

特集 変化する肺癌治療

Topics 1

分子異常診断法新時代

萩原 弘一

要旨：非小細胞肺癌において EGFR 遺伝子変異検査は必須となった。EGFR 遺伝子変異同様、癌の発生、進展に重要な変異遺伝子として ALK, ROS1, RET 融合遺伝子が報告され、DNA, RNA 検査用検体取扱い手法が臨床医の必須の知識となってきた。遺伝子変異には生殖細胞系列変異、体細胞変異があり、両者を厳密に区別して理解し、検索する必要がある。多数の遺伝子変異の同時検索施行には、高速シーケンサーの利用が現実的な選択肢である。今後高速シーケンサーを利用した遺伝子変異システムが開発されていくであろう。

キーワード：EGFR 遺伝子変異検査, ALK 融合遺伝子,
生殖細胞系列変異, 体細胞変異, 高速シーケンサー
EGFR mutation test, ALK fusion gene,
Germ line mutation, Somatic mutation,
High-speed sequencer

連絡先：萩原 弘一
〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38
埼玉医科大学呼吸器内科
(E-mail: hagiwark@saitama-med.ac.jp)

はじめに

遺伝子工学技術が広く世界に広がったのは1970年代のことであった。西欧の呼吸器病学はいち早くその恩恵を受けた。α1アンチトリプシン欠損症、嚢胞性線維症の遺伝子が明らかにされ、病態生理の理解、診断法の開発、治療戦略の構築に大きな寄与をするとともに、肺気腫、気管支拡張症、慢性気道感染症を来す類縁疾患を理解するための基礎となった。さらにはKartagener症候群、Hermansky-Pudlak症候群など、より患者数の少ない病態の原因も解明された。一方、日本の呼吸器病学において、遺伝子工学はあくまで研究分野の技術であり、臨床で利用されることは少なかった。わずかに感染症分野で病原体の同定に用いられた程度であった。

この状況を一変させたのが、肺癌における上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異の発見だった。EGFR 遺伝子変異のある患者に EGFR 阻害剤を使用すると、劇的な臨床効果が得られることが明らかになり、EGFR 遺伝子変異検査は肺癌診療に必須の検査となった。それとともに、遺伝子工学の用語、知識、技術が呼吸器病学に流れ込み、呼吸器病学を学ぶものにとって必須の事項となった。

EGFR 遺伝子変異は、遺伝子検査にとっても全く新しい挑戦となった。α1アンチトリプシン欠損症、嚢胞性線維症は、人体を構成するすべての細胞が異常をもっているため、末梢血を採取して白血球 DNA を調べれば遺伝子診断可能である。感染症病原体は、感染部位に大量の病原体が存在することがほとんどであり、検出は一般に容易である。一方、EGFR のように癌細胞のみに存在する体細胞変異の同定はきわめて難しい。検体採取法、検出手法、臨床に必要な感度、特異度に関して、日本ではおおむねコンセンサスが確立されたが、世界標準は確立されておらず、模索が続いている。

DNA と RNA (図1)

遺伝子検査の対象は2種類ある。DNA と RNA である。DNA と RNA は全く異なる化学的性質を示すので、遺伝子検査を行うにはそれぞれの性質を熟知しておかねばならない。

DNA は安定な物質である。DNA 分解酵素が存在し

なければ、長期間安定して存在する。古墳から出土した人骨から DNA を抽出して調べた研究は数多い。小説『ジュラシック・パーク』では、琥珀に閉じ込められた恐竜の血を吸った蚊から6,500万年前の恐竜の DNA を抽出するが、類似の試みは実際に行われている。このように DNA は安定なため、臨床検体から DNA を抽出するのは難しくない。しかし、注意しなければならないのは、ホルマリン固定は DNA を「引きちぎる」ことである。ホルマリンがタンパクを架橋させ固定するため、長鎖 DNA は物理的な牽引力を受けて細断されるようだ。そのため、ホルマリン固定された組織中の DNA はずたになっている。遺伝子変異検査を想定する検体は、凍結保存や DNA 保存液中での保存が勧められる。

