

大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス

第 4.2 版

2019 年 10 月

公益社団法人日本臨床腫瘍学会 編

4.1 版 Draft Version 0.01	2019 年 1 月 5 日
4.1 版 Draft Version 0.02	2019 年 3 月 4 日
4.1 版 Draft Version 0.03	2019 年 3 月 18 日
4.1 版 Draft Version 0.04	2019 年 3 月 23 日
4.1 版 Draft Version 0.05	2019 年 3 月 26 日
4.1 版 Draft Version 0.06	2019 年 4 月 19 日
4.1 版 Version 1.	2019 年 5 月 15 日
4.2 版 Version 1.	2019 年 9 月 25 日
4.2 版 Version 2.	2019 年 10 月 25 日

大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイドンス第 4.1 版
作成ワーキンググループ

委員長

衣斐 寛倫 (愛知県がんセンター がん標的治療トランスレーショナルリサーチ分野)

委員

奥川 喜永 (三重大学医学部 消化管・小児外科学講座)

隈元 謙介 (香川大学医学部 消化器外科)

砂川 優 (聖マリアンナ医科大学 臨床腫瘍学講座)

谷口 浩也 (国立がん研究センター東病院 消化管内科)

中谷 中 (三重大学医学部附属病院 中央検査部)

畑中 豊 (北海道大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門)

坂東 英明 (愛知県がんセンター 薬物療法部)

細田 和貴 (愛知県がんセンター 遺伝子病理診断部)

山崎 健太郎 (静岡県立静岡がんセンター 消化器内科)

(五十音順)

評価委員

石田 秀行 (埼玉医科大学総合医療センター 消化管外科・一般外科)

西尾 和人 (近畿大学医学部 ゲノム生物学講座)

土原 一哉 (国立がん研究センター先端医療開発センター)

馬場 英司 (九州大学大学院 医学研究院 九州連携臨床腫瘍学講座)

(五十音順)

目次

要約

1 総論

- 1.1 大腸がんの分子生物学的背景
- 1.2 大腸がん認められる遺伝子異常の臨床的意義
- 1.3 大腸がんの遺伝子関連検査に用いられる手法

2 RAS 変異検査

- 2.1 背景
- 2.2 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応判定を目的として、一次治療開始前に RAS 変異検査を実施する。
- 2.3 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に RAS 変異検査を実施する。

3 BRAF 変異検査

- 3.1 背景
- 3.2 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、予後予測に応じた治療選択を目的として、一次治療開始前に BRAF V600E 変異検査を実施する。
- 3.3 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に BRAF V600E 変異検査を実施する。
- 3.4 大腸がん患者に対し、リンチ症候群の診断の補助を目的として、BRAF V600E 変異検査を実施する。

4 ミスマッチ修復機能欠損に対する検査

- 4.1 背景
- 4.2 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、免疫チェックポイント阻害薬の適応判定を目的として、投与前にミスマッチ修復機能欠損を判定する検査(MMR 機能欠損を判定する検査)を実施する。
- 4.3 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に MMR 機能欠損を判定する検査を実施する。
- 4.4 大腸がん患者に対し、リンチ症候群のスクリーニングを目的として、MMR 機能欠損を判定する検査を実施する。
- 4.5 MMR 機能欠損を判定する検査として、
 - MSI 検査を実施する。
 - IHC 検査を実施する。

NGS を用いた検査を実施する。

5 次世代シーケンス法による包括的ゲノムプロファイリング検査

5.1 背景

5.2 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、治療薬適応判定の補助として、包括的ゲノムプロファイリング検査を実施する。

5.3 包括的ゲノムプロファイリング検査は、分析的妥当性が確認された検査システムで実施する。

6 リキッドバイオプシー

6.1 背景

6.2 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、ctDNA 検査を実施する。

6.3 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応および治療効果のモニタリング目的として、ctDNA 検査を実施する。

6.4 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、治療薬適応判定の補助として、ctDNA を用いた包括的ゲノムプロファイリング検査を実施する。

7 血管新生因子

7.1 背景

7.2 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、血管新生阻害薬の選択補助として、VEGF-D の測定を実施する。

8 その他の検査

8.1 結腸がん術後再発予測における多遺伝子アッセイ

8.2 CDX2

8.3 CpG island methylator phenotype (CIMP)

9 検体に用いる試料

9.1 組織検体

体細胞遺伝子検査にはホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いる。また、対応する H&E 染色標本で、未染薄切標本内に十分な量の腫瘍細胞が存在すること、および組織学的に想定される核酸の質が保たれていることを確認する。病変のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの選択とマクロダイセクション部位のマーキング、腫瘍細胞割合の評価は原則として病理医が行う。

9.2 血液検体

ctDNA 検査では、使用する採血管、採血後の血漿の調製や保管を各検査法が指定する方法に準じて実施する。

10 検査精度の確保

大腸がん診療における遺伝子関連検査は、精度の確保された検査室で実施する。

11 備考

11.1 日本臨床腫瘍学会におけるガイドライン、ガイダンスなどの定義

11.2 2019年3月現在の *RAS* 変異検査、*BRAF*V600E 変異検査、ミスマッチ修復機能欠損検査、次世代シーケンス法による包括的ゲノムプロファイリング検査の保険適用状況

11.3 Voting の参加について

パブリック用原稿

略語表

ASCO	American Society of Clinical Oncology
APC	adenomatous polyposis coli
BSC	best supportive care
CAPOX	カペシタビン+オキサリプラチン
CDx	companion diagnostics
CDX2	caudal-related homeobox transcription factor 2
cfDNA	cell free DNA
CGP	comprehensive genomic profiling
CI	confidence interval
CIMP	CpG island methylation phenotype
CIN	Chromosomal instability
CMS	Consensus Molecular Subtypes
CNA	copy number alterations
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CRC	Clinical Research Coordinator
ctDNA	circulating tumor DNA
DFS	Disease-free survival
dMMR	mismatch repair-deficient
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ESMO	European Society for Medical Oncology
FGF	fibroblast growth factor
FOLFIRI	5-FU+ロイコボリン+イリノテカン
FOLFOX	5-FU+ロイコボリン+オキサリプラチン
FOLFOXIRI	5-FU+ロイコボリン+オキサリプラチン+イリノテカン
GCHP	Goblet cell-rich type hyperplastic polyp
HGF	hepatocyte growth factor
HNPCC	Hereditary Non-polyposis colorectal cancer
HP	hyperplastic polyp
HR	Hazard Ratio
IHC	immunohistochemistry
IUO	investigational use only
IVD	<i>in-vitro</i> diagnostics

LDT	laboratory developed test
MMR	mismatch repair
MRD	minimal residual disease
MCP-3	macrophage chemoattractant protein-3
mRNA	mesenger RNA
MSI	microsatellite instability
MSI-H	microsatellite instability-high
MSI-L	microsatellite instability-low
MSS	microsatellite stable
MVD	microvessel density
MVHP	Microvascular type hyperplastic polyp
NCA	copy number alterations
NCCN	The National Comprehensive Cancer Network
NGS	next generation sequencing
NTRK	neurotrophin receptor tyrosine kinase
OR	Odds ratio
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PFS	progression-free survival
PIGF	placental growth factor
pMMR	mismatch repair-proficient
RFS	relapse-free survival
RR	Risk Ratio
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
RUO	research use only
SSA	sessile serrated adenoma
SSA/P	sessile serrated adenoma/polyp
TAT	turnaround time
TMB	tumor mutational burden
TSA	traditional serrated adenoma
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VUS	variant of uncertain significance
WES	whole exome sequencing

要約

本ガイドスは、初版である「大腸がん患者における KRAS 遺伝子変異の測定に関するガイドス第 1 版」、引き続いて発刊された「大腸がん患者における RAS 遺伝子 (KRAS/NRAS 遺伝子) 変異の測定に関するガイドス第 2 版」により、実地診療における KRAS 変異検査、RAS 変異検査の適切な普及に貢献してきた。その後、大腸がん診療において RAS 変異以外の異常の重要性が認識されるに従い、「大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイドス第 3 版」では、*BRAF* V600E 変異検査および MMR 機能欠損を判定する検査を適切に行うためのガイドスが示された。

前回第 3 版の公開から約 2 年が経過したが、その間に *BRAF* V600E 変異および MMR 機能欠損を判定する検査が保険適用されたのに加え、がん遺伝子パネル検査に基づく精密医療の急速な導入を受け、2018 年 12 月に 2 品目のがん遺伝子パネル検査が医療機器・体外診断薬部会で承認された。パネル検査により頻度の低いドライバー遺伝子変異に対する治療が行われるようになることが想定されるとともに、リキッドバイオプシーを用いたパネル検査の取り組みも急速に進んでいる。また、これらの検査に適合した腫瘍組織・血液検体の使用も正しい結果を得るには必要不可欠である。このため 2018 年 11 月より本ガイドス作成委員による改訂作業を開始し、独立した評価委員による評価を 2019 年 3 月から 4 月に行い、改訂第 4.1 版を作成した。さらに、次世代シーケンス法による包括的ゲノムプロファイリング検査が、同年 5 月に保険適用されたことから、内容をアップデートし 4.2 版を作成している。

本ガイドス改訂の目的は、大腸がん診療における遺伝子関連検査等に関わる臨床医や検査担当医に対し、現在保険適用されている検査をどのように実施し治療に反映するのが適切か、これらの検査の基本的要件を明らかにすること、および新規検査技術の現状と今後の展望について情報を提供することである。そのため、本ガイドス改訂版には、大腸がん診療において治療選択または予後予測に関わるこれらの遺伝子異常等の検査に関して、表 1 に示す基本的要件が記述されている (各遺伝子関連検査の対象および検査のタイミングは 図 1)。各要件に対する推奨度は、委員の voting により決定した (表 2)。各要件の推奨度は、各検査におけるエビデンス、検査を実施した場合に想定される患者が受ける利益、損失のバランスをもとに決定され、各検査の本邦における保険適用状況は考慮していない。Voting により 70%以上の同意が集約された場合はそれを全体の意見とした。全ての推奨度で 70%以上の同意が得られなかった場合は、結果を公表した上で再度 voting を行った。本工程を 3 回繰り返しても推奨度が決定できない場合は、「推奨度なし」とした。また、本文以外に基本的要件と直接関連する情報は「コメント」に、基本的要件に直接は関連しないが基本的要件の周辺情報として必要と思われる情報は「サイドメモ」に記載した。さらに、現在開発中の検査技術についても現状と展望を付記した。なお、日本臨床腫瘍学会におけるガイドスの定義、各検査の保険適用状況および各委員の voting への参加の有無については、備考欄を参照されたい。

表 1. 本ガイドンスが示す基本的要件

基本的要件	推奨度
RAS 変異検査	
<ul style="list-style-type: none"> ● 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応判定を目的として、一次治療開始前に RAS 変異検査を実施する。 RAS 変異検査は、コンパニオン診断薬を用いて実施する。 	強く推奨する
<ul style="list-style-type: none"> ● 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に RAS 変異検査を実施する。 RAS 変異検査は、分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。 	考慮する
BRAF 変異検査	
<ul style="list-style-type: none"> ● 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、予後予測に応じた治療選択を目的として、一次治療開始前に BRAF V600E 変異検査を実施する。 BRAF V600E 変異検査は、分析的妥当性が確認された方法で実施する。 	強く推奨する
<ul style="list-style-type: none"> ● 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に BRAF V600E 変異検査を実施する。 BRAF V600E 変異検査は、分析的妥当性が確認された方法で実施する。 	推奨する
<ul style="list-style-type: none"> ● 大腸がん患者に対し、リンチ症候群の診断の補助を目的として、BRAF V600E 変異検査を実施する。 BRAF V600E 変異検査は、分析的妥当性が確認された方法で実施する。 	推奨する
ミスマッチ修復機能欠損に対する検査	
<ul style="list-style-type: none"> ● 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、免疫チェックポイント阻害薬の適応判定を目的として、投与前にミスマッチ修復機能欠損を判定する検査 (MMR 機能欠損を判定する検査) を実施する。 免疫チェックポイント阻害薬の適応を判定するための MMR 機能欠損を判定する検査は、コンパニオン診断薬を用いて実施する。 	強く推奨する
<ul style="list-style-type: none"> ● 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に MMR 機能欠損を判定する検査を実施する。 再発リスクに応じた治療選択目的の MMR 機能欠損を判定する検査は、分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。 	推奨する
<ul style="list-style-type: none"> ● 大腸がん患者に対し、リンチ症候群のスクリーニングを目的として、MMR 機能欠損を判定する検査を実施する。 	強く推奨する

リンチ症候群のスクリーニングのための MMR 機能欠損を判定する検査は、分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。

MMR 機能欠損を判定する検査として、

- | | |
|--------------------|--------|
| ➤ MSI 検査を実施する。 | 強く推奨する |
| ➤ IHC 検査を実施する。 | 強く推奨する |
| ➤ NGS を用いた検査を実施する。 | 推奨する |

次世代シーケンス法による包括的ゲノムプロファイリング検査

- | | |
|--|--------|
| ● 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、治療薬適応判定の補助として、包括的ゲノムプロファイリング検査を実施する。 | 強く推奨する |
| ● 包括的ゲノムプロファイリング検査は、分析的妥当性が確認された検査システムで実施する。 | 強く推奨する |

リキッドバイオプシー

- | | |
|---|------|
| ● 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、ctDNA 検査を実施する。
検査は分析的妥当性が確認された微小残存腫瘍検出用のパネル検査を用いて実施する。 | 推奨する |
| ● 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応および治療効果のモニタリング目的として、ctDNA 検査を実施する。
検査は分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。 | 推奨する |
| ● 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、治療薬適応判定の補助として、ctDNA を用いた包括的ゲノムプロファイリング検査を実施する。
検査は分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。 | 推奨する |

血管新生因子

- | | |
|--|------|
| ● 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、血管新生阻害薬の選択補助として、VEGF-D の測定を実施する。
検査は分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。 | 考慮する |
|--|------|

検体に用いる試料

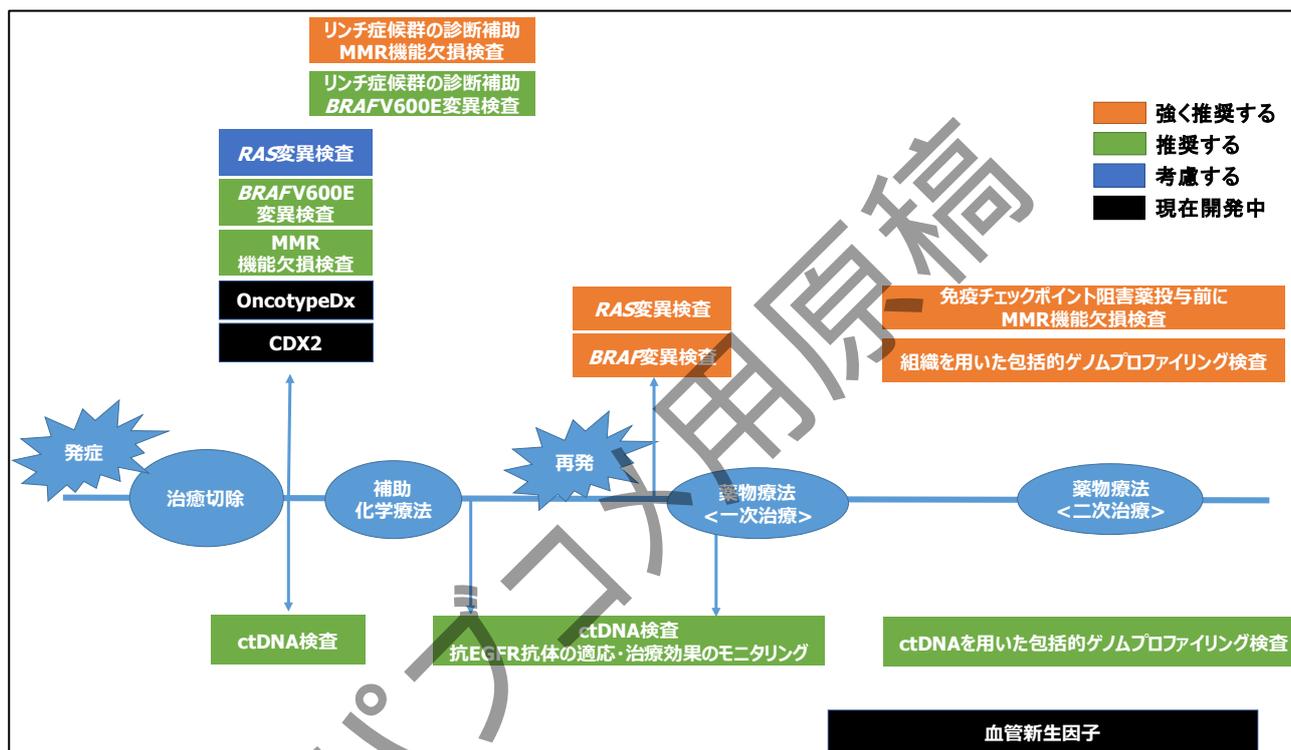
- | | |
|--|--------|
| ● 体細胞遺伝子検査にはホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いる。また、対応する H&E 染色標本で、未染薄切標本内に十分な量の腫瘍細胞が存在すること、および組織学的に想定される核酸の質が保たれていることを確認する。病変のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの選択とマクロダイセクション部位のマーキング、腫瘍細胞割合の評価は原則として病理医が行う。 | 強く推奨する |
|--|--------|

- ctDNA 検査では、使用する採血管、採血後の血漿の調製や保管を各検査法が指定する方法に準じて実施する。 強く推奨する

検査精度の確保

- 大腸がん診療における遺伝子関連検査は、精度の確保された検査室で実施されなければならない。 強く推奨する

図 1: 検査のタイミング



MMR; ミスマッチ修復、ctDNA; circulating tumor DNA

表 2. 推奨度と判定基準

推奨度	推奨度の判定基準
Strong recommendation (SR)	十分なエビデンスと損失を上回る利益が存在し、強く推奨される。
Recommendation (R)	一定のエビデンスがあり、利益と損失のバランスを考慮して推奨される。
Expert consensus opinion (ECO)	エビデンスや有益性情報は十分とは言えないが、一定のコンセンサスが得られている。
No recommendation (NR)	エビデンスがなく、推奨されない。

1 総論

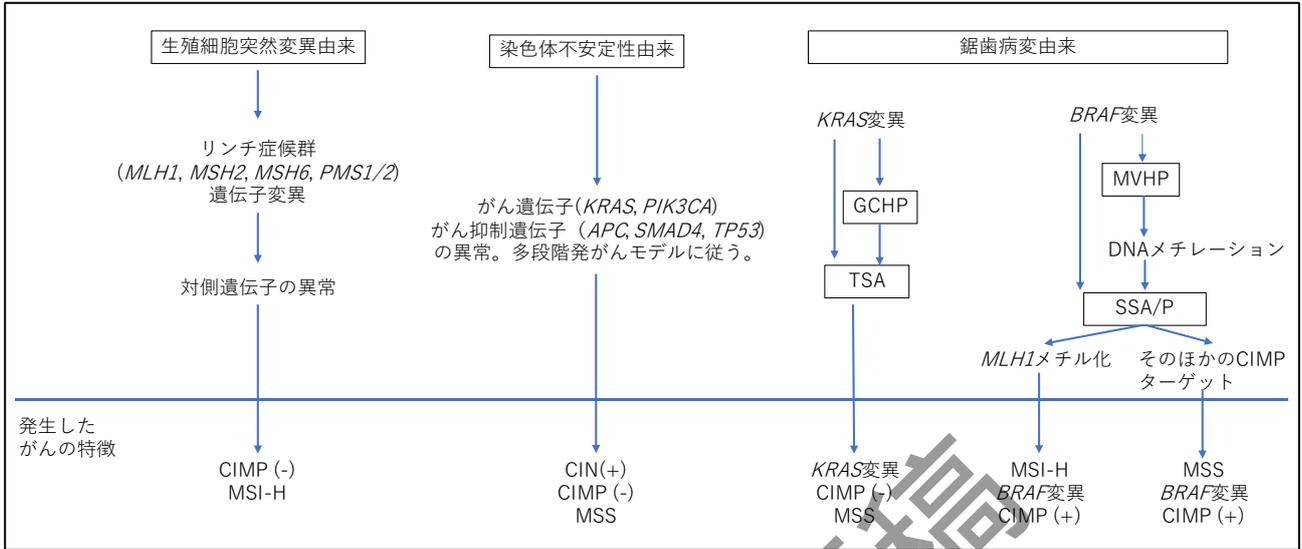
1.1 大腸がんの分子生物学的背景

大腸がんのほとんどは、複数の遺伝子に様々な異常が蓄積することにより段階的に発生し、悪性化が進展する。遺伝子異常には、遺伝的背景や環境因子による突然変異、欠失といったジェネティックな変化に加え、転写レベルにおける発現調節異常などのエピジェネティックな変化が含まれる。現在、大腸がんは、生殖細胞系列突然変異によるもの、染色体不安定性に起因するもの、鋸歯状病変に起因するものに大別される(図 1)¹。生殖細胞系列突然変異による大腸がんには、遺伝性大腸がんの一つであるリンチ症候群が含まれ、DNA ミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 機能の欠損にともない遺伝子異常が蓄積するマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability: MSI) が腫瘍の発生や進展に関与する。染色体不安定性由来の腫瘍では、APC や TP53 などのがん抑制遺伝子および KRAS、PIK3CA などのがん遺伝子に異常が蓄積する多段階発がんモデルが発がんのメカニズムとして考えられている。大腸鋸歯状病変は過形成ポリープ (hyperplastic polyp: HP)、鋸歯状腺腫 (traditional serrated adenoma: TSA)、sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) に分類されているが、SSA/P は右側大腸に好発し、BRAF 変異や CpG island methylation phenotype (CIMP) を高頻度にともない、MSI を示し、特に右側大腸がんの前駆病変として注目されている。

KRAS、BRAF の異常は、大腸がんの発生・進展に重要な役割を果たすドライバー遺伝子変異と考えられており、相互排他性を認め同時に検出されることはまれである。加えて、近年の包括的ゲノムプロファイリング検査の導入により、HER2 増幅など、その他のドライバー遺伝子異常も低頻度ながら同定されている。

一方、大腸がんを遺伝子発現プロファイルに基づいて分類すると、4 つに分類される(表 1)²。Consensus Molecular Subtype (CMS) 1 は女性・右側結腸原発が多く、高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-H: MSI-high) や BRAF 変異の割合が多い。遺伝子の変異率が高い一方で、ゲノムコピー数変化 (copy number alterations: CNA) の割合は低いとされる。CMS2 は CNA の割合が高く、WNT 経路の活性化が特徴的である。CMS3 は KRAS 変異率が高く、IGFBP2 の高発現が特徴的である。CMS4 は CNA が高く、ステージが進行した症例の割合が多いのが特徴である。このように、KRAS、BRAF の異常や MSI は発生した大腸がんの遺伝子発現プロファイルにも影響を与えると考えられる。

図 1 推定される大腸がんの発生経路



APC : adenomatous polyposis coli, CIMP : CpG island methylation phenotype, CIN : Chromosomal instability, GCHP : Goblet cell—rich type hyperplastic polyp, MSI : Microsatellite instability, MSS : Microsatellite stable, MVHP : Microvascular type hyperplastic polyp, SSA : Sessile serrated adenoma, TSA : Traditional serrated adenoma, SSA/P : sessile serrated adenoma/polyp

表 1. 発現解析に基づく大腸がんのサブタイプ分類

	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
	MSI immune	Canonical	Metabolic	Mesenchymal
MSI	MSI-H	MSS	Mixed	MSS
CIMP	高		低	
染色体異常		高	低	高
遺伝子変異	多			
遺伝子異常	<i>BRAF</i> 変異		<i>KRAS</i> 変異	
その他の特徴	免疫細胞の浸潤	WNT, MYC の活性化		血管新生、間質への浸潤
予後	再発後の予後が不良			無再発生存期間、全生存期間とも不良

1.2 大腸がんにも認められる遺伝子異常の臨床的意義

大腸がんの発生に関わる遺伝子異常について、実際の診療における意義についても解明が進んでいる。*RAS*(*KRAS/NRAS*)は、変異により上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)に対する抗体薬の効果を認めないことが多数の前向き試験による解析で示され(第2章 *RAS* 変異検査参照)、抗EGFR抗体薬の適否を判断することを目的として、2010年4月に*KRAS* 遺伝子検査(*K-ras* 遺伝子検査)、2015年4月には*RAS*(*KRAS/NRAS*) 遺伝子検査が保険適用となり、実地診療で広く普及している。

また*BRAF* V600E 変異は、切除不能進行再発大腸がんにおける独立した強い予後不良因子であることが示されていたが、最近では*BRAF* V600E 変異陽性例に対しFOLFOXIRI(5-FU+ロイコポリン+オキサリプラチン+イリノテカン)+ベバシズマブ療法が既存の化学療法より有効である可能性が報告されている(第3章 *BRAF* 変異検査参照)、さらに*BRAF* 阻害薬を用いた治療開発も進んでいる^{3,4}。このため、2018年8月に切除不能進行再発の大腸がんにおける治療選択の補助を目的として*BRAF* V600E 変異検査が保険適用となった。また、大腸がんでリンチ症候群の診断を行う際、免疫染色でMLH1の発現消失を示す場合に*BRAF* V600E 変異陽性であればリンチ症候群はほぼ否定できるため、大腸がんにおけるリンチ症候群の診断補助としても同時に保険適用となっている。

一方、MMR機能欠損を判定する検査であるMSI検査は、リンチ症候群に対するスクリーニング検査として2007年6月に保険適用された。MMR機能欠損は、Stage II結腸がん治癒切除例における再発低リスク因子、予後良好因子、および5-FU単剤による術後補助化学療法の無効因子であり、またMMR機能欠損を有する*BRAF* V600E野生型の切除不能進行再発大腸がん患者は予後が不良な傾向にある。最近、MMR機能欠損を有する切除不能進行再発大腸がん患者に対し抗PD-1抗体薬の有効性が示されたことから、2018年12月抗PD-1抗体薬ペムブロリズマブ(キイトルーダ®)の局所進行性又は転移性のがん患者への適用を判定する目的でも保険適用となった(第4章 ミスマッチ修復機能欠損に対する検査参照)。

1.3 大腸がんの遺伝子関連検査に用いられる手法

大腸がんなど疾病の診断に用いられる遺伝子関連検査は、主に体外診断用医薬品(*in-vitro* diagnostics: IVD)と、試薬として分類される薬事未承認検査(laboratory developed test: LDT)の2種類に分類される。体外診断用医薬品は、医薬品医療機器等法に基づき薬事承認され市場に流通している。*KRAS* 変異検査が開発された当初は薬事未承認検査が保険診療下で実施されていたが、現在、がん領域における遺伝子関連検査は一部を除き体外診断用医薬品化が進んでいる。体外診断用医薬品は、疾病や病態の診断に用いられるが、このうちコンパニオン診断薬(companion diagnostics: CDx)は、特定の医薬品の有効性又は安全性の向上等の目的で使用し、当該医薬品の使用に不可欠な体外診断薬として用いられる。このためコンパニオン診断薬は、検査対象の感度や特異度のみならず、対象となる薬剤の臨床成績に寄与する臨床的カットオフの設定が重要である。体外診断用医薬品や薬事未承認検査以外に、体外診断用医薬品としての承認を得ず、研究目的で用いられるRUO(research use only)に加え、米国などでは分析性能が確認されている臨床試験等に用いるIUO(investigational use only)といった分類も存在し、これに相当する遺伝子パネル検査が実地臨床で実施されている。これら、遺伝子パネル検査を含めた遺伝子関連検査を整理し、国内外で使用される代表的な遺伝子パネル検査との関連を示すと図2のようになる。また、近年の次世代シーケンサーの技術革新によ

り、各個人の全ゲノムシーケンスやゲノム上のエクソンを濃縮して解析するエクソームシーケンスも一部で行われつつある。現在本邦で承認されている包括的ゲノムプロファイリング検査 (comprehensive genomic profiling: CGP) についてコンパニオン診断薬と全ゲノムシーケンスの関係を図 3 に示す。

図 2. 遺伝子関連検査の概念図と対応する検査

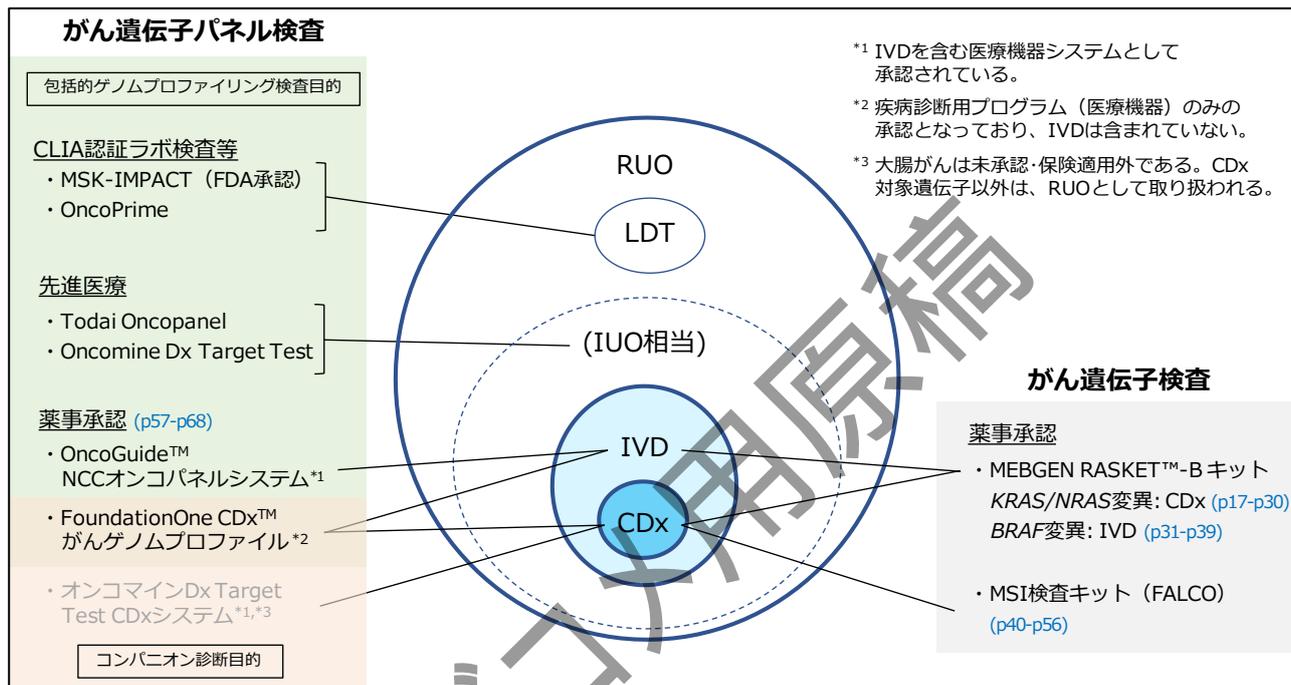
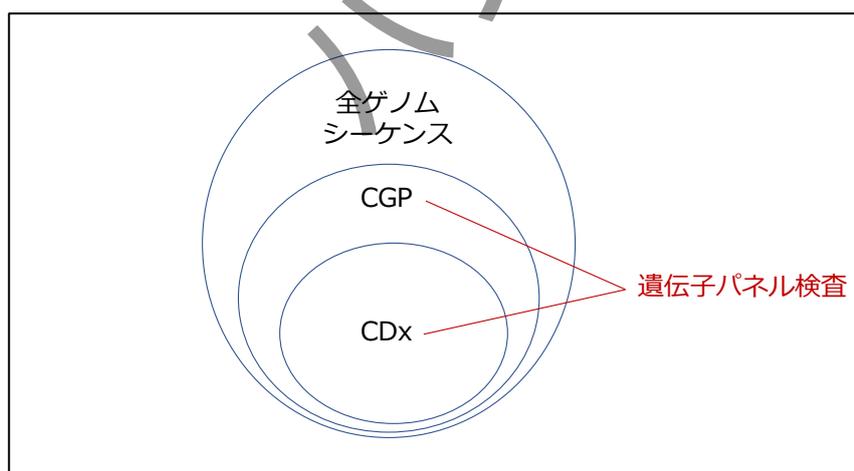


