

# 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
第 4.0 版	2021 年 7 月 5 日	バイオマーカー委員会コメント
第 4.0 版	2021 年 10 月 4 日	バイオマーカー委員会承認
第 4.0 版	2021 年 10 月 20 日	理事会承認

---

## 日本肺癌学会バイオマーカー委員会

- 第 4 版： 越智 宣昭、谷田部 恭、里内 美弥子、荒金 尚子、池田 貞勝、井上 彰、大泉 聡史、阪本 智宏、枝園 和彦、清水 淳市、角南 久仁子、宗 淳一、蔦 幸治、西尾 和人、西野 和美、畑中 豊、松本慎吾、三窪 将史、横瀬 智之、後藤 功一、豊岡 伸一
- 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
4.1. クリゾチニブ.....	6
4.2. アレクチニブ.....	8
4.3. セリチニブ.....	9
4.4. ロルラチニブ.....	10
4.5. ブリグチニブ.....	12
5. 薬剤耐性変異.....	13
6. ALK 融合遺伝子の診断.....	14
6.1. FISH 法.....	14
6.1.1. FISH のための検体.....	15
6.2. RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) 法.....	15
6.2.1. RT-PCR の検体.....	16
6.3. IHC 法.....	16
6.3.1. 検体.....	17
6.3.2. 抗原賦活処理.....	17
6.3.3. 検出キットによる違い.....	17
6.3.4. 検出法 (増感法).....	17
6.4. NGS 法.....	18
6.5. 標本の選択.....	18
6.5.1. セルブロック作製の推奨.....	19
7. 結果の報告.....	21
解析前セクション.....	21
解析セクション.....	21
結果セクション.....	21
解釈/結論.....	22
8. ALK 遺伝子検査のアルゴリズム.....	22
9. ALK 検査の保険適用.....	23
10. おわりに・・・実地診療と ALK.....	25
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.....	30
追補 2. ASCO Endorsement of CAP/IASLC/AMP Guideline.....	33
第 3.1 版から第 4.0 版への主な改定ポイント.....	34

## 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<sup>1</sup>。*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<sup>2</sup>、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。

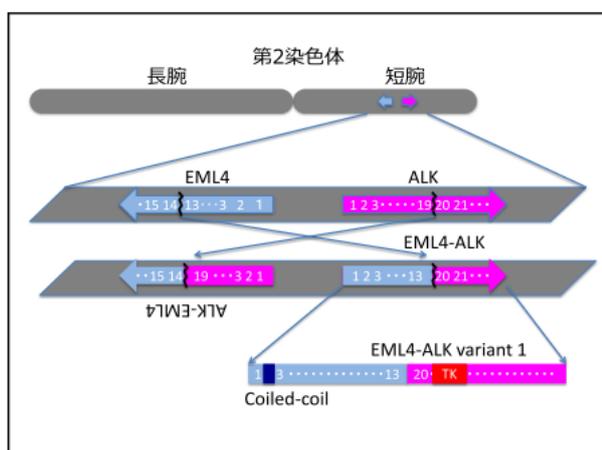
本稿では *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌の診療、特に *ALK* 融合遺伝子の診断にあたっての注意を中心に第 1 版 (2011 年)、第 2 版 (2015 年)、第 3 版 (2019 年) に続いて、最新の知見を第 4 版としてまとめた。なお、*ALK* 阻害薬とそのコンパニオン診断薬に関する情報は頻りに更新されるため、最新の情報については PMDA ホームページ\* を参照頂きたい。

\* (<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ク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<sup>1</sup>。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-like4) 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)<sup>a</sup>。

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<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>。*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は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<sup>5</sup>。



ウズでは生後数週のうちには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<sup>5</sup>。

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、逆向き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。

