

**Fig. 2.** Sensitivity of T790M detection. The percentages indicate the calculated proportion of T790M DNA in a mixture with wild-type DNA. An arrow at 5442 Da indicates the detection of the T790M mutation. An asterisk indicates a non-specific background peak. Three independent experiments were performed in duplicate, with identical results. DW, distilled water; UEP, unextended primer.

ThermoSequenase (Sequenom). The thermal cycling program for the reaction included an initial denaturation for 30 s at 94°C followed by five cycles of 5 s at 52°C and 5 s at 80°C. Forty additional annealing and extension cycles (5 s at 94°C, 5 s at 52°C, and 5 s at 80°C) were then performed. The final extension was performed at 72°C for 3 min, and the samples were then cooled to 4°C. The reaction products were desalted by dilution with 41 µL of distilled water, the addition of 15 mg of ion-exchange resin (Sequenom), and subsequent separation of the resin by centrifugation. The products were spotted on a SpectroChip II (Sequenom), processed, and analyzed using a Compact Mass Spectrometer and MassARRAY Workstation (version 3.3) software (Sequenom). The data analysis was performed using MassARRAY Typer software, version 4.0 (Sequenom).

**Sequencing analysis.** The PCR products were subcloned into a pTA2 vector (Toyobo, Osaka, Japan) and sequenced using an automated sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and M13 universal primers (Applied Biosystems).

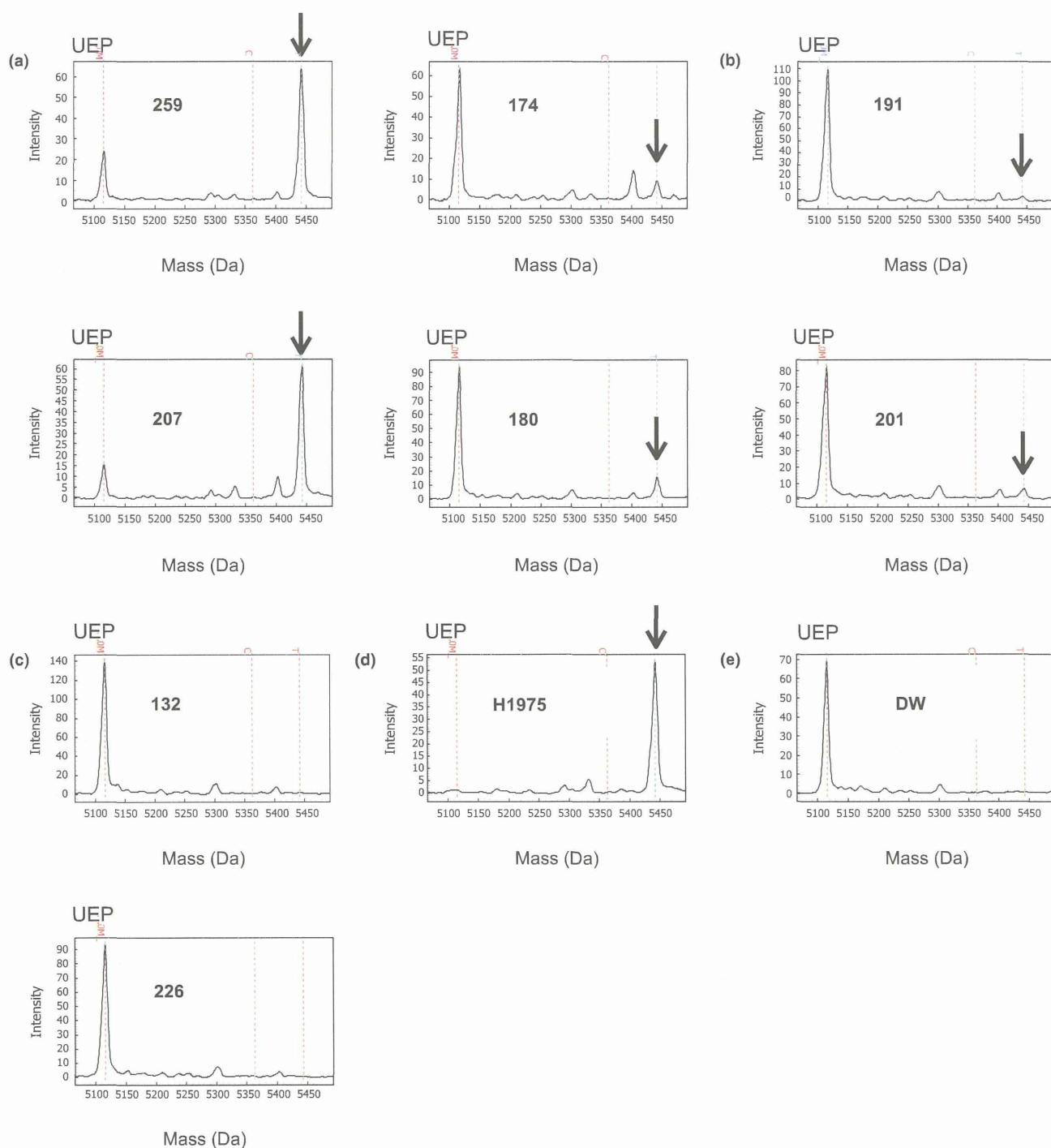
**Scorpion ARMS analysis.** Scorpion ARMS analysis used the DxS EGFR Mutation Test Kit for research use only (Qiagen)

and was carried out according to the manufacturer's instructions.

