



がん遺伝子パネル

市川 仁[†]

IRYO Vol. 74 No. 4 (181-186) 2020

【キーワード】次世代シーケンサー，ターゲットシーケンス，治療選択，診断，融合遺伝子

はじめに

がんに関わる数十～数百の遺伝子の異常を，次世代シーケンサー（next-generation sequencing：NGS）技術を用いて一度に調べる検査を，がん遺伝子パネル検査と呼ぶ。2019年6月に2種類のがん遺伝子パネル検査が保険適用となり，わが国でがん遺伝子パネル検査の実臨床における運用が開始された。これらに加えて先進医療として実施されてきた検査もあり，今後さらに新たな検査も利用可能になると予想される。

がん遺伝子パネル検査

NGS技術の開発・進化により，多くの遺伝子の異常を一度に，比較的安価に調べられるようになり，ゲノム情報を医療に用いることが可能な時代になった。研究においては，全ゲノムや全エクソンの解析が行われることが多いが，臨床に用いる検査としては，疾患に関わる数十～数百遺伝子のみを解析するターゲットシーケンス解析が用いられることが多い。検査コストを抑えられることが理由の一つである。また，がんの検査としては，解析する領域を減らすことで同じ場所を数百回以上読み取ることが可

能となり，病理診断で使われるホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体のような低品質の検体や，腫瘍細胞の含有率が低い検体でも検査できることも大きな理由となっている。ターゲットとする数十～数百の遺伝子のセットをパネルと呼び，そのような検査を遺伝子パネル検査と呼ぶ。

がんのための遺伝子パネル検査として，「OncoGuide™ NCCオンコパネルシステム」（以下，NCCオンコパネル検査）と「FoundationOne® CDxがんゲノムプロファイル」（以下，FoundationOne検査）の2種類の検査が，2018年12月に薬事承認を受け，2019年6月に保険収載された。これらの検査は，その結果を薬剤選択に用いることを主な目的としている。NCCオンコパネル検査の搭載遺伝子を，表1に示す。EGFR阻害薬，ALK阻害薬，BRAF阻害薬などの既承認の分子標的治療薬のバイオマーカーとなる遺伝子に加え，開発中もしくは今後開発が期待される分子標的治療薬の奏効に関わると予想される遺伝子が，選択されている。このようながん遺伝子パネル検査を用いると，多数の遺伝子の異常を同時に調べることが可能で，一度の検査で各患者に最も適した治療を選択できるようになると考えられている（図1）。

近年，比較的まれな遺伝子異常ではあるが，

国立がん研究センター研究所 基盤的臨床開発研究コアセンター（FIOC） †基礎研究者
 著者連絡先：市川 仁 国立がん研究センター研究所 基盤的臨床開発研究コアセンター（FIOC）
 〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1

e-mail：hichikaw@ncc.go.jp
 (2019年2月3日受付，2020年4月10日受理)

Cancer Gene Panel Test

Hitoshi Ichikawa, National Cancer Center Research Institute

(Received Feb. 3, 2019, Accepted Apr. 10, 2020)

Key Words：next generation sequencer, targeted sequencing, therapy selection, diagnosis, fusion gene

表1 NCCオンコパネル検査の搭載遺伝子

NCCオンコパネル検査では、114遺伝子の変異と増幅、12遺伝子の融合を検出する。このため、114遺伝子の全エクソン配列と、12遺伝子およびその主なパートナー遺伝子の転座が知られているイントロン配列を、ハイブリッドキャプチャー法により濃縮して解析している。

