

TABLE II. Univariate and Multivariate Prognostic Analyses in 425 Stage III Colorectal Cancer

Variables	DFS							OS						
	5-year rate	Univariate			Multivariate			5-year rate	Univariate			Multivariate		
		HR	(95% CI)	P value*	HR	(95% CI)	P value*		HR	(95% CI)	P value*	HR	(95% CI)	P value*
Age (years)														
<60	68.6	1	(referent)		—	—		85.7	1	(referent)		—	—	
≥60	71.6	0.938	(0.640–1.374)	NS (0.740)	—	—	—	87.4	0.932	(0.508–1.712)	NS (0.821)	—	—	—
Gender														
Female	69.4	1	(referent)		—	—		85.9	1	(referent)		—	—	
Male	72.3	1.185	(0.820–1.713)	NS (0.365)	—	—	—	87.9	1.252	(0.688–2.278)	NS (0.462)	—	—	—
Tumor location							NS (0.052)							
Proximal	68.1	1	(referent)		1	(referent)		85.7	1	(referent)		—	—	
Distal	79.8	0.609	(0.381–0.923)	0.038	0.716	(0.427–1.201)	NS (0.205)	90.5	0.618	(0.286–1.332)	NS (0.219)	—	—	—
Rectum	60.0	1.246	(0.806–1.927)	NS (0.322)	1.338	(0.831–2.155)	NS (0.230)	82.6	1.323	(0.658–2.661)	NS (0.431)	—	—	—
Mucinous histology							0.041							0.008
CAC	72.5	1	(referent)		1	(referent)		89.0	1	(referent)		1	(referent)	
ACM	65.8	1.351	(0.757–2.411)	NS (0.308)	1.125	(0.587–2.156)	NS (0.722)	70.2	2.916	(1.391–6.114)	0.004	2.314	(0.773–6.932)	NS (0.133)
MAC	37.5	3.205	(1.671–6.147)	<0.001	2.649	(1.210–5.802)	0.014	67.7	3.992	(1.555–10.248)	0.004	3.569	(1.535–8.300)	0.003
Intramural vascular invasion														
Negative	85.6	1	(referent)		1	(referent)		95.0	1	(referent)		1	(referent)	
Positive	67.3	2.696	(1.411–5.152)	0.002	2.522	(1.202–5.292)	0.014	85.0	3.230	(1.002–10.411)	0.013	2.293	(0.672–7.818)	NS (0.184)
pT stage							0.021							0.001
pT1 or pT2	86.0	1	(referent)		1	(referent)		97.2	1	(referent)		1	(referent)	
pT3	69.2	2.886	(1.498–5.558)	0.001	1.844	(0.930–3.656)	NS (0.079)	87.3	4.472	(1.067–18.743)	0.040	2.681	(0.617–11.652)	NS (0.188)
pT4	53.6	4.594	(2.206–9.569)	<0.001	2.896	(1.335–6.280)	0.007	68.3	13.439	(3.072–58.790)	<0.001	7.618	(1.658–34.999)	0.009
pN stage														
pN1	75.8	1	(referent)		1	(referent)		90.2	1	(referent)		1	(referent)	
pN2	54.9	2.099	(1.452–3.034)	<0.001	1.391	(0.873–2.217)	NS (0.164)	76.5	2.741	(1.534–4.898)	<0.001	1.516	(0.761–3.019)	NS (0.236)
Stage (7th AJCC)														
IIIA	86.2	1	(referent)		—	—		97.0	1	(referent)		—	—	
IIIB	71.6	2.741	(1.373–5.470)	0.004	—	—	—	89.8	3.202	(0.753–13.620)	NS (0.115)	—	—	—
IIIC	47.9	5.582	(2.681–11.621)	<0.001	—	—	—	63.7	14.972	(3.518–63.712)	<0.001	—	—	—
KRAS gene status														
Wild type	67.5	1	(referent)		—	—		85.5	1	(referent)		—	—	
Mutant	63.5	1.136	(0.752–1.715)	NS (0.543)	—	—	—	80.1	1.350	(0.717–2.544)	NS (0.352)	—	—	—
BRAF gene status														
Wild type	71.7	1	(referent)		1	(referent)		87.8	1	(referent)		1	(referent)	
Mutant	47.4	2.616	(1.404–4.874)	0.002	1.404	(0.709–2.780)	NS (0.330)	70.8	3.110	(1.314–7.359)	0.009	1.070	(0.391–2.930)	NS (0.895)
Preoperative CEA (ng/ml)														
<5	73.1	1	(referent)		—	—		87.6	1	(referent)		—	—	
≥5	65.4	1.397	(0.966–2.021)	NS (0.075)	—	—	—	84.8	1.231	(0.676–2.240)	NS (0.496)	—	—	—
Preoperative CA19–9 (ng/ml)														
<37	73.1	1	(referent)		1	(referent)		88.9	1	(referent)		1	(referent)	
≥37	56.3	1.930	(1.282–3.026)	0.002	1.691	(1.061–2.696)	0.027	74.3	2.637	(1.407–4.942)	0.002	2.023	(1.004–4.076)	0.048
LNR														
<20	75.1	1	(referent)		1	(referent)		92.0	1	(referent)		1	(referent)	
≥20	58.0	1.952	(1.351–2.821)	<0.001	1.675	(1.054–2.663)	0.029	72.5	3.893	(2.173–6.975)	<0.001	3.016	(1.517–5.997)	0.001
Adjuvant chemotherapy														
Absence	63.1	1	(referent)		1	(referent)		76.1	1	(referent)		1	(referent)	
Presence	72.2	0.677	(0.444–1.034)	0.041	0.607	(0.390–0.947)	0.027	89.0	0.390	(0.210–0.724)	0.002	0.426	(0.213 to –0.852)	0.015

