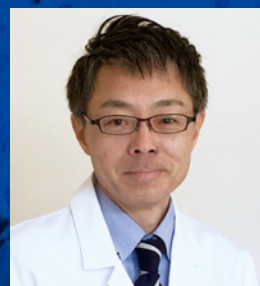


肺癌における ROS1、BRAF遺伝子検査の サロゲート

- ROS1 IHC and BRAF V600E IHC



執筆

谷田部 恭 先生

(国立がん研究センター
中央病院 病理診断科 科長)

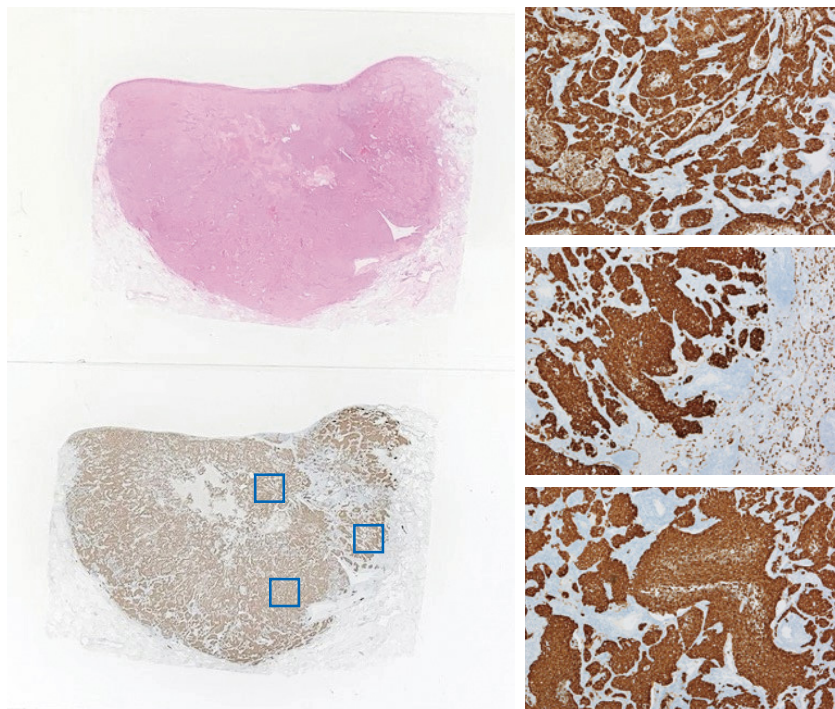


はじめに

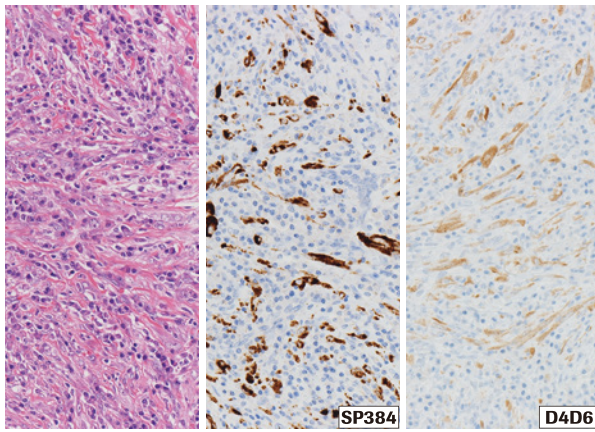
2020年7月現在、肺がんに対して行うことが推奨されている遺伝子検査はEGFR、ALK、ROS1、BRAF、METex14 skippingとされている。EGFR変異は本邦では比較的頻度が高く30-40%を占める。一方、ALKでは5%、ROS1 1-2%、BRAF V600E 1%、METex14 skipping 3-4%とその頻度は低い。現在では遺伝子パネル検査により一度ですべてのコンパニオン診断結果が得られるが、すべての症例で遺伝子パネル検査が施行できるとは限らず、微小検体で何とか結果を得たいというときもあろう。そこでより簡便な免疫組織科学染色(免疫染色;IHC)でのトリアージが意味を持つてくる。実際、CAP/IASLC/AMP最新遺伝子検査ガイドラインにはROS1 IHCをスクリーニングとして使うことも可能と記載されている。この資料ではROS1、BRAF V600E遺伝子異常をIHCでトリアージする方法をご紹介します。

