

高通量测序在临床肿瘤中的应用:机遇与挑战

陈伟¹,何裕隆^{1,2}

1.中山大学附属第一医院胃肠外科,广东 广州 510080

2.中山大学附属第七医院(深圳)消化医学中心,广东 深圳 518000



作者简介:何裕隆,教授、博士生导师、主任医师。中山大学附属第七医院院长、消化医学中心学科带头人;中山大学附属第一医院普通外科学科带头人。中山大学胃癌诊治中心主任,中山大学人类遗传资源平台主任,中国医学救援协会常务理事、重症分会会长,中国抗癌协会胃癌专业委员会副主任委员,中国医师协会外科医师分会上消化道外科医师委员会副主任委员,中华医学会外科学分会胃肠外科学组副组长,中华医学会肿瘤学分会胃肠肿瘤学组副组长,国家精品课程负责人。主编《直肠癌保肛手术》和《胃癌淋巴转移》等论著;《消化肿瘤杂志(电子版)》主编;《中华胃肠外科杂志》、《岭南现代外科杂志》副主编、《中国急救复苏与灾害医学杂志》副总编辑及十余种杂志编委;主持多项国家、省部级自然科学基金项目;发表学术论文470余篇,是中国高被引学者(医学领域)。荣获中国医师奖、中华医学会医学进步二等奖、中华医学奖进步三等奖、广东省科技进步一等奖2项,二等奖2项、南粤优秀教师、宝钢优秀教师奖、推动行业前行的力量十大领导力院管专家等荣誉。

【摘要】 肿瘤“精准医学”的概念自提出以后,逐渐风靡全球,国内大型医院纷纷建立起“精准医学中心”,布局高通量测序(NGS)。然而,NGS在肿瘤临床中的应用并不顺利。由于NGS肿瘤测序技术复杂、迭代迅速,其临床应用将长期处于探索性阶段;NGS测序仪具有强大的数据生产能力,通过大样本平行检测能够显著降低测序成本。上述两个原因导致医院不适于自建NGS测序平台。相反,NGS数据的临床解读和应用是目前最为欠缺,也是最值得医院努力的方向。为了应对基因组大数据的挑战和推动NGS的临床应用,“精准医学”需要专科化,发挥NGS数据生产与数据临床应用之间的桥梁作用。临床NGS专业人才匮乏是制约其应用的薄弱环节,重视NGS临床人才培养、加强学科建设是当务之急。NGS教育应不仅包括执业医生的继续教育,还应该积极布局本科、研究生等的基础教育,为NGS临床应用提供广泛的人才基础。通过医院、第三方测序公司的合理分工和密切协作,再加上医学院校的NGS人才培养,才能推动NGS在临床肿瘤中的广泛应用。

【关键词】 高通量测序; 肿瘤; 临床应用; 精准医学; 基因组医学; 靶集

Application of next generation sequencing in clinical oncology: opportunities and challenges

CHEN Wei¹, HE Yu-long^{1,2*}

1. Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;

2. The Center of Digestive Disease, the Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Shenzhen 518000, China

【Abstract】 After the proposal of “precision medicine” in oncology, it is widely accepted worldwide. Big hospitals in China set up their own “Precision Medicine Center” and begin to translate Next Generation Sequencing (NGS) technology into the clinic. However, the application of NGS in the clinical oncology is not proceeding smoothly. Because of the complexity and the quick renewal of NGS technologies in oncology, NGS could only be used experimentally in the predictable future. In addition, the latest NGS sequencers are very powerful in terms of data production, favoring simultaneously analysis of hundreds and thousands of samples at low cost. Because of the above facts, hospitals are not competitively enough to run an NGS platform by themselves. Alternatively, the interpretation and application of NGS data in the clinic is lagged far behind, and it's where the hospital resources should be devoted.

作者简介:陈伟,住院医师,E-mail: dr.chenwei@aliyun.com

通讯作者:何裕隆,主任医师,博士生导师,E-mail: heyulong@mail.sysu.edu.cn

To cope with the challenges of the big data produced by NGS, a new specialized department of precision medicine needs to be created, which will bridge the gap between NGS data production and its clinical application. The shortage of NGS specialists in the clinic is a weak point, highlighting the needs of training and specialization. This NGS training is not restricted to the practicing physicians, but also includes basic education for undergraduate and graduate students, which may form a solid base for clinical NGS application. With the cooperative efforts from the hospitals, independent NGS diagnostic testing facilities and medical schools, the NGS will see increasing prosperity in the future.