AJCC, 7th edition of the American Joint Committee on Cancer; Proximal, cecum to transverse colon; Distal, splenic flexure to sigmoid; LNR, lymph node ratio (ratio between metastatic and examined lymph nodes); DFS, disease-free survival; OS, overall survival; MSS, microsatellite stable; MSI-H, microsatellite instability-high; BRAF-W, BRAF-wild type; BRAF-M, BRAF-mutation; CAC, conventional adenocarcinoma, ACM, adenocarcinoma with mucinous component; MAC, mucinous adenocarcinoma; NS, not significant; N/A, not applicable.

*Cox proportional hazards model.

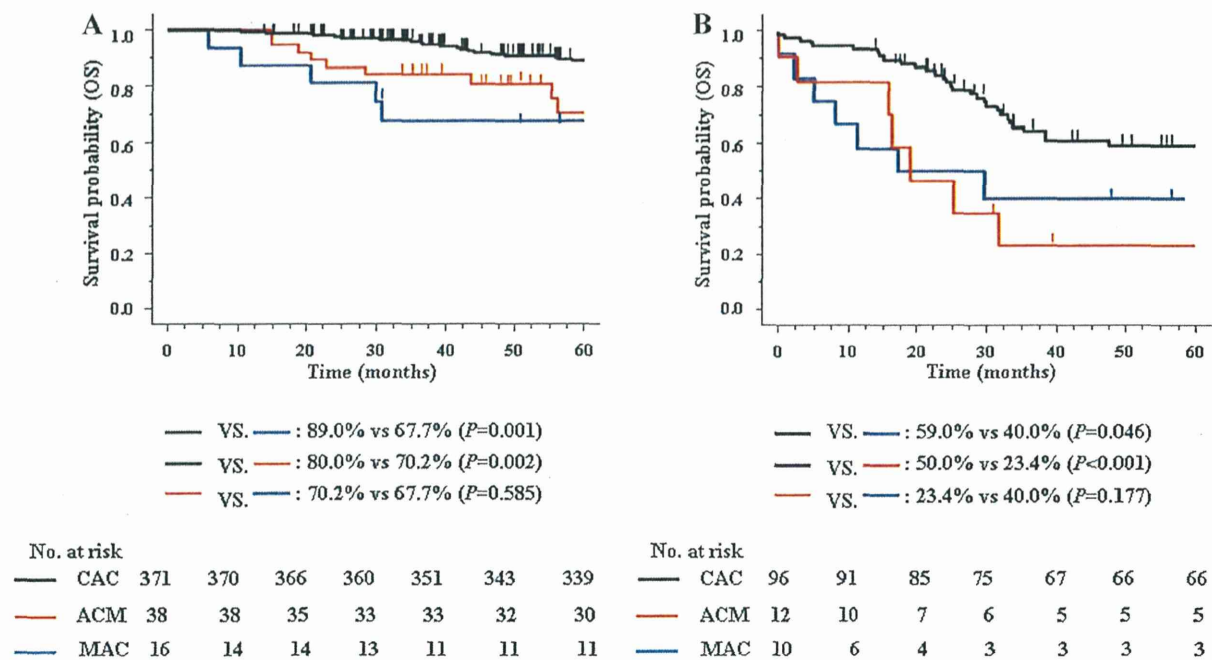


Fig. 3. Kaplan-Meier curves of 5-year OS according to mucinous histology (A) in 425 stage III CRC patients. OS defined as the time from tumor resection to death from any cause. (B) Patients with recurrence ($n = 118$): OS defined as time from tumor recurrence to death. Log-rank test used to compare distribution among mucinous histology. CAC, conventional adenocarcinoma; ACM, adenocarcinoma with mucinous component; MAC, mucinous adenocarcinoma.

Japan, DFS was 88.1% for stage IIIA, 75.3% for stage IIIB, and 52.8% for stage IIIC CRC in ACTS-CC study [20], and 90.4% for stage IIIA, 74.1% for stage IIIB, and 58.9% for stage IIIC in JCOG 0205 study [29], findings consistent with outcomes in the present study (Table II). In addition, 5-year OS (88.1%) in the present study was also similar to the OS (87.9%) in JCOG 0205 study. These findings support that patients in the present study had general outcomes of stage III CRC in Japanese population.

The MAC was observed in only 16 (3.7%) of the 425 patients with stage III CRC. The incidence of MAC is greater in North American and Italian populations than in Korean or Japanese populations, which is suggestive of ethnic differences [7,14,15,30–32]. The primary limitation to the present study is the small number of patients with mucinous histology and those treated with a combination of L-OHP and 5-FU chemotherapy, which hampered part of the statistical analyses, including retrospective analyses. In contrast, the strength of the present study is the homogeneous population with stage III CRCs that were diagnosed and treated at a single institution. Of note, the prognostic analysis included OS as a hard end point to avoid any misleading conclusions. In addition, we confirmed that MAC exhibited unique characteristics similar to previous studies, such as advanced disease progression, frequent *BRAF* mutation, and unfavorable DFS [9–12]. Although the findings of the present study must be interpreted with caution, these are potential of great value and require validation in a larger number of patients.

