

NCCオンコパネルの特徴 -この検査でわかること-

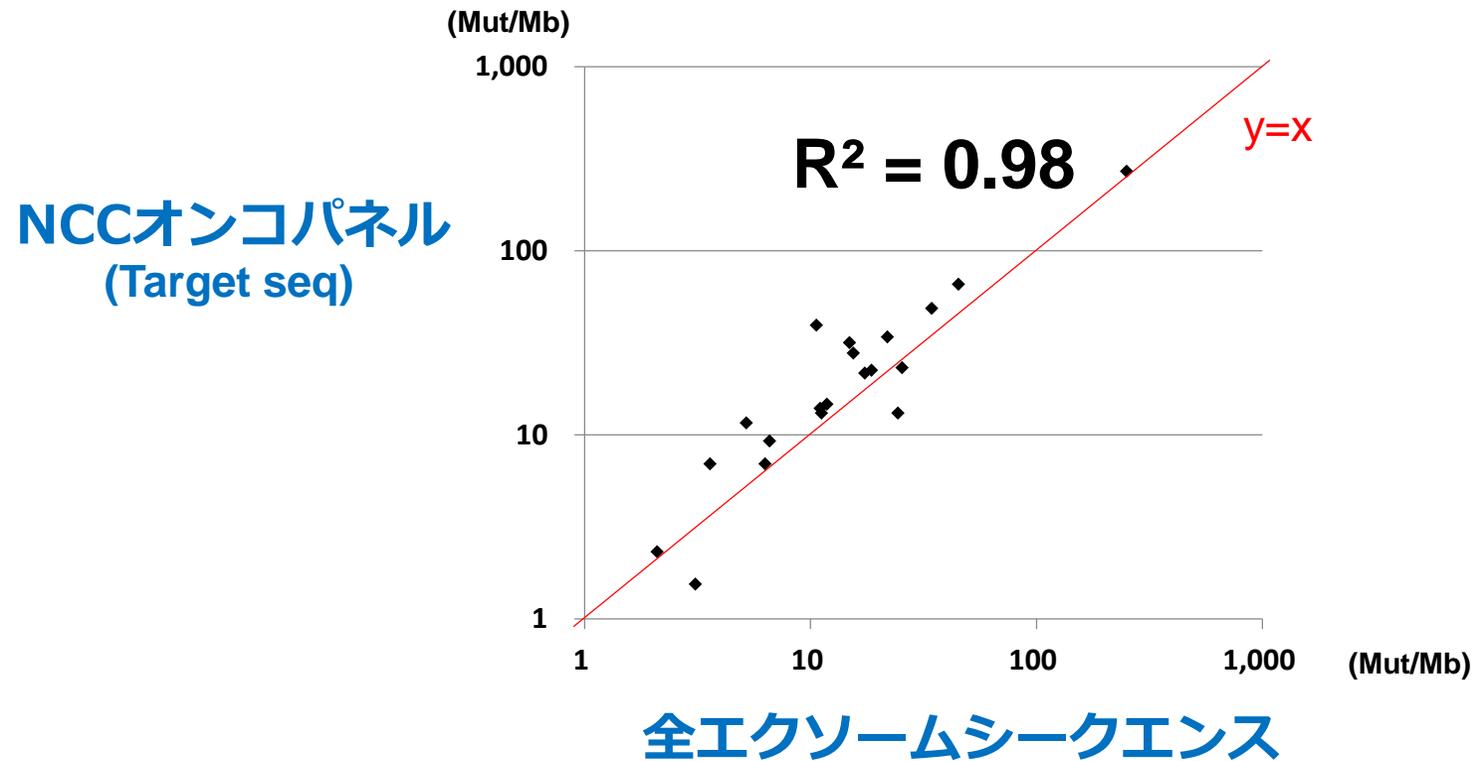
国立がん研究センター中央病院 臨床検査科
角南 久仁子

NCCオンコパネル 搭載遺伝子

114 遺伝子 変異・増幅 (全エクソン)			12 遺伝子 融合		
ABL1	CRKL	IDH2	NF1	RAC2	ALK
ACTN4	CREBBP	IGF1R	NFE2L2/Nrf2	RAD51C	AKT2
AKT1	CTNNB1/b-catenin	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		

- 114遺伝子：
 - ・ 遺伝子変異 (SNV/Indel)
 - ・ コピー数変化 (増幅, 欠失)
- 12遺伝子：
 - ・ 遺伝子融合
- 腫瘍変異負荷推定 (TMB)
- 13遺伝子 (網掛):
 - ・ 生殖細胞系列の遺伝子変異 (病的バリエーションに限る)

