

大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイドンス

第3版 2016年XX月

日本臨床腫瘍学会

Confidential

大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイドンス第3版作成委員会

委員長

山崎 健太郎（静岡県立静岡がんセンター 消化器内科）

委員

赤木 究（埼玉県立がんセンター 腫瘍診断・予防科）

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）

衣斐 寛倫（金沢大学 がん進展制御研究所・腫瘍内科）

谷口 浩也（愛知県がんセンター中央病院 薬物療法部）

土原 一哉（国立がん研究センター 先端医療開発センター）

中谷 中（三重大学医学部附属病院 中央検査部）

室 圭（愛知県がんセンター中央病院 薬物療法部）

谷田部 恭（愛知県がんセンター中央病院 遺伝子病理診断部）

山口 研成（がん研究会有明病院 消化器化学療法科）

吉野 孝之（国立がん研究センター東病院 消化管内科）

（五十音順）

評価委員

落合 淳志（国立がん研究センター東病院 臨床開発センター・臨床腫瘍病理部）

楠本 茂（名古屋市立大学病院 血液・腫瘍内科）

釧持 広知（静岡県立静岡がんセンター 呼吸器内科）

武田 晃司（大阪市立総合医療センター 腫瘍内科）

西尾 和人（近畿大学医学部 ゲノム生物学教室）

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）

福原 規子（東北大学病院 血液免疫科）

藤原 豊（国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科）

水野 聡朗（三重大学医学部附属病院 外来化学療法部/腫瘍内科）

吉村 清（国立がん研究センター中央病院 早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野）

（五十音順）

Confidential

目次

- 0. 要約
- 1. はじめに
- 2. 遺伝子関連検査
 - 2.1 *RAS* 遺伝子変異検査
 - 2.2 *BRAF* 遺伝子変異検査
 - 2.3 ミスマッチ修復機能欠損に対する検査
- 3. 検体に用いる試料
- 4. 検査の質保証
- 5. 現在開発中の検査技術と展望
- 6. 備考

0. 要約

これまで、「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ンス第 1 版¹⁾」、および「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ンス第 2 版^{2,3)}」は、実地診療における *KRAS* 遺伝子変異検査、*RAS* 遺伝子変異検査の適切な普及に貢献してきた。しかしながら、最近 *RAS* 遺伝子変異以外にも *BRAF V600E* 遺伝子変異や DNA ミスマッチ修復 (Mismatch repair; MMR) 機能欠損が、大腸がんにおける予後予測や治療選択に関わるといった知見が集積し、大腸がんを診療する際に重要な遺伝子異常として認識されるようになった。そのため、*RAS* 遺伝子変異検査のみならず、*BRAF V600E* 遺伝子変異検査、および MMR 機能欠損に対する検査を適切に行うためにガイドンスの改訂が必要になった。2016 年 2 月より本ガイドン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 2016 年 8 月から 9 月に行い、以下に示す改訂版を作成した。本ガイドンス改訂版には、大腸がん診療において予後予測または治療選択に関わるこれらの遺伝子異常の検査に関する 10 の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)。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、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、近年の検査技術の進歩に伴い、次世代シーケンス法による包括的遺伝子検査や血液サンプルを用いた体細胞遺伝子変異検査 (リキッドバイオプシー) の開発が急速に進んでいることを受けて、これら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。

- 1) 切除不能進行再発大腸がん患者に対し抗 *EGFR* 抗体薬投与前に *RAS (KRAS/NRAS)* 遺伝子変異検査を実施する。(Strong recommendation)
- 2) *RAS* 遺伝子変異検査は、体外診断用医薬品を用いるなど分析的妥当性が確認された検査法により実施する。
- 3) 切除不能進行再発大腸がん患者に対し一次治療開始前に *BRAF V600E* 遺伝子変異検査を実施することを推奨する。(Recommendation)
- 4) *BRAF V600E* 遺伝子変異検査は、ダイレクトシーケンス法 (マニュアルマイクロダ イセクション併用) やリアルタイム PCR 法などにより実施することを推奨する。(Recommendation)
- 5) リンチ症候群が疑われる大腸がん患者に対し腫瘍組織を用いたミスマッチ修復機能欠損に対する検査を実施する。(Strong recommendation)
- 6) ミスマッチ修復機能欠損に対する検査はマイクロサテライト不安定性検査、およびミ

- スマッチ修復タンパク質免疫染色である。(Strong recommendation)
- 7) 治癒切除が行われた **Stage II** 結腸がん患者に対し腫瘍組織を用いたミスマッチ修復機能欠損に対する検査を実施することを推奨する。(Recommendation)
 - 8) 切除不能進行再発大腸がん患者に対し一次治療開始前に腫瘍組織を用いたミスマッチ修復機能欠損に対する検査を実施することを考慮する。(Expert consensus opinion)
 - 9) 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 **HE** 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。(Strong recommendation)
 - 10) 大腸がん診療における遺伝子関連検査は、質保証されたシステムのもとで実施する。(Strong recommendation)

図 1 各遺伝子関連検査の対象および検査のタイミング

	RAS遺伝子変異検査	BRAF V600E遺伝子変異検査	MSI検査、MMRタンパク質免疫染色	
Stage 0	-	-	-	臨床病理情報でリンチ症候群が疑われた時 (SR) 2.3.1.参照
Stage I	-	-	-	
Stage II	- 2.1.1.【サイドメモ2】参照	- 2.3.3.【サイドメモ1】参照	根治切除後 (R) 2.3.3.参照	
Stage III	- 2.1.1.【サイドメモ2】参照	- 2.3.3.【サイドメモ1】参照	- 2.3.3.【サイドメモ2】参照	
Stage IV	- 2.1.1.【サイドメモ2】参照	- 2.2.1.【サイドメモ1】参照	-	
切除不能	抗EGFR抗体投与前 (SR) 2.1.1.【コメント1】参照	一次治療開始前 (R) 2.2.1.参照	一次治療開始前 (ECO) 2.3.4.参照	

SR: Strong recommendation R: Recommendation, ECO: Expert consensus opinion

上述の各要件に対して委員の **voting** により推奨度を決定した（表 1）。各要件の推奨度は、各検査におけるエビデンス、各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償還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。なお、各検査の保険償還状況に関しては「6.1. 2016 年 7 月現在の RAS 遺伝子変異検査、BRAF V600E

遺伝子変異検査、MMR 機能欠損に対する検査の保険償還状況」、各委員の voting への参加の有無については、「6.2. Voting の参加について」を参照されたい。

表 1 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。

【参考文献】

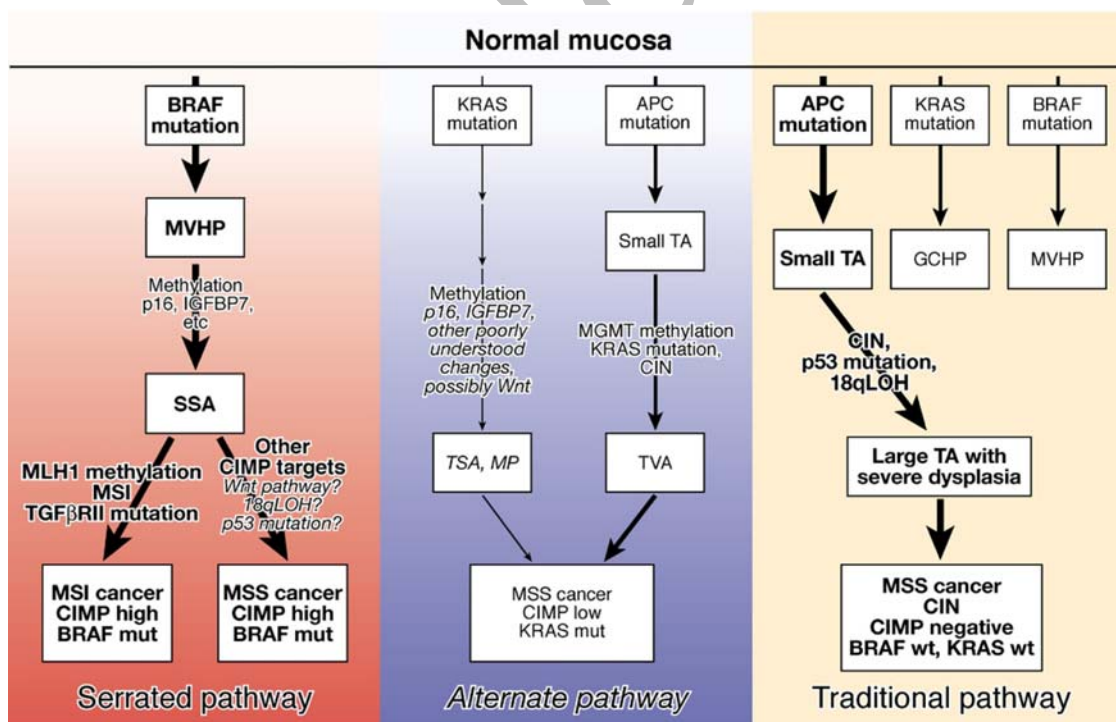
- 1) 日本臨床腫瘍学会 KRAS 遺伝子変異検討委員会（編）：大腸がん患者における KRAS 遺伝子変異の測定に関するガイドンス（第 1 版）
- 2) 日本臨床腫瘍学会 RAS 遺伝子変異ガイドンス部会（編）：大腸がん患者における RAS 遺伝子（KRAS/NRAS 遺伝子）変異の測定に関するガイドンス（第 2 版）
- 3) Taniguchi H, Yamazaki K, Yoshino T et al. Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: RAS (KRAS/NRAS) mutation testing in colorectal cancer patients. Cancer Sci 2015; 106: 324-327.

1. はじめに

1.1. 大腸がんの発生に関わる遺伝子異常

がんは複数の遺伝子に様々な異常が蓄積していくことで段階的に発生し悪性化が進展していくと考えられている。遺伝子の異常には遺伝的背景や環境因子による遺伝子の突然変異、欠失といったジェネティックな変化、転写レベルにおける遺伝子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。近年の分子生物学における研究の進歩にともない、大腸がんにおいても発生、進展に関与する遺伝子異常が解明されつつある。現在、推定される散発性大腸がんの主な発生経路として **Traditional pathway**、**Serrated pathway**、**Alternative pathway** があり、その発生、進展には **Chromosomal Instability (CIN)** や **Microsatellite Instability (MSI)**、さらに **CpG island methylation phenotype (CIMP)** が関与していると考えられている（図 1）¹。また遺伝性大腸がんの一つであるリンチ症候群では、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 **MSI** が腫瘍の発生や進展に関与していると考えられている。

図1 推定される散発性大腸がんの発生経路¹



APC: adenomatous polyposis coli, CIMP: CpG island methylation phenotype, CIN: Chromosomal instability, GCHP: Goblet cell-rich type hyperplastic polyp, IGFBP7: Insulin growth factor binding protein 7, MGMT: Methylguanine methyltransferase, MP: Mixed serrated polyp, MSI: Microsatellite instability, MSS: Microsatellite stable, MVHP: Microvascular type hyperplastic polyp, SSA: Sessile serrated adenoma, TA: Tubular adenoma, TSA: Traditional serrated adenoma, TVA: Tubulovillous adenoma,

1.2. 大腸がんの発生に関わる遺伝子異常の臨床的意義

大腸がんの発生に関わるこれらの遺伝子異常の、実際の診療における意義についても解明が進んでいる。なかでも *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) 遺伝子に関しては、その変異陽性例に上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) に対する抗体薬の効果が期待できないことが多数の前向き試験における解析にて示されたことから²⁻¹⁰、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) が、2015 年 4 月には *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) 遺伝子検査が保険償還され、実地診療で広く普及している。また *BRAF* 遺伝子に関しては、これまで *BRAF* V600E 遺伝子変異が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¹¹⁻²³、最近ではこの変異を有する患者に対して、5-FU+ロイコボリン+オキサリプラチン+イリノテカン (FOLFOXIRI) +ベバシズマブ療法が既存の化学療法よりも有効である可能性が報告され^{20,24}、さらに *BRAF* 阻害薬を用いた治療開発も進んでいる^{25,26}。一方、MMR 機能欠損に対する検査である MSI 検査は、すでに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 月に保険償還されているが、MMR 機能欠損はこれまでに 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ることが示されており²⁷⁻²⁹、さらに最近では *BRAF* V600E 野生型の切除不能進行再発大腸がんでは MMR 機能欠損を有する患者は予後が不良な傾向にあること^{22,30}、また 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する抗 PD-1 抗体の有望な結果が報告されている³¹⁻³³。これらの知見を踏まえ、現在、*BRAF* V600E 遺伝子変異や MMR 機能欠損は予後予測のみならず治療選択に関わる遺伝子異常として認識されるようになっている。

1.3. 大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイドンス第 3 版の必要性和目的

過去、欧米の報告より *KRAS* 遺伝子変異および *RAS* 遺伝子変異が抗 EGFR 抗体薬の無効予測因子であると明らかにされたことを受け、本邦におけるこれらの検査の保険償還に先立ち、*KRAS* 遺伝子変異、および *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) 遺伝子変異の測定をどのように実施し治療に反映するのが適切か、測定の基本的要件を明らかにする目的で、2008 年 11 月に「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ンス第 1 版³⁴」が、2014 年 4 月に「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ンス第 2 版^{35,36}」が日本臨床腫瘍学会より発行された。

第2版の公開から2年が経過したが、その間に上述の通り *RAS* 遺伝子以外にも *BRAF* *V600E* 遺伝子変異や *MMR* 機能欠損が、大腸がんにおける予後予測や治療選択といった診療に関わる重要な遺伝子異常であるとの認識が広まったこと、さらに近年の検査技術の進歩に伴い、次世代シーケンス法による包括的遺伝子検査や血液サンプルを用いた体細胞遺伝子検査（リキッドバイオプシー）の開発が急速に進んでいることを受けて、今回の改訂が必要と判断した。

本ガイドンス改訂の目的は、大腸がん診療における遺伝子関連検査に関わる臨床医や検査担当医に対し、*RAS* 遺伝子検査のみならず、*BRAF V600E* 遺伝子検査や *MMR* 機能欠損に対す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。

【参考文献】

- 1) Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 138: 2088-2100.
- 2) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369:1023-34.
- 3) 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*. 2015 Dec 15;21(24):5469-79.
- 4) Patterson SD, Peeters M, Siena S, et al. Comprehensive analysis of KRAS and NRAS mutations as predictive biomarkers for single agent panitumumab (pmab) response in a randomized, phase 3 metastatic colorectal cancer (mCRC) study (20020408). *ASCO Annual Meeting 2013 #3617*.
- 5) Seligmann JF, Elliott F, Richman SD, et al. Combined Epirigulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2016 Feb 11. [Epub ahead of print]
- 6) Kim TW, Elme A, Kusic Z, et al. An open label, randomized phase III trial evaluating the treatment (tx) effects of panitumumab (pmab) + best supportive care (BSC) versus BSC in chemorefractory wild-type (WT) KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (mCRC) and in WT RAS mCRC. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl 4S; abstr 642)
- 7) Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2015 Jul;51(10):1243-52.

- 8) Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 1;33(7):692-700.
- 9) Kawazoe A, Shitara K, Fukuoka S, et al. A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:258.
- 10) 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*. 2015 Jan;26(1):13-21.
- 11) Yokota T, Ura T, Shibara N, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011;104:856-62.
- 12) Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res*. 2005;65:6063-9.
- 13) Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:98-9.
- 14) Richman SD, Seymour MT, Chambers P, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2009;27:5931-7.
- 15) Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29:2011-9.
- 16) Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*. 2011;377:2103-14.
- 17) Price TJ, Hardingham JE, Lee CK, et al. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:2675-82.
- 18) Tveit KM, Guren T, Glimelius B, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol*. 2012;30:1755-62.
- 19) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369:1023-34.
- 20) 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.* 2015;16:1306-15.
- 21) Safaee Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, et al. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(10):e47054.
 - 22) 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.* 2014;20:5322-30.
 - 23) 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.* 2016 Jun 29. pii: mdw261. [Epub ahead of print]
 - 24) Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2014;50:57-63.
 - 25) Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33:4023-31.
 - 26) Tabernero J, Geel RV, Guren TK, et al. Phase 2 results: Encorafenib (ENCO) and cetuximab (CETUX) with or without alpelisib (ALP) in patients with advanced BRAF-mutant colorectal cancer (BRAFM CRC). *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 3544)
 - 27) 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* 2011; 29: 1261-1270.
 - 28) 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. *The New England journal of medicine* 2003; 349: 247-257.
 - 29) Sargent DJ, Marsoni S, Monges G et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; 28: 3219-3226.
 - 30) 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* 2011; 117: 4623-4632.
 - 31) Le DT, Uram JN, Wang H et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372: 2509-2520.

- 32) Le DT, Uram JN, Wang H et al. Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient colorectal cancer. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 103)
- 33) Overman MJ, Kopetz S, McDermott RS et al, Nivolumab ± ipilimumab in treatment (tx) of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) with and without high microsatellite instability (MSI-H): CheckMate-142 interim results. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3501)
- 34) 日本臨床腫瘍学会 *KRAS* 遺伝子変異検討委員会（編）：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ンス（第1版）
- 35) 日本臨床腫瘍学会 *RAS* 遺伝子変異ガイドンス部会（編）：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ンス（第2版）
- 36) Taniguchi H, Yamazaki K, Yoshino T et al. Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: RAS (*KRAS/NRAS*) mutation testing in colorectal cancer patients. Cancer Sci 2015; 106: 324-327.

