白血病の臨床シーケンス

要 旨

ゲノム解析技術の飛躍的な進歩によって、ゲノム医療が臨床に導入されつつある。ゲノム医療は、個々の患者の腫瘍細胞が有する詳細な変異情報に基づいて、適切な診断、予後予測、治療薬剤の選択を可能とすることで、医療の個別化を推進し、診療成績を向上させる可能性を秘めている。しかし、ゲノム解析の結果を適切に解釈するためには、解析技術に対する正しい理解が必要である。同時に、新たに生じる倫理的な問題に関する認識も重要である。

南谷 泰仁

〔日内会誌 107 : 1324~1330, 2018〕

Key words 遺伝子パネル検査, 次世代シーケンス, precision medicine

はじめに

過去10年間でみられたシーケンス技術の飛躍的な発展により、腫瘍細胞の網羅的なゲノム異常の検出が可能となり、多くのがん腫の遺伝子変異プロファイルが明らかになった。爆発的に増加したがんの遺伝子変異情報は、臨床データとの照合によって、特定のゲノム異常と特徴的な臨床像や予後・治療反応性が関連することもわかってきた。これは、個々の患者のもつ腫瘍の「性格」を見極め、それに応じて対処をする医療、すなわち「個別化医療」を推進するための必要不可欠なツールである。次世代シーケンスは、飛躍的なコストの低下とスループットの向上（一定時間におけるSystem処理能力の向上）によって、臨床検査の手段として用いることが現実的になってきた。段階的ではあるものの、網羅的な遺伝子検査が「臨床シーケンス」として我が国の診療現場に導入され

つつあり、近い将来、多くの医師が触れることになる。急速に身近な存在となる「臨床シーケンス」を正しく理解するために、その原理と応用を概説する。

1. 次世代シーケンサーの原理と臨床シーケンスに用いる技術

次世代シーケンサーは、従来のキャピラリーシーケンサーに代わる技術を用いて、核酸配列の決定を行う技術の総称である。現在、主に用いられている技術は、核酸合成を行う際に発する蛍光・発光を検出して塩基を決定するものであるが、1分子の鋳型からDNA (deoxyribonucleic acid) 合成を行う際に発生するシグナルを検出する方法や、微少な穴をDNAが通過する際に発生する電子信号を蛍光・発光以外の方法を用いて認識し、塩基配列を読む方法も開発されている。次世代シーケンサーの技術革新

京都大学腫瘍生物学講座

Acute leukemia. Topics : VIII. Clinical sequencing for leukemia.

Yasuhiro Nannya : Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University, Japan.

のスピードはめざましく、最新の機種では1回の処理実行(system-run)で6T(1T=1兆)ベースを読むことができる(Illumina社のNovaSeq)。ヒトのゲノムサイズは約3G(1G=10億)ベースであることを考えると、その威力を実感しやすい。次世代シーケンサーは、さまざまなアプリケーションに用いられている。例えば、mRNA(messenger ribonucleic acid)を対象としたRNA-Seqは、遺伝子発現の定量やスプライシングの変化の評価に用いられる。また、免疫沈降によって特定の蛋白質に結合したDNAを対象とすることで、その蛋白質の結合配列の決定や結合パターンの評価が可能である。その他、対象とするDNAの範囲によって「全ゲノムシーケンス」や「全エクソンシーケンス」等が可能であるが、現時点では、臨床シーケンスに使用されるアプリケーションは「標的シーケンス」である。これは解析の対象領域を予め絞る方法である(一般的に全ゲノムの~1/100程度にすることが多い)。具体的には、腫瘍由来のゲノムDNAから、対象領域に相補的な核酸プローブを用いて、標的領域のゲノムDNAを選択的に抽出してから、シーケンス処理を行う。メリットは、シーケンス及び生成データの管理・解析コストを低減させることであり、対象領域を限定する代わりに、読む回数(これをシーケンスの深度という)を増やすことで、変異の割合を正確に定量し、クローンの構成を調べたり治療後の微小残存病変(minimal residual disease:MRD)の評価を行ったりすることができる。デメリットは、対象領域を濃縮する手間やコストがかかること、標的とした領域の変異しか検出できないことである。しかし、現在のペースでシーケンスのスループットやコストパフォーマンスが向上するのであれば、対象領域を濃縮する手間やコストが不要な「全ゲノムシーケンシング」が、次第に「臨床シーケンシング」を目的とした解析に使われるようになって考えられる。