**Statistical analyses.** The Fisher exact test was used to assess the relationship between the T790M mutation status and different clinical characteristics, including patient sex and the primary mutation status. The objective tumor response (partial response [PR], stable disease [SD], or progressive disease [PD]) was evaluated according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors guidelines. Progression-free survival (PFS) was defined as the period from the start of treatment until the date when disease progression was observed. The survival curves were derived using the Kaplan–Meier method and were compared using the log-rank test. All the statistical analyses were performed using JMP software (version 10; SAS Institute, Cary, NC, USA). A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

**Assay sensitivity.** The assay sensitivity was determined using T790M DNA oligonucleotide ( $5.0 \times 10^{-16}$ ,  $2.5 \times 10^{-16}$ ,  $1.3 \times 10^{-16}$ ,  $6.3 \times 10^{-17}$ ,  $3.1 \times 10^{-17}$ ,  $1.6 \times 10^{-17}$ , and



**Fig. 3.** Mass spectroscopy (MS) analysis of the T790M mutation in plasma DNA. An arrow at 5442 Da indicates the detection of the T790M mutation. (a) Example of a T790M-SABER/subcloning double-positive sample. (b) Example of a T790M-positive case that was only detected using the T790M SABER method. (c) Example of a T790M-negative case, as detected using the T790M SABER method. (d) Positive control for the T790M-SABER method using T790M-positive human non-small cell lung cancer (NSCLC) H1975 cells. (e) Negative control for the T790M-SABER method using distilled water. The experiment was repeated twice with identical results. DW, distilled water; UEP, unextended primer.

$7.8 \times 10^{-18}$  mol/reaction (i.e. 4.8%, 2.4%, 1.2%, 0.6%, 0.3%, 0.2%, and 0.1%, respectively) mixed with a fixed amount ( $1 \times 10^{-14}$  mol/reaction) of wild-type DNA oligonucleotide. Figure 2 shows the MALDI-TOF MS spectra. Concentrations as low as  $3.1 \times 10^{-17}$  mol of T790M DNA mixed with

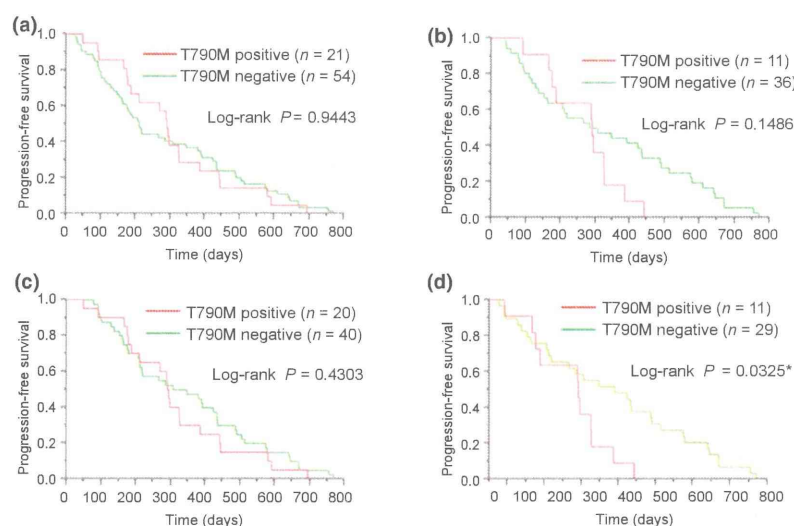
$1 \times 10^{-14}$  mol of wild-type DNA could be detected, indicating a detection sensitivity of approximately 0.3%, which is in agreement with previous studies using SABER.<sup>(6)</sup>

**Detection of T790M in plasma DNA.** We examined the T790M mutation status in plasma samples obtained after dis-

**Table 3. Clinical characteristics of T790M mutation positive patients with acquired resistance to epidermal growth factor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI)**

No.	Age	Sex	Histology	Pre-treatment EGFR mutation status (tumor) <sup>†</sup>		Response to EGFR-TKI	From PD to plasma collection (days)	Post-treatment T790M mutation status (plasma) <sup>‡</sup>	
				Direct sequencing	SABER			SABER	Clonal analysis T790M clones/Total clones
147	69	F	Ad	unknown	—	PR	139	+	0/105
162	76	F	Ad	L858R	—	PR	190	+	0/105
174	60	F	Ad	del E746-A751	n.t.	PR	272	+	2/20
180	67	F	Ad	del E746-A751	n.t.	PR	34	+	3/25
185	75	M	Ad	G719X	+	PR	17	+	1/55
191	56	F	Ad	L858R	—	PR	17	+	0/105
192	68	M	Ad	del E746-A751	—	PR	65	+	0/105
199	72	M	Ad	L858R	—	PR	0	+	0/100
201	73	F	Ad	del E746-A751	—	PR	390	+	0/105
207	64	F	Ad	L858R	—	PR	44	+	4/35
214	61	F	Ad	L858R	—	PR	60	+	2/65
217	71	F	Ad	unknown	n.t.	PR	128	+	3/20
235	69	F	Ad	unknown	n.t.	PR	222	+	1/35
243	59	M	Ad	L858R	—	PR	14	+	1/25
246	54	F	Ad	del E746-A751	—	PR	182	+	1/20
248	42	F	Large	del E746-A751	n.t.	PR	23	+	1/30
258	44	M	Ad	del E746-A751	—	PR	299	+	1/100
259	60	F	Ad	L858R	—	PR	237	+	2/25
279	71	F	Ad	L858R	n.t.	SD	379	+	1/30
306	43	M	Ad	del E746-A751	n.t.	PR	34	+	1/57
308	65	M	Sq	del E746-A751	n.t.	PR	42	+	0/105

<sup>†</sup>The EGFR mutation status of each tumor sample was analyzed using direct sequencing and SABER (single allele base extension reaction) method. <sup>‡</sup>The EGFR mutation status of each plasma sample was analyzed using the SABER method and was confirmed using clonal analysis. +, T790M positive; —, T790M negative; Ad, adenocarcinoma; Large, large cell carcinoma; n.t., not tested; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease; Sq, squamous cell carcinoma.