<sup>a</sup> *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。

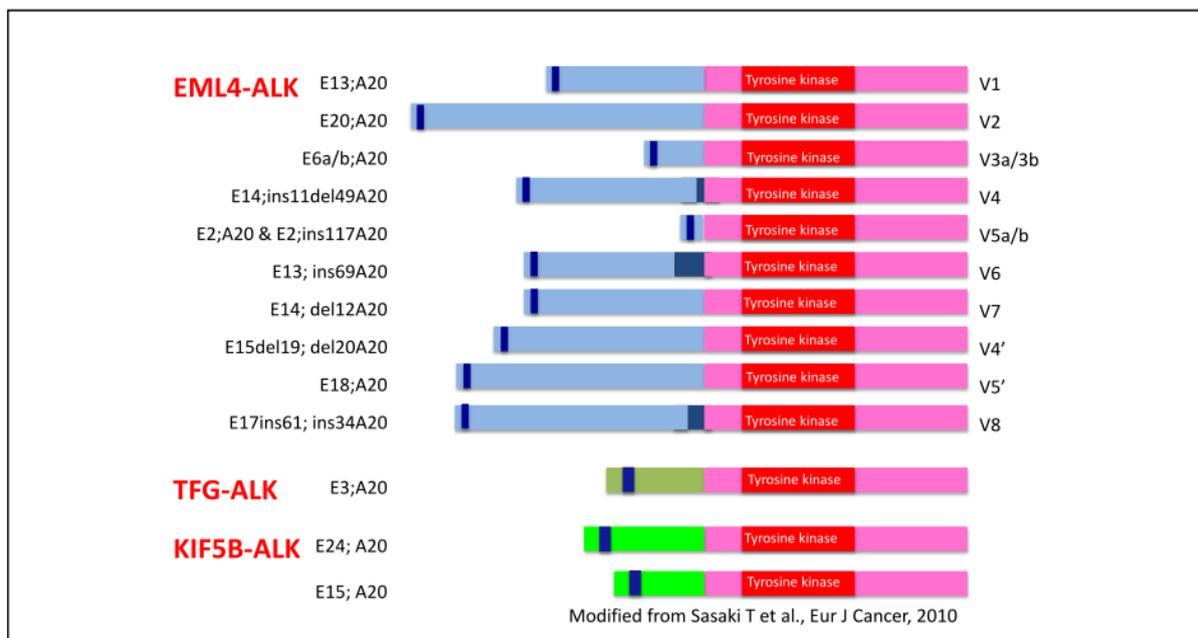


図2. 肺癌にみられる *ALK* 融合遺伝子(Sasaki T ら. The biology and treatment of *EML4-ALK* non-small cell lung cancer. Eur J Cancer 2010; 46: 1773-80.より改変) Reproduced with permission from Elsevier (2021)

## 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)<sup>b</sup>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<sup>6</sup>。*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 はこれを持っている。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)。

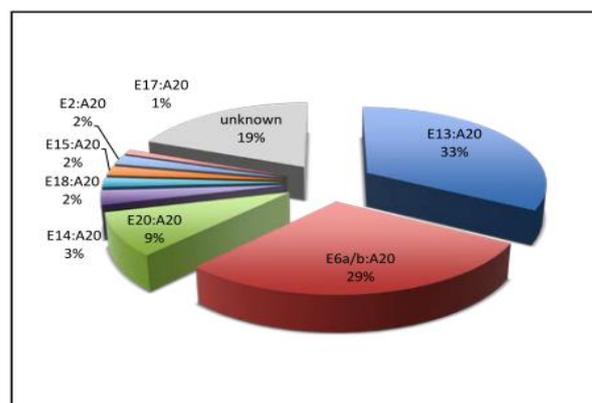


図3. 肺癌における *EML4-ALK* 融合遺伝子パターン別頻度 (Sasaki T ら. The biology and treatment of *EML4-ALK* non-small cell lung cancer. Eur J Cancer 2010; 46: 1773-80.より改変) Reproduced with permission from Elsevier (2021)

<sup>b</sup> 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 JR, 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<sup>7</sup>。*KIF5B* のエクソン 15 と融合する例も報告された<sup>8</sup>。*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、免疫沈降とマスマスペクトロメトリーを組み合わせ、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<sup>4</sup>。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

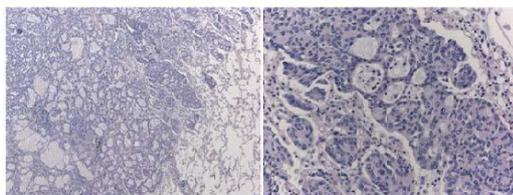
ALK 融合遺伝子を有する肺癌の特徴について表 1 にまとめた。非小細胞肺癌全体では 2-5%程度である。組織型では圧倒的に腺癌に多く、腺癌での頻度は 4-5%程度であり、他の組織型では例外的である。ただし、後述するように、充実型腺癌では胞体の形状が扁平上皮癌に類似する症例もあり、免疫組織学的に確認された腺癌か留意して解釈する必要がある<sup>9</sup>。最初に報告された症例は喫煙者であったが、後の報告では非喫煙者により頻度が高いことが確認されている。また、*EGFR* 遺伝子変異にみられるような人種差はないようである(表 1)。年齢では若年者に多い傾向にあり ALK 肺癌の平均年齢は 50 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 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<sup>10</sup>。