In conclusion, MAC has one of the most aggressive phenotypes of stage III CRC. Estimated risk of recurrence with ACM is similar to that of CAC, but the outcome is extremely poor once recurrence occurs and identical to that of MAC. Thus, both MAC and ACM are adverse prognostic factors for OS. Further research is required to validate the clinical relevance of the mucinous histology in stage III CRC.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank DMC Corp. (Tokyo, Japan) for their editorial assistance. This study was not supported by any grant. The authors declare no conflicts of interest. This study received no grant support.

REFERENCES

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10–29.
2. Mandel JS, Church TR, Bond JH, et al.: The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;343:1603–1607.
3. Obrand DI, Gordon PH: Incidence and patterns of recurrence following curative resection for colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1997;40:15–24.
4. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al.: Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343–2351.
5. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al.: Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1465–1471.
6. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Colon Cancer. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp 2014; version 3.
7. Kelemen LE, Kobel M: Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: Different organ, same dilemma. *Lancet Oncol* 2011;12:1071–1080.
8. Bosman F: WHO classification of tumours of the digestive system, 4th edition. Lyon: IARC; 2010.
9. Hyngstrom JR, Hu CY, Xing Y, et al.: Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2814–2821.

10. Mekenkamp LJ, Heesterbeek KJ, Koopman M, et al.: Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2012;48:501–509.
11. Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, et al.: Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol* 2012;65:381–388.
12. Ogino S, Brahmandam M, Cantor M, et al.: Distinct molecular features of colorectal carcinoma with signet ring cell component and colorectal carcinoma with mucinous component. *Mod Pathol* 2006;19:59–68.
13. Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ, et al.: Mucinous differentiation in colorectal cancer—indicator of poor prognosis? *Histopathology* 2012;60:1060–1072.
14. Lee DW, Han SW, Lee HJ, et al.: Prognostic implication of mucinous histology in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Br J Cancer* 2013;108:1978–1984.
15. Kim SH, Shin SJ, Lee KY, et al.: Prognostic value of mucinous histology depends on microsatellite instability status in patients with stage III colon cancer treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy: a retrospective cohort study. *Ann Surg Oncol* 2013;20:3407–3413.
16. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, et al.: Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol* 2010;28:264–271.
17. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, et al.: Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: Final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol* 2005;23:8671–8678.
18. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al.: Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2696–2704.
19. Lembersky B, Wieand H, Petrelli N, et al.: Oral Uracil and Tegafur Plus Leucovorin Compared With Intravenous Fluorouracil and Leucovorin in Stage II and III Carcinoma of the Colon: Results From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06. *J Clin Oncol* 2006;24:2059–2064.
20. Nakamoto Y, Ishiguro M, Yoshida M, et al.: Noninferiority of S-1 to UFT/LV as adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: A randomized phase III trial (ACTS-CC). *J Clin Oncol* 2013;31:suppl; abstr 3518.
21. Asaka S, Arai Y, Nishimura Y, et al.: Microsatellite instability-low colorectal cancer acquires a KRAS mutation during the progression from Dukes' A to Dukes' B. *Carcinogenesis* 2009;30:494–499.
22. Akagi K, Uchibori R, Yamaguchi K, et al.: Characterization of a novel oncogenic K-ras mutation in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:728–732.
23. Sargent DJ, Patiyil S, Yothers G, et al.: End points for colon cancer adjuvant trials: observations and recommendations based on individual patient data from 20,898 patients enrolled onto 18 randomized trials from the ACCENT Group. *J Clin Oncol* 2007;25:4569–4574.
24. Byrd JC, Bresalier RS: Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:77–99.
25. Velcich A, Yang W, Heyer J, et al.: Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 2002;295:1726–1729.
26. You JF, Hsieh LL, Changchien CR, et al.: Inverse effects of mucin on survival of matched hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:4244–4250.
27. Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, et al.: MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1994;106:353–361.
28. Sugarbaker PH: Mucinous colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2001;77:282–283.
29. Shimada Y, Hamaguchi M, Moriya Y, et al.: Randomized phase III study of adjuvant chemotherapy with oral uracil and tegafur plus leucovorin versus intravenous fluorouracil and levofolinate in patients (pts) with stage III colon cancer (CC): Final results of Japan Clinical Oncology Group study (JCOG0205). *J Clin Oncol* 2012;30:suppl; abstr 3524.
30. Catalano V, Loupakis F, Graziano F, et al.: Mucinous histology predicts for poor response rate and overall survival of patients with colorectal cancer and treated with first-line oxaliplatin- and/or irinotecan-based chemotherapy. *Br J Cancer* 2009;100:881–887.
31. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, et al.: A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1161–1168.
32. Numata M, Shiozawa M, Watanabe T, et al.: The clinicopathological features of colorectal mucinous adenocarcinoma and a therapeutic strategy for the disease. *World J Surg Oncol* 2012;10:109.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

国内における臨床シーケンスの展開

— 国立がん研究センター東病院におけるABC Study

Development of clinical sequencing : Pre-treatment sequencing and cancer encyclopedia programs at NCC-Kashiwa



土原 一哉

Katsuya TSUCHIHARA

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

◎次世代シーケンサーの登場により、個々の症例の詳細ながんゲノム情報が入手可能となった。一方、分子標的抗がん薬の普及とともにゲノムバイオマーカーの数も増加しつづけており、マルチプレックスゲノム診断の必要性は高まっている。次世代遺伝子検査の実用化には解析妥当性に加えて検体・データ管理や報告方法の検討、さらには臨床的有用性を明らかにする必要がある。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、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)によって、近未来の遺伝子診断の実施可能性を検証している。生検検体 FFPE 標本を用いたアンプリコンシーケンスの実施可能性はほぼ検証できたが、今後臨床的有用性をより高めるため、遺伝子増幅や融合を検出可能な解析システムの開発や、ゲノムリテラシーをもった医療従事者の充実をはかる必要がある。