ROS1免疫染色

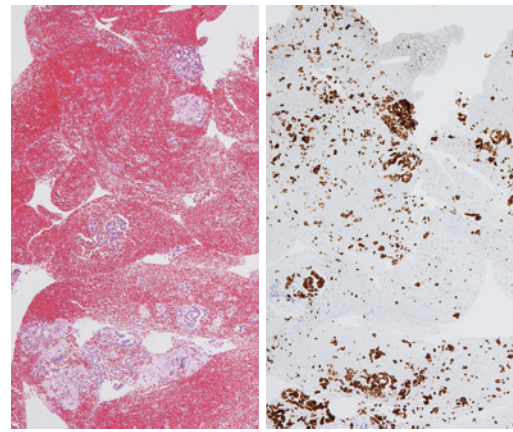
ROS1はCD74、SDC4、SLC34A2など多彩なパートナーと融合遺伝子を形成することで腫瘍化に寄与している。免疫染色では、融合パートナーのプロモーター下でのROS1キナーゼを含む融合転写物の過剰発現によって融合遺伝子の存在を検出することになる。ALK IHCと異なるのは、ROS1タンパクは正常肺組織でも低レベルの発現が認められるため、発現を定量的にみる必要がある点である(図1)。抗体としてはクローンD4D6(Cell Signaling Technology)が最も多く用いられており(図2)、複数の論文にも記載されているが、近年ではより安定して強い染色強度を示すクローンSP384(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)の報告もされている¹⁻³。ROS1陽性の定義として、2+、30%以上でカットオフした場合にFISHとの相関が良いとのデータが出ているが、いずれも手術症例に焦点を当てた研究であり、組織変性加わる生検組織でこの基準が応用可能であるかどうかの検証はされていないため、多少修正する必要があると考えている。個人的には、肺胞置換性II型肺胞上皮とは異なる形態を示し、均一で中~強い陽性像を示す場合はIHC陽性とし、遺伝子検査に提出するようにしている。図3、4に例を示す。



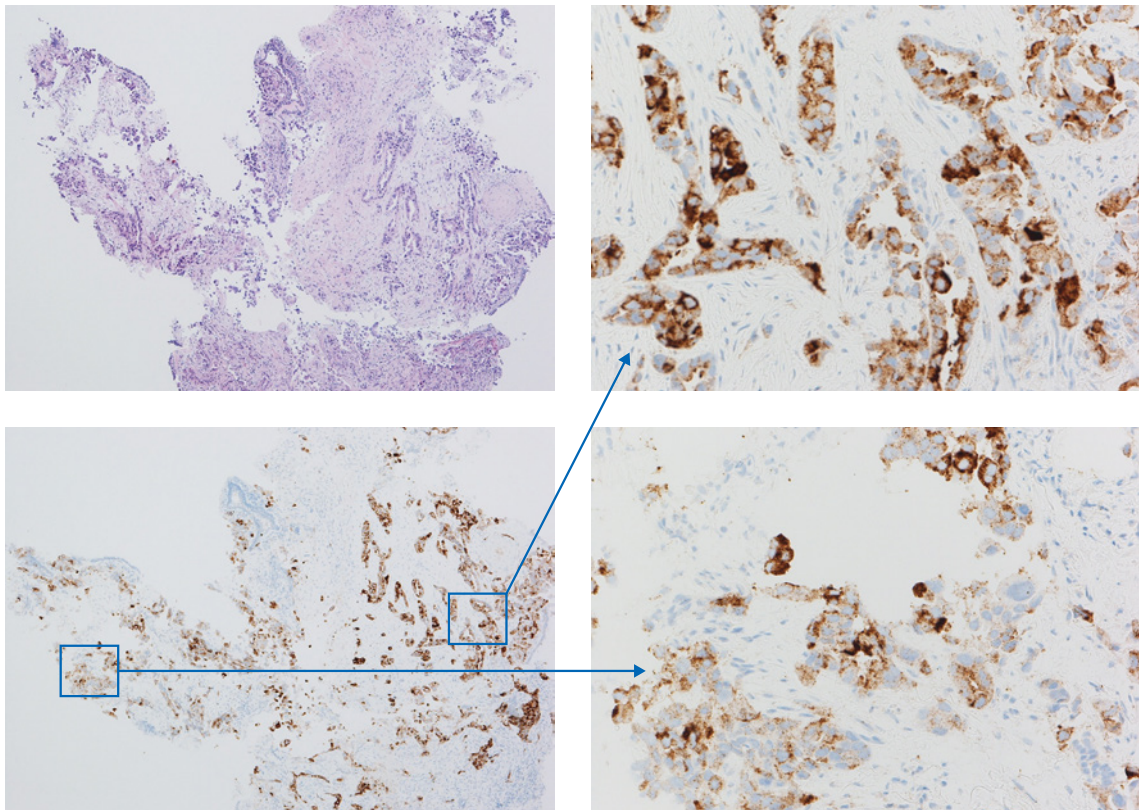
【図1】ROS1陽性肺癌におけるROS1(SP384)免疫染色像。3つの部分像を右欄に拡大したが、どの腫瘍細胞にも強い陽性反応が認められる。右中段は末梢肺組織での反応性II型肺胞上皮が陽性反応を示しているが正常組織ではよく見られる反応であり、スリガラス様陰影を示す腫瘍でも認められるが、融合遺伝子を持つことはない。



