

大腸がん患者における  
**RAS** 遺伝子(**KRAS/NRAS** 遺伝子)変異  
の測定に関するガイドンス

第2版 2014年4月

日本臨床腫瘍学会

## RAS 遺伝子変異ガイドンス部会

### 部 会 長

土原 一哉 (国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター トランスレーショナルリサーチ分野)

### 委 員

衣斐 寛倫 (金沢大学 がん進展制御研究所・腫瘍内科)  
落合 淳志 (国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理分野)  
谷口 浩也 (愛知県がんセンター中央病院 薬物療法部)  
馬場 英司 (九州大学大学院医学研究院 九州連携臨床腫瘍学)  
室 圭 (愛知県がんセンター中央病院 薬物療法部)  
谷田部 恭 (愛知県がんセンター中央病院 遺伝子病理診断部)  
山崎 健太郎 (静岡がんセンター 消化器内科)  
吉野 孝之 (国立がん研究センター東病院 消化管内科)  
渡邊 聡明 (東京大学 腫瘍外科・血管外科)

### 評 価 委 員

西尾 和人 (近畿大学医学部 ゲノム生物学教室)  
大津 敦 (国立がん研究センター東病院 臨床開発センター)  
奥坂 拓志 (国立がん研究センター中央病院 肝胆膵内科)  
神田 善伸 (さいたま医療センター 血液科)  
楠本 茂 (名古屋市立大学病院 血液・膠原病内科)  
里内 美弥子 (兵庫県立がんセンター 呼吸器科)  
武田 晃司 (大阪市立総合医療センター 臨床腫瘍科)  
藤原 豊 (国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科)  
水野 聡朗 (三重大学医学部附属病院 腫瘍内科)

**<利益相反事項開示項目>** 該当する場合具体的な企業名(団体名)・職名を記載、該当しない場合は「該当なし」を記載する。

1. 企業等から医薬収入以外の給与・(継続的な業務としての)顧問料・特許使用料として年間100万円以上の支払を受けています。
2. 企業等の効果安全性評価委員または独立データモニタリング委員に就任しています。
3. 企業等の代表者・役員・業務執行者となっているか、もしくは株式・出資金・その他より10%以上の持分を有しています。
4. 企業等から講演料等として年間50万円以上の支払を受けています。
5. 企業等から原稿料等として年間50万円以上の支払を受けています。
6. 研究責任者となっている企業治験に対し、企業等から年間200万円以上の研究費の提供を受けています。
7. 研究責任者となっている委託研究(治験を除く)に対し、企業等から年間200万円以上の研究費の提供を受けています。
8. 研究責任者となっている企業との共同研究(知的財産権についての一定配分が生じる研究)に対し、企業等から年間200万円以上の研究費の提供を受けています。
9. 「名宛人」としてその所属機関に対し年間200万円以上の研究助成(寄付)を受けています。
10. 裁判に際して、企業等からの依頼を受けて、専門的な証言・鑑定・助言・評価・コメント等に対し、年間100万円以上の報酬を得ています。
11. 臨床試験を行っている法人(NPO法人を含む)の代表者である場合は、その法人名と寄付・研究費を受けている企業名を記載して下さい。

下記に、本ガイドランスの作成にあたった委員の利益相反関連事項を開示します。

氏名(所属)	利益相反開示項目					
	開示項目 1 開示項目 7	開示項目 2 開示項目 8	開示項目 3 開示項目 9	開示項目 4 開示項目 10	開示項目 5 開示項目 11	開示項目 6
土原 一哉 (国立がん研究センター)	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
衣装 寛倫 (金沢大学がん進展制御研究所)	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
落合 淳志 (国立がん研究センター東病院・中央病院)	該当なし	該当なし	該当なし	中外製薬	該当なし	該当なし
谷口 浩也 (愛知県がんセンター中央病院)	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
馬場 英司 (九州大学大学院)	該当なし	該当なし	該当なし	大鵬薬品工業	該当なし	該当なし
室 圭 (愛知県がんセンター中央病院)	該当なし	小野薬品工業, ノバルティスファーマ	該当なし	大鵬薬品工業, 武田薬品工業, 中外製薬, メルクセロノ, ヤクルト本社	該当なし	イーライリリー, エーザイ, MSD, 大塚製薬, クインタイルズ・トランスナショナル・ジャパン, 第一三共, 大日本住友製薬, 大鵬薬品工業, 中外製薬, ファイザー, ベーリンガーインゲルハイム, メルクセロノ
谷田部 恭 (愛知県がんセンター中央病院)	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
山崎 健太郎 (静岡県立静岡がんセンター)	該当なし	該当なし	該当なし	武田薬品工業, 中外製薬, ヤクルト本社	該当なし	第一三共, 大鵬薬品工業, 日本イーライリリー, バイエル薬品, メルクセロノ, ヤクルト本社
吉野 孝之 (国立がん研究センター東病院)	該当なし	該当なし	該当なし	武田薬品工業, 中外製薬, メルクセロノ	該当なし	クインタイルズ・トランスナショナル・ジャパン, 第一三共, 大鵬薬品工業, 日本イーライリリー, ヤクルト本社, バイエル薬品, ファイザー
渡邊 聡明 (東京大学)	該当なし	大鵬薬品工業, 中外製薬, プリストル・マイヤーズ	該当なし	大鵬薬品工業, 武田薬品工業, 中外製薬, プリストル・マイヤーズ, メルクセロノ, ヤクルト本社	該当なし	該当なし
大津 敦 (国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター)	該当なし	大鵬薬品工業, ノバルティスファーマ	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
奥坂 拓志 (国立がん研究センター中央病院)	該当なし	ヤクルト本社, オンコセラピー・サイエンス	該当なし	ノバルティスファーマ	該当なし	大塚製薬, 小野薬品工業, 協和発酵キリン, 興和, しずおか産業, 大鵬薬品工業, 武田/バイオ開発センター, 中外製薬, 日本イーライリリー, 日本ベーリンガーインゲルハイム, メルクセロノ, ヤクルト本社
神田 善伸 (自治医科大学附属さいたま医療センター)	該当なし	大鵬薬品工業	該当なし	アステラス製薬, MSD, 協和発酵キリン, 大正富山医薬品, 大日本住友製薬, ファイザー, プリストル・マイヤーズ	該当なし	該当なし
楠本 茂 (名古屋大学病院)	該当なし	該当なし	アステラス製薬, 協和発酵キリン, 大日本住友製薬, 中外製薬	プリストル・マイヤーズ スクイブ	該当なし	該当なし
里内 美弥子 (兵庫県立がんセンター)	該当なし	該当なし	該当なし	大鵬薬品工業, 中外製薬, 日本イーライリリー, ファイザー	該当なし	イーザイ, 小野薬品工業, 協和発酵キリン, 第一三共, 大鵬薬品工業, 中外製薬, 日本イーライリリー, ノバルティスファーマ, ファイザー, プリストル・マイヤーズ
武田 晃司 (大阪市立総合医療センター)	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	イーザイ, 小野薬品工業, 協和発酵キリン, 大日本住友製薬, 大鵬薬品工業, 中外製薬, 日本イーライリリー, 日本ベーリンガーインゲルハイム, 西日本がん研究機構, メルクセロノ
西尾 和人 (近畿大学医学部)	該当なし	該当なし	該当なし	イーザイ, クラフゾスミスクライン, 住友ベークライト, 第一三共, 中薬製薬	該当なし	該当なし
藤原 豊 (国立がん研究センター中央病院)	協和発酵キリン, 塩野義製薬, 第一三共, 東レ日本イーライリリー	該当なし	ファイザー	該当なし	該当なし	該当なし
水野 聡明 (三重大学医学部附属病院)	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし

\*ガイドランス発行から過去2年分の利益相反関連事項を開示しています。  
 ※合併に伴う社名変更などありますが、企業等との経済的関係が発生した時期において記載しています。  
 日本臨床腫瘍学会 利益相反問題管理委員会

## 0. 要約

「大腸がん患者におけるKRAS遺伝子変異の測定に関するガイダンス(第1版)」<sup>1)</sup>は、公開から5年が経過し一定の役割を果たしたものの、大腸がんの治療体系の変化や新たな抗EGFR抗体薬効果予測因子としてのRAS遺伝子(KRAS/NRAS遺伝子)変異に関する知見が報告されたため、より適切にRAS遺伝子の測定を行うためにガイダンスの改訂が必要になった。2013年12月より上記作成委員による改訂作業を開始し、独立した評価委員による評価を2014年2月から3月に行い、以下に示す改訂版を作成した。本ガイダンス改訂版には、抗EGFR抗体薬療法の恩恵を得られない可能性の極めて高い患者群を選別するために行われるRAS遺伝子変異の測定に関する5つの基本的要件が記述されている。

- 1) RAS 遺伝子 (KRAS/NRAS 遺伝子) 変異を有する患者は、抗 EGFR 抗体薬投与により利益 (延命効果、腫瘍縮小) が得られない可能性が高い。そのため現行で KRAS エクソン 2 (コドン 12, コドン 13) 遺伝子変異の測定のみが行われ野生型と判断されている症例に対しても、それ以外の KRAS/NRAS 遺伝子変異の有無を追加測定することが望ましい。
- 2) RAS 遺伝子変異の測定に際し、頻回の測定は不要と考えられる。測定に用いる材料は原発巣でも遠隔転移巣でも良い。測定時期は抗 EGFR 抗体薬の投与前が推奨される。
- 3) 推奨される RAS 遺伝子変異検査法は、ダイレクトシーケンス法 (マニュアルダイセクション併用)、Allele-specific PCR 法などである。
- 4) 推奨される検査材料は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックの薄切標本である。また、薄切標本に対応する HE 染色標本で、検査方法に応じた十分量の腫瘍細胞を確保できることを確認する。
- 5) RAS 遺伝子変異検査は、技術および結果の質が保証された枠組みの下で実施されるべきである。

本ガイダンスは、刻々と進歩する大腸がん治療ならびに RAS 遺伝子を含むバイオマーカーに関する新たな知見により今後も適時改訂されることに留意されたい。

## 1. はじめに

### 1.1 大腸がんと EGFR 経路

上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) はHER1、erbB1とも呼ばれる170kDaの膜貫通型糖蛋白受容体チロシンキナーゼであり、大腸がんの約80%にEGFRの高発現が認められる<sup>2)</sup>。EGFRは、細胞外から上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF)、amphiregulin、epiregulinなどのリガンドが結合すると、EGFRもしくは他のHERファミリー分子との二量体を形成し、細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を介して活性化され、下流へのシグナル伝達が起こる。下流のシグナル経路としてはRAS/RAF/MAPK経路、PI3K/AKT/MTOR経路、JAK/STAT経路などが存在する<sup>3)</sup>。これらEGFR経路は正常組織では細胞分化、増殖、維持に重要な役割を果たす一方、大腸がん組織では機能亢進によりがんの増殖、浸潤、転移、生存、血管新生などに関与している<sup>4)</sup>。

### 1.2 大腸がんに対する抗 EGFR 抗体薬

セツキシマブはEGFRに対するマウス/ヒトキメラ型IgG1サブタイプモノクローナル抗体薬である。細胞膜上のEGFRの抗原エпитープに結合し、リガンドとの結合を阻害することで細胞増殖抑制を生じる。切除不能進行再発大腸がんを対象とした臨床試験で有効性が認められ<sup>5)</sup>、本邦では2008年7月に製造販売承認された。一方、パニツムマブはEGFRに対する完全ヒト型IgG2サブタイプモノクローナル抗体薬である。標準治療不応例を対象とした臨床試験で有効性が認められ<sup>6)</sup>、本邦では2010年4月に製造販売承認された。

### 1.3 RAS 遺伝子と RAS 遺伝子変異

RAS タンパクは 188-189 個のアミノ酸から成る約 21kDa の低分子グアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパクであり、KRAS、NRAS、HRAS の 3 種類のアイソフォームが存在する<sup>7,8)</sup>。EGFR など上流からの刺激により、グアノシン二リン酸 (GDP) が RAS 分子から離れ、代わりに細胞質から GTP が結合することで RAS は活性型となる。活性型 RAS は、RAF、PI3K、RALGDS など 20 種類に及ぶエフェクタータンパクと結合し、下流のシグナルカスケードを活性化する。一方、活性型 RAS は自身のもつ GTP 加水分解活性 (GTPase) により不活性型となる。RAS 遺伝子は、KRAS が 12 番染色体、NRAS が 1 番染色体、HRAS が 11 番染色体に位置し、それぞれ 4 つのエクソンと 3 つのイントロンからなる。RAS 遺伝子変異によりアミノ酸置換が生じると RAS の GTPase としての機能が低下して、恒常的な活性化状態となり、下流にシグナルを送り続ける。この過剰なシグナルが、発がんやがんの増殖に関与しているとされる。大腸がんでの RAS 遺伝子変異の頻度は、COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) データベースによれば KRAS 遺伝子 34.6%、NRAS 遺伝子 3.7%、HRAS 遺伝子 0.2%と報告され<sup>9)</sup>KRAS エクソン 2 (コドン 12, コドン 13) の変異が多くを占める。