2. 次世代シーケンスでわかること

次世代シーケンサーによって得られた短い塩基配列の情報は、コンピュータで解析される。まず各配列(リード)のヒトゲノム上における位置を決定し(マッピング)、reference genomeと比較することで相違点を検出する。同一部位を複数回読んで統計的な処理を行うことで、シーケンサーエラーと真の変異を区別し、変異の候補を抽出する。その結果、以下のような種類の変化を検出する。

1) 一塩基置換(single nucleotide variant: SNV), 2) 短い欠失や挿入(insertion/deletion, まとめてindelと呼ぶ), 3) ゲノム構造異常(染色体転座, 大きなゲノム領域の欠失や重複等, リードの両端がゲノム上の異なる領域にマッピングされる場合に検出される), 4) コピー数異常(同一領域のシーケンス深度を他の検体と比較して変化を評価する), 5) ヘテロ接合性の消失(ヘテロSNPsのコールの比を評価する)。

標的シーケンシングでは、選択した標的領域に生じた変化のみを検出することができるため、設計(標的領域を選択すること)は非常に重要である。通常、高頻度に変異がみられる遺伝子のエクソン領域を含めるが、プロモータやエンハンサー等の転写調節領域(固形癌における*TERT*遺伝子のプロモータ等)や、構造異常の切断点が集積するイントロン領域等、重要と思われる箇所も含める。そのため、標的シーケンシングで網羅的なゲノム構造異常の検出を行うことは困難であり、そのような目的にはG分染やFISH(fluorescence in situ hybridization)等の染色体分析法の活用を考慮するべきである。RNA-Seqもキメラ遺伝子の検出には有用である。臨床シーケンシングでは、異常のある変異のリストが返却される。これが特定の異常の「有無」が返却される従来型の遺伝子検査と大きく異なる点であり、ある異常がリストにない場合、異常そのものがない場合とその検査系では検出でき

ないものである場合の両方の可能性を考える必要がある。臨床シーケンスの結果を正しく解釈するためには、次世代シーケンサーの原理と設計を理解して、検出可能な異常の範囲を認識することが極めて重要である。

3. 臨床的有用性

【診断・診断の補助】診断における遺伝子異常の役割は、疾患によってさまざまなパターンがみられる。

1) 特定の遺伝子異常の検出が診断の必要条件となっている場合

慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia：CML）における*BCR-ABL1*の検出や、myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia with gene rearrangementにおける*PDGFRA/PDGFRB/FGFR1*を含む変異や*PCM1-JAK2*の検出がその例である。

2) ある異常が検出される場合、診断におけるその他の基準が緩和される場合

例えば、*SF3B1* 遺伝子変異を有する場合、MDS-RS-SLD（myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts with single lineage dysplasia）/ MDS-RS-MLD（MDS-RS with multilineage dysplasia）と診断するために必要な環状鉄芽球の割合は5%でよい（*SF3B1* 変異がない場合は15%必要である）。また*JAK2* 遺伝子のV617Fがexon12の変異が存在する場合、他の主要基準1つと副基準を満たせば、真性多血症（polycythemia vera：PV）と診断できる（これらの*JAK2*変異がない場合、他の主要基準は2つとも満たす必要がある）。

3) 遺伝子異常が診断基準の構成要素ではないが、検出された場合にある疾患を疑わせる場合

ただし、歴史的に形態診断による疾患概念の

確立が先行した場合は、遺伝子変異との関連が強くても診断の必要条件とならないこともある。有毛細胞白血病における*BRAF V600F*変異がその例で、診断基準には含まれないが、ほぼ全ての症例にみられる。遺伝子変異がある病型と弱い関連を認める多くの例（慢性骨髄単球性白血病（英名（chronic myelomonocytic leukemia：CMML）における*SRSF2*や血管免疫芽球性T細胞リンパ腫（angioimmunoblastic T-cell lymphoma：AITL）における*RHOA*等）もこの場合に含まれる。

また、前述したように、診断に用いられた疾患に特異的な遺伝子変異はMRDの検出標的としても用いることができる。Ph陽性白血病における*BCR-ABL1*や急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia：AML）における*NPM1*変異の有用性が証明されている。診断時には複数の変異が検出されることがあるが、どの変異をMRDの標的として用いるかというのは難しい問題である。*DNMT3A*のように、クローン性造血や前白血病幹細胞にみられる変異は残存していても、白血病細胞の残存を示すわけではない。逆に、腫瘍のサブクローンにのみ存在する変異は、MRDとして用いるには過小評価になることがある。