変異・増幅 (114)				遺伝子融合 (12)	
ABL1	CRKL	IDH2	NF1	RAC2	ALK
ACTN4	CREBBP	IGF1R	NFE2L2/Nrf2	RAD51C	AKT2
AKT1	CTNNB1	IGF2	NOTCH1	RAF1/CRAF	BRAF
AKT2	CUL3	IL7R	NOTCH2	RB1	ERBB4
AKT3	DDR2	JAK1	NOTCH3	RET	FGFR2
ALK	EGFR	JAK2	NRAS	RHOA	FGFR3
APC	ENO1	JAK3	NRG1	ROS1	NRG1
ARAF	EP300	KDM6A/UTX	NTRK1	SETBP1	NTRK1
ARID1A	ERBB2/HER2	KEAP1	NTRK2	SETD2	NTRK2
ARID2	ERBB3	KIT	NTRK3	SMAD4	PDGFRA
ATM	ERBB4	KRAS	NT5C2	SMARCA4/BRG1	RET
AXIN1	ESR1/ER	MAP2K1/MEK1	PALB2	SMARCB1	ROS1
AXL	EZH2	MAP2K2/MEK2	PBRM1	SMO	
BAP1	FBXW7	MAP2K4	PDGFRA	STAT3	
BARD1	FGFR1	MAP3K1	PDGFRB	STK11/LKB1	
BCL2L11/BIM	FGFR2	MAP3K4	PIK3CA	TP53	
BRAF	FGFR3	MDM2	PIK3R1	TSC1	
BRCA1	FGFR4	MDM4	PIK3R2	VHL	
BRCA2	FLT3	MET	POLD1		
CCND1	GNA11	MLH1	POLE		
CD274/PD-L1	GNAQ	MTOR	PRKCI		
CDK4	GNAS	MSH2	PTCH1		
CDKN2A	HRAS	MYC	PTEN		
CHEK2	IDH1	MYCN	RAC1		

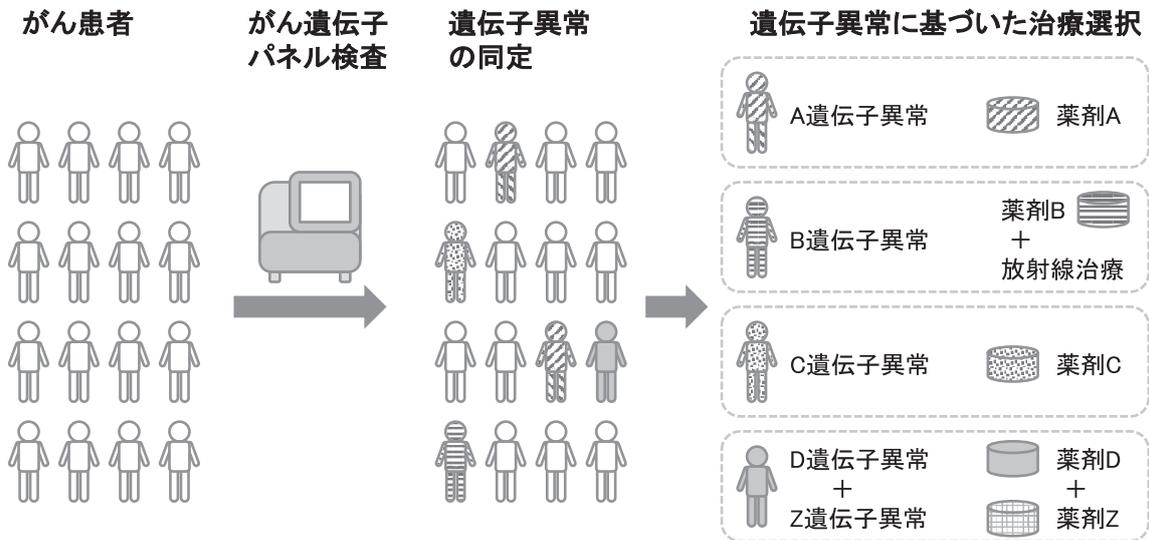


図1 がん遺伝子パネル検査による治療選択

分子標的治療薬は、多くの場合、特定の遺伝子異常を有する腫瘍に対してのみ高い効果を示す。がん遺伝子パネル検査を行ってそれぞれの遺伝子異常を同定することにより、各がん患者に最も適した治療を提供できる。

