

Cancer genomic medicine and pathological examination

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-04-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Ikeda, Hiroko メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00053874

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



【総説】

がんゲノム医療と病理検査 Cancer genomic medicine and pathological examination

金沢大学附属病院 病理診断科 / 病理部
池 田 博 子

1. はじめに

近年、日本国民の約2人に1人は生涯のうちにがん罹患すると推計されている。日本ではがん対策基本法に基づき、癌に対する取り組みが進められている。1990年に始まったヒトゲノム計画ではヒト1人分の全ゲノム解析に、13年の歳月と30億ドルの費用を要していたが、目覚ましい技術進歩により、2016年には解析期間は1週間以下にまで短縮し、費用は約1000ドルにまで低廉化してきた。こうした技術革新により、次世代シーケンシング法 (next-generation sequencing; NGS) を用いたゲノム解析が、研究のみならず、患者の診断・治療といった診療にも広がってきている。政府はがんゲノム医療の計画的な推進を提唱し、2017年には厚生労働省主導のがんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会が立ち上げられ、当該医療の推進に必要な薬事承認や保険適用の制度設計などが議論されている¹⁾。

悪性腫瘍の病理組織・細胞検体を用いた体細胞遺伝子検査は急増しており、今後は次世代シーケンシング法 (NGS) などの新規技術を用いたゲノム診断 (遺伝子パネル検査) の臨床導入が見込まれている。日常の病理組織診断では、生検もしくは手術などにより採取・切除された組織のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) 検体が主として用いられ、形態診断に加え、核酸やタンパクなどの検索を目的とした分子診断に供される。ゲノム解析では生体内環境に近い新鮮検体の利用が望ましいが、現況では治療法選択などにおいて腫瘍の病理診断は必須である。今後は形態診断、免疫組織化学法を用いた分子診断、ゲノム診断、いずれの利用にも耐えうる一定水準以上の病理検体の品質が求められるようになり、病理検査室ではその対応が急務となっている。

本稿では、がんゲノム医療の国内動向と遺伝子パネル検査の現状を概説し、ゲノム診療、研究のための病理組織検体取扱い規定を紹介する。

2. がんゲノム医療とは

がんゲノム医療とは『ゲノム情報に基づいた癌の医療』と定義されている。ゲノム医療では、原因となる遺伝子を特定して、より効果が高い治療薬を選択することが可能となり、患者一人一人にあった「個別化医療」につな

がる。例として、肺癌の治療において、イレッサは2002年に、全ての手術不能非小細胞肺癌を対象に保険適用が承認された。しかし、その後、EGFR遺伝子の異常がある非小細胞肺癌のみに有効であることが証明され、2011年に対象症例をEGFR遺伝子変異症例のみに変更した結果、イレッサの奏成功率は27.5%→76.4%となった。つまり、ゲノム情報により、イレッサ無効例への投与が回避され、有効性が上昇したわけである²⁾。

これまでの遺伝子診断方法は主にコンパニオン診断で、肺癌におけるEGFR, ALK, ROS1, 乳癌におけるHER2, 大腸癌におけるKRASなどを対象とし、1度に1つの遺伝子異常を調べ、治療法の選択を行っていた。次世代シーケンシング法では1度に多数の癌関連遺伝子を調べることが可能となり、新しい遺伝子診断方法として『遺伝子パネル検査』が開発されつつある。厚生労働省はがんゲノム医療推進に向けた取組の1つとして、遺伝子パネル検査の実用化、ゲノム検査に基づく治療の推進を掲げており、国民皆保険制度の下で、保険診療による遺伝子パネル検査が可能となることを目標としている (図1)。ただし、遺伝子パネル検査は、結果の解釈などに専門的な知見が必要となることから、一定の要件を満たす医療機関においてのみ、実施される。がんゲノム医療中核拠点病院の要件として、がんゲノム医療の提供体制 (図2) を満たす項目が設定された (表1)。厚生労働省による「がんゲノム医療中核拠点病院等の整備に関する指針」に基づいて、平成30年2月に北海道大学病院、東北大学病院、

