



血液腫瘍における遺伝子パネル検査

安田 貴彦[†]

IRYO Vol. 78 No. 5 (329–333) 2024

【キーワード】 パネル検査, 次世代シーケンサー, 血液腫瘍

はじめに

従来のシーケンサー（サンガー法）と比較し、塩基の読み取り情報が格段に増えた次世代シーケンサーが2005年頃に登場した。NGS（Next Generation Sequencer：NGS）と呼ばれるこの最新のシーケンサーは当初研究目的で用いられ、血液腫瘍において多くの新規ドライバー変異の発見をもたらした。その結果、血液腫瘍における分子遺伝学的基盤の理解が進み、近年の疾患分類は分子レベルの情報が診断基準として多く取り込まれている。

現在の診療で一般的に用いられている染色体検査であるG分染法・FISH法（Fluorescence in situ hybridization）や遺伝子検査であるRT-PCR法（reverse transcription PCR）ではこうした分子レベルの情報を一部しか得られないため、NGSによるシーケンス解析を診療に応用しようとする動きが盛んになっている。実際、2019年には、再発固形腫瘍を対象に遺伝子パネル検査（解析対象遺伝子をあらかじめ選定してNGSを用いてシーケンスを行う手法）が本邦で保険承認された。本原稿執筆時点では、血液腫瘍に対する遺伝子パネル検査は保険適応にはなっていないが、その準備は少しずつ進んでいる。

本稿では、血液疾患に対するパネル検査の現状を概説する。

パネル検査の原理・流れ

サンプルから抽出したDNAは、シーケンサーが読みとれるようにあらかじめ200–300塩基対（bp）程度に断片化する（図1）。その後、DNAの両端にアダプターと呼ばれる人工的な配列を付加する。シーケンスで読みたい領域と不良な領域を分けるため、相補的なビオチンプロブを用いて解析領域を濃縮し、不要な部分は破棄する（DNAライブラリーの作成）。

実際のシーケンスは、作成したDNAライブラリーをフローセルと呼ばれるガラスに入れて行われる（図1）。DNAの両端に付加されたアダプターは、DNA断片がフローセル上に付着することを可能にし、大量のDNA断片がフローセル上で並列に並ぶ状況を作り出す。このDNA断片を蛍光で標識し、一塩基ずつ読み取っていくことにより、DNAの塩基情報を取得する。NGSのハイスループットな性能は、フローセル上に並列に並んだDNA断片を同時に読めることに起因する。

国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター [†]医師
著者連絡先：安田貴彦 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター
〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸4-1-1
e-mail：takahiko.yasuda@nnh.go.jp
(2024年7月3日受付 2024年8月2日受理)
Genetic Panel Testing for Hematological Malignancies
Takahiko Yasuda
NHO Nagoya Medical Center
(Received Jul. 3, 2024, Accepted Aug. 2, 2024)
Key Words：panel testing, next generation sequencer, hematological malignancies

