

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

高瀬 貴章 印

Highly sensitive detection of a *HER2* 12-base pair duplicated insertion mutation in lung cancer using the Eprobe-PCR method

(Eprobe-PCR法を用いた肺癌におけるHER2 12塩基重複挿入変異の高感度検出系の構築)

human epidermal growth factor receptor-related 2 gene (*HER2*)における体細胞変異は、肺癌におけるdriver mutationの1つである。*HER2*遺伝子変異は肺腺癌の約2%に認められる。*HER2*遺伝子変異で最も多い変異型はexon20のcodon775における12塩基重複挿入変異であり、肺腺癌における*HER2*遺伝子変異の80%程度とされている。*HER2*タンパクに対する分子標的薬であるトラスツズマブや*HER*ファミリーに対する不可逆的阻害薬であるアフチニブが、上記の*HER2*遺伝子変異症例に対して高い病勢制御率を得たとする報告が散見される。このような過去の報告より、*HER2*遺伝子変異は予後予測因子となると考えられ、*HER2*遺伝子変異の有無が個別化医療に寄与するものと思われる。しかしながら、上記のような肺癌における*HER2*遺伝子変異同定の重要性があるにも関わらず、変異検出系の感度等の詳細については未だに知られていない。これまでは従来法のサンガー法や次世代シーケンサーによるスクリーニングに基づいた報告がなされている。一方、コスト面や煩雑性において実臨床への導入が困難なシーケンス解析手法に比べ、簡便で高感度な解析手法が求められている。近年、理化学研究所で開発された蛍光色素によるリアルタイムPCR法であるEprobe-PCR法が開発された。これにより定量的PCRと融解曲線解析が1本のprobeで行うことが可能である。今回我々はこのEprobe-PCR法を用いて、肺癌における*HER2*遺伝子変異を迅速、簡便、高感度に同定するアッセイを開発した。本研究ではサンガー法や次世代シーケンサーによる解析とEprobe-PCRによる解析を比較して、Eprobe-PCRのfeasibilityを評価することに焦点を当てた。*HER2*遺伝子変異型(12塩基重複挿入変異)のみをより増幅させるように、allele specific PCRの原理を応用してprimerおよびprobeを設計した。forward primerとreverse primerは1:5の非対称PCRとし、より効率的に変異型配列を増幅するような反応組成とした。本アッセイの定量感度を確認するためにin vitroによる検討を行っ

た。腫瘍のheterogeneityを考慮して、HER2変異型配列を含む変異Plasmid DNAを野生型Plasmid DNA で希釈して検討したところ0.1%まで変異型配列を検出可能で、高感度検出系であることが確認された。次に臨床検体から抽出したDNAを用いて、サンガー法および次世代シーケンサーでの amplicon sequenceを行いEprobe-PCRとの結果を比較検討した。2002から2014年に当院で切除された635症例の肺癌患者（腺癌以外も含む）の腫瘍の凍結検体およびホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体よりDNAを抽出し検討した。FFPE検体に関しては正常組織の混入を最小限とするために macrodissectionを行った。サンガー法では635例中7例がHER2遺伝子変異陽性と判定された。この7例は全てEprobe-PCRでも変異陽性と判定された。この7例を含む9例が次世代シーケンサーで変異陽性と判定され、Eprobe-PCRでも同様の結果であった。上記9例のFFPE検体から抽出したDNAを用いてEprobe-PCRを行ったところ、凍結検体と同様に9例全て変異陽性と判定された。従来法であるサンガー法と比較して簡便で迅速かつサンガー法と同等以上の検出感度が得られた。次世代シーケンサーによるvalidationをしばしばDNAの断片化が危惧されるFFPE組織から抽出したDNAでも変異同定が可能であり、本法の実臨床への導入が期待される。