図 3. NGS を使用した検査の相関図



【参考文献】

1. Leggett B, Whitehall V: Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 138:2088-100, 2010
2. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al: The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21:1350-6, 2015
3. van Geel R, Tabernero J, Elez E, et al: A Phase Ib Dose-Escalation Study of Encorafenib and Cetuximab with or without Alpelisib in Metastatic BRAF-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov* 7:610-619, 2017
4. Corcoran RB, Andre T, Atreya CE, et al: Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAF(V600E)-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov* 8:428-443, 2018

日本語用原稿

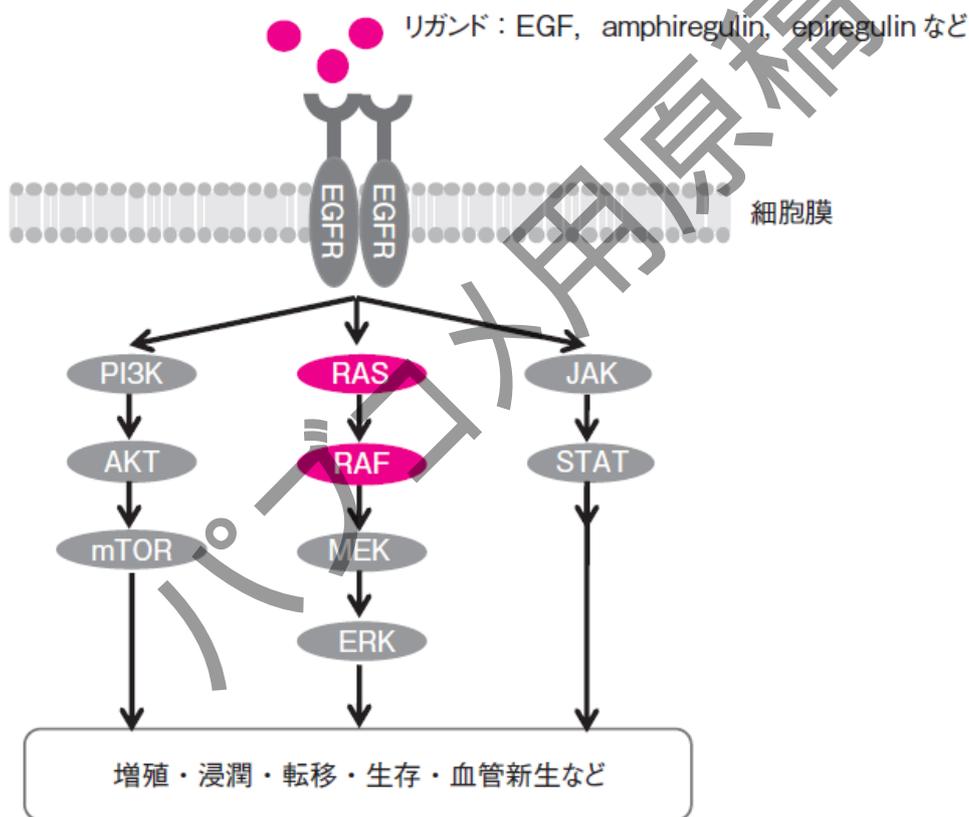
2 RAS 変異検査

2.1 背景

大腸がん EGFR 経路

EGFR は HER1、erbB1 とも呼ばれる 170 kDa の膜貫通型糖蛋白質受容体チロシンキナーゼであり、大腸がんの約 80% に高発現を認める。EGFR に細胞外から上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF)、amphiregulin、epiregulin などのリガンドが結合すると、EGFR もしくは他の HER ファミリー分子との二量体を形成し、細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を介して活性化し、下流へシグナルを伝達する。下流のシグナル経路としては RAS/RAF (MAPK) 経路、PI3K/AKT/mTOR 経路、JAK/STAT 経路などが存在する。これら EGFR 経路は正常組織では細胞分化、増殖、維持に重要な役割を果たす一方、大腸がん組織では機能亢進によりがんの増殖、浸潤、転移、生存、血管新生などに関与している(図 1)。

図 1 大腸がん EGFR シグナル伝達経路



EGFR はリガンド刺激により下流の PI3K/AKT/mTOR、RAS/RAF、JAK/STAT 経路を活性化し、がん細胞の生存・増殖などに関わる。RAS、RAF に変異を有するがん細胞においては、それぞれの変異蛋白質が EGFR からの刺激の有無にかかわらず MEK-ERK 経路を活性化し細胞の生存・増殖を維持する。

大腸がんに対する抗 EGFR 抗体薬

抗 EGFR 抗体薬にはセツキシマブとパニツムマブがある。セツキシマブは EGFR に対するマウス/ヒトキメラ型 IgG1 サブクラスモノクローナル抗体薬であり、パニツムマブは完全ヒト型 IgG2 サブクラスモノクローナル抗体薬である。両者とも細胞膜上の EGFR の抗原エピトープに結合し、リガンドとの結合を阻害することで細胞増殖抑制を生じる。切除不能進行再発大腸がんを対象とした臨床試験で有効性が認められ、本邦ではセツキシマブが 2008 年 7 月、パニツムマブは 2010 年 4 月に薬事承認された。

RAS 蛋白質の機能と RAS 変異

RAS 蛋白質は 188–189 個のアミノ酸から成る約 21 kDa の低分子グアノシン三リン酸(GTP)結合蛋白質であり、KRAS、NRAS、HRAS の 3 種類のアイソフォームが存在する。EGFR など上流からの刺激により、グアノシン二リン酸(GDP)が RAS 分子から離れ、代わりに細胞質から GTP が結合することで RAS は活性型となる。活性型 RAS は、RAF、PI3K、RALGDS など 20 種類に及ぶエフェクター蛋白質と結合し、下流のシグナルカスケードを活性化する。一方、活性型 RAS は GTPase 活性化タンパク質(GAP)と結合すると GTP を加水分解し不活性型となる。RAS は、KRAS が 12 番染色体、NRAS が 1 番染色体、HRAS が 11 番染色体に位置し、それぞれ 4 つのエクソンと 3 つのイントロンからなる。RAS 変異によりアミノ酸置換が生じると変異型 RAS 蛋白質は GTP に結合する一方で GTP を加水分解できなくなることから、恒常的な活性化状態となり、下流にシグナルを送り続ける。この過剰なシグナルが、発がんやがんの増殖に関与している。

大腸がんにおける RAS 変異の頻度

大腸がんにおける RAS 変異の頻度は、COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) データベース(v87)によれば KRAS 33.03%、NRAS 3.68%、HRAS 0.62%と報告され、KRAS エクソン 2 (コドン 12、13) 変異が多くを占める。RAS の点突然変異は大腸がんの発生初期に起こると報告されており、大腸がんの病期に関わらず一定の頻度で検出される(表 1)^{1,2}。KRAS エクソン 2 (コドン 12、13) 変異の頻度は大腸がんの約 35–40%であり、欧米と本邦の報告で差を認めない。欧米を中心に行われた臨床試験によると、KRAS エクソン 3、4 ならびに NRAS エクソン 2、3、4 変異の頻度は合わせて 10–15% (KRAS エクソン 2 野生型の約 20%) である(表 2)。

表 1 Stage 別 KRAS エクソン 2 変異の頻度

	Dukes' stage	頻度		Stage	頻度
Andreyev HJ, et al. (RASCAL) ¹ N=2721	Dukes'A	33.9%	Watanabe T, et al. ² N=5887	Stage I	33.1%
	Dukes'B	39.8%		Stage II	37.3%
	Dukes'C	38.3%		Stage III	38.1%
	Dukes'D	35.8%		Stage IV	37.5%

表 2 RAS 変異の頻度

	KRAS エクソン 2	KRAS エクソン 3	KRAS エクソン 4	NRAS エクソン 2	NRAS エクソン 3	NRAS エクソン 4	合計*
PRIME ³	40% (440/1096)	4% (24/638)	6% (36/620)	3% (22/637)	4% (26/636)	0% (0/629)	17%
20050181 ⁴	45% (486/1083)	4.4% (24/548)	7.7% (41/534)	2.2% (12/536)	5.6% (30/540)	0% (0/532)	20%
20020408 ⁵	43% (184/427)	4.8% (8/166)	5.0% (9/180)	4.2% (7/166)	3.0% (5/168)	1.1% (2/180)	18%
CRYSTAL ⁶	N/A	3.3%	5.6%	3.5%	2.8%	0.9%	15%
FIRE-3 ⁷	N/A	4.3% (21/431)	4.9% (24/458)	3.8% (18/464)	2% (10/468)	0% (0/458)	16%
CALGB 80405 ⁸	N/A	1.8%	5.9%	2.3%	4.2%	0%	14%
RASKET ⁹	37.8% (116/307)	3.1% (6/191)	5.2% (10/191)	3.1% (6/191)	4.2% (8/191)	0% (0/191)	16%

*KRAS エクソン 2 野生型に占める KRAS/NRAS 変異の頻度

N/A; not available

2.2

基本的要件

切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応判定を目的として、一次治療開始前に RAS 変異検査を実施する。

RAS 変異検査は、コンパニオン診断薬を用いて実施する。

推奨度

強く推奨する [SR 10 名]

RAS 変異陽性症例に対する抗 EGFR 抗体薬の治療成績

切除不能進行再発大腸がん症例を対象に一次治療として行われた標準的化学療法±抗 EGFR 抗体薬併用療法とのランダム化比較試験、化学療法既治療症例を対象とした化学療法±抗 EGFR 抗体薬併用療法との第Ⅲ相試験、標準治療不応症例を対象とした抗 EGFR 抗体薬単独療法と best supportive care (BSC) との第Ⅲ相試験における解析から、KRAS エクソン 2 (コドン 12、13) 変異を有する患者群は、抗 EGFR 抗体薬による奏効率の上乗せや、無増悪生存期間、全生存期間の延長を認めなかった。

その後、パニツムマブに関する第Ⅲ相試験において、KRAS エクソン 2 (コドン 12、13) 以外のエクソン 3 (コドン 59、61)、エクソン 4 (コドン 117、146) ならびに NRAS エクソン 2 (コドン 12、13)、エクソン 3 (コドン 59、61)、エクソン 4 (コドン 117、146) 変異の有無とパニツムマブの効果に関する追加解析が行われた^{3-5,10}。結果、KRAS/NRAS 変異を認めない RAS 野生型ではパニツムマブの効果が期待できる一方、KRAS エクソン 3、4、NRAS エクソン 2、3、4 のいずれかに変異を有する症例ではパニツムマブの効果が期待できないことが明らかとなった(表 3、表 4)。さらに、KRAS エクソン 2 変異陽性症例とそれ以外の KRAS/NRAS 変異陽性症例で分けた解析でも、同様にパニツムマブの上乗せ効果が期待できない結果であった。また、セツキシマブのランダム化比較試験でも、KRAS/NRAS 変異を認めない RAS 野生型でのみセツキシマブの効果が期待できる傾向が認められた^{6,11,12}。本邦においても、抗 EGFR 抗体薬投与症例の後ろ向き解析において、KRAS エクソン 2 以外の KRAS/NRAS 変異陽性症例では奏効を認めなかったことが報告されている。

以上、KRAS エクソン 2、3、4、NRAS エクソン 2、3、4 変異陽性症例は、抗 EGFR 抗体薬の利益が得られない可能性が高いことが示された。この傾向は、抗 EGFR 抗体薬の種類(セツキシマブ、パニツムマブ)、治療ライン、併用化学療法の有無や種類に関わらず再現性が認められ、メタアナリシスでも確認されている¹³。現在、セツキシマブ、パニツムマブの添付文書には効能・効果に関連する使用上の注意として「本剤の使用に際しては RAS (KRAS 及び NRAS) 遺伝子変異の有無を考慮した上で、適応患者の選択を行うこと」と記載されている。

大腸がんの治療アルゴリズムと RAS 変異検査

切除不能進行再発大腸がん一次治療症例を対象に抗 EGFR 抗体薬併用療法とベバシズマブ併用療法を比較したランダム化比較試験が欧米から 3 報報告されている。FIRE-3 試験⁷、PEAK 試験¹⁴では、RAS 野生型においてベバシズマブ群と比較し抗 EGFR 抗体薬併用群で全生存期間の延長が認められた。一方、CALGB80405 試験では、主要評価項目である全生存期間において両群に有意な差を認めなかった⁸。

大腸がんでは、右側結腸で BRAF V600E 変異、PIK3CA 変異、CpG island methylator phenotype-high (CIMP-high) マイクロサテライト不安定性の頻度が高く、左側結腸で TP53 変異の頻度が高いなど、原発巣の部位により各遺伝子変異の頻度や遺伝子発現のパターンが異なることが指摘されていた¹⁵。さらに近年、RAS 野生型大腸がんにおいて、原発巣が左側結腸と右側結腸の症例で、予後や抗 EGFR 抗体薬の効果が異なることが報告されている。抗 EGFR 抗体薬の有効性を検討した過去の 6 つの大規模臨床試験(CRYSTAL 試験、

FIRE-3 試験、CALGB80405 試験、RRIME 試験、PEAK 試験、20050181 試験)のデータを統合した解析では、RAS 野生型の右側結腸がんは全生存期間、無増悪生存期間、奏効割合すべてにおいて左側結腸がんより不良であり、RAS 野生型の左側結腸がんは全生存期間、無増悪生存期間において有意に抗 EGFR 抗体薬の上乗せ効果がある一方、右側結腸がんは抗 EGFR 抗体薬の上乗せ効果が認められないことが報告された¹⁶。また、過去に行われた臨床試験の後方視的な解析では、RAS 変異陽性症例は RAS 野生型より全生存期間が短いことが報告され¹⁷、特に NRAS 変異陽性症例は KRAS 変異陽性症例や RAS 野生型症例よりも予後不良である可能性が報告されている^{18,19}。

2019 年 1 月に刊行された「大腸癌治療ガイドライン 2019 年版」²⁰ や ESMO の Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines²¹ では、最新の治療アルゴリズムについて記載されており、一次治療開始前に RAS、BRAF 検査を行い、RAS/BRAF 野生型であればさらに原発巣占居部位に基づいて、左側結腸がんには標準的 化学療法 の FOLFOX(5-FU+ロイコボリン+オキサリプラチン)や FOLFIRI(5-FU+ロイコボリン+イリノテカン)と抗 EGFR 抗体薬の併用、右側結腸がんには標準的 化学療法 の FOLFOX/FOLFIRI、FOLFOXIRI(5-FU+ロイコボリン+オキサリプラチン+イリノテカン)などとベバシズマブの併用が第一選択薬として記載されている。以上より、RAS 変異検査の結果により選択される一次治療レジメンが異なるため、切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応判定を目的として、一次治療開始前に RAS 変異検査を実施することを強く推奨する。RAS 変異検査法については、次項のコメント欄を参照されたい。

表 3 RAS 野生型に対する抗 EGFR 抗体薬の治療効果

	RAS 評価可能*	レジメン	N	RR (%)	PFS (M)	HR	OS (M)	HR
PRIME ³ (一次治療)	90% (1060/ 1183)	FOLFOX4	253	–	7.9	0.72 (p=0.004)	20.2	0.78 (p=0.04)
		FOLFOX4 +Pmab	259	–	10.1		26.0	
20050181 ⁴ (二次治療)	85% (1008/ 1186)	FOLFIRI	213	10	4.4	0.70 (p=0.007)	13.9	0.81 (p=0.08)
		FOLFIRI+ Pmab	208	41	6.4		16.2	
20020408 ⁵ (三次治療)	82% (378/ 463)	BSC	63	0	7 weeks	0.36 (p<0.0001)	–	–
		BSC+ Pmab	73	16	14.1 weeks		–	
20100007 ¹⁰ (三次治療)	87% (328/ 377)	BSC	128	2.3	1.7	0.46 (p<0.0001)	6.9	0.70 (p=0.0135)
		BSC+ Pmab	142	31.0	5.2		10.0	
OPUS ¹¹ (一次治療)	75% (254/ 337)	FOLFOX4	49	29	5.8	0.53 (p=0.0615)	17.8	0.94 (p=0.80)
		FOLFOX4 +Cmab	38	58	12.0		19.8	
CRYSTAL ⁶ (一次治療)	69% (827/ 1198)	FOLFIRI	189	38.6	8.4	0.56 (p=0.0002)	20.2	0.69 (p=0.0024)
		FOLFIRI+ Cmab	178	66.3	11.4		28.4	
FIRE-3 ⁷ (一次治療)	78% (588/ 752)	FOLFIRI+ Bmab	201	58.7	10.2	0.97 (p=0.77)	25.0	0.70 (p=0.0059)
		FOLFIRI+ Cmab	199	65.3	10.3		33.1	
PEAK ¹⁴ (一次治療)	82% (233/ 285)	mFOLFOX6 +Bmab	82	54	10.1	0.66 (p=0.03)	28.9	0.63 (p=0.06)
		mFOLFOX6 +Pmab	88	58	13.0		41.3	
CALGB80405 ⁸ (一次治療)	59% (670/ 1137)	FOLFOX/ IRI+Bmab	256	53.8	11.0	1.03 (p=0.71)	31.2	0.9 (p=0.40)
		FOLFOX/ IRI+Cmab	270	68.6	11.2		32.0	

Pmab; パニツムマブ、Cmab; セツキシマブ、Bmab; ベバシズマブ、IRI; イリノテカン、RR; 奏効割合、PFS; 無増悪生存期間、HR; ハザード比、OS; 全生存期間、M; month、*RAS 評価可能; ランダム化された症例のうち RAS 変異の評価が可能であった症例の割合、BSC; best supportive care、FOLFOX; 5-FU+ロイコボリン+オキサリプラチン、FOLFIRI; 5-FU+ロイコボリン+イリノテカン

表 4 RAS 変異陽性症例に対する抗 EGFR 抗体薬の治療効果

	レジメン	N	RR (%)	PFS (M)	HR	OS (M)	HR
PRIME ³ (一次治療)	FOLFOX4	276	–	8.7	1.31 (p=0.008)	19.2	1.25 (p=0.034)
	FOLFOX4+Pmab	272	–	7.3		15.6	
20050181 ⁴ (二次治療)	FOLFIRI	294	13	4.0	0.86 (p=0.14)	11.1	0.91 (p=0.34)
	FOLFIRI+Pmab	299	15	4.8		11.8	
20020408 ⁵ (三次治療)	BSC	114	0	7.3 weeks	0.97 (p=0.729)	–	–
	BSC+Pmab	99	1	7.4 weeks		–	
20100007 ¹⁰ (三次治療)	BSC	28	–	1.6	1.03 (p=0.9429)	7.5	0.99 (p=0.9625)
	BSC+Pmab	26	–	1.6		7.6	
OPUS ¹¹ (一次治療)	FOLFOX4	75	50.7	7.8	1.54 (p=0.0309)	17.8	1.29 (p=0.1573)
	FOLFOX4+Cmab	92	37.0	5.6		13.5	
CRYSTAL ⁶ (一次治療)	FOLFIRI	214	36.0	7.5	1.10 (p=0.47)	17.7	1.05 (p=0.64)
	FOLFIRI+Cmab	246	31.7	7.4		16.4	
FIRE-3 ⁷ (一次治療)	FOLFIRI+Bmab	91	50.5	9.6	1.25 (p=0.14)	20.6	1.05 (p=0.75)
	FOLFIRI+Cmab	97	38.1	7.5		20.2	
PEAK ¹⁴ (一次治療)	mFOLFOX6+Bmab	27	56	8.9	1.39 (p=0.318)	16.6	0.41 (p=0.020)
	mFOLFOX6+Pmab	24	60	7.8		27.0	
CALGB80405 ⁸ (一次治療)	FOLFOX/IRI+Bmab	42	–	–	–	22.3	0.74 (p=0.21)
	FOLFOX/IRI+Cmab	53	–	–		28.7	

Pmab; パニツムマブ、Cmab; セツキシマブ、Bmab; ヘバシズマブ、IRI; イリノテカン、RR; 奏効割合、PFS; 無増悪生存期間、HR; ハザード比、OS; 全生存期間、M; month、

コメント 1 RAS 変異サブタイプ別の取り扱い

細胞株を用いた検討で、RAS のコドン 12、13、59、61、117、146 変異は、RAS 蛋白質の恒常的活性化、腫瘍細胞増殖速度の上昇、下流の増殖シグナルの活性化を誘導する。一方、変異 RAS 蛋白質が腫瘍細胞に与えるこれらの影響が、それぞれの変異コドンや変異アミノ酸により異なるかどうかについては、現在のところ明確ではない。

セツキシマブに関するランダム化比較試験の後解析において、KRAS エクソン 2 コドン 13D(G13D)変異陽性症例は KRAS エクソン 2 野生型と同様にセツキシマブの効果が期待できる可能性が示唆された²²。しかし、セツキシマブを用いた別の第Ⅲ相試験やパニツムマブを用いた第Ⅲ相試験の後解析、上記の試験を含む 8 つの試験のメタアナリシス²³では、KRAS G13D 変異陽性症例は他の KRAS エクソン 2 変異陽性症例と同様、抗 EGFR 抗体薬による効果は認められなかった。KRAS G13D 変異陽性症例だけを対象とした抗 EGFR 抗体薬併用療法の第Ⅱ相試験結果からも、その治療効果は限定的であることが報告されている^{24,25}。

また、KRAS コドン 146 変異陽性症例で、後方ラインの抗 EGFR 抗体(＋イリノテカン)薬併用療法によって奏効が認められたと報告もあることから²⁶、全てのコドン変異が同様に抗 EGFR 抗体薬による利益が得られないのか十分なエビデンスが蓄積されているとは言えない。しかしながら、各臨床試験で検査されたコドンに多少の違いはあるものの、RAS 変異陽性症例で抗 EGFR 抗体薬の上乗せ効果がなかった点は再現性がある。よって、RAS 変異の検査に際しては KRAS/NRAS コドン 12、13、59、61、117、146 変異の有無を検査し、抗 EGFR 抗体薬投与の可否を判断することが望ましい。

コメント 2 化学療法による RAS 変異の変化

RAS 変異は大腸がん発生の初期に起こることから、抗 EGFR 抗体薬を含まない化学療法後に腫瘍の RAS 変異の状態が変化することは極めて稀であると考えられる²⁷。そのため、RAS 変異検査はどの時点の既存の腫瘍組織を用いて実施しても結果は概ね一致すると考えられる。一方、抗 EGFR 抗体薬を含む化学療法後には、治療前には認められなかった RAS 変異が生じることがあり、このような新たな RAS 変異は抗 EGFR 抗体薬の獲得耐性の一因と考えられている²⁸。再生検で採取した腫瘍組織や、後述する血液検体を用いた RAS 変異検査を行った場合、抗 EGFR 抗体薬投与歴、検体の採取時期を十分に考慮して結果を解釈すべきである。

2.3

基本的要件

切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に RAS 変異検査を実施する。

RAS 変異検査は、分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。

推奨度

考慮する [ECO 9 名、R 1 名]

切除可能進行再発大腸がん患者における RAS 変異の臨床的意義

Stage III 結腸がんの術後補助療法として、FOLFOX 療法と FOLFOX+セツキシマブ併用療法を比較した 2 つの第 III 相試験が行われたが、KRAS エクソン 2 野生型においてもセツキシマブ併用による無再発生存期間、全生存期間の延長は認められなかった^{29,30}。また、切除可能同時性・異時性肝転移症例に対する術前術後化学療法へのセツキシマブの上乗せ効果を検証した第 III 相試験では、セツキシマブ併用による有効性は認められず、むしろ無増悪生存期間はセツキシマブ併用群で不良な傾向にあった³¹。以上より、切除可能進行再発大腸がんに対するセツキシマブの有効性は示されていない。

一方、切除可能進行再発大腸がんにおいて、RAS 変異が予後因子であるかについては未だ議論の余地がある。Stage II/III 結腸がんを対象とした補助療法に関する第 III 相試験の追加解析では、KRAS 変異の有無により無再発生存期間、全生存期間に差を認めなかった^{32,33}。一方で、KRAS 変異陽性症例が有意に予後不良であったとする報告もある^{34,35} (表 5)。また、肝転移などの転移巣切除症例においても RAS 変異陽性症例は RAS 野生型症例より無再発生存期間や全生存期間が短いことが報告されている³⁶。さらに、KRAS 変異 Stage II/III 結腸がん切除後の肺転移再発と関連していることも報告されている³⁷。以上より、RAS 変異の有無が切除可能大腸がんの予後因子になるかどうか現時点ではコンセンサスが得られていないものの、切除可能進行再発大腸がん患者に RAS 変異検査を行うことはその後の治療方針決定の参考になり、患者の状況によって考慮すべきである。

表 5 切除可能大腸がん患者における RAS 変異の有無による再発割合

	Stage	RAS	N	5 年 RFS (%)	HR	5 年 OS (%)	HR
CALGB 89803 ³²	III	KRAS WT	330	6	0.97 (p=0.84)	75	0.90 (p=0.56)
		KRAS MT	178	66		73	
PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 ³³	II/III	KRAS WT	818	-	1.05 (p=0.66)	-	1.09 (p=0.48)
		KRAS MT	481	-		-	
N0147 ³⁴	III	KRAS WT	1479	77*	1.50 (p<0.0001)	-	-
		KRAS MT	779 220	68 (コドン 12)* 67 (コドン 13)*		1.46 (p=0.0035)	
PETACC-8 ³⁵	III	KRAS WT	1019	-	1.56** (p<0.001)	-	-
		KRAS MT	638	-		-	

WT;野生型、MT;変異陽性、RFS;無再発生存、HR;ハザード比、OS;全生存、

*3年RFS、**再発までの期間のHRを記載

コメント RAS 変異検査法

体外診断用医薬品として薬事承認された検査

RAS 変異の検出には、様々な測定原理に基づく体外診断用医薬品がすでに薬事承認、国内に広く流通しているため、これらを用いて検査を行うことが推奨される(表 6)。

表 6 代表的な RAS(KRAS) 変異検査のための体外診断用医薬品

体外診断用医薬品	KRAS エクソン 2 変異	KRAS エクソン 3、4 変異 および NRAS 変異	検出限界	測定原理
MEBGEN™ RASKET-B Kit	検出可能*	検出可能*	1-5%	PCR-rSSO 法
FoundationOne® CDx	検出可能**	検出可能**	2.3%	ハイブリッドキャプチャー法
OncoBEAM™ RAS CRC キット	検出可能***	検出可能****	0.03%	BEAMing 法

*KRAS/NRAS のコドン 12(G12S、G12C、G12R、G12D、G12V、G12A)、コドン 13(G13S、G13C、G13R、G13D、G13V、G13A)、コドン 59(A59T、A59G)、コドン 61(Q61K、Q61E、Q61L、Q61P、Q61R、Q61H)、コドン 117(K117N)、コドン 146(A146T、A146P、A146V) 変異

**FoundationOne® CDx では、上記の変異はコンパニオン診断薬として結果が返却され、それ以外の RAS 変異は意義の確立していない新規の変異として結果が返却される。

*** KRAS のコドン 12(G12S、G12C、G12R、G12D、G12V、G12A)、コドン 13(G13D)、コドン 59(A59T)、コドン 61(Q61L、Q61R、Q61H)、コドン 117(K117N)、コドン 146(A146T、A146V) 変異

****NRAS のコドン 12(G12S、G12C、G12R、G12D、G12V、G12A)、コドン 13(G13R、G13D、G13V)、コドン 59(A59T)、コドン 61(Q61K、Q61L、Q61R、Q61H)、コドン 117(K117N)、コドン 146(A146T) 変異

PCR-rSSO; PCR-reverse sequence specific oligonucleotide

血液検体を用いた RAS 変異検査(表 7)

現在、がんの遺伝子変異診断の多くは、腫瘍組織由来の DNA を用いて行われる。しかし、すべての症例で組織を採取できる訳ではなく、また、組織採取時の侵襲を考えると繰返しの検査が難しいという課題がある。これらの課題を解決するために、血液検体を用いて血漿由来の DNA(circulating tumor DNA: ctDNA)を解析するための様々な技術開発が行われてきた。血液検体由来の微量な DNA を検出するために適した技術としてデジタル PCR 法が開発され、その一つである BEAMing 法は検出感度として 0.03%という優れた性能を示している。BEAMing 法を用いた RAS 変異検査キット(OncoBEAM™ RAS CRC キット)は 2016 年に欧州で CE マーク(ヨーロッパ連合(EU)加盟国の安全基準を満たしていることを示すマーク)を取得しており、欧州で行われた後ろ向き・前向きの臨床性能試験では、腫瘍組織を用いた RAS 変異検査と良好な一致を示している³⁸⁻⁴²。本邦で行われた臨床性能試験でも、OncoBEAM™ RAS CRC キットと腫瘍組織を用いた BEAMing による RAS 変異検査は良好な一致率が認められており⁴³、「血漿から抽出したゲノム DNA 中の RAS(KRAS 及び NRAS) 遺伝子変異の検出(セツキシマブ(遺伝子組換え)及びパニツムマブ(遺伝子組換え)の結腸・直腸癌患者への適応を判定するための補助に用いる)」を利用用途に 2019 年 7 月に薬事承認された。

表 7 血液検体を用いた RAS 変異検査と組織を用いた検査との一致

	N	感度	特異度	一致率
Grasselli, J., et al. ³⁸	146	88.9%	90.2%	89.7%
Vidal J, et al. ³⁹	115	96.4%	90.0%	93.0%
Garcia-Foncillas, J., et al. ⁴⁰	238	92.6%	94.0%	93.3%
Schmiegel W, et al. ⁴¹	98	90.4%	93.5%	91.8%
Garcia-Foncillas, J., et al. ⁴²	236	86.3%	92.4%	89.0%
Bando H, et al. ⁴³	280	82.1%	90.4%	86.4%

サイドメモ 1 同一検体を用いた異なる検査で RAS 変異検査結果が不一致の場合の取り扱い

体外診断用医薬品による RAS 変異検査の結果が、過去に研究用試薬で行われた RAS 変異検査の結果や、今後行われる可能性のある次世代シーケンス (next generation sequencing: NGS) による包括的ゲノムプロファイリング検査の結果と不一致となる可能性がある。同一検体を用いた 2 つの異なる検査法にて RAS 変異検査結果が異なる場合には、それぞれの検査法の確認が必要であり、原則として体外診断用医薬品の検査結果を優先し抗 EGFR 抗体薬の適応を判断する。