【図2】炎症性筋繊維芽細胞腫瘍におけるROS1クローン別の染色態度の比較。SP384は強い強度を持った染色を示し、やや弱い染色強度をもつD4D6とは対象的である。



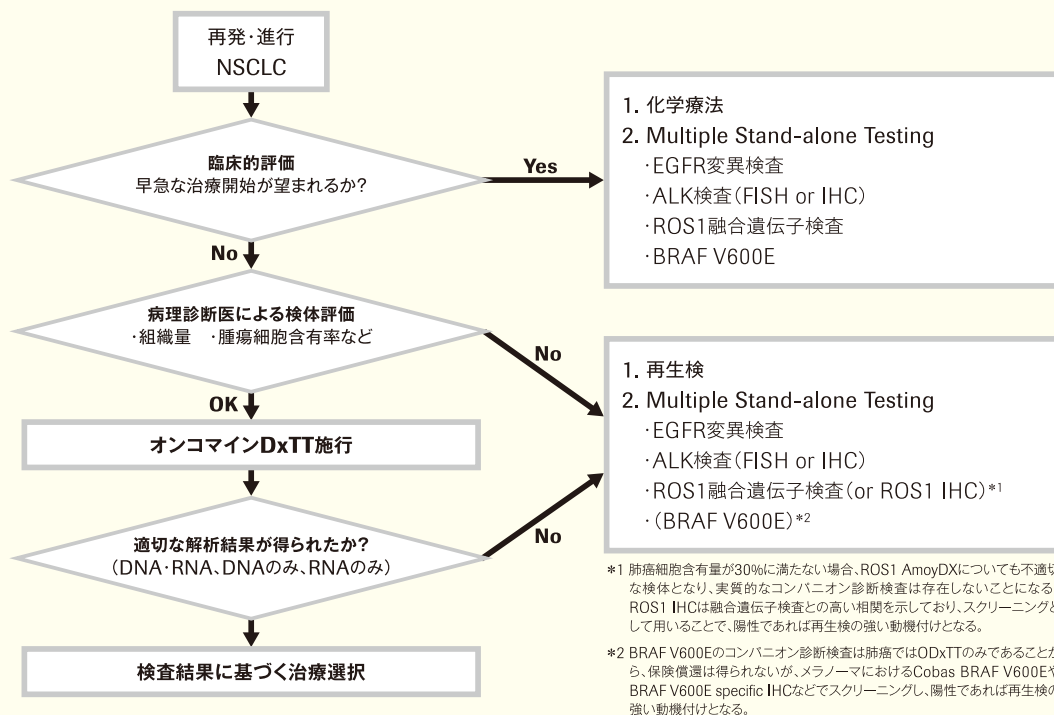
【図3】EBUSセルブロックでのROS1陽性肺腺癌。弱拡大で見た場合にすべての腫瘍細胞に強い均一な陽性像が特徴的であり、このような所見を見たらROS1融合遺伝子の存在を考える。



