



〈特集：シンポジウム（第33回年次学術集会より）〉

## 固形癌関連の遺伝子検査 ーがんゲノム医療と核酸品質ー

安倍 秀幸<sup>1)</sup>、河原 明彦<sup>1)</sup>、井上 賢二<sup>2)</sup>、川野 祐幸<sup>2)</sup>、内藤 嘉紀<sup>2)</sup>、  
秋葉 純<sup>1)</sup>

### Genetic Testing for Solid Tumors -Genomic Medicine and Nucleic Acid Quality-

Hideyuki Abe<sup>1)</sup>, Akihiko Kawahara<sup>1)</sup>, Kenji Inoue<sup>2)</sup>, Hiroyuki Kawano<sup>2)</sup>,  
Yoshiki Naito<sup>2)</sup>, Jun Akiba<sup>1)</sup>

**Summary** In cancer genomic medicine, cancer genomic profiling is performed using next-generation sequencing, which can simultaneously analyze many genes in tissue and cell samples of patients with cancer. Next-generation sequencing analysis can indicate which drug is most appropriate. Core and cooperative hospitals have been established throughout our country to provide genomic cancer medicine to patients with cancer. However, pathology samples are handled in many different ways in the clinical setting; therefore, it is important to understand the appropriate preanalytical techniques. As pathology medical technologists process many tissue and cell samples, it is essential to understand the importance of sample quality control in genetic testing.

**Key words:** Cancer Genomics, Cancer Genomic Profiling, Solid carcinoma, Molecular Target, Nucleic Acid Quality

#### I. はじめに

1990年代後半より、個別化医療（テーラーメイド医療）が注目され始め、低分子化合物を用いた抗体療法や遺伝子治療などの創薬研究が進

められてきた。その後、分子標的治療は様々な解析手法が発展し、それに合わせ新たな薬剤の開発が行われ始めた<sup>1)</sup>。分子標的治療薬は標的となる癌細胞に対して作用するが、がん細胞の遺伝子異常は単一のものではなく、複数の遺伝

<sup>1)</sup> 久留米大学病院 病理診断科・病理部

<sup>2)</sup> 久留米大学病院 臨床検査部

〒830-0011 福岡県久留米市旭町67

Department of Diagnostic Pathology, Kurume University Hospital

67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka, 830-0011, Japan

連絡先：安倍秀幸

久留米大学病院 病理診断科・病理部

Tel：+81-942-31-7651

E-mail: abe\_hideyuki@kurume-u.ac.jp

子異常が関与していることが把握されている。そのため2000年代には、相補的DNA (complementary DNA: cDNA) アレイなどを用いた遺伝子解析により効率的に遺伝子の変化を捉える手法が研究されてきた<sup>2)</sup>。これらの技術開発により、2004年には手術不能、または再発非小細胞肺癌においてEGFR-TKIの効果予測としてEGFR遺伝子変異が報告されたのを契機にALK陽性肺癌、ROS1陽性肺癌など、さまざまなドライバー遺伝子変異や転座に対するコンパニオン診断が行われるようになった<sup>3) 4)</sup>。さらに2018年には、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer:NGS) を用いたがんゲノムプロファイリングが承認され、治療のターゲットとなるドライバー遺伝子の解析が可能となり、がんゲノム医療が推進されることとなった。

## II. がんゲノム医療と遺伝子パネル検査

### 1. CGP 検査の実施状況

包括的がんゲノムプロファイリング検査 (comprehensive genomic profiling; CGP) として遺伝子パネル検査があるが、固形がんにおけるCGP検査は、Foundation One<sup>®</sup> Companion diagnostics (CDx)、Foundation One<sup>®</sup> Liquid CDx、Onco Guide<sup>™</sup>NCCオンコパネルなどが保険収載されている。治療対象となる固形がんは、肺がん、乳がん、皮膚がんなど特定の臓器や組織に塊として認められる充実性の癌、いわゆる固形がんであり、造血器系の腫瘍とは区別されている。

がんゲノム医療の対象となる患者は ①標準治療がない固形がん患者、②局所進行がんもしくは転移性がんがあり、標準治療が終了もしくは終了見込みの固形がんの患者が対象となる。この患者が、次の新たな薬物療法を希望する場