サイドメモ 2 KRAS/NRAS コドン 12、13、59、61、117、146 以外の RAS 変異が検出された場合の対応

切除不能進行再発大腸がん症例を対象とした抗 EGFR 抗体薬に関するランダム化比較試験において、抗 EGFR 抗体薬による治療効果が期待できないとされた RAS 変異の部位は、KRAS/NRAS コドン 12、13、59、61、117、146 である。しかしながら NGS を用いた包括的ゲノムプロファイリング検査が広く使われるようになると、稀ではあるが上記のコドン以外の RAS 変異が検出されるケースが想定される。例として、大腸がんにおいて KRAS コドン 22 のミスセンス変異や HRAS コドン 12 のミスセンス変異が検出された例が報告されている^{44,45}。KRAS/NRAS コドン 12、13、59、61、117、146 以外の RAS 変異が検出された患者に対する抗 EGFR 抗体薬の効果については臨床データが乏しく、一律に抗 EGFR 抗体薬投与の適応を否定できない。これらの遺伝子変異が検出された場合、抗 EGFR 抗体薬の適応は①変異により生じる RAS 蛋白質が活性の亢進を示すかどうか、②検出された RAS 変異に対し抗 EGFR 抗体薬投与が行われた既存の患者報告、③抗 EGFR 抗体薬の副作用、④抗 EGFR 抗体薬以外の治療選択肢があるか、等を勘案して総合的に判断する。

サイドメモ 3 EGFR 発現を評価する免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) 検査

セツキシマブは当初、IHC 検査による評価にて腫瘍細胞に EGFR 発現が認められた患者 (EGFR 発現陽性) に限定して治療開発が行われた。そのため、現在のセツキシマブの添付文書には、効能効果として「EGFR 陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がん」と記載されている。また、EGFR に対する IHC 検査は、N002 免疫染色 (免疫抗体法) 病理組織標本作製 EGFR タンパク (点数 690 点) として保険適用となり、体外診断用医薬品として EGFR pharmDx「ダコ」(2-18C9) およびヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) 抗 EGFR モノクローナル抗体 (31G7) が薬事承認されている。しかし、その後の検討により EGFR 発現陰性の大腸がん患者でもセツキシマブによる奏効例が認められること、EGFR 発現強度と抗 EGFR 抗体薬の治療効果が相関しないことが明らかになった。以上より、抗 EGFR 抗体薬の適応を判断するために EGFR に対する IHC 検査を実施する必要性はない。欧米のガイドラインでも、抗 EGFR 抗体薬の適応を判断するための EGFR に対する IHC 検査は推奨されていない。

【参考文献】

1. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 90:675-84, 1998
2. Watanabe T, Yoshino T, Uetake H, et al: KRAS mutational status in Japanese patients with colorectal cancer: results from a nationwide, multicenter, cross-sectional study. *Jpn J Clin Oncol* 43:706-12, 2013
3. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al: Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 369:1023-34, 2013
4. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, et al: Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 21:5469-79, 2015
5. Peeters M, Oliner KS, Parker A, et al: Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 19:1902-12, 2013
6. Van Cutsem E, Lenz HJ, Kohne CH, et al: Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 33:692-700, 2015
7. Stintzing S, Modest DP, Rossius L, et al: FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2016
8. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, et al: Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 317:2392-2401, 2017
9. Yoshino T, Muro K, Yamaguchi K, et al: Clinical Validation of a Multiplex Kit for RAS Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET (RAS KEY Testing) Prospective, Multicenter Study. *EBioMedicine* 2:317-23, 2015
10. Kim TW, Elme A, Kusic Z, et al: A phase 3 trial evaluating panitumumab plus best supportive care vs best supportive care in chemorefractory wild-type KRAS or RAS metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 115:1206-1214, 2016
11. Bokemeyer C, Kohne CH, Ciardiello F, et al: FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 51:1243-52, 2015
12. Sobrero A, Lenz H-J, Eng C, et al: Retrospective RAS analysis of the EPIC trial: Cetuximab plus irinotecan vs irinotecan in patients with second-line metastatic colorectal cancer. *ESMO Congress 2018* 484P, 2018
13. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, et al: Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 26:13-21, 2015
14. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, et al: PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 32:2240-7, 2014
15. Loree JM, Pereira AAL, Lam M, et al: Classifying Colorectal Cancer by Tumor Location Rather than Sidedness Highlights a Continuum in Mutation Profiles and Consensus Molecular Subtypes. *Clin*

Cancer Res 24:1062-1072, 2018

16. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, et al: Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomised trials. *Ann Oncol*, 2017

17. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, et al: Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol* 27:1746-53, 2016

18. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, et al: Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* 136:83-90, 2015

19. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, et al: Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin Cancer Res* 23:4753-4760, 2017

20. 大腸癌研究会編：大腸癌治療ガイドライン—医師用 2019年版. 金原出版, 東京, 2019

21. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, et al: Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Ann Oncol* 29:44-70, 2018

22. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, et al: Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Jama* 304:1812-20, 2010

23. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, et al: Meta-analysis comparing the efficacy of anti-EGFR monoclonal antibody therapy between KRAS G13D and other KRAS mutant metastatic colorectal cancer tumours. *Eur J Cancer* 55:122-30, 2016

24. Schirripa M, Loupakis F, Lonardi S, et al: Phase II study of single-agent cetuximab in KRAS G13D mutant metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 26:2503, 2015

25. Segelov E, Thavaneswaran S, Waring PM, et al: Response to Cetuximab With or Without Irinotecan in Patients With Refractory Metastatic Colorectal Cancer Harboring the KRAS G13D Mutation: Australasian Gastro-Intestinal Trials Group ICECREAM Study. *J Clin Oncol* 34:2258-64, 2016

26. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al: Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11:753-62, 2010

27. Kawamoto Y, Tsuchihara K, Yoshino T, et al: KRAS mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer. *Br J Cancer* 107:340-4, 2012

28. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al: Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486:532-6, 2012

29. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, et al: Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA* 307:1383-93, 2012

30. Taieb J, Tabernero J, Mini E, et al: Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15:862-73, 2014

31. Primrose J, Falk S, Finch-Jones M, et al: Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis: the New EPOC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*

15:601-11, 2014

32. Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, et al: KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 15:7322-9, 2009
33. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al: Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 28:466-74, 2010
34. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, et al: KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res* 20:3033-43, 2014
35. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, et al: Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Ann Oncol* 25:2378-85, 2014
36. Schirripa M, Bergamo F, Cremolini C, et al: BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. *Br J Cancer* 112:1921-8, 2015
37. Tie J, Lipton L, Desai J, et al: KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 17:1122-30, 2011
38. Grasselli J, Elez E, Caratu G, et al: Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 28:1294-1301, 2017
39. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, et al: Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 28:1325-1332, 2017
40. Garcia-Foncillas J, Alba E, Aranda E, et al: Incorporating BEAMing technology as a liquid biopsy into clinical practice for the management of colorectal cancer patients: an expert taskforce review. *Ann Oncol*, 2017
41. Schmiegel W, Scott RJ, Dooley S, et al: Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing. *Mol Oncol* 11:208-219, 2017
42. Garcia-Foncillas J, Tabernero J, Elez E, et al: Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2018
43. Bando H, Kagawa Y, Kato T, et al: A multicentre, prospective study of plasma circulating tumour DNA test for detecting RAS mutation in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 120:982-986, 2019
44. Palmirotta R, Savonarola A, Formica V, et al: A novel K-ras mutation in colorectal cancer. A case report and literature review. *Anticancer Res* 29:3369-74, 2009
45. Boidot R, Chevrier S, Julie V, et al: HRAS G13D, a new mutation implicated in the resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer, a case report. *Int J Colorectal Dis* 31:1245-6, 2016

3 BRAF 変異検査

3.1 背景

BRAF 蛋白質の機能と BRAF 変異

RAF 蛋白質は ARAF、BRAF、CRAF の 3 つのアイソフォームより構成される¹。BRAF 蛋白質は 766 個のアミノ酸から成る約 74 kDa のセリンスレオニンキナーゼであり、EGFR などの受容体型チロシンキナーゼにより活性化された RAS 蛋白質と直接結合し、BRAF 蛋白質や CRAF 蛋白質と二量体を形成することで活性化され、下流の MEK-ERK 経路を活性化することにより、細胞増殖や生存に関わる(第 2 章図 1 を参照)²。BRAF 遺伝子は、7 番染色体に位置し、18 のエクソンからなる。2002 年、ヒトのがんで高頻度に BRAF 変異が認められることが初めて報告され、悪性黒色腫(43%)、甲状腺がん(27%)、胆道がん(14%)などで頻度が高いことが知られている³。BRAF 変異によりアミノ酸置換が生じると、上流の RAS 蛋白質からの刺激の有無にかかわらず下流蛋白質に恒常的な活性化が生じる。

大腸がんにおける BRAF V600E 変異の頻度と臨床病理学的特徴

大腸がんにおける BRAF 変異の頻度は、COSMIC データベース(v87)によれば 10.3%(結腸がん 13.4%、直腸がん 3.2%)であり、エクソン 15 領域の 1799 番目のチミンがアデニンへ変異し(c.1799T>A)、コドン 600 のバリンがグルタミン酸となる V600E 変異(p.V600E)が多い。BRAF V600E 変異は大腸がんの発生初期に起こると報告されているが、その頻度は、Stage I/II と比較すると Stage III/IV でやや高い(表 1)^{4,5}。その理由として、後述のように BRAF V600E 変異腫瘍は予後不良なため進行期で見つかる症例が多いことが関与していると推測される。本邦の大腸がんにおける BRAF V600E 変異の頻度は、4.5–6.7%と報告されており^{6,7}、欧米からの報告(5–12%)と比較してやや低い。大腸がんにおける RAS 変異と BRAF V600E 変異とは相互排他的であるとされている。

また、BRAF V600E 変異陽性症例は、野生型と異なる臨床病理学的特徴を示す。25 研究 11955 例の大腸がんを含むメタアナリシスによれば、女性、60 歳以上、右側結腸原発、低分化腺がん、粘液成分あり、マイクロサテライト不安定性腫瘍において BRAF V600E 変異の頻度が高いことが報告されている(表 2)⁸。

表 1 Stage 別 BRAF V600E 変異の頻度

	Stage	N	頻度		Stage	N	頻度
Phipps AI, et al. ⁴ N=1980	Localized	785	12.1%	Ogura T, et al. ⁵ N=1304	Stage 0/ I	296	3.4%
	Regional	937	14.2%		Stage II	407	4.2%
	Distant	226	6.6%		Stage III	384	4.4%
	Unknown	32	—		Stage IV	217	6.9%

表 2 患者背景別の BRAF V600E 変異の頻度⁶

患者背景		N	頻度	オッズ比
性別	男性	6186	8.0%	1.71 (1.42–2.07)
	女性	5489	13.7%	
年齢	60 歳未満	1351	6.7%	2.29 (1.13–4.61)
	60 歳以上	1631	18.6%	
原発巣部位	左側結腸～直腸	5806	4.8%	4.85 (3.59–6.56)
	右側結腸	4007	21.6%	
診断時病期 (TNM 分類)	I / II	1806	8.0%	1.59 (1.16–2.17)
	III / IV	2630	11.6%	
分化度	高～中分化	4257	8.0%	3.89 (2.94–5.17)
	低分化	766	25.6%	
粘液癌成分の有無	なし	2134	8.1%	2.99 (2.20–4.07)
	あり	392	19.4%	
マイクロサテライト不安定性	なし	1371	9.3%	8.18 (5.08–13.17)
	あり	352	38.9%	

3.2

基本的要件

切除不能進行再発大腸がん患者に対し、予後予測に応じた治療選択を目的として、一次治療開始前に *BRAF* V600E 変異検査を実施する。

BRAF V600E 変異検査は、分析的妥当性が確認された方法で実施する。

推奨度

強く推奨する [SR 9 名、R 1 名]

切除不能進行再発大腸がん症例における *BRAF* V600E 変異の臨床的意義

2005 年、Samowitz らは 901 例の大腸がん症例のコホート研究から、*BRAF* V600E 変異陽性症例は野生型と比較して予後不良であることを報告した⁹。その後、同様の報告が相次ぎ、26 研究のメタアナリシスでは全生存期間のハザード比は 2.25 (95% confidence interval (CI):1.82–2.83) と報告されている。切除不能進行再発大腸がん一次化学療法症例を対象としたランダム化比較試験の統合解析でも、*BRAF* V600E 変異陽性症例の生存期間は、野生型と比較して大きく劣ることが示されている(表 4)^{10,11}。本邦においても、切除不能進行再発大腸がん症例の解析において、*BRAF* V600E 変異陽性症例は予後不良であることが報告されている。

大腸がん一次治療として FOLFOXIRI+ベバシズマブ療法と FOLFIRI+ベバシズマブ療法とを比較した第Ⅲ相試験(tribe 試験)において、*BRAF* V600E 変異陽性症例で特に、FOLFOXIRI+ベバシズマブによる生存延長効果が大きい傾向にあったと報告された(表 5)¹²。また、*BRAF* V600E 変異陽性症例のみを対象とした FOLFOXIRI+ベバシズマブの第Ⅱ相試験でも良好な治療効果が示されている¹³。これらの結果を踏まえ、大腸癌治療ガイドライン 2019 年版および ESMO の Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines では、*BRAF* V600E 変異陽性症例に対する一次治療レジメンとして FOLFOXIRI+ベバシズマブ療法が第一選択としてガイドラインに記載されている¹⁴。

さらに 2019 年 7 月に、1 つまたは 2 つの前治療歴のある *BRAF* V600E 変異陽性切除不能進行再発大腸がん症例を対象にエンコラフェニブ(*BRAF* 阻害薬)+ビニメチニブ(MEK 阻害薬)+セツキシマブ(抗 EGFR 抗体薬)の 3 剤群、エンコラフェニブ+セツキシマブの 2 剤群、FOLFIRI(またはイリノテカン)+セツキシマブのコントロール群の 3 群を比較した第Ⅲ相試験である BEACON CRC 試験の結果が報告された。初回の中間解析で主要評価項目である奏効割合および全生存期間において、3 剤群がコントロール群より明らかに優れていたため結果開示となり、全生存期間[中央値:3 剤群 9.0 ヶ月(ハザード比(HR);0.52、P<0.001)、2 剤群 8.4 ヶ月(HR;0.60、P<0.001)、コントロール群 5.4 ヶ月]、無増悪生存期間[中央値:3 剤群 4.3 ヶ月(HR;0.38、P<0.001)、2 剤群 4.2 ヶ月(HR;0.40、P<0.001)、コントロール群 1.5 ヶ月]、奏効割合[3 剤群 26%(P<0.001)、2 剤群 20%(P<0.001)、コントロール群 2%]いずれにおいても 3 剤群または 2 剤群がコントロール群より有意に優れていた¹⁵。

以上、*BRAF* V600E 変異の有無を確認することは、化学療法の治療効果や予後についてより正確な情報を得ることができ、治療選択の点で有益である。よって切除不能進行再発大腸がん患者に対しては、一次治療開始前に *BRAF* V600E 変異の有無を検査することが強く推奨される。

表 4 *BRAF* V600E 変異陽性症例の治療成績(統合解析)

		N	PFS (M)	HR	OS (M)	HR
Venderbosch S, et al. ¹⁰	<i>BRAF</i> WT	2813	7.7	1.34	17.2	1.91
	<i>BRAF</i> MT	250	6.2	(p=0.001)	11.4	(p=0.001)

Modest DP, et al. ¹¹	RAS / BRAF WT	664	10.3	2.19	26.9	2.99
	BRAF MT	74	7.4	(p<0.001)	11.7	(p<0.001)

WT; 野生型、MT; 変異陽性、PFS; 無増悪生存期間、HR; ハザード比、OS; 全生存期間、M; month

表 5 一次治療としての FOLFOXIRI+ペバシズマブ療法の治療成績

		レジメン	N	RR (%)	PFS (M)	HR	OS (M)	HR
TRIBE ¹²	RAS / BRAF WT	FOLFIRI+Bmab	45	60	12.2	0.85	33.5	0.77
		FOLFOXIRI+Bmab	48	65	13.7		41.7	
	RAS MT	FOLFIRI+Bmab	119	55	9.5	0.78	23.9	0.88
		FOLFOXIRI+Bmab	117	66	12.0		27.3	
	BRAF MT	FOLFIRI+Bmab	12	42	5.5	0.57	10.7	0.54
		FOLFOXIRI+Bmab	16	56	7.5		19.0	
Loupakis F, et al. ¹³	BRAF MT	FOLFOXIRI+Bmab	25	72	11.8	-	24.1	-

Bmab; ペバシズマブ、WT; 野生型、MT; 変異陽性、RR; 奏効割合、PFS; 無増悪生存期間、HR; ハザード比、OS; 全生存期間、M; month

コメント 1 BRAF V600E 変異陽性症例に対する抗 EGFR 抗体薬の効果

BRAF V600E 変異陽性の切除不能進行再発大腸がん症例に対する抗 EGFR 抗体薬の治療効果については未だ議論のあるところである。当初、抗 EGFR 抗体薬を投与した患者の後方視的検討から、KRAS 変異陽性症例の場合と同様に、抗 EGFR 抗体薬は効果が乏しいことが報告された。しかし、その後抗 EGFR 抗体薬併用群と非併用群とを比較した第Ⅲ相試験のサブグループ解析が複数報告され、抗 EGFR 抗体薬の効果については相反した報告がなされている。また、これら抗 EGFR 抗体薬併用群と非併用群を比較したランダム化比較試験のメタアナリシスでも、BRAF V600E 変異陽性症例では抗 EGFR 抗体薬併用による生存期間延長効果は認めないとする報告がある一方¹⁶、KRAS/BRAF 野生型と同様に抗 EGFR 抗体薬の治療効果が期待できるとする報告がある¹⁷。

このように、RAS/BRAF 野生型と比較して、BRAF V600E 変異陽性症例では抗 EGFR 抗体薬投与によるリスクベネフィットバランスが異なる可能性があることを考慮すれば、抗 EGFR 抗体薬投与前に BRAF V600E 変異の有無を明らかにすることは治療レジメン選択のうえで有益であると考えられる。実際、米国 The National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ガイドライン ver.1, 2019 では、BRAF V600E 変異陽性症例では抗 EGFR 抗体薬の治療効果はほとんど期待できない (highly unlikely) ことを踏まえ、Stage IV 大腸がんとして診断された時点で BRAF V600E 変異検査の実施が推奨されている¹⁸。一方、以上のエビデンスから、BRAF V600E 変異陽性症例に対して、抗 EGFR 抗体薬投与が無効とまでは結論できないことから、実地臨床においては、いずれかの治療ラインで抗 EGFR 抗体薬を含む治療を選択することが想定される。

3.3

基本的要件

切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に *BRAF* V600E 変異検査を実施する。

BRAF V600E 変異検査は、分析的妥当性が確認された方法で実施する。

推奨度

推奨する [R 7 名、ECO 3 名]

切除可能大腸がんにおける *BRAF* V600E 変異検査の臨床的意義

近年、切除可能症例においても *BRAF* V600E 変異が強い予後不良因子であるとの報告が蓄積されてきた。Stage II/III 結腸がんを対象とした術後補助化学療法に関する第Ⅲ相試験のメタアナリシスでは、*BRAF* V600E 変異陽性症例は野生型と比較して、全生存期間のハザード比 1.42(1.25–1.60)、無病生存期間のハザード比 1.26(1.07–1.48)と、*BRAF* V600E 変異が再発リスク因子となることが報告され¹⁹。術後補助化学療法として 5-FU/LV(5-FU+ロイコボリン)療法と FOLFOX 療法とを比較した第Ⅲ相試験である MOSAIC 試験のサブグループ解析では、*BRAF* 野生型と *BRAF* V600E 変異陽性症例で有意差はないもののオキサリプラチンの上乗せ効果が異なる可能性が示唆されている(全生存期間ハザード比 0.93 vs. 0.66)。また、治癒切除が行われた肝転移症例の観察研究でも *BRAF* V600E 変異陽性症例では、野生型と比較して無再発生存期間のハザード比 1.62(1.07–2.47)、全生存期間のハザード比 2.39(1.53–3.72)と有意に予後不良で *BRAF* V600E 変異陽性症例では術後一年以内の再発症例が極めて多いと報告されている²⁰。また、本邦からの報告を含むメタアナリシスでも同様の傾向が確認されている²¹。

一方、切除不能および切除可能症例を含めた大腸がん 27 研究 24,067 例のメタアナリシスでは、マイクロサテライト安定(MSS)かつ *BRAF* V600E 野生型と比較した、MSS かつ *BRAF* V600E 変異陽性症例、高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-H)かつ *BRAF* V600E 変異陽性の切除可能症例における無再発生存期間のハザード比はそれぞれ 1.54(1.16–2.05)、0.51(0.31–0.83)、切除不能症例を含めた全生存期間のハザード比はそれぞれ 2.02(1.71–2.39)、1.32(0.94–1.87)と、*BRAF* V600E 変異の予後因子の程度は、MSI-H と MSS で大きく異なることが報告されている²²。

このように、*BRAF* V600E 変異の有無は、切除可能症例においても特に MSS 症例で極めて強い予後不良因子である。本邦の大腸癌診療ガイドラインでは、治癒切除後の補助化学療法において再発リスクを考慮してフルオロピリミジン単独療法とオキサリプラチン併用療法とを選択することが推奨されている²³。また、遠隔転移切除症例でも再発リスクに応じて、転移巣切除の適応や補助化学療法レジメンなどの治療選択が異なる可能性がある。よって、切除可能大腸がん症例に対して *BRAF* V600E 変異検査は治療選択のために有用であると考えられ、その検査が推奨される。また *BRAF* V600E 変異の予後因子の程度は MSI-H と MSS で大きく異なることから、ミスマッチ修復機能検査も同時に実施することが望ましい。米国および欧州の診療ガイドラインでも、切除可能症例も含めた遠隔転移症例において治療方針を決定するための精密検査(work up)として、*BRAF* V600E 変異検査が推奨されている^{18,24}。なお 2019 年 9 月現在、本邦において *BRAF* V600E 変異検査は、切除可能な結腸直腸がんの治療選択については保険適用されていない。

3.4

基本的要件

大腸がん患者に対し、リンチ症候群の診断の補助を目的として、*BRAF* V600E 変異検査を実施する。

BRAF V600E 変異検査は、分析的妥当性が確認された方法で実施する。

推奨度

推奨する [SR 1 名、R 9 名]

リンチ症候群の除外診断のための *BRAF* V600E 変異検査

(リンチ症候群および dMMR, pMMR の詳細については第 4 章参照のこと)

大腸がんにおける *BRAF* V600E 変異の頻度は、Mismatch Repair-Deficient (dMMR: MSI-H または免疫組織化学検査による MMR 蛋白質発現が消失)と Mismatch Repair-Proficient (pMMR: MSS または免疫組織化学検査による MMR 蛋白質発現が陽性)で大きく異なり、dMMR でその頻度が高い(9.3% vs 38.9%、オッズ比 8.18 [5.08–13.2])。dMMR 大腸がんの中でも、リンチ症候群は生殖細胞系列の変異が原因であり、散発性の dMMR 大腸がんの多くはプロモーター領域のメチル化が原因とされている。例えば、*MLH1* 遺伝子のプロモーター領域の後天的な異常メチル化は、*MLH1* 蛋白質の発現消失を引き起こす。*BRAF* V600E 変異は散発性の dMMR 大腸がんで高頻度に認められ、35 研究 4562 例のレビューでは、リンチ症候群と考えられる大腸がんにおける *BRAF* V600E 変異の頻度は 1.4%、散発性と考えられる *MLH1* 蛋白質発現消失のある大腸がんでは 63.5%であった²⁵。このように MSI-H もしくは MMR 蛋白質発現消失(特に *MLH1* 蛋白質発現消失)の場合において、*BRAF* V600E 変異が認められればリンチ症候群を高確率に除外することができる。実際、欧米のリンチ症候群に関するガイドラインでも、MSI-H もしくは *MLH1* 蛋白質発現消失の場合、遺伝学的検査に進む前に *BRAF* V600E 変異検査を実施することが推奨され、リンチ症候群の確定診断である遺伝学的検査が必要となる患者を減らすことができ、費用対効果の高いリンチ症候群のスクリーニング方法と考えられている^{26,27}。本邦の遺伝性大腸癌診療ガイドラインでも、MSI-H または *MLH1* 蛋白質発現消失の場合には遺伝学的検査に進む前に *BRAF* V600E 変異検査の実施がオプションのひとつとして呈示されている。

以上より、大腸がん患者に対し、リンチ症候群の診断の補助を目的として、*BRAF* V600E 変異検査を実施することが推奨される。本邦でも、2018 年 8 月よりリンチ症候群の診断の補助として、*BRAF* V600E 変異検査が保険適用となっている。なお、大腸がん以外のがん腫では、リンチ症候群の除外を目的とした *BRAF* V600E 変異検査は、臨床的意義がない、あるいは不明なため不要であることに留意する必要がある。

コメント 1 *BRAF* 変異検査法

BRAF V600E 変異が予後不良因子であると示された臨床試験で実施された主な検査法は、ダイレクトシーケンス法、SURVEYOR 法、次世代シーケンサー法、パイロシーケンス法、MALDI MS 法、リアルタイム PCR クランピング法など様々である(表 7)。これらの検査法の変異検出限界は、ダイレクトシーケンス法を除くと概ね 1–10%である。これら様々な検査法により得られた結果において、*BRAF* V600E 変異陽性症例では予後不良であることが一貫して示されており、検出限界 1–10%の検査法を選択し *BRAF* 変異検査を実施することが推奨される。

本邦では 2018 年 8 月に大腸がんにおける *BRAF* V600E 変異検査が保険適用となっている。*RAS* 変異および *BRAF* V600E 変異を同時に検出する体外診断用医薬品として、2017 年 12 月に MEBGEN™ RASKET-B キットが製造販売承認されている。また、FoundationOne® CDx や OncoGuide™ NCC オンコパネルシステムは、*BRAF* V600E が解析対象に含まれており、検査結果は利用可能である。

一方、別の BRAF V600E 検査として、BRAF 変異蛋白 (VE1) に対する免疫組織化学検査法 (IHC 法) が報告されている。8 研究 1021 例の大腸がんコホートでのメタアナリシスでは、IHC 法と BRAF V600E 変異との一致率は 0.94 (95%CI 0.87–0.98)、感度 0.94 (0.91–0.96)、特異度 0.96 (0.95–0.98) と報告されている²⁸。また、IHC 法を用いた BRAF V600E 変異陽性症例と野生型の予後を比較した観察研究でも、BRAF V600E 変異が極めて強い予後不良因子であることが再現されている^{29,30}。IHC 法は使用する抗体クローンや染色条件、自動免疫染色装置等により染色の程度が変わりうることから、厳密に標準化された染色手技や試薬、判定方法を用いる必要がある。今後、BRAF VE1 クローンの免疫染色用試薬が体外診断薬として承認されれば、IHC 法も BRAF V600E 変異検出法として推奨される。

表 7 各臨床試験で用いられた BRAF V600E 変異検査法

試験名	検査法	N	BRAF V600E 変異陽性の頻度
CAIRO-2	ダイレクトシーケンス法	519	8.7%
FOCUS	パイロシーケンス法	711	7.9%
CRIYSTAL	リアルタイム PCR クランピング法	999	6%
COIN	パイロシーケンス法、MALDI MS 法	1316	8%
MAX	HRM シーケンス法	315	10.6%
NORDIC-VII	Wobble-enhanced ARMS 法 リアルタイム PCR クランピング法	457	12%
PRIME	ダイレクトシーケンス法 Wave-based Surveyor 法	641*	8%
TRIBE	パイロシーケンス法、MALDI MS 法	508	5.5%

*KRAS エクソン 2 野生型症例で実施

サイドメモ 1 コンパニオン診断薬としての BRAF 変異検査

悪性黒色腫では、欧米人の約 50–60%、本邦では約 20–30% の患者に BRAF V600 変異 (V600E 変異 90%、V600K 変異 10%) が認められる。BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫に対する BRAF 阻害薬の有効性が証明され、本邦でも BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫に対する治療薬として、BRAF 阻害薬のベムラフェニブ、ダブラフェニブが薬事承認されている。また、それぞれの治療薬の治療効果を投薬前に予測するコンパニオン診断薬としてリアルタイム PCR 法をベースとしたコバス® BRAF V600 変異検出キット、THxID® BRAF キットが体外診断薬として薬事承認されている。非小細胞肺癌では約 3% の患者に BRAF V600E 変異が認められ、本邦でも治療薬としてダブラフェニブと MEK 阻害薬のトラメチニブの併用療法が薬事承認されている。また、コンパニオン診断薬として次世代シーケンサー法を用いたオンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システムが薬事承認されている。

切除不能進行再発大腸がんにおいても、BRAF V600E 変異陽性症例を対象に、BRAF 阻害薬、MEK 阻害薬、抗 EGFR 抗体薬の併用療法の治療開発が行われ、2019 年 7 月に第Ⅲ相試験である BEACON CRC 試験でその有効性が検証された。今後、本邦においても BRAF 変異検査がコンパニオン診断薬として承認される可能性が考えられる。本試験では、各施設で実施された BRAF V600E 変異検査によりエントリー可能となっていることから、様々な検査法により変異陽性と判定された患者が登録されている。本治療薬に特定のコンパニオン診断薬が指定された場合、別の体外診断用医薬品など分析学的妥当性が確認された検査法により判定された BRAF V600E 変異陽性症例における本治療薬の有用性およびコンパニオン診断薬を用いた再検査の必要性については、専門家による適切なガイダンスが必要と考えられる。

【参考文献】

1. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, et al: Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4218-22, 1983
2. Chong H, Vikis HG, Guan KL: Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15:463-9, 2003
3. Schubbert S, Shannon K, Bollag G: Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7:295-308, 2007
4. Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, et al: BRAF mutation status and survival after colorectal cancer diagnosis according to patient and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21:1792-8, 2012
5. Ogura T, Kakuta M, Yatsuoka T, et al: Clinicopathological characteristics and prognostic impact of colorectal cancers with NRAS mutations. *Oncol Rep* 32:50-6, 2014
6. Yokota T, Ura T, Shibata N, et al: BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer* 104:856-62, 2011
7. Nakanishi R, Harada J, Tuul M, et al: Prognostic relevance of KRAS and BRAF mutations in Japanese patients with colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 18:1042-8, 2013
8. Chen D, Huang JF, Liu K, et al: BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9:e90607, 2014
9. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, et al: Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res* 65:6063-9, 2005
10. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al: Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 20:5322-30, 2014
11. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, et al: Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol* 27:1746-53, 2016
12. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, et al: FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol* 16:1306-15, 2015
13. Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, et al: FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 50:57-63, 2014
14. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, et al: Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Ann Oncol* 29:44-70, 2018
15. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, et al: Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*, 2019
16. Pietrantonio F, Petrelli F, Coiu A, et al: Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 51:587-94, 2015
17. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, et al: Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive

biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 112:1888-94, 2015

18. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Colon/Rectal Cancer 2018. Version 3. 2018.
19. Zhu L, Dong C, Cao Y, et al: Prognostic Role of BRAF Mutation in Stage II/III Colorectal Cancer Receiving Curative Resection and Adjuvant Chemotherapy: A Meta-Analysis Based on Randomized Clinical Trials. *PLoS One* 11:e0154795, 2016
20. Margonis GA, Buettner S, Andreatos N, et al: Association of BRAF Mutations With Survival and Recurrence in Surgically Treated Patients With Metastatic Colorectal Liver Cancer. *JAMA Surg* 153:e180996, 2018
21. Tosi F, Magni E, Amatu A, et al: Effect of KRAS and BRAF Mutations on Survival of Metastatic Colorectal Cancer After Liver Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Colorectal Cancer* 16:e153-e163, 2017
22. Yang Y, Wang D, Jin L, et al: Prognostic value of the combination of microsatellite instability and BRAF mutation in colorectal cancer. *Cancer Manag Res* 10:3911-3929, 2018
23. 大腸癌治療ガイドライン 医師用 2019年版 大腸癌研究会 編.
24. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, et al: Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 28:iv22-iv40, 2017
25. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, et al: Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 49:151-7, 2012
26. Rubenstein JH, Enns R, Heidelbaugh J, et al: American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology* 149:777-82; quiz e16-7, 2015
27. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, et al: Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol* 33:209-17, 2015
28. Pyo JS, Sohn JH, Kang G: Diagnostic Accuracy of BRAF Immunohistochemistry in Colorectal Cancer: a Meta-Analysis and Diagnostic Test Accuracy Review. *Pathol Oncol Res* 22:831-7, 2016
29. Kwon JH, Jeong BK, Yoon YS, et al: Utility of BRAF VE1 Immunohistochemistry as a Screening Tool for Colorectal Cancer Harboring BRAF V600E Mutation. *J Pathol Transl Med* 52:157-163, 2018
30. Nakaji Y, Oki E, Nakanishi R, et al: Prognostic value of BRAF V600E mutation and microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 143:151-160, 2017