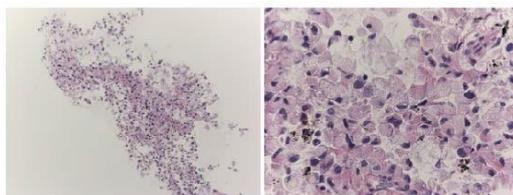
一方、ALK 融合遺伝子は肺腺癌に主にみられる他の *EGFR*、*KRAS*、*HER2* の遺伝子変異とは相互に排他的な関係があることが繰り返し示されており、他の遺伝子変異がすでに検出されていればその症例における ALK 融合遺伝子の検出の可能性はほとんどないと考えてよいであろう。ただし、これは治療前の場合であり、ALK 阻害薬の耐性機序として、ALK 遺伝子増幅や、*EGFR* 遺伝子変異や *KRAS* 遺伝子変異の獲得などの報告もある<sup>11</sup>。

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）<sup>12</sup>。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<sup>13</sup>。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<sup>13</sup>。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。

### 4.1. クリゾチニブ

クリゾチニブ (ザコーリ®) 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<sup>2</sup>。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<sup>14</sup> 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<sup>14</sup>。

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<sup>15</sup>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<sup>16</sup>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/m<sup>2</sup>, day1点滴静注・3週サイクル、もしくはドセタキセル75mg/m<sup>2</sup>, 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カ月(95%CI: 6.0-8.8)、化学療法群は5カ月(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カ月(95%CI: 18.1-not reached)、化学療法群で22.8カ月(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<sup>15</sup>。

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/m<sup>2</sup>, day1>もしくはカルボプラチン<AUC=5-6>+ペメトレキセド<500mg/m<sup>2</sup>, 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カ月(95%CI: 8.3-13.9)、化学療法群は7.0カ月(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<sup>16</sup>。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<sup>17</sup>。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))。

## 4.2. 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)<sup>18</sup> 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 20mg1 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<sup>19</sup>、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<sup>20</sup>。

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 Grade3 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<sup>20</sup>。

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<sup>21</sup>、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)<sup>22</sup> 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<sup>22</sup>。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)<sup>23</sup> および日本を除く Global (ALEX 試験)<sup>24</sup> 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<sup>18</sup>。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<sup>24</sup>、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<sup>25</sup>、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<sup>26</sup>、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。

### 4.3. 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<sup>27</sup>。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<sup>28</sup>、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<sup>29</sup>。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<sup>29</sup>。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<sup>30</sup>、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見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ペ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<sup>31</sup>。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<sup>23</sup>、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<sup>32,33</sup>。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。

#### 4.4. ロルラチニブ

ロルラチニブ（ローブレナ<sup>®</sup>）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<sup>34</sup>。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<sup>30</sup>。

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<sup>35</sup>、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<sup>36</sup>。

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<sup>36</sup>。

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<sup>35,36</sup>。

この第I/II相試験のUpdateが2018年のASCOにて発表されている<sup>37</sup>。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<sup>38</sup>。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<sup>39</sup>、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<sup>40</sup>。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融合遺伝子陽性肺癌の一次治療への適応拡大を申請中であり、承認されれば今後の肺癌診療ガイドラインが書き換えられることとなる。

## 4.5. 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<sup>41</sup>。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 180mg 1 日 1 回(90mg 1 日 1 回での 7 日間導入療法後)投与群 137 例、クリゾチニブ 250mg 1 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。Grade 3 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及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<sup>42</sup>。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 の下限値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<sup>43</sup>。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、HR 0.92 (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 2020 年度版では PS 0-1 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、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。PS 2-4 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 ALK-TKI 耐性または増悪後の PS 0-2 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、ロルラチニブ、ブリグチニブ、セリチニブが推奨度 2C でそれぞれ推奨されている。また、2018 年度版で記載されていた一次治療がクリゾチニブの場合の二次治療での推奨という表記が削除され、「一次治療で用いた ALK-TKI と異なる薬剤の推奨」という注釈が加えられた。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ケンスは不明である。クリゾチニブを初回 ALK 阻害薬とした場合のシーケ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<sup>44-46</sup>、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ケ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<sup>34</sup>。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<sup>47</sup>、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。