2. 遺伝子関連検査

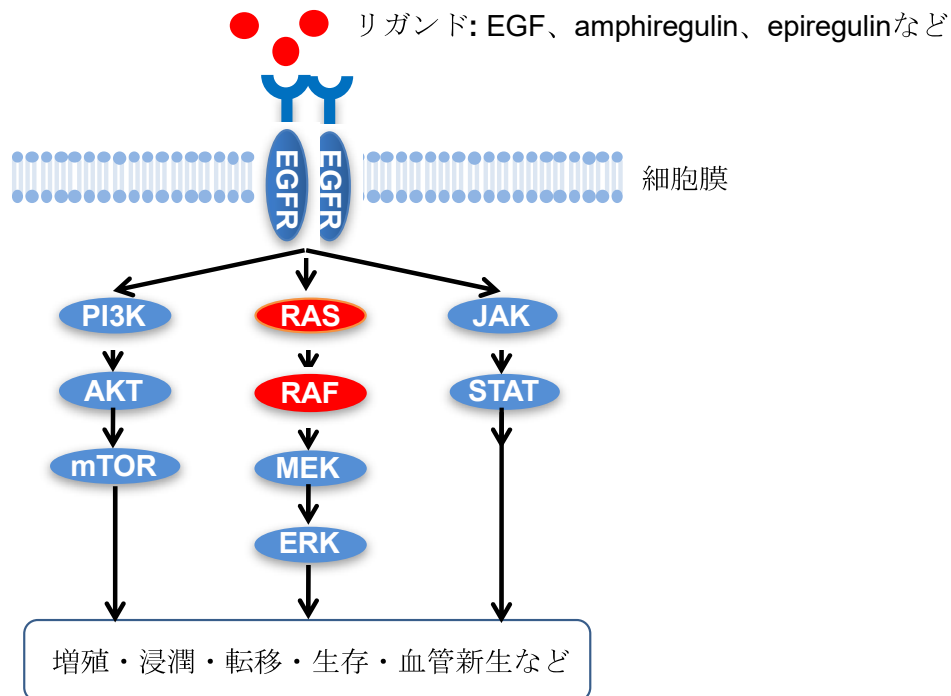
2.1. RAS 遺伝子変異検査

**2.1.1. 切除不能進行再発大腸がん患者に対し抗 EGFR 抗体薬投与前に RAS (KRAS/NRAS) 遺伝子変異検査を実施する。
(Strong recommendation、[SR 11 名])**

大腸がん と EGFR 経路

上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) は HER1、erbB1 と呼ばれる 170kDa の膜貫通型糖タンパク質受容体チロシンキナーゼであり、大腸がんの約 80% に EGFR の高発現が認められる^{1,2}。EGFR は、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され、下流へのシグナル伝達が起こる。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³。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)⁴。

図1: 大腸がん と 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*に遺伝子変異を有するがん細胞においては、それぞれの変異タンパク質が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

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る。細胞膜上のEGFRの抗原エпит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^{5,6}、本邦では2008年7月に薬事承認された。一方、パニツムマブはEGFRに対する完全ヒト型IgG2サブクラスモノクローナル抗体薬である。標準治療不応例を対象とした臨床試験で有効性が認められ^{7,8}、本邦では2010年4月に薬事承認された。

RAS 遺伝子と RAS 遺伝子変異

RASタンパク質は188-189個のアミノ酸から成る約21kDaの低分子グアノシン三リン酸（GTP）結合タンパクであり、KRAS、NRAS、HRASの3種類のアイソフォームが存在する^{9,10}。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、

大腸がんにおける *RAS* 遺伝子変異の頻度

表1: Stage別KRAS遺伝子エクソン2変異の頻度

Dukes' stage			Frequency	Stage			Frequency
Andreyev HJ, et al. (RASCAL) ¹² N=2721	Dukes' A		33.9 %	Watanabe T, et al. ¹³ 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*遺伝子変異の頻度

	<i>KRAS</i> exon 2	<i>KRAS</i> exon 3	<i>KRAS</i> exon 4	<i>NRAS</i> exon 2	<i>NRAS</i> exon 3	<i>NRAS</i> exon 4	Total*	Method
PRIME ²⁶	40% (440/1096)	4% (24/638)	6% (36/620)	3% (22/637)	4% (26/636)	0% (0/629)	17%	Sanger法 SURVEYOR法
20050181 ²⁷	45% (486/1083)	4.4% (24/548)	7.7% (41/534)	2.2% (12/536)	5.6% (30/540)	0% (0/532)	20%	Sanger法 SURVEYOR法
20020408 ²⁸	43% (184/427)	4.8% (8/166)	5.0% (9/180)	4.2% (7/166)	3.0% (5/168)	1.1% (2/180)	18%	Sanger法** SURVEYOR法
CRYSTAL ³²	N/A	3.3%	5.6%	3.5%	2.8%	0.9%	15%	BEAMing法
FIRE-3 ³⁶	N/A	4.3% (21/431)	4.9% (24/458)	3.8% (18/464)	2% (10/468)	0% (0/458)	16%	Pyrosequence法
CALGB 80405 ³⁸	N/A	1.8%	5.9%	2.3%	4.2%	0%	14%	BEAMing法
RASKET ⁶⁴	37.8% (116/307)	3.1 % (6/191)	5.2 % (10/191)	3.1 % (6/191)	4.2 % (8/191)	0 % (0/191)	16%	PCR-TSSO法

**KRAS*遺伝子エクソン2野生型に占める*KRAS/NRAS*遺伝子変異の頻度 **一部のコドンでは次世代シーケンサー法併用

KRAS 遺伝子エクソン 2 変異陽性例に対する抗 *EGFR* 抗体薬の治療成績

切除不能進行再発大腸がん患者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（OPUS試験¹⁴、CRYSTAL試験¹⁵、COIN試験¹⁶、NORDIC-VII試験¹⁷、PRIME試験¹⁸）、化学療法既治療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（EPIC試験¹⁹、20050181試験²⁰、PICCOLO試験²¹）、標準治療不応例を対象とした抗*EGFR*抗体薬単独療法とbest supportive care (BSC)との第III相試験（CO.17試験²²、20020408試験²³）における解析から、*KRAS*エクソン2（コドン12、コドン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。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た。また、本邦でも後ろ向きコホート研究²⁴や前向き臨床試験の後解析²⁵から、*KRAS*エクソン2（コドン12、コドン13）変異が抗*EGFR*抗体薬の負の効果予測因子であることが示され、欧米のエビデンスは本邦でも外挿可能であると考えられた。以上から、*KRAS*遺伝子エクソン2（コドン12、コドン13）変異陽性例に対しては、どの治療ラインにおいてもセツキシマブ、パニツムマブ投与による利益が得られない可能性が高く、抗*EGFR*抗体薬の投与は推奨されない。

RAS 遺伝子変異陽性例に対する抗 *EGFR* 抗体薬の治療成績

2013年4月以降、パニツムマブに関する第III相試験（PRIME試験²⁶、20050181試験²⁷、20020408試験²⁸、PICCOLO試験²⁹、20100007試験³⁰）において、*KRAS*遺伝子エク

ソン 2 (コドン 12、コドン 13) 以外のエクソン 3 (コドン 59、コドン 61) 、エクソン 4 (コドン 117、コドン 146) ならびに *NRAS* 遺伝子エクソン 2 (コドン 12、コドン 13) 、エクソン 3 (コドン 59、コドン 61) 、エクソン 4 (コドン 117、コドン 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。結果、*KRAS/NRAS* 遺伝子変異を認めない *RAS* 遺伝子野生型ではパニツムマブの効果が期待できる一方、*KRAS* 遺伝子エクソン 2 以外のエクソン 3、エクソン 4、*NRAS* 遺伝子エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4 のいずれかに変異を有する患者 (*RAS* 遺伝子変異陽性例) ではパニツムマブの効果が期待できない結果であった (表 3、表 4) 。さらに、*KRAS* 遺伝子エクソン 2 変異陽性例とそれ以外の *KRAS/NRAS* 遺伝子変異陽性例で分けた解析でも、同等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 (OPUS 試験³¹、CRYSTAL 試験³²) でも同様に、*KRAS/NRAS* 遺伝子変異を認めない *RAS* 遺伝子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。本邦においても、抗 EGFR 抗体薬を投与した患者の後ろ向き解析において、*KRAS* 遺伝子エクソン 2 以外の *KRAS/NRAS* 遺伝子変異陽性例では奏効が認められなかったと報告されている³³。

以上、抗 EGFR 抗体薬投与においては、従来の *KRAS* 遺伝子エクソン 2 変異だけでなく、*KRAS* 遺伝子エクソン 3、エクソン 4、*NRAS* 遺伝子エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4 変異陽性例についても利益が得られない可能性が高いことが示された【コメント 2】。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³⁴。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。また、本邦の大腸癌治療ガイドライン 医師用 2016 年版では、セツキシマブ、パニツムマブの投与は *RAS* (*KRAS/NRAS*) 遺伝子野生型切除不能進行再発大腸がんに対する化学療法の一次治療から三次治療として記載されている³⁵。よって、切除不能進行再発大腸がん患者に対し抗 EGFR 抗体薬投与前に *RAS* (*KRAS/NRAS*) 遺伝子変異検査を実施することが強く推奨される【コメント 1】。

表3: RAS遺伝子野生型に対する抗EGFR抗体薬の治療効果

	RAS evaluable *	Regimen	n	RR (%)	PFS (M)	HR	OS (M)	HR
PRIME ²⁶ (1 st line)	90 % (1060/1183)	FOLFOX4	253	-	7.9	HR 0.72 (p=0.004)	20.2	HR 0.78 (p=0.04)
		FOLFOX4+Pmab	259	-	10.1		26.0	
20050181 ²⁷ (2 nd line)	85 % (1008/1186)	FOLFIRI	211	10	4.4	HR 0.695 (p=0.006)	13.9	HR 0.803 (p=0.08)
		FOLFIRI+Pmab	204	41	6.4		16.2	
20020408 ²⁸ (3 rd line)	82 % (378/463)	BSC	63	0	7 wks	HR 0.36 (p<0.0001)	-	-
		BSC+Pmab	73	16	14.1 wks		-	
20100007 ³⁰ (3 rd line)	87 % (328/377)	BSC	128	2.3	1.7	HR 0.46 (p<0.0001)	6.9	HR 0.70 (p=0.0135)
		BSC+Pmab	144	31.0	5.2		10.0	
OPUS ³¹ (1 st line)	75 % (254/337)	FOLFOX4	49	29	5.8	HR 0.53 (p=0.0615)	17.8	HR 0.94 (p=0.80)
		FOLFOX4+Cmab	38	58	12.0		19.8	
CRYSTAL ³² (1 st line)	69 % (827/1198)	FOLFIRI	189	38.6	8.4	HR 0.56 (p=0.0002)	20.2	HR 0.69 (p=0.0024)
		FOLFIRI+Cmab	178	66.3	11.4		28.4	
FIRE-3 ³⁶ (1 st line)	69 % (520/752)	FOLFIRI+Bmab	171	59.6	10.2	HR 0.93 (p=0.54)	25.6	HR 0.70 (p=0.011)
		FOLFIRI+Cmab	171	65.5	10.4		33.1	
PEAK ³⁷ (1 st line)	82 % (233/285)	mFOLFOX6+Bmab	82	54	10.1	HR 0.66 (p=0.03)	28.9	HR 0.63 (p=0.06)
		mFOLFOX6+Pmab	88	58	13.0		41.3	
CALGB80405 ³⁸ (1 st line)	59 % (670/1137)	FOLFOX/IRI+Bmab	256	53.8	11.3	HR 1.1 (p=0.31)	31.2	HR 0.9 (p=0.40)
		FOLFOX/IRI+Cmab	270	68.6	11.4		32.0	

Pmab; パニツムマブ, Cmab; セツキシマブ, Bmab; ペバシズマブ, 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, *RAS evaluable ; ランダム化された症例のうちRAS遺伝子変異の評価が可能であった症例の割合

表4: RAS遺伝子変異陽性例に対する抗EGFR抗体薬の治療効果

	Regimen	n	RR (%)	PFS (m)	HR	OS (m)	HR
PRIME ²⁶ (1 st line)	FOLFOX4	276	-	8.7	HR 1.31 (p=0.008)	19.2	HR 1.25 (p=0.034)
	FOLFOX4+Pmab	272	-	7.3		15.6	
20050181 ²⁷ (2 nd line)	FOLFIRI	294	13	4.0	HR 0.861 (p=0.14)	11.1	HR 0.914 (p=0.34)
	FOLFIRI+Pmab	299	15	4.8		11.8	
20020408 ²⁸ (3 rd line)	BSC	114	0	7.3 weeks	HR 0.97 (p=0.729)	-	-
	BSC+Pmab	99	1	7.4 weeks		-	
20100007 ³⁰ (3 rd line)	BSC	28	-	1.6	HR 1.03 (p=0.9429)	7.5	HR 0.99 (p=0.9625)
	BSC+Pmab	26	-	1.6		7.6	
OPUS ³¹ (1 st line)	FOLFOX4	75	50.7	7.8	HR 1.54 (p=0.0309)	17.8	HR 1.29 (p=0.1573)
	FOLFOX4+Cmab	92	37.0	5.6		13.5	
CRYSTAL ³² (1 st line)	FOLFIRI	214	36.0	7.5	HR 1.10 (p=0.47)	17.7	HR 1.05 (p=0.64)
	FOLFIRI+Cmab	246	31.7	7.4		16.4	
FIRE-3 ³⁶ (1 st line)	FOLFIRI+Bmab	86	51.2	10.1	HR 1.31 (p=0.085)	20.6	HR 1.09 (p=0.60)
	FOLFIRI+Cmab	92	38.0	7.5		20.9	
CALGB80405 ³⁸ (1 st line)	FOLFOX/IRI+Bmab	42	-	-	-	22.3	HR 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; ペバシズマブ, 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,

【コメント 1】 RAS 遺伝子変異検査のタイミング

切除不能進行再発大腸がん一次治療例を対象に抗 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³⁶、PEAK 試験³⁷では、RAS 遺伝子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差を認めなかった³⁸。以上の試験結果から、RAS 遺伝子野生型では抗 EGFR 抗体薬併用、ベバシズマブ併用ともに一次治療の選択肢となっている。一方、RAS 遺伝子変異陽性例では、抗 EGFR 抗体薬の効果が期待できないことから野生型と比較して実施できる薬剤が少ないことを考慮に入れて治療戦略を考える必要がある。このように、RAS 遺伝子野生型と RAS 遺伝子変異陽性例とで治療戦略の組み立て方が異なる可能性があることを考慮すれば、可能な限り切除不能進行再発大腸がん一次治療レジメンの決定前に RAS 遺伝子変異の有無を明らかにしておくことが望ましい。欧米の大腸がん治療ガイドラインでは一次治療レジメンの決定前の RAS 遺伝子変異検査が推奨されている^{39,40}。

【コメント 2】 RAS 遺伝子変異サブタイプ別の取り扱い

細胞株を用いた検討で、RAS 遺伝子のコドン 12, 13, 59, 61, 117, 146 変異は、RAS タンパク質の恒常的活性化、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 タンパク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、現在のところ明確になっていない⁴¹⁻⁴⁴。

セツキシマブに関するランダム化比較試験（CRYSTAL 試験、OPUS 試験）の後解析において、KRAS 遺伝子エクソン 2 コドン 13D（G13D）変異陽性例は KRAS 遺伝子エクソン 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^{24,45}。しかし、セツキシマブを用いた別の第 III 相試験である COIN 試験やパニツムマブを用いた第 III 相試験（PRIME 試験、20050181 試験、20020408 試験）の後解析⁴⁶、以上の試験を含むメタアナリシス⁴⁷では、KRAS 遺伝子 G13D 変異陽性例は他の KRAS 遺伝子エクソン 2 変異陽性例と同様、抗 EGFR 抗体薬による効果は認められなかった。KRAS 遺伝子 G13D 変異陽性例だけを対象とした抗 EGFR 抗体薬併用療法の 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^{48,49}。

また、KRAS 遺伝子コドン 146 変異陽性例で、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⁵⁰、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* 遺伝子変異陽性例で抗 *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* 遺伝子変異の検査に際しては *KRAS/NRAS* 遺伝子コドン 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 3】。

【コメント 3】*RAS* 遺伝子変異不明例の取り扱い（表 5）

RAS 遺伝子変異の検査を試み、いずれかのコドンに変異が認められれば、他のコドンが未検・判定不能であった場合でも *RAS* 遺伝子変異陽性例とする。未検・判定不能のコドンがあり、かつ判定可能な他のコドンに変異が認められなかった場合は、*RAS* 遺伝子野生型とも *RAS* 遺伝子変異陽性例とも判定せず *RAS* 遺伝子変異不明例として扱う。判定不能の原因としては検体および検査方法の 2 つが考えられる。判定不能の原因が検体不良であると考えられる場合には、可能な限り保存腫瘍組織の再提出や新たな腫瘍組織の採取を試みる。自家調整試薬を用いた home-brew 検査などにおいて分析的妥当性が不十分など、検査方法が原因と考えられる場合は、後述する *RAS* 遺伝子変異を検査するための基本的要件を満たした他の検査法で再検査を行うことを推奨する。*RAS* 遺伝子変異不明例に対する抗 *EGFR* 抗体薬投与の可否は、①未検・判定不能のコドンの変異頻度、②*RAS* 遺伝子変異陽性例であった場合に抗 *EGFR* 抗体薬による治療効果が得られない可能性が高いこと、③抗 *EGFR* 抗体薬の副作用、④抗 *EGFR* 抗体薬以外の別の治療選択肢があるか、等を勘案して判断する。

