

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

4. バイオマーカー検査の対象となる遺伝子とその異常

4-7. KRAS

(2024年4月改訂版)

目次

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

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

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

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

(1) *RAS* 遺伝子とその遺伝子変異

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

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

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

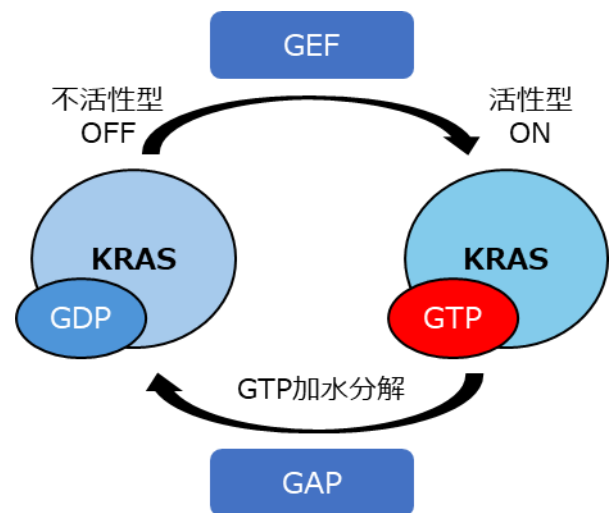


図1. *KRAS* の活性化型と不活性化型
KRAS は活性化型と不活性化型を行き来することでスイッチの役割を果たしている

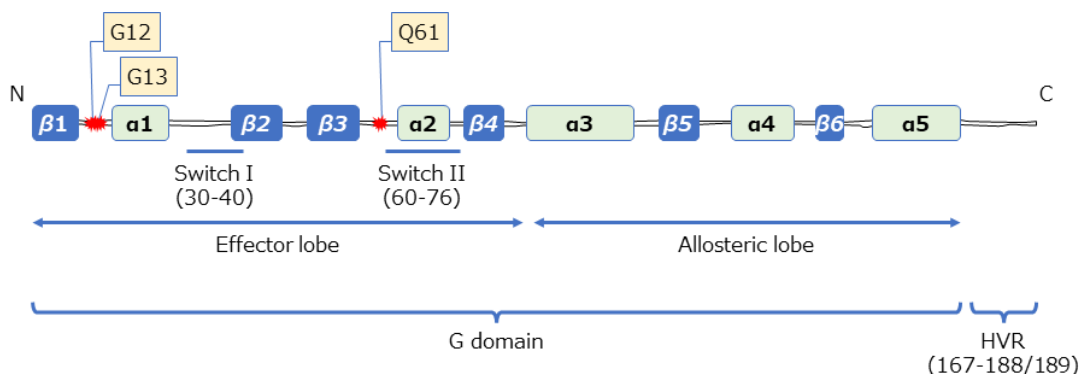


図2. *RAS* 蛋白の構造

表1 G12の変化パターン*

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

*COSMIC v96 (2023/11/26参照)

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

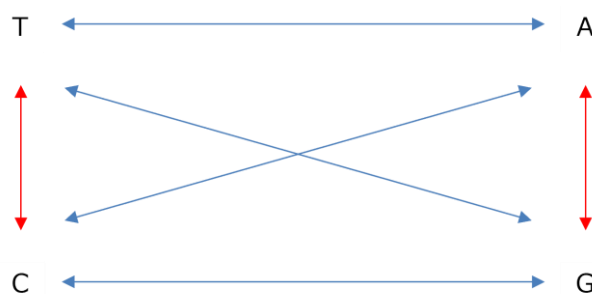


図3. 点突然変異のパターン
Transition 変異 (赤): アデニン (A)、グアニン (G) のプリン同士もしくはシトシン (C)、チミン (T) のピリミジン同士の変異
Transversion 変異 (青): プリンとピリミジンが入れ替わる変異