合には、全国のがんゲノム医療中核拠点病院 (13施設)、がんゲノム医療拠点病院 (32施設) やがんゲノム医療連携病院 (202施設) (令和5年4月1日現在) でCGP検査を行い、その結果に基づいた治療が受けられる<sup>5)</sup> (Table.1)。現在、当院はがんゲノム医療拠点病院に指定されて活動している。CGP検査を保険診療で行う際には個人が特定されない形で臨床情報が付随した遺伝子パネル検査情報がC-CAT (がんゲノム情報管理センター) に集約・統合され、C-CAT調査結果として中核拠点病院、拠点病院に報告される。CGP検査は解析結果が得られたのちに中核拠点病院、拠点病院においてエキスパートパネルを開催する必要があり、連携病院はいずれかの中核拠点病院、拠点病院のエキスパートパネルに参加する必要がある<sup>6)</sup>。エキスパートパネルとは主治医をはじめとする、がん薬物療法を行う専門医師、遺伝医学を専門とする医師、がんゲノム医療の専門家、病理医、遺伝カウンセラーなど多種にわたる専門家により構成されている。これらのエキスパートパネルで得られた結果を参考にして患者へ治療方針が説明される。

### 2. 固形癌におけるコンパニオン診断

コンパニオン診断は2013年厚生労働省より、「特定の医薬品の有効性及び安全性の確保を目的として使用される診断薬・医療機器のうち、当該医薬品の投与にあたり、必要不可欠なもの」とされ、薬剤の効果とともにその検査の有効性が検証された検査法である<sup>7)</sup>。

臓器特異的には肺がんが代表的なEGFR遺伝子変異などがあり、その他にも大腸がんのKRAS、NRAS野生型、乳がん、胃がんのHER2遺伝子増幅陽性などがあり、臓器横断的には固形癌に対するNTRK融合遺伝子や高頻度マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability:

Table 1 がんゲノム医療における中核拠点病院、医拠点病院の役割 (2023年4月現在の施設数) 文献<sup>5)</sup> 引用改版

	中核拠点病院 (13施設)	拠点病院 (32施設)	連携病院 (202施設)
役割	臨床研究・治験の実施 新薬等の研究開発 人材育成 エキスパートパネルの開催	エキスパートパネルの開催 治療機会の提供	遺伝子パネル検査による医療を中核拠点・拠点病院等と連携しエキスパートパネルを依頼

MSI)、腫瘍遺伝子変異量高スコア (Tumor Mutational Burden High Score: TMB-High) などがある。CGP検査として実施されるオンコマイン™ Dx Target Test (以下オンコマイン™DX) は、医薬品と紐づいた遺伝子変異が検査結果として確認できれば治療に用いることが可能である。Foundation One® CDx、Onco Guide™ NCCオンコパネルについても検査の中で遺伝子変異が確認できればエキスパートパネル後に紐づいた治療薬が患者に用いられている<sup>5) 8)</sup> (Table.2)。

CGP検査に用いられる検査材料としてホルマリン固定パラフィン包埋組織 (formalin fixed paraffin embedded; FFPE) があるが、最近では胸水セルブロックなどの細胞診材料も応用可能であるとの報告もなされている<sup>9)</sup>。現時点でのCGP検査は、組織検体をホルマリンで固定しFFPEブロックとして標本作製し、検査を進めることが想定されているが、肺癌ではオンコマイン™ Dxを行う際、胸水などの体腔液より細胞ペレットを作製する場合がある。しかし、細胞ペレットは有核腫瘍細胞の腫瘍含有率が分かり難い点もあり、細胞標本などで胸水中におけ

る腫瘍細胞の確認を遺伝子検査と併用して行うのが良いと考えられる。肺がんのCGP検査であるオンコマイン™ Dxや肺がん遺伝子PCRパネルを用いたAmoy Dx®肺癌マルチ遺伝子PCRパネル (以下Amoy Dx®) は、複数遺伝子を同時に検出可能であり、さらにエキスパートパネルを開催する必要はなく、シングルプレックス検査ほどではないが比較的TAT (Turn Around Time) は短い。よって現状では遺伝子検査は、臨床医が患者の状態および治療状況に応じてCGPのマルチプレックス検査もしくは遺伝子パネルPCRシングルプレックス検査を行うか判断している状況にある。特に肺癌は、病勢が進みやすい場合もあり、非小細胞性肺癌を中心にEGFR遺伝子変異、ALK融合遺伝子、ROS1融合遺伝子、BRAFV600EおよびV600K変異、NTRK1/2/3融合遺伝子、MET遺伝子エクソン14スキッピング変異などの遺伝子変異がみられた際、患者にコンパニオン診断薬を使用する判断材料として、これらの遺伝子検査が行われている状況にある。