4. 治療薬の使用・選択

次世代シーケンサーによる遺伝子異常の知見の蓄積によってもたらされる最大の貢献の1つは、分子病理の解明とその発症メカニズムを標的とする治療法の開発であろう。CMLにおける*BCR-ABL1*の発見に伴う*ABL1*阻害薬の開発は、その端緒となった象徴的な出来事である。このような薬剤では、特定の分子異常と有効性の間に強い関連がみられるため、厚生労働省の定める薬剤の使用条件に特定の遺伝子変異の証明が含まれることがある。CMLに対する*ABL1*阻害薬のほかには、*FIP111*-*PDGFRA*陽性好酸球増

多症に対するイマチニブやPML-RARA陽性APLに対するレチノイン酸等がその例である。CCR4陽性成人T細胞白血病（adult T-cell leukemia：ATL）に対するモガムリズマブやCD33陽性AMLに対するゲムツズマブ・オゾガマイシンも発現の証明が必要であるが、このように抗体型の分子標的薬の使用条件として標的分子の発現を証明する場合には、次世代シーケンサーの有用性は少ない。しかし、FLT3変異陽性AMLに対するmidostaurinやIDH2変異陽性AMLに対するenasidenib等、次世代シーケンサーが効率的に検出可能な遺伝子変異を標的とする薬剤が次々と開発されており、既にFDA（Food and Drug Administration）の承認を受けている。さらに、BRAF, IDH1, SF3B1, AKT1, CDK6, FGFR, LCK等の分子標的薬が現在開発中である。臨床シーケンスの目的の1つに、このような薬剤開発のプロセスを促進するということがある。例として、国立がん研究センターが中心となって進めている「SCRUM-JAPAN」が挙げられるが、これは稀少肺癌と消化器癌を対象とした全国のがん診療施設と多数の製薬企業が参加する臨床研究であり、次世代シーケンスの結果、検出された異常に適した薬剤の開発治験に患者を誘導することで、治験の促進を図っている。さらに、ある変異が薬剤の選択に関する情報を提供することもある。CMLにおけるABL1遺伝子変異の種類に応じたチロシンキナーゼ阻害薬の選択が代表的な例である。

5. 予後予測

遺伝子異常のなかには、予後予測因子としての役割をもつものも多く知られている。いくつかの疾患では、核型異常に加え、遺伝子変異も考慮した予後予測システムが提唱されている。疾患の特性としての悪性度を予測する因子と、特定の治療に対する反応性を予測する因子があり、両者を区別することが必要である。前者は

悪性度の高い症例には積極的に造血幹細胞移植を考慮したりする場合に用いられるが、後者は薬剤選択を含む治療の最適化に使用される。

6. ゲノム診療実現に向けた世界の動き

2015年の一般教書演説において当時のオバマ米大統領がprecision medicine initiativeの立ち上げを提唱した。これは、ある疾病・疾患に罹患する平均的な患者に画一的な医療を提供することを目的とした従来型の医療から、ゲノム等個人の医療情報を活用した個別化治療への転換を図ることで、医療全体の水準向上を図るものである。その目標を達成するためには、臨床シーケンスの普及が前提となる。アメリカでは、臨床の場で実施可能な遺伝子検査が約4,600項目あるといわれており、臨床シーケンスを行う素地や下地がある。さらに、網羅的な検査を可能とした遺伝子パネルも複数開発されている。そのうち、がん診療を目的とした代表的な遺伝子パネルとして「MSK-IMPACT」がある。これは、ニューヨークのMemorial Sloan Ketteringがんセンターが開発したパネルであり、468個のがん関連遺伝子と18種類の融合遺伝子から構成されている。MSK-IMPACTは既に20,000例の検査実績を有しており¹⁾、2017年11月にはFDAの承認を受けた。我が国でも順天堂大学や横浜市立大学がMSK-IMPACTを導入しており、これを用いた臨床シーケンスを実施している。

7. 日本のゲノム診療の体制構築と臨床シーケンス導入への動き

我が国のゲノム医療の導入については、厚労省は「がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会」を設立し、その体制や具体的な方法を検討している。日本はゲノム医療を保険診療として国民皆保険制度のなかで行うことを目指している。その他には、韓国が2017年より保険診療

