

報 告

大腸癌におけるPCR-High Resolution Melting解析を用いた
RAS, *BRAF*遺伝子検査Detection of *RAS* and *BRAF* mutation in colorectal cancer using
PCR-High Resolution Melting analysis神田 真志 畔上 公子 川崎 隆
木下 律子 本間 慶一 齋藤 大造*Masashi KANDA, Kimiko AZEGAMI, Takashi KAWASAKI
Noriko KINOSHITA, Keiichi HOMMA and Daizo SAITO*

要 旨

大腸癌における*RAS* (*KRAS*/*NRAS*) 遺伝子検査は、抗EGFR抗体薬投与の適否を判断する目的で行われる。予後不良因子である*BRAF* V600E遺伝子変異を含めると検索対象は7領域に渡り、複数領域の変異検索を簡便に行える方法が必要となった。PCR-High Resolution Melting (HRM) 解析は融解曲線の違いにより野生型と変異型を識別する方法である。ダイレクトシーケンス法 (以下 DS法) で変異の有無が確定した大腸癌40例についてPCR-HRM解析を行った。*RAS*遺伝子変異型17例と*BRAF*遺伝子変異型3例は、全例変異が検出された。野生型の20例は全例変異が検出されなかった。PCR-HRM解析で変異が検出された場合はDS法で塩基配列の決定を行っている。変異が検出されない場合はDS法での確認は不要となり、省力化につながった。

院内実施した200例では、*KRAS*遺伝子変異型は83例、*NRAS*遺伝子変異型は8例、*BRAF*遺伝子変異型は19例であった。他に4例で複数の変異を認めた。PCR-HRM解析は簡便に変異の有無をスクリーニングでき、検索対象の多い*RAS*, *BRAF*遺伝子検査に有用であることが示された。

はじめに

現在、がんの薬物治療において、分子標的薬の適応や治療効果の予測等に多くのバイオマーカーが利用されている。その一つに大腸癌における*RAS* (*KRAS*/*NRAS*) 遺伝子検査がある。複数の臨床試験の解析において*KRAS*遺伝子 exon 2の変異陽性例の他に、*KRAS*遺伝子 exon 3, 4, *NRAS*遺伝子 exon 2, 3, 4の変異陽性例においても抗EGFR抗体薬の効果が期待できないことが明らかとなっている¹⁻⁴⁾。本邦では抗EGFR抗体薬投与の適否を判断することを目的として、2010年4月に*KRAS*遺伝子検査が、2015年4月に*RAS*遺伝子検査が保険償還されている。また*BRAF* V600E遺伝子変異が切除不能進行再発大腸

癌における予後不良因子であることが示されるなど⁵⁾、変異の有無を検索することは治療選択のために重要となっている。

当院では2012年にダイレクトシーケンス法 (以下 DS法) およびTm解析法による*KRAS*遺伝子検査の院内実施を開始した。*KRAS*遺伝子検査はexon 2 (codon 12, 13) のみが検索対象であった。2015年に*RAS*遺伝子検査が保険償還され、検索対象が*KRAS*遺伝子および*NRAS*遺伝子 exon 2 (codon 12, 13), exon 3 (codon 59, 61), exon 4 (codon 117, 146) と広がった。DS法は目的とする遺伝子領域を増幅し、直接塩基配列を明らかにする方法であるが、手技が煩雑であり、検索対象の多い*RAS*遺伝子検査をより簡便に行える方法の導入が必要となった。

新潟県立がんセンター新潟病院 病理部 *臨床検査部

Key words : *RAS* *BRAF* High Resolution Melting解析 (High Resolution Melting analysis), 大腸癌 (Colorectal cancer), 院内実施 (Hospital implementation)

PCR-High Resolution Melting (HRM) 解析はリアルタイムPCR機器を用いて簡便な手技で、かつ感度よく変異の有無をスクリーニングできる方法であり、*RAS*遺伝子や*BRAF*遺伝子の変異検出にも用いられている⁶⁾。今回、PCR-HRM解析を用いた*RAS*、*BRAF*遺伝子検査を検討し、院内実施後の成績についてまとめた。