## 1.4 KRAS 遺伝子変異の測定に関するガイダンス第1版の作成

2008年以降、国際学会や様々な論文で抗EGFR抗体薬の効果とKRASエクソン2（コドン12，コドン13）変異との関連が報告され、腫瘍のKRAS遺伝子変異は抗EGFR抗体薬の負の効果予測因子となることが明らかとなった。抗EGFR抗体薬投与前にKRAS遺伝子変異を測定し、その効果を予測することは、患者の治療選択に非常に有益であると考えられた。しかし、本邦では2008年当時KRAS遺伝子検査が保険償還されていなかったこと、体外診断薬が未承認であったこと、各施設や委託臨床検査所での測定方法や検体材料の取扱いの基準が明確でなかったこと、等多くの問題点があった。そのような背景の中、KRAS遺伝子変異の測定をどのように実施し治療に反映するのが適切か、測定の基本的要件を明らかにする目的で、2008年11月に「大腸がん患者におけるKRAS遺伝子変異の測定に関するガイダンス第1版」が発行された。

## 1.5 本邦における KRAS 遺伝子変異測定の普及

2008年11月にKRAS遺伝子変異の測定に関するガイダンスが開示されて以降、2009年2月にはKRAS遺伝子変異の測定が第2項先進医療（先進医療A）として承認、2010年4月にはKRAS遺伝子変異の測定が保険償還された。また、セツキシマブの薬剤添付文書も、2010年4月にはセツキシマブの使用が初回治療への適応拡大と同時に効能・効果（使用上の注意内）に「KRAS遺伝子変異の有無を考慮した上で、適応患者の選択を行う」と記載された。2010年4月に製造販売承認されたパニツムマブは、効能・効果として「KRAS遺伝子野生型」の大腸がんに適応が限定された。その後、2011年5月にはKRAS遺伝子変異の体外診断薬が初めて保険償還され、現在では「MEBGEN™ KRAS 遺伝子変異検出キット」「TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit」「OncoGuide KRAS 遺伝子変異検出キット」が体外診断用医薬品として承認されている（表1）。現在、「大腸癌治療ガイドライン2014年度版」<sup>10)</sup>でもKRAS遺伝子変異型に対する抗EGFR抗体薬の使用は推奨されておらず、抗EGFR抗体薬投与前のKRAS遺伝子変異の測定は広く普及している。

表1: KRAS遺伝子変異検査法と体外診断薬

	ダイレクトシーケンス法	PCR-rSSO法	Scorpion-ARMS法	F-PHFA法
体外診断薬	—	MEBGEN™ KRAS 遺伝子変異検出キット	TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit	OncoGuide KRAS 遺伝子変異検出キット
検出可能な変異	全ての変異タイプが検出できる	G12S, G12C, G12R G12D, G12V, G12A G13S, G13C, G13R G13D, G13V, G13A	G12S, G12C, G12R G12D, G12V, G12A G13D	G12S, G12C, G12R G12D, G12V, G12A G13D
測定感度限界	10-25 %	5-10 %	1 %	10 %

## 1.6 KRAS 遺伝子変異の測定に関するガイダンス改訂の必要性

第1版の公開から5年が経過したが、その間、新規薬剤の承認や抗EGFR抗体薬を用いた新規併用療法の確立により、大腸がんに対する治療体系は変化してきた。さらに2013年に入って抗EGFR抗体薬の効果予測因子に関する新しい知見が報告された。

### ① 切除不能進行再発大腸がんの治療体系の変化

大腸がんに対する抗EGFR抗体薬は当初、後方治療ラインでの治療開発が行われた。その後、初回治療や二次治療における有効性も示された。また、標準治療不応例を対象にレゴラフェニブなど後方治療で有効性を示す新規薬剤が上市され、切除不能進行大腸がんにおける抗EGFR抗体薬療法の位置づけが変化してきている。

### ② 新たな効果予測因子としてのRAS遺伝子変異の登場

RAS遺伝子変異の測定は、最も変異が多いとされるKRASエクソン2（コドン12、コドン13）遺伝子で行われてきた。しかし、2013年4月以降、KRASエクソン3、エクソン4領域ならびにNRASエクソン2、エクソン3、エクソン4領域の遺伝子変異を有する症例に対しても、抗EGFR抗体薬が無効であることが複数の臨床試験の後解析より報告された<sup>11-16</sup>。また、この患者群は従来のKRAS野生型（KRASエクソン2野生型）患者の約20%と無視できない集団であり、一次治療としてのFOLFOX療法など一部の化学療法では抗EGFR抗体薬を併用することで元来期待される治療効果が減弱する可能性が示唆されている。

## 1.7 RAS 遺伝子変異の測定に関するガイダンス第2版の目的

本ガイダンス改訂版の目的は、RAS遺伝子変異の測定に関わる臨床医や検査担当医に対し、RAS遺伝子変異の測定をどのように実施し治療に反映するのが適切か、RAS遺伝子変異の測定の基本的要件を明らかにすることである。

## 2. RAS遺伝子変異を測定する基本的要件

1) RAS 遺伝子 (*KRAS/NRAS* 遺伝子) 変異を有する患者は、抗 EGFR 抗体薬投与により利益 (延命効果、腫瘍縮小) が得られない可能性が高い。