表5：*RAS*遺伝子変異検査の判定例

	<i>KRAS</i> exon 2	<i>KRAS</i> exon 3	<i>KRAS</i> exon 4	<i>NRAS</i> exon 2	<i>NRAS</i> exon 3	<i>NRAS</i> exon 4	判定
Case 1	変異なし	変異なし	変異なし	変異なし	変異なし	変異なし	<i>RAS</i> 遺伝子 野生型
Case 2	変異なし	変異あり	未検・判定不能	変異なし	変異なし	未検・判定不能	<i>RAS</i> 遺伝子 変異陽性例
Case 3	変異なし	変異なし	未検・判定不能	変異なし	変異なし	未検・判定不能	<i>RAS</i> 遺伝子 変異不明例

【コメント 4】化学療法による *RAS* 遺伝子状態の変化

RAS 遺伝子変異は大腸がん発生の初期に起こる（1.1 参照）ことから、抗 *EGFR* 抗体薬を含まない化学療法後に腫瘍の *RAS* 遺伝子状態が変化することは極めてまれであると考えられる⁵¹。そのため、*RAS* 遺伝子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（詳細な検体の選定方法については 3. を参照）。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* 遺伝子変異が生じることがあり、このような新たな *RAS* 遺伝子変異が抗 EGFR 抗体薬の獲得耐性の一因となる可能性が報告されている⁵²。従って、抗 EGFR 抗体薬投与歴のある患者における最新の *RAS* 遺伝子状態を確認したい場合は、抗 EGFR 抗体薬投与後に採取された直近の腫瘍検体を用いて *RAS* 遺伝子検査を実施することが望ましい。

【サイドメモ 1】*KRAS/NRAS* 遺伝子コドン 12, 13, 59, 61, 117, 146 以外の *RAS* 遺伝子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* 遺伝子変異の部位は、*KRAS/NRAS* コドン 12, 13, 59, 61, 117, 146 である。しかしながら、今後次世代シーケンサー法の普及に伴い、稀ではあるが、上記のコドン以外の *RAS* 遺伝子異常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* 遺伝子コドン 22 のミスセンス変異や *HRAS* 遺伝子 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^{53,54}。

KRAS/NRAS 遺伝子コドン 12, 13, 59, 61, 117, 146 以外の *RAS* 遺伝子変異が検出された患者に対し、抗 EGFR 抗体薬が効果を示さないという臨床データは乏しいことから、一律に抗 EGFR 抗体薬投与の適応がないとは言えない。これらの遺伝子変異が検出された患者に対する抗 EGFR 抗体薬の適応は、①変異により生じる *RAS* タンパク質が活性の亢進を示すかどうか、②検出された *RAS* 遺伝子変異に対し抗 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 抗体薬以外の別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 2】切除可能進行再発大腸がん患者における *RAS* 遺伝子変異の臨床的意義

Stage III 結腸がんの術後補助療法として 5-FU+ロイコボリン+オキサリプラチン (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 (N0147 試験⁵⁵、PETACC-8 試験⁵⁶) において、*KRAS* 遺伝子エクソン 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、全生存期間への上乗せは認められなかった。また、切除可能同時性・異時性肝転移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 (New EPOC 試験⁵⁷) 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。以上より、切除可能進行再発大腸がんへのセツキシマブの有効性は示されていない。

一方、*RAS* 遺伝子変異の有無が切除可能進行再発大腸がんにおける予後因子かどうかは未だ議論の余地がある。*Stagell-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* 遺伝子変異陽性例と野生型で無再発生存期間、全生存期間に差はなかったという報告がある^{58,59}。一方で、*KRAS* 遺伝子変異陽性例が有意に予後不良であったという報告もある^{60,61}。また、治癒切除が行われた同時性・異時性遠隔転移患者のメタアナリシスでは、*KRAS* 遺伝子変異陽性例は野生型と比較して無再発生存期間、全生存期間が不良であったと報告されている⁶²。以上より、*RAS* 遺伝子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おらず、切除可能大腸がん患者での *RAS* 遺伝子変異検査の臨床的意義は確立されていない。

【サイドメモ 3】EGFR 発現を評価する免疫組織化学染色検査

セツキシマブは当初、免疫染色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も効能効果として「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 免疫染色は、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）として保険償還され、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ブルステイン 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⁶³、EGFR 発現強度と抗 EGFR 抗体薬の治療効果とが相関しないことが明らかになった^{6,8}。以上より、抗 EGFR 抗体薬の適応を判断するために EGFR 免疫染色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 免疫染色は推奨されていない^{39,40}。

2.1.2. RAS 遺伝子変異検査は、体外診断用医薬品を用いるなど分析的妥当性が確認された検査法により実施する。

(Strong recommendation、[SR 8 名、R 3 名])

RAS 遺伝子変異検査法

RAS 遺伝子変異を検出する検査法として、変異アレルを特異的に増幅させるアレル特異的 PCR 法や、PCR 法で複数の領域を増幅後に蛍光タイピングを用い網羅的に遺伝子変異を検出する方法 (PCR-rSSO 法) など、リアルタイム PCR 法を応用し変異を特異的に検出する手法と、腫瘍 DNA から目的遺伝子領域を増幅し、直接塩基配列を明らかにする手法 (シーケンス法) がある。現在、本邦では大腸がんに対し KRAS 遺伝子検査 (K-ras 遺伝子検査) 又は RAS 遺伝子検査がそれぞれ保険償還されている。また、KRAS 遺伝子検査ならびに RAS 遺伝子検査用に薬事承認された体外診断用医薬品が存在する ^{26,64,65} (表 6)。KRAS 遺伝子検査および RAS 遺伝子検査は抗 EGFR 抗体薬投与の適応を判断するための重要な検査であることから、薬事承認された体外診断用医薬品を用いるなど十分に分析的妥当性が確認された検査法により実施されることが推奨される。

表6: 代表的なRAS(KRAS)遺伝子変異検査法

方法	リアルタイムPCR法			ダイレクトシーケンス法
	Scorpion-ARMS法	F-PHFA法	PCR-rSSO法	
体外診断用医薬品	TheraScreen K-RAS Mutation Detection Kit	OncoGuide KRAS Mutation Detection Kit	MEBGEN™ RASKET Kit	—
KRAS遺伝子エクソン2変異	検出可能*	検出可能*	検出可能**	検出可能
KRAS遺伝子エクソン3,4変異およびNRAS遺伝子変異	検出不可	検出不可	検出可能**	検出可能
検出限界	1 %	10 %	1-5 %	10-25 %

*KRAS遺伝子のコドン12 (G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A), コドン13 (G13D) 変異、**KRAS/NRAS遺伝子のコドン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
ARMS; Amplification Refractory Mutation System, F-PHFA; FRET-based Preferential Homoduplex Formation Assay, PCR-rSSO; PCR-reverse sequence specific oligonucleotide

【コメント 1】RAS 遺伝子変異検査に最適な変異検出限界

各臨床試験で実施された RAS 遺伝子変異検査法は、ダイレクトシーケンス法 (PRIME 試験、20050181 試験、20020408 試験、PEAK 試験)、SURVEYOR 法 (PRIME 試験、20050181 試験、20020408 試験、PEAK 試験)、次世代シーケンサー法 (20020408 試験)、パイロシーケンス法 (FIRE-3 試験)、BEAMing (beads, emulsions, amplification, and magnetics)

法（OPUS 試験、CRYSTAL 試験、CALGB80405 試験）である。これらの検査法における遺伝子変異の検出限界（Limit of detection）は、ダイレクトシーケンス法で 10-25%、BEAMing 法で 1%未満（ただし OPUS 試験、CRYSTAL 試験では 5%、CALGB80405 試験では 1%にカットオフ値を設定）、それ以外の検査法は概ね 1-10%である。これらの臨床試験では、各試験によって用いられた検査法や検出限界が異なるにもかかわらず **RAS** 遺伝子変異陽性例に対して抗 **EGFR** 抗体薬が無効であることが再現されている。一方、検出された **RAS** 遺伝子変異アレル割合が 1%よりも低い患者では、抗 **EGFR** 抗体薬投与により治療効果が得られたという報告もある^{66,67}。以上から、現時点では最適な検出限界についてコンセンサスは得られていないものの、10%よりも良好な検出限界の検査法を選択して **RAS** 遺伝子変異検査を実施することが推奨される。

【コメント 2】ダイレクトシーケンス法を実施する際の留意点

ダイレクトシーケンス法（サンガー法）は、未知の遺伝子変異も検出できる利点がある一方、検出限界は腫瘍含有量で 10-25%（正常細胞の中に **RAS** 遺伝子変異を含む腫瘍細胞が 10-25%以上のとき変異が検出可能）であり、リアルタイム PCR 法と比較すると低い【コメント 1】。実際、**KRAS** 遺伝子エクソン 2 野生型と判定された患者の抗 **EGFR** 抗体薬の治療効果は、ダイレクトシーケンス法よりリアルタイム PCR 法により判定された患者において良好であったとの報告もある^{68,69}。よって、ダイレクトシーケンス法による **RAS** 遺伝子変異検査を行う場合は、腫瘍細胞の割合を高めるため、がん部をマーキングし、その後マーキング部分の腫瘍組織を手取的に採取する方法（マニュアルマイクロダイセクション）⁷⁰等を併用することが必須である。

【コメント 3】同一検体を用いた異なる検査で **RAS** 遺伝子変異検査結果が不一致の場合の取り扱い

今後、次世代シーケンサー法を用いたマルチプレックス検査の普及に伴い、「同一検体を用いて 2 つの異なる検査法にて **RAS** 遺伝子検査結果が不一致であった場合には、それぞれの検査法の確認が必要である。例えば、精度管理された複数の検査法のうちいずれかで陽性だった場合は **RAS** 遺伝子変異陽性例と判定する。体外診断用医薬品を用いた検査で **RAS** 遺伝子変異を認めず、分析的妥当性が確認されていない自家調整試薬を用いた home-brew 検査などの検査法により **RAS** 遺伝子変異が認められた場合には、検出された遺伝子変異が体外診断用医薬品を用いた検査での検出可能変異であるかどうかにより対応が異なる。検出された遺伝子変異が体外診断用医薬品を用いた検査でも検出対象となってい

る遺伝子変異の場合には、体外診断用医薬品を用いた検査結果を優先し、原則として *RAS* 野生型と判定する。検出された遺伝子変異が体外診断用医薬品を用いた検査での検出対象となっていない遺伝子変異の場合には、先述した 2.1.1. 【サイドメモ 1】を参考に抗 *EGFR* 抗体薬の適応を判断する。

【サイドメモ 1】体外診断用医薬品とコンパニオン診断薬

臨床検査法には、専ら疾病の診断に使用され、その検査の分析的妥当性および臨床的有用性が証明され薬事承認されている体外診断用医薬品を用いた検査法（いわゆる *in-vitro Diagnostics: IVD*）と研究目的にのみ使用可能な試薬（研究用試薬）や自家調整試薬を用いた方法（いわゆる *home-brew* 検査、*laboratory developed test: LDT*）がある。また、特定の医薬品の有効性や安全性を高めるために、その使用対象患者に該当するかどうかを予め検査する目的で使用する診断薬をコンパニオン診断薬（*companion diagnostics: CoDx*）という^{71,72}。コンパニオン診断薬は、付随する治療薬と同時開発されることが多く、例えば *TheraScreen KRAS* 変異検出キットはパニツムマブのコンパニオン診断薬として薬事承認された経緯がある。

【参考文献】

- 1) Yen LC, Uen YH, Wu DC, et al. Activating *KRAS* mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Ann Surg*. 2010;251:254-60.
- 2) Spano JP, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of *EGFR* expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol*. 2005;16:102-8.
- 3) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the *ErbB* signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127-37.
- 4) Hynes NE, Lane HA. *ERBB* receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:341-54.
- 5) Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:337-45.
- 6) Tahara M, Shirao K, Boku N, et al. Multicenter Phase II study of cetuximab plus irinotecan in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin and fluoropyrimidines. *Jpn J Clin Oncol*. 2008;38:762-9.
- 7) Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best

- supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:1658-64.
- 8) Muro K, Yoshino T, Doi T, et al. A phase 2 clinical trial of panitumumab monotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2009;39:321-6.
 - 9) Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:459-65.
 - 10) Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:761-74.
 - 11) <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (v77)
 - 12) Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:675-84.
 - 13) 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*. 2013;43:706-12.
 - 14) Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol*. 2011;22:1535-46.
 - 15) Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29:2011-9.
 - 16) Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*. 2011;377:2103-14.
 - 17) Tveit KM, Guren T, Glimelius B, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol*. 2012;30:1755-62.
 - 18) Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010;28:4697-705.
 - 19) Lander C, Kopit J, Awad M, et al. Analysis of K-Ras mutations in patients with metastatic colorectal cancer receiving cetuximab in combination with irinotecan: Results from the EPIC trial. 33rd ESMO Congress 2008 #385P

- 20) Peeters M, Price TJ, Cervantes A, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:4706-13.
- 21) Seymour MT, Brown SR, Middleton G, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol*. 2013;14:749-59.
- 22) Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:1757-65.
- 23) Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:1626-34.
- 24) Bando H, Yoshino T, Yuki S, et al. Clinical outcome of Japanese metastatic colorectal cancer patients harbouring the KRAS p.G13D mutation treated with cetuximab + irinotecan. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42:1146-51.
- 25) Doi T, Tahara M, Yoshino T, et al. Tumor KRAS status predicts responsiveness to panitumumab in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;41:210-6.
- 26) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369:1023-34.
- 27) 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*. 2015 Dec 15;21(24):5469-79.
- 28) Patterson SD, Peeters M, Siena S, et al. Comprehensive analysis of KRAS and NRAS mutations as predictive biomarkers for single agent panitumumab (pmab) response in a randomized, phase 3 metastatic colorectal cancer (mCRC) study (20020408). *ASCO Annual Meeting 2013 #3617*.
- 29) Seligmann JF, Elliott F, Richman SD, et al. Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2016 Feb 11. [Epub ahead of print]
- 30) Kim TW, Elme A, Kusic Z, et al. An open label, randomized phase III trial evaluating the treatment (tx) effects of panitumumab (pmab) + best supportive care (BSC) versus BSC in chemorefractory wild-type (WT) KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (mCRC) and in WT RAS mCRC. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl 4S; abstr 642)
- 31) Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2015 Jul;51(10):1243-52.

- 32) Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 1;33(7):692-700.
- 33) Kawazoe A, Shitara K, Fukuoka S, et al. A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:258.
- 34) 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*. 2015 Jan;26(1):13-21.
- 35) 大腸癌研究会編: 大腸癌治療ガイドライン—医師用 2016 年版、金原出版、東京、2016
- 36) Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Sep;15(10):1065-75.
- 37) 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*. 2014 Jul 20;32(21):2240-7
- 38) Lenz HJ, et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III Trial of Irinotecan/5-FU/Leucovorin (FOLFIRI) or Oxaliplatin/5-FU/Leucovorin (mFOLFOX6) with Bevacizumab (BV) or Cetuximab (CET) for Patients (Pts) with Untreated Metastatic Adenocarcinoma of the Colon or Rectum (MCRC): Expanded RAS analyses. ESMO2014, #501O
- 39) NCCN Guidelines for Colon/Rectal Cancer 2016 version2
- 40) Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016.
- 41) Smith G, Bounds R, Wolf H, et al. Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine. *Br J Cancer*. 2010;102:693-703.
- 42) Feig LA, Cooper GM. Relationship among guanine nucleotide exchange, GTP hydrolysis, and transforming potential of mutated ras proteins. *Mol Cell Biol*. 1988 8:2472-8.
- 43) Wang Y, Velho S, Vakiani E, et al. Mutant N-RAS protects colorectal cancer cells from stress-induced apoptosis and contributes to cancer development and progression. *Cancer Discov*. 2013;3:294-307.
- 44) Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Res*. 2010;70:5901-11.
- 45) Tejpar S, Celik I, Schlichting M, et al. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in

- patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol.* 2012;30:3570-7.
- 46) Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol.* 2013;31:759-65.
 - 47) 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.* 2016 Mar;55:122-30.
 - 48) Schirripa M, Loupakis F, Lonardi S, et al. Phase II study of single-agent cetuximab in KRAS G13D mutant metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2015 Dec;26(12):2503.
 - 49) 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.* 2016 Apr 25. [Epub ahead of print]
 - 50) 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.* 2010 ;11:753-62.
 - 51) Kawamoto, Tsuchihara K, Yoshin T, et al. KRAS mutations in primary tumors and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2012;107:340-4.
 - 52) Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature.* 2012;486:532-6.
 - 53) Palmirotta R, Savonarola A, Formica V, et al. A novel K-ras mutation in colorectal cancer. A case report and literature review. *Anticancer Res.* 2009;29:3369-74.
 - 54) Biodot 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.* 2016;31:1245-6.
 - 55) 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.* 2012 Apr 4;307(13):1383-93.
 - 56) 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.* 2014 Jul;15(8):862-73.
 - 57) 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.* 2014 May;15(6):601-11.
- 58) 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.* 2009 Dec 1;15(23):7322-9.
- 59) 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.* 2010 Jan 20;28(3):466-74.
- 60) 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.* 2014 Jun 1;20(11):3033-43.
- 61) 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.* 2014 Dec;25(12):2378-85.
- 62) Brudvik KY, Kopetz SE, Li L, et al. Meta-analysis of KRAS mutations and survival after resection of colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2015;102:1175-83.
- 63) Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 2005;23:1803-10.
- 64) 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.* 2015;2:317-23.
- 65) Kitano S, Nakayama M, Yamane A, et al. Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay. *Anal Biochem.* 2011;408:197-205.
- 66) 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.* 2011;17:1087-97.
- 67) Tougeron D, Lecomte T, Pagès JC, et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2013;24:1267-73.
- 68) Shan L, Li M, Ma J, Zhang H. PCR-based assays versus direct sequencing for evaluating the effect of KRAS status on anti-EGFR treatment response in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014 Sep 26;9(9):e107926.
- 69) Bando H, Yoshino T, Tsuchihara K, et al. KRAS mutations detected by the amplification refractory mutation system-Scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *Br J Cancer.*

2011;105:403-6.

