

CASE REPORT

LC-SCRUM-Asia での再解析により ROS1 融合遺伝子を検出し、治療につながった肺腺癌の 1 例

國政 啓¹・松本慎吾²・西野和美¹・久木田洋児³・本間圭一郎⁴・
田宮基裕¹・井上貴子¹・川村卓久¹・後藤功一²・熊谷 融¹

The Re-analysis of LC-SCRUM-Asia Successfully Detected an Overlooked ROS1 Fusion Gene in a Lung Adenocarcinoma Patient and Led to Proper Treatment

Kei Kunimasa¹; Shingo Matsumoto²; Kazumi Nishino¹; Yoji Kukita³; Keiichiro Honma⁴; Motohiro Tamiya¹; Takako Inoue¹; Takahisa Kawamura¹; Koichi Goto²; Toru Kumagai¹

¹Department of Thoracic Oncology, Osaka International Cancer Institute, Japan; ²Department of Thoracic Oncology, National Cancer Center Hospital East, Japan; ³Laboratory of Genomic Pathology; ⁴Department of Diagnostic Pathology and Cytology, Osaka International Cancer Institute, Japan.

ABSTRACT — **Background.** A successful genetic analysis by accurate and quick next generation sequencing (NGS) has become essential in decision-making in relation to the treatment strategy for patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). We report the case of a female NSCLC patient in a country in which no driver mutations had been detected. A targetable driver mutation was successfully detected through the re-evaluation of LC-SCRUM-Asia (Lung Cancer Genomic Screening Project for Individualized Medicine in Asia). **Case.** A 49-year-old, never-smoking woman was diagnosed with advanced lung adenocarcinoma based on the histopathological analysis of a surgical biopsy specimen of her right cervical lymph node in Vietnam. NGS, which was performed using the specimen that was resected in her country did not detect any driver mutations. She came to Japan with the hope of undergoing a re-examination with NGS. The second NGS analysis through LC-SCRUM-Asia using her pleural effusion successfully detected the *SDC4-ROS1* fusion gene, leading to treatment with crizotinib. An evaluation of the quality of DNA and RNA from the surgically resected metastatic cervical lymph node revealed severe fragmentation of DNA, which seemed to be caused by formalin over-fixation. **Conclusion.** It is necessary to consider the storage condition when submitting samples for NGS. Global quality management is also required for the application NGS in precision medicine.

(JLCC. 2021;61:303-309)

KEY WORDS — Next generation sequence, ROS1 fusion gene, LC-SCRUM-Asia, Quality of nucleotide

Corresponding author: Kei Kunimasa.

Received January 12, 2021; accepted March 13, 2021.

要旨 — **背景.** 正確かつ迅速な次世代シーケンサー (NGS) による遺伝子解析の成功が、進行期非小細胞肺癌の治療方針の決定において必須のものとなりつつある。本報告では他国で検出されなかったドライバー変異が LC-SCRUM-Asia での解析を通じて検出された症例を報告する。**症例.** 49 歳女性、非喫煙者。外国 (ベトナム) 在住で同国にて右頸部リンパ節の外科的生検により肺腺癌

と診断された。胸水貯留を有する IV 期症例で、同国での NGS 解析では治療対象となるドライバー変異は検出されなかった (“not detected”)。その結果に納得されず、日本での再精査を希望し来日され、LC-SCRUM-Asia にて胸水検体を用いて再検討を行ったところ、*SDC4-ROS1* 融合遺伝子が検出され、Crizotinib による治療につながった。他国で用いた検体の DNA、RNA の品質評価を

¹大阪国際がんセンター呼吸器内科；²国立がん研究センター東病院呼吸器内科；大阪国際がんセンター³ゲノム病理ユニット、⁴病理・細胞診断科。

論文責任者：國政 啓。

受付日：2021 年 1 月 12 日，採択日：2021 年 3 月 13 日。

行ったところ、DNAの激しい分断化とRNAの品質劣化を確認し、過固定の影響が示唆された。結論、NGS解析で保存検体を用いる場合には、保存状態を考慮し検体提出を行う必要がある。また、解析結果についてもグロー

