

# 臨床腫瘤治療之 NGS 檢測臨床應用與分析一致性

黃其晟<sup>1</sup>

<sup>1</sup>台北榮民總醫院乳房醫學中心，台北，台灣

## 摘要

次世代定序 (Next-Generation Sequencing; NGS) 為近年來新興的技術服務，可應用於科學研究或臨床應用。依照定序範圍與深度，可再區分為全基因體定序或全外顯子定序 (Whole Genome Sequencing; WGS / Whole Exome Sequencing; WES)，常應用於科學研究的定序選擇；以可訴性突變 (Actionable mutations) 作為標的之 Targeted Panel 主要應用於臨床伴隨式診斷 (Companion diagnostics; CDx)，提供基因變異資訊供臨床醫師作為治療決策的參考。定序結果分析需經過許多繁雜步驟，不同的生物資訊手法會直接影響分析結果，僅取得原始定序數據 (Raw Data) 不保證能夠重現一致性的分析結果，缺乏一致性反而增加臨床決策的風險與困擾，臨床醫師使用上應選擇經完整分析驗證及臨床驗證之檢測並符合 LDTS 特管法規。(生物醫學 2021;14(1):19-22)

**關鍵字：**次世代定序 (Next-Generation Sequencing; NGS)、一致性、臨床應用、腫瘤治療

## 背景

基因檢測在個人化醫療中備受關注，其中次世代定序 (Next-Generation Sequencing; NGS) 提供高通量高解析度之定序結果，技術發展逐漸成熟，產出資料速度更快，使用率增加使成本降低，在臨床上已愈來愈多臨床應用 NGS 於疾病的診斷、預後分析、治療決策和病況追蹤的案例出現，也可作為新穎標靶藥物治療的伴隨式診斷 (companion diagnostics; CDx) 工具。

## 主要分類

NGS 檢測結合了不同的化學原理、大量 (平行式) 定序和生物資訊學分析，能夠在短時間內對不同長度的 DNA 或 RNA 序列，甚至整個基因組進行定序<sup>1</sup>，檢測基因變異。依常見之種類，大致分為以下三類：

一、全基因體定序或全外顯子定序 (Whole Genome Sequencing; WGS / Whole Exome Sequencing; WES)

通訊作者:黃其晟 醫師

電話：02-55681176

傳真：02-55681185

地址：11217 臺北市北投區石牌路二段201號

電子郵件：cchuang29@vghtpe.gov.tw

WGS 可定序 95~98% 的人類基因體，其涵蓋範圍廣，許多基因調節區段以及基因間區域的變異都可被偵測；WES 則以決定基因序列的外顯子區域為定序範圍，約為全基因組的百分之一。WES 與 WGS 因涵蓋範圍廣，會有定序深度 (Read Depth) 限制，主要應用於胚源性遺傳變異的研究，對於分析腫瘤組織這類高度複雜變異的體細胞突變，會需要更高的定序深度，因此目前 WGS / WES 多使用於疾病罹病性 (disease susceptibility) 的探討。

## 二、RNA 定序 (RNA sequencing)

針對所有的 RNA 轉錄產物，包含 mRNA、rRNA、tRNA、micro-RNA 及 non-coding RNA 進行定序實驗。mRNA 的定序加以量化，可以做為取代 microarray 的轉錄體研究，此外 RNA 定序也常用於檢測基因融合。

## 三、特定基因的定序 (Targeted Panel Sequencing)

針對已知特定疾病所設計的相關基因檢測，常見的癌症基因檢測，就屬此類型。與 WGS / WES 相比，這類定序已鎖定目標，所以能進行深度的定序並了解各基因變異頻率 (Variant allele frequency; VAF)。由於癌組織基因變異變化多端，不似胚源性變異可以倍體 (ploid) 的概念來加以定義，沒有足夠的定序深度，無法找出具可作為生物標記的次等位基因 (Minor allele) 變異。

## 檢測技術與生物資訊之重要

NGS 定序過程中包含了四個主要步驟：一、核酸片段化 (Fragmentation)；二、建庫 (Library Construction)；三、高通量定序 (High-throughput Sequencing)；四、生物資訊分析 (Bioinformatics Analysis)。

流程中每一個步驟皆會影響到檢測的結果，其中生物資訊分析尤須強調一致性。生物資訊分析包括將來自定序儀器的原始訊號資訊進行整合、鹼基判定 (Base calling)、使用預設的參數去篩除品質不良的鹼基判定及定序片段，並將所獲得的序列資訊與參考序列進行比對，以識別有意義的序列變異<sup>2</sup>。因此即使由同樣的 FASTQ 檔案 (定序儀器所輸出最原始 DNA / RNA 序列檔) 開始分析，會因為不同的前處理、演算法甚至不同的參數設定，導致不一致的 VCF (變異辨識檔案) 產出。特管法針對數據分析人員資格已有規範，除了實驗技術，經 LDTS 認證的分析程序需保持一致，才能確保 NGS 實驗結果的準確性與再現性。

由於我們並非對所有辨識出的變異都清楚了解其臨床意義，此時檢測實驗室所採用的公有領域 (Public domain) 或私有 (Private) 資料庫即可協助去對這些變異進行註解 (Annotation)。對癌組織定序結果的合理註解有以下兩個部分：

一、遵循目前治療指引：例如採用 NCCN 癌症診療指引等，這類指引中通常會提供可能對臨床診斷、預後、靶標和免疫治

療等具有重要意義的基因和突變列表。目前已有部分新穎治療的標靶藥物，以 NGS 定序結果作為伴隨式診斷，此時基因檢測辨識出可訴性突變，與特定的臨床診斷（腫瘤種類、病患臨床情境與治療病史）相結合，會提供臨床醫師找出更有效的藥物來醫治病患，作為精準醫療不可或缺的生物標記。