I 対象

対象はDS法にて*RAS*、*BRAF*遺伝子検査が実施され、変異の有無が確定した大腸癌40例で、*RAS*遺伝子変異型17例、*BRAF*遺伝子変異型3例、*RAS*、*BRAF*遺伝子野生型20例とした。*RAS*遺伝子変異型17例および*BRAF*遺伝子変異型3例の内訳は、*KRAS*遺伝子 G12D、G12Vが各2例、*KRAS*遺伝子 G12C、G12A、G12S、G13D、Q61L、Q61R、Q61H、K117N、A146Tが各1例、*NRAS*遺伝子 G12D、G13D、Q61K、Q61Rが各1例、*BRAF*遺伝子 V600Eが3例であった。

II 方法

PCR-HRM解析は、飽和型蛍光色素を使用し、精密な融解曲線を得ることで変異を検出する方法である。PCR後の増幅産物をアニーリングさせると、変異型では変異型アレルと野生型アレルとの mismatches のアニーリングが起こるため、変異型アレルを含まない野生型の融解曲線と違いが生じる。融解曲線の形の差を最大化するために生データに補正を加え、シグナル強度の差分をプロットした図（以下 差分プロット）より変異の有無を判定することができる。差分プロットの例を図1に示す。

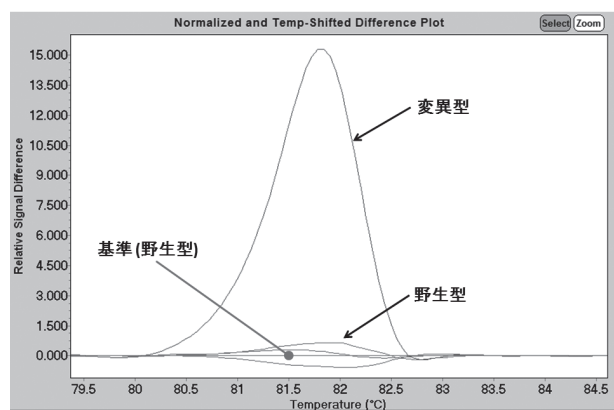


図1 差分プロットの例

野生型を基準とした場合、同じ野生型はほぼ平坦であるが、変異型ではピークを認める。

DNA抽出は厚さ5-10 μ mの10-20%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin fixed paraffin

embedded; FFPE)切片2-5枚より、手動的に腫瘍部分を採取し、QIAamp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN)で行った。LightCycler 480 II (Roche)を用いて*KRAS*遺伝子 exon 2(codon 12, 13), exon 3(codon 59, 61), exon 4(codon 117, 146), *NRAS*遺伝子 exon 2(codon 12, 13), exon 3(codon 59, 61), exon 4(codon 117, 146), *BRAF*遺伝子 exon 15(codon 600)の7領域についてPCR-HRM解析を行った。反応液は総量20 μ Lとし、終濃度で1 \times High-Resolution Melting Master Mix (Roche), 3.5mM MgCl₂, 0.2 μ M 各Primer, テンプレートDNA 20ngとした。反応条件は95°C 10分後、95°C 10秒, 58°C 30秒, 72°C 30秒を45cycle行った後、95°C 1分, 40°C 1分, 65°C 1秒, 0.02°C/秒で65°Cから95°Cまで連続的に上昇(1°C当たり25回のシグナル計測)とした。得られたデータをGene-scanning softwareで解析し、*RAS*、*BRAF*遺伝子野生型を基準とした差分プロットより各領域での変異の有無を判定した。また変異型アレルの含有率が異なるDNAサンプルを用いて、PCR-HRM解析の変異検出限界を検討した。対象の変異は*KRAS*遺伝子 G12D, Q61L, A146T, *NRAS*遺伝子 G12V, Q61K, K117N, *BRAF*遺伝子 V600Eとした。

