.8 カ月よりかなり長かった²⁰¹。

これらの試験では、組織検査により T790M 変異陽性であった患者に対して試験が行われたため、血漿検査で T790M 変異陽性であった患者集団に対するオシメルチニブの効果が検証されていない状況である。そのため、リキッドバイオプシー検査のみが実施され、T790M 変異陽性であった症例には、オシメルチニブ奏効性に関するデータが十分でないといえる。したがって、本邦では現時点において、組織採取が難しいときに限りリキッドバイオプシー検査を行うことを推奨している。また、リキッドバイオプシー検査において変異陰性であった場合は、腫瘍由来 DNA が血漿中に十分に漏出していないことを考慮して、再生検の可能性について検討すべきである。病勢の進行などによって組織採取が可能になった時点において、組織検体を用いて T790M 変異検査を行い、その有無を確認することが推奨される。なお Oxnard らは、二次的 T790M 変異検査では、最初の検査を血漿検体で行い、T790M 変異陰性患者に対し再生検された組織・細胞検体を用いる検査アルゴリズムを提案している²⁰¹。また、2016 年 9 月に改訂されたオシメルチニブの米国添付文

表 7. オシメルチニブ第 II 相国際共同試験 (AURA2) の患者検体での T790M 変異検出における血漿検体と各検査法との一致率

T790M変異		コバス®EGFR変異検出キットv1.0 (FFPE組織検体)	
		陽性	陰性
コバス®EGFR変異検出キットv2.0 (血漿検体)	陽性	131	22
	陰性	92	89
陽性一致率 58.7% (131/223) 陰性一致率 80.2% (89/111) 全体一致率 65.9% (220/334)			

T790M変異		次世代シーケンス解析 (NGS法) (血漿検体)	
		陽性	陰性
コバス®EGFR変異検出キットv2.0 (血漿検体)	陽性	129	16
	陰性	12	163
陽性一致率 91.5% (129/141) 陰性一致率 91.1% (163/179) 全体一致率 91.3% (292/320)			

「コバス® EGFR 変異検出キット v2.0」 添付文書より引用

書や IASLC の合意声明においては、再生検の可否を先行検討し、困難な場合について血漿検体による二次的 T790M 変異検査を実施する検査アルゴリズムを推奨している¹⁷⁵。本邦でも、血漿検体を用いた T790M 変異検査がオシメルチブの効果予測因子となることが、臨床試験 (WJOG8815L) で示されている²⁰²。

3. 対象となる検体とその適正性について

本検査では、様々な臨床検体が検査対象となりうるが、検査センターへ提出される割合は、主として FFPE 組織検体と細胞検体（胸水、気管支擦過細胞、気管支洗浄液等）が多い。IVD 法では FFPE 組織検体での検査が原則となっているが、臨床上、細胞検体が積極的に用いられてきた^{203,204}。腫瘍部の新鮮凍結検体の利用も可能であるが、検体の選択には、その特徴をよく理解することが重要である。上記の検査方法によって感度が異なるのと同様に、対象となる検体や採取によって腫瘍細胞の存在確認の方法や許容腫瘍細胞割合が異なるため、注意が必要である²⁰⁴⁻²⁰⁶。

3-1. 組織・細胞検体

EGFR 変異検査の陰性判定は、検体の適正性について十分に評価された場合にのみ可能となる。検体の適正性は、腫瘍細胞の割合、DNA の質および量に基づいて評価される必要がある。評価に際しては、EGFR 変異検査の感度（必要となる腫瘍細胞の割合）および必要最少の DNA 量が明示されている必要があり、外注先を含む検査担当部門はその情報を提供しなければならない。EGFR 変異検査法として標準的に使用されている IVD 法や主要な LDT 法の検出感度は、概ね 1-5%（%変異 DNA）となっている（表 4）。CDx 承認 IVD 法では、単一遺伝子検査法の場合は、腫瘍細胞含有割合は 20%以上が推奨され、NGS を用いたマルチプレックス検査法（オンコマインTM Dx Target Test マルチ CDx システム）の場合は、日常診療上の病理医間の目視評価差を考慮し、30%以上（検出感度上は最低 20%以上）が推奨されており、これに満たない場合、FFPE 組織検体などではマクロダイセクション（用手的に行うマイクロダイセクション）の実施が必要となる。これらの判断は病理医が行うのが通例であり、密接な連

携・関与が必要となる。EGFR 変異検査を外注検査として行う場合には、適正な検体を提出することが提出する側の責任であることを十分に留意する必要がある。

3-1-1. FFPE 組織検体

薄切した組織切片はスライドガラスにマウントさせて提出する。5-10 枚の未染色標本作製し、そのうちの 1 枚を HE 染色し腫瘍細胞の存在を確認することが推奨される。特に微小な生検検体では、病理診断の後に再薄切した場合には、腫瘍部分あるいは組織そのものがなくなってしまうことがあるので注意を要する。あらかじめ EGFR 変異検査を行う予定の場合は未染色標本作製時に遺伝子変異検査用標本を余分に作製しておくことも有用である²⁰⁷。検体中の腫瘍細胞の存在状態は様々であるため、病理診断報告書に腫瘍量や腫瘍含有割合を記録しておくことが推奨される。またマクロダイセクションを実施した場合は、その旨と実施後の腫瘍量や腫瘍含有割合を記録することが推奨される。検査センターへ外注する場合、検査に供した検体の HE 標本（マクロダイセクションを行う際に腫瘍部のマーキングを行った HE 染色標本）は、可能な限り検査後にも再確認できるようにしておく。ホルマリン固定には、10%中性緩衝ホルマリン液が標準的に用いられており、固定時間は 6-48 時間が推奨されている^{180,208}。FFPE 組織検体における取り扱いについては、日本病理学会から発出されている「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」²⁰⁹を参照されたい。

3-1-2. FFPE 細胞検体（セルブロック検体）

免疫組織化学染色 (IHC) 法や FISH 法を用いる ALK 検査が開始されて以降、胸水などの細胞検体からのセルブロックの検査使用の重要性が増した。セルブロックでの保管により、FFPE 組織検体同様、CDx や鑑別診断などを目的とした IHC 法や FISH 法による解析が繰り返し可能となる。また、腫瘍細胞の含有割合の確認も容易となる。セルブロック作製法は複数知られており、遠心分離細胞収集法と細胞固化法に大別される。本邦ではそれぞれ 4-5 種程度の作製法が用いられていることが、これまでの調査研究で明らかとなっているが、前者では遠心管法が、後者ではアルギン酸ナトリウム法が、比較的多くの施設で用いられている（アルギン酸ナトリウム法については肺

癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き「4.バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常 4-2. ALK」を参照).

3-1-3. 細胞検体

呼吸器領域における細胞診では、以下のような複数の方法による検体採取が行われている。一部を除き、細胞検体の核酸品質は、FFPE 組織検体やセルブロック検体に比べ良好であり、2018年のCAP/IASLC/AMPのアップデート遺伝子検査ガイドラインでも、その使用を推奨している¹⁸³。しかし、検査に必要な腫瘍細胞量や腫瘍含有割合を得ることが難しい場合も少なくなく、EGFR変異検査に使用する場合は、検体の特性を踏まえた対応が必要となる。

a) 胸水・心嚢液：これらの検体は、時として腫瘍細胞数が乏しい場合があり、腫瘍細胞の確認が必須である。上述のセルブロックの作製も考慮すべきである。

b) 経気管支擦過細胞・経気管支穿刺吸引細胞・リンパ節穿刺吸引細胞：これらの検体では、適切に腫瘍から採取されれば腫瘍細胞に富んだ検体の採取が可能である。スメア標本からのDNA抽出も可能であるが、腫瘍細胞の存在の確認が必須である。

c) 喀痰・吸引痰・気管支洗浄液 (BAL)：正常細胞が混入することが多く、腫瘍細胞に富んだ検体を採取することが比較的困難な検体であり、あまり推奨されない。喀痰での変異の検出率はEGFR変異を有する腫瘍をもつ患者の30-50%にとどまるとの報告もある²¹⁰。

3-1-4. 新鮮凍結検体

最も高品質のDNAやRNAを抽出可能であるが、同時にDNaseやRNaseの酵素活性も保持されており、検体の取扱いを迅速に行わなければ、核酸品質を急速に低下させるおそれがあるため、注意を要する。手術室などで割を入れ採取する場合も多いが、腫瘍細胞含有量を顕微鏡的に確認する必要がある。周囲の炎症が強い腫瘍、粘液産生が高度な腫瘍、中心部線維化巣が広範な腫瘍では、腫瘍細胞が採取されず偽陰性になることがある。腫瘍細胞

を確認する手段としては以下の方法がある：①凍結腫瘍組織を薄切し、HE標本を作製し、その標本で腫瘍細胞の存在および占有割合を確認する。②採取時に割を入れその片割れを凍結組織とし、残りの割面で組織標本を作製し確認する。

3-2. 血漿検体

リキッドバイオプシー検査では、血漿中に遊離しているDNA断片からEGFR変異を検出する。血漿検体は組織検体と異なり、腫瘍細胞の割合やDNAの質、量に基づいて評価できないため、血液採取、血漿の分離、血漿検体の保管に至るプレアナリシスの段階において適切に扱われた検体を使用すべきである。特に採血後の検体を長時間室温で放置すると、血球成分の崩壊やDNAの分解の原因につながる。また、血漿成分を分離する際に血球成分が混入すると、有核細胞由来のゲノムDNAが原因で、偽陰性となる可能性があることは注意しなければならない。IVD法では、EDTA-2Kの採血管を使用した場合、血漿の分離は、採血後8時間以内安定である。血漿分離後の血漿検体は、15-30℃で1日間、2-8℃で3日間、-25--15℃で12カ月、そして-70℃以下の場合には12カ月保管可能である。また、ASCOとCAPは合同で、血漿検体に対する取り扱いについてレビューをしている〔Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology (ASCO) and College of American Pathologists (CAP) Joint Review〕^{211,212}。

4. 薬事承認および保険診療の観点からみた本検査のあり方

EGFR-TKI投与前の初回検査については、2011年9月にゲフィチニブの添付文書改訂でEGFR変異陽性が適応条件となったことを受け、2012年4月の診療報酬改定で2,000点が2,100点に引き上げられ、このとき患者1人につき1回のみとする制限が撤廃された。2012年9月には「therascreen® EGFR変異検出キット」がEGFR変異検査として初めてIVDとして承認され、これにあわせIVD承認されたリアルタイムPCR法については2,500点が算定可能となった。一方で、EGFR-TKI耐性患者の

T790M 変異検査については、2016年3月にオシメルチニブのCDxとして、「コバス®EGFR 変異検出キットv2.0」がIVD承認されたことを受け、翌4月より2,500点での算定が可能となった。EGFR 変異検査については、再発や増悪により二次的遺伝子変異などが疑われ、再度治療法を選択する必要がある場合にも算定できる。

4-1. T790M 血漿検査の検査回数について

前述した通り、血漿検査の場合、検査結果が検査を行ったタイミングに大きく依存することが考えられているが、最適な血漿検査の時期については未だ知見はない。最適な血漿検査時期を推奨できない現時点においては、過度に検査回数を制限することは、血漿検査の偽陰性を招いて、T790M 変異陽性患者のオシメルチニブ治療の機会を喪失することが強く懸念される。さらに、肺癌患者のEGFR-TKI 治療および化学療法の臨床経過において奏効と増悪を繰り返すことに伴って、T790M 変異陽性細胞の出現状況（陽性または陰性）が動的に変化することも報告されている²⁰⁰。したがって、患者の不利益を回避する観点から、初回の T790M 変異血漿検査が陰性であっても、病勢の進行などにより T790M 変異陽性が強く疑われる症例であって、再生検が不可能であり、かつ再度治療選択を検討する必要がある場合などにおいては、再度の T790M 変異血漿検査の実施が望ましいと考える。これまで血漿検査（D006-12）に対しては、厳しい算定回数制限が設けられていたが、2020年4月の診療報酬改定においては、「肺癌の詳細な診断及び治療法を選択する場合、又は肺癌の再発や増悪により、EGFR 遺伝子変異の二次的遺伝子変異等が疑われ、再度治療法を選択する場合に、患者1人につき、診断及び治療法を選択する場合には1回、再度治療法を選択する場合には2回に限り算定できる」とされ、回数が2回へと変更となり制限が緩和された。

4-2. 同一月中の T790M 血漿検査・組織検査の実施について

血漿検査が優先される場合として、組織検査の標的病巣部位が内科的に到達困難で手術などの侵襲的な手技が必要な場合もしくはまったく組織検査不能の場合や、組

織検査による出血、縦隔炎、呼吸不全、肺炎、気胸などのリスクを考慮した結果、組織検査のリスクが高いと判断された場合が想定される。以上のような場合において T790M 変異血漿検査が実施されるが、結果が陰性の際には、組織検査合併症のリスクが高いことを承知のうえで気管支鏡生検、CT 下生検などによる組織採取に踏み切る例や侵襲を伴う全身麻酔下外科的手術（肺切除、縦隔鏡下切除、骨転移・病的骨折手術、転移性腫瘍切除など）により腫瘍組織を採取する例がある。このような症例においては、血漿検査から時間を置かず組織採取ならびに組織検査を行う必要性から、同一月中に血漿検査と組織検査、双方の実施が必要となる場合がある。しかしながら、上述のように血漿検査の回数については、再度治療法を選択する場合には2回へと増回されたものの、同一月中に血漿検査および組織検査の双方が実施された場合は「主たるもののみ算定する」という制限が設けられているため、実施においては注意が必要である。

5. おわりに

実臨床において適正な EGFR 変異検査に基づいた治療選択がなされる目的で解説した。一方で、本邦においても、NGSを用いたマルチプレックス CDx およびがんゲノムプロファイリング検査が保険適用となり、クリニカルシーケンスが本格稼働した。さらに2021年8月には、血漿のマルチプレックス CDx も保険償還された。肺癌は他のがん種とは異なり、前者のマルチプレックス CDx での臨床実施が主軸となっており、これまでの単一遺伝子検査からの移行が急速に進んでいる。一方で、この移行にあたっては、検体の核酸品質、患者の状態に対して検査にかかる時間（Turnaround time; TAT）などの課題が顕在化してきている。現在実施されている肺癌バイオマーカー検査の中で、変異陽性患者割合が最も高い EGFR 変異の検査については、特に進行・再発の NSCLC 患者で早急な治療開始が必要な場合は、その検査結果の把握は臨床で極めて重要となり、TAT を考慮した検査法選択が重要となる。従来の単一遺伝子検査もしくはマルチプレックス遺伝子検査をどのように使い分けていくか、さらに検討していく必要がある。

参考文献

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-39, 2004
2. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497-500, 2004
3. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352:786-92, 2005
4. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2:e73, 2005
5. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-37, 2001
6. Hynes NE, Lane HA: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5:341-54, 2005
7. Ciardiello F, Tortora G: EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358:1160-74, 2008
8. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19:183-232, 1995
9. Modjtahedi H, Dean C: The receptor for EGF and its ligands - expression, prognostic value and target for therapy in cancer (review). *Int J Oncol* 4:277-96, 1994
10. Kobayashi Y, Mitsudomi T: Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci* 107:1179-86, 2016
11. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al: Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 97:339-46, 2005
12. Mitsudomi T, Yatabe Y: Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 98:1817-24, 2007
13. Dearden S, Stevens J, Wu YL, et al: Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Ann Oncol* 24:2371-6, 2013
14. Midha A, Dearden S, McCormack R: EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res* 5:2892-911, 2015
15. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, et al: EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 29:633-9, 2005
16. Dong YJ, Cai YR, Zhou LJ, et al: Association between the histological subtype of lung adenocarcinoma, EGFR/KRAS mutation status and the ALK rearrangement according to the novel IASLC/ATS/ERS classification. *Oncol Lett* 11:2552-2558, 2016
17. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, et al: AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 4:1046-61, 2014
18. Takeda M, Okamoto I, Nakagawa K: Pooled safety analysis of EGFR-TKI treatment for EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 88:74-9, 2015
19. Janne PA, Yang JC, Kim DW, et al: AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 372:1689-99, 2015
20. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al: Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 378:113-125, 2018
21. Suh CH, Park HS, Kim KW, et al: Pneumonitis in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitor: Meta-analysis of 153 cohorts with 15,713 patients: Meta-analysis of incidence and risk factors of EGFR-TKI pneumonitis in NSCLC. *Lung Cancer* 123:60-69, 2018
22. アストラゼネカ: タグリッソ使用成績調査 最終報告 結果報告. <http://www.jsmo.or.jp/file/dl/newsj/2301.pdf>, 2019
23. Noonan SA, Sachs PB, Camidge DR: Transient Asymptomatic Pulmonary Opacities Occurring during Osimertinib Treatment. *J Thorac Oncol* 11:2253-2258, 2016
24. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al: The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2070-5, 2008
25. Kobayashi Y, Togashi Y, Yatabe Y, et al: EGFR exon 18 mutations in lung cancer: molecular predictors of augmented sensitivity to afatinib and neratinib as compared with first or third generation TKIs. *Clin Cancer Res*, 2015
26. Wu JY, Yu CJ, Chang YC, et al: Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17:3812-21, 2011
27. Arcila ME, Nafa K, Chaft JE, et al: EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol Cancer Ther* 12:220-9, 2013
28. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, et al: A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol* 9:154-62, 2014
29. Lee B, Lee T, Lee SH, et al: Clinicopathologic characteristics of EGFR, KRAS, and ALK alterations in 6,595 lung cancers. *Oncotarget* 7:23874-84, 2016

30. Sheng M, Wang F, Zhao Y, et al: Comparison of clinical outcomes of patients with non-small-cell lung cancer harbouring epidermal growth factor receptor exon 19 or exon 21 mutations after tyrosine kinase inhibitors treatment: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 72:1-11, 2016
31. Eck MJ, Yun CH: Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1804:559-66, 2010
32. Carey KD, Garton AJ, Romero MS, et al: Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res* 66:8163-71, 2006
33. Cho J, Chen L, Sangji N, et al: Cetuximab response of lung cancer-derived EGF receptor mutants is associated with asymmetric dimerization. *Cancer Res* 73:6770-9, 2013
34. Okabe T, Okamoto I, Tamura K, et al: Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. *Cancer Res* 67:2046-53, 2007
35. Oxnard GR, Lo PC, Nishino M, et al: Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. *J Thorac Oncol* 8:179-84, 2013
36. Pan Y, Zhang Y, Li Y, et al: Prevalence, clinicopathologic characteristics, and molecular associations of EGFR exon 20 insertion mutations in East Asian patients with lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 21 Suppl 4:S490-6, 2014
37. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM, et al: Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Ann Oncol* 25:126-31, 2014
38. Naidoo J, Sima CS, Rodriguez K, et al: Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: Clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer* 121:3212-20, 2015
39. Riess JW, Gandara DR, Frampton GM, et al: Diverse EGFR Exon 20 Insertions and Co-Occurring Molecular Alterations Identified by Comprehensive Genomic Profiling of NSCLC. *J Thorac Oncol* 13:1560-1568, 2018
40. Voon PJ, Tsui DW, Rosenfeld N, et al: EGFR exon 20 insertion A763-Y764insFQEA and response to erlotinib--Letter. *Mol Cancer Ther* 12:2614-5, 2013
41. Woo HS, Ahn HK, Lee HY, et al: Epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer and resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Invest New Drugs* 32:1311-5, 2014
42. Yasuda H, Park E, Yun CH, et al: Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med* 5:216ra177, 2013
43. Yasuda H, Kobayashi S, Costa DB: EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol* 13:e23-31, 2012
44. Lee CK, Wu YL, Ding PN, et al: Impact of Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations and Clinical Characteristics on Outcomes After Treatment With EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Versus Chemotherapy in EGFR-Mutant Lung Cancer: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 33:1958-65, 2015
45. Vasconcelos P, Gergis C, Viray H, et al: EGFR-A763_Y764insFQEA Is a Unique Exon 20 Insertion Mutation That Displays Sensitivity to Approved and In-Development Lung Cancer EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *JTO Clin Res Rep* 1, 2020
46. Park K, Haura EB, Leighl NB, et al: Amivantamab in EGFR Exon 20 Insertion-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Progressing on Platinum Chemotherapy: Initial Results From the CHRYSALIS Phase I Study. *J Clin Oncol*:Jco2100662, 2021
47. Zhou C, Tang KJ, Cho BC, et al: Amivantamab plus Chemotherapy in NSCLC with EGFR Exon 20 Insertions. *N Engl J Med*. 2023 Oct 21.
48. Cho JH, Lim SH, An HJ, et al: Osimertinib for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Multicenter, Open-Label, Phase II Trial (KCSG-LU15-09). *J Clin Oncol*:JCO1900931, 2019
49. Kohsaka S, Nagano M, Ueno T, et al: A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer. *Sci Transl Med* 9:eaan6566 2017
50. Chen YR, Fu YN, Lin CH, et al: Distinctive activation patterns in constitutively active and gefitinib-sensitive EGFR mutants. *Oncogene* 25:1205-15, 2006
51. Yang TY, Tsai CR, Chen KC, et al: Good response to gefitinib in a lung adenocarcinoma harboring a heterozygous complex mutation of L833V and H835L in epidermal growth factor receptor gene. *J Clin Oncol* 29:e468-9, 2011
52. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al: Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol* 25:1545-52, 2007
53. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al: Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 22:777-84, 2004
54. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al: Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 22:785-94, 2004
55. Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al: TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23:5892-9, 2005
56. Thatcher N, Chang A, Parikh P, et al: Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 366:1527-37, 2005

57. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353:123-32, 2005
58. Maruyama R, Nishiwaki Y, Tamura T, et al: Phase III study, V-15-32, of gefitinib versus docetaxel in previously treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 26:4244-52, 2008
59. Kim ES, Hirsh V, Mok T, et al: Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet* 372:1809-18, 2008
60. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361:947-57, 2009
61. Han JY, Park K, Kim SW, et al: First-SIGNAL: first-line single-agent iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 30:1122-8, 2012
62. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al: Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 362:2380-8, 2010
63. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al: Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 11:121-8, 2010
64. Zhou C, Wu YL, Chen G, et al: Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 12:735-42, 2011
65. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al: Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13:239-46, 2012
66. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al: Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 31:3327-34, 2013
67. Wu YL, Zhou C, Hu CP, et al: Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15:213-22, 2014
68. Yang JC, Wu YL, Schuler M, et al: Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 16:141-51, 2015
69. Kato T, Yoshioka H, Okamoto I, et al: Afatinib versus cisplatin plus pemetrexed in Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer harboring activating EGFR mutations: Subgroup analysis of LUX-Lung 3. *Cancer Sci* 106:1202-11, 2015
70. Urata Y, Katakami N, Morita S, et al: Randomized Phase III Study Comparing Gefitinib With Erlotinib in Patients With Previously Treated Advanced Lung Adenocarcinoma: WJOG 5108L. *J Clin Oncol* 34:3248-57, 2016
71. Park K, Tan EH, O'Byrne K, et al: Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 17:577-89, 2016
72. Paz-Ares L, Tan EH, O'Byrne K, et al: Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol* 28:270-277, 2017
73. Wu YL, Cheng Y, Zhou X, et al: Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18:1454-1466, 2017
74. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al: Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J Clin Oncol* 36:2244-2250, 2018
75. Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC, et al: CNS Response to Osimertinib Versus Standard Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*:JCO2018783118, 2018
76. 日本肺癌学会ガイドライン検討委員会: 肺癌診療ガイドライン 2023 年版. <https://www.haigan.gr.jp/guideline/2023/>
77. Ramalingam SS, Gray JE, Ohe Y, et al: Osimertinib vs comparator EGFR-TKI as first-line treatment for EGFRm advanced NSCLC (FLAURA): Final overall survival analysis. *Ann Oncol* 30:v851-v934. , 2019
78. Seto T, Kato T, Nishio M, et al: Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 15:1236-44, 2014
79. Yamamoto N, Seto T, Nishio M, et al: Erlotinib plus bevacizumab vs erlotinib monotherapy as first-line treatment for advanced EGFR mutation-positive non-squamous non-small-cell lung cancer: Survival follow-up results of the randomized JO25567 study. *Lung Cancer* 151:20-24, 2021
80. Ichihara E, Hotta K, Nogami N, et al: Phase II trial of gefitinib in combination with bevacizumab as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with activating EGFR gene mutations: the Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1001. *J Thorac Oncol* 10:486-91, 2015
81. Cheng Y, Murakami H, Yang PC, et al: Randomized Phase II Trial of Gefitinib With and Without Pemetrexed as First-Line Therapy in Patients With Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer With Activating Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *J Clin Oncol* 34:3258-66, 2016
82. Sugawara S, Oizumi S, Minato K, et al: Randomized phase II study of concurrent versus sequential alternating gefitinib and

- chemotherapy in previously untreated non-small cell lung cancer with sensitive EGFR mutations: NEJ005/TCOG0902. *Ann Oncol* 26:888-94, 2015
83. Cortot AB, Madroszyk A, Giroux-Leprieur E, et al: First-Line Afatinib plus Cetuximab for EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Results from the Randomized Phase II IFCT-1503 ACE-Lung Study. *Clin Cancer Res* 27:4168-4176, 2021
84. Hosomi Y, Morita S, Sugawara S, et al: Gefitinib Alone Versus Gefitinib Plus Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer With Mutated Epidermal Growth Factor Receptor: NEJ009 Study. *J Clin Oncol* 38:115-123, 2020
85. Saito H, Fukuhara T, Furuya N, et al: Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 20:625-635, 2019
86. Kawashima Y, Fukuhara T, Saito H, et al: Bevacizumab plus erlotinib versus erlotinib alone in Japanese patients with advanced, metastatic, EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NEJ026): overall survival analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Respir Med*, 2021
87. Zhou Q, Xu CR, Cheng Y, et al: Bevacizumab plus erlotinib in Chinese patients with untreated, EGFR-mutated, advanced NSCLC (ARTEMIS-CTONG1509): A multicenter phase 3 study. *Cancer Cell* 39:1279-1291.e3, 2021
88. Nakagawa K, Garon EB, Seto T, et al: Ramucirumab plus erlotinib in patients with untreated, EGFR-mutated, advanced non-small-cell lung cancer (RELAY): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 20:1655-1669, 2019
89. Nishio M, Nishio K, Reck M, et al: RELAY+: Exploratory study of ramucirumab plus gefitinib in untreated patients (pts) with epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology* 38:9564-9564, 2020
90. Planchard D, Jänne PA, Cheng Y, et al. Osimertinib with or without Chemotherapy in EGFR Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med* 389:1935-1948, 2023
91. Cho BC, Felip E, Spira AI, et al. LBA14 Amivantamab plus lazertinib vs osimertinib as first-line treatment in patients with EGFR-mutated, advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Primary results from MARIPOSA, a phase III, global, randomized, controlled trial. *Ann Oncol* 34;Suppl 2:S1306, 2023
92. Wu YL, Tsuboi M, He J, et al: Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 383:1711-1723, 2020
93. Tsuboi M, Herbst RS, John T, et al. Overall Survival with Osimertinib in Resected EGFR-Mutated NSCLC. *N Engl J Med* 389:137-147, 2023
94. Garassino MC, Martelli O, Broggin M, et al: Erlotinib versus docetaxel as second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer and wild-type EGFR tumours (TAILOR): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 14:981-8, 2013
95. Kawaguchi T, Ando M, Asami K, et al: Randomized phase III trial of erlotinib versus docetaxel as second- or third-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: Docetaxel and Erlotinib Lung Cancer Trial (DELTA). *J Clin Oncol* 32:1902-8, 2014
96. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al: Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 19:2240-7, 2013
97. Campo M, Gerber D, Gainor JF, et al: Acquired Resistance to First-Line Afatinib and the Challenges of Prearranged Progression Biopsies. *J Thorac Oncol* 11:2022-2026, 2016
98. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al: Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 3:75ra26, 2011
99. Bean J, Brennan C, Shih JY, et al: MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20932-7, 2007
100. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al: MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316:1039-43, 2007
101. Yano S, Wang W, Li Q, et al: Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* 68:9479-87, 2008
102. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, et al: HER2 Amplification: A Potential Mechanism of Acquired Resistance to EGFR Inhibition in EGFR-Mutant Lung Cancers That Lack the Second-Site EGFR T790M Mutation. *Cancer Discov* 2:922-933, 2012
103. Cheung HW, Du J, Boehm JS, et al: Amplification of CRKL induces transformation and epidermal growth factor receptor inhibitor resistance in human non-small cell lung cancers. *Cancer Discov* 1:608-25, 2011
104. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, et al: Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2127-33, 2012
105. Ercan D, Xu C, Yanagita M, et al: Reactivation of ERK signaling causes resistance to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* 2:934-47, 2012
106. Sos ML, Koker M, Weir BA, et al: PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* 69:3256-61, 2009
107. Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, et al: Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* 70:8715-25, 2010

108. Lee JK, Lee J, Kim S, et al: Clonal History and Genetic Predictors of Transformation Into Small-Cell Carcinomas From Lung Adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 35:3065-3074, 2017
109. Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, et al: Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res* 30:2513-7, 2010
110. Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, et al: Acquired Resistance to EGFR Inhibitors Is Associated with a Manifestation of Stem Cell-like Properties in Cancer Cells. *Cancer Res* 73:3051-61, 2013
111. Vazquez-Martin A, Cufi S, Oliveras-Ferraros C, et al: IGF-1R/epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) crosstalk suppresses the erlotinib-sensitizing effect of EGFR exon 19 deletion mutations. *Sci Rep* 3:2560, 2013
112. Hashida S, Yamamoto H, Shien K, et al: Acquisition of cancer stem cell-like properties in non-small cell lung cancer with acquired resistance to afatinib. *Cancer Sci*, 2015
113. Zhang Z, Lee JC, Lin L, et al: Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet* 44:852-60, 2012
114. Huang S, Holzel M, Knijnenburg T, et al: MED12 Controls the Response to Multiple Cancer Drugs through Regulation of TGF-beta Receptor Signaling. *Cell* 151:937-50, 2012
115. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, et al: TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15535-40, 2010
116. Miller VA, Hirsh V, Cadrel J, et al: Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* 13:528-38, 2012
117. Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, et al: Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Sci Transl Med* 3:90ra59, 2011
118. Soria JC, Wu YL, Nakagawa K, et al: Gefitinib plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer after progression on first-line gefitinib (IMPRESS): a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 16:990-8, 2015
119. Mok TSK, Kim SW, Wu YL, et al: Gefitinib Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy in Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer Resistant to First-Line Gefitinib (IMPRESS): Overall Survival and Biomarker Analyses. *J Clin Oncol* 35:4027-4034, 2017
120. Park K, Yu CJ, Kim SW, et al: First-Line Erlotinib Therapy Until and Beyond Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Progression in Asian Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: The ASPIRATION Study. *JAMA Oncol* 2:305-12, 2016
121. Goto Y, Tanai C, Yoh K, et al: Continuing EGFR-TKI beyond radiological progression in patients with advanced or recurrent, EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: an observational study. *ESMO Open* 2:e000214, 2017
122. Park K, J-S L, Lee KH: BI 1482694(HM61713), an EGFR mutantspecific inhibitor, in T790M+ NSCLC; efficacy and safety at the RP2D. *ASCO Meeting Abstracts* 2016; 34(15_Suppl.):9055
123. Finlay MR, Anderton M, Ashton S, et al: Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor. *J Med Chem* 57:8249-67, 2014
124. Planchard D, Brown KH, Kim DW, et al: Osimertinib Western and Asian clinical pharmacokinetics in patients and healthy volunteers: implications for formulation, dose, and dosing frequency in pivotal clinical studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 77:767-76, 2016
125. Yang JC, Ahn MJ, Kim DW, et al: Osimertinib in Pretreated T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: AURA Study Phase II Extension Component. *J Clin Oncol* 35:1288-1296, 2017
126. Goss G, Tsai CM, Shepherd FA, et al: Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 17:1643-1652, 2016
127. Ahn MJ, Tsai CM, Shepherd FA, et al: Osimertinib in patients with T790M mutation-positive, advanced non-small cell lung cancer: Long-term follow-up from a pooled analysis of 2 phase 2 studies. *Cancer* 125:892-901, 2019
128. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al: Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 376:629-640, 2017
129. Fujita Y, Suda K, Kimura H, et al: Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. *J Thorac Oncol* 7:1640-4, 2012
130. Rosell R, Molina MA, Costa C, et al: Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* 17:1160-8, 2011
131. Yu HA, Arcila ME, Hellmann MD, et al: Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann Oncol* 25:423-8, 2014
132. Ding D, Yu Y, Li Z, et al: The predictive role of pretreatment epidermal growth factor receptor T790M mutation on the progression-free survival of tyrosine-kinase inhibitor-treated non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 7:387-93, 2014
133. Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, et al: The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. *Clin Cancer Res* 20:2001-10, 2014

134. Watanabe M, Kawaguchi T, Isa S, et al: Ultra-Sensitive Detection of the Pretreatment EGFR T790M Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with an EGFR-Activating Mutation Using Droplet Digital PCR. *Clin Cancer Res* 21:3552-60, 2015
135. Zhao J, Feng HH, Zhao JY, et al: A sensitive and practical method to detect the T790M mutation in the epidermal growth factor receptor. *Oncol Lett* 11:2573-2579, 2016
136. Liu Y, Sun L, Xiong ZC, et al: Meta-analysis of the impact of de novo and acquired EGFR T790M mutations on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer receiving EGFR-TKIs. *Onco Targets Ther* 10:2267-2279, 2017
137. Ramalingam SS, Yang JC, Lee CK, et al: Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 36:841-849, 2018
138. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al: Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med* 382:41-50, 2020
139. Iuchi T, Shingyoji M, Itakura M, et al: Frequency of brain metastases in non-small-cell lung cancer, and their association with epidermal growth factor receptor mutations. *Int J Clin Oncol* 20:674-9, 2015
140. Porta R, Sanchez-Torres JM, Paz-Ares L, et al: Brain metastases from lung cancer responding to erlotinib: the importance of EGFR mutation. *Eur Respir J* 37:624-31, 2011
141. Schuler M, Wu YL, Hirsh V, et al: First-Line Afatinib versus Chemotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Common Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations and Brain Metastases. *J Thorac Oncol* 11:380-90, 2016
142. Ballard P, Yates JW, Yang Z, et al: Preclinical Comparison of Osimertinib with Other EGFR-TKIs in EGFR-Mutant NSCLC Brain Metastases Models, and Early Evidence of Clinical Brain Metastases Activity. *Clin Cancer Res* 22:5130-5140, 2016
143. Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, et al: CNS Efficacy of Osimertinib in Patients With T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Data From a Randomized Phase III Trial (AURA3). *J Clin Oncol* 36:2702-2709, 2018
144. Ahn MJ, Chiu CH, Cheng Y, et al: Osimertinib for patients with leptomeningeal metastases associated with epidermal growth factor receptor T790M positive advanced NSCLC: the AURA LM analysis. *J Thorac Oncol*, 2019
145. Yang JCH, Kim SW, Kim DW, et al: Osimertinib in Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer and Leptomeningeal Metastases: The BLOOM Study. *J Clin Oncol*:JCO1900457, 2019
146. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, et al: Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med*, 2015
147. Ercan D, Choi HG, Yun CH, et al: EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res* 21:3913-23, 2015
148. Ou SI, Agarwal N, Ali SM: High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression. *Lung Cancer* 98:59-61, 2016
149. Planchard D, Loriot Y, Andre F, et al: EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol* 26:2073-8, 2015
150. Ho CC, Liao WY, Lin CA, et al: Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Osimertinib. *J Thorac Oncol* 12:567-572, 2017
151. Bearz A, De Carlo E, Doliana R, et al: Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Thorac Oncol* 12:e181-e182, 2017
152. Ahn S, Hwang SH, Han J, et al: Transformation to Small Cell Lung Cancer of Pulmonary Adenocarcinoma: Clinicopathologic Analysis of Six Cases. *J Pathol Transl Med* 50:258-63, 2016
153. Fu K, Xie F, Wang F, Fu L. Therapeutic strategies for EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients with osimertinib resistance. *J Hematol Oncol* 15:173, 2022
154. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, et al: Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncol* 4:1527-1534, 2018
155. Chmielecki J, Gray JE, Cheng Y, et al: Candidate mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib in EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer. *Nat Commun* 14:1070, 2023
156. Lisberg A, Cummings A, Goldman JW, et al: A Phase II Study of Pembrolizumab in EGFR-Mutant, PD-L1+, Tyrosine Kinase Inhibitor Naive Patients With Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol* 13:1138-1145, 2018
157. Lee CK, Man J, Lord S, et al: Checkpoint Inhibitors in Metastatic EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer-A Meta-Analysis. *J Thorac Oncol* 12:403-407, 2017
158. Liang H, Liu X, Wang M: Immunotherapy combined with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer treatment. *Onco Targets Ther* 11:6189-6196, 2018
159. Reck M, Mok TSK, Nishio M, et al: Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer (IMpower150): key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Respir Med* 7:387-401, 2019
160. Nogami N, Barlesi F, Socinski MA, et al. IMpower150 Final Exploratory Analyses for Atezolizumab Plus Bevacizumab and Chemotherapy in Key NSCLC Patient Subgroups With EGFR Mutations or Metastases in the Liver or Brain. *J Thorac Oncol* 17:309-323, 2022
161. Park S, Kim TM, Han JY, et al. A Phase 3, Randomized study of atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in patients with EGFR or ALK mutated in non-small cell lung cancer (ATLAS, KCSG-LU19-04). *J Clin Oncol* 101200JCO2301891, 2023

162. Passaro A, Wang J, Wang Y, et al. Amivantamab plus chemotherapy with and without lazertinib in EGFR-mutant advanced NSCLC after disease progression on osimertinib: primary results from the phase III MARIPOSA-2 study. *Ann Oncol* 50923-7534(23)04281-3, 2023
163. Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, et al: Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 65:9176-84, 2005
164. Zhou BB, Peyton M, He B, et al: Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* 10:39-50, 2006
165. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 97:643-55, 2005
166. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al: Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353:133-44, 2005
167. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., et al: Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24:5034-42, 2006
168. Yatabe Y, Takahashi T, Mitsudomi T: Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Res* 68:2106-11, 2008
169. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al: Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 29:2866-74, 2011
170. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, et al: Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 23:5007-18, 2005
171. Engelman JA, Janne PA, Mermel C, et al: ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3788-93, 2005
172. Kim Y, Lee B, Shim JH, et al. Concurrent Genetic Alterations Predict the Progression to Target Therapy in EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol* 14:193-202, 2019
173. Yu HA, Suzawa K, Jordan E, et al. Concurrent Alterations in EGFR-Mutant Lung Cancers Associated with Resistance to EGFR Kinase Inhibitors and Characterization of MTOR as a Mediator of Resistance. *Clin Cancer Res* 24:3108-3118, 2018
174. Blakely CM, Watkins TBK, Wu W, et al. Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat Genet* 49:1693-1704, 2017
175. Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, et al: Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 96:1133-41, 2004
176. Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, et al: Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 66:944-50, 2006
177. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, et al: A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* 18:521-8, 2012
178. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T: Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 29:2972-7, 2011
179. Nahar R, Zhai W, Zhang T, et al: Elucidating the genomic architecture of Asian EGFR-mutant lung adenocarcinoma through multi-region exome sequencing. *Nat Commun* 9:216, 2018
180. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al: Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 8:823-59, 2013
181. Tan DS, Yom SS, Tsao MS, et al: The International Association for the Study of Lung Cancer Consensus Statement on Optimizing Management of EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Status in 2016. *J Thorac Oncol* 11:946-63, 2016
182. Mok TS, Carbone DP, Hirsch FR: IASLC ATLAS OF EGFR TESTING IN LUNG CANCER. An IASLC publication (<https://www.iaslc.org/publications/iaslc-atlas-egfr-testing-lung-cancer>), 2017
183. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al: Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 13:323-358, 2018
184. Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B, et al: Comparison of molecular testing methods for the detection of EGFR mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 66:381-5, 2013
185. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, et al: Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res* 17:1169-80, 2011
186. Sherwood JL, Muller S, Orr MC, et al: Panel based MALDI-TOF tumour profiling is a sensitive method for detecting mutations in clinical non small cell lung cancer tumour. *PLoS One* 9:e100566, 2014
187. Young EC, Owens MM, Adebiyi I, et al: A comparison of methods for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer. *Diagn Mol Pathol* 22:190-5, 2013

188. Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, et al: Rapid targeted mutational analysis of human tumours: a clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med* 2:146-58, 2010
189. Janne PA, Borrás AM, Kuang Y, et al: A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res* 12:751-8, 2006
190. Uchida J, Kato K, Kukita Y, et al: Diagnostic Accuracy of Noninvasive Genotyping of EGFR in Lung Cancer Patients by Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA. *Clin Chem* 61:1191-6, 2015
191. Forsheo T, Murtaza M, Parkinson C, et al: Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4:136ra68, 2012
192. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al: Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 17:7808-15, 2011
193. Newman AM, Bratman SV, To J, et al: An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20:548-54, 2014
194. 柳原玲子(PMDA): コンパニオン診断薬等 (CDx) に対する 新たな規制上の取扱い案について . <https://www.pmda.go.jp/files/000233040.pdf>, 2019
195. Nosaki K, Satouchi M, Kurata T, et al: Re-biopsy status among non-small cell lung cancer patients in Japan:A retrospective study. *Lung Cancer* 100:1-8, 2016
196. Kanai, K., Yamamoto N, Nogami N, et al: A prospective study of molecular testing status in the EGFR mutation positive NSCLC patients with disease progression during EGFR TKI treatment (REMEDY study) *J Thorac Oncol* 13:S82-S83, 2018
197. Qiu M, Wang J, Xu Y, et al: Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24:206-12, 2015
198. Wu YL, Zhou C, Liang CK, et al: First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol* 26:1883-9, 2015
199. Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M, et al: Monitoring EGFR T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Sci* 107:162-7, 2016
200. Zheng D, Ye X, Zhang MZ, et al: Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Sci Rep* 6:20913, 2016
201. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al: Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 2016
202. Sakai K, Takahama T, Shimokawa M, et al: Predicting osimertinib-treatment outcomes through EGFR mutant-fraction monitoring in the circulating tumor DNA of EGFR T790M-positive patients with non-small cell lung cancer (WJOG8815L). *Mol Oncol* 15:126-137, 2021.
203. Yatabe Y, Kerr KM, Utomo A, et al: EGFR mutation testing practices within the Asia Pacific region: results of a multicenter diagnostic survey. *J Thorac Oncol* 10:438-45, 2015
204. Shiao CJ, Babwah JP, da Cunha Santos G, et al: Sample features associated with success rates in population-based EGFR mutation testing. *J Thorac Oncol* 9:947-56, 2014
205. Leary AF, Castro DG, Nicholson AG, et al: Establishing an EGFR mutation screening service for non-small cell lung cancer - sample quality criteria and candidate histological predictors. *Eur J Cancer* 48:61-7, 2012
206. Hlinkova K, Babal P, Berzinec P, et al: Evaluation of 2-year experience with EGFR mutation analysis of small diagnostic samples. *Diagn Mol Pathol* 22:70-5, 2013
207. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, et al: The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 76:1-18, 2012
208. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118-45, 2007
209. 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/genome_med/pdf/textbook.pdf, 2018
210. Hubers AJ, Heideman DA, Yatabe Y, et al: EGFR mutation analysis in sputum of lung cancer patients: a multitechnique study. *Lung Cancer* 82:38-43, 2013
211. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al: Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 36:1631-1641, 2018
212. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al: Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Arch Pathol Lab Med* 142:1242-1253, 2018

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-2. ALK

(2024年4月改訂版)

目次

はじめに.....	3
(1) ALK 融合遺伝子肺癌.....	3
(2) ALK 融合遺伝子のメカニズム.....	4
(3) ALK 融合遺伝子肺癌の臨床病理学的特徴.....	5
(4) ALK 阻害薬の臨床試験.....	6
1. クリゾチニブ.....	6
2. アレクチニブ.....	8
3. セリチニブ.....	9
4. ロルラチニブ.....	10
5. プリグチニブ.....	12
(5) 薬剤耐性変異.....	14
(6) ALK 融合遺伝子の診断.....	14
1. FISH 法.....	14
1-1. FISH のための検体.....	15
2. RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) 法.....	16
2-1. RT-PCR の検査.....	16
2-2. RT-PCR の検体.....	16
3. IHC 法.....	17
3-1. 検体.....	17
3-2. 抗原賦活処理.....	17
3-3. 検出キットによる違い.....	17
3-4. 検出法 (増感法).....	17
4. NGS 法.....	17
5. 標本の選択.....	18
5-1. セルブロック作製の推奨.....	18
(7) 結果の報告.....	22

解析前セクション.....	22
解析セクション.....	22
結果セクション.....	22
解釈/結論.....	23
(8) ALK 遺伝子検査のアルゴリズム(図 11).....	23
(9) ALK 検査の保険適用.....	24
(10) おわりに・・・実地診療と ALK.....	25
参考文献.....	26
追補 1.改定版 CAP/IASLC/AMP チロシンキナーゼ阻害薬標的治療の患者選択のための遺伝子検査ガイドライン.....	29
追補 2. ASCO Endorsement of CAP/IASLC/AMP Guideline.....	31

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

朝重 耕一, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗 淳一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

はじめに

EML4-ALK 融合遺伝子は自治医大の曾田、間野らによって 2007 年に初めて報告された¹。*ALK* 融合遺伝子は、非小細胞肺癌の約 3-5%に認められ、非小細胞肺癌の中でも腺癌に特異的にみられる。

クリゾチニブが *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対する治療薬として初めて承認された *ALK* 阻害薬であり²、米国では 2011 年に、わが国では 2012 年に承認された。その後、第二世代 *ALK* 阻害薬として 2014 年にアレクチニブ、2016 年にセリチニブが承認され、第三世代 *ALK* 阻害薬として 2018 年にロルラチニブ、2021 年にブリグチニブが承認され、現在 5 種類の *ALK* 阻害薬を用いることが可能となった。これらの分子標的薬は従来の標準化学療法と比べ劇的な治療成績の向上をもたらした。しかしながら、*ALK* 融合遺伝子陽性肺癌を適正に取り扱うためには様々な注意が必要である。

本稿では *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌の診療、特に *ALK* 融合遺伝子の診断にあたっての注意を中心に第 1 版 (2011 年)、第 2 版 (2015 年)、第 3 版 (2019 年)、第 4 版 (2021 年) に続いて、最新の知見を第 5 版としてまとめた。なお、*ALK* 阻害薬とそのコンパニオン診断薬に関する情報は頻繁に更新されるため、最新の情報については PMDA ホームページ*を参照頂きたい。

* (<https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/review-information/cd/0001.html>)

(1) *ALK* 融合遺伝子肺癌

2007 年に自治医大の曾田、間野らのグループは軽度喫煙歴のある男性肺癌の cDNA 発現ライブラリーをマウス 3T3 線維芽細胞にトランスフェクションシフォーカス形成を指標にトランスフォーミング活性をもつ遺伝子を回収するという、1980 年代に *RAS* 遺伝子をクローニングした方法を改良した方法で *EMK4-ALK* 融合遺伝子を同定

した¹。これはともに第二染色体短腕に逆向きに存在する *EML4* (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) 遺伝子と *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) 遺伝子が小さな逆位を形成することで互いに同じ向きに融合したものである(図 1)^a。

受容体型チロシンキナーゼである *ALK* はリガンド結合によって二量体化し活性化するが、この遺伝子転座が起こると *ALK* に結合した coiled-coil ドメインによってリガンド結合なしに恒常的に二量体化し活性化すると考えられている³。遺伝子の転座は血液腫瘍ではよく知られた癌遺伝子の活性化メカニズムであるが、上皮性の固形腫瘍では稀であると考えられていたのでその意味でも重要な発見といえる。一方、Cell Signaling Technology のグループは肺癌細胞内のリン酸化チロシンを系統的にマスマスペクトロメトリーで解析する方法でまったく独立して *ALK* の活性化を発見した⁴。*EML4-ALK* のトランスジェニックマウスでは生後数週のうちに数百個の肺腫瘍を形成するが、*ALK* のチロシンキナーゼ阻害薬を投与すると急速な腫瘍消退が観察された⁵。

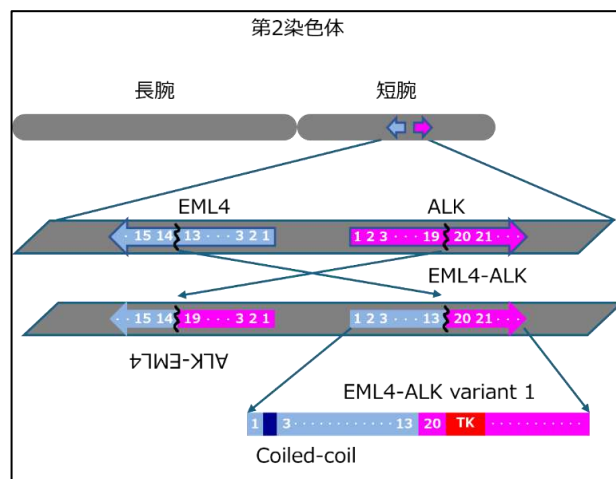


図 1. *EML4-ALK* variant 1 のメカニズム
染色体短腕上で、*EML4* と *ALK* 遺伝子内の切断点で、逆向に回転するようにして再結合することで、*EML4-ALK* と *ALK-EML4* が形成される。*EML4* の二量体化に必要な coiled-coil domain, *ALK* のチロシンキナーゼドメインをとともにもつ *EML4-ALK* のみが活性があると考えられる。

^a *EML4* 遺伝子と *ALK* 遺伝子の rearrangement(遺伝子再構成)あるいは translocation(転座)によって両者の融合遺伝子(fusion gene)が形成される。その結果両者が融合したタンパクが発現される。このとき *ALK* タンパクの発現量は正常より増加し、検出できるようになることが多い。また、この転座は突然変異ともいえる。

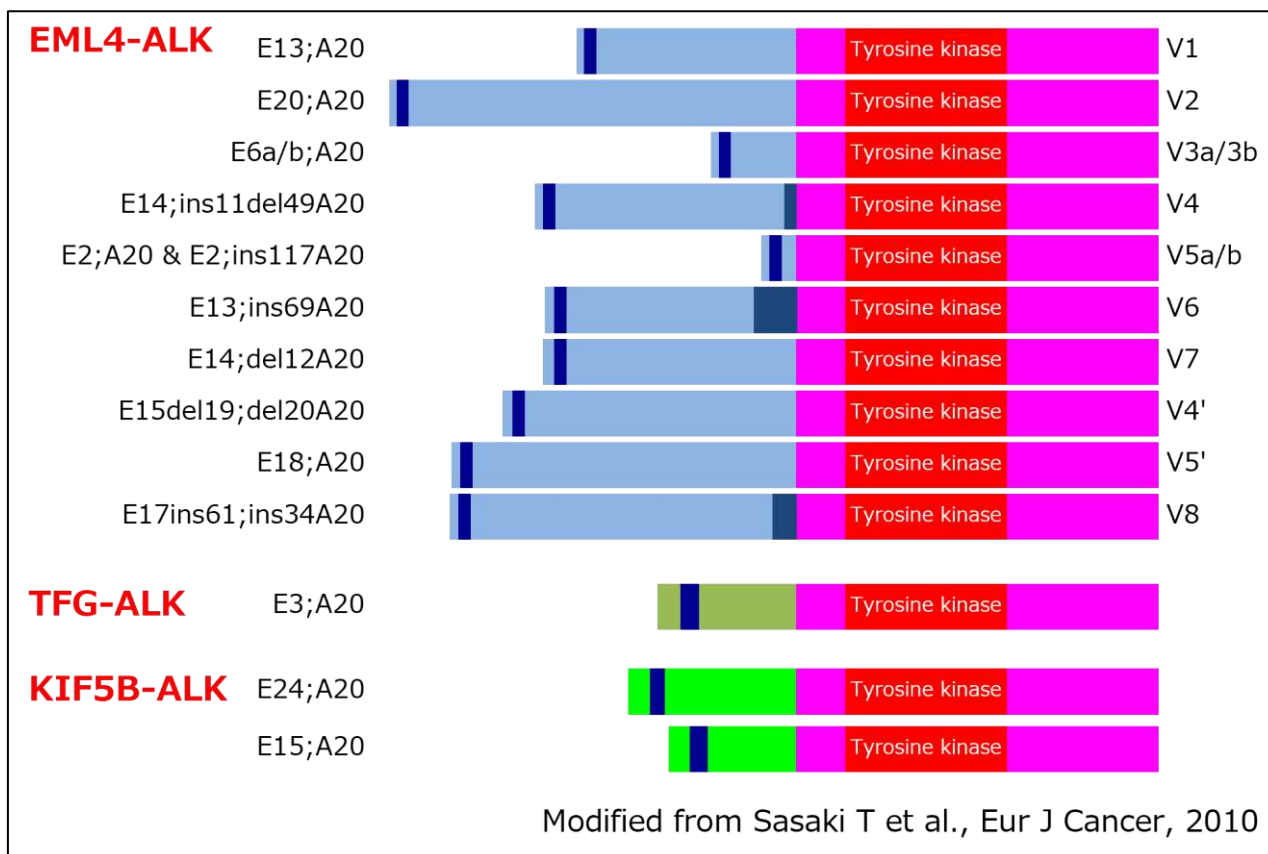


図2. 肺癌にみられる ALK 融合遺伝子 (Sasaki T ら. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. Eur J Cancer 2010; 46: 1773-80.より改変)
Reproduced with permission from Elsevier (2021)

(2) ALK 融合遺伝子のメカニズム

ALK 融合遺伝子はもともと anaplastic lymphoma において、次いで inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) (炎症性筋線維芽細胞性腫瘍)^b において報告された。これらの場合、転座の相手方の遺伝子は *EML4* ではなく、リンパ腫の場合 *NPM*, *TPM3*, *TFG*, *ATIC*, *CLTC1*, *MSN*, *TPM4*, *ALO17*, *MYH9* など、IMT の場合 *TPM4*, *RANBP2*, *CARS*, *SEC31L1* である⁶。ALK 融合遺伝子は ALK 側のエクソン 20 以降 (チロシンキナーゼドメインの上流) と融合タンパクを作っていることが多く、イントロン 19 上の脆弱部位が想定されている。

一方、転座の相手方である *NPM*, *TPM3*, *EML4* はすべてオリゴマー化ドメインあるいは coiled-coil ドメインを持っており、これらが ALK と融合することで、リガンド

の結合がなくても恒常的な ALK の二量体化をきたすことで活性化されてがん化キナーゼになる。

一方、別の ALK の活性化メカニズムとして、*EGFR* 遺伝子変異のような、ALK 遺伝子のキナーゼドメインの点突然変異が神経芽細胞腫で報告されている。

EML4-ALK は肺癌特異的であり他の腫瘍では報告がないが、10 種類以上の variant があることが明らかとなっている(図2)。トランスフォーム活性には *EML4* の N 末端側の coiled-coil ドメインと ALK エクソン 20 のキナーゼドメインは必須であり、すべての variant はこれをもっている。なかには 10-70 塩基の欠失や挿入を伴っているものもある。この中では特に、*EML4* エクソン 13 と ALK エクソン 20 の融合 (variant 1)、*EML4* エクソン 6 と ALK エクソン 20 の融合 (variant 3a/b) の二種がそれぞれ 30%程度で最も多い(図3)。

^b IMT は、主として、筋線維芽細胞の特徴を示す紡錘形細胞の増殖からなり、リンパ球や形質細胞を主とする炎症細胞浸潤を伴う稀な腫瘍である。原発巣としては、肺が最も多く、次いで腸間膜・腹腔内臓器 (肝・胃・腸・膀胱など)・頭部・四肢などと多岐にわたる。(Coffin C M, Watterson J, Priest J R, et al: Extrapulmonary inflammatory myofibroblastic tumor (inflammatory pseudotumor); A clinicopathologic and immunohistochemical study of 84 cases. Am J Surg Pathol 19: 859-872, 1995)

竹内らは高感度免疫組織化学法にて陽性を示した肺癌検体から新たな ALK 融合遺伝子を見いだした。この場合 *KIF5B* 遺伝子のエクソン 24 が ALK のエクソン 20 と融合していた⁷。*KIF5B* のエクソン 15 と融合する例も報告された⁸。*KIF5B* は細胞内小器官の運搬に関するタンパクであるが、これも二量体化ドメインをもっており、よって *EML4-ALK* と同様に二量体化することで ALK のキナーゼが活性化されると考えられている。

Cell Signaling Technology のグループはチロシンリン酸化を受けているタンパクを、免疫沈降とマスペクトロメトリーを組み合わせて、41 の肺癌細胞株、150 以上の肺癌検体を用いて網羅的に検索した⁴。その結果、1 例の細胞株 H2228 と 3 例の臨床検体において ALK リン酸化が亢進しており、3 例から *EML4-ALK* (E6;A20 と E13;A20) を同定した。もう一例は *TFG* 遺伝子 (*TRK* fused gene) のエクソン 3 と転座していたが、これはリンパ腫において以前同定されていたものと同じ融合であった。*TFG* も coiled-coil ドメインを有している。

(3) ALK 融合遺伝子肺癌の臨床病理学的特徴

ALK 融合遺伝子を有する肺癌の特徴について表 1 にまとめた。非小細胞肺癌全体では 2-5% 程度である。組織型では圧倒的に腺癌に多く、腺癌での頻度は 4-5% 程度であり、他の組織型では例外的である。ただし、後述するように、充実型腺癌では胞体の形状が扁平上皮癌に類似する症例もあり、免疫組織学的に確認された腺癌か留意して解釈する必要がある⁹。最初に報告された症例は喫煙者であつ