ALK, ROS1, RET, BRAF, NTRK1/2/3, FGFR1/2/3等の融合遺伝子が、多くのがん種において有効な治療標的として注目されている。また、肉腫や脳腫瘍においては、病型特異的な融合遺伝子が数多く知られており、転移・再発率、予後、薬物治療に対する奏効性にも関わるため、正しく融合遺伝

子を同定して診断することが欠かせない。このような診断補助としてもがん遺伝子パネル検査は有用と考えられており、このような用途には多くの融合遺伝子を一括して調べられる検査が必要となっている。融合遺伝子をどのように、そしてどれだけ検出するかは、がん遺伝子パネル検査の課題となっている。

表2 わが国で使われているがん遺伝子パネル検査の比較

	NCCオンコパネル検査	FoundationOne検査	Todaiオンコパネル検査	Oncomine検査
販売名	OncoGuide™ NCC オンコパネルシステム	FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル	未定	Oncomine™ Target Test システム
使用検体	FFPE腫瘍組織 末梢血	FFPE腫瘍組織	FFPE腫瘍組織 末梢血	FFPE腫瘍組織
使用核酸	DNA	DNA	DNA+RNA	DNA+RNA
NGS	イルミナ社	イルミナ社	イルミナ社	サーモフィッシャー サイエンティフィック社
ターゲット濃縮法	ハイブリッドキャプチャー法	ハイブリッドキャプチャー法	ハイブリッドキャプチャー法	PCR増幅法
対象遺伝子数	114遺伝子	324遺伝子	464遺伝子(DNA) 463遺伝子(RNA)	46遺伝子
TMB推定	可	可	可	不可
MSI評価	不可	可	可	不可
生殖細胞系列 変異同定	可	不可	可	不可

NGS : next-generation sequencer (次世代シーケンサー)
 TMB : tumor mutational burden (遺伝子変異数)
 MSI : microsatellite instability (マイクロサテライト不安定性)

わが国で使われている がん遺伝子パネル

保険収載されたNCCオンコパネル検査とFoundationOne検査に加え、「Todai OncoPanel」(以下、Todaiオンコパネル検査)、「Oncomine™ Target Testシステム」(以下、Oncomine検査)の二つの検査が、わが国で先進医療として実施されてきた。表2に、これらの4種のがん遺伝子パネル検査の特徴をまとめた。なお、Oncomine検査は、NCCオンコパネル検査やFoundationOne検査のような「がんゲノムプロファイリング検査」としては承認されていないが、非小細胞肺癌においてBRAF, EGFR, ALK, ROS1の4遺伝子に対する「マルチプレックスコンパニオン診断薬」として保険収載されている。

1. NCCオンコパネル検査

この検査は国立がん研究センターにおいてわれわれが開発した検査で、FFPE腫瘍組織のDNAと対照正常組織検体として末梢血のDNAを用いる¹⁾²⁾。ハイブリッドキャプチャー法によりターゲット領域を濃縮し、cisCall³⁾というオリジナルのプログラムを用いて、114遺伝子の変異と12遺伝子の融合を検出する。

2. FoundationOne検査

この検査は米国のFoundation Medicine社が開発した検査で、FFPE腫瘍組織のDNAのみを用いる⁴⁾。ハイブリッドキャプチャー法によりターゲット

領域を濃縮し、309遺伝子の変異と36遺伝子の融合／再編成を検出する。

3. Todaiオンコパネル検査

この検査は名前のおり東京大学において開発された検査で、FFPE腫瘍組織のDNAと対照正常組織検体としての末梢血のDNAに加え、FFPE腫瘍組織のRNAも用いる⁶⁾。DNAを用いる検査では464遺伝子を対象として変異とコピー数変化を、RNAを用いる検査では463遺伝子を対象として融合と発現を検出する。多数の遺伝子を解析対象としており、治療選択だけでなく、診断の機能も視野に入れた検査となっている。