**Fig. 4.** Progression-free survival according to T790M mutation status as measured in plasma DNA. The Kaplan-Meier progression-free survival curves are shown for all the T790M-positive and T790M-negative patients ( $n = 75$ ) in (a), for patients aged 65 years or younger ( $n = 47$ ) in (b), for patients with a partial response to epidermal growth factor-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) treatment ( $n = 60$ ) in (c), and for patients aged 65 years or younger who had a partial response to EGFR-TKI treatment ( $n = 40$ ) in (d).

continuation of EGFR-TKI. Using the SABER method, the internal control was successfully amplified and detected in all the samples (data not shown). The T790M mutation was detected in 21 of the 75 samples (28%). The key results of the SABER method are shown in Figure 3. The clinical characteristics of the T790M-positive patients are shown in Table 3.

The presence of the T790M mutation was confirmed by subcloning into sequencing vectors and sequencing. When up to 105 colonies were selected and sequenced (theoretical median limit of detection of 0.95%), the T790M mutation was confirmed in 14 of the 21 (66.6%) PCR products. The T790M mutation in plasma was also identified by the Scorpion ARMS (Table S1).

T790M was detected in 6/75 cases (8%). Of these cases, 5/6 were also positive by the SABER method. Compared to the positive rate (28%, 21/75) when using the SABER method, the rate detected by the Scorpion ARMS was relatively low.

**Detection of T790M in pretreatment tumor specimens.** We analyzed the T790M mutation status in the tumor samples using the SABER method. All of the tumor samples were obtained before the EGFR-TKI treatment. No tumor sample was obtained by the re-biopsy after EGFR-TKI treatment. T790M was detected in two tumor samples (Table S1). One case (no. 185) was double positive (tissue +, plasma +). Another case (no. 167) was T790M positive in tumor samples only. The positive rate (7%, 2/28) was relatively low as compared with that of plasma samples (46%, 13/28). These data suggest that the T790M mutation detected in the plasma is acquired by EGFR-TKI treatment and that detection of T790M in the plasma is feasible to detect EGFR-TKI refractory cases.

**Correlation between plasma T790M mutation status and clinical outcome.** There was no significant difference in clinical characteristics between patients with or without T790M mutation (Table 1). T790M positive detection tends to be observed more frequently in PR patients compared with non-PR patients although the correlation is not highly significant ( $P = 0.053$ , Table 1).

In our cohort of 75 patients, the median PFS of the patients with the T790M mutation ( $n = 21$ ) was not statistically different from that of the patients without the mutation ( $n = 54$ ) ( $P = 0.9443$ ), being 289 days and 210 days, respectively (Fig. 4a). When patients aged 65 years or younger were subdivided into two groups according to their plasma T790M status, the median PFS of the T790M-positive patients ( $n = 11$ ) tended to be shorter than that of the T790M-negative patients ( $n = 36$ ,  $P = 0.1486$ ; Fig. 4b). We also compared the PFS of patients according to their response to the EGFR-TKIs and found no statistical differences between the responders (PR) and the non-responders ( $P = 0.4303$ ; Fig. 4c). When patients aged 65 years or younger who had a PR were grouped according to their plasma T790M mutation status, the PFS of the T790M-positive patients ( $n = 11$ ) was significantly shorter than that of the T790M-negative patients ( $n = 29$ ,  $P = 0.0325$ ; Fig. 4d) being 289 days and 391 days, respectively.

## Discussion

Our findings show that the T790M mutation can be detected in plasma samples obtained after discontinuation of EGFR-TKI and that the SABER method is a feasible means of determining the plasma T790M mutation status. We detected the T790M mutation in 21 out of 75 plasma samples that were obtained from patients after discontinuation of EGFR-TKI (28%). This frequency seems to be lower than the positive rate (~50%) in tumor tissue samples reportedly.<sup>(7)</sup> However, the positive rate when using SABER is relatively higher than when using Scorpion-Arms (Table S1) for the same samples and our previous report.<sup>(8)</sup> We can speculate that the sensitivity of the SABER assay for circulating samples (plasma or serum) is much improved. In this study, plasma samples were collected following therapy with the EGFR-TKI; therefore, the time between the detection of PD and that of sample collection was varied. To conclude whether this sensitivity is enough or

not, it will be necessary to conduct a prospective comparison study using the paired samples of plasma and re-biopsy samples as the next step. Previously, we attempted to determine the EGFR mutation status in serum samples using the highly sensitive Scorpion-Arms method.<sup>(8,9)</sup> In that cohort, a high false-negative rate was observed, and more sensitive methods of detecting EGFR mutations in serum samples are desirable. Another group reported the results of a serum EGFR mutation analysis using the MBP-QP method,<sup>(10)</sup> which yielded a detection sensitivity equivalent to that of the SABER method used in the present report. Automated and high throughput analysis is an advantage of SABER method.

Direct sequencing of the subcloned PCR products confirmed the presence of the T790M mutation, suggesting that this SABER method is highly specific. However, the clonal analysis did not detect the T790M mutation in seven of the 21 (33.3%) samples that were found to be T790M-positive using SABER. In this cohort, we selected and sequenced up to 105 colonies (theoretical median limit of detection of 0.95%). Therefore, the number of tested colonies might not have been large enough to detect the low frequency of mutant clones with normal sampling error distribution.

In our study, the median PFS of the T790M-positive patients was significantly shorter than that of the T790M-negative patients with a clinical PR among younger ( $\leq 65$  years) patients. It is likely that the prognosis of patients with an activating mutation who acquire a resistance mutation is less favorable. However, Oxnard *et al.*<sup>(11)</sup> showed that EGFR-TKI resistant patients with T790M identified in re-biopsy specimens had a relatively favorable prognosis compared with patients without the T790M mutation. Their data seems to be inconsistent with our result. Different materials and detection methods may be the cause of this discrepancy between two studies.

