

●症 例

14年間保存された肺葉切除検体で ROS1融合遺伝子陽性が証明された肺腺癌の1例

西山 聖也^a 能勢 直弘^{b,c} 富田 雅樹^c
中村 都英^c 藤田 良佑^a 山口 哲朗^a

要旨：ROS1融合遺伝子陽性非小細胞肺癌に対してクリゾチニブ (crizotinib) が承認され、RT-PCR法を原理としたROS1融合遺伝子検出キットが承認されている。解析試料のRNAは保存期間が長期に及ぶと分解が進むことが多いため、できるだけ新鮮な検体を用いることが推奨されている。今回、我々は皮膚生検病変からROS1融合遺伝子陽性非小細胞肺癌の転移と診断された症例で、14年前に行われた肺癌手術検体を用いてROS1融合遺伝子陽性を証明できた症例を経験したので報告する。

キーワード：ROS1融合遺伝子陽性非小細胞肺癌，肺腺癌，クリゾチニブ

ROS1 fusion gene-positive non-small cell lung cancer (ROS1 fusion gene-positive NSCLC), Lung adenocarcinoma, Crizotinib

緒 言

ROS1融合遺伝子陽性非小細胞肺癌に対してクリゾチニブ (crizotinib) が承認され、コンパニオン診断薬としてRT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法を原理としたROS1融合遺伝子検出キットが承認されている。ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin fixed paraffin embedded: FFPE) 組織を解析試料に用いる場合、長期間保管されたものではribonucleic acid (RNA) の分解が進んでいることが多いため、できるだけ新しい検体を用いることが望ましいとされている¹⁾。しかし実臨床で本当に古い検体を使用できないのかを確認した報告は検索し得た限り存在しない。今回我々は14年前の手術検体を用いてROS1融合遺伝子を証明できた症例を経験したので報告する。

症 例

患者：70歳，男性。

主訴：右背部痛。

既往歴：右上葉肺腺癌術後 [56歳 acinar adenocarci-

noma, pT1bN0M0, Stage IA2 (「肺癌取扱い規約」第8版)]，2型糖尿病，糖尿病性腎症。

生活歴：喫煙60本/日×33年 (53歳で禁煙)。

現病歴：20XX年3月頃から右背部の腫瘤を自覚するようになり、同年7月に近医皮膚科を受診し、悪性腫瘍が疑われたため当院皮膚科へ紹介された。腫瘤の生検病理組織所見で、印環細胞癌の皮膚転移と診断された。上・下部消化管内視鏡検査を施行されたが、原発巣は認められなかった。肺癌の術後転移再発を疑われて当科へ紹介となった。

初診時現症：身長162cm，体重67.5kg，体温36.8℃，血圧156/89mmHg，脈拍83回/min・整，SpO₂98% (室内気)，呼吸数12回/min。眼瞼結膜蒼白なし，呼吸音清，心音整・雑音なし，腹部圧痛なし，脊椎叩打痛なし，浮腫なし。右背部に12cm大の腫瘤あり (Fig. 1)。右腋窩に弾性硬の母指頭大リンパ節1個触知する。

血液検査所見 (Table 1)：白血球9,760/μLと増加を認め、CRP 1.13mg/dLと軽度上昇していた。アルブミンは軽度低下しており、血糖 (随時) およびHbA1c (NGSP) はいずれも軽度高値を認めた。腎機能障害を認めた。腫瘍マーカーはCEA, CYFRAはいずれも基準範囲内であったが、ProGRPは軽度高値であった。

画像所見：造影CTで右胸膜に複数の結節を認め、右腋窩リンパ節腫大、右背部皮下に不均一に造影される腫瘤を認めたが、肺野には異時性原発性肺癌を疑う所見を認めなかった (Fig. 2a, b)。FDG-PETではCTで認めた病変すべてに異常集積を認めた。頭部造影MRIでは明ら

連絡先：西山 聖也

〒882-0835 宮崎県延岡市新小路2-1-10

^a 宮崎県立延岡病院内科

^b 同 呼吸器外科

^c 宮崎大学医学部外科学講座

(E-mail: nishisei_med@yahoo.co.jp)

(Received 7 Dec 2019/Accepted 14 Feb 2020)