- 70) Franklin WA, Haney J, Sugita M, et al. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. J Mol Diagn. 2010;12:43-50.
- 71) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長：コンパニオン診断薬等及び関連する医薬品の承認申請に係る留意事項について、薬食審査発 0701 第 10 号、平成 25 年 7 月 1 日
- 72) Food and Drug Administration, Guidance for industry and Food and Drug Administration Staff: In Vitro Companion Diagnostic Devices, July 2014

2.2. BRAF 遺伝子変異検査

2.2.1. 切除不能進行再発大腸がん患者に対し一次治療開始前に *BRAF V600E* 遺伝子変異検査を実施することを推奨する。
(Recommendation、[SR 3 名、R 7 名])

BRAF タンパク質と BRAF 遺伝子変異

BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) タンパク質は、766 個のアミノ酸から成る約 74kDa のセリンスレオニンキナーゼであり、ARAF (A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)、CRAF (Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase, RAF-1) などとともに RAF ファミリーと呼ばれる¹。BRAF タンパク質は、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 タンパク質と直接結合し、BRAF や CRAF と二量体を形成することで活性化され、下流の MEK-ERK 経路を活性化して、細胞増殖や生存に関わる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 遺伝子変異が認められることが初めて報告され³、悪性黒色腫 (43%)、甲状腺がん (27%)、胆道がん (14%) など頻度が高いことが知られている⁴。BRAF 遺伝子変異によりアミノ酸置換が生じると、上流の RAS タンパク質からの刺激の有無にかかわらず MEK-ERK 経路など下流タンパク質に恒常的な活性化が生じる。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とされる (2.1 RAS 遺伝子変異検査 図 1: 大腸がん と EGFR シグナル伝達経路を参照)⁵。

大腸がんにおける BRAF V600E 遺伝子変異の頻度と臨床病理学的特徴

大腸がんにおける BRAF 遺伝子変異の頻度は、COSMIC データベースによれば 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⁶。なお、2005 年頃まで、この変異は文献によっては p.V599E 変異として報告しているので注意が必要である。*BRAF* V600E 遺伝子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、Stage I-II と比較すると Stage III-IV でやや頻度が高い傾向がある（表 1）^{7,8}。本邦での大腸がんにおける *BRAF* V600E 遺伝子変異の頻度は、4.5-6.7%と報告されており⁹⁻¹¹、欧米からの報告（5-12%）¹²⁻¹⁴と比較してやや低い。大腸がんにおける *KRAS/NRAS* 遺伝子変異と *BRAF* V600E 遺伝子変異とは相互排他的であるとされている。

また、*BRAF* V600E 遺伝子変異陽性例は、野生型と異なる臨床病理学的特徴をもつことが知られている。25 研究 11955 例の大腸がんを対象とした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、ミスマッチ修復機能欠損例（「2.3 ミスマッチ修復機能欠損に対する検査」参照）において *BRAF* V600E 遺伝子変異の頻度が高いことが報告されている（表 2）¹⁵。

表1: Stage別*BRAF* V600E遺伝子変異の頻度

	Stage	N	Frequency		Stage	N	Frequency
Phipps AI, et al. ⁷ N=1980	Localized	785	12.1 %	Ogura T, et al. ⁸ 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遺伝子変異の頻度¹⁵

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

切除不能進行再発大腸がんにおける *BRAF* 遺伝子変異の臨床的意義

2005 年、Samowitz らは 901 例の大腸がん患者のコホート研究から、*BRAF* V600E 遺伝子変異陽性例は、*BRAF* 遺伝子野生型と比較して予後不良であることを報告した¹⁶。2009 年には切除不能進行再発大腸がん一次療法としてカペシタビン+オキサリプラチン(CapeOX)+ベバシズマブ療法と CapeOx+ベバシズマブ+セツキシマブ療法とを比較した第 III 相試験 (CAIRO-2 試験) の解析にて、いずれの治療群においても *BRAF* V600E 遺伝子変異陽性例では、無増悪生存期間、全生存期間が有意に不良であることが報告された¹⁷。その後も、*BRAF* V600E 遺伝子変異陽性例は *BRAF* 遺伝子野生型と比較して予後不良であることが再現性をもって示されており (表 3)^{14,18-23}、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%信頼区間 1.82-2.83) と報告されている²⁴。切除不能進行再発大腸がん一次化学療法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 遺伝子変異陽性例の生存期間は、*BRAF* 遺伝子野生型と比較して大きく劣ることが示されている (表 4)^{25,26}。本邦においても、切除不能進行再発大腸がん患者の解析において、*BRAF* V600E 遺伝子変異陽性例では予後不良であることが報告されている⁹。

表3: *BRAF* V600E遺伝子変異陽性例の治療成績 (第III相試験)

Study	Gene status	Regimen	N	RR	PFS	HR	OS (M)	HR
CAIRO-2 ¹⁷	<i>BRAF</i> WT	CapeOX+Bmab	243	50	12.2	-	24.6	-
		CapeOx+Bmab+Cmab	231	48	10.4		21.5	
	<i>BRAF</i> MT	CapeOX+Bmab	17	35	5.9		15.0	
		CapeOx+Bmab+Cmab	28	39	6.6		15.2	
FOCUS ¹⁸	<i>BRAF</i> WT	5-FU, Irinotecan+5-FU or Oxaliplatin+5-FU	634	-	-	HR 1.14 (p=0.37)	-	HR 1.82 (p=0.0002)
	<i>BRAF</i> MT		54	-	-		-	
CRYSTAL ¹⁹	<i>KRAS/BRAF</i> WT	FOLFIRI	289	42.6	8.8	-	21.6	-
		FOLFIRI+Cmab	277	61.0	10.9		25.1	
	<i>BRAF</i> MT	FOLFIRI	33	15.2	5.6		10.3	
		FOLFIRI+Cmab	26	19.2	8.0		14.1	
COIN ²⁰	<i>RAS/BRAF</i> WT	Chemo±Cmab	581	-	9.0	-	20.1	-
	<i>BRAF</i> MT		102	-	5.6		8.8	
MAX ²¹	<i>BRAF</i> WT	Cape, Cape+Bmab or Cape+Bmab+MMC	280	-	8.2	HR 1.25 (p=0.26)	20.8	HR 2.04 (p=0.001)
	<i>BRAF</i> MT		33	-	4.5		8.6	
NORDIC VII ¹⁴	<i>BRAF</i> WT	FLOX±Cmab	402	-	8.3	HR 2.08 (p<0.001)	22.0	HR 2.89 (p<0.001)
	<i>BRAF</i> MT		55	-	5.1		9.5	
PRIME ²²	<i>RAS/BRAF</i> WT	FOLFOX4	218	-	9.2	-	20.9	-
		FOLFOX4+Pmab	228	-	10.8		28.3	
	<i>BRAF</i> mutant	FOLFOX4	29	-	5.4		9.2	
		FOLFOX4+Pmab	24	-	6.1		10.5	

WT; 野生型, MT; 変異陽性例, Cape; カペシタビン, MMC; マイトマイシン, Pmab; パニツムマブ, Cmab; セツキシマブ, Bmab; ベバシズマブ, 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,

表4: **BRAF V600E**遺伝子変異陽性例の治療成績（統合解析）

	Regimen	n	PFS (M)	HR	OS (M)	HR
Venderbosch S, et al. ²⁵	<i>BRAF</i> WT	2813	7.7	HR 1.34 (p=0.001)	17.2	HR 1.91 (p=0.001)
	<i>BRAF</i> MT	250	6.2		11.4	
Modest DP, et al. ²⁶	<i>RAS/BRAF</i> WT	664	10.3	HR 2.19 (p<0.001)	26.9	HR 2.99 (p<0.001)
	<i>BRAF</i> MT	74	7.4		11.7	

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

BRAF V600E 変異陽性の切除不能進行再発大腸がんに対する一次治療は、**BRAF** 野生型と同じ治療が行われてきた（**BRAF V600E** 変異陽性例に対する抗 **EGFR** 療法の効果については【コメント1】参照のこと）。しかし最近、大腸がん一次治療として **5-FU**+ロイコボリン+オキサリプラチン+イリノテカン（**FOLFOXIRI**）+ベバシズマブ療法と **5-FU**+ロイコボリン+イリノテカン（**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）²³。また、**BRAF V600E** 変異陽性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²⁷。これらの結果を踏まえ、欧州のガイドラインでは、**BRAF V600E** 遺伝子変異陽性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推奨されている²⁸。

以上、切除不能進行再発大腸がんでは、**BRAF V600E** 変異陽性例は、野生型と比較して極めて予後不良であることが再現性をもって示されている。切除不能進行再発大腸がん診断された際に **BRAF V600E** 遺伝子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、治療選択の点からも有益であると考えられる。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** 遺伝子変異の有無を検査することが推奨される（保険償還状況に関しては6.1参照のこと）。

表5: 一次治療としてのFOLFOXIRI+Bmab療法の治療成績

		Regimen	n	RR (%)	PFS (M)	HR	OS (M)	HR
TRIBE ²³	RAS/BRAF WT	FOLFIRI+Bmab	45	60	12.2	HR 0.85	33.5	HR 0.77
		FOLFOXIRI+Bmab	48	65	13.7		41.7	
	RAS MT	FOLFIRI+Bmab	119	55	9.5	HR 0.78	23.9	HR 0.88
		FOLFOXIRI+Bmab	117	66	12.0		27.3	
	BRAF MT	FOLFIRI+Bmab	12	42	5.5	HR 0.57	10.7	HR 0.54
		FOLFOXIRI+Bmab	16	56	7.5		19.0	
Loupakis F, et al. ²⁷	BRAF MT	FOLFOXIRI+Bmab	25	72	11.8	-	24.1	-

WT; 野生型, MT; 変異陽性例, 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,

【コメント 1】 BRAF V600E 遺伝子変異陽性例に対する抗 EGFR 抗体薬の効果

BRAF V600E 遺伝子変異陽性の切除不能進行再発大腸がんに対する、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 遺伝子変異陽性例の場合と同様に、BRAF V600E 変異陽性例に対しても、抗 EGFR 抗体薬は効果が乏しいことが報告された²⁹。しかし、その後に抗 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、BRAF V600E 遺伝子変異陽性例ではやはり抗 EGFR 抗体薬の効果は期待できないとする報告と、BRAF V600E 遺伝子変異陽性例に対しては RAS 遺伝子変異陽性例と異なり、抗 EGFR 抗体薬の治療効果がある程度期待できるとする、相反した報告がなされている (表 6)^{19,20,22,30-34}。また、これら抗 EGFR 抗体併用群と非併用群を比較したランダム化比較試験試験のメタアナリシスでも、BRAF V600E 遺伝子変異陽性例では抗 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³⁵、KRAS/BRAF 遺伝子野生型と同様に抗 EGFR 抗体薬の治療効果が期待できるとする報告もある³⁶。

以上より、RAS/BRAF 遺伝子野生型と比較して、BRAF V600E 遺伝子変異陽性例では抗 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 遺伝子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 NCCN ガイドラインでは、BRAF V600E 遺伝子変異陽性例では抗 EGFR 抗体薬の治療効果は、ほとんど期待できない (highly unlikely) ことから Stage IV 大腸がんと診断された時点で BRAF V600E 遺伝子変異検査の実施が推奨されている³⁷。一方、以上のエビデンスから、BRAF V600E 遺伝子変異陽性例に対して、抗 EGFR 抗体薬投与が全く無効とまでは結論することもできない。よって、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されることが想定される。

表6： **BRAF**遺伝子変異の有無と抗**EGFR**抗体薬の効果

Study	Regimen	Gene Status	n	PFS	OS
PRIME ²² (1 st line)	FOLFOX4 vs. FOLFOX4+Pmab	RAS/BRAF WT	436	HR 0.68 (p=0.002)	HR 0.74 (p=0.02)
		BRAF MT	53	HR 0.58 (p=0.12)	HR 0.90 (p=0.76)
20050181 ³⁰ (2 nd line)	FOLFIRI vs. FOLFIRI+Pmab	RAS/BRAF WT	376	HR 0.68 (p=0.006)	HR 0.83 (p=0.15)
		BRAF MT	45	HR 0.69 (p=0.34)	HR 0.64 (p=0.20)
PICCOLO ³¹ (2 nd line)	Iri vs. Iri+Pmab	RAS/BRAF/PIK3CA WT	323	HR 0.68	HR 0.92
		BRAF MT	68	HR 1.40	HR 1.84
20100007 ³² (3 rd line)	BSC vs. BSC+Pmab	RAS/BRAF WT	242	HR 0.45 (p<0.001)	HR 0.75 (p=0.044)
		BRAF MT	20	HR 0.28 (p=0.050)	HR 0.39 (p=0.160)
CRYSTAL+OPUS ³³ (1 st line)	Chemo [*] vs. Chemo+Cmab	KRAS/BRAF WT	730	HR 0.64 (p<0.0001)	HR 0.84 (p=0.048)
		BRAF MT	70	HR 0.67 (p=0.38)	HR 0.62 (p=0.076)
COIN ²⁰ (1 st line)	Chemo ^{**} vs. Chemo+Cmab	RAS/BRAF WT	571	HR 0.93 (p=0.41)	HR 1.02 (p=0.86)
		BRAF MT ^{**}	102	HR 1.14 (p=0.54)	HR 1.18 (p=0.46)
FIRE-3 ³⁴ (1 st line)	FOLFIRI+Bmab vs. FOLFIRI+Cmab	RAS/BRAF WT	342	HR 0.93 (p=0.54)	HR 0.70 (p=0.011)
		BRAF MT	48	HR 0.87 (p=0.65)	HR 0.87 (p=0.65)

^{*}FOLFIRI (CRYSTAL試験)もしくはFOLFOX4 (OPUS試験)、^{**}CapeOxもしくは5-FU/LV+オキサリプラチン。BRAF D594遺伝子変異14例を含む。
WT; 野生型, MT; 変異陽性例, PFS; 無増悪生存期間, HR; ハザード比, OS; 全生存期間。

【サイドメモ 1】切除可能大腸がんにおける **BRAF** 遺伝子変異検査の臨床的意義

BRAF V600E 遺伝子変異の有無が切除可能大腸がんにおける予後因子かどうかについては、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** 遺伝子変異陽性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) と報告されており³⁸、**BRAF V600E** 遺伝子変異は再発リスク因子となることが報告されている。一方、治癒切除が行われた肝転移例において **BRAF V600E** 遺伝子変異陽性例では、**BRAF** 遺伝子野生型と比較して有意に無再発生存期間、全生存期間が不良であったという報告もあるが³⁹、比較的小規模なコホートでの検討に過ぎない。また、切除可能大腸がんに対する補助化学療法としての抗 **EGFR** 抗体薬の有効性は証明されておらず⁴⁰⁻⁴²、**BRAF V600E** 遺伝子変異陽性例に対しても同様に、抗 **EGFR** 抗体薬の投与は考慮されない。

以上より、**BRAF V600E** 遺伝子変異の有無が、治癒切除後の補助化学療法や転移巣切除の適応など治療選択において考慮されるべきか、コンセンサスが得られていない。よって、現時点で切除可能大腸がんに対する **BRAF V600E** 遺伝子検査の臨床的意義は確立していないと考えられる。なお、米国の NCCN ガイドラインでは、治療方針を決定するための精密検査 (work up) として、同時性肝転移を有する Stage IV 大腸がんにおいても、**BRAF V600E** 遺伝子検査が推奨されている³⁷。

【サイドメモ 2】 **V600E** 変異以外の **BRAF** 遺伝子変異陽性例の取り扱い

近年、大腸がんにおける V600E 以外の *BRAF* 変異（Non-V600E 変異）に関する報告が相次いでいる。抗 EGFR 抗体薬療法が行われた治療抵抗性の切除不能進行再発大腸がん 184 例の観察研究では、7 例（4.7%）に *BRAF* non-V600E 遺伝子変異を認め、*BRAF* V600E 遺伝子変異陽性例と同様に予後不良であると報告された⁴³。一方、*BRAF* V600E 遺伝子変異陽性例と *BRAF* non-V600E 遺伝子変異陽性例では、臨床病理学的特徴や予後が異なるという報告も散見される^{44,45}。現時点では、V600E 変異以外の *BRAF* 遺伝子変異陽性例の予後、臨床病理学的特徴や抗 EGFR 抗体薬の治療効果について、コンセンサスは得られていない。