### 【注釈1】 *KRAS*エクソン2遺伝子変異症例に対する抗EGFR抗体薬の治療成績

切除不能進行再発大腸がん患者を対象に初回治療として行われた標準的化学療法±抗EGFR抗体薬併用療法とのランダム化比較試験 (OPUS試験<sup>17)</sup>、CRYSTAL試験<sup>18)</sup>、COIN試験<sup>19)</sup>、NORDIC-VII試験<sup>20)</sup>、PRIME試験<sup>21)</sup>、化学療法既治療例を対象とした化学療法±抗EGFR抗体薬併用療法との第III相試験 (EPIC試験<sup>22)</sup>、20050181試験<sup>23)</sup>、PICCOLO試験<sup>24)</sup>、標準治療不応例を対象とした抗EGFR抗体薬単独療法とbest supportive care (BSC)との第III相試験 (CO.17試験<sup>25)</sup>、20020408試験<sup>26)</sup>)における解析から、*KRAS*エクソン2 (コドン12、コドン13) 遺伝子変異を有する患者群は、抗EGFR抗体薬による奏効率の上乗せや、無増悪生存期間、全生存期間の延長を認めなかった。この傾向は、抗EGFR抗体薬の種類 (セツキシマブ、パニツムマブ)、治療ライン、併用化学療法の有無や種類に関わらず再現性が認められた。また、本邦でも少数例の検討ではあるものの後ろ向きコホート研究<sup>27)</sup>や前向き臨床試験の後解析<sup>28)</sup>から、*KRAS*エクソン2 (コドン12、コドン13) 遺伝子変異が抗EGFR抗体療法への効果予測因子であることが示され、欧米のエビデンスは本邦でも外挿可能であると考えられた。一方、セツキシマブに関するランダム化比較試験 (CRYSTAL試験、OPUS試験) の後解析において、*KRAS* エクソン2コドン13D (*G13D*) 変異型は*KRAS*エクソン2野生型と同様にセツキシマブの効果が期待できる可能性が示唆された<sup>29)</sup>。しかし、セツキシマブを用いた別の第III相試験であるCOIN試験やパニツムマブを用いた第III相試験 (PRIME試験、20050181試験、20020408試験) の後解析<sup>30)</sup>では、*KRAS G13D*変異型は他の*KRAS*エクソン2変異型と同様、抗EGFR抗体薬による効果は認められなかった。以上から、*KRAS*エクソン2 (コドン12、コドン13) 遺伝子変異型に対しては、どの治療ラインにおいてもセツキシマブ、パニツムマブ投与による利益が得られない可能性が高く、抗EGFR抗体薬の投与は推奨されない<sup>10)</sup>。

### 【注釈2】 RAS 遺伝子変異に関する新しい知見

2013年4月以降、パニツムマブに関する第III相試験 (PRIME試験<sup>11)</sup>、20050181試験<sup>12)</sup>、20020408試験<sup>13)</sup>)において、*KRAS*エクソン2 (コドン12、コドン13) 以外の*KRAS*エクソン3、エクソン4領域ならびに*NRAS*エクソン2、エクソン3、エクソン4領域の遺伝子変異の有無とパニツムマブの効果に関する追加解析が報告された。結果、*KRAS/NRAS*変異を認めないRAS野生型ではパニツムマブの効果が期待できる一方、*KRAS*エクソン2以外の*KRAS*エクソン3、エクソン4領域、*NRAS*エクソン2、エクソン3、エクソン4領域の変異を有する症例ではパニツムマブの上乗せ効果が期待できない結果であった (表2、

表3)。さらに、*KRAS* エクソン2変異型とそれ以外の*KRAS/NRAS*変異型で分けた解析でも、同等にパニツムマブの上乗せ効果が期待できない結果であった。

また、セツキシマブのランダム化比較試験（OPUS試験<sup>14)</sup>でも同様に、*KRAS/NRAS*変異を認めない*RAS*野生型でのみセツキシマブの効果が期待できる傾向が認められた。さらに、初回治療例を対象に抗EGFR抗体薬併用療法とベバシズマブ併用療法を比較したランダム化比較試験（FIRE-3試験<sup>15)</sup>、PEAK試験<sup>16)</sup>においても、*RAS*野生型ではベバシズマブ群と比較し抗EGFR抗体薬併用群で生存期間の延長が認められた。以上、ランダム化比較試験のサンプルを用いたprospective-retrospective analysis<sup>31)</sup>の結果、従来の*KRAS*エクソン2変異だけでなく、*KRAS*エクソン3、エクソン4領域、*NRAS*エクソン2、エクソン3、エクソン4領域の変異型に対し、抗EGFR抗体薬投与による利益が得られない可能性が高く、欧米のガイドライン<sup>32)</sup>や添付文書<sup>33,34)</sup>では抗EGFR抗体薬の投与は推奨されていない。

表2: *RAS*野生型に対する治療効果

	RAS ascertainment*	Regimen	n	RR (%)	PFS (M)	HR	OS (M)	HR
PRIME (1 <sup>st</sup> line)	90 % (1060/1183)	FOLFOX4	253	-	7.9	HR 0.72 (p=0.004)	20.2	HR 0.78 (p=0.04)
		FOLFOX4+Pmab	259	-	10.1		26.0	
20050181 (2 <sup>nd</sup> line)	85 % (1008/1186)	FOLFIRI	211	10	4.4	HR 0.695 (p=.006)	13.9	HR 0.803 (p=.08)
		FOLFIRI+Pmab	204	41	6.4		16.2	
20020408 (3 <sup>rd</sup> line)	82 % (378/463)	BSC	63	0	7 wks	HR 0.36 (p<.0001)	-	-
		BSC+Pmab	73	16	14.1 wks		-	
OPUS (1 <sup>st</sup> line)	75 % (254/337)	FOLFOX4	46	30.4	5.8	HR 0.43 (p=0.018)	17.8	HR 0.83 (p=0.497)
		FOLFOX4+Cmab	36	61.1	12.0		20.7	
FIRE-3 (1 <sup>st</sup> line)	69 % (520/752)	FOLFIRI+Bev	171	59.6	10.2	HR 0.93 (p=0.54)	25.6	HR 0.70 (p=0.011)
		FOLFIRI+Cmab	171	65.5	10.4		33.1	
PEAK (1 <sup>st</sup> line)	82 % (233/285)	mFOLFOX6+Bev	82	60.5	9.5	HR 0.65 (p=0.029)	28.9	HR 0.63 (p=0.058)
		mFOLFOX6+Pmab	88	63.6	13.0		41.3	

Pmab; パニツムマブ, Cmab; セツキシマブ, Bev; ベバシズマブ, RR; 奏効割合, PFS; 無増悪生存期間, HR; ハザード比, OS; 全生存期間, \*RAS ascertainment; ランダム化された症例のうち*RAS*遺伝子変異の評価が可能であった症例の割合