DNA とは対照的に、RNA はきわめて不安定である。手術材料から RNA を抽出するため、手術室に液体窒素を持ち込み、摘出後の組織をすぐに細切して液体窒素に投げ入れて保存した経験のある人もいるだろう。RNA は反応性が高く、時に酵素としても働くほど化学的に活性が高い。タンパク質酵素が出現する前、初期の生命はタンパク質の代わりに RNA を酵素として使用したと考えられている。その名残がタンパク合成を触媒するリボソームや tRNA など、細胞代謝の基幹経路に残されている。他の物質と反応すると RNA 自身も分解されやすい。RNA 検査を行うためには、検体をできるだけ早く、RNA 保存液中に入れることが必要である。今後、臨床検体でさまざまな RNA を測定する必要が生じるだろう。それが可能かどうかは臨床医の特技にかかっている。現在提案されている手法を図2に示す。

生殖細胞系変異 (germ line mutation) と体細胞変異 (somatic mutation) (図3)

遺伝子変異には、①生殖細胞系変異と②体細胞変異がある。混乱しやすいのでまとめておこう。

①生殖細胞系変異：体を形成するすべての正常細胞がもつ変異である。子孫に伝えられる (遺伝する) 変異でもある。

②体細胞変異：癌細胞など、異常をきたした細胞のみが有する変異である。子孫には伝えられない。

生殖細胞系変異は倫理上の重要性が高い。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針など、遺伝子検索上の指針の多くは生殖細胞系変異を対象としている。

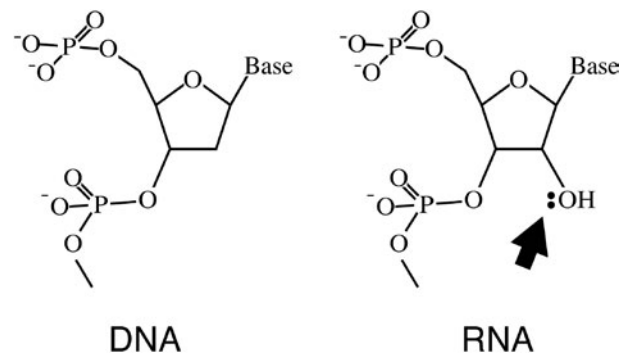


図1 DNAとRNA. DNAとRNAの違いは、酸素原子1つの違いにすぎない。しかし、この酸素原子の有する孤立電子対は反応性が高く、他の物質からの求核反応（nucleophilic reaction）の標的となり、さまざまな物質と反応する。その結果、RNAは酵素としてもはたらいたり（ribozyme）、分解されたりする。

生殖細胞系列変異は、個人の「体質」を規定し、子孫へ伝えられるものだからである。一方、体細胞変異は個人情報としての重要性ははるかに少ない。癌などの病的細胞に限定した性質を規定するものであり、子孫には伝えられないものだからである。

いくつか例を挙げよう。ダウン症候群の有無を妊婦の血液から検索する検査は、妊婦の血液中に流出している胎児DNAを利用し、胎児の生殖細胞系列DNAを観察している。肺癌におけるEGFR変異、EML4-ALK融合遺伝子検査は、体細胞変異検査である。

遺伝子変異検査

上記の知識を基礎として、現在行われている遺伝子変異検査に関して述べてみたい。ここでは特に体細胞変異に限定し、代表的なEGFR遺伝子変異検査とALK融合

遺伝子変異検査に関して述べる。

1. EGFR 遺伝子変異検査

EGFR 遺伝子変異は肺癌細胞に生じた体細胞変異である。DNAを検索する。癌細胞を採取した際に混入する正常細胞はEGFR変異をもたず、正常のEGFR遺伝子を保有している。EGFR 遺伝子変異検査は、正常細胞に由来する正常EGFR遺伝子の存在のもとで、それとはわずかに塩基配列が異なる変異EGFR遺伝子を検出する必要があるため、高感度法が使用される。日本で施行されているすべての検査法は、検体中の癌細胞が1%、正常細胞が99%の状態でも検出可能である^{1)~3)}。

DNAを検索する理由は以下のとおりである。①DNAは安定であり、RNAよりはるかに扱いやすいこと。②EGFR遺伝子は正常細胞には2コピー、癌細胞では時に増幅しているため2コピー以上存在することが保証されているので、検体中の癌細胞の数に比例した形で定量的な検査結果が得られること。RNAを使用した場合、正