【図4】ROS1染色反応を示すものの、ROS1陰性と判定すべき肺腺癌の例(気管支鏡生検)。比較的強い染色強度を持つが、均一な染色所見とはいえ、右に拡大した上下の部分では陰性細胞も混在している。このような染色態度は陽性と判断はできない。

ROS1融合遺伝子の検出では、FISH、NGSでの陰性が必ずしも融合遺伝子の存在を否定するものではないことが知られている。それぞれの方法は特徴があり、一部カバーしきれない変異も存在するためである。融合遺伝子に関しては standard criterionと考えられるRNA-based NGSの結果に対して、DNA-based NGSではROS1融合を示す腫瘍が必ずしも検出されるわけではないことが知られている^{4, 5}。また、現在汎用されているオンコマイン Dx Target Test マルチ CDxシステム(以下、オンコマインDxTTマルチ)ではRNAのみ質的不良で返却され、ALK、ROS1の結果が得られないこともある。我々の施設では2020年6月現在、226件のオーダーがあったが、14例は病理医により腫瘍細胞含有量が保てないなど不適切検体と評価され、22例が評価不能であり、190件で結果が得られた。評価不能の原因として最も多かったのがRNA不良で、18件(82%)を占めた。図1はRNA不良例の1つであり、日本肺癌学会による「肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の手引き」⁶の検査アルゴリズム(図5)により、ALK、ROS1 IHCを施行し、その結果、ROS1免疫染色でびまん性で強い陽性像が得られ、ROS1融合遺伝子の存在が強く示唆された。そのため、検査をOncoGuide® AmoyDx® ROS1融合遺伝子検出キットに変更し、再度検討したところROS1融合遺伝子が検出された。このような場合、ROS1 IHCは臨床医に再生検への強い意欲をもたらす威力となる。

遺伝子パネル検査を用いる場合のアルゴリズムの例



日本肺癌学会バイオマーカー委員会 編; 肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の手引き第1.1版(p.19 図9)より引用

【図5】日本肺癌学会バイオマーカー委員会により提示された肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査のアルゴリズムの一例。病理診断医による検体評価で不適とされた場合や適切な解析結果が得られなかった場合にROS1免疫染色、BRAF V600E免疫染色が言及されている。

BRAF V600E免疫染色

V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)の遺伝子変異は種々の腫瘍で検出され、特に悪性黒色腫、甲状腺乳頭癌では50-70%で変異が認められ、そのほとんどがBRAF V600Eである。これに対して、非小細胞肺癌ではBRAF変異は1%以下で検出され、V600Eが最も多いものの、G469A、G466V、D594Gなどのnon-V600Eの変異が半分以上を占める。

BRAFはその変異の部位によって腫瘍化に対して異なる生物学的意義を持つことが知られている。ダイマー形成、RAS依存性によりクラスI-Ⅲまで分類され、変異部位によってキナーゼ活性が強いもの(Class I)から、中等度(Class II)、低いもしくは欠如しているもの(Class III)までがある⁷(表1)。現在治療に用いられているのはBRAF V600Eであり、他のnon-V600Eについての治療法は確立されていない。BRAF V600Eがほとんどを占める悪性黒色腫では問題とならないが、非小細胞肺癌においてはBRAF変異がわかるだけでは不十分であり、V600Eとnon-V600Eを明確に区別する必要がある。そのため、非小細胞肺癌におけるBRAF V600E IHCは、V600Eがほとんどを占める悪性黒色腫とは異なる意味を持つ。