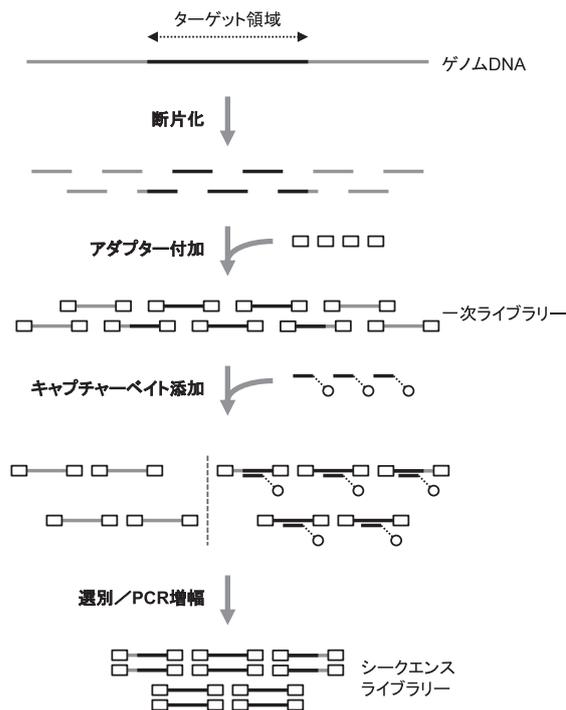
4. Oncomine検査

この検査は、他の三つの検査と異なり、サーモフィッシャーサイエンティフィック社のNGSシステムを用い、PCR増幅によりターゲット領域を濃縮する検査である。FFPE腫瘍組織由来DNAとRNAを用いて、46遺伝子のホットスポット変異と融合を検出する。

パネル検査の機能の違い

上記の各パネル検査に搭載されている遺伝子はそれぞれ異なっているが、それに加えて採用している手法・技術にも違いがあり、それがそれぞれの検査の特徴となっている。

A. ハイブリッドキャプチャー法



B. PCR増幅法

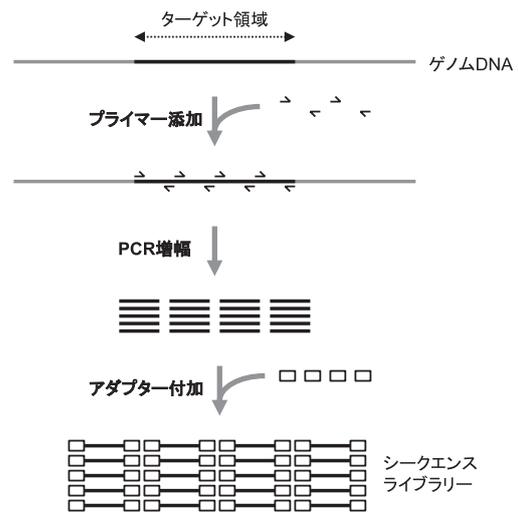


図2 ハイブリッドキャプチャー法とPCR増幅法

NGS解析では、DNAを数百bpの長さに断片化し、両端にアダプターを付けたシーケンスライブラリーを作製する必要がある。ターゲット領域を濃縮したシーケンスライブラリーを作製する方法として、ハイブリッドキャプチャー法とPCR増幅法が用いられる。ハイブリッドキャプチャー法では、合成DNAもしくはRNAをベイトとして用いて、ハイブリッドを形成した分子のみを選別して収集し、ターゲット領域を濃縮する。PCR増幅法では、特異的プライマーを用いたPCRによりターゲット領域を選択的に増幅する。

