

肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き

第1.0版 2009年 3月 6日

第1.7版 2009年 5月11日

第2.0版 2014年 2月11日

第2.1版 2014年 4月14日

第3.0版 2016年11月 2日

第3.05版 2016年12月 1日

第4.0版 2018年11月21日

第4.1版 2019年 1月30日

第4.2版 2019年 3月 6日

日本肺癌学会

バイオマーカー委員会

西野和美, 西尾和人, 畑中 豊, 池田貞勝, 菓子井達彦, 木村英晴, 後藤功一

阪本智宏, 里内美弥子, 清水淳市, 曾田 学, 蔦 幸治, 豊岡伸一, 松本慎吾

三窪将史, 谷田部 恭, 横瀬智之, 秋田弘俊

目次

内容

第4版の序.....	1
第3版の序.....	2
第2版の序.....	3
初版の序.....	4
要約	5
はじめに	7
I. EGFR分子とその遺伝子変異	7
1. EGFRによるシグナル伝達.....	7
2. EGFR 遺伝子変異.....	8
II. EGFR-TKI 治療	9
3. EGFR 低分子チロシンキナーゼ阻害薬.....	9
4. EGFR 遺伝子変異と EGFR-TKI 感受性.....	10
4-1. EGFR 活性型遺伝子変異 (common mutation) : エクソン 19 欠失変異と L858R 変異.....	10
4-2. まれな EGFR 遺伝子変異 (uncommon mutation).....	10
5. EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC に対する治療.....	11
5-1. 初回治療における EGFR-TKI vs. 化学療法の臨床試験.....	11
5-2. EGFR-TKI vs. EGFR-TKI の臨床試験.....	12
5-3. EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法.....	13
6. EGFR 遺伝子野生型における EGFR-TKI.....	13
7. 獲得耐性.....	13
8. 獲得耐性への治療戦略.....	14
8-1. 第三世代 EGFR-TKI 登場以前および T790M 変異陰性あるいは不明症例に対して.....	14
8-2. 第三世代 EGFR-TKI.....	15
8-3. オシメルチニブ.....	15
8-4. オシメルチニブの CNS 転移に対する効果.....	16
8-5. オシメルチニブに対する耐性機序.....	16
8-6. 第三世代 EGFR-TKI のための再生検.....	16
8-7. 免疫チェックポイント阻害薬.....	17
9. EGFR-TKI 治療とその他の効果予測因子.....	17
9-1. リガンドレベルの変化.....	17
9-2. EGFR 遺伝子増幅.....	17
9-3. 他の HER ファミリー.....	18

9-4. その他の遺伝子変化と TKI 感受性	18
III. EGFR 遺伝子変異検査	18
10. EGFR 遺伝子変異検査の対象患者	18
11. EGFR 遺伝子変異検査に用いる検査法	19
11-1. 組織検査	19
11-1-1. EGFR-TKI 投与前の初回検査	20
11-1-2. EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査	20
11-2. 血漿検査（リキッドバイオプシー検査）	21
11-2-1. EGFR-TKI 投与前の初回検査	21
11-2-2. EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査	22
12. 対象となる検体とその適正性について	23
12-1. 組織・細胞検体	23
12-1-1. FFPE 組織検体	23
12-1-2. FFPE 細胞検体（セルブロック検体）	24
12-1-3. 細胞検体	24
12-1-4. 新鮮凍結検体	24
12-2. 血漿検体	24
13. 薬事承認および保険診療の観点からみた本検査のあり方	25
13-1. T790M 血漿検査の検査回数について	25
13-2. 同一月中の T790M 血漿検査・組織検査の実施について	26
最後に	27
参考文献	28
付 録	36
付 1) 主な EGFR 変異の検出法の解説	36
第 4.2 版の改訂点	37

第4版の序

この度、「肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き」第4版が公開の運びとなった。第1版が2009年に作成された後、第2版は5年後の2014年4月に、第3版は2016年10月に公開された。今回は第3版からは2年あまりと最近のエビデンスの急速な蓄積を反映して最短間隔での改訂となった。

EGFR遺伝子は肺癌における最初のドライバー遺伝子として肺癌診療に大きなパラダイムシフトをもたらした。EGFR遺伝子変異は日本人の肺腺癌の約半数にみられるという点、日本人研究者が遺伝子検査を行って治療選択する、いわゆる今で云うところのprecision medicineの確立に大きな寄与をしたことなど、殊更われわれには感慨深い遺伝子である。

前回改訂以後の大きなEGFR肺癌研究における進歩はオシメルチニブあるいはダコミチニブが第一世代薬に比して生存期間の延長をもたらしたこと、リキッドバイオプシーの保険償還などがある。とくにオシメルチニブは中枢神経病変の有効性や毒性についても優れた点を有し、今後の第一選択薬としての大きな可能性を秘めている。また、2018年末現在、EGFR、ALK、ROS1、BRAFへの薬物が保険償還され、該当する患者に大きなベネフィットをもたらしている。このためこれらを遅滞なく診断することが重要であり、EGFR遺伝子変異検査をふくめてNGSパネル検査の臨床応用に期待があつまっている。

本手引きはEGFR遺伝子変異検査とEGFRチロシンキナーゼ阻害薬について、客観的網羅的にまとめられおり、診療のガイドとしてのみでなく、この分野の総説としても卓越した読み物となっていると信じる。本手引きが肺癌診療ガイドラインと共に臨床現場における適正な診断治療提供の一助となることを祈念する。

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

2018年11月吉日

日本肺癌学会理事長

光富徹哉

第4版執筆者

西野和美, 西尾和人, 畑中 豊, 池田貞勝, 菓子井達彦, 木村英晴, 後藤功一, 阪本智宏, 里内美弥子, 清水淳市, 曾田 学, 鳶 幸治, 豊岡伸一, 松本慎吾, 三窪将史, 谷田部 恭, 横瀬智之, 秋田弘俊

第3版の序

この度、「肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き」第3版が公開の運びとなった。第1版が2009年に作成された後、第2版は5年後の2014年4月に公開された。今回は2版からは2年半しか経っていないが、この分野の急速な進歩を反映しての改訂である。

EGFR遺伝子は肺癌における最初のドライバー遺伝子として肺癌診療に大きなパラダイムシフトをもたらした。EGFR遺伝子変異は日本人の肺腺癌の約半数にみられるという点、日本人研究者が遺伝子検査を行って治療選択する、いわゆる今で云うところのprecision medicineの確立に大きな寄与をしたことなど、殊更われわれには感慨深い遺伝子である。

前回改訂以後の大きなEGFR肺癌研究におけるブレイクスルーは、ベバシズマブの併用によるエルロチニブの無増悪生存期間(PFS)の大幅な延長、第二世代薬アファチニブがcommon EGFR mutationを有する症例でプラチナ二剤療法に対して初めて全生存期間(OS)の延長を示したこと、第三世代薬オシメルチニブの開発等があげられよう。特にオシメルチニブは第一世代EGFR-TKIにT790M二次変異で耐性となった症例に対して、ファーストラインの第一世代EGFR-TKIと同等の奏効率、PFSを示している。この薬剤を有効に使うためには耐性後の組織からこのT790M変異を効率よく見出すことが重要であることはいうまでもない。これらの進歩によって21世紀当初には1年をやや超える程度であったIV期非小細胞肺癌の生存期間は、EGFR肺癌については三年を超え四年に及ぼうとしている。2015年の暮れには免疫チェックポイント阻害剤が肺癌に承認され、今後しばらく肺癌診療体系はさらに劇的に変貌をとげ患者予後のさらなる改善が期待されている。

本手引きはEGFR遺伝子検査とEGFRチロシンキナーゼ阻害剤について、その歴史的事実から最新の知見まできわめて客観的網羅的にまとめられおり、診療のガイドとしてのみでなくこの分野の総説としても卓越した読み物となっている。

高度に複雑化し日進月歩をとげている肺癌診療を完璧に理解し患者さんに最大の利益をもたらす治療を実践し続けることは容易ではない。本手引きが肺癌診療ガイドラインと共に臨床現場における適正な診断治療提供の一助となることを祈念する。

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

2016年10月吉日

日本肺癌学会理事長

光富徹哉

第3版執筆者

西野 和美, 西尾 和人, 畑中 豊, 井上 彰, 後藤 功一, 里内美弥子, 曾田 学, 豊岡 伸一, 萩原 弘一, 谷田部 恭, 秋田 弘俊

第2版の序

この度、「肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き」第2版を公開することとなった。2009年5月に第1.7版が出されて以来、5年ぶりの改訂となる。この5年間にALK融合蛋白をはじめとして多くのdriver oncogeneが発見され、これらに対する阻害薬の開発が進んでおり、肺癌のバイオマーカーと分子標的治療研究は常に興奮に満ちている。にもかかわらず、EGFR遺伝子変異は肺癌研究の中心にあり続け、これに対するTKIは肺癌分子標的治療の主役としての位置にあり続けている。アジア人における本遺伝子の変異頻度の多さが要因の一つである。さらにEGFR-TKIはいったん奏効しても高頻度に耐性化すること、その結果耐性機序に関する研究が進捗したこと、解明された耐性機序がきわめて多岐に及ぶこと、さらに耐性を克服する治療法と治療薬が活発に開発されていること等が大きく影響している。まさにEGFR遺伝子変異研究は、学術的にも臨床的にも多くの新知見を生み出し、かつ肺腫瘍学の奥深さを具現している。

本手引きにおいては、肺癌学会の肺癌診療ガイドラインとの整合性をとりつつ実診療において本検査を実施するに際しての適応、検体の取扱、保険診療における注意点とコスト、結果の解釈など具体的な内容を示し、適正かつわかりやすい手引きとなっている。第1版よりこの作成を立案主導してきた光富徹哉理事と第2版作成に関わったバイオマーカー委員の諸氏に敬意を表すると共に、本手引きが診療ガイドラインとならんで臨床現場における適正な診断治療提供の一助となることを祈念する。

2014年3月28日

日本肺癌学会理事長

中西洋一

第2版執筆者

光富徹哉, 萩原弘一, 谷田部恭, 浦本秀隆, 井上彰, 曾田学, 後藤功一, 西尾和人, 秋田弘俊

初版の序

上皮成長因子受容体(EGFR:Epidermal Growth Factor Receptor)は膜貫通型受容体チロシンキナーゼであり、このチロシンキナーゼ領域の活性化すなわちリン酸化ががんの増殖、進展に関わるシグナル伝達に重要であると認識されている。このような観点から EGFR は癌治療の分子標的として注目され、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)や抗EGFR 抗体等が開発された。

わが国においてはEGFR-TKIの1つであるゲフィチニブが2002年7月、世界に先駆けて承認され、2007年10月には同種同効のエルロチニブも認可されている。2009年4月現在までEGFR-TKI製剤は8万5千人を超す非小細胞肺癌患者の治療に使われている。腺癌、非喫煙者を中心に劇的な効果を示す例も経験される中、科学的な効果予測因子としてEGFR遺伝子変異が最も重要な因子であると、少なくとも日本を含めたアジアでは認識されている。このような背景から2007年6月にEGFR遺伝子変異検査は保険収載されたものの本検査の実際について解説したものはなかった。

2009年2月26日の日本肺癌学会理事会において、光富徹哉理事より「肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の解説」の作成が提案され、承認後、僅か1ヶ月余で本解説が完成した。これも光富理事はじめ7名のEGFR解説作成委員の労に負うこと大であり、深甚の敬意と謝意を捧げたい。なお本書はEGFR遺伝子変異検査の解説にとどまらず、EGFR-TKIの臨床試験の結果や基礎的な最新の知見等の解説も含まれており、肺癌治療医のみならず多くの医療関係者に裨益することを期待している。

2009年5月

日本肺癌学会理事長

一瀬幸人

初版執筆者

光富徹哉, 谷田部恭, 萩原弘一, 弦間昭彦, 西尾和人, 秋田弘俊, 中川和彦

説 明								
EGFR 遺伝子 変異検査の適 応	EGFR-TKI 投与前の初回検査 ・薬物療法を考慮している肺癌患者 ・少なくとも一部は腺癌成分のある扁平上皮癌，小細胞肺癌も適応．少量の生検標本では腺癌成分がないことを否定することは難しいので検査の適応となる． ・性別，喫煙歴，人種などで検査不適応を決めない． EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査 ・EGFR-TKI 耐性となった肺癌患者							
	使用する検体	EGFR-TKI 投与前の初回検査 ・ホルマリン固定パラフィン包埋組織（FFPE）検体の使用が推奨される． ・胸水などの細胞検体は，体外診断用医薬品を用いた方法（IVD 法）では対象に含まれないが，運用上，検査に用いられている． ・新鮮凍結検体は上記の使用が困難な場合に使用を検討する． ・いずれの場合も十分な量と割合で腫瘍細胞が存在していることを確認することが必須である． EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査 ・再生検された組織検体および細胞検体での検査が可能な場合は，これら検体の使用が強く推奨される． ・再生検が不成功となった場合もしくは困難と判断される場合にのみ，血漿検体の使用を検討する．						
検出方法	検査の タイミング	本邦で承認 されている EGFR-TKI	IVD法				非IVD法	
			コバス® EGFR変異検出 キット2.0		therascreen® EGFR変異 検出キット		LDT相当法※1	
			組織 検査 ※2	血漿 検査 ※3	組織 検査 ※2	血漿 検査	組織 検査 ※2	血漿 検査
	EGFR-TKI投与前 の初回検査	ゲフィチニブ エルロチニブ アファチニブ	○	○	○	×	○	×
		ダコミチニブ	×	×	○	×	×	×
オシメルチニブ		○	○	×	×	×	×	
EGFR-TKI治療 耐性後の T790M変異検査	オシメルチニブ	○	○	×	×	×	×	
・EGFR-TKI 投与前の初回検査および EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査で使用可能な検出方法は以下の通りである． ※1. 遺伝子関連検査の質保証体制（ http://www.jrcla.or.jp/info/info/250726.pdf 参照）が十分に整備され，また検査に係る特許等に対する実施許諾（ライセンス）等の対応がなされている場合には，非 IVD 法の使用は可能である．具体的には，国内の主要検査センターで実施され，米国 CLIA ラボの LDT 法に相当すると判断される検査法はこれに該当する． ※2. D004-2 悪性腫瘍組織検査 1 悪性腫瘍遺伝子検査 イ EGFR 遺伝子検査（リアルタイム PCR 法）2,500 点，□ EGFR 遺伝子検査（リアルタイム PCR 法以外）2,100 点が適用される．IVD 法は，「イ」を，非 IVD 法は，「□」を適用する． ※3. D006-12 EGFR 遺伝子検査（血漿）2,100 点								

<p>検出対象となる変異</p>	<p>臨床的意義が明らかとなっている以下の変異タイプは、EGFR 変異検査の検出対象とすべきである。</p> <p>①活性型変異であることが既知のもの</p> <ul style="list-style-type: none"> ・エクソン 19 欠失変異, L858R 変異 (最も良い適応) ・ G719X 変異, L861Q 変異, S768I 変異 (薬剤により感受性が異なる) <p>②抵抗性変異であることが既知のもの</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ T790M 変異 (二次的の場合は第三世代 EGFR-TKI の適応) ・ エクソン 20 挿入変異 <p>すべての EGFR 変異が、EGFR-TKI の効果を予測するものではない。意義不明の変異は多数あるが、その頻度はまれである。</p>
<p>EGFR-TKI の使用</p>	<p>肺癌診療ガイドラインを参考にする。</p>

はじめに

上皮成長因子受容体 (EGFR) 特異的なチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) であるゲフィチニブ (イレッサ®) が本邦において 2002 年 7 月に承認され, 化学療法の不応例にもしばしば劇的な臨床症状および画像上の改善をもたらしてきた。2004 年の春に EGFR 遺伝子変異 (以下 EGFR 変異) のある非小細胞肺癌 (NSCLC) においてゲフィチニブの感受性が高いことが発見され, これを機に EGFR-TKI の研究はおおいに加速することとなった^{1,2}。2007 年 10 月にはエルロチニブ (タルセバ®) が, 2014 年 1 月には第二世代の EGFR-TKI であるアファチニブ (ジオトリフ®) が本邦で承認された。

一方, EGFR-TKI は EGFR 変異陽性 NSCLC に優れた抗腫瘍効果を示すものの, その後治療抵抗性 (耐性) となり, T790M 変異が EGFR-TKI 耐性例の約半数の症例で認められる^{3,4}。2016 年 3 月に, 「EGFR-TKI に抵抗性の EGFR T790M 変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌」に対し, オシメルチニブ (タグリッソ®) が承認された。これにともない, EGFR-TKI 耐性時の再生検や, 耐性時の T790M 変異および初回診断時 EGFR 変異の血漿検査の承

認など様々な変化が起こってきた。そして 2018 年 8 月に, オシメルチニブ (タグリッソ®) の EGFR 変異陽性 NSCLC に対する一次治療適応拡大が承認され, 2019 年 1 月にはダコミチニブ (ビジンプロ®) が本邦で承認された。

