

原 著

癌関連遺伝子検査
Genetic Testing for Cancer

畔 上 公 子
Kimiko AZEGAMI

要 旨

DNA, RNAを解析対象とする検査は漠然と「遺伝子検査」と言われているが、その検査がどのような遺伝情報を扱うのかを明確にする必要がある。我々が通常扱うのは腫瘍組織に見られる後天的な変化である。現在、肺癌EGFR遺伝子、大腸癌RAS遺伝子、悪性リンパ腫免疫関連遺伝子、c-kit遺伝子、軟部腫瘍融合遺伝子の各検査を行っている。これらの検査は主にホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いて行われる。今後、遺伝子診断に基づいた個別化治療の増加が見込まれ、FFPE標本作製にあたり病理診断を尊重する一方で、遺伝子解析への使用にも配慮する必要がある。

はじめに

遺伝子検査は細胞の内外に存在する遺伝子を対象として解析する検査である。これまで感染症や白血病などの検査として定着してきたが、近年固形腫瘍の診断確定や治療方針の選択など個別化医療に欠かせない検査となっている。DNA, RNAを解析対象とする検査は漠然と「遺伝子検査」と言われているが、その検査が遺伝情報を扱うのかを明確にする必要がある。我々が通常扱うのは腫瘍組織に見られる後天的な変化であり、先天的な遺伝情報を扱う遺伝学的検査とは異なる。本稿では、「遺伝子検査につ

いて」、「当院の遺伝子検査」、「組織・細胞検体を用いた遺伝子解析」について述べる。

I. 遺伝子検査について

日本臨床検査標準協議会・遺伝子関連検査標準化専門委員会によって遺伝子検査は3つに分類されている (表1)¹⁾。①病原体遺伝子検査 (病原体核酸検査)：ヒトに感染症を引き起こすウイルス、細菌等微生物の核酸 (DNAあるいはRNA) を検出・解析する検査、②体細胞遺伝子検査：癌細胞特有の遺伝子の異常を検出する遺伝子検査および遺伝子発現解

表1 ヒト遺伝子関連検査の分類

	病原体遺伝子検査	体細胞遺伝子検査	遺伝学的検査
検査の対象	病原体	腫瘍組織における体細胞遺伝子変異・遺伝子発現	生殖細胞系列の遺伝子変異・遺伝子多型 がん以外の細胞に見られる遺伝子の特徴 先天異常症を対象とした染色体検査
解析対象	各種体液、組織	腫瘍組織、癌細胞	白血球などヒトの有核細胞
倫理・遺伝カウンセリングの必要性	なし	なし	必要
例	ウイルス・細菌など 肝炎ウイルス HPV 結核菌群 クラミジアなど	肺癌などの固形腫瘍 白血病 悪性リンパ腫など	単一遺伝子疾患 (遺伝性疾患、家族性腫瘍) 薬物応答性 体質診断 (アルコール、肥満、個人識別) 疾患易罹患性 (乳癌、卵巣癌) など

新潟県立がんセンター新潟病院 病理部

Key words：遺伝子検査 (Genetic testing), 体細胞変異 (Somatic mutation), 固形腫瘍 (Solid cancer), ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-fixed, paraffin-embedded sample), プレアナリシス段階 (Pre-analysis stage)

析、腫瘍組織に限局し、病状とともに変化し得る一時的な遺伝子情報を明らかにする検査、③遺伝学的検査：単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物等の副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査等、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報を明らかにする検査に分類され、①～③を「遺伝子関連検査」と総称している¹⁾。後天的な変化をみる体細胞遺伝子検査と遺伝情報を扱う遺伝学的検査は明確に区別する必要があり、倫理的配慮が必要なのは③の遺伝学的検査である。

遺伝学的検査には、単一遺伝子疾患（メンデル遺伝病とも呼ばれる）の診断、移植に関わるHLAの遺伝子型、抗癌剤イリノテカン投与に際し副作用の出現を予測するために実施されるUGT1A1遺伝子解