二、參考當前科學研究（適應症外應用）：檢測中經常會發現目前治療指引未規範的基因變異，可藉由回顧已發表的文獻或進行中 / 已完成的臨床試驗，來評估檢測到變異的意義。由於新穎治療藥物推陳出新，臨床試驗結果日新月異，註解的結果必須隨時更新，確保資訊的即時性。由於不同的資料庫會影響到後續的基因變異判讀，因此在使用任何資料庫都需要謹慎，這也是 NGS 結果判讀需高度仰賴生資能力，以及臨床醫師的專業知識與經驗之處。此外適應症外應用，若沒有進入合適的臨床試驗來加以保護，是否能夠直接由 NGS 判讀來推論治療效果值得深思，也需要臨床醫師與病患共同決策。

由於各家定序平台所採用的技術、各實驗室所使用的分析流程及註解資料庫不同，產出的檢測結果多少會有不一致的現象。各平台採用不同定序原理、試劑和訊號放大的技術，其核酸放大（失真）程度會影響到訊號讀取。此外由於 NGS 在核酸片段化有其最大長度限制，檢體本身若存在重複序列和複雜的插入 / 刪除序列可能會導致不正確的比對，影響到變異的判定。此外演算法參數太

過寬鬆或嚴格都會影響到篩選的結果，因此分析的一致性必須加以維持，降低假陽性或假陰性的機會。

## 完整驗證之必要性

如前所述，同一檢體採用不同實驗與分析方式，可能會得到不同的結果。因此建立一個合格、可用於癌症臨床治療的檢測需經過以下幾個階段：

一、選擇定序平台：不同的定序平台有其優勢與缺點，根據定序基因數量、檢體性質、成本等需求選擇適當的平台。

二、選定基因：癌症基因變異的研究日新月異，因此除了檢測目前已知具有臨床意義的基因突變，若能包含尚未在臨床指引中規範但未來可預見會具有臨床意義的變異基因，可提供未來治療決策更多資訊，也可以累積更多的基因檢測數據，增進對特定腫瘤的了解。

三、驗證：NGS 檢測驗證主要針對從檢體到出具報告整個流程進行確校 (Validity)，分為分析驗證 (Analytical Validation) 及臨床驗證 (Clinical Validation)。分析驗證的內容包括確保檢測的精密度 (precision)、準確度 (accuracy)、報告區間 (reportable range)、參考值範圍 (reference range)、分析靈敏度 (analytic sensitivity)、分析特異性 (analytic specificity)<sup>3</sup>。而臨床驗證的目的為確認檢測所提供的資訊是否具有臨床的

治療意義。驗證的目的是減少檢驗錯誤率並確認其臨床效用。臨床醫師需要對病患的治療負責，因此醫師應留意所使用的檢測是否有經過完整分析和臨床驗證。

### 原始資料可否彌補臨床驗證之不足？

一個合格的 NGS 癌症檢測所提供的即是一套從檢體至報告的完整流程，包含分析中的參數設定，而資料庫比對後所出具的結果也須經過完整的驗證。那我們是否可透過原始資料 (FASTQ)，來進行品質把關 (QC) 呢？NGS 分析的過程中涉及演算法選擇、參數設定及諮詢特定的資料庫來做註解，因此參數設定的調整、比對的資料庫、使用的分析軟體或任何一個步驟與條件皆會影響到分析的結果，若單純由原始定序資料 (FASTQ) 自行進行分析，在 WGS / WES 或許可行，在 Targeted Panel 上其實是很難重現相同且可信賴的結果，反而會造成臨床使用上的困擾。因此由特管法 LDTs 準則來驗證整個 NGS 服務程序較為恰當。

### 結語

在進行 NGS 實驗時要選擇 WGS / WES 或 Targeted Panel，可依照科學研究或是臨床應用的目的，在基因涵蓋率 (Coverage) 與定序深度 (Read Depth) 中取得平衡。由於關係到病患的治療，臨床醫師在選擇時，建議需要採用高規格、經大型臨床試驗驗證過的檢測：如 BRCA Germline Testing、Tumor Mutation Burden (TMB)、

Homologous Recombination Deficiency (HRD) 等有其特定適用的腫瘤型態與臨床情境，並有治療後的數據可供參考。須注意不同的檢測平台或試劑，即使檢測同樣之項目，其結果並非可以宣稱相等，這也是美國 FDA 規範核酸檢測伴隨式診斷的概念，由藥物使用的需求來規範相對應的檢測工具。臨床應用 (Clinical Utility) 與臨床確校 (Clinical Validity) 應該由臨床醫師來綜合判斷。

如今市面上有許多基因檢測公司，其中不乏具備了完整的確校及臨床驗證的 NGS 定序服務與藥物伴隨式檢測。藥物伴隨式檢測由於臨床試驗採用而獲得美國 FDA 核准其檢測結果可對應於特定癌別與藥物，應用於臨床上可讓醫師較無疑慮。癌症治療現今已進入個人化治療之時代，期望未來台灣在癌症基因檢測之發展，也可朝向 IVD 或藥物伴隨式檢測等高品質的檢測之路邁進，讓醫師與病患皆受益。

### 參考文獻

1. Qin, D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med.* 2019;16(1):4-10.
2. Singh, R. R. Next-Generation Sequencing in High-Sensitive Detection of Mutations in Tumors: Challenges, Advances, and Applications. *J Mol Diagn.* 2020;22(8):994-1007.
3. Jennings LJ, et al Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the association for molecular pathology and college of american pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19:341-65.