臨床シーケンス, 治療前生検, マルチプルゲノムバイオマーカー, ABC Study

超並列 DNA シーケンサーによってもたらされたゲノム解析の高速化により、個々の症例における網羅的ながんゲノム解析が可能となった。日本から国立がん研究センター研究所ほかに参加した国際がんゲノムコンソーシアム(International Cancer Genome Consortium : ICGC)では、17の国と地域が参加した71のプロジェクトにより25,000例以上のがんゲノムの解析が進み、すでに10,067例の結果が共通のフォーマットに従ったデータベースとして公開されている(ICGC data portal data release 15, <http://dcc.icgc.org/>)。これ以外にも各国の個別の研究機関、研究室が収集したデータもつぎつぎに発表され、それらは発表論文で検索・閲覧できるほか、イギリス Wellcome Trust Sanger Institute が運営するがん体細胞遺伝子異常の文献情報を収集するデータベース、COSMIC(Catalogue of somatic mutations in cancer, <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/>

projects/cosmic/)からも容易に入手できるようになり、いまや各種がんゲノムの鳥瞰図が、いながらにして手に入る時代となった¹⁾。

がんの基礎・臨床研究者が長年待ち望んでいたこうした環境を、どのようにがんの発生・進展の分子生物学的メカニズムの解明とそれに基づく治療・診断開発に結びつけていくかが現在の大きなテーマである。網羅的ながんゲノム解析による新規治療標的の探索については本特集の他稿で詳細に述べられているとおりでであるが、本稿ではそれらの知見を臨床の現場で活用するためにどのような工夫が必要かについて言及したい。



治療選択バイオマーカーのマルチプル化

BCR-ABL 融合遺伝子陽性急性性リンパ性白血病(ALL)および変異型 KIT 陽性消化管間質腫瘍(GIST)に対するイマチニブ、EGFR 変異陽性非小細胞肺癌に対するゲフィチニブやエルロチニ

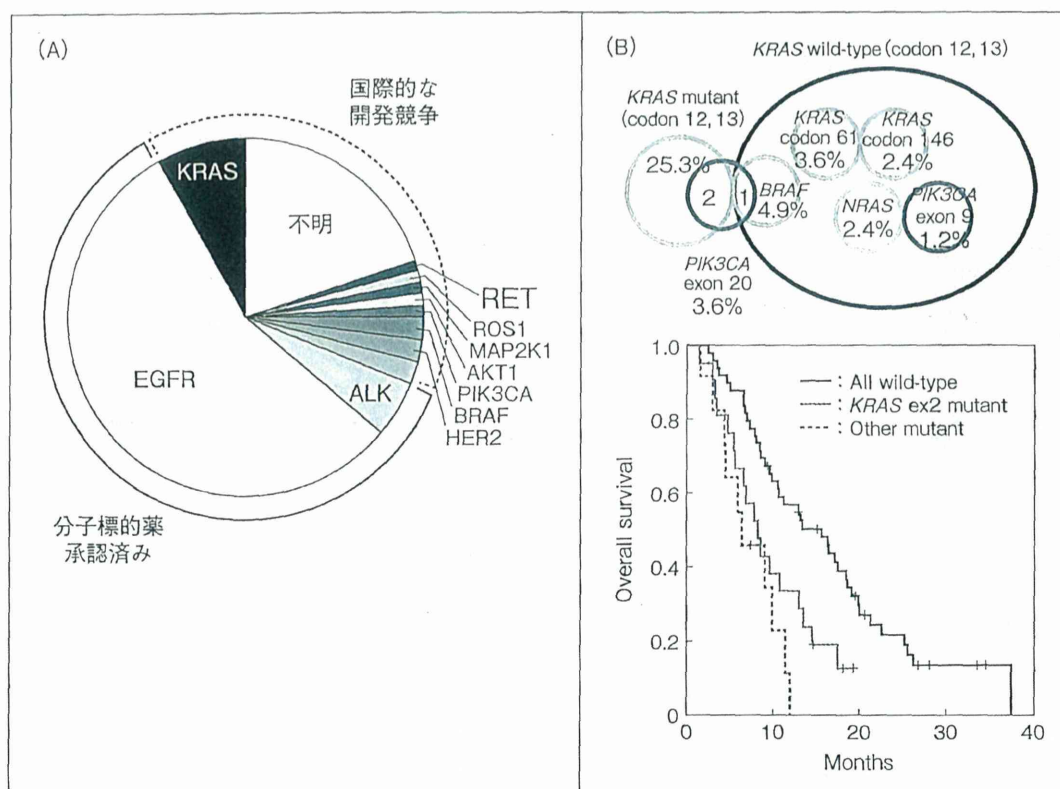


図 1 がん薬物療法の効果予測因子の多様化

A: 臨床的に利用可能な特異的阻害剤があるがん遺伝子変異により肺がんは細分化され、“希少フラクション”の集合体とみなされるようになった。
B: EGFR 下流の KRAS や NRAS が常時オンになる変異がある大腸がんでは、抗 EGFR 抗体薬の効果は期待できない。

