

肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引き

第 1.0 版 2011 年 8 月 1 日 バイオマーカー委員会コメント

第 1.1 版 2011 年 10 月 12 日 バイオマーカー委員会承認

第 1.2 版 2011 年 11 月 2 日 理事会で修正の上承認

第 2.0 版 2015 年 6 月 6 日 バイオマーカー委員会コメント

第 2.1 版 2015 年 7 月 28 日 バイオマーカー委員会承認

第 2.1 版 2015 年 7 月 28 日 理事会承認

第 3.0 版 2019 年 1 月 25 日 バイオマーカー委員会コメント

第 3.1 版 2019 年 2 月 16 日 バイオマーカー委員会承認

第 3.1 版 2019 年 2 月 28 日 理事会承認

日本肺癌学会 バイオマーカー委員会

- 第 3 版: 谷田部 恭、里内 美弥子、荒金 尚子、池田 貞勝、井上 彰、木下 一郎、木村 英晴、後藤 功一、阪本 智宏、清水 淳市、蔦 幸治、豊岡 伸一、西尾 和人、西野 和美、畑中 豊、松本 慎吾、三窪 将史、横瀬 智之、秋田 弘俊
- 第 2 版: 谷田部 恭、里内美弥子、秋田弘俊、井上 彰、後藤功一、曾田 学、豊岡伸一、西野和美、萩原弘一、畑中 豊
- 第 1 版: 光富 徹哉、谷田部 恭、秋田 弘俊、弦間 昭彦、曾田 学、豊岡 伸一、中川 和彦、西尾 和人、萩原 弘一

Contents

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	7
3) セリチニブ	8
4) ロルラチニブ	9
5. 薬剤耐性変異	11
6. ALK 融合遺伝子の診断	12
6.1 FISH 法	12
6.1.1 FISH のための検体	13
6.2 RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) 法	13
6.2.1 RT-PCR の検体	14
6.3 IHC 法	14
6.3.1 検体	14
6.3.2 抗原賦活処理	14
6.3.3 検出キットによる違い	15
6.3.4 検出法 (増感法)	15
6.4 NGS 法	15
6.5 標本の選択	15
6.4.1 セルブロック作製の推奨	16
7. 結果の報告	18
解析前セクション	18
解析セクション	18
結果セクション	18
解釈/結論	19
8. ALK 遺伝子検査のアルゴリズム (図 11)	19
9. ALK 検査の保険適用	20
おわりに・・・実地診療と ALK	20
文献	22
追補 1 改定版 CAP/IASLC/AMP チロシンキナーゼ阻害剤標的治療の患者選択のための遺伝子検査ガイドライン	25
追補 2 ASCO Endorsement of CAP/IASLC/AMP Guideline	27

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、非小細胞肺癌のなか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 2 世代 ALK 阻害薬としてセリチニブが米国で 2014 年 4 月に承認され、2014 年 7 月には日本でアレクチニブが ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する治療薬として承認された。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、とくに 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) に続いて、最新の知見を第 3 版としてまとめた。

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し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 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 EML4-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、この遺伝子転座がおこると 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まれ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全く独立して 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剤を投与すると急速な腫瘍消退が観察された⁵。

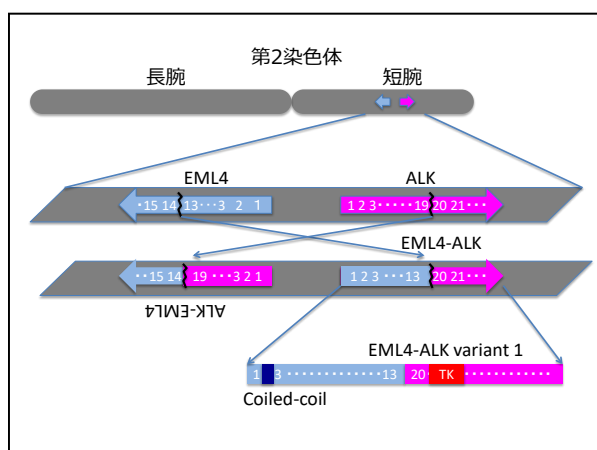


図 1. EML4-ALK variant 1 のメカニズム. 染色体短腕上で、EML4 と ALK 遺伝子内の切断点で、逆向に回転するようにして再結合することで、EML4-ALK と ALK-EML4 が形成される。EML4 の二量体化に必要な coiled-coil domain, ALK のチロシンキナーゼドメインをとともにもつ EML4-ALK のみが活性があると考えられる。

^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。この時 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。