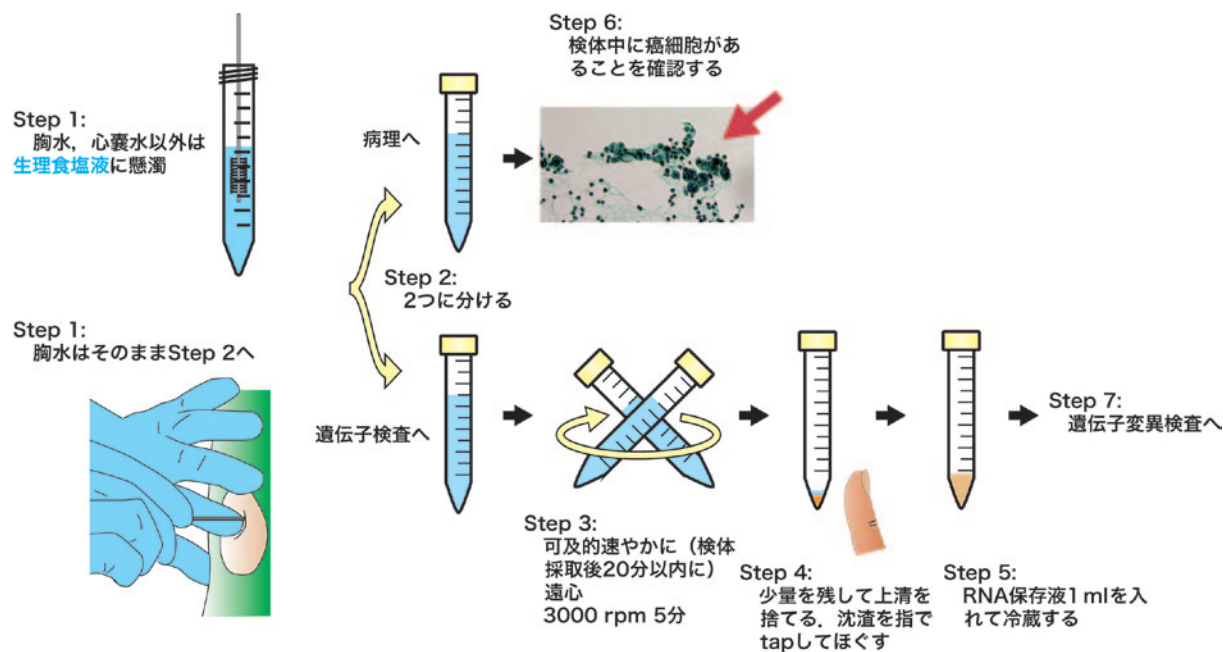


図2 遺伝子変異検査用臨床サンプルの採取法。DNA と RNA の同時検索が可能な手法である。RNA は分解しやすく、採取時の不適切な手技により容易に分解する。良好な RNA を採取可能なサンプルを保存することは、臨床医の重要な責任になるだろう。

常細胞が癌細胞よりEGFR遺伝子を多く発現していると、癌細胞由来の異常EGFRが覆い隠されてしまう。DNA検査のメリットの一つは、遺伝子発現とは無関係に変異検索ができることである。

2. ALK 融合遺伝子検査

ALK 融合遺伝子は肺癌細胞に生じた体細胞変異である。現在、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)、免疫組織染色 (IHC)、蛍光 *in situ* hybridization (FISH) で検査されている。本稿では RT-PCR を扱う。IHC、FISH に関しては Topics 2 を参照されたい。

ALK 融合遺伝子では、融合部位が染色体上 DNA 上の広い領域に分散しているため、DNA で検査すると非常に広範な染色体領域を検索する必要が生じ、事実上検査が不可能になる。RNA では、融合部位の DNA はイントロンとして除去されてしまうため、融合遺伝子を構成する2つの遺伝子（たとえば EML4 と ALK）のエク

ソン配列が隣接した構造が残る。この構造は RT-PCR で容易に検出できるため、RNA レベルの検査が行われる。正常の細胞由来の RNA にはこの共通構造が存在しないため、バックグラウンドのない検査が可能である。

