非小細胞肺癌の分子異常と診断

要 旨

EGFR遺伝子変異の発見以来、非小細胞肺癌では様々な分子診断手法が導入されてきた。最近、liquid biopsyが保険承認され、さらに多遺伝子変異検査の導入も視野に入っている。各検査手法には固有の限界があり、それを理解することが検査手法の導入、臨床応用に必要である。本稿では、遺伝子変異の概略に関して触れ、さらに各検査手法に特徴的な注意点に関して詳述する。

萩原 弘一

〔日内会誌 106：1082～1088, 2017〕

Key words EGFR, Mutation, liquid biopsy, Lusser's law

はじめに

15年前まで、進展した非小細胞肺癌の治療は殺細胞性抗癌薬しか存在しなかった。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) 阻害薬が利用可能になり、さらにEGFR遺伝子変異が発見され、非小細胞肺癌の治療は大きく変わった。その後、多数の分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬が導入され、毎年のように標準的治療法が変更されている。現在、肺癌は悪性腫瘍治療のフロンティアとなっており、肺癌診断だけでなく、他種の癌にも応用可能な様々な知見が得られると期待されている。

効する患者と無効な患者が明確に分かれることから、その原因追求が行われた。2004年、ゲフィチニブが著効する肺癌では、癌細胞にEGFR遺伝子変異がみられることが報告された^{1,2)}。EGFR遺伝子変異を有する肺癌を選択してゲフィチニブを投与すれば効率的な治療を行えると推定され、2010年に臨床試験で証明された^{3,4)}。これら一連の研究は精密医療 (precision medicine) の嚆矢となった。

従来、肺癌の治療方針は病理型で決定していた。しかし、EGFR遺伝子異常の有無は形態学的に判別できない。遺伝子を直接検索することが治療方針決定に必須となった。

1. 分子標的薬の導入

2002年、EGFR阻害薬ゲフィチニブ (gefitinib) が非小細胞肺癌の治療薬として上市された。著

2. driver遺伝子

EGFR遺伝子変異を有する肺癌にEGFR阻害薬が著効することは、変異EGFR遺伝子が肺癌細胞の増殖・生存に必須であることを意味する。こ

自治医科大学内科学講座呼吸器内科学部門

Recent advances in the treatment for lung cancer. Topics : I. Diagnosis of the molecular aberrations in non-small cell cancer.

Koichi Hagiwara : Division of Pulmonary Medicine, Department of Internal Medicine, Jichi Medical University, Japan.

図1 非小細胞肺癌の主要なdriver遺伝子
概数を示す。Driver遺伝子の多くは腺癌で見られる。扁平上皮癌ではKRAS遺伝子以外はほとんどみられない。

のような遺伝子をdriver遺伝子と呼ぶ。同様の作用を有する遺伝子として、ALK融合遺伝子^{5,6)}、ROS1融合遺伝子、RET融合遺伝子^{6~8)}、変異BRAF遺伝子 (Davies H, et al : Nature 417 : 949-954, 2002) が同定された。Driver遺伝子の阻害薬は有効な治療薬になる。変異KRAS遺伝子⁹⁾を含めると、非小細胞肺癌の半数程度で治療標的になり得るdriver遺伝子が同定できる (図1)。

1つの肺癌では1種類のdriver遺伝子しかみられない。肺癌発生の過程では多数の遺伝子変異が起こる。1つdriver遺伝子が生じると発癌に極めて大きな力をもつため、少数の力の弱い遺伝子変異があれば癌が発生する。このため、driver遺伝子は1つだけになると考えられている。Driver遺伝子がなくとも、多数の力の弱い変異遺伝子があれば発癌につながるかもしれない (図2)。Driver遺伝子の明確でない癌は、そのように説明される。

3. 遺伝子変異検査

肺癌遺伝子変異検査に最初に導入されたのはEGFR遺伝子変異検査である。遺伝子変異検査の

Driver遺伝子のある癌細胞

Driver遺伝子のない癌細胞

図2 driver遺伝子と発癌

Driver遺伝子は、癌細胞が生存していくために必須である。それを抑えると癌細胞は死滅するため、driver遺伝子の阻害薬は有効な癌治療薬になる。

基本事項がここで確立された。当初、病理学的に癌細胞が担保できる検体を用いて遺伝子変異検査が行われていた (図3, 通常検体)。しかし、状態の悪い患者などでは必ずしも検体採取が容易でない。そのため、血液や尿などの液性検体中に存在する癌細胞由来DNA (deoxyribonucleic acid)を用いたliquid biopsy検査が実用化された。Liquid biopsyでは提出検体中の癌細胞由来DNAの存在を病理学的に検索できない (図3, liquid biopsy)。そのため、遺伝子変異陰性の結果が出た場合、癌細胞中に本当に変異遺伝子がないのか、検体中に癌細胞由来DNAがないのか区別できない。Liquid biopsyは偽陰性になるリスクの大きい検査であり、あくまで通常検体が取れない場合の緊急避難的な手法である。