バルレベルでの統一規定などが求められる。

索引用語——次世代シーケンス, ROS1 融合遺伝子, LC-SCRUM-Asia, 核酸品質

背景

進行期肺癌症例では、治療方針の決定に次世代シーケンサー (NGS) による遺伝子解析の成功が不可欠ものとなりつつある。^{1,3} いかに迅速かつ正確に治療可能な遺伝子変異を同定できるかは、治療の成功にかかわる最も大きな因子の一つである。今回、我々は他国(ベトナム)にて進行期肺腺癌と診断され、同国内での腫瘍組織検体を用いたNGS解析では治療対象となるドライバー変異が検出されなかったが、本邦でのLC-SCRUM-Asia (Lung Cancer Genomic Screening Project for Individualized Medicine in Asia)⁴ での再検討にて、検体提出から3日後にROS1融合遺伝子が検出され、有効な治療につながった症例を経験したので、ここに提示する。

症例

症例：49歳、女性。

既往歴：肺結核 (23歳)、子宮外妊娠 (38歳)。

内服歴：なし。

喫煙歴：非喫煙者。

現病歴：右肩の痛みを自覚され、近医を受診されたところ、胸部CT検査にて右胸水貯留、右鎖骨上リンパ節腫脹、縦隔リンパ節腫脹、腸骨転移を認めた (Figure 1)。右頸部リンパ節腫脹からの外科的生検にて腺癌と診断され、免疫染色からCK7 (+)、CK20 (-)、TTF-1 (+)

であり、肺腺癌と診断された (Figure 2)。右頸部リンパ節の外科的生検検体を用いてNGS解析を行い、治療対象となるドライバー変異の検索を行ったところ、有意な変異は検出されなかった (Figure 3)。殺細胞性抗がん剤での治療を提案されたが、本人は日本での再評価を希望され、当院を受診された。

胸部造影CT検査にて右胸水貯留、縦隔リンパ節の腫大を認めた。再度ドライバー変異検索のため、LC-SCRUM-Asiaへの登録を行い、右胸水を採取のうえ提出した (Figure 4)。検体提出後、3日後にはAmoy 9-in-1の結果にてROS1融合遺伝子が報告され、後にOncoPrint™ Comprehensive Assay (OCA) version.3の解析にてSDC4-ROS1融合遺伝子 (SDC4-ROS1 (S2; R32)) が報告された。Amoy 9-in-1の結果が判明してから、自費診療にてCrizotinib (250 mg × 2 cap/日) 内服治療を開始したところ、投与開始後2週間で右胸水の消失傾向を認め、右肩の痛みの消失も認めた (Figure 5)。今後はベトナムと日本を行き来し、定期的に当院で効果判定を行いながら、Crizotinibでの治療を継続していく希望をもたれている。

前医で採取されたブロック検体から切り出しを行い、DNA, RNAをMaxwell® RSC DNA FFPE kit (Promega) と Maxwell® RSC RNA FFPE kit (Promega) をそれぞれ用いて抽出し、核酸の品質評価を行った。DNAは0.58 ng/μlの濃度で抽出することができ、アガロース電気泳