ブなど、これまでに臨床で明らかな治療効果を示している分子標的治療の例からも明らかなように、がん細胞で特徴的な異常遺伝子構造異常や変異が明確ながん化のドライバーとなっている場合に、これらの遺伝子産物の機能を抑制することが分子標的薬の成功の鍵となっている。

ALL や GIST の場合には従来の組織・細胞病理学的方法によって確定診断がついた時点で、その過半数が上にあげた遺伝子構造異常をもつ症例であるため、あらためて遺伝子検査を追加せずに分子標的薬の適応を決定してもそれほど問題はなかった。これに対し肺がんの場合、標的となる EGFR 活性型変異陽性例は、東アジアの非喫煙者に限っても約半数、欧米の症例では 4 割弱にすぎず、EGFR 変異の検出なしに阻害剤が投与されれば、過半数の患者は治療効果が望めないばかりでなく間質性肺炎など致死的な副作用のリスクにさらされることになる²⁾。EGFR の活性型変異の

90% 以上はエクソン 19 の欠失変異とエクソン 21 上のコドン 868 の点変異であり、これらを鑑別する解析妥当性が検証された体外診断薬が開発され、実臨床で汎用されている³⁾。

その後、肺がんにおけるドライバー遺伝子探索が進み、ALK 融合遺伝子、RET 融合遺伝子、ROS1 融合遺伝子、BRAF 変異などそれぞれのキナーゼ阻害剤による治療効果が期待できるドライバー遺伝子異常の数が増えるとともに、それらを有する患者集団は肺がん全体の 1~2% 程度にすぎない“希少フラクション”に細分化することが明らかとなった(図 1)¹⁾。現在わが国で保険収載されている肺がんのコンパニオン診断は EGFR 変異検査と ALK 融合遺伝子の検索のみであるが、これらの希少フラクションについての治療開発も着々と進んでおり、近未来において検索すべき遺伝子変異の数は大幅に増加すると予想される。

一方、分子標的薬が広く使用されるにつれ、そ

れら薬剤への不応や耐性に関連する遺伝子変異の知見も集積してきた。肺がん領域においては、EGFR, ALK のキナーゼ活性領域にそれぞれの阻害剤に対する治療抵抗性を誘導するゲートキーパー変異の存在がすでに知られている⁴⁾。また、抗EGFR抗体薬が臨床応用されている大腸がんでは、標的となるEGFRの下流のシグナルが恒常的に活性化していると抗腫瘍効果は期待できないと考えられ、実際いずれの治療ラインにおいても第Ⅲ相臨床試験のサブセット解析で、KRASエクソン2に変異を有する集団ではセツキシマブやパニツムマブの効果が認められず、治療ガイドラインにおいてもKRAS変異型に対する抗EGFR抗体薬の使用は推奨されていない⁵⁾。

さらに昨年来、これまで大腸がん症例では稀少フラクションとみなされてきたKRASエクソン3および4, NRASの遺伝子変異を有する症例で同様に治療の上乗せ効果は認められず、しかもこうした“マイナー変異”は、総計すると従来抗EGFR抗体薬が投与されてきたKRASエクソン2野生型の約20%とけっして少なくない集団であることも明らかとなった。すでに欧米の治療ガイドラインや抗体薬の添付文書ではKRAS, NRASいずれの変異例についても抗EGFR抗体薬の投与は推奨されなくなっており、著者らが行った日本の症例の解析でも同様の結果が得られ“All RAS”検査が求められている^{6,7)}。

以上のように、国内においてもマルチプレックスゲノム診断の必要性が日に日に高まっており、検査の堅牢性が担保された遺伝子診断法の開発の遅れは、実地診療におけるドラッグラグの誘因になりかねない現状である。

次世代シーケンサーを利用した マルチプレックス遺伝子変異解析

これに対して1回の反応で複数の遺伝子変異を同時に検出する方法、マルチプレックスゲノムバイオマーカー診断法が実用化しつつある。マルチプレックスPCRで増幅した複数の標的配列中の変異の有無を定量PCR法、マスアレイ法やルミネックス法で検出する研究用試薬はすでに一般に利用可能であり体外診断薬開発も進められている

が、これらに加え超並列シーケンス技術を応用して数十から数百種のがん関連遺伝子変異を検出するシステムも実用化が進んでいる。現在、ゲノム解析における標準機ともいえるイルミナ社のHiSeqシステムと同じsequencing by synthesis (SBS)法によるデスクトップ型のシーケンサーMiSeq DXは、2013年にアメリカ食品医薬品局(FDA)から市販前認可(premarket clearance)を受け、同時に嚢胞性線維症の原因となるCFTR遺伝子変異解析キットおよび施設ごとに独自の診断検査を開発できるユニバーサルキットも市販前認可を受けている⁸⁾。さらに2014年には、MiSeq DXを用いたパニツムマブのコンパニオン診断法の開発をめざして、イルミナ社とパニツムマブの製造元であるAmgen社が提携し、FDAやヨーロッパの規制機関による認可取得に向けた具体的な取組みが開始されている。日本において薬事法の認可を受ける次世代シーケンサーがいつ登場するか、まだ具体的なアナウンスはないが、それほど遠い将来ではないであろう。日本の臨床の現場に即した形で次世代シーケンス技術を応用した診断システムの実施可能性の検証は、早急に必要である。