表3: RAS変異型に対する治療効果

	Regimen	n	RR (%)	PFS (m)	HR	OS (m)	HR
<b>PRIME (1<sup>st</sup> line)</b>	FOLFOX4	276	-	8.7	HR 1.31 (p=0.008)	19.2	HR 1.25 (p=0.034)
	FOLFOX4+Pmab	272	-	7.3		15.6	
<b>2005181 (2<sup>nd</sup> line)</b>	FOLFIRI	294	13	4.0	HR 0.861 (p=0.14)	11.1	HR 0.914 (p=0.34)
	FOLFIRI+Pmab	299	15	4.8		11.8	
<b>20020408 (3<sup>rd</sup> line)</b>	BSC	114	0	7.3 weeks	HR 0.97 (p=0.729)	-	-
	BSC+Pmab	99	1	7.4 weeks		-	
<b>OPUS (1<sup>st</sup> line)</b>	FOLFOX4	78	48.7	7.8	HR 1.59 (p=0.018)	17.8	HR 1.35 (p=0.089)
	FOLFOX4+Cmab	94	36.2	5.6		13.4	
<b>FIRE-3 (1<sup>st</sup> line)</b>	FOLFIRI+Bev	86	51.2	10.1	HR 1.31 (p=0.085)	20.6	HR 1.09 (p=0.60)
	FOLFIRI+Cmab	92	38.0	7.5		20.9	

Pmab; パニツムマブ, Cmab; セツキシマブ, Bev; ベバシズマブ, RR; 奏効割合, PFS; 無増悪生存期間, HR; ハザード比, OS; 全生存期間

細胞株を用いた検討で、RAS 遺伝子のコドン 12, 13, 59, 61, 117, 146 変異は、RAS タンパクの恒常的活性化、腫瘍細胞増殖速度の上昇、下流の増殖シグナルの活性化が誘導される。一方、変異 RAS が腫瘍細胞に与えるこれらの影響が、それぞれの変異コドンや変異アミノ酸により異なるかどうかについては、現在のところ明確になっていない<sup>35-38</sup>)。また、臨床においても KRAS 遺伝子コドン 146 変異型大腸がんで、後方ラインの抗 EGFR 抗体(＋イリノテカン) 併用療法によって奏効が認められたといういくつかの報告があり<sup>39</sup>)、現在のエビデンスでは、全てのコドン変異が同様に抗 EGFR 抗体薬による利益が得られないのか十分なデータが揃っているとは言えない。しかし、各臨床試験で測定されたコドン(表 4) に多少の違いはあるものの、RAS 変異型で抗 EGFR 抗体薬の上乗せ効果がなかった点は再現性があり、よって、RAS 遺伝子変異の測定に際しては KRAS/NRAS 遺伝子のコドン 12, 13, 59, 61, 117, 146 変異の有無を測定することが望ましい。そのため、現行で KRAS エクソン 2(コドン 12, 13) 遺伝子変異の測定のみが行われ野生型と判断されている症例に対しても、それ以外の KRAS/NRAS 遺伝子変異の有無を追加測定することが望ましい。

表4: 各試験で測定されたコドン

	KRAS exon 2	KRAS exon 3	KRAS exon 4	NRAS exon 2	NRAS exon 3	NRAS exon 4
PRIME (1 <sup>st</sup> line)	12,13	(59)*,61	117,146	12,13	(59)*,61	117,146
20050181 (2 <sup>nd</sup> line)	12,13	59,61	117,146	12,13	59,61	117,146
20020408 (3 <sup>rd</sup> line)	12,13	61	117,146	12,13	61	117,146
OPUS (1 <sup>st</sup> line)	12,13	59,61	117,146	12,13	59,61	117,146
PEAK (1 <sup>st</sup> line)	12,13	59,61	117,146	12,13	59,61	117,146
FIRE-3 (1 <sup>st</sup> line)	12,13	61	146	12,13	59,61	117,146

\*初回解析ではコドン59は含まれず、後解析でコドン59を含む解析が行われた。

### 【注釈 3】 RAS 変異不明例の取扱い

RAS 遺伝子変異の測定を試み、いずれかのエクソンに変異が認められれば、他のエクソンが測定不能であった場合でも RAS 変異型とする。測定不能・未測定のエクソンがあり、かつ測定可能な他のエクソン領域に変異が認められなかった場合は、RAS 野生型とも RAS 変異型とも判断せず RAS 不明例として扱う。測定不能の原因としては検体および検査方法の 2 つが考えられる。測定不能の原因が検体不良であると考えられる場合には、可能な限り保存腫瘍組織の再提出や新たな腫瘍組織の採取を試みる。検査方法が原因と考えられる場合は、後述する 2. RAS 遺伝子変異を測定する基本的要件 5) を満たした検査法で再検査を行うことを推奨する。RAS 不明例に対する抗 EGFR 抗体薬投与の是非は、①測定不能・未測定のエクソン（またはコドン）の変異頻度、②RAS 変異型であった場合に治療効果が得られないこと、③抗 EGFR 抗体薬の副作用、④抗 EGFR 抗体薬以外の別の治療選択肢等を勘案して判断する。

### 【注釈 4】 RAS に対する規制当局などの動向

欧州医薬品庁は前述した 1) 注釈 2 のエビデンスに基づき、2013 年 9 月に「パニツムマブの投与対象を RAS 野生型に限定して推奨することに変更した添付文書」を掲載した。また、セツキシマブも同様に投与対象を RAS 野生型に限定する旨の改訂が行われた。本邦ならびに米国食品医薬品局（FDA）でも同様の改訂に向けた審議が行われている。また、米国の NCCN ガイドライン<sup>32)</sup>でも 2014 年 Version 3 より抗 EGFR 抗体薬投与の適応が治療ラインに関わらず KRAS 野生型から KRAS/NRAS 野生型に変更となった。現在、本邦では KRAS 遺伝子変異の測定の保険適用に関しては、「D004-2 悪性腫瘍組織検査」として保険償還されている（患者 1 人につき 1 回限りの算定）が、NRAS を含む RAS 遺伝子変異の測定は現時点で保険未承認である（備考を参照のこと）。

2) RAS 遺伝子変異の測定に際し、頻回の測定は不要と考えられる。測定に用いる材料は原発巣でも遠隔転移巣でも良い。測定時期は抗 EGFR 抗体薬の投与前が推奨される。