たが、後の報告では非喫煙者により頻度が高いことが確認されている。また、*EGFR* 遺伝子変異にみられるような人種差はないようである(表 1)。年齢では若年者に多い傾向にあり ALK 肺癌の平均年齢は 50 代半ばとするものが多く、ALK 融合遺伝子を有しない肺癌より 10 歳程度若年である。性差は明らかではないが、非喫煙者の数を反映してかやや女性に多い。

しかしながら、重要な点として ALK 融合遺伝子は喫煙者や高齢者の肺癌でもしばしば検出される。そのため、このような臨床背景のみで ALK 融合遺伝子の存在を確実に予測あるいは否定することは不可能である。すなわち検査を行うまでは不明であるというスタンスが必要である。これは CAP/IASLC/AMP ガイドラインでも述べられている¹⁰。

一方、ALK 融合遺伝子は肺腺癌に主にみられる他の *EGFR*、*KRAS*、*HER2* の遺伝子変異とは相互に排他的な関

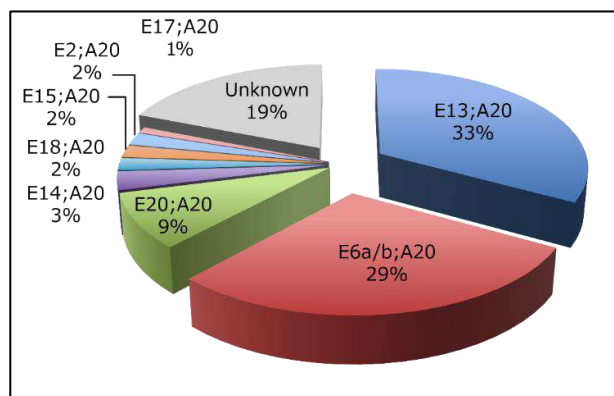


図 3. 肺癌における *EML4-ALK* 融合遺伝子パターン別頻度 (Sasaki T ら. The biology and treatment of *EML4-ALK* non-small cell lung cancer. Eur J Cancer 2010; 46: 1773-80. より改変) Reproduced with permission from Elsevier (2021)

表 1. 種々の臨床病理学的因子と ALK 遺伝子転座の関連

報告者	Journal	年	全体		組織型		喫煙歴		年齢		性別	
			症例数	ALK+	腺癌	非腺癌	非喫煙者	喫煙者	ALK(+)	ALK(-)	女性	男性
Soda	Nature	2007	75	5(7%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Rikova	Cell	2007	103	4(4%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Shinmura	Lung Cancer	2008	77	2(3%)	2/50(4%)	0/27	0/22(0%)	2/41(5%)	53	66	1/39(2.5%)	1/38(2.5%)
Perner	Neoplasia	2008	603	16(3%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Koivunen	CCR	2008	306	6(2%)	8/208(4%)	0/97	4/69(6%)	2/184(1%)	55.9	61.9	5/124(4%)	3/187(2%)
Wong	Cancer	2009	266	13(5%)	11/209(5%)	2/12*	10/127	1/82	59(52-65)	64(55-71)	8/134	5/132
Boland	Hum Pathol	2009	335	6(2%)	N/A	N/A	N/A	N/A	69.8	69.6	N/A	N/A
Martelli	Am J pathol	2009	120	9(8%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Rodig	CCR	2009	358	20(6%)	20/358(6%)	—	14/95(15%)	6/243(2%)	51(29-76)	66(29-90)	9/220(4%)	11/138(8%)
Shaw*	JCO	2009	141	19(13%)	18/130(14%)	1/11(9%)	19/85(22%)	0/57(0%)	52(29-76)	65(29-90)	8/85(9%)	11/38(29%)
Inamura	Mod Pathol	2009	363	11(3%)	11/253(4%)	0/110	6/105(6%)腺癌	5/147(3%)腺癌	56±11	64±9	5/134(4%)腺癌	6/119(5%)腺癌
Takahashi	Ann Surg	2010	211	5(2%)	5/211(2%)	0/102	4/92(4%)	1/118(1%)	70.0±9.7	65.2 ± 10.1	4/100(4%)	1/111(1%)
Paik	JTO	2011	640	28(4%)	27/450(6%)	1/190(1%)	16/275(6%)	12/365(3%)	N/A	N/A	14/226(6%)	14/414(3%)
Yatabe	unpublished	2011	831	31(4%)	31/730(4%)	1/100(1%)	21/364(6%)	6/379(2%)	57±9.9	65 ± 9.5	20/382(5%)	11/447(2%)
Total			4429	175(4%)	133/2699(5%)	5/649(1%)	94/1234(8%)	34/1626(1%)	N/A	N/A	74/1444(5%)	63/1624(4%)

*臨床病理学的因子で選択した症例

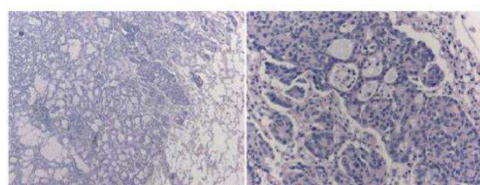
係があることが繰り返し示されており、他の遺伝子変異がすでに検出されていればその症例における ALK 融合遺伝子の検出の可能性はほとんどないと考えてよいであろう。ただし、これは治療前の場合であり、ALK 阻害薬の耐性機序として、ALK 遺伝子増幅や、EGFR 遺伝子変異や KRAS 遺伝子変異の獲得などの報告もある¹¹。

病理組織学的にも特徴があることが知られており、Inamura らは EML4-ALK 肺癌の 11 例のうち 6 例で acinartype が優勢であることを報告した。ちなみに他の 5 例は papillary 優勢であった（WHO 分類では 4 例が acinar、2 例が papillary、5 例が mixed であった）¹²。11 例全例は Thyroidtranscriptionfactor-1 (TTF-1) 陽性であり、cellineage 的には EGFR 遺伝子変異の多い、末梢肺由来の細胞に由来すると考えられる。また、Rodig らは優勢なパターンが細気管支肺胞上皮癌 (BAC)、acinar、papillary、solid のうちの ALK 肺癌の割合は 1/22、4/124、0/46、11/134 と solidtype に多いと報告している¹³。細胞レベルでは細胞内に豊富なムチンを有し核が偏在しているいわゆる印環細胞 (signetringcell) を有する症例が ALK 肺癌の 82% を占めていた。すなわち、腺癌症例を印環細胞がない、10% 以下、10% 以上での ALK 融合遺伝子の頻度はそれぞれ、3/295、2/21、12/26 であった¹³。図 4 に ALK 肺癌の典型的な組織像を示す。

(4) ALK 阻害薬の臨床試験

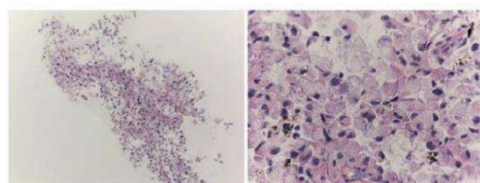
現在本邦で使用可能な ALK 阻害薬は第一世代のクリゾチニブ、第二世代のアレクチニブ、セリチニブ、第三世代のロルラチニブ、ブリグチニブなどの複数の薬剤が上市されている。

本項ではそれぞれの薬剤の臨床試験につき記載する。



腺房・充実型腺癌
(篩状・cribriformパターン)

68歳女性
切除肺
遺伝子変異: pT1N0M0
p53, H175R,
EGFR, wild type;
KRAS, wild type;
ALK, variant 1



印環細胞癌

47歳女性
経皮針生検
遺伝子変異: cT3N2M0,
p53, Y200C,
EGFR, wild type;
KRAS wild type;
ALK, variant 1

図4. ALK 融合遺伝子陽性肺癌の組織像
ALK 陽性肺癌では、特徴的な篩状パターンを示す腺癌が多いとされる。これらのパターンは腺癌組織分類で腺房型腺癌や充実型腺癌に分類される。また、印環細胞癌の形態を示す腺癌においても ALK 融合遺伝子を有することが多いが、この成分は部分的にみられることがほとんどである。

1. クリゾチニブ

クリゾチニブ (ザーコリ®) は、ALK と c-MET, ROS-1 などのチロシンキナーゼを阻害するマルチキナーゼ阻害薬であり、もともと MET 阻害薬として開発されていた。First-in-human の第 I 相試験はまず患者選択を行わない固形癌患者で 2006 年から Part1 の用量漸増試験が行われたが、ALK や MET の活性化がある患者を prescreening するようにプロトコール改正がなされ、Part2 では 250mg 1 日 2 回内服の推奨用量で、ALK か MET の活性化を有する症例を対象に molecularly defined expansion cohort が行われた。また非小細胞肺癌での ALK 転座が報告され、用量漸増試験中に 2 例の ALK 融合遺伝子陽性腫瘍 (ALK 転座を有する Inflammatory myofibroblastic tumor と EML4-ALK 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌) での良好な効果が確認された後、ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する expanded cohort が 2008 年に追加された。ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する抗腫瘍効果は最初の 19 例の preliminary な結果を 2009 年の米国臨床腫瘍学会、次いで 2010 年の New England Journal of Medicine 誌でこの ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する第 II 相部分というべき試験 (Profile1001) の結果が報告された²。さらに、その Update された結果は 2012 年の The Lancet Oncology 誌で報告されている¹⁴ので、この結果を以下に紹介する。

Profile1001 の ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する Expanded cohort には、FISH 法により診断された 149 例の ALK 融合遺伝子陽性肺癌が登録された。登録症例は非喫煙者が 71%、腺癌が 97% を占めており、84% は前治療を受けていた。

143例で抗腫瘍効果の判定が可能であり、3例のCRを含め87例が奏効し、奏効率は60.8%であった。投与後8週、16週での病勢制御率はそれぞれ82.5%、70.6%であった。無増悪生存期間(PFS)中央値は9.7ヶ月(95%信頼区間(CI); 7.7-12.8ヶ月)。6カ月、12カ月時点での生存率はそれぞれ、87.9%(95%CI; 81.3-92.3)、74.8%(95%CI; 66.4-92.3)であった。144例(97%)に有害事象が認められたが、多くはGrade 1/2であり、20%以上の発現率の副作用は視覚障害(残像など)(96例, 64%)、悪心(84例, 56%)、下痢(74例, 50%)、嘔吐(58例, 39%)、末梢性浮腫(44例, 30%)、便秘(41例, 28%)、眩暈(31例, 21%)であった。Grade 3/4の有害事象は36例に認められた(好中球減少9例、ALT上昇6例、低リン血症6例、リンパ球減少6例、AST上昇5例、肺臓炎3例<うちGrade 4が1例>など)。また、この試験ではRECISTで病勢進行(PD)となった後にも臨床的に利益があると判断されれば継続投与が可能となっており、主治医判定でPDとなった69例中39例はPD後2週間を超えてクリゾチニブを継続投与しており、うち12例はPD判定後6カ月を超えて継続投与を行っていた¹⁴。

この良好な成績を受けて、2011年8月に米国で承認され、本邦では2012年3月30日に「ALK融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」を効果・効能として承認され、同5月より販売され実臨床に導入されている。

ALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌に対するクリゾチニブの第Ⅲ相試験は二次治療でクリゾチニブとペメトレキセドまたはドセタキセルを比較するProfile1007試験¹⁵と一次治療でクリゾチニブとシスプラチンもしくはカルボプラチン+ペメトレキセドを比較するProfile1014試験¹⁶が行われ、その結果は1007試験については2013年に、1014試験については2014年にそれぞれNew England Journal of Medicine誌に報告されている。

1007試験ではFISH法によりALK融合遺伝子陽性と診断され、プラチナ併用療法による一次治療後に再発した347例が登録され、化学療法群(ペメトレキセド500mg/m², day1点滴静注・3週サイクル、もしくはドセタキセル75mg/m², day1点滴静注・3週サイクル)あ

るいはクリゾチニブ群(クリゾチニブ250mg 1日2回内服)に1:1で割り付けられた。化学療法群に割り付けられた場合、ペメトレキセドを未使用もしくは扁平上皮癌が優勢な組織型でなければペメトレキセドを用いる事とされており、また化学療法群に割り付けられた場合はPDとなった後に別の第Ⅱ相試験(Profile1005)に組み入れてクリゾチニブを投与するcrossoverが許容されていた。主評価項目はPFSであり、副次評価項目は全生存期間(OS)、奏効率、安全性、患者報告アウトカムであった。

PFS中央値はクリゾチニブ群で7.7ヶ月(95%CI: 6.0-8.8)、化学療法群は5ヶ月(95%CI: 2.6-4.3)であり、有意にクリゾチニブ群で延長していた(hazard ratio (HR)=0.49, 95%CI: 0.37-0.64, p<0.001)。

奏効率はクリゾチニブ群で65%、化学療法群で20%であり、クリゾチニブ群で有意に高かった(p<0.001)。化学療法群の中ではドセタキセルの奏効率が7%(95%CI; 2-16)、ペメトレキセドでは29%(95%CI; 21-39)であった。最終解析に必要なeventの40%の時点で行われたOSの中間解析では、クリゾチニブ群の生存期間中央値が20.3ヶ月(95%CI; 18.1-not reached)、化学療法群で22.8ヶ月(95%CI; 18.1-not reached)でありHRは1.02(95%CI; 0.68-1.54, p=0.54)と有意差を認めなかった。肺癌に関連する症状とQOLに関する患者報告アウトカムではクリゾチニブ群で化学療法群より大きな改善が認められた¹⁵。

1014試験ではFISHにより診断されたALK融合遺伝子陽性の進行期非扁平上皮非小細胞肺癌で化学療法未施行の343例がクリゾチニブ群(クリゾチニブ250mg 1日2回内服)あるいは化学療法群(シスプラチン<75mg/m², day1>もしくはカルボプラチン<AUC=5-6>+ペメトレキセド<500mg/m², day1>点滴静注・3週サイクル)に1:1で割り付けられた。主評価項目はPFSであり、副次評価項目はOS、奏効率、安全性、患者報告アウトカムであった。

PFS中央値はクリゾチニブ群で10.9ヶ月(95%CI: 8.3-13.9)、化学療法群は7.0ヶ月(95%CI: 6.8-8.2)であり、有意にクリゾチニブ群で延長していた(hazard ratio (HR)=0.45, 95%CI; 0.35-0.60, p<0.001)。

奏効率はクリゾチニブ群で 74%(95%CI : 67-81)、化学療法群で 45%(95%CI : 37-53)とクリゾチニブ群で有意に高かった($p < 0.001$)。PFS 解析時点での OS は event 数が 29%と immature であり、生存期間中央値には両群共に達しておらず、HR=0.82(95%CI; 0.54-1.26, $p=0.36$)と有意差はなかった。1 年生存率はクリゾチニブ群で 84%、化学療法群で 79%であった。有害事象に関してはクリゾチニブ群では視覚障害、下痢、悪心、浮腫が、化学療法群では悪心、倦怠感、嘔吐、食思不振が多く認められた。肺癌に関連する症状と QOL に関する患者報告アウトカムではクリゾチニブ群で化学療法群より大きな改善が認められた¹⁶。これらの試験結果から、クリゾチニブは ALK 融合遺伝子陽性肺癌において、初回治療および二次治療における標準治療に位置づけられた。本試験の Update データは 2018 年の Journal of Clinical Oncology 誌で報告されている¹⁷。Median follow up は 46 カ月であり、化学療法群の 84.2%はクリゾチニブの投与を受けていた。OS 中央値はクリゾチニブ群で not reached (95%CI : 45.8-not reached)化学療法群で 47.5 カ月 (95%CI : 32.2-not reached)であり、HR は 0.760 (95%CI : 0.548-1.053; $p=0.0978$)であった。また、本試験において後治療の影響について検討されており、クリゾチニブ群において後治療で少なくとも 1 レジメンの他の ALK-TKI が使用された 57 例において OS が良好であることも示されている (生存期間中央値 not reached (95%CI : not reached-not reached))。

2. アレクチニブ

アレクチニブ(アレセンサ®)は、当初より ALK を特異的に阻害することを目的にスクリーニング・創薬された選択的 ALK チロシンキナーゼ阻害薬である。

アレクチニブの first-in-human の第 I / II 相試験(AF-001JP)¹⁸は、2010 年より本邦で開始された。対象は免疫染色と FISH 両者もしくは RT-PCR により ALK 融合遺伝子陽性と診断された ALK 阻害薬未治療の進行期非小細胞肺癌患者であり、第 I 相試験部分では用量漸増試験の 20mg 1 日 2 回~300mg 1 日 2 回の範囲において用量制限毒性、安全性が評価された。最大投与量の 300mg 1 日 2 回においても用量制限毒性を認めなかったことから、推奨用量は 300mg 1 日 2 回とされ、第 II 相試験部分はこの

用量で実施されている。本試験結果は、2013 年の The Lancet Oncology 誌にて報告され¹⁹、さらに 3 年フォローアップされたデータが 2017 年の Journal of Clinical Oncology 誌に掲載された²⁰。

第 II 相試験に登録された 46 例について、9 例の CR を含む 43 例が奏効し、奏効率は 93.5% (95%CI : 82.1-98.6)、PFS 中央値は not reached (95%CI : 33.1-not reached)、3 年 PFS 率は 62% (95%CI : 45-75)、OS 中央値も not reached であり、3 年 OS 率は 78% (95%CI : 63-88) と報告されている。また安全性については、第 I 相部分と合わせ、300mg 1 日 2 回投与を受けた 58 例で評価されている。忍容性は良好で、20%以上の発現率の副作用は、血中ビリルビン増加 (21 例, 36.2%)、味覚異常 (20 例, 34.5%)、AST(GOT)増加 (19 例, 32.8%)、血中クレアチニン増加 (19 例, 32.8%)、便秘 (18 例, 31%)、皮疹 (17 例, 29.3%)、好中球減少 (15 例, 25.9%)、ALT(GPT)増加 (15 例, 25.9%)、CPK 増加 (12 例, 20.7%)、白血球減少 (12 例, 20.7%) であったが、このうち Grade 3 は好中球減少が 4 名、血中ビリルビン・AST(GOT)増加・CPK 増加が各 2 例、白血球減少が 1 名のみであり、Grade 4 の副作用は認めなかった²⁰。

この良好な臨床試験結果を受け、アレクチニブは 2014 年 7 月 4 日に「ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」に対して製造販売承認がなされ、同 9 月より日常診療に導入されている。

また、アレクチニブは、前臨床試験において、クリゾチニブに耐性を示す ALK 変異 (L1196M, C1156Y 等) に対しても有効であることが示されている。本邦でアレクチニブの 150mg 製剤と AF-001JP で用いられていた 20mg/40mg 製剤の生物学的同等性試験が行われたが、この試験は前治療を規定しない試験であり、ALK 阻害薬既治療例を含む試験であった。この試験にはクリゾチニブ既治療例 28 例を含む 35 例が登録された。その結果は 2016 年の Cancer Science 誌で報告され²¹、アレクチニブ 20mg/40mg カプセルと 150mg カプセルでは薬物動態は同様であり、食事にも影響されないことが示されるとともに、クリゾチニブ既治療例を含む ALK 陽性患者に対するアレクチニブの抗腫瘍効果が示された。その中でアレクチニブはクリゾチニブ耐性の 20 例に対し、65.0%の奏

効率 (95%CI; 40.8-84.6) を示したことが報告されている。

また海外での第 I - II 相試験(AF-002JG)²² は FISH により診断された ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌でクリゾチニブに耐性もしくは不耐の症例を対象に行われており、その第 I 相の用量増加試験の結果が 2014 年に The Lancet Oncology 誌に報告されている²²。体格が大きい症例の多い米国で行われた試験であり、投与量が 300-900mg 1 日 2 回と日本人での推奨用量と異なっているが、47 例が登録され、44 例で抗腫瘍効果が評価可能であり奏効率は 55% (confirmed complete response (CR) 2%, confirmed partial response (PR) 32%, unconfirmed PR 20%) であった。また baseline で中枢神経転移のあった 21 例中 6 例の CR (3 例は unconfirmed) を含む 11 例で奏効を得たことも報告された。

アレクチニブは、初回治療の第 III 相試験として標準的 化学療法ではなくクリゾチニブとの head to head 試験が本邦 (J-ALEX 試験)²³ および日本を除く Global (ALEX 試験)²⁴ で行われた。J-ALEX 試験では ALK 阻害薬未治療・化学療法歴は 1 レジメン以下の ALK 融合遺伝子陽性進行再発非小細胞肺癌患者 207 例を対象にアレクチニブ 300mg1 日 2 回投与群とクリゾチニブ 250mg1 日 2 回投与群に 1:1 に割り付けられて行われ、その結果は 2017 年に Lancet 誌に報告されている¹⁸。主評価項目は PFS であり、PFS 中央値はアレクチニブ群(n=103)で not reached(95%CI : 20.3-not reached)、クリゾチニブ群(n=104)で 10.2 カ月(95%CI : 8.2-12.0)であり、HR は 0.34 (99.7%CI : 0.17-0.71, p<0.0001)と有意にアレクチニブ群で良好であった。毒性のプロファイルは既報の通りであり、Grade 3-4 の有害事象や、投与中止に至る有害事象の頻度はクリゾチニブ群で高かった。ALEX 試験は J-ALEX と同様の対象でアレクチニブとクリゾチニブの比較を行った第 III 相試験であり、アレクチニブの投与量が ALEX 試験では 600mg 1 日 2 回と倍量であることと、層別化因子に脳転移の有無が加えられていることが主な相違点であった。本試験の結果は 2017 年の New England Journal of Medicine 誌に掲載されており²⁴、PFS 中央値はアレクチニブ群(n=152)で not reached (95%CI : 17.7-not reached)、クリゾチニブ群(n=151)で 11.1 カ

月(95%CI : 9.1-13.1)であり、HR は 0.47(95%CI : 0.34-0.65, p<0.001)と有意にアレクチニブ群で良好であった。また、CNS progression もしくは死亡までの期間はアレクチニブ群で有意に長かった (HR=0.16; 95%CI : 0.10-0.28, p<0.001)。12 カ月時点での CNS progression の累積発生率はアレクチニブ群で 9.4%(95%CI : 5.4-14.7)、クリゾチニブ群で 41.4%(95%CI:33.2-49.4%)であった。ALEX 試験での中枢神経系病変に対する効果は 2018 年に Annals of Oncology 誌にも報告されており²⁵、脳転移病変 (計測可能病変) の奏効率は放射線治療歴のある場合アレクチニブ群で 85.7%、クリゾチニブ群で 71.4%、放射線治療歴がない場合にはそれぞれ 78.4%、40.4%であった。CNS 転移のある場合の PFS は HR=0.40(95%CI : 0.25-0.64) と CNS 転移がない場合 HR=0.51(95%CI : 0.33-0.80) と同様アレクチニブ群で良好であった。

ALEX 試験のアップデートされた結果が 2020 年の Annals of Oncology 誌に報告されており²⁶、PFS 中央値はアレクチニブ群で 34.8 カ月(95%CI : 17.7-not evaluable)、クリゾチニブ群で 10.9 カ月(95%CI : 9.1-12.9)、HR は 0.43 (95%CI : 0.32-0.58)であった。OS データは immature であるが OS 中央値はアレクチニブ群は未到達、クリゾチニブ群で 57.4 カ月(95%CI : 34.6-not reached)、HR は 0.67 (95%CI : 0.46-0.98)であった。

3. セリチニブ

セリチニブ(ジカディア[®])は、選択的 ALK 阻害薬であり、クリゾチニブの約 20 倍の ALK 阻害活性をもつとされ、複数のクリゾチニブ耐性遺伝子変異にも有効とされる薬剤である。第 I - II 相試験 (ASCEND-1) の結果は 2014 年の New England Journal of Medicine 誌に報告されている²⁷。FISH 法により診断された ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌患者 59 例が第 I 相部分に登録され、推奨用量は 750mg 1 日 1 回投与とされた。その後の Expansion Phase では 71 例が追加され、400mg 以上を投与された 114 例における奏効率は 58% (95%CI; 48-67)、クリゾチニブ既治療の 80 例における奏効率は 56% (95%CI; 45-67) であった。また 400mg 以上を投与された症例における PFS 中央値は 7 カ月(95%CI; 5.6-9.5)

であった。また、少なくとも1レジメンのプラチナ併用療法歴を有するクリゾチニブ耐性例に対するセリチニブの第Ⅱ相試験(ASCEND-2 n=140)が行われた。本試験の結果は2016年にJournal of Clinical Oncology誌に報告されており²⁸、奏効率は38.6% (95%CI : 30.5-47.2)でPFS中央値は5.7カ月(95%CI : 5.4-7.6)であった。毒性では悪心(81.4%)、下痢(80.0%)、嘔吐(62.9%)と消化器毒性が強いことが特徴的であった。ASCEND-2の日本人サブセット(n=24)での主な毒性は悪心(91.7%)。嘔吐(83.3%)、下痢(83.3%)、食思不振(66.7%)、疲労(66.7%)、ALT上昇(41.7%)、AST上昇(41.7%)、体重減少(33.3%)でこれらの多くはGrade 1/2であり、主なGrade 3/4の毒性はγGTP上昇(16.7%)、倦怠感(12.5%)であった²⁹。毒性による休薬、減量は91.7%で行われており、その原因は悪心(45.8%)、下痢(37.5%)、嘔吐(33.3%)であったが、間質性肺疾患は認められず、毒性による治療中止はなかった²⁹。また、1-2レジメンの化学療法(1レジメンはプラチナ併用療法)とクリゾチニブ後に進行したALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌に対するセリチニブ(n=115)と化学療法(ドセタキセル(n=40)もしくはパメトレキセド(n=73))の比較第Ⅲ相試験(ASCEND-5)が行われ、The Lancet Oncology誌に報告されており³⁰、主評価項目のPFSはセリチニブ群で化学療法群より有意に良好なことが示された(PFS中央値5.4カ月(95%CI : 4.1-6.9) vs 1.6カ月(95%CI : 1.4-2.8)、HR=0.49 (95%CI : 0.36-0.67, p<0.001)。これらの結果を受けて本邦では、まず、2016年3月28日にクリゾチニブ不応もしくは不耐のALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌にセリチニブが承認された。セリチニブの初回治療での効果をみる試験として未治療のStage IIIb/IVのALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌を対象にセリチニブ750mg 1日1回連日経口投与とシスプラチンもしくはカルボプラチンにパメトレキセドの併用治療(3週間毎、点滴静注)を比較する第Ⅲ相試験(ASCEND-4)が行われ、2017年Lancet誌に報告されている³¹。主評価項目のPFSはセリチニブ群(n=189)で有意に良好なことが示され、また脳転移の有無によらずセリチニブ群でPFSが良好であることも示された。2016年6月時点での全生存期間の解析はimmatureではあるが、奏効率は72.5% vs 26.7%とセリチニブ群で有意に高かった。この結果により2017年9月22日「クリゾチニブ治療に不応もしくは

不耐の」の条件が外され、ALK融合遺伝子陽性肺癌の一次治療にも適応拡大がなされた。しかし、クリゾチニブとの比較第Ⅲ相試験でPFSが有意に長く、毒性が少ないことが示されているアレクチニブが初回治療の標準治療として広く使われるようになってきていることから、本邦でアレクチニブに耐性となったALK陽性肺癌(クリゾチニブ治療と1レジメンまでの化学療法の前治療は許容)に対するセリチニブの単群第Ⅱ相試験(ASCEND-9、n=20)が行われた。その結果は2018年にCancer Scienceに報告されているが²³、主評価項目の主治医判定の奏効率は25%(95%CI : 8.7-49.1)、副次評価項目の病勢制御率は70%(95%CI : 45.8-88.1)、奏効期間中央値は6.3カ月(95%CI : 3.5-9.3)、PFS中央値は3.7カ月(95%CI : 1.9-5.3)であった。またセリチニブ750mg空腹時投与により消化器毒性が多く認められており、その軽減を目的として低用量(450mgまたは600mg)での低脂肪食後投与を検討する海外無作為化第Ⅰ相試験(ASCEND-8)が行われ、結果が2017年、2019年のJournal of Thoracic Oncology誌に報告された^{32,33}。本試験においてセリチニブ450mg 1日1回食後投与が、750mg 1日1回空腹時投与と比較して、同程度の有効性と消化器毒性の軽減が認められた。その結果、2019年2月に本邦において「450mgを1日1回、食後に経口投与」とする用法・用量の変更承認がなされた。

4. ロルラチニブ

ロルラチニブ(ローブレナ[®])は、クリゾチニブ耐性遺伝子変異の克服とCNSへの移行性の改善を目的に、クリゾチニブの物理化学的性質を最適化し12員環に構造変化させたALK/ROS1阻害活性をもつ薬剤である。ALK阻害薬治療後の疾患進行(PD)には耐性変異が関わっており、なかでもG1202RおよびG1202del変異では、第一、第二世代ALK阻害薬の効果が減弱する一方、ロルラチニブはこれらの変異に対しても効果を発揮することがこれまでの*in vitro*の研究で示されてきた³⁴。また、脳内における臨床上有効な薬物濃度については、ロルラチニブのfirst-in-humanの国際共同第Ⅰ/Ⅱ相試験の第Ⅰ相パートにおいて、100mg QD(1日1回)または150mg QDを反復投与された患者の脳脊髄中濃度/血漿中濃度の比の平均値=0.75(標準偏差0.16)という結果が示され、良好なCSF

移行性が示されている³⁰。

ロルラチニブの国際共同第 I / II 相試験は、ALK 融合遺伝子陽性または *ROS1* 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発 NSCLC 患者を対象に 2014 年から実施された。第 I 相パートにおいて最大耐量および推奨用量が検討され、第 II 相パートにおいて、第 I 相試験で定められた推奨用量 100mg QD 投与における有効性および安全性が評価された。

国際共同第 I / II 相試験の結果は、第 I 相パートについては 2017 年に³⁵、第 II 相パートについては 2018 年に *The Lancet Oncology* 誌に掲載されている³⁶。

本試験の第 II 相パートには 275 例が組み入れられ、融合遺伝子および前治療レジメンに基づき 6 つのコホートに分けられた (EXP1~5: ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者 [EXP1: 未治療の患者 30 例、EXP2: クリゾチニブによる治療を受けた患者 27 例、EXP3A: クリゾチニブおよび化学療法による治療を受けた患者 32 例、EXP3B: クリゾチニブ以外の 1 レジメンの ALK 阻害薬による治療を受けた患者 28 例、EXP4: 2 レジメン以上の ALK 阻害薬による治療を受けた患者 65 例、EXP5: 3 レジメン以上の ALK 阻害薬による治療を受けた患者 46 例]、EXP6: *ROS1* 融合遺伝子陽性肺癌患者 47 例。なお、EXP3B~5 では化学療法の有無は問わないものとされた)。

1 レジメン以上の ALK 阻害薬による治療を受けていた患者 (EXP2~5) 198 例における奏効率 (ORR) は 47.0% (95%CI; 39.9-54.2)、PFS 中央値は 7.3 カ月 (95%CI; 5.6-11.0) であった。また、ベースライン時に頭蓋内病変がみられた 81 例における頭蓋内奏効率 (IC-ORR) は 63.0% (95%CI; 51.5-73.4) であった。これらの奏効率は、前治療の ALK 阻害薬がクリゾチニブであった患者 (EXP2~3A、ORR: 69.5% [95%CI; 56.1-80.8]、IC-ORR; 87.0% [95%CI; 66.4-97.2])、クリゾチニブ以外の ALK 阻害薬であった患者 (EXP3B、32.1% [95%CI; 15.9-52.4]、55.6% [95%CI; 21.2-86.3])、2 レジメン以上の ALK 阻害薬による治療を受けた患者 (EXP4-5、38.7% [95%CI; 29.6-48.5]、53.1% [95%CI; 38.3-67.5]) においても同様に、全般的な奏効率と比較して頭蓋内奏効率が低い数値を示した³⁶。

第 II 相パートの 275 例において認められた主な副作用は、高コレステロール血症 224 例 (81%)、高トリグリセリド血症 166 例 (60%)、浮腫 119 例 (43%)、末梢性ニューロパチー 82 例 (30%) であり、Grade3~4 の主な副作用は高コレステロール血症 43 例 (16%)、高トリグリセリド血症 43 例 (16%) であった。重篤な副作用は 19 例 (7%) に認められ、最もよくみられたものは認知障害 2 例 (1%) であった。ロルラチニブに特徴的な副作用として、認知障害、気分障害、言語障害などの中枢神経系障害が 107 例 (39%) に認められたが、その多くが Grade 1~2 であり、用量調整や投与中止によって回復し、可逆的と考えられている^{35,36}。

この第 I / II 相試験の Update が 2018 年の ASCO にて発表されている³⁷。2018 年 2 月 2 日にカットオフされたデータにおける ORR は EXP2-3A、EXP3B、EXP4-5 でそれぞれ 72.9% (95%CI; 59.7-83.6)、42.9% (95%CI; 24.5-62.8)、39.6% (95%CI; 30.5-49.4) であり、IC-ORR はそれぞれ 70.3% (95%CI; 53.0-84.1)、46.2% (95%CI; 19.2-74.9)、48.1% (95%CI; 36.9-59.5)、PFS 中央値はそれぞれ 11.1 カ月 (95%CI; 8.2-未達)、5.5 カ月 (95%CI; 2.9-8.2)、6.9 カ月 (95%CI; 5.4-9.5) であった。

この第 II 相試験の Baseline の耐性変異の状況による効果の違いが、米国癌研究会議 (AACR) において報告されている³⁸。198 例の少なくとも 1 レジメンの ALK 阻害薬に耐性となった症例から組織サンプルもしくは血漿サンプルを得、血漿の cell free DNA (cfDNA) での解析では 45/190 例 (24%) で、腫瘍組織の tissue DNA (tDNA) では 40/191 例 (21%) で 1 つ以上の ALK 変異を認め、1 サンプルにつき 1~8 つの ALK 変異が確認された。検出されたすべての遺伝子変異のうち、最もよくみられた変異は G1202R/del (25%, 27.6%) であり、その他、F1174、L1196M、G1269A、I1171 などが多く認められた。G1202R/del を有する症例における奏効率は 57.9% であり、奏効期間中央値は 6.9 カ月 (95%CI; 4.3-NR) であった。前治療がクリゾチニブのみの症例での奏効率は ALK 融合遺伝子変異が認められた症例と認められなかった症例では有意差がなかった (cfDNA 解析; 72.7% vs 73.3%、tDNA 解析; 72.7% vs 74.4%)。対照的に、第二世代 ALK

阻害薬の治療歴がある症例においては ALK 遺伝子変異が認められた症例のほうが遺伝子変異がなかった症例より奏効率が高かった (cfDNA 解析: 61.8 vs 30.9%、tDNA 解析: 65.5% vs 26.9%)。第二世代 ALK 阻害薬の治療歴のある症例となかった症例での PFS は cfDNA 解析で 7.3 カ月 (95%CI : 4.1-13.1) vs 5.6 カ月(95%CI : 4.1-8.2)、tDNA 解析で 11.0 カ月 (95%CI : 6.9-22.9) vs 5.4 カ月 (95%CI : 3.9-6.9)であった。

また、探索的解析として実施されたロルラチニブ投与後の頭蓋内 PD または頭蓋内以外の PD の累積発生率の解析結果が世界肺癌学会 (WCLC) において報告され³⁹、ベースライン時に脳転移なしの患者 (n=67) において、頭蓋内 PD の 12 カ月時点における累積発生率は評価不能、頭蓋内以外の PD は 49%であり、ベースライン時に脳転移ありの患者 (n=131) においてもそれぞれ 22%、31%と、頭蓋内病変が発生する割合が低いという結果であった。

ロルラチニブはこの第 I / II 相試験の結果で、世界に先駆け、本邦で 2018 年 9 月 21 日に「ALK チロシンキナーゼ阻害薬に抵抗性又は不耐容の ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」の効能・効果で承認され、臨床導入されている。

ロルラチニブに関しては、現在この第 I / II 相試験の結果をもって、日本肺癌学会のガイドライン 2020 年度版において、二次治療以降として推奨度 2C での治療が提案されている。

未治療の ALK 融合遺伝子陽性肺癌を対象としたロルラチニブとクリゾチニブの有効性を比較する国際共同第 III 相試験 (Crown 試験) が 2017 年より実施され、結果は 2020 年の New England Journal of Medicine 誌に掲載された⁴⁰。FISH 法により診断された ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌患者 296 例が組み入れられ、ロルラチニブ 100mg 1 日 1 回投与群 149 例、クリゾチニブ 250mg 1 日 2 回投与群 147 例に無作為に割り振られた。主要評価項目は PFS であり、PFS 中央値はロルラチニブ群 (n=149) で not reached (95%CI : not reached-not reached)、クリゾチニブ群(n=147)で 9.3 カ月(95%CI : 7.6-11.1)であり、HR は 0.28 (95%CI : 0.19-0.41, p<0.001)と有意にロルラチニブ群で良好であった。12カ

月無増悪生存率は、ロルラチニブ群 78%、クリゾチニブ群 39%であった。毒性のプロファイルは既報の通りであり、Grade3-4 の有害事象はロルラチニブ群で高かったが、12 ヶ月時点での治療継続割合はロルラチニブ群で 76%、クリゾチニブ群で 35%とロルラチニブ群で高かった。ベースラインで脳転移を有していた 78 症例の中中枢神経系病変に対する奏効率は、ロルラチニブ群で 66%、クリゾチニブ群で 20%とロルラチニブ群で良好であった。12 カ月時点で中枢神経病変の出現、増悪を伴わない生存割合はロルラチニブ群で 96% (95%CI : 91-98)とクリゾチニブ群で 60% (95%CI : 49-69)であり、HR は 0.07 (95%CI : 0.03-0.17)であり、ロルラチニブの中中枢神経系病変への有効性が引き続き示された。

ロルラチニブは本試験の結果をもって、「ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発非小細胞肺癌」に適応が拡大され、一次治療から使用可能となった。

5. ブリグチニブ

ブリグチニブ(アルンブリグ®)は、既存の ALK-TKI に対する二次耐性変異への阻害効果と、既治療での増悪時に出現する中枢神経病変への有効性を目的に創製された新規 ALK-TKI である。クリゾチニブやアレクチニブ耐性として知られる I1171X や G1202R を含む複数の二次耐性変異に対し *in vitro* で有効性を示し、マウス皮下移植片モデルにおいてもそれらの耐性変異に対する腫瘍増殖抑制効果が確認されている。また、マウスにおける中枢神経系転移モデルにおいても抗腫瘍効果を示すとともに生存を延長した。

海外において行われた臨床薬理第 I / II 相試験 (AP26113-11-101 試験)において、ALK 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌患者 79 例を含む進行癌(白血病を除く)137 症例を対象に 30mg 1 日 1 回から 300mg 1 日 1 回まで用量漸増し、MTD や安全性プロファイル、忍容性および DLT の検討が行われた。その際、「投与初期に発現する肺関連有害事象(EOPE : Early-onset Pulmonary Event)」が確認された。EOPE 発現と開始用量に関連が認められており、90mg 1 日 1 回 7 日間による導入療法を先行させることにより 180mg 1 日 1 回の用量において EOPE の発現が低下した。以上の結果を踏まえ、本邦での承認用法

および用量は「1日1回90mgを7日間経口投与する。その後、1日1回180mgを経口投与する。」となっている。

海外において、未治療のALK融合遺伝子陽性肺癌に対するブリグチニブとクリゾチニブの有効性を比較する国際共同第Ⅲ相試験(ALTA-1L試験)が2016年より実施され、結果は2018年のNew England Journal of Medicine誌に掲載された⁴¹。FISH法またはIHC法にて診断されたALK陽性非小細胞肺癌患者275例が組み入れられ、ブリグチニブ180mg1日1回(90mg1日1回での7日間導入療法後)投与群137例、クリゾチニブ250mg1日2回投与群138例に無作為に割り振られた。主要評価項目はPFSであり、PFS中央値はブリグチニブ群でnot reached、クリゾチニブ群で9.8カ月(95%CI:9.0-12.9)であり、HRは0.49(95%CI:0.33-0.74, p<0.001)と有意にブリグチニブ群で良好であった。12カ月無増悪生存率は、ブリグチニブ群67%、クリゾチニブ群43%であった。ベースラインで脳転移を有していた87例の中中枢神経系病変の12カ月無増悪生存率はブリグチニブ群67%、クリゾチニブ群21%であり、HRは0.27(95%CI:0.13-0.54)であり、ブリグチニブの中中枢神経系病変への有効性が示された。本試験においてブリグチニブ群で認められた主な副作用は、クレアチンホスホキナーゼ上昇53例(39%)、下痢67例(49%)、悪心36例(26%)、リパーゼ上昇26例(19%)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)上昇26例(19%)であった。Grade3以上の副作用は83例(61%)に認められ、間質性肺疾患・肺炎4例(3%)、貧血、錯乱状態などが認められた。

本邦において、アレクチニブを含む他のALK-TKI耐性非小細胞肺癌症例を対象とした日本人に対するブリグチニブの有効性および安全性を評価する第Ⅱ相試験(J-ALTA試験)が実施された。結果は2021年のJournal of Thoracic Oncology誌に掲載された⁴²。FISH法またはIHC法にて診断された日本人ALK陽性非小細胞肺癌患者72例(FAS群)を対象に、安全性評価リードインパートとしてALK阻害薬の治療歴を問わず9例、再燃例対象拡大パートとして63例が組み入れられた。さらに拡大パートではメインコホート(FAS-P群)としてアレクチニブのみ、またはアレクチニブとクリゾチニブ投与例47例、サブコ

ホートとしてメインコホート以外のALK阻害薬2剤までの投与例16例が設定された。主要評価項目は、FAS-P群における客観的奏効率であり、症例全体(FAS群)でのORRや、それぞれのサブグループでのPFS、OS、奏効期間などが副次評価項目として検討された。また頭蓋内病変に対する有効性も検討された。FAS-P群におけるORRは31%(95%CI:17-44%)であり、95%CIの下限值が設定された閾値奏効率15%を上回った。頭蓋内病変に対する奏効率は25%と良好であった。耐性変異別の奏効率については、G1202R変異で奏効率33%(1/3)、G1202R以外の変異では、少数例での検討ではあるものの奏効率55%と良好な結果であった。

ALTA-1L試験のアップデート結果が2020年にJournal of Clinical Oncology誌に報告された⁴³。中央判定によるPFSの比較では、PFSの中央値はブリグチニブ群とクリゾチニブ群でそれぞれ24.0カ月(95%CI:18.5-not reached)と11.0カ月(95%CI:9.2-12.9)であり、HRは0.49(95%CI:0.35-0.68, p<0.001)とブリグチニブ群で有意に良好であった。2年生存率はそれぞれ、76%(95%CI:67-82%)と74%(95%CI:65-80%)で、HR0.92(95%CI:0.57-1.47, p=0.771)であった。

以上の結果を踏まえ、ブリグチニブは本邦において「ALK融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」を適応として一次および二次治療以降の治療薬として承認された。

現在、本邦で承認されている5剤のALKチロシンキナーゼ阻害薬の臨床試験につき記載した。日本肺癌学会肺癌診療ガイドライン2023年度版ではPS0-1のALK融合遺伝子陽性肺癌の一次治療としてアレクチニブが推奨度1A、ブリグチニブ、ロルラチニブが推奨度2Bで推奨されている。2023年度版の改訂でクリゾチニブ、セリチニブについての推奨度は記載がなくなっているが、プラチナ製剤併用療法と比較した場合における有効性のエビデンスは確立されているためエビデンスの強さはA評価となっている。

PS2-4の場合にはアレクチニブが推奨度1Cで推奨されている。また、一次治療アレクチニブ耐性または増悪後

のPS 0-2 に対する治療としては、ロルラチニブ、ブリグチニブ、セリチニブを用いた単剤療法が推奨度 2C でそれぞれ推奨されている。しかし、ALK 阻害薬の一次治療を比較する第Ⅲ相試験の全生存期間の結果はすべて未だ immature であり、有意差が示されておらず、ALK 阻害薬の至適なシークエンスは不明である。クリゾチニブを初回 ALK 阻害薬とした場合のシークエンスでの治療における生存期間の報告が散見されるがいずれも小規模であり⁴⁴⁻⁴⁶、今後の検討が待たれる。また、それぞれの症例に対する至適なシークエンスを検討するにあたっては、今後は NGS を用いることにより耐性遺伝子の状況を確認し、その状況に応じて個別化されるようになる可能性もあるものと考えられる。

(5) 薬剤耐性変異

ALK 融合遺伝子肺癌に対するそれぞれの ALK 阻害薬治療後に、EGFR 阻害薬と同様に二次性変異を伴って耐性を生じることが知られている³⁴。EML4-ALK 融合バリエーションによって獲得される変異が異なるとする報告もあるが⁴⁷、薬剤によって生じる変異は大きく異なる(図5)。また、それぞれの薬剤における耐性変異ごとにその他の ALK 阻害薬の効果が異なり(表 2)、耐性メカニズムによる治療戦略の決定がなされる将来も近い。

(6) ALK 融合遺伝子の診断

ALK の異常を検出する方法として蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (Fluorescence *in situ* hybridization; FISH) 法、免疫組織化学 (immunohistochemistry; IHC)

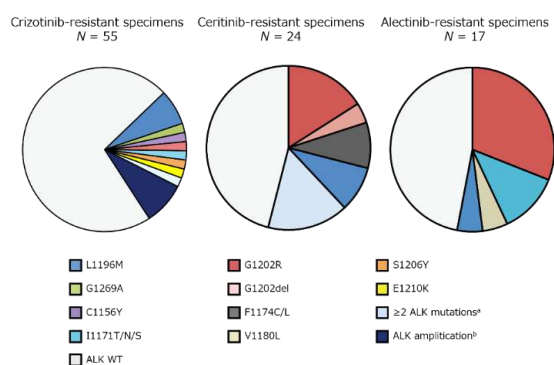


図 5. ALK 阻害薬治療後に生じる薬剤耐性遺伝子変異の分布 (Cancer Discov. 2016;6:1118-1133)
Reproduced with permission from American Association for Cancer Research (2021)

法、RT-PCR 法 (塩基配列決定を含む)、遺伝子パネル検査 (Capture hybrid 法および amplicon 法) がある。各検出法の長所と短所について表 3 にまとめるとともに、それぞれについて解説する。

1. FISH 法

蛍光色素でラベルした DNA プローブを標本上で標的遺伝子とハイブリダイズさせ、そのシグナルを蛍光顕微鏡で観察する方法である。本邦では、Vysis® ALK Break Apart FISH プローブキット (Abbott Molecular) がクリゾチニブ、アレクチニブおよびブリグチニブのコンパニオン診断薬として体外診断用医薬品 (IVD) の承認を取得しており、保険適用されている。

FISH の方法としては ALK 遺伝子と EML 4 遺伝子にそれぞれプローブをおいて、これらが融合するのを検出する方法 (fusion assay) と、ALK 遺伝子の切断点を隔てて 2 つのプローブを置いておき、これらが切断されて他の遺伝子と融合することを検出する方法 (break-apart assay) (図 6) の 2 つが存在する。しかし、EML4 と ALK はもともと染色体 2 番短腕の比較的近いところに存在している

表 2. それぞれの耐性遺伝子変異における ALK 阻害薬の IC₅₀ (Cancer Discov. 2016;6:1118-1133)
Reproduced with permission from American Association for Cancer Research (2021)

Mutation status	Cellular ALK phosphorylation mean IC ₅₀ (nmol/L)				
	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib	Brigatinib	Lorlatinib
Parental Ba/F3	763.9	885.7	890.1	2774.0	11293.8
EML4-ALK V1	38.6	4.9	11.4	10.7	2.3
EML4-ALK C1156Y	61.9	5.3	11.6	4.5	4.6
EML4-ALK I1171N	130.1	8.2	397.7	26.1	49.0
EML4-ALK I1171S	94.1	3.8	177.0	17.8	30.4
EML4-ALK I1171T	51.4	1.7	33.6*	6.1	11.5
EML4-ALK F1174C	115.0	38.0*	27.0	18.0	8.0
EML4-ALK L1196M	339.0	9.3	117.6	26.5	34.0
EML4-ALK L1198F	0.4	196.2	42.3	13.9	14.8
EML4-ALK G1202R	381.6	124.4	706.6	129.5	49.9
EML4-ALK G1202del	58.4	50.1	58.8	95.8	5.2
EML4-ALK D1203N	116.3	35.3	27.9	34.6	11.1
EML4-ALK E1210K	42.8	5.8	31.6	24.0	1.7
EML4-ALK G1269A	117.0	0.4	25.0	ND	10.0
EML4-ALK D1203N+F1174C	338.8	237.8	75.1	123.4	69.8
EML4-ALK D1203N+E1210K	153.0	97.8	82.8	136.0	26.6

IC₅₀ ≤ 50 nmol/L
IC₅₀ > 50 < 200 nmol/L
IC₅₀ ≥ 200 nmol/L

表 3. ALK 融合遺伝子の各種検出法の長所と短所

	IHC法	FISH法	RT-PCR法	NGS Capture hybrid法	NGS Amplicon法
長所	未知のfusionも 検出可能	未知のfusionも 検出可能	高感度	未知のfusionも 検出可能	
	比較的容易で、他の免疫染色はルーチンとして施行されている	リンパ腫の診断として確立	高特異度	他の遺伝子変異や融合遺伝子とともに結果が得られる	他の遺伝子変異や融合遺伝子とともに結果が得られる
	アレクチニブの臨床試験にも用いられた	クリソチニブの臨床試験にも			
	短いTAT				
	FFPEで可能	FFPEで可能		FFPEで可能	FFPEで可能
短所	融合遺伝子を直接的に見ているわけではない	比較的高価で、技術的に熟練が必要	良質のRNAを要する	比較的高価	比較的高価で、良質のRNAを要する
			腫瘍細胞の存在の確認が必要	腫瘍細胞の存在の確認が必要	腫瘍細胞の存在の確認が必要
	抗体のクローンと検出系によって結果に大きな差が出ることが知られている	比較的最長いTAT	多くの転座パターンに対応するためにはmultiplex化や複数のPCRを行う必要あり	比較的最長いTAT	比較的最長い TAT
		偽陽性、偽陰性が報告されている	未知の fusion は検出できない		未知の fusion は検出できない

TAT: Turnaround time

ので、融合のシグナルがしばしばわかりにくいこと、*EML4* のみが融合の相手とは限らないこと、などから現在では後者の break-apart assay が使われることがほとんどであり、前述の体外診断用医薬品として承認されたキットも break-apart 法での検出である。

1-1. FISH のための検体

FISH には通常ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本が用いられる。DNA 抽出のためには厚めの薄切切片が求められることが多いのに対し、FISH では IHC と同程度の厚さ (4-6 μ m 厚) が求められる。また、通常の IHC に比べてより強い熱処理やタンパク分解酵素を用いるため、薄切した組織がスライドからはがれやすい。必ず剥離防止剤を塗布されたコートスライドを用いる必要がある。代表的なコートスライドとして、MAS-GP コートスライド・FRONTIER コートスライド、プラチナプロスライド (松浪硝子工業) や New シラン II、New シラン III (武藤化学) などがある。

FISH の標的分子は DNA であるため、標本内の DNA の断片化に強く影響を受ける。長期間 (5 日以上程度) ホルマリンに浸透させることによる過固定や酸性脱灰液を用いた脱灰操作によって、DNA 断片化が引き起こされるため、これらの操作は避けるべきであり、結果としてこのような状態になってしまった組織標本を用いることは避ける必要がある。特に、肺癌骨転移巣標本では、ほとんどの

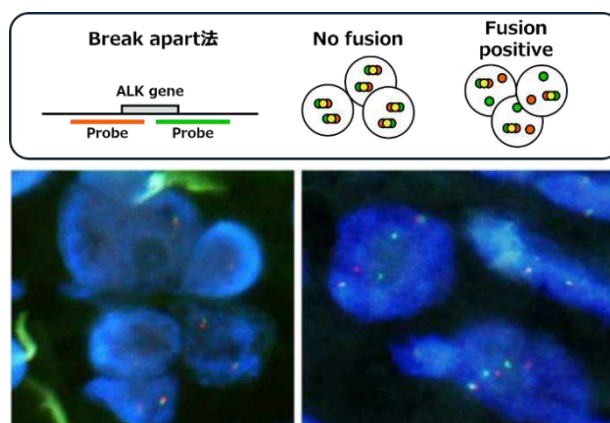


図 6. Break-apart 法による ALK 遺伝子再構成の検出
再構成切断点を挟んだプローブを異なる蛍光色素でラベルし FISH を行うと、遺伝子再構成のない場合は緑と赤が近接し、重なると黄色のシグナルを与えるが、遺伝子再構成があると緑と赤が分離してみえる。

場合脱灰操作が加わり、FISH および IHC による検討が困難となる可能性があることから、使用する脱灰液に十分留意する必要がある。

乳癌における *HER2* 遺伝子増幅検索については、固定までの条件が American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists によって細かく規定されたガイドラインが発表されている⁴⁸。このガイドラインでは、切除されてから 1 時間以内に中性緩衝ホルマリンでの固定が始められるべきであり、腫瘍を 5-6mm に細切し、6 時間以上 72 時間以下に固定を終了しなければならないとされている。また、これらの時間 (固定までの時間、固定方法、固定時間) の記録を残すように

勧めているほか、未染標本は作製してから 6 週間以内にテストが完了しなければならないと述べられている。

FISH は形態学的な観察が可能であり、腫瘍細胞の同定が可能であるが、暗視野での観察であり、光学顕微鏡ほど詳細な観察は不可能である。そのため、腫瘍細胞の同定が難しい標本は避けるべきである。

2. RT-PCR (reverse transcriptase^c-PCR) 法

EML4-ALK 融合遺伝子は *EML4* が逆方向に融合するために、*EML4* 側と *ALK* 側にそれぞれプライマーを設定しておけば正常では PCR 産物ができず、逆位をもって転座が起こったときのみに PCR 産物が得られるはずであり、特異度の高い転座の検出が期待される。さらに、最も頻度の高い *EML4-ALK* では、染色体逆位によって通常は転写産物に含まれない配列のプライマーを用いる点で、高い感度が得られる。また、必要により塩基配列を引き続いて決定することも可能でヌクレオチドレベルでの遺伝子再構成の詳細を検証することも可能となる(図 7)。

しかしながら、上述したように、*EML4-ALK* には多くの種類があるので、検出に際してはそこに留意する必要がある。

Takeuchi らはこれらを考慮して *EML4* のエクソン 2 とエクソン 13 に 2 つのセンス側のプライマー、*ALK* のエクソン 20 にアンチセンス側のプライマーをおく multiplex PCR で多くの variant を検出できると報告している⁴⁹。

この場合、染色体 DNA では通常増幅可能な PCR 産物の大きさの範囲を越えるため、検体としては mRNA を逆転写して合成される cDNA を用いる必要がある^d。PCR 産物の大きさを知ることでの variant であるかを知ることが可能であるが、特定の variant の PCR 産物が大きくなりすぎないように配慮する必要がある。また、この方法では高品質の RNA とともに高い RT-PCR の技術が必要とされる。通常の FFPE 標本から高品質の RNA を抽出するのは困難であり、この方法を FFPE 標本に適用するのは適切ではない¹⁰。また、*EML4-ALK* を検出するように設計

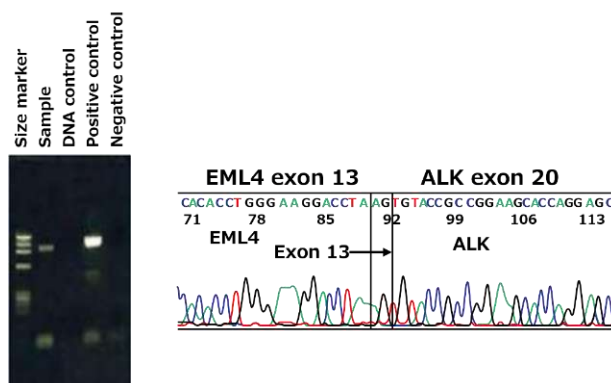


図 7. RT-PCR 産物の直接塩基配列決定法による *EML4-ALK* の variant 1 の検出

された PCR プライマーからは、当然 *KIF5B-ALK* や *TFG-ALK* などの転座は検出できず、未知のパートナーに対応できないということに留意する必要がある。

2-1. RT-PCR の検査

リアルタイム PCR 法を原理としたコンパニオン診断薬として、2021 年 9 月に「AmoyDx[®] 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル」が保険償還された。現在 11 ドライバー遺伝子の変異を同時に検出することが可能で、このうち 7 ドライバー遺伝子 (*EGFR/ALK/ROS-1/BRAF/MET/RET/KRAS*) について、非小細胞肺癌における 13 の抗悪性腫瘍薬の適応判定に用いることが可能となった。実際の運用については、「2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査」についても参照されたい。

2-2. RT-PCR の検体

核酸抽出後には腫瘍細胞が含まれていたかの検証ができないため、いかにその確証を取るかが重要となってくる。具体的には、検体採取後、ホルマリン固定する組織と対になるように組織を採取し、直ちに RNAlater などの RNA 分解阻害剤で処理する必要がある。また、細胞診検体では生食や PBS でよく攪拌して腫瘍細胞の分布に偏りをなくす必要がある。EGFR 遺伝子変異はサンプルから DNA を抽出して解析するが、ALK では RNA をもとに解析するので、検体処理法が異なることに留意が必要である。より一般的な方法としては、腫瘍組織の一部を OCT コンパウンドに包埋し、凍結切片を用いることで、腫瘍細胞に富んだ