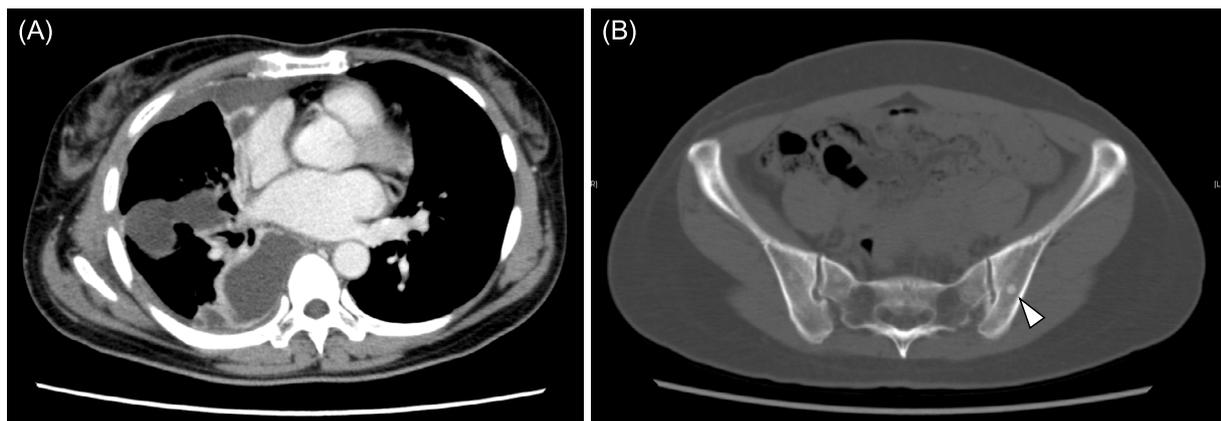


Figure 1. Enhanced CT scanning shows (A) pleural effusion in the right thoracic cage, (B) bone metastasis in the left ilium (white arrowhead).