Confidential

2.2.2. BRAF V600E 遺伝子検査は、ダイレクトシーケンス法（マニュアルマイクロダイセクション併用）やリアルタイム PCR 法などにより実施することを推奨する。

（Recommendation、[SR 2 名、R 7 名、ECO 1 名]）

BRAF V600E 遺伝子検査法

配列特異的蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法（ハイブリダイゼーション法）やダイレクトシーケンス法は、**BRAF V600E** 遺伝子変異の検査法として推奨される。主な臨床試験で実施された **BRAF V600E** 遺伝子変異の検査法は、ダイレクトシーケンス法（CAIRO-2 試験¹⁷、PRIME 試験²²、20100007 試験³²）、SURVEYOR 法（PRIME 試験）、次世代シーケンサー法（20020408 試験⁴⁶）、パイロシーケンス法（COIN 試験²⁰、TRIBE 試験²³、FOCUS 試験¹⁸）、MALDI MS 法（COIN 試験¹⁷、TRIBE 試験²³）、リアルタイム PCR クランピング法（CRYSTAL 試験¹⁹、NORDIC-VII 試験¹⁴）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では変異アレル頻度 10-25%^{47,48}、それ以外の検査法は概ね 1-10%^{49,50}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** 遺伝子変異陽性例では予後不良であることが一貫して示されていることを考慮すれば、検出限界 1-10%の検査法を選択して **BRAF** 遺伝子検査を実施することが推奨される。なお、ダイレクトシーケンス法（サンガー法）は、2.1.2 RAS 遺伝子検査法【コメント 2】ダイレクトシーケンス法を実施する際の留意点、に則して検査を実施することが必要である。

表7:各臨床試験で用いられたBRAF V600E**遺伝子変異検査法**

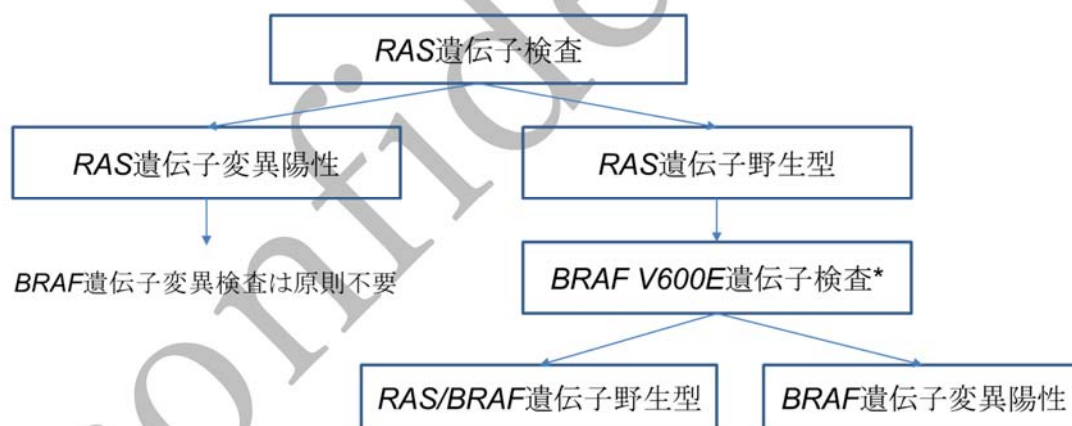
試験名	検査法	症例数	BRAF V600E 遺伝子変異陽性の頻度
CAIRO-2 ¹⁷	ダイレクトシーケンス法	519	8.7%
FOCUS ¹⁸	パイロシーケンス法	711	7.9%
CRYSTAL ¹⁹	リアルタイムPCRクランピング法	999	6%
COIN ²⁰	パイロシーケンス法 MALDI MS法	1316	8%
MAX ²¹	HRMシーケンス法	315	10.6%
NORDIC-VII ¹⁴	Wobble-enhanced ARMS法 リアルタイムPCRクランピング法	457	12 %
PRIME ²²	ダイレクトシーケンス法 Wave-based Surveyor 法	641*	8%
TRIBE ²³	パイロシーケンス法 MALDI MS法	508	5.5%

*KRASエクソン2遺伝子野生型

【コメント 1】 *RAS* 遺伝子検査と *BRAF* V600E 遺伝子検査のタイミング

切除不能進行再発大腸がんにおける *BRAF* V600E 遺伝子変異の有無は、化学療法の実施や治療レジメン選択に大きく影響する。また、*BRAF* V600E 遺伝子変異陽性例は一般的に病勢進行が早く、早急な化学療法開始を必要とする患者も少なくないため、検体提出日から 2 週間以内を目処に担当医に結果が返却されることが望ましい。*RAS* 遺伝子検査未実施の患者では、*RAS* 遺伝子検査と *BRAF* V600E 遺伝子検査の同時実施、もしくは *RAS* 遺伝子野生型と判明した場合に担当医の判断を仰ぐことなく *BRAF* V600E 遺伝子検査が実施（いわゆるリフレックステスト【サイドメモ 2】）されることが推奨される（図 1）。*RAS* 遺伝子野生型と判明しているが *BRAF* V600E 遺伝子検査が未実施の切除不能進行再発大腸がん患者では、必要に応じて *BRAF* V600E 遺伝子検査を実施する。既知の *RAS* 遺伝子変異陽性例では、*KRAS*/*NRAS* 遺伝子変異と *BRAF* 遺伝子変異が概ね相互排他的であることを考慮すると、*BRAF* V600E 遺伝子変異が認められる可能性は極めて低いことから、*BRAF* V600E 遺伝子検査の追加実施は原則不要と考えられる。

図1： *RAS* 遺伝子検査と *BRAF* V600E 遺伝子検査の流れ



*リフレックステスト（病理医や主治医の判断を得ることなく同じ検体で実施するテスト）として実施しても良い

【サイドメモ 1】 コンパニオン診断としての *BRAF* 遺伝子検査

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 遺伝子変異（V600E 変異 90%、V600K 変異 10%）が認められる^{51,52}。*BRAF* V600 遺伝子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^{53,54}、本邦でも *BRAF* V600 遺伝子変異陽性の悪性黒色腫に対する治療薬として、*BRAF* 阻害薬ベムラフェニブ、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診断

薬（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** キットが体外診断用医薬品として薬事承認されている。現在、悪性黒色腫に対し **BRAF** 阻害薬投与の適応を判断することを目的としたリアルタイム PCR 法による **BRAF** 遺伝子変異検査は、区分番号「D004-2」悪性腫瘍組織検査「ヌ」**BRAF** 遺伝子検査 6,520 点として保険償還されている。

切除不能進行再発大腸がんにおいても、**BRAF V600E** 遺伝子変異陽性例を対象に、**BRAF** 阻害薬と抗 **EGFR** 抗体薬の併用療法の治療開発が行われており、複数の早期臨床試験で有望な結果が報告されている^{55,58}。細胞株を用いた基礎的検討では、**BRAF** 遺伝子野生型細胞株に **BRAF** 阻害薬を添加すると細胞増殖が促進されとの報告もある⁵⁷ことから、**BRAF** 遺伝子野生型患者への **BRAF** 阻害薬投与は適切ではない。従って、将来的に **BRAF** 阻害薬の適応を判別するための **BRAF V600E** 遺伝子検査が実施される際には、コンパニオン診断薬、体外診断用医薬品など分析的妥当性が確認された検査法により検査されるべきである。

【サイドメモ 2】リフレックステスト

リフレックステストとは、最初の検査が実施された同一検体で異なる検査を実施することである。例えば、胃がん/乳がんにおける抗 **HER2** 抗体薬の適応を判断するための **HER2** 検査では、IHC 法で 2+ (equivocal) と判定された場合には *in situ* ハイブリダイゼーション法 (*in situ hybridization* : ISH) を用いたリフレックステストが推奨されている。この場合の ISH 検査は担当医の判断を仰ぐことなく病理医の判断で実施することができる。このように、どのような検査結果が得られた際にリフレックステストを実施するかについて予め決められるべきである（リフレックスルール）⁵⁸。

【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*. 1983;80:4218-22.
- 2) Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003 ;15:463-9.
- 3) Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
- 4) Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;;7:295-308. Review.
- 5) Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by

oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):855-67.

- 6) <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
- 7) 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*. 2012;21:1792-8.
- 8) Ogura T, Kakuta M, Yatsuoka T, et al. Clinicopathological characteristics and prognostic impact of colorectal cancers with NRAS mutations. *Oncol Rep*. 2014;32:50-6.
- 9) Yokota T, Ura T, Shibara N, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011;104:856-62.
- 10) 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*. 2013;18:1042-8.
- 11) Kawazoe A, Shitara K, Fukuoka S, et al. A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:258.
- 12) 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*. 2011;117:4623-32.
- 13) 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*. 2010;11:753-62.
- 14) Tveit KM, Guren T, Glimelius B, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol*. 2012;30:1755-62.
- 15) Chen D, Huang JF, Liu K, et al. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Mar 3;9(3):e90607.
- 16) Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res*. 2005;65:6063-9.
- 17) Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:98-9.
- 18) Richman SD, Seymour MT, Chambers P, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2009;27:5931-7.

- 19) Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29:2011-9.
- 20) Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*. 2011;377:2103-14.
- 21) Price TJ, Hardingham JE, Lee CK, et al. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:2675-82.
- 22) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369:1023-34.
- 23) 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*. 2015;16:1306-15.
- 24) Safaee Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, et al. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47054.
- 25) 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*. 2014;20:5322-30.
- 26) 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*. 2016 Jun 29. pii: mdw261. [Epub ahead of print]
- 27) Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2014;50:57-63.
- 28) Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016.
- 29) Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5705-12.
- 30) 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. 2015;21:5469-79.

- 31) Seymour MT, Brown SR, Middleton G, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. Lancet Oncol. 2013 Jul;14(8):749-59.
- 32) Kim TW, Elme A, Kusic Z, et al. Final results from a phase III trial evaluating panitumumab (pmab) + best supportive care (BSC) vs BSC in chemorefractory wild-type (WT) KRAS exon 2 and WT RAS metastatic colorectal cancer (mCRC). J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3536)
- 33) Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. Eur J Cancer. 2012;48:1466-75.
- 34) Heinemann V, et al. Analysis of KRAS /NRAS and BRAF Mutations in FIRE-3: A Randomized Phase III Study of FOLFIRI plus Cetuximab or Bevacizumab as First-line Treatment for Wild-type KRAS (exon 2) Metastatic Colorectal Cancer Patients. ESMO 2013 #LBA17
- 35) Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. Eur J Cancer. 2015 ;51:587-94.
- 36) 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. 2015 Jun 9;112(12):1888-94.
- 37) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Colon/Rectal Cancer 2016. Version 2.2016
- 38) 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. 2016 May 3;11(5):e0154795.
- 39) 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. 2015 Jun 9;112(12):1921-8.
- 40) 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. 2012;307:1383-93.
- 41) 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. 2014;15:862-73.

- 42) 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.* 2014;15:601-11.
- 43) Yamazaki K, Yoshino T, Tsuchihara K, et al. Clinical impact of expanded BRAF mutational status on the outcome for metastatic colorectal cancer patients with anti-EGFR antibody: An analysis of the BREAC trial (Biomarker Research for Anti-EGFR Monoclonal Antibodies by Comprehensive Cancer Genomics). *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl 3; abstr 573)
- 44) Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol.* 2015 ;26:2092-7.
- 45) Jones JC, Kipp B, Leal AD, et al. Commonality and clinical, pathological, and prognostic characteristics of non-V600E BRAF mutations (BRAFMut) in metastatic colorectal cancers (mCRC) compared to V600 BRAFMut CRCs. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 3529)
- 46) 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.* 2013;19:1902-12.
- 47) Løes IM, Immervoll H, Angelsen JH, et al. Performance comparison of three BRAF V600E detection methods in malignant melanoma and colorectal cancer specimens. *Tumour Biol.* 2015;36:1003-13.
- 48) Arcila M, Lau C, Nafa K, et al. Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping. *J Mol Diagn.* 2011;13:64-73.
- 49) Ihle MA, Fassunke J, König K, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer.* 2014;14:13.
- 50) Fumagalli D, Gavin PG, Taniyama Y, et al. A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes. *BMC Cancer.* 2010;10:101.
- 51) Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2135-47.
- 52) Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, et al. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci.* 2015;80:33-7.
- 53) Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507.
- 54) Flaherty KT, Infante JR, Daud A, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF

V600 mutations. N Engl J Med 2012;367:1694-1703.

- 55) Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition with dabrafenib and trametinib in BRAF V600-mutant colorectal cancer. J Clin Oncol. 2015;33:4023-31.
- 56) Tabernero J, Geel RV, Guren TK, et al. Phase 2 results: Encorafenib (ENCO) and cetuximab (CETUX) with or without alpelisib (ALP) in patients with advanced BRAF-mutant colorectal cancer (BRAFM CRC). J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3544)
- 57) Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. Nature. 2010;464:431-5.
- 58) Schink JC, Trosman JR, Weldon CB et al. Biomarker testing for breast, lung, and gastroesophageal cancers at NCI designated cancer centers. J Natl Cancer Inst 2014; 106.

Confidential

2.3 ミスマッチ修復機能欠損に対する検査

2.3.1. リンチ症候群が疑われる大腸がん患者に対し腫瘍組織を用いたミスマッチ修復機能欠損に対する検査を実施する。

(Strong recommendation、[SR 8 名、R 2 名])

2.3.2. ミスマッチ修復機能欠損に対する検査はマイクロサテライト不安定性検査、およびミスマッチ修復タンパク質免疫染色である。

(Strong recommendation、[SR 9 名、R 1 名])

リンチ症候群におけるミスマッチ修復機能欠損に対する検査の臨床的意義

リンチ症候群 (Lynch syndrome) は、主にミスマッチ修復 (Mismatch repair: MMR) 遺伝子である *MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2* の生殖細胞系列変異を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^{1,2}、患者および家系内に大腸がん、子宮内膜がんをはじめ、さまざま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いる。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 機能が損なわれる。その結果、ゲノムの単純な反復配列であるマイクロサテライト領域に反復回数の異常（不安定性）が好発するようになる。このような 1-数塩基の単純な反復配列は、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産物（タンパク質）をコードする領域に含まれているため、これらの領域の遺伝子異常が積み重なることによりがん化に結びつくと考えられている。

MMR 機能欠損に対する検査には、マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability: MSI) 検査および MMR タンパク質免疫染色がある。MSI 検査はマイクロサテライト領域の反復回数異常に伴うマイクロサテライトの長さの違いを調べることにより【コメント 1】、MMR タンパク質免疫染色は MMR 遺伝子産物（タンパク質）が消失しているかどうかを調べることにより【コメント 2】、腫瘍における MMR 機能が欠損していないかどうかを判別する。リンチ症候群の大腸がんでは 90% 以上に高度または高頻度 MSI (high-frequency MSI: MSI-H) を認める一方³、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%³⁻⁵、本邦報告では 6-7% であり^{6,7}、MSI 検査はリンチ症候群におけるスクリーニングとして

有用である。また、MMR タンパク質免疫染色も MSI 検査との一致率は 90%、リンチ症候群のスクリーニングにおける偽陰性率は 5-10%と報告されていることから^{1,8}、スクリーニングに用いられる。従って、リンチ症候群が疑われる大腸がん患者に対して、本疾患を鑑別するため MSI 検査または MMR タンパク質免疫染色を実施する【コメント 3】。本邦の遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版⁹では、臨床情報にてアムステルダム基準 II¹⁰ (表 1) または改訂ベセスダガイドライン¹¹ (表 2) 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) 【コメント 4】。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⁹を参照されたい。

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⁹ 一部改変)

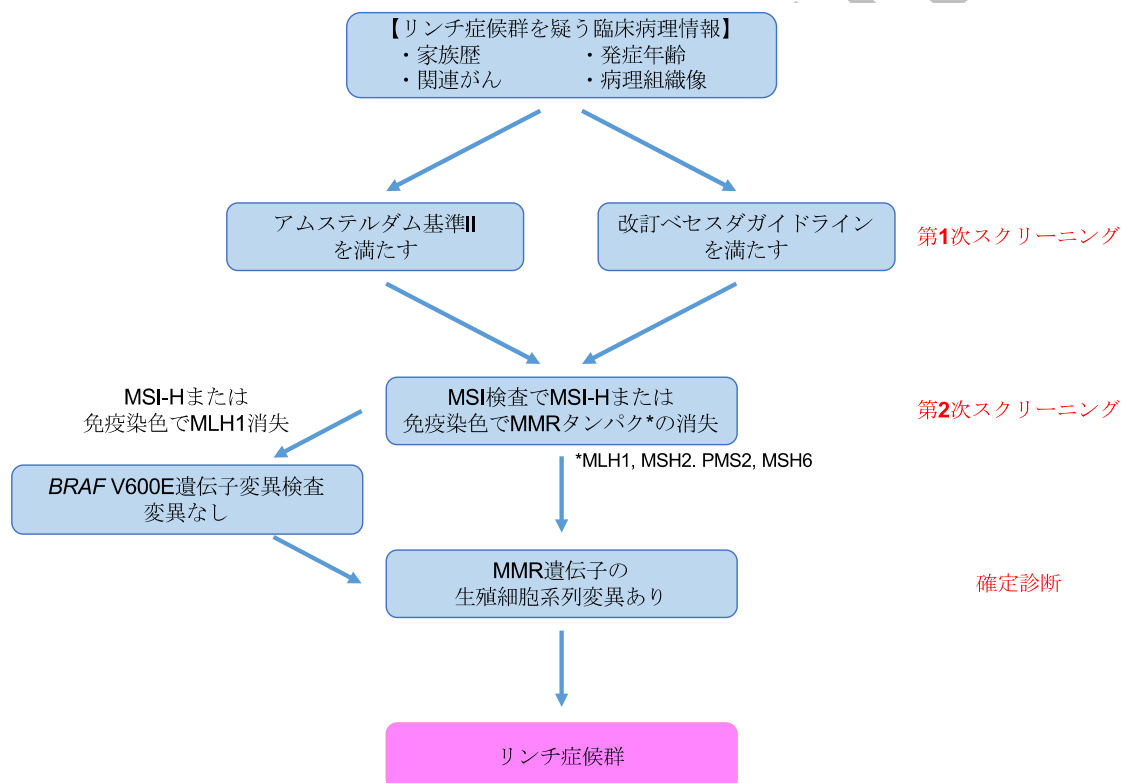


表 1 アムステルダム基準 II (1999) ¹⁰

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: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, **FAP: familial adenomatous polyposis