^d通常遺伝情報の流れは DNA→RNA→タンパクであるが、レトロウイルスといわれる一群のウイルスは RNA 依存性 DNA 合成酵素をもっている。この酵素は reverse transcriptase(逆転写酵素)という。

領域から選択的に DNA もしくは RNA を取ることが可能である。また、スタンプ法は、生検組織、切除材料ともに用いることができるが、腫瘍細胞が選択的にスライドに付着するため⁵⁰、そのアルコール固定標本は良い解析サンプルとなる。

3. IHC 法

ALKIHC 法は、その転座を有するリンパ腫の同定に有用であるが、肺癌における EML4-ALK は、これまで未分化大細胞型リンパ腫に用いてきた IHC 法では検出されにくいことがわかっている⁵¹。すなわち肺癌においては肺癌用に至適化された IHC 法が必要である。本邦においては、ニチレイバイオサイエンス社よりヒストファイン ALK iAEP®キットが、Ventana 社より OptiView ALK(D5F3) がコンパニオン体外診断薬として IVD 承認を取得している。従来は薬剤と対応しての承認であったが、どちらのテストにおいても、アレクチニブ、クリゾチニブの適応を判断することができる。セリチニブ、ロルラチニブおよびブリグチニブについては OptiView ALK(D5F3)のみ適応の判断に用いることができる。

3-1. 検体

FISH 法とほぼ同様に未染薄切標本によって検討がなされる。抗原賦活化処理による薄切組織脱離を防止するため、コートスライドグラスを用いる必要がある。少なくとも 1 枚の未染標本があれば IHC による検討が可能であるが、FISH 検体用に同時に未染標本を作っておくとよい。通常予備を含めて 3~4 枚の未染標本が必要である。重要な点は、これらのうちの 1 枚を HE 染色し、腫瘍細胞の存在を確認することである。特に TBLB 標本では、病理診断の後に再薄切して作製した標本では組織自体がほとんどなくなったり、腫瘍細胞が消失してしまうことがあるので注意を要する。

IHC 法では、FISH 法よりも少ない細胞数での評価が可能であり、腫瘍細胞量の乏しい検体においても施行できる

点は長所となる。組織の固定については、FISH の項で解説したとおり、ASCO/CAP による浸潤性乳癌における HER2 検査ガイドラインに従って固定を行うことが求められる。

3-2. 抗原賦活化処理

ホルマリン固定では、タンパク質にメチレン架橋が形成され、これにより抗原抗体反応の低下（抗原のマスキング）が起こることが知られている。抗原賦活化とは、これを熱処理やタンパク分解酵素処理などを用いて抗原性を回復することをいい、ALK 染色の場合はもともと発現量が少ないこともあり必須の工程である。使用する抗原賦活化処理液は、染色結果に大きな影響を与えることから、方法に適した処理液の選択が不可欠となる。この段階で切片が剥離することがあるので、剥離防止用にコートされたスライドグラスを用いる必要がある。

3-3. 検出キットによる違い

iAEP キットと OptiView ALK キットではその染色特性が異なる。iAEP では、一般的な免疫染色と同等の染色態度で、比較するとシグナル強度はやや弱めで、非特異的バックグラウンドシグナルは少ない。

OptiView ALK キットでは、シグナル増幅のためドット状に染色され、シグナル強度は強く、非特異的シグナルも強い傾向がある⁵²。

3-4. 検出法（増感法）

通常の現在ルーチン検査で用いられている IHC 法では、ポリマー法などの検出法が用いられているが、肺癌の ALK IHC においては高感度法を用いる必要がある。iAEP キットではリンカー法が（図 8）、OptiView ALK キットではタイラマイド法が用いられている。

4. NGS 法

オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム(以

⁴細胞の核から抽出される DNA は genomic DNA（染色体 DNA）であり、これにはタンパク質合成の設計図となる部分（エクソン）とタンパク質には翻訳されない部分（イントロン）がある。タンパク質合成の前にまず DNA はメッセンジャーRNA(mRNA)に転写（transcription）されるが、この際イントロン部分が飛ばして転写される。これをスプライシング(splicing)と呼ぶ。さらに mRNA からタンパク質が合成される過程を翻訳（translation）という。RNA から上述の逆転写酵素を用いて合成された DNA を cDNA(complementary DNA)といい、イントロン部分がない。これに対して染色体 DNA を gDNA と記載することがある。

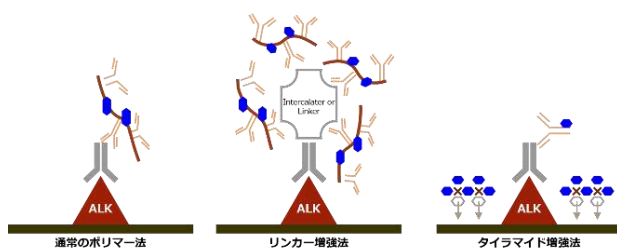


図 8. 免疫染色による増感法
図では通常のポリマー法と感度増強法の違いを示している。

下、オンコマイン DxTT)、Foundation One CDx がんゲノムプロファイル (以下、Foundation One CD x) Foundation One Liquid CDx がんゲノムプロファイル (以下、Foundation One Liquid CDx) GenMineTOP がんゲノムプロファイリングシステム (以下、GenmineTOP) 肺がんコンパクトパネル Dx マルチコンパニオン診断システム (以下、コンパクトパネル) などのコンパニオン診断テストを含んだ遺伝子パネル検査が IVD として認可されている。日本肺癌学会ではこれらのコンパニオン診断部分に対して手引きを作成しており、詳細はそれを参照されたい。ALK 検査において NGS 法として知っておかなくてはならないのは、オンコマイン DxTT、コンパクトパネルはアンプリコンシーケンスであり、既存の融合遺伝子しか検出ができないのに対し、Foundation One CDx および Foundation One Liquid CDx、GenmineTOP は capture hybrid 法を用いているため、これまで報告されていないパートナーとの融合遺伝子も検出できる点である。オンコマイン DxTT および Foundation One CDx、GenmineTOP はいずれの方法も 20%以上、コンパクトパネルは 5%以上の腫瘍細胞含有量を有する検体に対してのテストであり、検体を提出する前に病理診断医による確認が必要である。また、Foundation One Liquid CDx は血液検体を用いるため、検体の採取に関して侵襲性が低く採取しやすいというメリットがある一方で、ctDNA (circulating tumor DNA : 血中循環腫瘍 DNA)の量が不十分な場合、正確な検査結果が得られない可能性があることに留意する必要がある。さらに組織検体と血液検体における検査結果の一致率は 74.6%とする報告もあり検査結果の解釈には注意を要する⁵³。

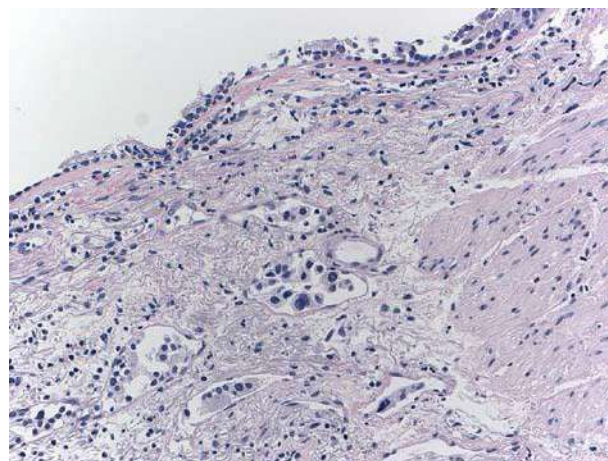


図 9. TBLB による組織標本の一例
腫瘍細胞は気管支粘膜内のリンパ管に沿って進展しており、免疫染色 (TTF-1 陽性) とあわせて腺癌と診断できるが、十分な腫瘍細胞が得られないため、FISH 法による ALK テストには不適切と判断された。ALK テスト用の検体は病理医により評価される必要がある。

5. 標本の選択

上記の ALK 検査法を施行するため、手術切除標本、転移巣の切開生検標本、内視鏡や針生検などによる小生検組織、胸水細胞診検体など様々な検体が用いられている。これらの組織内に腫瘍細胞が含まれていなければ、その組織から得られる結果は意味ももたず、偽陰性の原因にもなる。そのため、ALK 検査法の種類に応じた十分量の腫瘍細胞が検体内に含まれていることを病理部門が確認する必要がある。例えば図 9 の検体が得られた場合、すべての腫瘍細胞で FISH 法によるシグナル観察が可能であっても、規定である 100 個の腫瘍細胞は得られないため、腺癌と診断できたとしても FISH 法による ALK 検査は原則不可と評価すべきである。それぞれの検体種ごとのおおよその目安を表 4 に示した。特に細胞の変性が強い傾向をもつ生検組織は十分な観察のうえで ALK 検査に供されるべきか決定されるべきである。

5-1. セルブロック作製の推奨

組織をもとにした標本ではいずれの検索方法においても問題はないが (図 10-1)、細胞検体では工夫が必要である (図 10-2)。胸水検体などの細胞検体のみで、検査が必要な場合はセルブロックの作製が推奨され、CAP/IASLC/CAP のガイドラインでも、EGFR 変異検査利用も含めて、スミアではなく、セルブロックによる検討を推奨している。いったんセルブロックを作製してしまえば、

表 4. ALK テストに必要な実践的腫瘍細胞量

方法	最低必要細胞	実践的な腫瘍細胞量	備考
FISH法	100個	200-500個以上	すべての細胞で評価可能なシグナルが得られるわけではないため、実際には数百個の腫瘍細胞が必要となる。
IHC法	確実に腫瘍細胞と確定できる細胞1個	100個以上	アーチファクトを除外したり、神経内分泌形態や粘液産生細胞であることを認識するためには、組織構築をある程度判断できる腫瘍細胞量が必要。また、免疫染色による TTF-1 陽性所見や神経内分泌マーカー陰性所見はサンプル適否の判断に重要な参考所見になる。
RT-PCR法	1%以上の腫瘍細胞含有率	5%以上の腫瘍細胞含有率	<i>EML4-ALK</i> の場合、プライマー配列の特徴から RT-PCR 法は極めて感度が高い。しかしながら、細胞診で確実に腫瘍細胞陽性と判断できるのは、施設にもよるが、おおよそ 5%以上であり、細胞診陽性所見なしでの結果は意味がないと評価される。
NGS法	20%以上の腫瘍細胞核含有率*	20%以上の腫瘍細胞核含有率*	Hybrid Capture 法および Amplicon 法いずれにおいても平均リード数が 1000-2000 であり、実際の検出感度は RT-PCR 法よりさらに高い 20% の腫瘍含有量が必要とされている（*コンパクトパネルは 10% 以上の腫瘍含有量）。

腺癌・扁平上皮癌を区別するための IHC 法検査、*EGFR* 変異検査、ALK IHC 法および FISH 法検査、すべてに利用可能である。セルブロックの作製に関しては様々な方法が用いられているが、標準化はされていない。FISH プローブキット（アボット社）の 2014 年 7 月の添付文書改訂に伴い、対象検体に FFPE 細胞ペレットが追加されたことから、細胞をホルマリン固定する作製法を選択すべきである。代表的な方法について表 5 にまとめた。

表 5. 代表的なセルブロック作成法

細胞ボタン方法

- a. 吸引サンプルまたはサイトスピン検体を、拡散したり塗り付けたりしないように、スライドグラス上に静かに1滴滴下する。
- b. 数秒間付着させた後に、スライドを注意深くエタノールに浸漬して固定する。
- c. 固定が終わったボタン様の滴下物を静かにメスの刃で剥がし、生検標本と同様に処理する。

血漿トロンビン法

- a. 細胞診材料を2,500rpmで10分間遠心分離機にかける。
- b. 上清を取り除く。
- c. 2滴の沈殿物をピペットで先細の小チューブ（エッペンドルフチューブなど）へ移す。
- d. 200 μ Lの血漿を加えて、標本を短時間ミキサーで混和する。
- e. 50 μ Lのトロンビンを加えて、標本を短時間ミキサーで混和する。
- f. 標本を5分間インキュベートする。
- g. ゲル化した細胞塊を埋め込みカセット（2つのフィルターパッドの間）に入れ、カセットを閉じる。
- h. 10%緩衝ホルマリン液中で材料を固定する。
- i. 固定標本を取り出し、生検の小標本と同様に処理する。

アルギン酸ナトリウム法

- a. 液状検体の遠心沈殿物を、10%緩衝ホルマリン液内で溶解、浮遊させ2-3時間固定する。
- b. 遠心分離機によって固定細胞のペレットを集め、ホルマリン上清を注ぎ落とし、蒸留水で洗浄する。
- c. 遠心分離機にかけ、ペレットを0.5mLの1%アルギン酸ナトリウムで再浮遊させる。
- d. ナトリウムカルシウム（1M）を溶液に加え、ゲル化させる。
- e. ゲル化した材料を鉗子で採取し、生検の小標本と同様に処理する。

グルコマンナン法

- a. 液状検体の遠心沈殿物を、10%緩衝ホルマリン液内で溶解、浮遊させ2-3時間固定する。
- b. 遠心分離機によって固定細胞のペレットを集め、ホルマリン上清を注ぎ落とし、蒸留水で洗浄する。
- c. 遠心分離機にかけ、ペレットをグルコマンナン-ホルマリン溶液（HOLDGEL 110:アジア器材）に加える。
- d. メタノールに3時間以上浸し、グルコマンナンをゲル化させる。
- e. ゲル化した材料を鉗子で採取し、生検の小標本と同様に処理する。

IASLC ALK/ROS1 Atlas より

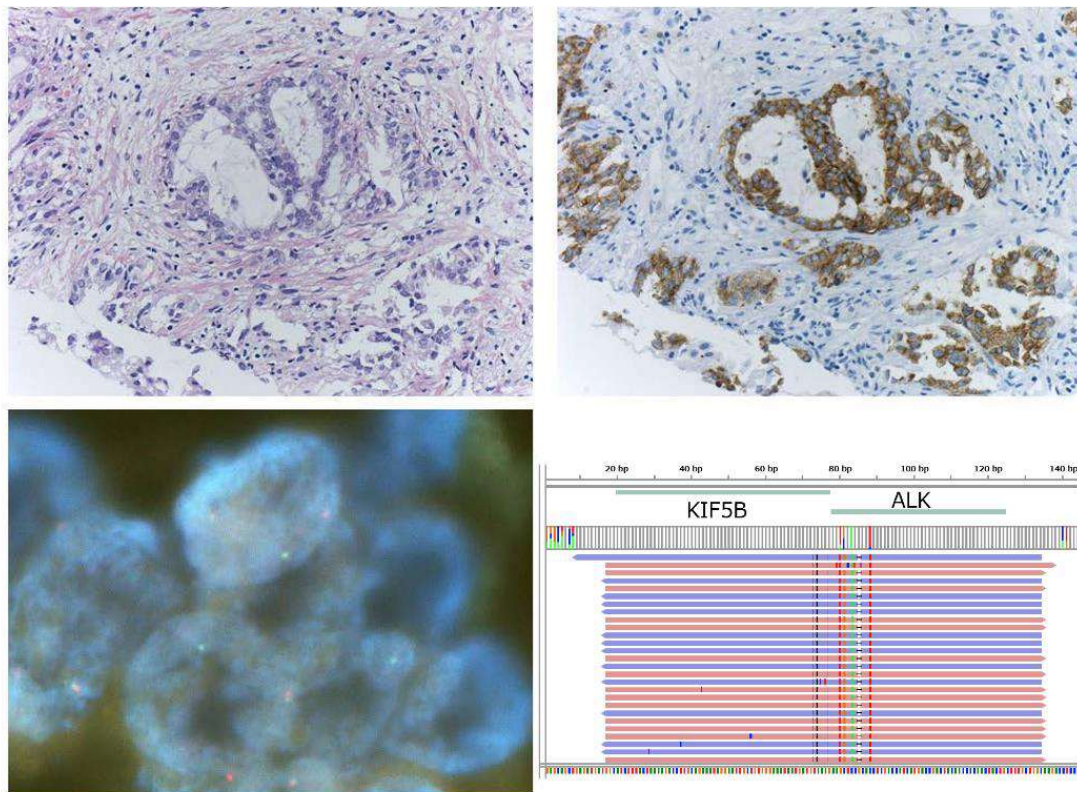


図 10-1. 生検組織での検出例

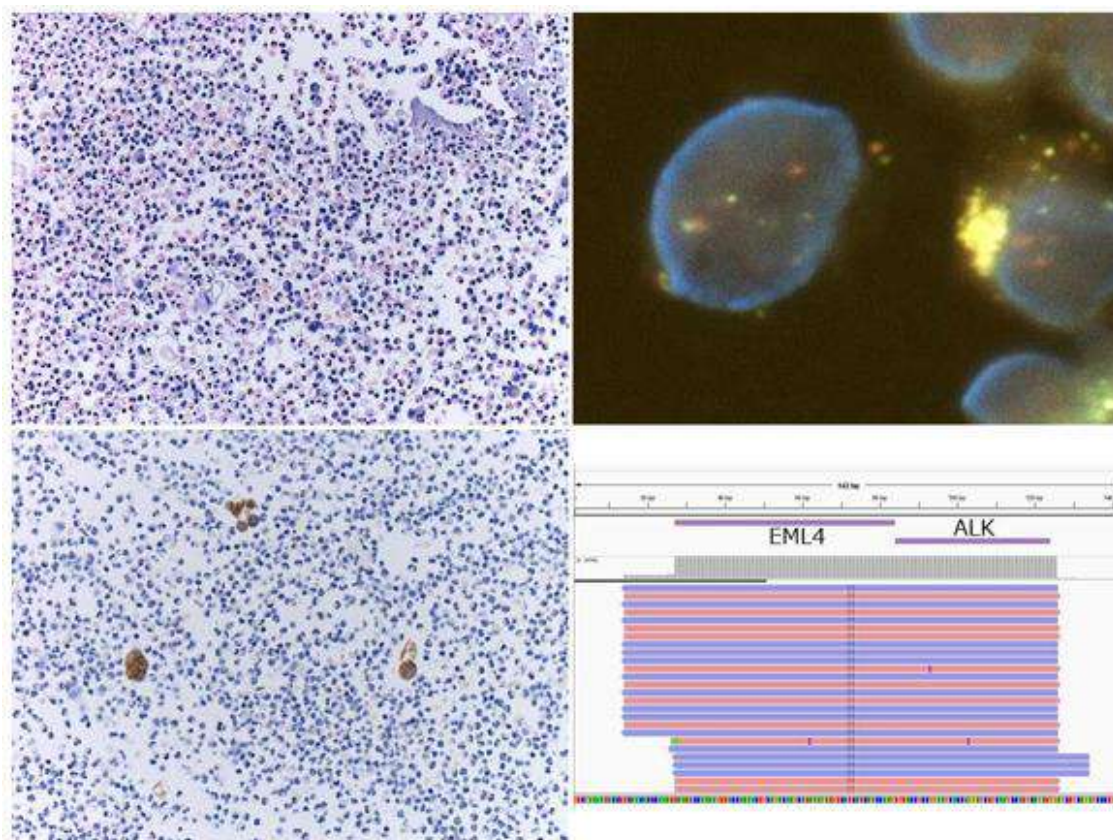


図 10-2. 細胞診セルブロックにおける検出例

(7) 結果の報告

腫瘍の分子病理診断の標準的な報告と同様に、ALK 検査も、解析前(preanalytic)、解析(analytic)、結果(results)、および解釈/結論(interpretation/conclusion)について以下の内容が記載されている必要がある。

解析前セクション

患者情報および標本の種類および診断の概要が記載される必要がある。

標本の種類：切除標本、切開生検、生検組織(気管支/経気管支生検、針生検)、FNA 細胞診、液状検体(胸水、脊髄液)

組織の提出状態：ホルマリン固定標本、セルブロック標本、これらの未染標本（標本の種類を記載する）

腫瘍細胞の評価：

- IHC 法、FISH 法、および/または RT-PCR 法検査のために検体に十分量の腫瘍細胞があるか否かを評価するための、切片内での推定される腫瘍細胞割合（切片内のすべての核と比較した腫瘍細胞の核のパーセント）およびその評価者氏名
- マクロダイセクションなどの手法により腫瘍細胞に富んだ領域を選択したか否か：施行した場合はその後の DNA/RNA が抽出される組織での腫瘍細胞割合
- 壊死の範囲、炎症性細胞浸潤、炭肺、および組織のアーティファクトの有無
- 情報があれば、追加診断用免疫組織化学マーカー、例えば TTF-1、p63/p40、および粘液染色による検査結果

総合的な標本の適切性：「検査に適正」あるいは「不適 (suboptimal)」の別。不適切であった場合はその理由を述べる。

解析セクション

解析方法の検出感度および診断基準とともに、基本的な操作手順記載される。再検査や検査施設間の結果の相違に備えて、別の検査施設が何を行ったのか理解できるよう

に十分な情報を提供すべきである。

- ALK FISH 法：使用試薬名および陽性結果判定に使用される診断基準
- ALK IHC 法：使用試薬名、抗体の濃度、インキュベーション時間および温度、および二次シグナルの増強システム
- ALK RT-PCR 法：方法、プライマー、プローブおよびその陽性コントロール、解析法の検出感度

ALK 検査に限らず、精度管理は遺伝子検査の重要な情報である。精度管理の種類、施行時期、結果について簡便に記載すべきである。

結果セクション

検査結果を記載する。偶然見つかった所見やその意義がわからないバリエーションなども含まれる。結果が不確定である場合は、それを明確に記載すべきである。結果は、腫瘍医および専門外の病理医が容易に結果を理解できるように ALK 融合遺伝子陽性または陰性として報告されるべきである。また、得られた付加的情報についても記載されるべきである。

- ALK FISH 法：解析された細胞の数および陽性パターンを示した細胞の数とパーセント。非定型パターンがみられたら、International Systems for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)による表記がなされるべきである。
- ALK IHC 法：陽性腫瘍細胞パーセント、染色強度、および染色パターンとともに、結果は陽性、陰性または評価不能として報告されるべきである。結果が評価不能の場合、その理由について説明をすべきである。
- ALK RT-PCR 法：これまで、「バリエーション 1」などと記載されてきたが、融合パターン、例えば *EML4-ALK* (E13;A20)、についての情報も付け加えることが推奨されている。（詳細な命名法は <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/inv2p21p23NSCCLungID5667.html> で入手可能）
- NGS 法：標準的な遺伝子パネル報告の記載についての推奨に沿った報告様式を用いる^{54, 55}。

解釈/結論

以下の項目が含まれるべきである。

容易で理解しやすい臨床的解釈: これは遺伝子検査結果や腫瘍が、ALK 阻害薬治療に反応するかもしれないか、もしくは抵抗するかの可能性(臨床的エビデンスを考慮しながら)も含まれる。

評価不能であった場合、同一標本での再検査の意義や他の標本を用いた検討の可能性について記載されるべきである。

(8) ALK 遺伝子検査のアルゴリズム(図 11)

これまで ALK 融合遺伝子を検出には、IHC によるスクリーニングを行い、陽性であれば、FISH でそれを確認するアルゴリズムが用いられてきた。ALK 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌は非小細胞肺癌の 4-5%を占めるにすぎず、

迅速で効率の良いスクリーニングが臨床的に求められてきたからである。しかしながら、IHC と FISH による結果の一致率は非常に高く、不一致があった場合にもその原因についての解析も進んでいる。これらの状況の変化を背景に、改訂版 CAP/IASLC/AMP 遺伝子検査ガイドラインでは、ALK IHC を FISH に並ぶ患者選択の手段として十分な性能を有することをシステムティックレビューで示した。また、米国 FDA および本邦においても、コンパニオン診断の改定が行われ、IHC での患者選択が可能になった。したがって、これまで IHC 陽性所見が得られた後に行っていた FISH は必要とされなくなった。また、近年は ALK 融合遺伝子結果もわかる遺伝子パネル検査(NGS 法、RT-PCR 法)もコンパニオン診断として加わり、これらの結果のみでも患者選択可能となった。

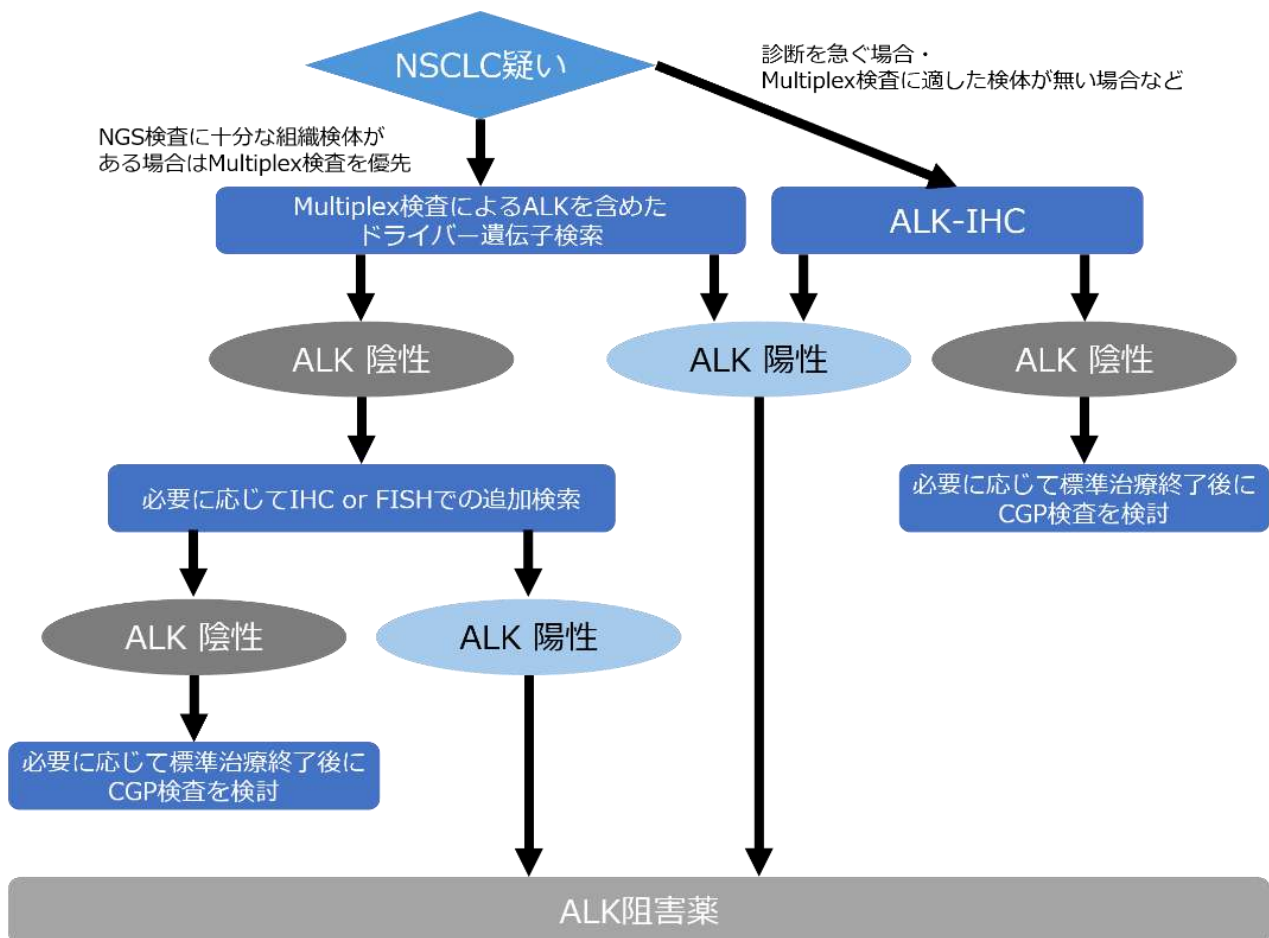


図 11. ALK 遺伝子検査のアルゴリズム

これら4つの検査方法を用いることができるが、それぞれの検査で、以下のpitfallsもあることが知られている。

FISH 法	<ul style="list-style-type: none"> 陽性細胞が境界領域にある場合は、その結果は不安定であることが多い。 isolated 5' predominant パターンに代表される非定型的シグナルでは規定上は陰性となるものの、ALK 融合遺伝子陽性例が含まれることが知られている。
IHC 法	<ul style="list-style-type: none"> 小細胞癌や神経内分泌大細胞癌では陽性反応が認められることがある。これは部分的なことが多いが、強いシグナルの場合もある。 マクロファージなどに非特異的な強陽性像で、腫瘍細胞が確認できず、陽性とされる場合もある。これは特に生検組織に多い。
NGS 法	<ul style="list-style-type: none"> 結果が得られる検査成功率が高くないため、結果が出てこない場合もある。
RT-PCR 法	<ul style="list-style-type: none"> NGS 法ほどではないがある程度の検体量と質が求められ、結果が左右される可能性がある。

これらの方法のどれを選択すべきかはそれぞれの施設での状況もあると考えられるが、それぞれのアッセイで長所および短所があり、いずれの方法も少数例ながら検出できない症例も出てくる。1つの方法のみならず、結果が確実といえない場合もしくは臨床病理像から ALK 融合遺伝子が少しでも疑われる場合は、異なる方法で再検査をすべきである。ETOP での検証では、IHC を施行するとともに、FISH、RT-PCR、NGS のいずれかを施行し、一致した結果が得られることを推奨している⁵⁶。

なお、結果が確実とはいえない場合とは、FISH における非定型シグナルや、境界領域での陽性細胞数を指す。免疫染色においては、小細胞癌や神経内分泌癌を否定できない場合、弱陽性像 (H-Score 120 以下) や不均一陽性像などを指す。また、臨床病理学的な像と異なる場合とは、若年腺癌や、組織学的な特徴をもつ腺癌(粘液産生を伴う篩状増生パターンを示す腺癌や、印環細胞癌などの TTF-1 陽性の粘液産生性腺癌)で陰性となる場合などが対象となる。

(9) ALK 検査の保険適用

2021年7月現在、IVD 承認コンパニオン体外診断薬として以下の検査がある。なお、冒頭でも述べたが、ALK 阻害薬とそのコンパニオン診断薬に関する情報は頻りに更新されるため、最新の情報については常に PMDA ホームページ内のコンパニオン診断薬等の情報 (<https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/review-information/cd/0001.html>) を確認頂きたい。

● FISH: N005-2 ALK 融合遺伝子標本作製 6520 点

ALK 阻害薬の投与の適応を判断することを目的として、FISH 法により遺伝子標本作製を行った場合に、当該薬剤の投与方針の決定までの間に1回を限度として算定する。

● IHC: N002 免疫染色(免疫抗体法)病理組織標本作製、6. ALK 融合タンパク 2,700 点

ALK IHC 適応の際の通知: 非小細胞肺癌患者に対して、ALK 阻害薬の投与の適応を判断することを目的として、ブリッジ試薬を用いた免疫組織染色法により病理標本作製を行った場合に、当該薬剤の投与方針の決定までの間に1回を限度として算定する。

● RT-PCR:

肺癌関連遺伝子多項目同時検査 (7項目) 12,500 点

D006-24 肺癌関連遺伝子多項目同時検査 10,000 点

D004-2 悪性腫瘍組織検査

1 悪性腫瘍遺伝子検査 イ(1) 2,500 点

肺癌患者の腫瘍組織を検体として EGFR/ROS1/ALK/BRAF/MET/KRAS/RET の遺伝子検査をリアルタイム PCR 法により同時に実施した場合に1回に限り算定する。

● NGS:

・オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム:
18,000 点

D004-2 悪性腫瘍組織検査

1 悪性腫瘍遺伝子検査

注 1 □ 3 項目 6,000 点

注 2 □ 3 項目以上 12,000 点

注：以下の FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイルおよび FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル検査は、ALK 陽性肺がんにおけるいくつかの ALK-TKI のコンパニオン診断薬として承認されているが、実際にはがんゲノム外来を通じて行われるエキスパートパネル検査において施行されなければ保険点数の問題などもあり、個別に行われることはないと考えられる。

・ FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル：
56,000 点

D006-19 がんゲノムプロファイリング検査
48,000 点

B011-5 がんゲノムプロファイリング評価提供料
12,000 点

・ FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル：
56,000 点

D006-19 がんゲノムプロファイリング検査
48,000 点

B011-5 がんゲノムプロファイリング評価提供料
12,000 点

血液検体を用いた CGP 検査については、2022 年度の診療報酬改定において、組織検体を用いた CGP 検査ができない場合に算定が可能であることに加え、組織検体を用いた CGP 検査で結果を得られなかった場合に 2 回目の CGP 検査として血液検体を用いた CGP 検査を行うことができるようになった。

(10) おわりに・・・実地診療と ALK

ALK 陽性肺癌は全肺癌の数パーセントを占めるにすぎず、その対象は限られている。しかしながら、ALK 転座肺癌において ALK チロシンキナーゼ阻害薬の効果は著明であることが多く、正しい患者選択を行うことが最重要であることはいうまでもない。しかし、ALK 肺癌の診断は、肺癌における EGFR、乳癌や胃癌における HER2 検査などの種々の遺伝子検査の中にあっても難しい点が多い。日本肺癌学会が中心となって衆中の知恵を結集し、この頻度は低いが治療効果の高い遺伝子変異をもつ肺癌の個別化治療を成功させたいものである。このために本手引きが一助となれば幸いである。

参考文献

1. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-566.
2. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693-1703.
3. Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer science* 2008;99:2349-2355.
4. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190-1203.
5. Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19893-19897.
6. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, et al. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:11-23.
7. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3143-3149.
8. Wong DW, Leung EL, Wong SK, et al. A novel KIF5B-ALK variant in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011.
9. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res* 2012;18:1167-1176.
10. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013;8:823-859.
11. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:1472-1482.
12. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol* 2009;22:508-515.
13. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 2009;15:5216-5223.
14. Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer--early successes and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:268-277.
15. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368:2385-2394.
16. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:2167-2177.
17. Solomon BJ, Kim DW, Wu YL, et al. Final Overall Survival Analysis From a Study Comparing First-Line Crizotinib Versus Chemotherapy in ALK-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:2251-2258.
18. Hida T, Nokihara H, Kondo M, et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* 2017;390:29-39.
19. Seto T, Kiura K, Nishio M, et al. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol* 2013;14:590-598.
20. Tamura T, Kiura K, Seto T, et al. Three-Year Follow-Up of an Alectinib Phase I/II Study in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: AF-001JP. *J Clin Oncol* 2017;35:1515-1521.
21. Nakagawa K, Hida T, Seto T, et al. Antitumor activity of alectinib (CH5424802/RO5424802) for ALK-rearranged NSCLC with or without prior crizotinib treatment in bioequivalence study. *J Clin Oncol* 2014;32:abstr 8103.
22. Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol* 2014;15:1119-1128.
23. Hida T, Seto T, Horinouchi H, et al. Phase II study of ceritinib in alectinib-pretreated patients with anaplastic lymphoma kinase-rearranged metastatic non-small-cell lung cancer in Japan: ASCEND-9. *Cancer science* 2018;109:2863-2872.
24. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017;377:829-838.
25. Gadgeel S, Peters S, Mok T, et al. Alectinib versus crizotinib in treatment-naive anaplastic lymphoma kinase-positive (ALK+) non-small-cell lung cancer: CNS efficacy results from the ALEX study. *Ann Oncol* 2018;29:2214-2222.
26. Mok T, Camidge DR, Gadgeel SM, et al. Updated overall survival and final progression-free survival data for patients with treatment-naive advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer in the ALEX study. *Ann Oncol*. 2020;31:1056-1064
27. Shaw AT, Kim DW, Mehra R, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;370:1189-1197.
28. Crino L, Ahn MJ, De Marinis F, et al. Multicenter Phase II Study of Whole-Body and Intracranial Activity With Ceritinib in Patients With ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer

- Previously Treated With Chemotherapy and Crizotinib: Results From ASCEND-2. *J Clin Oncol* 2016;34:2866-2873.
29. Hida T, Satouchi M, Nakagawa K, et al. Ceritinib in patients with advanced, crizotinib-treated, anaplastic lymphoma kinase-rearranged NSCLC: Japanese subset. *Jpn J Clin Oncol* 2017;47:618-624.
 30. Shaw AT, Kim TM, Crinò L, et al. Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK -rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2017;18:874-886.
 31. Soria J-C, Tan DSW, Chiari R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK - rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* 2017;389:917-929.
 32. Cho BC, Kim D-W, Bearz A, et al. ASCEND-8: A Randomized Phase 1 Study of Ceritinib, 450 mg or 600 mg, Taken with a Low-Fat Meal versus 750 mg in Fasted State in Patients with Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)-Rearranged Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *J Thorac Oncol*. 2017;12:1357-1367.
 33. Cho BC, Obermannova R, Bearz A, et al. Efficacy and Safety of Ceritinib (450 mg/d or 600 mg/d) With Food Versus 750-mg/d Fasted in Patients With ALK Receptor Tyrosine Kinase (ALK)-Positive NSCLC: Primary Efficacy Results From the ASCEND-8 Study. *J Thorac Oncol*. 2019;14:1255-1265.
 34. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer discovery* 2016;6:1118-1133.
 35. Shaw AT, Felip E, Bauer TM, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:1590-1599.
 36. Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018;19:1654-1667.
 37. Besse B, Solomon B, Felip E, et al. Lorlatinib in patients (Pts) with previously treated ALK+ advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Updated efficacy and safety. *J Clin Oncol* 2018;36:Abstr 9032.
 38. Shaw AT, Martini JF, Besse B, et al. Efficacy of lorlatinib in patients (pts) with advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) and ALK kinase domain mutations. *AACR Annu Meeting 2018:ABstr CT044*.
 39. Bauer TM, Shaw AT, Johnson M, et al. Brain Penetration of Lorlatinib and Cumulative Incidence Rates for CNS and Non CNS Progression from a Phase 1/2 Study. *J Thorac Oncol* 2018;2018:S382-S383.
 40. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, et al. First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383:2018-2029.
 41. Camidge DR, Kim HR, Ahn M-J, et al. Brigatinib Versus Crizotinib in Advanced ALK Inhibitor-Naive ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Second Interim Analysis of the Phase III ALTA-1L Trial. *J Clin Oncol*. 2020;38:3592-3603.
 42. Nishio M, Yoshida T, Kumagai T, et al. Brigatinib in Japanese Patients With ALK-Positive NSCLC Previously Treated With Alectinib and Other Tyrosine Kinase Inhibitors: Outcomes of the Phase 2 J-ALTA Trial. *J Thorac Oncol*. 2021;16:452-463.
 43. Camidge DR, Kim HR, Ahn M-J, et al. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379:2027-2039.
 44. Watanabe S, Hayashi H, Okamoto K, et al. Progression-Free and Overall Survival of Patients With ALK Rearrangement-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Treated Sequentially With Crizotinib and Alectinib. *Clin Lung Cancer* 2016;17:528-534.
 45. Duruisseaux M, Besse B, Cadranet J, et al. Overall survival with crizotinib and next-generation ALK inhibitors in ALK- positive non-small-cell lung cancer (IFCT-1302 CLINALK): a French nationwide cohort retrospective study. *Oncotarget* 2017;8:21903-21917.
 46. Asao T, Fujiwara Y, Itahashi K, et al. Sequential Use of Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors in Japanese Patients With ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin Lung Cancer* 2017;18:e251-e258.
 47. Lin JJ, Zhu VW, Yoda S, et al. Impact of EML4-ALK Variant on Resistance Mechanisms and Clinical Outcomes in ALK- Positive Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:1199-1206.
 48. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2013.
 49. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res* 2008;14:6618-6624.
 50. Maitra A, Wistuba, II, Virmani AK, et al. Enrichment of epithelial cells for molecular studies. *Nat Med* 1999;5:459- 463.
 51. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, 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.
 52. Marchetti A, Di Lorito A, Pace MV, et al. ALK Protein Analysis by IHC Staining after Recent Regulatory Changes: A Comparison of Two Widely Used Approaches, Revision of the Literature, and a New Testing Algorithm. *J Thorac Oncol* 2016;11:487-495.
 53. Shu Y, Wu X, Tong X, et al. Circulating Tumor DNA Mutation Profiling by Targeted Next Generation Sequencing Provides Guidance for Personalized Treatments in Multiple Cancer Types. *Sci Rep*. 2017;7:583.
 54. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in

Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:4-23.

55. 合同ワーキング・グループ. 次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドライン (第 1.0 版) .2017/10/11. Available at https://www.jsmo.or.jp/about/doc/20171011_01.pdf.
56. Letovanec I, Finn S, Zygoura P, et al. Evaluation of NGS and RT-PCR Methods for ALK Rearrangement in European NSCLC Patients: Results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *J Thorac Oncol* 2018;13:413-425.
57. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2018;13:323-358.
58. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142:321-346.
59. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2018;20:129-159.
60. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, et al. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2018;JCO2017767293.

追補 1. 改定版 CAP/IASLC/AMP チロシンキナーゼ阻害薬標的治療の患者選択のための遺伝子検査ガイドライン

Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment with Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors

Journal of Thoracic Oncology, Volume 13, Issue 3, Pages 323-358 (March 2018) ⁵⁷

DOI: 10.1016/j.jtho.2017.12.001

Archives of Pathology & Laboratory Medicine, Volume 142, Issue 3, Pages 321-346 (March 2018) ⁵⁸

DOI: 10.5858/arpa.2017-0388-CP.

Journal of Molecular Diagnostics, Volume 20, Issue 2, Pages 129-159 (March 2018) ⁵⁹

DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.11.004

表 3. アップデートされた推奨の概要（推奨度つき）⁵⁷

2013年推奨	2018年推奨
<p>専門家統一見解: 細胞検体は <i>EGFR</i> および <i>ALK</i> 検査に適している。 セルブロック標本がスメア標本よりも望ましい。</p>	<p>推奨: 病理医はセルブロックやその他の細胞診検体を肺癌バイオマーカー遺伝子検査に適した検体として用いることができる。</p>
<p>専門家統一見解: 検査室は、<i>EGFR</i> 検査として、少なくとも 50%の腫瘍細胞を有する検体で変異を検出可能な検査法を用いるべきであり、10%程度の腫瘍細胞を含む検体でも検出可能なより感度の高い検査法を用いる（もしくはそれが可能な外部検査機関を持つ）ことが推奨される。</p>	<p>専門家統一見解: 検査室は 20%程度の腫瘍細胞を含む検体で分子異常を検出可能な肺癌バイオマーカー遺伝子検査法を用いる、もしくはそれが可能な外部検査機関を持つべきである。</p>
<p>推奨: EGFR-TKI 治療の患者選択に <i>EGFR</i> 免疫染色を用いることを推奨しない。</p>	<p>強い推奨: 検査室は免疫染色による総 <i>EGFR</i> 発現量を EGFR-TKI 治療の患者選択に用いるべきではない。</p>

表 4. ガイドライン 2018 推奨一覧⁵⁸

ガイドライン推奨	推奨度
Key Question 1: 肺癌患者に対しどの新しい遺伝子を検査すべきか？	
1. <i>ROS1</i> 検査は臨床的特徴にかかわらず、すべての肺腺癌患者において行わなければならない。	強く推奨
2. <i>ROS1</i> タンパクのIHCは肺腺癌患者においてスクリーニング検査として使用することができる*1。しかし、 <i>ROS1</i> タンパクの IHC が陽性であった場合には、他の分子学的もしくは細胞遺伝学的診断法を用いて確認すべきである。	専門家統一見解
3. <i>BRAF</i> 遺伝子検査は、臨床試験を除いて、ルーチンの単独検査としては必要ない。多数のパネル検査の一遺伝子として、初回診断もしくは <i>EGFR</i> 、 <i>ALK</i> 、 <i>ROS1</i> 検査が陰性であった場合は、 <i>BRAF</i> を含めることは妥当である。	専門家統一見解
4. <i>RET</i> 遺伝子検査は、臨床試験を除いて、ルーチンの単独検査としては必要ない。多数のパネル検査の一遺伝子として、初回診断もしくは <i>EGFR</i> 、 <i>ALK</i> 、 <i>ROS1</i> 検査が陰性であった場合は、 <i>RET</i> を含めることは妥当である。	専門家統一見解
5. <i>ERBB2 (HER2)</i> 遺伝子検査は、臨床試験を除いて、ルーチンの単独検査としては必要ない。多数のパネル検査の一遺伝子として、初回診断もしくは <i>EGFR</i> 、 <i>ALK</i> 、 <i>ROS1</i> 検査が陰性であった場合は、 <i>ERBB2 (HER2)</i> を含めることは妥当である。	専門家統一見解
6. <i>KRAS</i> 遺伝子検査は、臨床試験を除いて、ルーチンの単独検査としては必要ない。多数のパネル検査の一遺伝子として、初回診断もしくは <i>EGFR</i> 、 <i>ALK</i> 、 <i>ROS1</i> 検査が陰性であった場合は、 <i>KRAS</i> を含めることは妥当である。	専門家統一見解
7. <i>MET</i> 遺伝子検査は、臨床試験を除いて、ルーチンの単独検査としては必要ない。多数のパネル検査の一遺伝子として、初回診断もしくは <i>EGFR</i> 、 <i>ALK</i> 、 <i>ROS1</i> 検査が陰性であった場合は、 <i>MET</i> を含めることは妥当である。	
Key Question 2: 遺伝子検査ではどのような方法を用いるべきか？	
8. <i>ALK</i> 検査において IHC は FISH と同等の代替法である。	推奨
9. <i>EGFR</i> 、 <i>ALK</i> 、 <i>ROS1</i> 以外の治療選択肢を決定するためには、複数の単一遺伝子検査を行うよりも、遺伝子パネル検査が望ましい。	専門家統一見解
10. 検査室は、予期しない、一致しない、曖昧な、信頼性が低い結果が得られた場合、他の方法もしくは検体を用いて確認もしくは解決し検査結果を保証すべきである。	専門家統一見解
Key Question 3: 腺癌成分を含まない肺癌において遺伝子検査を行うことは適切か？	
11. 臨床医は臨床的特徴からドライバー変異を有する可能性が高い場合、腺癌以外の組織型において遺伝子バイオマーカー検査を行ってもよい。	専門家統一見解
Key Question 4: 分子標的治療耐性となった患者においてどのような検査が必要か？	
12. 臨床医は、 <i>EGFR</i> -TKI 感受性 <i>EGFR</i> 遺伝子変異を持ち、 <i>EGFR</i> -TKI 治療後に増悪した肺腺癌患者において、第三世代 <i>EGFR</i> -TKI 治療適応を判断するために、 <i>EGFR</i> T790M 変異検査を行わなければならない。	専門家統一見解
13. <i>EGFR</i> -TKI耐性となった患者における <i>EGFR</i> T790M 検査では、腫瘍細胞が5%と少ない検体においても <i>EGFR</i> T790M 変異を検出可能な検査法を用いるべきである。	推奨
14. <i>ALK</i> -TKI 感受性変異を持ち、 <i>ALK</i> -TKI 耐性となった肺腺癌患者に対して <i>ALK</i> 遺伝子変異をルーチンに検査するかしないか、現時点での根拠は不十分である。	推奨度なし
Key Question 5: 肺癌患者における血中遊離 DNA テストの役割はなにか？	
15. 現時点では、血漿遊離 DNA テストを用いて原発性肺腺癌の診断とすることを裏付ける根拠は不十分である。	推奨度なし
16. 臨床医は、組織検体が遺伝子検査を行うには少なかつたり不良であったりした場合には、 <i>EGFR</i> 遺伝子変異検査として血漿遊離 DNA 検査を用いることができる。	推奨
17. 臨床医は、 <i>EGFR</i> -TKI 治療後に増悪した肺腺癌患者において、 <i>EGFR</i> T790M 変異検査として血漿遊離 DNA 検査を用いることができる。ただし血漿検査が陰性であった場合は、組織検体を用いた検査が推奨される。	専門家統一見解
18. 現時点で、原発性肺腺癌の診断、 <i>EGFR</i> やその他の遺伝子変異の同定、 <i>EGFR</i> -TKI 耐性時の <i>EGFR</i> T790M 変異検査として循環腫瘍細胞を用いた遺伝子検査の使用を裏付ける根拠は不十分である。	推奨度なし

略語: FISH, fluorescence in situ hybridization; IHC, immunohistochemistry, 免疫組織化学的検査, TKI, tyrosine kinase inhibitor, チロシンキナーゼ阻害薬

*1 訳者注: 具体的な免疫染色の方法については、CAP免疫染色における分析検証ガイドライン (Arch Pathol Lab Med. 2014;138:1432-1443)などを参照し、十分な検証を行うとともに慎重な運用が望まれる。

表 2. 推奨度の強さ⁵⁹

推奨カテゴリー	推奨内容	根拠
強い推奨 (strong recommendation)	肺癌における特定の遺伝子検査の 施行が勧められるもしくは行わな いよう勧められる。 (must, shouldが含まれる)	確信できる(高い)もしくは適切 な(中等度)の質をもったエビデ ンスによって裏付けられるか、あ らゆる害に勝る明らかな益がある 場合。
推奨 (recommendation)	肺癌における特定の遺伝子検査の 施行が勧められるもしくは行わな いよう勧められる。 (should, mayが含まれる)	エビデンスの質(中等度の適性、 低い非適性)や功罪、価値、費用 のバランスにやや制約があるが、 委員が推奨するに足る根拠がある と結論づけた場合。
専門家統一見解 (expert consensus opinion)	肺癌における特定の遺伝子検査の 施行が勧められるもしくは行わな いよう勧められる。 (should, mayが含まれる)	エビデンスの質(低いもしくはか なり低い適正性、低い非適正性) や功罪、価値、費用のバランスに 重大な制約があるが、委員のコン センサスが言及する必要があると する場合。
推奨なし (no recommendation)	肺癌における特定の遺伝子検査に 推奨がない。	推奨を行うだけのエビデンス、確 証、合意が不十分の場合。

追補 2. ASCO Endorsement of CAP/IASLC/AMP Guideline

なお、このCAP/IASLC/AMP updated molecular testing guideline は ASCO によって是認されているが⁶⁰、以下の
点が付記されている。

2013 年のガイドラインの対照表 (表 3)

1. その他の細胞診検体→細胞診スミア:

推奨: 病理医はセルブロックや細胞診スミア検体を肺癌バイオマーカー遺伝子検査に適した検体として用いること
ができる。

新しいガイドライン (表 4)

#3. BRAFテスト: BRAF 検査は、臨床像にかかわらず、すべての進行肺癌患者で施行されるべきである。#11. 臨
床医は次の腫瘍に関しても遺伝子バイオマーカー検査を施行してもよい。

a. 腺癌成分を含む場合

b. 非小細胞癌で、臨床的特徴からドライバー変異を有する可能性が高い場合 (例えば 50 歳以下の年齢や軽度
喫煙者～非喫煙者など)

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-3. ROS1

(2024年4月改訂版)

目次

(1) ROS1 融合遺伝子の種類	2
(2) ROS1 融合遺伝子陽性肺癌の臨床病理学的特徴	3
(3) ROS1 阻害薬の臨床試験	3
1. クリゾチニブ (Crizotinib)	3
2. セリチニブ (Ceritinib)	3
3. エヌトレクチニブ (Entrectinib)	3
4. ロルラチニブ (Lorlatinib)	4
5. タレトレクチニブ (Taletrectinib)	4
6. レポトレクチニブ (Repotrectinib)	4
(4) ROS1 融合遺伝子陽性進行肺癌の治療	4
(5) ROS1 融合遺伝子の診断	5
1. ROS1 融合遺伝子の検出法	5
2. RT-PCR 法 (AmoyDx 社)	5
3. FISH 法	7
4. IHC 法	7
5. マルチ遺伝子検査 (PCR 法/NGS 法)	8
参考文献	9

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

松本 慎吾, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗
淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

ROS1 はインスリン受容体サブファミリーに属し、細胞の増殖および分化に関与する癌原遺伝子受容体型チロシンキナーゼである。ROS1 蛋白質をコードする *ROS1* 遺伝子は染色体 6 番長腕 (6q21) に位置し、全長 127kb、44 エクソンから成る¹。2003 年に Charest ら^{1,2}が、神経膠芽腫の細胞株 U118MG において *ROS1* 遺伝子が *FIG* 遺伝子と融合していることを発見し、この *FIG-ROS1* 遺伝子融合によって ROS1 キナーゼが恒常的に活性化され、悪性細胞への形質転換をもたらすことが報告された。その後、肺癌細胞株や非小細胞肺癌患者において種々の *ROS1* 融合遺伝子が同定され、この融合遺伝子を線維芽細胞に発現させると細胞増殖能や腫瘍形成能を獲得すること、またそれらは ROS1 キナーゼの阻害によって抑制されることが報告された^{3,4}。さらに、*EZR-ROS1* 融合遺伝子を肺胞上皮細胞に発現させたトランスジェニックマウスでは肺腺癌が形成されることも報告されている⁵。これらのことから、*ROS1* 融合遺伝子は *EGFR* 遺伝子変異や *ALK* 融合遺伝子と同じように、非小細胞肺癌の治療標的として注目されるようになった。また、少数例ではあるが、胃癌、大腸癌、胆管癌、卵巣癌、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍、血管肉腫などでも *ROS1* 融合遺伝子の存在が報告されている^{6,7}。

(1) *ROS1* 融合遺伝子の種類

ROS1 融合遺伝子は、*ALK* 融合遺伝子等と同様に、染色体の転座や部分的欠失などによって遺伝子再構成が起こり、*ROS1* 遺伝子と種々のパートナー遺伝子が融合することで生じる⁶。*ROS1* 側の融合点は、RNA レベルでエクソン 32、34、35、36 であり、いずれもキナーゼ領域の上流であるためキナーゼ領域が保持されたまま融合する。*ALK* 融合遺伝子と比較して、*ROS1* と融合するパートナー遺伝子は多く、これまでに様々なパートナー遺伝子が報告されている (図 1)^{8,9,10}。中でも肺癌で高頻度に検出される *ROS1* のパートナー遺伝子は、*CD74*、*EZR*、*SLC34A2*、*SDC4* であり、この 4 種類で約 7 割を占める (図 2)^{10,11}。*ALK* 融合遺伝子と同様に、coiled-coil 領域を有するパートナーとの融合では、この領域による *ROS1* 融合タンパク質の恒常的な二量体化が *ROS1* キナーゼの活性化をも

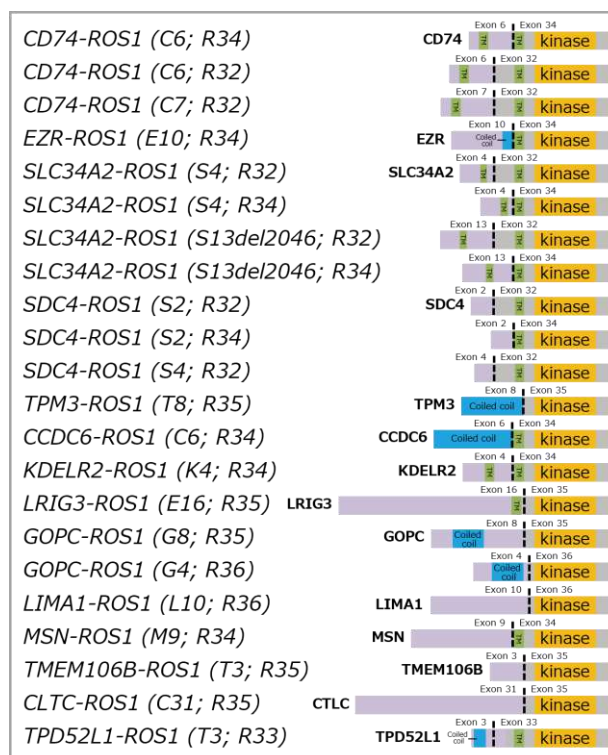


図 1. 肺癌における *ROS1* 融合遺伝子の種類 (文献 8 より引用、改変)

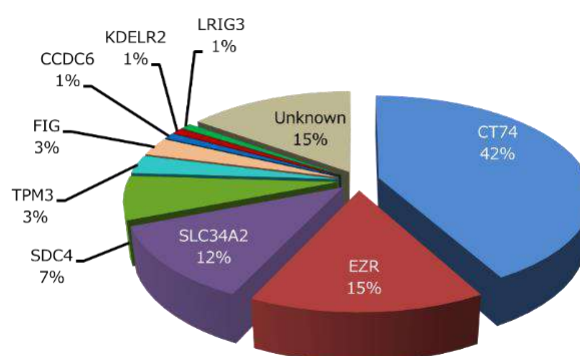


図 2. 肺癌における *ROS1* 融合遺伝子のパートナー別頻度

たらずと考えられるが、coiled-coil 領域を有さないパートナーとの *ROS1* 融合バリエーションも多く、これらのキナーゼ活性化の機序は明らかにされていないものもある⁷。また、*ROS1* キナーゼの活性化による細胞の形質転換は、MAP-ERK kinase, SHP-2, STAT3, AKT などの下流の細胞内シグナルの活性化によってもたらされるが^{12,13,14}、興味深いことに、*ROS1* キナーゼの下流で活性化される分子は、*ROS1* が融合するパートナー遺伝子の種類によって異なる可能性も示唆されている¹⁴。