The early detection of T790M mutation may be beneficial to such patients.

The intrinsic existence of T790M clones in pretreatment tumors has been previously suggested. Indeed, the T790M mutation has been detected in a few pretreatment tumor samples.<sup>(12,13)</sup> The T790M-SABER method is highly sensitive and is capable of detecting this mutation in plasma samples; consequently, the detection of the T790M mutation before or during EGFR-TKI treatment may be possible. Consequently, the T790M-SABER method is a promising tool for the detection of T790M mutation in a diagnostic setting.

## Acknowledgments

We thank the staff of the Life Science Institute of Kinki University for their technical support in performing this study; Mr Takuya Wada and Mr Yoshihiro Mine. Financial support: This work was supported by the Third-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan as well as by Health and Labor Scientific Research Grants [20-9].

## Disclosure Statement

Darryl L. Irwin was employed by Sequenom Inc. Kazuto Nishio received research funds from Qiagen Co. Ltd. and Roche Diagnostics Japan, and honoraria for a lecture fee for Chugai Pharmaceutical Co. Ltd. The other authors have no conflicts of interest.

## References

- Pao W, Miller VA, Politi KA *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005; 2: e73.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316: 1039–43.
- Kasahara K, Arai T, Sakai K *et al.* Impact of serum hepatocyte growth factor on treatment response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase

- inhibitors in patients with non-small cell lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 4616–24.
- 4 Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T *et al*. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005; **352**: 786–92.
  - 5 Yano S, Wang W, Li Q *et al*. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* 2008; **68**: 9479–87.
  - 6 Parker WT, Lawrence RM, Ho M *et al*. Sensitive detection of BCR-ABL1 mutations in patients with chronic myeloid leukemia after imatinib resistance is predictive of outcome during subsequent therapy. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 4250–9.
  - 7 Suda K, Onozato R, Yatabe Y, Mitsudomi T. EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival? *J Thorac Oncol* 2009; **4**: 1–4.
  - 8 Goto K, Ichinose Y, Ohe Y *et al*. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; **7**: 115–21.
  - 9 Kimura H, Kasahara K, Shibata K *et al*. EGFR mutation of tumor and serum in gefitinib-treated patients with chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006; **1**: 260–7.
  - 10 Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K *et al*. A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol* 2011; **6**: 1639–48.
  - 11 Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS *et al*. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 1616–22.
  - 12 Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S *et al*. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; **359**: 366–77.
  - 13 Rosell R, Molina MA, Costa C *et al*. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 1160–8.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** A comparison of T790M detection by SABER and Scorpion-ARMS methods.



## ● 総 説 ●

## 次世代シーケンス技術を応用したがん薬物療法最適化への試み

土原 一哉\*

[*Jpn J Cancer Chemother* 41(1): 1-6, January, 2014]

**Clinical Application of Next-Generation Sequencing Technologies to Achieve Cancer Precision Medicine: Katsuya Tsuchihara** (*Division of Translational Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center*)

**Summary**

Clinical applications of genomic biomarkers have been rapidly expanding, as has the development of molecular targeted therapies for various cancers. Ras activation has been regarded as a negative predictive marker for anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody therapy for colorectal cancer. Detection of mutations in *KRAS* codons 12 and 13 is widely used in clinical settings. Recent studies revealed that “minor” activating mutations such as those in *KRAS* codons 61 and 146, as well as *NRAS* mutations, contribute to resistance. Multiplex mutation testing that includes analysis of these mutations will be clinically available in the near future. We have conducted translational research in which novel biomarker candidates were evaluated using whole-exome sequencing-based mutation profiles of anti-EGFR antibody-treated samples from multiple centers in Japan. Development of the necessary infrastructure to ensure that genetic testing data are properly handled and utilized in clinical settings is also an important issue for the realization of cancer precision medicine. We have conducted pilot studies at the National Cancer Center in Japan. **Key words:** Next generation sequencer, Genome biomarker, Clinical sequence, Colorectal cancer, **Corresponding author:** Katsuya Tsuchihara, Division of Translational Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan

**要旨** 分子標的療法の進展に伴い、治療効果予測に用いられるゲノムバイオマーカーの数は増加している。大腸がん抗EGFR抗体療法の効果を予測するRAS遺伝子検査は、*KRAS* コドン 12, 13 について行われてきたが最近の研究結果より、これまでマイナーな変異とされてきた *KRAS* の他のコドンや *NRAS* 変異に拡大することで臨床的有用性が向上することが示された。さらに新規のバイオマーカーを探索するために、詳細な臨床情報を附随する組織標本を全国から集積し次世代シーケンサーによる大規模ゲノム解析を行う臨床研究も進行している。一方で、臓器の枠を越えてゲノムバイオマーカーを有効に利用するために実地臨床での次世代シーケンサーを利用した変異検出の可能性を評価することも重要である。国立がん研究センターにおけるクリニカルシーケンスの現状を紹介し、今後の課題について考察する。

**I. 大腸がん治療効果予測バイオマーカーの拡大**

いわゆる次世代シーケンサーの実用機の登場から5年以上が経過し、がん研究の領域でもゲノムワイドの高精度変異解析が一般的になった。国際がんゲノムコンソーシアムを中心とした各種がんゲノムのカタログ作りも順調に進捗し、新たながん関連遺伝子の同定や、特徴的なゲノムDNA塩基置換のシグネチャーからがんの発生要因との関連を探索する取り組みなど、基礎研究領域における寄与は多大なものがある<sup>1)</sup>。一方、高速シーケンス

