

## 目次

第3版の序	I	9-2. EGFR遺伝子増幅	10
第2版の序	II	9-3. 他のHERファミリー	10
初版の序	III	9-4. その他の遺伝子変化とTKI感受性	10
要約	IV		
はじめに	1	III. EGFR遺伝子変異検査	11
I. EGFR分子とその遺伝子変異	1	10. EGFR遺伝子変異検査の対象患者	11
1. EGFRによるシグナル伝達	1	11. EGFR遺伝子変異検査に用いる検査法	12
2. EGFR遺伝子変異	2	11-1. EGFR-TKI投与前の初回検査	12
II. EGFR-TKI治療	3	11-2. EGFR-TKI耐性患者の T790M変異検査	13
3. EGFR低分子チロシンキナーゼ阻害薬	3	11-3. EGFR変異タンパクを対象とした検査	13
4. EGFR遺伝子変異とEGFR-TKI感受性	4	11-4. NGS技術等を用いた マルチプレックス変異検査	13
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	4	12. EGFR遺伝子変異検査に用いられる 検体の特徴とその取り扱い	14
4-2. まれなEGFR遺伝子変異 (uncommon mutation)	4	12-1. FFPE組織検体	14
5. EGFR遺伝子変異陽性NSCLCに対する治療	4	12-2. 細胞検体	14
5-1. 初回治療における EGFR-TKI vs. 化学療法の臨床試験	5	12-3. FFPE細胞検体 (セルブロック検体)	14
5-2. 初回治療における EGFR-TKI vs. EGFR-TKIの臨床試験	6	12-4. 新鮮凍結検体	14
5-3. EGFR-TKIと他の薬剤の併用療法	6	12-5. 血中遊離DNA検体 (リキッドバイオプシー検査)	15
6. EGFR遺伝子野生型におけるEGFR-TKI	6	12-6. 検体の適正性の評価について	16
7. 獲得耐性	7	13. 薬事承認および保険診療の観点からみた 本検査の在り方	16
8. 獲得耐性への治療戦略	7	おわりに・・・実地診療とEGFR変異	18
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	7	文献	20
8-2. 第三世代EGFR-TKI	8	付録	26
8-3. 第三世代EGFR-TKIのための再生検	9	付1) CAP/IASLC/AMPガイドラインのまとめ	26
8-4. 免疫チェックポイント阻害薬	9	付2) 主なEGFR変異の検出法の解説	29
9. EGFR-TKI治療とその他の効果予測因子	10		
9-1. リガンドレベルの変化	10		

## 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、ペ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ままでもない。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ており、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. 肺癌, 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. この様な背景から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

## 要 約

	説 明
EGFR遺伝子変異検査の適応	<p><b>EGFR-TKI投与前の初回検査</b> 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. 小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.</p> <p><b>EGFR-TKI治療耐性後の二次的T790M変異検査</b> EGFR-TKI耐性となった肺癌患者</p>
使用する検体	<p><b>EGFR-TKI投与前の初回検査</b> 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.</p> <p><b>EGFR-TKI治療耐性後の二次的T790M変異検査</b> 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.</p>
検出方法	<p><b>EGFR-TKI投与前の初回検査</b> 以下のIVD法 (リアルタイムPCR法) の使用が推奨される (保険点数は2500点).  <ul style="list-style-type: none"> <li>・therascreen®EGFR変異検出キット (キアゲン社)</li> <li>・コバス®EGFR変異検出キットv2.0 (ロシュ・ダイアグノスティックス社)</li> </ul>           遺伝子関連検査の質保証体制*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 (保険点数は2100点). 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.</p> <p><b>EGFR-TKI治療耐性後の二次的T790M変異検査</b> 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, 以下のIVD法のみが推奨される (保険点数は2500点).  <ul style="list-style-type: none"> <li>・コバス®EGFR変異検出キットv2.0 (ロシュ・ダイアグノスティックス社)</li> </ul> </p>
検出対象となる変異	<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  <ul style="list-style-type: none"> <li>・エクソン19欠失変異, L858R変異 (最も良い適応)</li> <li>・G719X変異, L861Q変異, S768I変異 (薬剤により感受性が異なる)</li> </ul> </p> <p>② 抵抗性変異であることが既知のもの  <ul style="list-style-type: none"> <li>・T790M変異 (二次的の場合は第三世代EGFR-TKIの適応)</li> <li>・エクソン20挿入変異</li> </ul> </p> <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>
EGFR-TKIの使用	肺癌診療ガイドラインを参考にする.

\* 参考資料 (<http://www.jrcla.or.jp/info/info/250726.pdf>)

## 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, 2007年10月にはエルロチニブ (タルセバ®) が承認された. これらの薬物は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す. 2004年の春に非小細胞肺癌 (NSCLC) におけるEGFR遺伝子変異 (以下EGFR変異) 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<sup>1,2</sup>. 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<sup>3,4</sup>. 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耐性時のリバイオプシーやそのコンパニオン診断薬, リキッドバイオプシーの検討や耐性時の治療戦略など様々な変化が起こってきている.

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4月に第2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を鑑み, 今回手引きの第3.0版への改訂を行った.

## 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 $\alpha$ , amphiregulin (AR)), EGFRとHER4に結合するグループ (betacellulin (BTC)), heparin-binding EGF

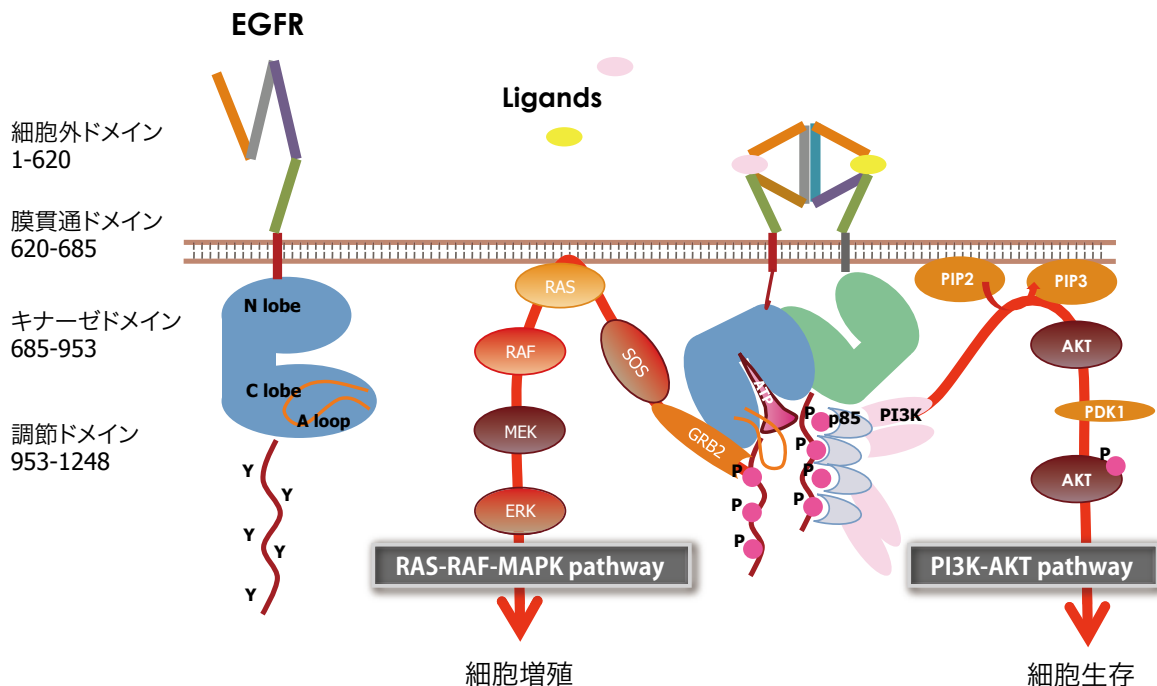


図1. EGFR経路

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.