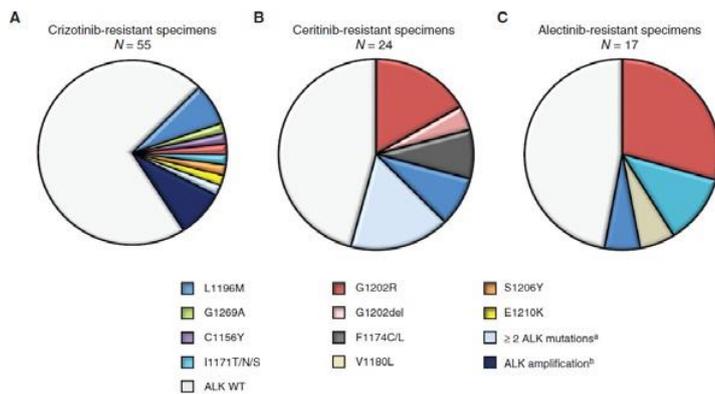
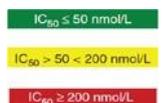


図 5. ALK 阻害薬治療後に生じる薬剤耐性遺伝子変異の分布 (Cancer Discov. 2016;6:1118-1133) Reproduced with permission from American Association for Cancer Research (2021)

Mutation status	Cellular ALK phosphorylation mean IC <sub>50</sub> (nmol/L)				
	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib	Brigatinib	Lorlatinib
Parental Ba/F3	763.9	895.7	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	11.8	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 <sup>a</sup>	6.1	11.5
EML4-ALK F1174C	115.0	38.0 <sup>a</sup>	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	381.8	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 阻害薬の IC<sub>50</sub> (Cancer Discov. 2016;6:1118-1133) Reproduced with permission from American Association for Cancer Research (2021)



## 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
<b>長所</b>	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	クリゾチニブ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
<b>短所</b>	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 EML4 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。

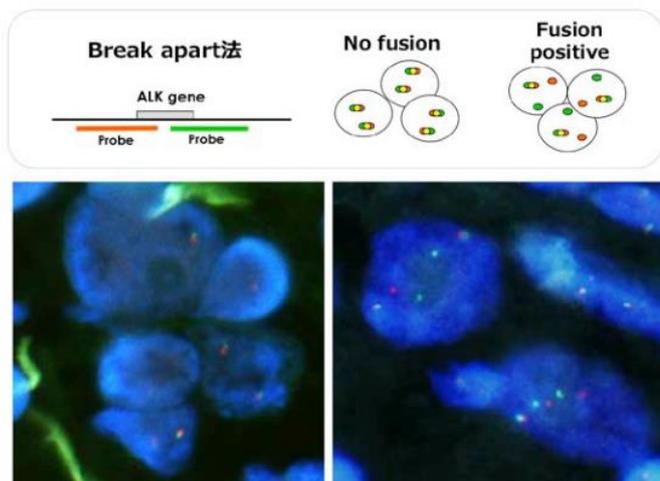


図 6. Break-apart 法による ALK 遺伝子再構成の検出。再構成切断点を挟んだプローブを異なる蛍光色素でラベルし FISH を行うと、遺伝子再構成のない場合は緑と赤が近接し、重なると黄色のシグナルを与えるが、遺伝子再構成があると緑と赤が分離してみえる。

### 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 $\mu$ 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<sup>48</sup>。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。

## 6.2. RT-PCR (reverse transcriptase<sup>c</sup>-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にのみ 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)。

<sup>c</sup> 通常遺伝情報の流れは DNA $\rightarrow$ RNA $\rightarrow$ 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。

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<sup>49</sup>。

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<sup>d</sup>。PCR 産物の大きさを知ることのできる 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<sup>10</sup>。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できないということに留意する必要がある。

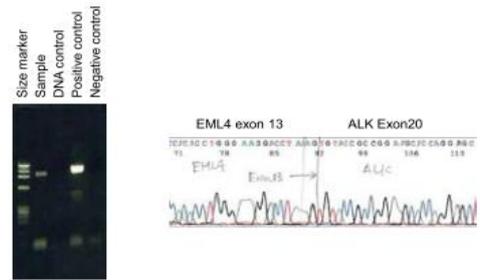


図 7. RT-PCR 産物の直接塩基配列決定法による *EML4-ALK* の variant 1 の検出

### 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 RNA later 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<sup>50</sup>、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

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<sup>51</sup>。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ブ 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。

<sup>d</sup>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 はメッセージ 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。