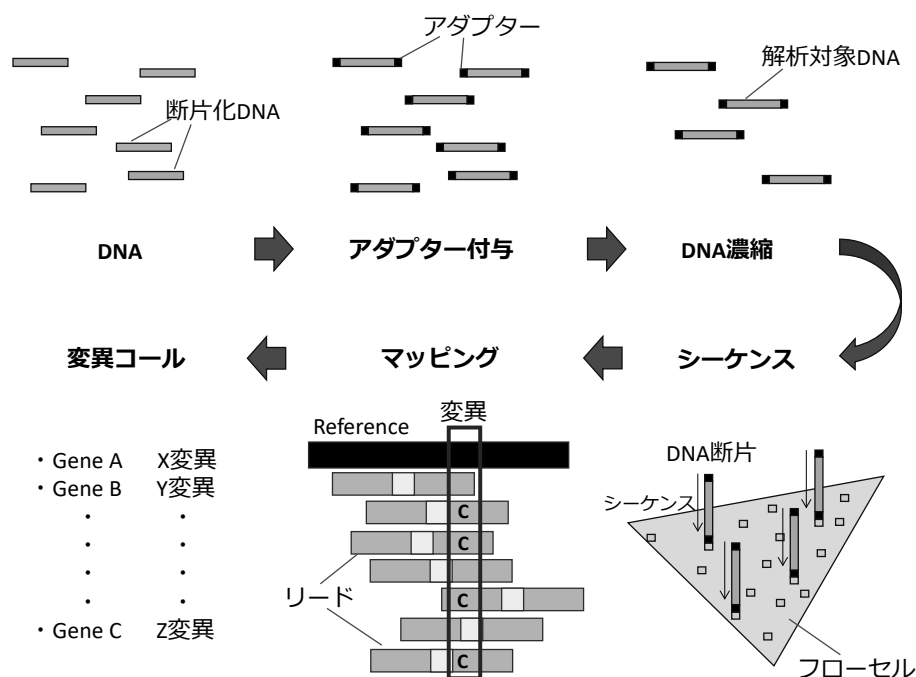


図1 パネル解析の原理・流れ

パネル検査の流れを示す。200–300 bp に断片化されたDNAの両断にアダプターを付与する。シーケンスの効率を上げるため、ビオチンプローブを用いて、必要な解析対象遺伝子のみを濃縮する。シーケンスの際には、濃縮されたDNAをフローセルと呼ばれるガラスに入れ、各DNA断片が並列に並ぶ状況を作る。それぞれの断片に対し、1塩基ずつ塩基を読み取り、100–300 bp のDNA断片の塩基情報を取得する。得られたリードはヒトゲノムのリファレンス配列にマッピングさせて、リードとリファレンス配列の違う部位を同定し、変異としてコールする。筆者作成。

得られた塩基配列情報の長さは、一つのリードあたり 100–300 bp 程度と一般に短い（短い配列であることから、ショートリードシーケンサーとも呼ばれている）。しかし、この程度の長さがあれば多くの場合、ヒトゲノムのリファレンス配列から該当する領域を一義的に探し出すことが可能となる（マッピングと呼ぶ）。マッピング後は、リファレンス配列と異なる配列を探し、遺伝子変異としてコールする（図1）。

●●同定できる遺伝子異常の種類

遺伝子変異はDNAの塩基レベルで生じるが、遺伝子の異常の種類はその変異がアミノ酸構造に及ぼす影響を考慮して分類されることが多い（表1）。たとえば、ミスセンス変異は、一塩基の置換により、アミノ酸が別のアミノ酸に置換される変異を示す。塩基が挿入欠失した場合は、変異塩基数が3の倍数かどうかによって、ノンフレームシフト変異（3の倍数）、フレームシフト変異（3の非倍数）に分け

ることができる。

コピー数異常は、特定の染色体・遺伝子の領域が増幅あるいは欠失する異常を示す。該当領域にマップされるリード数をカウントすれば、コピー数の増幅と欠失を判定することが可能となる（表1）。染色体転座は、血液腫瘍でしばしば認められる強力なドライバー変異である。FISH法やRT-PCR法で検出することが多いが、パネル解析において、染色体転座の融合点となりうる領域をパネルに加えれば、染色体転座も検出可能である。

●●遺伝子変異の臨床的解釈

上述したDNAの抽出→ライブラリー作成→シーケンス→遺伝子変異コールまでは、概ねスムーズ（半自動的に）その工程を遂行することは可能である。一方で、得られた遺伝子変異の臨床的意義をどのように捉えるのか、現時点では種々のデータベースを用いたマニュアル作業が必要なことも多く、必ずしも容易ではない。

表 1 遺伝子異常の種類

変異の種類	遺伝情報の変化	発現蛋白の変化
ミスセンス	アミノ酸の変化	アミノ酸の置換
ナンセンス	終止コドンへの変化	翻訳の途中終了
フレームシフト	挿入欠失 (3の非倍数)	異常なタンパクの合成
ノンフレームシフト	挿入欠失 (3の倍数)	一部が異なるタンパク
コピー数増幅	該当遺伝子のコピー数増加	該当遺伝子の発現増加
コピー数欠失	該当遺伝子のコピー数欠失	該当遺伝子の発現減少
染色体転座	二つの染色体の転座	融合遺伝子の出現