4 ミスマッチ修復機能欠損を判定するための検査

4.1 背景

ミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 機能欠損の分子機構

DNA は、複製を繰り返すたびに一定の頻度で複製エラー(replication error)を生じる。DNA 複製エラーを修復する主な機構として、直接修復、除去修復、複製後修復、ミスマッチ修復などがあり、特に相補的ではない塩基の組み合わせ(DNA ミスマッチ)を修復する機構の異常は、消化器がん発生に重要な役割を果たす。ミスマッチ修復には、*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*、*MLH3*、*MSH3* の少なくとも 6 つの遺伝子が関与することが知られており、*MSH2*、*MSH6*、*MLH1*、*PMS2* からなる四量体はおもに塩基-塩基ミスマッチおよび 1 塩基ループをもつ挿入・欠失ミスペアを修復し、*MSH2*、*MSH3*、*MLH1*、*PMS2*(あるいは *MLH3*)からなる四量体は主に 2~4 塩基ループをもつ挿入・欠失ミスペアを修復する。DNA 複製エラーは、マイクロサテライトと呼ばれる DNA の 1~数塩基の繰り返し配列の部分で起こりやすく、ミスマッチ修復機能欠損によりマイクロサテライトの反復回数に異常が生じ、マイクロサテライト不安定性(microsatellite instability: MSI)を引き起こす。腫瘍抑制、細胞増殖、DNA 修復やアポトーシスなどに関与する遺伝子が MSI によりフレームシフトを起こすとがん化につながる¹。

MMR 機能欠損大腸がんにおける dMMR と MSI の定義

ミスマッチ修復に関わる *MLH1*、*MSH2*、*PMS2*、*MSH6* のいずれかに病的変異やエピジェネティックな変化が起こると正常な機能を有する蛋白質の合成が行われず、ミスマッチ修復機能が欠損状態になる。この状態を mismatch repair-deficiency (dMMR)と呼ぶ。その結果、DNA 複製エラーをマイクロサテライト領域で惹起する。複数個所のマイクロサテライト領域における反復配列回数の検査が MSI 検査である。以上の背景から、dMMR という用語は、IHC 検査による MMR 蛋白質の発現消失、または MSI 検査による高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-H)のいずれにも使われる。一方、MSI 検査において異常を認めない腫瘍は、マイクロサテライト安定(microsatellite stable: MSS)大腸がんとして表現される。また、IHC 検査による MMR 蛋白質発現が陽性的の場合、mismatch repair-proficient (pMMR)大腸がんとして表現される。このように、MSS や pMMR は、一般にミスマッチ修復機能が維持された腫瘍を指す。

MMR 機能欠損大腸がんにおける腫瘍微小環境の免疫学的機構

dMMR 大腸がんは、DNA 複製エラーに伴い高度変異性(hyper-mutated type)を生じ、免疫原性の高い変異がオネアンチゲンとして細胞表面に表出される確率が高まるとともに、T リンパ球の賦活化を認める。その結果、腫瘍や微小環境に対する浸潤性 CD8+ T 細胞の有意な増加を認め、MSS および pMMR 大腸がんと比較し予後良好な一因と考えられる^{2,3}。一方で dMMR 大腸がんは、腫瘍細胞の PD-L1 発現を上昇させ、腫瘍免疫を回避することが報告されている⁴。このように、dMMR 大腸がんはミスマッチ修復機構の破綻による高免疫原性に加え、免疫寛容機構も獲得しており、免疫チェックポイント阻害薬が有効性を示す理由と考えられる。

4.2

基本的要件

切除不能進行再発大腸がん患者に対し、免疫チェックポイント阻害薬の適応判定を目的として、投与前にミスマッチ修復機能欠損を判定する検査(MMR 機能欠損を判定する検査)を実施する。

免疫チェックポイント阻害薬の適応を判定するための MMR 機能欠損を判定する検査は、コンパニオン診断薬を用いて実施する

推奨度

強く推奨する [SR 10 名]

切除不能進行再発大腸がんにおける MMR 機能欠損を判定する検査の臨床的意義(表 1)

抗 PD-1 抗体薬ペムブロリズマブは、既治療の切除不能進行再発大腸がんを対象とした第 II 相試験 (KEYNOTE-016 試験)において、MSS では奏効例を認めなかったのに対し、MSI-H では 40%の奏効割合を認めた⁵。また、既治療の切除不能進行再発 MSI-H/dMMR 大腸がんを対象としたペムブロリズマブの第 II 相試験 (KEYNOTE-164 試験)のうち、三次治療以降を対象としたコホート A では、登録された 61 例において奏効割合 27.9%(95%CI:17.1-40.8%)、12 カ月無増悪生存率 34.3%、12 カ月全生存率 71.7%を示し、日本人集団におけるサブグループ解析においても 7 例中 2 例の奏効例を認め、2 例ともに 10 カ月以上の長期生存が確認された^{6,7}。これらの結果から、本邦では 2018 年 12 月に MSI 検査キット (FALCO)をコンパニオン診断薬として、大腸がんを含む MSI-H 固形がんに対するペムブロリズマブが薬事承認された。治療ラインについては承認申請がコホート A のデータで行われたため、「フツ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤、オキサリプラチン及びイリノテカン塩酸塩水和物による治療歴のない患者における本剤の有効性及び安全性は確立していない」と添付文書の効能・効果に記載されている。しかし、KEYNOTE-164 試験では、2 次治療以降を対象としたコホート B でも有効性(奏効割合 32%)が示されており、二次治療以降での使用が考慮される。また、抗 PD-1 抗体薬ニボルマブも切除不能進行再発 MSI-H/dMMR 大腸がんを対象とした第 II 相試験 (CheckMate142 試験)において、奏効割合 31.1%(95%CI:20.8-42.9%)、無増悪生存期間中央値 14.3 カ月を示している⁸。

このように、切除不能進行再発 MSI-H 大腸がんに対するペムブロリズマブの有効性は確立されており、適応判定を目的とした MMR 機能欠損を判定する検査は強く推奨される。後述するように、MSI-H 大腸がんは切除不能症例では *BRAF* V600E 変異の有無にかかわらず予後不良と報告されている。有力な治療の機会を逃さないためにも切除不能進行再発大腸がんの治療経過において早い段階での MMR 機能欠損を判定する検査が推奨される。また、MMR 機能欠損は、*RAS/BRAF* 変異と相互排他性ではないため、遺伝子型にかかわらず MMR 機能欠損を判定する検査の実施が推奨される。また、大腸がんでは MMR ステータスの経時的変化は報告されておらず、病理組織材料の有効活用、コストの観点から *RAS/BRAF* 変異検査と同時に MMR 機能欠損を判定する検査を行うことが効率的である。

最近、免疫チェックポイント阻害薬の有効性は、切除不能進行再発大腸がんの一次治療においても報告されつつあり⁹、現在第 III 相試験 (KEYNOTE-177) が進行中である。その結果によっては一次治療への適応拡大の可能性もあり、同時に一次治療開始前から治療選択を目的とした MMR 機能欠損を判定する検査が必要となるかもしれない。

サイドメモ 1 Stage IV大腸がん と MMR ステータス

Stage IV大腸がんにおいて、dMMR は欧米では5–11%^{10,11}、本邦では約2%^{12,13}に認め、予後不良因子である。例えば、切除不能進行再発大腸がんを対象とした第Ⅲ相試験の統合解析において、dMMR はpMMRと比較し予後不良(13.6 カ月 vs 16.8 カ月、HR:1.35、95%CI:1.13–1.61)であった^{10,11}。BRAF V600E 変異の有無とあわせた解析では、MMR ステータスにかかわらず BRAF V600E 変異が強い予後不良因子であったが、BRAF V600E 野生型では、dMMR は pMMR と比較し予後不良であり、無増悪生存期間も短い傾向にあった(表 2)。

一方、切除不能進行再発 dMMR 大腸がんに対する化学療法の効果は、pMMR と比較して奏効割合が良好な傾向(オッズ比(Odds ratio; OR):0.81、95%CI:0.65–1.03)とする報告や¹⁴、5-FU に抵抗性となった後の二次治療としてのイリノテカンの奏効割合が良好とする報告もあるが、統一した見解は得られていない¹⁵。したがって、MMR ステータスにかかわらず切除不能進行再発大腸がんに対して一般的に選択される化学療法すべてが適応となり得るものの、予後予測を目的として BRAF V600E 変異検査とあわせて MMR 機能欠損を判定する検査を実施することが考慮される。

表 1 切除不能進行再発 dMMR 大腸がんに対する免疫チェックポイント阻害薬の効果

著者	試験名	Phase	免疫チェック ポイント阻害薬	対象	N	RR (%)	PFS (M)	OS (M)
Le DT, et al ⁵	KEYNOTE -016	II	Pembrolizumab	MSI-H	11	40	未達	未達
				MSS	21	0	2.2	5
Le DT, et al ¹⁶	KEYNOTE -016	II	Pembrolizumab	MSI-H	40	52	未達	未達
Dung L, et al ⁶	KEYNOTE -164 (コホートA)	II	Pembrolizumab	MSI-H/ dMMR	61	27.9	未達	未達
Overman MJ, et al ⁸	Checkmate -142	II	Nivolumab	MSI-H/ dMMR	74	31.1	14.3	未達

RR; 奏効割合、PFS; 無増悪生存期間、OS; 全生存期間、M; month、

表 2 切除不能進行再発大腸がんにおける MSI/MMR、*BRAF* V600E 変異ステータス別の全生存期間、無増悪生存期間

		<i>BRAF</i> MT		<i>BRAF</i> WT		MSI-H/dMMR		MSS/pMMR	
		MSI-H	MSS	MSI-H	MSS	<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i>
		/dMMR	/pMMR	/dMMR	/pMMR	MT	WT	MT	WT
Tran B ¹⁰	OS	8.0	8.2	17.2	26.6	8.0	17.2	8.2	25.5
	HR	-		-		-		-	
	<i>p</i>	0.363		0.021		0.011		<0.001	
Venderbosch S ¹¹	OS	11.7	11.3	15.0	17.3	11.7	15.0	11.3	17.3
	HR	1.05(0.68–1.63)		1.22(0.91–1.65)		1.51(0.93–2.46)		1.94(1.57–2.40)	
	<i>p</i>	-		-		-		-	
	PFS	6.1	6.2	6.3	7.8	6.1	6.3	6.2	7.8
	HR	0.95(0.62–1.46)		1.32(1.00–1.75)		1.07(0.67–1.70)		1.34(1.10–1.64)	
	<i>p</i>	-		-		-		-	

WT;野生型、MT;変異陽性、OS;全生存期間、HR;ハザード比、PFS;無増悪生存期間

4.3

基本的要件

切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に MMR 機能欠損を判定する検査を実施する。

再発リスクに応じた治療選択目的の MMR 機能欠損を判定する検査は、分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。

推奨度

推奨する [SR 2 名、R 8 名]

切除可能大腸がんにおける MMR 機能欠損を判定する検査の臨床的意義

Stage II/III 結腸がんにおける dMMR の頻度はそれぞれ 15–22%、12–14%¹⁷⁻¹⁹、本邦では 6–10%、5%^{13,20} と報告されている。細胞株の検討から dMMR と 5-FU 抵抗性の関係が報告されて以降²¹、dMMR 症例に対する 5-FU の有効性について多くの検討が行われてきた。

Stage II/III 大腸がんにおいて、dMMR を示す症例は pMMR と比較し有意に再発リスクが低く (11% vs 26%; HR:0.53、95%CI:0.40–0.70)、Stage II 結腸がんではその傾向が強かった (8% vs 21%、HR:0.44、95%CI:0.29–0.67)¹⁷。また Stage II/III 結腸がんを対象に術後 5-FU 併用療法と手術単独を比較したところ、MSI-H 症例は手術単独群では低頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-L)/MSS 症例と比較して全生存期間が有意に良好であったが、補助化学療法群では全生存期間に有意差を認めなかった。このように、5-FU を含む補助化学療法は、MSI-L/MSS 結腸がんでは有効性を示すが、MSI-H 結腸がんではむしろ悪影響を与える可能性がある (表 3)²。

Stage II/III 結腸がんにおいて、*BRAF* V600E 変異は pMMR (11.5%) より dMMR (35.3%) において高頻度に認められる²²。Stage III 結腸がんを対象にした N0147 試験、PETACC8 試験の統合解析では、dMMR は予後良好因子である一方、pMMR に *BRAF* V600E 変異や *KRAS* エクソン 2 変異が認められると、有意に再発リスクが高く予後不良であることが示された^{23,24}。これらから、Stage III 結腸がんの無再発生存期間を、*BRAF* V600E 変異と dMMR を同時に評価することでリスクごとに層別化できることが報告されている^{23,25}。

一方、直腸がんにおける dMMR の頻度は低く、本邦における Stage I-IV 大腸がんの後方視的検討においても、MSI-H の頻度は右側結腸 13% (36/275) に対し左側結腸 4% (12/271)、直腸 2% (7/394) である¹³。最近の観察研究では、dMMR 直腸がんの 5 年生存率は全病期で良好なほか、術前化学放射線療法を施行した Stage II/III 群の pathological complete response (pCR) 割合は 27.6% と、MSS /pMMR を含めた直腸がん全体の報告 (pCR 率 18.1%)²⁶ と比べ良好な効果を示し、治療効果予測因子となる可能性が示された²⁷。また米国 National Cancer Database による局所進行直腸がん 5086 例を対象とした解析でも、同様に MSI ステータスは pCR の独立した治療効果予測因子であることが報告されている²⁸。

このように、dMMR は Stage II/III 大腸がんの再発および予後予測因子として認識され、特に Stage II 結腸がんに対するフルオロピリミジン単独療法の実施は、再発率を高める可能性がある。Stage III 結腸がんでは *BRAF* 変異の有無と合わせて再発リスクの層別化が可能であり、大腸癌治療ガイドライン 2019 年版では、Stage III 結腸がんの術後補助療法として再発リスクに応じた治療レジメン、治療期間の選択が推奨されてい

ることから、補助化学療法開始前に MMR 機能欠損を判定することは、治療選択のために有用である。以上より、切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に MMR 機能欠損を判定する検査を実施することが推奨される。

表 3 Stage II/III 結腸がんを対象に術後 5-FU 療法と手術単独を比較した第Ⅲ相試験のメタアナリシス(文献 2)

全生存期間				
	手術単独	術後 5-FU 療法	MSI-H	MSI-L/MSS
	MSI-H vs MSI-L/MSS	MSI-H vs MSI-L/MSS	術後 5-FU 療法 vs 手術単独	術後 5-FU 療法 vs 手術単独
HR	0.31	1.07	2.17	0.69
95%CI	0.14-0.72	0.62-1.86	0.84-5.55	0.50-0.94
p	0.004	0.80	0.10	0.02

HR; ハザード比、CI; 信頼区間、MSI-L/MSS; 低頻度マイクロサテライト不安定性またはマイクロサテライト安定

表 4 Stage II/III 結腸がんを対象に術後 5-FU 療法と手術単独を比較した第Ⅲ相試験のメタアナリシス(文献 29)

無病生存期間						
	手術単独	術後 5-FU 療法	dMMR Stage II	dMMR Stage III	pMMR Stage II	pMMR Stage III
	dMMR vs pMMR	dMMR vs pMMR	術後 5-FU 療法 vs 手術単独			
HR	0.51	0.79	2.30	1.01	0.84	0.64
95%CI	0.29-0.89	0.49-1.25	0.084-6.24	0.41-2.51	0.57-1.24	0.48-0.84
p	0.009	0.30	0.09	0.98	0.38	0.001

HR; ハザード比、CI; 信頼区間

サイドメモ 1 切除可能大腸がんにおける MSI-L の臨床的意義

米国 National Cancer Institute は 1997 年に国際基準を作成し、Mononucleotide marker 2 つ(BAT25、BAT26)と Dinucleotide marker 3 つ(D2S123、D5S346、D17S250) の計 5 つのマーカー(ベセスダパネル)を用いて^{29,30}、波形のずれが 2 つ以上のマーカーで認められる場合を MSI-H、1 つのマーカーでのみ認められる場合を MSI-L、いずれのマーカーにおいても認められない場合を MSS と定義した³¹。しかし、MSI-L と MSS の診断は測定マーカーの数や種類に依存するため、両者については一定した見解がなく、臨床的意義はほとんど認めないとする意見も多い^{31,32}。最近の報告では、MSI-L が MSS と比較して再発・予後不良因子となる可能性も報告されているが³³⁻³⁶、MSI-L を診断するマイクロサテライトマーカーの種類や数、定義は報告により異なり、377 か所のマーカーを用いて測定すると MSI-H とされなかった大腸がん症例の約 80%に一か所以上の MSI を認めたとする報告もあり^{32,37}、その同定方法の確立が必要である。

基本的要件

大腸がん患者に対し、リンチ症候群のスクリーニングを目的として、MMR 機能欠損を判定する検査を実施する。

リンチ症候群のスクリーニングのための MMR 機能欠損を判定する検査は、分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する

推奨度

強く推奨する [SR 10 名]

リンチ症候群のスクリーニング

リンチ症候群(Lynch syndrome)は、MMR 遺伝子である *MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2* の生殖細胞系列変異を主な原因とする常染色体優性遺伝性疾患である。欧米の報告では全大腸がんの 2-4%と稀な疾患ではあるが^{38,39}、患者および家系内に大腸がん、子宮内膜がんをはじめ、様々な悪性腫瘍が発生することから、その診断は臨床的に重要である。リンチ症候群では、MMR 遺伝子の片方のアレルに生殖細胞系列の病的変異を有しており、後天的にもう片方の野生型アレルに変異(あるいはプロモーター領域のメチル化)が加わると MMR 機能が損なわれがん化に結びつくと考えられている。

大腸がん全体における MSI-H の頻度は、欧米の報告では 12-16%⁴⁰⁻⁴²、本邦報告では 6-7%^{13,43} である。大部分は *MLH1* のプロモーター領域のメチル化により後天的に獲得した MMR 遺伝子機能の欠損であるが、MSI-H 大腸がんのうち 10-20%程度にリンチ症候群の症例があると考えられる。したがって、MSI-H 大腸がんに一律に遺伝学的検査を実施することは適切ではないが、潜在的なリンチ症候群を拾い上げる可能性が高くなるため、リンチ症候群のスクリーニング過程を把握することが必須である。

海外では、全大腸がんを対象に MSI 検査や免疫組織学的検査によるリンチ症候群のユニバーサル・スクリーニングが提唱されている【サイドメモ 1】が、本邦では現段階では『遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版』に記載されているように、臨床情報にてアムステルダム基準Ⅱ(表 5)または改訂ベセスダガイドライン(表 6)を満たした場合の第 2 次スクリーニングとしてこれらの検査が推奨されている(図 1)。リンチ症候群の診断手順、およびサーベイランス、治療方針についての詳細は『遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版』を参照されたい。

表 5 アムステルダム基準Ⅱ(1999)

少なくとも 3 人の血縁者が HNPCC(リンチ症候群)関連がん(大腸がん、子宮内膜がん、腎盂・尿管がん、小腸がん)に罹患しており、以下の全てを満たしている。

1. 1 人の罹患者はその他の 2 人に対して第 1 度近親者である。
2. 少なくとも連続する 2 世代で罹患している。
3. 少なくとも 1 人のがんは 50 歳未満で診断されている。
4. 腫瘍は病理学的にがんであることが確認されている。

5. FAP が除外されている。

HNPCC: 家族性非ポリポーシス大腸がん(リンチ症候群)、FAP: familial adenomatous polyposis (家族性大腸腺腫症)

表 6 改訂ベセスダガイドライン(2004)

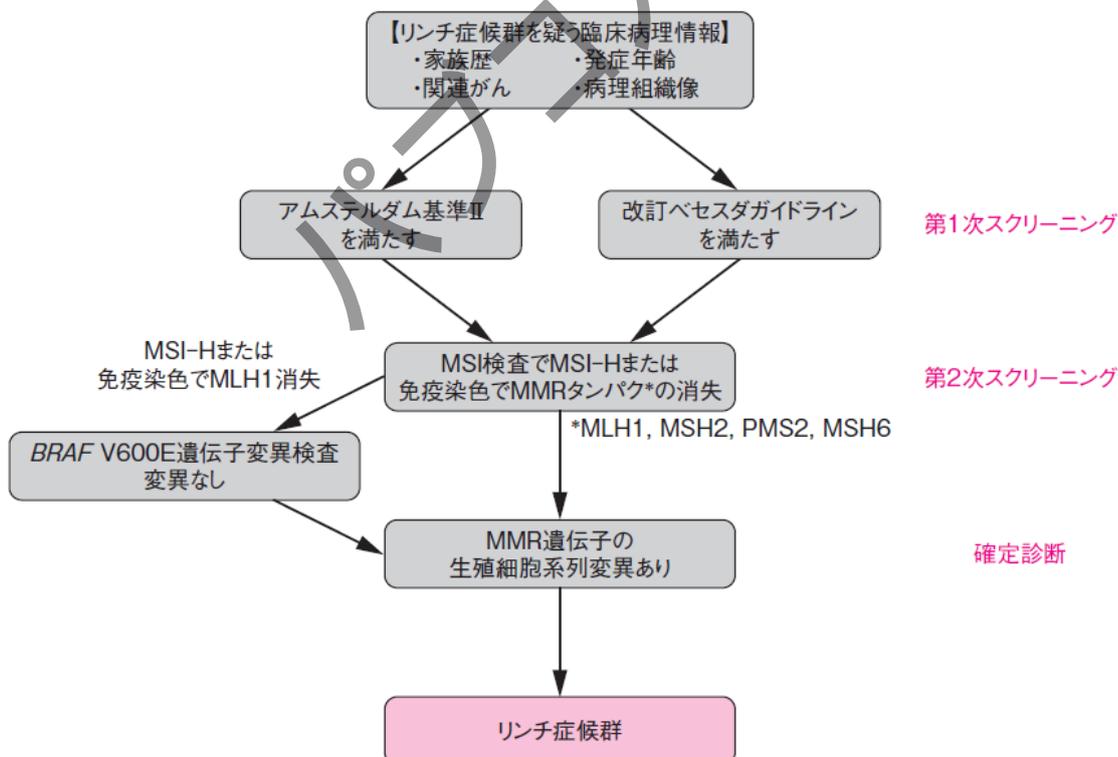
以下の項目のいずれかを満たす大腸がん患者には、腫瘍の MSI 検査が推奨される。

1. 50 歳未満で診断された大腸がん。
2. 年齢に関わりなく、同時性あるいは異時性大腸がんあるいはその他のリンチ症候群関連腫瘍*がある。
3. 60 歳未満で診断された MSI-H の組織学的所見**を有する大腸がん。
4. 第 1 度近親者が 1 人以上リンチ症候群関連腫瘍に罹患しており、そのうち一つは 50 歳未満で診断された大腸がん。
5. 年齢に関わりなく、第 1 度あるいは第 2 度近親者の 2 人以上がリンチ症候群関連腫瘍と診断されている患者の大腸がん。

*大腸がん、子宮内膜がん、胃がん、卵巣がん、膵がん、胆道がん、小腸がん、腎盂・尿管がん、脳腫瘍(通常はターコット症候群にみられる glioblastoma)、ムア・トレ症候群の皮脂腺腫や角化棘細胞腫

**腫瘍内リンパ球浸潤、クローン様リンパ球反応、粘液がん・印環細胞がん様分化、髄様増殖

図 1 リンチ症候群の診断手順(遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版一部改変)



サイドメモ 1 リンチ症候群に対するユニバーサル・スクリーニング

欧米では Stage に関わらず、全て(あるいは 70 歳以下)の大腸がんや子宮内膜がんに対して、MSI 検査や MMR 蛋白質の IHC 検査を行うユニバーサル・スクリーニングが、リンチ症候群診断に費用対効果の高い方法として推奨されており、ユニバーサル・スクリーニングから得られたリンチ症候群の頻度は 2.4–3.7%と報告されている^{44,45}。50 種類以上の全がん腫 15045 人を対象に、MSI 検査と *MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*、*EPCAM* の生殖細胞変異を解析した結果、MSI-H 症例の 16.3%、MSI-Intermediate(I)の 1.9%、MSS の 0.3%がリンチ症候群であったほか、MSI-H/I を認めるリンチ症候群の 50%で大腸がん・卵巣がん以外の悪性腫瘍を発症していた。これらのうち 45%の症例は改訂ベセスダ基準を満たしておらず、全がん腫に対し MMR 機能欠損を判定する検査によるユニバーサル・スクリーニングを行う必要性が示唆される⁴⁶。MSI-H/dMMR は、大腸がん以外の固形がんにおいても免疫チェックポイント阻害薬の効果予測因子であることから、全がん腫における MMR 機能欠損を判定する検査の重要性はさらに高まると考えられる。しかしながら本邦におけるユニバーサル・スクリーニングの有用性は検証されておらず、遺伝性腫瘍への対応も必要となるため、実施の際には遺伝性疾患特有の配慮すべき点に留意する必要がある。

サイドメモ 2 リンチ症候群と遺伝性非ポリポシス大腸がん

リンチ症候群は、近代においては Henry T Lynch らが 1971 年に、650 人の家系構成員中 95 名のがん患者発生を認め、その家系図から常染色体優性遺伝形式の“Cancer Family G”を明らかにしたのがその名称の契機とされており、その後、Lynch 自身が 1985 年に家族性大腸腺腫症と鑑別する目的で、遺伝性非ポリポシス大腸がん(Hereditary Non-polyposis colorectal cancer: HNPCC)を提唱した。ただし、リンチ症候群の病因やその臨床像が解明され、大腸がん以外のがん発症リスクが高いことを考慮すると、疾患名は「遺伝性非ポリポシス大腸がん」よりも「リンチ症候群」の方が適切であると考えられる。現在、MSI 検査の保険適用は「家族性非ポリポシス大腸癌又は・・・」と記載されているが、現在では「リンチ症候群」の呼称が適切であると考えられる。

4.5 ミスマッチ修復機能欠損を判定する検査の種類

MMR 機能欠損を判定する代表的な方法として、マイクロサテライトマーカを対象とした PCR 産物を用いてフラグメント解析を行い、そのマーカ波形のずれ(マイクロサテライト不安定性)を評価する MSI 検査、MMR 蛋白質(MLH1、MSH2、MSH6、PMS2)の腫瘍組織における発現を調べる IHC 検査、そしてミスマッチ修復機能を次世代シーケンス(NGS)により評価する方法があげられる。

基本的要件

MMR 機能欠損を判定する検査として、

- MSI 検査を実施する。 (強く推奨する [SR 10 名])
- IHC 検査を実施する。 (強く推奨する [SR 7 名、R 3 名])
- NGS を用いた検査を実施する。 (推奨する [R 9 名、ECO 1 名])

MMR 機能欠損を判定する検査としての MSI 検査

リンチ症候群のスクリーニングに用いられてきたベセスダパネル(表 7)は mono-nucleotide marker 2 つ (BAT25、BAT26)と di-nucleotide marker 3 つ(D2S123、D5S346、D17S250) の計 5 つから構成されている²⁹⁻³¹。Di-nucleotide marker は一般的に MSI-L を診断するのにより有効だが、MSH6、PMS2 に生殖細胞系列変異があるリンチ症候群では、MSI-H を示さないことがある^{47,48}。一方、mono-nucleotide marker は MSI-H を高い感度・特異度で診断し、遺伝子多型の影響を受けにくいことから、腫瘍組織のみで評価することが可能である。また従来 MSI-H を示しにくい MSH6 欠失症例も、mono-marker panel は比較的高率(62.5%)に同定可能である⁴⁹。

以上の背景から、1 塩基の繰り返しマーカのみで構成されるパネルが開発された。ペムブロリズマブの適応判定に用いられる MSI 検査キット(FALCO)もまた、1 塩基の繰り返しマーカ5 つを用いた診断薬である(表 7)⁵⁰。本検査では、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、腫瘍組織から DNA を抽出し、5 か所のマイクロサテライト領域を増幅して評価する。増幅された塩基配列を反復塩基配列の長さで分離したときに、通常の波形が認められる範囲から外れて異常な波形が認められる場合を MSI 陽性と判定し、MSI 陽性が 2 つ以上のマーカで認められる場合を MSI-H と判定する(図 2)。なお、腫瘍部位のみで判定ができない場合は、正常組織(血液検体で代用可)との比較が必要になる。MSI 検査では、一部のマーカが検査不能であった場合、他の 2 つ以上のマーカで MSI 陽性が確認されていれば MSI-H と判定される(表 8)。

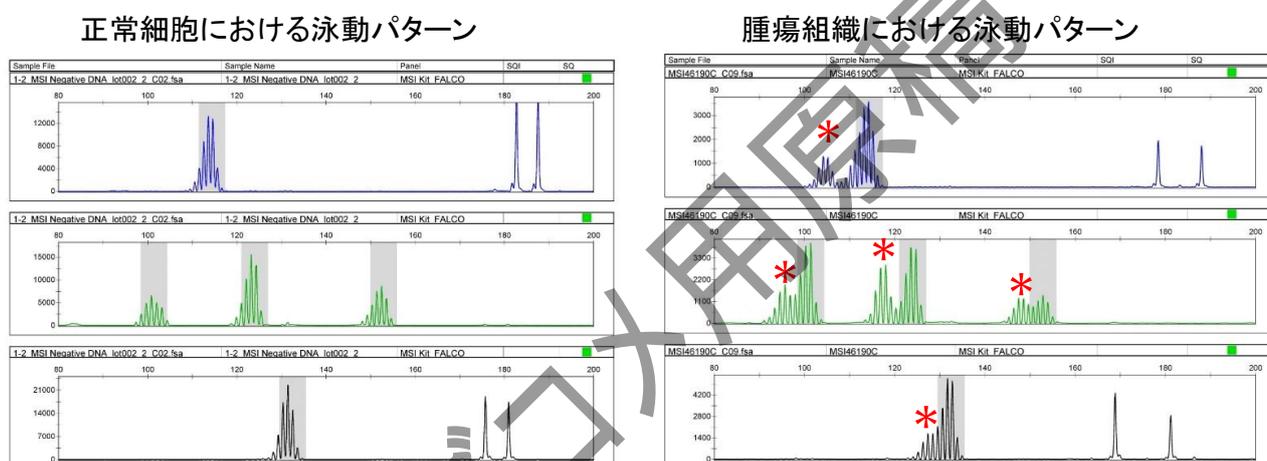
MSI 検査の対象

MSI 検査(FALCO)が、2018 年 12 月に本邦における MSI-H 固形がんに対するペムブロリズマブ適用判定のためのコンパニオン診断薬として保険適用となった。MSI 検査はリンチ症候群診断を目的とする場合、又は局所進行若しくは転移が認められた標準的な治療が困難な固形癌の薬剤治療方針の選択を目的とする場合に 1 回限り、保険適用されるが、もう一方の目的で再度本検査を実施した場合にあっても、別に 1 回に限り算定することが可能である。