【Key words】 Next Generation Sequencing (NGS); Oncology; Clinical application; Precision medicine; Medical genomics; NGS panel

1 NGS 临床应用概况

随着高通量测序 (next generation sequencing, NGS) 技术的发展, 测序成本不断降低。NGS 在基础研究领域的应用不断深入, 在肿瘤基因诊断中的应用价值也日益体现, 主要应用领域包括肿瘤个体化用药、肿瘤早期诊断、肿瘤患病风险预测等。为了追赶 NGS 检测的热潮, 不仅产业界积极布局第三方测序服务, 大型医院也纷纷建立“精准医学中心”, 这些工作积极推动了 NGS 技术的临床转化。然而由于各种因素的制约, NGS 在临床肿瘤中的应用进展并非一帆风顺。

NGS 的临床应用最早从无创产前检测 (Non-Invasive Prenatal Testing, NIPT) 开始, NIPT 也是目前 NGS 应用最为成熟的领域。该检测利用 NGS 对母亲血液中的游离 DNA (cfDNA) 测序, 从而对胎儿染色体拷贝数异常进行推断。NIPT 不仅准确率高, 而且无创、成本可控, 是对现有胎儿染色体异常筛查技术的巨大提升, 因此在临床迅速推广开来。目前, NIPT 已经像传统检验项目一样简便, 采用监管机构批准的测序仪和配套试剂盒, 医院可以在院内检验科进行 NIPT 自动化检测和数据分析, 不需要过多人为干预。NIPT 技术相对简单, 且临床意义明确, 是其获得成功的重要原因。

与之相反, 肿瘤临床 NGS 检测仍然是一个开放的、未成熟的、充满探索性的领域, 现阶段还无法做到像 NIPT 那样标准化。肿瘤领域应用比较成熟的方向是非小细胞肺癌的靶向用药指导和遗传性肿瘤的基因诊断。非小细胞肺癌具有较多的治疗靶点及匹配的治疗药物, 包括 EGFR 点突变和短缺失、ALK 或 ROS1 的融合基因等, 变异复杂、位点多, 采用 NGS 检测优势明显。同样的, 在遗传性肿瘤致病基因诊断方面, 大多数致病抑癌基因突变热点并不集中, 且往往存在多个候选致病基因, 因此最适合采用 NGS 实现多基因多位点平行

检测。相比于非小细胞肺癌, 其它散发性肿瘤缺乏足够数量的治疗靶点及靶向治疗药物, 少量的检测需求可以通过传统基因诊断技术明确, NGS 检测需求并不强烈, 导致临床应用较为缓慢。

2 千元基因组时代已经来临

由于上游测序仪器公司及下游测序服务公司的不断努力, 测序成本已经显著降低。本文撰写之时 (2019年6月), 部分公司的科研级外显子组测序服务 (含单个外显子组 40M 靶区、100×测序深度、初级数据分析), 报价已经低至 1000 元。对于数据量更大的全基因组测序, 报价也低至 3000 元。因此, “千元基因组”时代已经到来, 测序已经从“高端技术”逐步走向“平民化”, 之前只有经费充足的大型实验室才能开展的测序项目, 现在普通小型实验室也能够开展。测序技术的进步为 NGS 全面应用于个人健康评估及临床诊断铺平了道路。

3 肿瘤 NGS 临床应用潜力巨大

肿瘤领域仍存在迫切的未被满足的需求, 尤其是晚期肿瘤的治疗和早期肿瘤的筛查, NGS 恰恰具备满足这些需求的条件。对于晚期肿瘤而言, 靶向治疗、免疫治疗是控制乃至治愈肿瘤的希望, NGS 作为靶向治疗、免疫治疗的伴随诊断, 同样有着迫切的临床需求。晚期肿瘤用药指导是目前临床 NGS 应用的主要领域, NGS 能够同时实现多基因、多位点突变检测, 还能检测基因拷贝数变化 (CNV)、融合基因、寡插入与缺失变异等, 同时能够对标本的 MSI 状况、肿瘤突变负荷 (TMB) 等做出诊断, 较传统技术有着显著的优势。