RNA 検査の問題は、RNA がきわめて不安定なことである。臨床検体を適切に処理しないと、検体採取現場で RNA は分解してしまう。さらに、癌細胞が EML4-ALK をどの程度発現しているかがわからないため、検出されなかった場合、① EML4-ALK が存在しない、② RNA が分解していた、③ EML4-ALK の発現量がきわめて低い、のいずれだったのか判然としない。そのため、適切なコントロールをおいて検査する必要があるが、コントロールをおく標準的な手順は確立されていない。検査法開発者の創意工夫にまかされている。

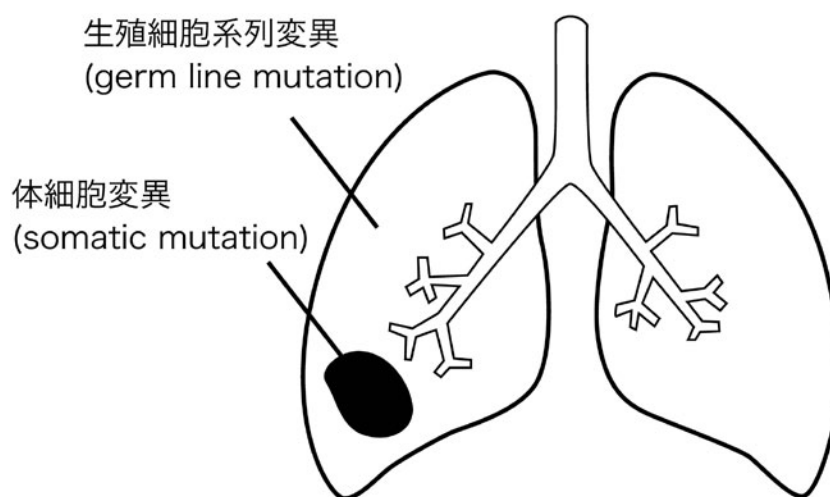


図3 生殖細胞系列変異と体細胞変異。癌細胞のみに存在する変異は体細胞変異 (somatic mutation) であり、正常細胞に存在する変異は生殖細胞系列変異 (germ line mutation) である。非小細胞肺癌でみられる EGFR 遺伝子変異は体細胞変異の例であり、嚢胞性線維症でみられる CFTR 遺伝子異常は生殖細胞系列変異の例である。

新たな遺伝子変異検査

癌細胞に体細胞変異が存在した場合、利用可能な保険適応分子標的薬が存在する遺伝子は、現時点で EGFR 変異遺伝子、ALK 融合遺伝子のみである。しかし、BRAF 変異遺伝子、ROS1 融合遺伝子、RET 融合遺伝子には、それぞれ分子標的薬が存在し、近い将来使用できる可能性がある。BRAF 変異遺伝子は DNA 検査、ROS1 融合遺伝子、RET 融合遺伝子は RNA 検査である。これからも、適切な分子標的薬のある変異遺伝子の数はさらに増えるだろう。これは、上記の遺伝子を含んだ複数の遺伝子変異を同時検査する検査法を確立する必要があることを示している。

さらに、実臨床で使用可能な検査は、以下の条件を満たす必要がある。

①実現可能な検体採取方法が確立されていること。

②すべての患者から検体採取可能なこと。

③1週間以内に結果返却可能なこと。

④全細胞の1%の癌細胞しか含まない検体からも検索可能なこと。

⑤感度、特異度が0.95以上で施行可能なこと。実際には0.99以上が求められるだろう。

⑥現実的な検査代金で施行可能なこと。実際には数万円程度であろう。

①～⑥すべてを満足する検査を開発するために現在利用可能な選択肢は、高速シーケンサーを使用する手法であると思われる。

高速シーケンサー (図4)