(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<sup>5,6</sup>。

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どうし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(図1)。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 $\gamma$ , 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<sup>5,6</sup>。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<sup>7-9</sup>。

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<sup>1,2</sup>。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)<sup>10</sup>。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。

2007年にMitsudomi T. 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<sup>11</sup>。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<sup>12</sup>。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<sup>13</sup>。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%)<sup>14</sup>。腺癌200例の解析でEGFR変異陽性腺癌のIASLC/ATS/ERS分類によ

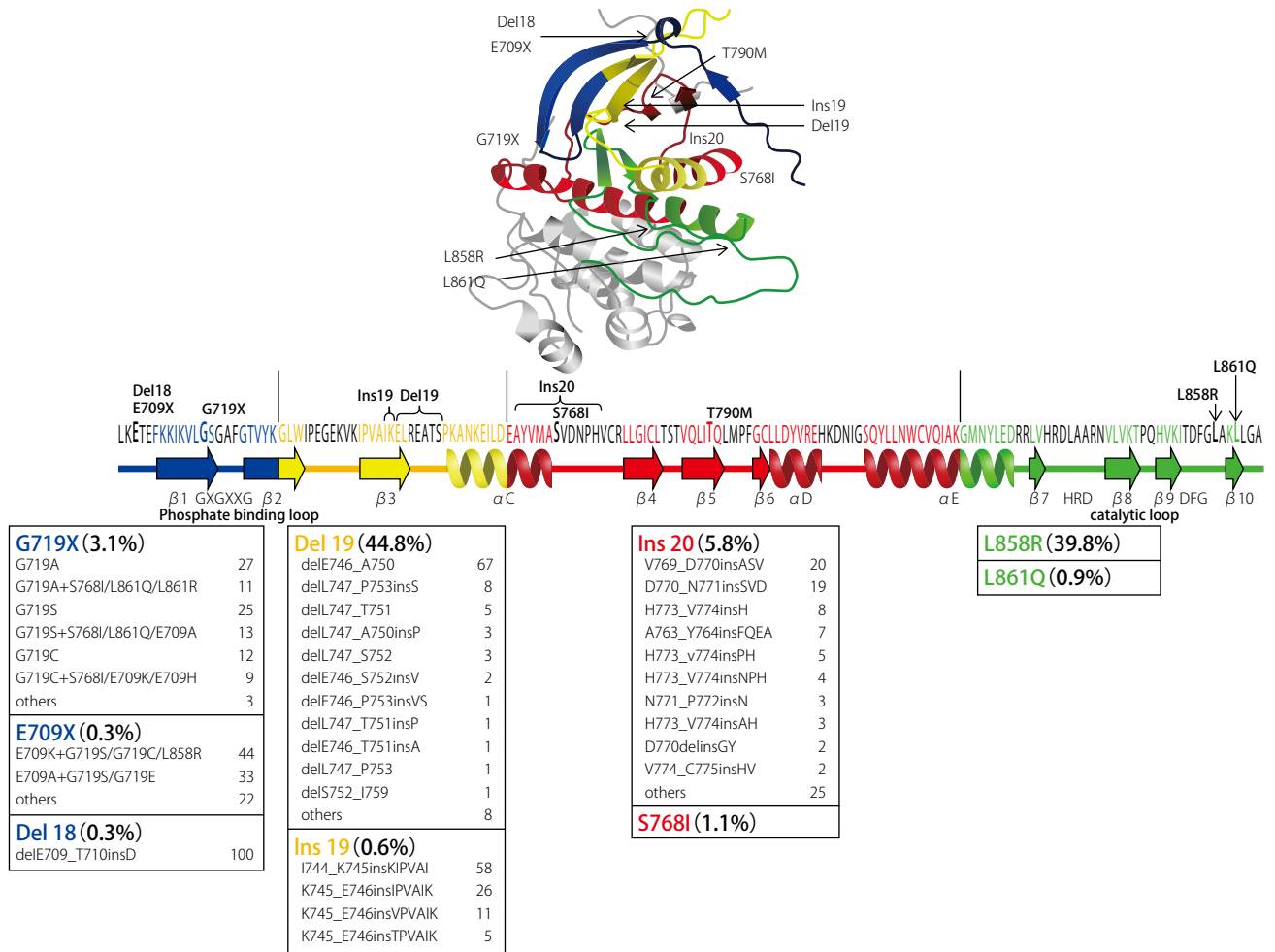


図2. EGFR遺伝子変異の種類と頻度

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、 $\alpha$ -ヘリックスを、太い矢印は、 $\beta$ -シートを示している。

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

るsubtypeはacinar predominant (43/77 ; 55.8%)とpapillary predominant (26/49 ; 53.1%)が多いと報告されている。また200例中3例がlepidic predominantで全例がEGFR変異陽性であった<sup>15</sup>。

## 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®)がある。

そして第三世代EGFR-TKIとして、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。EGFR変異陽性NSCLCの1次治療においてEGFR-TKIを投与すると、多くの患者で耐性の獲得が認められ、その耐性メカニズムとしてEGFR T790M変異が約60%を占めることが報告されている<sup>3,4</sup>。オシメルチニブは、EGFR活性化変異および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<sup>16</sup>。

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、下痢などが多く、特に重篤な副作用として頻度は少ないが薬剤性肺障害(ILD)(Grade3以上, 0.6-2.2%)があげられる<sup>17</sup>。一方、オシメルチニブはEGFR活性化変異と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、下痢の頻度も少なく軽度である<sup>18</sup>。またILDは全症例中2.7% (11/411)に、日本人の6.3% (5/80)に報告されている<sup>19</sup>。

#### 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<sup>20</sup>。

##### 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<sup>10, 21-25</sup>。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<sup>26</sup>。

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<sup>27</sup>。エクソン19欠失変異は、 $\alpha$ -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こり、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<sup>28</sup>。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<sup>29</sup>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<sup>30</sup>。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<sup>10, 31-34</sup>、ORRは第一世代EGFR-TKIに対し17%<sup>33-37</sup>、アフチニブに対して10%と効果が乏しい<sup>38, 39</sup>。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<sup>40</sup>。G719Xは第一世代EGFR-TKIに対するORRは32%であるのに対し、LUX-Lung2, 3, 6試験の統合解析ではアフチニブに対するORRは78%と良好であった<sup>10, 39</sup>。S768IとL861Qは第一世代EGFR-TKIに対しそれぞれ、42%、39%のORRで<sup>10</sup>、アフチニブに対しそれぞれ100%、56%のORRであった<sup>39</sup>。

#### 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 (TALENT<sup>41</sup>、INTACT1<sup>42</sup>、INTACT2<sup>43</sup>、TRIBUTE<sup>44</sup>) 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<sup>45</sup>) あるいはエルロチニブ (BR.21試験<sup>46</sup>) 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

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<sup>47</sup>、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<sup>48</sup>。