この手引きは肺癌臨床に携わる医師のために 2009 年に作成され, 2014 年 2 月に第 2 版, 2016 年 11 月に第 3 版の改訂を行った。前回改訂後 2 年ではあるが, 日本肺癌学会バイオマーカー委員会ではこの領域の急速な進歩に鑑み, 2018 年 11 月に手引きの第 4.0 版への改訂を行い, 今回第 4.2 版への小改訂を行った。

I. EGFR 分子とその遺伝子変異

1. EGFR によるシグナル伝達

EGFR は HER ファミリーとよばれる 4 つのレセプター分子族の一員であり, EGFR/HER1/erbB1, HER2/neu/erbB2, HER3/erbB3, HER4/erbB4 の 4 つの分子からなっている。HER ファミリーの増殖因子 (リガンド) は 11 種知られているが, EGFR に特異的に結合するグループ (EGF, TGF α , amphiregulin (AR)), EGFR と

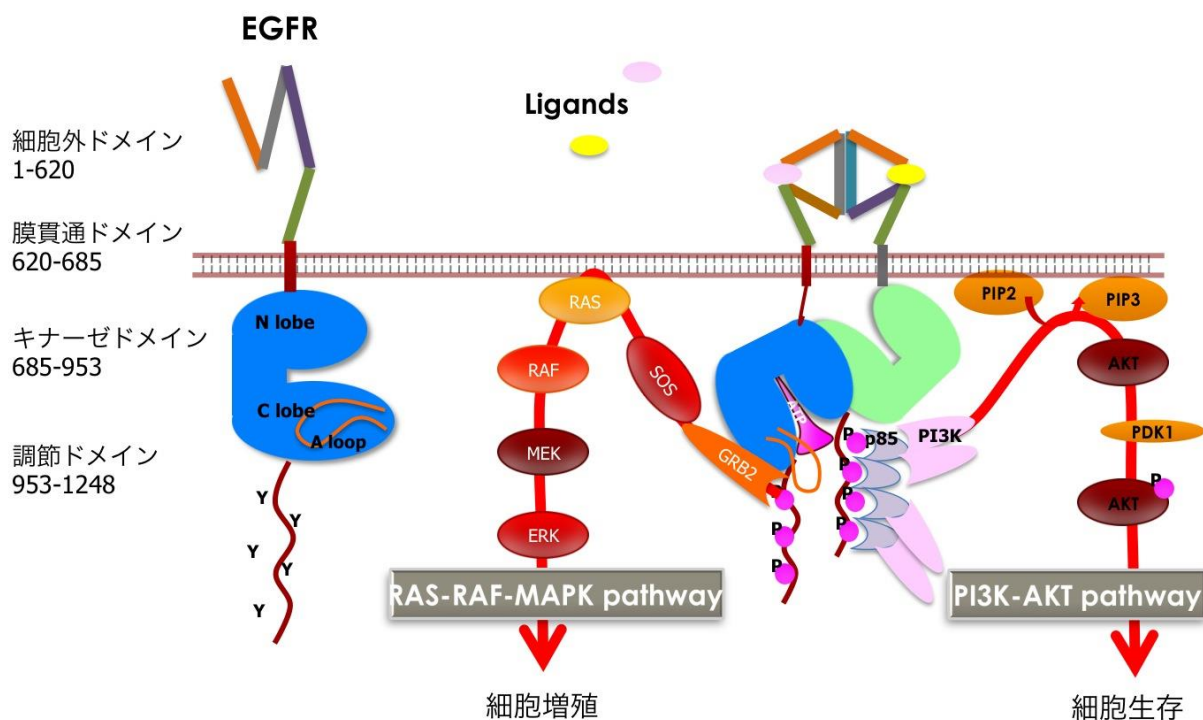


図 1. EGFR 経路

上皮増殖因子受容体 (EGFR) は細胞膜を貫通する受容体タンパク質である。チロシンキナーゼは N lobe と C lobe よりなり二つの lobe の間の cleft に ATP が結合する。EGFR-TKI はこの部において ATP と競合阻害する。受容体に増殖因子 (リガンド) が結合すると, 図に示すような非対称的な二量体 (ダイマー) 形成がおこり, ATP のリン酸が調節ドメインのチロシン残基に移される。このリン酸化チロシンに種々のタンパク質が結合していき次々と下流のタンパク質が活性化されていく。とくに重要なのが図に示した RAS-RAF-MAPK 経路と PI3K-AKT 経路である。

HER4 に結合するグループ (betacellulin (BTC)), heparin-binding EGF (HB-EGF), epiregulin), HER3, HER4 に結合するグループ (neuregulin (NRG) (別名 heregulin)) の三つに大別できる。HER2 には対応するリガンドがないが、常にリガンドが結合して活性化した状態に類似の構造をとっており、後述するダイマーの相手として選ばれやすい。一方、HER3 はアミノ酸の置換によってチロシンキナーゼ活性を失っているが、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の調節サブユニットである p85 の結合部位を多く有しておりダイマーの相手として、特に細胞生存に関わるシグナル伝達に重要である^{5,6}。

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

2. EGFR 遺伝子変異

EGFR は NSCLC をはじめとする多くの固形癌で過剰発現しており、がんの増殖シグナル伝達の起点となることが知られている⁷⁻⁹。

2002 年 7 月に本邦で初めて承認された EGFR-TKI であるゲフィチニブは NSCLC に対して優れた抗腫瘍効果を示すが、その抗腫瘍効果の詳細な機序について当初不明であった。2004 年に EGFR チロシンキナーゼドメインの変異がゲフィチニブの奏効率が高かった NSCLC に多くみられることが報告され、また in vitro でもゲフィチニブの感受性との関連が証明された^{1,2}。2016 年 5 月までに約

16000 例の EGFR 変異が COSMIC (the catalogue of somatic mutations in cancer) データベースに登録され、594 種類の EGFR 変異が報告されている。そのほとんど (93%) が細胞内のチロシンキナーゼドメインの中でもエクソン 18-21 の領域に集中している。特に頻度が高いものはエクソン 19 のコドン 746-750 の 5 つのアミノ酸 (ELREA) を中心とする部位の欠失変異とエクソン 21 のコドン 858 においてロイシンからアルギニンに変化する (L858R) 点突然変異であることがわかる (図2)¹⁰。エクソン 19 欠失変異には欠失アミノ酸の個数や、アミノ酸置換を伴うものなど、非常に多くのバリエーションがあるが、E746-A750 の単純欠失が最も多く、L747-E753 欠失に S が挿入されたもの、L747-E751 欠失、L747-E750 欠失に P が挿入されたものなどが続いている。その他エクソン 18 のコドン 719 の点突然変異 (G719X, アミノ酸が A, C, S の場合がありまとめて X と表す)、E709X, エクソン 20 の挿入変異, S768I, エクソン 21 の L861Q などのまれな遺伝子変異 (uncommon mutation) が認められる。これらの EGFR 変異型の内、機能的に EGF や TGF α などのリガンドの刺激がない場合でも下流の増殖シグナル経路にリン酸化シグナルを送り続ける変異型は、活性型変異と呼ばれる。

2005 年に Shigematsu らが、2007 年に Mitsudomi らが EGFR 変異は東洋人、女性、非喫煙者、腺癌に多くみられることを報告した^{11,12}。2013 年の NSCLC の EGFR 変異発現頻度をみたメタアナリシス (mutMAP) によるとその頻度は、アジア人 (腺癌の 47.9%, 扁平上皮癌の 4.6%), 西洋人 (腺癌の 19.2%, 扁平上皮癌の 3.3%), 既-重喫煙者 (8.4-35.9%), 非-軽喫煙者 (37.6-62.5%) であった¹³。2015 年にはさらに大規模なメタアナリシスの結果 (muMAPII: a global EGFR mutMAP) が報告され、日本人の腺癌の EGFR 変異の頻度は 45% (21-68%) であった¹⁴。組織学的には腺癌に多いが、未分化な腺癌で大細胞癌とも見なされるような症例、腺扁平上皮癌、小細胞癌 (とくに腺癌との combined type) などでも EGFR 変異はしばしば検出される。腺癌の亜型別にみると TTF-1 やサーファクタントを発現しているような肺癌に頻度が高い (50-65%)¹⁵。腺癌 200 例の解析で EGFR 変異陽性腺癌の IASLC/ATS/ERS 分類による subtype は acinar predominant (43/77 ; 55.8%) と papillary

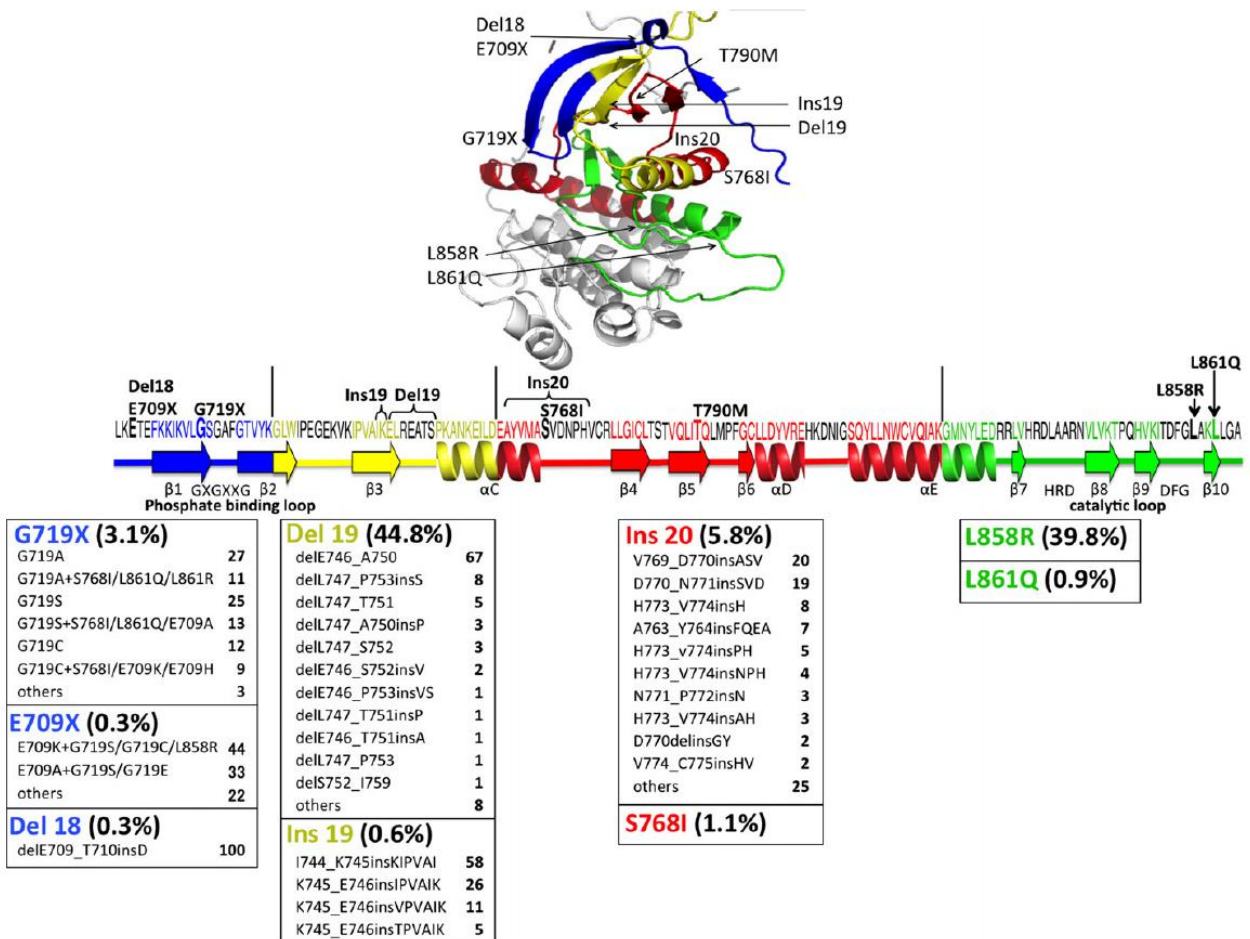


図 2. EGFR 遺伝子変異の種類と頻度
最近の大規模な研究の編集による肺癌における上皮増殖因子受容体 (EGFR) タンパク質の構造と EGFR 遺伝子変異の頻度。代表的な遺伝子変異の各コドンは、EGFR キナーゼドメインのタンパク質配列にマッピングしている。エクソン 18, 19, 20 及び 21 のコドンは、それぞれ青色, 黄色, 赤色と緑色で示している。スパイラル構造は、 α -ヘリックスを、太い矢印は、 β -シートを示している。
Reproduced with permission from [10] © Wiley (2016).

predominant (26/49 ; 53.1%) が多いと報告されている。また 200 例中 3 例が lepidic predominant で全例が EGFR 変異陽性であった¹⁶。

II. EGFR-TKI 治療

3. EGFR 低分子チロシンキナーゼ阻害薬

現在、臨床で使用されている EGFR-TKI には第一世代の EGFR 特異的可逆的 TKI であるゲフィチニブ (イレッサ®), エルロチニブ (タルセバ®) と EGFR/HER2/HER4 を不可逆的に阻害する第二世代のアファチニブ (ジオトリフ®), そして第三世代 EGFR-TKI としてオシメルチニブ (タグリッソ®) がある。オシメルチニブは、EGFR 活性型変異および EGFR T790M 変異に対して選択的かつ不可逆的に作用する EGFR-TKI である¹⁷。

第一および第二世代の EGFR-TKI の一般的な副作用としては、主に皮膚障害、爪囲炎、下痢などが多い¹⁸。一方、オシメルチニブは EGFR 活性型変異と T790M 変異に対しても作用するが、野生型 EGFR への作用は限定的となるよう開発された薬剤であるため皮膚障害、爪囲炎、下痢が発現しても軽度である^{19, 20}。重篤な副作用として頻度は少ないが薬剤性肺障害 (ILD) があげられる。Sue C.H. らの NSCLC 患者における EGFR-TKI 関連 ILD に関するメタアナリシスでは、初回 EGFR-TKI 治療で 1.12%, 再投与で 1.13% の ILD 発現頻度である。しかし日本人コホートでの ILD 発現率は日本人以外と比較して極めて高く、重篤でもある (全グレード ; 4.77% vs 0.55%, $p < 0.001$, 高グレード ; 2.49% vs 0.37%, $p < 0.001$, グレード 5 ; 1.00% vs 0.18%, $p < 0.001$)²¹。またタグリ

ツソ®の使用成績調査の結果から、オシメルチニブのILD発現頻度は6.8% (245症例/3578症例)で、ILD発現に関する多変量ロジスティック回帰モデル解析結果では「間質性肺疾患の病歴」と「ニボルマブ前治療歴」が有意なリスク因子と示唆された²²。一方、オシメルチニブ治療中に20例中7例(30%)に一過性無症候性のすりガラス陰影が出現し、治療継続中に改善したとの報告もあり、ILDかどうかの判断も慎重になされるべきである²³。

4. EGFR 遺伝子変異とEGFR-TKI感受性

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

4-1. EGFR 活性型遺伝子変異 (common mutation) : エクソン 19 欠失変異と L858R 変異

EGFR 活性型変異 (common mutation) のこれまで報告されている頻度はエクソン 19 欠失変異 44.8% (2573/5741)、L858R 変異 39.8% (2283/5731) である^{10, 25-29}。いずれもEGFR-TKIに高い感受性を示すが、変異のサブタイプによって有効性が異なる。EGFR変異を有する進行NSCLC患者を対象とした12の臨床試験の統合解析において、EGFR-TKI治療による無増悪生存期間(PFS)と全生存期間(OS)と奏効割合(ORR)に関して、エクソン19欠失変異がL858R変異にくらべて有意に良好であった: PFS (hazard ratio (HR) =0.69; 95% CI, 0.57-0.82; $p < 0.001$)、OS (HR=0.61; 95%CI, 0.43-0.86; $p=0.005$)、ORR (odds ratio, 2.14; 95%CI, 1.63-2.81; $p < 0.001$)。またEGFR変異別の臨床的背景との関連において、L858R変異と比較し、エクソン19欠失変異のほうが有意に若年者に多く、喫煙歴のある割合が高かった³⁰。

分子構造上、エクソン19欠失変異はATP結合部位のループから3-8残基が欠失しており、一方L858R変異は

ATP結合部位から離れて存在しているためにEGFR-TKIに対する効果が異なると考えられている³¹。エクソン19欠失変異は、 α -ヘリックスで残基が欠失した結果、チロシンキナーゼドメインの必須残基の構造変化がおり、EGFR-TKIに対する感受性がL858R変異と比べより高いと考えられる³²。またL858R変異は二量体を形成しないと活性化しないが、エクソン19欠失変異は単体の状態でも下流シグナルが活性化されるという報告³³や二量体形成後の自己リン酸化部位が異なり、それに続く下流へのシグナル伝達が異なるという報告も認める³⁴。これらの分子生物学的な違いが、EGFR-TKIに対する効果に影響している可能性が示唆される。