(2) ROS1 融合遺伝子陽性肺癌の臨床病理学的特徴

ROS1 融合遺伝子の頻度は非小細胞肺癌の約 1~2%であり、この頻度は、日本を含む東アジアと欧米でほぼ同程度であり、EGFR 遺伝子変異に見られるような人種間差はないと考えられている。また、ALK 融合遺伝子陽性肺癌 (ALK 肺癌) と同様に、若年、女性、非喫煙者に多い¹⁰。脳転移がやや多く、ROS1 融合遺伝子陽性の進行肺癌の約 3 割で診断時に脳転移を認めると報告されている¹⁰。病理組織型としては TTF-1 陽性の腺癌が多く^{10,15}、ALK 肺癌と同様に病理亜型として signet-ring cell や mucinous cribriform パターンを有する solid タイプに多いとする報告もあるが^{4,16}、これらの特徴を有さない腺癌や、扁平上皮癌、多形癌、大細胞癌等、腺癌以外の非小細胞肺癌でも ROS1 融合遺伝子は検出されることがあり¹⁰、臨床病理学的特徴のみで ROS1 融合遺伝子陽性肺癌 (ROS1 肺癌) を推定することは困難である。さらに、ROS1 融合遺伝子は、EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子等と同様に、その他のドライバー遺伝子異常と相互に排他的な関係にある¹⁰。

(3) ROS1 阻害薬の臨床試験

1. クリゾチニブ (Crizotinib)

ROS1 は蛋白質の構造上、ALK のチロシンキナーゼ領域と高い相同性を有しており¹⁷、ALK のチロシンキナーゼを阻害するクリゾチニブは ROS1 チロシンキナーゼの阻害活性も有する。海外で行われたクリゾチニブの臨床第 I 相試験 (PROFILE1001 試験) の拡大コホートでは、ROS1 肺癌 50 例のうち、完全奏効が 3 例、部分奏効が 33 例で、奏効割合 (ORR) は 72% (95% 信頼区間 [CI] 58~84%)、奏効期間中央値 (DCR) は 17.6 ヶ月 (95% CI 14.5 ヶ月~未到達)、無増悪生存期間中央値 (mPFS) は 19.2 ヶ月 (95% CI 14.4 ヶ月~未到達) であった¹⁸。この結果をもとに、ROS1 肺癌に対するクリゾチニブ (ザーコリ[®]) の適応拡大が、2016 年 3 月に米国 FDA で、同 8 月には欧州 EMA で承認された。

一方、我が国を含む東アジア 4 か国 (日本、中国、韓国、台湾) においては、ROS1 肺癌に対するクリゾチニブの臨

床第 II 相試験 (OO12-01 試験) が行われた。国内 26 例を含む計 127 例の患者が登録され、完全奏効が 17 例、部分奏効が 74 例で、ORR は 71.7% (95% CI 63.0~79.3%)、mPFS は 15.9 ヶ月 (95% CI 12.9~24.0 ヶ月) となり、クリゾチニブの高い有効性が示された¹⁹。この結果より、我が国では、クリゾチニブの ROS1 融合遺伝子陽性切除不能進行・再発非小細胞肺癌への適応拡大が承認された。

2. セリチニブ (Ceritinib)

第二世代の ALK 阻害薬であるセリチニブも ROS1 阻害作用があり、韓国で ROS1 肺癌に対するセリチニブの臨床第 II 相試験が行われた²⁰。その結果、ORR は 67% (95% CI 48~81%)、DOR は 21 ヶ月 (95% CI 17~25 ヶ月)、mPFS は 19.3 ヶ月 (95% CI 1~37 ヶ月) で、クリゾチニブとほぼ同等の効果が認められたが、ALK 肺癌に対するセリチニブ治療と同様に消化器毒性が多く見られた (下痢 78%、嘔気 59%、食思不振 56%、嘔吐 53%等)。その後セリチニブは、適応追加の承認申請が行われなかったため、ROS1 肺癌に対する治療薬としては承認されていない。

3. エヌトレクチニブ (Entrectinib)

エヌトレクチニブは、ROS1、ALK、TRK のキナーゼ阻害薬である。ROS1 肺癌に対するエヌトレクチニブの有効性は、ROS1 融合遺伝子陽性固形癌を対象に行われた 2 つの臨床第 I 相試験 (ALKA-372-001、STARTRK-1) と 1 つの臨床第 II 相試験 (STARTRK-2) の統合解析で評価されており、ORR は 67.1% (95% CI 59.3~74.3%)、DOR は 15.7 ヶ月 (95% CI 13.9~28.6 ヶ月)、mPFS は 15.7 ヶ月 (95% CI 11.0~21.1 ヶ月) であった²¹。また、エヌトレクチニブは脳脊髄液への移行が良い薬剤として知られており、この統合解析では、脳転移巣における ORR が 79.2% (95% CI 57.9~92.9%)、mPFS が 12.0 ヶ月 (95% CI 6.2~19.3 ヶ月) と報告されている²¹。頻度の高い有害事象としては、味覚障害 (43%)、浮動性めまい (35%)、便秘 (31%)、疲労 (30%)、下痢 (27%) 等が報告されている²¹。これらの臨床試験の結果、2020 年 2 月に、エヌトレクチニブは ROS1 融合遺伝子陽性の切

除不能な進行・再発非小細胞肺癌の治療薬として承認された（2019年6月に *NTRK* 融合遺伝子陽性の進行・再発の固形癌の治療薬としても承認されている）。

4. ロルラチニブ (Lorlatinib)

ALK 阻害薬であるロルラチニブも ROS1 キナーゼ阻害作用を有している。ROS1 肺癌に対するロルラチニブの臨床第 I/II 相試験では、ROS1 阻害薬未治療例 (N=21) において ORR は 62% (95% CI 38~82%)、DOR は 25.3 ヶ月 (95% CI 7.5~31.9 ヶ月)、mPFS は 21.0 ヶ月 (95% CI 4.2~31.9 ヶ月) であり、クリゾチニブ既治療例 (N=40) において ORR は 35% (95% CI 21~52%)、DOR は 13.8 ヶ月 (95% CI 9.7 ヶ月~未到達)、mPFS は 8.5 ヶ月 (95% CI 4.7~15.2 ヶ月) であった²²。主な有害事象は、高コレステロール血症 (80%)、高 TG 血症 (61%)、浮腫 (40%)、末梢神経障害 (36%)、認知機能への影響 (27%)、体重増加 (23%) 等が報告されている²²。

ロルラチニブは、ALK 肺癌に対しては承認されているが、ROS1 肺癌に対する治療薬としては承認されていない。

5. タレトレクチニブ (Taltrectinib)

タレトレクチニブは選択的 ROS1 キナーゼ阻害薬であり、前臨床試験では ROS1 G2032R 等の ROS1 阻害薬耐性変異にも感受性が高いことが示されている²³。ROS1 肺癌に対するタレトレクチニブの臨床第 I 相試験では、ROS1 阻害薬未治療例 (N=9) において ORR 66.7% (95% CI 35.4~87.9%)、mPFS 29.1 ヶ月 (95% CI 2.6 ヶ月~未到達) であり、クリゾチニブ既治療例 (N=6) において ORR 33.3% (95% CI 9.7~70.0%)、mPFS 14.2 ヶ月 (95% CI 1.5 ヶ月~未到達) であった²⁴。中国で行われた臨床第 II 相試験 (TRUST-I) の中間解析では、ROS1 阻害薬未治療例 (N=67) において ORR 92.5% (95% CI 83.4~97.5%)、ROS1 阻害薬既治療例 (N=38) において ORR 50.0% (95% CI 33.4~66.6%) であり、ROS1 G2032R 陽性の 5 例中 4 例で奏効した、と報告されている²⁵。現在、国際共同の臨床第 II 相試験 (TRUST-II) が進行中である²⁵。

6. レボトレクチニブ (Repotrectinib)

レボトレクチニブは、耐性変異克服可能な構造有する ROS1 阻害薬であり、脳脊髄液の移行も良好である。ROS1 肺癌に対する臨床第 I/II 相試験 (TRIDENT-1) の第 II 相推奨用量の結果は、ROS1 阻害薬未治療例 (N=71) において ORR 79% (95% CI 68~88%)、DOR 34.1 ヶ月 (95% CI 25.6 ヶ月~未到達)、mPFS 35.7 ヶ月 (95% CI 27.4 ヶ月~未到達) であり、ROS1 阻害薬既治療例 (N=56) において ORR 38% (95% CI 25~52%)、DOR 14.8 ヶ月 (95% CI 7.6 ヶ月~未到達)、mPFS 9.0 ヶ月 (95% CI 6.8~19.6 ヶ月) であった²⁶。ROS1 G2032R 陽性例においては、17 例中 10 例 (59%) で奏効が得られた。主な治療関連有害事象は、浮動性めまい (58%)、味覚障害 (50%)、感覚異常 (30%)、便秘 (26%)、貧血 (26%)、等が報告されている²⁶。

この臨床試験の結果に基づき、2023年10月、レボトレクチニブは ROS1 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌の治療薬として承認申請されている。

(4) ROS1 融合遺伝子陽性進行肺癌の治療

前述の臨床試験の結果に基づいて、本邦では ROS1 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌の治療薬としてクリゾチニブとエヌトレクチニブが承認されている。また、日本肺癌学会による肺癌診療ガイドライン (2023年版) では、ROS1 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌の初回治療において、クリゾチニブ単剤療法、エヌトレクチニブ単剤療法のいずれかを行うように推奨されている (推奨の強さ: 1、エビデンスの強さ: C、合意率: 100%)。加えて、クリゾチニブ耐性後のエヌトレクチニブ単剤療法の効果は明らかではないことが言及されている。また、ROS1 肺癌を対象とした細胞傷害性抗癌薬治療の前向き臨床試験は行われていないが、少数例の後ろ向き解析でペメトレキセドを含む治療が良好な成績が示されている²⁷。肺癌診療ガイドラインでは、ROS1 肺癌を含めてドライバー遺伝子陽性進行非小細胞肺癌 (*KRAS*, *HER2*, *NTRK* を除く) に対する細胞傷害性抗癌薬治療は、各々の標的療法後の 2 次治療として位置づけられている。

表 1. クリソチニブ、エヌトレクチニブのコンパニオン診断 (CDx)

検査法	検査名	クリソチニブ のCDx	エヌトレクチニブ のCDx
RT-PCR	OncoGuide AmoyDx ROS1 融合遺伝子検出キット	●	●
マルチ遺伝子 PCR	AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル	●	●
NGS (tissue)	オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム	●	●
	FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル		●
	肺がんコンパクトパネル Dx マルチコンパニオン診断システム	●	
NGS (plasma)	FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル		●

(5) ROS1 融合遺伝子の診断

1. ROS1 融合遺伝子の検出法

ROS1 融合遺伝子の検出には、単一遺伝子検査として RT-PCR 法 (reverse transcription polymerase chain reaction)、免疫組織化学染色 (immunohistochemistry: IHC) 法、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (Fluorescence *in situ* hybridization: FISH) 法があり、マルチ遺伝子検査としてマルチ遺伝子 PCR 法、次世代シーケンス法 (Next generation sequencing: NGS) がある。これらのうち、クリソチニブとエヌトレクチニブのコンパニオン診断 (CDx) をそれぞれ表 1 に示す。

2. RT-PCR 法 (AmoyDx 社)

RT-PCR 法は、解析する検体から RNA を抽出し、逆転写反応を行ったあと、目的とする遺伝子領域に設定されたプライマーを用いて増幅する方法である。ROS1 融合遺伝子を検出するためには、融合点をはさんで ROS1 側と融合パートナー側にそれぞれプライマーを設定する。手技は比較的容易であり汎用性が高い。また検査に要する時間が短く、進行肺癌の治療選択のための臨床検査として適用可能である。しかしながら、解析試料である RNA は分解されやすいため、取扱いや保存に細心の注意が必要である。

表 2. Oncoguide AmoyDx ROS1 融合遺伝子検出キットで検出可能な ROS1 融合遺伝子

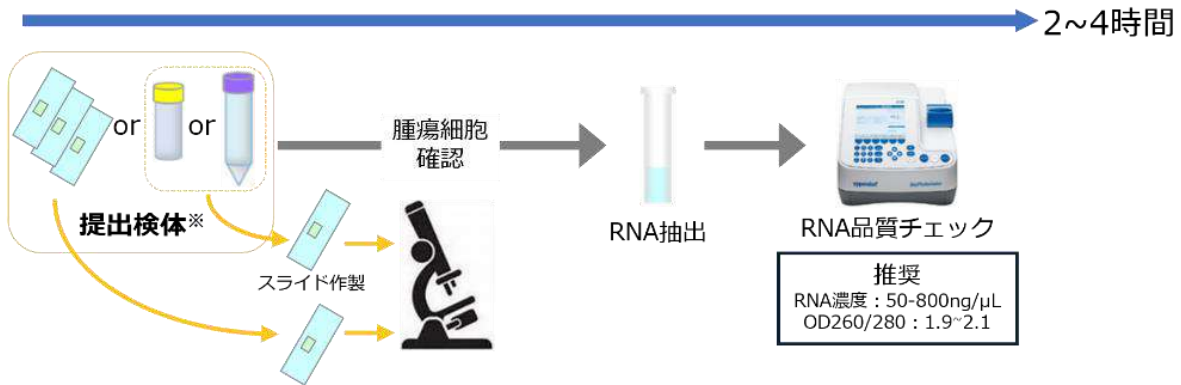
Partner	Variant	
	Exon	COSMIC ID
CD74-ROS1	C6R32	COSF1202
	C6R34	COSF1200
EZR-ROS1	E10R34	COSF1267
SDC4-ROS1	S2R32	COSF1265
	S4R32	COSF1278
	S4R34	COSF1280
SLC34A2-ROS1	S13R32	COSF1259
	S13R34	COSF1261
	S4R32	COSF1197
	S4R34	COSF1198
TPM3-ROS1	T8R35	
LRIG3-ROS1	L16R35	COSF1269
GOPC-ROS1	G4R36	COSF1188
	G18R35	

また、予め目的とする遺伝子領域にプライマーを設定する必要があるため、既知の融合バリエーションのみ検出可能であり、未知の融合バリエーションは検出不可能である。

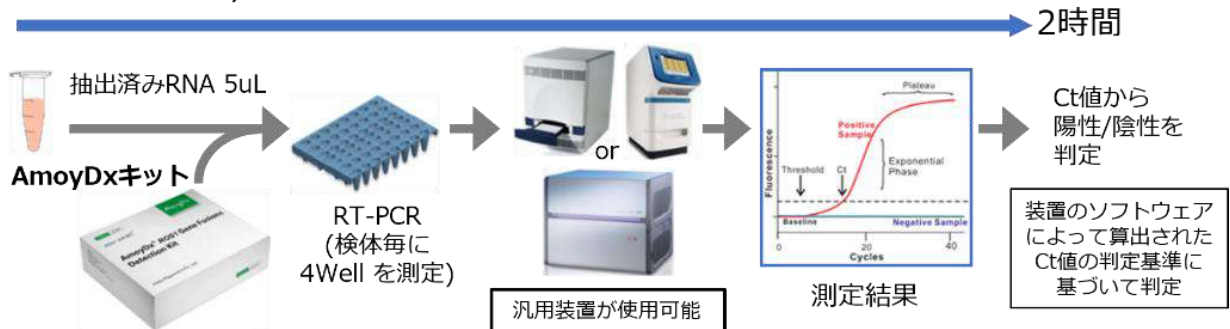
本邦では、AmoyDx社のROS1 RT-PCRキット「OncoGuide AmoyDx ROS1 融合遺伝子検出キット」が、ROS1肺癌に対するクリゾチニブ、エヌトレクチニブのコンパニオン診断薬として承認されている。本キットは、逆転写反応、及び蛍光標識加水分解プローブ法を用いたリアルタイムPCRを連続して行うツーステップRT-PCRを原理としており、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組

織、新鮮凍結組織、細胞診検体から抽出したRNAを用いて、14種類のROS1融合遺伝子を検出することが可能である（表2）。標的配列の両端に蛍光物質（FAM）と消光物質（BHQ1）で標識されたプローブがPCRの伸長反応に伴い加水分解され、蛍光を発する。その蛍光強度をPCRのサイクルごとに検出し、蛍光強度が一定量に達した際のサイクル数（Cycle threshold（Ct）値）に応じて結果を

① 検体抽出



② RT-PCR法（AmoyDx社）による検査



検体種	特徴	HE染色による腫瘍細胞確認	保存処理	ブロック・スライド作製	RNA抽出の前処理
FFPE組織、FFPEセルブロック	<ul style="list-style-type: none"> 長期保存に向いている 固定条件により品質にばらつき 	 FFPEスライド	ホルマリン固定、パラフィン包埋		脱パラフィン処理
新鮮凍結組織（FF）	検体の劣化が少ない	 FFPEスライド	凍結保存（液体窒素も可）		
細胞診検体*	侵襲性が低い	 細胞診標本	遠心分離凍結保存		

*細胞診検体：胸水、気管支洗浄液、心嚢液、喀痰などの検体

図3. OncoGuide AmoyDx ROS1 融合遺伝子検出キットによる検査フロー

判定する。図3に検査フローを示す。

3. FISH 法

蛍光色素でラベルした DNA プローブを標本上でターゲット遺伝子とハイブリダイズさせ、そのシグナルを蛍光顕微鏡で観察する方法である。ROS1 融合遺伝子について体外診断薬 (IVD) 化された FISH 法は現時点では存在せず、Abbott Molecular や ZytoVision、アジレント・テクノロジーのプローブキットが研究用試薬 (RUO) として販売されている。

FISH 法には、融合を起こす 2 つの遺伝子それぞれにプローブを置いて、2 つのプローブが融合するのを検出する方法 (fusion FISH 法) と、ROS1 などキナーゼ遺伝子の切断点を隔てて 2 つのプローブを置き、他の遺伝子と融合する際に、切断点を境に 2 つの遺伝子領域が離断されることを検出する方法 (break apart FISH 法) が存在する。ROS1 融合遺伝子では、パートナー遺伝子の種類が多いことやパートナー遺伝子が ROS1 の位置する染色体 6 番長腕の近くに存在する場合も多いことから、break apart FISH 法を用いることが多い。図4に break apart FISH 法を用いた ROS1 融合遺伝子の検出例を示す¹⁵。

Break apart FISH 法の利点は、FFPE 切片で DNA を標的とするので解析試料として比較的安定性が高いことや、パートナー遺伝子の情報がなくても検出できること、すなわち未知の融合バリエーションも検出可能なことである (ただしパートナー遺伝子は同定不可能)。一方、問題点としては、まず、検査手技や判定に熟練を要するため、検査実施

設や判定医が限定されることである。さらに、立体での現象を一断面で評価するため、異なる切片で判定結果が一致しない可能性があること、検体の品質によって蛍光シグナルを検出できない場合があること、また特に進行肺癌からの微量な検体は評価可能な細胞数が少なく判定困難な場合があることなどが、問題点としてあげられる。米国 FDA におけるクリゾチニブの適応拡大の承認は、PROFILE1001 試験の ROS1 肺癌拡大コホートの成績¹⁸をもとに行われたが、この試験での ROS1 肺癌の診断は主に break apart FISH 法が用いられ、その診断基準は、「50 個以上の評価可能な腫瘍細胞のうち陽性細胞 \geq 15%」であった。

4. IHC 法

IHC 法は、安価かつ比較的簡便で汎用性が高い方法である。IHC 法では、FFPE 切片における細胞の ROS1 タンパク質に対して特異的な抗体を反応させ、二次抗体と発色基質を用いて発現タンパク質を可視化する。一般的に、発現強度や発現細胞割合に応じてスコア化し、タンパク質発現の程度を評価する。図5に IHC 法を用いた ROS1 タンパク質発現解析の例を示す¹⁵。

ROS1 の IHC 法には、Cell Signaling Technology 社の抗 ROS1 抗体 (D4D6 クローン、ウサギモノクローナル抗体) などが RUO として市販されているが、現時点で IVD 化された抗体試薬はない。これまでに、肺癌における ROS1 融合タンパク質の発現を IHC 法で検討した報告もあり^{15,28}、ROS1 融合遺伝子陽性例で ROS1 高発現の傾向はあるものの、これらの検討は主に外科的切除標本で行

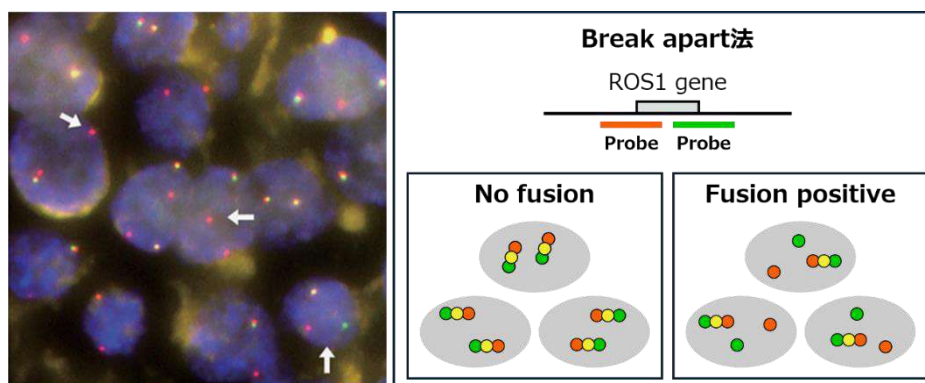
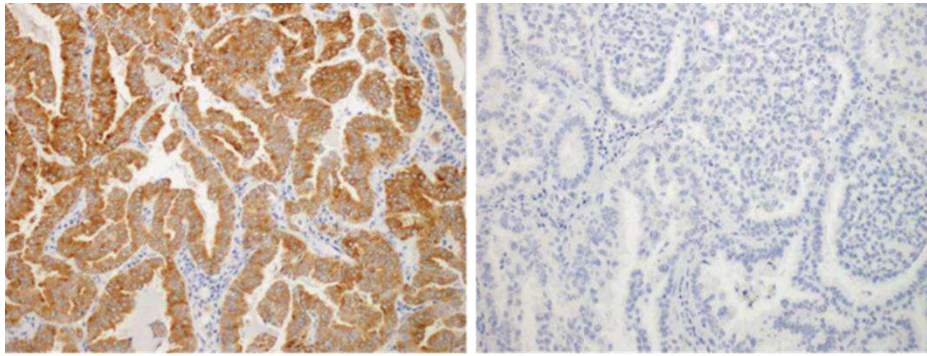


図4. break apart FISH 法による ROS1 融合遺伝子の検出 (文献 15 より引用)
 緑: 5'ROS1 プローブ、赤: 3'ROS1 プローブ



ROS1 IHC陽性 ROS1 IHC陰性
 図5. IHC法によるROS1タンパク質の検出例（文献15より引用）

われており生検標本での検討は少なく、また正常細胞においてもROS1の発現が高頻度に認められる。ROS1 IHC法には陽性／陰性カットオフ値の設定の仕方によって偽陽性や偽陰性の可能性がある。世界肺癌学会が作成したガイドランス（IASLC ATLAS of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer, Second Edition, 2016）²⁹には、IHC法を用いたROS1肺癌のスクリーニングに関する記述が見られるが、IHC法でスクリーニングを行ったとしてもROS1肺癌の診断にはその他の検査法による確認が必要と記載されている。

5. マルチ遺伝子検査（PCR法/NGS法）

マルチ遺伝子検査としては、PCR法を用いたAmoyDx肺癌マルチ遺伝子PCRパネルと、NGS法を用いたオンコマイン Dx Target Test マルチCDxシステム、FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル、肺がんコンパクトパネル Dx マルチコンパニオン診断システムがあるが、これらについては各々の検査の手引きを参照されたい。

(6) ROS1 融合遺伝子検査のアルゴリズム

ROS1 融合遺伝子の診断は、他のドライバー遺伝子の診断と同様に、コンパニオン診断機能を有するマルチ遺伝子検査で行うことが推奨される。コンパニオン診断ではない検査法でROS1融合遺伝子が検出された場合は、単一遺伝子検査のコンパニオン診断である OncoGuide AmoyDx ROS1 融合遺伝子検出キットでROS1融合遺伝子の存在を確認する必要がある。表2に示すように、クリゾチニブとエヌトレクチニブで承認されているコンパニオン診断が異なる場合があるので、薬剤を選択する時にはどのコンパニオン診断を用いるか注意を要する。

参考文献

- Charest A, Lane K, McMahon K, et al. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:58-71.
- Charest A, Kheifets V, Park J, et al. Oncogenic targeting of an activated tyrosine kinase to the Golgi apparatus in a glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:916-21.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190-203.
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012;18:378-81.
- Arai Y, Totoki Y, Takahashi H, et al. Mouse model for ROS1-rearranged lung cancer. *PLoS one* 2013;8:e56010.
- Shaw AT, Hsu PP, Awad MM, Engelman JA. Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies. *Nat Rev Cancer* 2013;13:772-87.
- Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:4040-5.
- Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2015;4:156-64.
- Hirsch FR, Suda K, Wiens J, Bunn PA. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *The Lancet* 2016;388:1012-24.
- Gendarme S, Bylicki O, Chouaid C, et al. ROS-1 Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date. *Curr Oncol*. 2022;29:641-58.
- Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *The oncologist* 2013;18:865-75.
- Charest A, Wilker EW, McLaughlin ME, et al. ROS fusion tyrosine kinase activates a SH2 domain-containing phosphatase-2/phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling axis to form glioblastoma in mice. *Cancer Res* 2006;66:7473-81.
- Davies KD, Le AT, Theodoro MF, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:4570-9.
- Jun HJ, Johnson H, Bronson RT, de Feraudy S, White F, Charest A. The oncogenic lung cancer fusion kinase CD74-ROS activates a novel invasiveness pathway through E-Syt1 phosphorylation. *Cancer Res* 2012;72:3764-74.
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012;30:863-70.
- Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol* 2014;27:711-20.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000;19:5548-57.
- Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1963-71.
- Wu YL, Yang JC, Kim DW, et al. Phase II study of crizotinib in East Asian patients with ROS1-positive advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:1405-11.
- Lim SM, Kim HR, Lee JS, et al. Open-label, multicenter, phase II study of ceritinib in patients with non-small-cell lung cancer harboring ROS1 rearrangement. *J Clin Oncol* 2017;35:2613-18.
- Dziedziszko R, Krebs MG, De Braud F, et al. Updated integrated analysis of the efficacy and safety of entrectinib in locally advanced or metastatic ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2021; 39:1253-63.
- Shaw AT, Solomon BJ, Chiari R, et al. Lorlatinib in advanced ROS1-positive non-small-cell lung cancer: a multicentre, open-label, single-arm, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 2019;20:1691-1701
- Katayama R, Gong B, Togashi N et al. The new-generation selective ROS1/NTRK inhibitor DS-6051b overcomes crizotinib resistant ROS1-G2032R mutation in preclinical models. *Nat. Commun* 2019;10:3604.
- Ou SI, Fujiwara Y, Shaw AT, et al. Efficacy of Taletrectinib (AB-106/DS-6051b) in ROS1+ NSCLC: An Updated Pooled Analysis of U.S. and Japan Phase 1 Studies. *JTO Clin Res Rep* 2020; 2:100108.
- Nagasaka M, Ohe Y, Zhou C, et al. TRUST-II: a global phase II study of taletrectinib in ROS1-positive non-small-cell lung cancer and other solid tumors. *Future Oncol* 2023;19:123-135.
- Drilon A, Camidge DR, Lin JJ, et al. Repotrectinib in ROS1 Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2024;390:118-131.
- Drilon A, Bergagnini I, Delasos L, et al. Clinical outcomes with pemetrexed-based systemic therapies in RET-rearranged lung cancers. *Ann Oncol* 2016;27:1286-91.
- Viola P, Maurya M, Croud J, et al. A Validation Study for the Use of ROS1 Immunohistochemical Staining in Screening for ROS1 Translocations in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016;11:1029-39.
- IASLC ATLAS of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer. Second Edition ed. Aurora, CO, USA: International Association for the Study of Lung Cancer; 2016.

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-4. BRAF

(2024年4月改訂版)

目次

(1) BRAF 遺伝子とその遺伝子変異	2
(2) BRAF 変異陽性肺癌の臨床病理学的特徴	3
(3) BRAF V600E 陽性肺癌に対する治療戦略と臨床試験	4
(4) BRAF 変異の診断	4
1. オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム (オンコマイン DxTT)	4
2. AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル	4
3. その他の方法	4
参考文献	6

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

阪本 智宏, 荒金 尚子, 後藤 功一, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗 淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

(1) BRAF 遺伝子とその遺伝子変異

v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF) タンパク質は、細胞内シグナル伝達経路の一つである RAS-RAF-MEK-ERK 経路 (MAPK 経路) の構成因子であるセリン/スレオニン プロテインキナーゼ RAF ファミリータンパク質の一つであり、細胞の分化・増殖に関与している (図 1)。このタンパク質をコードする BRAF 遺伝子は、7 番染色体長腕 (7q34) に位置し、全長 190kb, 18 エクソンで構成されている。

2002 年に Davies ら¹は、悪性黒色腫や大腸癌、肺癌などの様々な癌種において BRAF 遺伝子変異が起こっていることを発見した。悪性腫瘍で起こる BRAF 遺伝子変異は、BRAF タンパク質の activation loop (A-loop) をコードするコドン 599~602 と、phosphate binding loop (P-loop) をコードするコドン 464~469、およびこれらの周辺に集中している (図 2)。悪性黒色腫においては BRAF 遺伝子変異のほとんどが V600E 変異であるが、肺癌で起こる BRAF 遺伝子変異は V600E 変異が約半数であり、その他の変異タイプ (non-V600E 変異) が比較的

多いのが特徴といえる²。BRAF V600E 変異は BRAF キナーゼの活性化を引き起こし、下流シグナルである ERK の恒常的なリン酸化が起こること、またこのシグナル伝達経路の活性化によって悪性細胞への形質転換をもたらすことが知られているが¹、BRAF non-V600E 変異には生物学的意義が不明なものもあり、これまでのところ肺癌における BRAF を標的とした治療開発は、V600E 陽性例に限定して行われている。

悪性黒色腫や甲状腺癌における BRAF 遺伝子変異の頻度は約 40%であるが、非小細胞肺癌においては 1~3%と希少頻度である^{2,3}。2013 年から我が国で行われている、全国規模の肺癌遺伝子スクリーニングプロジェクト (Lung Cancer Genomic Screening Project for Individualized Medicine in Japan: LC-SCRUM-Japan) では、EGFR 遺伝子変異陰性の非扁平上皮非小細胞肺癌において BRAF 遺伝子変異は 5% (83/1688 例) で、V600E 変異に限ると 2% (34/1688 例) であり、ALK、ROS1 や KRAS 等のその他のドライバー変異と相互排他性が認められた⁴。LC-SCRUM-Japan は、主に EGFR 遺伝子変異陰性例を対象にして遺伝子解析を行っていることから、EGFR 遺伝子変異が非扁平上皮非小細胞肺癌の約 50%を

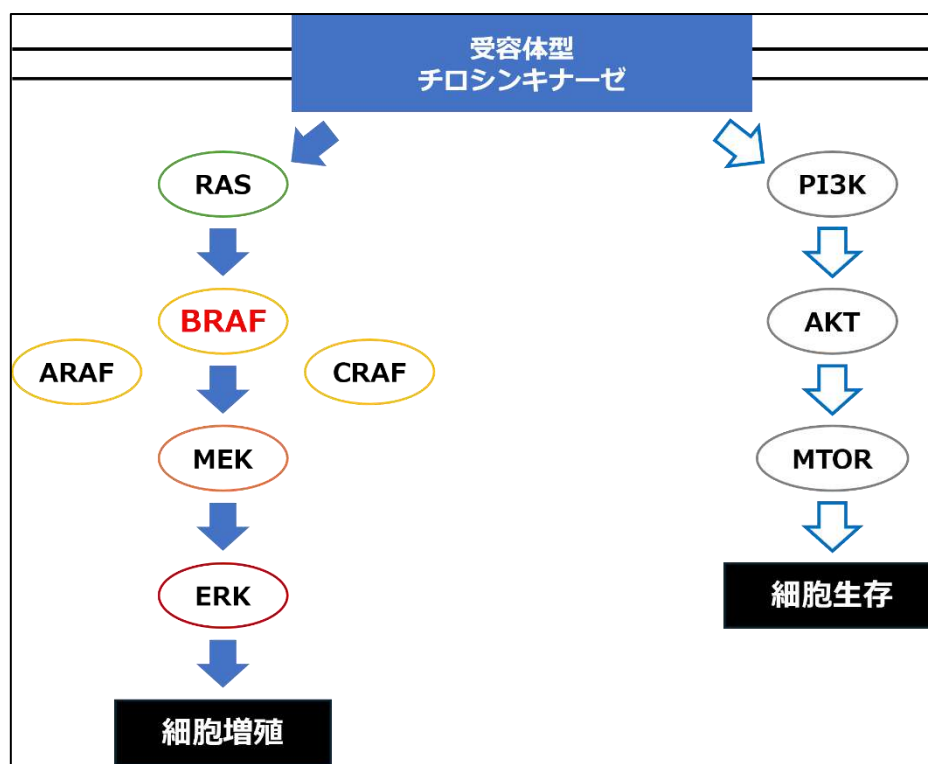


図 1. 細胞の増殖、生存に関わる細胞内シグナル伝達経路
Reproduced with permission from Elsevier (2021)

占めると考えると、BRAF V600E 変異の頻度は非扁平上皮非小細胞肺癌の約 1%と考えられる (図 3)。

(2) BRAF 変異陽性肺癌の臨床病理学的特徴

Ding らの報告では、non-V600E 変異 4 例を含む BRAF 遺伝子変異患者 28 例のうち、43% (12/28 例) が男性、21% (6/28 例) が喫煙者であり、年齢中央値は 64 歳 (37-78 歳) であった⁸。LC-SCRUM-Japan においては、BRAF V600E 陽性患者の 68% (23/34 例) が男性、65% (22/34 例) が喫煙者であり、年齢中央値は 65 歳 (39-85 歳) で

あった。また、腺癌が 97% (33/34) であり、1 例は扁平上皮癌 (1/264 例)、小細胞肺癌 309 例の解析では変異例を認めなかった。以上より、BRAF V600E 陽性肺癌の特徴として、組織型は非小細胞肺癌、特に腺癌であること、非喫煙者/軽喫煙者にも認められるが、喫煙者に多い傾向があること、EGFR/ALK/ROS1 といったその他のドライバー変異とは相互排他性があることが挙げられる^{2,5-7}。EGFR/ALK/ROS1 肺癌とは異なり、若年者や女性に多い傾向はなく、傾向としては KRAS 肺癌と類似している。病理学的には、腺癌の垂型として acinar predominant type が最も多く、solid predominant type が次いで多くみら

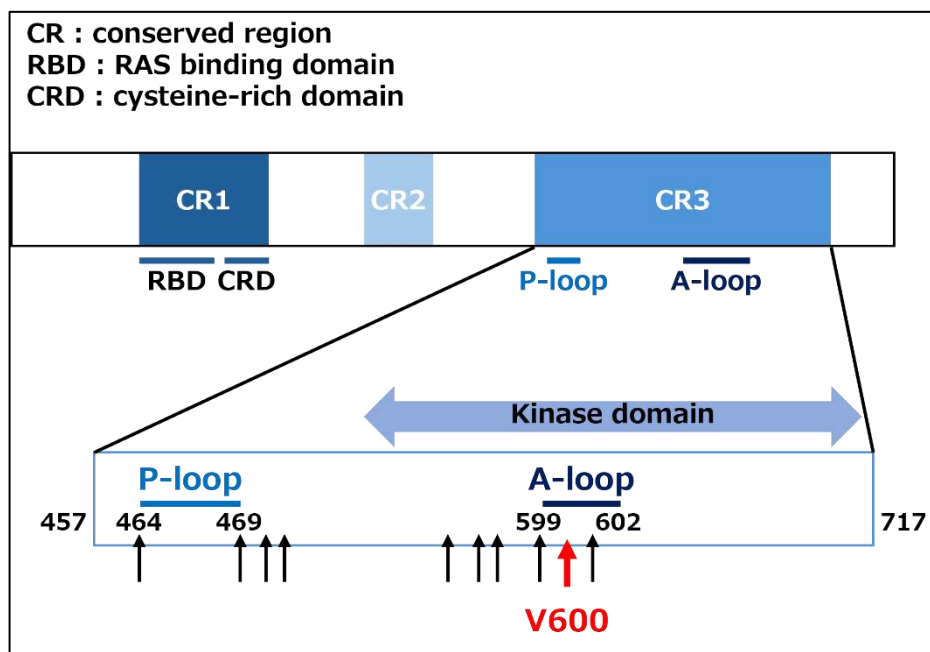


図 2. BRAF の蛋白構造と非小細胞肺癌における BRAF 遺伝子変異の種類 (LC-SCRUM-Japan のデータより。矢印 (↑) は変異箇所を示す。

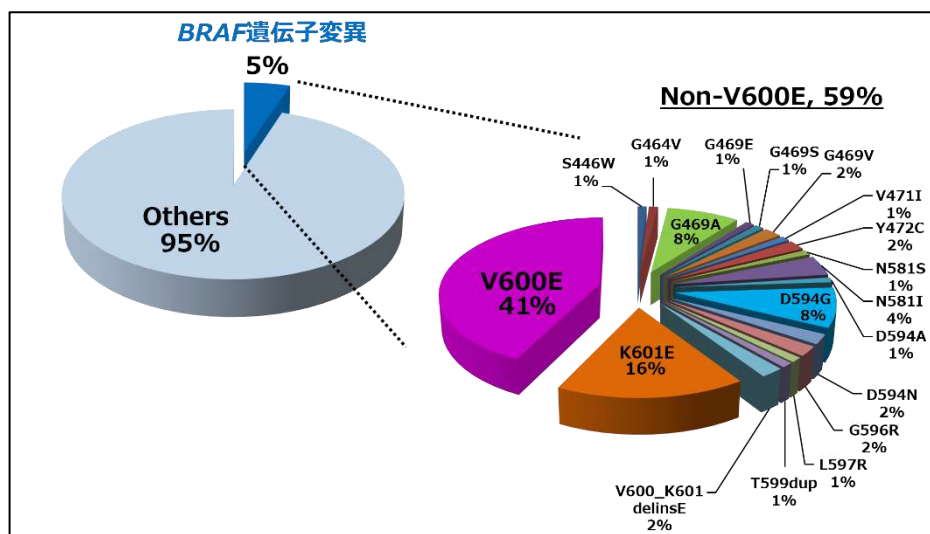


図 3. LC-SCRUM-Japan における BRAF 遺伝子変異の頻度 (EGFR 変異陰性非扁平上皮非小細胞肺癌 1688 例の解析結果)

れるとされる⁷⁾。

LC-SCRUM-Japan で同定された BRAF V600E 陽性肺癌において、1 次治療としてプラチナ併用化学療法が行われた 20 例の治療成績をみると、奏効割合は 30% (6/20 例)、病勢制御割合は 75% (15/20 例)、無増悪生存期間中央値は 13.7 ヶ月 (95% CI 7.9~31.9 ヶ月) であった。これは過去の非小細胞肺癌に対する 1 次化学療法の治療成績と比較してやや良好な傾向を示しており、細胞障害性抗癌剤も BRAF V600E 変異陽性肺癌に対して一定の効果を有すると考えられる。

(3) BRAF V600E 陽性肺癌に対する治療戦略と臨床試験

BRAF V600E 陽性非小細胞肺癌に対する治療開発として、未治療または既治療例を対象に BRAF 阻害薬ダブラフェニブ単剤療法、あるいはダブラフェニブと MEK 阻害薬トラメチニブ併用療法の国際多施設共同第 II 相試験 (BRF113928 試験) が行われた。この臨床試験は 3 つのコホートで行われ、BRAF V600E 陽性非小細胞肺癌に対するダブラフェニブ単剤の治療効果をみたコホート A には、未治療例が 6 例、二次治療以降の症例が 78 例登録された。既治療例 78 例のうち 26 例で部分奏効 (PR) が得られ、奏効割合は 33% (95%信頼区間 [CI] 23~45%)、奏効期間中央値は 9.6 ヶ月 (95% CI 5.4~15.2 ヶ月)、無増悪生存期間中央値は 5.5 ヶ月 (95% CI 3.4~7.3 ヶ月) であった。また、未治療例 6 例のうち 4 例は PR が得られ、無増悪生存期間は 4.0 ヶ月~16.6 ヶ月であった⁹⁾。BRAF V600E 陽性の既治療非小細胞肺癌に対するダブラフェニブとトラメチニブの併用療法の効果をみたコホート B では、57 例中 2 例の完全奏効 (CR) と 34 例の PR が得られ、奏効割合は 63.2% (95% CI 49.3~75.6%)、奏効期間中央値は 9.0 ヶ月 (95% CI 6.9~18.3 ヶ月)、無増悪生存期間中央値は 9.7 ヶ月 (95% CI 6.9~19.6 ヶ月) であった¹⁰⁾。一方、コホート C では、未治療の BRAF V600E 陽性非小細胞肺癌に対してダブラフェニブとトラメチニブの併用療法が行われ、36 例中 2 例の CR と 21 例の PR が得られ、奏効割合は 64% (95% CI 46~79%)、奏効期間中央値は 10.4 ヶ月 (95% CI 8.3~17.9 ヶ月)、

無増悪生存期間中央値は 10.9 ヶ月 (95% CI 7.0~16.6 ヶ月) であった¹¹⁾。これらの結果に基づき、BRAF V600E 陽性肺癌に対するダブラフェニブ (タフィンラー[®]) とトラメチニブ (メキニスト[®]) の併用療法が、2017 年 4 月に欧州 EMA で、同 6 月に米国 FDA で承認された。同様に、我が国でも 2016 年 12 月に承認申請され、2018 年 3 月に承認された。

(4) BRAF 変異の診断

1. オンコマイン[™] Dx Target Test マルチ CDx システム (オンコマイン DxTT)

オンコマイン DxTT は、NGS を用いた遺伝子パネル検査であり、がん関連 46 遺伝子の標的領域を PCR で増幅してシークエンス解析を行い、遺伝子異常を検出する。我が国では、2018 年に BRAF V600E 陽性非小細胞肺癌に対するダブラフェニブ+トラメチニブ併用療法のコンパニオン診断薬として承認された。その後、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌や ALK 融合遺伝子陽性肺癌をはじめとするさまざまな標的治療薬のコンパニオン診断薬としても承認され、現在ではオンコマイン DxTT は 6 つのドライバー遺伝子を同時に診断するマルチ遺伝子検査となっている。

2. AmoyDx[®] 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル

AmoyDx[®] 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネルは、リアルタイム PCR 法を用いたマルチ遺伝子診断薬であり、肺癌関連 11 遺伝子の主要な領域を標的に、遺伝子異常を検出する。本邦では、2021 年 6 月に EGFR、ALK、ROS1、BRAF および MET を標的とする各々の分子標的薬のコンパニオン診断薬として承認された。さらにその後、2023 年 3 月に RET 融合遺伝子陽性肺癌に対するセルペルカチニブのコンパニオン診断薬としても承認された。このキットは、上記遺伝子に KRAS を加えた 7 つのコンパニオン診断対象ドライバー遺伝子に加え、HER2、NTRK1-3 の解析もできるように設計されている。

3. その他の方法

肺がん コンパクトパネル[®] Dx マルチコンパニオン診

断システムは、NGS を用いたマルチ遺伝子診断薬で、本邦で開発された。FFPE 検体の他に、細胞診検体についても比較的容易に検査提出が可能となっている。2023 年 2 月に 4 遺伝子 (*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*MET*) に、2024 年 2 月には追加で 3 遺伝子 (*BRAF*、*KRAS*、*RET*) について保険適用となった。

その他の検査として、本邦では、腫瘍組織を用いた遺伝子パネル検査である「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」と「OncoGuide™ NCC オンコパネル システム」、「GenMineTOP®がんゲノムプロファイリングシステム」が承認されている。また血液検体を用いた遺伝子パネル検査としては「FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル」と「Guardant360™ CDx がん遺伝子パネル」が承認されている。これらはいずれも、腫瘍組織由来あるいは血漿由来の DNA を用いて合成核酸とのハイブリダイゼーションによって標的領域を濃縮し、シーケンス解析を行う。現時点では、リキッド解析による融合遺伝子の診断精度はまだ低く、偽陰性と診断される危険性が高いため、組織を用いた遺伝子検査を優先すべきである。いずれの検査においても、*BRAF* 遺伝子変異はコンパニオン診断の対象ではなく、包括的がんゲノムプロファイル (CGP) 検査の解析対象である。したがって、これらのパネルを用いた CGP 検査で *BRAF* 遺伝子変異が検出され

た場合、エキスパートパネルによる推奨が必要となる。なお、NGS を用いた遺伝子パネル検査を実施するにあたっては、日本臨床腫瘍学会、日本癌治療学会、日本癌学会の 3 学会から合同で発出している「次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドライン¹²⁾」や、「2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査」、「3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い」の項も参照されたい。

また、悪性黒色腫では、アリル特異的 PCR 法を原理としたロシュ・ダイアグノスティクス社の「コバス® BRAF V600 変異検出キット」が、*BRAF* 阻害薬ベムラフェニブの CDx として承認されている。また同様に、ダブルフェニブおよびトラメチニブの CDx としてはシスメックス・ビオメリュー社の「THxID® BRAF キット」が承認されている。悪性黒色腫の場合、コバス® BRAF V600 変異検出キットは、ダイレクトシーケンス法との比較において、陽性一致率 92.7%、陰性一致率 90.8%であったとされる。また、THxID® BRAF キットもダイレクトシーケンス法との比較において、98%の陽性一致率を示したとされる。これらの結果から、PCR 法は *BRAF* V600E 変異診断において有用な手法であると言えるが、現在のところ、これらのキットの適応は悪性黒色腫のみであり、肺癌における *BRAF* 遺伝子検査法としては承認されていない。

参考文献

1. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-954
2. Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29:2046-2051
3. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12:175-180
4. 松本慎吾. 全国肺癌ゲノムスクリーニングプロジェクト (LC-SCRUM-Japan) におけるクリニカルシーケンス. 第 58 回日本肺癌学会学術集会 2017 (S2-1) .
5. Kinno T, Tsuta K, Shiraishi K, et al. Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF mutations. *Ann Oncol* 2014; 25:138-142
6. Litvak AM, Paik PK, Woo KM, et al. Clinical characteristics and course of 63 patients with BRAF mutant lung cancers. *J Thorac Oncol* 2014; 9:1669-1674
7. Zheng D, Wang R, Pan Y, et al. Prevalence and Clinicopathological Characteristics of BRAF Mutations in Chinese Patients with Lung Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2015; 22 Suppl 3:S1284-1291
8. Ding, X, Zhang, Z, Jiang, T, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of Chinese patients with non-small-cell lung cancer and BRAF mutation. *Cancer Med* 2017 ; 6 : 555-562
9. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, et al. Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)- positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17:642-650
10. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17:984-993
11. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18:1307-1316
12. 日本臨床腫瘍学会, 日本癌治療学会, 日本癌学会. 次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドライン (第 1.0 版) . 2017 年.

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-5. MET

(2024年4月改訂版)

目次

(1) はじめに	3
(2) <i>MET</i> 遺伝子とその異常	3
1. <i>MET</i> 遺伝子の構造と機能	3
2. <i>MET</i> ex14 skipping	3
3. <i>MET</i> 増幅	5
4. <i>MET</i> 蛋白過剰発現	5
5. <i>MET</i> 融合遺伝子	5
(3) <i>MET</i> 阻害剤	5
1. 総論	5
2. <i>MET</i> ex14 skipping に対する <i>MET</i> 阻害薬の種類	5
2-1. VISION 試験	6
2-2. GEOMETRY mono-1 試験	7
(4) <i>MET</i> ex14 skipping 変異の診断	7
1. 総論	7
2. Amoy CDx	7
3. コンパクトパネル	8
4. FoundationOne CDx および FoundationOne Liquid CDx	8
5. オンコマイン DxTT	8
6. 保険点数について	8
7. 肺癌の遺伝子検査における <i>MET</i> ex14 skipping 検査の位置づけ	9
(5) おわりに	9
参考文献	10

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

横内 浩, 谷田部 恭, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗 淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 清水 淳市, 豊岡 伸一

(1) はじめに

MET は 1984 年に中村らによってラットの血清中に肝細胞増殖因子として見いだされた分子であり¹、*KRAS* に次いで古いがん遺伝子の一つである。以降、多くの研究が精力的になされ、2010 年代後半には NSCLC に対する MET 抗体薬 (Onartuzumab) を用いた臨床試験²が行われたものの、肺癌治療に対する有効な分子標的としては *MET* exon 14 skipping (以下 *MET* ex14 skipping) に対する薬剤を待たなければならなかった。現在は、*MET* の遺伝子異常である *MET* 増幅に対する治療薬、*MET* 分解を促す抗体薬、*MET* 発現に対する抗体薬複合体などの開発が進んでいる。本手引き (ガイダンス) では、すでに実地臨床に用いられている *MET* ex14 skipping に対する解析について解説を加え、他の *MET* 遺伝子異常については、対応する薬剤が承認された時点でその解析のガイダンスを追加していきたい。

(2) *MET* 遺伝子とその異常

1. *MET* 遺伝子の構造と機能

MET 遺伝子は 7q21-q31 に位置する proto-oncogene で、肝細胞増殖因子 (HGF) をリガンドとする受容体型チ

ロシンキナーゼをコードしている。*MET* はさまざまなドメインから成る単一膜貫通受容体タンパク質であり、構成するドメインとして細胞外リガンド結合 (SEMA) ドメイン、プレキシシン-セマフォリン-インテグリン (PSI) ドメイン、免疫グロブリン-プレキシシン-転写因子 (IPT) ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内の膜近傍 (JM) ドメイン、チロシンキナーゼドメインがある³。リガンドが結合すると、*MET* はホモ二量体を形成してチロシン 1234/1235 (キナーゼドメイン) と 1349/1356 (ドッキングドメイン) のリン酸化が生じ、RAS/MAPK、Rac/Rho、PI3K/AKT シグナル伝達経路を活性化することで、腫瘍においては、その増殖、抗アポトーシス、転移に関与することが知られている (図 1)⁴。

MET 遺伝子変化としては、ex14 skipping 変異・増幅・蛋白過剰発現・融合遺伝子が報告されている。特に ex14 skipping 変異は強力なドライバー遺伝子異常であり、近年の *MET* 阻害薬の開発に伴って注目されるようになった。

2. *MET* ex14 skipping

2006 年、*MET* 遺伝子のイントロン領域などの変異により、exon14 が翻訳されなくなることが明らかとなり、*MET* ex14 skipping 変異として報告された⁵。*MET* ex14 skipping には、図 2 に示すように *MET* ex14 そのものの

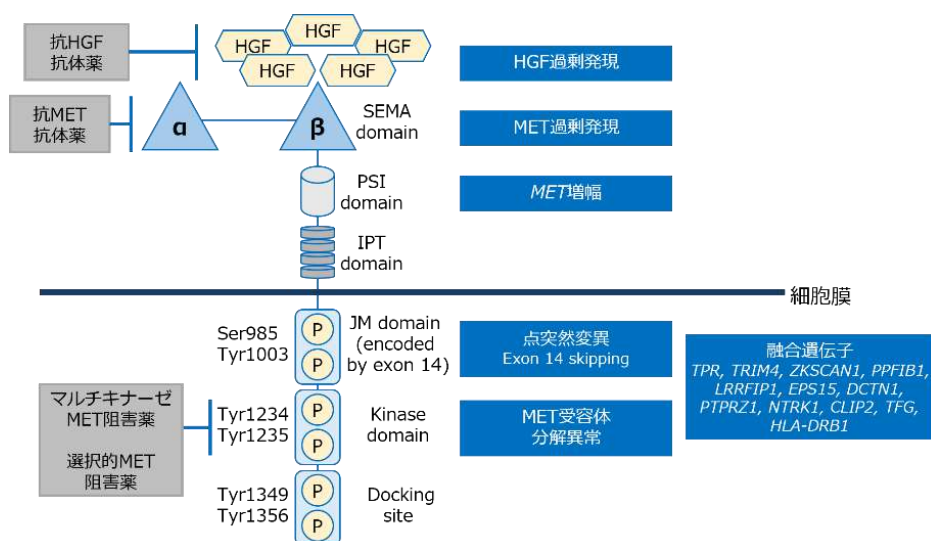
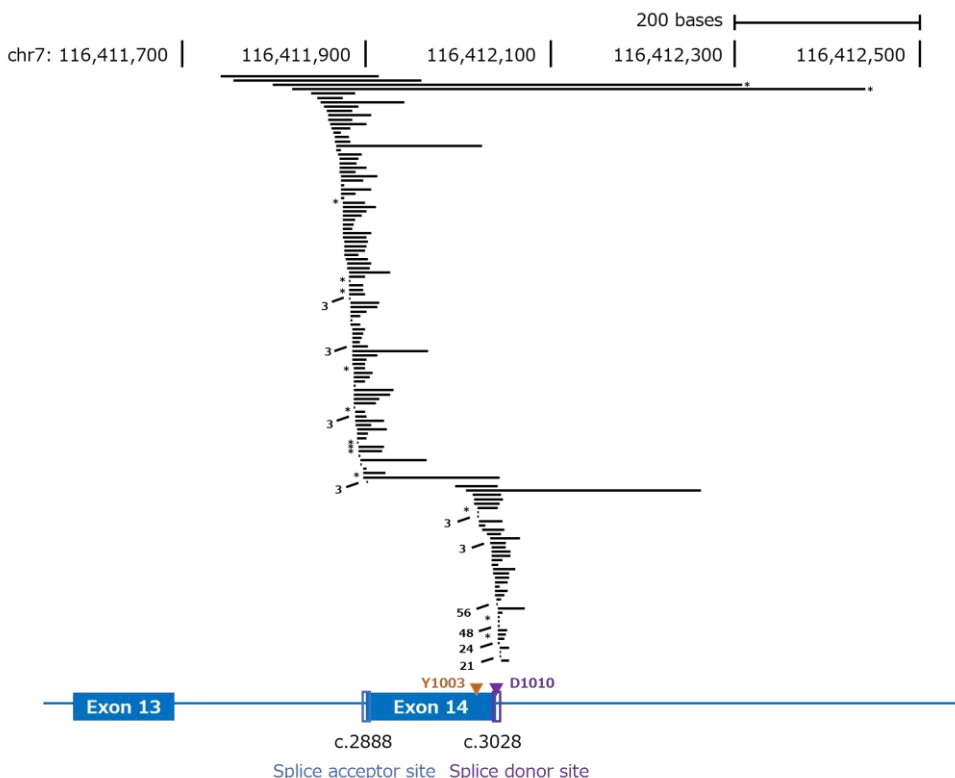


図 1. *MET* とそのリガンドである HGF の機能とその異常、それに対する薬剤の概要



METex14 skipping	Base substitution	Indel
Splice donor sites	149 (49.1%)	42 (13.8%)
Splice acceptor sites	4 (1.3%)	100 (32.9%)
Noncoding regions adjacent to splice acceptor	4 (1.3%)	3 (1.0%)
Whole exon 14 deletion		2 (0.7%)

図 2. MET ex14 skipping を生じる遺伝子異常の分布 (J Thorac Oncol 2016;11:1493-1502 より改変)

欠失のほか、イントロン/エクソン部分の遺伝子欠失や遺伝子変異により、スプライス部位の異常をきたし、exon14 の欠失した転写物の生成を生じるものもある。細胞表面における MET タンパク質発現の調節は、E3 ユビキチンリガーゼ (Cbl) によって媒介される。MET ex14 は膜近傍領域 (JM) をコードし、c-Cbl E3 ubiquitin ligase binding site を含んだ領域で、Cbl は、JM ドメイン内のリン酸化した Y1003 と結合する⁶。Cbl によるユビキチン化によって受容体の細胞内への取り込みや分解が誘発され、下流シグナルの制御に関わる⁷。一方、MET ex14 がいないことにより、ユビキチン化や分解が抑制され、その結果 MET の活性化が生じると考えられている (図 3)。このユビキチン化に重要な MET Y1003 の変異においても MET ex14 skipping と同等の分解異常を来す (“

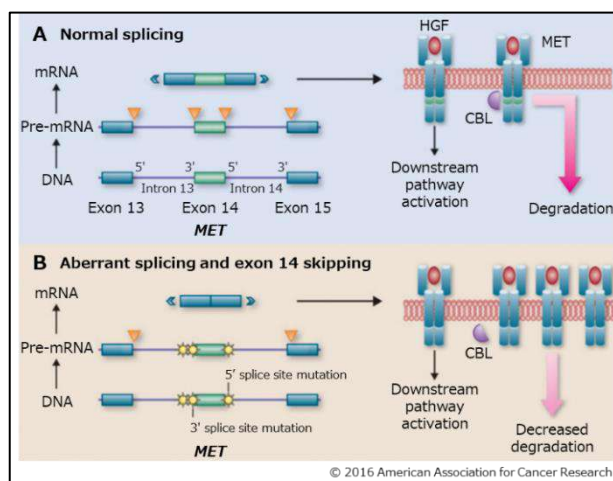


図 3. MET 遺伝子の正常スプライシング (A) と ex14 skipping による異常スプライシング (B) (Clin Cancer Res 2016; 22: 2832-2834) Reproduced with permission from American Association for Cancer Research (2024)

functional analogue")^{8,9}。この分解異常によってタンパク質の異常集積が生じ、後述の遺伝子増幅と合わせて免疫染色での過剰発現と関連することが知られている^{8,10,11}。*MET* ex14 skipping は、肺腺癌のおよそ3-4%を占め、高齢者に多く、性差、喫煙との相関は低いとされる¹²。また、通常他のドライバー変異 (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *HER2*) とは相互排他的だが、*KRAS* の共変異が約3%の症例で報告されている¹³。*MET* ex14 skipping は、肺腺癌以外の組織型では扁平上皮癌にも認められ¹⁴、肉腫様癌で頻度が高い (5%~32%) ことが知られている^{8,13,15,16}。