液体活检是 NGS 另一潜力较大的方向。肿瘤 DNA 变异在肿瘤发生早期或肿瘤负荷较小时便出现于血液中, 通过检测这些体液中的游离 DNA 能够对肿瘤是否存在或是否发生进展做出判断。

NGS具有高敏感性和特异性,研究表明肿瘤发生早期,深度测序便能够发现循环中肿瘤相关的基因变异,较目前广泛使用的肿瘤标志物和影像学检查具有早的提前量。在早期癌变甚至癌前病变阶段就筛查出肿瘤,无疑能够大大降低肿瘤的危害。目前产业界和学术界正在积极开发基于NGS液体活检的肿瘤早筛技术,将来有望应用于肿瘤的早期乃至超早期筛查。不仅如此,NGS液体活检还能用于监测已经发生的肿瘤,应用于根治性术后肿瘤复发监测、肿瘤治疗后效果评估、微小残留病灶诊断等。这些前沿性肿瘤临床应用均在积极开发之中,将来有望取得突破并最终推广应用。

4 临床级 NGS 测序成本较高

尽管科研级外显子组(WES)测序价格已经下探至千元,临床级测序价格仍然高昂,类似的临床级外显子组测序报价在两万元以上。科研级与临床级NGS检测存在着明显的区别,临床级别的NGS测序对测序仪、相关试剂耗材、测序靶集(panel)、测序场地、检测流程、人员资质、企业资质等有着更加严格的要求,这样会增加相应的成本。作为体外诊断项目,技术要足够稳定,需要大样本积累和人群大规模验证等。此外,由于NGS技术升级较快,开发一款符合政府监管的产品需要数年时间,等到拿到注册证准备销售之时,产品往往已经落伍了。这些原因导致临床肿瘤NGS靶集研发成本较高。

此外,容易被忽视的临床级测序成本是产品推广和数据解读相关成本。科研级测序一般由科研用户直接联系测序服务商,市场推广成本相对较低。相反,临床级测序往往需要第三方测序服务商向每位医生宣传教育,成本高昂。科研级测序一般测序数据生产出来后服务即结束,不存在下游临床解读。相反,临床级测序拿到数据只是完成了一半,医生还需要对测序结果进行分析、查阅资料、讨论,形成处理方案;在测序靶集较大时,花费的时间成倍增加。这部分临床数据解读成本,目前也转嫁到测序环节。由于上述原因,临床级测序收费高昂,阻碍了一大批患者和医生的选择。

5 NGS 临床推广应用困难

目前国内获得NMPA(国家药品监督管理局)批准的肿瘤NGS试剂盒,主要用作伴随诊断,用

于指导肿瘤临床用药。然而临床上早已有了经典的竞争性技术,包括一代测序、实时定量PCR(Real-time PCR)、FISH(荧光原位杂交)等。由于大多数临床医生对传统技术更加熟悉,由传统技术转向高通量测序并非易事。一方面,NGS技术体系较为复杂,医生缺乏相关训练,对其并不了解;另一方面,绝大多数NGS测序试剂盒或服务并没有经过大样本科学验证,可靠性难以评价。因此,尝试使用昂贵的、未经明确验证的高通量测序,往往并不容易。与传统技术相比,NGS的巨大优势无疑其高内涵,不仅在于其对同质性检测的高通量,还在于对异质性检测的高通量,例如单个靶集囊括点突变、融合基因、MSI等。因此,尽管单位点NGS成本优势不及传统技术,但多位点整体成本优势明显。如何密切联系临床开发测序靶集,将NGS优点发挥到极致,将是NGS成为临床核心分子诊断技术的必由之路。