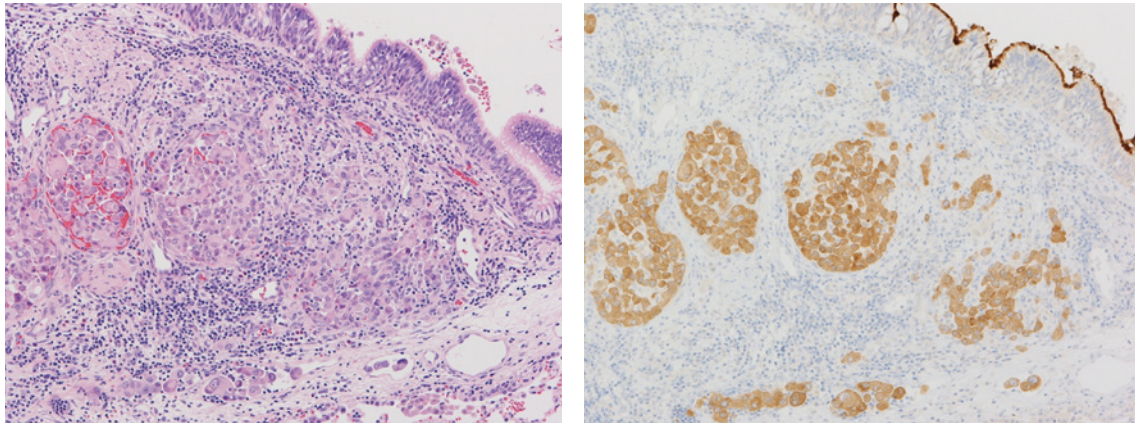
■表1 BRAF変異のクラスとキナーゼ活性との関係

Class	Mutation	Location of mutation	Kinase activity	Comments
1	V600E/K/D/R	Activation segment	High	Occurs most frequently in melanomas
2	R462I	G-rich loop	Intermediate	
2	I463S	G-rich loop	Intermediate	
2	G464E/V/R	G-rich loop	Intermediate	Breast cancer G464V
2	G469 A/V/S	G-rich loop	High/Intermediate	NSCLC G649 A; G649 V melanoma
2	E586K	$\beta 7$ - $\beta 8$ loop	High	
2	F595L	DFG	Intermediate	
2	L597Q/R/S/V	Activation segment	High/Intermediate	Melanoma L597R; NSCLC L597V
2	A598V	Activation segment	Active	
2	T599I	Activation segment	Intermediate	
2	K601E/N/T	Activation segment	High	Melanoma K601E
2	A727V	Distal to $\alpha 1$	Intermediate	
2	B-Raf fusions		High	
3	G466 A/E/V/R	G-rich loop	Impaired	Stomach cancer G466V
3	S467 A/E/L	G-rich loop	Impaired	
3	G469E	G-rich loop	Impaired	
3	K438M	Proximal to $\beta 1$	Impaired	
3	D594 A/E/G/H/N/V	DFG	None	Melanoma D594N
3	G596 A/C/D/R	DFG	Impaired	Colorectal cancer G596R

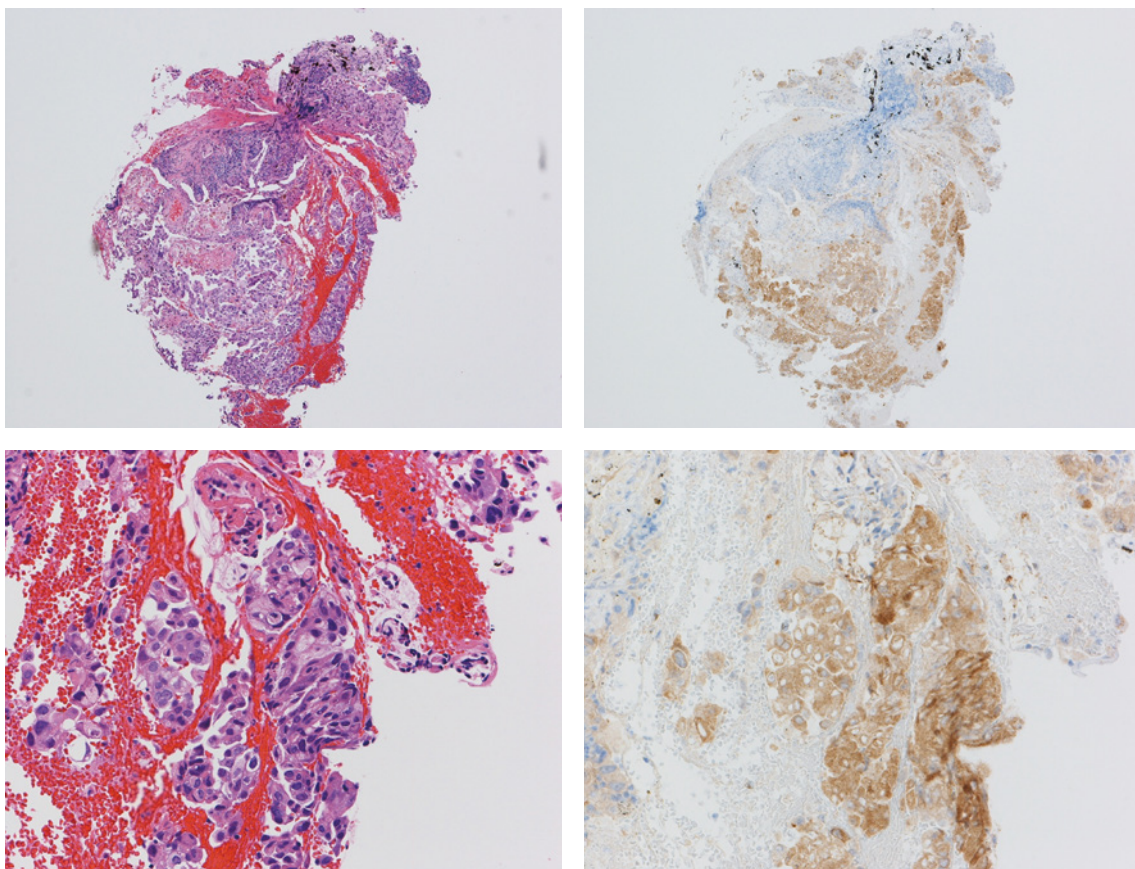
Pharmacol Res. 2018 Sep;135:239-258. より引用