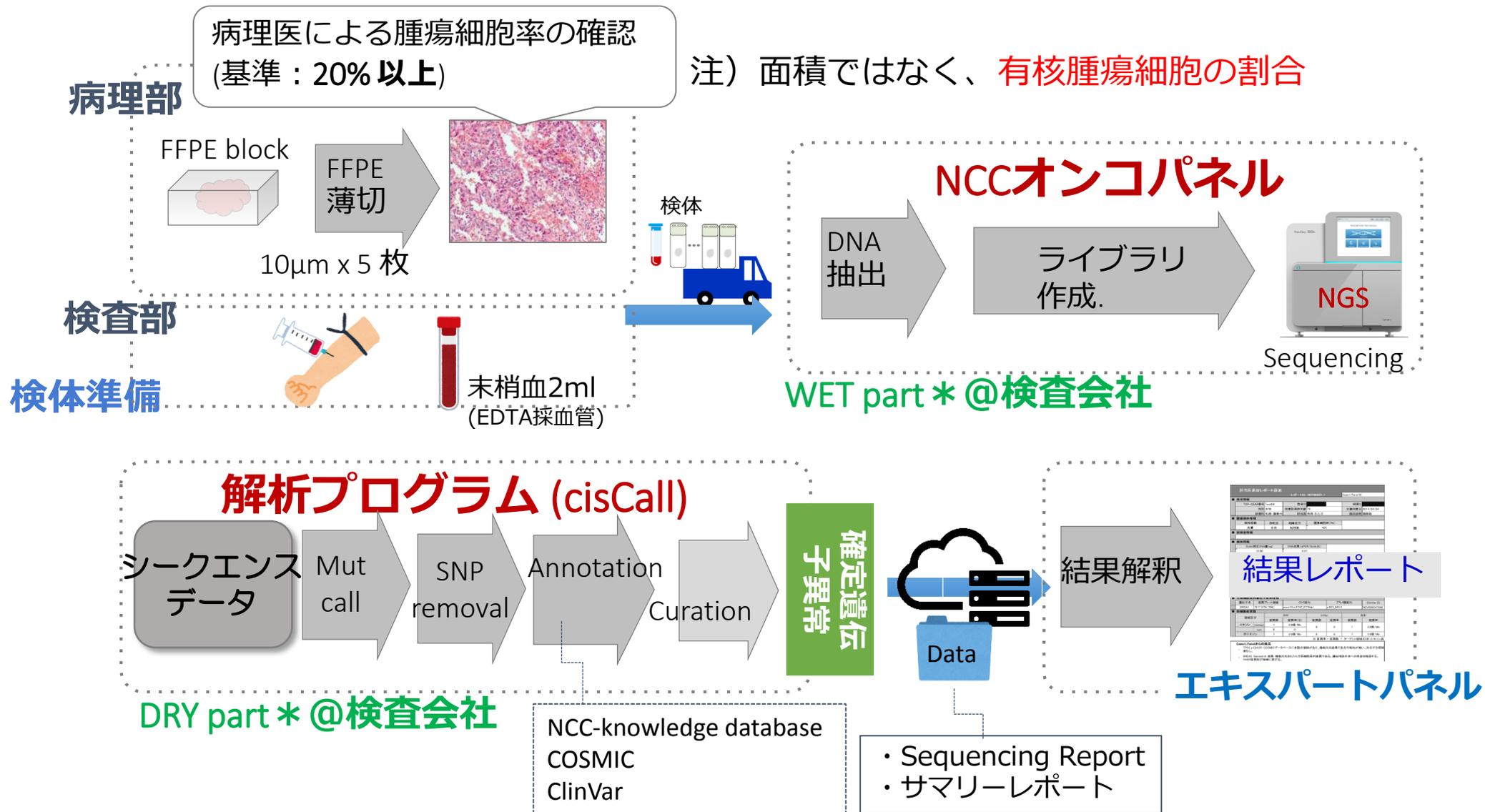
腫瘍変異負荷 (TMB: No. of Mut/Mb) 推定能の評価



全エクソームシーケンス解析済の肺、乳、卵巣がん20例についてNCCオンコパネル解析を実施。
NCCオンコパネルのTMB推定値と高い相関を示した。

(Saito et al., Cancer Res, 2015; Kanke et al., Oncotarget, 2017; Honda et al., in press)

OncoGuide™ NCCオンコパネルシステムのワークフロー概要



結果レポート : Sequencing Report①

OncoGuide™ NCC オンコパネル システム

シーケンシングレポート

検査会社受付ID: TRK00010

■ サンプル情報

サンプル 検体識別番号 : PTI00010(tumor_sample, normal_sample)