表 7 各種パネルの概要

ベセスダパネル		MSI 検査キット (FALCO)	
マーカー名	配列構造	マーカー名	配列構造
BAT25	1 塩基繰り返し	BAT25	1 塩基繰り返し
BAT26	1 塩基繰り返し	BAT26	1 塩基繰り返し
D2S123	2 塩基繰り返し	NR21	1 塩基繰り返し
D5S346	2 塩基繰り返し	NR24	1 塩基繰り返し
D17S250	2 塩基繰り返し	MONO27	1 塩基繰り返し

図 2 MSI 検査キット (FALCO) で測定を行った MSI-H 患者 (5 つ全てのマーカーで MSI 陽性)
(MSI 検査キット (FALCO) 添付文書を改変)



マイクロサテライトマーカー領域を PCR 増幅した後、キャピラリー電気泳動にてフラグメント解析を行う。正常細胞に対し、腫瘍細胞由来の DNA では反復回数の減少 (*) が認められる。正常細胞由来の波形は一定の範囲内に認められることが知られており、MSI 検査キット (FALCO) はその範囲から外れた波形を MSI 陽性と判定することで、腫瘍組織のみで MSI ステータスの判定を行っている。

表 8 検査不能なマーカーがあった場合の判定例

症例	マーカー-A	マーカー-B	マーカー-C	マーカー-D	マーカー-E	判定
A	(-)	(-)	(-)	(-)	検査不能	MSI-L または MSS
B	(+)	(-)	(-)	(-)	検査不能	判定不能
C	(+)	(+)	(-)	(-)	検査不能	MSI-H
D	(+)	(+)	(-)	検査不能	検査不能	MSI-H
E	(+)	(+)	検査不能	検査不能	検査不能	MSI-H

(+): MSI 陽性あり、(-): MSI 陽性なし

MMR 機能欠損を判定する検査としての IHC 検査

腫瘍における MMR 蛋白質 (MLH1、MSH2、MSH6、PMS2) の発現を IHC により評価する方法も MMR 機能欠損を判定する一般的な検査手法である。染色評価の際には内部陽性コントロール (非腫瘍組織における大腸粘膜の腺底部やリンパ濾胞の胚中心) を用いて染色の適切性を確認する。MMR 機能欠損のない腫瘍では 4 種類の蛋白質全てが発現しているが、MMR 機能異常を呈するリンチ症候群関連腫瘍では不活化された MMR 遺伝子に対応した蛋白質の発現が消失する。

個々の MMR 遺伝子異常と蛋白質の発現消失は 1 対 1 対応とはならず、*MLH1* 変異は *MLH1* に加えて *PMS2*、*MSH2* 変異は *MSH2* に加えて *MSH6* の発現消失をとめない、多くは表 9 のような染色パターンを示す。また表 9 に当てはまらない染色結果が得られた場合は、例外的な患者である可能性を考慮する前に染色の妥当性を確認し、要すれば MSI 検査を実施する。詳細は『遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版』を参照されたい。

表 9 IHC 法による MMR 蛋白質の染色性と各遺伝子変異の関係

		IHC 染色での発現			
		MLH1	MSH2	PMS2	MSH6
変異遺伝子	<i>MLH1</i>	—	+	—	+
	<i>MSH2</i>	+	—	+	—
	<i>PMS2</i>	+	+	—	+
	<i>MSH6</i>	+	+	+	—

IHC 検査は、大腸がんにおいて MSI 検査結果と高い一致率を示すことが報告されており、リンチ症候群のスクリーニング検査として使用されるほか、今後は免疫チェックポイント阻害薬のコンパニオン診断薬として体外診断用医薬品化が期待されている。実際、5 つの KEYNOTE 統合解析 (KEYNOTE-012、-016、-028、-158、-164 (コホート A)) および Checkmate 142 試験では、IHC 検査で dMMR と判定された症例において抗 PD-1 抗体薬の有効性が示され、中央判定で MSI-H 陰性とされ IHC 検査で dMMR を指摘された症例についても奏効を認めている⁵¹。今後実地臨床において、MSI 検査で MSS と判定された場合でも、後述するような理由により検査の偽陰性が想定される際には、免疫組織化学検査による再判定が有用である場合も想定される。

IHC 検査による MMR 機能欠損を判定する検査において、手術検体と生検組織では、同等もしくは生検組織の優越性が報告されており、その理由としてホルマリン固定の均一性が指摘されている⁵²⁻⁵⁴。生検組織を用いた MSI 検査では、腫瘍細胞含有率や DNA 収量に注意が必要であるが、IHC 検査では H&E 標本による腫瘍細胞含有率の確認が行える利点がある。一方、IHC 検査では、抗体がクローンごとに抗原分子の異なるエピトープを認識するとともに、各クローンに最適化された検出法が必要である。したがって、IHC 検査では、特異性・反応性の良い抗体を用い、標準化された検出法で評価する必要がある。MMR 蛋白質に対する IHC 検査において、海外の外部精度評価機関において高評価が得られた、もしくは海外ですでに体外診断用医薬品化され今後国内での開発が期待される代表的な抗体クローンを示す (表 10)。

ただし、MSI 検査と IHC 検査にはごく一部ではあるが不一致症例が存在する。dMMR である腫瘍でも、機能喪失型ミスセンス変異により IHC 検査では染色陽性 (pMMR) となる症例や、低い腫瘍細胞比率や *MSH6* 変異により MSI 検査では MSS となる症例が想定され、両検査の特性を十分に理解する必要がある。なお、術

前化学放射線療法やシスプラチン含有レジメン後の検体では、MSH6 や MLH1 蛋白の発現消失が報告されており^{48,55-57}、とくに化学放射線療法が標準治療の一つである下部直腸がんにおいては留意が必要となる。

表 10 MMR 蛋白質の IHC 検査に使用される代表的な抗体クローン

MMR 蛋白質	Agilent/Dako 社	Roche/Ventana 社
MLH1	ES05	M1
MSH2	FE11	G219-1129
PMS2	EP51	A16-4
MSH6	EP49	SP93

※参考: <http://www.nordiqc.org/about.php>

MMR 機能欠損を判定する検査としての次世代シーケンス(NGS)

NGS を用いた MMR 機能欠損を判定する検査も臨床的に有用である。FoundationOne[®] CDx (第 5 章参照)は、95 のイントロン領域のマイクロサテライトマーカを評価し MSI の判定を行うことが可能である。MSI 検査や IHC 検査との一致率は 97%と高く⁵⁸、MSI 検査で MSS ながら IHC 検査で dMMR であった症例も NGS 法で診断できる可能性が示されている⁵⁹。そのほか、MSK-IMPACT を用いた MSIsensor アルゴリズム⁶⁰ や全エクソーム塩基配列解析を用いた MOSAIC アルゴリズム・MANTIS アルゴリズム等^{61,62} が報告されているが、含まれるマイクロサテライトマーカやアルゴリズムにより MSI 判定方法が異なる点に注意が必要である。また NGS 検査は他の検査より提出検体の量や質などの影響により測定不能となる可能性が高いこと、サンプル提出から結果到着までに要する時間(turnaround time: TAT)も数週間を要すること、これまでの免疫チェックポイント阻害薬を用いた臨床試験では NGS に基づく MSI の判定は適格基準に含まれていないことなどより、その実臨床での利用は慎重に判断する必要がある。

コメント 1 MMR 機能欠損を判定する検査の説明同意について

MMR 機能欠損を判定する検査は、遺伝性大腸がんであるリンチ症候群が疑われる大腸がん患者を対象に補助的診断・第 2 次スクリーニングとして実施されてきた。MSI 検査(FALCO)がペムブロリズマブの適応判定のコンパニオン診断薬として承認されたことから、検査対象が固形がん全体に広がり、MSI 検査の需要は急増している。リンチ症候群のスクリーニングを目的としない場合は、①検査の目的が免疫チェックポイント阻害薬や術後補助化学療法を選択のためであること、②検査がリンチ症候群診断のスクリーニングにもなり得ることについて説明し、患者の同意を得た上で検査を実施する。また、これらの内容を説明し同意を得たことを診療録に明記する。なお、検査結果によりリンチ症候群が強く疑われる場合、患者が確定診断を希望する場合においては遺伝カウンセリングについて説明するとともに遺伝学的検査(自費診療)が必要となることを説明する。また確定診断を目的に遺伝学的検査を実施する場合には、遺伝医療にかかわる経験を有した医療従事者(臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラー、家族性腫瘍専門医、家族性腫瘍カウンセラー、家族性腫瘍コーディネーターなど)と連携をとることが推奨されるため、自施設で遺伝カウンセリングができない場合は、あらかじめ遺伝医療に関わる医療従事者と連携をとり、患者に検査の目的や結果の解釈などの遺伝カウンセリングを実施できる体制を整備しておく必要がある。詳しくは『遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版』を参照されたい。

【参考文献】

1. Boland CR, Goel A: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138:2073-2087.e3, 2010
2. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349:247-57, 2003
3. Chen DS, Mellman I: Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541:321-330, 2017
4. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al: The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 5:43-51, 2015
5. Le DT, Uram JN, Wang H, et al: PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372:2509-20, 2015
6. Dung L, Thierry A, Won KT, et al: P-274 Pembrolizumab for patients with previously treated, mismatch repair-deficient microsatellite instability-high advanced colorectal carcinoma: phase 2 KEYNOTE-164 study. *Annals of Oncology* 27:ii79-ii79, 2016
7. Diaz L, Marabelle A, Kim TW, et al: 386P Efficacy of pembrolizumab in phase 2 KEYNOTE-164 and KEYNOTE-158 studies of microsatellite instability high cancers. *Annals of Oncology* 28:mdx367.020-mdx367.020, 2017
8. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al: Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 18:1182-1191, 2017
9. Lenz HJJ, Van Cutsem E, Limon ML, et al: LBA18_PR Durable clinical benefit with nivolumab (NIVO) plus low-dose ipilimumab (IPI) as first-line therapy in microsatellite instability-high/mismatch repair deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC). *Annals of Oncology* 29:mdy424.019-mdy424.019, 2018
10. Tran B, Kopetz S, Tie J, et al: Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 117:4623-32, 2011
11. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al: Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 20:5322-30, 2014
12. Kajiwara T SK, Denda T, et al.: The Nationwide Cancer Genome Screening Project for Gastrointestinal Cancer in Japan (GI-SCREEN) : MSI-status and cancer-related genome alterations in advanced colorectal cancer (CRC) —GI-SCREEN 2013—01—CRC sub—study. . *J Clin Oncol.* 34:suppl : abstr 3573, 2016
13. Asaka S, Arai Y, Nishimura Y, et al: Microsatellite instability-low colorectal cancer acquires a KRAS mutation during the progression from Dukes' A to Dukes' B. *Carcinogenesis* 30:494-9, 2009
14. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, et al: Microsatellite instability does not predict the efficacy of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res* 29:1615-20, 2009

15. Fallik D, Borrini F, Boige V, et al: Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 63:5738-44, 2003
16. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al: Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357:409-413, 2017
17. Hutchins G, Southward K, Handley K, et al: Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 29:1261-70, 2011
18. Bertagnolli MM, Redston M, Compton CC, et al: Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: prospective evaluation of biomarkers for stages II and III colon cancer--a study of CALGB 9581 and 89803. *J Clin Oncol* 29:3153-62, 2011
19. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al: Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 28:466-74, 2010
20. Yamanaka T, Oki E, Yamazaki K, et al: 12-Gene Recurrence Score Assay Stratifies the Recurrence Risk in Stage II/III Colon Cancer With Surgery Alone: The SUNRISE Study. *J Clin Oncol* 34:2906-13, 2016
21. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, et al: Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 117:123-31, 1999
22. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, et al: Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res* 18:6531-41, 2012
23. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, et al: Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst* 109, 2017
24. Zaanan A, Shi Q, Taieb J, et al: Role of Deficient DNA Mismatch Repair Status in Patients With Stage III Colon Cancer Treated With FOLFOX Adjuvant Chemotherapy: A Pooled Analysis From 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol* 4:379-383, 2018
25. Sinicrope FA, Shi Q, Allegra CJ, et al: Association of DNA Mismatch Repair and Mutations in BRAF and KRAS With Survival After Recurrence in Stage III Colon Cancers : A Secondary Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol* 3:472-480, 2017
26. Park IJ, You YN, Agarwal A, et al: Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 30:1770-6, 2012
27. de Rosa N, Rodriguez-Bigas MA, Chang GJ, et al: DNA Mismatch Repair Deficiency in Rectal Cancer: Benchmarking Its Impact on Prognosis, Neoadjuvant Response Prediction, and Clinical Cancer Genetics. *J Clin Oncol* 34:3039-46, 2016
28. Hasan S, Renz P, Wegner RE, et al: Microsatellite Instability (MSI) as an Independent Predictor of Pathologic Complete Response (PCR) in Locally Advanced Rectal Cancer: A National Cancer Database (NCDB) Analysis. *Ann Surg*, 2018
29. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, et al: Diagnostic microsatellite instability: definition and

correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57:4749-56, 1997

30. Bocker T, Diermann J, Friedl W, et al: Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res* 57:4739-43, 1997

31. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58:5248-57, 1998

32. Laiho P, Launonen V, Lahermo P, et al: Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res* 62:1166-70, 2002

33. Lee SY, Kim DW, Lee HS, et al: Low-Level Microsatellite Instability as a Potential Prognostic Factor in Sporadic Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore)* 94:e2260, 2015

34. Nazemalhosseini Mojarad E, Kashfi SM, Mirtalebi H, et al: Low Level of Microsatellite Instability Correlates with Poor Clinical Prognosis in Stage II Colorectal Cancer Patients. *J Oncol* 2016:2196703, 2016

35. Garcia M, Choi C, Kim HR, et al: Association between recurrent metastasis from stage II and III primary colorectal tumors and moderate microsatellite instability. *Gastroenterology* 143:48-50.e1, 2012

36. Torshizi Esfahani A, Seyedna SY, Nazemalhosseini Mojarad E, et al: MSI-L/EMAST is a predictive biomarker for metastasis in colorectal cancer patients. *J Cell Physiol*, 2018

37. Halford S, Sasieni P, Rowan A, et al: Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 62:53-7, 2002

38. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al: Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 352:1851-60, 2005

39. Barrow E, Hill J, Evans DG: Cancer risk in Lynch Syndrome. *Fam Cancer* 12:229-40, 2013

40. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, et al: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 54:1645-8, 1994

41. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al: Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338:1481-7, 1998

42. Peltomaki P: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21:1174-9, 2003

43. Ishikubo T, Nishimura Y, Yamaguchi K, et al: The clinical features of rectal cancers with high-frequency microsatellite instability (MSI-H) in Japanese males. *Cancer Lett* 216:55-62, 2004

44. van Lier MG, Leenen CH, Wagner A, et al: Yield of routine molecular analyses in colorectal cancer patients ≤ 70 years to detect underlying Lynch syndrome. *J Pathol* 226:764-74, 2012

45. Julie C, Tresallet C, Brouquet A, et al: Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol* 103:2825-35; quiz 2836, 2008

46. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, et al: Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *J Clin Oncol*:Jco1800283, 2018

47. Clendenning M, Senter L, Hampel H, et al: A frame-shift mutation of PMS2 is a widespread

cause of Lynch syndrome. *J Med Genet* 45:340-5, 2008

48. Shia J, Zhang L, Shike M, et al: Secondary mutation in a coding mononucleotide tract in MSH6 causes loss of immunoeexpression of MSH6 in colorectal carcinomas with MLH1/PMS2 deficiency. *Mod Pathol* 26:131-8, 2013
49. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, et al: An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One* 5:e9393, 2010
50. Bando H, Okamoto W, Fukui T, et al: Utility of the quasi-monomorphic variation range in unresectable metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Sci* 109:3411-3415, 2018
51. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, et al: Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 36:773-779, 2018
52. Shia J, Stadler Z, Weiser MR, et al: Immunohistochemical staining for DNA mismatch repair proteins in intestinal tract carcinoma: how reliable are biopsy samples? *Am J Surg Pathol* 35:447-54, 2011
53. Kumarasinghe AP, de Boer B, Bateman AC, et al: DNA mismatch repair enzyme immunohistochemistry in colorectal cancer: a comparison of biopsy and resection material. *Pathology* 42:414-20, 2010
54. O'Brien O, Ryan E, Creavin B, et al: Correlation of immunohistochemical mismatch repair protein status between colorectal carcinoma endoscopic biopsy and resection specimens. *J Clin Pathol* 71:631-636, 2018
55. Bao F, Panarelli NC, Rennert H, et al: Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 34:1798-804, 2010
56. Watanabe Y, Koi M, Hemmi H, et al: A change in microsatellite instability caused by cisplatin-based chemotherapy of ovarian cancer. *Br J Cancer* 85:1064-9, 2001
57. Vilkin A, Halpern M, Morgenstern S, et al: How reliable is immunohistochemical staining for DNA mismatch repair proteins performed after neoadjuvant chemoradiation? *Hum Pathol* 45:2029-36, 2014
58. FoundationOne SUMMARY OF SAFETY AND EFFECTIVENESS DATA (SSED).
59. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, et al: Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* 7:746-756, 2018
60. Middha S, Zhang L, Nafa K, et al: Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data. *JCO Precis Oncol* 2017, 2017
61. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, et al: Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* 22:1342-1350, 2016
62. Bonneville R, Krook MA, Kautto EA, et al: Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis Oncol* 2017, 2017

5 次世代シーケンス法による包括的ゲノムプロファイリング検査

5.1 背景

次世代シーケンサーを用いた包括的ゲノムプロファイリング検査の概要

次世代シーケンス(NGS)は超並列シーケンスの原理に基づく塩基配列解析法である。従来法であるサンガー法と比較して、塩基配列解読能力が飛躍的に向上し、超高速かつ大量にゲノム解読が可能となり^{1,2}、ゲノム配列決定にもとづくゲノム配列の差異(変異)の同定だけでなく、ゲノムのコピー数解析(増幅・欠損)、修飾を受けているゲノム部位の同定とその頻度の定量、トランスクリプトーム解析による RNA 量(発現)の決定、融合遺伝子の探索などが可能である。

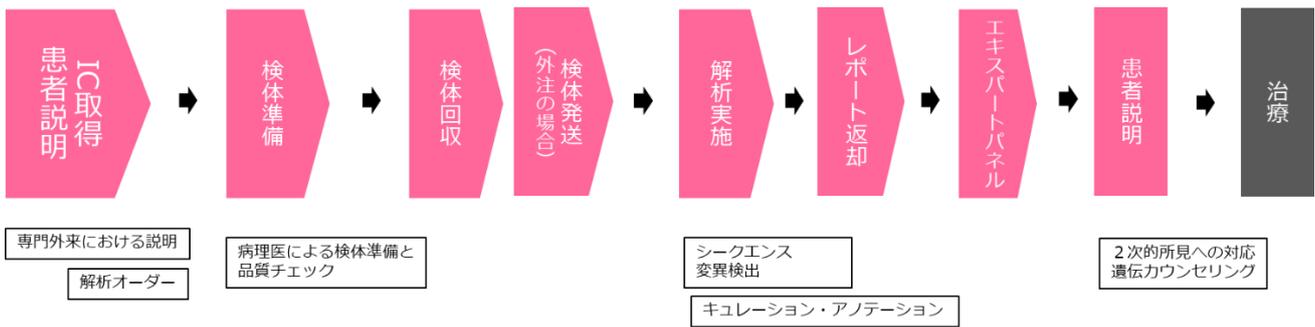
クリニカルシーケンスは、患者試料を用い、解析結果を患者の治療選択に利用することを目的とした遺伝子解析である。これまでのがん関連遺伝子検査では、単一遺伝子や少数遺伝子を対象に検査が行われてきたが、希少遺伝子異常に対する分子標的治療薬開発の流れを受け、同時に多くの遺伝子異常を同定できる検査が求められている。このような背景を受け、臨床実装のために開発された NGS を用いたクリニカルシーケンスのひとつが包括的ゲノムプロファイリング(CGP)検査である。CGP 検査については、2017 年 10 月 1 日付で発出された 3 学会(日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会)合同の「次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドライン(第 1.0 版)」(以下、「3 学会ガイドライン」という)において、個々のがん患者において最良の治療法を選択する上で、CGP 検査を用いて多数の遺伝子を網羅的に解析する臨床的有用性が示されている。

包括的ゲノムプロファイリング検査の流れ

CGP 検査を用いたクリニカルシーケンスの過程はいくつかの段階から成る(図 1)。検査を希望する患者に同意を取得した後、本検査に適した検体を選び(または新たに採取し)、検体のクオリティーチェックを行う。検体中の腫瘍細胞含有割合を見積もり、割合が低い場合にはマイクロダイセクションを実施することが推奨される。抽出した DNA は品質や濃度が測定されたのち、NGS のライブラリー調製が行われシーケンスされる。データ解析では、まず得られた塩基配列データをヒトの参照配列に当てはめ、reference allele と異なる塩基の部位を抽出する。抽出された塩基配列がコードする遺伝子やアミノ酸変化、一塩基多型であるか否かの情報を付加する。得られたバリエーションに対する遺伝子機能の情報に関して、既知のものに対しては ClinVar や COSMIC などの公的データベースを用いて機能変化を検索し(アノテーションという)、意義不明なものは意義不明の変異(variant of uncertain significance: VUS)として報告する(サイドメモ 1)。また、検出された遺伝子異常が二次的所見に該当するか否かを判断する(サイドメモ 2)。検出された遺伝子異常は、対応する抗がん薬の有無や適応のあるがん種、薬の開発段階などが総合的に判断され、遺伝子異常のエビデンスレベルが決定される(次項表 1)³。

アノテーションにより出てきた総合的な解析結果に対して、エキスパートパネルを開催し、多職種(がん)の専門家が集まり医学的解釈について議論する。エキスパートパネルには、担当医のほか、がん薬物療法の専門医、遺伝医学の専門医、遺伝カウンセリングの専門家、病理医、分子遺伝学やがんゲノム医療の専門家、バイオインフォマティシャンらが参加し、議論の後に担当医への返却レポートが作成される。遺伝子プロファイルの解釈とその異常に基づく治療選択肢が検討され、最終的なレポートには、検体の品質、解析結果の信頼性、検出された遺伝子異常、その生物学的意義付け、分子標的治療薬などによる治療法の可能性、薬剤の承認・適応状況、進行中の臨床試験情報、VUS に対する対応、二次的所見への対応、遺伝カウンセリングの必要性などが記載される。これらの得られたゲノム情報は、がんゲノム情報管理センター(C-CAT)内の「がんゲノム知識データベース」に集積される。日本人集団のゲノム情報に基づき、より個人の状態にあった治療法を選択することを可能にするとともに、新たな医薬品等の開発において利活用されることが想定されている。

図 1. がん遺伝子パネル検査を用いた臨床シークエンス



サイドメモ 1 意義不明の変異 (VUS)

NGS を用いてがん細胞の遺伝子を解析すると多くの変異が見つかり、実際にはその多くは VUS である。がん遺伝子における低頻度の変異は、がん化を強力に引き起こすドライバー変異なのか、あるいは偶発的に生じたパッセンジャー変異なのかなど、その意義が明確でない場合が多い。こうした VUS がシークエンスで発見されると、がん化能に加え薬剤感受性の有無も不明であるため、解釈がしばしば困難となる。現時点で VUS については、ClinVar や COSMIC などの公的データベースや、すでにアノテーションが十分に行われた遺伝子関連ゲノム情報データベースを参考にして、エキスパートパネルが方針を決めるのが適当と考えられる。

サイドメモ 2 二次的所見

CGP 検査において生殖細胞系列に病的と確定できる遺伝子変異が見出されることを二次的所見と呼ぶ。二次的所見への対応については、日本医療研究開発機構 (AMED) のゲノム創薬基盤推進研究事業で行われた「医療現場でのゲノム情報の適切な開示のための体制整備に関する研究」の「ゲノム医療における情報伝達プロセスに関する提言—がん遺伝子パネル検査と生殖細胞系列全ゲノム/全エクソーム解析について—」を参照していただきたい。

5.2

基本的要件

切除不能進行再発大腸がん患者に対し、治療薬適応判定の補助として、包括的ゲノムプロファイリング検査を実施する。

推奨度

強く推奨する [SR 7 名、R 3 名]

CGP 検査は、がんの発生・増殖または抑制に関連する異常が報告されている遺伝子、並びにコンパニオン診断薬やバイオマーカーとして承認されている、または開発中の分子標的薬と関連する遺伝子異常を包括的に含んでいるため、その異常の情報に基づいた治療効果が期待される薬剤の選択、予後予測に係る情報が入手可能である。分子標的薬の標的となる遺伝子異常を認める腫瘍では、標的がない腫瘍よりも、分子標的薬を用いた治療により予後が延長することが示されている。第 I 相試験に参加した大腸がんを含む症例を後ろ向きに解析したところ、標的となる分子異常を認めた症例では、奏効割合、無増悪生存期間、全生存期間が有意に長いことが報告された^{4,5}。CGP 検査の有用性を検証したメタアナリシスでは、遺伝子パネル検査の結果に基づいた治療選択と治療成績の相関が報告されている。消化器がんを含む様々ながん種を対象にした第 II 相試験、計 570 試験 32,148 例について、遺伝子パネル検査を用いてバイオマーカーによる治療選択を行った群と行わない群で比較検討した結果、遺伝子パネル検査あり群で奏効割合、無増悪生存期間、全生存期間すべてが有意に優れていた⁶。さらに、大腸がんを含む第 I 相試験、計 346 試験 13,203 例について、遺伝子パネル検査を行った群で奏効割合、無増悪生存期間ともに有意に優れ、遺伝子異常をバイオマーカーに用いた群の奏効割合はさらに良好であったことが報告されている⁷。

CGP 検査の使用は、本邦の「がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会」からの提言、がんゲノム医療中核拠点病院を中心とする診療体制整備、がんゲノム情報管理センターの設置による情報の集積・提供体制の整備、さらに 3 学会ガイダンスにより最適化されており、個々の患者における最適ながん薬物療法の選択に繋がるものである。以上より、ゲノムプロファイルから治療方針策定の補助となる遺伝子異常の情報が得られ、最適ながん薬物療法の選択に繋がる可能性があることから、切除不能進行再発大腸がん患者に対し CGP 検査を行うことは強く推奨される。

包括的ゲノムプロファイリング検査に基づく治療

担当医への返却レポートではエビデンスレベルに応じていくつかの治療が推奨される(表 1)(エビデンスレベルに関しては 3 学会ガイダンスを参照)。コンパニオン診断薬として薬事承認された異常が検出された場合は、コンパニオン診断の結果を踏まえ承認された治療薬の使用を考慮する(エビデンスレベル 1A)(ただし、現時点では大腸がんでは KRAS/NRAS のみである)。前向き試験やメタアナリシスにより有用性が示されている場合(エビデンスレベル 1B~2B)には、治験・先進医療・薬価基準収載医薬品の適応外使用等の評価療養や患者申出療養等の保険外併用療養費制度の利用を考慮する。しかしながら、海外の試験結果では、CGP 検査をもとに治療薬にアクセスできた症例は全体の約 20%であったとされ⁸、多くの症例では推奨される治療選択肢が提示されない。

治験(拡大治験を含む)および先進医療については、限定的であることから全ての患者が治療機会を得る訳ではない。また、薬価基準収載医薬品の適応外使用を自由診療として実施する場合には、費用についての懸念や安全性への問題も危惧される。拡大治験は、すでに第 III 相の治験が終わり承認前の薬剤などで、PMDA の承認以前ではあるが、薬剤の使用が許可される制度である。先進医療は、将来の薬事承認を目指して医師が行う医療で、同じく適応外での使用が許されるが、薬剤の費用は基本的には患者負担である。患者申出療養制

度は、患者の申し出により適応外の薬剤の使用が許される制度であるが、先進医療と同じく薬剤の費用の負担は患者となる場合があり、また実際の手続きには数カ月を必要とする。

表 1 担当医返却レポートの結果と治療選択肢

遺伝子異常の内容		遺伝子異常と薬剤の状況 ＜3学会ガイダンスのエビデンスレベル分類＞	治療選択肢
既知の遺伝子異常の検出	あり	当該がん種においてコンパニオン診断薬として薬事承認されている ＜エビデンスレベル:1A＞	承認された治療薬の使用
		当該がん種において ・コンパニオン診断薬として FDA 承認されている＜エビデンスレベル:1B＞ ・前向き試験またはメタ解析データで有用性が示されている＜エビデンスレベル:1B＞ ・前向き試験のサブグループ解析により有用性が示されている＜エビデンスレベル:2A＞	治験・先進医療・薬価基準収載医薬品の適応外使用等の評価療養や患者申出療養等の保険外併用療養費制度の利用を考慮
		異なるがん種において薬事承認されている ＜エビデンスレベル:2B＞	治験・先進医療・薬価基準収載医薬品の適応外使用等の評価療養や患者申出療養等の保険外併用療養費制度の利用を考慮
	なし	エキスパートパネルによる推奨薬あり ＜エビデンスレベル:3A＞	治験・先進医療等を考慮しても良い
		エキスパートパネルによる推奨薬なし	治療提案なし
MSI-H*	あり	免疫チェックポイント阻害薬	承認された治療薬の使用
TMB-H**	あり	免疫チェックポイント阻害薬	治験・先進医療等を考慮しても良い

*MSI-H; 高頻度マイクロサテライト不安定性; **TMB-H; tumor mutational burden-high

包括的ゲノムプロファイリング検査を行うタイミング

CGP 検査の本邦の臨床への実装は、2019年6月に2つのがん遺伝子パネル検査が保険適用となり、本格的に始動した。CGP 検査の適応は、標準治療終了時（もしくは標準治療がなくなることが予測される時点）および、標準治療がないがん種の治療開始前から定められた。ただし、後述する FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイルはコンパニオン診断薬として使用可能な遺伝子異常が含まれており、腫瘍の遺伝子プロファイルを把握できるだけではなくコンパニオン診断として該当治療薬の効果予測検査を行うことが可能である。切除不能進行再発大腸がんでは、一次治療開始前に RAS/BRAF 変異検査を実施することが強く推奨されており、FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイルには RAS 変異検査が含まれていることを考えると、一次治療前に検査を行うことが可能であるが、CGP 検査としてではなくコンパニオン診断目的での使用となり、CGP 検査としての保険請求ができないことに注意が必要である。

実際、分子標的治療薬の適応判断において、複数のコンパニオン診断薬を個別に実施するより、1回のパネル検査で複数の標的薬の適応を判断することは、時間的・経済的に理にかなっている。CGP 検査により治療の

早い段階から腫瘍の遺伝子プロファイルを把握できれば、その後の治療修飾によるプロファイルの変化が懸念されるものの、予後や将来使用可能な候補薬剤などを考えながら効率的な治療を行うことに繋がると考える。総合的に考えて CGP 検査は、将来的には一次治療前に検査が行われることが理想である。