BRAF V600E(クローンVE1)はV600E変異を有するGLATEKSRWSG(コドン596-606)を抗原として作製されたマウスモノクローナル抗体である。米国では、リンチ症候群の除外目的にhMLH1発現欠失を示す大腸癌に対して認可されている。これはリンチ症候群が遺伝子変異によるhMLH1発現欠失を示すのに対し、孤発例ではpromoter hypermethylationによる発現消失を来し、それがBRAF変異とよく相関していることに基づく。この抗体を用いた免疫染色では遺伝子解析によるBRAF V600Eの存在とよく相関していることが広く受け入れられている⁸⁻¹⁰。しかしながら、non-V600E変異に対する反応性は十分に評価されていなかったが近年2つの論文^{11, 12}により、V600E変異に特異的であることが示された。すなわち、non-V600E変異が多い肺癌においても、治療標的となるBRAF V600Eのみを特異的に検出することができることを示している。

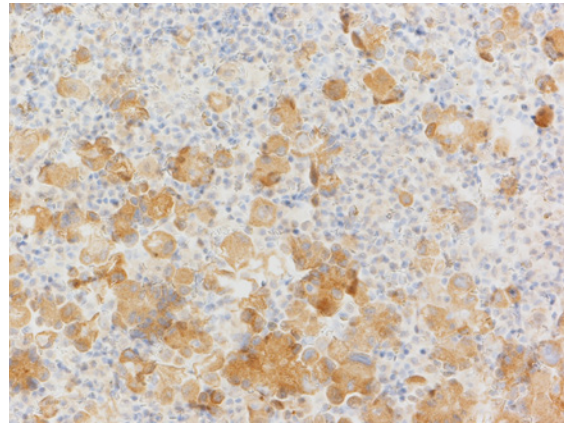
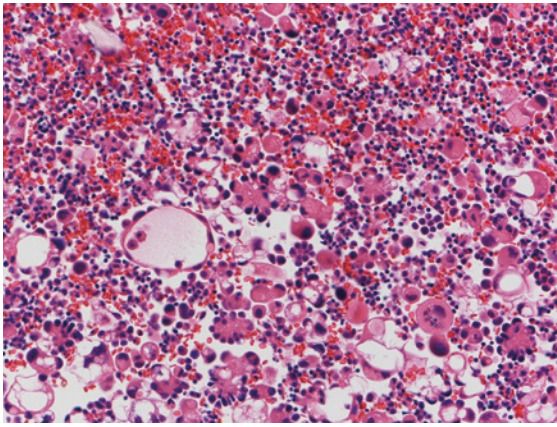
BRAF V600E IHCの陽性像は細胞質にびまん性に染色されることが特徴である(図6、7、8)。また、気管支上皮の刷子縁に強い陽性像を示す(図7)。時としてその反応は弱い場合があり、偽陰性を招くことが知られている⁹⁾。しかしながら、ROS1と同様に、腫瘍細胞に均一に遺伝子変異が分布するため、どの細胞も同じような染色強度で陽性となる点が鑑別点である。図9は弱い染色強度ではあるが、均一に陽性像が観察され、現在オンコマインDxTTマルチによる解析を行っている。