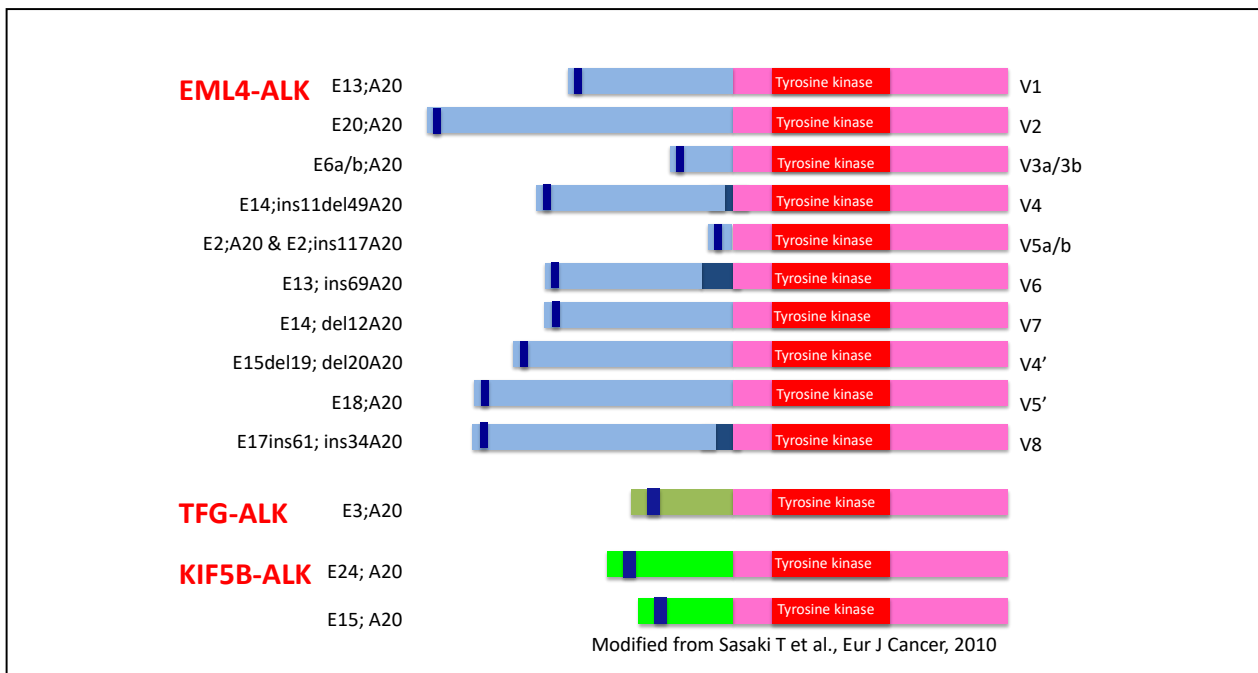


図 2. 肺癌にみられる ALK 融合遺伝子 (Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2009; 27: 4232-5 を改変).

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。

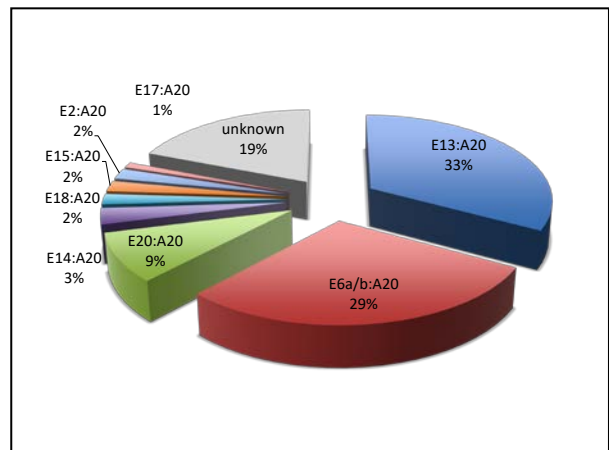


図 3. 肺癌における EML4-ALK 融合遺伝子パターン別頻度 (Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. Eur J Cancer 2010; 46: 1773-80.より).

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。中には 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成り、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)

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
Shimura	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

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う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

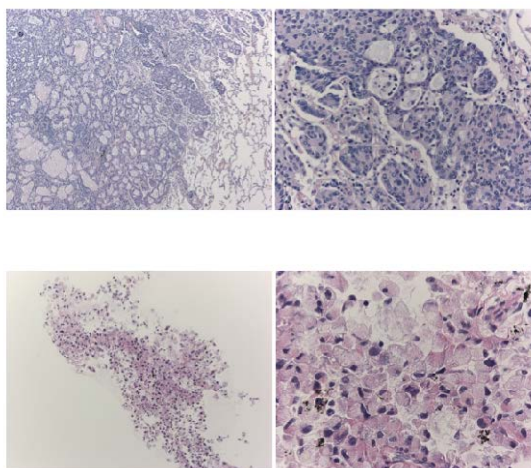
ALK 融合遺伝子を有する肺癌の特徴について表 1 にまとめた。非小細胞肺癌全体では 2-5% 程度である。組織型では圧倒的に腺癌に多く、腺癌での頻度は 4-5% 程度であり、他の組織型では例外的である。ただし、後述するように、充実型腺癌では胞体の形状が扁平上皮癌に類似する症例もあり、免疫組織学的に確認された腺癌か留意して解釈する必要がある⁹。最初に報告された症例は喫煙者であったが、後の報告では非喫煙者により頻度が高いことが確認されている。また、EGFR 遺伝子変異にみられるような人種差はないようである(表 1)。年齢では若年者に多い傾向にあり ALK 肺癌の平均年齢は 50 代半ばとするものが多く、ALK 融合遺伝子を有しない肺癌より 10 才程度若年である。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見られる他の EGFR、KRAS、HER2 の遺伝子変異とは相互に排他的な関係があることがくりかえし示されており、他の遺伝子変異がすでに検出されてお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いいであろう。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 例が acinar type 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 Thyroid transcription factor-1（TTF-1）陽性であり、cell lineage 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 のうちでの ALK 肺癌の割合は 1/22、4/124、0/46、11/134 と solid type 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（signet ring cell）を有する症例が ALK 肺癌の 8.2% 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。