■ 腫瘍組織シーケンシング解析情報

パネル	NCC oncopanel
試薬	OncoGuide NCC オンコパネル キット
解析プログラム実行日	2019/08/09
リードデータ名	tumor_sample
総リード数	33,999,196
リードマッピング率 (%)	87.65
デュPLICATION率 (%)	50.64
Discordance率 (%)	0.00
Mismatch率 (%)	0.00
Deletion率 (%)	0.00
読取深度平均値	1,414.1
読取深度中央値	1,302.0
インサートサイズ平均値	199.5
インサートサイズ中央値	199.0

■ 非腫瘍細胞シーケンシング解析情報

パネル	NCC oncopanel
試薬	OncoGuide NCC オンコパネル キット
解析プログラム実行日	2019/08/09
リードデータ名	normal_sample
総リード数	36,693,480
リードマッピング率 (%)	87.59
デュPLICATION率 (%)	46.15
Discordance率 (%)	0.00
Mismatch率 (%)	0.00
Deletion率 (%)	0.00
Insertion率 (%)	0.00
読取深度平均値	1,672.6
読取深度中央値	1,539.0
インサートサイズ平均値	199.5
インサートサイズ中央値	199.0

■ データ解析

モジュール	cisCall-7.1.8, cisGermline-1.0.1, cisAnnotate-1.1.5, cisReport-1.0.3
データセット	Dataset-1.02-190717
遺伝子異常選択条件 (SNV, InDel)	Exon/Splicing, -Syn, -SNP(+COSMIC), VAF>=0.05
遺伝子異常選択条件 (CNV)	CNR>=4.0
遺伝子異常選択条件 (Fusion)	target

シーケンス解析情報
腫瘍組織

平均読み取り深度など

シーケンス解析情報
正常組織

データ解析

解析パイプラインのversion情報、各異常の検出条件。

・ NGS解析に関する情報と遺伝子異常候補を記載。

・ 検出された遺伝子異常のうち、**病的遺伝子異常の可能性のあるもの**を記載している。

・ 遺伝子多型の可能性が極めて高い (いずれかのSNPデータベースにおいて**頻度1%以上**で登録がある) 場合は記載されない。

・ **意義不明変異**、rare SNP (頻度1%未満) が含まれる。

結果レポート : Sequencing Report②

遺伝子変異の記載例

2	遺伝子名 (Ensemble Expression ID)	BRCA2(COSMIC-R, ENST00000380152)
	変異種類	frameshift deletion
	物理位置 (染色体 : 塩基番号)	13:32,903,605
	遺伝子コピー数比 (補正リード数比)	1.00
	変異アレル頻度 (%)	47.5 (95/200)
	CDS変化	exon8:c.657_658delTG
	アミノ酸変化	V220fs*4
	COSMIC ClinVar登録ID	- RCV000009929.4
	COSMIC ClinVar登録数	- 10
	COSMIC Status ClinVar Significance	- Pathogenic
	SNPデータベース	ExAC
	検出方法	gatk
3	遺伝子名 (Ensemble Expression ID)	ERBB2
	変異種類	amplification
	物理位置 (染色体 : 塩基番号)	17:37,844,337-37,884,915
	遺伝子コピー数比 (補正リード数比)	8.81
	変異アレル頻度 (%)	-
	CDS変化	-
	アミノ酸変化	-
	COSMIC ClinVar登録ID	-
	COSMIC ClinVar登録数	-
	COSMIC Status ClinVar Significance	-
	SNPデータベース	-
	検出方法	matched

⋮

■ 生殖細胞系列遺伝子変異情報

BRCA2 V220fs*4

COSMICおよびClinVarデータベース上での登録状況。
各データベース上におけるID, 登録数, 付加情報が記載されている。

COSMIC Status: 体細胞変異としての確認の有無

Confirmed_somatic_variant - 確認済み

Variant_of_unknown_origin - 未確認

ClinVar Significance: 変異の臨床的意義

Pathogenic, Likely pathogenic - 病的変異(とおもわれる)

Uncertain_significance - 病的な可能性はあるが証拠不足

Likely_benign, benign - 病的変異ではない(なさそう)

変異を検出した解析プログラムのコンポーネントが判る。

- matched: 患者正常検体との比較において検出 = 体細胞変異
- known(somatic): 体細胞変異として検出 (既報の重要バリエーション)
- known(germline): 生殖細胞系列変異として検出 (同上)
- gatk: 生殖細胞系列変異として検出

生殖細胞系列変異の候補はレポートの最下段にて別途まとめて記載される。(頻度1%未満のrare SNPも含む。)