3. *MET* 増幅

MET 増幅は、主に *de novo* と獲得性 (acquired) の2つに分類される。*de novo MET* 増幅は NSCLC の1%~5%に見られ、予後不良と関連する^{17,18}。一方、耐性獲得機序としての *MET* 増幅は第1~第3世代の *EGFR* TKI 投与後の耐性化後に認められ、*EGFR* 変異陽性 NSCLC 患者の5%~15%で確認される^{19,20}。また *ALK*, *RET*, *ROS1* を標的とする治療に対する獲得耐性のメカニズムとしても認識されている²¹。

4. *MET* 蛋白過剰発現

IHC を用いた *de novo MET* 蛋白過剰発現は陽性基準にもよるが、NSCLC 患者の約20%~48%で認められる^{22,23}。一部の *MET* ex14 skipping 陽性腫瘍のみで *MET* 蛋白質発現が増強するとする報告もあるが²⁴、*MET* 過剰発現と遺伝子増幅または、*MET* の他の遺伝子変化の相関は弱く、他の発癌性ドライバー変化の状況で過剰発現を認めることがある^{13,24,25}。そのため、*MET* 過剰発現は遺伝子異常をサロゲートするバイオマーカーとはならない。

5. *MET* 融合遺伝子

MET 遺伝子融合は、主に神経膠腫、乳頭状腎細胞癌、甲状腺癌などで報告されている²⁶。NSCLC における *MET* 融合遺伝子の頻度は非小細胞肺癌の0.29%²⁷、ドライバー遺伝子陰性肺腺癌の0.5%と報告されている²⁸。これまでさまざまな融合パートナーが特定されており、その

ブレイクポイントは *MET* 遺伝子内のイントロン14を中心に各イントロン領域で発生している。融合遺伝子産物によってパートナー遺伝子内のコイルドコイルドメインと *MET* キナーゼドメインとの二量体形成が促進される^{26,28}。

(3) *MET* 阻害剤

1. 総論

MET 活性化機序は、増幅、変異、過剰発現、融合遺伝子など多様であり、これらの *MET* 遺伝子異常に対する薬物治療が進展している。特に開発が進んでいる薬剤は *MET* チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) であり、結合メカニズムと構造によりタイプ Ia, Ib, II, III に分けられる^{29,30}。タイプ I の阻害薬は、チロシンキナーゼドメインの活性化した ATP 結合部位に作用する阻害薬である。タイプ I に該当する阻害薬 (クリゾチニブ、カプマチニブ、テポチニブ、サボリチニブ、Vebreltinib、Glumetinib など) のうち、solvent-front の G1163 残基などとの相互作用に依存する点が特徴的であるクリゾチニブはタイプ Ia³⁰、*MET* キナーゼへの特異性がより高い阻害薬をタイプ Ib と呼ぶ。タイプ II の阻害薬 (カボザチニブ、メレスチニブ) は、タイプ I の領域ならびに非活性化 ATP 結合部位に作用する ATP 競合性のチロシンキナーゼ阻害薬であり、タイプ III 阻害薬はアロステリックサイトに接合する阻害薬である。現在 *MET* 阻害薬はチロシンキナーゼ阻害薬の他に抗体薬も開発され、種々の *MET* 遺伝子異常に対する効果が期待される。

2. *MET* ex14 skipping に対する *MET* 阻害薬の種類

現在報告されている *MET* ex14 skipping に対する *MET* 阻害薬について表1にまとめた。このうちテポチニブ (商品名: テブミトコ) は、先駆け審査指定制度に基づいて臨床第II相試験である VISION 試験³¹ を基に2019年11月19日に承認された。また GEOMETRY mono-1 試験³² をもとに、2020年6月4日にカプマチニブ (商

表 1. MET ex14 skipping 陽性 NSCLC を標的とした治療薬（承認済及び試験進行中のみ）

Agent	本邦における承認	Company	Targets	Type of inhibitor	Enzyme IC50, nM	Clinicaltrials.gov/NCT No.	PMID
選択的MET TKI							
Tepotinib	承認済 (2019/11/19)	Merck	MET	Type Ib TKI	3	NCT02864992	23553846 32469185 37270698
Capmatinib	承認済 (2020/6/29)	Novartis	MET	Type Ib TKI	0.13	NCT02414139	21918175 32877583
Savolitinib	未承認	AstraZeneca	MET	Type Ib TKI	5	NCT02897479	25148209
Vebreltinib (Bozitinib, APL-101, PLB-1001)	未承認	Apollomics	MET	Type Ib TKI	31	NCT03175224 NCT04258033	ESMO 2023 #1379P
Glumetinib (SCC244)	未承認	Haihe Biopharma	MET	Type Ib TKI	0.42	NCT04270591	29237805
マルチキナーゼ阻害薬							
Crizotinib	未承認	Pfizer	MET, ALK, ROS1, RON	Type Ia TKI	<1.0	NCT02465060 NCT02499614 NCT02664935	21812414 19459657 31932802
Elzovantib (TPX-0022)	未承認	Turning Point Therapeutics	MET, CSF1R, SRC	Type I TKI	0.14	NCT03993873	AACR-NCI-EORTC 2020 #P225
Cabozantinib	未承認	Elexis	MET, AXL, RET, VEGFR2, FLT3, ROS1, KIT	Type II TKI	1.3	NCT01639508	21926191
Merestinib	未承認	Eli Lilly	MET, RON, TIE-1, TIE-2, AXL, ROS1, DDR1/2, FLT3, MERTK, RON, MKNK1/2	Type II TKI	4.7	NCT02920996	23275061
抗体薬							
Sym015	未承認	Symphogen Servier	MET	IgG1 MoAb mixture	N/A	NCT02648724	ASCO 2020 #9510
REGN5093	未承認	Regeneron	MET	MET bispecific Ab	N/A	NCT04077099	ASCO 2022 #TPS8593
Amivantamab	未承認	Janssen	EGFR, MET	Bispecific Ab	N/A	NCT02609776	WCLC 2023 #OA21.04

品名：タブレクタ）が承認されている。いずれの試験においても MET ex14 skipping を来す変異部位（splice acceptor site, splice donor site, whole-exon 14 deletion）や変異種類（indels, point mutations）と治療効果との間に関連は認めなかった。また、MET TKI に加え、新しい作用機序を有する抗 MET 抗体薬の開発も進ん

でいる。

2-1. VISION 試験

VISION 試験は、MET ex14 skipping 変異陽性の切除不能な進行・再発 NSCLC 患者を対象にテポチニブ

500mg の 1 日 1 回投与における抗腫瘍効果と忍容性及び安全性を評価する、国際共同、非盲検、単群、マルチコホート、第 II 相試験である³¹。主要評価項目は奏効率 (ORR・RECIST ver 1.1 基準に基づく独立評価判定) で、有効性評価が可能であった主要解析コホート (コホート A) 146 例の ORR は 44.5%、そのうち観察期間が 9 カ月以上得られた 99 例における ORR は 46%、PFS 中央値は 8.5 カ月、OS 中央値は 17.1 カ月であった。その後、並行して行われていた検証的コホート (コホート C) と統合した長期フォローデータ解析結果が公表され、事前に規定された前治療歴別のサブグループ解析において、未治療例 (n=111)/既治療例 (n=97) の ORR、PFS 中央値、OS 中央値は、それぞれ 58.6%/49.5%、15.9 カ月/11.5 カ月、29.7 カ月/20.4 カ月であった³³。

2-2. GEOMETRY mono-1 試験

GEOMETRY mono-1 試験は、*MET* ex14 skipping 変異陽性の切除不能な進行・再発 NSCLC 患者を対象とした国際共同、非盲検、単群、第 II 相試験である³²。未治療例 (コホート 5b) 28 例、及び既治療例 (コホート 4) 69 例に対してカプマチニブ 1 回 400mg が 1 日 2 回経口投与された。主要評価項目である独立評価判定による ORR (RECIST ver 1.1 基準に基づく) は、未治療例/既治療例でそれぞれ 67.9%/40.6%、PFS 中央値、OS 中央値は、それぞれ 12.42 カ月/5.42 カ月、15.24 カ月/13.57 カ月であった^{32,34}。

(4) *MET* ex14 skipping 変異の診断

1. 総論

MET ex14 skipping は DNA の異常が exon14 を欠くたんぱく質として腫瘍化に作用する。前述のごとくスプライス部位を含む広い範囲の Indel が半分程度を占め、一般に DNA をもとにした解析は多くの偽陰性が生じることがわかっている^{35,36,37}。本邦で承認されているマルチプレックス検査ではいずれも RNA をもとにした解析であり、exon 14 欠失そのものを検出するため、より高い感受性と機能を有するアプローチが可能である³⁸。

VISION 試験では、組織検体に対してはアンブリコンベースの NGS であるオンコマイン Focus Assay、および血漿 cfDNA にハイブリッドキャプチャーベースの Guardant360 CDxTest を用いて患者選択が行われたが、組織・血液が同一プラットフォームで検討可能な ArcherMET の分析学的妥当性が確認され、本邦におけるコンパニオン診断薬として 2020 年 3 月に薬事承認された。ArcherMET は、モレキュラーバーコードを有している点や Anchored Multiplex PCR を用いている点が新しかった。しかし、Invitae/ArcherDx 社のグローバル経営戦略転換に伴い、2023 年 2 月に製造販売終了となった。2023 年 11 月 30 日現在、本邦において *MET* ex14 skipping 陽性非小細胞肺癌患者におけるテポチニブのコンパニオン診断となっているのは、AmoyDx (厚生労働省承認: 2021 年 8 月 12 日) およびコンパクトパネル (同: 2022 年 11 月 16 日)、カプマチニブのコンパニオン診断となっているのは FoundationOne CDx (同: 2020 年 5 月 29 日) および FoundationOne Liquid CDx (同: 2023 年 5 月 25 日) であり、単一検査で *MET* ex14 skipping を調べる方法は入手不可となった。なおオンコマイン DxTT については、カプマチニブのコンパニオン診断システムとして 2023 年 11 月 1 日に、テポチニブのコンパニオン診断システムとして 2023 年 12 月 4 日に厚労省に対して一部変更承認申請が行われており、将来的な使用が想定される。なお、*MET* ex14 skipping を検出する簡便なスクリーニング法としての *MET* IHC は、否定する報告が明確であり^{25,31,39}、現時点では推奨できない。一方で *MET* ex14 skipping を有する患者において、*MET* 過剰発現が *MET* 標的療法に対する感受性を予測する可能性があることを示唆する新たなデータも出てきている⁴⁰。

2. AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル

非小細胞肺癌 7 種のドライバー遺伝子 (*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*BRAF*、*MET*、*KRAS*、*RET*) をカバーする、リアルタイム PCR 法を原理としたコンパニオン診断薬で TAT (Turn Around Time) が短いことが特長である。組織から抽出した RNA 中の *MET* ex14 skipping を、RT-PCR (reverse transcription PCR) 法により検出する。具体的な解説については、肺癌患者におけるバイオマーカー検

査の手引き「2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査」の項を参照されたい。VISION 試験にて *MET* ex14 skipping 変異の有無が確認された 127 例の検体を用い、NGS 法を原理とした既承認医療機器を対照として一致率を検討した。その結果、本検査法の陽性一致率 100.0%、陰性一致率 97.7%であった⁴¹。

3. 肺がん コンパクトパネル Dx マルチコンパニオン診断システム

非小細胞肺癌 7 種のドライバー遺伝子(*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*MET*、*BRAF*、*KRAS*、*RET*) をカバーする、NGS を用いたコンパニオン診断薬である。検査に必要な腫瘍含有率は 5%以上が推奨とされ、他のマルチプレックス検査と比べて低く、細胞診検体での提出も可能となっていることが特長である。ArcherMET を対照とした相関性試験(肺癌組織 FFPE 検体 *MET* ex14 skipping 変異) : 全症例数 99 例(陽性 49 例、陰性 50 例)において、本検査法の陽性一致率 98.0%、陰性一致率 100.0%であった⁴²。

4. FoundationOne CDx および FoundationOne Liquid CDx

GEOMETRY mono-1 試験では、中央測定機関で RT-PCR 法により検査された。当該検査との分析学的妥当性が確認された FoundationOne CDx がンゲノムプロファイルがコンパニオン診断として承認されている。FoundationOne CDx における *MET* ex14 skipping の解析には exon14 近傍の splice site mutation/deletion の検出によって検出する。同様の技術を持つ FoundationOne Liquid CDx もコンパニオン診断として承認された。具体的な解説については、肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き「2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査」の項を参照されたい。

5. オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム

広く肺癌診療に用いられているが、2023 年 11 月 30 日時点で *MET* ex14 skipping 検出に対してコンパニオン診断として用いることはできない。研究用結果返却として

MET ex14 skipping の情報が提供されるが、オンコマイン DxTT では、解析アルゴリズムとして RNA における *MET* ex14 skipping と DNA での *MET* イントロン-エクソン境界領域の遺伝子解析を行う。当初 *MET* ex14 skipping 検出についてはオンコマイン DxTT での偽陽性の問題があり、現状での使用においては日本肺癌学会からの留意のお知らせの通り、*MET* ex14 skipping のリードカウントがおよそ 800 以下の場合には偽陽性の可能性が高い⁴³。2023 年 11 月 1 日付でカブマチニブに対するコンパニオン診断として、2023 年 12 月 4 日にテポチニブのコンパニオン診断として厚生労働省に医療機器製造販売承認事項一部変更申請が行われており、その後の分析学的妥当性を検証して改善を加えた結果、この問題は一定の解決がなされていることが期待される。

6. 保険点数について

Amoy Dx: 進行再発非小細胞肺癌患者へのテポチニブによる治療法の選択を目的として、患者 1 人につき 1 回のみ算定できる。

- 組織による Amoy Dx : 12500 点

(「D006-24 肺癌関連遺伝子多項目同時検査 10,000 点」「D004-2 悪性腫瘍組織検査 1. 悪性腫瘍遺伝子検査 イ. 処理が容易なもの (1)医薬品の適応判定の補助等に用いるもの 2,500 点」を合算した)

コンパクトパネル: 進行再発非小細胞肺癌患者へのテポチニブによる治療法の選択を目的として、患者 1 人につき 1 回のみ算定できる。

- 組織もしくは細胞によるコンパクトパネル : 11000 点

(「D004-2 悪性腫瘍組織検査 1. 悪性腫瘍遺伝子検査 イ. 処理が容易なもの 3 項目:6000 点と「D004-2 悪性腫瘍組織検査 1. 悪性腫瘍遺伝子検査 ロ.処理が複雑なもの 1 項目 5000 点を合算した)

FoundationOne CDx あるいは FoundationOne

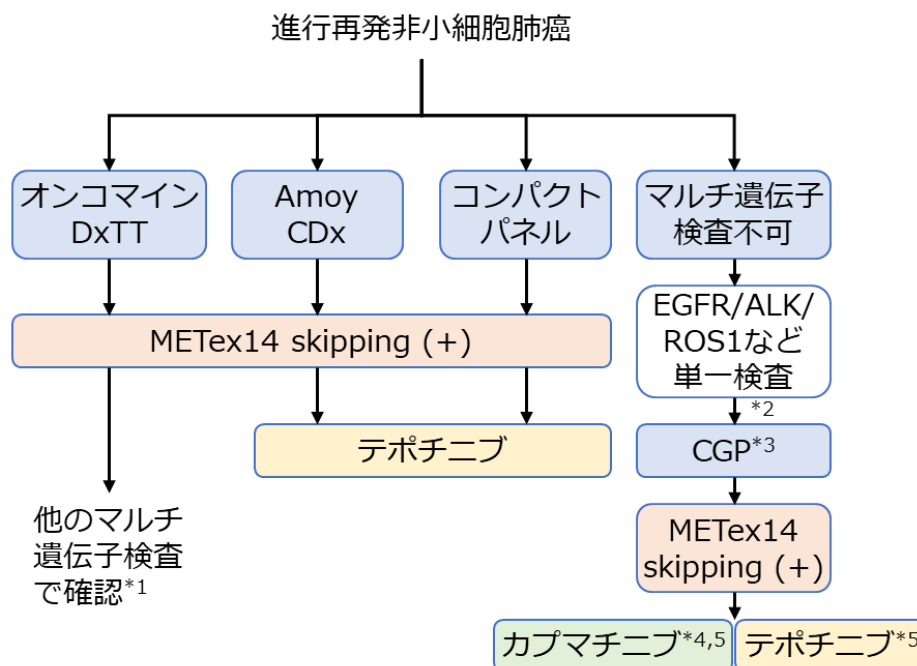


図 4. 保険診療における *MET* ex14 skipping 検査のアルゴリズム

*1 保険診療にてカバーできないことに留意

*2 標準治療が終了あるいは終了見込みのタイミングで出検。

*3 包括的がんゲノムプロファイリング検査（Comprehensive Genomic Profiling）。がんゲノム医療中核拠点病院・拠点病院・連携病院より出検される。2023年11月30日現在、保険収載された検査は FoundationOne CDx (F1CDx)、NCC オンコパネル、FoundationOne Liquid CDx (F1 リキッド)、GenMineTOP、Guardant360 である。

*4 F1CDx、F1 リキッドを*2のタイミングに依らず *MET* ex14 skipping のコンパニオン診断として用いた場合。ただしこの場合には、検査費用と診療報酬に大きな差が生じることに注意する。

*5 CGP 検査を行って *MET* ex14 skipping が検出され、がんゲノム医療中核拠点病院もしくは拠点病院のエキスパートパネルで推奨された場合。

Liquid CDx: コンパニオン診断薬として用いた場合にはカプマチニブによる治療法の選択を目的として使用される。ただし検査費用として保険償還される額はコンパニオン部分のみである。そのため検査会社が病院に請求する額との間に大きな相違が生じ、病院側が多額の負担を負うことになるため、実質的には使用が困難な状態となっている。

7. 肺癌の遺伝子検査における *MET*ex14 skipping 検査の位置づけ

MET 阻害薬の高い奏効率を考えると、他のドライバー変異である *EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*BRAF* と同等の位置づけで、すべての非小細胞肺癌患者でその遺伝子変異を知った上で治療計画を立てる必要がある。個別遺伝子検査では *MET* ex14 skipping を検出できる保険収載された検査は前述の通りない。他の遺伝子異常同様に、初回治療前にマルチ遺伝子パネル検査を行うことが推奨される。現状での

遺伝子検査と治療薬剤の組み合わせを、図4にまとめた。

(5) おわりに

MET ex14 skipping に対する有効な治療薬が開発され、2つの *MET* TKI が保険適応となっている。この治療薬を患者さんに届けるために、現状では単一検査はなくマルチプレックス遺伝子検査を施行する状況となっている。そのため微小検体にてマルチ検査を出検できない場合に *MET* ex14 skipping の診断は困難であるため、組織採取に工夫が必要であり、採取検体の状況に応じたマルチ検査の選択も重要である。またマルチ検査が failure した際の *MET* ex14 skipping 検出方法については保険診療の面も含めた今後の課題となっている。さらに他の *MET* 遺伝子異常（増幅、融合遺伝子）、蛋白過剰発現に対する診断方法、治療開発の今後の動向にも注視していく必要がある。

参考文献

1. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;122(3):1450-9.
2. Spigel DR, Edelman MJ, O'Byrne K, et al. Results from the phase III randomized trial of onartuzumab plus erlotinib versus erlotinib in previously treated stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer: METLung. *J Clin Oncol.* 2017;35(4):412-420.
3. Matsumoto K, Umitsu M, De Silva DM, et al. Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery. *Cancer Sci.* 2017; 108 (3): 296-307.
4. Liang H, Wang M. MET Oncogene in Non-Small Cell Lung Cancer: Mechanism of MET Dysregulation and Agents Targeting the HGF/c-Met Axis. *Onco Targets Ther* 2020; 13: 2491-2510.
5. Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 283-289.
6. Peschard P, Ishiyama N, Lin T, et al. A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *J Biol Chem.* 2004; 279 (28): 29565-29571.
7. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, et al. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature.* 2002; 416 (6877): 187-190.
8. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, et al. MET exon 14 mutations in non-small-cell lung cancer are associated with advanced age and stage-dependent MET genomic amplification and c-Met overexpression. *J Clin Oncol* 2016; 34: 721-730.
9. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov* 2015; 5: 850-859.
10. Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov* 2015; 5: 842-849.
11. Tong JH, Yeung SF, Chan AW, et al. MET amplification and exon 14 splice site mutation define unique molecular subgroups of non-small cell lung carcinoma with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 3048-3056.
12. Adib E, Nassar AH, Abou Alaiwi S, et al. Variation in targetable genomic alterations in non-small cell lung cancer by genetic ancestry, sex, smoking history, and histology. *Genome Med.* 2022; 14(1): 39.
13. Lee JK, Madison R, Classon A, et al. Characterization of non-small-cell lung cancers with MET exon 14 skipping alterations detected in tissue or liquid: clinicogenomics and real-world treatment patterns. *JCO Precis Oncol.* 2021; 5:PO.21.00122.
14. Sands JM, Nguyen T, Shivdasani P, et al. Next-generation sequencing informs diagnosis and identifies unexpected therapeutic targets in lung squamous cell carcinomas. *Lung Cancer.* 2020; 140: 35-41.
15. Liu X, Jia Y, Stoopler MB, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol.* 2016; 34(8): 794-802.
16. Fujino T, Suda K, Sakai K, et al. Intra-tumor and inter-tumor heterogeneity in MET Exon 14 skipping mutations and co-mutations in pulmonary pleomorphic carcinomas. *Clin Lung Cancer.* 2022; 23(3): e185-e195.
17. Schildhaus HU, Schultheis AM, Ruschoff J, et al. MET amplification status in therapy-naïve adeno- and squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(4):907-915.
18. Go H, Jeon YK, Park HJ, et al. High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010; 5(3): 305-313.
19. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR mutant lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(8): 2240-2247.
20. Leonetti A, Sharma S, Minari R, et al. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2019; 121(9): 725-737.
21. Coleman N, Hong L, Zhang J, et al. Beyond epidermal growth factor receptor: MET amplification as a general resistance driver to targeted therapy in oncogene-driven non-small-cell lung cancer. *ESMO Open.* 2021; 6(6): 100319.
22. Park S, Koh J, Kim DW, et al. MET amplification, protein expression, and mutations in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2015; 90(3): 381-387.
23. Li A, Niu FY, Han JF, et al. Predictive and prognostic value of de novo MET expression in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2015; 90(3): 375-380.
24. Baldacci S, Figeac M, Antoine M, et al. High MET overexpression does not predict the presence of MET exon 14 splice mutations in NSCLC: results from the IFCT PREDICT.amm study. *J Thorac Oncol.* 2020; 15(1): 120-124.
25. Guo R, Berry LD, Aisner DL, et al. MET IHC is a poor screen for MET amplification or MET exon 14 mutations in lung adenocarcinomas: data from a tri-institutional cohort of the Lung Cancer Mutation Consortium. *J Thorac Oncol.* 2019; 14(9): 1666-1671.
26. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun.* 2014; 5: 4846.
27. Riedel R, Fassunke J, Scheel AH, et al. MET fusions in NSCLC: clinicopathologic features and response to MET inhibition. *J Thorac Oncol.* 2023; S1556-0864(23)00666-4.

28. Plenker D, Bertrand M, de Langen AJ, et al. Structural alterations of MET trigger response to MET kinase inhibition in lung adenocarcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2018; 24(6):1337-1343.
29. Cui JJ. Targeting receptor tyrosine kinase MET in cancer: small molecule inhibitors and clinical progress. *J Med Chem.* 2014; 57:4427-4453.
30. Guo R, Luo J, Chang J, et al. MET-dependent solid tumours-molecular diagnosis and targeted therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(9):569-587.
31. Paik PK, Felip E, Veillon R, Tepotinib in non-small-cell lung cancer with MET exon 14 skipping mutations. *N Engl J Med.* 2020; 383(10): 931-943.
32. Wolf J, Seto T, Han JY, et al. Capmatinib in MET exon 14 mutated or MET amplified non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2020; 383: 944-957.
33. Mazieres J, Paik PK, Garassino MC, et al. Tepotinib treatment in patients with MET exon 14-skipping non-small cell lung cancer: long-term follow-up of the VISION phase 2 nonrandomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2023; 9: 1260-1266.
34. 国際共同第Ⅱ相試験 (A2201 試験) [承認時評価資料]
35. Davies KD, Lomboy A, Lawrence CA, DNA-based versus RNA-based detection of MET exon 14 skipping events in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2019; 14: 737-741.
36. Descarpentries C, Lepretre F, Escande F, et al. Optimization of routine testing for MET exon 14 splice site mutations in NSCLC patients. *J Thorac Oncol* 2018; 13: 1873-1883.
37. Jurkiewicz M, Saqi A, Mansukhani MM, et al. Efficacy of DNA versus RNA NGS-based methods in MET exon 14 skipping mutation detection. *J Clin Oncol* 2020; 38: 9036-9036.
38. Davies KD, Lomboy A, Lawrence CA, et al. DNA-based versus RNA-based detection of MET exon 14 skipping events in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2019; 14(4): 737-741.
39. Bubendorf L, Dafni U, Schobel M, et al. Prevalence and clinical association of MET gene overexpression and amplification in patients with NSCLC: results from the European Thoracic Oncology Platform (ETOP) Lungscape project. *Lung Cancer.* 2017; 111: 143-149.
40. Guo R, Offin M, Brannon AR, et al. MET exon 14-altered lung cancers and MET inhibitor resistance. *Clin Cancer Res.* 2021; 27(3): 799-806.
41. AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル添付文書 https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/850278_30300E ZX00076000_A_01_07.pdf
42. Kato K, Okami J, Nakamura H, et al. Analytical performance of a highly sensitive system to detect gene variants using next-generation sequencing for lung cancer companion diagnostics. *Diagnostics.* 2023; 13(8): 1476.
43. 日本肺癌学会. 「オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム」における METex14 skipping 変異検出時での留意点について. https://www.haigan.gr.jp/modules/important/index.php?content_id=227

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-6. RET

(2024年4月改訂版)

目次

(1) RET 遺伝子	2
(2) RET 融合遺伝子陽性肺癌の臨床病理学的特徴	3
(3) RET 融合遺伝子陽性肺癌に対する臨床試験	4
(4) RET 融合遺伝子の診断	5
1. オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム	5
2. AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル	5
3. その他の方法	5
参考文献	7

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

阪本 智宏, 荒金 尚子, 後藤 功一, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗 淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

(1) RET 遺伝子

Rearranged during transfection (*RET*) は 1985 年に発見された癌原遺伝子である¹。*RET* 遺伝子は膜貫通型の *RET* 受容体型チロシンキナーゼをコードしており、*RET* 遺伝子の胚細胞変異は多発性内分泌腫瘍症 2 型の原因になることや、体細胞における遺伝子融合が甲状腺乳頭癌で見られることが知られている。2012 年 2 月、肺癌においても *RET* 遺伝子に体細胞性の遺伝子融合が認められることが、日米 3 つのグループから同時に報告された。この 3 グループはそれぞれ異なった手法でこの融合遺伝子を発見している。Takeuchi らは、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization: FISH) 法を用いたスクリーニングによって、*KIF5B* あるいは *CCDC6* と融合する *RET* 遺伝子を発見した²。一方 Kohno らは、30 例の肺腺癌の全 RNA シークエンス解析を行い 1 例の *KIF5B-RET* を発見し、さらに RT-PCR とサンガーシークエンス法によって 319 例の肺腺癌のうち 6 例で *KIF5B-RET* を同定した³。さらに、米国の Foundation Medicine 社が中心となったグループは、一部の癌関連遺伝子を選択的に解析するターゲットシークエンス解析を用いて、*KIF5B-RET* を発見した⁴。融合バリエーションとして最も多い *KIF5B-RET* は 10 番染色体腕間逆位によって生じる。このように、主に coiled-coil ドメインをもつ融

合パートナー遺伝子が *RET* と融合することで、リガンドの結合に依存しない恒常的な二量体化をきたし、キナーゼが活性化される¹⁻³ (図 1)。また先の Takeuchi らの報告では、*RET* 融合遺伝子を発現させた線維芽細胞をヌードマウスに移植すると腫瘍を形成すること、そして *KIF5B-RET* を導入した Ba/F3 細胞の増殖が *RET* 阻害活性をもつバンデタニブ (vandetanib)、スニチニブ (sunitinib)、ソラフェニブ (sorafenib) によって用量依存性に抑制されることも示された。その後、*CCDC6-RET* を有するヒト由来の肺癌細胞株 LC-2/ad も発見され、この細胞を用いたマウスゼノグラフトモデルでは、バンデタニブ投与によって腫瘍縮小効果も示された⁵。

非小細胞肺癌における *RET* 融合遺伝子の頻度は 1~2% と希少である⁶⁻⁸。2013 年から行われている多施設肺癌遺伝子スクリーニングプロジェクト (LC-SCRUM-Asia) においても、非扁平上皮非小細胞肺癌 8678 例を RT-PCR や NGS で解析した結果、*RET* 融合遺伝子は 206 例 (2%) で検出され、*ALK*、*ROS1*、*BRAF*、*MET* や *KRAS* などのその他のドライバー変異と相互排他性が認められた⁸。*RET* 融合遺伝子は、融合するパートナー遺伝子によって 30 種類以上のバリエーションが報告されている⁹ (図 2)。パートナー遺伝子の多くは coiled-coil 領域をコードしており、融合蛋白はこの coiled-coil 領域によって二量体を形成することで、*RET* キナーゼの恒常的活性化をきたすと

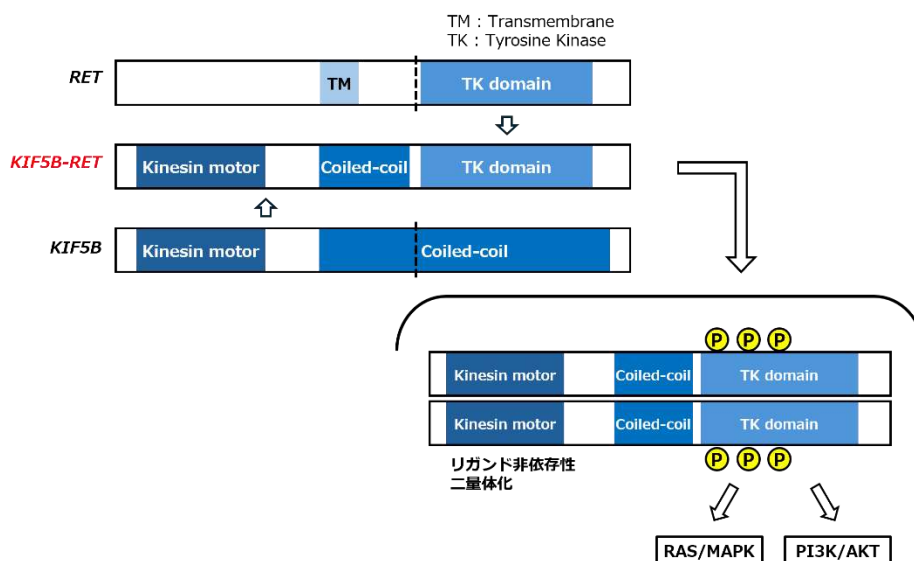


図 1. *RET* 融合遺伝子とその活性化メカニズム

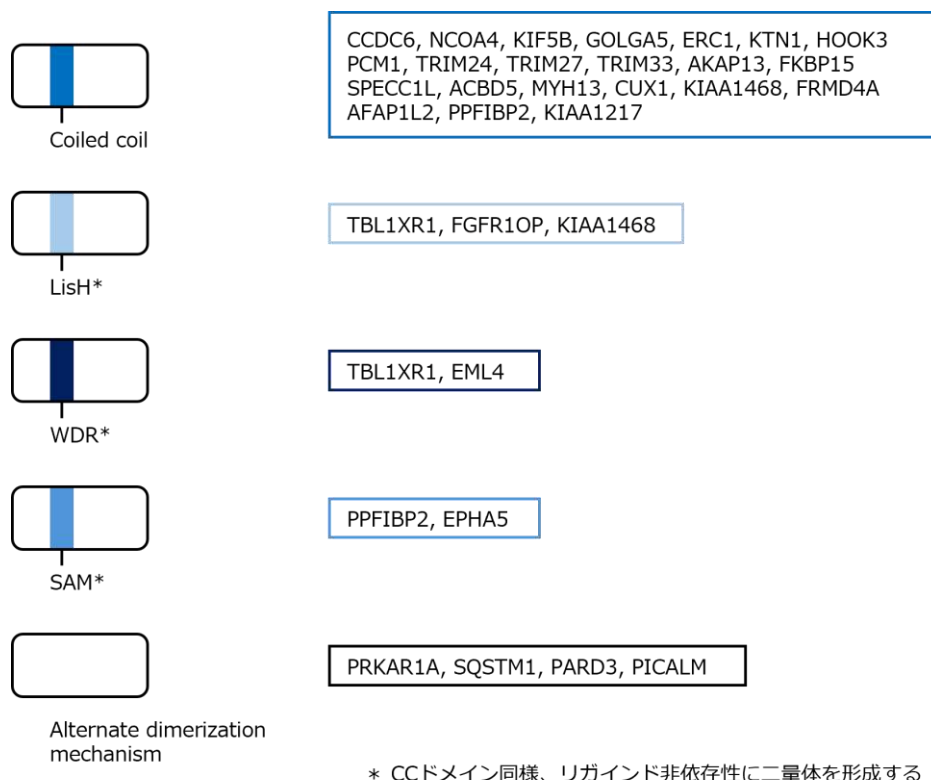


図2. RETの融合パートナー遺伝子

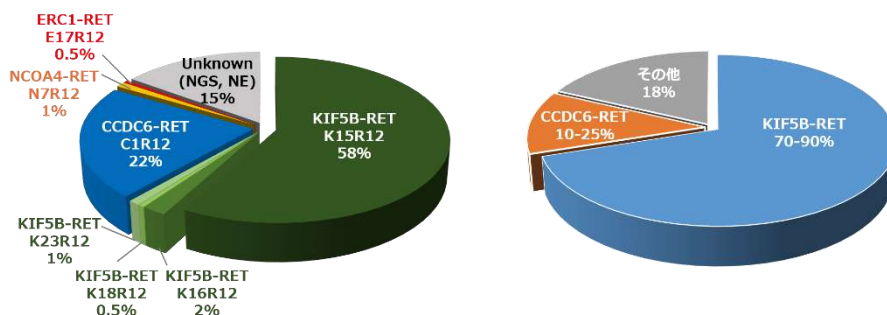


図3. 非小細胞肺癌におけるRETの融合パートナー遺伝子とその頻度
 左: LC-SCRUM-Asiaのデータより (RET肺癌 206例)
 右: Liらの報告より(Cancer Treat Rev. 2019;81:101911.)

考えられている。非小細胞肺癌で検出されるRET融合遺伝子のバリエーションの多くはKIF5B-RETとCCDC6-RETであり、この2つで約80%を占める。その他、頻度は低いがNCOA4-RETやERC1-RETなども検出される^{8,10} (図3)。

(2) RET融合遺伝子陽性肺癌の臨床病理学的特徴

Linらが行った非小細胞肺癌患者のメタ解析において、RET融合遺伝子は腺癌で1.4% (57/3,980例)、非腺癌で0.3% (4/1,278例)と腺癌に多い (オッズ比 3.59、

$p=0.004$) こと、また女性、若年者、非喫煙者が多いことが報告されている¹¹。これらの臨床病理学的特徴は、EGFR遺伝子変異、ALK融合遺伝子、あるいはROS1融合遺伝子を有する肺癌と類似している。また、LC-SCRUM-AsiaでRET融合遺伝子が検出された206例の日本人において、年齢中央値63歳 (29-87歳)、腺癌が97% (199/206例)、女性が59% (122/206例)、非喫煙者が60% (124/206例)と、日本人においても同様の傾向がある可能性が示唆される。

またOffinらは、26例のRET肺癌において58% (15/26

例)でPD-L1 TPS \geq 50%と高発現であったこと、その一方でTumor Mutation Burden (TMB)はRET融合遺伝子のない肺癌と比べて低値であったこと(1.75 mut/Mb vs 5.27mut/Mb, $p < 0.0001$)を報告している。さらに、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)を投与された16例のRET肺癌において無増悪生存期間は3.4カ月(95% CI, 2.1~5.6カ月)であり、PD-L1高発現群や高TMB群においても高い治療効果はみられなかったと報告されている¹²。またYohらは、9例の日本人RET肺癌において67%(6/9例)でPD-L1 TPS \geq 50%と高発現であったことを報告しており¹³、日本人においても同様の傾向がある可能性が示唆される。

(3) RET 融合遺伝子陽性肺癌に対する臨床試験

RET肺癌に対する治療開発は、まずバンデタニブ、カボザチニブ、アレクチニブ、レンバチニブ、ソラフェニブといったRET阻害活性を有するマルチキナーゼ阻害薬の臨床試験が行われてきたが、その効果は限定的であり¹⁴⁻¹⁸(表1)、薬剤承認までには至らなかった。マルチキナーゼ阻害薬では、他の標的遺伝子も同時に阻害するため、関連する毒性によりRET阻害効果が得られる十分量まで薬剤を増量するのが困難であったことがその主な原因と考えられている。

その後、RETキナーゼに対する選択的阻害薬が相次いで開発され、その中でも最初に行われた臨床試験がRET遺伝子異常を有する固形腫瘍を対象としたセルペルカチニブ単剤療法の国際多施設共同第I/II相バスケッ試験(LIBRETTO-001試験)である。この臨床試験は第I相用量漸増パートと、6つのコホートからなる第II相用量拡大パートで行われ、そのうち、RET融合遺伝子陽性の既治療固形腫瘍を対象としたコホート1と、RET融合遺伝子

陽性の未治療固形腫瘍を対象としたコホート2に、それぞれ105例と39例の非小細胞肺癌が含まれていた。既治療非小細胞肺癌の治療成績は、105例のうち2例で完全奏効(CR)、65例で部分奏効(PR)が得られ、奏効割合は64%(95%信頼区間[CI]54~73%)、奏効期間中央値は17.5カ月(95% CI 12.0カ月~未到達[NE])、無増悪生存期間中央値は16.5カ月(95% CI 13.7カ月~NE)であった。また、未治療例の治療成績は、39例のうち33例でPRが得られ、奏効割合は85%(95% CI 70~94%)、奏効期間中央値はNE(95% CI 12.0カ月~NE)、無増悪生存期間中央値はNE(95% CI 13.8カ月~NE)であった¹⁹。この結果に基づき、RET融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌に対するセルペルカチニブ(レットヴィモ[®])の単剤療法が、2020年5月に米国FDAで、2021年9月に本邦で承認された。またその後、未治療のRET融合遺伝子陽性肺癌を対象とした、セルペルカチニブ単剤療法とプラチナ併用化学療法およびペムブロリズマブ併用療法を比較する無作為化国際多施設共同第III相試験(LIBRETTO-431試験)が行われた。無増悪生存期間中央値はセルペルカチニブ群で24.8カ月、対照群で11.2カ月、ハザード比0.482(95%CI 0.331~0.700, $p < 0.001$)であった。奏効割合はセルペルカチニブ群で83.7%、対照群で65.1%、奏効期間中央値はセルペルカチニブ群で24.2カ月(95% CI 17.9カ月~NE)、対照群で11.5カ月(95% CI 9.7カ月~23.3カ月)であった²⁰。

また、RET選択的阻害薬の臨床試験としては、RET遺伝子異常を有する固形腫瘍を対象としたラルセチニブ単剤療法の国際多施設共同第I/II相バスケッ試験(ARROW試験)も行われた。この臨床試験は第I相用量漸増パートと、9つのコホートからなる第II相用量拡大パートで行われた。RET融合遺伝子陽性肺癌既治療例の治

表1. RET融合遺伝子陽性肺癌に対する過去の臨床試験

Agent	Study	Subject	N	ORR(%)	mPFS(months)
Vandetanib	LURET	Treated	19	47(Intention-to-treat) 53(primary analysis)	4.7
Cabozantinib	—	Treated/Untreated	26	28	5.5
Alectinib	ALL-RET	Treated	34	4	3.4
Lenvatinib	—	Treated	25	16	7.3
Sorafenib	—	Treated	3	0	NA

療成績は、87例のうち5例でCR、48例でPRが得られ、奏効割合は53% (95% CI 50~71%)、奏効期間中央値はNE (95% CI 15.2カ月~NE)、無増悪生存期間中央値は17.1カ月 (95% CI 8.3~22.1カ月)であった。また、未治療例の治療成績は、27例のうち3例でCR、16例でPRが得られ、奏効割合は70% (95% CI 50~86%)、奏効期間中央値は9.0カ月 (95% CI 6.3カ月~NE)、無増悪生存期間中央値は9.1カ月 (95% CI 6.1~13.0カ月)であった²¹。この結果に基づき、RET融合遺伝子陽性肺癌に対するプラルセチニブの単剤療法は、2020年9月に米国FDAで承認された (本邦では未承認)。

(4) RET融合遺伝子の診断

1. オンコマイン™ Dx Target Test マルチCDx システム

オンコマイン DxTT は、NGSを用いた遺伝子パネル検査であり、がん関連46遺伝子の標的領域をPCRで増幅してシーケンス解析を行い、遺伝子異常を検出する。我が国では、2018年にBRAF V600E陽性非小細胞肺癌に対するダブラフェニブ+トラメチニブ併用療法のコンパニオン診断薬として承認され、その後、2019年にEGFR遺伝子変異陽性肺癌、ALK融合遺伝子陽性肺癌、ROS1融合遺伝子陽性肺癌に対する各々の分子標的薬のコンパニオン診断薬としても承認された。そして、2021年9月には、RET融合遺伝子陽性肺癌に対するセルペルカチニブのコンパニオン診断薬としても承認され、現在、オンコマイン DxTT は6つのドライバー遺伝子を同時に診断するマルチ遺伝子検査として承認されている。オンコマイン DxTT で検出可能なRET融合遺伝子のバリエーションは44種類であり、図3で示した非小細胞肺癌で検出されるバリエーションはほとんどカバーされている。

2. AmoyDx®肺癌マルチ遺伝子PCR パネル

AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子PCR パネルは、リアルタイムPCR法を用いたマルチ遺伝子診断薬であり、肺癌関連11遺伝子の主要な領域を標的に、遺伝子異常を検出する。本邦では、2021年6月にEGFR、ALK、ROS1、BRAFおよびMETを標的とする各々の分子標的薬のコン

パニオン診断薬として承認された。さらにその後、2023年3月にRET融合遺伝子陽性肺癌に対するセルペルカチニブのコンパニオン診断薬としても承認された。このキットは、上記遺伝子にKRASを加えた7つのコンパニオン診断対象ドライバー遺伝子に加え、HER2、NTRK1-3の解析もできるように設計されている。

3. その他の方法

肺癌 コンパクトパネル® Dx マルチコンパニオン診断システムは、NGSを用いたマルチ遺伝子診断薬で、本邦で開発された。FFPE検体の他に、細胞診検体についても比較的容易に検査提出が可能となっている。2023年2月に4遺伝子 (EGFR、ALK、ROS1、MET) に、2024年2月には追加で3遺伝子 (BRAF、KRAS、RET) について保険適用となった。

その他の検査として、本邦では、腫瘍組織を用いた遺伝子パネル検査である「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」と「OncoGuide™ NCC オンコパネル システム」、「GenMineTOP®がんゲノムプロファイリングシステム」が承認されている。また血液検体を用いた遺伝子パネル検査としては「FoundationOne® Liquid CDx がんゲノムプロファイル」と「Guardant360™ CDx がん遺伝子パネル」が承認されている。これらはいずれも、腫瘍組織由来あるいは血漿由来のDNAを用いて合成核酸とのハイブリダイゼーションによって標的領域を濃縮し、シーケンス解析を行う。現時点では、リキッド解析による融合遺伝子の診断精度はまだ低く、偽陰性と診断される危険性が高いため、組織を用いた遺伝子検査を優先すべきである。いずれの検査においても、RET融合遺伝子はコンパニオン診断の対象ではなく、包括的がんゲノムプロファイル (CGP) 検査の解析対象である。したがって、これらのパネルを用いたCGP検査でRET融合遺伝子が検出された場合、RET阻害薬による治療を行うためには、エキスパートパネルによる推奨が必要となる。なお、NGSを用いた遺伝子パネル検査を実施するにあたっては、日本臨床腫瘍学会、日本癌治療学会、日本癌学会の3学会から合同で発出している「次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドライン²²」や、肺癌患者にお

けるバイオマーカー検査の手引き「2.バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査」、「3.バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い」の項も参照されたい。

また、これまで ALK などの融合遺伝子の診断には FISH 法が簡便で多くの検査室で用いられており、RET 融合遺伝子に対しても甲状腺癌などでの結果が報告されている。特に break apart プローブを用いることで、理論的にはほとんどの RET 再構成が検出できると考えられるが、実際には多くの乖離が報告され、感度は高いものの特異性が

やや低い²³。すなわち、break apart FISH では陽性と出ても必ずしも RET 融合遺伝子が存在するとは限らない。また、免疫染色も感度・特異度ともに 80%台と満足な結果を示す検査ともいえない²³。したがって、FISH、IHC ともに診療および研究においても RET 融合遺伝子の有用な surrogate とは考えにくい。コンパニオン診断テストはいずれも RNA ベースのパネル解析であるが、DNA ベースの F1CDx や NCC オンコパネル、WGS では意義不明の構造異常が検出されることがある点は留意する必要がある。

参考文献

1. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell*. 1985 Sep;42(2):581-8.
2. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18:378-381
3. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012; 18:375-377
4. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med* 2012; 18:382-384.
5. Suzuki M, Makinoshima H, Matsumoto S, et al. Identification of a lung adenocarcinoma cell line with CCDC6-RET fusion gene and the effect of RET inhibitors in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 2013; 104:896-903.
6. Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:4352-4359.
7. Tsuta K, Kohno T, Yoshida A, et al. RET-rearranged non-small-cell lung carcinoma: a clinicopathological and molecular analysis. *Br J Cancer* 2014;110:1571-1578.
8. Sunami K, Furuta K, Sasada S, et al. Multiplex Diagnosis of Oncogenic Fusion and MET Exon Skipping by Molecular Counting Using Formalin-Fixed Paraffin Embedded Lung Adenocarcinoma Tissues. *J Thorac Oncol*. 2016;11(2):203-12.
9. Matsumoto S, Ikeda T, Yoh K, et al. Impact of rapid multigene assays with short turnaround time (TAT) on the development of precision medicine for non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 39, 2021 (suppl 15; abstr 9094)
10. Drilon A, Hu ZI, Lai GGY, et al. Targeting RET-driven cancers: lessons from evolving preclinical and clinical landscapes. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Mar;15(3):151-167.
11. Lin C, Wang S, Xie W, et al. The RET fusion gene and its correlation with demographic and clinicopathological features of non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Biol Ther*. 2015; 16: 1019-1028.
12. Offin M, Guo R, Wu SL, et al. Immunophenotype and Response to Immunotherapy of RET-Rearranged Lung Cancers. *JCO Precis Oncol*. 2019; 3: PO.18.00386.
13. Yoh K, Matsumoto S, Furuya N, et al. Comprehensive assessment of PD-L1 expression, tumor mutational burden and oncogenic driver alterations in non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Lung Cancer*. 2021 Sep;159:128-134.
14. Yoh K, Seto T, Satouchi M, et al. Vandetanib in patients with previously treated RET-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (LURET): an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Respir Med*. 2017 Jan;5(1):42-50.
15. Drilon A, Rekhtman N, Arcila M, et al. Cabozantinib in patients with advanced RET-rearranged non-small-cell lung cancer: an open-label, single-centre, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2016 Dec;17(12):1653-1660.
16. Takeuchi S, Yanagitani N, Seto T, et al. Phase 1/2 study of alectinib in RET-rearranged previously-treated non-small cell lung cancer (ALL-RET). *Transl Lung Cancer Res*. 2021 Jan;10(1):314-325.
17. Hida T, Velcheti V, Reckamp K, et al. A phase 2 study of lenvatinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2019 Dec;138:124-130.
18. Horiike A, Takeuchi K, Uenami T, et al. Sorafenib treatment for patients with RET fusion-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016 Mar;93:43-6.
19. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Aug 27;383(9):813-824.
20. Zhou C, Solomon B, Loong HH, et al. First-Line Selpercatinib or Chemotherapy and Pembrolizumab in RET Fusion-Positive NSCLC (LIBRETTO-431). *N Engl J Med*. 2023 Nov; 389:1839-1850
21. Gainor JF, Curigliano G, Kim DW, et al. Pralsetinib for RET fusion-positive non-small-cell lung cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, phase 1/2 study. *Lancet Oncol*. 2021 Jul;22(7):959-969.
22. 日本臨床腫瘍学会, 日本癌治療学会, 日本癌学会. 次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドライン (第 2.1 版) . 2020 年.
23. Radonic T, Geurts-Giele WRR, Samsom KG, et al. RET Fluorescence In Situ Hybridization Analysis Is a Sensitive but Highly Unspecific Screening Method for RET Fusions in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2021 May;16(5):798-806.