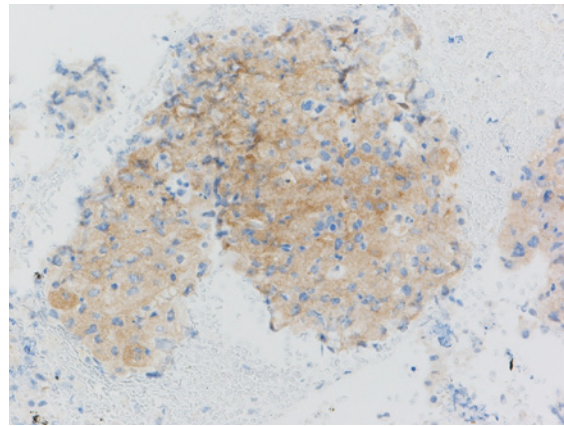
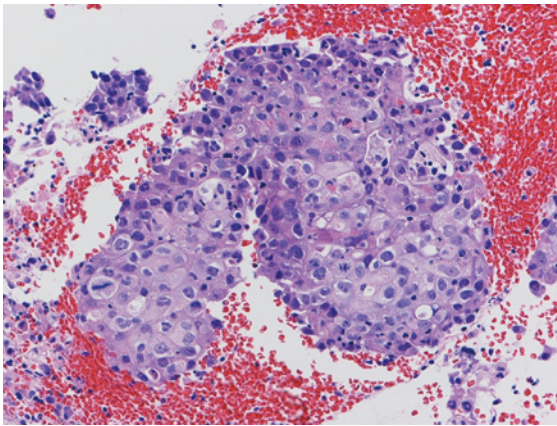
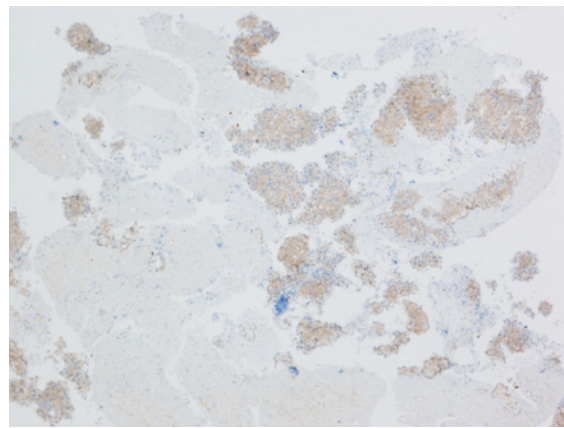
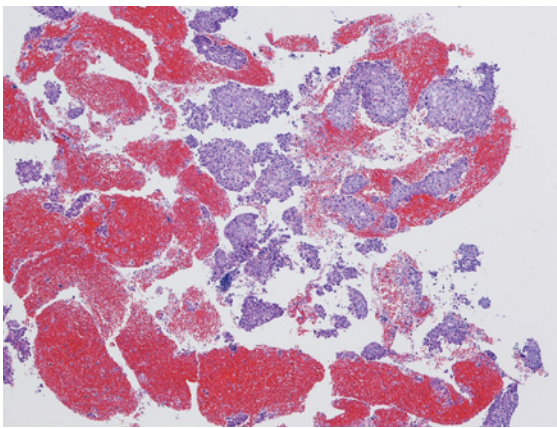
【図6】 BRAF V600E変異が検出された切除検体におけるBRAF V600E(VE1)免疫染色像。腫瘍細胞にややぼんやりとした陽性像が観察される。正常気管支上皮の刷子縁に強い交差反応も認められる。