Table 1 Laboratory findings

Hematology		Biochemistry		Tumor markers	
WBC	9,760/ μ L	TP	7.4 g/dL	CEA	2.0 ng/mL
Neutro	68.2 %	Alb	3.51 g/dL	CYFRA	3.3 ng/mL
Lympho	20.2 %	BUN	19.6 mg/dL	ProGRP	82.8 pg/mL
Eosino	1.6 %	Cre	1.89 mg/dL		
Mono	9.7 %	AST	17 U/L		
Hb	16.4 g/dL	ALT	10 U/L		
Plt	20.3×10^4 / μ L	LDH	195 U/L		
		ALP	244 U/L		
Serology		γ -GTP	56 U/L		
CRP	1.13 mg/dL	Glu	119 mg/dL		
		HbA1c	6.5 %		
Coagulation		Na	140 mmol/L		
PT%	86.6 %	K	4.6 mmol/L		
PT-INR	1.08	Cl	103 mmol/L		
APTT	27.4 sec	Ca	9.9 mg/dL		



Fig. 1 A mass on the right side of the back.

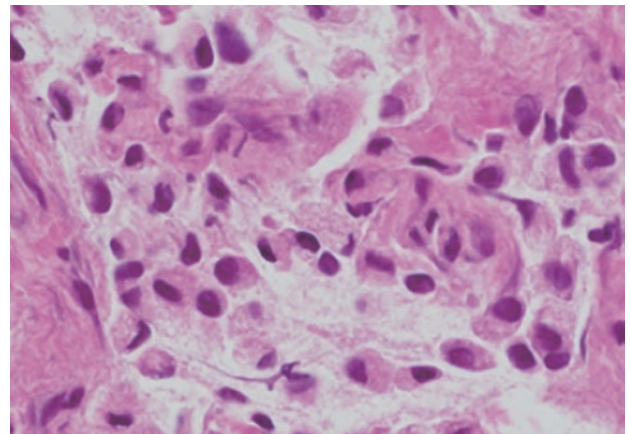


Fig. 3 The pathological image of back tumor biopsy with signet ring cells [hematoxylin-eosin (HE) staining].

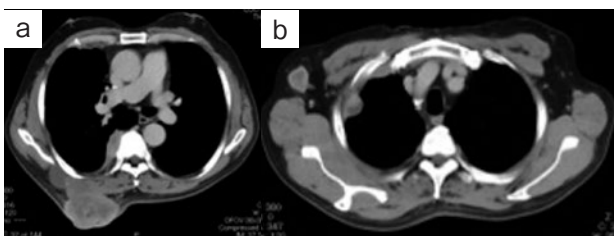


Fig. 2 Contrast-enhanced CT. (a) A nonuniformly contrasting tumor on the right side of the back. (b) Right axillary lymphadenopathy. (a, b) Multiple nodules in the pleura.

かな転移巣を認めなかった。

臨床経過：右背部腫瘍の生検病理組織は、hematoxylin-eosin (HE) 染色で印環細胞を認め、免疫染色でTTF-1 およびNapsin A陽性、cytokeratin 7およびCEAも陽性であり肺腺癌による転移と考えた (Fig. 3)。RT-PCR法で*ROSI*融合遺伝子陽性であり、*EGFR* 遺伝子野生型、

*ALK*転座陰性、PD-L1 tumor proportion score 1~24%であった。14年前に右上葉肺腺癌に対して手術を受けており、保存検体を調べたところ、HE染色で印環細胞、mucinous cribriform patternを認め (Fig. 4)、RT-PCR法で*ROSI*融合遺伝子陽性であった。肺癌術後の少なくとも5年間は再発所見がなかったことを当時の読影レポートで確認できたが、今回、肺野には明らかな異時性原発性肺癌の所見を認めなかったこと、胸膜播種病変を認めたこと、希少な*ROSI*融合遺伝子を両検体に認めたことから、14年前の肺癌術後胸腔内再発および皮膚転移と診断した。

肺腺癌術後再発としてクリゾチニブ500mg/日を開始した。経過中に腎機能悪化があり、200mg/日に減量したが、6ヶ月後の治療効果判定で部分奏効を認めている。

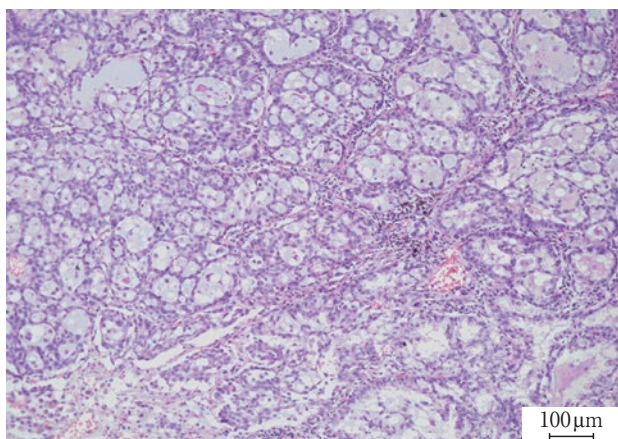


Fig. 4 The pathological image of a surgical specimen 14 years ago with mucinous cribriform pattern (HE staining).