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-7. KRAS

(2024年4月改訂版)

目次

(1) RAS 遺伝子とその遺伝子変異	2
(2) KRAS 変異陽性肺癌の臨床病理学的特徴	4
(3) KRAS G12C 陽性肺癌に対する臨床試験	4
(4) KRAS 遺伝子 G12C 変異の検査	9
1. <i>therascreen</i> KRAS 変異検出キット RGQ 「キアゲン」	9
2. Guardant360 CDx がん遺伝子パネル	10
3. AmoyDx [®] 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル	10
4. その他のマルチ遺伝子検査	11
4-1. その他留意事項	12
4-1-1. 検査実施時期および検査対象	12
おわりに	12
参考文献	13

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

清水 淳市, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗
淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 豊岡 伸一

Kristen rat sarcoma virus (*KRAS*) 遺伝子は、1980年代に発見された *RAS* がん遺伝子 (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS*) のうちの1つである¹。*RAS* がん遺伝子は、ヒトがんにおいて最も高頻度にみられるがん遺伝子であり約19%にみられる²。*KRAS* 遺伝子変異は欧米の肺腺がんの約30%²、日本の肺腺がんの約10%で見つかる³。他の Driver mutation とは基本的に相互排他的である。*KRAS* 遺伝子変異を標的とする治療開発は長く困難であったが⁴、*KRAS* G12C 変異を標的とした分子標的治療薬の有効性が示され⁵、ソトラシブが米国FDAで2021年5月に、本邦で2022年1月に承認された。

(1) *RAS* 遺伝子とその遺伝子変異

RAS 蛋白ファミリーは188-189個のアミノ酸からなる、GTP (グアノシン三リン酸) をGDP (グアノシン二リン酸) に加水分解する低分子量(分子量21kDa)のGTPaseの1つであり細胞膜内面に単量体で存在する。GTPの結合した活性化状態とGDPの結合した不活性化型が存在し、両者を行き来することで細胞内のシグナル伝達経路においてスイッチとしての役割をもつ(図1)。上流からのシグナルにより活性化状態となり下流へシグナルを伝達し、細胞の増殖、分化などの調節を行う。スイッチのオンオフは、活性化を促進するグアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide exchange factor; GEF) と、*RAS* の内因性 GTPase 活性を促進し、活性化型から不活性化型への変換を促進する GTPase 活性化蛋白質 (GTPase activating protein; GAP) により調節される。*RAS* 遺伝子には *HRAS*、*KRAS*、*NRAS* の3種類が存在し、これらの配列は高い相同性をもっている。スイッチ I とスイッチ

II、Pループからなり下流のエフェクター蛋白と結合するGドメインと、C末端の超可変領域 (hypervariable regions; HVRs) からなる(図2)。HVRsのCAAX (C; システイン、A; 脂肪族アミノ酸、X; 任意のアミノ酸) の4つのアミノ酸が、翻訳後修飾を受けることにより細胞膜内面と結合するようになり *RAS* 蛋白質の細胞膜内側への局在が決定される。*RAS* の下流シグナル伝達経路は、RAF-MEK-ERK 経路と PI3K-AKT-mTOR 経路など10種類以上が存在する。

RAS 遺伝子に点突然変異が生じると、*RAS* 蛋白質のGTPase活性が減少するとともに、蛋白質の構造変化によりGAPの結合も阻害される。これにより、活性化型から不活性化型への変換が阻害され、活性化型 *RAS* 蛋白が蓄積することにより、癌細胞における増殖・生存シグナル伝達が増

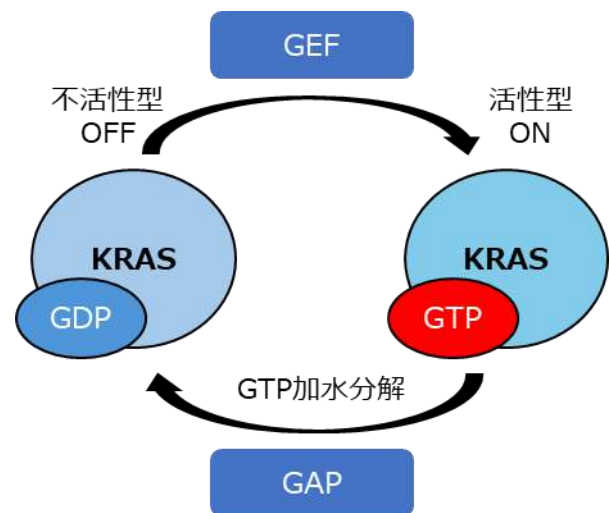


図1. *KRAS* の活性化型と不活性化型
KRAS は活性化型と不活性化型を行き来することでスイッチの役割を果たしている

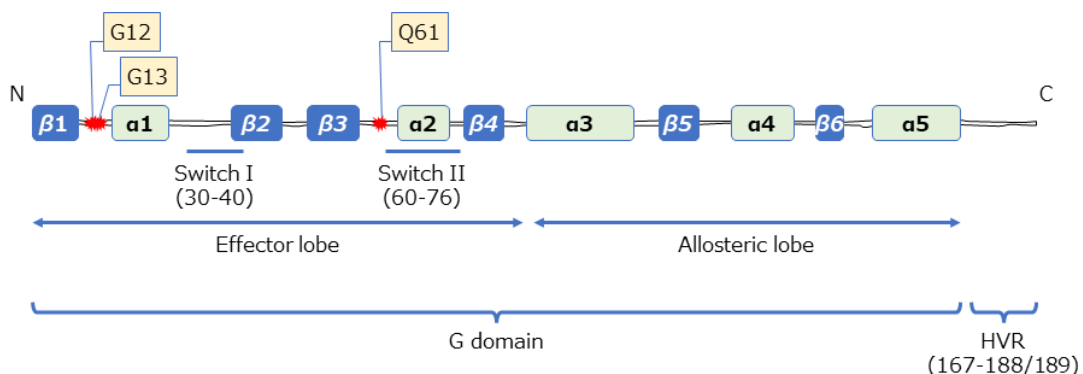


図2. *RAS* 蛋白の構造

表1 G12の変化パターン*

KRAS G12 アミノ酸置換	塩基置換			バリエーションタイプ	COSMIC 件数 (全臓器)
	c.34 G>	c.35 G>	c.36 T>		
G12C	T	G	T	c.34G>T	5462
				c.33_34delinsCT	3
				c.33_34delinsGT	1
G12V	G	T	C	c.34_36delinsTGC	1
				c.35G>T	10921
				c.35_36delinsTC	17
G12D	G	A	T	c.35_36delinsTG	1
				c.35G>A	16096
				C35_36inv	2
G12A	G	C	A	c.35G>C	2470
				c.35_36delinsCA	1
G12S	A	G	T	c.34G>A	2101
				c.34_35delinsTC	1
G12R	C	G	A	c.34G>C	1611
				c.34_36delinsAGA	1
G12F	T	T	T	c.34_35delinsTT	62
G12L	C	T	G	c.34_35delinsCT	13
				c.34_36delinsTGC	1
G12I	A	T	T	c.34_35delinsAT	8
G12W	T	G	G	c.34_36delinsTGG	6
G12E	G	A	G	c.35_36delinsAA	4
				c.35_36delinsCA	1
G12Y	T	A	T	c.34_35delinsTA	3
G12N	A	A	T	c.34_35delinsAA	2
G12H	C	A	T	c.34_35delinsCA	1

*COSMIC v96 (2023/11/26参照)

強される。点突然変異には、G12、G13、Q61の3カ所のホットスポットが存在し、全体の96-98%を占める。RAS遺伝子変異は様々な癌腫で見られ、臓器ごとに遺伝子変異の種類と頻度は異なっている。非小細胞肺癌では肺腺癌ではKRAS変異が最も多く、さらにG12変異が80%を占める。G12に起きる点突然変異にはいくつかのパターンが存在し、肺腺癌では34番目のグアニンがチミンに置換することにより、アミノ酸がグリシンからシステインに変わるG12Cが最も多く、次いで、35番目のグアニンがチミンに置換して、アミノ酸がグリシンからバリンに変わるG12Vが多い(表1)。肺癌においては、発がんの原因として喫煙が最も重要な要因である。一般に点突然変異の起こり方は12通り存在し、アデニン、グアニンのプリン同士もしくはシトシン、チミンのピリミジン同士の変異はtransition変異と呼ばれ、プリンとピリミジンが入れ替わる変異がtransversion変異と呼ばれる(図3)。喫煙による塩基置換は、GからTへのtransversion変異が多いと

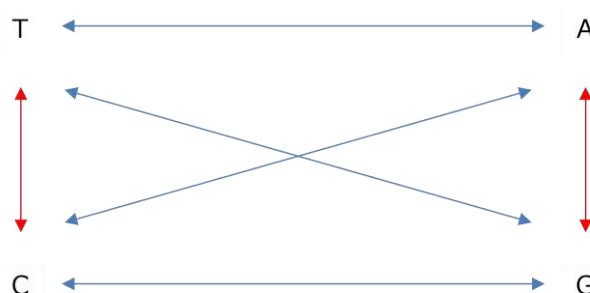


図3. 点突然変異のパターン
Transition 変異 (赤): アデニン (A)、グアニン (G) のプリン同士もしくはシトシン (C)、チミン (T) のピリミジン同士の変異
Transversion 変異 (青): プリンとピリミジンが入れ替わる変異

されており⁶、G12に起きる変異について、喫煙者と非喫煙者では傾向が異なっている。現喫煙者ではG12Cが最も多く、次いでG12Vが多いが、非喫煙者ではG12Dが最も多い⁷(図4)。G12Dは35番目の塩基がGからAにtransition変異を起こすことによって生じる。

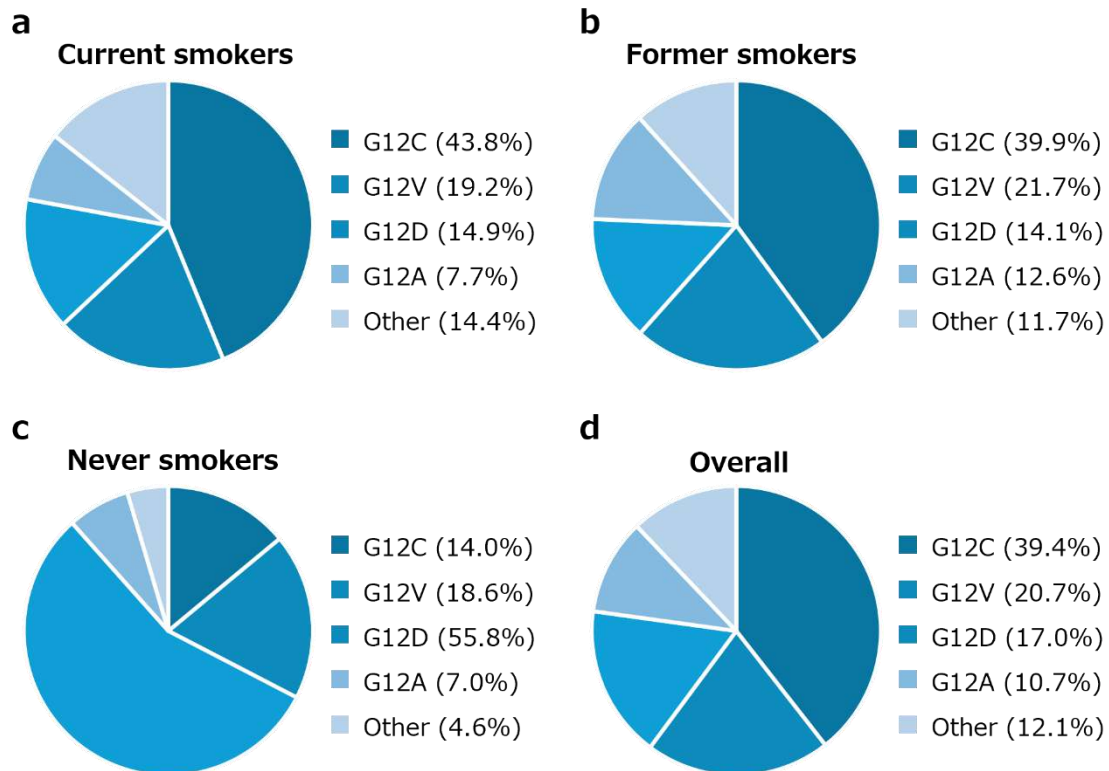


図4. KRAS 遺伝子変異と喫煙歴の関係
KRAS 変異のバリエーションタイプの頻度は喫煙歴によって異なる⁷

(2) KRAS 変異陽性肺癌の臨床病理学的特徴

KRAS 遺伝子変異は、主として欧米のデータベースによると肺腺癌の約 30%、肺扁平上皮癌の約 4%にみられる²。本邦においては、肺腺癌の 9.7%にみられ、喫煙歴を有する男性に多い傾向がある³。KRAS 遺伝子変異のなかで最も高頻度に見られる変異は G12C である。浸潤性粘液性腺癌 (invasive mucinous adenocarcinoma; IMA) において、KRAS 遺伝子変異が多くみられることが報告されているが、90%以上を G12D もしくは G12V が占め、G12C の頻度は高くない⁸。KRAS G12C 陽性の進行非小細胞肺癌を対象としたソトラシブの治療 (CodeBreak100) に登録された患者の背景では、年齢中央値 63.5 歳、女性 50.0%、非喫煙者 4.8%、脳転移あり 20.6%、腺癌 95.2%・扁平上皮癌 0.8%・大細胞癌 2.4%・肺胞上皮癌 1.6%であった⁹。

KRAS 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌の予後や化学療法感受性については、悪いとするもの、変異の有無によ

って差がないとするものがあり一貫しない⁷。KRAS 遺伝子変異のサブタイプにより異なるとの報告もあり、サブタイプを区別した大規模な検討が必要であろう^{10,11}。KRAS 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌では、PD-L1 発現が変異陰性と比較して高い傾向にあり¹²、免疫チェックポイント阻害薬の有効性も示されている¹³。

(3) KRAS G12C 陽性肺癌に対する臨床試験

長らく KRAS を標的とした治療薬の開発が成功しなかったが、2013 年に不活性型 KRAS の Switch-II の近傍に薬剤が結合し得るポケットが見つかり、薬剤を結合させることで活性型への変換を阻害し得ることが報告された⁵。この Switch-II ポケットへの薬剤結合の足掛かりとして、グアニンからシステインに変換した 12 番目のアミノ酸が利用された。ソトラシブ (AMG510) はこのシステインにおけるチオールと、アクリルアミド部位で共有結合を形成し結合する低分子化合物である (図 5)¹⁴。結果として、活性型への変換を阻害し、下流のシグナル伝達を阻害し、細胞増殖を抑制する。変異したシステインに結合するため、

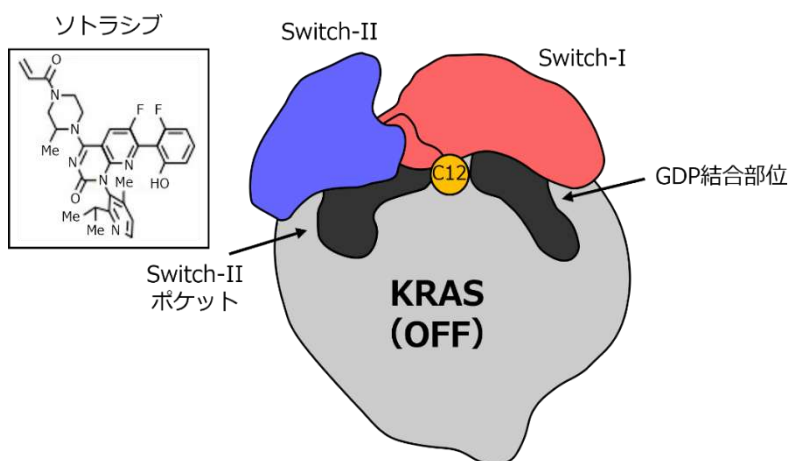


図5 KRAS 蛋白とソトラシブの結合
ソトラシブは非活性型 KRAS の Switch- II ポケットに結合する

野生型の KRAS へは結合せず、選択性が高い。2018 年から KRAS G12C 変異を有する進行固形がん患者を対象とした国際共同第 I / II 相試験 (CodeBreak 100) が開始された。この II 相部分において既治療の非小細胞肺癌 126 例(日本人 11 例)にソトラシブが投与され、奏効率 37.1%、無増悪生存期間の中央値が 6.8 カ月、全生存期間中央値が 12.5 カ月 (いずれもデータカットオフ日: 2021 年 3 月 15 日) であった⁹。この結果を受けて、米国 FDA では 2021 年 5 月に、本邦では 2022 年 1 月に「がん化学療法後に増悪した KRAS G12C 変異陽性の切除不能な進行・再発非小細胞肺癌」に対する治療薬として承認された。さらに、既治療非小細胞肺癌を対象としてドセタキセルと比較する国際共同第 III 相試験 (CodeBreak 200、NCG04303780) が実施され無増悪生存期間が有意に延長したことが報告された (HR0.66; 95%CI 0.51-0.86; p=0.005。1 年無増悪割合ソトラシブ 24.8%、ドセタキセル 10.1%)¹⁵。また、進行非小細胞肺癌の一次治療における第 II 相無作為化試験 (CodeBreak 201、NCT04933695) が進行中である。また、様々な薬剤との併用療法についての検討も進んでいる (CodeBreak 101、NCT04185883/ jRCT 2031210121)。

KRAS G12C を標的とした低分子化合物として、adagrasib (MRTX849、Krazati) も臨床開発が進んでいる。固形腫瘍を対象とした第 I / II 相試験が進行中であり (KRYSTAL-1、NCT03785249)、II 相コホートにおいて非小細胞肺癌 116 例で奏効率が 42.9%、奏効期間中央値

が 8.5 カ月、無増悪生存期間中央値が 6.5 カ月であったと報告され¹⁶、米国 FDA では 2022 年 12 月に迅速承認された。その他、Divarasinib (GDC6036、NCT04449874)、LY3499446 (NCT04165031)、JNJ74699157 (NCT04006301)、JDQ443 (NCT) の臨床開発が進行している。

単剤のソトラシブ、adagrasib については、耐性変異の検討も報告されている¹⁷⁻²⁰。KRAS の二次変異や、増幅、MET、NRAS、BRAF などのバイパス経路の活性化、他の Driver 変異の出現など、他の分子標的治療薬でみられるのと同様に種々の耐性メカニズムがある。

KRAS G12C 以外の変異に対する治療開発も始まっている。KRAS G12D に対する阻害薬である MRTX1133 が前臨床で有効であることが示された²¹。また、活性型の KRAS を阻害する薬剤についても、種々の化合物が開発されている (表 2、3)。

表 2. KRAS G12C 変異を有する肺癌に対する主な臨床試験*

標的	薬剤 製薬企業	試験名	Phase	使用薬剤	患者数	結果概要もしくは発表学会
KRAS G12C (In-active)	ソトラシブ (AMG510) Amgen	CodeBreak 101 ^{※1} NCT04185883	Ib/II	単剤、または MEK, PD-1, SHP2, ErbB 阻害薬など併用	1054	・アファチニブ併用 Gandara et al. AACT2021 ・トラメチニブ併用 Ramalingam et al. AACR-NCI-EORTC2021 ・PD-1/PDL-1 併用 BT.Li et al. WCLC2022 ・SHP2 併用 Gerald S. Falchook et al. WCLC2022 ・CBDCA+PEM 併用 Ckarke et al. WCLC2023
		CodeBreak 200 NCT04303780	III	単剤 対 ドセタキセル	345	PFS HR 0.66, p=0.002(de Langen et al. Lancet 2023 ¹⁵)
		CodeBreak 100 NCT03600883	I/II	単剤、または抗PD-1/L1 併用	793	・NSCLC N=126, 単剤, ORR 37.1%, mPFS 6.8 カ月 (Skoulidis et al. NEJM 2021 ⁹)
		CodeBreak 201 NCT04933695	II	2用量で検討 (960mg、 240mg)	170	42 例で登録終了
		SCARLET WJOG14821L	II	Carboplatin+Pemetrexed 併 用	27	ORR 88.9%, 6mPFS 61.2% (Akamatsu et al. ASCO2023)
		HERKURES-2 ^{※2} NCT04959981	Ib/II	ERAS601(SHP2i) 併用 ERSA007(ERKi) 併用	200	
	Adagrasib (MRTX849) Mirati	KRYSTAL-1 NCT03785249	I/II	単剤、またはペムプロリズマ ブ、アファチニブ併用	740	・単剤・耐性メカニズム (Awad et al. NEJM2021 ¹⁷) ・単剤・NSCLC N=112, ORR 42.9%, mPFS 6.5 カ月 (Janne et al. NEJM 2022 ¹⁶) ・単剤・NSCLC 2年フォロー N=132,MST14.1カ月, N=128 mPFS6.9カ月 (Gadgeel et al. WCLC2023)
		KRYSTAL-2 ^{※3} NCT04330664	I/II	TNO155 (SHP2i) 併用	86	
		KRYSTAL-7 NCT04613596	II/III	Pembrolizumab 併用	751	KRYSTAL-1とpIIの解析 (Janne et al. ESMO IO 2022) pIIIはPD-L1 TPS≥50%
		KRYSTAL-12 NCT04685135	III	単剤 対 ドセタキセル	340	
		KRYSTAL-14 ^{※6} NCT04975256	I/Ib	BI1701963(SOS1i)併用	100	
		KRYSTAL-19 ^{※7} NCT05840510	I/II	Nab-Sirolimus 併用	79	
		KRYSTAL-21 NCT05853575	II	600mgBID vs 400mgBID	200	
		849-017 NCT05609578	II	プラチナ+ペメトレキセド +ペムプロリズマブ併用	90	
		Neo-Kan NCT05472623	II	単剤 対 ニボルマブ併用	42	
		NCT05848843	I	Durvalumab 併用	44	胃癌、NSCLC
		NCT06039384	I	INCB099280 (PD-L1 阻害 薬) 併用	125	固形腫瘍
		ADEPPT NCT05673187	II	単剤。高齢者もしくは PS2	68	

KRAS G12C (In-active)	Divarasib GDC6036/ RG6330 Genentech/ Roche	GO42144 NCT04449874	I	単剤、またはアテゾリズマブ、 エルロチニブ、GDC1971 など と併用	498	・NSCLC N=60, 単剤, ORR 53.4%, mPFS 13.1M (Sacher et al. NEJM2023)
	JDQ443 Novartis	KontRASt-01 ※4 NCT04699188	Ib/II	単剤、または TNO155(SHP2i)、 tislelizumab(anti-PD1)と併用	375	・ NSCLC N=20, 単剤 200mgBID, ORR57% (Tan et al, AACR 2022)
		KontRASt-02 NCT05132075	III	単剤 対 ドセタキセル	360	
		NCT05445843	II	単剤。1次治療	120	PD-L1 陰性もしくはSTK11 変異陽性
		STRIDER NCT05999357	II	単剤。脳転移あり。	42	
	LY3537982 Eli Lilly	NCT04956640	I	単剤、他剤と併用	400	固形腫瘍 単剤、NSCLC =8, ORR38% (Yonina et al. AACR 2023)
		SUNRAY-01 NCT06119581	III	パートA : ペムブロリズマブ併 用、パートB : ペムブロリズマ ブ+化学療法併用	1016	
	D1553 InventisBio	D1553-101 KEYNOTE-C15 NCT04585035	I/II	単剤、または他剤と併用	200	・NSCLC N=6m, 単剤 600mgBID, ORR37.1%, (Shun Lu et al. WCLC2022)
		D1553-102 NCT05383898	I/II	単剤	203	
		D1553-105 NCT05492045	I/II	単剤、または他剤と併用	144	
	JAB21822 Jacobio	NCT05009329 NCT05002270	I/II	単剤 単剤、またはセツキシマブ併用	144 100	・NSCLC N=33, ORR 56.3% (Zhao et al. ASCO2022 abst.#3089)
		NCT05276726	I/II	単剤	104	STK11 変異あり、KEAP1 野生型
	<p><その他の薬剤：薬剤名（製薬企業）・試験名・Phase> MK1084(Merk Sharp & Dohme LLC)・NCT05067283・I相、BI1823911(Boehringer Ingelheim)・NCT04973163・I相、 GFH925(GenFleet)・NCT05005234・I/II相、YL15293(Shanghai YingLi)・NCT05173805・I/II相、GH35(Suzhou Genhouse Bio)・NCT05010694・I相、HS10370(Jiangsu Hansoh)・NCT05367778・I/II相、BPI421286(Betta)・ NCT05315180・I相</p>					

ORR：奏効率、mPFS：無増悪生存期間中央値

※1-7 表3の試験と対応

※6 NSCLCを対象とした試験。他はNSCLCを含む固形腫瘍対象

*肺癌を含むもの、2023/11Clinicaltrials.gov 検索

表 3. KRAS に関連したその他の試験

薬剤 製薬企業	標的	試験名	対象疾患	対象遺伝子 異常	Phase	使用薬剤
RMC6291 Revolution	KRAS G12C, NRAS G12C Active	NCT05462717	Solid tumor	KRAS G12C	I	単剤
		NCT06128551	Solid tumor	KRAS G12C	I	RMC-6236併用
MRTX1133 Mirati	KRAS G12D	NCT05737706	Solid tumor	KRAS G12D	I/II	単剤
ASP3082 Astellas	KRAS G12D	NCT05382559	Solid tumor	KRAS G12D	I	単剤
RMC6236 Revolution	KRAS G12D, G12V Active	NCT05379985	Solid tumor	G12Cを除く KRAS G12X	I	単剤
ERAS601 Sarah Cannon	SHP2	FLAGSHP-1 NCT04670679	Solid tumor	変異によらず	I/Ib	単剤、またはセツキシマブ併用
		HERKULES-2 NCT04959981	NSCLC	Part3/6 KRAS G12C	I	Part3/6でソトラシブ併用
BI1701963 Boehringer Ingelheim	SOS1 In-active	NCT04111458	Solid tumor	KRAS	I	単剤、またはトラメチニブ併用
		※6 KRYSTAL-14 NCT04975256	Solid tumor	KRAS G12C	I	Adagrasib 併用
MRTX0902 Mirati	SOS1	NCT05578092	Solid tumor	KRAS 併用はG12C	I/II	単剤、または Adagrasib 併用
RMC4630 (SAR442720) Revolution	SHP2	NCT03634982	Solid tumor	KRAS G12C, KRAS amp 他	I	単剤
		NCT03989115	Solid tumor	KRAS mut and amp 他	Ib/II	コピメチニブ併用
		※1 CodeBreak 101	Solid tumor	KRAS G12C	Ib	ソトラシブ併用 (Falchook et al. WCLC2022)
		NCT05054725	NSCLC	KRAS G12C	II	ソトラシブ併用
		NCT04418661	Solid tumor	KRAS G12C	I/II	パート3B Adagrasib 併用
		SHERPA NCT04916236	Solid tumor	KRAS	I	LY3214996(ERK 阻害薬)併用
TNO155 Novartis	SHP2	NCT03114319	Solid tumor	KRAS G12	I	単剤
		※4 KontraSt-01	Solid tumor	KRAS G12C	Ib/II	JDQ443 併用 KRAS 阻害薬既治療 N=12, ORR33.3% (Negrao et al. WCLC2023)
		※1 CodeBreak 101	Solid tumor	KRAS G12C	Ib	ソトラシブ併用
		※3 KRYSTAL-2	Solid tumor	KRAS G12C	I/II	Adagrasib 併用
		※5 NCT04956640	Solid tumor	KRAS G12C	I	LY3537982 併用
BMS-986466 BMS	SHP2	NCT06024174	Solid tumor	KRAS G12C	I/II	Adagrasib 併用 ±Cetuximab
LUNA18 Roche	ALL RAS GEF の相互作用を阻害	NCT05012618	Solid tumor	RAS alterations positive	I	単剤
RMC5552 Revolution	mTORC1/4EBP1	NCT04774952	Solid tumor	mTOR pathway	I	単剤
Nab-Sirolimus ABI-009	mTOR	※7 KRYSTAL-19 NCT05840510	Solid tumor	KRAS G12C	I/II	Adagrasib 併用
Olaparib	PARP	NCT06130254	Solid tumor	KRAS G12C	Ib	Adagrasib 併用 KEAP1 変異陽性

VS-6766 Avutemetinib Verastem	RAF-MEK	NCT05375994	NSCLC	KRAS G12C	I/II	Atagrasib 併用 KRAS G12C 阻害薬耐性
		NCT05074810	NSCLC	KRAS G12C	I/II	ソトラシブ併用
		NCT02407509	Solid tumor/Myeloma	KRAS	I	エベロリムス併用 NSCLCコホートあり(Minchom et al. ASCO2022)
mRNA-5671/V941 Merck Sharp & Dohme LLC	mRNA based vaccine	NCT03948763	NSCLC他	KRAS G12D/V/C, G13D	I	単剤、またはペムプロリスマブ 併用
Zotatifin(eFT226) Effector Therapeutics	eIF4	NCT04092673	Solid tumor	G12C以外のKRAS G12X	I / II	eFT226 (Zotatifin) alone
VIC-1911 Vitrac Therapeutics	Aurora kinase A inhibitor	NCT05374538	NSCLC	KRAS G12C	Ia/Ib	Sotorasib 併用
Palbociclib	CDK4/6	KRYSTAL-16 NCT05178888	Solid tumor	KRAS G12C	I	Adagrasib 併用
Tarloxotinib	Pan-EGFR TKI	NCT05313009	NSCLC	KRAS G12C	IB	Sotorasib 併用

※1-5, 7, 8 表2の試験と対応

(4) KRAS 遺伝子 G12C 変異の検査

ソトラシブの適応判定を目的とした KRAS 遺伝子の G12C 変異の検出には、当該薬剤のコンパニオン診断 (CDx) 薬/システムとして *therascreen* KRAS 変異検出キット RGQ「キアゲン」(以下 *therascreen*)、AmoyDx[®] 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル (以下 AmoyDx)、肺癌コンパクトパネ[®]Dx マルチコンパニオン診断システム (以下、コンパクトパネル) および Guardant360 CDx がん遺伝子パネル (以下 G360CDx) (表4) が承認されている。このうち、G360CDx は、①検査費用と保険点数の乖離が大きいこと、②外注可能施設が限られること、③ *therascreen* に対する G360CDx の陽性一致率が 70%に留まること (表5) などから初回診断時にコンパニオン診断薬として使用することが難しい。進行非小細胞肺癌においては、初回診断時に多数の遺伝子異常を調べる必要があるため複数の異常を一度に調べられるマルチ遺伝子検査が推奨される。AmoyDx やコンパクトパネルで KRAS G12C 陽性と診断された場合は、二次治療以降でソトラシブが使用可能であるが、オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム (以下、オンコマイン) を用いた場合、参考情報として事前に得られる KRAS 変異情報に基づいて、上記 CDx 薬を用いた検査が行われる場合が多いと想定され、これら検査法に関する分析性能などの情報把握も必要となる (2024 年 2 月の承認状況) (表7)。

1. *therascreen* KRAS 変異検出キット RGQ「キアゲン」

本法は、アレル特異的な ARMS プライマーと増幅された PCR 産物を蛍光プローブで検出する Scorpion 法を用いたリアルタイム PCR 法に基づくものであり、すでに CDx 承認 EGFR 変異検査法としても用いられている方法である。プライマー部の変異部位に特異的結合する PCR プライマーの 3'端をミスマッチな塩基に置換することで伸長反応をブロックする ARMS (amplification refractory mutation system)法と、増幅された PCR 産物を検出する Scorpion 法により高感度高特異度に検出する。このプローブは蛍光色素と発色を減弱するクエンチャーを結合しており、プローブが PCR 産物に結合するとクエンチャーと蛍光色素が離れて発色反応が起こることを利用している。Scorpion-ARMS 法における検出感度 (検出可能な変異 DNA の比率) は一般的に 1%程度とされており、細胞株のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を用いた CDx 承認 *therascreen* における KRAS G12C 変異の最小検出感度は 1.5%であることが示されている。

therascreen KRAS 変異検出キット RGQ を用いた検査では FFPE 組織検体が検査対象となっており、推奨される腫瘍細胞含有割合は 20%以上である。他の検体種

表 4. ソトラシブの CDx 薬/システムとして承認されている KRAS 変異検査法

	<i>therascreen</i> KRAS 変異検出 キット RGQ (キアゲン社)	AmoyDx [®] 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル (理研ジェネシス社)	Guardant360 CDx がん遺伝子 パネル* (ガーダントヘルス社)
承認形態	体外診断用医薬品	体外診断用医薬品	プログラム医療機器
検査種別	単一遺伝子検査	マルチPCRパネル検査	遺伝子パネル検査*
検査法	qPCR 法 (Scorpion-ARMS 法)	Real-time PCR (ARMS法)	NGS 法 (Digital Sequencing 法)
対象検体	FFPE 組織 (tissue DNA)	FFPE あるいは新鮮凍結組織 (tissue DNA)	血漿 (cfDNA)
外注可能施設	すべての医療機関	すべての医療機関	がんゲノム医療指定病院**
外注時検査TAT	4~10 日	4~7 日	原則 14 日以内
院内検査実施	可能	可能	不可 (原則)

* 肺癌 KRAS G12C 変異以外の CDx 承認項目; MSI-H: 固形癌 (ペムプロリズマブ) 大腸癌 (ニボルマブ) IVD 承認 CGP 対象遺伝子数; SNV/INDEL: 74 遺伝子、Amplification: 18 遺伝子、Fusion: 6 遺伝子

**がんゲノム医療中核拠点病院、拠点病院、連携病院

(新鮮凍結検体、LBC 検体を含む細胞検体など)での検査も原理上可能であることから、これら検体で提出を検討する場合は、検体受付の可否を検査機関へ事前確認する。なおこれら検体での検査が可能となった場合、データの取扱い(参考値扱いとなるかなど)について併せて確認する必要がある。これら検体で検査する場合であっても、20%以上の腫瘍細胞含有割合が推奨されるため必ず確認を行う(各組織・細胞検体提出の留意点は、別項を参照)。

2. Guardant360 CDx がん遺伝子パネル

本法は、digital sequencing 技術を用いたリキッドバイオプシー法による包括的ゲノムプロファイリング (CGP) 検査であり、血中遊離 DNA (cfDNA) 中の、循環腫瘍 DNA (ctDNA) を解析対象とする。解析対象遺伝子数は 74 遺伝子 (塩基置換および挿入/欠失; 74 遺伝子、遺伝子増幅; 18 遺伝子、融合遺伝子; 6 遺伝子) であり、その他バイオマーカーとして、マイクロサテライト不安定性 (MSI) の判定が可能となっている (表 4)。CDx 承認項目は、肺癌 KRAS G12C 変異 (ソトラシブ) のほか、固形癌 MSI-H (ペムプロリズマブ)、大腸癌 MSI-H (ニボルマブ) となっている。本検査は、ガーダントヘルス社が指定する CLIA 認証などの施設認定を取

得した施設のみで実施され、医療機関からの検体提出は、指定の cfDNA 専用採血管 (Streck Cell-Free DNA BCT[®] CE) により採血された血液検体により行われる。

本 digital sequencing 法における検出感度は、SNV では 1.8%、INDEL では 2.3% (いずれも cfDNA 5ng 使用時) と報告されているが^{22, 23}、CDx 承認された G360CDx における KRAS G12C 変異の最小検出感度は 1.5%となっている。CodeBreakK100 試験の第 II 相 NSCLC コホートで登録された 126 症例と感度分析のために追加された 132 症例のうち、組織と血漿検体での比較解析が可能であった 188 症例を用いた KRAS G12C 変異検出における *therascreen* と G360CDx 間の一致率に関する検討では、陰性一致率は 100.0%であった一方、陽性一致率は 69.8%にとどまっており、検査法の選択にあたっては留意が必要である (表 5)。

3. AmoyDx[®]肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル

KRAS G12C 変異に対するソトラシブの治験で用いられた検査は、*therascreen* であったが、AmoyDx についても 2023 年 2 月にソトラシブに対するコンパニオン診断薬として承認された。AmoyDx については

表 5. *therascreen* と G360CDx 間の一致率

		Therascreen		合計	
		陽性	陰性		
G360CDx	陽性	81	0	81	PPA: 69.8% (81/116)
	陰性	35	72	107	
合計		116	72	188	NPA: 100.0% (72/72)

表 6. *therascreen* と AmoyDx 間の一致率

		Therascreen		合計	
		陽性	陰性		
AmoyCDx	陽性	31	1	32	PPA: 96.9% (31/32)
	陰性	1	85	86	
合計		32	86	118	NPA: 98.8% (85/86)

CodeBreak100 試験からの KRAS G12C 陽性検体 32 例とバイオバンクから調達した陰性検体 86 例の計 118 検体を用いた一致率が示されており、全体一致率は 98.3%であった (表 6)。AmoyDx による KRAS G12C 変異の最小検出感度は 1%であることが示されている。AmoyDx を用いる場合の注意点として、G12C と G12R の交差反応性があり、検査実施施設においては検査試薬の取扱説明書に記載の判定基準に基づき適切に結果を判定するよう注意する必要がある (製造販売元の製品情報に基づく)。また、AmoyDx では G12F 変異の場合、G12C が陽性として判定される。この背景として、G12F の変異が存在する場合、G12V/G12A/G12R/G13C の判定結果*が G12C と同時に陽性となることが確認されており (製造販売元の製品情報に基づく)、この場合は G12C の結果コメント欄に「偽陽性の可能性あり」と記載される。したがって、KRAS 変異の参考情報が確認できる場合は、KRAS G12V/G12A/G12R/G13C の判定結果をあわせて確認することが望ましい。一方で、両方が陽性の結果となった場合においては、KRAS G12C に加えて、G12V/G12A/G12R/G13C、G12F のいずれかの変異が両方存在する Co-mutation である可能性も否定はできない。G12C と G12F が両方存在する Co-mutation の可能性もあるが、G12F のバリエントのみを有する検体は、*therascreen* KRAS では G12C 変異陰性となる (非公開データ)。

* これらの変異は薬事未承認であり、また検体中にどの変異が存在しているかの区別はできないが、研究目的の参考情報として、いずれかの変異が存在する場合に陽性または陰性の報告を受けることができる。

4. その他のマルチ遺伝子検査

コンパクトパネルは、NGS を用いたマルチ遺伝子診断薬で、本邦で開発された。FFPE 検体の他に、細胞診検体についても比較的容易に検査提出が可能となっている。2023 年 2 月に 4 遺伝子 (*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*MET*) に、2024 年 2 月には追加で 3 遺伝子 (*BRAF*、*KRAS*、*RET*) について保険適用となった。その他に、進行非小細胞肺癌の初回診断時には、オンコマインを用いて分子診断が行われることもあるが、2024 年 2 月の段階ではソトラシブのコンビオン診断薬にはなっておらず、KRAS G12C については参考情報として報告される。マルチ遺伝子検査において検査精度の確保は極めて重要となるため、マルチ遺伝子検査時に CDx 項目と同様に、参考情報項目についても、KRAS を含めドライバー変異陽性症例が擬陰性化しないよう、各検査法の長所・短所を十分把握し、検査法の選択を行うことが求められる (表 7)。

表 7. 日常診療下で KRAS 変異検出に用いられる主な検査法

	オンコメイン Dx Target Test マルチCDx システム	AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル	肺癌コンパクトパネル Dx マルチコンパニオン診断システム	therascreen KRAS 変異検出キット RGQ
検査種別	マルチ遺伝子検査	マルチ遺伝子検査	マルチ遺伝子検査	単一遺伝子検査
KRAS G12C 変異の薬事上の取扱	未承認 (RUO)	CDx 承認	CDx 承認	CDx 承認
KRAS G12C 変異の最小検出感度	未開示 ^{*1}	1.0%	未開示 ^{*1}	1.5%

^{*1} 他遺伝子 (EGFR や BRAF) の SNV の LOD を参考にすると、オンコメイン Dx Target Test マルチ CDx システムでは 6%程度、コンパクトパネルでは 1%と推察される。

4-1. その他留意事項

4-1-1. 検査実施時期および検査対象

ソトラシブは、化学療法既治療例が適応となり、上述のように二次治療以降で用いられることから、前治療中もしくは開始時に、KRAS G12C 変異検査を実施することが推奨される。上述のように、先行してコンパニオン診断薬ではないマルチプレックス遺伝子検査が行われている場合は、その参考情報にて KRAS G12C 変異陽性例を対象に行うことが望ましい。また過去に一部の単一遺伝子検査が実施され、それらすべてドライバー遺伝子 (EGFR や ALK など) で変異陰性となった患者においても、当該検査を実施すべきである。

おわりに

長く治療標的とならなかった KRAS 遺伝子変異に対し、G12C 変異に限定されるものの有効な分子標的治療薬、ソトラシブが登場した。コンパニオン診断薬は *therascreen* KRAS 変異検出キット RGQ、AmoyDx[®]肺癌マルチ遺伝

子 PCR パネル、肺癌 コンパクトパネル[®]Dx マルチコンパニオン診断システムの3つである。現在は、二次治療以降での承認であるが、KRAS G12C 変異を対象としたさまざまな試験が進行している。非小細胞肺癌の分子診断は、初回治療前に複数の遺伝子変異を含めて実施されるようになっており KRAS 変異についても初回診断前に診断することで、治験参加を含めて治療選択肢が広がることが期待される。すでに治療対象となる遺伝子変異陰性として治療されている非小細胞肺癌患者に対しても、KRAS G12C 検査は実施すべきである。検体採取とその処理に注意を払って適切に分子診断を行い、有効な分子標的治療薬を使用することは肺癌診療の基礎となっている。複雑化する分子診断の理解のために本手引きが活用されることを願う。

なお、KRAS 阻害薬とその CDx 薬に関する情報は今後更新されることが予想されるため、最新の情報については PMDA のウェブサイトに掲載されている「コンパニオン診断薬等の情報」を確認いただきたい (<https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/review-information/cd/0001.html>)。

参考文献

- Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):459-465.
- Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res*. 2020;80(14):2969-2974.
- Saito M, Shiraishi K, Kunitoh H, Takenoshita S, Yokota J, Kohno T. Gene aberrations for precision medicine against lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 2016;107(6):713-720.
- Horio Y. KRAS 変異陽性肺がんの薬物療法は開発されるか？. *肺癌*. 2018;58(7):953-958.
- Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*. 2013;503(7477):548-551.
- Yoshida K, Gowers KHC, Lee-Six H, et al. Tobacco smoking and somatic mutations in human bronchial epithelium. *Nature*. 2020;578(7794):266-272.
- Ghimessy A, Radezczyk P, Laszlo V, et al. Current therapy of KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(4):1159-1177.
- Buettner R. Invasive mucinous adenocarcinoma: genetic insights into a lung cancer entity with distinct clinical behavior and genomic features. *Mod Pathol*. 2022;35(2):138-139.
- Skoulidis F, Li BT, Dy GK, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med*. 2021;384(25):2371-2381.
- Izar B, Zhou H, Heist RS, et al. The prognostic impact of KRAS, its codon and amino acid specific mutations, on survival in resected stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1363-1369.
- Mellema WW, Masen-Poos L, Smit EF, et al. Comparison of clinical outcome after first-line platinum-based chemotherapy in different types of KRAS mutated advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2015;90(2):249-254.
- Schoenfeld AJ, Rizvi H, Bandlamudi C, et al. Clinical and molecular correlates of PD-L1 expression in patients with lung adenocarcinomas. *Ann Oncol*. 2020;31(5):599-608.
- Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-1639.
- Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019;575(7781):217-223.
- de Langen AJ, Johnson ML, Mazieres J, et al. Sotorasib versus docetaxel for previously treated non-small-cell lung cancer with KRAS G12C mutation: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2023;401(10378):733-746.
- Janne PA, Riely GJ, Gadgeel SM et al. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRAS^{G12C} Mutation. *N Engl J Med*. 2022;387:120-131.
- Tanaka N, Lin JJ, Li C, et al. Clinical Acquired Resistance to KRAS(G12C) Inhibition through a Novel KRAS Switch-II Pocket Mutation and Polyclonal Alterations Converging on RAS-MAPK Reactivation. *Cancer Discov*. 2021;11(8):1913-1922.
- Awad MM, Liu S, Rybkin, II, et al. Acquired Resistance to KRAS(G12C) Inhibition in Cancer. *N Engl J Med*. 2021;384(25):2382-2393.
- Koga T, Suda K, Fujino T, et al. KRAS Secondary Mutations That Confer Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibitors, Sotorasib and Adagrasib, and Overcoming Strategies: Insights From In Vitro Experiments. *J Thorac Oncol*. 2021;16(8):1321-1332.
- Zhao Y, Murciano-Goroff YR, Xue JY, et al. Diverse alterations associated with resistance to KRAS(G12C) inhibition. *Nature*. 2021;599(7886):679-683.
- Wang X, Allen S, Blake JF, et al. Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRAS(G12D) Inhibitor. *J Med Chem*. 2022;65(4):3123-3133.
- Baumli JM, Li BT, Velcheti V, et al. Clinical validation of Guardant360 CDx as a blood-based companion diagnostic for sotorasib. *Lung Cancer*. 2022 Apr;166:270-278.
- Odegaard JI, Vincent JJ, Mortimer S, et al. Validation of a Plasma-Based Comprehensive Cancer Genotyping Assay Utilizing Orthogonal Tissue- and Plasma-Based Methodologies. *Clin Cancer Res*. 2018 Aug 1;24(15):3539-3549
- オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム添付文書 <https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/bookSearch/01/04987837210139>
- AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル添付文書 <https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/bookSearch/01/04582392472468>

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-8. HER2

(2024年4月改訂版)

目次

はじめに	2
(1) <i>HER2/ERBB2</i> 遺伝子とその異常	2
(2) NSCLC でみられる <i>HER2</i> 遺伝子変異	2
(3) <i>HER2</i> 遺伝子変異の頻度と臨床的特徴	3
(4) <i>HER2</i> 遺伝子変異肺癌に対する治療法の開発	4
(5) 耐性メカニズム	4
(6) <i>HER2</i> 遺伝子変異の検出法	5
おわりに	5
参考文献	9

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

須田 健一, 畑中 豊, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 宗 淳一, 朝重 耕一, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

はじめに

HER2 は human epidermal growth factor receptor 2 (ヒト上皮成長因子受容体 2) の略であり、ERBB2 とも呼ばれる受容体型チロシンキナーゼ (RTK: receptor tyrosine kinase) である。HER2 は HER family のひとつであり、HER family には他に EGFR (epidermal growth factor receptor)、HER3、HER4 が含まれる。これらの RTK は構造的にも高い相同性を有しており、ホモダイマーやヘテロダイマーを形成することで活性化する¹

HER family に属する RTK のうち、EGFR 遺伝子変異は肺腺癌において最も頻度の高い遺伝子異常のひとつである。2004 年に発見されて以降、EGFR 変異肺がんに対する治療戦略は大いに発展した(肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き「4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常 4-1. EGFR」参照)。一方、HER2 遺伝子変異も 2004 年に発見されていたが²、HER2 変異肺がんに対する分子標的治療(主に第 2 世代の pan-HER 阻害剤)については、多少の臨床効果は認められるものの、承認に至るような十分に治療効果を有する薬剤はなかった³⁻⁷。この理由のひとつとして、肺がんにおける HER2 変異で最も頻度が高いものが Exon 20 の挿入変異であり、EGFR での Exon 20 挿入変異と同様に、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI: tyrosine kinase inhibitor) の効果が比較的乏しいことが挙げられる。しかし TKI ではなく、HER2 に対する抗体薬物複合体 (ADC: antibody-drug conjugate) のひとつであるトラスツズマブ デルクステカンが HER2 変異陽性肺がん治療に応用されたことで (2023 年 8 月に本邦でも承認)、HER2 変異肺がんに対する個別化治療も大きく進み始めた。

(1) HER2/ERBB2 遺伝子とその異常

HER2/ERBB2 遺伝子は 17 番染色体長腕 (17q11.2-q12) に存在する。HER2 タンパクはその他の RTK と同様、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインからなる。しかしその他の HER family メンバーと異なり、HER2 はリガンドと結合することなくその他の HER family メンバーと 2 量体を形成し、下流経路を活性化さ

せるという特徴を有する。また HER2 は内在化や分解を受けにくく、キナーゼの活性化と下流シグナルの伝達がより長く持続するとの報告もある。HER2 を含む HER family メンバーは、下流経路の活性化を経て、細胞増殖・アポトーシス抑制などに関するシグナルを活性化させる。

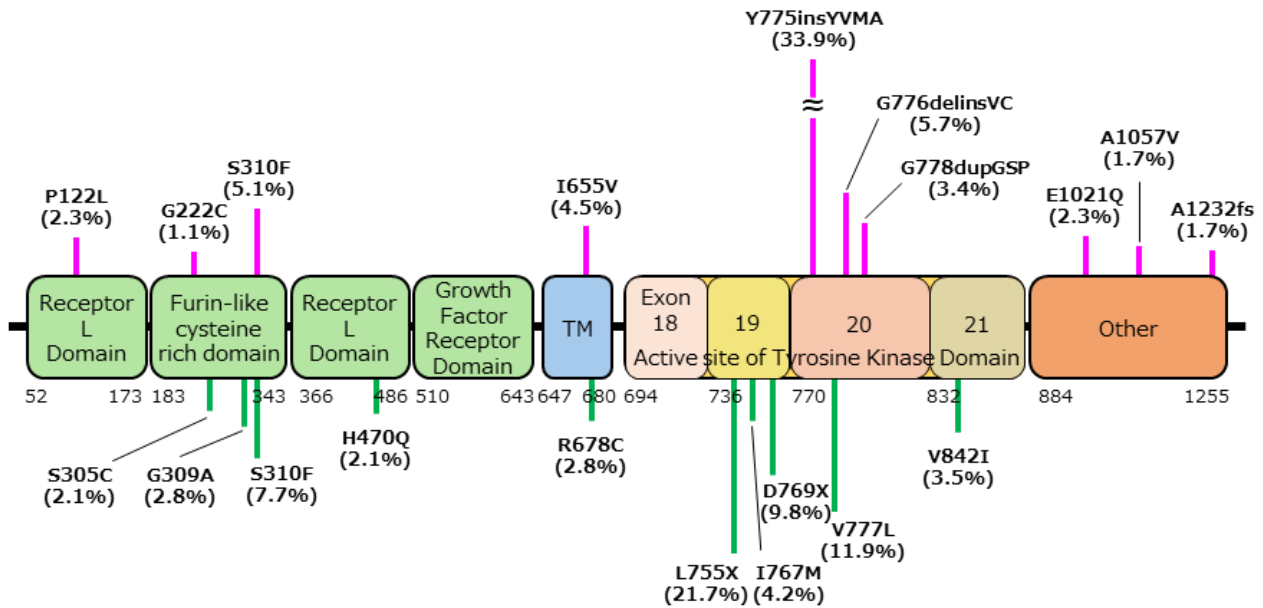
HER2 の異常活性化はさまざまな固形がんでは認められ、活性化の機序として、遺伝子変異や遺伝子増幅、タンパク過剰発現が知られている。非小細胞肺癌 (NSCLC) でもタンパク過剰発現や遺伝子増幅が低頻度ながら認められ、また EGFR 変異肺がんにおいては EGFR-TKI 獲得耐性機序として HER2 遺伝子増幅が生じることも報告されている⁸。しかし 2023 年 8 月現在、NSCLC において治療標的となる HER2 異常は、HER2 遺伝子変異のみである。HER2 遺伝子変異は、EGFR 遺伝子変異や KRAS 遺伝子変異、ALK や ROS1 の遺伝子転座など、NSCLC のドライバー変異と基本的には相互に排他的な関係にあり⁹、同様に NSCLC におけるドライバー変異のひとつとされている。

(2) NSCLC でみられる HER2 遺伝子変異

HER2 遺伝子変異は、乳がん、胃がん、子宮がん、胆道がん、結腸直腸がん、膀胱がんなどさまざまな固形がんで見られる¹⁰。このうち NSCLC における HER2 遺伝子変異は、主に細胞内ドメイン内のキナーゼ領域を構成するエクソン 20 の挿入変異として生じ、その中でも A775_G776insYVMA の頻度が最も高い (図 1)。ただし挿入変異の場合は、同一の変異に対しいろいろな表現法があることに留意する必要がある。例えば、この A775_G776insYVMA については、Y772_A775dup、A771_M774dup、E770_A771insAYVM などと表記されている文献もあるが、実際にはすべて同じ変異を指している。

NSCLC で見られる HER2 遺伝子変異としては、図 1 に示す通り、A775_G776insYVMA 以外にも複数のエクソン 20 挿入変異が知られている。頻度の高いものとしては、P780_Y781insGSP や G776delinsVC などがあり、他にもエクソン 20 の点突然変異である L755A/P などの報告がある¹¹。さらに、チロシンキナーゼドメイン外の変異として、細胞外ドメインに生じる S310F 変異や膜貫通

非小細胞肺癌におけるHER2変異 (n=177)



乳がんにおけるHER2変異 (n=143)

図1. 非小細胞肺癌における HER2 遺伝子変異の分布 (乳がんにおける HER2 遺伝子変異の分布と対比しつつ示す) Robichaux JP, et al. Cancer Cell 2019 より引用・改変. Reproduced with permission from Elsevier (2024)

ドメインに生じる I655V 変異なども、NSCLC において複数例の報告がある (図 1)。少数例の報告を含めると HER2 遺伝子のほぼ全長にわたって遺伝子変異が報告されているが、これらの遺伝子変異の多くは、未だ意義不明の変異 (variants of unknown significance: VUS) に分類されている。

次項で述べるように、HER2 遺伝子変異も EGFR 遺伝子変異と同様、肺腺がんで頻度が高い遺伝子異常である。しかし、肺扁平上皮がんを対象とした Lux-Lung 8 試験の post-hoc 解析では、これまでに報告がほとんどなかった多数の HER2 遺伝子変異が同定され、これらの患者では afatinib の奏効期間が長かったことが報告された¹²。しかし、この報告をベースとして実施された Ba/F3 細胞株を用いた検討では、これらの HER2 遺伝子変異の多くには腫瘍形成能が認められず、扁平上皮がんと同定されたこれらの HER2 遺伝子変異の多くはドライバー変異ではないと推察されている¹³。

(3) HER2 遺伝子変異の頻度と臨床的特徴

上述の通り、HER2 遺伝子変異は肺腺がんによく認めら

れ、肺腺がんの 2~3% に存在するとの報告が多い。肺腺がんにおける HER2 遺伝子変異と関連した患者背景として、人種の違いによる頻度の差 (本邦を含む東アジア人と欧米人との差) はほとんどないと考えられているが、EGFR 遺伝子変異と同様、非喫煙者や女性で頻度が高いとされている。

HER2 遺伝子変異の予後因子としての意義については、予後良好との報告や予後不良の傾向との報告、A775_G776insYVMA など特定の変異が予後因子であるとの報告など、一貫した結果は得られていない。EGFR 変異陽性肺がんと同様、患者背景 (非喫煙者が多い) やその他の予後因子 (すりガラス陰影を有する肺がんの割合など) との関連など、複数の因子が絡んでいるためと考えられる。また HER2 遺伝子変異陽性患者の特徴として、EGFR 遺伝子変異と同様¹⁴、脳転移のリスクが高い可能性も報告されている¹⁵。一方、治療効果予測因子としては、ペメトレキセドに対する感受性が低い可能性が報告されており¹⁶、この点でも EGFR 遺伝子変異肺がんとの類似性が示唆される¹⁷。同様に、HER2 遺伝子変異肺がんはがん免疫治療薬に対する感受性も低い可能性が示唆されている¹⁸⁻¹⁹。

(4) HER2 遺伝子変異肺がんに対する治療法の開発

HER2 異常に対する分子標的治療薬の開発では、乳がんや胃がんが先行していた。例えば乳がんでは、免疫組織化学染色 (IHC) 検査での HER2 タンパク過剰発現ないし ISH 検査での HER2 遺伝子増幅のある乳がんが HER2 陽性乳がんと定義され、抗 HER2 療法が実臨床でも広く用いられている。

乳がんや胃がん以外の固形腫瘍では、HER2 陽性 (IHC 1+以上または HER2 遺伝子変異陽性) かつ治療歴のある患者を対象に、トラスツズマブ・デルクステカンの有効性および安全性を検証する第 I 相試験 (NCT02564900) が実施された。その結果、HER2 変異陽性肺がんにおける高い奏効率 (73%, 8/11 例) が示されるとともに、HER2 タンパク陽性肺がんでも奏効例が認められた²⁰。これを受けて、HER2 変異陽性肺がんおよび HER2 タンパク過剰発現 (IHC 2+または 3+) を有する肺がんを対象に、DESTINY-Lung01 試験 (NCT03505710) が計画・実施された。トラスツズマブ・デルクステカン 6.4mg/kg・3 週間毎が投与された本試験の中間解析において、HER2 変異陽性肺がんでは奏効率 61.9%、PFS の中央値 (推定) は 14.0 ヶ月と良好な治療成績が示された²¹。一方、HER2 タンパク過剰発現を有する肺がんでは、奏効率 24.5%、PFS の中央値 (推定) は 5.4 ヶ月であったものの、Grade 3 以上の副作用が 73.5% に認められ、間質性肺障害により 6% の患者が死亡するなど、治療効果の割に有害事象が目立つ結果であった²²。これらの結果を受けて DESTINY-Lung01 試験は、HER2 変異陽性肺がんコホートについて登録患者数を拡大する形で進められた (HER2 タンパク過剰発現を有する肺がんコホートでは、投与量を 5.4mg/kg としたコホート 1a が設けられた²³)。

2022 年の N Engl J Med 誌に掲載された DESTINY-Lung01 試験の報告では、91 名の既治療 HER2 遺伝子変異陽性肺がん患者において、トラスツズマブ・デルクステカン 6.4mg/kg 投与の奏効率は 55% (95%CI, 44-65%)、PFS 中央値は 8.2 ヶ月 (95%CI, 6.0-11.9 ヶ月)、OS の中央値は 17.8 ヶ月 (95%CI, 13.8-22.1 ヶ月) であった。本試験に登録された患者の 86% が HER2 エクソン 20 挿

入変異 (このうち 80% が A775_G776insYVMA) を有していたが、エクソン 8、19 および 20 の点突然変異陽性の患者も一部含まれており (それぞれ 6.5%、4.4% および 3.3%)、これらの患者においても治療効果が認められた。また、HER2 タンパク発現や HER2 遺伝子コピー数に関わらず、ほとんどの患者においてトラスツズマブ・デルクステカンの治療効果が認められたことも特筆すべきことである。

このようにトラスツズマブ・デルクステカンは既治療 HER2 遺伝子変異陽性肺がんに対し高い治療効果を示したが、一方で 27.5% の患者において間質性肺障害を生じるなど、副作用リスクも問題となった。このため、トラスツズマブ・デルクステカン 6.4mg/kg 投与と 5.4mg/kg 投与の有効性・安全性を比較する第 II 相試験 (DESTINY-Lung02 試験, NCT04644237) が実施された²⁴。この試験では、両群において治療効果はほぼ同等であったのに対し、間質性肺障害の発生率は 5.4mg/kg 投与群と 6.4mg/kg 投与群において、それぞれ 12.9% (95%CI, 7.0-21.0%) と 28.0% (16.2-42.5%) であったなど、5.4mg/kg 群において副作用の頻度が少ないことが示された。この結果を受けて、本邦でも治療歴のある HER2 変異陽性肺がんに対し、5.4mg/kg の投与量にて承認されるに至った。DESTINY-Lung02 試験においても、HER2 エクソン 20 挿入変異を有する患者に加え、HER2 エクソン 8、19、20、21 の点突然変異を有する患者が含まれており、DESTINY-Lung01 試験と同様、遺伝子変異タイプに関わらず、トラスツズマブ・デルクステカンの治療効果が示された。

(5) 耐性メカニズム

HER2 遺伝子変異を有する肺がんに対しては、分子標的治療薬の候補として HER2 も阻害可能な第 2 世代 pan-HER チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の臨床開発がまず進められていたことより、TKI を用いた場合に生じ得る耐性メカニズムについては多くの探索的研究が行われてきた^{5,11,25}。その結果、on target の耐性機序としては C805S 2 次的変異 (EGFR 遺伝子の C797 と相同部位) が、第 2 世代 pan-HER TKI に対する耐性変異として生じることが

繰り返し報告されている。しかし、HER2 遺伝子変異肺がんに対する治療薬として承認されたトラスツズマブ・デルクステカン[®]は抗体薬物複合体であり、TKI とは全く異なる耐性獲得をきたすことが想定され、今後の耐性機序探索が重要である。直近の報告において、トラスツズマブ・デルクステカン耐性獲得後の検体で、がん抑制遺伝子である RB1 の欠失が生じていたことなどが示されている²⁶。

(6) HER2 遺伝子変異の検出法

HER2 遺伝子変異を検出するコンパニオン診断薬として、本邦では組織検体を用いるオンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム（以下、オンコマイン DxTT）および血漿検体を用いる Guardant360 CDx がん遺伝子パネル（以下、G360CDx）が承認されている（オンコマイン DxTT の詳細や必要とされる検体取扱いなどについては、肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き「2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査」の項を参照）。ただし G360CDx については、①CGP としての検査費用と CDx としての保険点数の乖離が大きいこと、②CDx 対象ドライバー遺伝子が HER2 と KRAS の 2 遺伝子のみであることから、実臨床においては、コンパニオン診断はオンコマイン DxTT での運用となる（G360CDx については後述）。

2023 年 11 月現在、オンコマイン DxTT では 54 種類の HER2 遺伝子変異が検出可能であるが、うち 48 種類がコンパニオン診断として使用可能であり、残りの 6 種類は参考情報として返却され、コンパニオン診断としては使用不可である（表 1）。54 種類の HER2 遺伝子変異のうち約半数がエクソン 20 の挿入変異であるが、エクソン 20 の点突然変異やその他のエクソンの遺伝子変異が残りの半数を占めている。一方、他のマルチ遺伝子検査である肺癌コンパクトパネル Dx や AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネルでも、HER2 遺伝子変異の結果が参考情報として返却される。この場合には、マルチ遺伝子検査法を用いた検査アルゴリズムの項（肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き「2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査」）で示されているように、確認検査としてオンコマイン DxTT を用いたコンパニオン診

断を行い、その結果を確認する必要がある。2023 年 11 月現在、トラスツズマブ・デルクステカン[®]は二次治療以降で承認されていることから、前治療中に確認検査を行うことも可能ではあるが、前治療開始時など早めの実施が推奨される。なお、これらのマルチ遺伝子検査でカバーされる HER2 遺伝子変異とオンコマイン DxTT でカバーされる HER2 遺伝子変異（表 1）は必ずしも一致していない可能性を念頭に置く必要がある。

血漿検体を用いる G360CDx は主に CGP 検査として実施されると想定されるが、HER2 遺伝子の全エクソン領域が解析対象となっているため、オンコマイン DxTT でカバーされていない HER2 遺伝子変異が同定される可能性がある。2023 年 11 月現在、DESTINY-Lung02 試験の inclusion criteria に含まれる HER2 遺伝子変異のうち、Gly776_Val777delinsCysValCysGly、Val777_Gly778insCysVal、Thr798Ile の 3 つのバリエーションはオンコマイン DxTT には含まれていないが、G360CDx で検出された場合にはコンパニオン診断として使用可能である。また Ile767Phe 変異はオンコマイン DxTT では参考情報として返却されるものの、DESTINY-Lung02 試験の inclusion criteria には含まれており、G360CDx で検出された場合にはコンパニオン診断として使用可能となっている。

おわりに

HER2 遺伝子変異は EGFR 遺伝子変異と同様に 2004 年に発見され、乳がんや胃がんなど他のがん腫でも抗 HER2 療法の開発が進んでいたが、本邦の HER2 遺伝子変異陽性肺がん患者が分子標的治療薬の恩恵を受けられるようになったのは、発見から約 20 年後の 2023 年 8 月のことである。組織検体を用いたコンパニオン診断薬としては、2023 年 11 月現在、オンコマイン DxTT のみが承認されているが、オンコマイン DxTT で検出可能な HER2 変異のうち、6 種類は参考情報として返却される（コンパニオン診断用には使用できない）ことに留意する必要がある。また他のマルチ遺伝子検査である肺癌コンパクトパネル Dx や AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネルでも HER2 遺伝子変異が参考情報として返却され、変異陽性の

場合はコンパニオン診断薬であるオンコマイン DxTT で結果を確認する必要がある。

しかし一方、非小細胞肺癌においては多岐にわたる *HER2* 遺伝子変異が報告されていることもまた事実である。*HER2* 遺伝子変異を含むドライバー変異陰性の患者においては、CGP 検査を治療の経過で取り入れることにより、見落とされているドライバー変異の拾い上げに繋がられる可能性もある(上記 G360CDx に関する記述も参照)。しかし、稀な *HER2* 遺伝子変異が CGP 検査にて同定された場合、その多くは VUS に分類されと考えられ、当該患者の治療方針についてはエキスパートパネルなどにて十分に検討する必要がある。