III 結果

PCR-HRM解析では、*RAS*遺伝子変異型17例および*BRAF*遺伝子変異型3例の全例で、DS法と一致した領域で変異が検出された。*RAS*、*BRAF*遺伝子野生型の20例全例で、変異は検出されなかった。結果の一部を図2に示す。*RAS*遺伝子変異型17例中4例で、既知の変異がある領域とは別に、複数の領域で変異を疑う差分プロットが得られたが、DS法では野生型で偽陽性と判断した。結果の一部を図3に示す。

変異検出限界の検討では、7領域それぞれで変異検出限界に多少の違いが見られたが、全体として変

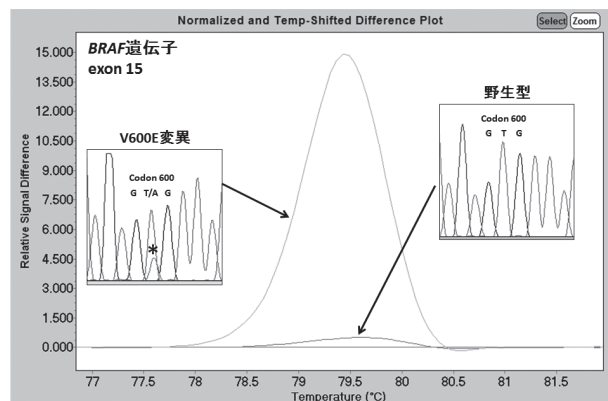


図2 *BRAF*遺伝子変異検出例

PCR-HRM解析で変異が検出され、ダイレクトシーケンシング法で変異(*)を確定した。

異アレルの含有率で5-10%とするのが適当であった。結果の一部を図4に示す。

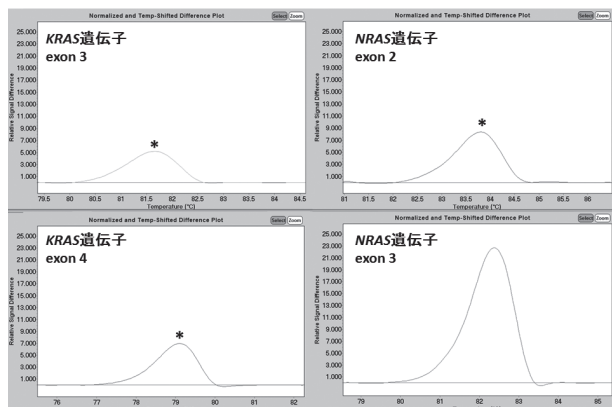


図3 偽陽性例の差分プロット

KRAS遺伝子 exon 3, 4, NRAS遺伝子 exon 2領域で変異が疑われる差分プロット(*)が得られたが、ダイレクトシーケンス法では野生型であった。ダイレクトシーケンス法で変異が確定したNRAS遺伝子 exon 3領域の差分プロットと比較しピークは低い。