考 察

*ROS1*蛋白質は細胞増殖および分化に関わる癌原遺伝子受容体型チロシンキナーゼであり、*ROS1*融合遺伝子は*EGFR*遺伝子変異、*ALK*融合遺伝子、*BRAF*遺伝子変異などと同様に肺癌の重要なドライバー遺伝子となっている。ただしその検出頻度は低く、非小細胞肺癌の1~2%と報告されている¹⁾。*ROS1*融合遺伝子陽性肺癌の病理所見では病理亜型として印環細胞やmucinous cribriform patternを有するsolidタイプが多いとされている²⁾³⁾。本例でも手術検体、今回の皮膚組織検体両者で同様のHE染色病理所見が確認された。

一般に非小細胞肺癌は切除術後5年間の無再発で治癒と判断されるが、Maedaら⁴⁾は根治的外科切除術819例のうち、87例(11%)で術後5年以降の再発を認めたことを報告しており、肺癌は術後遠隔期においても再発があり得ることを考慮すべきである。我々は根治手術14年後に再発した*ROS1*融合遺伝子陽性肺癌を経験したが、希少ドライバー遺伝子変異陽性肺癌の遠隔期再発に関して松本ら⁵⁾は根治術後22年目に胸壁再発をきたした*ALK*融合遺伝子陽性肺癌を報告し、二次性肺癌と再発肺癌の鑑別に有用であった症例を報告している。またSonodaら⁶⁾は根治切除後再発した476例中、15年以上経過してから再発した2例についてはいずれも*ALK*融合遺伝子陽性腺癌であったことを報告しており、希少ドライバー遺伝子変異陽性肺癌の根治術後遠隔期における再発が臨床的に問題になることは少なくないと考えられた。

*ROS1*融合遺伝子陽性肺癌に対するクリゾチニブのように、ドライバー癌遺伝子を有する肺癌では有効な分子標的治療薬が存在することから、組織による遺伝子診断が治療方針決定のうえできわめて重要である。しかしな

がら組織生検は侵襲を伴うため、腫瘍の部位や患者状態によっては容易に施行できない場合も多い⁷⁾⁸⁾。したがって、すでに得られている検体で診断がつくのであれば、保存検体でも利用したいという場合は多い。

今回、*ROS1*解析についてはRT-PCR法(AmoyDx社)を用いたが、LC-SCRUM-Japanではnext generation sequencingに対するRT-PCR法(AmoyDx社)の陽性一致率(感度)は95.2%、陰性一致率(特異度)は99.7%であったと報告されている¹⁾。RT-PCRでは検体中のRNAを鋳型として逆転写酵素によってcomplementary deoxyribonucleic acid(cDNA)を合成し、cDNAに対してPCRを行うことで目的とする標的遺伝子配列を増幅させて検出する⁹⁾。そのため、使用検体の核酸保存状態が解析結果の信頼性に影響する。

*ROS1*解析に用いる試料のホルマリン固定については10%中性緩衝ホルマリン溶液を用い、固定時間については手術検体で18~36時間、生検検体で4~24時間と推奨されており¹⁰⁾、7日以上長時間固定はDNA、RNAともに品質が著しく低下し解析不能となる¹⁾が、本例の肺癌手術検体は当時の病理伝票から固定時間は48時間以内であったことが判明した。固定に使用していたホルマリンは20%中性緩衝ホルマリンであったことも判明したが、10%よりも20%ホルマリンの方が、RNase(ribonuclease)が完全に失活するなどの理由でRNA分解が少ないとの見解もある¹¹⁾。実臨床では他のドライバー癌遺伝子検索も考慮するとRNA解析用のみ20%ホルマリンで固定したFFPEを作成することは現実的ではないが、本例では20%ホルマリンで固定していたことが長期保存検体で*ROS1*解析できた一因である可能性が考えられた。