4-2. まれな EGFR 遺伝子変異 (uncommon mutation)

まれなEGFR変異として、エクソン18のコドン719の点突然変異(G719X)、E709X、エクソン18欠失変異、エクソン19の挿入変異、エクソン20の挿入変異、S768I、エクソン21のL861Qなどがある。エクソン20の挿入変異の頻度はEGFR変異の5.8%で^{10, 35-38}、ORRは第一世代EGFR-TKIに対し17%³⁷⁻⁴¹、アファチニブに対して10%と効果が乏しい^{42, 43}。しかしながらオシメルチニブに奏効するサブタイプも報告されている⁴⁴。G719Xは第一世代EGFR-TKIに対するORRは32%であるのに対し、LUX-Lung 2, 3, 6試験の統合解析ではアファチニブに対するORRは78%と良好であった^{10, 43}。S768IとL861Qは第一世代EGFR-TKIに対しそれぞれ、42%、39%のORRで¹⁰、アファチニブに対しそれぞれ100%、56%のORRであった⁴³。

Kohsakaらはmixed-all-nominated-mutants-in-one (MANO)法を開発し、この方法を用いてEGFRの多くの意義不明の変異(variants of unknown significance; VUS)の中から形質転換能力とそれらのEGFR-TKIに対する感受性を評価した。この結果、エクソン19内のゲフィチニブおよびエルロチニブ非感受性ミスセンス変異、ならびにL833V、A839T、V851I、A871TおよびG873Eなど、EGFR-TKI耐性にかかわる突然変異が同定され、L858R変異の12.8%がcompound mutationsを有し、ゲフィチニブの初期耐性に関与している可能性について報告した⁴⁵。

5. EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC に対する治療

EGFR 変異陽性に限定しない NSCLC に対する EGFR-TKI の第 III 相比較試験では、negative な結果が続いた。まず、EGFR-TKI の標準化学療法への上乗せ効果および延命効果をみた四つの臨床試験 (TALENT⁴⁶, INTACT1⁴⁷, INTACT2⁴⁸, TRIBUTE⁴⁹) ではいずれも negative な結果であった。次いで、既治療進行 NSCLC に対するゲフィチニブ (ISEL 試験⁵⁰) あるいはエルロチニブ (BR.21 試験⁵¹) と best supportive care の比較試験が行われたが、BR.21 試験のみエルロチニブの延命効果を示した。

セカンドライン以降でのドセタキセルとの比較試験において、国内の V15-32 試験はゲフィチニブの非劣性が証明されず⁵², 海外での INTEREST 試験ではゲフィチニブのドセタキセルに対する非劣性が証明された⁵³。

これらの混沌とした状況に終止符を打ったのは、アジアで行われたカルボプラチン+パクリタキセル対ゲフィチニブの第 III 相試験 IPASS⁵⁴ である。本試験では、非喫煙歴の腺癌症例を対象にゲフィチニブの PFS における優越性が検証されたが、試験全体において統計学的にはゲフィチニブの優越性が示されたものの、両群の PFS 曲線が交差する解釈が難しい結果が示された。しかし、

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

5-1. 初回治療における EGFR-TKI vs. 化学療法の臨床試験

IPASS や韓国で行われた First-Signal 試験⁵⁵ のような臨床的背景因子 (腺癌, 非喫煙者) ではなく、EGFR 変異陽性 NSCLC に対するゲフィチニブの効果を検証する第 III 相臨床試験は、まずわが国から世界に先駆けて 2 つ報告された。NEJ002 試験⁵⁶ と WJTOG3405 試験⁵⁷ は、ともにゲフィチニブを試験治療群とし、標準治療群を前者はカルボプラチン+パクリタキセル、後者はシスプラチン+ドセタキセルとした。いずれの試験においても、PFS ではゲフィチニブ群が優越性を示し、OS については両群間で差を認めなかった^{56, 57}。これは 2 次治療以降のクロスオーバーによるもので、WJTOG3405 試験の生存期間中央値 (MST) は 36 か月を超える長いものであった (表 1)。その後、エルロチニブとプラチナ併用療法との比較試験として中国から OPTIMAL 試験⁵⁸, 欧州からは EURTAC 試験⁵⁹ が報告され、PFS および ORR ともにエル

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

Study (n)	レジメン	適格条件	奏効率 (%)	PFS (月)	HR (95% CI) p < 0.0001	OS (月)	HR (95% CI)
IPASS (n=261)	Gefitinib vs. CBDCA/PTX	Ex19/L858R+ Others	71 vs. 47	9.5 vs. 6.3	0.48 (0.36-0.64) p < 0.0001	21.6 vs. 21.9	1.00 (0.76-1.13)
First-SIGNAL (n=42)	Gefitinib vs. CDDP/GEM	Ex19/L858R	85 vs. 38	8.0 vs. 6.3	0.54 (0.27-1.1)	27.2 vs. 25.6	1.04 (0.50-2.2)
NEJ002 (n=228)	Gefitinib vs. CBDCA/PTX	Ex19/L858R + others (6%)	74 vs. 31	10.8 vs. 5.4	0.30 (0.22-0.41) p < 0.001	27.7 vs. 26.6	0.89 (0.63-1.24)
WJTOG3405 (n=172)	Gefitinib vs. CDDP/DTX	Ex19/L858R	62 vs. 32	9.6 vs. 6.6	0.56 (0.41-0.77) p < 0.0001	34.8 vs. 37.3	1.25 (0.88-1.78)
EURTAC (n=174)	Erlotinib vs. CDDP or CBDCA/DTX or GEM	Ex19/L858R	61 vs. 18	9.7 vs. 5.2	0.37 (0.25-0.54) p < 0.0001	22.9 vs. 19.6	0.92 (0.63-1.35)
OPTIMAL (n=165)	Erlotinib vs. CBDCA/GEM	Ex19/L858R	83 vs. 36	13.7 vs. 4.6	0.16 (0.11-0.26) p < 0.0001	22.8 vs. 27.2	1.19 (0.83-1.71)
ENSURE (n=217)	Erlotinib vs. CDDP/GEM	Ex19/L858R	63 vs. 34	11 vs. 5.6	0.42 (0.27-0.66) p = 0.0001	26.3 vs. 25.5	0.91 (0.63-1.31)
LUX-lung 3 (n=345)	Afatinib vs. CDDP/PEM	Ex19/L858R+ Others (11%)	56 vs. 23 (61 vs. 22)*	11.1 vs. 6.9 (13.6 vs. 6.9)*	0.58 (0.43-0.78) [0.47 (0.34-0.65)]* p = 0.001	28.2 vs. 28.2	0.88 (0.66-1.17)
LUX-lung 6 (n=363)	Afatinib vs. CDDP/GEM	Ex19/L858R+ Others (11%)	74 vs. 31	11.0 vs. 5.6	0.28 (0.20-0.39) p < 0.0001	23.1 vs. 23.5	0.93 (0.72-1.22)

* exon 19 欠失変異と L858R 変異のみ (n=308)

ロチニブの優越性が示された。さらにアファチニブとプラチナ併用療法との第 III 相臨床試験が行われた。LUX-Lung 3 試験⁶⁰ではシスプラチン+ペメトレキセド群と LUX-Lung 6 試験⁶¹ではシスプラチン+ゲムシタビン群との比較が行われ、主要評価項目の PFS では、両試験において化学療法群に対するアファチニブ群の有意な延長効果を認めた(表 1)。2015 年に LUX-Lung 3 試験と LUX-Lung 6 試験の OS の統合解析の結果が報告され、EGFR 活性型変異 (common mutation) においてアファチニブ群が化学療法群に対して有意に OS を延長することが示された (HR=0.81)⁶²。この統合解析において EGFR 変異のサブタイプにより治療効果が異なることが注目された。エクソン 19 欠失変異においてはアファチニブ群で有意な OS の延長 (HR=0.59) を認めた。一方、L858R 変異では有意差はないものの、化学療法群で良い傾向が見られた⁶²。LUX-Lung 3 試験の日本人サブグループ解析でも同様にエクソン 19 欠失変異ではアファチニブ群で有意な OS の延長を認めた⁶³。いずれの臨床試験も EGFR 変異陽性例に対しては EGFR-TKI が初回治療として有意に優れた PFS の延長効果を示し、オシメルチニブの一次治療適応拡大承認までは第一世代・二世 EGFR-TKI は初回標準療法とされていた(表 1)。

5-2. EGFR-TKI vs. EGFR-TKI の臨床試験

第一および第二世代の EGFR-TKI の効果の優劣は 2017 年までは明らかではなく、皮疹や下痢などの有害事象の頻度としてはゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブの順で多くなることが知られている。一方、肝機能障害はゲフィチニブに多い¹⁸。それらの有効性と安全性のバランスを含めた優劣の判断には head to head の前向き比較試験での結果が重要とされた。

腺癌を対象に 2 次治療以降でエルロチニブとゲフィチニブを比較する第 III 相比較試験 (WJOG5108L 試験) が行われ、主要評価項目である PFS においてゲフィチニブのエルロチニブに対する非劣勢は証明されず、EGFR 変異全体・エクソン 19 欠失変異・L858R 変異いずれのサブグループ解析においても有意差を認めなかった⁶⁴(表 2)。ゲフィチニブとアファチニブとの第 IIb 相比較試験(LUX-Lung 7 試験)の結果が報告された。LUX-Lung 7 試験では主要評価項目である PFS と time-to-treatment failure がアファチニブ群において有意に延長したが⁶⁵、OS には差がなかった⁶⁶(表 2)。この試験においては LUX-Lung 3 試験と LUX-Lung 6 試験の統合解析結果⁶²と異なり、L858R を有する患者においても、アファチニブ群において PFS や奏効率はエクソン 19 欠失変異と同様に良好な結果であったが、あくまでも第 IIb 相比較試験のサブグループ解析である。

また第二世代 EGFR-TKI であるダコミチニブとゲフィチニブとの第 III 相比較試験 (ARCHER 1050) においては主要評価項目である PFS と副次評価項目である OS がダコミチニブ群において有意に延長した^{67,68}(表 2)。しかし中枢神経系 (CNS) 転移を除外した患者集団の結果であり、66%の患者にダコミチニブの減量が必要となった有害事象が課題と思われる。なお、本試験における患者の組み入れに際して実施された EGFR 変異検査には、キアゲン社の Therascreen EGFR 変異検出キット RGQ「キアゲン」等が使用され、同キットがコンパニオン診断薬として使用されている。

これら EGFR-TKI 同士の臨床試験に決定打を放ったのが第三世代のオシメルチニブと第一世代 EGFR-TKI のゲフィチニブあるいはエルロチニブとの第 III 相比較試験

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

Study (n)	Phase	line	レジメン	適格条件	奏効率 (%)	PFS (月)	HR (95%CI)	OS (月)	HR (95%CI)
WJOG 5108L (n=561, *EGFR変異; n=401)	III	2 nd 以降	Gefitinib vs. Erlotinib	腺癌 → *Ex19/L858R + Others	*58.9 vs. 55.0	*8.3 vs. 10.0	*1.093 (0.879-1.358) p = 0.424	*26.5 vs. 31.4	*1.189 (0.900-1.570) p = 0.221
LUX-Lung 7 (n=319)	IIb	1 st	Afatinib vs. Gefitinib	Ex19/L858R	72.5 vs. 56.0	11.0 vs. 10.9	0.74 (0.57-0.95) p = 0.0178	27.9 vs. 24.5	0.86 (0.66-1.12) p = 0.2580
ARCHER 1050 (n=452)	III	1 st	Dacomitinib vs. Gefitinib	Ex19/L858R	75 vs. 72	14.7 vs. 9.2	0.59 (0.47-0.74) p < 0.0001	34.1 vs. 26.8	0.76 (0.582-0.993) p = 0.044
FLAURA (n=172)	III	1 st	Osimertinib vs. Gefitinib/Erlotinib	Ex19/L858R	80 vs. 76	18.9 vs. 10.2	0.46 (0.37-0.57) p < 0.001	NR	NR

* EGFR 変異陽性の 401 名の解析

(FLAURA 試験)である。オシメルチニブ群において PFS が有意に延長し、脳転移症例にも有効で、Grade3 以上の毒性も有意に少なかった^{20, 69}。この試験でのオシメルチニブの有効性および忍容性から、オシメルチニブはEGFR 変異陽性 NSCLC の初回標準治療となった(表2)。

しかしながらオシメルチニブと第二世代 EGFR-TKI の直接比較試験がなされていないこと、また FLAURA 試験での OS の結果がまだ不明であるため、今後これらの結果が待たれるところである。

5-3. EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法

また、近年では EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法を検討した臨床試験での報告が相次いでいる。エルロチニブ+ペバシズマブの JO25567 試験⁷⁰では PFS は良好であったが OS には差がなかった⁷¹。ゲフィチニブ+ペバシズマブの OLCSG1001 試験⁷²、ゲフィチニブ+ペメトレキセドの JMIT 試験⁷³、ゲフィチニブ+カルボプラチン/ペメトレキセドの NEJ005/TCOG0902 試験⁷⁴などで EGFR-TKI と他の薬剤の併用療法について報告されている。しかしこれらの試験はすべて第 II 相臨床試験である。EGFR-TKI と他の薬剤との併用療法を検討した第 III 相臨床試験として EGFR 変異を有する未治療進行 NSCLC に対するゲフィチニブ単独療法とゲフィチニブ/カルボプラチン/ペメトレキセド併用療法とを比較する NEJ009 試験では併用療法群において PFS と OS とともに有意に延長した⁷⁵。併用療法群の OS 中央値が 52.2 カ月と驚くべき結果であった。エルロチニブ/ペバシズマブ併用療法とエルロチニブ単剤療法を比較する NEJ026 試験では併用療法群において PFS は有意に延長したが OS の結果はまだ出ていない⁷⁶。

6. EGFR 遺伝子野生型における EGFR-TKI

一方、BR. 21 試験の結果からは EGFR 変異陰性例(野生型)であっても EGFR-TKI の有用性があると認識され⁵¹、エルロチニブについては EGFR 野生型 NSCLC の二次治療以降の選択肢の 1 つとされてきた。しかし EGFR 野生型 NSCLC を対象とした第 III 相試験(TAILOR 試験)では、エルロチニブは、ドセタキセルよりは明らかに劣る結果が示されている⁷⁷。また本邦でもプラチナ製剤治

療歴のある進行 NSCLC を対象とし、2, 3 次治療でのドセタキセルとエルロチニブを比較する第 III 相試験(DELTA 試験)が報告され、サブセット解析ではあるが EGFR 野生型 NSCLC に対してドセタキセル群は有意に PFS が良好であった⁷⁸。このため EGFR 変異陰性もしくは不明におけるエルロチニブ単剤は有効性と間質性肺障害のリスクなどから推奨するだけの根拠が明確でなく、日本肺癌学会の肺癌診療ガイドラインにおいても「推奨なし」とされている⁷⁹。

7. 獲得耐性

EGFR 変異陽性進行 NSCLC の 1 次治療において EGFR-TKI を投与すると約 1 年で多くの患者に耐性の獲得が認められる。耐性化した症例の 50-60%で、EGFR 遺伝子エクソン 20 領域での T790M 変異(コドン 790 におけるトレオニンからメチオニンへの変異)を認める^{3, 4, 80-82}。ゲートキーパー変異と呼ばれるこのような変異が起ると、EGFR の ATP への結合性が高まる結果、EGFR-TKI の EGFR への結合が低下することが耐性化の原因であり、癌細胞の EGFR 依存性はまだ保たれているので異なった結合プロファイルをもつ EGFR-TKI は有効であることが期待される(図3)。

その他の耐性メカニズムとしては MET 増幅^{80, 82-84}、HGF 過剰発現⁸⁵、HER2 (ERBB2) 増幅⁸⁶、CRKL 遺伝子増幅⁸⁷、PIK3CA 変異⁸²、BRAF 変異⁸⁸、MAPK1 増幅⁸⁹、PTEN 発現喪失^{90, 91}などがある。さらに、5-10%の頻度で小細胞肺癌(SCLC)形質転換^{80, 82}も報告されており、EGFR-TKI 治療前に Rb と p53 の両方に不活化のある EGFR 変異陽性 NSCLC の場合、SCLC 形質転換リスクが 43 倍高い⁹²。また上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)^{82, 93-96}の関与も示され、そのメカニズムとしては、AXL 活性化⁹⁷、MED12 発現低下⁹⁸、TGF β -IL6⁹⁹等が報告されている(図3)。