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

【コメント 1】 MSI 検査

これまで MSI 検査には、1塩基の繰り返しマーカー2種類と2塩基の繰り返しマーカー3種類を組み合わせたベセスダパネル (表 3) が一般的に用いられてきた。本検査では、正常組織 (血液検体で代用可能) と腫瘍組織におけるマイクロサテライトの長さを比較し、腫瘍組織でマイクロサテライトの長さが変化している場合を MSI 陽性と判定し、MSI 陽性が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 (low-frequency MSI)、いずれのマーカーにおいても認められない場合を MSS (Microsatellite stable) と判定する (図 2)。MSI-H では腫瘍における MMR 機能が欠損、MSI-L/MSS では保持されていると判断する。MSI-L は MSS と比較し KRAS 変異や methylguanine methyltransferase のメチレーションの頻度など分子生物学的な特徴が異なるとの報告もあるが、予後など臨床的な面では同様と考えられている ¹²。なお、MSI 検査にて一部のマーカーが検査不能であった場合、他の2つ以上のマーカーで MSI 陽性が確認

されていれば **MSI-H**、4 つのマーカーで **MSI** 陽性を認めず、残り 1 つのマーカーが検査不能であった場合は **MSI-L** または **MSS** と判定されるが、それ以外の場合は判定不能となる(表 4)。判定不能の場合、検査不能の原因が検体不良であると考えられる場合には、可能な限り保存腫瘍組織の再提出や新たな腫瘍組織の採取を試みる、あるいは現行の組織での **MMR** タンパク質免疫染色を考慮する。検査方法が原因と考えられる場合は、他のパネルの使用や **MMR** タンパク質免疫染色を実施するなど、他の検査方法を試みる。

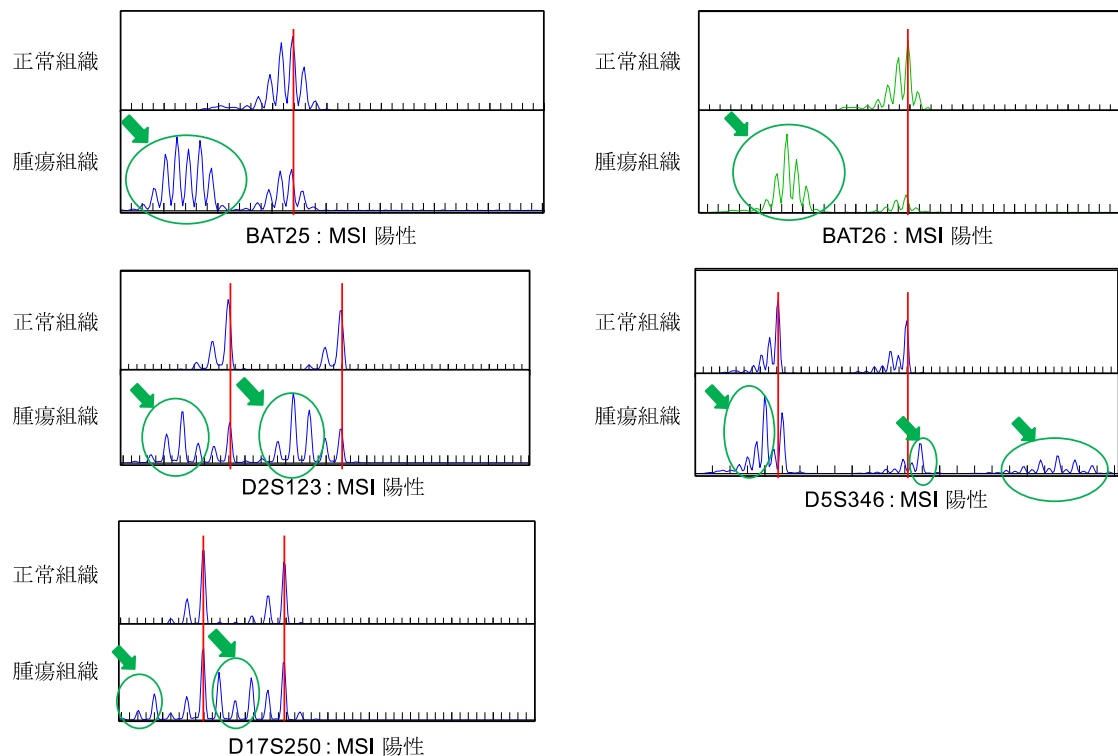
ベセスダパネルを用いた **MSI** 検査の欠点として、2 塩基の繰り返しマーカーは 1 塩基の繰り返しマーカーと比較し感度が劣っていることが挙げられる。そのため、改訂ベセスダガイドラインでは 2 塩基の繰り返しマーカーのみで **MSI-L** と判定された患者に対しては、**BAT40** や **MYCL** などの異なるマーカーによる追加検査が推奨されている¹¹。さらに、ベセスダパネルを用いた **MSI** 検査で注意すべき点として、**MSH6**、**PMS2** に生殖細胞系列変異があるリンチ症候群では、**MSI-H** を示さないことが挙げられる^{13,14}。最近、1 塩基の繰り返しマーカーのみで構成されるパネル (**Pentaplex**、**Promega**) の開発が進んでおり(表 3)、これらのパネルではベセスダパネルと比較して **MSI-H** の判定における感度が同等もしくは高いこと、そして腫瘍組織のみで検査が可能であることが報告され臨床導入が進んでいる¹⁵⁻²²。

本邦では、**MSI** 検査はリンチ症候群が疑われる大腸がん患者を対象とする悪性腫瘍遺伝子検査として 2006 年度に保険償還されている。

表 3 各種パネルの概要

ベセスダパネル		Pentaplexパネル		Promegaパネル	
マーカー名	配列構造	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	BAT25	1塩基繰り返し
BAT26	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	NR21	1塩基繰り返し
D5S346	2塩基繰り返し	NR22	1塩基繰り返し	NR24	1塩基繰り返し
D17S250	2塩基繰り返し	NR24	1塩基繰り返し	MONO27	1塩基繰り返し

図2 ベセスダパネルを用いた MSI-H 患者（5 つ全てのマーカーで MSI 陽性）



正常なマイクロサテライトのサイズ（赤い線）に対し、腫瘍組織では正常と異なるサイズのマイクロサテライト（緑で囲まれた波形）が見られる。このパターンをマイクロサテライト不安定性（MSI）陽性と判定する。（横軸：塩基長bp、縦軸：シグナル強度）

表4 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

【コメント 2】 MMR タンパク質免疫染色

MMR タンパク質（MLH1、MSH2、MSH6、PMS2）の腫瘍組織における発現を免疫染色によって調べる検査である。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種類のタンパク質全てが発現しているが、MMR 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 遺伝子に対応したタンパク質が消失する。腫瘍における MMR 機能の欠損、保持という観点から、MSI-H や MMR タンパク質消失を dMMR (MMR deficient)、MSI-L/MSS や MMR タンパク質発現を pMMR (MMR proficient) と表現する。

個々の MMR 遺伝子異常とタンパク質の消失は1対1対応とはならず、*MLH1* 遺伝子変異は *MLH1* に加えて *PMS2*、*MSH2* 遺伝子変異は *MSH2* に加えて *MSH6* の消失をとめない、多くは表4のような染色パターンを示す。表4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⁹を参照されたい。

リンチ症候群のスクリーニング検査として MMR タンパク質免疫染色、MSI 検査どちらが適切であるかについては一定の見解が得られていない。しかしながら、免疫染色は安価かつ簡便であり、リンチ症候群の原因遺伝子を推定することが可能であることから、本邦でも実施する施設が増加しつつある。

表4 MMRタンパク質に対する免疫染色と疑われる変異遺伝子

		免疫染色での発現			
		MLH1	MSH2	PMS2	MSH6
変異遺伝子	<i>MLH1</i>	-	+	-	+
	<i>MSH2</i>	+	-	+	-
	<i>PMS2</i>	+	+	-	+
	<i>MSH6</i>	+	+	+	-

【コメント3】MSI 検査、MMR タンパク質免疫染色の説明同意について

リンチ症候群が疑われる患者に対して、スクリーニング検査として MSI 検査、または MMR タンパク質免疫染色を実施する際には、遺伝性のがんである可能性について、検査の目的・方法、検査結果が得られた場合の対応などについて十分な説明と同意が必要である。日本家族性腫瘍学会ホームページ (<http://jsft.umin.jp/>) およびリンク先に参考資料が公開されているので参照されたい。

また、これらのスクリーニング検査で陽性であった場合は、確定診断のために MMR 遺伝子に対する遺伝学的検査が必要となる。遺伝学的検査を実施する前後には、遺伝性疾患特

有の注意点や配慮すべき点があるため、必ず遺伝カウンセリングを実施し遺伝学的検査の同意を確認しなければならない。詳細は遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版⁹を参照されたい。

【コメント 4】 MSI-H、MMR タンパク質の消失と *BRAF V600E* 遺伝子変異

前述の通り MSI 検査や MMR タンパク質免疫染色はリンチ症候群のスクリーニングに有用ではあるが、MSI-H はリンチ症候群だけに特異的ではなく、散发性大腸がんにおいても認められる。散发性大腸がんで MSI-H を示す主な原因は、*MLH1* 遺伝子のプロモーター領域の後天的な異常メチル化であり、このような腫瘍では免疫染色で *MLH1* タンパク質の消失を認める。また、MSI-H を示す大腸がんの 35-43% に *BRAF V600E* 遺伝子変異を認めるが²³、リンチ症候群の大部分の大腸がんは MSI-H を示しても、*BRAF V600E* 遺伝子変異はほとんど認めない。したがって、MSI 検査にて MSI-H を示した場合、または MMR タンパク質免疫染色にて *MLH1* タンパク質の消失を認めた場合は *BRAF V600E* 遺伝子検査を追加することで、リンチ症候群が疑われる患者なのか、それとも MSI-H の散发性大腸がんなのかの鑑別の一助になる（図 1）。ただし、*PMS2* に変異があるリンチ症候群の大腸がんの一部では *BRAF V600E* 遺伝子変異を認めることが報告されており注意が必要である。

【サイドメモ 1】 リンチ症候群に対するユニバーサル・スクリーニングについて

近年、欧米では Stage に関わらず、すべて（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 タンパク質免疫染色を行うユニバーサル・スクリーニングがリンチ症候群の診断に関し、費用対効果の高い方法として推奨され、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^{24,25}。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いない。

2.3.3. 治癒切除が行われた Stage II 結腸がん患者に対し腫瘍組織を用いたミスマッチ修復機能欠損に対する検査を実施することを推奨する。
(Recommendation、[R 7 名、ECO 3 名])

Stage II 大腸がんにおけるミスマッチ修復機能欠損に対する検査の臨床的意義

欧米における Stage II 結腸がんの dMMR の頻度は 15-22%²⁶⁻²⁸、本邦の後方視的な検討では 6-10%^{7,29}と報告されている。

Stage II/III 大腸がんを対象に術後 5-FU 療法と手術単独を比較した QUASAR 試験の後解析において、dMMR 大腸がんは pMMR 大腸がんと比較し有意に再発リスクが低く (11% vs 26%; risk ratio 0.53, 95%信頼区間 0.40-0.70, $p<0.001$)、さらに Stage II 結腸がんのみを対象とした解析においてはさらにその傾向が強いことが示された (8% vs 21%; risk ratio 0.44, 95%信頼区間 0.29-0.67, $p<0.001$)²⁶。また 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において、Ribic らは手術単独群では MSI-H 結腸がんは MSI-L/MSS 結腸がんと比較して全生存期間が有意に良好であるが、術後 5-FU 療法群では MSI-H と MSI-L/MMS との間で全生存期間に有意差は認めず、MSI-L/MSS 結腸がんでは術後 5-FU 療法の有効性を認めるものの、MSI-H 結腸がんでは術後 5-FU 療法の有効性は認められず、逆に悪い傾向にあることを報告した (表 1)³⁰。同様のメタアナリシスにおいて Sargent らは dMMR 結腸がんでは pMMR 結腸がんと比較し再発リスクが有意に低いこと、術後 5-FU 療法の有効性は pMMR の Stage III 結腸がんに対してのみ認められ、逆に dMMR の Stage II 結腸がんでは術後 5-FU 療法群で再発リスクが高い傾向にあることを示した (表 2)³¹。一方、Stage II/III 結腸がんを対象に実施された MOSAIC 試験では、術後 5-FU 療法に対するオキサリプラチンの上乗せ効果は dMMR、pMMR いずれにも認められた³²。以上の結果より、dMMR は Stage II/III、特に Stage II 結腸がんにおける再発および予後予測因子として認識されている。さらに、dMMR を有する Stage II/III 結腸がんにおける術後 5-FU 療法の有効性を示唆する報告もあるものの^{33,34}、多くは術後 5-FU 療法が無効、あるいは再発リスク、予後を悪化させることを示唆する報告であり、dMMR は術後 5-FU 療法無効因子と認識されている。従って、治癒切除が行われた Stage II 結腸がん患者に対する再発・予後予測目的、さらに術後補助化学療法を考慮する患者【コメント 1】に対しては術後 5-FU 療法無効予測因子として MSI 検査または MMR タンパク質免疫染色を実施することを推奨する 2.3.2. 【コメント 2】。

表 1 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 (Ribic ら) ³⁰

全生存期間				
	手術単独 MSI-H vs MSI-L/MSS	術後5-FU療法 MSI-H vs MSI-L/MSS	MSI-H 術後5-FU療法 vs 手術単独	MSI-L/MSS 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

表 2 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 (Sargent ら) ³¹

無病生存期間						
	手術単独 dMMR vs pMMR	術後5-FU療法 dMMR vs pMMR	dMMR Stage II 術後5-FU療法 vs 手術単独	dMMR Stage III 術後5-FU療法 vs 手術単独	pMMR Stage II 術後5-FU療法 vs 手術単独	pMMR Stage III 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

【コメント 1】 Stage II 結腸がんに対する術後補助化学療法について

Stage II 結腸がんに対する術後補助化学療法の有効性には未だ議論の余地があるものの、QUASAR 試験など術後補助化学療法の有用性を示唆する報告もある ³⁵⁻³⁷。特に Stage II 患者のうち、T4、低分化腺がん、印環細胞がん、粘液がん、脈管侵襲、リンパ管侵襲、傍神経浸潤、未分化がん、腸閉塞または穿孔発症、検索リンパ節個数 12 個未満などの再発リスク因子をもつ患者の予後は不良と考えられ、術後補助化学療法による再発抑制効果が示唆される報告もあることから ^{38,39}、本邦の大腸癌治療ガイドライン医師用 2014 年版でも「Stage II のなかでも予後不良なサブグループに的を絞って補助化学療法を行うという戦略は、現時点で妥当な選択と考えられ、当面は上述のリスク因子を参考として術後補助化学療法の適応を検討することが望まれる」と記載されている。現時点でこれら全てが同様に再発リスク因子であるかどうかは明確になっていないが、これらのリスク因子を有する患者に対して術後補助化学療法を企図する場合、dMMR であれば無効、あるいは予後を悪化させる可能性を考慮し、術後 5-FU 単剤療法は推奨されない。pMMR であれば、期待される効果、予測される有害事象を鑑みて無治療、5-FU 単剤療法、オキサリプラチン併用療法のいずれか選択するといった戦略は現時点では妥当と思われる。

【コメント 2】 MSI 検査、MMR タンパク質免疫染色の説明同意について

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検査の目的が予後予測や術後補助化学療法を選択のためであること、②検査費用が保険償還されてないこと（患者負担、施設負担など検査費用に関する各施設の対応を含む）、③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①-③の内容を説明し同意を得たことをカルテに明記する。なお、検査結果によりリンチ症候群が強く疑われる場合もあるため、自施設で遺伝カウンセリングができない場合は、あらかじめ遺伝カウンセリングが実施できる施設と連携することを確認して対応する。検査結果によりリンチ症候群が強く疑われる場合の対応は遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版⁹を参照されたい。

【サイドメモ 1】 Stage II/III 結腸がんにおける MSI、MMR ステータスと BRAF V600E 遺伝子変異について

Gavin らが実施した NSABP C-07、C-08 の統合解析において、Stage II/III 結腸がんにおける BRAF V600E 遺伝子変異は、dMMR で 35.3%、pMMR で 11.5%に認められた⁴⁰。本解析において、dMMR は pMMR と比較して有意に再発リスクが少なく、予後が良好であること、また BRAF V600E 遺伝子変異陽性例は野生型と比較して再発リスクには有意差は認めないが、再発後生存および全生存期間が有意に不良であることが報告された。さらに、MMR ステータスと BRAF V600E 遺伝子変異ステータスをあわせた解析では dMMR/ BRAF V600E 遺伝子野生型の予後が最も良好で、続いて dMMR/ BRAF V600E 遺伝子変異陽性例および pMMR/ BRAF V600E 遺伝子野生型、最も予後が不良だったのは pMMR/ BRAF V600E 遺伝子変異陽性例であり（5 年生存率 各々 89.7%、84%、82.1%、69.1%）、Stage II/III 結腸がんにおける BRAF V600E 遺伝子変異は dMMR および pMMR における予後不良因子であることが報告されている。

