

(様式4)

学位論文の内容の要旨

病態制御内科学 笠原 礼光 印

Plasma epidermal growth factor receptor mutation testing with a chip-based digital PCR system in patients with advanced non-small cell lung cancer

(進行非小細胞肺癌症例を対象としたデジタルPCRによる血漿中EGFR遺伝子変異検出系の検討)

(学位論文の要旨)

背景：上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor ; EGFR) 遺伝子変異検査はEGFRチロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR tyrosine kinase inhibitors; EGFR-TKI) のコンパニオン検査として、非小細胞肺癌とくに肺腺癌の治療選択に必須の検査である。EGFR-TKIにより一旦は良好な治療効果が得られるが、多くの患者は最終的にEGFR-TKIに耐性を示すようになり、その約半数でT790Mという耐性変異が検出されることが知られている。近年、T90Mを標的とした第3世代EGFR-TKIであるオシメルチニブが保険収載された。オシメルチニブの使用には再発腫瘍でT790Mを確認することが条件だが、その検出方法は生検や手術による組織検体を主体としているため、病状増悪時の腫瘍の再生検が困難な症例が多い。

近年、組織生検の代替方法として、Liquid biopsyといわれる血中循環DNAをバイオマーカーとした研究が進められている。血中循環DNAの採取は採血のみで行えるため、従来の生検と比べて低侵襲である。しかし血中の腫瘍由来のDNAはしばしば非常に低濃度であり、従来法よりも高感度な検出法が必要とされる。デジタルPCRは高感度で正確な定量性を有する検査法であり、血中循環DNAへの適応が期待されている。そこで我々はQuantStudio 3D デジタルPCRシステムを用いて、血漿中のEGFR遺伝子変異 (Exon19欠失、L858R、T790M) 検出系を立ち上げ、その有効性を評価した。

方法：49例のEGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌を対象として、血中循環DNAを血漿中より抽出した。49例中、21例がEGFR-TKIによる治療前の血漿であり、28例がTKI治療後の血漿であった。全例が腺癌であり、34例がEx19欠失を有し、15例がL858Rを有していた。

結果：検定用DNAを用いた検出感度検定を行ったところ、Quantstudio 3Dシステムの検出感度は0.1%となった。臨床検体の血中循環DNA濃度の中央値は35.1ng/ml (range 12.2-139.5ng/ml)であった。組織検体でのEGFR遺伝子変異の結果を真とした場合の血中循環DNAを用いたEx19欠失の感度は70.6% (24/34)、特異度は93.3% (14/15)であり、L858Rの感度は66.7% (10/15)、特異度は100% (34/34)であった。Ex19欠失の全体の一致率は77.6% (38/49)であり、L858Rの一致率は89.8% (44/49)であった。28例のEGFR-TKI治療後の血漿中、T790Mは43% (12/28)で検出されたが、TKI治療前の21例からはT790Mは検出されなかった。胸郭内に病変が限局している症例(M1a)と比べて、胸郭外に転移がある症例(M1b)でより血中循環DNA中のEGFR遺伝子変異が検出される傾向があった(p=0.053)。治療前に血漿サンプリングされた21例のうち20例でEGFR-TKIが投与されたが、血漿中EGFR遺伝子変異検出の有無により治療効果に差は見られなかった (EGFR遺伝子変異無 vs 有; 奏効率 87.5 vs 66.7%, p=0.60; 無増悪生存期間中央値 11.7 vs 9.7カ月, p=0.60)。

考察：QuantStudio 3D デジタルPCRシステムによる血中循環DNA中EGFR遺伝子変異の検出感度は0.1

%であり、感度は66.7-70.6%、特異度は93.3-100%であった。他のデジタルPCRと比較すると、ドロップレットデジタルPCRであるQX100/QX200の検出感度は0.01-0.04%、磁気ビーズを用いたBEAMing法は0.01%、他機種チップベースデジタルPCRの感度は0.03-0.1%と、本研究よりも良い検出感度が報告されている。その一方で他機種のデジタルPCRの感度・特異度はそれぞれドロップレットデジタルPCRで感度66.7-84.3%、特異度95.8-100%、BEAMing法の感度72.7-87.0%、特異度96.8-100%、他機種チップベースデジタルPCR感度78.9%、特異度100%であり、本検討とほぼ同等であった。これらの結果からは高い検出感度の検査法が必ずしも高い感度・特異度を示すとは限らないと考えられる。この解離の原因としては、検出感度検定に用いるDNAの違い（プラスミドあるいはヒトゲノム）、プライマーやプローブの設計の違い、カットオフの設定値の違い等が考えられる。この研究のlimitationとして、第一に他のデジタルPCRによる検証ができていないことが挙げられる。これについては他機種のドロップレットデジタルPCRで検証済みの検定用DNAを用いて検定感度測定を行ったことで、間接的にはあるがパフォーマンスの検証を行えたと考える。第二に、本研究は血中循環DNAのみを対象としており、組織検体での検討ができていないことが挙げられる。感度、特異度の検定は従来法であるスコーピオンアームズ法による組織検体の結果を真として行っているため、可能であれば組織検体に対してもデジタルPCRによる検査を行うことが望ましい。本研究では十分な組織検体が残っておらず、組織検体を用いた検定は困難であった。第三に組織検体と血漿検体を採取するタイミングが異なっていたことが挙げられる。血中循環DNA中のEGFR変異の濃度はEGFR-TKIや殺細胞性抗がん剤の影響で変動することが報告されており、時間経過自体も濃度に影響を与えうる。またEGFR-TKI治療後に組織の再生検が行われていないため、T790M変異の感度・特異度の評価が行えなかった。以上は臨床的な限界であり、組織生検と採血のタイミングを一致させた前向き研究の施行が望まれる。

結論：QuantStudio 3DデジタルPCRシステムは他のデジタルPCRシステムと同等のパフォーマンスを示した。デジタルPCRを用いたcfDNA中のEGFR遺伝子変異検査は低侵襲な検査法として今後利用しうると考えられた。