図1. ゲノム関連検査の種類とその活用法

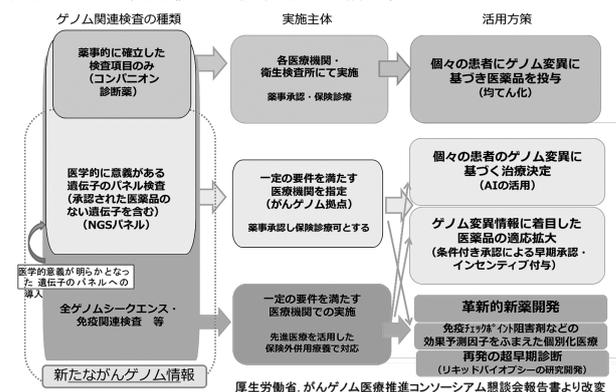


図2. がんゲノム医療の提供体制

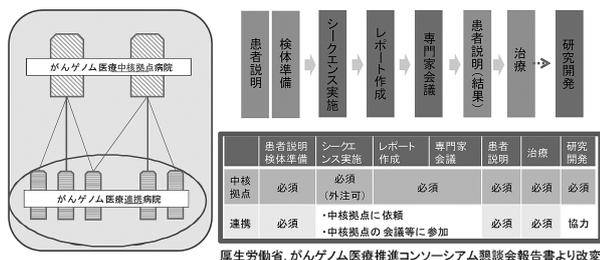


表1. がんゲノム医療中核拠点病院の要件

①	パネル検査を実施できる体制がある(外部機関との委託を含む)
②	パネル検査結果の医学的解釈可能な専門家集団を有している(一部の診療領域について他機関との連携により対応することを含む)
③	遺伝性腫瘍等の患者に対して専門的な遺伝カウンセリングが可能である
④	パネル検査等の対象者について一定数以上の症例を有している
⑤	パネル検査結果や臨床情報等について、セキュリティが担保された適切な方法で収集・管理することができ、必要な情報については「がんゲノム情報管理センター」に登録する
⑥	手術検体等生体試料を新鮮凍結保存可能な体制を有している
⑦	先進医療、医師主導治験、国際共同治験も含めた臨床試験・治験等の実施について適切な体制を備えており、一定の実績を有している
⑧	医療情報の利活用や治験情報の提供等について患者等にとって分かりやすくアクセスしやすい窓口を有している

厚生労働省、がんゲノム医療中核拠点病院などの整備に関する指針より改変

国立がん研究センター東病院、慶應義塾大学病院、東京大学医学部附属病院、国立がんセンター中央病院、名古屋大学医学部附属病院、京都大学医学部附属病院、大阪大学医学部附属病院、岡山大学病院、九州大学病院の11施設ががんゲノム医療中核拠点病院に指定された。金沢大学附属病院は国立がん研究センター東病院、慶應義塾大学病院のがんゲノム医療連携病院に認定された。金沢大学附属病院では2018年7月より、がんセンターにがん遺伝子外来を開設し、遺伝子パネル検査が導入されている。

3. がんゲノム検査における病理検体の重要性

分子診断を高い精度で行うためには、検査の成否を左右する検体の品質管理は極めて重要である。治療選択に直結しているコンパニオン診断においては、不適切な検体の使用が原因で検査が実施できない、あるいは誤った結果がもたらされた場合には、患者の治療機会の損失につながり、大きな不利益を被ることとなる。多遺伝子の検査情報を保証しなければならないゲノム診断(遺伝子パネル検査)においては複数遺伝子を対照とするため、その結果の質を保証するためには、現行の単一遺伝子検査以上に、より厳格な検体の品質管理が求められることに十分留意しなければならない。2017年10月に日本臨床腫瘍学会、日本癌治療学会、日本癌学会の三学会合同で発刊された「次世代シーケンサー等を用いた遺伝子検査パネル検査に基づくがん診療ガイドライン(第1.0版)」においても、適切に品質管理された検体の使用が言及されている³⁾。日本病理学会から2016年3月に発刊されたゲノム研究用病理組織検体取扱い規定⁴⁾、2018年3月に発刊されたゲノム診断用病理組織検体取扱い規定⁵⁾では