これらの混沌とした状況に終止符を打ったのは、アジアで行われたカルボプラチン+パクリタキセル対ゲフィチニブの第Ⅲ相試験IPASS<sup>49</sup>である。本試験では、非-軽喫煙歴の腺癌症例を対象にゲフィチニブのPFSにおける優越性が検証されたが、試験全体において統計学的にはゲフィチニブの優越性が示されたものの、両群のPFS曲線が交差する解釈が難しい結果が示された。しかし、EGFR変異別のサブセット解析にて、EGFR変異陽性群ではゲフィチニブ群が明らかに化学療法群に勝り(HR=0.48)、一方のEGFR変異陰性群では全く逆の結果となったことから(HR=2.85)、EGFR-TKIの効果予測因子がEGFR変異である可能性が示唆された(表1)。

### 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<sup>50</sup>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試験とWJTOG3405試験は、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<sup>51, 52</sup>。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。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<sup>53</sup>、欧州からはEURTAC試験<sup>54</sup>が報告され、PFSおよびORRともにエル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<sup>55</sup>ではシスプラチン+ペメトレキセド群とLUX-Lung 6試験<sup>56</sup>ではシスプラチン+ゲムシタピン群との比較が行われ、主要評価項目のPFSでは、両試験において化学療法群に対するアファチニブ群の有意な延長効果を認めた。2015年にLUX-Lung 3試験とLUX-Lung 6試験のOSの

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	OS(月)	HR
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)

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)<sup>57</sup>。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生存期間の延長 (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。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生存期間の延長を認めた<sup>58</sup>。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、現在の初回標準療法と考えられる (表1)。

## 5-2. 初回治療におけるEGFR-TKI vs. EGFR-TKIの

### 臨床試験

複数存在するEGFR-TKIの効果の優劣は現時点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<sup>17</sup>。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。

2016年にゲフィチニブとエルロチニブとの第Ⅲ相比較試験 (WJOG5108L試験)<sup>59</sup>とゲフィチニブとアファチニブとの第Ⅱ相比較試験 (LUX-Lung 7試験)<sup>60</sup>の結果が報告された。ゲフィチニブのエルロチニブに対するPFSの非劣性を検証したWJOG 5108L試験では非劣性は示されなかった<sup>59</sup>。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<sup>60</sup>、OSには差がなかったことが2016年の欧州臨床腫瘍学会 (ESMO) で報告された。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<sup>57</sup>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Ⅱ相比較試験

のサブグループ解析のため、この結果により薬剤選択が変わるというものではない。

## 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が生まれ、エルロチニブ+ペバシズマブのJO25567試験<sup>61</sup>、ゲフィチニブ+ペバシズマブのOLCSG1001試験<sup>62</sup>、ゲフィチニブ+ペメトレキセドのJMIT試験<sup>63</sup>、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<sup>64</sup>のように有望な結果が報告されている。これらの試験はすべて第Ⅱ相臨床試験であり、今後第Ⅲ相臨床試験にて再現性が確認されることが期待される。EGFR-TKIと他の薬剤との併用療法を検討した第Ⅲ相臨床試験として現在、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、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、ゲフィチニブ単剤療法とゲフィチニブにシスプラチン+ペメトレキセドを途中挿入する治療とのランダム化比較試験 (JCOG1404/WJOG8214L試験：AGAIN試験) などが進行中で、その結果が待たれる。

## 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<sup>46</sup>、特にエルロチニブについては現時点でもEGFR野生型NSCLCの二次治療における標準療法の1つとされてきた (グレードC1)。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<sup>65</sup>。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次治療とし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が有意にPFSが良好であった<sup>66</sup>。この結果より、EGFR野生型の2次治療において少なくともドセタキセルの前にエル

ロチニブを使用する科学的根拠は乏しい。

## 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<sup>3,4</sup>。ゲートキーパー変異と呼ばれるこのような変異が起こると、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。

その他の耐性メカニズムとしてはMET遺伝子増幅<sup>67-69</sup>、HGF過剰発現<sup>70</sup>、HER2増幅<sup>71</sup>、CRKL遺伝子増幅<sup>72</sup>、PI3K遺伝子変異<sup>69</sup>、BRAF変異<sup>73</sup>、MAPK1増幅<sup>74</sup>、PTEN発現喪失<sup>75,76</sup>などがある。さらに、小細胞肺癌トランスフォーメーション<sup>69</sup>上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)<sup>77</sup>の関与も示され、そのメカニズムとしては、AXL活性化<sup>78</sup>、MED12発現低下<sup>79</sup>、TGFβ-IL6<sup>80</sup>等が報告されている(図3)。

現在はT790M変異を対象とした薬剤が開発され、T790M変異の有無により治療を考えることができるようになった。

## 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<sup>81</sup>。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<sup>82</sup>、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<sup>83</sup>。2015年の世界肺癌学会ではIMPRESS試験のT790Mサブグループ解析で、T790M陽

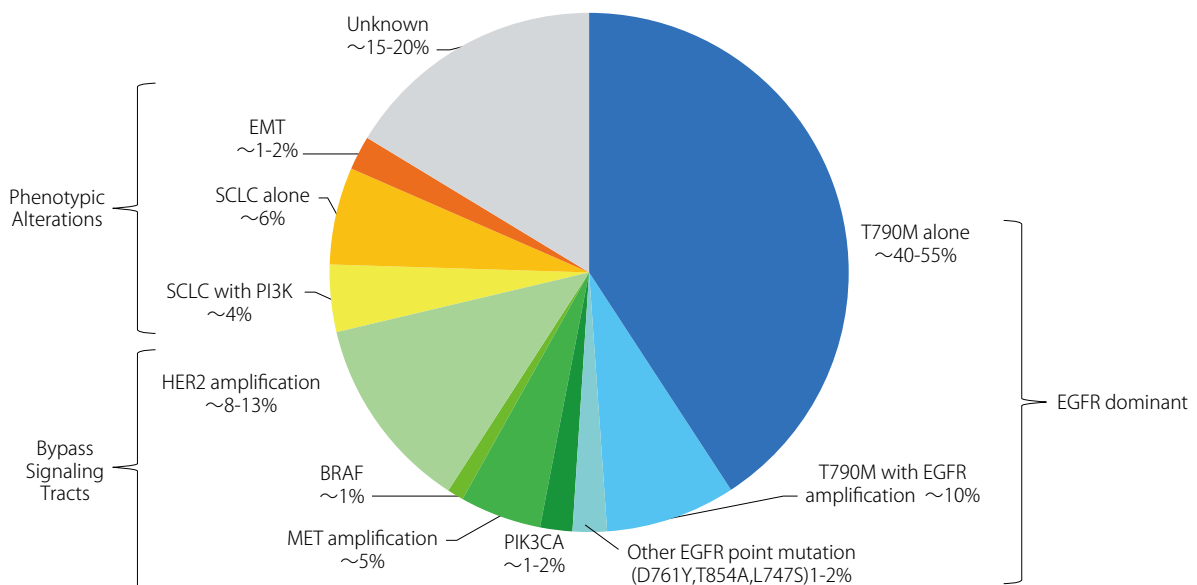


図3. EGFR-TKIsに対する獲得耐性のメカニズム

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。

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<sup>84</sup>。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。

2014年のASCOで報告されたCSPOR LC-02試験は、日本の多施設共同、プロスペクティブ、コホート試験で、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。577例について解析した結果、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。