【サイドメモ 2】 Stage III 結腸がんにおける MMR 機能欠損に対する検査について

欧米における Stage III 結腸がんの dMMR の頻度は 12-14%^{27,28}、本邦の頻度は後方視的検討において約 5%と報告されている^{7,29}。Zaanan らは後方視的検討において、Stage III 結腸がんにおける MSI-H は予後良好因子であること、さらに術後補助療法としてオキサリプラチン併用療法は 5-FU 単剤療法と比較して有意に再発が少なかったと報告している^{41,42}。また、最近では Stage III 結腸がんを対象に術後 FOLFOX 療法にセツキシマブの上乗せを検

討した N0147 試験、PETACC8 試験の統合解析において、MSI-H は再発・予後予測因子とはならなかったが、MSS における検討において、*BRAF* V600E 遺伝子変異、および *KRAS* exon2 遺伝子変異を有する患者は、有意に再発リスクが高く予後が不良であり、再発および予後予測因子となり得る可能性が示唆された^{43,44}。今後、本邦における検討が望まれる。

【サイドメモ 3】Stage II/III 直腸がんにおける MMR 機能欠損に対する検査について

dMMR を有する大腸がんは右側結腸に多いとされ、実際 QUASAR 試験においても dMMR の頻度は右側結腸で 26% (179/695) と最も高く、左側結腸や直腸では各々わずか 3% (22/685)、1% (3/407) と低頻度である²⁶。同様に本邦における Stage I-IV 大腸がんの後方視的検討においても、右側結腸の MSI-H の頻度 13% (36/275) と比較し左側結腸 4% (12/271)、直腸 2% (7/394) と低頻度である⁷。そのため、Stage II/III 直腸がんを対象とした MMR ステータスの検討はほとんどなく、その検査の意義は明確になっていない。

**2.3.4. 切除不能進行再発大腸がん患者に対し一次治療開始前に腫瘍組織を用いたミスマッチ修復機能欠損に対する検査を実施することを考慮する。
(Expert consensus opinion、[ECO 10 名])**

切除不能進行再発大腸がんにおけるミスマッチ修復機能欠損に対する検査の臨床的意義

病期の進行に伴い dMMR の頻度は低くなり、欧米の報告では Stage IV 大腸がんにおける頻度は 5-11%と報告されている^{45,46}。本邦では全国規模のがん関連遺伝子異常のスクリーニングプロジェクト (GI-SCREEN) や後方視的検討により、その頻度は約 2%と報告されている^{7,47}。Stage II/III とは異なり、Tran らは豪州、米国の 2 施設における Stage IV 大腸がんを対象とした後方視的検討において MSI-H は MSS と比較して予後が不良であること (11.1 ヶ月 vs 21.1 ヶ月、 $P=0.001$)、また Venderbosch らも切除不能進行再発大腸がんを対象に化学療法の有効性を検討した 4 つの第 III 相試験の統合解析において dMMR は pMMR と比較して予後が不良であること (13.6 ヶ月 vs 16.8 ヶ月、HR 1.35、95%信頼区間 1.13-1.61) を報告した^{45,46}。両報告ともに *BRAF* V600E 遺伝子変異ステータスとあわせた解析が実施され (表 1)、MMR ステータスにかかわらず *BRAF* V600E 遺伝子変異が強

い予後不良因子であること、一方 **BRAF V600E** 遺伝子野生型では pMMR と比較し dMMR は予後不良な傾向にあることを示した。従って、切除不能進行再発大腸がんに対し一次治療を開始する際には予後予測を目的として **BRAF V600E** 遺伝子検査とあわせて MSI 検査もしくは MMR タンパク質免疫染色を実施することを考慮する。

一方、切除不能進行再発大腸がんに対する化学療法の選択に関してミスマッチ修復機能欠損に対する検査の意義は明らかではない。表 1 に示すとおり、**BRAF V600E** 遺伝子野生型において dMMR は pMMR と比較し無増悪生存期間が短い傾向にあるが、無治療と比較した検討ではないため現状の化学療法そのものが無効であるとは結論づけることはできない。実際、これまでに報告された論文のシステマティックレビューにおいて MSI-H は MSS と比較して化学療法による奏効率が良好な傾向にある (Odds ratio 0.81、95%信頼区間 0.65-1.03) との報告や⁴⁸、5-FU に抵抗性となった後の 2 次治療としてのイリノテカンの奏効率が MSI-H で良好であったとの報告もある⁴⁹。従って、MMR ステータスにかかわらず切除不能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。

表 1 Stage IV、切除不能進行再発大腸がんにおける MSI/MMR、**BRAF V600E** 遺伝子変異ステータス別の全生存期間、無増悪生存期間

		BRAFMT		BRAFWT		MSI-H/dMMR		MSS/pMMR	
		MSI-H /dMMR	MSS /pMMR	MSI-H /dMMR	MSS /pMMR	BRAFMT	BRAFWT	BRAFMT	BRAFWT
Tran B ⁴⁵	MST	8.0	8.2	17.2	26.6	8.0	17.2	8.2	25.5
	HR	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	0.363		0.021		0.011		<0.001	
Venderbosch S ⁴⁶	MST	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)	
	P	-		-		-		-	
	mPFS	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)	
	P	-		-		-		-	

MST: median survival time (生存期間中央値)、mPFS: median progression-free survival (無増悪生存期間中央値)

【コメント 1】MSI 検査、MMR タンパク質免疫染色の説明同意について

2.3.3. 【コメント 2】参照のこと。

【サイドメモ 1】MSI-H 切除不能大腸がんに対する抗 PD-1 抗体について。

dMMR 大腸がんでは、tumor microenvironment を構成する各種細胞（免疫系細胞や腫瘍細胞）において PD-1、PD-L1、CTLA-4 などの免疫チェックポイント分子が pMMR と比較

し高発現していることが知られている⁵⁰。最近、MSI-H 切除不能進行再発大腸がん対して、免疫チェックポイント阻害薬の一つである抗 PD-1 抗体の有望な結果が報告されている。2015 年の ASCO (American society clinical oncology) annual meeting において、ペンブロリズマブは既治療の MSI-H 大腸がん、および MSS 大腸がんを対象とした第 II 相試験で、奏効率が MSI-H (10 例) 40%、MSS (25 例) 0%、無増悪生存期間中央値は各々 5.0 ヶ月、2.2 ヶ月⁵¹、2016 年の ASCO annual meeting における MSI-H 大腸がん 28 例の報告でも、奏効率は 57%、観察期間中央値 9.3 ヶ月時点で無増悪生存期間中央値は未到達と有望な成績を示した⁵²。ニボルマブも 2016 年の ASCO annual meeting において、既治療の MSI-H 切除不能進行再発大腸がん 70 例で、奏効率 25.5%、無増悪生存期間中央値 5.3 ヶ月と同様に有望な結果を示し、現在臨床開発が進行中である⁵³。

【参考文献】

- 1) Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). N Engl J Med 2005; 352: 1851-1860.
- 2) Barrow E, Hill J, Evans DG. Cancer risk in Lynch Syndrome. Fam Cancer 2013; 12: 229-240.
- 3) Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. Cancer Res 1994; 54: 1645-1648.
- 4) 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 1998; 338: 1481-1487.
- 5) Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol 2003; 21: 1174-1179.
- 6) 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 2004; 216: 55-62.
- 7) 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 2009; 30: 494-499.
- 8) Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. J Mol Diagn 2008; 10: 293-300.
- 9) 遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016 年版
- 10) Vasen HF. Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. J Clin Oncol 2000; 18: 81S-92S.
- 11) Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis

- colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 261-268.
- 12) Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers* 2004; 20: 199-206.
- 13) Clendenning M, Senter L, Hampel H et al. A frame-shift mutation of PMS2 is a widespread cause of Lynch syndrome. *J Med Genet* 2008; 45: 340-345.
- 14) Shia J, Zhang L, Shike M et al. Secondary mutation in a coding mononucleotide tract in MSH6 causes loss of immunoexpression of MSH6 in colorectal carcinomas with MLH1/PMS2 deficiency. *Mod Pathol* 2013; 26: 131-138.
- 15) Suraweera N, Duval A, Reperant M et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002; 123: 1804-1811.
- 16) Buhard O, Suraweera N, Lectard A et al. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 2004; 20: 251-257.
- 17) Ebinger M, Sotlar K, Weber A et al. Simplified detection of microsatellite instability in colorectal cancer without the need for corresponding germline DNA analysis. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1114-1115.
- 18) Soreide K. Molecular testing for microsatellite instability and DNA mismatch repair defects in hereditary and sporadic colorectal cancers--ready for prime time? *Tumour Biol* 2007; 28: 290-300.
- 19) Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One* 2010; 5: e9393.
- 20) Xicola RM, Llor X, Pons E et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 244-252.
- 21) Murphy KM, Zhang S, Geiger T et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol Diagn* 2006; 8: 305-311.
- 22) Patil DT, Bronner MP, Portier BP et al. A five-marker panel in a multiplex PCR accurately detects microsatellite instability-high colorectal tumors without control DNA. *Diagn Mol Pathol* 2012; 21: 127-133.
- 23) Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2004; 108: 237-242.

- 24) 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* 2012; 226: 764-774.
- 25) 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* 2008; 103: 2825-2835; quiz 2836.
- 26) 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* 2011; 29: 1261-1270.
- 27) 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. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29: 3153-3162.
- 28) 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; 28: 466-474.
- 29) 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* 2016.
- 30) 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. *The New England journal of medicine* 2003; 349: 247-257.
- 31) Sargent DJ, Marsoni S, Monges G et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; 28: 3219-3226.
- 32) Andre T, de Gramont A, Vernerey D et al. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4176-4187.
- 33) Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS et al. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007; 25: 767-772.

- 34) Elsaleh H, Joseph D, Grieu F et al. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000; 355: 1745-1750.
- 35) Gray R, Barnwell J, McConkey C et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 2007; 370: 2020-2029.
- 36) Mamounas E, Wieand S, Wolmark N et al. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *J Clin Oncol* 1999; 17: 1349-1355.
- 37) McKenzie S, Nelson R, Mailey B et al. Adjuvant chemotherapy improves survival in patients with American Joint Committee on Cancer stage II colon cancer. *Cancer* 2011; 117: 5493-5499.
- 38) Morris EJ, Maughan NJ, Forman D, Quirke P. Who to treat with adjuvant therapy in Dukes B/stage II colorectal cancer? The need for high quality pathology. *Gut* 2007; 56: 1419-1425.
- 39) Kumar A, Kennecke HF, Renouf DJ et al. Adjuvant chemotherapy use and outcomes of patients with high-risk versus low-risk stage II colon cancer. *Cancer* 2015; 121: 527-534.
- 40) 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; 18: 6531-6541.
- 41) Zaanan A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloix A et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2010; 21: 772-780.
- 42) Zaanan A, Flejou JF, Emile JF et al. Defective mismatch repair status as a prognostic biomarker of disease-free survival in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 7470-7478.
- 43) Zaanan A, Shi Q, Taieb J et al. Analysis of DNA mismatch repair (MMR) and clinical outcome in stage III colon cancers from patients (pts) treated with adjuvant FOLFOX +/- cetuximab in the PETACC8 and NCCTG N0147 adjuvant trials. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 3506)
- 44) Taieb J, Madeleine KL, Penault-Llorca FM et al. Prognostic value of *BRAF* V600E and *KRAS* exon 2 mutations in microsatellite stable (MSS), stage III colon cancers (CC) from patients (pts) treated with adjuvant FOLFOX +/- cetuximab: A pooled analysis of 3934 pts from the PETACC8 and N0147 trials. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 3507)

- 45) 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* 2011; 117: 4623-4632.
- 46) 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* 2014; 20: 5322-5330.
- 47) Kajiura T, Shitara K, 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, 2016 (suppl; abstr 3573)
- 48) Des Guez 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* 2009; 29: 1615-1620.
- 49) Fallik D, Borriani 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* 2003; 63: 5738-5744.
- 50) 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 discovery* 2015; 5: 43-51.
- 51) Le DT, Uram JN, Wang H et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372: 2509-2520.
- 52) Le DT, Uram JN, Wang H et al. Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 103)
- 53) Overman MJ, Kopetz S, McDermott RS et al. Nivolumab ± ipilimumab in treatment (tx) of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) with and without high microsatellite instability (MSI-H): CheckMate-142 interim results. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 3501)

3. 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 HE 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。

(Strong recommendation、[SR 11 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、HE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。また、腫瘍由来の血漿中遊離DNAや血液循環腫瘍細胞などを検体とした遺伝子検査の妥当性や有用性については、今後の検討課題であり、「5. 現在開発中の検査技術と展望」を参照されたい。

部位の選択

RAS 遺伝子変異、BRAF 遺伝子変異、ミスマッチ修復機能欠損は、その腫瘍を形成するのにきわめて重要な役割を果たし、腫瘍発生の早期に獲得されと考えられている。そのため、原発巣と転移巣とは遺伝子変異・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¹。

組織検体の選択

HE染色標本上で腫瘍細胞と正常細胞（間質細胞）の比率を検討し、用いる検出法の検出感度以上の腫瘍細胞が存在することを確認できた検体のみを用いるべきである。検体によっては、マニュアルマイクロダイセクション等を併用し腫瘍細胞の比率を高め、必要腫瘍細胞量を確保してもよい。生検材料などの腫瘍細胞の選択的な採取が難しい場合には、検出限界以下の腫瘍細胞量の検体は用いないようにする。

腫瘍細胞量と同時に、組織学的に想定される核酸の質が保たれた腫瘍細胞を用いるべきである。適切に固定されていれば多くの場合核酸の質は保たれるが、それぞれの病理診断部門での適正化の努力が望まれる。組織学的にアポトーシスや壊死を起こしている部分は

材料としては適さない。また、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。

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。

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。各医療施設での病理標本固定条件（ホルマリン濃度、中性緩衝/非緩衝、浸漬時間、固定組織の大きさや分割の仕方など）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。固定液としては、10%中性緩衝ホルマリンが推奨される²。

また、固定時間は組織の大きさによるが、6-48時間以内に完了する必要がある。長時間固定を行っても、表層部から固定が進むため、なかなか内部は固定されない。そのため、1週間を超えて外科標本をそのまま浸漬固定しても十分な固定は得られない。また、薄切後の未染標本でも経時的劣化が認められるため、薄切後できるだけ早くDNA抽出を行う²。

【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* 遺伝子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）^{3,4}。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。また、大腸がんは同時性、異時性の多発がんが少なくない。従って、治療対象となる転移巣からの組織が得られる場合には転移巣を検査することが好ましいとするガイドラインもある

(http://www.amp.org/committees/clinical_practice/CRCOpenComment.cfm)。

【コメント 2】 核酸の質の確認について

固定不足は免疫染色での反応性を低下させるが核酸に与える影響は少なく、過固定は免疫染色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^{5,6} (REFS)。固定不良は形態学的に容易に同定できるが、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、免疫染色ともに通常と同等の結果が得られる。

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* 遺伝子変異の相違のまとめ (Baas ら³ に一部加筆)

Study	n	Frequency of <i>KRAS</i> mutation in primary tumor	Site of metastasis	Overall concordance	<i>KRAS</i> testing method
Krijn et al. (2011) ⁴	305	35%	Liver, 100%	96%	Sequencing
Melucci et al. (2010) ⁷	62	37%	Not specified	94%	Sequencing
Italiano et al. (2010) ⁸	59	39%	Not specified	95%	Sequencing
Baldus et al. (2010) ⁹	75	41%	Lymph node, 73%; other (27%)	76%	Sequencing and pyrosequencing
Cejas et al. (2009) ¹⁰	110	34%	Liver, 83%; lung, 17%	94%	Sequencing
Molinari et al. (2009) ¹¹	37	43%	Liver, 74%; other, 26%; lymph node, 41%	92%	Sequencing
Loupakis et al. (2009) ¹²	43	40%	Not specified	95%	Sequencing
Garm Spindler et al. (2009) ¹³	31	29%	Not specified	94%	Sequencing
Santini et al. (2008) ¹⁴	99	38%	Liver, 81%; lung, 7%; other, 12%	96%	Sequencing
Artale et al. (2008) ¹⁵	48	27%	Liver, 81%; other, 19%	94%	Sequencing
Etienne-Grimaldi et al. (2008) ¹⁶	48	33%	Liver, 100%	100%	PCR-RFLP
Perrone et al. (2009) ¹⁷	10	20%	Not specified	80%	Sequencing
Albanese et al. (2004) ¹⁸	30	47%	Liver, 100%	70%	SSCP
Zauber et al. (2003) ¹⁹	42	52%	Lymph node, 93%; liver, 5%; mesentery, 2%	100%	SSCP
Thebo et al. (2000) ²⁰	20	100%	Lymph node, 100%	80%	AS-PCR
Schimanski et al. (1999) ²¹	22	95%	Liver, 100%	95%	PCR-RFLP
Al-Mulla et al. (1998) ²²	47	34%	Lymph node, NR; liver, NR	83%	ASO
Finkelstein et al. (1993) ²³	NR	35%	Not specified	100%	Sequencing
Losi et al. (1992) ²⁴	18	83%	Liver, 33%; other, 67%	100%	AS-PCR
Suchy et al. (1992) ²⁵	66	21%	Not specified	100%	ASO
Oudejans et al. (1991) ²⁶	31	42%	Lung, liver	87%	ASO

【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* 2012; 61: 1117-1124.
- 2) http://www.iccls.org/techreport/bestpractice_guideline.pdf
- 3) 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* 2011; 16: 1239-1249.