6 肿瘤 NGS 将长期处于探索性应用阶段

NGS具有广阔应用前景,同时也意味着技术变化多端、创新日新月异。遗传病基因检测相对简单,WES或WGS(全基因组测序),联合CNV(拷贝数变异)分析,可以满足大部分致病基因检测需求。肿瘤体细胞突变领域则完全不同,组织类别、肿瘤细胞占比、待检变异类型等的不同,检测手段差别巨大。胸腹水、穿刺活检、石蜡切片等标本来源的不同,对NGS测序也带来很大的考验;未来潜力巨大的液体活检技术,检测ctDNA突变、CNV、甲基化等几乎是完全不同的流程。不同条件下的NGS检测均需要逐步试验和完善,这将是一个长期的过程。与此同时,肿瘤NGS的进化紧随临床治疗的进步,随着新的治疗或预测靶点的发现,NGS测序靶集需要不断升级。因此,NGS技术的复杂性决定了其将长期处于探索性应用阶段,这不仅是对测序公司的挑战,同样也是对临床数据解读医生的挑战。临床需要密切追踪NGS检测的升级和肿瘤治疗的进步,及时更新自己的知识体系,并把最新的研究成果应用于肿瘤患者的个体化诊疗。

7 医院不适于自建肿瘤 NGS 平台

临床NGS应用主要有两种模式:第一,医院自建NGS平台,完成从数据生产到数据应用的整

个流程;第二,医院把测序和数据分析外包给第三方测序公司,医院负责 NGS 数据的临床解读。尽管大型医院自建 NGS 平台看似更加符合自身的定位,但实际上由于主客观条件所限,医院自建 NGS 平台并非最优选择。NGS 平台的搭建需要多种硬件和软件设施,不仅包括测序仪、数据库、场地、技术人员、生信人员等看得见的投入,还包括测序数据分析软件、变异解读软件等看不见的投入。由于肿瘤 NGS 检测将长期处于探索性应用阶段,包括测序仪、配套试剂耗材、测序靶集、分析方法等都在进行快速迭代。临床负责 NGS 的检验科或病理科并非研发型机构,不具备快速反应甚至主动研发能力。其次,与其它体外诊断一样,较大的样本量是降低成本的必由之路。NGS 测序仪具有非常强大的数据生产能力,单家医院一般难以获得足够的样本量,导致产能闲置。因此,目前 NGS 临床应用最有效的模式是外包测序服务,医院不再作为 NGS 数据生产的主体,由第三方测序公司负责测序数据生产和分析,由医院医生进行测序数据的临床解读(图 1)。



图 1 外包模式下 NGS 检测的实施流程。

外包模式下 NGS 检测主要参与者有:病人、医院(医生)、第三方测序服务商。其主要流程如下:1. 就诊对象(病人)来到医院就诊,医生筛选出需要进行 NGS 检测的患者;2. 医生直接联系第三方测序服务商,或者通过医院平台间接联系测序服务商,提出 NGS 检测需求;3. 第三方测序服务商取得标本进行规范的 NGS 检测 and 数据分析,并将结果回报给医院;4. 医生根据 NGS 检测报告,确定就诊对象的治疗计划。

8 基因与变异解读挑战

基因功能和基因突变注释是一项艰巨的任务。人类基因数以万计,每个基因的变异种类成百上千,基因与变异自由组合以后可能性几乎无限。

在基因功能注释尚未透彻的情况下,对基因变异的注释难度更大。临床证据的获得依赖于对大样本同质化个体的观察和试验,由于绝大部分基因/变异组合发生率较低,因此对变异的注释难度很大。目前通行的做法是假设发生在同一基因上的不同变异具有相同的功能。这一过度简化的解读显然存在缺陷,一个典型的例子是 EGFR,临床观察和功能研究证实了 EGFR 不同突变具有不同的作用,例如初治肺癌常见 EGFR 突变为 19 外显子非移码缺失突变、21 外显子 L858R 点突变,携带上述突变的肺癌患者适于二代抗 EGFR TKI(酪氨酸激酶抑制剂)例如吉非替尼、厄洛替尼治疗。一代 EGFR TKI 治疗后肿瘤发生耐药,主要原因是出现 EGFR T790M 突变,此时适用于三代 TKI 例如奥西替尼治疗。由此例可以看出,并不能笼统认为同一基因,例如 EGFR 的各种突变功能大致相同。然而,要发现这些知识是非常困难的,肺癌由于其庞大的病例量和全球范围内的积极合作研究,才得以做出上述发现;然而,其它肿瘤或基因变异并不具备这种基础。遗传性肿瘤基因解读中的一个棘手的问题是意义未明突变 (Variant of Uncertain Significance, VUS),主要是抑癌基因的错义突变。VUS 同样可以用于描述肿瘤体细胞突变。尽管存在一系列的算法来预测这些突变的功能,但没有解读医生会依赖这些预测。这些 VUS 只有通过临床观察或者功能试验一个一个解决,其难度可想而知。