技術の臨床応用も着実に進んでいる。その背景には、分子標的治療の効果を予測するバイオマーカーの重要性が広く認識され、その種類も増え続けていることがある。代表的なものは、非小細胞肺癌においてEGFR阻害剤の奏効と関連するEGFRの活性型変異であり、また大腸がんの抗EGFR抗体薬の応答に関連する*KRAS*の活性型変異である。*EGFR*、*KRAS*遺伝子の変異(挿入欠失変異および塩基置換変異)検査は国内でも汎用されており、品質が保証された対外診断薬キットが承認されている。これらのキットは単一遺伝子の数か所のホットス

\* 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター・トランスレーショナルリサーチ分野

連絡先: 〒277-8577 千葉県柏市柏の葉6-5-1 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター・トランスレーショナルリサーチ分野  
土原 一哉

ポット変異を同時に検出するように設計されており、変異箇所の認識には、変異アレル特異的プライマーを用いたPCR (Scorpion-ARMS法) や、ラベルされた特異的プローブと変異アレルとのハイブリダイゼーション (xMAP法) が利用されている<sup>2,3)</sup>。いずれもサンガー法によるダイレクトシーケンスに比べ感度、特異度に優れていること、特殊な操作、技術を必要とせず、検査に必要な機器も普及していること、検査結果を数量化でき客観的な判定基準を規定しやすいこと、検査に掛かるコストが比較的安価であることなど、臨床検査として成立するための要件を満たしている。

*KRAS* コドン 12, 13 に変異をもつ大腸がん症例に抗EGFR 抗体薬であるセツキシマブの治療効果が期待できないことは、複数の第Ⅱ相、第Ⅲ相臨床試験のサブセット解析から明らかにされた<sup>4-7)</sup>。これらを根拠として治療前 *KRAS* 遺伝子検査が開始されたのは前述のとおりであるが、Ras 蛋白質の立体構造上、GTP 結合部位を構成するコドン 61 やコドン 146 にミスセンス変異が生じても GTPase 活性が低下し、細胞増殖のシグナルを「オン」にすることは生物学的にはよく知られている。コドン 12, 13 と同じくこれらの変異も治療抵抗性の予測マーカーとなる可能性が想定されたが、変異の発生頻度の低さがネックとなり臨床的な検証は難しいとされてきた。英国 Sanger 研究所が各種のがん組織における体細胞変異の文献情報を収集しているデータベース、COSMIC の最新版 (v67) には、大腸 (large intestine) の腺がん (adenocarcinoma) 44,982 例において *KRAS* 変異例は 16,276 例 (36%) が登録されている。このうち最も頻度が高い G12D 変異 (5,628 例) を筆頭に、コドン 12 変異 12,725 例 (変異症例の 78%)、コドン 13 変異が 3,360 例 (変異症例の 20%) を占めるのに対し、コドン 61 変異 214 例、コドン 146 変異は 97 例にとどまっている。これらのデータから、変異検索をコドン 12 および 13 にかぎっても *KRAS* 変異例のほとんどがカバーでき、臨床に十分な性能が期待できると考えられてきた。

国立がん研究センター東病院の吉野孝之医長と筆者は大腸がんゲノムバイオマーカーの適正化をめざし、消化器がんの治療開発の経験が豊富な施設によって構成された研究グループを主宰しており、*KRAS* 変異検査の性能が実地臨床においても満足できるものかを検証することにした。北米、欧州と異なり日本におけるセツキシマブの承認 (2008 年) と *KRAS* 検査の承認、普及 (2010 年) には時間差があった。残念ながらこれは日本における明白なデバイスラグを示すものであるが、翻って市販後 *KRAS* コドン 12, 13 変異例に対する治療効果の検討は日本でしか行えないとも考えられた。後方視的解析では

あるが上記のラグの期間に国立がん研究センター東病院、北海道大学、がん研有明病院、四国がんセンター、埼玉県立がんセンター、静岡がんセンター、富山大学においてセツキシマブ、イリノテカン併用療法が施行された 376 例から、規定に従った治療前後の画像診断の有無など十分に評価に耐え得る 109 例を抽出した。Scorpion-ARMS 法、xMAP 法によるコドン 12 変異検出例 26 例、コドン 13 変異例は 7 例であった。一部の施設で先進医療として *KRAS* 変異検査の結果を診療に利用していたことなどを考慮しても、そのプロファイルは COSMIC 登録例と大きく変わらないことが確認された。コドン 12, 13 野生型 76 例において 23 例 (30%) の奏効が得られたのに対し、コドン 13 変異例の 1 例を除き *KRAS* 変異例に奏効はなく、無増悪生存期間、全生存期間においても既報とほぼ一致した結果となっていた。コドン 13 変異例において統計学的有意差には至らないものの、無増悪生存期間、全生存期間の延長の傾向が認められたのも、過去の臨床試験のサブセット解析の結果と矛盾しないものと考えられた。これらの結果はコドン 12, 13 変異検査の negative predictive marker としての有用性を担保するものであった<sup>8)</sup>。

ただし、依然低い *KRAS* 野生型の奏効率が次の課題になった。薬理的その他の原因も考えられたが、まず *KRAS* コドン 12, 13 以外の変異、*KRAS* 以外の EGFR 下流分子の変異の寄与を検討することにした。改めて組織検体が入手可能な 82 例を抽出し、既承認の *KRAS* コドン 12, 13 検査 (MEBGEN<sup>TM</sup> *KRAS* 遺伝子変異検出キット、株式会社医学生物学研究所) と同じ原理 (xMAP 法) により、ほぼ同等の性能で *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* の一塩基置換変異を検出するキット (GENOSERCH<sup>TM</sup> Mu-PACK<sup>TM</sup>, 株式会社医学生物学研究所) を開発し、これを用いて変異検索を行った<sup>9,10)</sup>。82 例中計 21 例の *KRAS* コドン 12, 13 変異例があったのに対し、*KRAS* コドン 61 変異 3 例、コドン 146 変異 2 例、*NRAS* 変異 2 例などが検出され、母集団の小ささを考慮しても大腸がんにおける Ras ファミリーのマイナー変異の割合が無視できないことが示唆された (図 1)。改めて上述の COSMIC データベースにおける変異頻度の解釈には収集された各研究における変異検出範囲、方法のバイアスを考慮する必要があると考えられる。実際、米国のがんゲノム解析コンソーシアム、TCGA が行った系統的な網羅的全エクソン解析の対象例にかぎると、*KRAS* 変異陽性 118 例中コドン 12 変異 51 例、コドン 13 変異 12 例に対し、コドン 61 変異 8 例、コドン 117 変異 4 例、コドン 146 変異 11 例が同定されており、筆者らの実感とも一致する。筆者らの解析において上述の Ras ファミリーのマ