結果レポート : Sequencing Report③

コピー数変化

3 遺伝子名 (Ensemble Expression ID)	ERBB2	CDKN2A
変異種類	amplification	homozygous deletion
物理位置 (染色体 : 塩基番号)	17:37,844,337-37,884,915	9:21,967,751-21,994,490
遺伝子コピー数比 (補正リード数比)	8.81	0.32
変異アレル頻度 (%)	-	-
CDS変化	-	-
アミノ酸変化	-	-
COSMIC ClinVar登録ID	-	-
COSMIC ClinVar登録数	-	-
COSMIC Status ClinVar Significance	-	-
SNPデータベース	-	-
検出方法	matched	matched

遺伝子コピー数比を計測、検出している。
各遺伝子領域全体を評価しており、部分欠失は検出しない。

注意点 :

- ・ 腫瘍細胞率を反映してはいない。
- ・ 欠失は常にhomozygous deletionの記載になる。

コピー数変化の検出条件

- ・ 増幅 ≥ 4
- ・ 欠失 < 0.5

遺伝子融合

4 遺伝子名 (Ensemble Expression ID)	ROS1 CD74
変異種類	fusion
物理位置 (染色体 : 塩基番号)	6:117,609,529-5:149,782,197
遺伝子コピー数比 (補正リード数比)	30/85 71
変異アレル頻度 (%)	35.29
CDS変化	-
アミノ酸変化	-
COSMIC ClinVar登録ID	-
COSMIC ClinVar登録数	-
COSMIC Status ClinVar Significance	-
SNPデータベース	-
検出方法	target

ゲノム配列の融合を確認している事から、
遺伝子の順番が逆に表記される場合がある。
既知の知見を確認する必要あり。

結果レポート：サマリーレポート

OncoGuide™ NCC オンコパネル システム
サマリーレポート

検査会社受付ID: TRK00010 Expert Panel 予定日:

■ サンプル情報
サンプル 検体識別番号: PTI00010(tumor_sample, normal_sample)

■ 遺伝子変異情報

遺伝子名	変異アレル頻度	CDS変化	アミ/酸変化	COSMIC ID (登録数)
EGFR**	11.7(58/494)	exon19c.2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223(971)
BRCA2**	47.5(95/200)	exon8c.657_658delTG	V220fs*4	(-)

■ 遺伝子増幅・欠失情報

遺伝子名	遺伝子コピー数 (補正リード数比)
ERBB2	amplification*8.81 (Control Depth:252)

■ 遺伝子再構成 (融合) 情報

遺伝子名	物理位置
ROS1 CD74	Fusion 6:117,609,529-5:149,782,197
CD74 ROS1	Fusion 5:149,782,198-6:117,645,578

■ 体細胞変異数 **リード数が閾値を下回った変異です

領域区分	SNV		InDel		合計		
	変異出現数	変異出現率**	変異出現数	変異出現率**	変異出現数	変異出現率**	
エキソン	nonsyn	0	0.0 /Mb	2	5.6 /Mb	2	5.6 /Mb
	syn	0	0.0 /Mb				
非エキソン		0	0.0 /Mb	0	0.0 /Mb	0	0.0 /Mb
領域全体		0	0.0 /Mb	2	1.6 /Mb	2	1.6 /Mb

**変異出現率=1Mbpあたりの変異数

解析レポート:
 ・EGFR:E746_A750delELREA: 既知の活性化変異である。
 ・BRCA2:V220fs*4: 短縮型変異のため機能欠失変異と考えられる。
 ・ERBB2:amplification: 増幅あり。
 ・ROS1|CD74: 遺伝子の再構成が認められる。
 ・CD74|ROS1: 遺伝子の再構成が認められる。

報告書原案作成日: 2019/8/9 確認サイン:

Sequencing Reportに記載されている遺伝子異常から下記が抽出される

体細胞遺伝子変異:

- ・ 既知Druggable変異
- ・ COSMIC DB登録変異
- ・ 短縮型変異、スプライス部位変異 (がん抑制遺伝子)
- ・ 遺伝子増幅 (コピー数比 ≥ 4)
- ・ 遺伝子融合 (・ 遺伝子欠失は記載されない。)

生殖細胞系列遺伝子変異 (病的バリエーションに限る)

<対象遺伝子>
 APC, BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, PTEN, RB1, RET, STK11, SMAD4, TP53, TSC1, VHL

- ・ ClinVarで "Pathogenic"
- ・ 短縮型変異 (がん抑制遺伝子)

サマリーレポートでは区別されない

体細胞変異数

解析レポート

個々の検出遺伝子異常に対し異常の内容が記載される。

- ・ 断定的に記載されているものは変異により機能変化が生じる知見があるもの。
- ・ 既存のコンパニオン診断薬で検出可能な変異については文頭に「既知の」が入る。