サイドメモ 1 Tumor Mutational Burden (TMB)

TMB は腫瘍組織中の遺伝子変異量を示す指標である。TMB のカウント方法についてはコンセンサスの得られたものはないが、Chalmers らはコーディング配列上の体細胞遺伝子変異 (synonymous を含む一塩基変異もしくは挿入/欠失) について 1Mb あたりの数値を TMB としている⁹。本来 TMB を測定するには全エクソンシーケンス (whole exome sequencing: WES) が必要であるが、Chalmers ら⁹ は 29 症例の検体について 315 のがん関連遺伝子を網羅した遺伝子パネル検査 (カバーしている領域は 1.1Mb) より得られる TMB の推定値が全エクソンシーケンスによる解析結果とほぼ相関し、遺伝子パネル検査で TMB が十分推定可能であると報告している。TMB が高い症例では免疫チェックポイント阻害薬が奏効することが複数のがん種で報告されており¹⁰⁻¹⁴、大腸がんについては、MSI-H 大腸がんの中でも TMB が高い症例ほど免疫チェックポイント阻害薬がより有効であったことが報告されている¹⁵。

サイドメモ 2 クリニカルシーケンスの結果に基づいたバスケット試験、アンブレラ試験

バスケット試験は、網羅的遺伝子解析により同定した治療標的となるサブタイプを複数のがん種でスクリーニングし、単一の治療を検証する試験である。一方、アンブレラ試験は、特定のがん種において網羅的遺伝子解析で同定した複数のサブタイプに対して複数の治療を同時に評価する試験である。CGP 検査で同定された遺伝子異常に基づきバスケット試験やアンブレラ試験を行うことは、治療薬の開発、治療効果および薬事承認に向けたデータ収集の点で効率的である¹⁶。現在、CGP 検査により検出された遺伝子異常に基づく臨床試験が数多く実施されている^{17,18}。

サイドメモ 3 大腸がんの希少フラクションに対する治療開発

CGP 検査により、これまで他のがん種で同定されていたがんの生存・増殖に関わるドライバー遺伝子異常が、大腸がんにも低頻度存在することが明らかとなりつつある。現在大腸がんの治療標的として有望とされる遺伝子異常について解説する。

① *NTRK* 融合遺伝子

神経栄養受容体チロシンキナーゼ (neurotrophin receptor tyrosine kinase: NTRK) 遺伝子には、*NTRK1*、*NTRK2* および *NTRK3* のサブタイプが存在し、それぞれトロポミオシン受容体キナーゼ (TRK) 蛋白質である TRKA、TRKB および TRKC をコードする。*NTRK* のがん遺伝子としての活性化は融合遺伝子として最も多く認められ、臓器横断的に融合遺伝子が認められる。乳腺分泌がんや頭頸部領域にできる乳腺相似分泌がんなどまれながん種では 90% 以上に *NTRK* 融合遺伝子が認められる一方、大腸がんでは 1% 以下と低頻度である¹⁹。TRK の選択的阻害薬である Larotrectinib や ROS1/TRK 阻害薬である **エヌトレクチニブ** が *NTRK* 融合遺伝子をもつ様々ながん種に高い有効性を示すことが報告されており^{20,21}、**エヌトレクチニブ** は 2019 年 6 月に、本邦で *NTRK* 融合遺伝子陽性固形がんを対象に薬事承認となり、2019 年 9 月に保険適用となった。さらに、2019 年 6 月に FoundationOne® CDx が **がんゲノムプロファイル** が、**エヌトレクチニブ** のコンパニオン診断薬として使用目的追加の承認を取得した。ただし、コンパニオン診断薬として一次治療前に使用した場合、CGP 検査として保険請求ができないため、実臨床では CGP 検査で *NTRK* 融合遺伝子が検出された症例に **エヌトレクチニブ** を用いていくことになると考える。

② HER2 増幅

HER2 蛋白過剰発現、および HER2 のコピー数増加は、大腸がんの 1.6–5.2%に存在することが報告されている²²⁻²⁶。標準治療不応の KRAS 野生型かつ HER2 陽性の切除不能大腸がんを対象にトラスツズマブ+ラパチニブの有効性をみた HERACLES 試験や²⁷、さまざまな遺伝子異常に対して分子標的治療薬の有効性を評価したバスケット試験である MyPathway 試験の、HER2 陽性の切除不能大腸がんを対象にトラスツズマブとペルツズマブの有効性をみたパート^{28,29}では有望な結果が報告されている。MyPathway 試験では、KRAS 野生型の患者では客観的奏効割合が高い一方、KRAS 変異型の患者では 1 例も客観的奏効が認められなかったことも報告された²⁸。現在、トラスツズマブおよびペルツズマブ併用療法の第 II 相医師主導治験 (UMIN000027887)、や HER2 標的抗体薬物複合体 DS-8201a の国際共同第 III 相試験が行われている (NCT03384940)。

③ V600E 以外の BRAF 変異

BRAF 変異にはホットスポットである V600E 以外の BRAF non-V600E 変異症例が存在し、その頻度は切除不能大腸がんの 2.2–5.5%である³⁰⁻³³。本邦で行われた BREAC 試験では BRAF V600E 変異ばかりでなく BRAF non-V600E 変異も、抗 EGFR 抗体薬の負の治療効果予測因子となる可能性があること、予後不良因子である可能性があることが報告された。一方、米国の大規模な解析では、BRAF non-V600E 変異大腸がんは BRAF V600E 変異大腸がんと異なり、年齢が若い、男女差が少ない、右側結腸原発が少ない、腹膜播種が少ないといった特徴が認められ、予後についてはむしろ良好である可能性が報告されている³³。

基礎的検討で BRAF non-V600E 変異細胞株に BRAF、MEK、EGFR を阻害することで相乗効果が認められたことが報告され³⁴、現在本邦では BRAF non-V600E 変異症例にエンコラフェニブ (BRAF 阻害薬)、ビニメチニブ (MEK 阻害薬)、セツキシマブ (抗 EGFR 抗体薬) の併用治療の有効性をみる第 II 相医師主導治験が行われている (UMIN000031857)。

④ その他の遺伝子変異・増幅の意義

NTRK、HER2、BRAF 以外に MET、FGFR、ROS1、ALK など臓器横断的に有効性が期待できる治療標的と考えられており、これらの対象に対する治療開発も今後期待される。

5.3

基本的要件

包括的ゲノムプロファイリング検査は、分析的妥当性が確認された検査システムで実施する。

推奨度

強く推奨する [SR 10 名]

CGP 検査は、治療方針の策定及び治療薬の適応判定の補助となる遺伝子異常の情報を得るために行われる。そのため、検査システムには、解析対象遺伝子の選択の妥当性、解析対象異常に対する検出性能の妥当性、レポート作成工程及びレポートの提示内容の妥当性に基づいた臨床性能を有することが必須である。

解析対象遺伝子の選択の妥当性については、固形がん患者において、コンパニオン診断薬やバイオマーカーが承認又は開発されている分子標的薬と関連する異常、がんの発症、増殖又は抑制に関連する異常が報告されている遺伝子が網羅的に含まれることが重要である。薬物療法の対象となる患者を特定するために使用されることを踏まえると、解析対象遺伝子として 3 学会ガイドンスのエビデンスレベル 3A 以上に該当する遺伝子が十分に含まれていることが求められる。解析対象変異に対する検出性能の妥当性については、代表的な塩基置換、挿入/欠失、コピー数異常および融合遺伝子において、真度、精度、特異性及び最小検出感度等が示されていることが重要である。また、コンパニオン診断薬としての臨床性能については、本邦で既承認のコンパニオン診断薬との分析学的同等性が示されていることが重要である。レポート作成工程と提示内容の妥当性については、変異の検出基準、データの品質評価基準、レポートへの出力基準に基づき適切に管理されていることが求められる。本邦での遺伝子パネル検査の製造販売承認審査では、これらの臨床性能に関してそれぞれ評価され、2018 年 12 月に CGP 検査を含む 2 つのがん遺伝子パネル検査が製造販売承認された。

以上より、切除不能進行再発大腸がんに対して、治療方針の策定または治療薬の適応判定の補助として、包括的ゲノムプロファイリング検査は、分析的妥当性が確認された検査システムで実施することが強く推奨される。

薬事承認されたがん遺伝子パネル検査(表 2)

① OncoGuide™ NCC オンコパネルシステム

腫瘍組織より抽出された DNA と患者白血球由来の DNA をそれぞれシーケンスして結果を比較し、腫瘍特異的な遺伝子異常を正確に捉える仕組みをとっている。腫瘍組織より抽出された DNA 中の 114 のがん関連遺伝子における遺伝子異常と 12 の融合遺伝子異常、および TMB を解析できる。

② FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル

腫瘍組織より抽出された DNA 中の 324 のがん関連遺伝子における変異プロファイルの取得に加えて、大腸がんでは KRAS/NRAS の遺伝子変異がセツキシマブ、パニツムマブのコンパニオン診断薬として搭載されている。Genomic Findings として上記の遺伝子異常を検出するとともに、biomarker Findings としてマイクロサテライト不安定性 (MSI)、TMB を解析することができる。

表 2 薬事承認されたがん遺伝子パネル検査の詳細

遺伝子パネル名	OncoGuide™ NCC オンコパネルシステム	FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル
対象遺伝子数	114	324
塩基置換、挿入/欠失、コピー数異常、融合など	12	36
MSI	-	解析可能
TMB	解析可能	解析可能
エビデンスレベル 3A 以上	46	120 以上
必要なサンプル	組織 DNA、血液 DNA	組織 DNA
生殖細胞系列変異	あり	なし
変異の検出判定基準	<p><u>塩基置換</u> アレル頻度 5%以上</p> <p><u>挿入/欠失</u> アレル頻度 5%以上</p> <p><u>コピー数異常</u> 遺伝子増幅を示す領域の Depth の中央値 ≥ 200 かつ、コピー数 ≥ 8(Depth) 比 ≥ 4、$\log(\text{Depth 比}) \geq 2$</p> <p><u>融合遺伝子</u> アレル頻度 3%以上 全リード数に占める割合が $2.0e-6$ 以上</p>	<p><u>塩基置換</u> アレル頻度 5%以上</p> <p><u>挿入/欠失</u> アレル頻度 5%以上</p> <p><u>コピー数異常</u> 腫瘍割合 20%以上 遺伝子増幅:ディプロイド:6 コピー以上(ただし、ERBB2 の場合、ディプロイドは 5 コピー以上)、トリプロイド:7 コピー以上、テトラプロイド:8 コピー以上 ホモ接合型欠失:0 コピー</p> <p><u>融合遺伝子</u> 異なる染色体上又は 10Mbp 以上離れたリードペアが 5 つ以上(既知の融合遺伝子の場合は 3 つ以上)</p>
検査実施機関	理研ジェネシス	Foundation Medicine(米国)
薬事承認日	2018 年 12 月 25 日	2018 年 12 月 27 日

MSI; microsatellite instability、TMB; tumor mutational burden

コメント 1 遺伝子パネル検査を用いたコンパニオン診断について

大腸がんの腫瘍組織検体を用いて NGS 法による RAS 変異検査あるいは BRAF 変異検査をダイレクトシーケンシング法 (Sanger 法) などの標準法と比較した検討では、両者の結果の一致率は 92-100% と高いことが報告されている³⁵⁻³⁸。また、パネル検査を用いた KRAS/NRAS エクソン 2、3、4 および BRAF エクソン 15 の検査は、全ての領域をサンガー法により検査する場合より費用および結果判明に要する時間も同程度であり必要 DNA 量は少量で済むと報告されている³⁹。FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイルには複数のコンパニオン診断薬が搭載されており、既承認コンパニオン診断薬との分析学的同等性について判定一致率の非劣性が確認されている。従来、分子標的治療薬の開発は、特定のコンパニオン診断薬が同時に開発・承認されることが多く、同じ治療標的に対し違う治療薬を使用する場合、新たに異なるコンパニオン診断薬を用いて検査する必要が生じていた。2019 年 6 月 4 日、厚生労働省保険局は、保険適用された FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル及び OncoGuide™ NCC オンコパネルシステムを用いた遺伝子パネル検査後に開催されるエキスパートパネルが、添付文書・ガイドライン・文献等を踏まえ、当該遺伝子変異等に係る医薬品投与が適切であると推奨した場合であれば、改めてコンパニオン検査を行うことなく当該医薬品を投与しても差し支えないことを通知した。今後は体外診断用医薬品として承認されているなど質保証された検査法であれば、同等性試験を実施するなどして、薬剤横断的に適応が追加されることが望まれる。

サイドメモ 1 包括的ゲノムプロファイリング検査の施設要件

2018 年 4 月 1 日に全国 11 施設の「がんゲノム医療中核拠点病院」が選定され、各地域で中核拠点病院と連携しがんゲノム医療を展開する「がんゲノム医療連携病院」が認定された。さらに、2019 年 9 月にがんゲノム医療を自施設で完結できる 34 の「がんゲノム医療拠点病院」が選定された。中核拠点・拠点・連携病院は、患者説明後にパネル検査のための検体取り扱い方法に則り検体の準備・提出を行う。中核拠点・拠点病院は測定・解析されたデータのアノテーションならびに結果の意味付けをするキュレーションを行い、CGP 検査で測定した遺伝子データの医学的解釈を行うエキスパートパネルを開催する(表 3)。

表 3 **がんゲノム医療中核拠点病院等の機能**

	患者説明 検体準備	シーケン ス実施	エキスパー トパネル	レポート作 成	患者 説明	治療	研究 開発	人材 育成
中核 拠点	必須	外注可	必須		必須	必須	必須	必須
拠点	必須	外注可	必須		必須	必須	連携	連携
連携	必須	外注可	中核拠点あるいは拠点 病院の会議等に参加		必須	必須	連携	連携

【参考文献】

1. Meyerson M, Gabriel S, Getz G: Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 11:685-96, 2010
2. Mardis ER: A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470:198-203, 2011
3. Carr TH, McEwen R, Dougherty B, et al: Defining actionable mutations for oncology therapeutic development. *Nat Rev Cancer* 16:319-29, 2016
4. Tsimberidou AM, Wen S, Hong DS, et al: Personalized medicine for patients with advanced cancer in the phase I program at MD Anderson: validation and landmark analyses. *Clin Cancer Res* 20:4827-36, 2014
5. Tsimberidou AM, Hong DS, Ye Y, et al: Initiative for Molecular Profiling and Advanced Cancer Therapy (IMPACT): An MD Anderson Precision Medicine Study. *JCO Precis Oncol* 2017, 2017
6. Schwaederle M, Zhao M, Lee JJ, et al: Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *J Clin Oncol* 33:3817-25, 2015
7. Schwaederle M, Zhao M, Lee JJ, et al: Association of Biomarker-Based Treatment Strategies With Response Rates and Progression-Free Survival in Refractory Malignant Neoplasms: A Meta-analysis. *JAMA Oncol* 2:1452-1459, 2016
8. Johnson A, Khotskaya YB, Brusco L, et al: Clinical Use of Precision Oncology Decision Support. *JCO Precis Oncol* 2017, 2017
9. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al: Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 9:34, 2017
10. Wang Z, Duan J, Cai S, et al: Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer With Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel. *JAMA Oncol*, 2019
11. Ready N, Hellmann MD, Awad MM, et al: First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers. *J Clin Oncol*:JCO1801042, 2019
12. Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, et al: Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 35:329, 2019
13. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al: Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet* 51:202-206, 2019
14. Ott PA, Bang YJ, Piha-Paul SA, et al: T-Cell-Inflamed Gene-Expression Profile, Programmed Death Ligand 1 Expression, and Tumor Mutational Burden Predict Efficacy in Patients Treated With Pembrolizumab Across 20 Cancers: KEYNOTE-028. *J Clin Oncol* 37:318-327, 2019
15. Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, et al: Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 2019
16. Billingham L, Malotki K, Steven N: Research methods to change clinical practice for patients with rare cancers. *Lancet Oncol* 17:e70-e80, 2016
17. Hurwitz H, Hainsworth JD, Swanton C, et al: Targeted therapy for gastrointestinal (GI) tumors based on molecular profiles: Early results from MyPathway, an open-label phase IIa basket study in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 34:653-653, 2016

18. Conley BA, Chen AP, O'Dwyer PJ, et al: NCI-MATCH (Molecular Analysis for Therapy Choice) – a national signal finding trial. *Journal of Clinical Oncology* 34:TPS2606-TPS2606, 2016
19. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A: NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15:731-747, 2018
20. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al: Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* 378:731-739, 2018
21. Drilon A, Siena S, Ou SI, et al: Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov* 7:400-409, 2017
22. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487:330-7, 2012
23. Ingold Heppner B, Behrens HM, Balschun K, et al: HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 111:1977-84, 2014
24. Valtorta E, Martino C, Sartore-Bianchi A, et al: Assessment of a HER2 scoring system for colorectal cancer: results from a validation study. *Mod Pathol* 28:1481-91, 2015
25. Richman SD, Southward K, Chambers P, et al: HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials. *J Pathol* 238:562-70, 2016
26. Kato T, Hamaguchi T, Hara H, et al: The Nationwide Cancer Genome Screening Project in Japan, SCRUM-Japan GI-SCREEN: Efficient identification of cancer genome alterations in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol. abstr* 3591, 2016
27. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, et al: Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 17:738-746, 2016
28. Hurwitz H RK, Burris HA, Kurzrock R, Sweeney C, Meric-Bernstam F, Vanderwalde AM, Spigel DR, Bose R, Fakih Marwan, Swanton C, Guo S, Bernaards C, Beattie MS, Sommer N, Hainsworth JD: Pertuzumab + trastuzumab for HER2-amplified/overexpressed metastatic colorectal cancer (mCRC): Interim data from MyPathway. *J Clin Oncol* 35:abstr 676, 2017
29. Hainsworth JD, Meric-Bernstam F, Swanton C, et al: Targeted Therapy for Advanced Solid Tumors on the Basis of Molecular Profiles: Results From MyPathway, an Open-Label, Phase IIa Multiple Basket Study. *J Clin Oncol* 36:536-542, 2018
30. Ciardiello F, Normanno N, Maiello E, et al: Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: findings from the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol* 25:1756-61, 2014
31. Haley L, Tseng LH, Zheng G, et al: Performance characteristics of next-generation sequencing in clinical mutation detection of colorectal cancers. *Mod Pathol* 28:1390-9, 2015
32. Shen Y, Wang J, Han X, et al: Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine. *PLoS One* 8:e81628, 2013
33. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, et al: Non-V600 BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 35:2624-2630, 2017

34. Kotani H, Adachi Y, Kitai H, et al: Distinct dependencies on receptor tyrosine kinases in the regulation of MAPK signaling between BRAF V600E and non-V600E mutant lung cancers. *Oncogene* 37:1775-1787, 2018
35. Gao J, Wu H, Wang L, et al: Validation of targeted next-generation sequencing for RAS mutation detection in FFPE colorectal cancer tissues: comparison with Sanger sequencing and ARMS-Scorpion real-time PCR. *BMJ Open* 6:e009532, 2016
36. Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, et al: Extended RAS and BRAF Mutation Analysis Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 10:e0121891, 2015
37. Kothari N, Schell MJ, Teer JK, et al: Comparison of KRAS mutation analysis of colorectal cancer samples by standard testing and next-generation sequencing. *J Clin Pathol* 67:764-7, 2014
38. Malapelle U, Vigliar E, Sgariglia R, et al: Ion Torrent next-generation sequencing for routine identification of clinically relevant mutations in colorectal cancer patients. *J Clin Pathol* 68:64-8, 2015
39. Belardinilli F, Capalbo C, Buffone A, et al: Validation of the Ion Torrent PGM sequencing for the prospective routine molecular diagnostic of colorectal cancer. *Clin Biochem* 48:908-10, 2015

論文用原稿

6 リキッドバイオプシー

6.1 背景

大腸がんに対するリキッドバイオプシー

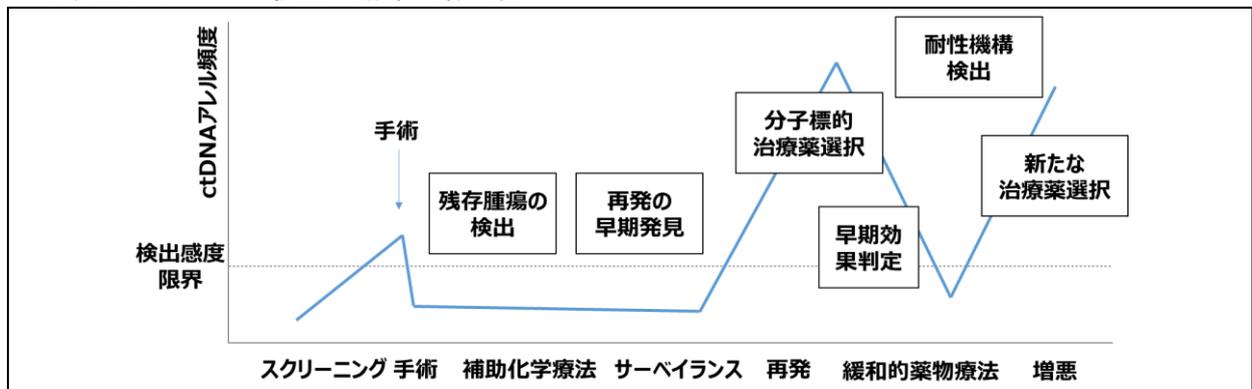
リキッドバイオプシーは、血液や尿などの体液サンプルを用いて、直接腫瘍組織を採取することなく、腫瘍の状態を診断する検査法である。ヒトの血液中には通常でも一定量の遊離 DNA が存在しているが、がん患者ではその量が増えることが知られている。正常細胞・腫瘍由来を含め、血漿中に存在する DNA を cell free DNA (cfDNA)と呼ぶ。がん患者における cfDNA は腫瘍由来のものも含まれることから、circulating tumor DNA (ctDNA)と呼ばれることも多い。検体材料として腫瘍組織ではなく ctDNA を用いて実施する体細胞遺伝子検査は、低侵襲かつリアルタイムに腫瘍の遺伝子異常を検出する検査法として期待されている^{1,2}。再発大腸がん患者では、肝臓や肺など体の深部にのみ腫瘍組織が存在することがあり、腫瘍組織を採取する遺伝子検査には侵襲を伴う。よって、ctDNA から遺伝子検査を行うことができれば、腫瘍組織採取を回避することができる。また、ctDNA を用いた遺伝子検査は、病理組織検体の処理が不要であることから、結果判明までの時間(TAT)を短縮することができ、早急に治療レジメンを決定して薬物療法を開始したい場合などに特に有用性が高い。

腫瘍組織における遺伝子異常との一致と ctDNA 量

BEAMing 法や droplet digital PCR 法などの超高感度変異検出法の登場により、ctDNA からの遺伝子変異検出の感度は飛躍的に向上している。抗 EGFR 抗体投与薬歴のない Stage IV 大腸がん患者における腫瘍組織検体と血液検体での KRAS 変異検査の一致率は、78–96%と高い³⁻⁶。抗 EGFR 抗体薬投与前の Stage IV 大腸がん 205 例を対象に BEAMing 法による腫瘍組織検体と ctDNA での KRAS/NRAS 変異型を比較したところ、一致率 92.2%、陽性一致率 90.4%、陰性一致率 92.2%と報告された⁷。欧州では BEAMing 法による ctDNA を用いて KRAS/NRAS 変異を検出する OncoBEAM™ RAS CRC キットが既に体外診断薬として CE マーク登録されており、後述するように本邦でも薬事承認された。

切除不能例において、化学療法開始前の ctDNA 量が、予後不良因子となることが報告されている⁸。10 研究 1076 例の大腸がん患者のメタアナリシスでは、治療前の cfDNA 値が中央値以上の高値群は有意に予後不良であった(HR:2.39、95% CI:2.03–2.82、 $p < 0.001$)⁹。また、治療後早期の ctDNA の減少が早期治療効果予測因子として有用であるという報告も多い。Tie らは、腫瘍組織内に変異アレルが検出された大腸がん 52 例のうち、48 例(92.3%)で治療開始前に ctDNA が検出でき、治療開始早期(2 コース目開始前)の ctDNA の減少が治療効果と相関することを示している¹⁰。既存の腫瘍マーカーよりも鋭敏に腫瘍量や化学療法の効果を予測できる可能性がある。

図 1: 想定される ctDNA 検査の臨床的有用性



6.2 微小残存腫瘍の検出および再発モニタリングを目的とした ctDNA 検査

基本的要件

切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、ctDNA 検査を実施する。

検査は分析的妥当性が確認された微小残存腫瘍検出用のパネル検査を用いて実施する。

推奨度

推奨する [R 10 名]

微小残存腫瘍 (minimal residual disease: MRD) 検出を目的とした ctDNA 検査

ctDNA (遺伝子変異アレル) は、血漿中の半減期が腫瘍マーカー (CEA、CA19-9) 等に比較して極めて短いことが知られている¹¹。よって、治癒切除後は、がんの残存がなければ ctDNA は血中から速やかに消失する。ctDNA の本特性を生かして、微小残存腫瘍 (minimal residual disease: MRD) 検出のための次世代シーケンス技術を利用した診断システムが開発されている。

Tie らは、増幅対象の遺伝子にタグを付けることで、遺伝子変異と読み取りエラーとを容易に識別可能にして感度を高めて次世代シーケンスを実施する Plasma-Safe-SeqS を用い、大腸がんで高頻度に遺伝子変異を認める APC、TP53、SMAD4 など 10 数遺伝子を対象とした診断パネルを開発した。治癒切除が行われた Stage II 結腸がん患者 231 例に対して腫瘍組織を用いて検査したところ、230 例 (99.6%) でいずれかの遺伝子変異が検出可能であった。術後補助化学療法を実施しなかった 178 例のうち、治癒切除後 4-7 週時点での ctDNA 中に変異アレルが検出された 14 例では、検出されなかった 164 例と比較して有意に再発率が高く (HR:18、95%CI:7.9-40、 $p<0.001$)、うち 85% で画像検査の再発確定以前に ctDNA から変異アレルが検出されたと報告した¹²。肝転移治癒切除例 37 例でも同様に変異アレル陽性群では 3 年無再発生存割合 0% と変異陰性群の 84% と比較して大きな差が認められた (HR:13、95%CI:19-325、 $p<0.001$)。また Stage III 結腸がんを含めた解析 (58 例、HR:17)、局所進行直腸がん (159 例、HR:13) における前向き観察研究においても同様の結果が報告されている^{13,14}。また、Reinert らは、切除腫瘍組織の全エクソン解析から 16 遺伝子を抽出してプライマーを作成し術後の血液検体から MRD のモニタリングを行う方法 (Signatera) について報告した。治癒切除後の Stage I-III 大腸がん患者 130 例を対象に検査を行い、術後 30 日時点で ctDNA 陽性であった患者の再発率は有意に高かった (HR:7.2、95%CI:2.7-19.0、 $p<0.001$)¹⁵。

このように、大腸がん治癒切除例を対象とした MRD 検出のための ctDNA 遺伝子パネル検査は、非常に再発リスクの高い患者群の同定に有用であると考えられる。本邦の大腸癌治療ガイドライン 2019 年版では、術後補助療法において再発リスクに応じた治療レジメンの選択を推奨している¹⁶。また、再発ハイリスク群を除外できれば、予後良好な集団の抽出も可能であり、他の臨床的予後因子を鑑みて術後補助化学療法を省略することも可能となる。また、CT や採血などを定期的な評価することは術後再発のサーベイランスとして有効であることから、リキッドバイオプシーによる MRD モニタリングについても、繰り返し実施することにより、再発の早期発見につながることを期待される。以上より、切除可能進行再発大腸がん患者に対する MRD 検出を目的とした ctDNA 遺伝子パネル検査は、再発ハイリスク群の同定のための繰り返し実施可能な検査として推奨される。

6.3 抗 EGFR 抗体薬の適応を判定するための ctDNA 検査

基本的要件

切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応判定および治療効果モニタリングを目的として、ctDNA 検査を実施する。

検査は分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。

推奨度

推奨する [SR 1 名、R 9 名]

抗 EGFR 抗体薬の適応を判定するための ctDNA を用いた RAS 変異検査

切除不能進行再発大腸がん患者に対する RAS (*KRAS/NRAS*) 変異検査は、一次治療の治療レジメンを選択するための検査として推奨されている。ctDNA を用いた RAS 変異検査は、腫瘍組織採取が不要であり、TAT が短いことが大きな利点である。ctDNA を用いて BEAMing 法により RAS 変異を検出する、OncoBEAM™ RAS CRC キットは、本邦で行われた臨床性能試験において、薬物療法前の腫瘍組織を用いた RAS 検査と良好な一致率 (86.4%) が報告され¹⁷、2019 年 7 月に薬事承認された。ただし、肺転移単独例では腫瘍組織と ctDNA の遺伝子型の一致率が低いことが報告されており留意が必要である。

また、抗 EGFR 抗体薬の効果予測因子としての遺伝子変異アレル検出に関する報告も蓄積されてきた。抗 EGFR 抗体薬投与前の血液検体を用いた検討において、治療開始前 ctDNA の RAS 変異アレルの存在は、予後不良因子であると報告されている^{18, 19}。さらに、これらの遺伝子異常のない大腸がんに対しては抗 EGFR 抗体薬の再投与 (リチャレンジ) の有効性が報告されている。抗 EGFR 抗体薬耐性後の三次治療としてセツキシマブ併用療法の有効性を探索した CRICKET 試験では、全体集団での奏効割合は 21%であったが、リチャレンジ前に採取された血液 ctDNA で RAS 変異が検出された症例では奏効例は認めなかった²⁰。RAS 変異の検出は、抗 EGFR 抗体薬投与中に耐性クローンが腫瘍組織内に増殖した結果を反映していると考えられている。

このように、抗 EGFR 抗体薬の投与前 (抗 EGFR 抗体の再投与を含める) に ctDNA を用いた RAS 検査を行うことは、抗 EGFR 抗体薬の適応の判定のために有用であると考えられる。獲得耐性として出現した ctDNA で検出される RAS 変異は抗 EGFR 抗体薬未投与の期間が経過するとともに減衰すると報告されており²¹、ctDNA による RAS 変異の有無について経時的な複数回測定によるモニタリングを行いながら、抗 EGFR 抗体薬の再投与のタイミングを決定するという治療戦略が期待されている。明確なカットオフの決定については今後、知見の蓄積を待つ必要があるものの、少なくとも 1%以上の *KRAS* 変異アレルの存在は、抗 EGFR 抗体薬が無効とする報告が多い。以上より、切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応判定および治療効果モニタリングを目的として、ctDNA 検査を実施することは推奨される。