9 基于分子分型的跨瘤种用药是肿瘤治疗的趋势

目前美国食品药品监督管理局(FDA)已经批准了 2 个跨肿瘤基因检测和对应的靶向或免疫治疗。其一是 2017 年批准 PD-1 抗体(pembrolizumab),用于确诊为高度微卫星不稳定性(MSI)或者错配修复基因缺陷(dMMR)的晚期或转移性实体肿瘤患者,这也是历史上首次按照基因型而非肿瘤类型确定药物应用范围。PD-1 抗体的获批为跨瘤种用药开了先例,其后美国 FDA 又批准了靶向 NTRK 家族融合基因的 larotrectinib(拉罗替尼)。NTRK 家族也是一种酪氨酸激酶,在多种肿瘤中存在罕见融合基因,总体发生率约 0.2%。对于携带 NTRK 融合基因的肿瘤,拉罗替尼显示出显著的效果。由上述案例可以推测,未来肿瘤分子分型会越来越细,肿瘤将按照驱动基因进行划分,对应的新

药研发、临床试验也会按照驱动基因进行。预计未来会有越来越多的跨肿瘤药物获批,随着治疗靶点的不断累积,药物弹药库的不断充实,之前那些缺医少药瘤种中将有一部分人可以从靶向/免疫治疗中获益。

10 基因组“大数据”带来的挑战

靶向药物弹药库的增长必然带来对多基因靶集的需求,肿瘤的治疗模式渐渐转向“测序-药物”模式:先通过 NGS 寻找靶点,再匹配药物库,进而开展治疗。这种模式将会对医生的疾病、基因、药物三角知识网络提出前所未有的挑战(图 2)。随着测序成本的不断下降和 NGS 临床意义的不断挖掘,未来大靶集测序(例如 500 基因靶集、WES)是大势所趋。尽管每个病人的测序报告中阳性或有临床意义的结果不多,但这并不代表解读工作会非常轻松,事实上人群变异累积起来会非常多,理论上解读医生需要掌握靶集中所有的基因。要掌握如此多的基因,以及相应的疾病和药物知识,对于人类来说是巨大的挑战。基因组医学医生将不得不求助于疾病、基因、药物数据库,但无论如何电脑无法代替人脑来完成主要工作。

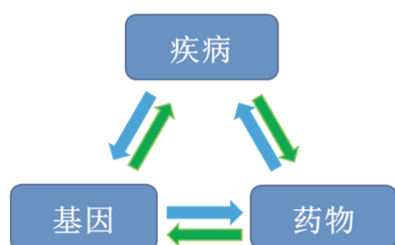


图 2 疾病、基因、药物的“三角关系”。

目前肿瘤主要按照解剖部位进行分类和治疗,在“精准医学”时代,肿瘤将按照基因变异进行分子分型,不同的亚型适用不同的治疗药物。新的分子分型将打破传统肿瘤分类的界限,肿瘤医生需要掌握的基因与药物知识将显著增加。

11 精准医学需要专业分工

医院在应用基因组学大数据时,需要对相关科室职能进行重新分工。目前医院 NGS 应用采用传统病理检测模式:由病理科等负责(外包)NGS 检测并出具报告,相关科室医生在收到报告后对患者的诊疗做出判断。因此,NGS 数据的临床解读按病种散布在不同科室。在“精准医学”时代,肿瘤