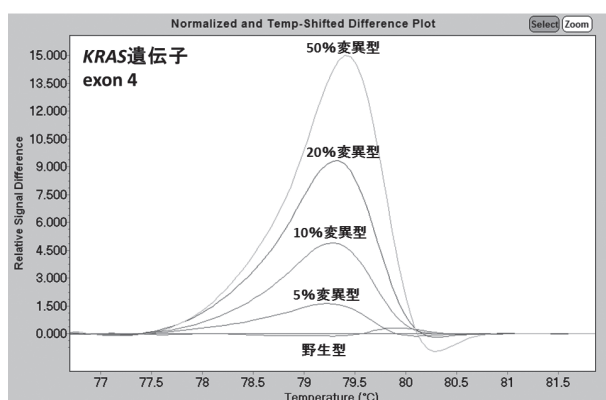


図4 KRAS遺伝子 exon 4領域での変異検出限界の検討
変異型アレルの含有率が低下するにつれて、ピークが低くなり野生型の差分プロットに近くなる。

IV 院内実施後のRAS, BRAF遺伝子検査の成績

2015年4月よりRAS, BRAF遺伝子検査にPCR-HRM解析を導入し、院内実施を開始した。2017年6月までに依頼された200例ではKRAS遺伝子変異型は83例(41.5%), NRAS遺伝子変異型は8例(4%), BRAF遺伝子変異型は19例(9.5%)であった。他に4例(2%)で複数の変異を認めた。RAS, BRAF遺伝子野生型は86例(43%)であった。詳細を表1に示す。日本臨床腫瘍学会の「大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイドライン 第3版」ではKRAS遺伝子 exon 2の変異の頻度は約35-40%, その他のKRAS遺伝子 exon 3, 4, NRAS遺伝子 exon 2, 3, 4の変

異の頻度は合わせて10-15%とされており⁷⁾, 同程度の結果であった。またBRAF V600E遺伝子変異の頻度は、本邦では4.5-6.7%と報告されているが^{5, 8-9)}, これをやや上回る8%であった。

V 考察

PCR-HRM解析を用いたRAS遺伝子検査はKRAS遺伝子 exon 2, 3, 4, NRAS遺伝子 exon 2, 3, 4の6領域について変異検出を行うことにより、検索対象を網羅することができる。加えて、当院ではBRAF遺伝子 exon 15のcodon 600も変異検出の対象としている。PCR-HRM解析の反応条件を統一することで、一度に7領域の変異スクリーニングが可能となった。DS法で確定した変異はPCR-HRM解析で全て検出できた。また変異が検出されない領域は、DS法でも全て野生型であった。PCR-HRM解析のみでは変異の詳細が不明なため、変異が検出された場合はDS法による塩基配列の決定が必要である。PCR-HRM解析で変異が検出されない場合、DS法での確認は不要となり、省力化につながった。

PCR-HRM解析でRAS, BRAF遺伝子野生型と変異型を識別可能な変異アレルの含有率は5-10%であった。RAS遺伝子検査は変異検出限界が10%以下の検査法により実施することが推奨されており⁷⁾, 条件を満たしている。一方、PCR-HRM解析で変異が検出された場合に実施するDS法の変異検出限界は10-25%であり、DS法でRAS遺伝子検査を行う場合はマニュアルマイクロダイゼクション等の併用により腫瘍細胞の比率を高めることが必須とされている⁷⁾。当院でもDNAを抽出する際、用手的に腫瘍細胞の比率を高めており、PCR-HRM解析で変異が検出された例は、全てDS法で変異型が確定している。

PCR-HRM解析はFFPE検体から抽出したDNAを用いた場合の特異性が問題とされており¹⁰⁾, 本検討においても偽陽性を経験した。PCR-HRM解析では、PCRにおける増幅曲線の立ち上がりのサイクル数やプラトー相の蛍光強度が、基準となるDNAサンプルと近いことが正確なデータ解析のために必要となる。偽陽性例は上記の条件を満たしておらず、DNAの質の低下が原因と考えられた。経験的に偽陽性は複数領域に見られて野生型の差分プロットとの違いが少ない場合が多く、正確なデータ解析に必要な条件等を加えると判断は比較的容易であるが、最終的にDS法での確認は必要である。

PCR-HRM解析は、PCRで増幅する領域内における変異の有無をスクリーニングする方法であり、検索対象以外の変異も検出される。検索対象以外の変異としてNRAS遺伝子 L120FやBRAF遺伝子 D594G, D594Nが検出された。KRAS/NRAS遺伝子 codon 12, 13, 59, 61, 117, 146以外のRAS遺伝子変異が検出さ

表1 *RAS*, *BRAF*遺伝子検査の成績 (2015年4月～2017年6月)