表2. がん遺伝子パネル検査で使用可能な検体

検体の特性	組織		細胞(細胞診用)	血液(遊離核酸)
	新鮮凍結組織	ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織		
体細胞遺伝子検査での利用	ごく一部で利用	広く利用	一部で利用	一部で利用
検体の核酸品質	品質は良いが、取扱いは十分注意(核酸の分解)	検体処理工程が多く、品質のばらつきが生じやすい	未固定やアルコール固定検体は、品質は良い一部はFFPE化する(セルブロック)	品質は良い
検体の保管	-80℃下保管が必要、診療時に保管しない	FFPE組織ブロックとして長期保管が可能	診療時に保管しない	診療時に保管しない 採取は容易
検体使用にあたっての注意点	腫瘍細胞割合の確認が煩雑	長期保管ブロックは核酸品質が低下	腫瘍細胞割合の確認が煩雑	検体処理には注意 がん種や病期で適用制限あり

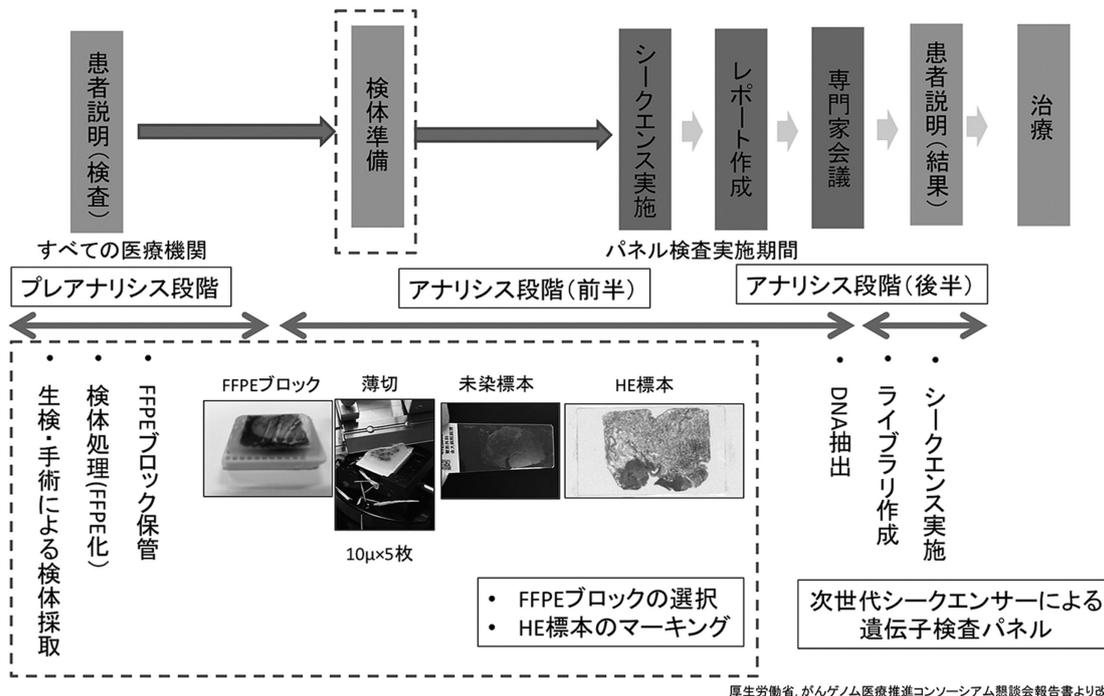
がんゲノム検査に供される病理検体の品質管理についての重要事項が明記されている。

がんゲノム検査ではヒトの組織、細胞、血液が使用可能であるが、検体としては組織または細胞をホルマリン固定パラフィン包埋(formalin-fixed, paraffin embedded; FFPE)ブロックとした、FFPE検体が最も広く利用されている(表2)。組織・細胞のFFPE化は、形態診断や免疫組織化学法による分子診断、検体の室温下における長期保存や繰り返しの検索を可能とするが、ホルマリン固定による核酸やタンパクの一定の変性は不可避である。

FFPE組織検体を用いたがん遺伝子パネル検査の過程は、すべての医療機関が担当するプレアナリシス段階と、パネル検査実施機関が担当するアナリシス段階に大きく分けられる。プレアナリシス段階は生検や手術による組織、細胞検体の採取、検体のFFPE化、FFPEブロックの保管といった一般的な病理検査業務に該当する。アナリシス段階前半ではゲノムパネル検査を実施する医療機関の病理部門において、がん遺伝子パネル検査の対象となるFFPEブロックや薄切部位を選択する(図3)。