Table 2 Foundation One® CDxがんゲノムプロファイリングに紐づく分子標的薬剤 文献<sup>8)</sup> 引用

遺伝子変異など	がん腫	関連する医薬品
活性型EGFR遺伝子変異	非小細胞肺癌	アファチニブ, エルロチニブ, ゲフィチニブ, オシメルチニブ, グコミチニブ
EGFRエクソン20 T790M変異		オシメルチニブ
ALK融合遺伝子		アレクチニブ, クリゾチニブ, セリチニブ, プリグチニブ
ROS 1 融合遺伝子		エヌトレクチニブ
MET遺伝子exon14スキッピング変異		カブマチニブ
BRAFV600E及びV600K変異	悪性黒色腫	ダブラフェニブ, ترامチニブ, ベムラフェニブ, エンコラフェニブ, ビニメチニブ
ERBB2コピー数異常(HER2遺伝子増幅陽性)	乳癌	トラスツズマブ
KRAS/NRAS野生型	結腸・直腸癌	セツキシマブ, パニツムマブ
高頻度マイクロサテライト不安定性		ニボルマブ
高頻度マイクロサテライト不安定性	固形癌	ベムプロリズマブ
腫瘍遺伝子変異量高スコア		ベムプロリズマブ
NTRK1/2/3融合遺伝子		エヌトレクチニブ, ラロトレクチニブ
BRCA1/2遺伝子変異	卵巣癌	オラパリブ
BRCA1/2遺伝子変異	前立腺癌	オラパリブ
FGFR2融合遺伝子	胆道癌	ペミガチニブ

### Ⅲ. がんゲノム医療における病理検体の 取り扱いと品質管理

がんゲノム検査を行う際には、病理検体の取り扱いと品質管理がパネル検査の成功の要因の一つとなる。当院では検査の成功率を向上させる取り組みとして臨床検査技師が携わる検体取り扱い業務の標準化を図り、またがんゲノム検査の理解を高めるため、がんゲノム医療コーディネーターの資格を2名、認定病理技師の資格を1名が取得しており、日常の病理検体取り扱いの教育を行っている。さらにがんゲノム拠点病院においてはエキスパートパネルを開催することが義務付けられているが、この院内で開催されるエキスパートパネルにがんゲノム医療コーディネーターを取得した病理部門の臨床検査技師が参加している。

マルチプレックス検査やシングルプレックス検査などの遺伝子検査では、FFPEにより作製された組織ブロックの品質の程度により、検査結果に影響を及ぼすことが報告されている<sup>10)</sup>。病理検体の取り扱い不備による核酸品質への影響を少なくする必要があるが、実臨床においては、様々な職種により取り扱われており、それぞれが適切な検体の取り扱い(プレアナリシス)を理解することが重要である。プレアナリシスは固定前プロセス、固定プロセス、固定後プロセスの3段階がある。

固定前プロセスは、主に臨床医、看護師や検体搬送者が関与する。摘出臓器は手術などの操作により臓器の血流が停止し、摘出までの温虚

血時間、摘出から固定までの冷虚血時間があり、これらは前述の医療従事者が主に関わることとなる。DNA、RNAなどの核酸品質の低下は、この時間が長くなるほど大きくなるといわれている<sup>10)</sup>。臓器摘出後は自己融解を防ぐために直ちに4℃以下の冷蔵を開始するか、速やかにホルマリン固定を行うことが肝要である。対して生検検体は手術検体と比較して小さく、速やかに固定されることが多いため固定前プロセスの影響は比較的低い。組織の過固定も核酸品質に影響するため採取された組織は直ちに病理検査室に提出するのが望ましい<sup>5)</sup> (Table.3)。

固定プロセスは、10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定を行うことが推奨されている。この固定プロセスは主に臨床医、病理医および病理技師が関与する。摘出された臓器が大きい場合は、ホルマリンが腫瘍内部まで浸透せず未固定になるのを防ぐため、ホルマリンを入れた注射針付きシリンジを用いてホルマリンを注入する、もしくは組織に割を入れホルマリンが浸透しやすくするなどの工夫が必要である。その際に正常組織と腫瘍組織の固定による収縮に差が生じ、断面が膨隆するような変化がみられるため、組織の切り出しの際には臓器のオリエンテーションを把握することが肝要である。また組織の過固定は、核酸に影響を与えるため、とくに検体の切出し処理までの時間の管理は重要である。固定時間が48時間を過ぎた頃より、シトシンが加水分解を伴う脱アミノ化によりウラシルに置換され、その後のPCR反応においてチミンの生成 (C>T置換) が増加し、結果に影響

Table 3 病理検体取り扱い工程と主な影響因子 文献<sup>5)</sup>より引用改版)

プレアナリシスの工程	工程の主な担当	影響因子
固定前プロセス	臨床医 (検体採取医) 看護師など	・血流停止から摘出までの時間 (温虚血時間) ・摘出から固定までの時間 (冷虚血時間) ・組織の大きさ
固定プロセス	(臨床医) 病理医 病理技師	・ホルマリン固定液の組成や濃度、pH ・ホルマリン固定の時間や温度 ・ホルマリン固定時の固定液容量と組織量の比率 ・固定液の組織浸透法 (浸漬、注入など)
固定後プロセス	病理医 病理技師	・組織プロセッサのタイプおよび機器試薬の交換頻度 ・脱水、透徹条件 (試薬の種類、温度、時間など) ・パラフィン浸透条件 (パラフィンの種類、温度、時間など) ・薄切切片の乾燥温度、時間 ・薄切時のコンタミネーション (水、替刃、筆など)