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

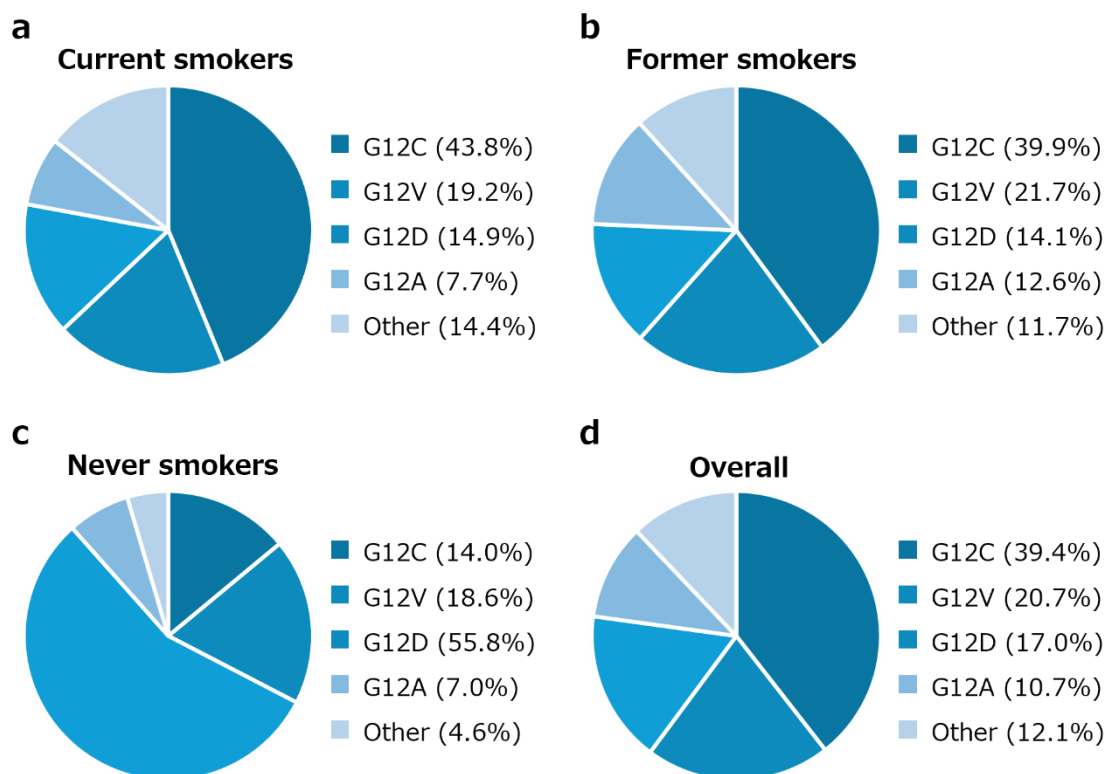


図4. KRAS 遺伝子変異と喫煙歴の関係
KRAS 変異のバリエーションタイプの頻度は喫煙歴によって異なる⁷

(2) KRAS 変異陽性肺癌の臨床病理学的特徴

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

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

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

(3) KRAS G12C 陽性肺癌に対する臨床試験

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

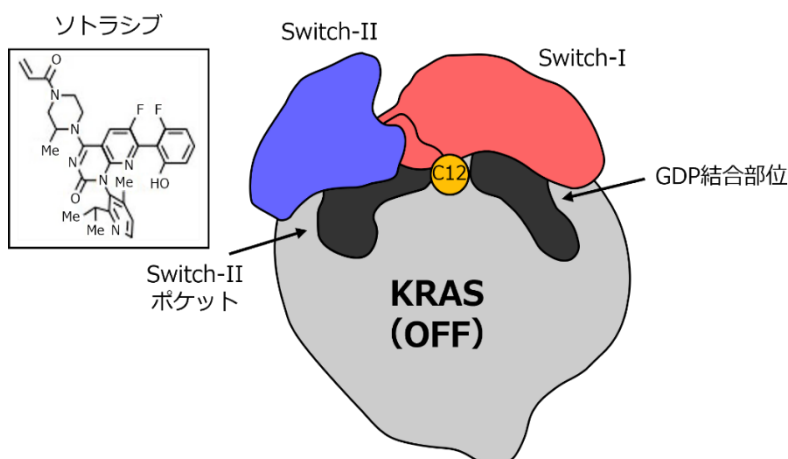


図5 KRAS 蛋白とソトラシブの結合
ソトラシブは非活性型 KRAS の Switch- II ポケットに結合する

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

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

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

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

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

表 2. KRAS G12C 変異を有する肺癌に対する主な臨床試験*

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

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

ORR：奏効率、mPFS：無増悪生存期間中央値

※1-7 表3の試験と対応

※6 NSCLCを対象とした試験。他はNSCLCを含む固形腫瘍対象

*肺癌を含むもの、2023/11Clinicaltrials.gov 検索

表 3. KRAS に関連したその他の試験

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

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

※1-5, 7, 8 表2の試験と対応

(4) KRAS 遺伝子 G12C 変異の検査

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

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

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

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

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

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

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

**がんゲノム医療中核拠点病院、拠点病院、連携病院

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

2. Guardant360 CDx がん遺伝子パネル

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

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

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

3. AmoyDx[®]肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル

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

表 5. *therascreen* と G360CDx 間の一致率

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

表 6. *therascreen* と AmoyDx 間の一致率

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

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

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

4. その他のマルチ遺伝子検査

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

表 7. 日常診療下で KRAS 変異検出に用いられる主な検査法

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

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

4-1. その他留意事項

4-1-1. 検査実施時期および検査対象

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

おわりに

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

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

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

参考文献

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