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。



腺房・充実型腺癌
（篩状・cribriformパターン）
68歳女性
切除肺 pT1N0M0
遺伝子変異: 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 cT3N2M0,
遺伝子変異: p53, Y200C,
EGFR, wild type,
KRAS wild type,
ALK, variant 1

4. ALK 阻害薬の臨床試験

現在本邦で使用可能な ALK 阻害剤は第 1 世代のクリゾチニブ、第 2 世代のアレクチニブ、セリチニブ、第 3 世代のロルチニブがあり、そのほかにブリガチニブなどの複数の薬剤が開発中である。

本項ではそれぞれの薬剤の臨床試験につき記載する。

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剤であり、もともと MET 阻害剤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ル改正がなされ、Part2 では 250mg1 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、ついで 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（Profile 1001）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 ヶ月、12 ヶ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 Grade1/2 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%）、嘔気（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 Grade4 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 ヶ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 2 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 Profile 1007 試験¹⁵と 1 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 Profile 1014 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 1 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 500 mg/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 250mg1 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 (Profile 1005) に組み入れてクリゾチニブを投与する cross over 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 250mg1 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<500 mg/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、嘔気、浮腫が、化学療法群では嘔気、倦怠感、嘔吐、食欲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 2 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 ヶ月であり、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 ヶ月 (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剤である。

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 阻害剤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 20 mg 1 日 2 回～300 mg 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 300 mg 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 300 mg 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、300 mg 1 日 2 回投与を受けた 58 例で評価されている。認容性は良好で、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 阻害剤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 Phase I 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 300mg-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 阻害剤未治療・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 300mg 1 日 2 回投与群とクリゾチニブ 250mg 1 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 ヶ月(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、Grade3-4 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、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 ヶ月(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 ヶ月時点での 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 2018 年の米国臨床腫瘍学会(ASCO)で報告されており²⁶、PFS 中央値はアレクチニブ群で 34.8 ヶ月(95%CI :17.7-not reached)、クリゾチニブ群で 14.7 ヶ月(95%CI: 10.8-20.3)、HR は 0.47(95%CI: 0.32-0.71)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 阻害剤であり、クリゾチニブの約 20 倍の ALK 阻害活性を持つとされ、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。Phase I-II study (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 phase I 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 ヶ月(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 Phase II study (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 ヶ月(95%CI: 5.4-7.6)であった。毒性では嘔気(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)での主な毒性は嘔気(91.7%)、嘔吐(83.3%)、下痢(83.3%)、食欲不振(66.7%)、疲労(66.7%)、ALT 上昇(41.7%)、AST(41.7%)、体重減少(33.3%)でこれらの多くは Grade 1/2 であり、主な Grade3/4 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、その原因は嘔気(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)もしくはペメトレキセド(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 ヶ月(95%CI:4.1-6.9) vs 1.6 ヶ月(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 750mg1 日 1 回連日経口投与とシスプラチン 75mg/m²もしくはカルボプラチン AUC=5-6 にペメトレキセド 500mg/m²の併用治療 (3 週間毎、点滴静注)を比較する第 3 相試験(ASCEND-4)が行われた。この結果は 2017 年 Lancet 誌に報告されているが³¹、主評価項目の PFS はセリチニブ群(n=189)で化学療法群(n=187)に比べて有意に良好なことが示された (PFS 中央値 16.6 ヶ月 (95%CI:12.6-27.2)vs 8.1 ヶ月(95%CI:5.8-11.1)、HR=0.55 (95%CI: 0.42-0.73), p<0.00001)。脳転移がある症例(n=121)でも (PFS 中央値 10.7 ヶ月 (95%CI:8.1-16.4)vs 6.7 ヶ月(95%CI:4.2-10.6)、HR=0.70 (95%CI: 0.44-1.12)、脳転移がない症例(n=126)でも (PFS 中央値 26.3 ヶ月 (95%CI:15.4-27.7)vs8.3 ヶ月(95%CI:6.0-13.7)、HR=0.48 (95%CI: 0.33-0.69)でもセリチニブ群で PFS が良好であることも示された。2016 年 6 月 24 日時点での全生存期間の解析は immature ではあるが、セリチニブ群で not Reached(95%CI:29.3-not reached)、化学療法群で 26.2 ヶ月(95%CI: 22.8-not reached) HR は 0.73(95%CI:0.50-1.08, p=0.056)であった。奏効率は 72.5% (95%CI: 65.5-78.8) vs 化学療法群で 26.7% (95%CI: 20.5-33.7)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」の条件がはずされ、ALK 融合遺伝子陽性肺癌の 1 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 3 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) がおこなわれた。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 ヶ月 (95%CI:3.5-9.3)、PFS 中央値は 3.7 ヶ月(95%CI: 1.9-5.3)であった。