				例数		
<i>KRAS</i> 遺伝子変異型				83 (41.5%)		
exon 2	codon 12	G12D	30			
			G12V	13		
			G12S	6		
			G12C	5		
			G12A	1		
		codon 13	G13D	16		
			exon 3	codon 61	Q61H	1
				exon 4	codon 117	K117N
			K117R		1	
			codon 146		A146T	7
A146V	1					
<i>NRAS</i> 遺伝子変異型				8 (4%)		
exon 2	codon 12	G12D	2			
	codon 13	G13D	1			
		G13R	1			
exon 3	codon 61	Q61R	3			
		Q61K	1			
<i>BRAF</i> 遺伝子変異型				19 (9.5%)		
exon 15	codon 600	V600E	16			
		V600R	1			
	codon 594	D594G	2			
遺伝子変異 (複数)				4 (2%)		
<i>KRAS</i> G12V, <i>NRAS</i> G12S			1			
<i>KRAS</i> G13D, <i>NRAS</i> Q61H			1			
<i>NRAS</i> G12V, <i>BRAF</i> D594N			1			
<i>NRAS</i> L120F, <i>BRAF</i> V600E			1			
<i>RAS</i> , <i>BRAF</i> 遺伝子野生型				86 (43%)		
合計				200		

れた患者に対する抗EGFR抗体薬の効果については、臨床データに乏しく一律に適応がないとは言えないとされている⁷⁾。また*BRAF* V600E遺伝子変異以外の*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⁷⁾。これらの変異に関しては今後の検討が待たれる。

大腸癌における遺伝子検査は、これまでの*RAS*遺伝子検査に加えて、*BRAF* V600E遺伝子変異やDNAミスマッチ修復機能の欠損が予後予測や治療選択に関わる重要な遺伝子異常として認識され、次世代シーケンサーを用いた包括的遺伝子検査や血液サンプルを用いたりキッドバイオプシーなど、さらに

発展していくと予想される。これらの新規項目に院内で対応していくためには、機器整備やランニングコスト、技術面等多くの課題がある。遺伝子検査が外部に委託される場合も、測定前のプロセスを適正に行い、正確な検査が行われるように努めていきたい。

結 語

PCR-HRM解析は簡便に変異の有無をスクリーニングでき、検索対象の多い*RAS*, *BRAF*遺伝子検査に有用であることが示された。一方で、体外診断用医薬品を用いた検査法が推奨されており、今後、臨床試験等でその結果を必要とする場合も増える可能

性がある。*RAS*遺伝子検査については外部委託も含めて臨機応変に対応して行きたい。

謝 辞

本研究にご協力頂いた病理部の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al : Wild-type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 26(10) : 1626-1634, 2008.
- 2) Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al : *K-ras* mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New england journal of medicine*. 359(17) : 1757-1765, 2008.
- 3) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al : Panitumumab-FOLFOX4 treatment and *RAS* mutations in colorectal cancer. *New england journal of medicine*. 369(11) : 1023-1034, 2013.
- 4) Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, et al : FOLFOX4 plus cetuximab treatment and *RAS* mutations in colorectal cancer. *European journal of cancer*. 51(10) : 1243-1252, 2015.
- 5) Yokota T, Ura T, Shibata N, et al : *BRAF* mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *British journal of cancer*. 104(5) : 856-862, 2011.
- 6) Ishige T, Itoga S, Sato K, et al : High-throughput screening of extended *RAS* mutations based on high-resolution melting analysis for prediction of anti-EGFR treatment efficacy in colorectal carcinoma. *Clinical biochemistry*. 47(18) : 340-343, 2014.
- 7) 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ドライン第3版. 金原出版. 2016.
- 8) Nakanishi R, Harada J, Tuul M, et al : Prognostic relevance of *KRAS* and *BRAF* mutations in Japanese patients with colorectal cancer. *International journal of clinical oncology*. 18(6) : 1042-1048, 2013.
- 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*. 15 : 258, 2015.
- 10) Shackelford RE, Whitling NA, McNab P, et al : *KRAS* Testing: A Tool for the Implementation of Personalized Medicine. *Genes & cancer*. 3(7-8) : 459-466, 2012.