FFPE検体を用いた分子診断ではプレアナリシス段階に、検査に影響する多数の因子が知られている(表3)。ホルマリン固定前、ホルマリン固定、ホルマリン固定後のプロセスがあり、それぞれに検査結果に重大な影響を与える処理がある。固定前プロセスは検体採取を行う臨床医が把握すべき事項であり、臓器・細胞摘出直後から始まる生体分子の不可逆的変化(変性、壊死)を最小限にとどめることが重要である。臓器切除・採取直後の組織取扱いの注意点としては、①手術により切除された組織は、摘出後は速やかに冷蔵庫など4℃下で保管し、1時間以内、遅くとも3時間以内に固定を行うことが望ましい。一般的な固定液であるホルマリンの浸透速度は1mm/時間程度である。大きな手術検体では、切り出しまでに十分な固定が行える程度の厚みまで、固定前に適切に入割ることが推奨される。②手術により切除された組織においては、摘出後、30分以上室温で保持することは極力回避する。③生検、内視鏡的に切除された消化管組織など、比較的小型の組織については、速やかに固

図3. FFPE組織検体を用いたがん遺伝子パネル検査の流れ



厚生労働省、がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会報告書より改変

表3. FFPE検体を用いた分子診断のプレアナリシス段階における主な影響因子

プレアナリシス段階の工程	工程の主な責任・担当者	影響因子
固定前プロセス	臨床医 (検体採取医)	<ul style="list-style-type: none"> 血流停止から摘出までの時間(温虚血時間; warm ischemic time) 摘出から固定までの時間(冷虚血時間; cold ischemic time) 組織の大きさ
固定プロセス	病理医 病理検査技師	<ul style="list-style-type: none"> 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用量と組織量の比率 固定液の組織浸透法(浸漬、注入、マイクロウェーブ加速など)
固定後プロセス	病理医 病理検査技師	<ul style="list-style-type: none"> 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)

日本病理学会、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規約、初版、2018、より改変

定液に浸漬し、固定を行う。固定プロセスにおける注意点としては、ホルマリンによる過度の組織変性を極力避けることが重要となる。ホルマリンは核酸やタンパクに化学的および物理的修飾を引き起こし、検体品質にきわめて大きな影響を与えることが広く知られている。しかし、固定時間が短いと、形態診断、免疫組織化学が困難な質の悪いFFPE検体が作製されることとなり、病理診断に影響を及ぼす。病理診断、ゲノム診断の両者に適切なホルマリン固定条件の検討が望まれ、日本病理学会では有識者による検証を重ね、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程として、詳細な実験データに基づく見解、推奨事項を冊子および日本病理学会ホームページで公開している。固定プロセスでの重要項目は①ホルマリン固定液の組成は、酸性や非緩衝ではなく、中性緩衝ホルマリン溶液を用いることが望ましい。②ホルマリン濃度は10%(3.7%ホルムアルデヒド)の使用が望ましい。③組織検体では、コンパニオン診断などの推奨を考慮し、6-48

時間の固定を行うことが望ましい。④固定不良(固定不足・過固定)による品質劣化は回避しなければならない。固定後プロセスの注意事項は①硬組織を含む検体をゲノム診断に供する可能性がある場合は、酸脱灰を避け、EDTA脱灰を行うべきである。②FFPEブロックの保管は、室温でよいが、多湿を避け、冷暗所が望ましい。ゲノム診断を目的として作製されたFFPEブロックは、冷蔵下の保存が望ましい。③未染色FFPE標本の形態で保管する場合は、低温保管やパラフィンコーティングなどの核酸品質劣化を防止する対応を行うことが望ましいが、原則薄切後、時間が経過した未染色FFPE標本のゲノム診断への使用は避け、可能な限り、FFPEブロックから再薄切をすることが望ましい。パラフィンコーティングは、マニュアル・マイクロダイセクションや核酸抽出などの作業へ影響を与える場合がある。

アナリシス段階では病理医によるFFPEブロックの選択や、腫瘍細胞量の判定に注意を要する。①ゲノム診断に供する検体は、病理診断時に作製されたHE染色標本の観察や病理診断報告書の記載に基づき、解析に必要な腫瘍量を有するFFPEブロックを、原則病理医が選択する。このとき、出血、壊死、炎症細胞などの非腫瘍細胞が多いブロックの使用は可能な限り、避ける。②同一患者において、切除・採取時期が異なる検体が複数存在する場合は、作成時期が最新の検体を第一選択とすべきである。FFPEブロックの核酸品質は経年劣化していくことが明らかとなっている。経年による影響は、次世代シークエンス法の場合、使用する遺伝子パネル検査によって異なるが、作成後、3年以内のFFPEブロックの使用が