4) ロルラチニブ

ロルラチニブ(ロープレナ[®])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 阻害活性を持つ薬剤である。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 1、第 2 世代 ALK 阻害剤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³²。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³³、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³⁴。

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高い数値を示した³⁴。

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 Grade1～2 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^{33, 34}。

この Phase I/II study の Update が 2018 年の ASCO にて発表されている³⁵。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 Phase II study 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³⁶。198 例の少なくとも 1 レジメンの ALK 阻害剤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。検出された全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 ケ月 (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 2 世代 ALK 阻害剤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方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 2 世代 ALK 阻害剤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 ケ月 (95%CI ; 4.1-13.1) vs 5.6 ケ月 (95%CI ; 4.1-8.2)、tDNA 解析で 11.0 ケ月 (95%CI ; 6.9-22.9) vs 5.4 ケ月 (95%CI ; 3.9-6.9) であった。これらの結果は NGS 解析が臨床導入された際の ALK 阻害剤の使い分けの参考になるものと考えられる。

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³⁷、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剤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 相試験の結果のみしか得られておらず、日本肺癌学会のガイドライン 2018 年度版においても、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。現在、一次治療におけるロルラチニブとクリゾチニブを比較する第 III 相試験「CROWN 試験」が進行中である。

現在、本邦で承認されている 4 剤の ALK チロシンキナーゼ阻害剤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 2018 年度版では PS0-1 の ALK 融合遺伝子陽性肺癌の 1 次治療としてアレクチニブが推奨度 1A、クリゾチニブが推奨度 2A、セリチニブが推奨度 2B でそれぞれ推奨されている。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。又、一次治療 ALK-TKI 耐性又は増悪後の PS0-2 に対する治療としては、一次治療がクリゾチニブであった場合に限定してアレクチニブが推奨度 1C で、セリチニブが推奨度 2C でそれぞれ推奨され、1 次治療を限定しない 2 次治療に (第 2 世代 ALK チロシンキナーゼ阻害剤使用例を含む 2 次治療に) ロルラチニブが推奨度 2C で推奨されている。しかし、ALK 阻害剤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全て未だ immature であり、有意差が示されておらず、ALK 阻害剤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

阻害剤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³⁸⁻⁴⁰、今後の検討が待たれる。又、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、またブリガチニブなどのさらなる新規 ALK チロシンキナーゼ阻害剤の臨床導入なども予想される状況でもあり、今後の進展に大いに関心が保たれるところである。

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阻害剤治療後に、EGFR阻害剤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³²。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⁴¹、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阻害剤の効果が異なり（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。

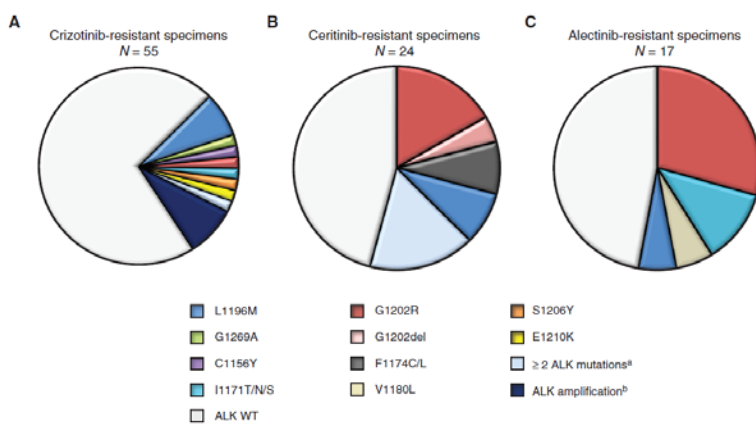


図5. ALK阻害剤治療後に生じる薬剤耐性遺伝子変異の分布 (Cancer Discov. 2016;6:1118-1133)

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 ^a	6.1	11.5
EML4-ALK F1174C	115.0	38.0 ^a	27.0	18.0	8.0
EML4-ALK L1196M	339.0	9.3	117.6	26.5	34.0
EML4-ALK L1196F	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

表2. それぞれの耐性遺伝子変異におけるALK阻害剤のIC₅₀ (Cancer Discov. 2016;6:1118-1133)

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

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) 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。

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
	Alectinibの臨床試験にも用いられた。	crizotinibの臨床試験にも用いられた。			
	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、技術的熟練必要	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
			腫瘍細胞の存在とその量の確認が必要	腫瘍細胞の存在とその量の確認が必要	腫瘍細胞の存在とその量の確認が必要
	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を行う必要がある	比較的長いTAT	比較的長い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