■ 使用データベースバージョン

EPDB	20190710_v5.4
refGene	20171218
ensGene	20140406
1000人ゲノム	Phase_3(20130502)
ESP6500	V2-SSA137
ExAC	r0.3.1(20160316)
HGVD	v2.10(20170202)
COSMIC	v71(20180226)
ClinVar	20170905
Except	1.00(20180411)

■ 免責事項
 本検査に基づく解析レポートに関して、医療機関が自己の責任で適応性、妥当性、適時性などを判断の上、活用するものとする。

エキスパートパネル

- **構成員:**

- がん薬物療法の専門的知識をもつ臨床医 (含: 担当医)
- 遺伝医学の専門的知識をもつ医師
- 遺伝医学のカウンセリング技術をもつ者
- 病理医
- 分子遺伝学・ゲノム医療の知識を持つ者
- バイオインフォマティシャン

- **開催要件:**

- 上記構成員の、各該当者がそれぞれ最低1名出席することが求められる
- リアルタイムでの画像を介したコミュニケーションが可能な機器 (=Web会議) も許容される。
- C-CAT登録同意を得た患者については、「C-CAT調査結果」を用いて実施する

エキスパートパネルにおける検討事項の標準化

C-CAT 調査結果

- 検査全体に関して
 - ・ 検体およびデータの品質について
- 各遺伝子異常に関して
 - ① 遺伝子異常に対する生物学的意義付け(がん化能など特定の形質獲得に寄与するかどうかなど)を行う。
 - ② 遺伝子異常に対応する治療薬を確認する。
 - ③ 患者基本情報(年齢・性別・がん種など)を考慮した上で遺伝子異常に対応する具体的な候補薬とエビデンスレベル、および承認状況や治験状況※を踏まえたavailabilityランクを付ける。
 - ※ 日本国内での治験実施状況について定期的に情報収集を行い、遺伝子異常に対応する候補薬を可能な限り探索することが望ましい
 - ④ 必要に応じて③で挙げられた候補薬剤から、患者状態やavailabilityを考慮して、優先的に推奨されるものがあるか等について検討する。
 - ⑤ 診断や予後に関するエビデンスの解釈
 - ⑥ 生殖細胞系列遺伝子異常を認める（または疑われる）場合は、関連するガイドライン・ガイダンス・提言に従い、その意義付け及び対応について検討する。

遺伝子パネル検査の結果で承認薬投与可能に

「遺伝子パネル検査の保険適用に係る留意点について」

厚生労働省保険局医療課（令和元年5月31日）

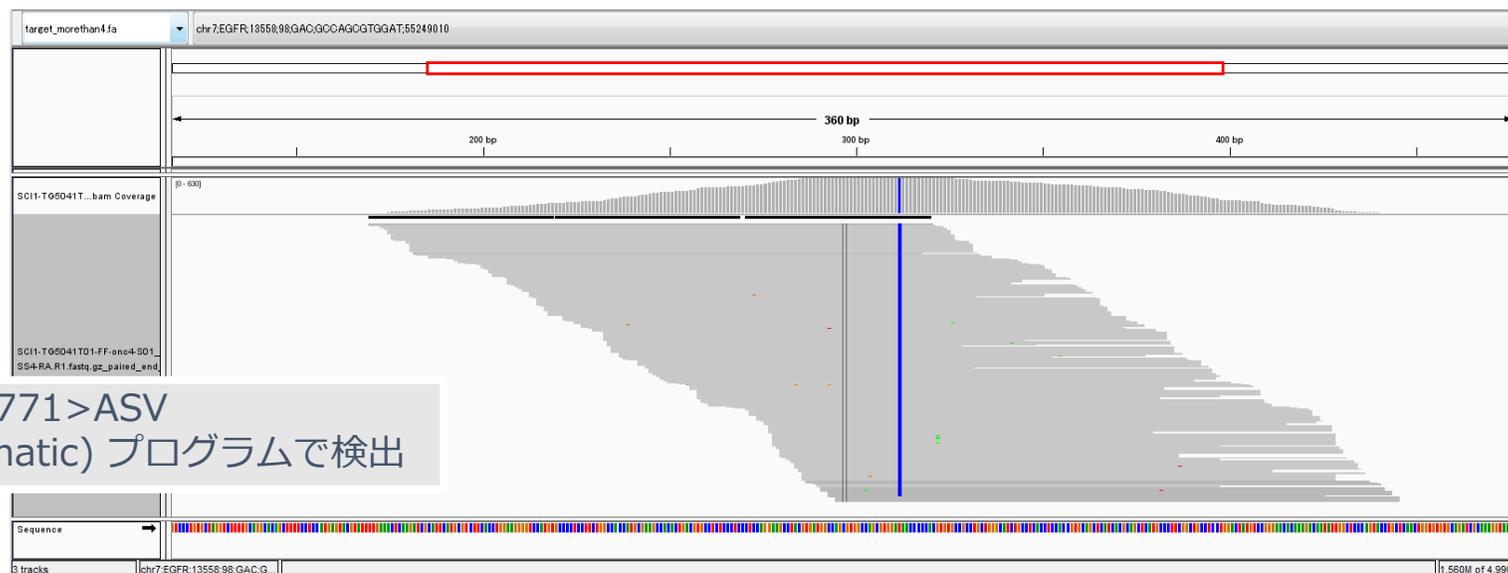
問 「日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会合同 次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドランス（第1.0版 2017年10月11日）」（以下、「3学会ガイドランス」という。）に基づき、遺伝子パネル検査の対象となる患者であって、コンパニオン検査が存在する遺伝子の異常について、当該遺伝子パネル検査を用いて確認された場合、当該遺伝子異常に係る医薬品投与に際して、改めてコンパニオン検査を用いた遺伝子異常の確認を行う必要があるか。