析などファーマコゲノミクス検査の一部、多因子疾患の易罹患性や体質に関わるSNPs、親子鑑定や法医学的検査などの個人識別がある。体細胞遺伝子検査には、非小細胞肺癌のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤投与の際のEGFR遺伝子解析、大腸癌の抗EGFR抗体薬投与の際のRAS遺伝子解析等がある。

本邦における遺伝子検査のうち変異解析については、その多くが検査センターで実施されている。日本衛生検査協会の2017年1月の第8回染色体・遺伝子検査アンケート調査を表2、3に示す²⁾。病原体遺伝子検査は約5,745,000件、体細胞遺伝子検査は約410,000件、遺伝学的検査は87,000件となっている。感染症診断に関わる病原体遺伝子検査は2016年に比べ、実施数が約100万件増加し、全遺伝子検

表2 遺伝子検査アンケート/全体

分類	詳細	件数	割合
病原体遺伝子検査		5,744,991	92.1%
	感染症診断に関わる病原体	5,744,991	92.1%
体細胞遺伝子検査		409,744	6.6%
	白血病・リンパ腫関連	298,580	4.8%
	固形腫瘍関連	111,164	1.8%
遺伝学的検査		86,632	1.3%
	臓器移植のための検査	47,112	0.8%
	薬剤応答性	26,848	0.4%
	単一遺伝子疾患	6,059	0.1%
	家族性腫瘍	1,862	0.0%
	生活習慣病の疾患感受性	606	0.0%
	親子鑑定	450	0.0%
	その他個人体質に関する遺伝子検査	3,695	0.0%
合計		6,241,367	

表3 遺伝子検査アンケート/固形腫瘍の体細胞遺伝子検査

分類	詳細	件数	割合
固形腫瘍関連		111,164	
	保険適用外のp53等の癌関連遺伝子	8,652	
	マイクロRNA、CTC、セルフリーDNA等	350	
保険適用の悪性腫瘍遺伝子検査		102,162	
	EGFR遺伝子検査	58,958	57.7%
	RAS遺伝子検査	42,064	41.2%
	EWS-Fli1遺伝子検査	30	0.0%
	TLS-CHOP遺伝子検査	0	0.0%
	SYT-SSX遺伝子検査	30	0.0%
	c-kit遺伝子検査	600	0.6%
	マイクロサテライト不安定検査	480	0.5%
	センチネルリンパ節生検に係る遺伝子検査	0	0.0%

査の90%以上を占めている。中でもB型・C型肝炎の感染者に増加はないものの、新たな治療法の開発と普及に伴い今後も定量検査の増加が予想される。白血病・リンパ腫関連の遺伝子検査は2016年に比べ76,000件(30%)増加した。分子標的治療等白血病・リンパ腫の新たな治療法が普及したことで、治療経過のモニタリング検査が増加したと考えられる。固形腫瘍関連の遺伝子検査では2016年に比べ、約14,000件(13%)増加した。EGFR遺伝子は9施設で約59,000件、KRAS遺伝子は7施設で約42,000件、c-kit遺伝子は3施設で約600件と、同年に行われた保険適応の悪性腫瘍遺伝子検査全体の99.5%を占め年々増加している。遺伝学的検査における薬剤応答性に関わるUGT1A1遺伝子検査は、7,300件の増加(36%)を示した(表2)。