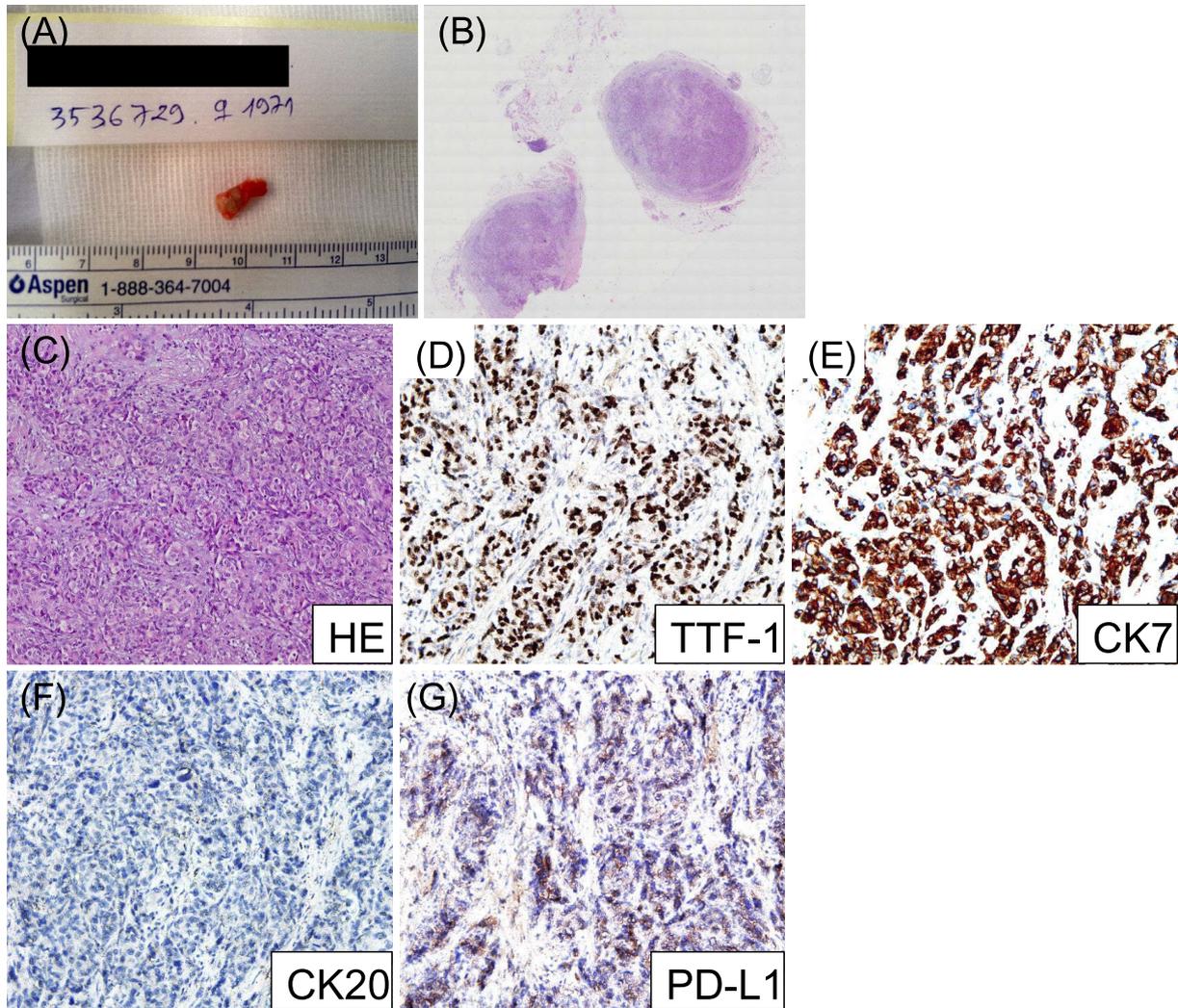


Figure 2. A histopathological analysis of the resected metastatic cervical lymph node. (A) The gross findings of the specimen, (B) a macroscopic image of the resected specimen. The immunohistopathological analysis of the resected specimen: (C) hematoxylin and eosin staining, (D) anti-TTF-1 antibody staining, (E) anti-CK7 antibody staining, (F) anti-CK20 antibody staining, (G) anti-PD-L1 antibody staining.

動にて、不鮮明なバンドが 200 bp 付近と 100 bp 以下に観察され、激しい断片化が確認された (Figure 6A)。RNA については 7.7 ng/μl の濃度で抽出することができた。Bioanalyzer (Agilent) によると、RNA Integrity Numbers (RIN) は 1.0 であったが、200 ヌクレオチド以上の RNA 断片の割合を示す指標である DV₂₀₀ = 85% であり、NGS 解析に用いる RNA としては高品質という評価となった (Figure 6B)。SDC4-ROS1 (S2;R32) に対するプライマーを過去の文献から作成し、⁴ 抽出した RNA を用いて Reverse Transcription PCR (RT-PCR) を行ったところ、SDC4-ROS1 融合遺伝子の検出に成功した (Figure 7)。

考 察

本症例は他国での NGS を用いた遺伝子パネル解析では治療対象となるドライバー変異が検出されなかったが、本邦の LC-SCRUM-Asia での解析⁵で SDC4-ROS1 融合遺伝子が検出され、Crizotinib による治療につながった症例である。残念ながら、他国の主治医から現時点では紹介状以上の診療情報などを伺うことができず、遺伝子パネル解析の詳細について結果以外は不明であるが、今回の解析から保存検体の核酸劣化のため、偽陰性であった可能性が示唆された。

他国で遺伝子パネル解析に対して用いた検体は頸部リンパ節転移巣の外科的生検検体であり、腫瘍面積、腫瘍含有率ともに十分な検体と考えられた (Figure 2)。⁶ し