HER2 変異肺癌に対するトラスツズマブ・デルクステカン治療は、その他の肺癌分子標的治療薬と異なり、*HER2* タンパクを指標として標的細胞(がん細胞)に殺細胞性抗がん剤(デルクステカン)を運搬する ADC 薬である。このため、多くの稀な *HER2* 遺伝子変異は VUS であるものの、(真のドライバー変異でなかったとしても)トラスツズマブ・デルクステカンの治療効果が期待できる可能性もある。今後は、各 *HER2* 変異(特にエクソン 20 挿入変異以外の稀な変異)について、本薬剤の治療効果に関するデータを蓄積していく必要がある。

表 1. オンコマイン DxTT で検出可能な HER2 遺伝子変異一覧 (2023 年 11 月現在)

① コンパニオン診断として使用可能な遺伝子変異			
エクソン	変異の詳細		ヌクレオチドの変化
8	p.S310Y		c.929C>A
8	p.S310F		c.929C>T
17	p.R678Q		c.2033G>A
18	p.T733I		c.2198C>T
19	p.L755P		c.2263_2264delTTinsCC
19	p.L755A		c.2263_2264delTTinsGC
19	p.L755M		c.2263T>A
19	p.L755S		c.2264T>C
19	p.L755W		c.2264T>G
19	p.I767M		c.2301C>G
19	p.D769N		c.2305G>A
19	p.D769H		c.2305G>C
19	p.D769Y		c.2305G>T
20	p.E770_A771insAYVM		c.2324_2325insATACGTGATGGC
20	p.Y772_V773insVMAT		c.2325_2326insACCGTGATGGCT
20	p.A771_Y772insYVMA		c.2325_2326insTACGTGATGGCT
20	p.G776delinsLC		c.2326_2326delGinsCTTT
20	p.G776delinsLC		c.2326_2326delGinsTTGT
20	p.A775_G776insV		c.2326_2327insTAG
20	p.G776delinsVC		c.2326_2327insTAT
20	p.A775_G776insV		c.2326_2327insTCG
20	p.G776delinsVC		c.2326_2327insTCT
20	p.A775_G776insV		c.2326_2327insTGG
20	p.G776delinsVC		c.2326_2327insTGT
20	p.A775_G776insV		c.2326_2327insTTG
20	p.G776delinsVC		c.2326_2327insTTT
20	p.G776S		c.2326G>A
20	p.G776C		c.2326G>T
20	p.G776V		c.2327G>T
20	p.G776_V777insL		c.2328_2329insCTT
20	p.V777M		c.2329G>A
20	p.V777L		c.2329G>C
20	p.V777L		c.2329G>T
20	p.G776_V777insVGC		c.2330_2331insAGGTTGTGT
20	p.V777_G778insCG		c.2331_2332insTGTGGG
20	p.G778_S779insLPS		c.2333_2334insGCTCCCCAG
20	p.V777_G778insG		c.2333_2334insGGG
20	p.V777_G778insGCP		c.2335_2336insGCCCAGGCT
20	p.G776_V777insVGS		c.2336_2337insTGTGGGCTC
20	p.V777_G778insGSP		c.2339_2340insCGGCTCCCC
20	p.V777_G778insGSP		c.2339_2340insGGGCTCCCC
20	p.V777_G778insGSP		c.2339_2340insTGGCTCCCC
20	p.V777_G778insGSP		c.2340_2341insGGCTCCCCA
21	p.V842I		c.2524G>A
21	p.T862I		c.2585C>T
21	p.L869R		c.2606T>G
22	p.R896C		c.2686C>T
22	p.R896H		c.2687G>A

② 参考情報として返却可能な遺伝子変異（コンパニオン診断には使用不可）		
エクソン	変異の詳細	ヌクレオチドの変化
19	p.L755_T759del	c.2264_2278delTGAGGGAAAACACAT
19	p.I767F	c.2299A>T
20	p.G776delinsCV	c.2326_2327delGGinsTGTGT
20	p.Y772_V773insVMAV	c.2326_2327insTCGTGATGGCTG
20	p.G778_S779insSR	c.2338_2339insGCTCCC
21	p.T862A	c.2584A>G

参考文献

1. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci.* 2007 Dec;98(12):1817-24.
2. Philip S, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours, *Nature* 2004, 30;431(7008):525-6.
3. Tomizawa K, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer.* 2011 Oct;74(1):139-44.
4. Lai WV, et al. Afatinib in patients with metastatic or recurrent HER2-mutant lung cancers: a retrospective international multicentre study. *Eur J Cancer.* 2019 Mar;109:28-35.
5. Koga T, et al. Activity and mechanism of acquired resistance to tarloxotinib in HER2 mutant lung cancer: an in vitro study. *Transl Lung Cancer Res.* 2021 Aug;10(8):3659-3670.
6. Wang Y, et al. HER2 exon 20 insertions in non-small-cell lung cancer are sensitive to the irreversible pan-HER receptor tyrosine kinase inhibitor pyrotinib. *Ann Oncol.* 2019 Mar 1;30(3):447-455.
7. Han H, et al. Targeting HER2 Exon 20 Insertion-Mutant Lung Adenocarcinoma with a Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Mobocertinib. *Cancer Res.* 2021 Oct 15;81(20):5311-5324.
8. Yu HA, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2013 Apr 15;19(8):2240-7.
9. Shigematsu H, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2005 Mar 1;65(5):1642-6.
10. Oh DY, Bang YJ. HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2020; 17 (1) , 33-48.
11. Koga T, et al. Activity of a novel HER2 inhibitor, poziotinib, for HER2 exon 20 mutations in lung cancer and mechanism of acquired resistance: An in vitro study. *Lung Cancer.* 2018 Dec;126:72-79.
12. Goss GD, et al. Association of ERBB Mutations With Clinical Outcomes of Afatinib- or Erlotinib-Treated Patients With Lung Squamous Cell Carcinoma: Secondary Analysis of the LUX-Lung8 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018 Sep 1;4(9):1189-1197.
13. Hamada A, et al. In vitro validation study of HER2 and HER4 mutations identified in an ad hoc secondary analysis of the LUX-Lung 8 randomized clinical trial. *Lung Cancer.* 2021 Dec;162:79-85.
14. Suda K, et al. Clinical Impacts of EGFR Mutation Status: Analysis of 5780 Surgically Resected Lung Cancer Cases. *Ann Thorac Surg.* 2021 Jan;111(1):269-276.
15. Offin M, et al. Frequency and outcomes of brain metastases in patients with HER2-mutant lung cancers. *Cancer.* 2019;125(24):4380-4387.
16. Wang Y, et al. Outcomes of pemetrexed-based chemotherapies in HER2-mutant lung cancers. *BMC Cancer.* 2018;18(1):326.
17. Kenmotsu H, et al. Randomized Phase III Study of Pemetrexed Plus Cisplatin Versus Vinorelbine Plus Cisplatin for Completely Resected Stage II to IIIA Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2020 Jul 1;38(19):2187-2196.
18. Guisier F, et al. Efficacy and safety of Anti-PD-1 immunotherapy in patients with advanced NSCLC with BRAF, HER2, or MET mutations or RET translocation: GFPC 01-2018. *J Thorac Oncol.* 2020;15(4):628-636.
19. Mazieres J, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1321-1328.
20. Tsurutani J, et al. Targeting HER2 with Trastuzumab Deruxtecan: A Dose-Expansion, Phase I Study in Multiple Advanced Solid Tumors. *Cancer Discov.* 2020 May;10(5):688-701.
21. Egbert F, et al. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients with HER2-mutated metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim results of DESTINY-Lung01. *Journal of Clinical Oncology* 38, no. 15_suppl (May 20, 2020) 9504-9504.
22. Nakagawa K, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-overexpressing metastatic non-small cell lung cancer: interim results of DESTINY-Lung01. *J Thorac Oncol* 2021; 16: S109-S110. abstract.
23. Egbert FS, et al. Trastuzumab Deruxtecan in patients with HER2-overexpressing metastatic non-small cell lung cancer: Results from the Destiney-Lung01 trial. *ESMO* 2022.
24. Goto K, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Mutant Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: Primary Results From the Randomized, Phase II DESTINY-Lung02 Trial. *J Clin Oncol.* 2023 Nov 1;41(31):4852-4863.
25. Kosaka T, et al. Response Heterogeneity of EGFR and HER2 Exon 20 Insertions to Covalent EGFR and HER2 Inhibitors. *Cancer Res.* 2017 May 15;77(10):2712-2721.
26. Gupta A, et al. Loss of Rb1 Associated With the Onset of Acquired Resistance to Trastuzumab Deruxtecan in TP53-/HER2-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer: Case Series. *JCO Precis Oncol.* 2023 Feb;7:e2200476.

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-9. NTRK

(2024年4月改訂版)

目次

(1) NTRK 遺伝子	2
(2) NTRK 融合遺伝子陽性肺癌の臨床病理学的特徴	4
(3) NTRK 融合遺伝子陽性肺癌に対する臨床試験	4
(4) NTRK 融合遺伝子の診断	5
1. NGS 法	6
2. RT-PCR 法 (AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル)	7
3. FISH 法	7
4. IHC 法	7
参考文献	8

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

三窪 将史, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗 淳一,
朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

(1) NTRK 遺伝子

Neurotrophic tropomyosin receptor kinase (NTRK) 遺伝子は1q21-22に位置するNTRK1、9q22.1に位置するNTRK2、15q25に位置するNTRK3を含む癌原遺伝子ファミリーであり、トロポミオシン受容体キナーゼ (TRK) ファミリーに属するTRKA、TRKB、TRKCをコードしている。TRKは膜貫通型タンパク質チロシンキナーゼであり、神経栄養因子がリガンドとして結合することにより活性化し、細胞内のRAS/MAPK、PI3K/AKT、PKCシグナル伝達経路を介して神経細胞の発生、分化や生存維持に関与することが知られている^{1, 2}。TRKは成人では神経細胞と精巣に限定して発現している³。NTRK融合遺伝子は、1986年にMartin-Zancaらが大腸癌の細胞株からはじめて同定し報告された⁴。以後、小児fibrosarcomaや乳腺および唾液腺原発の分泌癌においてETV6-NTRK3融合遺伝子が90%以上の症例で認められることが明らかにされ⁵⁻⁸、現在まで様々な癌腫においてNTRK融合遺伝子がOncogenic driverとして腫瘍細胞の増殖・生存に関与することが報告されている。肺癌においては、2013年にVaishnaviらがNTRK1融合遺伝子(MPRIP-NTRK1、CD74-NTRK1、TPM3-NTRK1)を肺腺癌で同定し、これらの融合遺伝子が腫瘍の増殖に関与すること、TRKAキナーゼ活性を阻害することで融合遺伝

子を有する細胞株の増殖が抑制されることが報告された⁹。

NTRK融合遺伝子はNTRK1/2/3遺伝子の3'領域と、同一染色体内あるいは他の染色体に存在するパートナー遺伝子の5'領域が融合することで生じる。遺伝子の融合によりTRK融合蛋白が生じることで、リガンド非依存性にTRKキナーゼが活性化され、腫瘍細胞の増殖・生存が促進される。NTRK1/2/3融合遺伝子の分布は腫瘍タイプによって異なり、小児fibrosarcomaや乳腺および唾液腺原発の分泌癌ではNTRK3が、中枢神経系腫瘍ではNTRK2が多い。肺癌では蓄積されたデータが少ないものの、NTRK1に次いでNTRK3が多く、NTRK2の報告例は少ない¹⁰。NTRKと融合するパートナー遺伝子は多彩で、これまでに80種類以上のパートナー遺伝子が様々な癌腫において報告されている。ALK、ROS1、RET融合遺伝子と異なり、上述の乳腺・唾液腺分泌癌などの腫瘍特異的なバリエーションを除き、その他の癌腫では融合パートナーに関する一定の傾向は認められていない。肺癌においてはNTRK1/2/3融合遺伝子含めてこれまでに28種類のパートナー遺伝子が報告されており、TPM3-NTRK1融合遺伝子の報告例がやや目立つものの、遺伝子のバリエーションは豊富でNTRK遺伝子側のbreak pointも様々である(図1、表1)。しかし、いずれの融合遺伝子でも

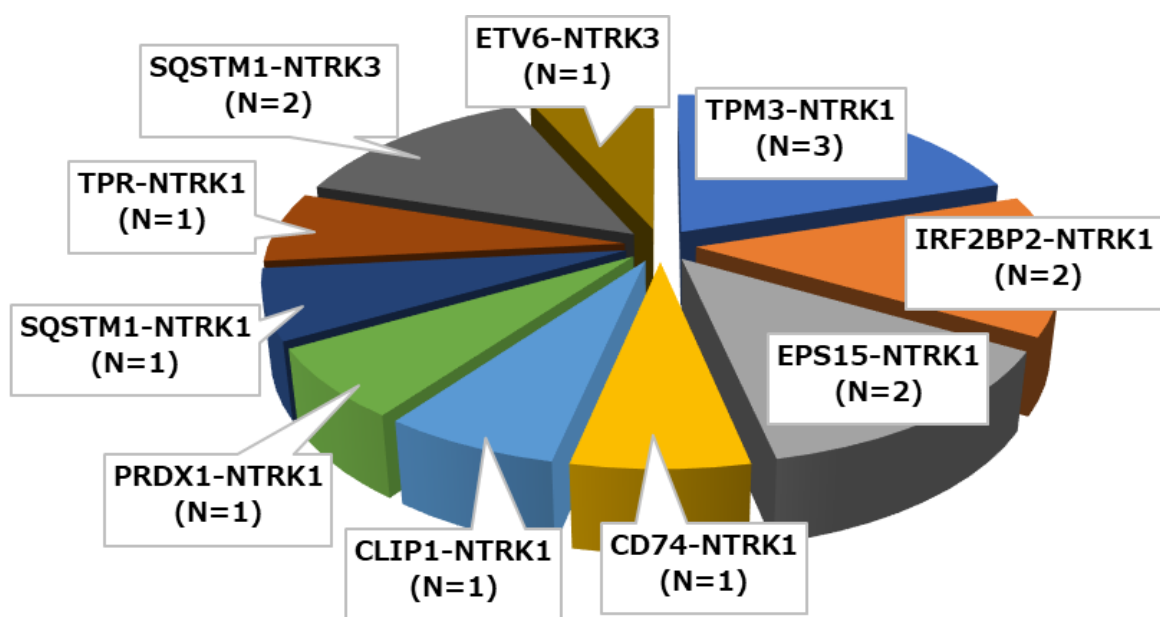
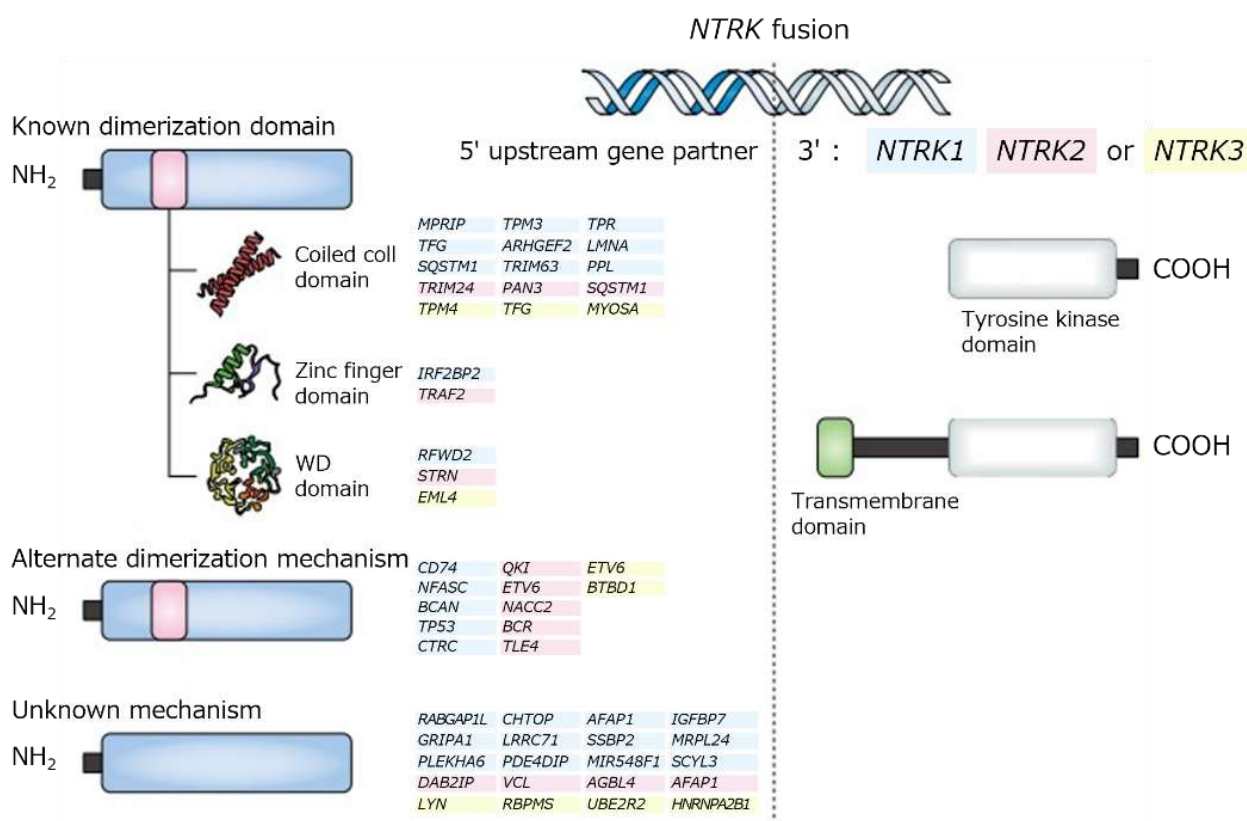


図1. Larotrectinibに関する臨床試験(LOXO-TRK-14001, SCOUT, NAVIGATE)に登録された肺癌におけるNTRK融合遺伝子バリエーション(文献10を基に作図)

表 1. 肺癌における *NTRK* 融合遺伝子の報告例 (文献 9, 13, 20, 23, 25-28 から作成)

NTRK	融合パートナー	融合点	組織型	NTRK	融合パートナー	融合点	組織型
NTRK1	P2RY8	N5, P2	Ad	NTRK1	TPM3	N12, T8	Ad
	PHF20	N5, P2	Sarcomatoid		BCL9	N12, upstream BCL9	Ad
	LIPI	N8, L1	Ad		MPRIP	N14, M21	Ad
	TFG	N9, T4	Ad		CLIP1	NA	Ad
	SQSTM1	N10, S6	Ad		RFWD2	NA	NE
	TPR	N10, T21	Ad	NTRK2	TRIM24	N15, T12	Ad
	IRF2BP2	N10, I1	Ad		STRN	N16, S3	Ad
	EPS15	N10, E21	Ad		SQSTM1	N16, S4	Ad
	NCOR2	N10, N9	Ad	NTRK3	EML4	N14, E2	Ad
	F11R	N10, F4	NSCLC, Sq		ETV6	N14, E4	Ad
	GRIPAP1	N11, G22	Ad		RBPMS	N14, R5	Ad
	LMNA	N11, L7	Ad		AKAP13	N14, A3	Ad
	CD74	N12, C8	Ad		SQSTM1	N15, S5	Ad, NE
	PRDX1	N12, P5	Ad		ETV6	N15, E5	Ad, Sq

図 2. *NTRK* 融合遺伝子とその活性化メカニズム (文献 11 より引用). Reproduced with permission from Springer Nature (2024)

NTRK 遺伝子側の融合点はキナーゼ領域の上流にあり、キナーゼ領域が保持されたまま融合する。他の融合遺伝子と同様、coiled-coiled ドメインなどの二量体化ドメインを有するパートナー遺伝子との融合においては、この領域による *NTRK* 融合タンパクの恒常的な二量体の形成

によって TRK キナーゼの活性化がもたらされるが、二量体化ドメインを有さないパートナー遺伝子との融合パターンも多く、これらのバリエーションにおけるキナーゼ活性化の機序は明らかにされていない (図 2)。パートナー遺伝子由来の配列が TRK タンパクの細胞外領域に存在する

自己阻害ドメインを置換することや、パートナー遺伝子によって融合タンパク質の細胞内局在が異なることなどが報告されており、パートナー遺伝子の違いによって、様々な異なる機序でキナーゼ活性化が生じるものと考えられている¹¹。

(2) NTRK 融合遺伝子陽性肺癌の臨床病理学的特徴

NTRK 融合遺伝子を有する肺癌は極めて稀であり、非小細胞肺癌の0.1-0.3%と報告されている¹²。臨床背景としては、EGFR 遺伝子変異、ALK/ROS1/RET 融合遺伝子陽性肺癌と同様に、若年～中年の軽喫煙あるいは非喫煙者に多い傾向にあるものの、高齢者や喫煙者の報告もあり、どの臨床背景の患者にも生じる可能性がある。組織型としては、これまでの報告例では大部分が肺線癌であるが、扁平上皮癌や神経内分泌癌などでも報告例が見られる¹³。EGFR、ALKをはじめとした他のドライバー遺伝子異常と相互排他的とされているが、EGFR 陽性肺癌に対するEGFR-TKI 後の耐性機序としての報告例もある¹⁴。

(3) NTRK 融合遺伝子陽性肺癌に対する臨床試験

NTRK 融合遺伝子を有する腫瘍に対してはTRK 阻害活性を有する薬剤が有効であり、選択的TRK 阻害剤や他の標的遺伝子も同時に阻害するマルチキナーゼ阻害剤の開発が進められている。希少な遺伝子異常であり、年齢や腫瘍タイプによらず横断的に認められるという特性から、NTRK 融合遺伝子に関する臨床試験の多くはバスケット試験として行われている。現在、NTRK 融合遺伝子陽性肺癌に対して承認されているTRK キナーゼ阻害薬はラロトレクチニブ (ヴァイトラックビ®) とエヌトレクチニブ (ロズリートレク®) の2つがある。

ラロトレクチニブはTRKA、TRKB、TRKC に選択的に作用する選択的TRK 阻害剤である。ラロトレクチニブの有効性は、成人を対象とした第1相試験 (LOXO-TRK-14001 試験)、小児を対象とした第1/2相試験 (SCOUT 試験)、青年期および成人を対象とした第2相バスケット試験 (NAVIGATE 試験)によって検証された^{15,16}。これらの試験には、NGS、FISH、RT-PCR のいずれかの方法で検出されたNTRK 融合遺伝子陽性の固形腫瘍が組み入れられた。3つの試験に登録されたはじめての55例のNTRK

融合遺伝子陽性腫瘍の統合解析では、画像中央判定において7例 (13%) で完全奏功 (CR)、34例 (62%) で部分奏功が得られ、奏功割合 (ORR) は75% (95%信頼区間 [CI] 61-85%) と高い効果を示すことが報告された¹⁵。また、ラロトレクチニブの効果は患者の年齢や腫瘍タイプ、NTRK 遺伝子 (NTRK1/2/3)、融合パートナーに関わらず得られることも示された。この結果をもとに、NTRK 融合遺伝子陽性の進行・再発固形がんに対するラロトレクチニブ (ヴァイトラックビ®) が2018年11月にFDAで承認された。その後の拡大フォローアップで解析された159例の結果は、ORR 79% (95%CI 72-85%)、奏功期間中央値は35.2ヶ月 (95%CI 22.8ヶ月～未到達)、無増悪生存期間中央値は28.3ヶ月 (95%CI 22.1ヶ月～未到達)、全生存期間中央値は44.4ヶ月 (95%CI 36.5ヶ月～未到達)であり、本邦ではこれらの結果をもとに2021年3月に承認が取得されている¹⁶。これらの臨床試験のうち、非小細胞肺癌は第1相試験 (LOXO-TRK-14001 試験)に1例、第2相試験 (NAVIGATE 試験)に19例の計20例が含まれていた。組織型は19例が腺癌、1例が神経内分泌癌であり、NTRK1 融合遺伝子が16例 (80%)、NTRK3 融合遺伝子が4例 (20%)であった。1例 (7%)でCR、10例 (67%)でPRが得られ、ORRは73% (95%CI 45-92%)であった。奏功期間中央値は33.9ヶ月 (95%CI 5.6～33.9ヶ月)、無増悪生存期間中央値は35.4ヶ月 (95%CI 5.3～35.4ヶ月)、全生存期間中央値は40.7ヶ月 (95%CI 17.2ヶ月～未到達)であり、全体集団と変わらない効果が認められた¹⁷。

エヌトレクチニブは、ROS1、ALK、TRK を阻害するマルチキナーゼ阻害薬である。NGS、FISH、RT-PCR のいずれかの方法で同定されたNTRK 融合遺伝子陽性の固形がんを対象する2つの第1相試験 (ALKA-372-001、STARTRK-1)および1つの第2相試験 (STARTRK-2)においてその有効性が検証され、統合解析の結果が報告された¹⁸。54例のNTRK 融合遺伝子陽性固形がんのうち、4例 (7%)でCR、27例 (50%)でPRが得られ、ORRは57% (95%CI 43-71%)であった。奏功期間中央値は10.4ヶ月 (95%CI 7.1ヶ月～未到達)、無増悪生存期間中央値は11.2ヶ月 (95%CI 8.0～14.9ヶ月)であり、この結果に基づき、NTRK 融合遺伝子陽性の進行・再発固形がんに対するエヌトレクチニブ (ロズリートレク®) の

表 2. NTRK 融合遺伝子固形がんに対する臨床試験

薬剤	標的	試験名	phase	対象
Larotrectinib	TRK A/B/C	NCT02122913 (LOXO-TRK-14001)	1	TRK-TKI未治療
		NCT02637687 (SCOUT)	1/2	
		NCT02576431 (NAVIGATE)	2	
Entrectinib	TRK A/B/C ROS1 ALK	EudraCT,2012-000148-88 (ALKA-372-001)	1	TRK-TKI未治療
		NCT02097810 (STARTRK-1)	1	
		NCT02568267 (STARTRK-2)	2	
Taletrectinib (DS-6051b/AB-106)	TRK A/B/C ROS1	NCT02279433	1	TRK-TKI未治療
		NCT02675491	1	
Repotrectinib (TPX-0005)	TRK A/B/C ROS1 ALK	NCT03093116 (TRIDENT-1)	1/2	TRK-TKI未治療 TRK-TKI耐性後
Selirectinib (LOXO-195)	TRK A/B/C	NCT03215511	1	TRK-TKI耐性後

単独療法が 2019 年 6 月に本邦で、同年 8 月に米国 FDA で承認された。これらの臨床試験には 13 例の非小細胞肺癌が登録された。組織型は腺癌 9 例、扁平上皮癌 2 例、NSCLC-NOS 2 例であり、NTRK1 融合遺伝子が 8 例 (62%)、NTRK2 融合遺伝子が 1 例 (7%)、NTRK3 融合遺伝子が 4 例 (31%)であった。1 例 (8%)で CR, 8 例 (62%)で PR が得られ、ORR は 69% (95%CI 39-91%)であった。無増悪生存期間中央値は 14.9 ヶ月 (95%CI 4.7 ヶ月～未到達)、全生存期間中央値は 14.9 ヶ月 (95%CI 5.9 ヶ月～未到達)であった¹⁹。

TRK 阻害剤による治療後の耐性機序も報告されている。On-target の耐性機序としては、NTRK キナーゼ領域の遺伝子変異 (TRKA G595R, F589L, G667C; TRKB G639R; TRKC G623R, G696A) が見つかっており、これらの耐性変異を有する腫瘍にも効果を示す第 2 世代 TRK 阻害剤 (Repotrectinib, Selitrectinib, Taletrectinib) の治療開発も進められている^{20,21,22}。Off-target の耐性機序としては、KRAS G12D, BRAF V600E, MET 増幅などの MAPK 経路の遺伝子変異や増幅が関連するとされている²⁰。

(4) NTRK 融合遺伝子の診断

NTRK 融合遺伝子の検出には、次世代シーケンシング法 (Next generation sequencing: NGS)、RT-PCR 法 (reverse transcription polymerase chain reaction)、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (Fluorescence *in situ* hybridization: FISH)、免疫組織化学染色法 (Immunohistochemistry: IHC) がある。このうち、エヌトレクチニブ (ロズリートレク[®]) のコンパニオン診断薬として FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル (F1CDx) と FoundationOne®Liquid CDx がんゲノムプロファイル (F1 Liquid CDx) が、ラロトレクチニブ (ヴァイトラックビ[®]) のコンパニオン診断薬として F1CDx が承認されている。しかし、これらの検査は保険算定上の問題からコンパニオン診断薬としては利用しづらく、実際には包括的ゲノムプロファイリング Comprehensive genome profile (CGP) 検査としてエキスパートパネルを経て薬剤の投与が行われることが多い。他の driver 遺伝子と異なり、他にコンパニオン診断薬として承認されている検査法がないため、NTRK 融合遺伝子陽性肺癌の治療は CGP 検査の結果を基に行う運用が中心となる。

表 3. NTRK 融合遺伝子の検出に用いられる各種検査法の比較

方法	感度	特異度	全融合遺伝子の検出	融合パートナーの検出	発現の検出
IHC	高*	中～高	可能	不可	可能
FISH	高	高	プローブあたり1つ	不可	不可
RT-PCR	中	高	可能	可能	不可
DNA-seq NGS	中	高	可能†	可能	不可
RNA-seq NGS	高‡	高	可能	可能	可能

* NTRK3 では中等度、† F1CDx では NTRK3 の掲載なし、‡ アンブリコンシーケンス法では中等度

1. NGS 法

NGS 法には検査対象として RNA と DNA のいずれを用いるか、シーケンス法としてアンブリコンシーケンス法とハイブリッドキャプチャー法のいずれを用いるかが検査法によって異なり、これら違いが融合遺伝子の検出に影響する（検査法の詳細については、肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き「2. バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査」の項を参照）。

F1CDx はハイブリッドキャプチャー法を用いて腫瘍組織由来の DNA を解析する方法である。ハイブリッドキャプチャー法の特性上、未知の融合パートナーでも検出可能であるため、融合パートナーのバリエーションが豊富な *NTRK* 融合遺伝子の検出には優れている。しかし、*NTRK3* については *NTRK3* 自体の搭載がなくパートナー遺伝子側から検出するため、搭載遺伝子がパートナーであった場合のみ検出可能であることに注意が必要である。また、DNA ベースの検査であるため、イントロン領域に存在する転座点を検出するためには広い範囲をシーケンスする必要があり、その全てを網羅することは困難であるため、RNA ベースの検査に比較すると検出効率が低くなることが指摘されている。特に *NTRK2*、*NTRK3* はそれぞれ 350.7kb、379.2kb と *NTRK1* (20.7kb) に比べて遺伝子自体が大きいこと偽陰性となる可能性に注意が必要である²³。F1 Liquid CDx は血漿中の腫瘍由来 DNA を解析対象としているが、感度の問題があり、組織を用

いた *NTRK* 融合遺伝子検査との陽性一致率は 47.4% に留まるとされているため²⁴、組織採取が困難な場合を除いては組織を用いた遺伝子検査が優先される。

その他の CGP 検査として、NCC オンコパネル、GenMineTOP がンゲノムプロファイリングシステムが使用可能である。NCC オンコパネルはハイブリッドキャプチャー法を用いた DNA ベースの検査である点で F1CDx と同様の特徴を有する。GenMineTOP がンゲノムプロファイリングシステムもハイブリッドキャプチャー法を用いているが、融合遺伝子の検出に RNA を使用することからエクソンのジャンクション配列を読み取ればよく、DNA ベースの検査より検出の効率がよいとされる。いずれも *NTRK1/2/3* 融合遺伝子を検出可能であり、それぞれの検査の特性に留意して検査法の選択や結果の解釈を行うことが求められる。

オンコマイン™ Dx Target test マルチ CDx システム (オンコマイン DxTT) は融合遺伝子の検出に RNA を用い、*NTRK1/2/3* のいずれも検出遺伝子として搭載されている。しかし、アンブリコンシーケンス法を用いるため、既知のパートナー遺伝子のみが検出可能であり、*NTRK* 融合遺伝子においてはパートナー遺伝子が多彩であることや、*NTRK* 遺伝子自体の break point にもバリエーションが多いことから検出感度に限界があることに留意が必要である。また、オンコマイン DxTT は TRK キナーゼ阻害薬のコンパニオン診断薬として承認されていないため、

NTRK 融合遺伝子が検出された場合においても薬剤の投与には CGP 検査での確認が必要である。

2. RT-PCR 法 (AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル)

AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネルは、リアルタイム PCR 法を用いたマルチプレックス遺伝子検査であり、研究用の参考情報として *NTRK1/2/3* の解析が可能である。融合点をはさんで *NTRK* 側とパートナー遺伝子側のプライマー設定が必要であり、既知のパートナー遺伝子のみ検出可能である。乳腺・唾液腺分泌癌における *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子など、融合遺伝子のパターンが限られているがん種では有効であるが、非小細胞肺癌での *NTRK* 融合遺伝子の検出は限られる。

3. FISH 法

融合遺伝子の検出に使用され、非小細胞肺癌においても主に *ALK* 融合遺伝子の検出に用いられている。パートナー遺伝子の種類が多い *NTRK* 融合遺伝子においても break apart プローブを用いることで理論的には検出可能である。しかし、*NTRK1/2/3* の全てについて検討するには 3 セットのプローブ設定が必要であることや、融合パートナーが *NTRK* と同一染色体内に存在する場合に

はシグナルの判別が難しいことがあり、偽陰性となる可能性に留意する必要がある²³。

4. IHC 法

IHC 法は TRK タンパクの発現を検出するものであり、IHC 陽性例が必ずしも *NTRK* 融合遺伝子を有するわけではないため、TRK 阻害剤の適応を直接判断することはできない。しかし、安価で簡便な検査であり、非小細胞肺癌における *NTRK* 融合遺伝子の希少性を考慮すると、NGS 検査の前のスクリーニング検査としての使用は考慮される。最も広く使用されている市販の抗体は pan-TRK 抗体の clone EPR17341 (Abcam, Roche/Ventana) であり、報告にもよるが感度は 75-95%、特異度は 81-100% である²⁵⁻²⁷。しかし、*NTRK3* では *NTRK1/2* に比較して感度が低い (55-79%) ともされており注意を要する^{25,27}。面白いことに、IHC における陽性パターン (核、細胞質、細胞膜) は融合パートナーによって異なるとされており、パートナー遺伝子によって調整される融合タンパクの細胞内局在の違いに起因すると考えられている¹¹。陽性のカットオフとして 1% を用いた報告が多いが、明確に定められたカットオフは存在せず、判定方法含めて今後の検討が求められる。

参考文献

1. Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 2001; 169(2): 107–114.
2. Thiele CJ, et al. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res*. 2009; 15 (19) : 5962-5967. 19755385
3. Kheder ES, Hong DS. Emerging targeted therapy for tumors with *NTRK* fusion proteins. *Clin Cancer Res*. 2018;24(23):5807-5814.
4. Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 1986; 319: 743–8.
5. Knezevich SR, McFadden DE, Tao W. et al. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet* 1998; 18(2): 184–187.
6. Bourgeois JM, Knezevich SR, Mathers JA. et al. Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(7): 937–946.
7. Vasudev P, Onuma K. Secretory breast carcinoma: unique, triple-negative carcinoma with a favorable prognosis and characteristic molecular expression. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135(12): 1606–1610.
8. Skalova A, Vanecek T, Sima R. et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(5): 599–608.
9. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med*. Nov 2013;19(11):1469–1472.
10. Rudzinski ER, Hechtman J, Roy-Chowdhuri S, et al. Diagnostic testing approaches for the identification of patients with TRK fusion cancer prior to enrollment in clinical trials investigating Larotrectinib. *Cancer Genet* 2022; 260-261:46-52.
11. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; 15: 731–747.
12. Forsythe A, Zhang W, Phillip Strauss U, et al. A systematic review and meta-analysis of neurotrophic tyrosine receptor kinase gene fusion frequencies in solid tumors. *Ther Adv Med Oncol* 2020;12:1758835920975613.
13. Farago AF, Taylor MS, Doebele RC, et al. Clinicopathologic Features of Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring an NTRK Gene Fusion. *JCO Precis Oncol* 2018;2018:PO.18.00037.
14. Xia H, Xue X, Ding H, et al. Evidence of NTRK1 Fusion as Resistance Mechanism to EGFR TKI in EGFR NSCLC: Results From a Large-Scale Survey of NTRK1 Fusions in Chinese Patients With Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* 21 (3) (2020) 247–254.
15. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al, Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N. Engl. J. Med*. 378 (8) (2018) 731–739.
16. Hong DS, DuBois SG, Kummar S, et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol* 2020;21:531-40.
17. Drilon A, Tan DSW, Lassen UN, et al. Efficacy and Safety of Larotrectinib in Patients with Tropomyosin Receptor Kinase Fusion-Positive Lung Cancers. *JCO Precis Oncol*. 2022 Jan;6:e2100418.
18. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *Lancet Oncol*. 2020 Feb;21(2):271-282.
19. Drilon A, Paz-Ares L, Doebele RC, et al. Entrectinib in NTRK fusion-positive NSCLC: Updated integrated analysis of STARTRK-2, STARTRK-1 and ALKA-372-001. *Ann. Oncol*. 2020; 31 (2020) S474–S475. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.657>
20. Qin H, Patel MR. The challenge and opportunity of NTRK inhibitors in non-small cell lung cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):2916.
21. Harada G, Santini FC, Wilhelm C, et al. NTRK fusions in lung cancer: From biology to therapy. *Lung cancer* 2021;161:108-113.
22. Haratake N, Seto T. NTRK Fusion-positive Non-small-cell Lung Cancer: The Diagnosis and Targeted Therapy. *Clin Lung Cancer* 2021;22:1-5.
23. Hsiao SJ, Zehir A, Sireci AN, et al. Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy. *J Mol Diagn* 2019;21:553-571.
24. Dziadziuszko R, Hung T, Wang K, et al. Pre- and post-treatment blood-based genomic landscape of patients with ROS1 or NTRK fusion-positive solid tumours treated with entrectinib. *Mol Oncol*. 2022 May;16(10):2000-2014.
25. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J et al. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol*. 2019 ; 32 (1) : 147-153.
26. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM et al. Pan-Trk immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol*. 2017 ; 41 (11) : 1547-1551.
27. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol*. 2020;33(1):38-46.
28. Overbeck TR, Reiffert A, Schmitz K, et al. NTRK Gene Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Real-World Screening Data of 1068 Unselected Patients. *Cancers (Basel)* 2023;15(11):2966.

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編
肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-10. PD-L1

(2024年4月改訂版)

目次

（1）肺癌における免疫チェックポイント阻害薬の承認状況	3
（2）抗 PD-1 抗体薬／抗 PD-L1 抗体薬の臨床試験結果	3
1. 周術期非小細胞肺癌	4
2. 局所進行非小細胞肺癌	4
3. 進行非小細胞肺癌（ファーストライン）	5
4. 進行非小細胞肺癌（セカンドライン以降）	7
5. 進展型小細胞肺癌	7
（3）PD-L1 発現の診断	7
1. 22C3 抗体を用いた PD-L1 IHC 検査	8
2. 28-8 抗体を用いた PD-L1 IHC 検査	11
3. SP142 抗体を用いた PD-L1 IHC 検査	13
4. SP263 抗体を用いた PD-L1 IHC 検査	15
5. PD-L1 測定における課題	16
5-1. 検体による PD-L1 発現の相違	16
5-2. 治療介入による PD-L1 発現の変化	17
5-3. 抗体間のハーモナイゼーション	17
（4）結果の報告	17
1. 解析前セクション	18
2. 解析セクション	18
3. 結果セクション	18
4. 解釈/結論	18
5. 標準的な結果様式	18
参考文献	20
追補	23

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

清水 淳市, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 宗
淳一, 朝重 耕一, 畑中 豊, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 豊岡 伸一

免疫チェックポイント阻害薬が固形腫瘍において長期に奏効することが示され、複数の薬剤がさまざまな適応疾患、治療ライン、併用にて承認された。有効な集団を選択する主要な因子としてPD-L1 IHC検査は、免疫チェックポイント阻害薬の開発において積極的に臨床試験に組み入れられコンパニオン診断検査として開発が進められてきた。そのため、薬剤ごとに異なるコンパニオン診断テストが開発され、それらの診断基準も異なっている（表1）。たとえキットが同じであっても対象となる癌腫によってその診断基準が異なる場合もあり、どの癌腫でどの薬剤を用いるか区別して用いる必要がある。バイオマーカー委員会では、2017年3月に「肺癌患者におけるPD-L1検査の手引き」の第1版を、2020年10月に第2版、2021年2月に第2版の補遺を作成した。肺癌患者に対する免疫チェックポイント阻害薬を使用した治療レジメンは、非小細胞肺癌の周術期、局所進行期、進行期に広がっているが、治療選択のためにPD-L1検査は依然として有用である。

(1) 肺癌における免疫チェックポイント阻害薬の承認状況 (表2)

非小細胞肺癌には、手術症例において術前治療として

表1

抗体クローン	Dako 28-8	Dako 22C3	Ventana SP142	Ventana SP263
対応する治療薬	Nivolumab	Pembrolizumab	Atezolizumab	Durvalumab
製造会社	BMS	MERCK	ROCHE	AstraZeneca
免疫染色プラットフォーム	Link 48	Link 48	BenchMark ULTRA	BenchMark ULTRA
評価細胞	腫瘍細胞	腫瘍細胞	腫瘍細胞および腫瘍浸潤免疫細胞	腫瘍細胞
陽性細胞カットオフ値	≥ 1% ≥ 5% ≥ 10%	TPS ≥ 50% ≥ 1%	TC1/2/3 or IC1/2/3 ≥ 1%	TC ≥ 25% ≥ 1%
承認状況	体外診断薬	コンパニオン診断薬	コンパニオン診断薬 (進行非小細胞肺癌初回単剤治療)	コンパニオン診断薬 (術後アテゾリズマブ治療)
補足	頭頸部癌、悪性黒色腫、食道癌では腫瘍細胞の発現を、胃癌ではCPSを用いる。いずれも体外診断薬。	食道癌、乳癌でコンパニオン診断薬。頭頸部癌、子宮頸癌では体外診断薬。肺癌以外はCPSで評価する。	乳癌ではコンパニオン診断薬、ICのみ評価する	Durvalumab に対しては体外診断薬

TPS: tumor proportion score, CPS: combined positive score, TC: tumor cell, IC: tumor-infiltrating immune cell (用語については各抗体の項を参照)

ニボルマブ (オブジーボ®) と化学療法併用が、術後治療としてPD-L1陽性例にアテゾリズマブ (テセントリク®) 単剤が承認されている。局所進行例では、化学放射線療法後のデュルバルマブ (イミフィンジ®) 単剤投与が承認されている。進行例の初回治療においてはPD-L1陽性例にペムブロリズマブ (キイトルーダ®) 単剤が、PD-L1高発現例にアテゾリズマブ単剤が承認されている。既治療ではPD-L1発現によらずニボルマブ単剤、アテゾリズマブ単剤が、PD-L1陽性例にペムブロリズマブ単剤が承認されている。進行例の初回治療としては、PD-L1発現によらず、ニボルマブ+イピリムマブ (ヤーボイ®) 併用が、化学療法との併用でニボルマブ※、アテゾリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ+イピリムマブ併用、デュルバルマブ+トレメリムマブ (イジウド®) 併用が承認されている。さらに、アテゾリズマブとデュルバルマブは化学療法との併用で進展型小細胞肺癌への使用が承認されている。

(2) 抗PD-1抗体薬/抗PD-L1抗体薬の臨床試験結果

各薬剤における主要な臨床試験結果を示す。

表2. 本邦における非小細胞肺癌に対する承認状況

	治療レジメン	承認された検査法	検査法の互換使用
PD-L1 検査が必須	術後 アテゾリズマブ単剤	SP263 TC \geq 1%	22C3
	一次治療 アテゾリズマブ単剤	SP142 TC3 or IC3	—
	一次治療 ペムブロリズマブ単剤 二次治療以降 ペムブロリズマブ単剤	22C3 TPS \geq 1%	—
	一次治療 ニボルマブ+化学療法 ^{※1}	28-8 ^{※2} PD-L1 $<$ 1%	22C3
PD-L1 検査を推奨	二次治療以降 アテゾリズマブ単剤（扁平上皮癌）	SP142 ^{※2} TC1/2/3 or IC1/2/3	22C3
	二次治療以降 ニボルマブ単剤（非扁平上皮癌）	28-8 ^{※2} PD-L1 \geq 1%	
	局所進行、化学放射線療法後 デュルバルマブ単剤	SP263 ^{※2} PD-L1 \geq 1%	
PD-L1 検査が不要	術前 ニボルマブ+化学療法 一次治療 ペムブロリズマブ+化学療法 アテゾリズマブ+化学療法（非扁平上皮癌） ニボルマブ+イピリムマブ ニボルマブ+イピリムマブ+化学療法 ニボルマブ+化学療法（ペバシズマブ併用、非扁平上皮癌） ^{※1} デュルバルマブ+トレメリムマブ+化学療法 二次治療以降 ニボルマブ単剤（扁平上皮癌） アテゾリズマブ単剤（非扁平上皮癌）	—	—

※1 CM227 における化学療法併用は PD-L1 陰性例のみが対象であるが、TASUKI-52 における化学療法併用は PD-L1 によらない。

※2 コンパニオン診断薬ではなく、体外診断薬として承認されている

※3 2023 年 11 月に簡略化して改定発表されたニボルマブの最適使用推進ガイドラインでは、記載されなくなった

1. 周術期非小細胞肺癌（表3）

切除可能な非小細胞肺癌（AJCC 第7版に基づく IB（4cm 以上）～IIIA 期）を対象とした、根治手術前の術前ニボルマブ+化学療法3サイクルを化学療法単独3サイクルと比較する CheckMate 816 試験が行われ、無イベント生存期間の有意な延長が示され、承認された(1)。また、外科切除された非小細胞肺癌（AJCC 第7版に基づく IB（4cm 以上）～IIIA 期）に対し、プラチナ併用化学療法後のアテゾリズマブ単剤、3週ごと16サイクル投与を対症療法と比較する IMpower010 試験が行われ、中間解析の結果 PD-L1 陽性の II 又は IIIA 期集団において、無

病生存期間の有意な延長が認められ承認された(2, 3)。IMpower010 試験では、層別化因子として用いられた PD-L1 発現は SP142 が用いられていたが、主要評価集団は SP263 を用いた TC 1%以上とされた。

2. 局所進行非小細胞肺癌（表3）

局所進行非小細胞肺癌に対する化学放射線療法後に、デュルバルマブ単剤を1年間投与する試験（PACIFIC）においてプラセボに対し生存期間の有意な延長が示され、承認された(4, 5)。4年フォローアップデータまで発表されている(6)。

表 2. 周術期非小細胞肺癌に対する臨床試験

試験名	試験の種類	対象 (PD-L1 発現)	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	EFS/DFS (月)	HR for EFS/DFS (95% CI)
CM816	第III相 試験	切除可能非小細胞肺癌 IB (4cm以上) ~IIIA 期 ^{※1}	P-併用+NIVO P-併用	179	NR	0.57 (0.30-1.07)	31.6	0.63 (0.43-0.91)
				179	NR		20.8	
IMp010	第III相 試験	切除後非小細胞肺癌 IB (4cm以上) ~IIIA 期 ^{※1} (承認はTC \geq 1%、II-IIIA)	Atezo BSC	248	NR ^{※2}	0.71 ^{※2} (0.49-1.03)	NR ^{※2}	0.66 ^{※2} (0.50-0.88)
				228	NR		35.3	

※1 AJCC 第7版に基づく、※2 PD-L1 陽性(TC \geq 1%)のII-IIIA期のデータ

OS: 全生存期間、EFS: 無イベント生存期間 (CM816)、DFS: 無病生存期間 (IMp010)、HR: ハザード比、CI: 信頼区間、NR: 未到達、TC: SP263
による腫瘍細胞におけるPD-L1発現割合

P-併用: プラチナ製剤併用化学療法、NIVO: ニボルマブ、Atezo: アテゾリズマブ BSC: 最良の対症療法

表 3. 局所進行非小細胞肺癌に対する臨床試験

試験名 (Update)	試験の種類	対象 (PD-L1発現)	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	PFS (月)	HR for PFS (95% CI)
PACIFIC (4年)	第III相 試験	切除不能 III 期非小細胞肺癌、化 学放射線療法後増悪なし (All comers)	Durva Placebo	476 237	47.5 29.1	0.71 (0.57-0.88)	17.2 5.6	0.55 (0.44-0.67)

OS: 全生存期間、PFS: 無増悪生存期間、HR: ハザード比、Placebo: プラセボ、CI: 信頼区間、NR: 未到達
Durva: デュルバルマブ

3. 進行非小細胞肺癌（ファーストライン）（表 4）

ペムブロリズマブ単剤をプラチナ併用化学療法と比較した KEYNOTE-024 試験では、PD-L1 が高発現 (TPS \geq 50%) の進行非小細胞肺癌を対象としてペムブロリズマブ単剤が有意な生存期間の延長を示した(7) (8)。同様の比較が KEYNOTE-042 試験において PD-L1 TPS1%以上の症例を対象として行われ、有意な生存期間の延長を示した(9) (10)。これらの結果よりペムブロリズマブ単剤は本邦において PD-L1 が TPS 1%以上の非小細胞肺癌に対する初回治療としての使用が承認されている。ニボルマブ単剤は、プラチナ併用化学療法と比較して有意な生存期間の延長を示せなかった (CheckMate026) (11)。アテゾリズマブ単剤は IMpower110 において、PD-L1 が腫瘍細胞 (TC) もしくは腫瘍浸潤免疫細胞 (IC) で高発現¹である患者においてプラチナ併用化学療法と比較して有意に生存期間を延長することが報告され、これらの PD-L1 高発現症例に対して承認された(12) (13)。

免疫チェックポイント阻害薬と化学療法の併用は、主として PD-L1 発現での患者選択は行わず実施された。非扁平上皮非小細胞肺癌を対象とした試験は、カルボプラチ

ンもしくはシスプラチンとペメトレキセドへのペムブロリズマブの上乗せ (KEYNOTE-189)、カルボプラチン、パクリタキセル、ベバシズマブへのアテゾリズマブの上乗せ (IMpower150)、カルボプラチン、ナバパクリタキセルへのアテゾリズマブの上乗せ (IMpower130)、プラチナ、ペメトレキセドへのアテゾリズマブの上乗せ (IMpower132)、カルボプラチン、パクリタキセル、ベバシズマブへのニボルマブの上乗せ (TASUKI-52) の 5 試験で有意な生存期間の延長が示され、いずれも承認されている(14-16) (17) (18) (19) (20, 21)。扁平上皮非小細胞肺癌を対象とした試験は、カルボプラチン、パクリタキセルもしくは nab パクリタキセルへのペムブロリズマブの上乗せ (KEYNOTE-407) において有意な生存期間の延長が示され、承認された(22) (23)。カルボプラチン、nab パクリタキセルにアテゾリズマブを上乗せする試験 (IMpower131) では生存期間の有意な延長が得られなかった(24)。抗 CTLA-4 抗体を併用する試験として、ニボルマブ+イピリムマブ (CheckMate227)、2 サイクルの化学療法とイピリムマブ+ニボルマブの併用 (CheckMate 9LA)、化学療法へのデュルバルマブ、トレメリムマブの上乗せをする試験 (POSEIDON) においても有意な生存期間の延長が示され承認された(25-29)。

表4. 進行非小細胞肺癌のファーストラインにおける試験局所進行非小細胞肺癌に対する臨床試験

試験名 (Update)	試験の 種類	対象 (PD-L1発現)	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	PFS (月)	HR for PFS (95% CI)
KEYNOTE 024 (5年)	第III相 試験	非小細胞肺癌 ^{※1} (PD-L1 \geq 50%)	Pembro P併用療法	154	26.3	0.62 (0.48-0.81)	7.7	0.50 (0.39-0.65)
				151	13.4			
KEYNOTE 042 (5年)	第III相 試験	非小細胞肺癌 ^{※1} (PD-L1 \geq 1%)	Pembro P併用療法	637 637	16.4 12.1	0.79 (0.70-0.89)	5.6 6.8	1.03 (0.91-1.16)
IMpower 110 (2021)	第III相 試験	非小細胞肺癌 ^{※1} (PD- L1 TC3 or IC3)	Atezo P併用療法	107 98	20.2 14.7	0.76 (0.54-1.09)	8.2 5.0	0.59 (0.43-0.81)
KEYNOTE 189 (5年)	第III相 試験	非扁平上皮 非小細胞肺癌 ^{※1} (All comers)	P併用 + Pembro P併用 + Placebo	410	22.0	0.60 (0.50-0.72)	9.0	0.50 (0.42-0.60)
				206	10.6		4.9	
KEYNOTE 407 (5年)	第III相 試験	扁平上皮 非小細胞肺癌 (All comers)	P併用 + Pembro P併用 + Placebo	278	17.2	0.71 (0.59-0.85)	8.0	0.62 (0.52-0.74)
				281	11.6		5.1	
IMpower 150 (2021)	第III相 試験	非扁平上皮 非小細胞肺癌 ^{※1} (All comers)	P併用 + Atezo P併用	356	19.5	0.80 (0.67-0.95)	8.4	0.57 (0.48-0.67)
				336	14.7		6.8	
IMpower 130	第III相 試験	非扁平上皮 非小細胞肺癌 ^{※1} (All comers)	P併用 + Atezo P併用	451	18.6	0.79 (0.64-0.98)	7.0	0.64 (0.54-0.77)
				228	13.9		5.5	
IMpower 132	第III相 試験	非扁平上皮 非小細胞肺癌 ^{※1} (All comers)	P併用 + Atezo P併用	292	17.5	0.86 (0.71-1.06)	7.6	0.60 (0.49-0.72)
				286	13.6		5.2	
TASUKI-52	第III相 試験	非扁平上皮 非小細胞肺癌 ^{※1} (All comers)	P併用+Nivo P併用	275	25.4	0.85 (0.63-1.14)	12.1	0.56 (0.43-0.71)
				275	24.7		8.1	
CheckMate 227	第III相 試験	非小細胞肺癌 ^{※1} (PD-L1 < 1%)	Nivo+Ipi P併用+Nivo P併用	187	17.4	0.65 ^{※2} (0.52-0.81)	5.1	0.75 ^{※2} (0.59-0.95)
				117	15.2		0.80 ^{※2} (0.64-1.00)	
		186	12.2	4.7				
		非小細胞肺癌 ^{※1} (PD-L1 \geq 1%)	Nivo+Ipi P併用	396	17.1	0.77 (0.66-0.91)	5.1	0.79 (0.67-0.94)
397	14.9			5.6				
CheckMate 9 LA	第III相 試験	非小細胞肺癌 ^{※1} (All comers)	P併用+Nivo + Ipi P併用	361	15.6	0.66 (0.55-0.80)		
				358	10.9			
POSEIDON	第III相 試験	非小細胞肺癌 ^{※1} (All comers)	P併用 +Durva+Treme P併用	338	14.0	0.77 (0.62-0.92)	6.2	0.72 (0.60-0.86)
				337	11.7		4.8	

OS : 全生存期間、PFS : 無増悪生存期間、HR : ハザード比、Placebo : プラセボ、CI : 信頼区間

Pembro : ペムブロリズマブ、Atezo : アテゾリズマブ、P : プラチナ製剤、Nivo : ニボルマブ、Ipi : イピリムマブ、Durva : デュルバルマブ、Treme : トレメリムマブ

※1 EGFR 遺伝子変異又は ALK 融合遺伝子陽性の患者は除かれた

※2 プラチナ併用化学療法に対する HR

4. 進行非小細胞肺癌（セカンドライン以降）（表 5）

既治療の進行非小細胞肺癌を対象として、単剤免疫チェックポイント阻害薬の効果をドセタキセルと比較する臨床試験が各薬剤について行われた。ニボルマブは PD-L1 発現で選択せずに扁平上皮癌（CheckMate017）と非扁平上皮癌（CheckMate057）の2試験に分けて、ペムプロリズマブは、PD-L1 TPS \geq 1%に絞って（KEYNOTE-010）、アテゾリズマブは PD-L1 発現でも組織型でも対象を絞らずに（OAK）試験が行われ、いずれも生存期間の有意な延長を示した(30-33) (34) (35) (36)。ペムプロリズマブは PD-L1 TPS \geq 1%に限って、ニボルマブ、アテゾリズマブは PD-L1 にかかわらず単剤での使用が承認されている。

5. 進展型小細胞肺癌（表 6）

進展型小細胞肺癌を対象として、カルボプラチン、エトポシドへのアテゾリズマブの追加効果を検討した試験（IMpower133）で生存期間の有意な延長が示され、承認

された(37)。デュルバルマブを用いた試験（CASPIAN）でもシスプラチンもしくはカルボプラチン、エトポシドへのの上乗せ効果が検討され、生存期間の有意な延長が示され承認された(38) (39)。