### 【注釈 1】 RAS 遺伝子変異の頻度

RAS 遺伝子の点突然変異は大腸がんの初期に起こると報告されており、大腸がんの病期に関わらず一定の頻度で検出される (表 5)<sup>40,41)</sup>。KRAS エクソン 2 (コドン 12、コドン 13) 変異の頻度は大腸がんの約 35-40% であり、欧米と本邦の報告で差を認めない。欧米を中心に行われた臨床試験によると、KRAS エクソン 3、4 ならびに NRAS エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4 の頻度は合わせて 10-15% (KRAS エクソン 2 野生型の約 20%) である (表 6)。なお、NRAS エクソン 4 (コドン 117, 146) 変異の頻度は、全大腸がんの 0.3% 未満と極めてまれである。日本人での KRAS エクソン 2 以外の KRAS/NRAS 遺伝子変異頻度に關する詳細な報告は少なく、今後の検討課題である。

表5: Stage別KRASエクソン2変異割合

Dukes' stage			Proportion	Stage			Proportion
Andreyev, et al (RASCAL) N=2721	Dukes' A		33.9 %	Watanabe , et al N=5887	Stage I		33.1 %
	Dukes' B		39.8 %		Stage II		37.3 %
	Dukes' C		38.3 %		Stage III		38.1 %
	Dukes' D		35.8 %		Stage IV		37.5 %

表6: エクソン別遺伝子変異割合

	KRAS exon 2	KRAS exon 3	KRAS exon 4	NRAS exon 2	NRAS exon 3	NRAS exon 4	Total*	Method
PRIME (1 <sup>st</sup> line)	40% (440/1096)	4% (24/638)	6% (36/620)	3% (22/637)	4% (26/636)	0% (0/629)	17%	Sanger法 SURVEYOR法
20050181 (2 <sup>nd</sup> line)	45% (486/1083)	4.4% (24/548)	7.7% (41/534)	2.2% (12/536)	5.6% (30/540)	0% (0/532)	20%	Sanger法 SURVEYOR法
20020408 (3 <sup>rd</sup> line)	43% (184/427)	4.8% (8/166)	5.0% (9/180)	4.2% (7/166)	3.0% (5/168)	1.1% (2/180)	18%	Sanger法** SURVEYOR法
OPUS (1 <sup>st</sup> line)	43% (136/315)	6.8% (9/132)	9.3% (12/130)	7.6% (10/132)	5.1% (7/138)	3.4% (5/147)	31%	BEAMing法
PEAK (1 <sup>st</sup> line)	N/A	4% (9/225)	7% (17/223)	5% (12/224)	6% (13/225)	0% (0/223)	22%	Sanger法 SURVEYOR法
FIRE-3 (1 <sup>st</sup> line)	N/A	4.3% (21/431)	4.9% (24/458)	3.8% (18/464)	2% (10/468)	0% (0/458)	16%	Pyrosequencing法

\*KRASエクソン2野生型に占めるKRAS/NRAS変異割合 \*\*一部のコドンでは次世代シーケンサー法併用

**【注釈 2】 原発巣と転移巣との RAS 遺伝子変異の一致**

大腸がん原発巣と転移巣での RAS 遺伝子変異を比較検討した報告によれば、原発巣に RAS 遺伝子変異を伴えば転移巣でも一致して変異を有するとされ、その一致率はメタアナリシスにて 93%と報告されている<sup>42)</sup>。

**【注釈 3】 手術組織検体と内視鏡下生検検体での RAS 遺伝子変異の一致**

RAS 遺伝子変異は大腸がん発生の初期に起こることから、腫瘍の粘膜と浸潤部での RAS 遺伝子変異の有無は概ね一致すると考えられ、同一症例にて手術組織検体と内視鏡下生検検体での KRAS エクソン 2 遺伝子変異の一致率は 97%以上と報告されている<sup>43)</sup>。

**【注釈 4】 二次的な RAS 遺伝子変異**

抗 EGFR 抗体薬を含まない化学療法では、二次的な RAS 遺伝子変異はまれである<sup>44)</sup>。一方、抗 EGFR 抗体薬を含む治療を行った後には二次的な RAS 遺伝子変異の出現が報告されている<sup>45)</sup>。ただし、この獲得変異が抗 EGFR 抗体薬の効果予測因子となるかを含め臨床的な意義は現時点では不明である。

**3) 推奨される RAS 遺伝子変異検査法は、ダイレクトシーケンス法 (マニュアルダイセクション併用)、Allele-specific PCR 法などである。**

#### 【注釈1】 推奨される RAS 遺伝子変異検査法

腫瘍 DNA から目的遺伝子領域を増幅し、直接塩基配列を明らかにするダイレクトシーケンス法 (サンガー法など) は、RAS 遺伝子変異の検査法として推奨される。また、アリルト異的なプライマーを用いて増幅し、標的とした変異の増幅の有無を判定する allele-specific PCR 法も、RAS 遺伝子変異の検査法として推奨される。ダイレクトシーケンス法は、未知の遺伝子変異も検出することができる利点がある一方、その測定感度限界は腫瘍含有量で 10-25% (正常細胞の中に RAS 遺伝子変異を含む腫瘍細胞が 10-25% 以上のとき RAS 遺伝子変異が検出可能) であり、allele-specific PCR 法と比較すると低い。よって、ダイレクトシーケンス法による RAS 遺伝子変異検査を行う場合は、腫瘍細胞の割合ができるだけ高くなるように領域をマーキングし、その後マーキング部分の腫瘍組織を手動的に採取する方法 (マニュアルダイセクション)<sup>46)</sup>等を併用することが必須である。

#### 【注釈2】 最適な測定感度

各臨床試験で実施された RAS 遺伝子変異の検査法は、ダイレクトシーケンス法 (PRIME 試験、20050181 試験、20020408 試験、PEAK 試験)、SURVEYOR 法 (PRIME 試験、20050181 試験、20020408 試験、PEAK 試験)、次世代シーケンサー法 (20020408 試験)、パイロシーケンス法 (FIRE-3 試験)、BEAMing 法 (OPUS 試験) である。これらの検査法の測定感度限界は、最も感度の低いダイレクトシーケンス法では 10-25%、最も感度の高い BEAMing 法で 1% 未満、それ以外の検査法の測定感度は概ね 1-10% であったが<sup>47-49)</sup>、検査法・検出感度にかかわらず RAS 変異型に対して抗 EGFR 抗体薬が無効であることが再現されている。以上から、現時点では最適な測定感度は明らかでないものの、測定感度限界 1-10% の検査法を考慮すべきである。