4. 検体中の癌細胞比率

臨床検体は正常細胞と癌細胞の混合物である。癌細胞比率が少ない検体では変異遺伝子の

通常検体

細胞診検体

Liquid biopsy 検体

遠心して血漿を遺伝子変異検査に提出

図3 検査検体

遺伝子変異検査には、病理学的に癌細胞の確認できる検体が提出されてきた。近年、liquid biopsyが臨床に導入された。Liquid biopsyは癌細胞由来DNAが含まれているか確認できないため、偽陰性のリスクが大きい。

検出は難しくなる。

図3の手順で病理学的に癌細胞が確認できた通常検体中の癌細胞比率は、おおむね1%以上である。これに対応し、1%の癌細胞比率の検

体から変異遺伝子検出可能な手法を用いて遺伝子変異検査が行われている(図4)。

Liquid biopsy検体では癌細胞比率が不明だが、通常検体より少ないと推定される。では、

図4 検体中の癌細胞由来DNA比率と検査の理論的限界

通常の検体では、検体中の癌細胞由来DNA比率と遺伝子変異検査の感度がほぼ一致している。Liquid biopsyでは癌細胞由来DNA比率は低いと推定される。臨床検体を用いた遺伝子変異検査の理論的限界は癌細胞由来DNA比率0.1%付近になる。

どの程度の癌細胞比率まで検索が可能なのだろうか。

5. 検出の理論的検出限界

遺伝子変異検査では、いかに高感度の検査手法を用いても乗り越えられない理論的検出限界が、癌細胞比率0.1%付近に存在する(図4)。Liquid biopsyで採取可能なDNA量は数ng(細胞1,000個分程度)である。癌細胞比率0.1%の検体から細胞1,000個分程度のDNAを採取することを考えよう。検体中の癌細胞由来DNAの割合は二項分布で計算できる。そして、癌細胞由来のDNAが全く入らない確率が37%にも達することがわかる(図5)。すなわち、サンプリングの段階ですでに偽陰性が37%も出ることになる。サンプリングエラーはDNAが分子である限り避けられない。採取DNA量を10~100倍に増やせばより低い癌細胞比率でも検査可能だが、臨床検体からそのような大量のDNAを採取する

ことは非現実的である。癌細胞比率0.1%は遺伝子変異検査の理論的検出限界といってよい。

通常検体では、「病理学的に癌細胞が確認できる検体」という点で、検出限界の問題は回避できていた(図3)。Liquid biopsyではそれがいないため、大きな偽陰性率をあらかじめ想定して結果を解釈する必要がある。

6. 検体の種類

分子異常を診断する検体には組織検体と細胞診検体がある。使用する検体には、その国の臨床状況が色濃く反映される。

海外では、病理医が遺伝子変異検査を提出する国が多い。生検→パラフィン包埋→切片提出という流れである。そして、海外から輸入された遺伝子検査システムは組織検体を用いるものが多い。一方、日本では気管支鏡検査が盛んで、気管支鏡、超音波プローブを用いて小組織、細胞診検体を採取し、それで癌診断を行うことが

図5 理論的検出限界が生じる理由

遺伝子変異検査には理論的検出限界がある。1,000個に1つ癌細胞がある検体から細胞1,000個をとると、1つも癌細胞が入らない確率は ${}_{1,000}C_0(0.001)^0(0.999)^{1,000}=0.37$ 。Driver変異では癌細胞の2つのアレルのうち1つのみ変異しているため、DNAレベルで考えると特定の遺伝子に関し、癌細胞由来の遺伝子が入らない確率は ${}_{2,000}C_0(0.0005)^0(0.9995)^{2,000}=0.37$ と計算される。このサンプリングエラーは避けられない。

多い。日本の遺伝子検査システムは細胞診検体も検査可能なものが多い理由の1つは、使用手技の違いもあると推定される。

現在、肺癌では、変異EGFR遺伝子、ALK融合遺伝子、PD-1発現の検索が必須である。全てを組織検体で検索すると、採取組織をほぼ使い切ってしまうため、これ以上遺伝子が増えたら検索は不可能になると危惧されている。細胞診検体は有用な検体であり、EGFR遺伝子は細胞診検体で十分に検索できる。次世代シーケンサーによる多遺伝子変異検査も可能である。臨床の実態に合わせて様々な検体が使用可能になるよう、基盤整備を行うことが望ましい。