EGFR-TKI耐性に対し、アフアチニブと抗EGFR抗体であるセツキシマブを併用した第Ib相臨床試験で良好な結果が報告された<sup>85</sup>。T790M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アチニブ単剤に対するアフアチニブ＋セツキシマブ併用療法の効果を検証する第II/III相試験が現在行われている。

現時点では、一次治療でEGFR-TKIsを投与されて進行した場合、再生検が困難な症例やT790M変異陰性の症

例には二次治療として細胞傷害性抗癌剤が選択される（推奨グレードB）。

## 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た。多くの第三世代EGFR-TKIはT790M変異に対する結合親和性が高く、野生型EGFRに対する結合親和性は低いという特徴がある。またC797Sに共有結合することでEGFRに対して不可逆的に結合する<sup>16</sup>。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期待される。第三世代EGFR-TKIとして、現在多くの薬剤（オシメルチニブ、HM61713、ASP8273など）の臨床試験中である。ロシレチニブ（CO-1618）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。

その中で本邦において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。

2015年4月に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<sup>18</sup>。2016年の欧州肺癌学会（ELCC）においてT790M変異陽性NSCLC患者に対しオシメルチニブ80mgを投与した第I相試験および第II相試験併合成績の結果が報告された。ORRは第I相試験で71%、第II相試験で66%であった。PFS中央値は第I/II相併合成績で11.0か月で、2016年の日本臨床腫瘍学会で日本人コホート81名では13.9か月と非常に良好な結果が報告された。

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、オシメルチニブが有意にPFSの延長を認めたことを2016年7月にアストラゼネカ社よりプレスリリースされている。

2016年のASCOで報告された第I相BLOOM試験では、初回EGFR-TKI耐性患者のT790M変異の発現状態に関係なく、オシメルチニブが中枢神経系(CNS)病変にも効果が期待できることが報告された。

AURA試験の第I相試験拡大コホートで局所進行または転移を有するEGFR変異陽性NSCLC患者60人が対象となり、初回治療として80mgと160mgのオシメルチニブを投与された。PFS中央値は160mg投与群で19.3カ月、80mg投与群で未到達であったことが2016年のELCCで報告された。現在おこなわれている初回治療として、ゲフィチニブ、エルロチニブとオシメルチニブを比較した第Ⅲ相試験(FLAURA試験)の結果が待たれる。

すでに第三世代EGFR-TKI投与例においても約1年で耐性変異が発現することが報告されている。耐性獲得メカニズムの一つとしてC797S変異の関与が報告された<sup>86, 87</sup>。またT790M変異陰性化による耐性機序で、その要因として、MET増幅やHER2増幅<sup>88</sup>、BRAF V600E変異<sup>89</sup>の可能性も示唆された。

### 8-3. 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<sup>90</sup>。

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<sup>91</sup>。

再生検からの組織検体に加えて、血中遊離DNA (cell-free DNA ; cfDNA) を用いたT790M変異検査も近年開発が進み、その臨床導入が期待される。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)。

### 8-4. 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、Checkmate-057試験でEGFR変異状況別のPFS検討がされており、変異陽性例ではドセタキセル群で良好な傾向がみられているが、少数例であり今後の検討課題である<sup>92</sup>。

また、2016年のELCCにてEGFR変異陽性の進行NSCLC患者を対象に実施された国際共同第Ib相試験

(TATTON) のオシメルチニブと抗PD-L1抗体である Durvalumab (MEDI4736) の併用群に関する試験結果が報告された。オシメルチニブとDurvalumab併用群では、ILDの発現頻度が各単剤投与時と比べ増加するという報告がなされており、両剤が併用された34例中13例(38%)にILDが認められ(Grade3/4が5例, Grade5は0例), うち日本人症例においては10例中6例(60%)で、試験は中断され、解析中である<sup>93</sup>。

実臨床では現在ニボルマブが使用可能であるが、ニボルマブ治療後にオシメルチニブなどの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。ILDのリスクを鑑みるとEGFR-TKI(特に第三世代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 $\alpha$ の発現が高いことが示された<sup>94</sup>。また、血中のこれらのリガンド濃度の上昇はゲフィチニブの感受性と逆相関していた。

HERファミリーのリガンドは細胞表面に結合した形で合成され、shedaseといわれる蛋白分解酵素で切り出される。ErbBリガンドのshedaseはADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリーに属し、特にADAM10と17の関与が強い。多くの肺癌細胞株がADAM17を発現しており、このような細胞ではERBB3のリガンドであるheregulinが増加している<sup>95</sup>。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<sup>95</sup>。

### 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)<sup>96</sup>。ここで注意しておくべきことは、遺伝子増幅のほかに40%以上の腫瘍細胞がテトラソミー(4染色体性)以上となっている場合(high polysomy)をふくめて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<sup>11</sup>。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<sup>97</sup>。またISEL試験においてもコピー数が生存の予測因子であったと報告されている<sup>98</sup>。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<sup>99</sup>、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<sup>100</sup>。

### 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<sup>101</sup>、前述のようにHER2増幅はEGFR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<sup>102</sup>。

### 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<sup>103</sup>, 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<sup>104</sup>。

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<sup>105</sup>。

### III. EGFR遺伝子変異検査

#### 10. EGFR遺伝子変異検査の対象患者

EGFR変異は肺腺癌特異的に認められるEGFR-TKIの効果予測因子であるので, EGFR変異検査は薬物治療を考慮している腺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。

またひとつの検体の中の不均一性についてはあるとするものないとするもの様々な報告があるが, Yatabeらの詳細な解析により否定されたと考えて良いであろう<sup>106</sup>。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<sup>106</sup>。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重複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ないとはいえない。

一方, EGFR-TKI治療後に出現した腫瘍に対しては, 2016年3月に承認された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。二次的T790M変異検査では, 現在血漿中のcfDNAを用いた検査(リキッド・バイオプシー検査)の開発が国内外で進んでいるが, 本邦で薬事承認され, 保険適用対象となっている検体は組織であることから, EGFR-TKI治療後の増悪部位から再生検された検体が必要となる。

なお初回のEGFR変異検査については, 2013年にCollege of American Pathologists(CAP), International



表2. EGFR遺伝子変異の検出法とその特性<sup>107-119</sup>

Class (in tissue)		Technique	Sensitivity (%Mutant DNA)	Mutations Identified	Detection of Co-mutations	Potential Applications	Ref (s)
IVD	JP US EU	Cobas	3%-5%	known only	No	Tissue, Plasma	108
		therascreen	1%-10%	known only	No	Tissue, Plasma	108
	EU only	MassARRAY Dx Lung Panel	1%-10%	known only	Yes (hotspots)	Tissue	109 110
		Oncomine™ Solid Tumour DNA Kit	1%-10%	known & new	Yes	Tissue	—
RUO		Direct sequencing	10%-25%	known & new	No	Tissue	MS
		Pyrosequencing	5%-10%	known only	No	Tissue	111
		Multiplex PCR (SnaPshot)	5%	known only	Yes (hotspots)	Tissue	112
		WAVE-surveyor	2%	known only	No	Tissue, Plasma	113
		High-depth NGS (at least 1000x depth)	1%-10%	known & new	Yes	Tissue, Plasma	114
		Scorpion ARMS	1%	known only	No	Tissue, Plasma	—
		Locked nucleic acid clamp	1%	known only	No	Tissue, Plasma	115
		TAm-Seq	2%	known & new	Yes	Tissue, Plasma	116
		BEAMing	<0.1%	known only	No	Tissue, Plasma	117
		Digital droplet PCR	<0.1%	known only	No	Tissue, Plasma	118
	CAPP-Seq	~0.02%	known & new	Yes	Plasma	119	

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.