### 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、コートスライドガ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。

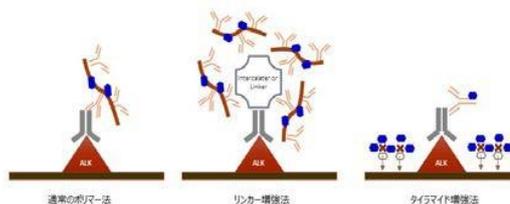


図 8. 免疫染色による増感法。図では通常のポリマー法と感度増強法の違いを示している。

### 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ガラスを用いる必要がある。

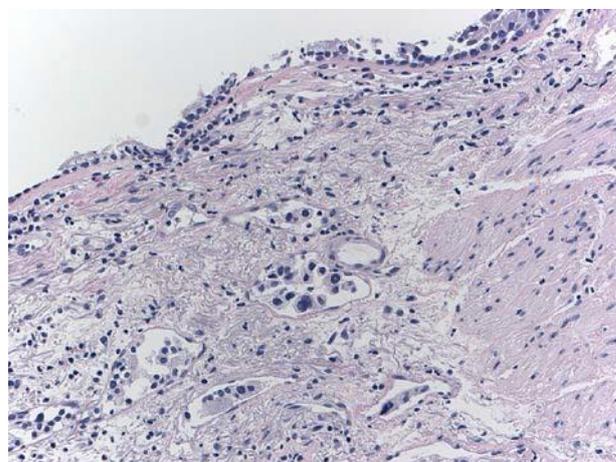


図 9 TBLB による組織標本の一例。腫瘍細胞は気管支粘膜内のリンパ管に沿って進展しており、免疫染色（TTF-1 陽性）とあわせて腺癌と診断できるが、十分な腫瘍細胞が得られないため、FISH 法による ALK テストには不適切と判断された。ALK テスト用の検体は病理医により評価される必要がある。

### 6.3.3. 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<sup>52</sup>。

### 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 キットではタイラミド法が用いられている。

## 6.4. NGS 法

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）、Foundation One CDx がんゲノムプロファイル（以下、Foundation One CDx）Foundation One Liquid CDx がんゲノムプロファイル（以下、Foundation One Liquid 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、オンコマイン DxTT 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 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 はいずれの方法も 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。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<sup>53</sup>。

## 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	EML4-ALK 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。

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。

### 6.5.1. 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、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

- 吸引サンプルまたはサイトスピン検体を、拡散したり塗付けたりしないように、スライドガラス上に静かに1滴滴下する。
- 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。
- 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

- 細胞診材料を2,500rpmで10分間遠心分離機にかける。
- 上清を取り除く。
- 2滴の沈殿物をピペットで先細の小チューブ(エッペンドリフチューブなど)へ移す。
- 200 $\mu$ Lの血漿を加えて、標本を短時間ミキサーで混和する。
- 50 $\mu$ 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。
- 標本を5分間インキュベートする。
- 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。
- 10%緩衝ホルマリン液中で材料を固定する。
- 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

- 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。
- 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。
- 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。
- ナトリウムカルシウム(1M)を容液に加え、ゲル化させる。
- 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