6.4 がん遺伝子異常のモニタリングを目的とした ctDNA 検査

基本的要件

切除不能進行再発大腸がん患者に対し、治療薬適応判定の補助として ctDNA を用いた包括的ゲノムプロファイリング検査を実施する。

検査は分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。

推奨度

推奨する [R 8 名、ECO 2 名]

ctDNA を用いた治療標的の探索およびモニタリング

大腸がんにおいても新たな治療標的に対する分子標的薬の治療開発が進行している。腫瘍組織の *BRAF* V600E 変異陽性の切除不能進行再発大腸がんを対象としたベムラフェニブ (*BRAF* 阻害薬) + イリノテカン + セツキシマブ療法第 I b 相試験では、奏効割合 35% と報告され、治療前の ctDNA 検査が実施された 12 例全例で *BRAF* V600E 変異の検出が可能であった。また、治療開始後の ctDNA の減少の程度は、奏効の程度と強い相関があったと報告されている²²。同様に、腫瘍組織で *HER2* 陽性の大腸がんを対象とした *HER2* 抗体薬 トラスツズマブ療法第 II 相試験では治療前 ctDNA より 96.6% (28/29) で *HER2* 増幅が検出可能であり、治療効果と ctDNA での copy number との相関が見られたと報告されている²³。このように、切除不能大腸がんに対する新たな分子標的治療の開発を鑑みると、腫瘍組織を材料とした包括的遺伝子ゲノムプロファイリング (CGP) 検査と同様に、ctDNA を用いた CGP 検査も、治療標的を探索するという点で臨床的に有用であると考えられる。ctDNA による CGP 検査は、腫瘍組織を用いた場合と比較して、感度を高めるために解析対象遺伝子数を数十程度に留める必要がある点が課題である一方、簡便で侵襲がなく解析結果が短期間で得られる利点がある。また、簡便に再検査が可能であり、早期治療効果判定にも有用であることが報告されている。米国では、すでに 2018 年に Guardant360、FoundationOne Liquid、PGDx elio™ Plasma が ctDNA を用いた CGP 検査として承認申請されている。

耐性機構の検出と新たな治療薬選択

RAS 野生型切除不能進行再発大腸がんに対する抗 *EGFR* 抗体薬投与後に、ctDNA から *EGFR*、*KRAS*、*NRAS*、*BRAF* 変異や *HER2* 増幅、*MET* 増幅など耐性因子と想定される複数の遺伝子異常が検出されることが知られている^{24, 25}。また、抗 *EGFR* 抗体薬の再投与前の ctDNA 検査において、これら複数の耐性遺伝子異常が検出されなかった患者で治療効果が高いことが報告されている²⁶。

このように、切除不能大腸がんに対する血液サンプルを用いた ctDNA 体細胞遺伝子検査は、単に腫瘍組織検査の代替としてだけでなく、腫瘍内の不均一性 (heterogeneity) を加味した腫瘍全体の遺伝子状態 (predominant one) を経時的に把握できる低侵襲検査として確立されてきた。治療標的の探索だけでなく、治療の効果予測、耐性の獲得に関する有益な情報を得ることが可能である。特に抗 *EGFR* 抗体薬のリチャレンジ (再投与) に際しては、治療直前の ctDNA での遺伝子状態と治療効果に相関が認められることから、治療前の ctDNA 検査は、治療選択に大きな影響を及ぼす。

以上より、大腸がん切除不能例に対する ctDNA 遺伝子パネル検査は、治療標的の同定および治療効果のモニタリングを目的とした繰り返し実施可能な低侵襲検査として推奨される。経時的モニタリングの有用性を考慮すると、臨床導入に際しては、臨床経過に応じて複数回実施できることが望まれる。

【参考文献】

1. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11:426-37, 2011
2. Diaz LA, Jr., Bardelli A: Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32:579-86, 2014
3. Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al: Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 59:1722-31, 2013
4. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, et al: Comparison of genetic and epigenetic alterations of primary tumors and matched plasma samples in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 10:e0126417, 2015
5. Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I, et al: Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res* 18:1177-85, 2012
6. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al: Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 20:430-5, 2014
7. Jones FS, Edelstein D, Wichner K, et al: Performance of standardized BEAMing platform for detecting RAS mutations in the blood of metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. *Journal of Clinical Oncology* 34:11538-11538, 2016
8. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, et al: Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res* 22:3067-77, 2016
9. Spindler KG, Boysen AK, Pallisgaard N, et al: Cell-Free DNA in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncologist* 22:1049-1055, 2017
10. Tie J, Kinde I, Wang Y, et al: Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 26:1715-22, 2015
11. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al: Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 14:985-90, 2008
12. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, et al: The potential of circulating tumor DNA (ctDNA) to reshape the design of clinical trials testing adjuvant therapy in patients with early stage cancers. *Journal of Clinical Oncology* 34:3511-3511, 2016
13. Reinert T HT, Rasmussen MH, Sethi H, Salari R, Shchegrova S, Swenerton R, Wu H, Sharma S, Christensen E, Natarajan P, Dashner S, Tin T, Olson A, Pawar H, Zimmermann B, Iversen LH, Madsen MR, Lin J, Andersen CL. : Serial circulating tumor DNA analysis for detection of residual disease, assessment of adjuvant therapy efficacy and for early recurrence detection. *Annals of Oncology* (2018) 29 (suppl_8): viii150-viii204. 10.1093/annonc/mdy281, 2018
14. Tie J, Cohen JD, Wang Y, et al: Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut* 68:663-671, 2019
15. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2019 May 9. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.0528. [Epub ahead of print]
16. 大腸癌治療ガイドライン 医師用 2019年版 大腸癌研究会 編.

17. Bando H, Kagawa Y, Kato T, et al: A multicentre, prospective study of plasma circulating tumour DNA test for detecting RAS mutation in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 120:982-986, 2019
18. Azuara D, Santos C, Lopez-Doriga A, et al: Nanofluidic Digital PCR and Extended Genotyping of RAS and BRAF for Improved Selection of Metastatic Colorectal Cancer Patients for Anti-EGFR Therapies. *Mol Cancer Ther* 15:1106-12, 2016
19. Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, et al: Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res* 21:1087-97, 2015
20. Cremolini C, Rossini D, Dell'Aquila E, et al: Rechallenge for Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to First-line Cetuximab and Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 2018
21. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK, et al: Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann Oncol* 30:243-249, 2019
22. Hong DS, Morris VK, El Osta B, et al: Phase IB Study of Vemurafenib in Combination with Irinotecan and Cetuximab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer with BRAFV600E Mutation. *Cancer Discov* 6:1352-1365, 2016
23. Siravegna G, Sartore-Bianchi A, Nagy RJ, et al: Plasma HER2 (ERBB2) copy number predicts response to HER2-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2019
24. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, et al: The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486:537-40, 2012
25. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al: Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6:224ra24, 2014
26. Montagut C, Argiles G, Ciardiello F, et al: Efficacy of Sym004 in Patients With Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to Anti-EGFR Therapy and Molecularly Selected by Circulating Tumor DNA Analyses: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 4:e175245, 2018

7 血管新生因子

7.1 背景

大腸がんと血管新生

大腸がんに限らず腫瘍の増殖、進展においては腫瘍血管の新生が必要であり、血管新生には血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) や血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF)、アンジオポエチンなど様々な因子が関与している。VEGF は二量体を形成する糖蛋白であり、血管内皮細胞上に発現する膜貫通型レセプター (VEGF receptor; VEGFR) に結合することで、シグナル伝達経路が活性化される。VEGF には VEGF-A、B、C、D、E、胎盤増殖因子 (placental growth factor: PlGF)-1、2 の 7 つが、VEGFR には VEGFR-1、2、3 の 3 つが同定されている。なかでも VEGF-A の VEGFR-2 に対する結合がシグナル伝達経路の中心と考えられている。

パブリックドメイン用原稿

基本的要件

切除不能進行再発大腸がん患者に対し、血管新生阻害薬の選択補助として、VEGF-D の測定を実施する。

検査は分析的妥当性が確認された検査を用いて実施する。

推奨度

考慮する [ECO 6 名 R 3 名]

血漿中 VEGF-D 値とラムシルマブの治療成績

VEGFR-2 に対する完全ヒト化モノクローナル抗体であるラムシルマブは VEGFR-2 への VEGF-A、C、D の結合を阻害することで血管新生阻害作用を発揮する。切除不能進行再発大腸がん患者の二次治療として FOLFIRI+ラムシルマブの有効性を検証した RAISE 試験ではバイオマーカー解析が事前に設定されており、試験に登録された 1,050 例を探索コホートと検証コホートに 1:2 の割合で割り付け、治療前血漿中の VEGF-C、D、sVEGFR-1、2、3、および腫瘍組織の VEGFR-2 蛋白質発現と治療効果について検討された¹。結果、探索コホートにおいて VEGF-D 高値と全生存期間、無増悪生存期間におけるラムシルマブ 併用効果に強い相関を認めた。探索コホートにおいて推定された VEGF-D 高値/低値とラムシルマブの治療効果には検証コホートにおいても同様に有意な交互作用を認めた(全生存期間: p=0.01, 無増悪生存期間: p=0.001)。全対象(探索+検証コホート)における解析でも、VEGF-D 高値/低値とラムシルマブの治療効果に有意な交互作用を認め(全生存期間: p=0.0005, 無増悪生存期間: p<0.0001)、VEGF-D 高値群(n=536)では全生存期間、無増悪生存期間ともにラムシルマブ併用群で有意に良好であったが、VEGF-D 低値群(n=348)ではラムシルマブの有効性は示せず全生存期間では有意に不良であった(表 1)。以上より、RAISE 試験単独の結果ではあるものの、治療前血漿中 VEGF-D 値はラムシルマブの治療効果予測因子になり得ることが示唆された。現在、本邦でも前向きな多施設共同研究(UMIN000028616)においてその意義の評価を行っている。血管新生阻害薬の治療前後によりさまざまな血管新生因子が変動することが報告されており、これらの変動をモニタリングすることで最適な血管新生阻害薬の選択につながることを期待される^{2,4}。

表 1a 全生存期間と VEGF-D の関係

Arm	VEGF-D 高値				VEGF-D 低値			
	N	OS(M)	HR	p	N	OS(M)	HR	p
RAM	270	13.9	0.73	0.0022	176	12.6	1.32	0.0344
Placebo	266	11.5			172	13.1		

表 1b 無増悪生存期間と VEGF-D の関係

Arm	VEGF-D 高値				VEGF-D 低値			
	N	PFS(M)	HR	p	N	PFS(M)	HR	p
RAM	270	6.0	0.62	<0.0001	176	5.4	1.16	0.1930

Placebo	266	4.2			172	5.6		
---------	-----	-----	--	--	-----	-----	--	--

OS; 全生存期間、HR; ハザード比、PFS; 無増悪生存期間、M; month

コメント1 血管新生因子とベバシズマブの治療成績

VEGF-A に対するヒトモノクローナル抗体であるベバシズマブは様々な殺細胞性抗がん薬との併用で有効性を示している。ベバシズマブ併用療法を用いた 11 試験のメタアナリシスでは、治療開始前 VEGF-A(血漿中、腫瘍組織様々)高値群では全生存期間(HR:1.30, p<0.0001)、無増悪生存期間 (HR:1.26, p=0.0001)ともに有意に不良であることが報告された⁵。カペシタビン(±マイトマイシン)に対するベバシズマブ併用の有効性を検証した AGITG-MAX 試験におけるバイオマーカー解析では、腫瘍組織における VEGF-A、B、C、D、VEGFR-1、2 蛋白質の発現とベバシズマブ併用効果について検討が行われ、VEGF-D 蛋白質の発現程度だけが多変量解析において、ベバシズマブの効果と有意な交互作用を認めた⁶。しかしながら、その後予定されていた CAIRO-2 試験の対照群(CAPOX(カペシタビン+オキサリプラチン)+ベバシズマブ群)の腫瘍組織を用いた解析では、VEGF-D 蛋白質発現程度と無増悪生存期間、全生存期間の関連は認められなかった。さらに、FOLFOX または FOLFIRI 療法に対するベバシズマブ併用とセツキシマブ併用を比較した CALGB80405 試験の治療前血漿検体を用いたバイオマーカー解析では、VEGF-D 低値群(低値 1/4 群)で、FOLFOX+ベバシズマブ併用群は FOLFOX+セツキシマブ併用群と比較して全生存期間(HR:0.62, 95% CI:0.41-0.92)、無増悪生存期間(HR:0.59, 95%CI:0.41-0.85)ともに良好であったが、FOLFIRI との併用では同様の傾向は認められなかった⁷。以上よりベバシズマブの効果予測因子として様々な血管新生因子が検討されているが、現時点では臨床上有用なバイオマーカーは確立されていない。

コメント2 血管新生因子とアフリベルセプトの治療成績

アフリベルセプトは VEGFR1、2ドメインと IgG1 抗体の Fcドメインを融合させた遺伝子組み換え蛋白であり、VEGF-A、B および PlGF を阻害することで血管新生阻害作用を発揮する。切除不能進行再発大腸がん患者の二次治療として FOLFIRI+アフリベルセプトの有効性を検証した VELOUR 試験では、後方視的なバイオマーカー解析として、治療前血漿を用いた 98 の血管新生因子および炎症性サイトカインについて検討が行われ、ベバシズマブ治療歴を有する症例では、VEGF-A、PlGF、serum amyloid component、C-reactive protein が高発現していることが報告された³。さらに、血漿中 VEGF-A、PlGF 値が中央値より高い症例においてはベバシズマブ治療歴の有無にかかわらず、アフリベルセプト併用群において全生存期間が良好であった⁸。本解析結果から、ベバシズマブ治療歴有無により血管新生因子および炎症性サイトカインの発現程度が変動する可能性が示唆されたものの、現時点ではアフリベルセプトの効果予測に有用なバイオマーカーは確立されていない。現在、サイトカイン、血管新生因子の変動により、ベバシズマブ併用療法への不応を早期に予測するバイオマーカーを探索し(part 1)、そのバイオマーカーをもとに画像上の増悪より前に早期にベバシズマブをアフリベルセプトへ変更することの臨床的意義を検討する(part 2)第 II 相試験(PERMIID 試験)が進行中である(NCT02331927)⁴。

サイドメモ 大腸がんの予後と血管新生因子

血管新生の程度は腫瘍浸潤や病期などとともに予後不良因子であることが報告されている。腫瘍深達度が深い症例やリンパ節転移、肝転移を有している症例では VEGF mRNA 発現が有意に高いことや、VEGF mRNA 発現高値例では低値例と比較して有意に予後が不良であることを報告されており(リスク比 (Risk

Ratio;RR)=2.49, $p<0.0001$)⁹、VEGF 発現(多くは VEGF 蛋白質発現)、および腫瘍内の微小血管濃度 (microvessel density、MVD)と予後に関するメタアナリシスでは、VEGF 発現、MVD 高値ともに無増悪生存期間(VEGF: RR =2.84, $p<0.001$; MVD: RR=2.32, $p<0.001$)、全生存期間(VEGF: RR =1.65, $p<0.001$; MVD: RR=1.44, $p<0.001$)が有意に不良であることが報告されている¹⁰。術前症例においても、術前の血漿中 VEGF (VEGF165)値と年齢、病期、Stage は有意に相関し、術前の血漿中 VEGF 低値群では高値群と比較し治癒切除症例が多く、術後には速やかに血漿中 VEGF 値が低下することが報告されている¹¹。以上より、大腸がん患者における腫瘍内 VEGF 発現や血漿中 VEGF 値が高い症例では予後が不良と考えられている。

パブリックメ用原稿

【参考文献】

1. Tabernero J, Hozak RR, Yoshino T, et al: Analysis of angiogenesis biomarkers for ramucirumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer from RAISE, a global, randomized, double-blind, phase III study. *Ann Oncol* 29:602-609, 2018
2. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, et al: Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* 28:453-9, 2010
3. Tabernero J, Paccard C, Chiron M, et al: Placental growth factor and the angiogenic environment based on analysis of baseline plasma biomarkers from the VELOUR trial. *Journal of Clinical Oncology* 35 no. 4_suppl:592, 2017
4. Seufferlein T, Lausser L, Stein A, et al: A novel biomarker combination and its association with resistance to chemotherapy combinations with bevacizumab: First results of the PERMAD trial. *Annals of Oncology* 29 suppl_8, 2018
5. Zhao L, Zhang D, Ma H, et al: High VEGF-A level at baseline predicts poor treatment effect of bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Panminerva Med* 58:48-58, 2016
6. Weickhardt AJ, Williams DS, Lee CK, et al: Vascular endothelial growth factor D expression is a potential biomarker of bevacizumab benefit in colorectal cancer. *Br J Cancer* 113:37-45, 2015
7. Nixon AB, Sibley A, Hatch AJ, et al: Blood-based biomarkers in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFOX or FOLFIRI plus bevacizumab (Bev), cetuximab (Cetux), or Bev plus Cetux: Results from CALGB 80405 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology* 34:3597-3597, 2016
8. Dochy EC PM, Tabernero CJ: Impact of prior bevacizumab treatment of VEGFA and PIGF levels and patient outcomes: A retrospective analysis of baseline plasma samples from the VELOUR trial. *WCGI* 2017, O-012.
9. Ishigami SI, Aii S, Furutani M, et al: Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 78:1379-84, 1998
10. Liang JF, Wang HK, Xiao H, et al: Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 29:71, 2010
11. De Vita F, Orditura M, Lieto E, et al: Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 100:270-8, 2004

8 その他の検査

8.1 結腸がん術後再発予測における多遺伝子アッセイ

結腸がん治癒切除症例における多遺伝子アッセイの開発経緯

StageⅢ結腸がん治癒切除術症例(R0)に対し再発予防のため術後補助化学療法が一律に行われているが、T1-2N1M0 症例は一部の StageⅡ 症例よりも予後良好であることが報告されている¹。また、StageⅡ 結腸がん症例に対する術後補助化学療法の有用性は未だ確立されておらず、米国および欧州臨床腫瘍学会のガイドラインでは臨床病理学的因子を用いた再発高リスク群が規定されているが、エビデンスレベルは高くない^{2,3}。このため StageⅡ/Ⅲ結腸がん治癒切除症例の再発や予後の予測精度を高める目的で、多遺伝子アッセイが開発された。そのうちの一つである Oncotype DX[®] Colon Cancer Assay は、過去の術後補助化学療法の大規模臨床試験に登録された症例の保存検体を用い遺伝子の発現を調べ、再発期間との相関、StageⅡ/Ⅲでの一貫性、クラスタリングの結果から、7 個の遺伝子 (*BGN*, *FAP*, *INHBA*, *GADD45B*, *Ki67*, *C-MYC*, *MYBL2*) と 5 個の対照遺伝子 (*ATP5E*, *GPX1*, *PGK1*, *UBB*, *VDAC2*) の計 12 個の構成遺伝子が決定された。12 個の遺伝子の発現量から再発スコア (Recurrence score: RS) を算出し、0–29 が低リスク、30–40 が中リスク、41–100 を高リスクに分類される⁴。

Oncotype DX[®] Colon Cancer Assay の有用性を検証した試験

結腸直腸がん治癒切除症例に対して手術単独と術後 5-FU/LV ± レバミゾールを比較した QUASAR 試験⁵に参加した症例のうち、StageⅡ の結腸がんでホルマリン固定標本が利用可能な症例 (n=1436) を対象に RS を算出した。結果、低リスク/中リスク/高リスク群のそれぞれの 3 年再発率は 12%/18%/22% と推定され、RS 25 単位あたりの再発リスクのハザード比は 1.38 (95%CI 1.11–1.74, p=0.004) であった。また、T4 かつ pMMR 症例は RS 低値でも再発率は高く、逆に T3 かつ dMMR 症例は RS 高値でも再発率は低いという結果が得られ、全体の 74% を占める T3 かつ pMMR 症例の再発リスクの評価に RS は特に有用であると考えられた。

stageⅡ 結腸がんに対して手術単独と術後 EpCAM 抗体を比較した CALGB9581 試験⁶では、T3 かつマイクログサテライト安定症例の RS の低リスク/中リスク/高リスク群の 5 年再発率はそれぞれ 13%/16%/21% であった。RS 25 単位あたりの再発リスクのハザード比は 1.68 (95%CI:1.18–2.38, p=0.004) であり、改めて StageⅡ 結腸がんに対する有用性が示された。さらに、stageⅡ/Ⅲ結腸がんに対して 5-FU/LV と FLOX (5-FU + ロイコボリン + オキサリプラチン) を比較した NSABP-07 試験⁷では、Stage、治療法で調整を行った RS 25 単位あたりの再発リスクのハザード比は 1.96 (95%CI:1.50–2.55, p<0.001) で StageⅡ に加え StageⅢ においても治療法によらず有意に再発を予測できることが示された。また無病生存期間、全生存期間においても RS 25 単位あたりのハザード比は各々 1.60、1.89 と有意差を認めた。

本邦で行われた SUNRISE 試験⁸では、日本国内で StageⅡ/Ⅲ結腸がんに対して治癒切除が実施され、かつ術後補助化学療法を受けていない 1,568 例より再発:無再発を 1:2 の割合で抽出した 630 例のうち、RT-PCR による評価が可能であった 597 人を対象に解析が行われた。結果、StageⅡ の 3 年再発率が 9%、5 年再発率が 11%、RS 中央値が 27 (Interquartile Range (IQR):20–36)、StageⅢ では各々 26%、31%、32 (IQR:22–40) であった。主要評価項目である無再発期間は RS と有意な相関を認め、RS 25 単位あたりのハザード比は 2.05 (95%CI:1.47–2.86, p<0.001) であった。また RS は副次評価項目の無再発生存期間、無病生存期間、全生存期間とも有意な相関 (全て p<0.001) を認め、RS 25 単位あたりのハザード比は各々 1.77、1.90、2.02 であ

った。また Stage II の高リスク群と Stage IIIA、B の低リスク群の 5 年再発率はそれぞれ 19%、20%と同等であり、Stage IIIA、B の高リスク群と Stage IIIC の低リスク群の 5 年再発率はともに 38%であった。

IDEA collaboration の結果で、Stage III 結腸がんの Low-risk (T1-T3 かつ N1) の症例には XELOX 療法 3 ヶ月間の術後補助化学療法が推奨されるようになるなど、症例に応じて治療期間の短縮が行われるようになった。こうした背景の中、本邦では Stage II/III 結腸がんにおける Oncotype DX® Colon Cancer Assay の治療方針への影響 (Decision Impact) に対する前向き検討 (SUNRISE-DI) が行われた。275 症例で解析が行われ、全体で 40% の症例の推奨治療が変更となり、Stage 別では、Stage II で 30%、Stage III で 45% と Stage III の症例で有意に推奨治療が変更となった。さらに Stage III の症例を IDEA collaboration の Low-risk (T1-T3 かつ N1) と high-risk (T4 かつ/または N2) 別でみるとそれぞれ 48% と 38% の症例で推奨治療が変更となり、post-IDEA の時代においても、本検査が有用であることが示唆された⁹。

結腸がん治癒切除例における多遺伝子アッセイの今後の展望

Oncotype DX[®] Colon Cancer Assay は、Stage II/III 結腸がんの再発、予後予測において術後補助化学療法の有無、レジメンの違いにかかわらず有用性が示唆されている。術後補助化学療法は、臨床病理学的因子を用いた患者選択だけでは一部の症例において overtreatment もしくは undertreatment となる可能性があり、分子生物学的な因子を用いた精度の高い再発予測検査の開発が期待される。

8.2 CDX2

caudal-related homeobox transcription factor 2 (CDX2)とは

CDX2 は、腸管上皮細胞の発生・分化に関わるホメオボックス転写因子ファミリーのひとつである¹⁰。腸管粘膜上皮細胞の核内で発現し、腸上皮化生に重要な働きを及ぼす¹¹。CDX2 は、細胞接着、分化、細胞周期制御、アポトーシスなどに関わる遺伝子の発現制御に関わり¹²、大腸がんでは腫瘍に対し抑制的に働く¹³⁻¹⁶。大腸がん症例の 90-95%以上で高発現を認め^{17,18}、発現低下は低分化、高い進行度、右側原発、マイクロサテライト不安定性と相関する¹⁰。消化管における細胞分化の組織マーカーとしても有用である¹⁹。

治癒切除後の予後評価

CDX2 は、ハイリスク結腸がんの予後予測マーカーの探索により同定された²⁰。466 例の discovery data set では、5 年無病生存率は CDX2 陽性群が 93.1%に対して陰性群は 6.9%と有意に低く(HR:3.44, 95%CI:1.60-7.38, p=0.002)、多変量解析でも Stage、年齢、性差と独立した予後因子であった。CDX2 の発現と 5 年無病生存率の有意な相関は、314 例の validation data set でも確認されている(HR:2.42, 95% CI:1.36-4.29, p=0.003)。特に Stage II 症例の 5 年無病生存率は、CDX2 陰性群で有意に低いことが示された(discovery set; 陽性群(n=191) 87%, 陰性群(n=15) 49%, p=0.003、validation set; 陽性群(n=106) 80%, 陰性群(n=15) 51%, p=0.004)。また、術後補助化学療法は Stage III 症例では CDX2 の発現に関わらず無病生存率を改善したが、Stage II 症例では、CDX2 陰性群でのみ改善を認めた(CDX2 陰性群 p=0.006 vs CDX2 陽性群 p=0.4)。また、1045 例の Stage I - III 大腸がん症例を対象とした後ろ向き研究では、*BRAF* 変異陽性群において、CDX2 陰性は MSI や CMS とは独立した予後不良因子であった。この研究では、CDX2 陰性の Stage III 症例において、術後補助化学療法により 5 年無再発生存率が有意に改善している²¹。14 試験のメタ解析・システムティックレビューでは、CDX2 陽性大腸がん症例は有意に死亡率が低く (HR:0.5, 95%CI:0.38-0.66, p<0.001)、他の 6 試験の解析でも CDX2 発現は再発または死亡率低下と有意に相関していた(HR:0.48, 95%CI:0.39-0.59, p<0.001)²²。細胞株では、CDX2 陰性細胞株は陽性株より化学療法に高感受性であることが示されている²¹。このように、CDX2 は、切除可能大腸がんの予後予測因子であり、特に Stage II では術後補助化学療法の効果予測因子となる可能性が示されている。

進行大腸がんにおける予後因子

切除不能進行再発大腸がん症例を対象とした後ろ向き研究により、CDX2 の発現が患者背景とは独立した予後因子であることが報告された²¹。進行性大腸がん症例を対象とした本邦の検討においても、検討した 2560 遺伝子のうち CDX2 の発現が最も強く予後と相関していた²³。また、CDX2 低発現と化学療法抵抗性の関連も示されている²⁴。しかしながら、CDX2 発現の低下は大腸がんの進行度や低分化型と相関するだけではなく、*BRAF* 変異と MSI、さらに CMS (特に CMS4) と相関することが報告されており^{10,25-34}、海外で行われた FIRE-3 試験の付随研究においても、CDX2 の発現と予後の関連は、MSI および *BRAF* 変異に依存していた³⁵。

今後の臨床応用

CDX2 の発現は、Stage II 大腸がんにおいて術後補助化学療法が有用な症例を選択するバイオマーカーになる可能性が示唆されている。しかしながら、MSI や *BRAF* 変異など既知の予後因子と相関を認めた報告もあり、CDX2 と大腸がんの予後を前向きに検証した研究が乏しいことから、さらなる解析が必要である。

8.3 CIMP

CpG island methylator phenotype (CIMP)とは

CpG island はヒト遺伝子のプロモーター領域の 50–70%に認められ、大腸がんの 15–20%でゲノムワイドなメチル化異常が認められ、CpG island methylator phenotype (CIMP)と呼ばれている。大腸鋸歯状病変の一部である sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) 由来の大腸がんを高率に認めるとされており、CIMP 陽性大腸がんは MSI-H、*BRAF* 変異陽性、*TP53* 変異陰性、低分化腺癌、右側結腸、高齢女性発症などの特徴を持っている³⁶。

予後因子としての CIMP

MSI-H の大腸がんでは CIMP は予後と関係しないとされているが、MSS の大腸がんでは Stage に係わらず複数の解析で予後不良因子であることが報告されている。さらには、MSS かつ *BRAF* 変異陽性大腸がんにおいても CIMP 陽性の症例が予後不良であることが報告されている^{37,38}。

抗 EGFR 抗体薬治療効果予測因子としての CIMP

本邦で行われた *KRAS* 変異陽性切除不能進行再発大腸がん症例の後方視的な解析では、CpG island の 99%をカバーした DNA チップを用いて抗 EGFR 抗体薬を投与した 97 例 (first cohort 45 例、second cohort 52 例) を高メチル化大腸がんと低メチル化大腸がんに分類したところ、両コホートで再現性を持って低メチル化大腸がんは高メチル化大腸がんよりも奏効割合、病勢制御率、無増悪生存期間、全生存期間が有意に優れており、ゲノムワイドなメチル化が抗 EGFR 抗体薬の独立した治療効果予測因子であることが示唆された³⁹。

現在 Methylation specific PCR の技術を用いて 16 の CpG island のメチル化を評価可能な体外診断用医薬品の開発が進められており、217 例の抗 EGFR 抗体薬を投与した切除不能進行再発大腸がん症例の後方視的な解析では、上記試薬が抗 EGFR 抗体薬の治療効果を予測するのに有効であったことが報告された⁴⁰。今後の開発の進展、体外診断用医薬品としての承認が期待される。

【参考文献】

1. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY: Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 96:1420-5, 2004
2. Benson AB, 3rd, Schrag D, Somerfield MR, et al: American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 22:3408-19, 2004
3. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, et al: Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24 Suppl 6:vi64-72, 2013
4. O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, et al: Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol* 28:3937-44, 2010
5. Gray RG, Quirke P, Handley K, et al: Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 29:4611-9, 2011
6. Venook AP, Niedzwiecki D, Lopatin M, et al: Biologic determinants of tumor recurrence in stage II colon cancer: validation study of the 12-gene recurrence score in cancer and leukemia group B (CALGB) 9581. *J Clin Oncol* 31:1775-81, 2013
7. Yothers G, O'Connell MJ, Lee M, et al: Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J Clin Oncol* 31:4512-9, 2013
8. Yamanaka T, Oki E, Yamazaki K, et al: 12-Gene Recurrence Score Assay Stratifies the Recurrence Risk in Stage II/III Colon Cancer With Surgery Alone: The SUNRISE Study. *J Clin Oncol* 34:2906-13, 2016
9. Watanabe J, Sato T, Kagawa Y, et al: SUNRISE-DI Study: Decision Impact of the 12-Gene Recurrence Score (12-RS) Assay on Adjuvant Chemotherapy Recommendation for Stage II and IIIA/B Colon Cancer. *ESMO World Congress on Gastrointestinal Cancer O-017, 2019*
10. Olsen J, Espersen ML, Jess P, et al: The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review. *Surg Oncol* 23:167-76, 2014
11. Verzi MP, Shin H, Ho LL, et al: Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. *Mol Cell Biol* 31:2026-39, 2011
12. Witek ME, Nielsen K, Walters R, et al: The putative tumor suppressor Cdx2 is overexpressed by human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 11:8549-56, 2005
13. Abate-Shen C: Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2:777-85, 2002
14. Bonhomme C, Duluc I, Martin E, et al: The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 52:1465-71, 2003
15. Gross I, Duluc I, Benameur T, et al: The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene* 27:107-15, 2008
16. Hryniuk A, Grainger S, Savory JG, et al: Cdx1 and Cdx2 function as tumor suppressors. *J*