ホルマリン固定組織から抽出したゲノムDNAを用いるマルチプレックス変異検索キットは、研

サイド メモ

アンブリコンシーケンス

アンブリコンシーケンスとは、任意の領域のDNA配列を次世代シーケンサーによって決定する方法のひとつである。ゲノムDNAやcDNAから数百から数千種類の標的をマルチプレックスPCRで増幅し、100~200塩基対(bp)の増幅産物の塩基配列を決定する。任意の領域を相補的なプローブを使ったハイブリダイゼーションによって濃縮しシーケンスする“ターゲットキャプチャー法”に比べ、微量の鋳型で開始できることや、シーケンスに用いるライブラリー作成が迅速に行えるなどの利点があるが、一度に解析可能な領域が数十kb程度に制限されるため、ゲノムDNA上で多様な融合点をもつ肺腺がんのALKやRETの転座解析に難がある。

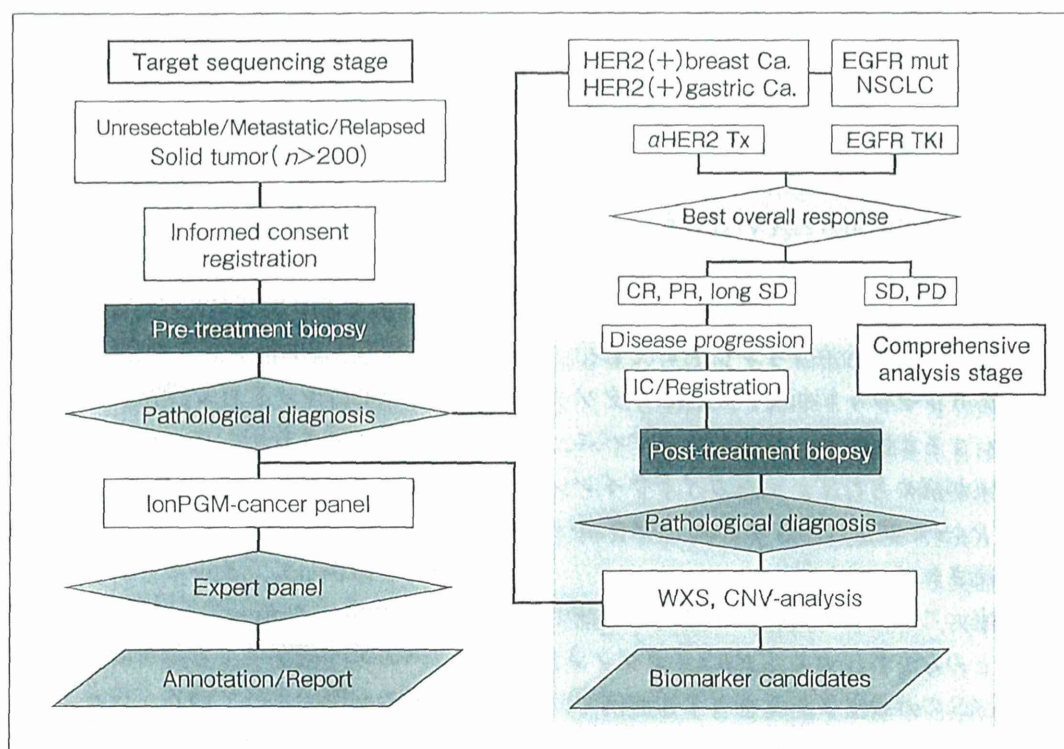


図2 ABC (Analysis of Biopsy samples for Cancer genomics) Studyの概要

薬物治療前の固形がん患者の生検検体を用いて50種のがん遺伝子、抑制遺伝子のホットスポット変異を検出する(target sequencing stage)。分子標的治療が奏効した症例について増悪後にpaired biopsyを行い、治療前後のゲノムの網羅的解析により耐性機構を検討する(comprehensive analysis stage)。

究用試薬として国内でも利用可能なものがある。ライフテクノロジー社は、半導体チップを利用したベンチトップ型の次世代シーケンサー、Ion PGMTMシステムに対応したアンプリコンシーケンスキット(Ion AmpliSeqTM Cancer Panel)を発表している。現行のバージョンでは50種類のがん関連遺伝子における変異のホットスポット約2,800カ所をカバーする領域をマルチプレックスPCRで増幅し、超並列シーケンスを行って一塩基変異、挿入欠失型の変異を検出する。微量のゲノムDNAで実施できることがアンプリコンシーケンスの長所であり、以下に述べるABC Studyにおける著者らの経験でも、ホルマリン固定材料から抽出した10 ngの二本鎖DNAから平均2,500以上のカバレッジでシーケンスが可能であった。また、ABC Studyに登録された176例中EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CAのホットスポット変異は223カ所で検出され、同一試料についてすでに臨床検査として利

用されているScorpion-ARMS法によるKRAS, EGFR変異検査や、同じくKRAS検査で薬事承認されているPCR-rSSO法と同等の性能でNRAS, BRAF, PIK3CAの変異を検出可能なキットでの解析結果と比較したところ、99.7%の全体一致率を示し、次世代シーケンサーによる解析が感度・特異度とも現行の遺伝子検査法に遜色ないことが示唆された(未発表データ)。

マルチプレックスゲノムバイオマーカー診断の実施可能性の検証

次世代遺伝子検査の実用化のためには、上記のような検査方法の解析妥当性に加えて検体管理、データ管理の妥当性や臨床担当医への報告方法の検討、さらには遺伝子変異解析が臨床上どの程度有用であることを明らかにしておかなければならない。