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。

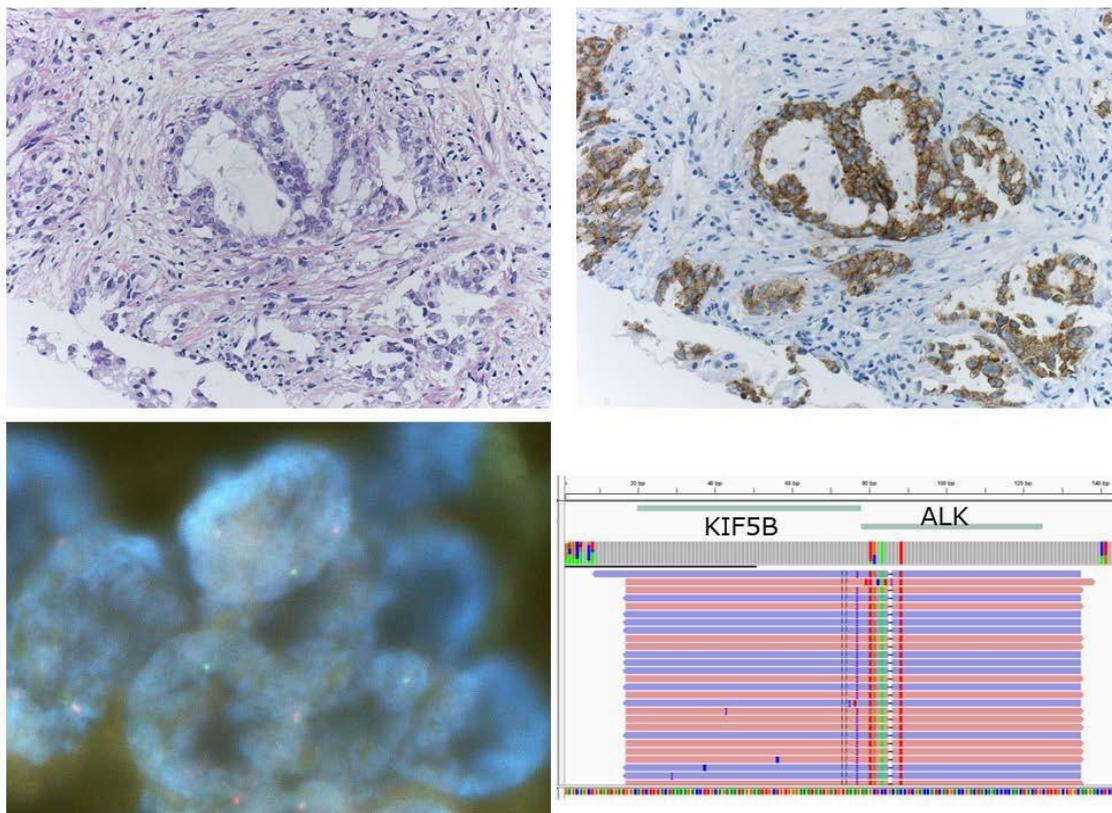


図 10-1 生検組織での検出例

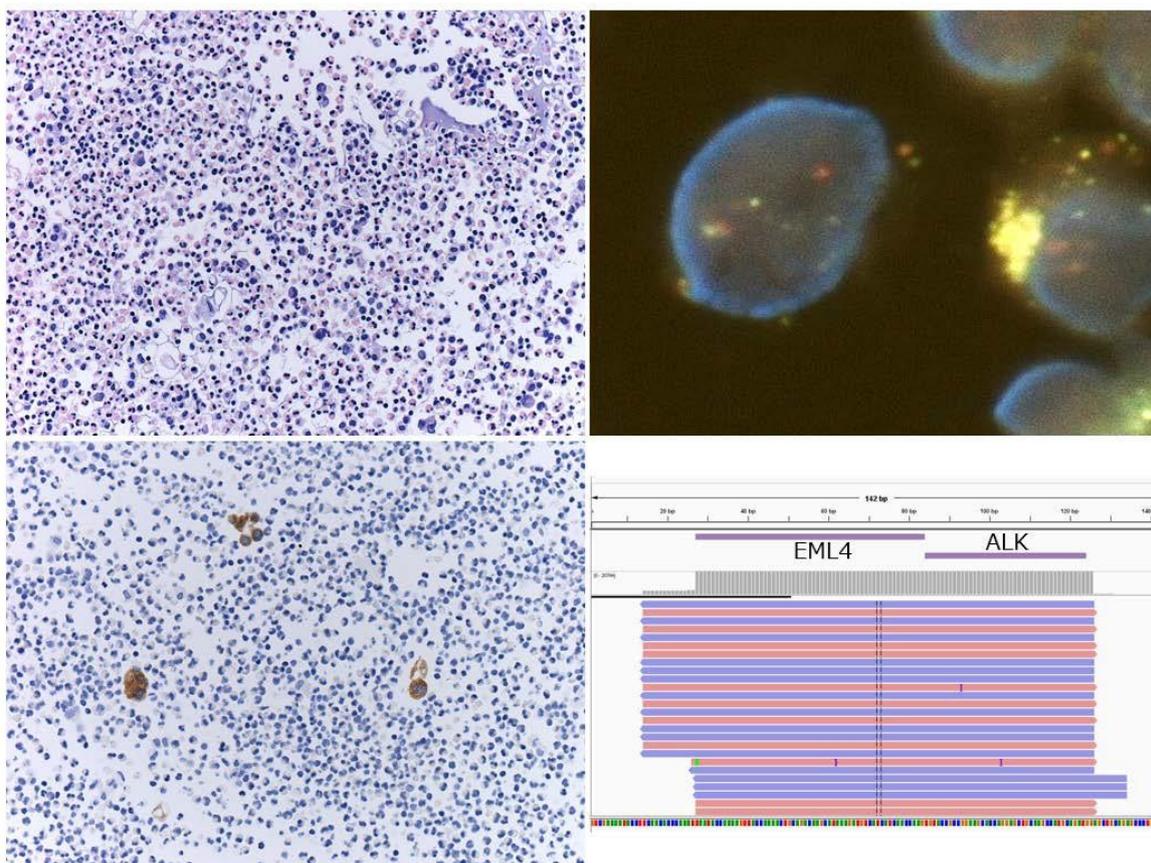


図 10-2 細胞診セルブロックにおける検出例

## 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、「バリエント 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<sup>54, 55</sup>。