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<sup>91</sup>が発出されているので、その和訳要約を巻末に示す(付1)。また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2016年7月に公表されたので参照されたい<sup>107</sup>。

## 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)。また近年次世代シーケンス(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、薬事未承認検査法(laboratory developed test ; LDT)として利用が進んでいる(表2)<sup>107-119</sup>。一般に、腫瘍組織を用いたEGFR変異検査において求められる検出感度は、1%~5%程度とされる。本邦においては、EGFR変異検査が保険適用され、まもなく10

年になろうとしている。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、上記LDT法に相当する検査法(LDT相当法)を用いて、その運用が進められていた。その後2012年には体外診断用医薬品(*in vitro* diagnostics ; IVD)承認された検査法が上市され、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ことで、IVD法の利用は急増している。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を鑑みると、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。

### 11-1. 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。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PNA LNA PCR-Clamp法、PCR-Invader法、Cycleave法の3つのLDT相当法が、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Taqman probe法を用いたリアルタイムPCR法 (コバス®EGFR変異検出キット；ロシュ・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。現在では主要検査センターにおいてIVD法の受託が可能となる状況となり、また医療機関においても徐々に導入が進んでいる。

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-Lung 2、-Lung 3、-Lung 6の統合解析で示された<sup>39</sup>。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<sup>33-39</sup>。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。

### 11-2. EGFR-TKI耐性患者のT790M変異検査

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、日本では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 (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) 組織検体から抽出したゲノムDNAを検査対象にIVD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承認法との検査結果の一致率は95.6%、次世代シーケンス (next generation sequencing；NGS) 法との一致率は91.0%となっている。

### 11-3. EGFR変異タンパクを対象とした検査

EGFR変異タンパクに特異的な抗体が市販され<sup>120</sup>、複数の報告でEGFR変異との相関性が報告されているが、臨床有用性は確立されておらず、患者選択の方法として用いることは推奨されない<sup>91</sup>。

### 11-4. NGS技術等を用いたマルチプレックス変異検査

近年、トランスレーショナル研究を中心に、マルチプレックス変異解析法の利用が急速に広まっており、特にNGSをベースとした解析は、今後のがんゲノム診断での臨床実装に向け、国内外で臨床開発が進んでいる。NGSを用いたクリニカルシーケンスでは、DNA断片をテンプレートとし1塩基ずつ再合成する時の蛍光強度を検出し塩基配列を決定する方法や、合成時に放出される水素イオンを検出する方法などが用いられている。海外では欧州において2015年1月にEGFR変異を含む22種のがん関連遺伝子のNGS用腫瘍遺伝子パネル (Oncomine Solid Tumor DNA kit；サーモフィッシャーサイエンティフィック社) がCE-IVD認証された。また国内では、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シーケ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。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たといえる。NGS法を用いたEGFR変異検査については、分析的な妥当性は示されているものの、あくまでも臨床研究レベルであり臨床の有用性等については未だ検証途上にあることから、現時点では保険診療 (D004-2 悪性腫瘍組織検査・EGFR遺伝子検査 (リアルタイムPCR法以外) 2,100点) としての使用は推奨されない。

## 12. EGFR遺伝子変異検査に用いられる検体の特徴とその取り扱い

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）が多く用いられている。IVD法ではFFPE組織検体での検査が原則となっているが、臨床上、細胞検体は積極的に用いられている<sup>121,122</sup>。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<sup>122-124</sup>。

### 12-1. 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。切片を5um厚で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TBLB検体では、病理診断の後に再薄切した場合には、組織自体がほとんどなくなり、腫瘍細胞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<sup>125</sup>。また、病理診断報告書で腫瘍細胞があるといっても、その含有量は様々であり病理医にどの程度の腫瘍細胞があるか報告書に記載を依頼したり、提出する際にそれを確認することが必要である。検査センターへ外注する場合で、かつ小さな生検検体で分量のFFPE組織検体の提出が難しい場合は、検査センター担当者に問い合わせるのがよい。

DNAは固定の影響を受けやすく、長時間（1週間以上）ホルマリンに固定・浸漬していた検体ではDNAは断片化されてしまい、検出不能である。ホルマリン固定は、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<sup>91,126</sup>。生検材料では固定時間は6～18時間程度が一般的なので、腫瘍細胞

の量は少ないながらも、DNA品質が保たれていることが多い。過固定の可能性のある手術標本については、むしろ生検標本を用いることを考慮したい。

### 12-2. 細胞検体

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。また、セルブロックの作製も考慮されたい（後述）。

b) 経気管支擦過細胞・経気管支穿刺吸引細胞・リンパ節穿刺吸引細胞：これらの検体では適切に腫瘍から採取されれば腫瘍細胞に富んだ検体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メア標本からの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<sup>127</sup>。

### 12-3. 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作製の重要性が増している。セルブロックでの保存により、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免疫組織化学法やFISH法による解析が、繰り返し可能となる。セルブロック作製法は複数知られており、遠心分離細胞収集法と細胞固化法に大別される。本邦ではそれぞれ4～5種程度の作製法が用いられていることがこれまでの調査研究で明らかとなっているが、前者では遠心管法が、後者ではアルギン酸ナトリウム法が、比較的多くの施設で用いられている（アルギン酸ナトリウム法については「肺癌患者におけるALK遺伝子検査の手引き」を参照）。

### 12-4. 新鮮凍結検体

もっとも高品質のDNA、RNAを抽出可能である。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率を確認する。②採取時に割をいれその片割れを凍結組織とし、残りの割面で組織標本を作製し、確認する。

## 12-5. 血中遊離DNA検体(リキッドバイオプシー検査)

組織検体に加えて、cfDNAを用いた、いわゆるリキッドバイオプシー検査によるEGFR変異検査が、欧米で臨床導入されるようになり、本邦においても目前に迫っている。リキッドバイオプシー検査は、患者の負担も少なく、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<sup>128</sup>。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2)。またコバス®EGFR変異検出キットv2.0については、欧州でCE-IVD承認を、米国において、2016年6月にエルロチニブ、9月にオシメルチニブのコンパニオン診断薬としてそれぞれFDA承認を取得している。リキッドバイオプシー検査については、EGFR-TKI耐性患者のT790M変異検査に対する実施が最も期待されている。上述のように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。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<sup>129</sup>。

オシメルチニブの第I相試験(AURAI試験)で使用された検査検体の後ろ向き解析では、組織検体のT790M変異の有無(Cobas法)を参考基準とした場合の血漿cfDNA検体(BEAMing法)の感度は70%であった。組織検体においてT790M変異陰性と判定された58例のうち、18例(31%)は血漿検体においてT790M変異が検出された。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ヵ月 vs. 9.7ヵ月)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ヵ月と、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ヵ月よりかなり長いものであった<sup>130</sup>。リキッドバイオプシー検査の問題点は偽陰性が多い(感度が低い)ことであり、リキッドバイオプシー検査だけにすると本来はオシメルチニブでメリットを得る可能性がある多くの人が落ちてしまう可能性がある。こうした結果を踏まえ、Oxnardらは二次的T790M変異検査では、初回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<sup>130</sup>。一方、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の合意声明では、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が推奨されている<sup>107</sup>。