- 4) 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* 2011; 104: 1020-1026.
- 5) Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1016-1019.
- 6) 横田知哉、谷田部恭、セツキシマブの効果予測因子としてのKRAS遺伝子測定における検体の取扱い。
医学のあゆみ 228(13): 1237 -1241 2009
- 7) Melucci E, Conti S, Diodoro M et al. Relationship between K-Ras mutational status and EGFR expression evaluated using Allred score in primary and metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(15 suppl):3568.
- 8) 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* 2010;17:1429 –1434.
- 9) 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* 2010;16:790–799.
- 10) Cejas P, López-Gómez 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* 2009;4:e8199.
- 11) 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* 2009;100:1087–1094.
- 12) 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* 2009;27:2622–2629.
- 13) 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* 2009;20: 879–884.
- 14) 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. *The Oncologist* 2008;13:1270 – 1275.
- 15) 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* 2008;26:4217– 4219.

- 16) 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* 2008;14:4830–4835.
- 17) Perrone F, Lampis A, Orsenigo M et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2009;20:84 –90.
- 18) 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* 2004;325:784 –791.
- 19) 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* 2003;56:137–140.
- 20) 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* 2000;43:155–159; discussion 159–162.
- 21) Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res* 1999;59:5169 –5175.
- 22) 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* 1998;185:130–138.
- 23) Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S et al. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer* 1993;71:3827–3838.
- 24) Losi L, Benhattar J, Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1992;28A:1115–1120.
- 25) Suchy B, Zietz C, Rabes HM. K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: Relation to aneuploidy and metastasis. *Int J Cancer* 1992;52: 30–33.
- 26) 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* 1991;49:875– 879.

4. 検査の質保証

大腸がん診療における遺伝子関連検査は、質保証されたシステムのもとで実施する。

(Strong recommendation、[SR 11 名])

検査の質保証の要件

検査の質保証の要件は、施設認証、検査自体、検査従事者の水準・資格、職員に関する教育及びリスクマネジメントの観点から考える必要がある。検査施設は国際規格である ISO15189（臨床検査室-品質と能力に関する特定要求事項）や米国病理学会（CAP: College of American Pathologists）などによる外部認定を取得・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望ましい。検査自体の質保証、検査従事者の質保証に関しては、「OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing」、「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」¹（以下、ベストプラクティスガイドライン）に準拠して行われるべきである。

質保証に必要な検討項目

検査は、標準操作手順書（SOP）を作製したうえで実施する。経済産業省「遺伝子検査ビジネス実施事業者の遵守事項」の中では、SOP に記載すべき基本項目を以下のように記載されており、各検査室でも参考にすることが望ましい。

- ① 検査室の温度及び湿度条件
- ② 検査室において検体を受領するときの取扱いに関する事項
- ③ 測定の実施方法
- ④ 管理試料及び標準物質の取扱い方法
- ⑤ 検査用機械器具の操作方法
- ⑥ 測定に当たっての注意事項
- ⑦ 正常参考値及び判定基準（形態学的検査及び画像認識による検査の正常像及び判定基準を含む。）
- ⑧ 異常値を示した検体の取扱い方法（再検査の実施基準を含む。）
- ⑨ 精度管理の方法及び評価基準
- ⑩ 測定作業日誌の記入要領
- ⑪ 作成及び改定年月日

結果報告書に必要な記載項目

ベストプラクティスガイドラインの中では、遺伝子検査の結果報告書には最低限、以下の情報を含めることが求められており、これを参照されることが望ましい。

1. 被検者識別情報
2. 医師等検査依頼者の氏名とその連絡先
3. 検査の適用理由と、検査実施に必要な被検者の医学的情報
4. 実施した検査と方法（解析の範囲、検査の限界及び解析感度と特異性を含む）
5. 検体の種類
6. 検体採取日と受領日
7. 検体の状態に関する情報（必要に応じて、添加物、輸送や保存の状態等）
8. その検体を実際に検査した施設（再外注された場合は検査施設を含む）の名称と所在地
9. 検査結果（検査結果の中間報告を行った場合は、その内容を最終報告に反映させる。）
10. 検査結果の解釈に必要な情報（報告書には、臨床的意義を含めた適切な医学的解釈を記載するとともに、依頼元に対して十分な情報提供に努めること。）
11. 報告書の作成者及び最終責任者の所属、役職、氏名
12. 検査施設の連絡先情報
13. 報告書の発行日

検査室での結果の一致率（**concordance rate**）を指し、これが高いことが求められている。

【参考文献】

- 1) 「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」 特定非営利活動法人 JCCLS 日本臨床検査標準協議会 JCCLS 遺伝子関連検査標準化専門委員会（平成 28 年 3 月）

5. 現在開発中の検査技術と展望

5.1 次世代シーケンス法による包括的遺伝子検査

次世代シーケンス法による包括的遺伝子検査は、大腸がん患者に対し複数の遺伝子検査を同時に実施する際の有用なツールとなる。

がんゲノム医療の現状とマルチプレックス遺伝子検査の必要性

がん領域では、個々のゲノム情報に基づき、より効果的・効率的な診断や治療を行うゲノム医療の実用化が急速に進んでいる。実際、非小細胞肺腺がんでは、*EGFR* 遺伝子変異、*ALK* 遺伝子異常、*ROS1* 遺伝子異常、*RET* 遺伝子異常など、患者ごとの治療標的となるドライバー遺伝子異常に応じた分子標的治療の有効性が確立されている。切除不能進行再発大腸がん患者に対して、本ガイドランスでは *KRAS/NRAS* 遺伝子、*BRAF V600E* 遺伝子、*MSI* 検査という複数の遺伝子検査を推奨している。この場合、結果判明に要する時間や検査に使用する DNA 量の観点から、それぞれの検査を順々に実施するよりも、同時に複数の遺伝子異常を同定できるマルチプレックス検査が望ましい。それぞれの検査結果が治療方針の決定に大きく影響することを考慮すれば、これら複数の検査を、一度に実施可能なマルチプレックス遺伝子検査が必要である。

大腸がんに対する次世代シーケンス法による包括的遺伝子検査

次世代シーケンス法（Next generation sequencing; NGS 法）は超並列シーケンスの原理に基づき 2005 年頃以降に実用機が登場した塩基配列解析法である。サンガー法とキャピラリーシーケンサーを組み合わせた従来法と比較して、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った¹⁻²。現在汎用されているシーケンシング原理は、逐次の合成法（sequencing by synthesis, SBS）などである。ゲノム DNA の全長を解析する全ゲノムシーケンス（whole genome sequencing）のほか、特定の遺伝子変異、遺伝子増幅、染色体構造異常（転座、逆位）の解析には、目的領域のゲノム DNA や cDNA を PCR によって増幅したり、核酸プローブを用いたハイブリダイゼーションによって濃縮した後に塩基配列を決定するアンプリコンシーケンス、ターゲットキャプチャーシーケンスが広く行われている³。これらの解析範囲を限定した解析により比較的 low コストでシーケンス深度（depth）を高めることができ変異検出の感度が向上するため、がん組織中に非がん細胞が混入しががん細胞由来の変異アレルが少ない場合にも正確な診断が可能にな

る。こうした理由から解析対象を数十種類のがん関連遺伝子に絞った“Cancer Panel”の開発が進んでいる⁴⁻⁶。

大腸がんの腫瘍組織検体を用いて NGS 法による *KRAS* 遺伝子検査あるいは *RAS/BRAF* 遺伝子検査をダイレクトシーケンス法（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⁷⁻¹⁰。また、Cancer Panel を用いた NGS 法の *KRAS/NRAS* 遺伝子エクソン 2, 3, 4 および *BRAF* 遺伝子エクソン 15 検査は、すべての領域を Sanger 法により検査する場合と比較して、検査にかかる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 量は少なく済むと報告されている¹¹。切除不能進行再発大腸がんに対する抗 EGFR 抗体療法の有効性を探索的に検討した第Ⅱ相・第Ⅲ相試験の中には、バイオマーカー解析の際に NGS 法が採用された研究もある^{12,13}。

また、Cancer Panel を用いた NGS 法での包括的遺伝子検査は、増幅した領域内であればどんな遺伝子変異パターンでも検出できる可能性があることから、分子標的治療薬開発の標的となる遺伝子異常のスクリーニング検査として導入されつつある。実際、欧米では、NGS 法により検出された個別の遺伝子異常に基づいて試験治療に組み入れられるような臨床試験が実施されている^{14,15}。

次世代シーケンス法による遺伝子検査実用化に向けての課題

NGS 法による診断システムは 2013 年、米国食品医薬品局（FDA）から嚢胞性線維症の適応で *CFTR* の変異検出可能なテンプレート DNA 調製試薬、シーケンシングサンプル調製試薬、DNA シーケンサー、解析プログラムを組み合わせた診断システムが市販前認可を受けている。日本では遺伝学的検査として保険収載された先天性難聴のスクリーニング検査に NGS 法を利用している例があるが、体外診断用医薬品・医療機器として薬事承認された診断システムは現在ない。大腸がんをはじめとする治療選択に有用な遺伝子検査のためのシステム開発も進んでいるが、医療機器、体外診断薬として日米欧の規制当局から薬事承認されたものは現在ない。2016 年 4 月に厚生労働省より「遺伝子検査システムに用いる DNA シーケンサー等を製造販売する際の取扱いについて」通知が発出され¹⁵、次世代シーケンサーを使用した診断システムの「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（医薬品医療機器法）」における取り扱いが定められた。これにより病因遺伝子や医薬品の適用可否に関連する遺伝子を検査するもの、将来の罹患リスクも含め具体的な疾患名を標榜するものは、原則として医療機器又は体外診断用医薬品として薬事承認が必要であることが明示された。近い将来、次世代シーケンス法による包括

的遺伝子検査は、大腸がん患者に対し複数の遺伝子検査を同時に実施する際の有用なツールとして確立されることが期待される。

【コメント】 Incidental findings への対応

NGS 法による包括的な遺伝子検査では、解析当初に意図した目的を超えて見いだされる偶発的所見（いわゆる incidental findings; IF）が得られる可能性が高まることが想定される。同定された IF が、遺伝子検査対象者及びその血縁者の生命に重大な影響を与える場合、その取り扱いが問題となる。本邦における IF への対応は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」には、研究対象者からインフォームドコンセントを受ける際に IF が発見された場合における遺伝情報の開示に関する方針についても説明し理解を得るように努めること、と記載されている¹⁷。一方、米国臨床遺伝学会（American College of Medical Genetics and Genomics; ACMG）より、2013 年に次世代シーケンサーにおける IF の取り扱いに関するガイドラインが発出され、NGS 法による遺伝子解析、解析結果の解釈や報告を行っている検査室に、患者の希望や年齢とは関係なく臨床的有用性のある IF を担当医へ報告する義務を明確化するとともに、IF として報告すべき 24 疾患・56 遺伝子のリストが提示されている^{18, 19}。本邦においても、NGS 法による包括的な遺伝子検査を臨床導入に際しては、IF の取り扱いに対する新たな指針策定が望まれる。

5.2 大腸がん患者の血液サンプルを用いた遺伝子検査

大腸がん患者の血液サンプルを用いた体細胞遺伝子検査（リキッドバイオプシー）は、繰り返し実施可能な低侵襲検査として有用となり得る。

大腸がんに対するリキッドバイオプシーの必要性

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、直接腫瘍組織を用いることなく、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 (以下 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²⁰⁻²¹。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、腫瘍組織を用いた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 からの遺伝子検査は、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を短縮することができ、早急に治療レジメン決定して化学療法を開始したい場合などに特に有用性が高い。

腫瘍組織と ctDNA との遺伝子異常の一致率

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 遺伝子検査の一致率は、78-96% と高い²²⁻²⁵。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 遺伝子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²⁶。欧州では BEAMing 法による ctDNA を用いて KRAS/NRAS 遺伝子変異を検出する試薬が既に体外診断薬として CE マーク登録されている。

大腸がんにおける ctDNA の今後の展開

① 切除不能進行再発大腸がんにおける予後因子、化学療法の早期効果予測因子

がん患者における ctDNA 量はがんの進行に伴い増加することが知られている。また、化学療法開始前の ctDNA 量は、予後因子となることが報告されている²⁷。Tie J らは、腫瘍組織内に変異アレルが検出された切除不能進行再発大腸がん 52 例のうち、48 例（92.3%）で化学療法開始前に 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た²⁸。ctDNA を用いることにより既存の腫瘍マーカーである CEA 値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。

② 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

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 遺伝子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^{24, 29, 30}。大腸がんでは腫瘍の不均一性（heterogeneity）が存在することも報告されており、腫瘍組織の一部からの生検検体よりも、ctDNA のほうが腫瘍全体の遺伝子変異状態（predominant one）を反映する可能性もある。一方、1%未満の KRAS 遺伝子変異アレルの存在は、抗 EGFR 抗体の治療効果予測因子とならないとする報告もある³⁰。

③ 抗 EGFR 抗体薬投与による獲得耐性変異の検出

KRAS 遺伝子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 KRAS、NRAS、BRAF 遺伝子変異が検出されることが相次いで報告された^{31, 32}。また、これら変異遺伝子の出現は、抗 EGFR 抗体薬投与中に耐性となった変異型クローンが腫瘍組織内に増殖した結果であると考えられている。この場合リキッドバイオプシーにより、低侵襲に抗 EGFR 抗体薬の治療効果をモニタリングすることができ、画像診断による増悪の判断よりも前に治療無効を判断することができる可能性がある。

④ 治癒切除後の残存腫瘍検出

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）等と比較して極めて短いことが知られている³³。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。Tie J らは、治癒切除が行われた Stage II 結腸がん患者に対し 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³⁴。治癒切除後の ctDNA 検査は、術後補助化学療法の適応や効果判定、再発の早期発見に有用な可能性がある。

以上、大腸がんにおける血液サンプルを用いた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、がんの状態を経時的に把握できる低侵襲検査として期待されて

いる。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) Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2010;11:685-96.
- 2) Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature.* 2011;470:198-203.
- 3) 菅野純夫、鈴木穰 監修、次世代シーケンサー目的別アドバンスメソッド、秀潤社、2012
- 4) Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med.* 2012;18:382-4.
- 5) Meric-Bernstam F, Brusco L, Shaw K, et al. Feasibility of Large-Scale Genomic Testing to Facilitate Enrollment Onto Genomically Matched Clinical Trials. *J Clin Oncol.* 2015;33:2753-62.
- 6) Kou T, Kanai M, Matsumoto S, et al. The possibility of clinical sequencing in the management of cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2016;46:399-406.
- 7) 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.* 2016;6:e009532.
- 8) Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, et al. Extended RAS and BRAF Mutation Analysis Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One.* 2015;10:e0121891.
- 9) 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.* 2014;67:764-7.
- 10) 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.* 2015;68:64-8.
- 11) 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.* 2015;48:908-10.
- 12) 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.* 2013;19:1902-12.
- 13) 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.* 2014;25:1756-61.
- 14) 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. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl 4S; abstr 653)
- 15) Conley BA, Chen AP, O'Dwyer PJ, et al. NCI-MATCH (Molecular Analysis for Therapy Choice) – a national signal finding trial. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr TPS2606)
- 16) 遺伝子検査システムに用いる DNA シークエンサー等を製造販売する際の取扱いについて 薬生機発 0428 第 1 号 . 薬生監麻発 0428 第 1 号 . 平成 28 年 4 月 28 日
<https://www.pmda.go.jp/files/000211989.pdf>
- 17) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 26 年 11 月 25 日一部改正)
- 18) Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15:565-74.
- 19) ACMG Board of Directors. ACMG policy statement: updated recommendations regarding analysis and reporting of secondary findings in clinical genome-scale sequencing. *Genet Med*. 2015;17:68-9.
- 20) Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:426-37.
- 21) Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32:579-86.
- 22) 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*. 2013;59:1722-31.
- 23) 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*. 2015;10:e0126417.
- 24) 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*. 2012;18:1177-85.
- 25) 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*. 2014;20:430-5.
- 26) Johns 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. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 11538).
- 27) 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*. 2016;22:3067-77.
- 28) 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*. 2015 ;26:1715-22.

- 29) 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 to anti-EGFR therapies. *Mol Cancer Ther*. 2016 Apr 1.
- 30) 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*. 2015;21:1087-97.
- 31) Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486:537-40.
- 32) Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6:224ra24.
- 33) Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14:985-90.
- 34) 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. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 3511)

6. 備考

6.1. 2016 年 7 月現在の *RAS* 遺伝子変異検査、*BRAF* V600E 遺伝子変異検査、MMR 機能欠損に対する検査の保険償還状況

- ・*RAS* 遺伝子変異検査は、「D004-2 悪性腫瘍組織検査」に「*RAS* 遺伝子検査 (2,500 点)」として大腸がんに対して保険償還されている。
- ・*BRAF* 遺伝子変異検査は、「D004-2 悪性腫瘍組織検査」に「*BRAF* 遺伝子検査 (6,520 点)」として悪性黒色腫に対して保険償還されているが、大腸がんに対しては保険償還されていない。
- ・MMR 機能欠損に対する検査として MSI 検査は、「D004-2 悪性腫瘍組織検査」に「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（リンチ症候群）に対して保険償還されている。

6.2. Voting の参加について

本ガイドンスは全委員による討議のもとに作成されたが、各項に関わる検査試薬の現在進行中・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、該当する項の基本的要件の **voting** に参加しなかった。

委員	Voting への参加有無				
	<i>RAS</i> 遺伝子 変異検査	<i>BRAF</i> 遺伝子 変異検査	MMR 機能欠損 に対する検査	検体に 用いる試料	検査の 質保証
赤木	有	有	有	有	有
石田	有	有	有	有	有
衣斐	有	有	有	有	有
谷口	有	無	有	有	有
土原	有	有	有	有	有
中谷	有	有	有	有	有
室	有	有	有	有	有
谷田部	有	有	有	有	有
山口	有	有	有	有	有
山崎	有	有	有	有	有
吉野	有	有	無	有	有