【図7】 気管支鏡生検組織におけるBRAF V600E陽性肺癌のBRAF V600E(VE1)免疫染色像。弱~中等度の染色強度を示すが、腫瘍細胞に一樣に反応が観察されるとともに、刷子縁を除く気管支上皮は完全な陰性像を示す。



【図8】胸水セルブロックに出現したBRAF V600E陽性肺腺癌のBRAF V600E (VE1)免疫染色像。腫瘍細胞に均一な陽性像が観察される。



【図9】染色強度としては弱い、ひまん性に陽性反応が見られ、BRAF V600E変異が示唆される。遺伝子検査を施行すべき症例と評価された。

まとめ

ALKのコンパニオン診断薬はFISHであったが、免疫染色の分析学的妥当性が多くの論文で示され、追加されたのは2017年のことである。ALK免疫染色では感度・特異度ともに高い値を示したため、免疫染色の大きなアドバンテージである少ない未染標本で数日以内の結果取得が可能という点もあり、より多くの検査が免疫染色によって行われている。ROS1、BRAF V600E免疫染色はALK染色のような特性を示さないが、少なくともトリアージとしての使用によって臨床医の再検査への意欲をもたらすには十分な効果が得られる。そのためには、至適化された状態で精度管理を行いながら用いる必要があるのはいうまでもない。

文 献

- 1 | Conde E, Hernandez S, Martinez R, et al. Assessment of a New ROS1 Immunohistochemistry Clone (SP384) for the Identification of ROS1 Rearrangements in Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma: the ROSING Study. *Journal of Thoracic Oncology* 2019;14:2120-2132.
- 2 | Hofman V, Rouquette I, Long-Mira E, et al. Multicenter Evaluation of a Novel ROS1 Immunohistochemistry Assay (SP384) for Detection of ROS1 Rearrangements in a Large Cohort of Lung Adenocarcinoma Patients. *J Thorac Oncol* 2019;14:1204-1212.
- 3 | Huang RSP, Smith D, Le CH, et al. Correlation of ROS1 Immunohistochemistry With ROS1 Fusion Status Determined by Fluorescence In Situ Hybridization. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2020;144:735-741.
- 4 | Davies K, T. Le A, Jamie Sheren, et al. Comparison of Molecular Testing Modalities for Detection of ROS1 Rearrangements in a Cohort of Positive Patient Samples. 2018;13:1474-1482.
- 5 | Ryma Benayed, Michael Offin, Kerry Mullaney, et al. High Yield of RNA Sequencing for Targetable Kinase Fusions in Lung Adenocarcinomas with No Mitogenic Driver Alteration Detected by DNA Sequencing and Low Tumor Mutation Burden. 2019;25:4712-4722.
- 6 | 日本肺癌学会バイオマーカー委員会. 肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の手引き, 2019年12月23日 第 1.1 版. Available at <https://www.haigan.gr.jp/uploads/files/NGS%E3%82%AC%E3%82%A4%E3%83%89%E3%83%A9%E3%82%A4%E3%83%B3%20%E7%90%86%E4%BA%8B%E4%BC%9A%E6%89%BF%E8%AA%8D%20-%201.1%281%29.pdf>.
- 7 | Roskoski R Jr. Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in humancancers. *Pharmacol Res.* 2018 Sep;135:239-258.
- 8 | Toon CW, Walsh MD, Chou A, et al. BRAFV600E Immunohistochemistry Facilitates Universal Screening of Colorectal Cancers for Lynch Syndrome. *The American journal of surgical pathology* 2013;37:1592-1602.
- 9 | Long GV, Wilmott JS, Capper D, et al. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *The American journal of surgical pathology* 2013;37:61-65.
- 10 | Lasota J, Kowalik A, Wasag B, et al. Detection of the BRAF V600E Mutation in Colon Carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 2014;38:1235-1241.
- 11 | Ilie M, Long E, Hofman V, et al. Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAFV600E mutation in primary lung adenocarcinoma Caucasian patients. *Ann Oncol* 2013;24:742-748.
- 12 | Seto K, Haneda M, Masago K, et al. Negative reactions of BRAF mutation-specific immunohistochemistry to non-V600E mutations of BRAF. *Pathology International* 2020;70:253-261.