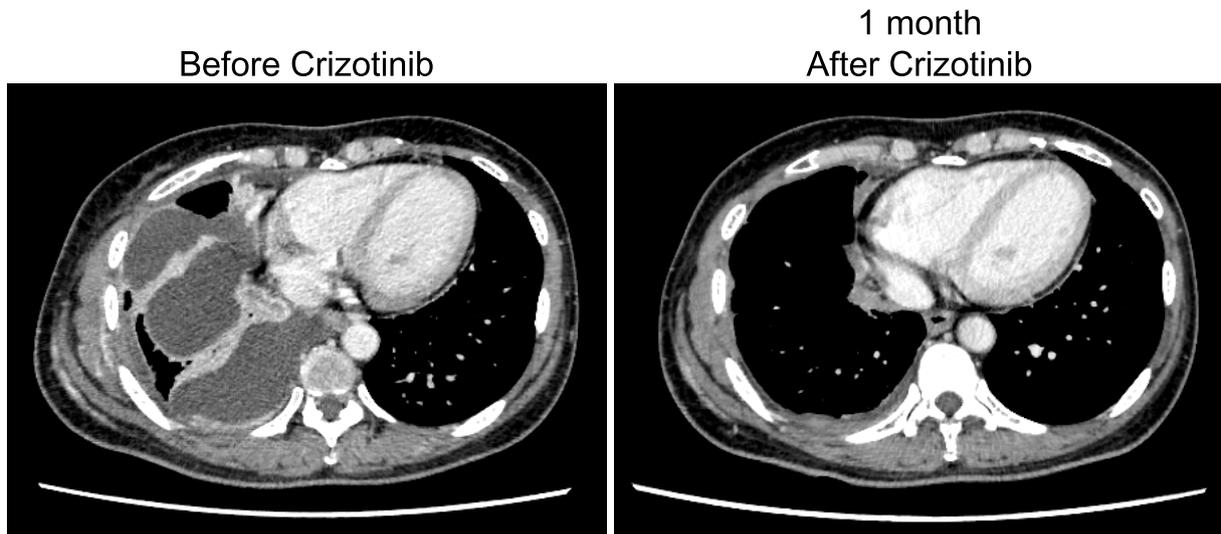


Figure 5. Chest radiographs obtained before and 2 weeks after the administration of crizotinib.