表4. FFPE検体を用いた遺伝子パネル検査における注意事項

段階	工程	説明
プレアナリシス段階	固定前	・ 抽出後は速やかに4°C下で保管。3時間程度以内に固定を行うことが望ましい(手術検体)。
	固定	・ 10%中性緩衝ホルマリンの使用を推奨 ・ 固定時間は、6~48時間を推奨
アナリシス段階	ブロック選択	・ 解析に必要な腫瘍量を有するブロックを、原則病理医が選択(出血・壊死や炎症細胞の多いブロックは避ける) ・ 作製時期が最新の検体を第一選択とすべき(作成後3年以内のFFPEブロックの使用が望ましい)
	HE標本マーキング	・ 原則病理医がマーキングをし、腫瘍量や腫瘍割合を判定(腫瘍割合は面積ではなく、有核細胞数で判定する)
	品質確認	・ 解析の成功率を予測する指標としては Δ Ct値やDIN値などは有用

日本病理学会/ゲノム診療用病理組織検体取扱規程。初版。2018。より改変

望ましい。③ゲノム診断用に作製した未染色FFPE標本から、再度HE染色標本を作製し、原則病理医が標本上にマーキングするとともに腫瘍量(総腫瘍細胞数)や腫瘍割合(標本中の全細胞に占める腫瘍細胞の%)を判定する。腫瘍割合は面積ではなく、有核細胞数で判定する。一般に遺伝子パネル検査に必要なDNA量は10~500ngである。ただし、必要な量は使用する遺伝子パネルやNGS機器の種類によって異なることから、腫瘍量や腫瘍割合の判定を担当する病理医は、その把握が必要である。1有核細胞から得られるDNA収量は6pg程度と見積もられる。仮に10ngのDNAを得る場合には約2000細胞(未染色標本上では腫瘍細胞が豊富なエリアが少なくとも60~100mm²程度)からの抽出が必要とされている。腫瘍割合について、SNV(single nucleotide variant)やIndel(small insertion and deletion)などの変異検出では30%以上、CAN(copy number alteration)検出を含む場合では50%以上の腫瘍細胞を含むように、また遺伝子発現量の測定では、可能な限り非腫瘍細胞を含まないようにすることが望ましい。腫瘍割合が満たない場合は、手動的に非腫瘍部の除去(マニュアル・マイクロダイセクション)が必要となる。非腫瘍組織の除去操作を実施した場合には、実施した旨と除去操作実施後の腫瘍割合をゲノム診断報告書へ記載する。FFPEからの核酸抽出に関しては、診療での使用に適した標準化された市販キットの使用が望ましい。抽出した核酸は、分光光度計などによるA₂₆₀/A₂₈₀比の測定や、DNAについては蛍光法によるdsDNA濃度の測定などを行い、純度や収量を確認することが重要である。FFPE検体が長期保管されている場合や、過固定などによる核酸の品質低下が懸念される場合、核酸品質の確認が推奨される。核酸品質確認方法にはリアルタイムPCR(DNA)もしくはリアルタイムRT-PCR(RNA)法により得られるCt値を用いてDNA/RNA品質を評価する方法や、アジレント社のAgilent 2200/4200 TapeStationシステムを用いたGenomic DNA ScreenTape assayで測定したデータをgDNAの分解度に応じてスコア化されたDIN(DNA Integrity Number)がFFPE検体のDNA品質評価に有用とされている(表4)。

遺伝子パネル検査の主な検体であるFFPEブロックは、血液などの液状検体に比べ、かなり多くの工程と時間を経て作製されるため、その品質には多数の因子が影響を及ぼし、施設間にも品質差が生じうる。がんゲノム医療中核拠点病院や連携拠点病院だけではなく、すべての医療機関で日常業務下に作製されるFFPE検体が、がんゲノム検査に供される可能性がある。今後は病理医や病理検査技師はもちろんのこと、病理検体採取にかかわる臨床医も、ゲノム診断に要求される良質な病理検体作製についての知識、情報をもつことが不可欠である。がんゲノム医療の臨床導入にあたり、日本病理学会を中心として、FFPE検体の適切な作製・保管方法の標準化が提唱されたことから、各医療機関における病理検体の採取、検査室への検体提出方法、FFPEブロック作製工程などの早急な見直しや改善が望まれる。