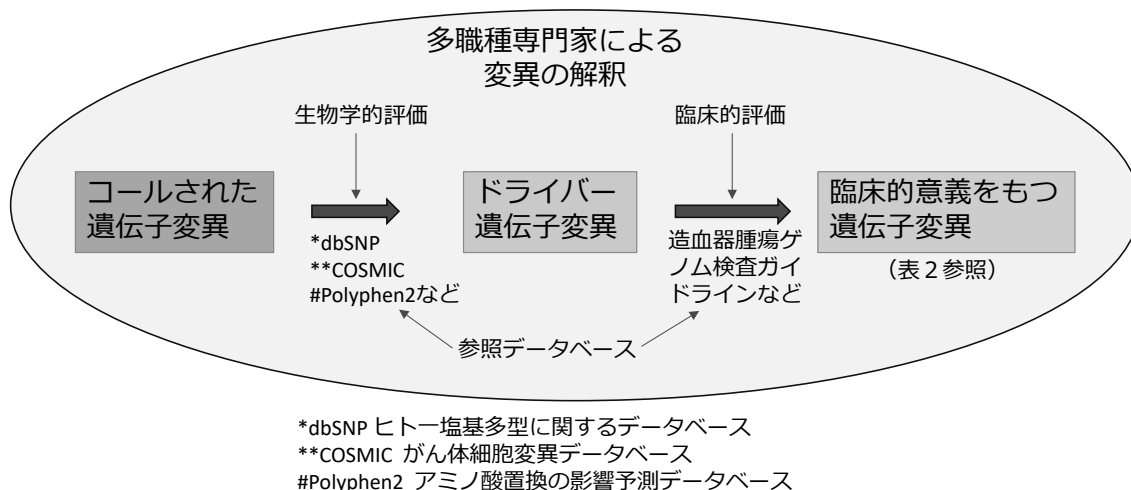


図 2 遺伝子変異の解釈

遺伝子変異の解釈には、生物学的評価と臨床的評価を行う必要がある。それぞれに適したデータベースを参照して意義付けを行う。生物学的評価は、遺伝子変異が機能的に疾患の発症に関係しているかどうかを判定する。臨床的評価はその遺伝子が臨床的にどのような意義を有するかを検討する。筆者作成。

遺伝子変異は、変異が生じてほとんど機能的に変化がない場合（パッセンジャー変異）がある一方で、新しい機能を獲得したり、機能を喪失したりと機能的に大きな変化がある場合（ドライバー変異）もある。そのため、遺伝子のどこの場所（何番目のアミノ酸なのか）でどのような変異（どのアミノ酸に置換したのか）が生じたのかを検討することが重要である。この変異パターンは多岐にわたるため、一つ一つその意義を確認していく作業が必要となる。具体的には、得られた変異が一塩基多型 (SNPs) でないかどうか、がんでよく見つかる変異かどうか、変異が遺伝子の機能にどの程度影響を及ぼすのか、など種々のデータベースを用いて遺伝子変異の生物学的意義を総合的に判断する必要がある (図2)。

ドライバー変異が得られた場合は、その変異が臨床的にどのような意味を持つかを検討する (図2)。血液学会が提唱するゲノム検査ガイドライン¹⁾では、得られた変異情報は「診断」、「予後予測」、「治

療法選択」の3つのカテゴリーをベースに、エビデンスレベルを加味したうえで評価することが推奨されている (表2)。また、このガイドラインでは、評価者が簡便に使えるよう、血液疾患における代表的な遺伝子変異に関して、疾患に対する3つのカテゴリーごとのエビデンスがあらかじめ示されている。

たとえば、急性骨髄性白血病の患者に DNMT3A R882C 変異が検出された場合を考えてみる。まず、がん体細胞変異データベース (COSMIC; Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) でこの変異を検索すると、過去に血液腫瘍のサンプルで多数報告された変異であることがわかる。したがって、この変異は遺伝子の機能に大きな変化を及ぼし、急性骨髄性白血病の発症に強くかわるドライバー変異と考えることができる。さらにゲノム検査ガイドラインで DNMT3A を検索し、急性骨髄性白血病の項をみると、「診断」エビデンスレベル A、「治療法選択」エ