II. 当院の遺伝子検査

当院遺伝子検査では体細胞遺伝子検査を行っている。肺癌EGFR遺伝子検査、大腸癌RAS遺伝子検査、悪性リンパ腫免疫関連遺伝子検査、c-kit遺伝子検査、軟部腫瘍融合遺伝子検査、胃癌HER2遺伝子(FISH)検査などである。近年、新規に開発される医薬品では、投薬前に薬効や副作用を予測する検査であるコンパニオン診断(Companion diagnostics: CoDx)が一般化している。本稿ではCoDx法、CoDx薬をCoDxに統一記載している。新規分子標的薬について、院内でCoDxができない場合は外部委託での対応となる。現在、CoDxが実施されている体細胞遺伝子検査項目を表4に示す。このうち、当院では肺癌EGFR遺伝子検査、肺癌ROS1融合遺伝子検査、大腸癌RAS遺伝子検査、胃癌HER2遺伝子(FISH)検査を行っている。悪性黒色腫BRAF遺伝子検査、乳癌HER2遺伝子(FISH)検査、肺癌ALK融合遺伝子(FISH)検査は外部委託となっている。2016年の実施件数(含外部委託)は肺癌EGFR遺伝子検査200件、大腸癌RAS遺伝子解析54件、悪性黒色腫BRAF遺伝子解析21件、肺癌ALK融合遺伝子12件であった。

肺癌EGFR遺伝子検査は、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)投与の決定に不可欠で、変異の有無や変異の種類で感受性が異なる。当院では研究試薬で解析(Laboratory Developed Test: LDT)を行っており、解析箇所はEGFR遺伝子 exon 18~21で、リアルタイムPCR法にダイレクトシーケンス法を併用している³⁾。検体は手術組織、気管支鏡生検組織、気管支鏡細胞検体、胸水等である。いずれの検体が遺伝子検査に適しているか、腫瘍細胞の多寡を確認し、検体を選別している。必要な場合は、腫瘍細胞の割合が10%以上含まれるように顕微鏡下でマクロダイセクションを行う。2013年~2017年7月までに肺腺癌症例437件のEGFR遺伝子検査を

院内実施し、192件(43.94%)に変異が検出された。日本人における肺腺癌のEGFR遺伝子変異の頻度は45%(21~68%)で、報告例と同様の結果であった⁴⁾。2011年11月にtherascreen EGFR変異検出キットRGQ(キアゲン)が、2013年9月にはコバス®EGFR変異検出キット(ロシユ)がCoDxとして承認された。2012年9月よりCoDxを用いると「悪性腫瘍遺伝子検査」でなく「抗悪性腫瘍剤感受性検査」の2,500点が算定できるようになった。現在LDTとCoDxと保険点数が2本立て(LDTは2,100点)に設定されている。TKI投与後の耐性変異の出現による再増悪には、2016年に承認されたオシメルチニブ(タグリッソ®)が有効とされ、コバス®EGFR変異検出キットv2.0がCoDxとなっている。耐性変異検査は院内実施可能であるが、CoDxでないため外部委託している。また、コバス®EGFR変異検出キットv2.0の検出感度は1~5%であるため、腫瘍含有率がそれ以上になるよう、外部委託提出時には必要に応じてマクロダイセクションを行っている。2016年~2017年12月までに外部委託に提出された38件中36件に既知の変異が検出(94.7%)され、その36件中15件に耐性変異T790M(41.7%)が検出された。外部委託の検査内容に則した検体を提出することで、より良い結果が出るよう努めている。

大腸癌RAS遺伝子検査は、抗EGFR抗体薬適応の判断を目的としており、変異例では効果が期待できない。2010年4月にKRAS遺伝子検査が、2015年4月にはRAS(KRASとNRAS)遺伝子検査が保険償還された。また、切除不能進行再発大腸癌では、BRAF V600E遺伝子変異陽性例は予後不良であることが示されており⁵⁾、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の指標となり、治療選択の点からも有益である。当院では2012年からKRAS遺伝子を、2015年からRAS遺伝子およびBRAF遺伝子をリアルタイムPCR法とダイレクトシーケンス法の併用で解析している⁶⁾。解析箇所はKRAS遺伝子のexon 2, 3, 4, NRAS遺伝子のexon 2, 3, 4, BRAF遺伝子のcodon 600である。検体は手術組織、内視鏡生検組織である。検出感度は5%であり、腫瘍細胞が10%以上含まれるようにマクロダイセクションを行っている。大腸癌の変異陽性率は、KRAS 33.4%, NRAS 3.6%, BRAF 4.5~6.7%とされている⁵⁾。2015年4月~2017年6月までに遺伝子検査が行われた200件中114件(57%)に変異が検出された。KRAS遺伝子変異83件、NRAS遺伝子変異8件、BRAF遺伝子変異19件、NRAS+KRAS遺伝子変異2件、NRAS+BRAF遺伝子変異2件であった。