1. 対照正常検体の利用の有無：

NCCオンコパネル検査とTodaiオンコパネル検査は、腫瘍組織に加え、比較するための対照正常組織検体として末梢血を用いているが、FoundationOne検査とOncomine検査は腫瘍組織のみを検査試料としている。後二者は一塩基多型（SNP）データベース等を用いて変異か多型かを判定しており、体細胞変異と生殖細胞系列変異を厳密には区別できない。近年、免疫チェックポイント阻害剤の奏効バイオマーカーとして、単位DNA長当たりの遺伝子変異数（腫瘍遺伝子変異負荷（tumor mutation burden：TMB））が注目されている。Oncomine検査以外の検査はTMBを算出するが、対照正常検体を用いないFoundationOne検査では、一部の多型を変異と認識してTMBの値が高めにすることが指摘されている。

2. ターゲット領域濃縮法：

遺伝子パネル検査において、約3Gbpに及ぶ全ゲ

ノムDNA配列の中で、ターゲットとなる数十～数百の遺伝子の領域のみを濃縮する必要があり、主に二つの濃縮法が用いられている。合成核酸（DNAもしくはRNA）をベイトとして用いてハイブリダイゼーションによりターゲット領域を集めるハイブリッドキャプチャー法と、特異的プライマーを用いてPCRによりターゲット領域を選択的に増幅するPCR増幅（アンプリコン）法である（図2）。NCCオンコパネル検査、FoundationOne検査、Todaiオンコパネル検査はハイブリッドキャプチャー法を、Oncomine検査はPCR増幅法を用いている。ハイブリッドキャプチャー法では、部分的な相同性でターゲット領域を集めることができるため、ゲノムDNAから融合遺伝子を検出することができるが、PCR増幅法では増幅する領域の両端に特異的なプライマーを設定しなければならないため、転座点が入子中に散在するゲノムDNAから転座点を含む配列を増幅することは事実上不可能である。一方、PCR増幅法は、比較的安価にターゲット領域を濃縮