6.1 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) がクリゾチニブおよびアレク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 遺伝子の切断点をへだてて二つのプローブをおいておき、これらが切断されてほかの遺伝子と融合することを検出する方法 (break-apart assay) (図 6) の二つが存在する。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かぎらないこと、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。

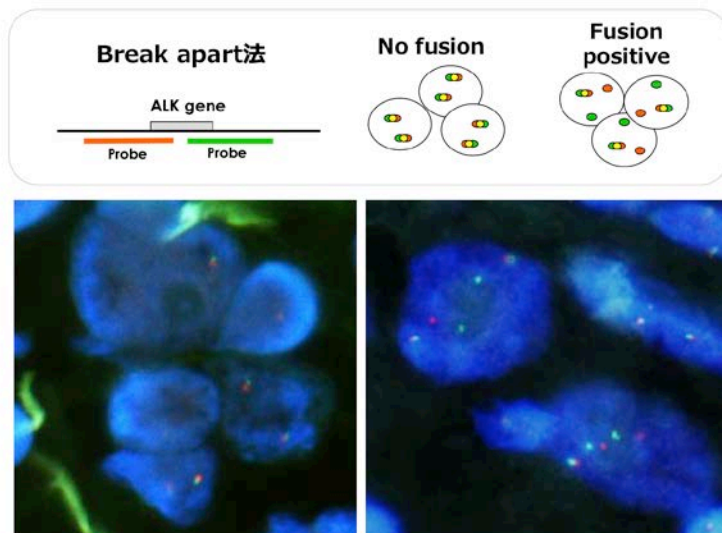


図 6. Break-apart 法による、ALK 遺伝子再構成の検出。再構成切断点を挟んだプローブを異なる蛍光色素でラベルし FISH を行うと、遺伝子再構成のない場合は緑と赤が近接し、重なると黄色のシグナルを与えるが、遺伝子再構成があると緑と赤が分離してみえる。

6.1.1 FISH のための検体

FISH には通常の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 (4~6um 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。とくに、肺癌骨転移巣標本では、ほとんどの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⁴²。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 - 6 mm 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。

6.2 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 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、高い感度を得られる。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)。

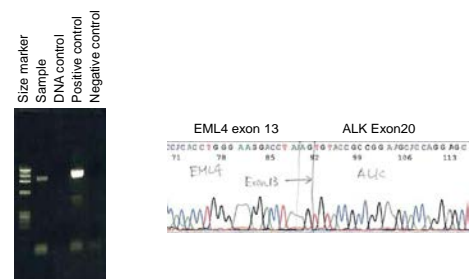


図 7. RT-PCR 産物の直接塩基配列決定法による EML4-ALK の variant 1 の検出。

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。

^c 通常遺伝情報の流れは DNA->RNA->蛋白であるが、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。

Takeuchiらはこれらを考慮して EML4 のエクソン 2 とエクソン 13 に二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⁴³。

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こえるため、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 産物が大きくなり過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。通常ホルマリン固定パラフィン包埋 (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出来ないということに留意する必要がある。

6.2.1 RT-PCR の検体

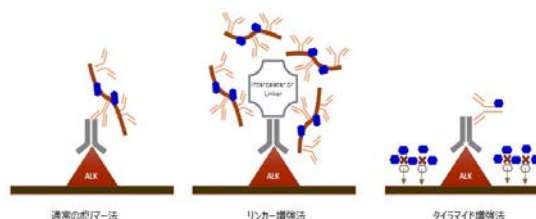
核酸抽出後には腫瘍細胞が含まれていたかの検証ができないため、いかにその確証を取るかが重要となってくる。具体的には、検体採取後、ホルマリン固定する組織と対になるように組織を採取し、直ちに RNAlater などの RNA 分解阻害薬で処理する必要がある。また、細胞診検体では生食や PBS でよく攪拌して腫瘍細胞の分布に偏りを無くす必要がある。EGFR 遺伝子変異はサンプルから DNA を抽出して解析するが、ALK では RNA をもとに解析するので、検体処理法が異なることに留意が必要である。より一般的な方法としては、腫瘍組織の一部を OCT コンパウンドに包埋し、凍結切片を用いることで、腫瘍細胞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、スタンブ法は、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⁴⁴、そのアルコール固定標本は良い解析サンプルとなる。

6.3 IHC 法

ALK IHC 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⁴⁵。すなわち肺癌においては肺癌用に最適化された 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。従来は薬剤との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、クリゾチニブでの適応を判断することができる。

6.3.1 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。



6.3.2 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 (抗原のマスク

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。

^d 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もちいて合成された 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。

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ガラスを用いる必要がある。

6.3.3 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ことなる。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⁴⁶。