8. 獲得耐性への治療戦略

8-1. 第三世代 EGFR-TKI 登場以前および T790M 変異陰性あるいは不明症例に対して

1~2 レジメンの化学療法歴があり、第一世代 EGFR-TKI を 12 週以上投与されて PD となった患者を対象として、第二世代 EGFR-TKI のアファチニブとプラセボを比較した第 IIb/III 相試験 (LUX-Lung 1) では主要評価項目の OS はプラセボ群と比較して有意な延長は認められなかった¹⁰⁰。この結果よりアファチニブは第一世代 EGFR-TKI 耐性例では無効であった。

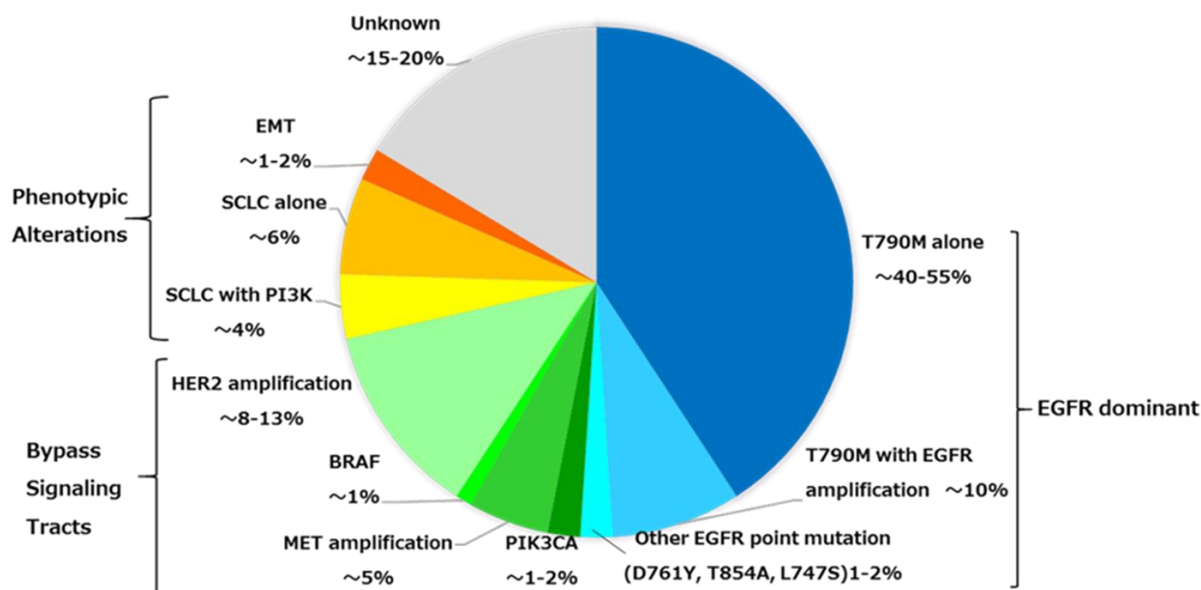
増悪後にも EGFR-TKI を継続しながら化学療法を併用する治療戦略 (Beyond PD) が理論上は有効とされており¹⁰¹、ゲフィチニブ治療中の増悪時にシスプラチン+ペメトレキセドを追加することの意義を検証する第 III 相試験 (IMPRESS 試験) が実施された。結果は両群とも PFS は変わらず、OS はゲフィチニブの Beyond PD を行わないほうが良いというものであった¹⁰²。また IMPRESS 試験の血漿バイオマーカー解析で、血漿 T790M 陽性の患者に対しては、2 次治療でプラチナ併用療法を行う際に、ゲフィチニブは併用すべきではないことが示された。一方で、PD 時点で血漿 T790M 変異陰性の患者に対しては、

化学療法にゲフィチニブを併用することでベネフィットが得られる可能性も示唆されている¹⁰³。

1 次治療としてエルロチニブ治療を実施中に RECIST PD と判定された後もエルロチニブを継続投与することの臨床的意義を検討する目的で実施された第 II 相試験 (ASPIRATION 試験) では、PFS の差は 3.1 カ月であった¹⁰⁴。Beyond PD 継続により次治療に移行できない可能性を回避するためにも、RECIST PD より 3 か月以内での次治療への切り替えを検討する必要があるかもしれない。

日本の多施設共同、プロスペクティブ、コホート試験である CSPOR LC-02 試験において、EGFR-TKI の一次治療を受けた EGFR 変異陽性の進行・再発 NSCLC 患者での RECIST PD 後の治療の実態と、EGFR-TKI 治療中止後の臨床経過が調査された。進行によって何らかの臨床症状を有する場合や複数個所での増大、主要臓器を脅かすものを臨床的悪化 (clinical PD) と定義して、それに至るまでの期間を評価した。RECIST PD から clinical PD まで継続した患者と RECIST PD の時点で中止した患者では RECIST PD 後の OS に大きな差はみられなかった。ただし多変量解析にて、RECIST PD 後も臨床症状が安定している患者の中で女性、PS 良好、そして Ex19 欠失変異の患者などは beyond PD での EGFR-TKI の継続することで良好な OS を認めた¹⁰⁵。

図3. EGFR-TKIsに対する獲得耐性のメカニズム



日本肺癌学会バイオマーカー委員会作成

EGFR-TKI 耐性に対し、アファチニブと抗 EGFR 抗体であるセツキシマブを併用した第 I b 相臨床試験で良好な結果が報告された¹⁰⁶。T790M 変異陽性群・陰性群に明らかな効果の差は認めなかった。しかし皮疹と下痢などの毒性が強く、EGFR-TKI 耐性例ではなく、EGFR 変異陽性 NSCLC の初回治療でのアファチニブ単剤に対するアファチニブ+セツキシマブ併用療法の効果を検証する第 II 相試験 (ACE-Lung) が現在行われている。

現時点では、一次治療で EGFR-TKIs を投与されて耐性または増悪後、T790M 変異陰性の症例には二次治療として細胞傷害性抗癌薬が選択される (推奨度 1A)⁷⁹。

8-2. 第三世代 EGFR-TKI

T790M 変異を標的とした第三世代 EGFR-TKI が開発され、EGFR-TKI 耐性後の T790M 変異陽性例に対する臨床試験の有用性が報告されてきた。

その中でも、最初にオシメルチニブが EGFR 変異陽性の EGFR-TKI 耐性後の T790M 変異陽性 NSCLC に対し 2015 年 11 月に FDA (アメリカ食品医薬品局) で、2016 年 2 月に EMA (欧州医薬品庁) で承認された。本邦において 2016 年 3 月に「EGFR-TKI に抵抗性の EGFR T790M 変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌」に対しオシメルチニブ (タグリッソ®) が承認された。

その他の第三世代 EGFR-TKI として、ロシレチニブは、効果と毒性の問題で Clovis Oncology 社が欧米での承認申請を撤回し、開発を中止した。オルムチニブ (olmutinib) は EGFR-TKI 耐性後 T790M 変異陽性 EGFR 変異陽性 NSCLC に対する第 I/II 相試験で ORR 56%、PFS 中央値 8.3 カ月と良好な結果であった¹⁰⁷。2016 年に韓国でオルムチニブは一旦は承認されたが、開発段階での 2 例の中毒性表皮壊死症 (TEN) と 1 例のステーブンス・ジョンソン症候群の重症皮疹の有害事象について報告が適切にされず、すでに開発は中止され、保険償還リストからも除外された。ASP8273 も毒性のために開発が中止された。その他の第三世代 EGFR-TKI として、Avitinib, EGF816, PF-06747775 や YH5448 などが開発されている。

8-3. オシメルチニブ

オシメルチニブは EGFR キナーゼドメインの ATP 結合部位の C797S に共有結合することで不可逆的に結合する¹⁷。オシメルチニブは 特徴的な分子構造を有することで従来の EGFR-TKI とは異なる EGFR への阻害プロファイルを発揮するようデザインされており、EGFR 活性型変異及び T790M 変異の両方を有する EGFR に選択的に作用するが、野生型 EGFR への作用は限定的である¹⁰⁸。このため T790M 変異を有する EGFR 変異陽性 NSCLC に対する高い効果と毒性の軽減が証明された。オシメルチニブの半減期は 48.3 時間で食事、人種 (アジアと非アジア)、性別、体重や年齢の影響はうけにくく安定しており、1 日 1 回の 80mg の固定用量が推奨された¹⁰⁹。

2015 年に EGFR-TKI 耐性になった EGFR 変異陽性 NSCLC に対するオシメルチニブの第 I/II 相臨床試験 (AURA1/AURA2 試験) にあたる dose escalation 試験と dose expansion 試験の結果が報告された。T790M 変異陽性症例の ORR は 61%、PFS 中央値は 9.6 か月に対し、陰性症例の ORR は 21%、PFS 中央値は 2.8 か月であった¹⁹。AURA2 試験の extension コホート 201 例の結果も PFS、ORR とともに良好で、サブグループ解析で CNS 転移症例に対するオシメルチニブの高い効果が示唆された¹¹⁰。第 II 相試験 (AURA2 試験) でも同様の結果であった¹¹¹。AURA extension 試験と AURA2 試験の併合解析の結果、ORR は 66%、PFS 中央値は 9.9 カ月で OS 中央値は 26.8 カ月であった¹¹²。

EGFR-TKI に抵抗性の T790M 変異陽性 NSCLC 患者を対象としてオシメルチニブとプラチナ併用化学療法を比較する第 III 相 AURA3 試験において、オシメルチニブで有意に PFS の延長を認め (10.1 vs. 4.4 カ月、HR=0.30)、ORR もオシメルチニブが有意に良好 (71% vs 31%) であった。オシメルチニブ群で下痢、皮疹、皮膚乾燥や爪囲炎などの有害事象を認めるも、いずれも軽微であった。ILD は 4% にみられた¹¹³。

EGFR-TKI 未治療の EGFR 変異陽性 NSCLC の中で、de novo T790M 変異の発現が 22-80% にみられ、EGFR-TKI の初期耐性に関与している¹¹⁴⁻¹²¹。オシメルチニブを

EGFR 変異陽性 NSCLC の一次治療にもってこることで、この de novo T790M 耐性を克服できると考えられた。

第 I 相の AURA 試験で、未治療の EGFR 変異陽性 NSCLC に対するオシメルチニブ一次治療において、ORR 77%と OS 20.5 カ月と良好な結果であった¹²²。この結果は一次治療での第一世代 EGFR-TKI の有効性と比較しても有益であり、de novo T790M の発現に関係なく、オシメルチニブの一次治療としての第 III 相試験（FLAURA 試験）が行われた。これは、局所進行あるいは転移性 EGFR 変異陽性 NSCLC 患者を対象としオシメルチニブと一次標準治療であるゲフィチニブまたはエルロチニブとの第 III 相比較試験で、オシメルチニブでの PFS が有意に延長し（表 2）、脳転移症例にも有効で⁶⁹、Grade3 以上の毒性も有意に少なかった²⁰。この試験でのオシメルチニブの有効性および忍容性から、EGFR 変異陽性 NSCLC の一次標準治療はオシメルチニブと考える研究者も多くいる。しかしながら、EGFR 変異肺癌に対する最良の治療シークエンスに関しては、AURA3 試験と FLAURA 試験の OS の結果が待たれるところである。

8-4. オシメルチニブの CNS 転移に対する効果

EGFR 変異陽性 NSCLC 患者での CNS 転移の頻度は 31%と多い¹²³。エルロチニブ¹²⁴、ゲフィチニブ⁶⁵やアファチニブ¹²⁵の CNS 内での活性はきわめて低いが、ブレクリニカルなデータで、オシメルチニブはゲフィチニブ、ロシレチニブやアファチニブよりも高い CNS 移行率が示された¹²⁶。AURA3 試験での CNS 転移症例に対するオシメルチニブの効果は、CNS ORR が 70%で CNS PFS 中央値は 11.7 カ月であった¹²⁷。FLAURA 試験においても、オシメルチニブの CNS ORR は 91%で、CNS PFS 中央値は未到達であるのに対し、ゲフィチニブまたはエルロチニブでは 13.9 カ月（HR=0.48）であった⁶⁹。

8-5. オシメルチニブに対する耐性機序

T790M 耐性変異 NSCLC に対するオシメルチニブ投与例においても約 10 カ月程度で耐性変異が発現することが報告されている¹¹³。耐性獲得メカニズムの一つとして C797S 変異の関与がある^{128, 129}。それ以外にも MET 増幅¹³⁰や ERBB2 (HER2)増幅¹³¹、BRAF V600E 変異¹³²,

¹³³, SCLC 形質転換¹³⁴などが報告されている。Oxnard らは T790M 耐性変異患者のオシメルチニブ耐性後の腫瘍組織の次世代シーケンス (next-generation sequencing; NGS) を行い、耐性機序を明らかにした。T790M/C797S 変異が 22%に、T790M loss が 68%にみられた。T790M loss の耐性機序には SCLC 形質転換、MET 増幅、BRAF V600E 変異などがみられ、T790M loss のほうがオシメルチニブの治療期間が短いことより、もともとヘテロな耐性クローンが存在していることが示唆される¹³⁵。

また初回オシメルチニブの耐性機序に関して、少数の血漿検体での解析では MEK1, KRAS, PIK3CA 変異など様々な変異を認めるも、T790M 変異は認められなかった¹²²。2018 年の欧州臨床腫瘍学会において FLAURA 試験での血漿検体による初回オシメルチニブの耐性機序が報告された。T790M 変異はなく、MET 増幅 (15%)、C797S 変異 (7%)、PIK3CA 変異 (7%) など種々の耐性機序が報告されたが¹³⁶、血漿検体では MET 増幅が過少評価され、SCLC 形質転換などは検出できないため組織検体での解析結果が待たれる。今後、初回オシメルチニブの耐性機序に関しては、積極的に再生検をおこない解明していくことが望まれる。

8-6. 第三世代 EGFR-TKI のための再生検

EGFR-TKI 耐性 NSCLC に有効な第三世代 EGFR-TKI の登場で、耐性獲得後の遺伝子変異が治療方針に大きな影響を及ぼすこととなり、同時に耐性獲得時の再生検も重要性が増すことになった。再生検は診断時生検に比べ手技的難易度が高いといわれるものの、その実施状況についての情報は少ない。日本国内 30 施設における EGFR-TKI 耐性進行 NSCLC の再生検の実態を調査した多施設共同後ろ向き観察研究によると、主要評価項目である再生検成功率（癌細胞が採取できた症例数/再生検症例数）は 79.5%（314/395）であった。再生検時の検体採取部位は原発巣 55.7%、転移巣 30.6%で、転移巣を採取部位とする割合は初回診断時の 9.1%と比べ大きく増加していた。再生検の採取方法は経気管支アプローチが 62.0%、経皮的アプローチが 29.1%で、経皮的アプローチは診断時の 7.6%から大幅に増加していた。採取部位と採取方法による成功率の差はみられず、再生検時の合併症は 5.8%で多くは気胸であった¹³⁷。一方、国内 49 施設において 2017 年

に EGFR-TKI 投与中に病勢増悪を認めた 236 例を対象に行われた前向き観察研究 (REMEDY 試験) の結果, T790M 変異検査のための検体採取率は 86.9% (205 例), T790M 検査実施率は 84.3% (199 例), T790M 変異陽性率は 25.8% (61 例), T790M 変異陽性でオシメルチニブが使用された割合は 23.7% (56 例) であった¹³⁸. しかしながら, 血漿検体が全体の 58% (137/236) を占めていたために T790M 変異陽性率が低かった可能性も考えられる.

再生検の問題は, 確定診断時の原発巣に比べ, 奏効後の原発巣は腫瘍が小さくなり, 周囲が線維化しており, 鉗子での組織採取が困難になることである. また CT 上, 腫瘤陰影であっても活動性病変でないこともあり, 可能であれば生検前に PET/CT を行い FDG 集積の強い部分を生検することが望ましい. 再発部位 (新規病変) が末梢肺に生じた場合には, 気管支鏡でのアプローチが困難になり, 肺外の臓器に再発した際には, 消化器内科, 整形外科や脳神経外科のような他科との連携が必要になる. 再増悪部位が脳である場合は再生検困難なことも多く, 骨に関しては脱灰処理により遺伝子検査が困難になることもあり, 採取部位や脱灰方法に工夫が必要になる. 脱灰方法については, EDTA 溶液を用いた処理が推奨され, 強酸溶液等による処理は避けるべきである¹³⁹.

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

8-7. 免疫チェックポイント阻害薬

EGFR 変異陽性肺癌に関しては, 二次治療での免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor; ICI) (ニボルマブ, ペムブロリズマブ, アテゾリズマブ) とドセタキセルの第 III 相試験を統合解析した結果, ICI はドセタキセルに対して OS は改善しなかった¹⁴⁰.

また, ICI と EGFR-TKI の併用療法においては, 有効性よりも重篤な肝機能障害, ILD や皮疹など有害事象が報告されており¹⁴¹, 現時点では EGFR 変異陽性例への ICI と EGFR-TKI の併用療法は推奨されていない.