**4) 推奨される検査材料は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックの薄切標本である。また、薄切標本に対応するHE染色標本で、検査方法に応じた十分量の腫瘍細胞を確保できることを確認する。**

#### 【注釈1】 推奨される検査材料

検査材料としてはホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックが推奨される。検査方法に応じた十分量の腫瘍細胞の存在が組織学的に確認できれば、新鮮凍結組織を検査材料として使用しても良い。また、腫瘍由来の血漿中遊離DNAや血液循環腫瘍細胞などを検体としたRAS遺伝子変異検査の妥当性や有用性については、今後の検討課題である。

#### 【注釈2】 検体を選ぶ際の注意点

病理標本上で腫瘍細胞と正常細胞（間質細胞）の大まかな面積比率を確認し、がん組織が全体の50%以上を占めているものを検体とするのが望ましい。腫瘍細胞の占める面積が少ない検体を用いてダイレクトシーケンス法など測定感度の低い検査法によりRAS遺伝子変異の検査を行う場合には、手術材料の場合にはマニュアルダイセクション等を併用し腫瘍細胞の比率を高める。生検材料などの腫瘍細胞の選択的な回収が難しい場合にはできるだけ腫瘍細胞比の高い検体を用いるように努める。また、アポトーシスや壊死を起こしている部分は、すでにDNAが分解しているため、材料としては適さない。生検材料、原発巣手術材料、再発後の肝転移巣手術材料など、複数の材料が存在する場合には、保存期間が短い、組織内の腫瘍細胞量が多い、薬物療法や放射線療法などの前治療による組織への影響が少ない、等を勘案して、RAS遺伝子変異検査に用いる材料を選定する。検査に必要な薄切標本枚数は、生検材料か手術材料か、用いる測定方法等により大きく異なるため、担当病理部門や検査会社等と事前に協議しておく。

#### 【注釈3】 ホルマリン固定の注意点

ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックは、ホルマリン固定によるDNAの変性等により、DNAの断片化が生じる。そのため、特にダイレクトシーケンス法での検査を行う場合には、各医療施設での病理標本固定条件（ホルマリン濃度、中性緩衝/非緩衝、浸漬時間、固定組織の大きさや分割の仕方など）がDNAの保存性の良否を大きく左右することに留意が必要である。固定液としては、10%中性緩衝ホルマリンが推奨される。

また、固定時間は組織の大きさによるが、目安として6-48時間とされている。1週間を超える浸漬時間ではDNAの断片化が進み遺伝子変異検査には適さないとの研究報告がある。ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックから切り出された薄切組織切片は、経時的劣化が認められるため、薄切後できるだけ早くDNA抽出を行う<sup>50)</sup>。

**5) RAS遺伝子変異検査は、技術および結果の質が保証された枠組みの下で実施されるべきである。**

### 【注釈1】 検査の質保証に関するガイドライン

検査施設は、解析方法の質を設定し維持することにより、検査結果が妥当であることを保証する責務がある。そのために、国際標準化機構(ISO)の定める国際規格(ISO/IEC 17025、ISO15189など)等の認定を取得する、もしくはそれに類似する定期的な外部監査を伴う外部審査が行われることが望ましい。検査の質保証(quality assurance (QA))は、「OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing」<sup>51)</sup>、「遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティスガイドライン(暫定文書)」<sup>50)</sup>に準拠して行われるべきである。

### 【注釈2】 質保証に必要な検討項目

検査は、標準操作手順書(SOP)を作製したうえで実施する。欧州のQAプログラムでは、検査法のvalidationのための検討事項として、下記のとおり記載されている<sup>52)</sup>。

- ・ DNA抽出のために最低限必要な腫瘍組織量(割合)、切片の厚さ
- ・ 検査実施に必要な固定方法の条件(パラフィン、凍結等)
- ・ 検査実施に必要なDNAの質、量、濃度
- ・ 変異アレルと正常アレルとを区別するのに必要なcut-off値
- ・ がん細胞株等のサンプル等による希釈系列を用いての感度測定
- ・ 別の検査法との検査結果の正確度の比較
- ・ 再現性の検討
- ・ ロバスト性検証(各DNA濃度における検討、手動・自動装置間の違い等を含む)

また、各検査室は下記のsuccess rate(推奨レベル)を保証することが望ましい。

- ・ DNA抽出が95%以上のサンプルで可能であること
- ・ RAS遺伝子変異検査の正しい結果が97%以上のサンプルで得られること

### 【注釈3】 結果報告書に必要な記載項目

RAS遺伝子変異検査の結果報告書には少なくとも次の内容を含むことが推奨される<sup>53, 54)</sup>。

- ・ 検討(提出)組織の適切性(推定される腫瘍細胞占有率および固定状態)
- ・ 検査に用いた方法(サンガー法、パイロシークエンス法、PCR-rSSO法など)
- ・ 用いたダイセクションの方法(レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法、顕微鏡併用のマニュアルダイセクション法、肉眼観察でのマニュアルダイセクション法、腫瘍細胞選択操作なし、など)
- ・ 検査を行ったKRAS/NRAS遺伝子のコドン部位(試みたコドンをすべて記載)
- ・ 各コドンの変異の有無(変異あり、変異なし、評価不能)
- ・ 変異パターン(G12A, G12Dなど特定されたパターン、もしくは変異パターン不明)

### 3. 備考

**3.1 2014年4月現在、本邦においてRAS遺伝子変異の測定は保険適用未承認である。**

KRAS遺伝子変異の測定は「D004-2 悪性腫瘍組織検査」に「KRAS遺伝子検査 (2,100点)」として保険適用されている。しかし、NRAS遺伝子変異の測定が現時点で保険が適応されないことから、真のRAS遺伝子変異測定は保険未承認である。臨床現場や各種学会からのRAS遺伝子変異測定への保険承認の要望が出ており、早急な対応が期待されている。なお、日本臨床腫瘍学会から提出された厚生労働大臣への要望事項は下記のとおりである。

<要望事項>

1. 治癒切除不能な進行・再発大腸癌に対する抗EGFR抗体薬のRAS (KRAS および NRAS) 遺伝子変異例に対する投与条件追加 (添付文書改訂) における承認
2. RAS (KRAS および NRAS) 遺伝子変異検査の迅速な体外診断薬承認かつ保険適用
3. 抗EGFR抗体薬の添付文書改訂とRAS遺伝子検査保険償還の同時期承認
4. 現KRAS遺伝子測定における診療報酬の算定「D004-2項」におけるKRAS遺伝子からRAS遺伝子への変更、並びに、KRAS検査後のRAS後追検査の容認