高速シーケンサーは、次世代シーケンサーと呼ばれる。高速シーケンサー登場前、核酸塩基配列決定は、

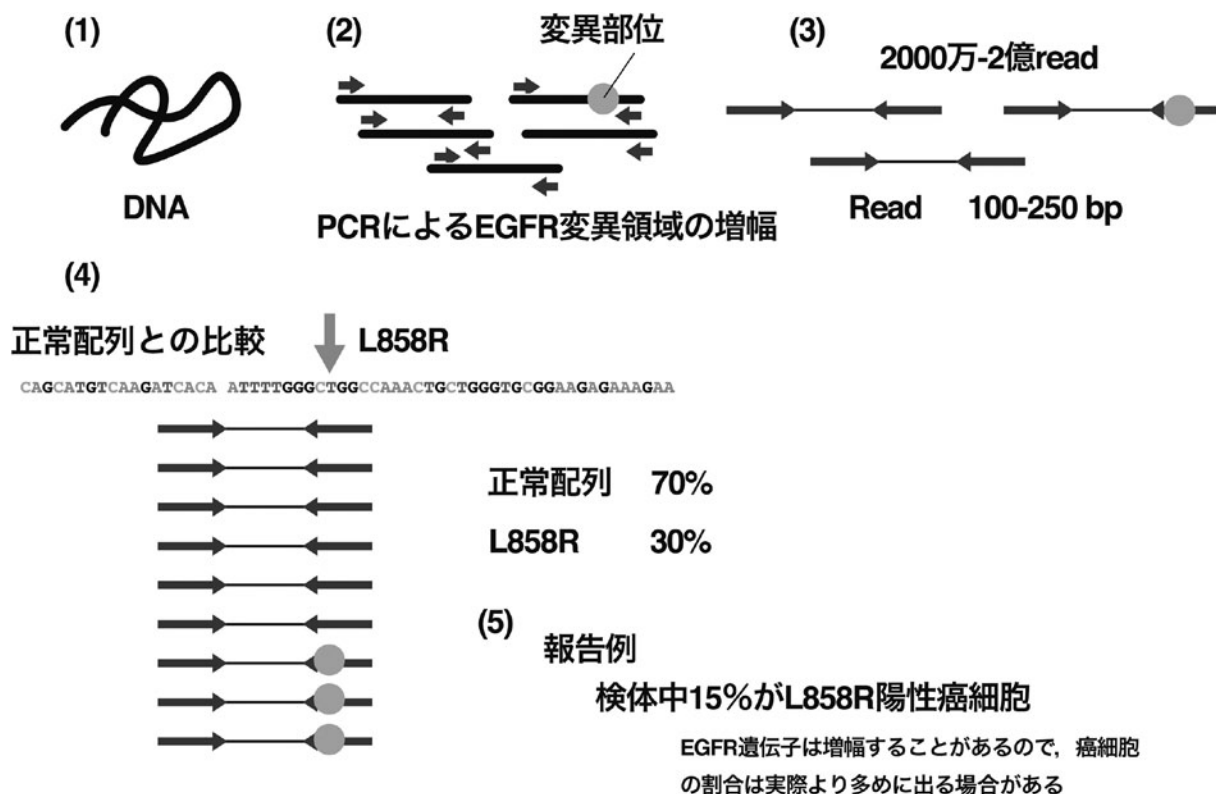


図4 高速シーケンサーによる変異解析の手順。(1),(2) 変異領域 (mutation hotspot) をPCRで増幅,(3) 高速シーケンサーで塩基配列を決定,(4) 正常配列と比較し, 変異配列の割合を計算,(5) 結果報告。

蛍光シーケンサーを用いてSanger法で行われていた。反応はサンプルごとに液相で行われ, 一度に1つのDNA鎖の塩基配列しか決定できず, 決定可能な塩基対数は600~800塩基対であった。固相反応と液相反応を共用することで, 数十塩基対の配列を一度に数千万配列決定する手法が開発された。当初は30塩基対程度の短い配列しか決定できなかったが, 徐々に決定できる塩基対の長さが伸び, 現在では200~300塩基対を数千万配列一度に決定できるようになっている。このデータ量は数百GB(ギガバイト)にもなり, 以前の非力なコンピュータではとても処理できる量ではなかった。しかし, 近年のCPU(中央演算装置)の進歩により, デスクトップパソコンでも処理可能な範囲に入ってきた。高速シーケンサーは, コンピュータ科学の進歩が可能にした技術という側面が大きい。

