

## Q&A

### KRAS Mutation Detection: A New Look at an Old Gene

Joel A. Lefferts<sup>1</sup> and Gregory J. Tsongalis<sup>2</sup>

## Q&A

### KRAS 遺伝子変異検査：古くから知られる遺伝子の新展望

特殊な受容体と特殊なシグナル変換経路をターゲットにした新規治療法として、低分子薬剤およびヒトモノクローナル抗体の導入は、以前腫瘍形成過程に含まれるものとして同定された遺伝子への興味を新たにしました。これらの遺伝子の最初は、ヒト肺癌で増幅される上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーの一員の、ERBB2<sup>3</sup> [v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)] 癌遺伝子（HER2 としても知られている）でした。この遺伝子に対する診断における関心は、初めての細胞受容体に対するモノクローナル抗体療法として創薬されたハーセプチンのターゲットとなるまでは、ピークに達しませんでした。同様に EGFR は結合ドメインをターゲットにしたモノクローナル抗体療法と、チロシンキナーゼ活性を阻害する低分子薬剤の両方のターゲットとなりました。KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) は、EGFR 経路で主として働く既知の癌遺伝子である。この癌遺伝子の変異は様々なタイプのヒトの癌と関係していることが知られていますが、最近になって治療法の選択肢を決定する一つのメカニズムとして、臨床研究室やヘルスケア提供者にとって魅力的なバイオマーカーとなっています。KRAS 変異検査は結腸直腸癌患者のスタンダードな精密検査の一部となっており、一つの KRAS 変異を抱えるこれらの腫瘍は、抗 EGFR 治療に対して反応しないことが証明されています。臨床研究としての KRAS 変異検査の実施は、US では四人の病理学者と四ヶ所の一流医療施設の癌専門医の下で検査されます。

**KRAS 変異検査は、あなたの施設で日常的に行われていますか？もしもそうならば、臨床学的な意義は何かですか？もしもそうでないならば、実施に際し影響される障害は何ですか？**



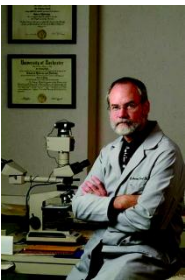
**Arief A. Suriawinata<sup>4</sup>**： 結腸直腸癌における KRAS 検査は、我々の施設でセツキシマブやパンチツムマブなどの抗 EGFR 治療が検討されている患者に対して日常的に実施されています。腫瘍学者が進行した結腸直腸癌患者に対しての二次的治療として、抗 EGFR 治療法を検討しているとき、彼らは KRAS 変異分析を依頼する責任を負っています。そのとき病理学者は適切な組織片を特定し、検査のため分子病理研究室にそれらを運びます。また、KRAS 検査は、すべての肺腺癌のケースでも実施されています。



**William K. Funkhouser<sup>5</sup>**: 我々は一部の結腸直腸癌や非小細胞肺癌で、抗 EGFR 抗体（結腸直腸）、もしくは抗 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（肺）による治療を検討している患者に対して、一般的に KRAS 変異スクリーニングを実施しています。



**Marc Ladanyi<sup>6</sup>**: はい、我々は二つの臨床学的背景、すなわち肺腺癌と転移性結腸直腸癌に対して、日常的に KRAS 変異検査を実施しています。前者においては、すべてのケースで初めに EGFR 変異を検査し、もしも陰性ならば、KRAS 検査に進みます。EGFR と KRAS 変異は、肺腺癌においては相互排他的です。多くの場合は再発する可能性があるので、我々はすべての切除した肺腺癌を検査します。一般的なほとんどの結腸直腸癌は外科的に治癒できるので、転移性結腸直腸癌のみを検査しています。



**Jan A. Nowak<sup>7</sup>**: 今のところ、検体は KRAS 検査の推薦研究室に送られています。KRAS 検査のリクエストは、結腸直腸癌患者の治療法の選択を決定する腫瘍専門医からきています。我々の研究室は、まもなく導入される KRAS 検査の分析の妥当性を確認している段階です。



**J. Marc Pipas<sup>8</sup>**: 我々の機関では、胃腸腫瘍学グループは抗 EGFR 治療が検討されている転移性結腸直腸癌患者全てにおいて、KRAS 変異検査を定期的実施しています。これは 2009 年に発行された、アメリカ臨床腫瘍学暫定臨床検査学会のガイドラインに準拠しています。KRAS 遺伝子変異を持った患者に対して、EGFR 阻害剤の反応の欠落がみられたならば、抗 EGFR 療法はこのグループでは適切ではありません。