表1 がんゲノム医療の実施に必要な要件（厚生労働省通知 健発 1225 第3号がんゲノム医療中核拠点病院等の整備について）

①パネル検査を実施できる体制がある（外部機関との委託を含む）。
②パネル検査結果の医学的解釈可能な専門家集団を有している（一部の診療領域について他機関との連携により対応することを含む）。
③遺伝性腫瘍等の患者に対して専門的な遺伝カウンセリングが可能である。
④パネル検査等の対象者について一定数以上の症例を有している。
⑤パネル検査結果や臨床情報等について、セキュリティが担保された適切な方法で収集・管理することができ、必要な情報については「がんゲノム情報管理センター」に登録する。
⑥手術検体等生体試料を新鮮凍結保存可能な体制を有している。
⑦先進医療、医師主導治験、国際共同治験も含めた臨床試験・治験等の実施について適切な体制を備えており、一定の実績を有している。
⑧医療情報の利活用や治験情報の提供等について患者等にとって分かりやすくアクセスしやすい窓口を有している。

による遺伝子パネル検査を開始した。この流れの一環として、2018年2月に厚労省は11カ所の「がんゲノム医療中核拠点病院」を選定した。これは表1の要件を満たした施設であり、「がんゲノム医療連携病院」と連携し、我が国のがんゲノム医療実施の中核を担うことが期待されている。将来的には、「がんゲノム医療連携病院」のうち、パネル検査の医学的解釈を自施設で実施することが可能となった施設が「がんゲノム医療拠点病院」に昇格することで、拠点病院の増加とゲノム医療の普及を促進する。さらに同月、国立がん研究センターの申請した固形がん用のパネル検査を「パネル検査を用いた医療技術等」の先進医療として承認した。これは、有効性や問題点を評価した後、薬事承認と保険収載を目指す予定である。

8. 血液腫瘍における臨床シーケンス

このような流れのなか、2017年8月に日本血液学会はゲノム医療部会を立ち上げ、臨床上有用なゲノム検査の指針を作成した。この部会は造血器腫瘍の診断・予後予測・治療の観点から有用と思われる遺伝子変異を選定し（表2）、造血器腫瘍用のパネル検査に含まれるべき遺伝子セットの標準モデルを提唱した。これをもと

に、検査会社や中核拠点病院がパネルを開発する流れを促進することで、血液腫瘍の分野でもゲノム医療の恩恵を受けることができるようにした。指針では、パネル検査を中心としたゲノム解析を臨床の場で用いるべき病態や活用法に関する情報も提供されている。

9. ゲノム医療の倫理的な問題

1) 個人情報の扱いと体制の構築

ゲノム医療は、新たな倫理的問題を生み出した。臨床シーケンスは「個別化医療」を目指したゲノム医療であり、その性質から不可避免的にゲノムという個人情報を扱う。網羅的なゲノム情報は個人を特定し得るという考えから、個人のゲノム情報は個人情報として扱われ、疾患情報等の要配慮個人情報とセットで用いられる性格上、ゲノム医療においても慎重な扱いが求められている。ゲノム解析の結果そのものも要配慮個人情報となる。また、患者が正しく結果を解釈することは非常に困難であり、医師にも説明するための十分な時間がない。国民の理解を高める啓発活動や、ゲノム医療の意義や結果を説明することのできる医師・コメディカルの育成も課題である。

表2 ゲノム検査の提供するエビデンスレベル (日本血液学会ゲノム医療部会作成)

エビデンス	治療	診断	予後
レベル A	当該血液腫瘍を対象として： 1. 薬事承認において、適応の条件としてあげられている遺伝子変異 2. FDA 承認において、適応の条件としてあげられている遺伝子変異 3. 治療*に対する反応性や抵抗性を予見するバイオマーカーとして、日本もしくは海外の学会指針等のガイドラインに収載されている遺伝子変異	当該血液腫瘍の診断に有用なバイオマーカーとして、学会指針、もしくは専門家によるガイドライン等に収載されている遺伝子変異	当該血液腫瘍の予後予測に有用なバイオマーカーとして、学会指針、もしくは専門家によるガイドライン等に収載されている遺伝子変異
レベル B	当該血液腫瘍を対象とした治療に対する反応性や抵抗性を予見するバイオマーカーとして、統計学的信憑性の高い臨床試験で証明され、かつ当該分野の専門家間のコンセンサスを得た遺伝子変異	当該血液腫瘍の診断に有用なバイオマーカーとして、統計学的信憑性の高い大規模臨床試験で証明され、当該分野の専門家間のコンセンサスを得た遺伝子変異	当該血液腫瘍の予後予測に有用なバイオマーカーとして、統計学的信憑性の高い大規模臨床試験で証明され、当該分野の専門家間のコンセンサスを得た遺伝子変異
レベル C	1. 当該血液腫瘍以外のがん種を対象に、薬事承認、FDA 承認、もしくは学会承認された治療への反応性や抵抗性を予見する遺伝子変異 2. 臨床試験において治療選択基準として使用されている遺伝子変異	診断に有用なバイオマーカーとして、多数の小規模臨床試験で証明された遺伝子変異	予後予測に有用なバイオマーカーとして、多数の小規模臨床試験で証明された遺伝子変異
レベル D	1. 小規模臨床試験や複数の症例報告から、治療に対する反応性や抵抗性を予見するバイオマーカーとして示唆される遺伝子変異 2. 前臨床研究から、治療に対する反応性や抵抗性を予見するバイオマーカーとして示唆される遺伝子変異	小規模臨床試験や複数の症例報告から、単独、もしくは他のバイオマーカーとの併用により、診断における有用性が示唆される遺伝子変異	小規模臨床試験や複数の症例報告から、単独、もしくは他のバイオマーカーとの併用により、予後予測における有用性が示唆される遺伝子変異