高速シーケンサーを用いた検査の理屈は難しくない。

①臨床検体より目的とする標的配列(EGFR exon 19,

21など)をPCRで増幅する。RNAの場合は, RT-PCRにより増幅する。

②複数の標的配列の増幅産物をすべて合わせ, 高速シーケンサーにかける。

臨床検体中, 1%の癌細胞しか含まない検体を検索したと考えよう。この癌細胞はEGFR exon 19変異をもっているとする。その場合, 正常EGFR exon 19配列が100,000配列, 変異EGFR exon 19配列が500配列(通常, 癌細胞の2つのEGFR遺伝子のうち片方のみが変異を有するため)という形でデータが出てくる。

高速シーケンサーも塩基配列決定時に誤りをおかし, 正常配列を変異配列と読み間違えることがある。このようなエラーをどのように補正するか, また, RNA検査の場合は, どのようにRNAの品質を保証するためのコントロールをおくか, などの点が実用化上の問題だが, これらも解決されつつある。近い将来, 高速シーケンサーが遺伝子変異検査の主役になることは間違いない。

遺伝子変異検査における日本の果たすべき役割

EGFR 遺伝子変異頻度が日本で高かったこと、EGFR 遺伝子変異が早期に保険収載されたこと、臨床検査が国内少数の検査センターで集約的に行われる医療システムであることなどが幸いし、日本では進行非小細胞肺癌患者全員が EGFR 遺伝子変異検査を受けるシステムができ上がった。これは世界の最先端の成果である。また、日本の遺伝子変異検査は、世界で最も厳しい基準で施行されているといってよい。EGFR 遺伝子変異システムで達成したこの成果を損なうことなく、さらに発展させ、患者に迅速に基礎研究結果を還元できるシステムを推進することが、日本の責務であると考えられる。

おわりに

肺癌細胞はさまざまな遺伝子変異をもっている。そのなかに、治療薬と密接に結びついた変異が存在する。検索しなければならない遺伝子の数はこれからも増すであ

ろう。基礎医学の進歩を臨床医学に速やかに還元するために、遺伝子変異検査も進歩しなければならない。そのためには、検体採取法を臨床現場で施行可能なものにし、結果の返却時間や必要な感度など、臨床に必要な検査仕様を考慮してシステムを設計していく必要がある。高速シーケンサーを用いたシステムは、それらをすべて満たす可能性があり、今後積極的に開発を進めていく必要があると考えられる。

引用文献

- 1) Goto K, et al. An evaluation study of EGFR mutation tests utilized for non-small-cell lung cancer in the diagnostic setting. *Ann Oncol* 2012; 23: 2914-9.
- 2) Hagiwara K, et al. Importance of the cytological samples for the epidermal growth factor receptor gene mutation test for non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2013; 104: 291-7.
- 3) Kobayashi K, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *Target Oncol* 2013; 8: 27-33.

Abstract

Next-generation test system for genetic mutation in lung cancer

Koichi Hagiwara

Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University

The identification of an epithelial growth factor receptor (EGFR) mutation as a cancer driver gene in nonsmall cell lung cancers, and the development of high-sensitivity mutation test systems have dramatically changed the procedures to treat nonsmall cell lung cancers. Currently, almost all patients with advanced nonsmall cell lung cancer are tested for the presence of EGFR mutation in Japan, and if positive, treating patients with regimens containing EGFR-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) are considered mandatory. The EGFR mutation test should detect mutant EGFR genes from clinical specimens in which cancer cell content is only 1%. Recently, anaplastic lymphoma kinase fusion genes, rearranged during transfection (RET) fusion genes, and c-ros1 proto-oncogene (ROS1) fusion genes have been reported: all of these genes have drugs that suppress activities and thus can be used for treatment. Genetic tests that are capable of investigating all these mutant genes are required. Moreover, the test system should be equipped with the practical sample isolation procedures, should report the result within a week, should detect mutation from a clinical specimen in which cancer cell content is only 1%, and should be inexpensive and allow all patients with nonsmall cell lung cancer to be tested. The most practical approach constructing such a system is to employ a high-speed sequencer. Systems using them are now being constructed and will soon be introduced to clinical practice.