EGFR-TKI 未治療の PD-L1 発現陽性の EGFR 変異陽性 NSCLC に対する一次治療としてのペムブロリズマブの第 II 相試験の結果, 奏効例がなかったことより試験は無効中止となっている¹⁴².

実臨床では複数の ICI が使用可能であるが, ニボルマブ治療後の EGFR-TKI 投与時の ILD 発症例および ILD による死亡例も報告されている²². ILD のリスクに鑑みて, EGFR-TKI と免疫チェックポイント阻害薬の併用および治療シーケンスに関しては慎重に検討すべきである.

9. EGFR-TKI 治療とその他の効果予測因子

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

9-1. リガンドレベルの変化

ゲフィチニブの奏効例と非奏効例で発現が異なる遺伝子を発現プロファイリングで検討したところ, 非奏効例でリガンドである Amphiregulin と TGF α の発現が高いことが示された¹⁴³. また, 血中のこれらのリガンド濃度の上昇はゲフィチニブの感受性と逆相関していた.

HER ファミリーのリガンドは細胞表面に結合した形で合成され, sheddase といわれる蛋白分解酵素で切り出される. ErbB リガンドの sheddase は ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリーに属し, 特に ADAM10 と 17 の関与が強い. 多くの肺癌細胞株が ADAM17 を発現しており, このような細胞では ERBB3 のリガンドである heregulin が増加している¹⁴⁴. ADAM の阻害薬である INCB4298 はこの autocrine ループを切ることでゲフィチニブの感受性を高くすることから, ADAM17 は EGFR-TKI の効果を抑制していると考えられる¹⁴⁴.

9-2. EGFR 遺伝子増幅

Cappuzzo らは EGFR 変異よりも Fluorescent in situ hybridization (FISH) によって検索された EGFR 遺伝子のコピー数の増加の方がゲフィチニブの有効性の予測により有効であると報告した (全生存期間に対する p 値は EGFR 変異で 0.09 に対して EGFR 増幅は 0.03 であった)

¹⁴⁵. ここで注意しておくべきことは、遺伝子増幅のほか、40%以上の腫瘍細胞がテトラソミー（4 染色体性）以上となっている場合（high polysomy）をふくめて FISH 陽性としている点である。8 研究の 663 例の結果をまとめてみるとコピー数増加症例の奏効率は 35%、増加のない症例では 9%であった¹²。BR.21 試験においてはコピー数のみが予測因子であり、遺伝子変異は無関係であったと報告されている¹⁴⁶。また ISEL 試験においてもコピー数が生存の予測因子であると報告されている¹⁴⁷。一般に、EGFR 変異がおこったあと腫瘍の進展により遺伝子増幅がおこると考えられるので¹⁴⁸、増幅（high polysomy ではない）がある場合は変異も同時にあることが多く、このことも種々の結果をもたらす原因と成っている。2010 年に前述の IPASS 試験のバイオマーカー解析において EGFR 遺伝子コピー数が増幅した群においても EGFR 変異の有無によって明らかに EGFR-TKI の効果が異なることが示され、EGFR 変異の方が FISH よりも優れたバイオマーカーであるとの結論に至り、FISH の意義は否定されるにいたった¹⁴⁹。

9-3. 他の HER ファミリー

EGFR 変異がある症例において、HER2 FISH が陽性の場合では陰性の場合とくらべて有意にゲフィチニブ投与後の生存期間が長いと報告されているが¹⁵⁰、前述のように HER2 増幅は EGFR-TKI 獲得耐性のメカニズムでありこの両知見は矛盾する。また、EGFR 変異の有無にかかわらずゲフィチニブの感受性の細胞では ERBB3 の発現が増加しており ERBB3 を介して PI3K-AKT 経路が活性化されているが、耐性細胞では ERBB3 を介していないことが示されている¹⁵¹。

9-4. その他の遺伝子変化と TKI 感受性

KRAS, EGFR, ERBB2 変異, ALK 転座, ROS1 転座は相互排他的関係があるので、EGFR 以外のこれらの遺伝子異常の存在は EGFR 変異の存在を否定することになるので、このような症例における EGFR-TKI の奏効は期待しがたい。

PI3K（ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ）の触媒サブユニット p110a をコードする遺伝子が PIK3CA で

あり、この遺伝子の変異は肺癌では 1-4%に認められる。PIK3CA 変異は EGFR 変異との排他的な関係はなく、ゲフィチニブ奏効ともあまり関連しないようであった。一方、PI3K の逆の作用をもつのが PTEN 腫瘍抑制遺伝子であり、PTEN 発現低下があると相対的に AKT が活性化され EGFR-TKI 感受性が低くなるとされている。一方、リン酸化 AKT の陽性率が高いとゲフィチニブの感受性が高いとの報告もあるが¹⁵²、一定の結論は得られていない。間接的に変異を含む EGFR の活性化をみている場合と、一次的な異常が PTEN にあって AKT が活性化している場合とは結果が異なると解釈できると思われる。

接着分子である E-カドヘリンは EGFR と相互作用があることが知られているが、この蛋白発現と EGFR-TKI の感受性に相関があることが報告されている¹⁵³。

BIM (BCL2-like 11, BCL2 interacting modulator of cell death) はアポトーシスを促進する分子であり、これが EGFR-TKI で起こる細胞死に必要とされている。アジア人の 10-20%は BIM のイントロンの欠失多型をもっておりこれらの症例では EGFR-TKI の奏効が悪いことが報告されている¹⁵⁴。

III. EGFR 遺伝子変異検査

10. EGFR 遺伝子変異検査の対象患者

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

検査を施行することは妥当である。またひとつの検体中の不均一性の有無については様々な報告があるが、Yatabe らの詳細な解析により基本的には無いと考えて良いであろう¹⁵⁵。すなわち、EGFR 変異は発がん過程のきわめて早期に獲得されると考えられており、EGFR-TKI による治療前であれば、一般に腫瘍細胞に均一に分布している。原発巣と転移巣、原発巣と再発病巣における EGFR 変異状態が異なることもきわめて稀であることが示されている^{155, 156}。原発巣/再発巣のいずれも EGFR 変異検査が可能であれば、腫瘍細胞量、DNA の保持状態でどちらを用いるか判断すべきである。ただし、多発性で明らかに別々の肺腺癌に対しては多発癌の可能性を考慮し、それぞれの腫瘍について検討を行うことは意味がある。

一方、EGFR-TKI 治療後に出現した腫瘍に対しては、オシメルチニブを用いた治療対象選択のため、特定のコンパニオン診断薬を用いた T790M 耐性変異の有無の確認が必要となる。なお初回の EGFR 変異検査については、2013 年に College of American Pathologists (CAP) , International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) および Association for Molecular Pathology (AMP) の三学会から EGFR および ALK 遺伝子検査ガイドライン¹³⁹が発出されている。また 2016 年 7 月に EGFR-TKI 耐性患者およびその T790M 変異検査を含めた EGFR 変異陽性 NSCLC の診療に関する IASLC の合意声明が公表され¹⁵⁷、2017 年には The IASLC Atlas of EGFR Testing in Lung Cancer が発出されているので参照されたい¹⁵⁸。

11. EGFR 遺伝子変異検査に用いる検査法

2004 年の EGFR 変異の発見以降は、その検出法が相次いで報告され、本手引ではそれらの解説を行ってきた(付 2)。当初本検査は、質保証体制が整備された主要検査センターによって、薬事未承認検査法、すなわち (laboratory developed test ; LDT) 法に相当する検査 (LDT 相当法) を用いて、その運用が進められていた。その後、2012 年には体外診断用医薬品 (*in vitro* diagnostics ; IVD) として承認された検査法が上市された。さらに 2016 年には、EGFR 変異検査としては国内初となるコンパニオン診断

薬として IVD 承認された検査法が登場した。一般に実臨床で行われている腫瘍組織を用いた EGFR 変異検査の検出感度は、1%~5%程である。2018 年に発出された 2013 年の CAP/IASLC/AMP の EGFR および ALK 遺伝子検査ガイドライン¹³⁹ のアップデートガイドラインでは、20%程度の腫瘍細胞を含む検体で検出可能な検査法 (すなわち検出感度が 10%以上の検査法) を用いるべきとしている¹⁵⁹。

今後 EGFR 変異検査は、特許/ライセンス取得の対応や検査の質保証体制への整備状況に鑑みて、これらをクリアできる特定の実施機関での LDT 相当法を除き、IVD 法の利用が推奨される。また、近年、次世代シーケンシング (next-generation sequencing ; NGS) 法などを用いたマルチプレックス検査が登場し、米国では CLIA/CAP 認証を受けた医療機関や検査センターで、LDT 法として利用が進んできた (表 3)^{118, 119, 158, 160-169}。2017 年 6 月には、Thermo Fisher Scientific 社の Oncomine Dx Target Test がコンパニオン診断法として FDA 承認され、さらに 2018 年 5 月には Medicare による保険償還がされたことをきっかけに、薬事承認薬の運用も徐々に広まっている。同システム (オンコマイン Dx Target Test CDx システム; ライフテクノロジーズ社) は、本邦においては、2018 年 4 月に BRAF V600E 変異のみを対象としたコンパニオン診断法として承認されており、現在 EGFR 変異への適用拡大に向け臨床開発が進んでいる。現在、本邦にて保険償還されている検査方法および適用される薬剤については、「要約」(5 頁) に記載されている一覧表を参照にされたい。

11-1. 組織検査

2007 年に本検査が保険適用対象となって以降は、主要検査センターで採用された 3 つの LDT 相当法 (PNA LNA PCR-Clamp 法, PCR-Invader 法, Cycleave 法) が、検査法として国内では主流となった。その後、Scorpion-ARMS 法を用いたリアルタイム PCR 法 (therascreen® EGFR 変異検出キット; キアゲン社) が 2012 年 2 月に、また Taqmanprobe 法を用いたリアルタイム PCR 法 (コバス® EGFR 変異検出キット; ロシユ・ダ

イアグノスティックス社)が2014年1月にそれぞれIVD承認された。現在はIVD法が、主要検査センターや医療機関において主流となっている。

11-1-1. EGFR-TKI 投与前の初回検査

EGFR 変異は90%がエクソン21のL858R変異かエクソン19の欠失変異であるので、特定の変異に的を絞った検索が可能である。EGFR-TKI 投与前の初回検査において検索対象となる変異は、IVD法を用いる場合、主要なL858R変異、エクソン19欠失変異、T790M変異のほか、まれなG719X変異、L861Q変異、エクソン20挿入変異、S768I変異が対象となる。一方、LDT法の場合では、実施機関側の判断に委ねるかたちとなる。2015年度に日本病理学会において実施された医療機関を対象としたEGFR変異検査の実態調査では、LDT法を用いている施設のうち、L858R変異とエクソン19欠失変異の2種あるいはこれにT790M変異を加えた3種のみを検索対象としている施設(とくに医療機関)が一定割合存在することが明らかとなった。IVD法によって検索可能なまれな変異のうち、

G719X変異、L861Q変異、S768I変異はアファチニブに対し感受性を示すことが、LUX-Lung2, Lung3, Lung6の統合解析で示された⁴³。またエクソン20挿入変異は、第一および第二世代のEGFR-TKIに対し効果が乏しいことが報告されている³⁷⁻⁴³。これらの結果を踏まえると、LDT法においても、IVD法と同等の変異の種類の検索が推奨される。

11-1-2. EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査

第一・第二世代のEGFR-TKIが初回のEGFR-TKIとして投与され、その後増悪した場合でオシメルチニブの投与を考慮する際には、増悪後の検体を用いて、T790M変異陽性であることを確認する必要がある。EGFR-TKI耐性になったNSCLCに対するオシメルチニブの第II相国際共同試験(AURA2試験)で実施された患者データに基づき、米国では2015年11月に、本邦では2016年3月に、コバス®EGFR変異検出キット2.0(以下、コバスEGFR v2.0、ロシュ・ダイアグノスティックス社)がホルマリン固定パラフィン包埋(formalin-fixed paraffin embedded; FFPE)

表3. EGFR遺伝子変異の検出法とその特性

Class (in tissue)	Technique	Sensitivity (%Mutant DNA)	Mutations Identified	Detection of co-mutations	Potential Applications	Ref(s)
IVD	Cobas (JP/US/EU)	3%-5%	known only	No	Tissue, Plasma	160
	therascreen (JP/US/EU)	1%-10%	known only	No	Tissue, Plasma	160
	Oncomine™ Dx Target Test (US)	6-8%*	known & new	Yes	Tissue	-
	FoundationOne CDx™ (JP/US)	2-5%**	known & new	Yes	Tissue	-
	Oncomine™ Solid Tumour DNA Kit (EU)	1%-10%	known & new	Yes	Tissue	-
	MassARRAY Dx Lung Panel (EU)	1%-10%	known only	Yes (hotspots)	Tissue	161, 162
RUO	Direct sequencing	10%-25%	known & new	No	Tissue	MS
	Pyrosequencing	5%-10%	known only	No	Tissue	163
	Multiplex PCR (SnaPshot)	5%	known only	Yes (hotspots)	Tissue	164
	WAVE-surveyor	2%	known only	No	Tissue, Plasma	165
	High-depth NGS (at least 1000x depth)	1%-10%	known & new	Yes	Tissue, Plasma	166
	Scorpion ARMS	1%	known only	No	Tissue, Plasma	-
	Locked nucleic acid clamp	1%	known only	No	Tissue, Plasma	118
	TAm-Seq	2%	known & new	Yes	Tissue, Plasma	167
	BEAMing	<0.1%	known only	No	Tissue, Plasma	168
	Digital droplet PCR	<0.1%	known only	No	Tissue, Plasma	119
	CAPP-Seq	~0.02%	known & new	Yes	Plasma	169

EGFR; epidermal growth factor receptor gene, PCR; polymerase Chain reaction, NGS; next-generation sequencing, ARMS; amplification refractory mutation system, CAPP; cancer personalized profiling by deep sequencing, RUO; research use only, IVD; in vitro diagnostics, MS; multiple studies, Ref(s); reference(s)
 *, **; Data from FDA SSED document (*; https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/P160045B.pdf, **; https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf)

組織検体から抽出したゲノム DNA を検査対象にオシメルチニブのコンパニオン診断薬として承認された。オシメルチニブのコンパニオン診断薬として承認されているのは現時点では本法のみである。FFPE 組織検体を用いた本法の承認申請データにおける他の IVD 法との検査結果の一致率は 95.6%、NGS 法との一致率は 91.0%となっている。

11-2. 血漿検査（リキッドバイオプシー検査）

リキッドバイオプシー検査は、患者の負担も少なく、組織検体採取困難な患者対しても比較的容易に検査できるため、様々ながん種の変異検査での利用に期待が高まっている。NSCLC 患者における血中 cfDNA を用いた EGFR 変異検査のメタアナリシスでは、組織検体の結果を参考基準とした場合、cfDNA 検体の特異性は 0.96、感度は 0.62 と報告されている¹⁷⁰。本メタアナリシスの解析対象となった 27 研究では、cfDNA の抽出に血漿と血清の両方が用いられているが、現在では血漿が推奨されている。血中 cfDNA 検体を用いる検査法は、高感度の BEAMing 法や droplet digital PCR 法を含め組織検体で使用されている方法が IVD 承認されていないが、現在臨床研究で広く使われている（表 3）。

現在、本邦で薬事承認されているリキッドバイオプシーによる検査では、cfDNA を用いている。リキッドバイオプシー検査は、米国において、2016 年 6 月にエルロチニブの、また 9 月にオシメルチニブのコンパニオン診断薬として cobas EGFR Mutation Test v2 が、FDA 承認を取得している。本邦においてもオシメルチニブのコンパニオン診断薬として、コバス EGFR v2.0 による T790M 変異検査が、2016 年 12 月 26 日に承認され、2017 年 7 月 1 日より保険適用された。また、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブに対する EGFR-TKI 投与前の初回検査は、2017 年 8 月 10 日に承認され、2018 年 1 月 1 日より保険適用されている。なお、2018 年 7 月 31 日からはオシメルチニブの EGFR-TKI 投与前の初回検査に対しても薬事承認・保険適用されている。現在オシメルチニブのコンパニオン診断として実施する二次的 T790M 変異検査では、再生検による検体採取が不可欠となっているが、

国内 30 施設における調査研究での再生検成功割合（再生検実施例のうち腫瘍細胞が採取された症例割合）は 79.5%と報告されている¹³⁷。また海外の単施設における研究でも、再生検実施例のうち検体不適正もしくは腫瘍細胞の不採取となった割合は 20%と報告されている¹⁷¹。