表2 エビデンスレベルの基準（造血器腫瘍ゲノム検査ガイドラインより抜粋）

エビデンス	診断	治療法選択	予後予測
レベル A	当該造血器腫瘍の診断に有用なバイオマーカーとして、学会指針、もしくは専門家によるガイドライン等に収載されている遺伝子異常	当該血液腫瘍を対象として： 1. 薬事承認において、適応の条件としてあげられている遺伝子異常 2. FDA承認において、適応の条件としてあげられている遺伝子異常 3. 治療*に対する反応性や抵抗性を予見するバイオマーカーとして、日本もしくは海外の学会指針等のガイドラインに収載されている遺伝子異常	当該造血器腫瘍の予後予測に有用なバイオマーカーとして、学会指針、もしくは専門家によるガイドライン等に収載されている遺伝子異常
レベル B	当該造血器腫瘍の診断に有用なバイオマーカーとして、統計学的信憑性の高い大規模臨床試験で証明され、当該分野の専門家間のコンセンサスを得た遺伝子異常	当該造血器腫瘍を対象とした治療に対する反応性や抵抗性を予見するバイオマーカーとして、統計学的信憑性の高い臨床試験で証明され、かつ当該分野の専門家間のコンセンサスを得た遺伝子異常	当該造血器腫瘍の予後予測に有用なバイオマーカーとして、統計学的信憑性の高い大規模臨床試験で証明され、当該分野の専門家間のコンセンサスを得た遺伝子異常
レベル C	診断に有用なバイオマーカーとして、多数の小規模臨床試験で証明された遺伝子異常	1. 当該造血器腫瘍以外のがん種を対象に、薬事承認、FDA承認、もしくは学会承認された治療への反応性や抵抗性を予見する遺伝子異常 2. 臨床試験において治療選択基準として使用されている遺伝子異常	予後予測に有用なバイオマーカーとして、多数の小規模臨床試験で証明された遺伝子異常
レベル D	小規模臨床試験や複数の症例報告から、単独、もしくは他のバイオマーカーとの併用により、診断における有用性が示唆される遺伝子異常	1. 小規模臨床試験や複数の症例報告から、治療に対する反応性や抵抗性を予見するバイオマーカーとして示唆される遺伝子異常 2. 前臨床研究から、治療に対する反応性や抵抗性を予見するバイオマーカーとして示唆される遺伝子異常	小規模臨床試験や複数の症例報告から、単独、もしくは他のバイオマーカーとの併用により、予後予測における有用性が示唆される遺伝子異常

ビデンスレベルD、「予後予測」エビデンスレベルCと解釈できるのである（表3）。

以上の遺伝子変異の臨床的な評価は、その評価が必ずしも明快でない場合もあるため、独善的な解釈にならないよう、多職種の専門家（疾患専門医、病理医、臨床遺伝専門医、分子遺伝学の専門家、がん薬物療法の専門家、カウンセラーなど）が集まって合議のうえ、決定することが一般的である（図2）。

血液腫瘍に対するパネル検査の実行可能性研究

本邦において、血液腫瘍に対するパネル検査は一部の研究を除いて、一般に実施されておらず、その有効性・問題に関する十分な議論が実施されていない。そのため、われわれはAMEDの班研究で血液腫瘍に対するパネル検査の実行可能性研究を前向きに実施した²⁾。急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫の4疾患を含む計96症

例を対象にパネル検査で得られる臨床的意義を評価した。

「診断」に関しては、エビデンスレベルA/Bの知見が急性骨髄性白血病で77%、急性リンパ性白血病で29%、悪性リンパ腫で64%、骨髄腫で67%得られた（図3）。「予後予測」に関しては、エビデンスレベルA/Bの知見が急性骨髄性白血病で80%、急性リンパ性白血病で47%、悪性リンパ腫で67%、骨髄腫で79%得られた。「治療法選択」に関しては、エビデンスレベルA/B/Cの知見が急性骨髄性白血病で47%、急性リンパ性白血病で24%、悪性リンパ腫で52%、骨髄腫で54%得られた。

血液腫瘍に対するパネル検査では、「診断」、「予後予測」に関する高いエビデンスレベルの情報を高頻度で得ることができたが、「治療法選択」に関しては、エビデンスレベルCの情報にとどまることがほとんどであった。また、疾患ごとにパネル検査の有用性が異なることも示された。

表 3 DNMT3A変異がもつ臨床的意義 (造血器腫瘍ゲノム検査ガイドラインより改変)

遺伝子名 DNMT3A	
該当する造血器疾患	急性骨髄性白血病
遺伝子変異の機能的意義とその種類	機能喪失、機能獲得 (変異: R882C::Hなど)
エビデンスレベル 診断	A 根拠となる論文、学会指針、臨床試験: WHO2022, ELN2022, NCCN2023 (AML)
エビデンスレベル 治療法選択	D 根拠となる論文、学会指針、臨床試験: PMID: 22417203, 25609058, 26755712, 27841873
エビデンスレベル 予後予測	C 根拠となる論文、学会指針、臨床試験: PMID: 21067377, 21670448, 22291079, 22289988, 27983727, 35941135