（3）PD-L1 発現の診断

既治療非小細胞肺癌に対する免疫チェックポイント阻害薬単剤治療では、約 20%の患者に効果がみられる。効果を予測するバイオマーカーの検討が多数行われているが、確立したものは存在しない。PD-L1 発現については、各薬剤の開発段階から患者選択に用いられており、発現が高いほうが奏効が低い、もしくは発現がない場合よりも奏効する患者の割合が高くなることが示されている（表 7、8、10、11）。しかし、PD-L1 の発現は空間的に不均一性があること、経時的に変化することが報告されている。さらに、各薬剤の開発においてはそれぞれ異なる抗体、評価法、閾値が用いられており、同一の抗体であっても他臓器腫瘍においては評価法が異なることがあるため注意を要する（表 1）。

表 5. 進行非小細胞肺癌のセカンドライン以降における試験

試験名 (Update)	試験の種類	対象 (PD-L1発現)	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	PFS (月)	HR for PFS (95% CI)
CheckMate 017 (5年)	第III相試験	扁平上皮癌 (All comers)	Nivo DTX	135	9.2	0.62 (0.48-0.79)	3.5	0.61 (0.47-0.80)
				137	6.0		2.6	
CheckMate 057 (5年)	第III相試験	非扁平上皮癌 [※] (All comers)	Nivo DTX	292	12.2	0.70 (0.58-0.83)	2.3	0.90 (0.75-1.08)
				290	9.5		4.4	
KEYNOTE 010 (5年)	第II/III相試験	非小細胞肺癌 [※] (PD-L1 \geq 1%)	Pembro2mg/kg DTX	344	10.4	0.71 (0.58-0.88)	3.9	0.88 (0.74-1.23)
OAK (2021)	第III相試験	非小細胞肺癌 [※] (All comers)	Atezo DTX	613	13.3	0.78 (0.68-0.89)	2.8	0.95 (0.82-1.10)
				612	9.8		4.0	

OS : 全生存期間、PFS : 無増悪生存期間、HR : ハザード比、Placebo : プラセボ、CI : 信頼区間

Nivo : ニボルマブ、Pembro : ペムプロリズマブ、Atezo : アテゾリズマブ、DTX : ドセタキセル

※ EGFR 遺伝子変異又は ALK 融合遺伝子陽性の患者はそれぞれに対応する阻害薬の治療歴がある患者に限られた

表 6. 進展型小細胞肺癌に対する試験

試験名 (Update)	試験の種類	対象 (PD-L1発現)	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	PFS (月)	HR for PFS (95% CI)
IMpower 133	第III相試験	進展型小細胞肺癌 (All comers)	P 併用 + Atezo P 併用 + Placebo	201	12.3	0.70 (0.54-0.91)	5.2	0.77 (0.62-0.96)
				202	10.3		4.3	
CASPIAN (3年)	第III相試験	進展型小細胞肺癌 (All comers)	P + ETP + Durva P + ETP	268	12.9	0.75 (0.62-0.91)	5.1	0.80 (0.66-0.96)
				269	10.5		5.4	

OS : 全生存期間、PFS : 無増悪生存期間、HR : ハザード比、Placebo : プラセボ、CI : 信頼区間

P : プラチナ製剤、Atezo : アテゾリズマブ、ETP : エトポシド、Durva : デュルバルマブ

表 7. PD-L1 免疫染色に適した検体処理の条件

要素	最適な条件
検体の種類	FFPE生検検体、切除検体、（セルブロック）
スライド作成	3-5µm に薄切し陽性荷電したスライドもしくは “adhesive coated slides” に載せる
寒冷虚血時間	30 分以内
固定液	10% 中性緩衝ホルマリン（SP263 では亜鉛ホルマリン固定液も使用可）
固定液の量	サンプル量の 10 倍
固定時間	生検検体・セルブロックでは 6-48 時間、切除検体では 24-48 時間（72 時間まで許容）
未染色スライドでの保管期間	2 カ月（2-8℃では最長 12 カ月）
パラフィンブロックでの保管期間	3 年（5 年までは許容）
保管条件	2-8℃（室温は許容）、遮光、熱・高湿度を避ける

これらは理想的な条件であり、それぞれの検査室で検証しうるものである。
FFPE, Formalin fixed paraffin embedded、ホルマリン固定パラフィン包埋

PD-L1 発現の染色性に影響する技術的な要因として、検体採取から固定液に入れるまでの時間（寒冷虚血時間、cold ischemia time [CIT]）、固定液の量と質、固定時間、保管条件、保管期間が挙げられている（表 7）。一般的な免疫組織化学的検索に適した標本管理が重要である。サンプル量の 10 倍以上の 10%中性緩衝ホルマリンを用い、採取後速やかに固定を始め、6-48 時間後に包埋処理を行う。薄切後長く室温で保存されていた未染色切片では発現が著しく低下して見える場合があり、偽陰性の要因となるため薄切後は 2 か月以内に染色を行うことが推奨される（40）。従来、K-CX®等の強酸系脱灰剤で処理された組織における免疫染色は推奨されていないが、最近の 22C3 抗体を使用した研究では、小石灰化物に用いられるエチレンジアミン四酢酸（EDTA）による脱灰処理で、他の部位から採取した検体と比較して PD-L1 の染色性に有意な差がなかったことが報告されている（41）。骨転移巣からの針生検では脱灰処理をせず薄切可能である場合もあり、検体の状況を見極める必要がある。胸水などの体腔液セルプロ

ック検体や、穿刺細胞診からのセルブロック検体を用いた検査に関しては、組織検体との比較検討が精力的に行われ、一定の一致率を見てはいるものの（42, 43）、これまでの臨床試験では使用されておらず、組織標本の代替可能性についてはこれからの動向を見極める必要がある。

各抗体について概略を述べる。肺癌においてコンパニオン診断薬として承認された PD-L1 検査は依然としてペムブロリズマブ単剤投与に対する Dako 22C3 のみであり、その他の抗体は診療の参考とするためのコンプレメンタリー診断薬¹として承認されている。現在は製薬会社も含め、それぞれウェブ上に e-learning サイトが存在し、判定を行う際の有用な学習ツールとして用いることができる。サイトのまとめを追補にまとめた。

1. 22C3 抗体を用いた PD-L1 IHC 検査

本検査は、ペムブロリズマブの臨床試験において用いられた検査である。当初ペムブロリズマブ単剤療法は、ファーストラインでは KEYNOTE-024 の試験結果をもとに

¹コンプレメンタリー診断薬とは、CheckMate 017 試験の結果を受けて PD-L1 IHC 28-8 PharmDx に初めて与えられた診断薬カテゴリーであり、この臨床試験の結果によれば、この診断テストによる患者選択を行わなくともニボルマブの効果は期待できるが、患者選択を行えばより高い臨床的利益が得られる。このように、対象となる薬剤を投与するのに必須ではないが臨床的に有用な情報を与える診断テストが該当する。本邦ではこのカテゴリーがないために、体外診断薬として扱われる。これに対して、コンパニオン診断薬においては、診断テストによる患者選択が薬剤投与に対して必須となる点が異なる。

PD-L1 TPS \geq 50%に対して承認され、セカンドライン以降では KEYNOTE-010 の結果をもとに PD-L1 TPS \geq 1% に対して承認された。現在は、KEYNOTE-042 の結果をもとに、保険承認はファーストラインにおいても、PD-L1 TPS \geq 1%に拡大された。肺癌診療ガイドラインにおいては 50%以上の場合のみ単剤療法が推奨されている。化学療法併用においては PD-L1 発現に関わらずペムブロリズマブ使用が承認されている。肺癌においては TPS を用いるが、肺癌以外では CPS (Combined Positive Score、CPS = (PD-L1 を発現した腫瘍細胞、リンパ球及びマクロファージ) / 総腫瘍細胞数 \times 100) が用いられる。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Dako (以下 22C3 キット) がペムブロリズマブのコンパニオン診断薬として承認されている。22C3 キットは PD-L1 の細胞外ドメインを認識する抗 PD-L1 マウスモノクローナル抗体を一次抗体として用いており、自動免疫染色機 (Dako Autostainer Link 48) の専用試薬であり、この染色機での検査が必須である (Code No. SK006)。非小細胞肺癌に対しては、次世代染色プラットフォーム Dako Omnis 用のキット (Code No. GE006) も使用可能となった。診断キットを適正に用い、その使用方法や手技に習熟することで、技術的な要因による結果のばらつきを最小化し、精度を高めることが重要である。PD-L1 22C3 免疫染色に関しては、2017 年に日本病理学会より「進行肺癌に対する PD-L1 免疫染色についての留意事項について、(その 2)」が発表されており(44)、1. ペムブロリズマブに対する効果予測は PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」で行うこと、および 2. PD-L1 22C3 IHC の報告には、少なくとも 3 段階の発現判定結果を明記すること、が述べられている。

■免疫染色判定法

- ① 評価のためには 100 個以上の Viable な腫瘍細胞が必要とされており、まず HE 標本にて十分な腫瘍細胞が含まれていることを確認する必要がある。
- ② キット同梱の細胞株陽性コントロールスライドで細胞膜染色強度 2+ の腫瘍細胞が 70% 以上であること、陰性コントロールスライドで陽性細胞が 10 個以下であること、かついずれもバックグラウンドの染色強度が 1+ 未満であることを確認し、試薬の適切性を判定する。
- ③ 陽性コントロール組織を組織標準として用い、組織切片が適切に作製され、試薬が反応していることの確認を行う。陽性コントロールとしては扁桃上皮が含まれた扁桃組織もしくは胎盤組織 (図 1) を用いることができる。
- ④ 対象腫瘍細胞の細胞膜における染色性を評価の対象とし、tumor proportion score (TPS, 全腫瘍細胞に対して PD-L1 陽性細胞が占める割合) を指標として用いる。染色強度や細胞膜の染色が部分的か全周性かに関わらず、わずかでも染色されていれば陽性と判定する。TPS < 1% を陰性、1-49% を陽性 (低発現、図 2)、 \geq 50% を陽性 (高発現、図 3) と定義している。治療ラインに関わらず、TPS \geq 1% がペムブロリズマブ単剤の治療対象と判定される。PD-L1 はリンパ球やマクロファージなどにも陽性となるため、腫瘍細胞とこれらの免疫関連細胞が混在する症例では疑陽性となる可能性があり注意が必要である。細胞の形態を注意深く観察し、明確に区別することが重要である。

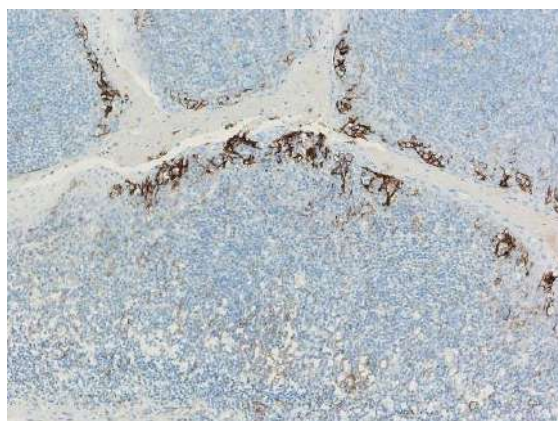
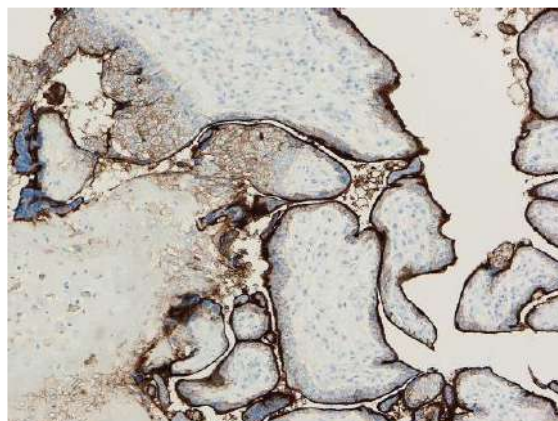


図 1. 正常組織 (左: 扁桃上皮、右: 胎盤組織) における PD-L1 発現



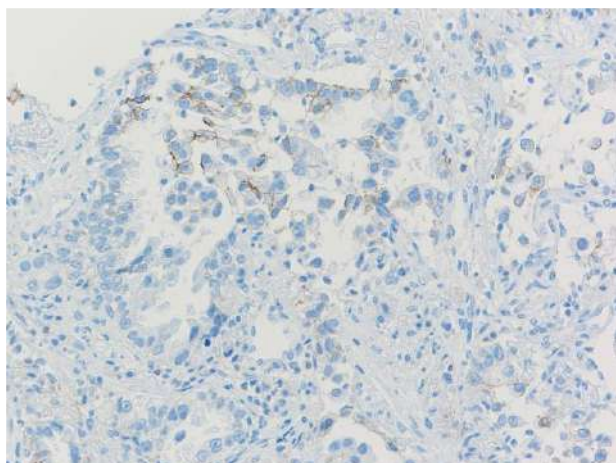


図2. PD-L1 IHC 22C3 1-49%例. TPS 10%程度であり、ペムブロリズマブ単剤治療の適応あり。

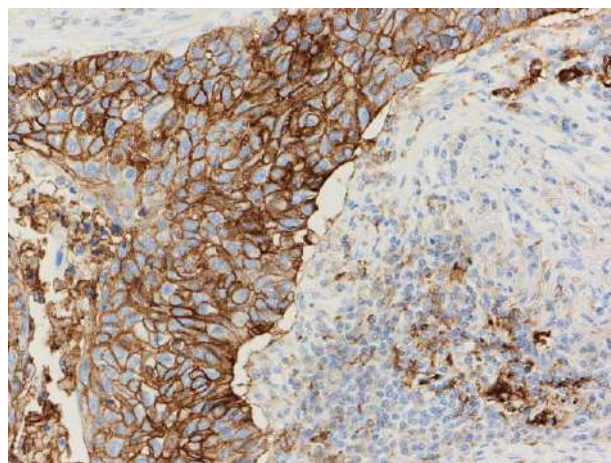


図3. PD-L1 IHC 22C3 ≥ 50%例. 免疫細胞はTPS には含まない。

表7. 22C3 で層別化された試験

試験名 (Update)	試験の種類	対象	カットオフ	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	PFS (月)	HR for PFS (95% CI)
KEYNOTE 010 (5年)	第II/III相試験	非小細胞肺癌	≥ 1%	Pembro DTX	690 343	11.8 8.4	0.70 (0.61-0.80)	4.0 4.1	0.84 (0.73-0.96)
			≥ 50%	Pembro DTX	290 152	16.9 8.2	0.55 (0.44-0.69)	5.3 4.2	0.57 (0.46-0.71)
KEYNOTE 024	第III相試験	非小細胞肺癌	≥ 50%	Pembro P 併用	154 151	30.0 14.2	0.63 (0.47-0.86)	10.3 6.0	0.50 (0.37-0.68)
KEYNOTE 042 (5年)	第III相試験	非小細胞肺癌	≥ 1%	Pembro P 併用	637 637	16.4 12.1	0.79 (0.70-0.89)	5.6 6.8	1.03 (1.03-1.16)
			1-49%	Pembro P 併用	338 337	13.4 12.1	0.88 (0.75-1.04)		
			≥ 50%	Pembro P 併用	299 300	20.0 12.2	0.68 (0.57-0.81)	6.5 6.5	0.86 (0.72-1.02)
KEYNOTE 189 (5年)	第III相試験	非扁平上皮非小細胞肺癌	< 1%	P併用 + Pembro P併用 + Placebo	127 63	17.2 10.2	0.55 (0.39-0.76)	6.2 5.1	0.67 (0.49-0.92)
			1-49%	P併用 + Pembro P併用 + Placebo	128 58	21.8 12.1	0.65 (0.46-0.90)	9.4 4.9	0.57 (0.41-0.80)
			≥ 50%	P併用 + Pembro P併用 + Placebo	132 70	27.7 10.1	0.68 (0.49-0.96)	11.3 4.8	0.35 (0.25-0.49)
KEYNOTE 407 (5年)	第III相試験	扁平上皮非小細胞肺癌	< 1%	P併用 + Pembro P併用 + Placebo	95 99	15.0 11.0	0.83 (0.61-1.13)	6.3 5.9	0.70 (0.52-0.95)
			1-49%	P併用 + Pembro P併用 + Placebo	103 104	18.0 13.1	0.61 (0.45-0.83)	8.2 6.0	0.60 (0.45-0.81)
			≥ 50%	P併用 + Pembro P併用 + Placebo	73 73	19.9 11.5	0.68 (0.47-0.97)	8.3 4.2	0.48 (0.33-0.69)

OS : 全生存期間、PFS : 無増悪生存期間、HR : ハザード比、Placebo : プラセボ、CI : 信頼区間、NR : 未到達
Pembro : ペムブロリズマブ、DTX : ドセタキセル、P : プラチナ製剤

2. 28-8 抗体を用いた PD-L1 IHC 検査

本検査は、ニボルマブの臨床試験において用いられた検査である。臨床試験においては、TPS 1%、5%、10% がカットオフとして用いられたが、扁平上皮癌を対象とした CheckMate 017 では PD-L1 発現に関わらず（PD-L1 TPS < 1% においても）ニボルマブによる生存期間の延長傾向が認められた。一方、非扁平上皮非小細胞肺癌を対象とした CheckMate 057 においては TPS < 1% の群において生存期間はドセタキセル群とほぼ同様であったため、最適使用推進ガイドラインにおいては TPS < 1% の場合には、原則、ドセタキセル等の投与を優先すると記載された（2023 年 11 月に改定された最適使用推進ガイドラインでは、記載されなくなった）。ニボルマブをアバスチン併用化学療法に上乗せした TASUKI-52 では、PD-L1 別の PFS が報告されており PD-L1 発現によらずニボルマブ上乗せの効果が示された。術前化学療法へのニボルマブの上乗せを検討した CheckMate816 においては、PD-L1 発現が高いほど DFS が延長することが示された。

28-8 抗体は、米国では、ニボルマブ効果予測のための補助的な検査（コンプレメンタリー診断薬）として承認されている。本邦においては PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, Dako はニボルマブの体外診断薬と明記されて認可されているが、ニボルマブの添付文書上 PD-L1 28-8 免疫染色による患者選択は必要とされていないので、米国同様のコンプレメンタリー診断薬の位置付けとなる。28-8 IHC 検査キットは PD-L1 の細胞外ドメインを認識する抗 PD-L1 ラビットモノクローナル抗体を一次抗体として用いており、自動免疫染色機（Dako Autostainer Link 48）専用試薬であるため、この染色機での染色することで保険承認されている。

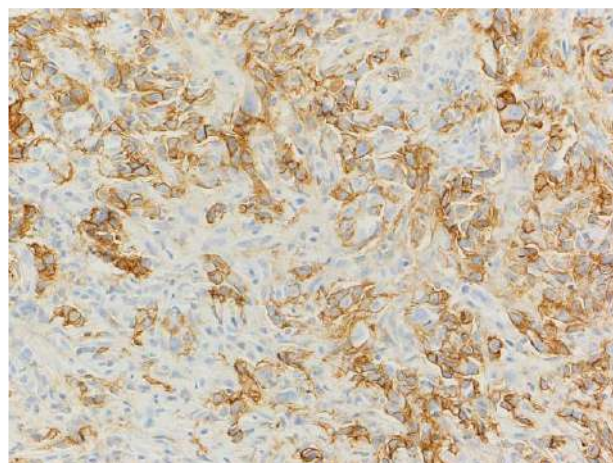


図4. PD-L1 IHC 28-8 TP > 10%であり、ニボルマブ単剤による一定の治療効果が期待できる。

■免疫染色判定法

- ① PD-L1 28-8 免疫染色でも同様に、PD-L1 22C3 免疫染色の①-③の操作（6 ページ参照）を行う。ただし、②については 28-8 ではキット同梱の陽性細胞株で細胞膜染色強度 2+の腫瘍細胞が 80%以上である確認が必要である。
- ② そののち、腫瘍細胞の細胞膜における染色性を評価し、その染色強度や染色範囲に関わらず、わずかでも染色されていれば陽性と判定する。TPS < 1%、 $\geq 1\%$ 、 $\geq 5\%$ 、 $\geq 10\%$ で評価を行う（図4）が、前述のようにニボルマブの投与の可否は TPS によって規定されず、TPS はあくまで非扁平上皮癌における効果予測の参考として用いられる。

表 8. 28-8 抗体で層別化された試験

試験名 (Update)	試験の 種類	対象	カット オフ	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	PFS (月)	HR for PFS (95% CI)
CheckMate 057	第III相 試験	非扁平上皮癌	< 1%	Nivo DTX	108 101	10.5 10.1	0.90 (0.66-1.24)	2.1 3.6	1.19 (0.88-1.61)
			≥ 1%	Nivo DTX	123 123	17.7 9.0	0.59 (0.43-0.82)	4.2 4.5	0.70 (0.53-0.94)
			≥ 5%	Nivo DTX	95 86	19.4 8.1	0.43 (0.30-0.63)	5.0 3.8	0.54 (0.39-0.76)
			≥ 10%	Nivo DTX	86 79	19.9 8.0	0.40 (0.26-0.59)	5.0 3.7	0.52 (0.37-0.75)
CheckMate 026	第III相 試験	非小細胞肺癌	≥ 5%	Nivo DTX	211 212	14.4 13.2	1.03 (0.81-1.32)	4.2 5.9	1.18 (0.94-1.49)
			≥ 50%	Nivo DTX	88 126		0.90 (0.63-1.29)		1.07 (0.77-1.49)
CheckMate 026と057 統合 (5年)	第III相	非小細胞肺癌	≥ 1%	Nivo DTX	185 179	13.4 8.5	0.61 (0.49-0.7)	3.8 3.6	0.66 (0.53-0.84)
			< 1%	Nivo DTX	163 153	9.7 7.8	0.76 (0.61-0.96)	2.1 3.5	0.99 (0.78-1.26)
TASUKI-51	第III相	非扁平上皮癌	< 1% 又は不明	P併用+Nivo P併用	120 120			13.6 8.4	0.55 (0.38-0.78)
			1-49%	P併用+Nivo P併用	82 81			11.0 8.4	0.63 (0.42-0.96)
			≥ 50%	P併用+Nivo P併用	73 74			9.9 6.9	0.55 (0.36-0.83)
CheckMate 227 (5年)	第III相	非小細胞肺癌	< 1%	Nivo+Ipi P併用	187 186	17.4 12.2	0.65 (0.52-0.81)	5.1 4.7	0.75 (0.59-0.95)
			≥ 1%	Nivo+Ipi P併用	396 397	17.1 14.9	0.77 (0.66-0.91)	5.1 5.6	0.79 (0.67-0.94)
CheckMate 9LA (3年)	第III相	非小細胞肺癌	< 1%	P併用+Nivo+Ipi P併用	135 129	17.7 9.8	0.67 (0.51-0.88)	5.8 5.0	0.69 (0.52-0.91)
			1-49%	P併用+Nivo+Ipi P併用	128 106	15.2 10.4	0.70 (0.53-0.93)	> 1% 9LA vs P併用 例数 204 vs 204 PFS 6.9 vs 4.7 HR 0.71 (0.57-0.88)	
			≥ 50%	P併用+Nivo+Ipi P併用	76 98	18.9 12.9	0.75 (0.53-1.07)		
CheckMate 816	第III相	非小細胞肺癌	< 1%	P-併用+NIVO P-併用	78 77			(EFS) 25.1 18.4	(EFS) 0.85 (0.41-1.32)
			1-49%	P-併用+NIVO P-併用	51 47			NR 26.7	0.58 (0.30-1.12)
			≥ 50%	P-併用+NIVO P-併用	38 42			NR 19.6	0.24 (0.10-0.61)

OS : 全生存期間、PFS : 無増悪生存期間、HR : ハザード比、Placebo : プラセボ、CI : 信頼区間、NR : 未到達
Nivo : ニボルマブ、DTX : ドセタキセル、P : プラチナ製剤、Ipi : イピリムマブ、EFS : 無イベント生存期間

3. SP142 抗体を用いた PD-L1 IHC 検査

主に、アテゾリズマブの臨床試験において用いられる検査である。既治療進行非小細胞肺癌患者へのアテゾリズマブ単剤投与の適応を判断するための体外診断薬として承認されていたが、IMpower 110 の結果を受けて、未治療進行非小細胞肺癌患者へのアテゾリズマブ単剤投与の適応を判断するためのコンパニオン診断薬となった。一次抗体として抗 PD-L1 ウサギモノクローナル抗体（クローン SP142）を用い、ベンタナ ベンチマーク ULTRA 等の自動染色装置を用いて染色を行う。非小細胞肺癌における判定は、腫瘍細胞における PD-L1 発現率（TC）と腫瘍浸潤免疫細胞における PD-L1 発現率（IC）の両者の評価を行う。未治療の場合は、PD-L1 高発現、すなわち TC3 もしくは IC3 の場合（表 9 参照）にアテゾリズマブ単剤投与が可能である。非小細胞肺癌のセカンドライン以降ではアテゾリズマブ単剤投与は PD-L1 発現に関わらず承認されている。一方、最適使用推進ガイドラインにおいては、OAK 試験の扁平上皮癌の患者では、TC0 かつ IC0 群においてドセタキセル群と比較した際の効果の大きさが小さ

い傾向があるとの判断で、PD-L1 発現率を確認したうえで投与の可否を判断することが望ましいと記載されている。その際に、SP142 抗体での再検査が困難な場合には、22C3 による結果を参照できると記載されている。術後補助治療としてのアテゾリズマブ単剤投与を検討した IMpower 010 試験では、層別化因子として SP142 が用いたれたが、主要解析は SP263 による PD-L1 が用いられたため SP263 がコンパニオン診断薬となった。

■免疫染色判定法

- ① まず HE 標本にて十分な腫瘍細胞が含まれていることを確認する。
- ② 精度管理用コントロールスライド及び試薬対象スライドの染色に問題がないことを確認する。
- ③ 腫瘍細胞全体に対して、染色強度にかかわらず細胞膜に茶褐色の染色が認められる腫瘍細胞の割合を算出し、腫瘍細胞における PD-L1 発現率（TC）を測定する（表 9）。また、腫瘍領域に対して、染色強度にかかわらず茶褐色の染色が認められる腫瘍浸潤免疫細胞（腫瘍組織

表 9. SP142 を用いる場合の評価基準(45)

腫瘍細胞における PD-L1 発現率（TC）	スコア
腫瘍細胞全体に対して、染色強度に関係なく、細胞膜に PD-L1 による陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合が 50%以上を占める	TC3
腫瘍細胞全体に対して、染色強度に関係なく、細胞膜に PD-L1 による陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合が 5%以上 50%未満を占める	TC2
腫瘍細胞全体に対して、染色強度に関係なく、細胞膜に PD-L1 による陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合が 1%以上 5%未満を占める	TC1
腫瘍細胞全体に対して、細胞膜に PD-L1 の陽性反応が認められない 又は、染色強度に関係なく、細胞膜に PD-L1 による陽性反応が認められる腫瘍細胞が 1%未満を占める	TC0
腫瘍浸潤免疫細胞における PD-L1 発現率（IC）	スコア
腫瘍領域 [*] に対して、染色強度に関係なく、PDL1 による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞の割合が 10%以上を占める	IC3
腫瘍領域 [*] に対して、染色強度に関係なく、PDL1 による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞の割合が 5%以上 10%未満を占める	IC2
腫瘍領域 [*] に対して、染色強度に関係なく、PDL1 による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞の割合が 1%以上5%未満を占める	IC1
腫瘍領域 [*] に対して、PD-L1 の陽性反応が認められない 又は、染色強度に関係なく、PD-L1 による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞が 1%未満を占める	IC0

腫瘍領域：壊死していない腫瘍細胞および腫瘍細胞間に存在する腫瘍内間質と腫瘍の周囲に存在する腫瘍周囲間質により占められている領域

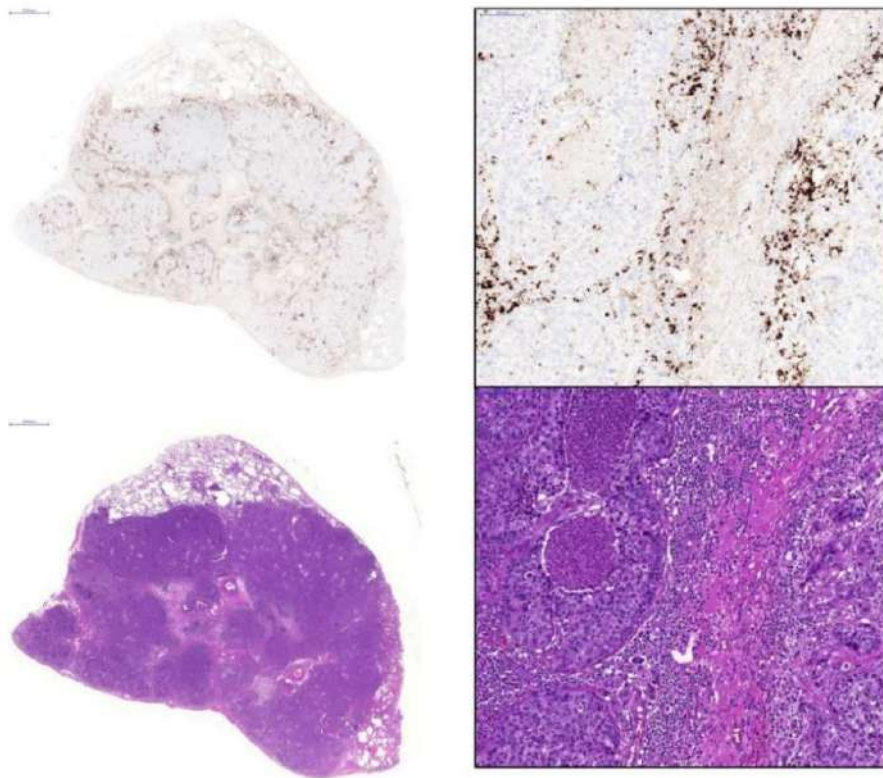


図5. PD-L1 SP142 による扁平上皮癌の免疫染色. 腫瘍細胞は陰性だが、腫瘍巣を取り囲むように浸潤するリンパ球に陽性像を認め、IC3と評価される。

内及び腫瘍組織の辺縁部に局在する免疫細胞)の割合を算出し、腫瘍浸潤免疫細胞におけるPD-L1発現率(IC)を測定する。なお、腫瘍領域以外の免疫細胞にもPD-L1陽性となる可能性があるが、判定対象とはしない(図5)。

④注意. 腫瘍細胞における細胞質染色については評価対

象から除外する。正常粘液細胞や壊死部分においてもバックグラウンド染色が認められることがあり、これらの反応も判定対象から除外する。タンパク質又は基質反応生成物の非免疫学的結合のために、偽陽性結果を示す場合があるので組織像との対比が必要である。

表 10. SP142 で層別化された試験

試験名 (Update)	試験の 種類	対象	カットオフ	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	PFS (月)	HR for PFS (95% CI)
OAK (OSのみ 2021)	第III相 試験	非小細胞肺癌	TC3 or IC3	Atezo DTX	89 85	20.5 9.7	0.50 (0.36-0.71)	4.2 3.3	0.63
			TC2/3 or IC2/3	Atezo DTX	168 182	16.6 11.4	0.69 (0.54-0.87)	4.1 3.6	0.76
			TC1/2/3 or IC1/2/3	Atezo DTX	347 337	14.3 10.8	0.78 (0.66-0.93)	2.8 4.1	0.91
			TC0 and IC0	Atezo DTX	260 271	11.8 8.9	0.78 (0.65-0.94)	2.6 4.0	1.00
IMpower 110 (2021)	第III相 試験	非小細胞肺癌	TC3 or IC3	Atezo P 併用療法	107 98	20.2 14.7	0.76 (0.54-1.09)	8.2 5.0	0.59 (0.43-0.81)
			TC2/3 or IC2/3	Atezo P 併用療法	166 162	19.9 16.1	0.87 (0.66-1.14)	7.3 5.5	0.64 (0.50-0.82)
			TC1/2/3 or IC1/2/3	Atezo P 併用療法	277 277	18.9 14.7	0.85 (0.69-1.04)	5.8 5.6	0.72 (0.60-0.86)
IMpower 150 (2021)	第III相 試験	非扁平上皮 非小細胞肺癌	TC3 or IC3	ABCP BCP	71 65	30.0 15.0	0.70 (0.46-1.08)	15.2 6.8	0.34 (0.23-0.50)
			TC1/2/3 or IC1/2/3	ABCP BCP	192 165	22.5 16.0	0.73 (0.57-0.94)	11.1 6.8	0.47 (0.38-0.60)
			TC0 and IC0	ABCP BCP	167 173	16.9 14.1	0.90 (0.71-1.14)	7.2 6.9	0.71 (0.57-0.89)
IMpower 130	第III相 試験	非扁平上皮 非小細胞肺癌	TC3 or IC3	P 併用 + Atezo P 併用	88 42	17.3 16.9	0.84 (0.51-1.39)	6.4 4.6	0.51 (0.34-0.77)
			TC1/2 or TC1/2	P 併用 + Atezo P 併用	128 65	23.7 15.9	0.70 (0.45-1.08)	8.3 6.0	0.61 (0.43-0.85)
			TC0 and IC0	P 併用 + Atezo P 併用	235 121	15.2 12.0	0.81 (0.61-1.08)	6.2 4.7	0.72 (0.56-0.91)
IMpower 132	第III相 試験	非扁平上皮 非小細胞肺癌	TC3 or IC3	P 併用 + Atezo P 併用	25 20			10.8 6.5	0.46 (0.22-0.96)
			TC1/2 or TC1/2	P 併用 + Atezo P 併用	63 73			6.2 5.7	0.80 (0.56-1.16)
			TC0 and IC0	P 併用 + Atezo P 併用	88 75			8.5 4.9	0.45 (0.31-0.64)

OS : 全生存期間、PFS : 無増悪生存期間、HR : ハザード比、Placebo : プラセボ、CI : 信頼区間

Atezo : アテゾリズマブ、DTX : ドセタキセル、P : プラチナ製剤、ABCP : カルボプラチン+パクリタキセル+アバスチン+アテゾリズマブ、BCP : カルボプラチン+パクリタキセル+アバスチン

4. SP263 抗体を用いた PD-L1 IHC 検査

主に、デュルバルマブの臨床試験において用いられる検査であり、デュルバルマブの投与可否を判断するにあたって用いる体外診断用医薬品として承認されていたが、IMpower 010 の結果を受けて術後補助治療としてのアテゾリズマブ単剤の適用を判定するためのコンパニオン診断薬となった。一次抗体として抗 PD-L1 ウサギモノクロー

ナル抗体 (クローン SP263) を用い、ベンタナ ベンチマーク ULTRA 等の自動染色装置を用いて染色を行う。腫瘍細胞における PD-L1 発現率の評価を行う (TC)。術後補助治療のアテゾリズマブ単剤は、TC1%以上が適用となる。同等性が複数の試験 (4.5.3 抗体間のハーモナイゼーションを参照) で示されていることから、最適使用推進ガイドラインでは 22C3 の結果を代用可能であると述べられている。

表 11. SP263 で層別化された試験

試験名 (Update)	試験の種類	対象	カット オフ	治療薬	例数	OS (月)	HR for OS (95% CI)	PFS (月)	HR for PFS (95% CI)
PACIFIC (4年)	第III相 試験	切除不能III期非小細胞肺癌、化学放射線療法後増悪なし	≥ 1%	Durva Placebo	212 91	57.4 29.6	0.60 (0.43-0.84)	23.9 5.6	0.49 (0.36-0.66)
			< 1%	Durva Placebo	90 58	33.9 43.0	1.05 (0.69-1.62)	10.7 5.6	0.79 (0.53-1.19)
			不明	Durva Placebo	174 88	44.2 23.5	0.67 (0.48-0.92)	15.6 6.0	0.58 (0.43-0.80)
IMpower 010	第III相 試験	術後非小細胞肺癌 主要評価は病期II- IIIA(AJCC 7版)	≥ 50%	Atezo BSC	115 114	NE NE	0.43 (0.24-0.78)	NE* 35.7	0.43* (0.27-0.68)
			1-49%	Atezo BSC	133 114	NE NE	0.95 (0.59-1.54)	32.8* 31.4	0.87* (0.60-1.23)
			< 1%	Atezo BSC	181 202	NE NE	1.36 (0.93-1.99)		

OS : 全生存期間、PFS : 無増悪生存期間、HR : ハザード比、Placebo : プラセボ、CI : 信頼区間
Durva : デュルバルマブ、Atezo : アテゾリズマブ、BSC : 最良の対症療法
※DFS : 無病生存期間

■免疫染色判定法

- ① まず HE 標本にて十分な腫瘍細胞が含まれていることを確認する。
- ② 精度管理用(陽性)コントロールスライド及び試薬対象(陰性コントロール)スライドの染色に問題がないことを確認する。
- ③ 腫瘍細胞全体に対して、染色強度にかかわらず(ただし、試薬対照スライドの背景染色よりも強い染色強度)細胞膜に茶褐色の陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合を算出し、腫瘍細胞における PD-L1 発現率(TC)とする。

5. PD-L1 測定における課題

PD-L1 の評価において、空間的、時間的な Heterogeneity が存在することが報告されている。また、治療介入により発現が変化することも報告されており結果の解釈に注意を要する。治療方針を決定する際には、PD-L1 測定に用いた検体の種類と質、検体を採取したタイミングなどを考慮したうえで、PD-L1 発現を治療選択の参考に用いる必要がある。

5-1. 検体による PD-L1 発現の相違

生検標本と手術標本の比較: SP142 を用いて 160 人の

手術標本と対応する生検標本の PD-L1 発現を TC と IC の両者を評価して比較検討した報告では、手術標本と生検標本での一致率は 52% と低かった(46)。生検標本での PD-L1 発現が低く評価されていた。22C3 と SP124、SP263 をそれぞれ 26 人、20 人、46 人の手術標本と生検標本で評価比較した報告では、カットオフ 1% と 50% での一致率は、22C3 で 96% と 73%、SP142 で 70% と 80%、SP263 で 91% と 80% と比較的良好的な一致率であった(47)。

細胞診標本と組織標本の比較: 細胞診標本と組織標本の PD-L1 発現を比較検討した報告は複数あり、システムティックレビューが行われている。細胞診標本の 92.0% で PD-L1 発現の評価が可能であり、PD-L1、50% もしくは 1% をカットオフとしたときの一致率はそれぞれ 89.7% と 88.3% であり、細胞診標本が組織標本よりも PD-L1 発現の検討において劣っていることはない結論付けられている(43)。細胞診標本が生検標本よりも有用である可能性が指摘されている。穿刺吸引細胞診では、穿刺時に前後に、さらに扇状に穿刺することで生検標本よりも広い範囲の腫瘍を反映しうる可能性があり、体腔液や肺胞洗浄液は生検とは違う部位の状態を反映することで腫瘍の不均一性に対応することが可能かもしれない。一方、注意点として検体が小さいため十分な腫瘍細胞があることを確認しなければならず、腫瘍細胞がマクロファージと類似した大きさで核の多型に乏しい場合にはマクロファ

ージは PD-L1 で染色されるため注意を要する。さらに、免疫細胞についての評価は組織検体と同様にはできないとされている。

病巣の部位による比較: 原発巣と遠隔転移巣、リンパ節転移巣での PD-L1 の一致率は 67% から 90% と報告されている(48)。これらの違いの原因は評価対象の PD-L1 発現が異なる可能性のほか、PD-L1 の評価法、カットオフ値、検体採取の時期の違いなどが考えられる。

5-2. 治療介入による PD-L1 発現の変化

PD-L1 の発現は様々な治療介入の前後で変化することが報告されている(49)。術前化学療法を評価した試験において、PD-L1 発現は症例によって増加、減少または維持されており、PD-L1 発現が増加する群では予後が不良であった(50)。EGFR-TKI 治療前後での PD-L1 の発現については、増加するという報告がある一方、変化しないとの報告もある(51) (52)。

5-3. 抗体間のハーモナイゼーション

PD-L1 発現に応じて免疫チェックポイント阻害薬の使用を検討する場合に、それぞれ対応する抗体によって PD-L1 発現を検討することが最も正確であるが現実的ではない。進行非小細胞肺癌においては、複数の Driver mutation と同時に PD-L1 を測定することが推奨されており、この場合の PD-L1 はペムプロリズマブ単剤使用を検討することが目的であるため通常 22C3 によって評価される。したがって、以後の治療においても 22C3 による

PD-L1 発現の結果を基に治療戦略が検討されるため、各抗体間のハーモナイゼーションが重要である。承認されている 4 つの抗体 (22C3、28-8、SP142、SP263) の染色性能を比較した試験は複数報告されている(53) (42) (54)。SP142 は一貫して他の抗体と比較し TC、IC とも PD-L1 発現を検出する感度が低く、22C3 と 28-8 は良く一致し、一部の試験において SP263 が TC において 28-8、22C3 よりも感度が高かった (図 6)。ペムプロリズマブ以外の薬剤を用いた試験においても、後解析として 22C3 による PD-L1 発現別の効果を報告しているものもあり、これらのデータを総合して治療選択を行うことが重要である。一例として、術後アテゾリズマブ単剤に対するコンパニオン診断薬は SP263 であるが、最適使用推進ガイドラインにおいて 22C3 で置き換えることが可能と記載されている。IMpower010 の検体を用いて 22C3 と SP263 の両者を検討した結果が報告され、PD-L1 1%以上をカットオフとした場合の一致率は 82.6%、50%以上では一致率 91.8%であり、いずれの抗体を用いても術後アテゾリズマブの有効性が期待できる患者群を選択することが可能であるとされた(55)。

(4) 結果の報告

腫瘍の分子病理診断の標準的な報告と同様に、PD-L1 検査も解析前 (preanalytical)、解析 (analytic)、結果 (result)、および解釈/結論 (interpretation/conclusion) について以下の内容が記載されている必要がある。また、腫瘍細胞の同定には専門的な知識が必要であることから、結果は病理診断医によって評価され、記載される必要がある。

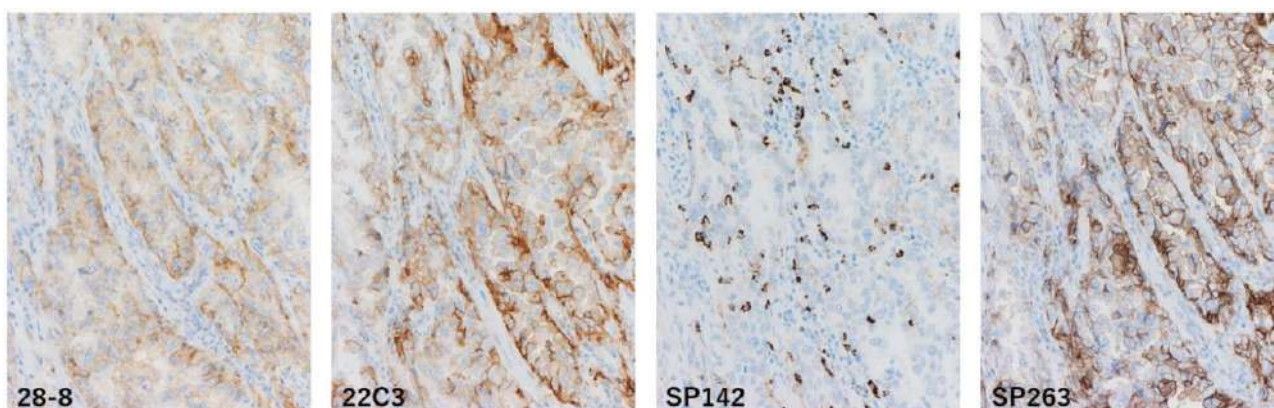


図 6. それぞれの抗体クローンによる PD-L1 免疫染色。同一腫瘍の同一部分を同時に染色した。22C3 を標準とすると 28-8 は同等もしくは少し弱め、SP142 は明らかに発現態度が異なる。SP263 は、ほぼ同等もしくは強い強度を示す。

1. 解析前セクション

患者情報、標本の種類および診断の概要が記載される必要がある。

標本の種類：切除標本、切開生検、生検組織（気管支/経気管支生検、針生検）提出組織：ホルマリン固定標本、骨を含む標本では脱灰の有無と方法(酸脱灰、EDTA 脱灰)、これらの未染標本（標本の種類を記載する）

標本作成時期：ブロック作成や薄切からの時間が結果に影響する可能性がある場合にはこれを記載する。

2. 解析セクション

検査方法：使用した抗体の種類やキットの名称、その概要や基本的な操作手順などが記載される。使用する抗体ごとに異なるため、評価対象細胞(腫瘍細胞、腫瘍浸潤免疫細胞)および判定方法を明確に記載する必要がある。また、それぞれのキットには使用期限もあり、施設内において十分なロット管理を行う必要がある。

3. 結果セクション

総合的な標本の適切性：キット同梱のコントロールスライドや施設内コントロールの染色結果。「検査に最適」あるいは「不適 (suboptimal)」の別。不適切であった場合はその理由を述べる。

■腫瘍細胞の評価

- 採取された検体中に、適正な評価のための十分量の腫

瘍細胞があるか否かを評価するため、切片内でのおよその腫瘍細胞数(< 100 個または ≥ 100)を記載する。

- 壊死やクラッシュ・アーチファクトを伴う細胞は評価対象外となるため、これが認められる場合にはその旨を記載する。

染色結果：陽性、陰性もしくは発現の程度(高発現/低発現)について、それぞれの検査法で定められた基準に基づいて結果の報告を行う。また、陽性/陰性の評価だけでなく、陽性細胞の割合を TPS(%)として記載する。とくに PD-L1 IHC 22C3 では IHC 28-8, SP142, SP263 の染色結果の代用として使用される場合があり、TPS として記載する必要がある。評価不能の場合には、その理由について説明する。

4. 解釈/結論

PD-L1 IHC の結果が免疫チェックポイント阻害薬の投与適応条件を満たすか否か、もしくはその治療効果が期待できるか否かについての臨床的解釈を説明する。評価不能であった場合には、他の標本を用いた再検査での検討の可能性についても記載するべきである。

5. 標準的な結果様式

PD-L1 IHC には複数の検査方法があり、それぞれ異なる意義を持つ。混乱を防ぐためにも PD-L1 IHC の標準記載様式を提示する。

標本番号： XXXX
 ID： XXXX 患者氏名： XXXX 年齢： 65 性別： 男性

依頼の目的： 再発肺癌に対するペムプロリズマブ治療の適応確認のため

検体の種類： 経気管支生検

提出組織： ホルマリン固定組織の未染標本（骨を含まず）

検体採取日：XXXX 年 X 月 X 日

固定時間：20 時間 ホルマリンの種類：10%中性緩衝ホルマリン

標本作成時期： 新鮮薄切標本

検査方法：

使用検査薬 Dako PD-L1 22C3 PharmDX (Lot # 10121104A, Exp. 2017-10-31)

染色 Dako Autostainer Link 48 を用い、検査説明書に基づき施行

染色標本の適切性：

- コントロール染色結果：
- 陽性コントロールで細胞膜染色強度 2+の腫瘍細胞が 70%以上
 - 陰性コントロールスライドで陽性細胞が 10 個以下
 - バックグラウンドの染色強度が 1+未満

腫瘍細胞数： 100 個以上

PD-L1 IHC 22C3 染色結果：

Tumor Proportion Score： 40%

Expression status High expression $\geq 50\%$

Low expression 1-49%

No expression $< 1\%$

解釈：

PD-L1 IHC 22C3 において TPS 40%であり、Low expression (1-49%)と評価されるため、EGFR、ALK 陰性非小細胞肺癌の治療としてペムプロリズマブによる治療が選択肢として加えることができる。

評価年月日：XXXX 年 X 月 X 日

病理医氏名： XXXX

参考文献

1. Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(21):1973-85.
2. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csozsi T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2021;398(10308):1344-57.
3. Felip E, Altorki N, Zhou C, Vallieres E, Martinez-Marti A, Rittmeyer A, et al. Overall survival with adjuvant atezolizumab after chemotherapy in resected stage II-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase III trial. *Ann Oncol.* 2023;34(10):907-19.
4. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(20):1919-29.
5. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;379(24):2342-50.
6. Faivre-Finn C, Vicente D, Kurata T, Planchard D, Paz-Ares L, Vansteenkiste JF, et al. Four-Year Survival With Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC-an Update From the PACIFIC Trial. *J Thorac Oncol.* 2021;16(5):860-7.
7. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csozsi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823-33.
8. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csozsi T, Fulop A, et al. Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score \geq 50. *J Clin Oncol.* 2021;39(21):2339-49.
9. Mok TSK, Wu Y-L, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2019;393(10183):1819-30.
10. de Castro G, Jr, Kudaba I, Wu YL, Lopes G, Kowalski DM, Turna HZ, et al. Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy as First-Line Therapy in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer and Programmed Death Ligand-1 Tumor Proportion Score \geq 1% in the KEYNOTE-042 Study. *J Clin Oncol.* 2023;41(11):1986-91.
11. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;376(25):2415-26.
12. <IMP110.pdf>.
13. Jassem J, de Marinis F, Giaccone G, Vergnenegre A, Barrios CH, Morise M, et al. Updated Overall Survival Analysis From IMpower110: Atezolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy in Treatment-Naive Programmed Death-Ligand 1-Selected NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16(11):1872-82.
14. Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(22):2078-92.
15. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;378(24):2288-301.
16. West H, McCleod M, Hussein M, Morabito A, Rittmeyer A, Conter HJ, et al. Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2019;20(7):924-37.
17. Garassino MC, Gadgeel S, Speranza G, Felip E, Esteban E, Domine M, et al. Pembrolizumab Plus Pemetrexed and Platinum in Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: 5-Year Outcomes From the Phase 3 KEYNOTE-189 Study. *J Clin Oncol.* 2023;41(11):1992-8.
18. Gadgeel S, Rodriguez-Abreu D, Speranza G, Esteban E, Felip E, Domine M, et al. Updated Analysis From KEYNOTE-189: Pembrolizumab or Placebo Plus Pemetrexed and Platinum for Previously Untreated Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2020;38(14):1505-17.
19. Socinski MA, Nishio M, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, et al. IMpower150 Final Overall Survival Analyses for Atezolizumab Plus Bevacizumab and Chemotherapy in First-Line Metastatic Nonsquamous NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16(11):1909-24.
20. Nishio M, Barlesi F, West H, Ball S, Bordoni R, Cobo M, et al. Atezolizumab Plus Chemotherapy for First-Line Treatment of Nonsquamous NSCLC: Results From the Randomized Phase 3 IMpower132 Trial. *J Thorac Oncol.* 2021;16(4):653-64.
21. Sugawara S, Lee JS, Kang JH, Kim HR, Inui N, Hida T, et al. Nivolumab with carboplatin, paclitaxel, and bevacizumab for first-line treatment of advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2021;32(9):1137-47.
22. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gumus M, Mazieres J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(21):2040-51.
23. Novello S, Kowalski DM, Luft A, Gumus M, Vicente D, Mazieres J, et al. Pembrolizumab Plus Chemotherapy in Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer: 5-Year Update of the Phase III KEYNOTE-407 Study. *J Clin Oncol.* 2023;41(11):1999-2006.
24. Jotte R, Cappuzzo F, Vynnychenko I, Stroyakovskiy D, Rodriguez-Abreu D, Hussein M, et al. Atezolizumab in Combination With Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Advanced Squamous NSCLC (IMpower131): Results From a Randomized Phase III Trial. *J Thorac Oncol.* 2020;15(8):1351-60.
25. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim SW, Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(21):2020-31.

26. Brahmer JR, Lee JS, Ciuleanu TE, Bernabe Caro R, Nishio M, Urban L, et al. Five-Year Survival Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab Versus Chemotherapy as First-Line Treatment for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer in CheckMate 227. *J Clin Oncol*. 2023;41(6):1200-12.
27. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021.
28. Paz-Ares LG, Ciuleanu T-E, Cobo M, Bennouna J, Schenker M, Cheng Y, et al. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab With Chemotherapy Versus Chemotherapy Alone for Metastatic NSCLC in CheckMate 9LA: 3-Year Clinical Update and Outcomes in Patients With Brain Metastases or Select Somatic Mutations. *Journal of Thoracic Oncology*. 2023;18(2):204-22.
29. Johnson ML, Cho BC, Luft A, Alatorre-Alexander J, Geater SL, Laktionov K, et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab in Combination With Chemotherapy as First-Line Therapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: The Phase III POSEIDON Study. *J Clin Oncol*. 2023;41(6):1213-27.
30. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-35.
31. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-39.
32. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016;387(10027):1540-50.
33. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*. 2017;389(10066):255-65.
34. Borghaei H, Gettinger S, Vokes EE, Chow LQM, Burgio MA, de Castro Carpeno J, et al. Five-Year Outcomes From the Randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057: Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2021;39(7):723-33.
35. Herbst RS, Garon EB, Kim DW, Cho BC, Gervais R, Perez-Gracia JL, et al. Five Year Survival Update From KEYNOTE-010: Pembrolizumab Versus Docetaxel for Previously Treated, Programmed Death-Ligand 1-Positive Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2021;16(10):1718-32.
36. Mazieres J, Rittmeyer A, Gadgeel S, Hida T, Gandara DR, Cortinovis DL, et al. Atezolizumab Versus Docetaxel in Pretreated Patients With NSCLC: Final Results From the Randomized Phase 2 POPLAR and Phase 3 OAK Clinical Trials. *J Thorac Oncol*. 2021;16(1):140-50.
37. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(23):2220-9.
38. Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, et al. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2019;394(10212):1929-39.
39. Goldman JW, Dvorkin M, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, et al. Durvalumab, with or without tremelimumab, plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide alone in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): updated results from a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(1):51-65.
40. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol*. 2020;15(4):499-519.
41. O'Malley DP, Yang Y, Boisot S, Sudarsanam S, Wang JF, Chizhevsky V, et al. Immunohistochemical detection of PD-L1 among diverse human neoplasms in a reference laboratory: observations based upon 62,896 cases. *Mod Pathol*. 2019;32(7):929-42.
42. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol*. 2018;13(9):1302-11.
43. Gosney JR, Boothman AM, Ratcliffe M, Kerr KM. Cytology for PD-L1 testing: A systematic review. *Lung Cancer*. 2020;141:101-6.
44. 進行肺癌に対する PD-L1 免疫染色についての留意事項について. . および (その2)
<http://pathology.or.jp/news/whats/PD-L1-170124.html>、
<https://pathology.or.jp/news/pdf/guideline-170610.pdf>
45. ヘンタナ OptiViwe PD-L1(SP142).
https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/700025_23000E ZX00005000_A_01_04.pdf
46. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhlel L, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol*. 2016;27(1):147-53.
47. Kim I, Kim A, Lee CH, Lee G, Kim A, Jo EJ, et al. Reliability of PD-L1 assays using small tissue samples compared with surgical specimens. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(14):e14972.
48. Liu Y, Dong Z, Jiang T, Hou L, Wu F, Gao G, et al. Heterogeneity of PD-L1 Expression Among the Different Histological Components and Metastatic Lymph Nodes in Patients With Resected Lung Adenosquamous Carcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2018;19(4):e421-e30.

49. Sheng J, Fang W, Yu J, Chen N, Zhan J, Ma Y, et al. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2016;6:20090.
50. Zhang P, Ma Y, Lv C, Huang M, Li M, Dong B, et al. Upregulation of programmed cell death ligand 1 promotes resistance response in non-small-cell lung cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy. *Cancer Sci.* 2016;107(11):1563-71.
51. Omori S, Kenmotsu H, Abe M, Watanabe R, Sugino T, Kobayashi H, et al. Changes in programmed death ligand 1 expression in non-small cell lung cancer patients who received anticancer treatments. *Int J Clin Oncol.* 2018;23(6):1052-9.
52. Boothman AM, Scott M, Ratcliffe M, Whiteley J, Dennis PA, Wadsworth C, et al. Impact of Patient Characteristics, Prior Therapy, and Sample Type on Tumor Cell Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Patients with Advanced NSCLC Screened for the ATLANTIC Study. *J Thorac Oncol.* 2019;14(8):1390-9.
53. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol.* 2017;12(2):208-22.
54. Fujimoto D, Sato Y, Uehara K, Ishida K, Fukuoka J, Morimoto T, et al. Predictive Performance of Four Programmed Cell Death Ligand 1 Assay Systems on Nivolumab Response in Previously Treated Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2018;13(3):377-86.
55. Zhou C, Srivastava MK, Xu H, Felip E, Wakelee H, Altorki N, et al. Comparison of SP263 and 22C3 immunohistochemistry PD-L1 assays for clinical efficacy of adjuvant atezolizumab in non-small cell lung cancer: results from the randomized phase III IMPower010 trial. *J Immunother Cancer.* 2023;11(10).

追補**PD-L1 IHCの評価に関する e-learning サイトのまとめ**

Agilent Dako : PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」 検査の染色結果判定トレーニングプログラム

<https://pdl122c3-learning.dako.com/jp/>

PD-L1 22C3 について、病理診断の概要、高度な分析および解釈、習熟度の評価の3つに分けて学習できる。

Roche Ventana :

Roche Academy e-Learning

<https://dianews.roche.com/elearning-jptd.html>

SP142, SP263 の具体的な判定方法の解説やバーチャルスライドによる実地問題が掲載されている。このサイトにアクセスするためには、メールマガジンへの登録が必要。

MSD : Biomarker Image Bank

<https://www.msconnect.jp/products/keytruda/biomarker-image-bank/test-your-knowledge/#/>

22C3 を用いた PD-L1 発現率についてバーチャルスライドを用いた学習ができる。アクセスには医療関係者として登録する必要がある。