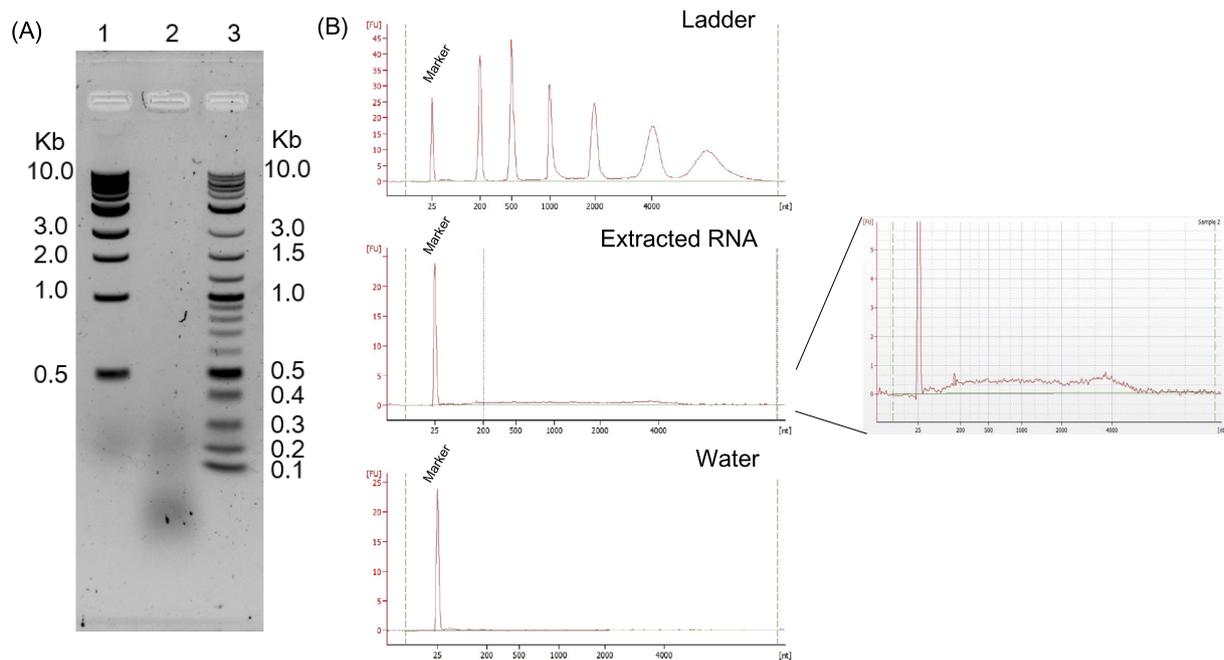


Figure 6. (A) DNA gel electrophoresis (1% agarose gel). Lane 1: A 1 kb DNA ladder (12.5 ng, NEB). Lane 2: Extracted DNA (5.8 ng) from the resected specimen. Lane 3: A 1 kb plus DNA ladder (12.5 ng, NEB). (B) A bioanalyzer image of the extracted RNA (15 ng) from the resected specimen.

プロジェクトである。⁵ 提出検体として新鮮凍結検体、胸水を含む体腔液検体が認められている。体腔液検体の場合には核酸の品質保持のため、細胞診での悪性の証明を待たずに提出することが許可されており、後に悪性細胞が確認されたものについてNGS解析が進められる。解析はOCAを含む、Oncomine™ Precision Assay (OPA), Oncomine™ Mutation Load Research Assay (OMLA)

(すべて Thermo Fisher SCIENTIFIC 社)のNGS解析に加え、Multiplex 定量PCR法であるAmoy 9-in-1 kitによりROS1を含む計11遺伝子の測定を行っている。Amoy 9-in-1 kitの結果は早ければ事務局から検体提出後3~4日程度で各施設に届き、本症例においても胸水提出から3日後にROS1融合遺伝子の検出が報告された。極めて迅速な結果判明である。後にNGSの解析でも同変異が