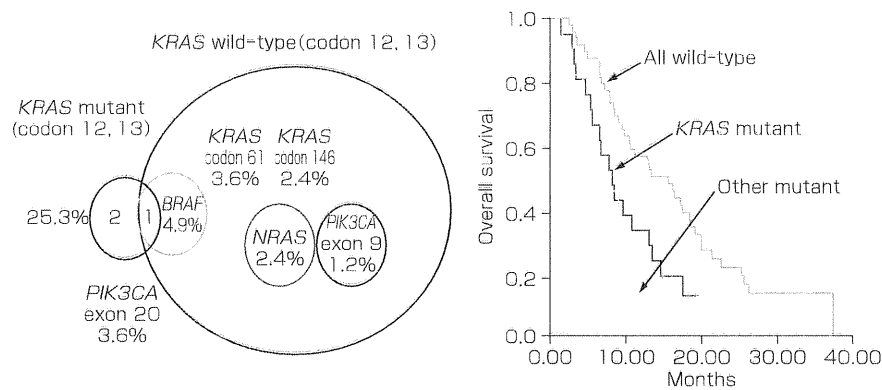


図1 マルチプレックスゲノムバイオマーカーによる抗EGFR抗体療法の最適化(文献<sup>9)</sup>を改変)

イナー変異に *BRAF*, *PIK3CA* 変異を加えた12例に奏効例はなく、無増悪生存期間1.6か月、全生存期間6.3か月も *KRAS* コドン12, 13変異21例における無増悪生存期間2.7か月、全生存期間8.2か月と有意差を認めなかった(図1)。*KRAS* コドン12, 13変異のみを除外した際の奏効率31.1%に対し、それ以外の変異も除外すると奏効率は38.8%に向上することも示され、大腸がん抗EGFR抗体薬の治療効果予測における *KRAS* コドン12, 13以外の変異検出の有用性が示唆された。最近、もう一つの抗EGFR抗体薬であるパニツムマブのFOLFOX4療法における上乗せ効果を示したPRIME試験の後解析が発表された。同試験における *KRAS* コドン12, 13野生型512例のうち108例に *KRAS* コドン61, 117, 146変異もしくは *NRAS* 変異が検出され、これらの症例では *KRAS* コドン12, 13変異例と同様にパニツムマブの効果がみられなかった。なお、この論文では *BRAF* 変異については、従前の報告と同様予後予測因子としての側面が強いことが報告されている<sup>11)</sup>。

これらの結果は、生物学的な基礎研究の結果から推測された抗EGFR抗体薬の治療効果を修飾する因子が、実際の臨床例においても重要な役割を果たしていることを示す合理的なものであり、拡大した *RAS* 遺伝子変異をバイオマーカーとして臨床応用することの必要性を示している。そのためには、性能、価格など遺伝子診断の基準に適合した検査システムの開発が必要である。検索しなければならない変異の増加により、ダイレクトシーケンス法やScorpion-ARMS法では検査手順が煩雑になり、また検査に必要な検体の量も増大する。筆者らが用いたマルチプレックスPCRとLuminex技術を組み合わせた方法であれば100~200か所程度の変異検索を従来の *KRAS* 検査法とほぼ同じ手順で解析可能である。現在この方法を応用し、さらに感度を向上させた診断試薬について早期の保険承認をめざした臨床性能試験(UMIN000011784, Luminex技術を用いた新規 *RAS* 遺

伝子変異検査試薬の臨床性能試験、責任研究者 吉野孝之、実施責任組織 株式会社医学生物学研究所)が進行中である。

## II. 全エクソン解析を応用した新規バイオマーカー探索の試み

筆者らの研究グループでは、抗EGFR抗体薬の効果を修飾する因子をより広範に探索することで、治療効果が期待できる患者集団をさらに絞り込める可能性を追求している。愛知県がんセンターを加えた上述の臨床研究グループに東京大学、国立国際医療研究センターのゲノム解析グループ、診断薬開発企業(G & Gサイエンス株式会社)が参加したコンソーシアムを形成し、科学技術振興機構の研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)の補助を受け研究を開始した。研究成果によってがんの最適化治療実現のために風穴を開けることをめざして、BREAC studyと呼称している「網羅的遺伝子解析技術を用いた抗EGFR抗体薬治療効果予測バイオマーカーの探索に関する多施設共同研究」では、原則として *KRAS* コドン12, 13に変異をもたない大腸がん抗EGFR抗体薬投与例の組織を集積し全エクソン解析を行い、詳細な臨床情報と併せて治療効果と関連する遺伝子変異、多型を探索する(図2)。

この研究には二つの技術的な特徴がある。まず、対象症例を抗EGFR抗体薬投与時期の違いによって「探索用コホート」、「統計推測用コホート」に分けた。効果に関連する特徴的な変異を濃縮するため探索用コホートでは「著効例」、「無効例」のみを各施設から抽出して登録している。著効、無効の判定は各参加施設の腫瘍内科医に加え、画像診断、病理診断の専門医、生物統計学の専門家が加わったボード全員の合議で行うことにより、その信頼性を高めている。探索用コホートの解析で得られる候補遺伝子変異の妥当性は、各施設で当該期間に治療された連続的な症例を集積する統計推測コホートを用い検証