響を及ぼすことが知られている<sup>10)</sup>。当院においてはホルマリン固定時間の管理を行うため、組織検査依頼時に依頼用紙に固定開始時間を記入できるように用紙のレイアウト変更を行い固定時間の管理を行っている。また生検および切除例に関わらず、週末や年末年始など長期休業がある場合、固定時間を延長させないための対策として、休日の包埋作業も行っている。

固定後プロセスは組織の切出し作業を行う病理医、病理技師が主に担当する。ここでは実際の標本作製が対象となるため、精度管理や試薬管理が重要となる。遺伝子検査に用いる病理検体のうち脱灰処理が必要な場合は、核酸品質の低下を防ぐため酸性脱灰液は使用せず、中性脱灰液 (EDTA) などを用いるようにする。やむを得ず酸性脱灰液を使用する場合は、脱灰前に遺伝子検査用に必要な量の組織をあらかじめ別途確保しておくことが必要である。また組織プロセッサについては、試薬交換時に関して記録を残して管理を行うのが望ましい。作業に使用している試薬の品質を保つためには定期的なプロセッサの試薬交換は必須である。また薄切から切片貼付に至る工程においては、使用する替刃、筆、水などによる組織片や細胞などへのコンタミネーションの影響を受けるため細心の注意が必要である。

病理検体を用いた遺伝子検査は、精度の高い検査となり、臨床では積極的に治療に応用されている。今後、遺伝子検査の成功率を維持するためには、病理検体を取り扱う際のプレアナリシスの品質管理を確実に行っていくことが重要であり、これらは臨床と病理が協力し合うチーム医療が重要であると考えられる。

#### IV. 最後に

ここまで固形癌関連の遺伝子検査について、がんゲノム医療の実装と病理検体のプレアナリシスについて概説した。がんゲノム医療におけるコンパニオン診断薬が、開発される中で、固形癌の遺伝子検査に対する重要性は大きくなってきている。これらの遺伝子検査は、病理部門に所属する臨床検査技師がFFPEブロックを用いて作製する検体の品質と核酸の収量が大きく影響する。病理検体のプレアナリシスについて、

日本病理学会より「ゲノム診療用病理検体取り扱い規定」、日本臨床細胞学会より「がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針」などが提言され、病理検体の取り扱いについての重要性が明記されている。とくに病理に携わる臨床検査技師は、多くの組織・細胞検体を取り扱うため遺伝子検査における病理検体の品質管理の重要性を理解する必要がある。CGP検査において検体追加・再提出によるTATの遅延や検査中止は少なからず患者に影響が生じる。今後はがんゲノム医療を臨床と病理の双方が理解することが重要である。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

#### 文献

- 1) 鶴尾 隆：がんの分子標的療法.最新医学,6: 7-11, 2001.
- 2) 西尾和人、小泉史明、芥川 成他：がんの化学療法. 最新医学,56: 19-29, 2001.
- 3) Paez IG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304: 1497-1500, 2004.
- 4) 市原英基：肺癌診療アップデート：分子標的治療. 肺癌, 61: 377- 382, 2021.
- 5) 南 優子：病理と癌ゲノム医療. 肺癌, 61: 887-892, 2021.
- 6) 織田克利：がんゲノム医療（プレジジョンメディシン）. 神経治療, 39：495-499, 2001.
- 7) 厚生労働省：コンパニオン診断薬等及び関連する医薬品の承認申請に係る留意事項について. 2013.
- 8) 中外製薬：Foundation One<sup>®</sup> CDx がんゲノムプロファイル添付文書 第18版, 2023.
- 9) Ramani NS, Chen H, Broaddus RR, Lazar AJ, Luthra R, Medeiros LJ, Patel KP, Rashid A, Routbort MJ, Stewart J, Tang Z, Bassett R, Manekia J, Barkoh BA, Dang H, Roy-Chowdhuri S: Utilization of cytology smears improves success rates of RNA-based next-

- generation sequencing gene fusion assays for clinically relevant predictive biomarkers. *Cancer Cytopathol*,129:374-382,2021.
- 10) 日本病理学会編；ゲノム診療用病理組織検体取り扱い規定 初版, 日本病理学会, 東京 (2018) .
- 11) Do H, Dobrovic A: Sequence artifacts in DNA from formalin fixed tissues: cause and strategies for minimization. *Clin Chem*, 61: 64 – 71, 2015.