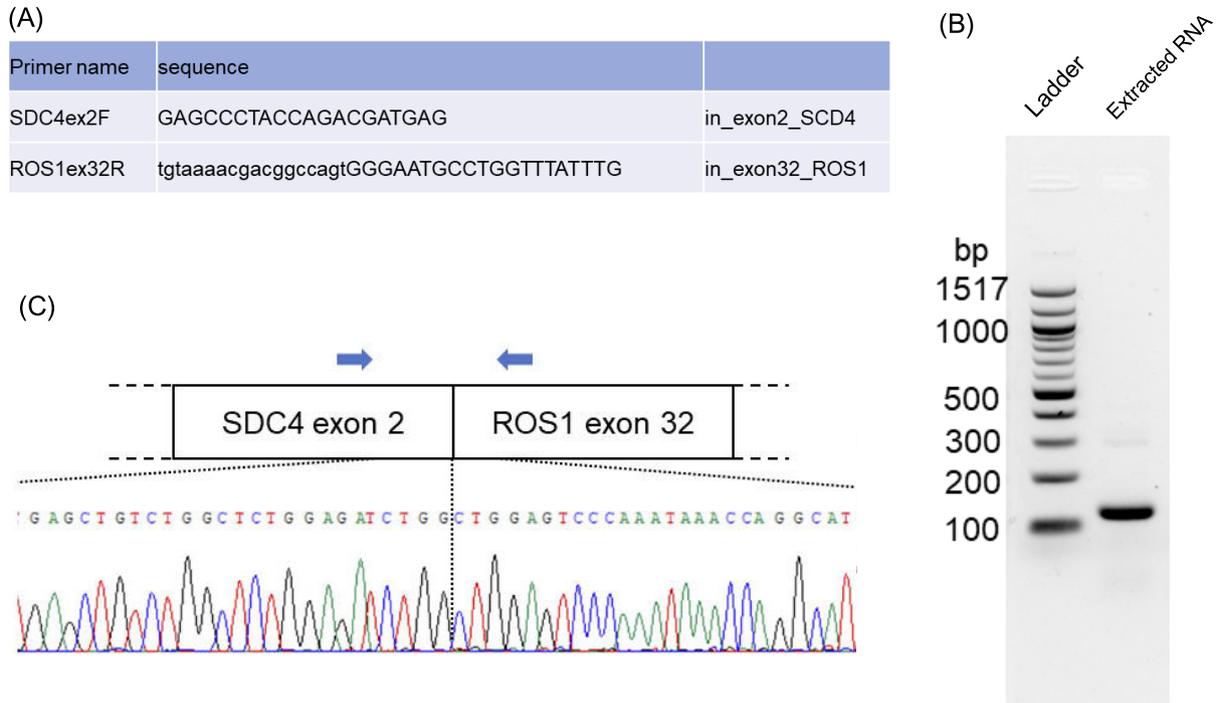


Figure 7. Reverse-transcription PCR to detect the *SDC4-ROS1* (S2;R32) fusion gene. (A) Forward and reverse primers for the *SDC4-ROS1* (S2;R32) fusion gene. The lowercase letter sequence in the reverse primer is an adaptor sequence for Sanger sequencing. (B) DNA gel electrophoresis (1% agarose gel). A 1 kb DNA ladder and RT-PCR product showing a 128 bp band. (C) A Sanger DNA sequence chromatogram of the RT-PCR product for the *SDC4-ROS1* (S2;R32) fusion gene.

確認された。胸水検体には多量の肺腺癌細胞が確認されており (Figure 4), ホルマリン固定などを経なかった分、良質な RNA が抽出できた可能性がある。

NGS 解析は進行期肺癌における化学療法において必須のものになりつつある。¹⁻³ しかし、従来の検査法と比べて、その工程は極めて複雑であり、検体採取、核酸抽出、シーケンス、シーケンス結果のバイオインフォマティクスを活用した解析、臨床像に照らし合わせたうえでの解析結果の意義付けなど多数の工程を含んでいる。^{10,11} また検査費用も従来の検査と比較して高額であり、その点でも解析成功が強く求められる。これらの理由を踏まえて、NGS 解析の精度管理・費用の点から検査の集約化や米国の CLIA (臨床検査室改善法; Clinical Laboratory Improvement Amendment) のような検査制度管理体制の確立が求められる。¹² 本邦でも国際規格である ISO (International Organization for Standardization) に基づき、臨床検査の審査が行われており、ISO15189 からは NGS 検査を含む体細胞遺伝子変異検査における基準も提示されている。¹³ 本症例においても我々の行った DNA の品質評価からすれば、NGS 解析前に頸部リンパ節生検検体では解析成功が期待できないと判断でき、別

検体での解析を試みる事が可能であったと考える。本症例のような偽陰性や解析不成功は、正確な治療選択や治療開始の大きな遅延を招くことになるため、避けなければならない。

本症例では本人の行動力と LC-SCRUM-Asia での迅速なスクリーニングにより *SDC4-ROS1* 融合遺伝子変異の検出につながった。Precision medicine の実現には患者本人の治療に対する熱意が影響することは、Lukas D. Wartman 氏の逸話にも反映されている。¹⁴ 有望なドライバー変異を基に治療を組み立てられるかどうかは、進行期肺癌症例の予後や QOL にも大きくかわることである。LC-SCRUM-Asia が本症例の人生を変えたと言っても過言ではない。今後も同プロジェクト基盤をもとにした Precision medicine の実践とエビデンスの構築が本邦を含めたアジア、ひいては世界の肺癌診療における指針につながるものであると考える。アジアを含めたグローバルでの NGS 解析の精度基準の統一などが求められる。

結 語

LC-SCRUM-Asia での再検討にて *SDC4-ROS1* 融合遺

伝子の検出につながった。NGS解析に際しては提出検体の品質管理と精度管理が必要である。LC-SCRUM-Asiaを通じたPrecision medicineの基盤整備とエビデンスの構築が求められる。