悪性黒色腫BRAF遺伝子のcodon 600の変異解析はBRAF阻害剤の投与決定に不可欠で、変異例に有効性を認める。BRAF阻害剤にはベムラフェニブ(ゼ

表4 コンパニオン診断として行われている主な固形腫瘍の遺伝子検査

検査項目	EGFR遺伝子解析	ROS1融合遺伝子	ALK融合遺伝子	RAS遺伝子解析	BRAT遺伝子解析	HER2増幅
適応疾患	非小細胞肺癌	非小細胞肺癌	非小細胞肺癌	大腸癌	悪性黒色腫	乳癌・胃癌
分子標的薬	ゲフィチニブ エルトチニブ アファチニブ オシメルチニブ	クレゾチニブ	クレゾチニブ	セツキシマブ パニツムマブ	ペムラフイニブ ダブラフフェニブ	トラスツズマブ ラパチニブ
検索方法	リアルタイムPCR法 CoDx (キアゲン、 ロシユ)	RT-PCR法 CoDx (理研ジェネシス)	FISH法	リアルタイムPCR法 CoDx (MBL)	リアルタイムPCR法 CoDx (ロシユ、 シスメックス・ビオメリユウ)	FISH法
使用が推奨され ている主な検体	FFPE組織・セルブブロック 細胞検体 新鮮凍結組織 血漿検体	FFPE組織・セルブブロック 細胞検体 新鮮凍結組織	FFPE組織・セルブブロック	FFPE組織	FFPE組織	FFPE組織

CoDx : コンパニオン診断

RT-PCR : Reverse Transcription-PCR

IHC : Immunohistochemical staining analysis (免疫組織化学染色)

FISH : Fluorescence in situ Hybridization

FFPE組織 : Formalin-fixed, paraffin-embedded sample

ルボラフ®)とダブルフェニブ(タフィンラー®)がある。ベムラフェニブはコバス®BRAF V600変異検出キットとコバスz 480(ロシユ)による解析、ダブルフェニブはTHxIDとBRAFキット指定の機器(シスメックス・ピオメリュウ)による解析がCoDxとなっている。BRAF遺伝子codon 600の変異解析は、リアルタイムPCR法とダイレクトシーケンシング法の併用で院内でも解析可能であるが、CoDxでないため外部委託対応している。腫瘍含有率が多くなるよう、外部委託提出時には必要に応じてマクロダイセクションを行っている。2012年～2017年12月までに外部委託に提出された72件中24件(33.3%)に変異が検出された。日本人悪性黒色腫における変異率は25～30%で、適正な検体が提出されていると考えられる⁷⁾。