6.3.4 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。

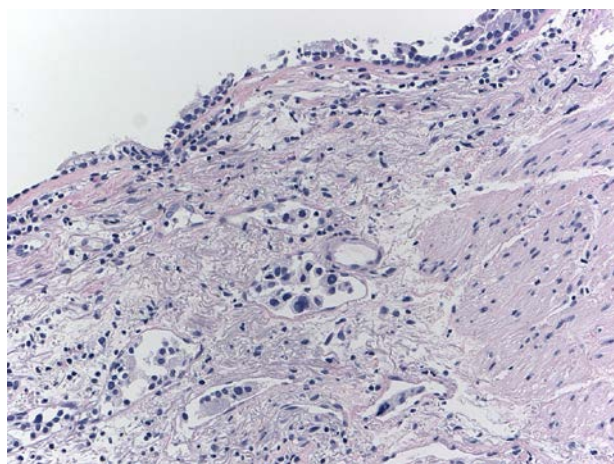


図 9 TBLB による組織標本の一例。腫瘍細胞は気管支粘膜内のリンパ管に沿って進展しており、免疫染色（TTF-1 陽性）とあわせて腺癌と診断できるが、十分な腫瘍細胞が得られないため、FISH 法による ALK テストには不適切と判断された。ALK テスト用の検体は病理医により評価される必要がある。

6.4 NGS 法

Oncomine Target Dx テスト、FoundationOne CDx 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、Oncomine Target Dx テストはアンブリコンシークエンスであり、既存の融合遺伝子しか検出ができないのに対し、FoundationOne CDx 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。いずれの方法も 20%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。

6.5 標本の選択

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 100 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 TTF1 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	EML4_ALK の場合、プライマー配列の特徴から RT-PCR 法はきわめて感度が高い。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、おおそ 5%以上であり、細胞診陽性所見なしでの結果は意味が無いと評価される。
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、実際の検出感度はさらに高い 20%の腫瘍含有量が必要とされている。

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さまざまな検体を用いられている。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持たず、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 3 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上で ALK 検査に供されるべきか決定されるべきである。

6.4.1 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。一旦セルブロックを作成してしまえば、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、全てに利用可能である。セルブロックの作製に関してはさまざまな方法が用いられているが、標準化はされていない。FISH プロベキット（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 4 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様に、スライドガラス上に静かに 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。
血漿トロンピン法	
a.	細胞診材料を 2,500rpm で 10 分間遠心分離機にかける。
b.	上清を除去し、
c.	2 滴の沈澱物をピペットで先細の小チューブ（エッペンドリフトチューブなど）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 のトロンピンを加えて、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.	液状検体の遠心沈澱物を、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.	液状検体の遠心沈澱物を、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

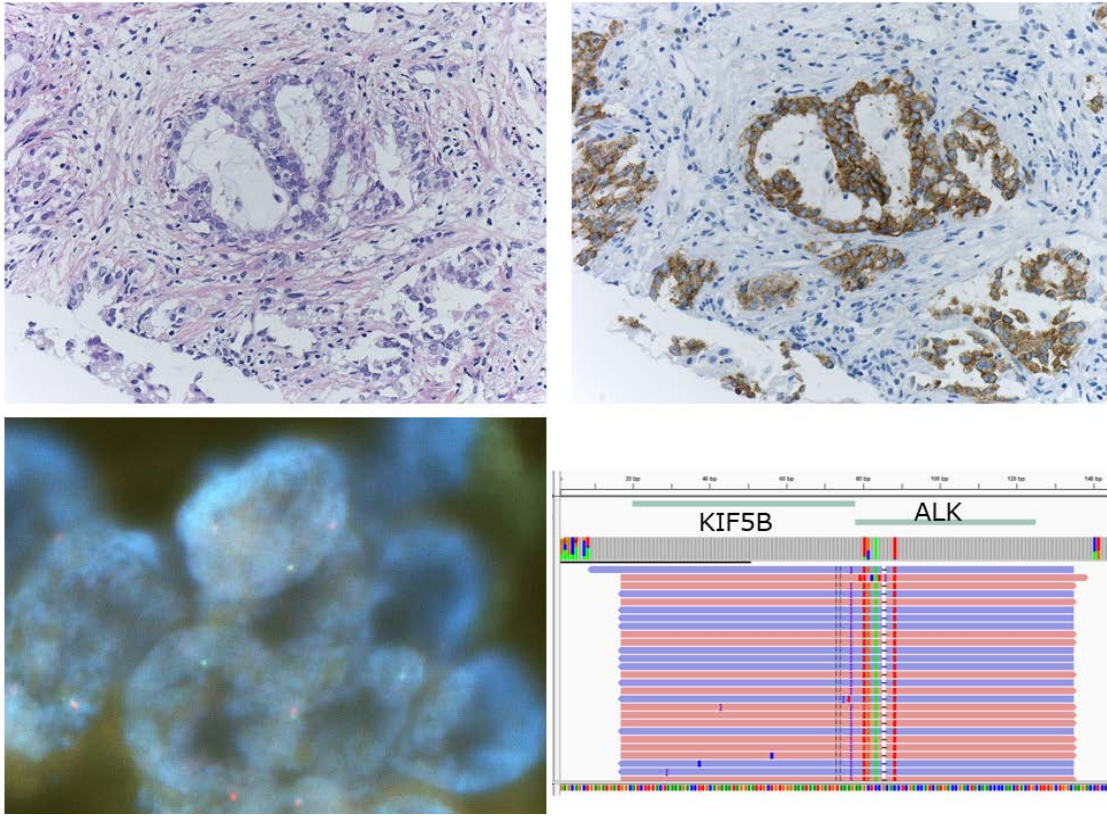


図 10-1 生検組織での検出例.