■ どのようなタイプの治療法の決定が KRAS 結果に基づいており、また患者の腫瘍のレトロスペクティブ分析は許可されているのでしょうか？

**Arief A. Suriawinata**: 抗 EGFR 療法で患者を治療することに対する決定は、KRAS 遺伝子変異の結果に強く依存しています。例えば、抗 EGFR 療法は野生型 KRAS を持った患者にのみ投与されています。腫瘍特性に関するレトロスペクティブ研究は KRAS 変異の状況を予測し、KRAS 変異に関連した特異的な組織学的特徴を理解するのに役立つかもしれません。例えば、結腸直腸癌における我々の最近の研究では、大多数の持続性既存絨毛線種を持った結腸直腸癌が KRAS 変異陽性でした。

**William K. Funkhouser:** 活性化 KRAS 変異を持った結腸直腸癌患者は、抗 EGFR 抗体での治療に反応しないことが試験データから示されました。一次療法に反応しなかった癌患者は、パラフィン片から抽出された DNA テンプレートをを使用することで、コドン 12、13、61 の活性化 KRAS 変異存在下でレトロスペクティブに検査されます。

**Marc Ladanyi:** KRAS 変異は肺腺癌と結腸直腸癌の両方における EGFR をターゲットにした療法に、とても強い負の予測因子反応を示します。もしも今のサンプルが検査に適していないならば、患者の初期の外科サンプルのレトロスペクティブ分析が役立ちます。なぜならば、KRAS 変異は診断で一般的に存在し、病気の過程を通して維持されているためです。もちろん、二次的、もしくは多数の初期癌の可能性は留意しておかなければなりません。

**Jan A. Nowak:** 多くの研究では、KRAS コドン 12 と 13 の変異を抱えた転移性結腸直腸癌患者に対しては、セツキシマブやパンチツムマブによる治療に役立たないことが示されています。腫瘍が野生型コドン 12 と 13 配列である患者は、一部これらの薬剤への応答を示します。そのような療法を開始した患者では、KRAS 検査がこれらの薬剤の継続的使用の可能性を決定するのに役立つでしょう。

**J. Marc Pipas:** 野生型 KRAS の場合は欠くことができませんが、転移性結腸直腸癌患者における EGFR 阻害剤の応答は十分ではありません。また、変異した KRAS [and BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)] は全生存の低下と関係していることが示されています。結腸直腸癌患者のおおよそ 40% の腫瘍標本が、KRAS 変異を起こしているだろうから、KRAS 変異分析は抗 EGFR 療法を検討する際に重要です。KRAS 変異が現れている腫瘍を持った患者はその他の治療を検討するべきです。残念ながら、これは治療選択肢の限界ですが、KRAS 変異した腫瘍を持った患者に、特異的に対処した臨床試験は現在展開されています。

**不均一な腫瘍での体細胞変異の検出には問題があります。このことは検査結果の解釈にどのような影響がありますか？**

**Arief A. Suriawinata:** 我々は KRAS 検査において、最も腫瘍細胞を代表する部分を選択することに最善を尽くしている際に、稀な腫瘍細胞の不均一性が、わずかな分化の異なった系列を持った、多数の結腸直腸癌で問題になることに気付きます。また、KRAS 検査はもしも腫瘍の不均一性が疑われたならば、最も進行的なクローンに現れると思われる転移癌を用いて実施されます。我々の研究室は野生型と変異合成オリゴヌクレオチドが 95 : 5 で構成される 7 つの変異株と、それぞれの 5% コントロールを使用します。同じ腫瘍の中で多数の KRAS 変異の検出を報告している研究室に対する私の懸念は、腫瘍の不均一性に対して通常変異した (コドン 12 と 13) 塩基が非常に近くにあるために、分析性能でいくつかの技術的な課題がないかどうかということです。

**William K. Funkhouser:** 野生型と変異 KRAS DNA の日常的な混合は、コドン 12、13、61 の点突然変異の検出にとっては、高感度測定の必要性を意味しています。我々はスパイクした 5% ポジティブコントロールを使用し、点突然変異の検出にはピロシークエンシングを使用しています。サンガーシークエンシングはあまり感度が良くなく、融解曲線分析はコンフォーマトリーシークエンシングを必要とするでしょう。

**Marc Ladanyi:** 我々の経験では、KRAS 変異（もしくは EGFR 変異）のような重要な遺伝子変化は、めったに生来の腫瘍内の不均質性を示しません。KRAS 変異のための明らかな腫瘍内の不均質性に関連した多くの状況は、実際には腫瘍内の変化する領域での検査で現れます。いくつかは検査方法（一般的なサンガーシーケンシング）の感度を下げているかもしれません。その他の KRAS 変異の不均質性事例は、別々の原発性を意味しているかもしれません。我々はそれぞれ異なった変異（EGFR や KRAS）を含む、多発原発性肺腺癌の患者をみてきました。