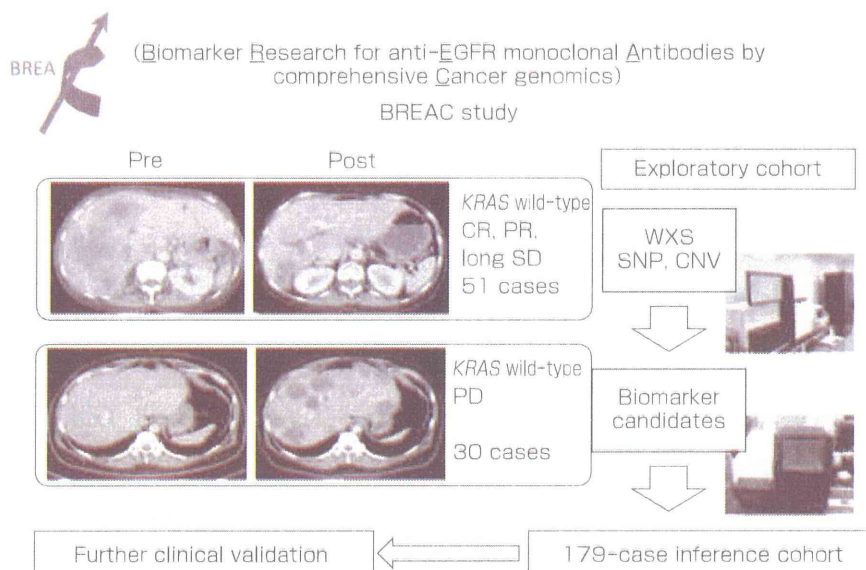


図2 新規抗EGFR抗体療法バイオマーカーを探索するためのBREAC studyの概要  
WXS: 全エクソンシーケンス, CNV: コピー数異常

する。いずれのコホートにおいても、各施設から送られてくる症例報告書は国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター先端医療開発支援室、および臨床試験支援室で入念なチェックが行われ逸脱を防いでいる。ゲノム試料を用いた大規模な研究であり、個人情報管理についても各参加施設の倫理審査委員会の承認の下、連結可能匿名化を国立がん研究センター東病院個人情報管理室で一元的に行っている。バイオマーカー研究において解析に用いる臨床情報の質と検体提供者の保護は最重要項目であり、筆者らの取り組みは多施設共同研究における今後のモデルケースになると考えている。

一方、ゲノム解析では探索用コホート全例についてゲノム中の蛋白質をコードする全領域とマイクロRNAの標的となるUTR領域計約50 Mbを標的としたターゲットシーケンスを行い、著効、無効群に有意に集積する変異遺伝子を同定した後、統計推測コホート試料について候補遺伝子変異をカバーしたカスタム化キャプチャーパネルを用いたターゲットシーケンスを行う。多施設において日常診療で得られる組織検体を解析する本研究では、ゲノムDNAのソースをホルマリン固定パラフィン包埋組織に求める必要があった。従来、国際コンソーシアムなどのがんゲノム研究では質の高いDNA検体を確保するために凍結組織の提出を必須にするものが多い。しかし、ホルマリン固定後のDNAを利用することで、より臨床の実地に近いサンプル、希少症例のサンプルが得やすくなり、研究のスピードも向上することが期待される。筆者らはホルマリン固定後のDNAの抽出、シーケンスライブラリー作製について手法の改良と適切な品質評価法を工夫し、これまでに数百例の全エクソン解析

を成功させている(文献<sup>12)</sup>、投稿中)。この経験を生かしBREAC studyにおいても著効51例、無効30例のシーケンスを終了し、抗EGFR抗体薬治療効果と関連するいくつかの変異遺伝子候補を見いだしている。

### Ⅲ. 臓器横断型ゲノムバイオマーカー診断の実現可能性

大腸がんのEGFR標的療法にかぎらず、今後の分子標的治療においてゲノムバイオマーカーの増加は避けられない。また、他臓器のがんで治療開発が進んでいる標的分子と同様の活性変化が示唆される遺伝子変異が低頻度で見つかるケースもあり、こうした症例を対象にした臨床試験の実施や、適応外使用のチャンスが広がることも予想される。こうした状況に対応するためにも、臓器の枠を越えてゲノムバイオマーカー診断が可能な体制を整備する必要がある。また、これらの検査は進行、再発症例を対象にすることが多く、内視鏡生検、針生検やいわゆるliquid biopsyによって得られる微量の組織サンプルを利用できるようにしなければならない。国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター、東病院では近未来に予想されるbiomarker-based drug selectionの実施可能性を検証するためのABC study(切除不能・進行・再発固形がんに対するがん関連遺伝子変異のプロファイリングと分子標的薬耐性機構の解明のための網羅的体細胞変異検索)を各科横断的に実施している(図3)。ABC studyは二段階の構成になっており、第一段階をtarget sequencing stageとしている。文書による同意を得られた進行・再発固形がん患者の治療前生検の余剰検体からゲノムDNAを抽出し、市販のシステム(Ion AmpliSeq™