Ⅲ. 組織・細胞検体を用いた遺伝子解析

ホルマリン固定を経てパラフィン包埋(formalin-fixed, paraffin-embedded, 以下FFPE)される生検や手術検体の主な用途は病理組織診断である。近年、固形腫瘍への分子標的治療が一般化され、個別化治療を目的とした遺伝子検査が増加している。これまでFFPE標本作製過程に生じるDNA・RNAの断片化のため遺伝子検査に制限が多かったが、核酸抽出技術や解析技術の向上により、FFPE標本を用いた遺伝子解析が日常的になった。また、体腔液採取によって得られた細胞検体からもFFPE標本：セルブロックの作製が行われている。2016年の診療報酬改定で「悪性中皮腫を疑う際」と限定的であるが、採取した胸水を用いてセルブロックを作成した場合算定可能となった。肺癌患者においても胸水をセルブロック化することがあり、当院でも必要に応じて遺伝子検査に使用している。組織・細胞のFFPE標本は、室温での長期保管や繰り返しての使用が可能であり、技術開発に伴いさらに診断的重要性が高まると考えられる。次世代シーケンシング(next-generation sequencing)などの新規技術の導入を控え、ゲノム診断で利用に耐えうる一定水準以上の品質を保持したFFPE標本の安定的な作製が求められる。

日本病理学会は、「ゲノム研究用試料に関する病理組織検体取り扱い規程の策定及び病理組織検体取り扱いに関する実証研究」に従事し、ゲノム等オミックス研究に適した質の高い病理組織検体を全国のバイオバンク等で収集できることを目指し、2016年3月「ゲノム研究用病理組織検体取り扱い規程」を策定した⁸⁾。病理医・臨床医・臨床検査技師・バイオバンク実務者の病理組織検体の取り扱い指針が示されている。その後、日常業務下での実施が想定されるがんゲノム診断での使用に耐えうる病理組織・細胞検体に関する取扱いについて、2017年9月「ゲノム診療用病理

組織検体取扱い規程(暫定版)」が示された⁹⁾。この中で日常業務の材料の多くを占め、検体の取り扱いにより品質差が生じやすいFFPE標本の適切な作製や保管方法についても述べられている。今後、病理診断のためのFFPE標本の作製方法を尊重する一方で、ゲノム解析にも供し得るように配慮していく必要がある。

おわりに

固形腫瘍における遺伝子検査の増加に伴い、病理組織・細胞検体が検査対象としてより一層重要となる。利用が進んでいるFFPE標本は、適切な処理により核酸の断片化を最小限に留め、解析不能となる事態を避ける必要がある。形態と核酸の品質の保持が当たり前の時代となっており、プレアナリシス段階を担う病理部門の役割は非常に大きいと考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり貴重なご助言をいただいた川崎 隆先生をはじめ協力いただいた本間慶一先生、齋藤大造臨床検査部技師長、遺伝子検査、病理部の皆様に深謝いたします。

本遺伝子検査の一部は「文部科学省科学研究費助成事業 コホート・生体試料支援プラットフォーム」の助成を受けたものである。

参考文献

- 1) 医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン. 日本医学会. 2011年. [引用2018-12-20] <http://jams.med.or.jp/guideline/genetics-diagnosis.pdf>
- 2) 日本衛生検査所協会: 第8回染色体・遺伝子検査アンケート調査報告書. 2017年. [引用2018-12-20] <http://www.jrcla.or.jp/info/info/280204.pdf>
- 3) 畔上公子, 神田真志, 柳原優香ほか: 当院における遺伝子検査の取り組み. 県立がんセンター新潟病院医誌55(1):27-35, 2016.
- 4) 肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き. 第3.05版. 日本肺癌学会 2016年. [引用2018-12-20] <https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/1329.pdf>
- 5) 日本臨床腫瘍学会: 大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイダンス第3版. 金原出版. 2016.
- 6) 神田真志, 畔上公子, 川崎隆 ほか: 大腸癌におけるPCR-High Resolution Melting解析を用いたRAS, BRAF遺伝子検査. 県立がんセンター新潟病院医誌56(2):44-48, 2017.
- 7) 宇原 久: メラノーマにおけるBRAF V600変異の検出. モダンメディア 61(8):238-242.
- 8) 日本病理学会: ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程. [引用2018-12-20] <http://pathology.or.jp/genome/>
- 9) 日本病理学会: ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程(暫定版). [引用2018-12-20] http://pathology.or.jp/news/pdf/genome_kitei_170915.pdf