本論文内容に関連する著者の利益相反：松本慎吾 [日当・講演料] ノバルティス [研究費・助成金などの総額] MSD, メルク, 中外製薬, イーライリリー, ノバルティス, 西野和美 [原稿料] アストラゼネカ, 中外製薬, ノバルティスファーマ, 日本イーライリリー [研究費・助成金などの総額] 日本ベーリンガーインゲルハイム, 田宮基裕 [日当・講演料] ベーリンガーインゲルハイム, 中外製薬株式会社 [研究費・助成金などの総額] ベーリンガーインゲルハイム, 後藤功一 [日当・講演料] 中外製薬株式会社, アストラゼネカ株式会社, 日本イーライリリー株式会社, ガーダントヘルスジャパン株式会社 [研究費・助成金などの総額] 大鵬薬品工業株式会社, 中外製薬株式会社, 小野薬品工業株式会社, アストラゼネカ株式会社, 大日本住友製薬株式会社, 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社, アステラス製薬株式会社, エーザイ株式会社, 第一三共株式会社, ファイザー株式会社, 協和キリン株式会社, ノバルティスファーマ株式会社, 武田薬品工業株式会社, メルクバイオファーマ株式会社, MSD 株式会社, ブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社, ヤンセンファーマ株式会社, 株式会社医学生物研究所, Amgen Inc., 日本イーライリリー株式会社

謝辞：LC-SCRUM-Asia 事務局の村田由利さま, LC-SCRUM 検体管理を担当いただいている大阪国際がんセンター樋口真美さま, 桑村有紀さまに, 日々の診療補助について心より深謝いたします。

本研究の内容は大阪国際がんセンター内倫理委員会にて承認を受けている (承認番号『20172』)。

本症例報告の内容は第 113 回日本肺癌学会関西支部学術集會にて発表し, 優秀演題に選ばれました。

REFERENCES

1. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F,

- Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020;31:1491-1505.
2. Hey SP, Gerlach CV, Dunlap G, Prasad V, Kesselheim AS. The evidence landscape in precision medicine. *Sci Transl Med*. 2020;12:eaaw7745.
3. Kunimasa K, Matsumoto S, Nishino K, Nakamura H, Kuhara H, Tamiya M, et al. Improvement strategies for successful next-generation sequencing analysis of lung cancer. *Future Oncol*. 2020;16:1597-1606.
4. Lira ME, Choi YL, Lim SM, Deng S, Huang D, Ozeck M, et al. A single-tube multiplexed assay for detecting ALK, ROS1, and RET fusions in lung cancer. *J Mol Diagn*. 2014; 16:229-243.
5. 松本慎吾. LC-SCRUM-Asia における遺伝子パネル検査の現状と展望. *肺癌*. 2020;60:456.
6. 一般社団法人日本病理学会, 編集. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 羊土社; 2019.
7. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.
8. Evaluating RNA Quality from FFPE Samples, Tech Note: RNA sequencing, Illumina. Pub No. 470-2014-001, October 26 2016.
9. Matsubara T, Soh J, Morita M, Uwabo T, Tomida S, Fujiwara T, et al. DV200 Index for Assessing RNA Integrity in Next-Generation Sequencing. *Biomed Res Int*. 2020;2020:9349132.
10. Takeda M, Sakai K, Terashima M, Kaneda H, Hayashi H, Tanaka K, et al. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26:2477-2482.
11. Sunami K, Ichikawa H, Kudo T, Kato M, Fujiwara Y, Shimomura A, et al. Feasibility and utility of a panel testing for 114 cancer-associated genes in a clinical setting: A hospital-based study. *Cancer Sci*. 2019;110:1480-1490.
12. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*. 2017;23:703-713.
13. https://www.jab.or.jp/service/clinical_examination/
14. Wartman LD. The future of cancer treatment using precision oncogenomics. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2018; 4:a002824.