本邦では、2016年12月1日現在、「コバス® EGFR変異検出キット v2.0」(仮称)による血漿を用いた二次的T790M変異の検出法は承認申請中であるが、組織を用いた検査と血漿を用いた検査をどのような順序で使用するかについては添付文書に明確には記載されないことも考えられる。米国同様に、T790M血漿検査結果(コバス® EGFR変異検出キット v2.0)とオシメルチニブ奏効性に関するデータが十分でなく、現時点で、組織検査に比べて、コバス® EGFR変異検出キット v2.0でT790M血漿検査・陽性をもってオシメルチニブを投与する根拠が薄いと考えられ、組織採取が難しい時に限って血漿検査が使用され

ることが推奨される。

なお、血漿を用いた検査においてT790M変異陰性の場合、偽陰性の可能性(本項で記載済み)を考慮して、再検の可能性について再検討し、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は、組織検体を用いてT790M変異の有無を検査、確認することが推奨される。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「コバス® EGFR変異検出キット v2.0」検査(血漿検体)とFFPE組織検体の一致率解析において、血漿検査のFFPE組織検査との全体一致率は65.9%(220例/330例)、陽性一致率(感度)は58.7%(131例/223例)、陰性一致率(特異度)80.2%(89例/111例)である(表3上)(ELCC 2016 Abst 1340\_PR及び米国「cobas® EGFR Mutation Test v2」(IVD)添付文書p67-68, Table 32)。なお、血漿検体を用いたT790M検出における「コバス® EGFR変異検出キット v2.0」検査とNGSの一致率解析において、「コバス® EGFR変異検出キット v2.0」検査の全体一致率は91.3%(292例/320例)、陽性一致率(感度)は91.5%(129例/141例)、陰性一致率(特異度)91.1%(163例/179例)である(表3下)(米国「cobas® EGFR Mutation Test v2」(IVD)添付文書p66, Table 30)。

表3. オシメルチニブ第II相国際共同試験(AURA2)に登録された非小細胞肺癌患者の血漿検体を用いたT790M変異検出におけるコバス® EGFR変異検出キット v2.0と各検査法の一貫率：FFPE組織検体との比較(上)と次世代シーケンス法による血漿検体との比較(下)

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
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

「米国「cobas® EGFR Mutation Test v2」添付文書より

## 12-6. 検体の適正性の評価について

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2)。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。病理診断を外注している場合には、EGFR変異検査を提出する前に、これらの項目を提出検体について再検討する必要がある。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は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。

## 13. 薬事承認および保険診療の観点からみた本検査の在り方

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変異検査として初のIVD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。なおこれらを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）と遜色ないことが示されている<sup>131</sup>。

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。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が明らかになっている。また大腸癌におけるRAS変異検査では、IVD法への移行・一本化が完了している。さらに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。

## おわりに・・・実地診療とEGFR変異

EBMの手法による肺癌診療ガイドライン2015年版におけるEGFR-TKIの適応は以下のごとくである。

### 1) ファーストライン治療ではEGFR変異陽性に限る

ア) PS0-1：75才未満ではEGFR-TKI単剤（ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ）が推奨グレードA（1次治療で推奨される細胞傷害性抗癌剤は推奨グレードB）、75才以上ではゲフィチニブ単剤またはエルロチニブ単剤が推奨グレードA（1次治療で推奨される細胞傷害性抗癌剤は推奨グレードB）

イ) PS2：ゲフィチニブ単剤、エルロチニブ単剤が推奨グレードA（1次治療で推奨される細胞傷害性抗癌剤は推奨グレードB）

ウ) PS3-4：ゲフィチニブ単剤のみ推奨グレードC1

### 2) セカンドライン以降

ア) EGFR変異陽性例ファーストラインでEGFR-TKI単剤を使用しPS0-1：変異なしの1次治療に準ずる（推奨グレードB）、またEGFR T790M変異陽性ではオシメルチニブ単剤（推奨グレードB）

イ) EGFR変異陽性例ファーストラインでEGFR-TKI単剤を使用しPS2：変異なしの1次治療に準ずる（推奨グレードB）

ウ) EGFR変異陽性例ファーストラインでEGFR-TKI単剤を使用していない場合：PS0-2ではEGFR-TKI単剤（ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ）が推奨グレードA、PS3-4ではゲフィチニブ単剤のみ推奨グレードC1。三次治療以降は変異なしの2次治療に準ずる

エ) EGFR変異陰性例、不明例でPS0-1：ニボルマブ単剤や非プラチナ単剤、ドセタキセル+ラムシルマブとともに、エルロチニブも選択肢（推奨グレードC1）

オ) EGFR変異陰性例、不明例でPS2：非プラチナ単剤とともに、エルロチニブも選択肢（推奨グレードC1）

なお添付文書上、ゲフィチニブおよびアファチニブは

EGFR変異陽性例に限ることになっている。また、エルロチニブのファーストライン使用も変異陽性例に限る。オシメルチニブはEGFR-TKI抵抗性のT790M変異陽性例に限る。

重要な点は臨床背景やEGFR変異の有無から想定される臨床的ベネフィットと、臨床背景から想定される急性肺障害を含むリスクのバランスをよく考慮することである。このようなリスクの高い患者においてEGFR遺伝子検査の意義がとくに高いと考えられる。実際、Inoueらは細胞傷害性抗癌剤の適応がないと考えられる、PS不良 and/or 高齢の患者のうちEGFR変異陽性患者30名（うちIV期27例、PS3以上22例、喫煙者7名を含む）にゲフィチニブをファーストラインで投与する第II相試験の結果を報告している。ORRは66%、OSは17.8ヵ月というすぐれた成績であった<sup>132</sup>。





## 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(21): 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(5676):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(8):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(3):e73.
5. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-137.
6. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-354.
7. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1160-1174.
8. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19(3):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(2):277-296.
10. Kobayashi Y, Mitsudomi T. Not all EGFR mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci*. 2016.
11. 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(12):1817-1824.
12. Dearden S, Stevens J, Wu YL, Blowers D. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Ann Oncol*. 2013;24(9):2371-2376.
13. 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(9):2892-2911.
14. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(5):633-639.
15. 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(4):2552-2558.
16. 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(9):1046-1061.
17. 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(1):74-79.
18. Janne PA, Yang JC, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(18):1689-1699.
19. Satouchi M. O2-1-1 Osimertinib in pre-treated pts with T790M positive advanced NSCLC: updated results from two Phase II studies. *JSMO2016*. 2016.
20. 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(6):2070-2075.
21. 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(23):5305-5313.
22. Wu JY, Yu CJ, Chang YC, Yang CH, Shih JY, Yang PC. 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(11):3812-3821.
23. Arcila ME, Nafa K, Chaft JE, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(2):220-229.
24. 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(2):154-162.
25. Lee B, Lee T, Lee SH, Choi YL, Han J. Clinicopathologic characteristics of EGFR, KRAS, and ALK alterations in 6,595 lung cancers. *Oncotarget*. 2016.
26. 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):1-11.
27. 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(3):559-566.
28. 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(16):8163-8171.
29. 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(22):6770-6779.