*治療薬だけでなく、各種の治療法（幹細胞移植法、免疫抑制療法、多剤併用化学療法など）も含む。

2) 生殖細胞変異の検出

網羅的な遺伝子シークエンスの結果、当初の検査目的とは別の他の疾患リスク上昇を来たす生殖細胞変異が偶然発見されることがあり、これを偶発的・二次的所見という。米国臨床遺伝学会は、変異に病的意義があり、かつ、予防法や治療法があり (actionable)、知らせることで患者と家族にベネフィットがあるという観点から、偶発的・二次的所見を患者に報告すべき遺伝子リストを作成している²⁾。現在のリストには、腫瘍性疾患、循環器疾患、代謝疾患等計24疾患の56遺伝子が含まれている。医師は患者に対し、臨床シークエンス検査を受ける前に、偶発的・二次的所見が発見される可能性について説明すべきであり、報告を受けることを希望し

ない権利 (オプトアウト権) が認められる。偶発的・二次的所見が認められた場合は、認証ラボにおいてSanger法による確認が必要であり、確認された場合は、遺伝カウンセリングを提供する体制を整備する必要がある。約1%の患者にこのような所見が見つかるという推計が出ており³⁾、臨床シークエンスを行う際には意識をしておかなければいけない問題である。また、近年、造血器腫瘍を生じやすい体質をもたらす生殖細胞変異が多く存在することがわかってきた。現在、このような変異のリストが次第に増加している。しかし、多くの場合、変異保有者が疾患を発症する割合 (浸透率) が明らかにならず、どのような対処が適切であるかというエビデンスが存在しないため、状況に応じて個別の判断が必要となる。例えば、白血病発症

リスクのある生殖細胞変異をもつ患者が血縁ドナーからの幹細胞移植を受ける場合、ドナーが同じ変異を保有している可能性があるため、患者に通知してドナーの検査を勧めることがある。これは、患者のメリットを考えると合理的に思えるが、健常者として生きてきたドナーの知らない権利を確保することができないため、家族関係やドナーの性格を考慮して慎重に判断すべき事項である。

おわりに

次世代シーケンサー技術の発展は、多くの遺伝子変異検査を安価に高いスループットで行えるのみならず、新たな知見をもたらし、将来の医学を発展させるポテンシャルをもつ。その実現のためには、大量の情報を効率的に収集し、利用可能な形に集約化することが必要である。腫瘍細胞の形態的特徴や薬剤の副作用等の

詳細な臨床情報とのリンクも必要となる。個人情報保護に配慮しながら、こうしたデータを集積し、情報処理によって新たな知見を生む作業は、高度な知識集約型の新たな医学分野であり、強力なリーダーシップのもとに体制を構築することが必要である。2015年の一般教書演説において、オバマ米大統領が“personalized medicine”ではなく、“precision medicine”という言葉を使ったことは、患者のゲノム情報を個々の患者の診療に用いるのみならず、さらに、患者全体のゲノム情報を包括的に集約したビッグデータ解析を通じて得られた成果を将来の一般の医療へ広げていく方向性を明らかにした国家戦略を示したものであると考えられる。ゲノム医療のもたらす循環型の効用を上手く活かすことが重要である。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：南谷泰仁；研究費・助成金（武田科学振興財団）

文献

- 1) Zehir A, et al : Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. Nat Med 23 : 703-713, 2017.
- 2) Kalia SS, et al : Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0) : a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med 19 : 249-255, 2017.
- 3) Olsson E, et al : Identification of Medically Actionable Secondary Findings in the 1000 Genomes. PloS One 10 : e0135193, 2015.