(答) 遺伝子パネル検査後に開催されるエキスパートパネルが、添付文書・ガイドライン・文献等を踏まえ、当該遺伝子異常に係る医薬品投与が適切であると推奨した場合であって、主治医が当該医薬品投与について適切であると判断した場合は、改めてコンパニオン検査を行うことなく当該医薬品を投与しても差し支えない。

なお、この場合の遺伝子パネル検査に用いられる検体は、3学会ガイドランスにおいても「生検等が可能である場合には、遺伝子パネル検査実施のために必要な検体を採取するが、採取困難な場合はこの限りではなく、診断時等の保存検体を使用しても良い。」と記載されていることを踏まえ、再生検が困難な場合には、保存検体を使用しても差し支えない。

従来のコンパニオン診断薬で検出されないrare variantも検出される

EGFR rare variant



例) EGFR p.770_771>ASV
* known (somatic) プログラムで検出

エキスパートパネルでEGFR-TKI投与推奨を検討

No.	Tumor type	Gene	Aberration	CDx detection	EGFR-TKI投与
1	Lung	EGFR	ex20ins, p.773_774>GH	-	N/A
2	Lung	EGFR	ex19del, p.751_759>N	-	Gefitinib, Erlotinib
3	Lung	EGFR	ex19del, p.746_751>I	-	Afatinib
4	Lung	EGFR	ex19del, p.752_759del	-	N/A
5	Lung	EGFR	ex19del, p.746_752>V	-	N/A
6	Lung	EGFR	ex20ins, p.767_768insTLA	-	N/A

必要とされる検体条件

腫瘍組織 (FFPE)

●ご用意いただくFFPE標本について

厚さ10 μ mの切片(未染色FFPE)を5枚程度ご用意ください。

検査不成立やDNA収量不足を避けるため、以下にご留意ください。

- ・スライド中の腫瘍細胞が20%以上であることをご確認ください。
* 腫瘍細胞が20%未満の場合はマクロダイセクションをお考えください。
- ・1スライドあたり16mm²程度の組織を提出してください。
* 4mm²以上の組織であれば本品の推奨インプット量である200ng以上の総DNA量が得られることを確認しておりますが、16mm²程度の組織を推奨しています。

●FFPE標本の取扱い

FFPE標本はホルマリン固定処理により組織中の核酸(DNA)の断片化を伴うため、医療機関の定める方法、または各種のガイドラインに記載の条件に基づいて、適切に取り扱ってください。

酸脱灰した検体はDNAが分解しているため検査不能となる可能性がありますのでご注意ください。

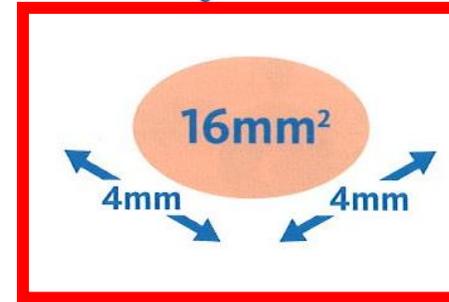
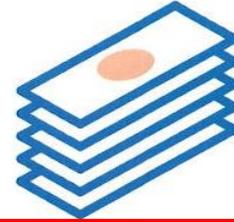
例：ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程(日本病理学会作成)推奨条件

- ・固定には10%中性緩衝ホルマリン十分量を使用してください。
- ・短時間(48時間以内)に固定を完了させてください。
- ・作製後3年以内の標本を使用してください。