血漿検査では、使用する検出法の検出感度の把握が重要となる。コバス EGFR v2.0 を用いた血漿検査における最小検出感度については、同キットの添付文書にデータが示されている（表 4）。血漿検体へ約 220 bp に断片化した細胞株 DNA をスパイクインした際の、野生型 DNA 約 100,000 コピー/mL 中における変異型 DNA の検出限界（コピー数）が記載されており、最低で 100 コピー（25～100）とされている。ここから各バリエーションの最小検出感度を計算すると、0.025%（S768I およびエクソン 20 挿入）～0.1%（L858R および T790M）となることから、血漿検体を用いた際の最小検出感度は 0.1%程度と考えられる。なお、本手引きの表 3 に EGFR 変異の検出法とその特性が記載されているが、本記載は組織検体を用いた場合の感度である。

表4. コバス®EGFR変異検出キット v2.0 の感度（最小検出感度）

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

コバス®EGFR変異検出キット v2.0の添付文書より引用

*約220 bpに断片化、バックグラウンドとして野生型DNA を約100,000コピー/mLを含む。

11-2-1. EGFR-TKI 投与前の初回検査

リキッドバイオプシー検査による初回 EGFR 変異検査の承認は、IIIB/IV 期 NSCLC の第一選択薬として、エルロチニブとシスプラチン+ゲムシタビンの有効性と安全性を評価するための多施設オープンラベル無作為化第 III 相試験（ENSURE 試験）¹⁷²に基づいている。コバス EGFR v2.0 による組織での検査を規準とした場合の陽性一致率（感度）は 76.7%にとどまるが、陰性一致率（特異度）は

98.2%ときわめて高い(表5)ため、この検査で陽性である場合は組織でのEGFR変異が陽性とほぼ同等のEGFR-TKIの奏効が期待できるといえよう。なお、コバスEGFR v2.0は、NSCLCと病理組織診断または細胞診断された患者において、何らかの理由で組織検体や細胞検体を用いてEGFR変異検査を実施できない場合に血漿検体を用いて検査することを目的としている。また、EGFR変異が血漿検体中に検出されない患者は、偽陰性^{*注1}の可能性が少なくないことを考慮して、再生検の可能性について検討し、採取可能となれば組織検体や細胞検体でEGFR変異検査を行うことが推奨される。

^{*注1} 血漿検査の偽陰性: 組織検査において変異陽性であって血漿検査で変異が検出されないこと

表5. ENSURE試験に登録されたNSCLC患者のEGFR遺伝子変異(エクソン19欠失変異とL858R変異)における血漿検査(コバス®EGFR変異検出キットv2.0)とFFPE組織検体検査(コバス®EGFR変異検出キットv1.0)との一致率

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

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

11-2-2. EGFR-TKI 治療耐性後の二次的 T790M 変異検査

T790M 変異は、EGFR-TKI に対する耐性獲得の過程で出現することが多く、T790M 変異陽性の腫瘍細胞数は耐性獲得後、臨床経過とともに増加することも知られている。それにつれて、血液中の腫瘍細胞由来漏出 DNA が出現し増加し、血漿検査による T790M 変異の検出率が上昇する。従って、同一患者において最初の血漿検査で T790M 変異が検出されない場合でも、tumor burden の増加に伴って、後日再度の血漿検査で T790M 変異が検出される場合がある。EGFR-TKI に対する耐性獲得後に臨床経過とともに T790M 変異血漿検査の陽性率も上昇することが報告されている^{173, 174}。検査結果が血漿検査の時期に大きく依存することが示されているが、最適な血漿検査の時期については未だ明らかな知見はない。

オシメルチニブの第 II 相国際共同試験 (AURA2 試験) に登録された NSCLC 患者の検体のうち T790M 変異検出における血漿検体 (コバス EGFR v2.0) と FFPE 組織検体 (コバス EGFR v1.0) 間、および血漿検体を用いた NGS 法とコバス EGFR v2.0 間の一致率解析結果を示す(表6)。コバス EGFR v2.0 における血漿検査と組織検査の全体一致率は、65.9%であったが、血漿を検体とし、コバス EGFR v2.0 と NGS 法による一致率を評価したところ、全体一致率は 91.3%であった。

表6. オシメルチニブ第II相国際共同試験 (AURA2) の患者検体でのT790M変異検出における血漿検体と各検査法との一致率

T790M変異		コバス®EGFR変異検出 キットv1.0 (FFPE組織検体)	
		陽性	陰性
コバス®EGFR 変異検出キットv2.0 (血漿検体)	陽性	131	22
	陰性	92	89
陽性一致率 58.7% (131/223) 陰性一致率 80.2% (89/111) 全体一致率 65.9% (220/334)			
T790M変異		次世代シーケンス解析 (NGS法) (血漿検体)	
		陽性	陰性
コバス®EGFR 変異検出キットv2.0 (血漿検体)	陽性	129	16
	陰性	12	163
陽性一致率 91.5% (129/141) 陰性一致率 91.1% (163/179) 全体一致率 91.3% (292/320)			

「コバス® EGFR 変異検出キット v2.0」添付文書より引用

オシメルチニブの第 I 相試験 (AURA I 試験) で使用された検査検体の後ろ向き解析では、血漿検体および組織検体による T790M 変異陽性患者の ORR (63% vs. 62%) と PFS 中央値 (9.7 カ月 vs. 9.7 カ月) の比較では、両者は同等であった。一方、組織検体で T790M 変異陽性であった 158 例のうち 47 例 (29.7%) が血漿検体での T790M 変異が陰性であり、その PFS は 16.5 カ月と組織検体および血漿検体で T790M 変異陰性であった症例の 2.8 カ月よりかなり長いものであった¹⁷⁵。

これらの試験では、組織検査により T790M 変異陽性であった患者に対して試験が行われたため、血漿検査で

T790M 変異陽性であった患者集団に対するオシメルチニブの効果が検証されていない状況である。そのため、リキッドバイオプシー検査のみが実施され、T790M 変異陽性であった症例には、オシメルチニブ奏効性に関するデータが十分でないとされる。従って、本邦では現時点において、組織採取が難しい時に限ってリキッドバイオプシー検査が使用されることを推奨している。また、リキッドバイオプシー検査において変異陰性であった場合は、腫瘍由来 DNA が血漿中に十分に漏出していないことを考慮して、再生検の可能性について検討すべきである。病勢の進行等によって組織採取が可能になった時点において、組織検体を用いて T790M 変異検査を行い、その有無を確認することが推奨される。なお、Oxnard らは二次的 T790M 変異検査では、最初の検査を血漿検体で行い、T790M 変異陰性患者に対し再生検された組織・細胞検体を用いる検査アルゴリズムを提案している¹⁷⁵。また、2016 年 9 月に改訂されたオシメルチニブの米国添付文書や IASLC の合意声明においては、再生検の可否を先行検討し、困難な場合について血漿検体による二次的 T790M 変異検査を実施する検査アルゴリズムを推奨している¹⁵⁷。2018 年の日本臨床腫瘍学会において、コバス EGFR v2.0 を用いて T790M 血漿検査を前向きに実施した場合のオシメルチニブの治療効果を評価した試験 (WJOG8815L/LPS) の結果が Takahama らにより報告され¹⁷⁶、本血漿検査の有用性が直接的に示されるなど、血漿検査に対する知見の蓄積が待たれる。

12. 対象となる検体とその適正性について

本検査では、さまざまな臨床検体が検査対象となりうるが、検査センターへ提出される割合は、主として FFPE 組織検体と細胞検体（胸水、気管支擦過細胞、気管支洗浄液等）が多い。IVD 法では FFPE 組織検体での検査が原則となっているが、临床上、細胞検体は積極的に用いられている^{177, 178}。腫瘍部の新鮮凍結検体の利用も可能であるが、検体の選択には、その特徴をよく理解することが重要である。上記の検査方法によって感度が異なるのと同様に、対象となる検体や採取によって腫瘍細胞の存在確認の方法や許容腫瘍細胞割合が異なるので注意が必要である¹⁷⁸⁻¹⁸⁰。

12-1. 組織・細胞検体

EGFR 変異検査の陰性判定は、検体の適正性について十分に評価された場合にのみ可能となる。検体の適正性は、腫瘍細胞の割合、DNA の質および量にもとづいて評価される必要がある。評価に際しては、EGFR 変異検査の感度（必要となる腫瘍細胞の割合）および必要最少の DNA 量が明示されている必要があり、外注先を含む検査担当部門はその情報を提供しなければならない。現在 EGFR 変異検査法として、標準的に使用されている IVD 法や主要な LDT 法の検出感度は、概ね 1~5% (%変異 DNA) となっている (表 3)。IVD 法では腫瘍細胞含有量は 10%以上が推奨され、これに満たない場合、FFPE 組織検体などではマクロダイセクション (手行的に行うマイクロダイセクション) の実施が必要となる。これらの判断は病理医が行うのが通例であり、密接な連携・関与が必要となる。EGFR 変異検査を外注検査として行う場合には、適正な検体を提出することが提出する側の責任であることを十分に留意する必要がある。

12-1-1. FFPE 組織検体

薄切した組織切片はスライドガラスにマウントさせて提出する。5~10 枚の未染色標本作製し、そのうちの 1 枚を HE 染色し腫瘍細胞の存在を確認することが推奨される。特に微小な生検検体では、病理診断の後に再薄切した場合には、腫瘍部分あるいは組織そのものがなくなってしまうことがあるので注意を要する。あらかじめ EGFR 変異検査を行う予定の場合は未染色標本作製時に遺伝子変異検査用標本を余分に作製しておくことも有用である¹⁸¹。検体中の腫瘍細胞の存在状態は様々であるため、病理診断報告書に腫瘍量や腫瘍含有割合を記録しておくことが推奨される。またマクロダイセクションを実施した場合は、その旨と実施後の腫瘍量や腫瘍含有割合を記録することが推奨される。また検査センターへ外注する場合、検査に供した検体の HE 標本 (マクロダイセクションを行う際に、腫瘍部のマーキングを行った HE 染色標本) は、可能な限り検査後にも再確認できるようにしておくことが望ましい。ホルマリン固定には、10%中性緩衝ホルマリン液が標準的に用いられており、固定時間は 6 時間~48 時間が推奨されている^{139, 182}。FFPE 組織検体における

取り扱いについては、日本病理学会から発出されている「ゲノム診療用病理組織検体取り扱い規程」¹⁸³を参照されたい。

12-1-2. FFPE 細胞検体（セルブロック検体）

近年肺癌では、免疫組織化学染色（IHC）法や FISH 法を用いる ALK 検査が開始されて以降、胸水等の細胞検体からのセルブロックの検査使用の重要性が増している。セルブロックでの保管により、FFPE 組織検体同様、コンパニオン診断や鑑別診断などを目的とした IHC 法や FISH 法による解析が、繰り返し可能となる。また腫瘍細胞の含有割合の確認も容易となる。セルブロック作製法は複数知られており、遠心分離細胞収集法と細胞固定法に大別される。本邦ではそれぞれ 4~5 種程度の作製法が用いられていることがこれまでの調査研究で明らかとなっているが、前者では遠心管法が、後者ではアルギン酸ナトリウム法が、比較的多くの施設で用いられている（アルギン酸ナトリウム法については「肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引き」¹⁸⁴を参照）。

12-1-3. 細胞検体

呼吸器領域における細胞診では、以下のような複数の方法による検体採取が行われている。一部を除き、細胞検体の核酸品質は、FFPE 組織検体やセルブロック検体に比べ良好であり、2018 年の CAP/IASLC/AMP のアップデート遺伝子検査ガイドラインでも、その使用を推奨している¹⁵⁹。しかし検査に必要な腫瘍細胞量や腫瘍含有割合を得ることが難しい場合も少なくなく、EGFR 遺伝子変異検査に使用する場合は、検体の特性を踏まえた対応が必要となる。

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

b) 経気管支擦過細胞・経気管支穿刺吸引細胞・リンパ節穿刺吸引細胞：これらの検体では適切に腫瘍から採取できれば腫瘍細胞に富んだ検体を採取することができることが報告されている。これら検体についてはスミア標本

からの DNA 抽出が可能であるが腫瘍細胞の存在の確認が必須である。

c) 喀痰・吸引痰・気管支洗浄液（BAL）：正常細胞が混入することが多く、腫瘍細胞に富んだ検体を採取することが比較的困難な検体であり、あまり推奨されない。喀痰での変異の検出率は EGFR 変異を有する腫瘍をもつ患者の 30-50%にとどまるとの報告もある¹⁸⁵。

12-1-4. 新鮮凍結検体

もっとも高品質の DNA や RNA を抽出可能であるが、同時に DNase や RNase の酵素活性も保持されており、検体の取扱いを迅速に行わなければ、核酸品質を急速に低下させるおそれがあるため、注意を要する。手術室等で割を入れ採取する場合も多いが、腫瘍細胞含有量を顕微鏡的に確認する必要がある。周囲の炎症が強い腫瘍、粘液産生が高度な腫瘍、中心部線維化巣が広範な腫瘍では、腫瘍細胞が採取されず偽陰性になることがある。腫瘍細胞を確認する手段としては以下の方法がある：① 凍結腫瘍組織を薄切し、HE 標本を作成し、その標本で腫瘍細胞の存在及び占有割合を確認する。② 採取時に割をいれその片割れを凍結組織とし、残りの断面で組織標本を作製し確認する。

12-2. 血漿検体

リキッドバイオプシー検査では、血漿中に遊離している DNA 断片から EGFR 変異を検出する。血漿検体は、組織検体と異なり、腫瘍細胞の割合や DNA の質、量に基づいて評価できないため、血液採取、血漿の分離、血漿検体の保管に至るプレアナリシスの段階において適切に扱われた検体を使用すべきである。特に採血後の検体を長時間室温で放置すると、血球成分の崩壊や DNA の分解の原因につながる。また、血漿成分を分離する際に血球成分が混入すると、有核細胞由来のゲノム DNA が原因で、偽陰性となる可能性があることは注意しなければならない。IVD 法では、EDTA-2K の採血管を使用した場合、血漿の分離は、採血後 8 時間以内安定である。血漿分離後の血漿検体は、15~30℃で 1 日間、2~8℃で 3 日間、-25~-15℃で 12 か月、そして -70℃以下の場合は 12 か月保管

可能である。また、ASCO と CAP は合同で、血漿検体に対する取り扱いについてレビューをしている。(Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology (ASCO) and College of American Pathologists (CAP) Joint Review)^{186, 187}

13. 薬事承認および保険診療の観点からみた本検査のあり方

EGFR-TKI 投与前の初回検査については、2011年9月にゲフィチニブの添付文書改訂で *EGFR* 変異陽性が適応条件となったことを受け、2012年4月の診療報酬改定で2000点が2100点に引き上げられ、このとき患者1人につき1回のみとする制限が撤廃された。2012年9月には *therascreen*[®]EGFR 変異検出キットが *EGFR* 変異検査として初めて IVD として承認され、これに合わせ IVD 承認されたリアルタイム PCR 法については2500点が算定可能となった。一方、EGFR-TKI 耐性患者の T790M 変異検査については、2016年3月にオシメルチニブのコンパニオン診断薬として、コバス[®]EGFR 変異検出キット v2.0 が IVD 承認されたことを受け、翌4月より2500点での算定が可能となった。*EGFR* 変異検査については、再発や増悪により、二次的遺伝子変異等が疑われ、再度治療法を選択する必要がある場合にも算定できる。

保険診療においては IVD 承認された診断薬の使用が原則であるが、悪性腫瘍を対象とした多くの体細胞遺伝子検査では、IVD 化の遅れから、非 IVD 法（自家調製試薬を用いた方法；home-brew 法）が現在でも数多く用いられている。*EGFR* 変異検査については、当初アカデミアの成果等に基づき主要検査センターで臨床開発され、質保証された LDT 相当法（PNA LNA PCR-Clamp 法、PCR-Invader 法、Cycleave 法の3法）を軸に、保険診療として暫定運用された。その後 IVD 法が本邦で利用可能となったものの、移行措置として上記 LDT 相当法を含む非 IVD 法と IVD 法の両法が、現在でも保険適用となっている。なおこれらの LDT 相当法については、その感度や特異度はその当時のみなし標準と考えられた Scorpion-ARMS 法（のちの「*therascreen*[®]EGFR 変異検出キット」として承認）と同等であることが示されている¹⁸⁸。*EGFR*

変異検査は、*EGFR* 遺伝子そのものにも特許がかかっており、EGFR-TKI に感受性または抵抗性を示す変異について複数社で権利化されている。IVD 法では、こうした関連特許の実施許諾（ライセンス）等の対応は、診断薬メーカーによって行われているが、非 IVD 法では許諾を受けていない場合が多い。現在、主要検査センターでは IVD 法を用いた検査実施が可能となっており、また LDT 相当法のうち、現在も使用されている PNA LNA PCR-Clamp 法、PCR-Invader 法については、主要検査センターが実施許諾等への対応を行っている。