7. 多遺伝子変異検査

次世代シーケンサーが基礎医学で広く使われるようになり、多遺伝子変異検査への期待が高まっている。多遺伝子変異検査には特有の問

題があり、それを考える必要がある。

様々な多遺伝子変異検査が考案されているが、いずれも検索遺伝子が多すぎる問題がある。数十～数百の遺伝子を検索しても、図1のdriver遺伝子以外は臨床的意義が確立されていないため、無駄な情報として捨て去るしかない。

次いで、検査精度の問題がある。単一遺伝子を0.99の特異度（偽陽性率0.01）で検索する遺伝子変異検査は優秀な検査だが、その特異度で100個の遺伝子を検索した場合を考えてみる。全く変異のない組織を検索しても、各遺伝子0.01の割合で積み重なる偽陽性のため、65%の患者で偽陽性が生じ、遺伝子変異があると判定される。すなわち、65%の患者に誤った分子標的薬が投与される危険性がある（図6）。この問題はLusserの法則として知られ、月面着陸を目指したアポロ計画の時に重要視された。ロケットでは各部品が99%の確率で正確に働いても1つの部品が故障すると正確に飛ばない。全ての

各遺伝子変異検出の特異度が0.99でも、100遺伝子を調べると67%のサンプルで偽陽性が出る。

図6 多遺伝子変異検査とLusserの法則

一つひとつの遺伝子が正確に調べられても、複数の遺伝子を調べるとエラーが蓄積し、システム全体としては大きなエラーとなる。

図7 MINTSシステム

次世代シーケンサーを用いたdriver遺伝子検索システムの例。遺伝子数を限り、症例数を増やし、癌細胞を1%含む検体からの各単一遺伝子変異検出の感度特異度を各遺伝子0.999以上、システム全体として癌細胞を1%含む検体からの遺伝子変異検出感度特異度を0.99以上にしている。

部品が働いてロケットが正確に飛ぶために、各部品が正確に働く確率として99.9999%が求め

られた。多遺伝子変異検査でも同様のことがいえる。単一遺伝子の検出特異度を非常に高く

し、全体として正確な結果を出す必要がある。

上記を解決する例として、我々のシステムを紹介する^{10,11)}(図7)。検索遺伝子数をdriver遺伝子に限ると次世代シーケンサーの余力ができ、多数の検体が同時検索できる。それを利用して200検体が同時検索できるようにした。癌細胞を1%含む検体からの各単一遺伝子変異検出感度、特異度を0.999以上に上げ、Lusserの法則を考慮しても全体として癌細胞を1%含む検体からの遺伝子変異検出感度、特異度0.99以上が可能になるようにした。このようなシステムが、臨床検査として望ましいと考えている。

おわりに

EGFR遺伝子変異検査の導入後、非小細胞肺癌では様々な分子標的薬が導入された。薬剤の適正使用のため遺伝子変異検査をどのように利用していったらよいか模索が続いている。日本の医師は、患者の身体的負担を軽減して小さな組織でも検査ができるよう工夫してきた。海外の企業から輸入された検査システムは大きな組織を要求するものが多く、必ずしも日本の臨床の実情に合っていない。実情に合った合理的な検査体制が構築できるよう望みたい。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：萩原弘一；特許使用料 (LSIメディエンス)，講演料 (アストラゼネカ)，寄附金 (小野薬品工業)

文献

- 1) Lynch TJ, et al : Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350 : 2129-2139, 2004.
- 2) Paez JG, et al : EGFR mutations in lung cancer : correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304 : 1497-1500, 2004.
- 3) Maemondo M, et al : Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 362 : 2380-2388, 2010. doi : 10.1056/NEJMoa0909530.
- 4) Mitsudomi T, et al : Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405) : an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 11 : 121-128, 2010. doi : 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
- 5) Soda M, et al : Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448 : 561-566, 2007. doi : 10.1038/nature05945.
- 6) Takeuchi K, et al : RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 18 : 378-381, 2012. doi : 10.1038/nm.2658.
- 7) Kohno T, et al : KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 18 : 375-377, 2012. doi : 10.1038/nm.2644.
- 8) Lipson D, et al : Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med* 18 : 382-384, 2012. doi : 10.1038/nm.2673.
- 9) McGrath JP, et al : Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304 : 501-506, 1983.
- 10) 平成25～27年度厚生労働科学研究費「高速シーケンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システムの構築」(研究代表者：萩原弘一)。
- 11) Inoue Y, et al : A Highly Specific and Sensitive Massive Parallel Sequencer-based Test for Somatic Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 12 : e0176525, 2017.