### 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)

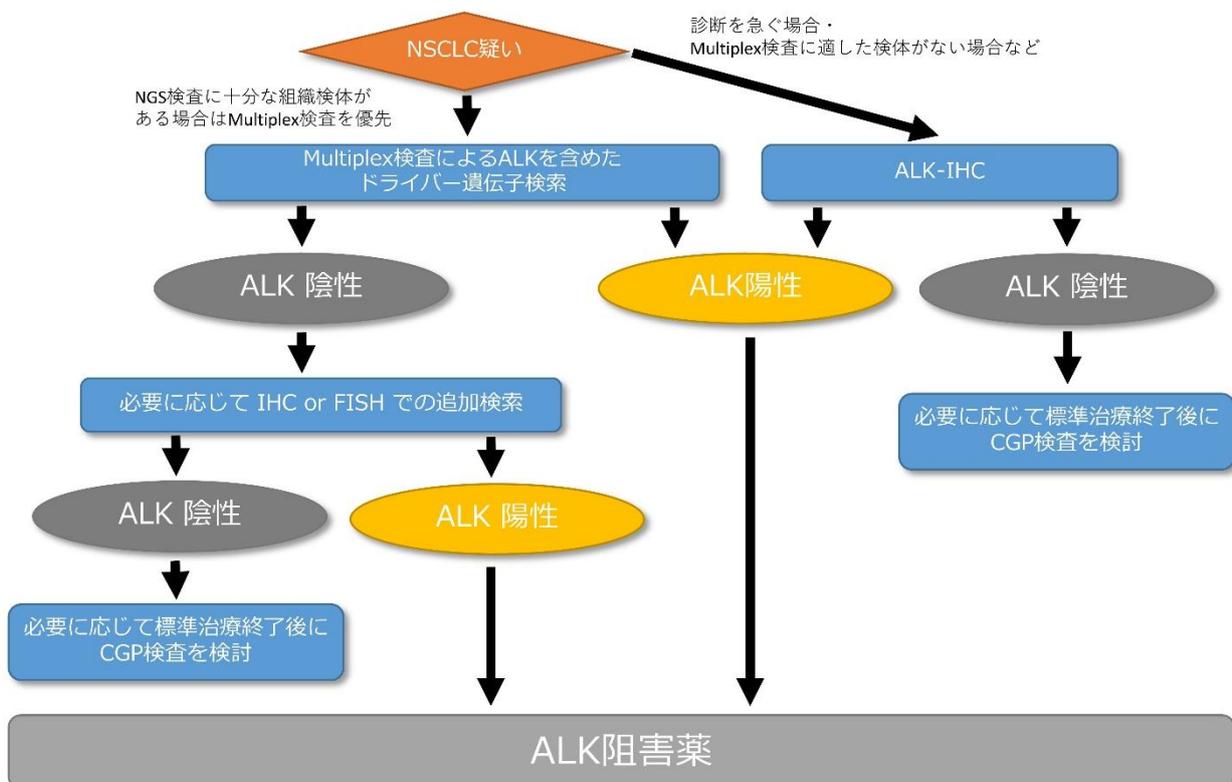


図 11. ALK 遺伝子検査のアルゴリズム

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。

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"> <li>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。</li> <li>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。</li> </ul>
IHC 法	<ul style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> </ul>
NGS 法	<ul style="list-style-type: none"> <li>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。</li> </ul>
RT-PCR 法	<ul style="list-style-type: none"> <li>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。</li> </ul>

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<sup>56</sup>。

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を確認頂きたい。

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

- 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。

● NGS:

・ オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム: 11,700 点

○ 準用技術料 (下記を合算して算定)

D004-2 悪性腫瘍組織検査

1 悪性腫瘍遺伝子検査 注 イ 2項目 4,000 点

D006-4 遺伝学的検査

2 処理が複雑なもの 5,000 点

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

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 陽性肺癌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

○ 準用技術料

・ 包括的ゲノムプロファイル取得のための本品検査 (パネル検査) 実施に係る準用技術 (パネル検査実施料)