●コンタミネーションの防止

切片作製時に別の患者由来FFPE切片とのコンタミネーションを避けるため、以下の操作を行ってください。

- ・検体ごとに毎回新たなマイクロームブレードを使用してください。
- ・ウォーターバスは検体ごとに毎回洗浄してください。
- ・手袋は頻繁に交換してください。



NCCオンコパネルカタログより

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程

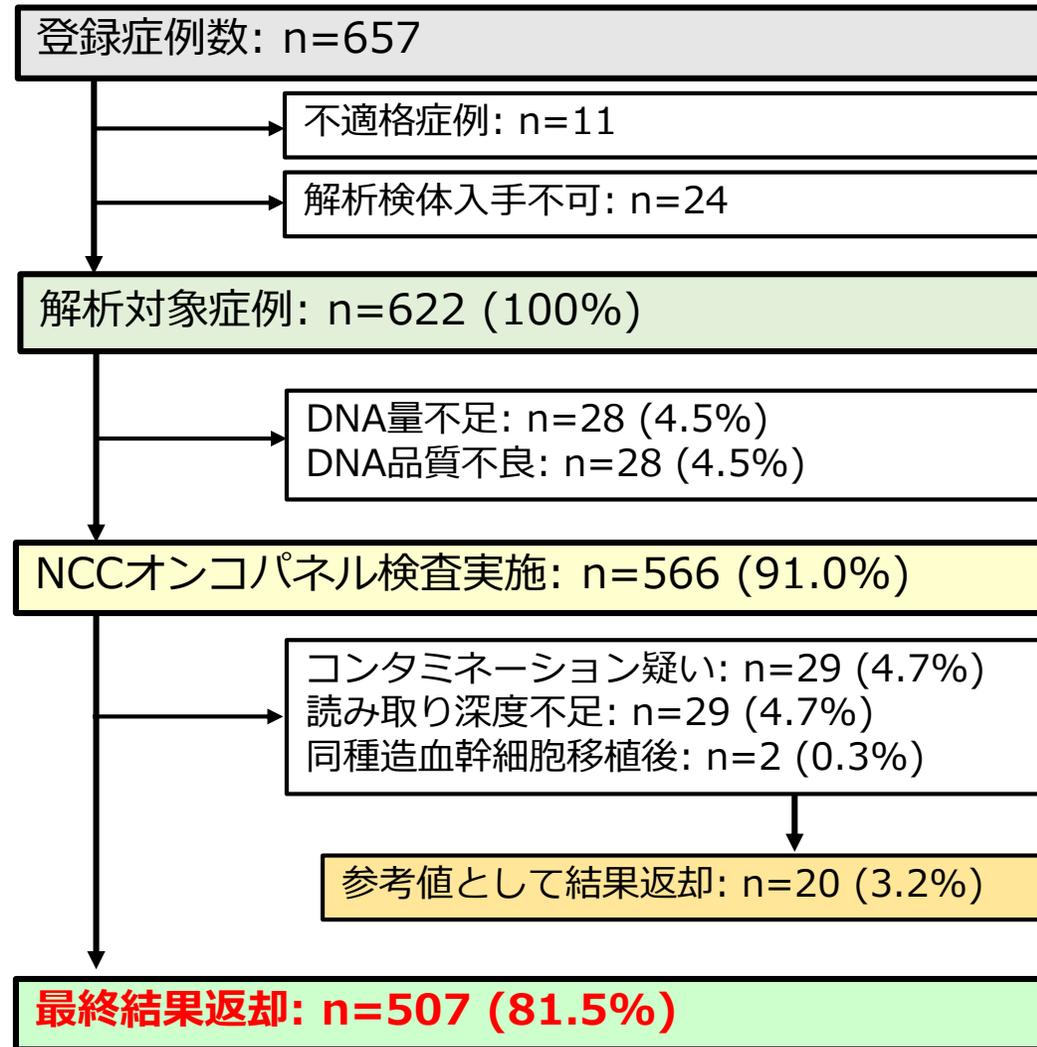
抜粋：

- ・10%中性緩衝ホルマリン溶液を使用
- ・3時間以内に固定
- ・固定時間は6～48時間
- ・脱灰はEDTA脱灰
- ・マイクロームの刃を症例毎に交換
- ・ウォーターバスは検体毎に洗浄