**Jan A. Nowak:** 私は、誰も体系的に大腸腫瘍での KRAS 変異に関して、潜在的な腫瘍の不均質性の争点を述べられないと思います。十分なデータが出るまで、このことは仮説に基づいた問題として留めましょう。しかしながら、おおよそ 30-40% の結腸腫瘍が KRAS 変異を持ち、これらの腫瘍が上記で述べた抗 EGFR 薬剤に対して反応しそうでないことがわかっています。手法と目的が KRAS-EGFR 測定と同様ならば、同様な結果が出ると予測されるべきです。これらは現在、研究室が実施している分析です。腫瘍微小不均一性は一要因として示されるべきならば、KRAS 検査結果の解釈はそれを考慮しなければなりません。著しい KRAS 不均質性を示す腫瘍が、抗 EGFR 療法に対して異なった反応をするかどうかはわかりません。

**J. Marc Pipas:** 我々の機関では、リアルタイム PCR と、TaqMan プローブを利用した体細胞 KRAS 変異検査を実施した経験があります。我々はこれがわかりやすく使いやすく、しかもしっかりとした方法であることを示してきています。この方法では、アルコール系固定液で保存された細針吸引サンプルからの物質と同様に、パラフィン包埋組織標本を使うことで低容量検査として使用できます。我々はこのアプローチが広く臨床検査で手頃なものになることを信じています。

#### **KRAS 変異検査は他の腫瘍タイプにまで拡張されると思いますか？**

**Arief A. Suriawinata:** 他の腫瘍タイプでの検査は、もしも治療がこれら他の腫瘍タイプのシグナル変換を標的とすることができるときにのみ行われるでしょう。EGFR は他の腫瘍でも重要な役割を果たしているため、この試みはかなり実現性があります。

**William K. Funkhouser:** KRAS 変異スクリーニングは、抗体もしくはチロシンキナーゼ阻害剤を用いたアップストリームキナーゼ治療が考慮される、いくつかの悪性腫瘍で検討されるべきです。BRAF 変異スクリーニングも、活性化 BRAF 変異が抗 EGFR 治療に反応しなかったならば考慮すべきです。

**Marc Ladanyi:** 現在、KRAS 変異は EGFR 標的療法への応答の負の予測因子として使われており、検査を受けた腫瘍タイプでは EGFR 標的療法がすでに広く使用されています。例えば肺腺癌や結腸直腸癌があげられます。しかしながら、KRAS 変異癌自身への標的アプローチは様々な段階の臨床開発中であり、より広い領域での腫瘍組織での KRAS 検査の拡張を推し進めています。

**Jan A. Nowak:** KRAS 変異が、EGFR シグナル経路のダウストリーム活性化因子になっているかもしれません。おそらく、これらの変異が EGFR アンタゴニストの効果を回避するメカニズムと推察されるからです。非小細胞肺癌において、KRAS 変異と EGFR 変異は報告によれば、互いに排他的ではありません。KRAS 変異検査は非小細胞肺癌における EGFR 経路の評価のためのアルゴリズムの一部になりがちです。

**J. Marc Pipas:** KRAS 検査は EGFR-MAPK シグナル経路 (BRAF のような) 、その他の成分の検査と同様に、他の腫瘍タイプや臨床状況で評価され続けるでしょう。また、腫瘍代謝経路で他の成分が発見されると、これらは他の様々な癌における有力な予知、予測因子として必ず追求されるでしょう。

(訳者：小治 健太郎)

## 謝辞

**Author Contributions:** All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

**Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest:** No authors declared any potential conflicts of interest.

**Role of Sponsor:** The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, or preparation or approval of manuscript.

## 脚注

1 Joel A. Lefferts, Postdoctoral Fellow, Molecular Pathology and Translational Research Program, Department of Pathology, Dartmouth Medical School, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH.

2 Gregory J. Tsongalis, Director of Molecular Pathology and Translational Research Program, Department of Pathology, Dartmouth Medical School, Dartmouth-Hitchcock Medical Center and Norris Cotton Cancer Center, Lebanon, NH.

3 Human genes: ERBB2, v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian); KRAS, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1.

4 Arief Suriawinata, Section Chief of Anatomic Pathology, Associate Professor of Pathology, Department of Pathology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH.

5 William K. Funkhouser, Professor, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Director of Anatomic and Surgical Pathology, UNC Hospitals, University of North Carolina, Chapel Hill, NC.

6 Marc Ladanyi, Attending Pathologist and Chief of Molecular Diagnostics Service, Department of Pathology, Member, Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.

7 Jan A. Nowak, Director of Molecular Diagnostics Laboratory, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Evanston Hospital NorthShore University HealthSystem, Evanston, IL.

8 J. Marc Pipas, Associate Professor, Department of Medicine, Director GI Oncology Program, Dartmouth Medical School and Norris Cotton Cancer Center, Lebanon, NH.