D006-4 遺伝学的検査「3」処理が極めて複雑なもの 8,000 点

・ パネル検査の結果の判断及び説明等の実施に係る準用技術 (パネル検査判断・説明料)

D006-4 遺伝学的検査「3」処理が極めて複雑なもの 4 回分

32,000 点

D004-2 悪性腫瘍組織検査

1 悪性腫瘍遺伝子検査

注 ロ 3項目以上

6,000 点

M001-4 粒子線治療 (一連につき)

注 3 粒子線治療医学管理加算

10,000 点

(エキスパートパネル実施に係る費用が含まれる)

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

○ 関連技術料

(腫瘍の包括的なゲノムプロファイルを取得することを目的とした場合)

D006-19 がんゲノムプロファイリング検査

1. 検体提出時

8,000 点

2. 結果説明時

4,800 点

● RT-PCR 法:

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、「AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル」が 2021 年 6 月 25 日に承認され、今後実臨床で使用可能となる。11 の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 4 つのドライバー遺伝子 (EGFR/ALK/ROS-1/BRAF) について、非小細胞肺癌における 9 つ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、AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネルに関する手引きについても参照されたい。

## 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、この頻度は低いが高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 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 Annuall 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, 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.
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ンス (第 1.0 版) .2017/10/11. Available at [https://www.jsmo.or.jp/about/doc/20171011\\_01.pdf](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) <sup>57</sup>  
DOI: 10.1016/j.jtho.2017.12.001

Archives of Pathology & Laboratory Medicine, Volume 142, Issue 3, Pages 321-346 (March 2018) <sup>58</sup>  
DOI: 10.5858/arpa.2017-0388-CP.

Journal of Molecular Diagnostics, Volume 20, Issue 2, Pages 129-159 (March 2018) <sup>59</sup>  
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）<sup>57</sup>

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>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>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>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 <i>EGFR</i> 発現量を <i>EGFR</i>-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<sup>58</sup>

ガイドライン推奨	推奨度
Key Question1: 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. *ERBB2 (HER2)* 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 *EGFR*、*ALK*、*ROS1* 検査が陰性であった場合は、*ERBB2 (HER2)* を含めることは妥当である。 専門家統一見解
- 6. *KRAS* 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 *EGFR*、*ALK*、*ROS1* 検査が陰性であった場合は、*KRAS* を含めることは妥当である。 専門家統一見解
- 7. *MET* 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 *EGFR*、*ALK*、*ROS1* 検査が陰性であった場合は、*MET* 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. *ALK* 検査において IHC は FISH と同等の代替法である。 推奨
- 9. *EGFR*、*ALK*、*ROS1* 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、EGFR-TKI 感受性 *EGFR* 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、第三世代 EGFR-TKI 治療適応を判断するために、*EGFR* T790M 変異検査を行わなければならない。 専門家統一見解
- 13. EGFR-TKI 耐性となった患者における *EGFR* T790M 検査では、腫瘍細胞が 5% と少ない検体においても *EGFR* 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 *ALK* 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、*EGFR* 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、*EGFR* 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、EGFR やその他の遺伝子変異の同定、EGFR- 推奨度なし TKI 耐性時の EGFR 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。

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<sup>59</sup>

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<sup>60</sup>、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する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)

### 第 3.1 版から第 4.0 版への主な改定

全体：

- ・ ALK 阻害剤を、ALK 阻害薬に記載の統一
- ・ 一部の誤字、表現の微修正、記載の統一、レイアウトの修正
- ・ 図表についての引用の許諾を取得し明記

Page 3.

コンパニオン診断薬の最新情報についての参照元について追記。

Page 9.

アレクチニブの臨床試験結果についての情報をアップデートした。

Page 10.

セリチニブに関する情報をアップデート。

Page 11.

ロルラチニブに関する記載を最新の情報に基づいてアップデート。

Page 12.

ブリグチニブに関する記載を追加。

Page 14.

表 3 のレイアウト、デザインを変更。

Page 16.

IHC 法について、現時点でのコンパニオン診断薬との対応についてアップデートした。

Page 18.

「6.4 NGS 法」に各検査法の相違点やリキッドバイオプシーについての情報を追記。

Page 22.

「8. ALK 遺伝子検査のアルゴリズム」の図 11 を最新の推奨されるアルゴリズムにアップデート。

Page 23.

検査方法に関する表に「RT-PCR 法」についての記載を追記。

Page 23.

「9. ALK 検査の保険適用」の記載を最新のものにアップデート。特に NGS 法、RT-PCR 法についての記載を大幅に追加した。