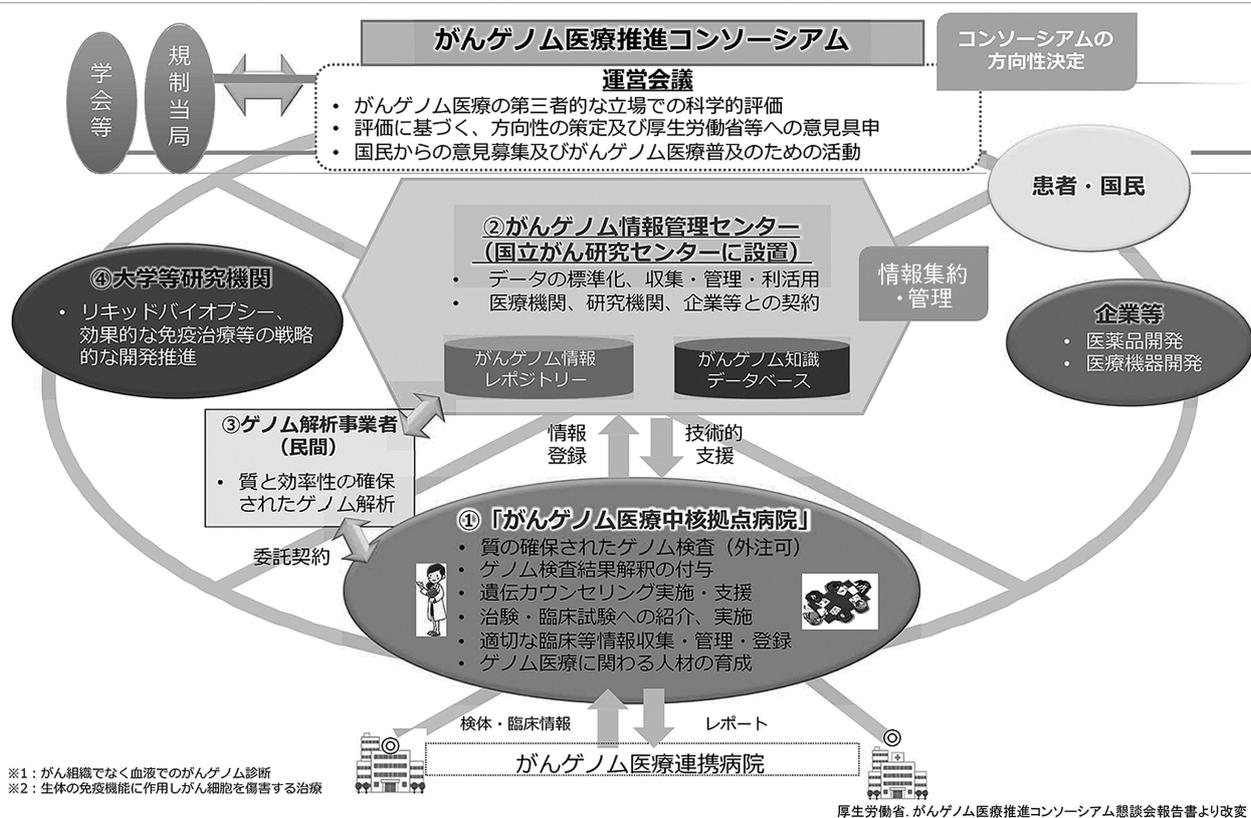
4. 遺伝子パネル検査の現況

日本では国立がん研究センター中央病院のNCCオンコパネル、東京大学医学部附属病院の東大オンコパネル、大阪大学医学部附属病院のOncomine Target Testが厚生労働省の審査を受けており、オンコパネル検査は実施中である²⁾。金沢大学附属病院では、がん遺伝子外来にてがん遺伝子パネル検査「プレジジョン PleSSision検査」がスタートした。自費診療で、解析遺伝子数は160個である。患者さんはがん遺伝子外来を受診し、検査の十分な説明をうける。患者さんの同意後、当院または紹介元医療機関で採取された組織、細胞のFFPEブロックが病理検査に提出される。病理医がHEの確認、腫瘍細胞含有率の判定、技師が薄切(必要であればトリミングを加える)を行い、患者さんの血液とともに検査センター(衛生研究所)へ病理検体を輸送する。検査センターでDNAの抽出、シーケンスセンターでNGSによる解析が行われ、解析結果は慶應義塾大学病院のWebカンファレンスで呈示される。カンファレンスには各関連分野のエキスパートで構成された「がんゲノムエキスパートパネル」と、遺伝子パネル検査を実施した医療機関の臨床医、病理医が参加する。1回のカンファレンスで複数施設の症例を議論し、各症例の推奨治療が決定される。専門家会議で作製されたカンファレンスシートを参照し、金沢大学附属病院のがん遺伝子外来医師は、遺伝子パネル検査の結果や推奨治療について、患者さんに説明を行っている。

5. バイオバンク構築

がん診療には新たに見いだされたがん原因遺伝子に対する分子標的薬の開発のみならず、新たな機序による診断、治療法の開発が不可欠である。その実現には、質が確保されたより多くのゲノム情報を効率的に集約・活用できるシステムの構築が必要である。厚生労働省では制度的対応を進め、日本の国民皆保険制度の下、質の高いがんゲノム医療を国民に提供しつつ、個人情報を含めた医療情報を集約し、研究での利活用を促す仕組みを検討している(図4)。上述の遺伝子パネル検査ではFFPE検

図4. がんゲノム医療推進コンソーシアムの体制と役割



体が使用されるが、様々なオミックス研究にはホルマリンによる修飾が加わっていない新鮮材料が不可欠である。厚生労働省はがん診療拠点病院に必要な項目に手術検体などを新鮮凍結保存可能な体制を有していることを挙げている(表1)。日本病理学会では2016年にゲノム研究用病理検体取扱い規程を発行し、DNA・RNA・タンパク質などの変性を最小限にし、高い品質を保持して長期の保管を可能とするための、凍結組織検体の適切な採取・保管・移送方法を呈示した。