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bio-

marker-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 2)。

ABC Study は 2 段階の構成になっている。第 1 段階の target sequencing stage では、臓器を問わず薬物療法が予定されている進行・再発固形がん患者を対象とする。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 では、文書による同意を得て治療前の診断確定のために行われる内視鏡下生検、エコーガイド下生検、切開生検などで得られる組織を病理担当医が検討し、体細胞変異検出に影響を及ぼす因子 (組織中の腫瘍細胞比、組織中の壊死の程度など) を記録し、検査に適すると思われる組織を、診断の妨げにならない範囲で提出する。臨床検査室の国際規格 (ISO15189 など) に準拠した検査室でホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本からゲノム DNA を抽出し、上記の Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel を用いシーケンスを行う。ただし現行のシステムでは検出した変異について染色体上の座標での塩基置換が示されるのみで、その結果どのようなアミノ酸置換が生じるかはそのままではわからない。そこでゲノム変異の情報を cDNA および蛋白質における変異情報に置き換える。たとえば、3 番染色体の 178,952,085 番目のアデニン (A) がグアニン (G) に置換していれば、それは PIK3CA 遺伝子の cDNA 上 3,140 番目の A が G に置換することを示し、これによって蛋白質上では 1,047 番目のヒスチジン (H) がアルギニン (R) に置換する、と記載する。PIK3CA の H1047R 変異はキナーゼ活性の亢進と下流の AKT-mTOR シグナルの活性化を引き起こすことが知られており、乳がんをはじめ多くのがんで生じている変異

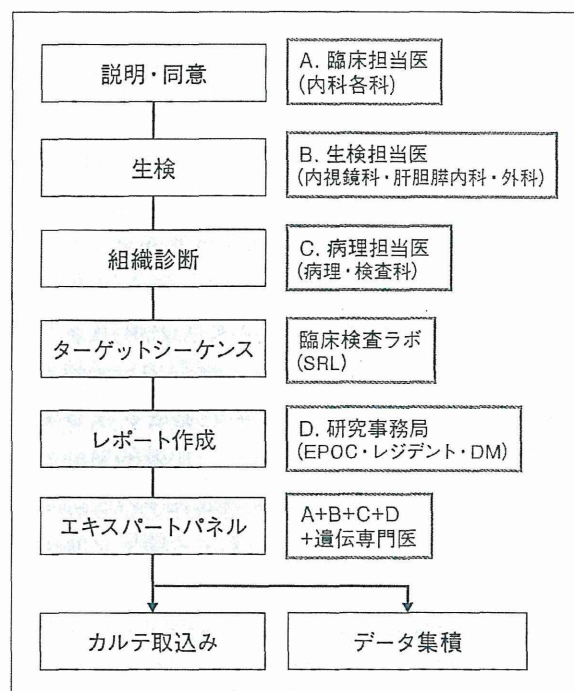


図 3 T-stageにおける検体・情報の流れ
病院内の各職種が関与し、分子生物学、遺伝学の専門家も参加するエキスパートパネルで症例検討を行った結果をカルテ情報として提供する。

が報告されている。こうした生物学的特徴、各臓器のがんにおける変異頻度など臨床疫学的な特徴を UniProt や COSMIC など出典が明らかな公的データベースから引用する。さらに、既承認および開発中の PI3K-AKT-mTOR 経路の阻害剤について現在自施設で進行中の治験の情報などを中心に記載するとともに、その変異が及ぼす薬理学的な情報もエビデンスレベルを考慮して可能なかぎり記載する。

こうしたレポート作成を、内科の若手のスタッフやレジデントが中心となって運営する研究事務局で行っている。その後、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で構成されるエキスパートパネルで臨床担当医、病理担当医、遺伝子解析レポートの担当者によるケースプレゼンテーションを軸に討議を行い、その結果を電子カルテにアップロードし共有している (図 3)。Target sequencing stage には 2012 年 7 月の研究開始以降、約 1 年 7 カ月で想定を上回る 208 例の症例が集積され、組織学的にがん細胞が確認された症例の 99% でアンプリ

コンシークエンスに成功している。有害事象はなく日常診療の範囲で安全に検査が実施可能なことが示され、上述の既存法との一致率とあわせ臨床的妥当性(clinical validity)は十分なことが示された。

初年度に用いた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何らかの関連が想定される変異は、約40%の症例で見出された。比較的早期の治療ラインでの登録で標準治療が継続中の症例が多く、当初想定していたシークエンス結果を直接利用した治験への登録例はまだ少なく、症例を登録した臨床担当医のアンケートでも今回のシークエンスの結果が临床上直接有用であったとする意見も限定的であったが、今後さらに観察を続けて遺伝子変異情報の有無が治療方針の決定にどの程度影響を与えたかなど、臨床的有用性(clinical utility)についても検証を続ける。

ABC Studyでは上記の腫瘍内科医や病理医、ゲノム科学者だけでなく、生検を担当する医師、外来、病棟の看護師、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各職種の協力なしには成り立たない。研究の実施にあたり、近未来のがん治療における遺伝子解析による層別化の必要性について各診療科、病棟単位でのきめ細かい説明会の開催や、現場からの問合せに対してつねに事務局で対応可能な体制を整えた。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。

ABC Studyによって生検検体FFPE標本を用いたアンプリコンシークエンスの実施可能性はほぼ検証できたが、臨床的有用性をより高めるためには遺伝子変異に加えて遺伝子増幅や融合を同じプラットフォームで検出可能なシステムの開発も加速させなければならない。比較的簡便に多数遺伝子の変異情報を解析できるこれらのシステムはとくに早期開発においてゲノムバイオマーカー候補の探索や、標的分子が明確な治療薬候補について合理的な患者集団を濃縮して行う臨床試験での