Biol Chem 289:33343-54, 2014

17. Wicking C, Simms LA, Evans T, et al: CDX2, a human homologue of Drosophila caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. *Oncogene* 17:657-9, 1998
18. Saad RS, Ghorab Z, Khalifa MA, et al: CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations. *World J Gastrointest Surg* 3:159-66, 2011
19. Liu Q, Teh M, Ito K, et al: CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. *Mod Pathol* 20:1286-97, 2007
20. Dalerba P, Sahoo D, Paik S, et al: CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med* 374:211-22, 2016
21. Bruun J, Sveen A, Barros R, et al: Prognostic, predictive, and pharmacogenomic assessments of CDX2 refine stratification of colorectal cancer. *Mol Oncol* 12:1639-1655, 2018
22. Tomasello G, Barni S, Turati L, et al: Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer* 17:97-103, 2018
23. Sunakawa Y, Stintzing S, Cao S, et al: 483PA biomarker study to validate predictors for clinical outcome of cetuximab based chemotherapy in first-line metastatic colorectal cancer (mCRC) patients: JACCRO CC-05/06AR and FIRE-3. *Annals of Oncology* 29:mdy281.031-mdy281.031, 2018
24. Zhang BY, Jones JC, Briggler AM, et al: Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 16:124-128, 2017
25. Pilati C, Taieb J, Balogoun R, et al: CDX2 prognostic value in stage II/III resected colon cancer is related to CMS classification. *Ann Oncol* 28:1032-1035, 2017
26. Trinh A, Trumpi K, De Sousa EMF, et al: Practical and Robust Identification of Molecular Subtypes in Colorectal Cancer by Immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 23:387-398, 2017
27. Baba Y, Noshro K, Shima K, et al: Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15:4665-73, 2009
28. Dawson H, Galvan JA, Helbling M, et al: Possible role of Cdx2 in the serrated pathway of colorectal cancer characterized by BRAF mutation, high-level CpG Island methylator phenotype and mismatch repair-deficiency. *Int J Cancer* 134:2342-51, 2014
29. Dawson H, Koelzer VH, Lukesch AC, et al: Loss of Cdx2 Expression in Primary Tumors and Lymph Node Metastases is Specific for Mismatch Repair-Deficiency in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 3:265, 2013
30. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, et al: Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 159:2239-48, 2001
31. Lugli A, Tzankov A, Zlobec I, et al: Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status. *Mod Pathol* 21:1403-12, 2008
32. Olsen J, Eiholm S, Kirkeby LT, et al: CDX2 downregulation is associated with poor differentiation and MMR deficiency in colon cancer. *Exp Mol Pathol* 100:59-66, 2016

33. Herr R, Brummer T: BRAF inhibitors in colorectal cancer: Toward a differentiation therapy? *Mol Cell Oncol* 2:e1002709, 2015
34. Landau MS, Kuan SF, Chiosea S, et al: BRAF-mutated microsatellite stable colorectal carcinoma: an aggressive adenocarcinoma with reduced CDX2 and increased cytokeratin 7 immunohistochemical expression. *Hum Pathol* 45:1704-12, 2014
35. Neumann J, Heinemann V, Engel J, et al: The prognostic impact of CDX2 correlates with the underlying mismatch repair status and BRAF mutational status but not with distant metastasis in colorectal cancer. *Virchows Arch* 473:199-207, 2018
36. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, et al: Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 129:837-45, 2005
37. Dahlin AM, Palmqvist R, Henriksson ML, et al: The role of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer prognosis depends on microsatellite instability screening status. *Clin Cancer Res* 16:1845-55, 2010
38. Vedeld HM, Merok M, Jeanmougin M, et al: CpG island methylator phenotype identifies high risk patients among microsatellite stable BRAF mutated colorectal cancers. *Int J Cancer* 141:967-976, 2017
39. Ouchi K, Takahashi S, Yamada Y, et al: DNA methylation status as a biomarker of anti-epidermal growth factor receptor treatment for metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci* 106:1722-9, 2015
40. Ouchi K, Takahashi S, Okita A, et al: Development of novel in vitro diagnostics to predict the efficacy of anti-EGFR treatment based on DNA methylation status. *Annals of Oncology* 30, 2019

9 検体に用いる試料

9.1 組織検体

基本的要件

体細胞遺伝子検査にはホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いる。また、対応する H&E 染色標本で、未染薄切標本内に十分な量の腫瘍細胞が存在すること、および組織学的に想定される核酸の質が保たれていることを確認する。病変のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの選択とマクロダイセクション部位のマーキング、腫瘍細胞割合の評価は原則として病理医が行う。

推奨度

強く推奨する [SR 10 名]

推奨される検査材料

ホルマリン固定パラフィン包埋組織は容易に入手可能であり、H&E 染色により腫瘍の形態学的な観察が可能であることから、体細胞遺伝子関連検査に適した検査材料である。外科切除材料を用いた検査が標準的であるが、腫瘍細胞割合の高い生検材料(内視鏡生検や針生検)でも RAS 変異、BRAF 変異、ミスマッチ修復機能欠損の検査は可能である。パラフィンブロックの薄切後は速やかに DNA 抽出を完了することが望ましく、常温で長期保管された薄切標本の遺伝子検査への使用は避けるべきである。これは薄切後の未染標本には核酸の経時的劣化が認められるためである。他施設からの供与標本を遺伝子検査に使用する際にも留意すべきである。

部位の選択

RAS 変異、BRAF 変異、ミスマッチ修復機能欠損は、その腫瘍を形成するのに極めて重要な役割を果たし、腫瘍発生の早期に獲得されると考えられている。そのため、原発巣と転移巣とには遺伝子変異・異常の有無に違いはないとされている【コメント1】。また、同様に同一腫瘍からの採取であれば、生検検体でも手術検体でも遺伝子変異・異常の有無に違いはないと考えられる¹。

ホルマリン固定

ホルマリン固定パラフィン包埋組織は、ホルマリン固定による DNA の変性等により、DNA の断片化が生じる。病理標本の固定条件が DNA の保存性の良否を大きく左右することに留意が必要である。臨床医と病理診断部門は切除材料の固定が遺伝子検査に理想的な条件を満たすよう調整が必要である。以下に重要な固定条件を挙げる²。

- 手術摘出後は速やかに冷蔵庫など 4℃で保管し、摘出後1時間以内にホルマリン固定を行う。
- 固定液: 10%中性緩衝ホルマリンが推奨される。
- 固定時間: 組織の大きさによるが、6–48 時間以内に完了し、切り出しを行う。
- 固定液量: 組織量に対し 10 倍量の固定液を用いる。

ホルマリン液浸透の促進: 大腸の場合は腸管を開き伸展させたのち固定する。転移病変を用いる際、腫瘍に割

を入れホルマリン液の浸透を促進させる。

腫瘍部位の選択と腫瘍細胞割合

H&E 染色標本から腫瘍細胞数の全細胞に占める割合(腫瘍細胞割合)を推定し、腫瘍細胞割合の高い部分を検査に用いる。ブロックを薄切し組織をスライドガラス上に乗せ、腫瘍組織を剥ぎ取りチューブに集めたのち、核酸を抽出する。腫瘍細胞がブロック全体を占める場合はスライドガラス上の全ての組織を剥ぎ取ることで検査される。一方ブロック内に正常組織も含まれ、スライドガラス上の全ての組織を剥ぎ取ると腫瘍細胞割合が低くなる場合は、H&E 標本上に腫瘍細胞密度の高い部分をマーキングしマクロダイセクションを行う(エンリッチメント)。MSI 検査の場合、全組織を剥ぎ取ると腫瘍細胞割合が 50%未満となる場合、マーキングとマクロダイセクションによる腫瘍採取を推奨している³。凝固壊死や粘液の多い部分は避けたほうがよい。また腫瘍の中心など固定不良の組織は腫瘍細胞の同定が難しいため避けるべきである。病理医がブロックと腫瘍部位の選択、マクロダイセクション部位のマーキングを実施することが望ましい。

生検材料を用いる場合、選択的なマクロダイセクションは難しく、多くの場合組織切片の全てが検査に用いられることになる。従って、生検組織全体における腫瘍細胞割合を推定する。最初から腫瘍細胞の少ない、あるいは腫瘍細胞割合の低い生検検体は偽陰性となる可能性があり遺伝子検査に用いないようにする。

正確な腫瘍細胞割合の推定は遺伝子検査の解析前過程における非常に重要な判断項目である。腫瘍細胞核の個数の正常細胞核の個数に対する比であり、腫瘍細胞の占める面積比でないことに留意されたい。遺伝子検査で必要となる腫瘍細胞割合は検査法ごとに異なるため確認が必要である。遺伝子パネル検査における変異検出では 30%以上(最低でも 20%以上)となることが望ましい。MSI 検査の検出限界は 2%から 10%のアリル頻度で、腫瘍細胞が二倍体とすると腫瘍細胞割合は 20%が検出限界とする報告がある^{4,5}。加えて病理学的な腫瘍細胞割合の推定にばらつきが生じることも考慮すべきである。実際の腫瘍細胞割合が推定値よりも大幅に低いことがあり、偽陰性の要因になりうる⁶⁻⁹。一つのブロックから遺伝子パネル検査や MSI 検査を含む全ての遺伝子検査項目を解析する際には、検査の検出限界の 2 倍かそれ以上(理想的には 40%から 50%かそれ以上)の腫瘍細胞割合が確保されることが望ましい¹⁰。

複数の検体が存在する場合は、保存期間が短い、組織内の腫瘍細胞量が多い、薬物療法や放射線療法などの前治療による組織への影響が少ない、等を勘案して遺伝子検査に用いる材料を選定する。術前治療後の切除材料では間質の線維化、炎症細胞浸潤が多くなり腫瘍細胞割合が低くなる傾向にある。またリンパ節転移材料も腫瘍細胞割合が低くなりやすい。

コメント 1 原発巣と転移巣における遺伝子異常の相関

大腸がんにおいて、原発巣と転移巣の間での *KRAS* 変異一致率は一般に高く、90%以上とする報告がほとんどを占める(表 1)^{11,12}。しかしながら、その一致率は検索する転移臓器で異なり、原発とリンパ節転移を比較した場合には肝転移巣に比べて低い傾向を示すため、リンパ節転移を検査する場合は留意する必要がある。MSI に関しても原発組織と同時性・異時性含む肝転移組織で、高い一致率が確認されている¹³。本邦からの報告でも、原発巣と転移巣における *KRAS* 変異、*BRAF* 変異、MSI ステータスの一致率は概ね 90%以上と高いが、肝転移巣と比較しリンパ節転移では *KRAS* 変異、MSI-H の一致率が低かったことが示されている¹⁴。また、大腸が

んは同時性、異時性の多発がんが少なくない。ASCP/CAP/AMP/ASCO 合同大腸がんバイオマーカーガイドラインでは治療対象となる転移巣からの組織が得られ、それらが適正である場合には転移巣を検査することが好ましいとしている¹⁰。

表 1 大腸がんにおける原発および対応した転移巣での KRAS 変異の相違のまとめ (Baas¹¹らに一部加筆)

	N	原発巣における KRAS 変異の頻度	転移部位	全体の一致率	KRAS 変異の検出法
Vakiani et al. (2012) ¹⁵	613	36%	肝臓 78%、肺 12% その他 10%	93%*	MassARRAY and sequencing
Knijn et al. (2011) ¹²	305	35%	肝臓 100%	96%	Sequencing
Italiano et al. (2010) ¹⁶	59	39%	Not specified	95%	Sequencing
Baldus et al. (2010) ¹⁷	75	41%	リンパ節 73% その他 27%	76%	Sequencing and pyrosequencing
Cejas et al. (2009) ¹⁸	110	34%	肝臓 83%、肺 17%	94%	Sequencing
Molinari et al. (2009) ¹⁹	37	43%	肝臓 74%、肺 8% その他 18%	92%	Sequencing
Loupakis et al. (2009) ²⁰	43	40%	Not specified	95%	Sequencing
Garm Spindler et al. (2009) ²¹	31	29%	Not specified	94%	Sequencing
Santini et al. (2008) ²²	99	38%	肝臓 81%、肺 7%、 その他 12%	96%	Sequencing
Artale et al. (2008) ²³	48	27%	肝臓 81% その他 19%	94%	Sequencing
Etienne-Grimaldi et al. (2008) ²⁴	48	33%	肝臓 100%	100%	PCR-RFLP
Perrone et al. (2009) ²⁵	10	20%	Not specified	80%	Sequencing
Albanese et al. (2004) ²⁶	30	47%	肝臓 100%	70%	SSCP
Zauber et al. (2003) ²⁷	42	52%	リンパ節 93%、 肝臓 5%、腸間膜 2%	100%	SSCP
Thebo et al. (2000) ²⁸	20	100%	リンパ節 100%	80%	AS-PCR
Schimanski et al. (1999) ²⁹	22	95%	肝臓 100%	95%	PCR-RFLP

Al-Mulla et al. (1998) ³⁰	47	34%	リンパ節、肝臓	83%	ASO
Finkelstein et al. (1993) 31	NR	35%	Not specified	100%	Sequencing
Losi et al. (1992) ³²	18	83%	肝臓 33% その他 67%	100%	AS-PCR
Suchy et al. (1992) ³³	66	21%	Not specified	100%	ASO
Oudejans et al. (1991) 34	31	42%	肺、肝臓	87%	ASO

* KRAS、NRAS、BRAF の 3 つの遺伝子変異の一致率

SSCP; Single Strand Conformation Polymorphism、AS-PCR; Allele Specific PCR、ASO; allele-specific oligonucleotide

コメント 2 核酸の質の確認について

固定不足は免疫組織化学染色 (IHC) の反応性を低下させるが核酸に与える影響は少なく、過固定は IHC の反応性低下および核酸の断片化を起こすことが知られている³⁵。固定不良は形態学的に容易に判定できるが、過固定の評価は難しいため、形態学的に保たれていても過固定である可能性がある。そのため、遺伝子検査の際に核酸の質を考慮して結果を解釈する必要がある。核酸の質を評価する方法として試料中の二本鎖 DNA を real-time PCR 法により定量するアッセイキットなどが汎用されている。アッセイ系によって核酸の質を確認する方法は異なるが、腫瘍組織には必ず正常細胞も含まれるため、それを由来とする正常シグナルが十分に検出できているかなどを指標にすることができる。

サイドメモ 1 骨組織を含む組織標本の扱い

骨組織を含む標本では脱灰処理が施されるが、その脱灰操作の多くは核酸を著しく断片化するため、固定後の操作も配慮する必要がある。ちなみに EDTA 脱灰液を用いた場合にはその影響を受けないため、遺伝子検査、IHC ともに通常と同等の結果が得られる。

サイドメモ 2 セルブロック

セルブロックは体腔液中の細胞を固定し、集塊化処理を加えたのちにパラフィンブロックを作成する標本作成法である。超音波内視鏡下穿刺吸引法 (EUS-FNA) で得られた吸引検体に用いる場合もある。複数の施設から種々の細胞集塊化処理の方法が考案され用いられている³⁶。IHC、in situ hybridization、遺伝子検査の上での有用性が複数報告されている。細胞の状態のよい標本からは核酸を抽出し遺伝子検査が可能であるが、遺伝子パネル検査への利用のためのセルブロック作成法の標準化はなされていない。

【参考文献】

1. Fadhil W, Ibrahim S, Seth R, et al: The utility of diagnostic biopsy specimens for predictive molecular testing in colorectal cancer. *Histopathology* 61:1117-24, 2012
2. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程: http://pathology.or.jp/genome_med/pdf/textbook.pdf.
3. http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/201680_23000EZX00047000_A_01_01.pdf.
4. Berg KD, Glaser CL, Thompson RE, et al: Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2:20-8, 2000
5. Trusky CL, Sepulveda AR, Hunt JL: Assessment of microsatellite instability in very small microdissected samples and in tumor samples that are contaminated with normal DNA. *Diagn Mol Pathol* 15:63-9, 2006
6. Smits AJ, Kummer JA, de Bruin PC, et al: The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Mod Pathol* 27:168-74, 2014
7. Viray H, Li K, Long TA, et al: A prospective, multi-institutional diagnostic trial to determine pathologist accuracy in estimation of percentage of malignant cells. *Arch Pathol Lab Med* 137:1545-9, 2013
8. Boyle TA, Bridge JA, Sabatini LM, et al: Summary of microsatellite instability test results from laboratories participating in proficiency surveys: proficiency survey results from 2005 to 2012. *Arch Pathol Lab Med* 138:363-70, 2014
9. Chen G, Yang Z, Eshleman JR, et al: Molecular Diagnostics for Precision Medicine in Colorectal Cancer: Current Status and Future Perspective. *Biomed Res Int* 2016:9850690, 2016
10. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al: Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 35:1453-1486, 2017
11. Baas JM, Krens LL, Guchelaar HJ, et al: Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review. *Oncologist* 16:1239-49, 2011
12. Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, et al: KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 104:1020-6, 2011
13. Koi M, Garcia M, Choi C, et al: Microsatellite Alterations With Allelic Loss at 9p24.2 Signify Less-Aggressive Colorectal Cancer Metastasis. *Gastroenterology* 150:944-55, 2016
14. Fujiyoshi K, Yamamoto G, Takahashi A, et al: High concordance rate of KRAS/BRAF mutations and MSI-H between primary colorectal cancer and corresponding metastases. *Oncol Rep* 37:785-792, 2017
15. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, et al: Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol* 30:2956-62, 2012
16. Italiano A, Hostein I, Soubeyran I, et al: KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Surg Oncol* 17:1429-34,

2010

17. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, et al: Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 16:790-9, 2010
18. Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C, et al: KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One* 4:e8199, 2009
19. Molinari F, Martin V, Saletti P, et al: Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant. *Br J Cancer* 100:1087-94, 2009
20. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, et al: PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:2622-9, 2009
21. Garm Spindler KL, Pallisgaard N, Rasmussen AA, et al: The importance of KRAS mutations and EGF61A>G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 20:879-84, 2009
22. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, et al: High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 13:1270-5, 2008
23. Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, et al: Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:4217-9, 2008
24. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, et al: K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 14:4830-5, 2008
25. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, et al: PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 20:84-90, 2009
26. Albanese I, Scibetta AG, Migliavacca M, et al: Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 325:784-91, 2004
27. Zauber P, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, et al: Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol* 56:137-40, 2003
28. Thebo JS, Senagore AJ, Reinhold DS, et al: Molecular staging of colorectal cancer: K-ras mutation analysis of lymph nodes upstages Dukes B patients. *Dis Colon Rectum* 43:155-9; discussion 159-62, 2000
29. Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR: Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res* 59:5169-75, 1999
30. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, et al: Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in

primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol* 185:130-8, 1998

31. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, et al: Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer* 71:3827-38, 1993

32. Losi L, Benhattar J, Costa J: Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 28A:1115-20, 1992

33. Suchy B, Zietz C, Rabes HM: K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: relation to aneuploidy and metastasis. *Int J Cancer* 52:30-3, 1992

34. Oudejans JJ, Slebos RJ, Zoetmulder FA, et al: Differential activation of ras genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver. *Int J Cancer* 49:875-9, 1991

35. Werner M, Chott A, Fabiano A, et al: Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24:1016-9, 2000

36. 松永徹、羽場礼次: R11. 細胞診およびセルブロックへの応用 - 体腔液、穿刺細胞診を中心に. *病理と臨床* 32:45-53, 2014

ハルコメ用原稿

9.2 血液検体

基本的要件

ctDNA 検査では、使用する採血管、採血後の血漿の調製や保管を各検査法が指定する方法に準じて実施する。

推奨度

強く推奨する [SR 10 名]

推奨される血液検体

リキッドバイオプシーのように血液中の ctDNA を用いて体細胞遺伝子検査を行う場合は、通常血清ではなく血漿が用いられる(リキッドバイオプシーについては第 6 章参照)。cell free DNA (cfDNA)を分離する場合の採血には、一般的な EDTA 採血管を用いることも可能であるが、検査法ごとに検証・指定されている専用採血管を使用すべきである【コメント 1】。

採血および血漿検体の調製

血液中には、細胞死(アポトーシスやネクローシス)等により正常組織や腫瘍組織から放出された cfDNA が含まれ、このうち腫瘍組織に由来する ctDNA は微量である場合が多い。そのため、採血後の採血管の取り扱いが不適切(長期間の放置や非推奨温度下での静置など)であると、血液中に大量に含まれる白血球などの有核細胞が傷害を受け、それら細胞のゲノム DNA が血漿中に漏出し、ctDNA が希釈される場合がある。また血漿分離の際に、白血球などの有核細胞が混入した場合も、同様にゲノム DNA により ctDNA が希釈され、適切な検査結果が得られない場合がある。こうした状況を回避するため、各検査法の検査キット添付文書や標準作業手順書に則った検体取扱いが不可欠である。

コメント 1)使用する採血管および採血後の取り扱い

血液検体を用いた体細胞遺伝子検査については、非小細胞肺がんでは、すでにコンパニオン診断薬として体外診断用医薬品承認された EGFR 変異検査キット(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)が臨床導入されている。大腸がんにおいては、RAS 変異検査については、OncoBEAM™ RAS CRC キット(シスメックス社)がコンパニオン診断薬として 2019 年 7 月に承認された。一方、がん遺伝子パネル検査については、薬事承認されたものはないものの国内申請に向けた開発が進んでいる。表 2 に代表的な検査法とそれらで推奨されている採血管および採血後の取り扱いについてまとめた(なお本情報は 2019 年 3 月 31 日時点の薬事未承認段階のものであり、今後変更される可能性がある)。

表 2: 血漿 ctDNA を検体としたがん遺伝子パネル検査

	OncoBEAM™ RAS CRC キット ¹⁻³ (シスメックス)	Guardant 360 ^{4 5} (ガーダントヘルス)	Foundation One Liquid ⁶ (中外製薬/ Foundation Medicine)
体細胞遺伝子検査の 種別	コンパニオン診断	包括的ゲノムプロファイ リング検査	包括的ゲノムプロファイリ ング検査
薬事承認 保険適用	体外診断用医薬品 (コンパニオン診断薬)	国内未承認	国内未承認
対象遺伝子数	2 遺伝子 (KRAS, NRAS)	74 遺伝子	70 遺伝子
使用採血管	Streck cell-free DNA BCT(推奨)	Streck cell-free DNA BCT(指定)	Streck cell-free DNA BCT(指定)
採血後から血漿分離 までの保管条件	保管温度; 15-25°C 保管時間; ①の場合は採血後 3 日 以内。 ②の場合は採血後 4 時 間以内	保管温度; 15-30°C 保管時間; 採血後 7 日以内	18-25°Cで保存し、原則 採血日に提出
血漿分離の実施場所	医療機関および国内検 査機関	特定の海外検査施設 (米国・レッドウッドシ ティ)	特定の海外検査施設 (米国・ケンブリッジ)
分離した血漿の保管	-30~-15°Cもしくは-70°C 以下で保存した場合は 6 カ月間安定。	非公開	非公開
抽出した cfDNA の保管	2-8°Cで 24 時間、-30~- 15°Cで 30 日間安定	非公開	非公開

【参考文献】

1. Medina Diaz I, Nocon A, Mehnert DH, et al: Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. PLoS One 11:e0166354, 2016
2. Garcia-Foncillas J, Taberero J, Elez E, et al: Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 119:1464-1470, 2018
3. Kagawa Y, Kato T, Bando H, et al: A multicentre, prospective clinical evaluation study for analyzing RAS mutational status utilizing plasma circulating tumor DNA in patients with metastatic colorectal cancer. Annals of Oncology 29:Suppl 5: v101-v102, 2018
4. 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 24:3539-3549, 2018
5. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, et al: Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. PLoS One 10:e0140712, 2015
6. Clark TA, Chung JH, Kennedy M, et al: Analytical Validation of a Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Genomic Profiling of Cell-Free Circulating Tumor DNA. J Mol Diagn 20:686-702, 2018

10 検査精度の確保

基本的要件

大腸がん診療における遺伝子関連検査は、精度の確保された検査室で実施されなければならない。

推奨度

強く推奨する [SR 10 名]

検査室における検査精度の確保の要件

医療法等の一部を改正する法律の一部の規定が、平成 30 年 12 月 1 日に施行され、医療機関、衛生検査所等における遺伝子関連・染色体検査の精度の確保が医療法の枠組みに組み入れられた。これに伴い、検体検査の精度管理等に関する検討会の取りまとめ¹に基づいた省令改正が実施され、①遺伝子関連検査・染色体検査の責任者の配置、②内部精度管理、適切な研修の実施、③外部精度管理調査の受検、が規定された。検査室における検査自体の品質の確保、検査要員の質の確保は、臨床検査室の品質と能力に関する国際規格である ISO15189:2012 第 5 章の技術的要求事項²や「遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティスガイドライン解説版」³の要求水準に準拠して行われるべきである。また、検査施設の第三者認定を取得することを当面、勧奨することになった。

「遺伝子関連検査・染色体検査精度の確保のために設けるべき基準」に関する改正省令における要点は、以下の通りである。

- ① 検体検査全般の精度管理に係る責任者の他に、遺伝子関連検査・染色体検査の責任者を配置することが義務化された。原則として、業務経験を有する医師または臨床検査技師であるが、専門性・経験を勘案して他の職種の者が責任者になることを妨げないとされた。
- ② 内部精度管理(施設内における検査の精密度・再現性などの管理)の実施と統計学的精度管理台帳、標準作業書、作業日誌等を作成することが義務化された。検査要員の質を確保するために、適切な研修を実施することも義務化された。
- ③ 外部精度管理調査を受検する。外部精度管理調査の体制がない場合には、医療機関、衛生検査所等の各施設が施設間で連携して、それぞれ保管・保有する検体を用いて検体検査の精度について相互確認するなどの代替方法を活用することを努力義務としている。
- ④ その他、検査施設は国際規格である ISO15189 や米国病理学会 (College of American Pathologists; CAP)⁴ の臨床検査室認定プログラム (Laboratory Accreditation Program; LAP) などによる第三者認定を取得・維持することにより、検査精度の信頼性を確保することが勧奨されている。

【参考文献】

1. 検体検査の精度管理等に関する検討会の取りまとめ、平成 30 年6月6日第62回社会保障審議会医療部会
https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12601000-Seisakutoukatsukan-Sanjikanshitsu_Shakaihoshoutantou/0000210421.pdf
2. 日本適合性認定協会.「認定の基準」についての指針—臨床検査室—JAB RM300:2014
<https://www.jab.or.jp/files/items/2208/File/RM3002014V3clear.pdf>
3. 日本臨床検査標準協議会.遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティスガイドライン解説版.学術広告社.東京.2016
4. <https://www.cap.org>

パブリック用原稿

11 備考

11.1 日本臨床腫瘍学会におけるガイドライン、ガイダンスなどの定義

1. ガイドライン

目的とする疾患・診療の領域が広い、多くのエビデンスが集積されている、作成に関して多職種の間与が必要、あるいは対象が多職種にわたる内容であるような場合など。

2. ガイダンス

目的とする疾患・診療の領域が狭い、エビデンスが限定的である、作成者や対象者が狭い領域に限定される場合など。

3. コンセンサスレポート

専門家集団の投票(voting)等によって定められた、最大公約数的な意見や診療指針。

4. エキスパートオピニオン

専門家あるいは専門家集団の意見、診療指針。

5. 暫定的見解

一時的、暫定的な意見、声明。未確定ではあるが、必要のため現時点での仮の見解として声明しておくべき時に使用する。Provisional statement/opinion と同義。

11.2 2019年9月現在における各種検査の薬事承認・保険適用の状況

1. RAS 変異検査

- ・ RAS 変異検査は、「D004-2 悪性腫瘍組織検査」に「RAS 遺伝子検査(2,500点)」として、切除不能な進行再発の結腸直腸がんにおける治療選択の補助のために保険適用されている。
- ・ 血液検体を用いた RAS 変異検査として、OncoBEAM™ RAS CRC キットは、2019年7月に薬事承認されたが、2019年9月現在保険適用されていない。
- ・ RAS/BRAF 変異検査は、両検査を同時に行った場合「D004-2 悪性腫瘍組織検査」の「2項目 4,000点」の包括規定となる。

2. BRAF V600E 変異検査

- ・ BRAF 変異検査は、「D004-2 悪性腫瘍組織検査」に「BRAF 遺伝子検査(2,100点)」として、切除不能な進行再発の結腸直腸がんにおける治療選択の補助、大腸がんにおけるリンチ症候群の診断の補助のために保険適用されている。

3. ミスマッチ修復機能欠損に対する検査

- ・ ミスマッチ修復機能欠損に対する検査として、マイクロサテライト不安定性検査は「D004-2 悪性腫瘍組織検査」の「マイクロサテライト不安定検査(2,100点)」として「家族性非ポリポーシス大腸がん又は局所進行若しくは転移が認められた標準的な治療が困難な固形癌」に対して保険適用されている。
- ・ ミスマッチ修復機能欠損に対する検査として、次世代シーケンサー(NGS)を用いた検査は薬事承認・保険適用されていない。ただし、包括的ゲノムプロファイリング検査として「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」を用いた場合、マイクロサテライト不安定性の結果を得ることができ、厚生労働省が発出した「遺伝子パネル検査の保険適用に係る留意点について」では、CGP 検査後に開催されるエキスパートパネルが適切であると判断した場合、改めてコンパニオン検査を行うことなく当該医薬品を投与しても差し支えないとされている。
- ・ ミスマッチ修復機能欠損に対する検査として、免疫組織化学検査は薬事承認・保険適用されていない。ただ

し、免疫組織化学検査については「N002 8 免疫染色(免疫抗体法)病理組織標本作製 その他(1 臓器につき) 400 点」での算定は可能である。

4. 包括的ゲノムプロファイリング検査

- ・ 包括的ゲノムプロファイリング検査は、2018 年 12 月に「OncoGuide™ NCC オンコパネル システム」と「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」がそれぞれ薬事承認され、2019 年 6 月に保険適用となった。検査提出時にパネル検査実施料として「D006-4 遺伝学的検査「3」処理が極めて複雑なもの 8,000 点」が算定可能であり、エキスパートパネルによる結果判断・患者説明時にパネル検査判断・説明料として「D006-4 遺伝学的検査「3」処理が極めて複雑なもの 4 回分 32,000 点」「D004-2 悪性腫瘍組織検査 3 項目以上 6,000 点」「M001-4 粒子線治療(一連につき) 粒子線治療医学管理加算 10,000 点」の所定点数を合算したものを準用して合計 48,000 点の算定が患者 1 人につき 1 回に限り可能である。
- ・ 「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」を結腸・直腸癌のセツキシマブ、パニツムマブの CDx として使用した場合、「D004-2 悪性腫瘍組織検査」の「K-ras 遺伝子検査 2,100 点」の算定は可能であるが、パネル検査実施料としての 8,000 点は算定できない。その後結果を包括的ゲノムプロファイリング検査として用いる場合、パネル検査判断・説明料として 48,000 点の算定が可能である。
- ・ エストレクチニブの CDx として、「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」は 2019 年 6 月に薬事承認され、2019 年 9 月に保険適用となった。なお、厚生労働省が発出した「遺伝子パネル検査の保険適用に係る留意点について」では、CGP 検査後に開催されるエキスパートパネルが適切であると判断した場合、改めてコンパニオン検査を行うことなく当該医薬品を投与しても差し支えないとされているため、「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」以外の保険適用されている CGP 検査の結果もエストレクチニブの投与可否に使われると考える。

5. リキッドバイオプシー(ctDNA 検査)

- ・ OncoBEAM™ RAS CRC キット以外の ctDNA 検査は、切除不能な進行再発の結腸直腸がんおよび、切除可能な結腸直腸がんの治療選択のために薬事承認・保険適用されていない。
- ・ ctDNA を用いた包括的ゲノムプロファイリング検査は、切除不能な進行再発の結腸直腸がんにおける治療選択のために薬事承認・保険適用されていない。

11.3 Voting の参加について

本ガイダンスは全委員による討議のもとに作成された。各項に関わる検査試薬について現在進行中・計画
中の臨床性能性試験に主体的に関与している委員は voting に参加できないことを確認し、谷口委員は「7. 血
管新生因子」の推奨度に関する voting から外れた。