団法人 日本病理学会
Japanese Society of Pathology

当院における解析成功割合

2016.5-2018.3

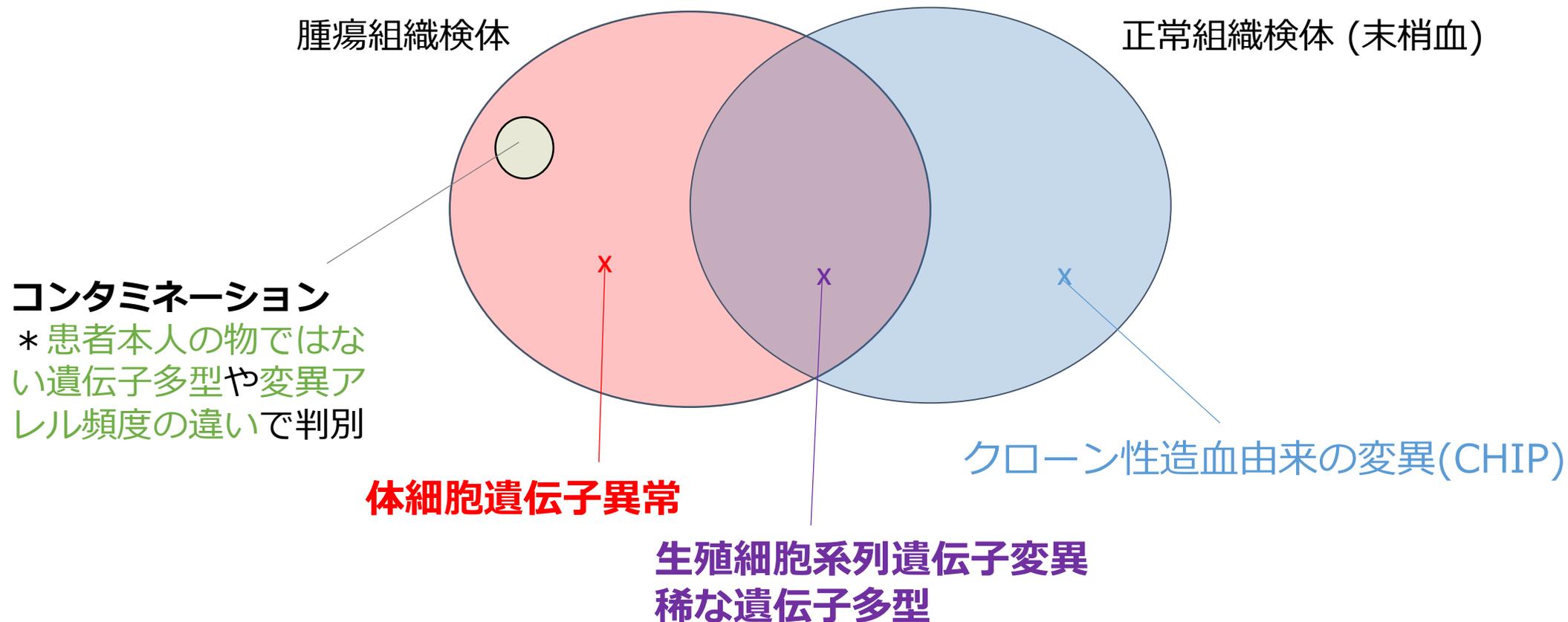


NCCオンコパネルとしての
成功率

$\frac{527}{566}=93.1\%$
(参考値含む)

$\frac{507}{566}=89.6\%$

腫瘍・正常ペア（マッチドペア）解析の利点



利点：
体細胞遺伝子変異と生殖細胞系列遺伝子変異を区別できる
遺伝子多型を除去できる

エビデンスレベル別遺伝子数

治療薬効果のエビデンス	エビデンスレベル分類	オンコパネル
1A	(日本で)当該がん種においてコンパニオン診断薬として薬事承認されている遺伝子異常(既に承認された治療薬がある)	7
1B	当該がん種において ・(日本で未承認だが)FDAにおいて薬事承認されている遺伝子異常 ・(FDAで未承認だが)臨床試験で一貫して有用性が示された遺伝子異常	4
2A	臨床試験の対象患者のうち、一部の集団でのみ有用性を示す結果がある遺伝子異常	6
2B	他のがん種において薬事承認されている遺伝子異常	12
3A	症例報告で有用性を示す結果がある遺伝子異常	15
3B	抗がん薬の治療効果との関連がある遺伝子異常	33
4	がんに関与することが知られている遺伝子異常	11
掲載なし	非該当	30
エビデンスレベル2B以上の遺伝子数		29
エビデンスレベル3A以上の遺伝子数		44

※がん3学会合同ガイダンス（平成29年10月11日別表2）より集計、ただし造血器腫瘍でのエビデンスは除く

NCCオンコパネルの特長：まとめ

- 114遺伝子の遺伝子変異・コピー数変化、および12遺伝子の遺伝子融合が検出可能
- 13遺伝子については遺伝性腫瘍の原因となる生殖細胞系列変異（病的バリエーションに限る）を報告
- Tumor Mutation Burden (TMB) も測定可能
- 比較的小さい検体（生検検体など）でも検査可能
- マッチドペア解析の利点を活かして、まれな遺伝子多型も含めて除外可能

ご清聴ありがとうございました