**3.2 本ガイダンスは全委員による討議をもとに作成されたが、吉野委員は新規RAS遺伝子変異検査試薬の臨床性能試験 (UMIN000011784) の主任研究者のため2. RAS遺伝子変異を測定する基本的要件3)の討議には加わらなかった。**

#### 4. 参考文献

- 1) 日本臨床腫瘍学会 KRAS 遺伝子変異検討委員会 (編): 大腸がん患者における KRAS 遺伝子変異の測定に関するガイドンス(第1版)
- 2) Spano JP, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol.* 2005;16:102-8.
- 3) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:127-37.
- 4) Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:341-54.
- 5) Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351:337-45.
- 6) Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:1658-64.
- 7) Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:459-65.
- 8) Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:761-74.
- 9) <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>
- 10) 大腸癌研究会 編、大腸癌治療ガイドライン医師用2014年版, 金原出版
- 11) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013;369:1023-34.
- 12) Peeters M, Oliner KS, Price TJ, et al. Analysis of KRAS/NRAS mutations in phase 3 study 20050181 of panitumumab (pmab) plus FOLFIRI versus FOLFIRI for second-line treatment (tx) of metastatic colorectal cancer (mCRC). *ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium 2014 #LBA387.*
- 13) Patterson SD, Peeters M, Siena S, et al. Comprehensive analysis of KRAS and NRAS mutations as predictive biomarkers for single agent panitumumab (pmab) response in a randomized, phase 3 metastatic colorectal cancer (mCRC) study (20020408). *ASCO Annual Meeting 2013 #3617.*
- 14) Tejpar S, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Effect of KRAS and NRAS mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus FOLFOX4: New results from the OPUS study. *ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium 2014 #LBA444.*
- 15) Stintzing S, Jung A, Rossius L, et al. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in FIRE-3. *ESMO 2013 #LBA17.*
- 16) Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2

- metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014 [Epub ahead of print]
- 17) Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol*. 2011;22:1535-46.
  - 18) Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29:2011-9.
  - 19) Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*. 2011;377:2103-14.
  - 20) Tveit KM, Guren T, Glimelius B, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol*. 2012;30:1755-62.
  - 21) Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010;28:4697-705.
  - 22) Lander C, Kopit J, Awad M, et al. Analysis of K-Ras mutations in patients with metastatic colorectal cancer receiving cetuximab in combination with irinotecan: Results from the EPIC trial. 33<sup>rd</sup> ESMO Congress 2008 #385P
  - 23) Peeters M, Price TJ, Cervantes A, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:4706-13.
  - 24) Seymour MT, Brown SR, Middleton G, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol*. 2013;14:749-59.
  - 25) Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:1757-65.
  - 26) Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:1626-34.
  - 27) Bando H, Yoshino T, Yuki S, et al. Clinical outcome of Japanese metastatic colorectal cancer patients harbouring the KRAS p.G13D mutation treated with cetuximab + irinotecan. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42:1146-51.
  - 28) Doi T, Tahara M, Yoshino T, et al. Tumor KRAS status predicts responsiveness to panitumumab in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;41:210-6.
  - 29) Tejpar S, Celik I, Schlichting M, et al. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in

- patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol.* 2012;30:3570-7.
- 30) Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol.* 2013;31:759-65.
  - 31) Patterson SD, Cohen N, Karnoub M, et al. Prospective-retrospective biomarker analysis for regulatory consideration: white paper from the industry pharmacogenomics working group. *Pharmacogenomics.* 2011;12:939-51.
  - 32) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology\_Colon Cancer, Rectal Cancer  
[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/colon.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf)  
[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/rectal.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/rectal.pdf)
  - 33) EMA\_SPC  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000741/WC500047704.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000741/WC500047704.pdf)
  - 34) EMA\_SPC  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000558/WC500029111.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000558/WC500029111.pdf)
  - 35) Smith G, Bounds R, Wolf H, et al. Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine. *Br J Cancer.* 2010;102:693-703.
  - 36) Feig LA, Cooper GM. Relationship among guanine nucleotide exchange, GTP hydrolysis, and transforming potential of mutated ras proteins. *Mol Cell Biol.* 1988 8:2472-8.
  - 37) Wang Y, Velho S, Vakiani E, et al. Mutant N-RAS protects colorectal cancer cells from stress-induced apoptosis and contributes to cancer development and progression. *Cancer Discov.* 2013;3:294-307.
  - 38) Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Res.* 2010;70:5901-11.
  - 39) De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010 ;11:753-62.
  - 40) Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:675-84.
  - 41) Watanabe T, Yoshino T, Uetake H, et al. KRAS mutational status in Japanese patients with colorectal cancer: results from a nationwide, multicenter, cross-sectional study. *Jpn J Clin Oncol.* 2013;43:706-12.
  - 42) Baas JM, Krens LL, Guchelaar HJ, et al. Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review. *Oncologist.* 2011;16:1239-49.
  - 43) Krol LC, 't Hart NA, Methorst N, et al. Concordance in KRAS and BRAF mutations in endoscopic

- biopsy samples and resection specimens of colorectal adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2012;48:1108-15.
- 44) Kawamoto Y, Tsuchihara K, Yoshino T, et al. KRAS mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;107:340-4.
  - 45) Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012;486:532-6.
  - 46) Franklin WA, Haney J, Sugita M, et al. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J Mol Diagn*. 2010;12:43-50.
  - 47) Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn*. 2005;7:413-21.
  - 48) Jänne PA, Borrás AM, Kuang Y, et al. rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res*. 2006;12:751-8.
  - 49) Li M, Diehl F, Dressman D, et al. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods*. 2006;3:95-7.
  - 50) [http://www.jccs.org/techreport/bestpractice\\_guideline.pdf](http://www.jccs.org/techreport/bestpractice_guideline.pdf)
  - 51) <http://www.oecd.org/science/biotech/38839788.pdf>
  - 52) van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch*. 2008;453:417-31.
  - 53) Bartley AN, Hamilton SR, Alsabeh R, et al. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 ;138:166-70.
  - 54) Cagle PT, Sholl LM, Lindeman NI, et al. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with non-small cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:171-4.