

# 池田喬哉 論文内容の要旨

## 主 論 文

Direct Comparison of 3 PCR Methods in Detecting EGFR Mutations in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer

進行非小細胞肺癌患者の EGFR 遺伝子変異検出における 3 つの PCR 法の直接比較の検討

池田喬哉、中村洋一、山口博之、朝永七枝、土井誠志、中富克己、飯田哲也、元島幸平、溝口孝輔、永安 武、塚元和弘、河野 茂

Clinical Lung Cancer 2012 Mar 10: Epub ahead of print (6 ページ)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員：河野 茂 教授)

## 緒 言

ゲフィチニブは上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼを阻害することで抗腫瘍効果を示す。非小細胞肺癌患者のおおよそ20～30%にEGFR遺伝子変異があるといわれており、exon18、exon21の点突然変異とexon19の欠失はEGFRチロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性因子である。現在、EGFR遺伝子変異の検出はさまざまな方法で行われているが、実臨床においてどの測定法が最も適しているかは明らかにされていない。今回、我々はEGFR遺伝子変異検出における代表的な3つのPCR法の直接比較を行い、それぞれの臨床的特性を評価した。

## 対象と方法

### 対象症例

病期分類ⅢB・Ⅳ期または術後再発の非小細胞肺癌患者で、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤で治療歴がなく、年齢20歳以上、PS2以下、重篤な合併症がなく主要臓器の機能が保持されている症例

### DNA解析方法

患者から得られた検体を3分割し、3つのPCR法 (mutant-enriched PCR法、PNA-LNA PCR clamp法、PCR invader法) でEGFR遺伝子変異の測定を行った。少なくとも1つのPCR法でEGFR遺伝子変異を認めた症例に対してはゲフィチニブによる治療を行った。どのPCR法でもEGFR遺伝子変異を認めなかった症例に対しては殺細胞性抗癌剤による化学療法を行った。以下にPCR法について記す。

- Mutant-enriched PCR法

最初に変異のない塩基配列を切断する制限酵素を用いて正常alleleを切断し、次に変異alleleを選択的に増幅し、そのDNA鎖を切断する2段階制限酵素を用いるPCR-RFLP法を応用したMutant-enriched PCR法。

- PNA-LNA PCR clamp法

PNA (peptide nucleic acid) clamp primerとLNA (locked nucleic acid) probeを用い、優先的に変異のある配列を増幅させ遺伝子変異の検出を行う方法。LNAを、変異型配列を検出するプローブとして用いた。また、野生型配列に結合し野生型配列の増幅を抑制するPNA clamp primerを用い検出感度を改善している。

- PCR invader法

変異のある塩基配列に結合する2種類のプローブを用いてDNAとの3重鎖のオーバーラップ構造を形成させ、オーバーラップ構造を認識する切断酵素を用いてプローブの一部を切断し、それをfluorescence resonance energy transfer (FRET)で認識を行うことで遺伝子変異の検出を行う方法。

## 治療

EGFR遺伝子変異を認めた症例に対しゲフィチニブ1日1回250mgの投与を行った。EGFR遺伝子変異を認めなかった症例に対しては通常の化学療法が行われた。

## 結 果

2008年4月から2010年5月に50例の進行非小細胞肺癌患者が登録された。男性31例、女性19例で47例が腺癌であった。うち17例でEGFR遺伝子変異を認め、5例は3つのPCR法の結果に相違を認めたが、これら5例はすべてゲフィチニブが奏効した。EGFR遺伝子変異を認めた17例全ての症例でゲフィチニブ治療が行われ、EGFR遺伝子変異のない33例中21例で殺細胞性抗癌剤での化学療法が行われた。ゲフィチニブ投与群、化学療法群の無増悪期間中央値はそれぞれ8.2ヶ月、5.9ヶ月であった。

## 考 察

50例の非小細胞肺癌患者において、3つのPCR法を用いてEGFR遺伝子変異検査を行った。17例でEGFR遺伝子変異を認め、このうち5例に3つのPCR法の結果の解離(3つのうち少なくとも1つ以上で遺伝子変異陰性)を認めたが、これら5例はすべてゲフィチニブが奏効しており偽陰性が考えられた。5例のうち3例は術後パラフィン検体であり、提出検体中に腫瘍量は十分であると予想されたものの解析結果にばらつきがあった。病理検体は固定の過程でDNAの損傷が生じることが知られており、それらがこのばらつきの原因であることが示唆された。これにより、たとえDNA解析であって十分な癌細胞を含んだ良質な未固定の検体を解析に提出すべきであると考え得るが、肺癌はほとんどの症例において直視下での検体採取が不可能である。このため、未固定検体では検体中の腫瘍細胞の存在が必ずしも保証されない、という問題を常に含んでいる。このことに対して、臨床現場でのさらなる改善を図っていく必要性が示唆された。