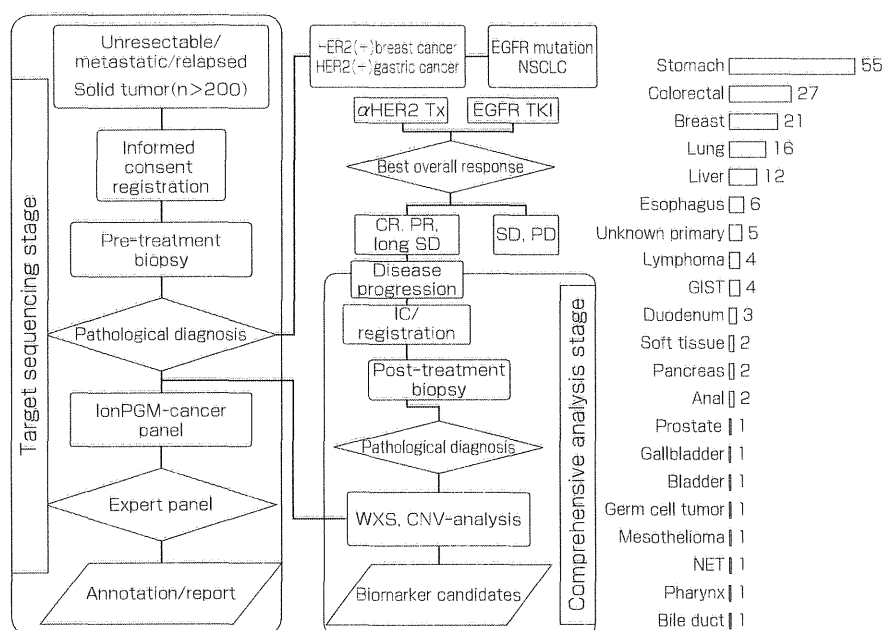


図3 国立がん研究センター柏キャンパスで実施されているABC studyの概要と2013年8月現在での臓器別登録状況

Cancer Hotspot Panel v1 および v2)を用いマルチプレックスPCRで増幅した約50遺伝子のホットスポット変異を、半導体型次世代シーケンサーでシーケンス、変異検出する。その後、生物学的特徴、変異頻度など臨床疫学的な特徴、既承認および開発中の治療法に関する薬理学的情報を研究事務局で集積し、センター内の病理学、臨床腫瘍学、臨床遺伝学、分子生物学、生物統計学の専門家からなるエキスパートパネルで内容を討議した後に臨床担当医にレポートする。第二段階としてtarget sequencing stageに登録された症例のうち、標準治療として分子標的治療が施行されたものを追跡し、いったん奏効した後、病勢が制御できなくなった際に再同意を得て生検を行い、治療前後の試料について全エクソン解析を含む網羅的ゲノム解析を行い、治療抵抗性の原因を探索するステップをcomprehensive analysis stageとしている。target sequencing stageには2012年7月の研究開始以降、約1年で想定を上回る160例以上の症例が集積された。国立がん研究センター東病院における診療実績をほぼ反映して多臓器の症例が登録されている。比較的早期の治療ラインでtarget sequencing stageに登録されていることもあり、comprehensive analysis stageは現状では5例にとどまっているが、今後登録が進むと予想している。target sequencing stageでは99%以上の同意取得が得られ、組織学的にがん細胞が確認された症例の99%でアンブリコンシーケンスに成功している。46遺伝子の739変異をカバーする初期型のCancer Panelを用いた93例の解析では1検体当たり平均1.6個の変

異が検出され、*PIK3CA*や*BRAF*、EGFRなど既存の分子標的療法の治療効果との関連が想定される何らかの変異が約40%の症例で見いだされている。ABC studyは腫瘍内科医、分子生物学者だけでなく、生検を担当する医師、看護師、検体を処理する検査技師に加え、データマネージャーなどセンター内の各職種の協力なしには成り立たない。また、今後BRCA1/2など遺伝性腫瘍にかかわる変異の診断にも対応できるよう家族性腫瘍外来の整備を進めたことも、この研究の成果であった。現在DNA抽出からアンブリコンシーケンスのステップは一連の検査工程のバリデーションを定期的に行っている外部の臨床検査機関(株式会社エスアルエル)に委託している。今後、次世代シーケンサーを利用したがん遺伝子検査を実施していくためには国内では未整備の検査機関、手法の標準化も避けて通れない課題である。

## おわりに

新たなドライバー変異の発見とそれに基づく治療法の開発など、基礎研究と臨床の距離は極めて近くなっている。新たな知見の有効性、妥当性をいち早く検証する先進的で臨床的な研究体制の構築に合わせ、こうした「ショールーム」で得られた結果を全国に展開するシステムの構築にも今後力を注ぎたいと考えている。

## 文 献

- 1) Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, *et al*: Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500(7463): 415-421, 2013.

- 2) Ogasawara N, Bando H, Kawamoto Y, *et al*: Feasibility and robustness of amplification refractory mutation system (ARMS)-based *KRAS* testing using clinically available formalin-fixed, paraffin-embedded samples of colorectal cancers. *Jpn J Clin Oncol* 41(1): 52-56, 2011.
- 3) 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* 105(3): 403-406, 2011.
- 4) 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* 26(10): 1626-1634, 2008.
- 5) 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* 28(31): 4697-4705, 2010.
- 6) 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* 28(31): 4706-4713, 2010.
- 7) Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, *et al*: Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360(14): 1408-1417, 2009.
- 8) 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* 42(12): 1146-1151, 2012.
- 9) Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, *et al*: Simultaneous identification of 36 mutations in *KRAS* codons 61 and 146, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* in a single reaction by multiplex assay kit. *BMC Cancer* 13: 405, 2013.
- 10) Kawamoto Y, Tsuchihara K, Yoshino T, *et al*: *KRAS* mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer. *Br J Cancer* 107(2): 340-344, 2012.
- 11) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, *et al*: Panitumumab-FOLFOX4 treatment and *RAS* mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 369(11): 1023-1034, 2013.
- 12) 土原一哉, 松島洗達, 三牧幸代: 全エクソンリシーケンシング, 次世代シーケンサー目的別アドバンストメソッド (細胞工学別冊) (菅野純夫, 鈴木 穰・監), 学研メディカル秀潤社, 東京, 2012, pp56-63.