30. 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(5):2046-2053.
31. 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(2):179-184.
32. 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.
33. 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(1):126-131.
34. 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(18):3212-3220.
35. 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(216):216ra177.
36. Voon PJ, Tsui DW, Rosenfeld N, Chin TM. EGFR exon 20 insertion A763-Y764insFQEA and response to erlotinib--Letter. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(11):2614-2615.
37. 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(6):1311-1315.
38. 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(1):e23-31.
39. Yang JC, Sequist LV, Geater SL, et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol.* 2015;16(7):830-838.
40. 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(36):38789-38803.
41. 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(12):1545-1552.
42. 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(5):777-784.
43. 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(5):785-794.
44. 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(25):5892-5899.
45. 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(9496):1527-1537.
46. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(2):123-132.
47. 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(26):4244-4252.
48. 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(9652):1809-1818.
49. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361(10):947-957.
50. 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(10):1122-1128.
51. 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(25):2380-2388.
52. 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(2):121-128.
53. 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(8):735-742.
54. 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(3):239-246.
55. 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(27):3327-3334.
56. 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(2):213-222.
57. 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(2):141-151.
58. 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(9):1202-1211.
59. 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.
60. 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.
61. 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(11):1236-1244.
62. 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(3):486-491.
63. Cheng Y, Murakami H, Yang P. ORAL17.02 - Randomized Trial of Gefitinib with and without Pemetrexed as First-Line Therapy in East-Asian Patients with Advanced NS NSCLC with EGFR Mutations *16th World Conference on Lung Cancer.* 2015.
64. 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(5):888-894.
65. Garassino MC, Martelli O, Brogginini 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(10):981-988.
66. 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(18):1902-1908.
67. 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(52):20932-20937.
68. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316(5827):1039-1043.
69. 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(75):75ra26.
70. 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(22):9479-9487.
71. 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(10):922-933.
72. 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(7):608-625.
73. 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(31):E2127-2133.
74. Ercan D, Xu C, Yanagita M, et al. Reactivation of ERK signaling causes resistance to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov.* 2012;2(10):934-947.
75. 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(8):3256-3261.
76. 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(21):8715-8725.
77. Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, Shimokawa H, Hanagiri T, Oyama T. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2010;30(7):2513-2517.
78. 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(8):852-860.
79. 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(5):937-950.
80. 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(35):15535-15540.
81. Miller VA, Hirsh V, Cadranell 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(5):528-538.
82. 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(90):90ra59.
83. 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(8):990-998.
84. 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(3):305-312.
85. 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(9):1036-1045.
86. 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(6):560-562.
87. Ercan D, Choi HG, Yun CH, et al. EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2015;21(17):3913-3923.
88. 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(10):2073-2078.
89. Oxnard GR, Thress KS, Paweletz CP. Mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M positive lung cancer. *16th World Conference on Lung Cancer*. 2015.
90. Nosaki K, Satouchi M, Kurata T, Yoshida T. Re-biopsy status among non-small cell lung cancer patients in Japan: A retrospective study. *Lung Cancer*. 2016;100:1-8.
91. 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(7):823-859.
92. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-1639.
93. Ahn MJ, Yang J, Yu H, et al. 136O: Osimertinib combined with durvalumab in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: Results from the TATTON phase Ib trial. *J Thorac Oncol*. 2016;11(4 Suppl):S115.
94. 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(20):9176-9184.
95. 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(1):39-50.
96. 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(9):643-655.
97. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*. 2005;353(2):133-144.
98. 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(31):5034-5042.
99. 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(7):2106-2111.
100. 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(21):2866-2874.
101. 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(22):5007-5018.
102. 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(10):3788-3793.
103. 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(15):1133-1141.
104. 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(2):944-950.
105. 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(4):521-528.
106. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):2972-2977.
107. 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(7):946-963.
108. 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(5):381-385.
109. 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(5):1169-1180.
110. Sherwood JL, Muller S, Orr MC, Ratcliffe MJ, Walker J. 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(6):e100566.
111. 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(4):190-195.
112. Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, et al. Rapid targeted mutational analysis of human tumours: a clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med*. 2010;2(5):146-158.
113. 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(3 Pt 1):751-758.
114. 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(9):1191-1196.
115. 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(7):2001-2010.
116. Forshew 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(136):136ra168.
117. 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(24):7808-7815.
118. 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(15):3552-3560.
119. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20(5):548-554.
120. Yu J, Kane S, Wu J, et al. Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(9):3023-3028.
121. 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(3):438-445.
122. Shiau 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(7):947-956.
123. 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(1):61-67.
124. 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(2):70-75.
125. 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):1-18.
126. 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(1):118-145.
127. Hubers AJ, Heideman DA, Yatabe Y, et al. EGFR mutation analysis in sputum of lung cancer patients: a multitechnique study. *Lung Cancer*. 2013;82(1):38-43.
128. 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(1):206-212.
129. 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(3):939-948.
130. 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.
131. 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(11):2914-2919.
132. Inoue A, Kobayashi K, Usui K, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1394-1400.



## 付 録

### 付1) CAP/IASLC/AMPガイドラインのまとめ<sup>91</sup>

#### Section I. 肺癌遺伝子検査をいつ行うべきか？

論点1 *EGFR*, *ALK*変異検査をどのような患者に行うべきか？

1. 1. a推奨 : *EGFR*-TKI治療を行うための患者選択には*EGFR*変異検査を用いるべきである。肺癌患者は臨床的因子で遺伝子検査を省くべきではない。
1. 1. b推奨 : *ALK*-TKI治療を行うための患者選択には*ALK*検査を用いるべきである。肺癌患者は臨床的因子で遺伝子検査を省くべきではない。
1. 2推奨 : 切除検体では、組織学的な悪性度によらず、肺癌もしくは肺癌の成分を含む混合型肺癌に対して*EGFR*・*ALK*検査が行われるべきである。完全に切除され、肺癌の成分をまったく含まない場合(すべて扁平上皮癌, 小細胞癌, 免疫染色で肺癌のマーカーが完全に陰性の大細胞癌の成分のみ)は*EGFR*・*ALK*検査は推奨されない。
1. 3推奨 : 肺癌の可能性を完全に否定出来ない生検や細胞診などの部分的な検体の場合は、扁平上皮癌や小細胞癌の診断であっても、*EGFR*・*ALK*検査は施行してもよいが、その際には臨床情報(例えば、若年者、非喫煙者)が役立つことがある。
1. 4推奨 : 初回治療で*EGFR*・*ALK*変異の有無を決定する際に、原発巣でも転移巣でも同等に遺伝子検査に適している。
1. 5専門家統一見解 : 多発性で明らかに別々の肺腺癌に対しては、それぞれの腫瘍について検討してもよいが、1つの腫瘍の異なった領域を検討する必要はない。