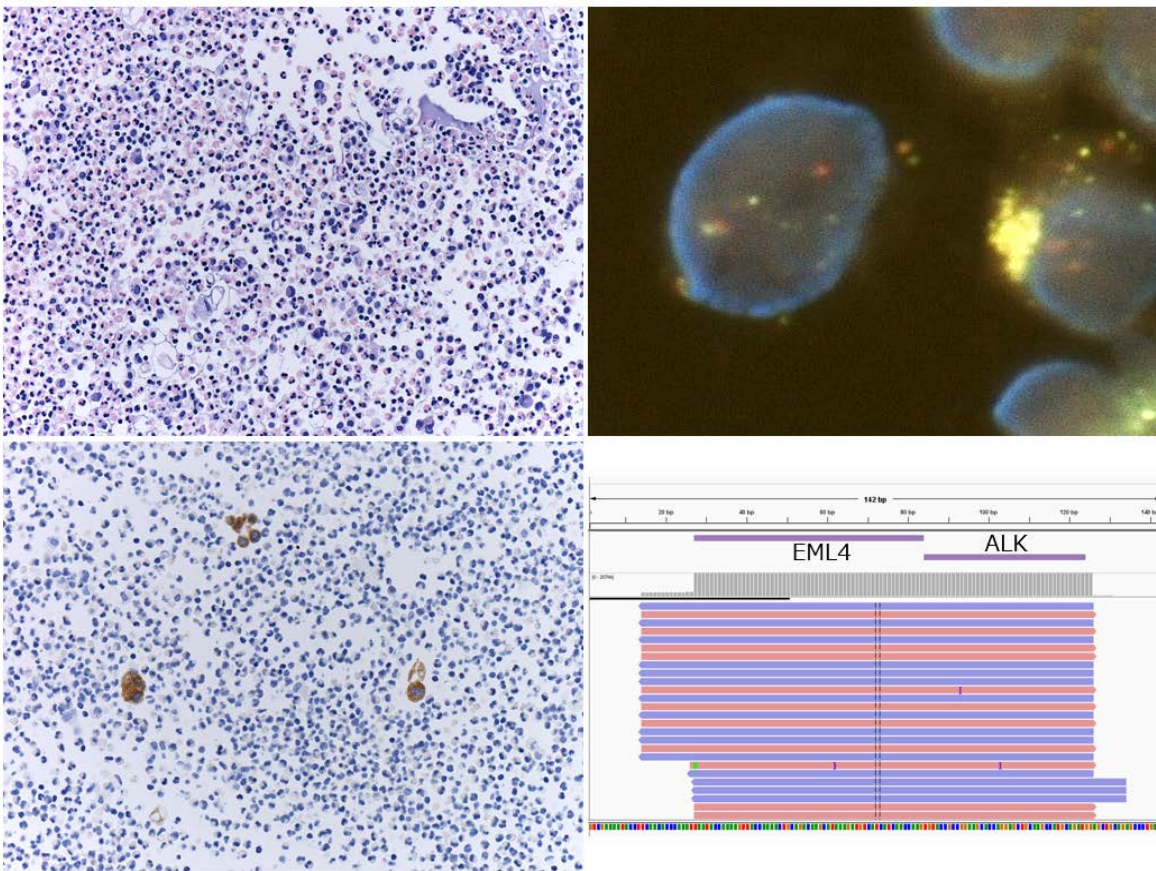


図 10-2 細胞診セルブロックにおける検出例.

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共に、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。偶然見つけ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。非定型パターンが見られたら、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そった報告様式を用いる^{47, 48}。

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)