的治疗依赖基因检测和分子分型,不同的分子亚型的肿瘤适用不同的治疗药物,同一分子亚型的不同肿瘤可以使用同样的药物治疗,新的分子分型将打破传统肿瘤分类的界限。另一方面,随着靶向药物的不断涌现和 NGS 临床应用的不断挖掘,具有关键临床意义的基因和药物数量将越来越多,关于基因、疾病、药物的临床知识库会爆炸式增长,肿瘤医生需要掌握的基因与药物知识将显著增加。在 NGS 时代之前,一位医生往往掌握本领域的 5-10 个基因,便能够达到专家级别;到了 NGS 时代,测序产生的数量庞大的低频变异、复杂变异、跨瘤种基因变异等,几乎没有个人能够胜任。

由于临床基因组大数据明显超出了肿瘤专科医生的应付范围,因此需要建立一个“精准医学科”或者“基因组学科”专科,其核心是从事基因组大数据的临床解读(图 3)。“精准医学中心”的自身定位是作为数据生产(主要是第三方测序公司)与数据应用(各瘤种对应的临床专科)之间的桥梁,负责把基因组大数据解读给一线的专科肿瘤医生,让患者从基因组数据中获益(图 3)。目前各大医院成立的“精准医学中心”,其实只是布局测序数据的生产,绝大多数甚至只是外包测序,不能满足临床对肿瘤“精准医学”的需求。精准医学专科化以后,可以带来专科化管理运营、专科化人才培养和梯队建设,能够有效提高基因组大数据解读的效率。

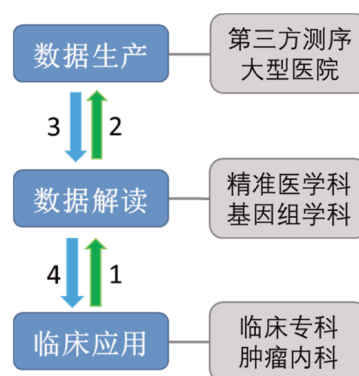


图 3 潜在 NGS 临床肿瘤应用方案。

1. 肿瘤病人来到医院就诊,专科医生评估病情,并联合“精准医学科”确定 NGS 检测方案;2.“精准医学科”外包给第三方测序服务商,或者通过医院测序平台,进行 NGS 检测;3. 第三方测序服务商取得标本进行标准化 NGS 检测和数据分析,并将结果回报给“精准医学科”;4.“精准医学科”解读测序报告,并与专科医生讨论和设计就诊对象的诊疗计划。

12 NGS本科与研究生教育

NGS作为一个新生事物,诞生不过十余年,快速推广应用不过最近几年的时间。在临床应用领域,NGS相关从业人员主要靠“自学成才”。NGS临床专业人才极为匮乏,医学院校和医院的系统教育仍然为零。由于临床基因组学的复杂性,显然不能只依靠执业后的继续教育。为了培养更多的、更高质量的“精准医学医生”,需要推广NGS的本科与研究生教育。相应的,一个新的学科需要被建立起来,其名称类似“基因组医学”、“精准医学”等。设立相关的本科和研究生学位,传授遗传学、基因组学、生物信息学、分子诊断学、肿瘤学等课程,用于培养专业临床基因组学医生。通过这种方式培养起来的基因组学医生无疑更加专业。有了良好的基础教育,才能源源不断的往临床输送人才,推

动肿瘤NGS的临床应用。

13 总结

本文主要阐述了NGS在肿瘤临床应用中面临的挑战,评价了医院和医生需要努力的方向。除了上述问题以外,NGS的推广应用还需要解决其它关键问题,例如完善行业标准和监管,包括NGS数据生产、数据解读等各个环节,促进NGS的规范化、标准化;推动数据共享,建立人群基因组学大数据库,揭示低频变异的临床意义;推动NGS进入医保支付,减轻患者的负担等;合理分配权益,平衡各方利益。针对上述问题,学术界和政府也在开展相关工作,但步伐相对滞后。各利益相关方需要进一步认识到NGS所面临的机遇和挑战,采取相关措施,积极推动肿瘤NGS的临床应用。

·读者·作者·编者·

更正声明

由于第一作者疏忽,未能发现文字错误,遗漏一名作者中文信息,现特此说明:刊登在《消化肿瘤杂志(电子版)》2019年第11卷第1期题为《液体活检技术及其在肿瘤早筛中的应用进展》一文第五作者为吴英英(中山大学附属第一医院转化医学科,广东广州510080),特此声明。