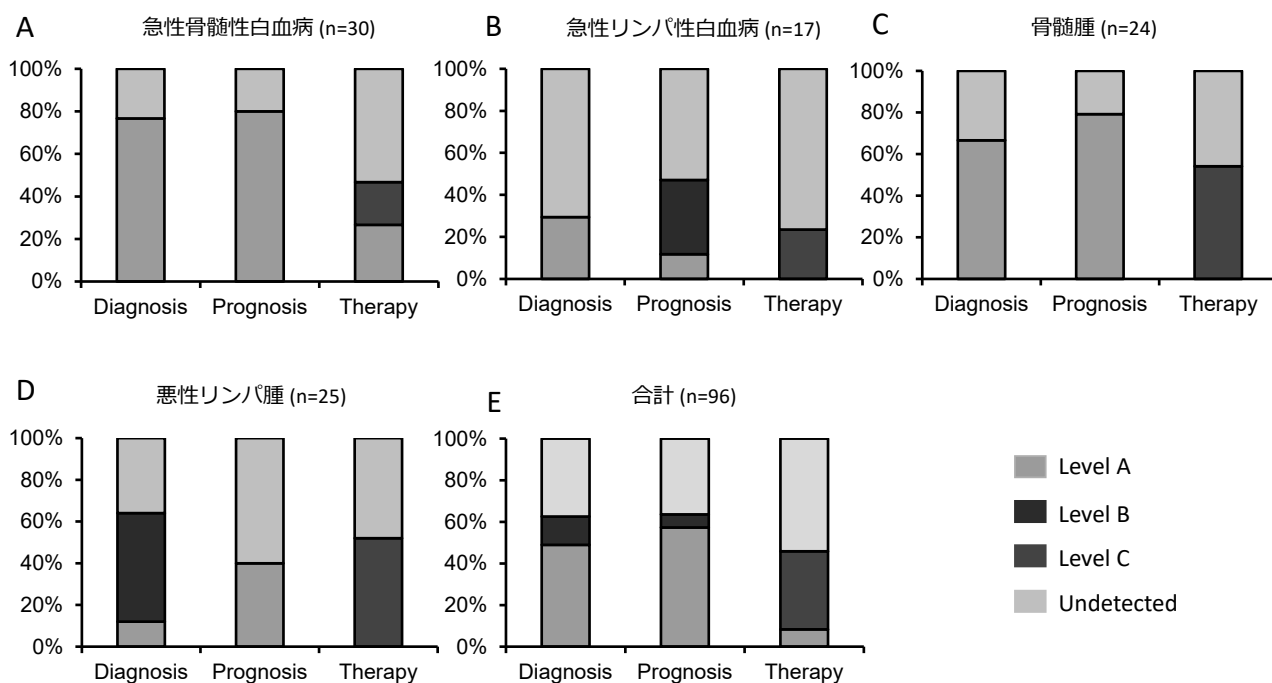


図 3 各疾患におけるパネル検査の臨床的有用性

各疾患におけるパネル検査で得られた臨床的有用性の頻度を診断 (Diagnosis)・予後 (Prognosis)・治療 (Therapy) のエビデンス別を示す。引用文献 2 より改変。

おわりに

本稿では、血液腫瘍に対するパネル検査を概説した。パネル検査を導入することにより、血液腫瘍に対する「診断」、「予後予測」に関する多彩な情報を得られる点はメリットである。一方、われわれの実行可能性研究では、エビデンスレベルの高い「治療法選択」に関わる情報を得られる可能性はやや低く、現行の医療制度下でパネル検査の結果を直接治療法に結び付けるには、ハードルが高いことが改めて示唆された。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

【文献】

- 1) 日本血液学会 造血器腫瘍ゲノム検査ガイドライン (<http://www.jshem.or.jp/genomgl/>)
- 2) Yasuda T, Sanada M, Nishijima D, et al. Clinical utility of target capture-based panel sequencing in hematological malignancies: A multicenter feasibility study. Cancer Sci 2020 ; 111 : 3367-78.