上述のように2016年4月に保険適用された EGFR-TKI 耐性患者の T790M 変異検査では、IVD 承認されたコンパニオン診断薬を用いた実施が原則となっている。上述の2015年度に日本病理学会で行われた医療機関を対象とした院内 *EGFR* 変異検査の検査精度に関する調査研究では、非 IVD 法使用施設において、検査実施上の諸問題も指摘された。大腸癌における *RAS* 変異検査では、本邦においても、IVD 法への移行・一本化が完了した。さらには2016年4月に厚生労働省課長通知として医薬品医療機器法における NGS 等の取扱いが示され、今後こうした技術の保険診療下の検査実施は、コンパニオン診断法として薬事承認された NGS 法の使用が前提となっている。こうした状況を踏まえると、質保証体制が整備された主要検査センターで実施されている上記一部の LDT 相当法を除き、IVD 法での *EGFR* 変異検査の実施が強く推奨される。表7に *EGFR* 変異検査の保険適用状況を示す（2019年3月6日時点）。

13-1. T790M 血漿検査の検査回数について

前述した通り、血漿検査の場合、検査結果が検査を行ったタイミングに大きく依存することが考えられているが、最適な血漿検査の時期については未だ知見はない。最適な血漿検査時期を推奨できない現時点においては、過度に検査回数を制限することは、血漿検査の偽陰性を招いて、T790M 変異陽性患者のオシメルチニブ治療の機会を喪失することが強く懸念される。さらに、肺癌患者の EGFR-TKI 治療および化学療法の臨床経過において奏効と増悪を繰り返すことに伴って、T790M 変異陽性細胞の

出現状況（陽性または陰性）が動的に変化することも報告されている¹⁷⁴。従って、患者の不利益を回避する観点から、初回のT790M変異血漿検査が陰性であっても、病勢の進行等によりT790M変異陽性が強く疑われる症例であって、再生検が不可能であり、かつ再度治療選択を検討する必要がある場合等においては、再度（複数回）のT790M変異血漿検査の実施が望ましいと考える。しかしながら、現状では血漿検査（D006-12）に対し、留意事項として、「肺癌の詳細な診断及び治療法を選択する場合、又は肺癌の再発や増悪により、EGFR遺伝子変異の2次的遺伝子変異等が疑われ、再度治療法を選択する場合に、患者1人につきそれぞれの場合に1回に限り算定できる。ただし、本検査の実施は、医学的な理由により、肺癌の組織を検体として、区分番号「D004-2」悪性腫瘍組織検査の「1」悪性腫瘍遺伝子検査の「イ」EGFR遺伝子検査（リアルタイムPCR法）又は「ロ」EGFR遺伝子検査（リアルタイムPCR法以外）を行うことが困難な場合に限る。」と記されている。

13-2. 同一月中のT790M血漿検査・組織検査の実施について

血漿検査が優先される場合として、組織検査の標的病巣部位が内科的に到達困難で手術等の侵襲的な手技が必要な場合もしくは全く組織検査不能の場合や、組織検査による出血、縦隔炎、呼吸不全、肺炎、気胸等のリスクを

考慮した結果、組織検査のリスクが高いと判断された場合が想定される。以上のような場合においてT790M変異血漿検査が実施されるが、結果が陰性の際には、組織検査合併症のリスクが高いことを承知の上で気管支鏡生検、CT下生検等による組織採取に踏み切る例や侵襲を伴う全身麻酔下外科的手術（肺切除、縦隔鏡下切除、骨転移・病的骨折手術、転移性腫瘍切除等）により腫瘍組織を採取する例がある。このような症例においては血漿検査から時間を置かずに組織採取並びに組織検査を行う必要性から、同一月中に血漿検査と組織検査、双方の実施が必要となる場合がある。

しかしながら、血漿検査の回数については、保険診療上、「肺癌の詳細な診断及び治療法を選択する場合、又は肺癌の再発や増悪により、EGFR遺伝子変異の2次的遺伝子変異等が疑われ、再度治療法を選択する場合に、患者1人につきそれぞれの場合に1回に限り算定できる」という算定制限が設けられている。また、同一月中に血漿検査および組織検査の双方が実施された場合は、「主たるもののみ算定する」という制限が設けられているため、実施においては注意が必要である。

表7. EGFR遺伝子変異検査の保険適用状況

検査法		項目	保険点数	注意したい留意事項
組織検査	IVD法	D004-2 悪性腫瘍組織検査 1 悪性腫瘍遺伝子検査 イ EGFR遺伝子検査（リアルタイムPCR法）	2,500	平成30年4月1日より、D004-2には、以下の注が追加されているため、検査を行う際に考慮する必要がある。 「患者から1回に採取した組織等を用いて同一がん種に対して悪性腫瘍遺伝子検査を実施した場合は、所定点数にかかわらず、検査の項目数に応じて次に掲げる点数により算定する。イ2項目4,000点 ロ3項目以上6,000点」
	非IVD法	D004-2 悪性腫瘍組織検査 1 悪性腫瘍遺伝子検査 ロ EGFR遺伝子検査（リアルタイムPCR法以外）	2,100	
血漿検査	IVD法	D006-12 EGFR遺伝子検査（血漿）	2,100	肺癌の詳細な診断及び治療法を選択する場合、又は肺癌の再発や増悪により、EGFR遺伝子変異の2次的遺伝子変異等が疑われ、再度治療法を選択する場合に、患者1人につきそれぞれの場合に1回に限り算定できる。ただし、本検査の実施は、医学的な理由により、肺癌の組織を検体として、区分番号「D004-2」悪性腫瘍組織検査の「1」悪性腫瘍遺伝子検査の「イ」EGFR遺伝子検査（リアルタイムPCR法）又は「ロ」EGFR遺伝子検査（リアルタイムPCR法以外）を行うことが困難な場合に限る。

最後に

実臨床において適正な *EGFR* 変異検査に基づいた治療選択がなされる目的で解説した。一方で、前述の如く欧米においては、既に NGS を用いたクリニカルシーケンスが導入されている。本邦においても、2016 年 4 月に厚生労働省課長通知として「遺伝子検査システムに用いる DNA シークエンサー等を製造販売する際の取扱いについて」（薬生機発 0428 第 1 号・薬生監麻発 0428 第 1 号）が発出された。さらに、医薬品医療機器法における NGS 等の取扱いが示され、NGS をベースとする検査の臨床導入実現に向け前進し、2018 年 2 月にがんゲノム医療中核拠点病院が、同年 3 月にはがんゲノム医療連携拠点病院が指定されるなど、実臨床におけるがんゲノム医療提供

体制が整いつつある。また、NGS 法は先進医療として導入されている他、パネル検査が薬事承認申請中であることから、遺伝子プロファイルに基づいた治療が臨床現場で実装される日も遠くないものと考えられる。NGS 法を実施する上では、検体の品質、患者の状態に対して検査にかかる時間 (turn around time)、保険償還や治療可能な薬剤へのアクセスなど課題も議論されている。検査における品質・精度における見解に関しては、2018 年 10 月に臨床検査振興協議会より「がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方 (第 1.0 版)」が発出されている¹⁸⁹⁾。今後は、これらの NGS 法における課題を考慮しつつ、現在の *EGFR* 変異検査と NGS 法をどのように使い分けていくかを検討していく必要がある。

参考文献

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-2139.
2. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
3. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352:786-792.
4. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73.
5. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-137.
6. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341-354.
7. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-1174.
8. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183-232.
9. Modjtahedi H, Dean C. The receptor for EGF and its ligands - expression, prognostic value and target for therapy in cancer (review). *Int J Oncol* 1994;4:277-296.
10. Kobayashi Y, Mitsudomi T. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci* 2016;107:1179-1186.
11. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:339-346.
12. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 2007;98:1817-1824.
13. Dearden S, Stevens J, Wu YL, et al. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Ann Oncol* 2013;24:2371-2376.
14. Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res* 2015;5:2892-2911.
15. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, et al. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:633-639.
16. Dong YJ, Cai YR, Zhou LJ, et al. Association between the histological subtype of lung adenocarcinoma, EGFR/KRAS mutation status and the ALK rearrangement according to the novel IASLC/ATS/ERS classification. *Oncol Lett* 2016;11:2552-2558.
17. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 2014;4:1046-1061.
18. Takeda M, Okamoto I, Nakagawa K. Pooled safety analysis of EGFR-TKI treatment for EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015;88:74-79.
19. Janne PA, Yang JC, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;372:1689-1699.
20. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018;378:113-125.
21. Suh CH, Park HS, Kim KW, et al. Pneumonitis in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitor: Meta-analysis of 153 cohorts with 15,713 patients: Meta-analysis of incidence and risk factors of EGFR-TKI pneumonitis in NSCLC. *Lung Cancer* 2018;123:60-69.
22. アストラゼネカ株式会社. タグリツソ使用成績調査 最終報告 結果報告. <http://med2.astrazeneca.co.jp/safety/download/TAG18.pdf> 2019.
23. Noonan SA, Sachs PB, Camidge DR. Transient Asymptomatic Pulmonary Opacities Occurring during Osimertinib Treatment. *J Thorac Oncol* 2016;11:2253-2258.
24. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2070-2075.
25. Kobayashi Y, Togashi Y, Yatabe Y, et al. EGFR Exon 18 Mutations in Lung Cancer: Molecular Predictors of Augmented Sensitivity to Afatinib or Neratinib as Compared with First- or Third-Generation TKIs. *Clin Cancer Res* 2015;21:5305-5313.
26. Wu JY, Yu CJ, Chang YC, et al. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:3812-3821.
27. Arcila ME, Nafa K, Chaff JE, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol Cancer Ther* 2013;12:220-229.
28. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol* 2014;9:154-162.
29. Lee B, Lee T, Lee SH, et al. Clinicopathologic characteristics of EGFR, KRAS, and ALK alterations in 6,595 lung cancers. *Oncotarget* 2016;7:23874-23884.

30. Sheng M, Wang F, Zhao Y, et al. Comparison of clinical outcomes of patients with non-small-cell lung cancer harbouring epidermal growth factor receptor exon 19 or exon 21 mutations after tyrosine kinase inhibitors treatment: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 2016;72:1-11.
31. Eck MJ, Yun CH. Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:559-566.
32. Carey KD, Garton AJ, Romero MS, et al. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res* 2006;66:8163-8171.
33. Cho J, Chen L, Sangji N, et al. Cetuximab response of lung cancer-derived EGF receptor mutants is associated with asymmetric dimerization. *Cancer Res* 2013;73:6770-6779.
34. Okabe T, Okamoto I, Tamura K, et al. Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. *Cancer Res* 2007;67:2046-2053.
35. Oxnard GR, Lo PC, Nishino M, et al. Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. *J Thorac Oncol* 2013;8:179-184.
36. Pan Y, Zhang Y, Li Y, et al. Prevalence, clinicopathologic characteristics, and molecular associations of EGFR exon 20 insertion mutations in East Asian patients with lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014;21 Suppl 4:S490-496.
37. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM, et al. Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Ann Oncol* 2014;25:126-131.
38. Naidoo J, Sima CS, Rodriguez K, et al. Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: Clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer* 2015;121:3212-3220.
39. Voon PJ, Tsui DW, Rosenfeld N, et al. EGFR exon 20 insertion A763-Y764insFQEA and response to erlotinib--Letter. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2614-2615.
40. Woo HS, Ahn HK, Lee HY, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer and resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Invest New Drugs* 2014;32:1311-1315.
41. Yasuda H, Park E, Yun CH, et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med* 2013;5:216ra177.
42. Yasuda H, Kobayashi S, Costa DB. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol* 2012;13:e23-31.
43. Lee CK, Wu YL, Ding PN, et al. Impact of Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations and Clinical Characteristics on Outcomes After Treatment With EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Versus Chemotherapy in EGFR-Mutant Lung Cancer: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 2015;33:1958-1965.
44. Hirano T, Yasuda H, Tani T, et al. In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2015;6:38789-38803.
45. Kohsaka S, Nagano M, Ueno T, et al. A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer. *Sci Transl Med* 2017;9:eaan6566
46. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol* 2007;25:1545-1552.
47. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;22:777-784.
48. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;22:785-794.
49. Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:5892-5899.
50. Thatcher N, Chang A, Parikh P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005;366:1527-1537.
51. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123-132.
52. Maruyama R, Nishiwaki Y, Tamura T, et al. Phase III study, V-15-32, of gefitinib versus docetaxel in previously treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:4244-4252.
53. Kim ES, Hirsh V, Mok T, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet* 2008;372:1809-1818.
54. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-957.
55. Han JY, Park K, Kim SW, et al. First-SIGNAL: first-line single-agent iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 2012;30:1122-1128.
56. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380-2388.

57. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121-128.
58. Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011;12:735-742.
59. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239-246.
60. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013;31:3327-3334.
61. Wu YL, Zhou C, Hu CP, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:213-222.
62. Yang JC, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015;16:141-151.
63. Kato T, Yoshioka H, Okamoto I, et al. Afatinib versus cisplatin plus pemetrexed in Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer harboring activating EGFR mutations: Subgroup analysis of LUX-Lung 3. *Cancer Sci* 2015;106:1202-1211.
64. Urata Y, Katakami N, Morita S, et al. Randomized Phase III Study Comparing Gefitinib With Erlotinib in Patients With Previously Treated Advanced Lung Adenocarcinoma: WJOG 5108L. *J Clin Oncol* 2016;34:3248-3257.
65. Park K, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2016;17:577-589.
66. Paz-Ares L, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIB LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol* 2017;28:270-277.
67. Wu YL, Cheng Y, Zhou X, et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:1454-1466.
68. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al. Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J Clin Oncol* 2018;36:2244-2250.
69. Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC, et al. CNS Response to Osimertinib Versus Standard Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2018;JCO2018783118.
70. Seto T, Kato T, Nishio M, et al. Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2014;15:1236-1244.
71. Yamamoto N, Seto T, Nishio M, et al. Erlotinib plus bevacizumab (EB) versus erlotinib alone (E) as first-line treatment for advanced EGFR mutation-positive non-squamous non-small-cell lung cancer (NSCLC): Survival follow-up results of JO25567. *J Clin Oncol (suppl; abstr 9007)* 2018;36.
72. Ichihara E, Hotta K, Nogami N, et al. Phase II trial of gefitinib in combination with bevacizumab as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with activating EGFR gene mutations: the Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1001. *J Thorac Oncol* 2015;10:486-491.
73. Cheng Y, Murakami H, Yang PC, et al. Randomized Phase II Trial of Gefitinib With and Without Pemetrexed as First-Line Therapy in Patients With Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer With Activating Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *J Clin Oncol* 2016;34:3258-3266.
74. Sugawara S, Oizumi S, Minato K, et al. Randomized phase II study of concurrent versus sequential alternating gefitinib and chemotherapy in previously untreated non-small cell lung cancer with sensitive EGFR mutations: NEJ005/TCOG0902. *Ann Oncol* 2015;26:888-894.
75. Nakamura A, Inoue A, Morita S, et al. Phase III study comparing gefitinib monotherapy (G) to combination therapy with gefitinib, carboplatin, and pemetrexed (GCP) for untreated patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with EGFR mutations (NEJ009). *J Clin Oncol (suppl; abstr 9005)* 2018;36.
76. Furuya N, Fukuhara T, Saito H, et al. Phase III study comparing bevacizumab plus erlotinib to erlotinib in patients with untreated NSCLC harboring activating EGFR mutations: NEJ026. *J Clin Oncol (suppl; abstr 9006)* 2018;36.
77. Garassino MC, Martelli O, Brogini M, et al. Erlotinib versus docetaxel as second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer and wild-type EGFR tumours (TAILOR): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14:981-988.
78. Kawaguchi T, Ando M, Asami K, et al. Randomized phase III trial of erlotinib versus docetaxel as second- or third-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: Docetaxel and Erlotinib Lung Cancer Trial (DELTA). *J Clin Oncol* 2014;32:1902-1908.
79. 日本肺癌学会ガイドライン検討委員会. EBMの手法による肺癌診療ガイドライン 2017年版 ver1.1. https://www.haigangrjp/modules/guideline/indexphp?content_id=3 2018.

80. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 2013;19:2240-2247.
81. Campo M, Gerber D, Gainor JF, et al. Acquired Resistance to First-Line Afatinib and the Challenges of Prearranged Progression Biopsies. *J Thorac Oncol* 2016;11:2022-2026.
82. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3:75ra26
83. Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20932-20937.
84. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-1043.
85. Yano S, Wang W, Li Q, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* 2008;68:9479-9487.
86. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov* 2012;2:922-933.
87. Cheung HW, Du J, Boehm JS, et al. Amplification of CRKL induces transformation and epidermal growth factor receptor inhibitor resistance in human non-small cell lung cancers. *Cancer Discov* 2011;1:608-625.
88. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E2127-2133.
89. Ercan D, Xu C, Yanagita M, et al. Reactivation of ERK signaling causes resistance to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* 2012;2:934-947.
90. Sos ML, Koker M, Weir BA, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* 2009;69:3256-3261.
91. Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, et al. Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* 2010;70:8715-8725.
92. Lee JK, Lee J, Kim S, et al. Clonal History and Genetic Predictors of Transformation Into Small-Cell Carcinomas From Lung Adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 2017;35:3065-3074.
93. Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2010;30:2513-2517.
94. Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, et al. Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells. *Cancer Res* 2013;73:3051-3061.
95. Vazquez-Martin A, Cufi S, Oliveras-Ferreras C, et al. IGF-1R/epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) crosstalk suppresses the erlotinib-sensitizing effect of EGFR exon 19 deletion mutations. *Sci Rep* 2013;3:2560.
96. Hashida S, Yamamoto H, Shien K, et al. Acquisition of cancer stem cell-like properties in non-small cell lung cancer with acquired resistance to afatinib. *Cancer Sci* 2015;106:1377-1384.
97. Zhang Z, Lee JC, Lin L, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet* 2012;44:852-860.
98. Huang S, Holzel M, Knijnenburg T, et al. MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF-beta receptor signaling. *Cell* 2012;151:937-950.
99. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, et al. TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15535-15540.
100. Miller VA, Hirsh V, Cadrel J, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2012;13:528-538.
101. Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Sci Transl Med* 2011;3:90ra59.
102. Soria JC, Wu YL, Nakagawa K, et al. Gefitinib plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer after progression on first-line gefitinib (IMPRESS): a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2015;16:990-998.
103. Mok TSK, Kim SW, Wu YL, et al. Gefitinib Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy in Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer Resistant to First-Line Gefitinib (IMPRESS): Overall Survival and Biomarker Analyses. *J Clin Oncol* 2017;35:4027-4034.
104. Park K, Yu CJ, Kim SW, et al. First-Line Erlotinib Therapy Until and Beyond Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Progression in Asian Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: The ASPIRATION Study. *JAMA Oncol* 2016;2:305-312.
105. Goto Y, Tanai C, Yoh K, et al. Continuing EGFR-TKI beyond radiological progression in patients with advanced or recurrent, EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: an observational study. *ESMO Open* 2017;2:e000214.
106. Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ, et al. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov* 2014;4:1036-1045.

107. Park K, J-S L, Lee KH. BI 1482694(HM61713), an EGFR mutantspecific inhibitor, in T790M+ NSCLC; efficacy and safety at the RP2D. *ASCO Meeting Abstracts 2016; 34(15_Suppl):9055*.
108. Finlay MR, Anderton M, Ashton S, et al. Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor. *J Med Chem* 2014;57:8249-8267.
109. Planchard D, Brown KH, Kim DW, et al. Osimertinib Western and Asian clinical pharmacokinetics in patients and healthy volunteers: implications for formulation, dose, and dosing frequency in pivotal clinical studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77:767-776.
110. Yang JC, Ahn MJ, Kim DW, et al. Osimertinib in Pretreated T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: AURA Study Phase II Extension Component. *J Clin Oncol* 2017;35:1288-1296.
111. Goss G, Tsai CM, Shepherd FA, et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2016;17:1643-1652.
112. Mitsudomi T, Ahn M, Bazhenova L, et al. 1348P - Overall survival (OS) in patients (pts) with EGFR T790M-positive advanced non small cell lung cancer (NSCLC) treated with osimertinib: Results from two phase II studies. *Ann Oncol* 2017;28 (Suol 5).
113. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017;376:629-640.
114. Fujita Y, Suda K, Kimura H, et al. Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. *J Thorac Oncol* 2012;7:1640-1644.
115. Rosell R, Molina MA, Costa C, et al. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* 2011;17:1160-1168.
116. Yu HA, Arcila ME, Hellmann MD, et al. Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann Oncol* 2014;25:423-428.
117. Ding D, Yu Y, Li Z, et al. The predictive role of pretreatment epidermal growth factor receptor T790M mutation on the progression-free survival of tyrosine-kinase inhibitor-treated non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2014;7:387-393.
118. Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, et al. The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. *Clin Cancer Res* 2014;20:2001-2010.
119. Watanabe M, Kawaguchi T, Isa S, et al. Ultra-Sensitive Detection of the Pretreatment EGFR T790M Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with an EGFR-Activating Mutation Using Droplet Digital PCR. *Clin Cancer Res* 2015;21:3552-3560.
120. Zhao J, Feng HH, Zhao JY, et al. A sensitive and practical method to detect the T790M mutation in the epidermal growth factor receptor. *Oncol Lett* 2016;11:2573-2579.
121. Liu Y, Sun L, Xiong ZC, et al. Meta-analysis of the impact of de novo and acquired EGFR T790M mutations on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer receiving EGFR-TKIs. *Onco Targets Ther* 2017;10:2267-2279.
122. Ramalingam SS, Yang JC, Lee CK, et al. Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:841-849.
123. Iuchi T, Shingyoji M, Itakura M, et al. Frequency of brain metastases in non-small-cell lung cancer, and their association with epidermal growth factor receptor mutations. *Int J Clin Oncol* 2015;20:674-679.
124. Porta R, Sanchez-Torres JM, Paz-Ares L, et al. Brain metastases from lung cancer responding to erlotinib: the importance of EGFR mutation. *Eur Respir J* 2011;37:624-631.
125. Schuler M, Wu YL, Hirsh V, et al. First-Line Afatinib versus Chemotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Common Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations and Brain Metastases. *J Thorac Oncol* 2016;11:380-390.
126. Ballard P, Yates JW, Yang Z, et al. Preclinical Comparison of Osimertinib with Other EGFR-TKIs in EGFR-Mutant NSCLC Brain Metastases Models, and Early Evidence of Clinical Brain Metastases Activity. *Clin Cancer Res* 2016;22:5130-5140.
127. Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, et al. CNS Efficacy of Osimertinib in Patients With T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Data From a Randomized Phase III Trial (AURA3). *J Clin Oncol* 2018;36:2702-2709.
128. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015;21:560-562.
129. Ercan D, Choi HG, Yun CH, et al. EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res* 2015;21:3913-3923.
130. Ou SI, Agarwal N, Ali SM. High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression. *Lung Cancer* 2016;98:59-61.
131. Planchard D, Loriot Y, Andre F, et al. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol* 2015;26:2073-2078.
132. Ho CC, Liao WY, Lin CA, et al. Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Osimertinib. *J Thorac Oncol* 2017;12:567-572.
133. Bearz A, De Carlo E, Doliana R, et al. Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Third-

- Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Thorac Oncol* 2017;12:e181-e182.
134. Ahn S, Hwang SH, Han J, et al. Transformation to Small Cell Lung Cancer of Pulmonary Adenocarcinoma: Clinicopathologic Analysis of Six Cases. *J Pathol Transl Med* 2016;50:258-263.
135. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, et al. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncol* 2018;4:1527-1534.
136. Ramalingam SS, Cheng Y, Zhou C, et al. LBA50 Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: preliminary data from the phase III FLAURA study. *Ann Oncol* 2018;29.
137. Nosaki K, Satouchi M, Kurata T, et al. Re-biopsy status among non-small cell lung cancer patients in Japan:A retrospective study. *Lung Cancer* 2016;100:1-8.
138. Kanai K, Yamamoto N, Nogami N, et al. A prospective study of molecular testing status in the EGFR mutation positive NSCLC patients with disease progression during EGFR TKI treatment (REMEDY study) *J Thorac Oncol* 2018;13:S82-S83.
139. 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.
140. Lee CK, Man J, Lord S, et al. Checkpoint Inhibitors in Metastatic EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer-A Meta-Analysis. *J Thorac Oncol* 2017;12:403-407.
141. Liang H, Liu X, Wang M. Immunotherapy combined with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer treatment. *Onco Targets Ther* 2018;11:6189-6196.
142. Lisberg A, Cummings A, Goldman JW, et al. A Phase II Study of Pembrolizumab in EGFR-Mutant, PD-L1+, Tyrosine Kinase Inhibitor Naive Patients With Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol* 2018;13:1138-1145.
143. Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, et al. Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2005;65:9176-9184.
144. Zhou BB, Peyton M, He B, et al. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* 2006;10:39-50.
145. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643-655.
146. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005;353:133-144.
147. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5034-5042.
148. Yatabe Y, Takahashi T, Mitsudomi T. Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Res* 2008;68:2106-2111.
149. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011;29:2866-2874.
150. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, et al. Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23:5007-5018.
151. Engelman JA, Janne PA, Mermel C, et al. ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3788-3793.
152. Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, et al. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1133-1141.
153. Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2006;66:944-950.
154. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* 2012;18:521-528.
155. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29:2972-2977.
156. Nahar R, Zhai W, Zhang T, et al. Elucidating the genomic architecture of Asian EGFR-mutant lung adenocarcinoma through multi-region exome sequencing. *Nat Commun* 2018;9:216.
157. Tan DS, Yom SS, Tsao MS, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Consensus Statement on Optimizing Management of EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Status in 2016. *J Thorac Oncol* 2016;11:946-963.
158. Mok TS, Carbone DP, Hirsch FR. IASLC ATLAS OF EGFR TESTING IN LUNG CANCER. An IASLC publication (<https://www.iaslc.org/publications/iaslc-atlas-egfr-testing-lung-cancer>) 2017.
159. 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.
160. Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B, et al. Comparison of molecular testing methods for the detection of EGFR mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2013;66:381-385.
161. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res* 2011;17:1169-1180.
162. Sherwood JL, Muller S, Orr MC, et al. Panel based MALDI-TOF tumour profiling is a sensitive method for detecting mutations in clinical non small cell lung cancer tumour. *PLoS One* 2014;9:e100566.
163. Young EC, Owens MM, Adebisi I, et al. A comparison of methods for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer. *Diagn Mol Pathol* 2013;22:190-195.
164. Dias-Santagata D, Akhavanfar S, David SS, et al. Rapid targeted mutational analysis of human tumours: a clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med* 2010;2:146-158.
165. Janne PA, Borras AM, Kuang Y, et al. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res* 2006;12:751-758.
166. Uchida J, Kato K, Kukita Y, et al. Diagnostic Accuracy of Noninvasive Genotyping of EGFR in Lung Cancer Patients by Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA. *Clin Chem* 2015;61:1191-1196.
167. Forsheo T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012;4:136ra168.
168. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011;17:7808-7815.
169. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014;20:548-554.
170. Qiu M, Wang J, Xu Y, et al. Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24:206-212.
171. Yoon HJ, Lee HY, Lee KS, et al. Repeat biopsy for mutational analysis of non-small cell lung cancers resistant to previous chemotherapy: adequacy and complications. *Radiology* 2012;265:939-948.
172. Wu YL, Zhou C, Liang CK, et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol* 2015;26:1883-1889.
173. Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M, et al. Monitoring EGFR T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Sci* 2016;107:162-167.
174. Zheng D, Ye X, Zhang MZ, et al. Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Sci Rep* 2016;6:20913.
175. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2016;34:3375-3382.
176. 高濱隆幸, 東公一, 下川元継, et al. 血漿 EGFR T790M 遺伝子変異陽性/既治療非小細胞肺癌患者における osimertinib の有効性を検討する第二相試験 (WJOG8815L/LPS). 第 16 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2018.
177. Yatabe Y, Kerr KM, Utomo A, et al. EGFR mutation testing practices within the Asia Pacific region: results of a multicenter diagnostic survey. *J Thorac Oncol* 2015;10:438-445.
178. Shiao CJ, Babwah JP, da Cunha Santos G, et al. Sample features associated with success rates in population-based EGFR mutation testing. *J Thorac Oncol* 2014;9:947-956.
179. Leary AF, Castro DG, Nicholson AG, et al. Establishing an EGFR mutation screening service for non-small cell lung cancer - sample quality criteria and candidate histological predictors. *Eur J Cancer* 2012;48:61-67.
180. Hlinkova K, Babal P, Berzinec P, et al. Evaluation of 2-year experience with EGFR mutation analysis of small diagnostic samples. *Diagn Mol Pathol* 2013;22:70-75.
181. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 2012;76:1-18.
182. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-145.
183. 日本病理学会. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 初版. http://pathologyorjp/genome_med/pdf/textbookpdf 2018.
184. 日本肺癌学会バイオマーカー委員会. 肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引き 第 2.1 版 <https://www.haigangrjp/uploads/files/photos/1039pdf> 2015.
185. Hubers AJ, Heideman DA, Yatabe Y, et al. EGFR mutation analysis in sputum of lung cancer patients: a multitechnique study. *Lung Cancer* 2013;82:38-43.
186. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 2018;36:1631-1641.

187. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142:1242-1253.

188. Goto K, Satouchi M, Ishii G, et al. An evaluation study of EGFR mutation tests utilized for non-small-cell lung cancer in the diagnostic setting. *Ann Oncol* 2012;23:2914-2919.

189. 臨床検査振興協議会. がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方 (第 1.0 版).

<https://www.jslm.org/committees/gene/20181030panelpdf>
2018.

付 録

付 1) 主な EGFR 変異の検出法の解説 (本手引き第 2.1 版掲載分)

検査法の種類	説明
1) 塩基配列決定により変異を特定する方法*	
直接塩基配列法 (Direct sequencing 法)	Sanger 法による塩基配列決定をおこなう方法。通常は数時間で 300 塩基ほどの配列が決定できる。変異アレルが 10%以上あることが必要で感度はあまり良好ではないが、変異検索の基本となる方法である。本法を EGFR 変異検査に用いることは本邦ではほとんどなくなった。
2) 変異のスクリーニングが可能な方法 (未知の変異の検出が可能) **	
PCR-SSCP 法	一本鎖 DNA 断片の塩基配列特異的な高次構造による電気泳動距離の差により変異の有無を検出する方法。
Fragment (length) 解析法	解析対象の領域を PCR で増幅し、PCR 産物の長さを genetic analyzer で検討する。エクソン 19 欠失変異やエクソン 20 の挿入変異では変異によって DNA の長さが変化するため、このような変異であれば未知なものでもスクリーニングできる。
3) 特定の変異の検出を高感度、迅速に行う方法***	
PNA LNA PCR-Clamp 法	PNA (peptide nucleic acid) で正常配列をマスクするクランププライマー、LNA (locked nucleic acid) を検出プローブとして用いたリアルタイム PCR。PNA と LNA は 1 塩基のミスマッチで Tm 値が大きく減少するため、通常の DNA プローブよりも特異性は向上しており、高感度測定が可能となった。感度は 1%程度。
PCR-Invader 法	PCR 後に Invader 法を行う。2 種類のプローブとサンプル DNA (PCR 増幅産物) が 3 重鎖を形成した部位を酵素が切断すると蛍光シグナルが発生する。特に遺伝子変異が 1 塩基置換の場合、プローブの結合のみに頼るリアルタイム PCR と比較して特異性は非常に高く、高感度測定が可能である。感度は 1%程度。
Cycleave 法	点突然変異を検出する方法である。変異特異的なプローブを作成し両端を蛍光色素とクエンチャーでラベルしておく。変異特異的な塩基は RNA で合成しておく、これが PCR 産物とハイブリダイズすると、加えられていた RNaseH は DNA-RNA ハイブリッドの RNA 部分で切断する酵素なので、プローブが RNA 切断され、クエンチャーが蛍光色素からはなれることで蛍光が発せられる。感度は 1%程度。
Scorpion ARMS 法	Scorpion プライマーと ARMS プライマーを用いたリアルタイム PCR 法。プローブ部の変異部位に結合する PCR プライマーの 3'端をミスマッチな塩基に置換することで伸長反応をブロックする ARMS (amplification refractory mutation system)法と、増幅された PCR 産物を検出する Scorpion 法により高感度高特異度に検出する。このプローブは蛍光色素と発色を減弱するクエンチャーを結合しており、プローブが PCR 産物に結合するとクエンチャーと蛍光色素がはなれて発色反応がおこることを利用している。
Taqman probe 法	蛍光ラベルされたオリゴヌクレオチドプローブ (Taqman プローブ) を用いたリアルタイム PCR 法。

*: 上記のほか、Pyrosequencing 法などがある。

** : 上記のほか、denaturing HPLC, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), LH-MSA 法などがある。

***: 上記のほか、PCR-RFLP 法, iPLEX 法, SMAP 法, HRMA (high resolution melting analysis) 法などがある。

第 4.1 版から第 4.2 版への改訂点

- 9-10 頁

改訂前

「また the US Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System (FAERS) database をもちいた解析では, EGFR-TKI 関連 ILD の発現頻度は第一・第二世代 EGFR-TKI で 2.1-6.9%であるのに対しオシメルチニブは 10.7%である²²⁾」

上記、発現頻度という表記が誤解を招くため、削除し、

改訂後

「またタグリッソ®の使用成績調査の結果から、オシメルチニブの ILD 発現頻度は 6.8% (245 症例/3578 症例) で、ILD 発現に関する多変量ロジスティック回帰モデル解析結果では「間質性肺疾患の病歴」と「ニボルマブ前治療歴」が有意なリスク因子と示唆された²²⁾」

文献 22 を「アストラゼネカ株式会社. タグリッソ使用成績調査 最終報告 結果報告.

<http://www.jsmoor.jp/file/dl/newsj/2301pdf> 2019.) に差し替えた.