有識者による実証解析データを根拠とした検体の採取対象、採取者、採取時間、採取量、組織処理、急速凍結、長期保管、凍結組織切片作製、研究使用、移送、バイオセーフティー、試料の廃棄などの項目について記載されている⁴⁾。バイオバンク設立に関しては、運営方針、情報や品質の管理など、各医療機関/部門での綿密な計画や打ち合わせが必要であろう。個々の医療機関における高品質なバイオバンク設立と様々な機関との連携ネットワークが、all Japan体制のがんゲノム医療情報の集約につながり、広範・網羅的な研究、革新的な診断・治療法の開発につながると期待される。

6. おわりに

保険診療に適応されつつあるとはいえ、ゲノム検査はまだまだ高額である。NGSで遺伝子シーケンスの読めない品質の悪い病理検体を提供することは、がん患者に多大なる不利益を与えることとなる。遺伝子パネル検査の臨床導入により、病理検体の管理や品質向上の重要性

が増し、がんゲノム医療を実施する中核拠点病院、連携病院ではISO15189などによる検査室の第三者認定(外部制度管理)が必須となりつつある。自施設でのFFPE検体からの核酸抽出、核酸品質チェックなどの内部精度管理も実施すべきであろう。病理検体の品質は、病理検査室での固定・包埋などの標本作成過程だけではなく、臨床医による検体採取や固定までの時間なども大きく影響する。今後はがんゲノム医療における情報を、臨床系や関連施設に発信し、最適な状態の病理検体を遺伝子検査、研究に提供することにより、医療の発展に貢献したいと考えている。

参考文献

- 1) 厚生労働省. がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会報告書. <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000166310.pdf>
- 2) 厚生労働省. 第1回がんゲノム医療推進コンソーシアム運営会議資料. <http://www.mhlw.go.jp/content/10901000/000341604.pdf>
- 3) 長村義之. ゲノム病理学 (Genomic Pathology) の今後の展開と精度管理について. 臨床検査グローバルニュース, 2018.
- 4) 日本病理学会. ゲノム研究用病理組織検体取扱い規約. 初版, 2016
- 5) 日本病理学会. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規約. 初版, 2018.