*ROS1*解析のためにFFPE組織を用いる際には、長期間(3年以上)保管されたものではDNA、RNAの分解が進んでいることが多いため、できるだけ新しい検体を用いることが望ましいとされている¹⁾。非小細胞肺癌110例のRNAを用いた融合遺伝子パネル解析において、解析実施年から4年以上経過したFFPE検体では解析成功率は81.8%、3年以内の検体では96.6%、解析実施年の検体では100%であったと報告されている¹⁰⁾。一方、10年以上経過したFFPE組織でも核酸解析が可能であったとする研究も存在し、解析方法によっては40年以上前のFFPE組織から抽出された核酸でも使用できるという報告もある¹²⁾¹³⁾。これらの知見から長期保存FFPE検体におけるRT-PCR法では*ROS1*融合遺伝子が陰性であった場合には偽陰性なのか真の陰性なのか判断はできないが、陽性と診断された場合の信頼性は高いと考えられる。本例のみで一般化はできないものの、同様の症例が集積されれば、特に再生検困難な例においては長期保存FFPE検体を使用したドライバー癌遺伝子検索も許容される可能性

があることが示唆された。

以上、遠隔期術後再発を生じた肺腺癌で、14年前に行われた手術検体を用いて *ROS1* 融合遺伝子陽性を証明できた症例を経験した。

本研究の論旨は、第82回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部春季学術講演会（2019年3月、宮崎）で発表した。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して申告なし。

引用文献

- 1) 日本肺癌学会 バイオマーカー委員会. 肺癌患者における *ROS1* 融合遺伝子検査の手引き 第1.0版. 2017.
- 2) Takeuchi K, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18: 378-81.
- 3) Yoshida A, et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying *ROS1* rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol* 2014; 27: 711-20.
- 4) Maeda R, et al. Late recurrence of non-small cell lung cancer more than 5 years after complete resection: incidence and clinical implications in patient follow-up. *Chest* 2010; 138: 145-50.
- 5) 松本大資, 他. 肺葉切除22年後に胸壁転移を認めた *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌の1例. *肺癌* 2016; 56: 1046-50.
- 6) Sonoda D, et al. Ultra-late recurrence of non-small cell lung cancer over 10 years after curative resection. *Cancer Manag Res* 2019; 11: 6765-74.
- 7) Nosaki K, et al. Re-biopsy status among non-small cell lung cancer patients in Japan: a retrospective study. *Lung Cancer* 2016; 101: 1-8.
- 8) Yoon HJ, et al. Repeat biopsy for mutational analysis of non-small cell lung cancers resistant to previous chemotherapy: adequacy and complications. *Radiology* 2012; 265: 939-48.
- 9) 平間 崇. PCR, RT-PCR, real-time PCR. *呼吸* 2013; 32: 1047-52.
- 10) 日本病理学会. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 初版. 2018.
- 11) 日本病理学会. ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程. 2016.
<http://pathology.or.jp/genome/> (accessed on January 31, 2020)
- 12) Schweiger MR, et al. Genome-wide massively parallel sequencing of formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues for copy-number- and mutation-analysis. *PLoS One* 2009; 4: e5548.
- 13) Ludyga N, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch* 2012; 460: 131-40.

Abstract

A case of lung adenocarcinoma in which the *ROS1* fusion gene was detected in a lobectomy specimen stored for 14 years

Seiya Nishiyama^a, Naohiro Nose^{b,c}, Masaki Tomita^c, Kunihide Nakamura^c,
Ryosuke Fujita^a and Tetsuro Yamaguchi^a

^aDepartment of Internal Medicine, Miyazaki Prefectural Nobeoka Hospital

^bDepartment of Thoracic Surgery, Miyazaki Prefectural Nobeoka Hospital

^cDepartment of Thoracic and Breast Surgery, Faculty of Medicine, University of Miyazaki

Crizotinib was approved for *ROS1* fusion gene-positive non-small cell lung cancer, and a *ROS1* fusion gene detection kit based on the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was approved to detect the *ROS1* fusion gene. It is recommended that a fresh specimen be used because the RNA present in the analysis sample often degrades when stored over a longer period.

A 70-year-old man who underwent right upper lobectomy for lung adenocarcinoma 14 years previously was referred to us for detailed examination of a mass on the right side of the back. Biopsies of the tumor confirmed a diagnosis of metastatic *ROS1* fusion gene-positive non-small cell lung cancer, and a lung cancer surgical specimen collected 14 years earlier was revealed to be *ROS1* fusion gene-positive. We report a case in which an existing lesion confirmed late recurrence of lung adenocarcinoma for which he had received surgery many years earlier.