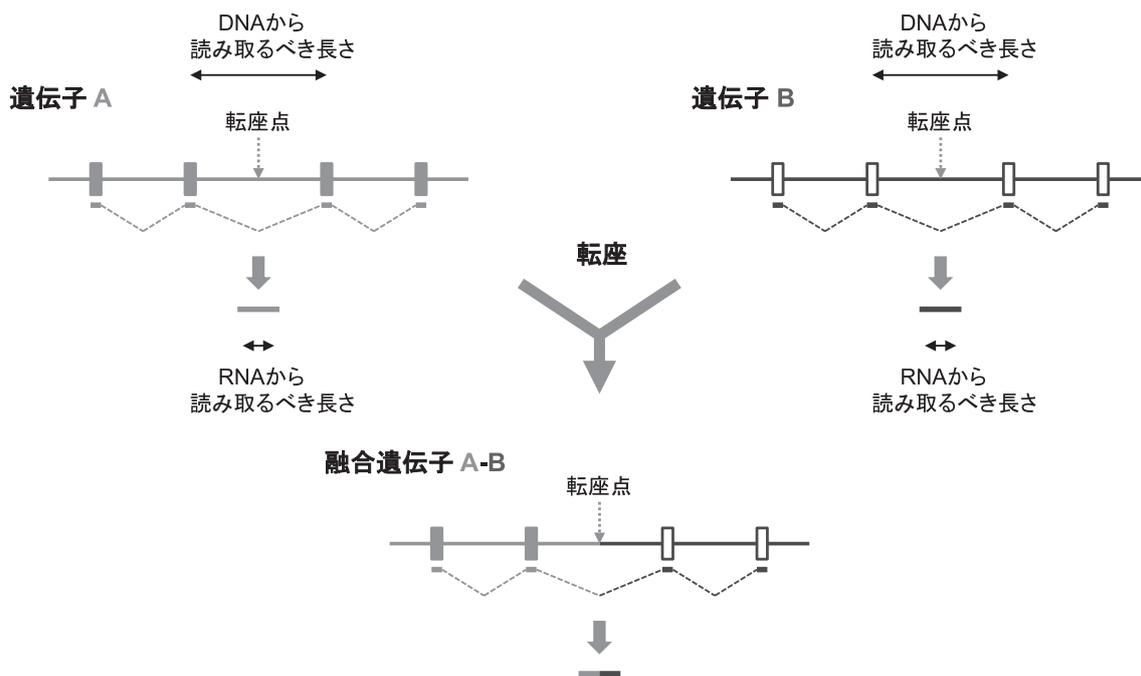


図3 DNAからの融合遺伝子検出とRNAからの融合遺伝子検出

ゲノムの組換え（染色体転座）が二つの遺伝子のイントロン中でおきることにより、融合遺伝子が形成される。mRNA上ではエクソンとエクソンがつながっているため、RNAを用いて融合遺伝子検出を行う場合は、限られた領域のみをキャプチャーして転座点を含むリードを検出すればよい。しかし、DNAを用いて融合遺伝子検出を行う場合は、イントロン領域内のどこでも組換えがおきるため、広いイントロン領域のすべてをキャプチャーしなければならない。

できる利点がある。

3. RNAの利用の有無：

一般にRNAはDNAより分解しやすいため、がん遺伝子パネル検査ではゲノムDNAのみを用いる検査が主流であった。しかし、FFPE検体由来のRNAでも一定レベルの解析が可能なこと、融合遺伝子検出の重要性が増してきたことから、RNAを用いる検査も開発されてきた。上記4種の検査の中では、Todayオンコパネル検査とOncomine検査がRNAも検査試料としている。

ゲノムDNAを検査試料として用いる場合、ハイブリッドキャプチャー法を用いても、多くの融合遺伝子を検出することは困難である。これは、図3に示したように、イントロン中の転座点を検出するためには、時には一つのイントロンだけで100 kbp以上に達する広い領域をキャプチャーして読み取らなければならないからである。実際、NCCオンコパネル検査では、12遺伝子の融合を検出するために解析領域の2/3を使っている。一方、RNAを検査試料とする場合は、mRNA上の組換え部位を検出す

るため、トランスクリプト配列（ゲノム上ではエクソン配列）だけを、さらにいえばエクソンのジャンクション配列だけを読み取ればよい。このため、多数の融合遺伝子の検出にはRNAを用いることが圧倒的に有利である。

● 終わりに

本稿では、固形腫瘍のがん遺伝子パネル検査について紹介した。白血病、リンパ腫等の造血器腫瘍に対しては、異常のみられる遺伝子が固形腫瘍とは大きく異なるため、専用のパネル検査の開発が行われている。造血器腫瘍の診療においてはもともと遺伝子異常に基づく診断・リスク分類の意義が大きいため、この開発中の検査でも診断・リスク分類に関わる遺伝子が多数搭載されている。固形腫瘍を対象とした検査においても、多くの遺伝子を解析対象としたTodayオンコパネル検査が今後薬事承認されることにより、診断・リスク分類を目的とした利用が広がるかもしれない。

著者の利益相反：本論文発表内容に関連して申告なし。

[文献]

- 1) Tanabe Y, Ichikawa H, Kohno T et al. Comprehensive screening of target molecules by next-generation sequencing in patients with malignant solid tumors : guiding entry into phase I clinical trials. *Mol Cancer* 2016 ; **15** : 73.
- 2) Sunami K, Ichikawa H, Kubo T et al. Feasibility and utility of a panel testing for 114 cancer-associated genes in a clinical setting: A hospital-based study. *Cancer Sci* 2019 ; **110** : 1480-90.
- 3) Kato M, Nakamura H, Nagai M et al. A computational tool to detect DNA alterations tailored to formalin-fixed paraffin-embedded samples in cancer clinical sequencing. *Genome Med* 2018 ; **10** : 44.
- 4) Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2013 ; **31** : 1023-31.
- 5) Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 2017 ; **9** : 34.
- 6) Kohsaka S, Tatsuno K, Ueno T et al. Comprehensive assay for the molecular profiling of cancer by target enrichment from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Cancer Sci* 2019 ; **110** : 1464-79.