論点2 いつ患者検体を*EGFR*・*ALK*検査すべきか？

2. 1. a推奨 : *EGFR*-TKI治療を行うための患者選択には*EGFR*変異検査を用いるべきである。肺癌患者は臨床的因子で遺伝子検査を省くべきではない。
2. 1. a推奨 : 患者が進行癌(第7版TNMで, stage IV)で発症し、治療が適切と考えられる場合で診断された時や、低いステージで以前に検査していない腫瘍でも再発や病状の進行をきたした際には、*EGFR*変異検査をオーダーすべきである。
2. 1. a推奨 : 患者が進行癌(第7版TNMで, stage IV)で発症し、治療が適切と考えられる場合で診断された時や、低いステージで以前に検査していない腫瘍でも再発や病状の進行をきたした際には、*ALK*融合遺伝子検査をオーダーすべきである。
2. 2. a専門家統一見解 : Stage I, II, IIIで発症した患者が診断された際には*EGFR*変異検査が勧められるが、その決定は、それぞれの施設でオンコロジーチームでと協議して決めるべきである。
2. 2. b専門家統一見解 : Stage I, II, IIIで発症した患者が診断された際には*ALK*融合遺伝子検査が勧められるが、その決定は、それぞれの施設でオンコロジーチームでと協議して決めるべきである。
2. 3推奨 : 組織は*EGFR*・*ALK*検査に優先的に持ちられるべきである。

### 論点3 どの程度で検査結果が得られるべきか？

- 3.1 専門家統一見解 : EGFR・ALK検査の結果は, 検査を行う検査部が標本を受け取ってから2週間(10労働日数)以内に結果が閲覧できるようになるべきである。
- 3.2 専門家統一見解 : 返却時間が平均で2週間を超える検査部は, 臨床的な緊急性に応じて, 院内でもしくは提携検査所で, より迅速な検査ができるようにすべきである。
- 3.3 専門家統一見解 : 検査部は, 依頼を受けてから3実労働日以内に外部の遺伝子検査所に, 院内の場合では24時間以内に最終病理診断がなされた検体が届くプロセスを構築すべきである。

## Section II. どのようにEGFR検査を行うべきか？

### 論点4 EGFR検査をいかに進めていくべきか？

- 4.1 専門家統一見解 : 病理医は, ホルマリン固定パラフィン包埋標本, 新鮮凍結標本もしくはアルコール固定標本を, PCRベースのEGFR変異検査に用いるべきである。他の固定(酸性もしくは重金属製の固定液もしくは脱灰標本)はEGFR変異検査用には避けるべきである。
- 4.2 専門家統一見解 : 細胞診検体はEGFRおよびALK検査に適している。セルブロック標本がスミア標本よりも望ましい。

### 論点5 EGFR変異検査の検体必要条件とは？

- 5.1 専門家統一見解 : 病理医は, EGFR検査のための検体の適正を, 癌細胞の割合, DNAの質および量にもとづいて決定すべきである。
- 5.2 専門家統一見解 : それぞれの検査ラボでは, 変位検出の際の最低含有量および細胞数を検証実験の際に決定する必要がある。
- 5.3 専門家統一見解 : 病理医は, それぞれの検体における腫瘍成分を取り出せるようにすべきで, 必要に応じて病理医自ら, もしくはよく指導された技師によって腫瘍に富んだ部分をマイクロダイセクトすべきである。

### 論点6 どのようにEGFR検査は行われるべきか？

- 6.1 推奨 : 検査ラボは, 十分な性能特性を持ったと確認されたEGFR検査を用いることができる。
- 6.2 専門家統一見解 : 検査施設は, 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方法を用いるべきであり, 10%程度の腫瘍細胞でも検出可能なより感度の高い方法(もしくはそれが可能なレフェンスラボを持つこと)を用いることが推奨される。
- 6.3 専門家統一見解 : 臨床的なEGFR検査は, 少なくともEGFR変異肺腺癌で1%以上の頻度と報告されているすべての変異を検出可能である必要がある。
- 6.4 推奨 : 通常のEGFRの免疫染色はEGFR阻害薬治療の患者選択に用いるべきではない。
- 6.5 推奨 : EGFRコピー数解析(FISHもしくはCISHいずれも)は, EGFR阻害薬治療の患者選択に用いるべきではない。

### 論点7 EGFR阻害薬の患者選択におけるKRAS遺伝子変異の役割とは？

- 7.1 推奨 : KRAS変異検査は, EGFR阻害薬を決定づける唯一の因子であると推奨されない。

### 論点8 二次的もしくは獲得耐性の場合に, どんな追加的な検査を考慮するのが重要か？

- 8.1 推奨 : EGFR阻害薬に対する獲得耐性を有する患者からの検体で検査を行う場合, 5%足らずの細胞で二次的EGFR T790M変異が検出できる必要がある。



### Section III. どのようにALK検査を行うべきか？

論点9 EGFR検査をいかに進めていくべきか？

- 9.1推奨 : 検査施設は, ALK阻害薬治療の患者選択のためには, 2色でラベルされた分離プローブ式のALK FISHアッセイを用いるべきである. 注意深く検証された場合には, 免疫染色もALK FISHのスクリーニング方法として考慮してもよいと思われる.
- 9.2推奨 : ALK阻害薬の患者選択に, FISHに変わるものとしてRT-PCRは推奨されない.
- 9.3専門家コンセンサス: 病理医は, 腫瘍構築, 細胞像, 標本品質を評価することで, ALK FISH検査のための標本選択に関与すべきである.
- 9.4専門家コンセンサス: 病理医は, 直接解析を行ったり, 固形癌のFISH解析の特別トレーニングを受けた遺伝子検査士もしくは技術者の評価をレビューすることで, ALKFISHスライドの解釈に参加すべきである.
- 9.5専門家コンセンサス: ALK阻害薬に対する獲得耐性に関連した二次的遺伝子変異に対する検査は, 臨床的なマネージメントに現在では必要ではない.

### Section IV. 他の遺伝子変異も肺腺癌でルーチンに検査すべきであるか？

論点10 他の分子マーカーは肺癌で検査するのに適しているか？

- 10.1.a推奨 : 肺腺癌においては, EGFR検査は他の分子マーカーよりも優先的に扱われるべきである.
- 10.1.b提言 : EGFR検査の次に, ALK検査は肺腺癌では優先的に扱われねばならないが, 現状では十分なエビデンスは発表されていない.

### Section V. 肺腺癌の遺伝子検査はいかに実施され, 運用されるべきか？

論点11 すべての腺癌が, EGFRとALKの両方検査されるべきであるか？

- 11.1専門家統一見解: 検査施設は, 全体の結果レポート返却時間要件を満たしつつ, 腺癌の遺伝子検査の効率を最大化する検査アルゴリズムを実施すると思われる.

論点12 EGFRとALKの結果はいかに報告されるべきか？

- 12.1専門家統一見解: EGFR変異検査とALKFISHの報告書には, 腫瘍内科医や非専門家病理医にも容易に理解できる結果と解釈の項目が含まれている必要がある.

論点13 EGFRとALK検出法はいかに有効性が確認されるべきか？

- 13.1専門家統一見解: EGFRとALK検査の有効性の実証については, 他の遺伝子診断やFISH検査と同様のガイドラインを用いるべきである.

論点14 いかにして精度管理を行うべきであるか？

- 14.1専門家統一見解: 検査施設は, 肺癌のEGFR, ALK検査も他の臨床検査で用いられる精度管理ポリシーに従うべきである. 特に, 治療のためのEGFR, ALK検査を行う検査所は, 技能調査に参加すべきである.

## 付2) 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
<b>1) 塩基配列決定による変異の特定する方法*</b>	
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塩基ほどの配列を決定できる. 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.
<b>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)**</b>	
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の欠失変異やエクソン20の挿入変異では変異によってDNAの長さが増加するため, そ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.
<b>3) 特定の変異の検出を高感度, 迅速に行う方法***</b>	
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) という技術と, 増幅されたPCR産物をScorpion法で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.