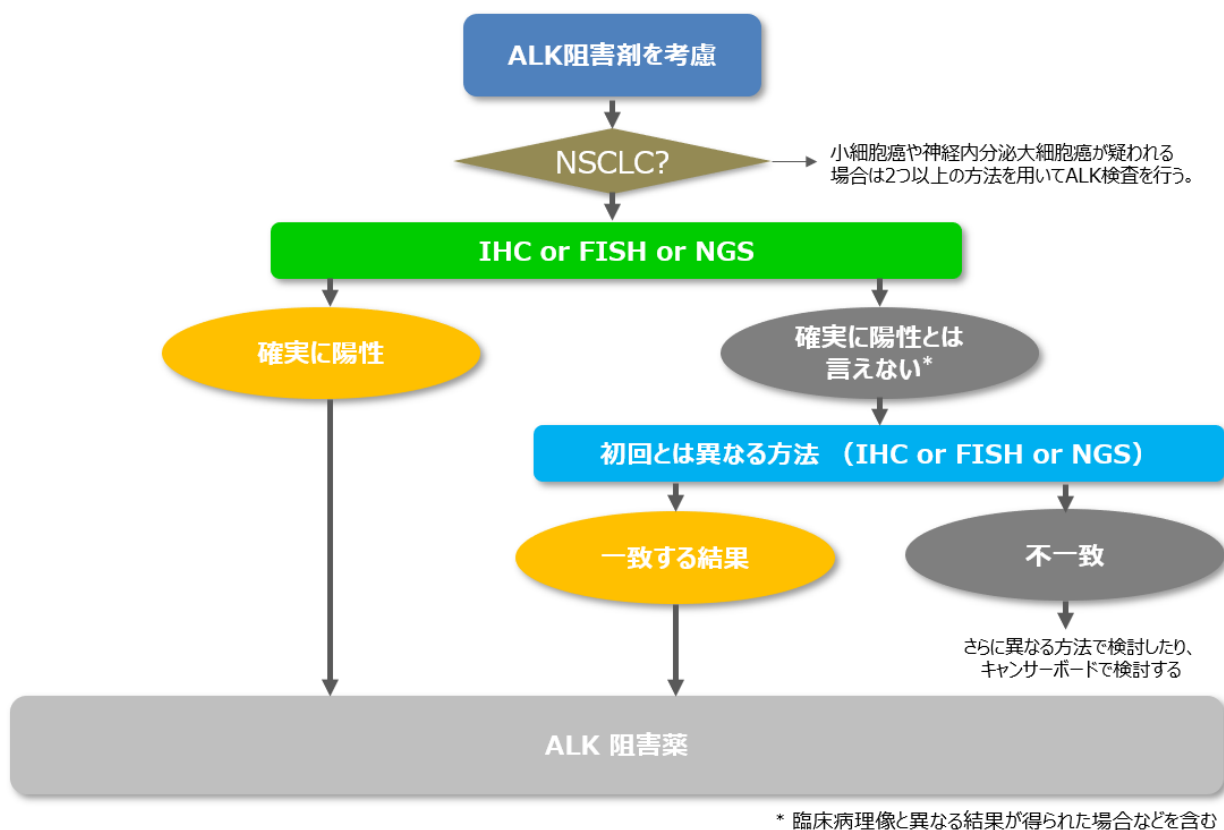


図 11 ALK 検査のアルゴリズム。

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%を占めるに過ぎず、迅速で効率のよ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、改正版 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マチ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あとに行っていた 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。

これら3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。
	<ul style="list-style-type: none"> 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。
	<ul style="list-style-type: none"> 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。

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。一つの方法のみならず、結果が確実と言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⁴⁹。

なお、結果が確実とは言えない場合とは、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出来ない場合、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

2019年1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。

FISH: N005-2 ALK 融合遺伝子標本作製 6520 点

ALK 阻害剤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 阻害剤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。

その他

RT-PCR 法については保険適用されていない。遺伝子パネル検査である FoundationOne CDx および Oncomine Target Dx テストが薬事申請を行っている。

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過ぎず、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。

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 oncokine 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. Camidge DR, Dolange P, Mok T, et al. Updated efficacy and safety data from global Phase III ALEX study of alectinib (ALC) vs crizotinib (CZ) in untreated advanced ALK+ NSCLC. *J Clin Oncol* 2018;36.
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. Gainor JF, Dardai 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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 Annual Meeting* 2018:ABstr CT044.
37. 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.
38. 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.
39. Duruisseaux M, Besse B, Cadranel 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Maitra A, Wistuba II, Virmani AK, et al. Enrichment of epithelial cells for molecular studies. *Nat Med* 1999;5:459-463.
45. 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.
46. 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.
47. 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.

48. 合同ワーキング・グループ 日白白. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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剤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) ⁵⁰

DOI: 10.1016/j.jtho.2017.12.001

Archives of Pathology & Laboratory Medicine, Volume 142, Issue 3, Pages 321-346 (March 2018) ⁵¹

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

Journal of Molecular Diagnostics, Volume 20, Issue 2, Pages 129-159 (March 2018) ⁵²

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）

2013 年 推奨	2018 年 推奨
<p>専門家統一見解：細胞検体は EGFR および ALK 検査に適している。セルブロック標本がスミア標本よりも望ましい。</p> <p>専門家統一見解：検査室は、EGFR 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>推奨：EGFR-TKI 治療の患者選択に EGFR 免疫染色を用いることを推奨しない。</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 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>強い推奨：検査室は免疫染色による総 EGFR 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

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> 蛋白の 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> 蛋白の IHC が陽性であった場合には、ほか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</i> (<i>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</i> (<i>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。 | 専門家統一見解 |

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、ほか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、EGFR-TKI 感受性 <i>EGFR</i> 遺伝子変異を持ち、EGFR-TKI 治療後に増悪した肺腺癌患者において、第 3 世代 EGFR-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。 | 強く推奨 |
| 13. EGFR-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. ALK-TKI 感受性変異を持ち、ALK-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っ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、EGFR-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、EGFR-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

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⁵³、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)