スクリーニングに有用であるが、さらに、分子標的薬の適応外使用やcompassionate useを視野に入れば、実地診療において患者の利益となる情報を提供できる可能性もある。

今後、次世代シークエンサーを利用したがん遺伝子検査をより幅広く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。一方、次世代シークエンサーが産出する多数のショートリードシークエンスには、目的とする遺伝子変異箇所以外のゲノム配列が含まれており、慎重に扱わなければならない。また、従来のバイオバンクと比較してはるかに多くの臨床情報を経時的に収集することも想定される。これら患者個人に直結した情報をゲノム情報と組み合わせ、いかに安全・正確に管理するかは大きな課題である。そのためにはこれまで治療開発に中心的な役割を果たしてきた臨床・基礎研究者に加え、情報工学の専門家も交えて情報インフラの整備についての研究を進めることも重要である。

文献/URL

- 1) Alexandrov, L. B. et al.: Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, **500**: 415-421, 2013.
- 2) Kohno, T. et al.: RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci.*, **104**: 1396-1400, 2013.
- 3) Goto, K. et al.: An evaluation study of EGFR mutation tests utilized for non-small-cell lung cancer in the diagnostic setting. *Ann. Oncol.*, **23**: 2914-2919, 2012.
- 4) Yano, S. et al.: Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer: roles of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor receptor ligands. *Cancer Sci.*, **103**: 1189-1194, 2012.
- 5) 大腸がん研究会: 大腸がん治療ガイドライン医師用, 2014年版, 金原出版, 2014.
- 6) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology_ Colon Cancer, Rectal Cancer. 2014, (http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf, http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/rectal.pdf)
- 7) Bando, H. 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.
- 8) Collins, F. S and Hamburg, M. A.: First FDA authorization for next-generation sequencer. *N. Engl. J. Med.*, **369**: 2369-2371, 2013.

【第Ⅲ部 実用化に向かうゲノム創薬】

生検材料の臨床シーケンスがもたらす新しいがん診療

土原一哉*

はじめに：標的分子による治療最適化を目指した創薬

「個別化医療」という言葉ががんの治療開発の現場で使われるようになって久しい。薬効と副作用が表裏一体となるがん薬物療法において、効果がより期待できる患者集団を選択、濃縮し患者のリスク-ベネフィットのバランスを最大化することは治療個別化、最適化の大前提である。これまでの殺細胞性抗がん剤による標準治療は統計学的なエビデンスに基づき集団的な効果を期待するものであったが、分子標的薬の普及とともに個々の症例の生物学的特性の把握、すなわちがん細胞、組織で発現亢進や活性化が認められる分子を特異的に検出する治療前診断の複雑さと重要性が日に日に増している。その傾向が最も顕著なのは河野の稿でも解説されている肺がんであるが、大腸がんなど他の固形がんにおいてもその状況は変わらない(本特集の別稿(河野)を参照)。biomarker-guided treatmentの波は今や現実のものとして押し寄せており、特に新規抗がん剤開発の機会が多い施設では切実な問題となっている。現在開発中の未承認薬の多くは第2相、第3相臨床試験の段階で標的となる分子の発現、変異に基づいた患者選択が行われており、医師主導治験、企業治験によらず患者登録と同時に生検や手術切除標本のパラフィン包埋ブロックを提供し各試験で定めた方法によって中央診断によって適格と判断された症例にのみ試験薬が投与される。提供されたブロックは多くの場合参加施設には返却されない。そのため不適格と判断された症例の標本が死蔵されることとなり、これらの症例を別の試験に登録しようとした際に必要な標本の提供が困難になる、各施設における病理診断、研究に支障をきたすおそれがあるなど、患者にとって明

らかな不利益を及ぼす可能性がある。個別にバイオマーカー検索を行う非効率性は薬剤を開発する企業、アカデミア側にとっても大きな問題である。各がん種において分子標的薬の標的となる変異等を有する症例は細分化されることから、多くの症例を登録しても実際にはごく一部の患者しか投与の対象にならず、バイオマーカー陽性例で臨床試験を成立させるのに必要な十分な数の母集団を確保することが一層困難となっている。また鑑別すべき遺伝子数が増し、それらを個別に検索していくスクリーニングのコストの上昇にも歯止めが効かない。こうした問題を解決するための一つの方法として、各種の臨床試験への登録に先立って各施設において系統的な分子診断をあらかじめ行い、その結果を参照してより適切と考えられる試験に登録をした上で、各試験に定められた検査法でのバイオマーカーの確定を行うという手順が考えられる。このシステムが有効に機能すれば臨床試験実施の合理化にとどまらず、将来それらの分子標的薬が実臨床で利用可能になった際には実用的な「臨床検査(コンパニオン診断)」に移行させることができ、また遺伝子変異の検索結果をカルテ情報として残していくことで新たな治療標的の探索や、がん生物学研究にも利用可能な有用な臨床情報のリソースとして活用することも考えられる。

I. 臓器横断的ゲノムスクリーニングプログラム
「ABCスタディ」

国立がん研究センター柏キャンパス(東病院、臨床開発センター、早期・探索臨床研究センター)では数年前から基礎、病理、臨床のスタッフ、レジデントの有志による分子標的療法の勉強会(TRミーティング)を定期的に開催しており、その中で遺伝子変異、発現異常の系統的プレスクリーニングシステムの必要性がしばしばディスカッションされてきた。おりしも次世

* 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