

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19790567
 研究課題名(和文)全ゲノムSNP解析を用いた非小細胞肺癌関連遺伝子の同定
 研究課題名(英文)A genome-wide screen for gene affecting non-small cell lung cancer.
 研究代表者 田中 知明(TANAKA TOMOAKI)
 埼玉医科大学・医学部・研究員
 研究者番号：60433653

研究成果の概要：

本研究室で開発した EGFR 遺伝子変異高感度迅速検出法である PNA-LNA PCR clamp法を用い、約2000例の解析結果より、およそ30%の患者に gefitinib 感受性 EGFR 遺伝子変異の存在を有することを明らかにした。この EGFR 遺伝子変異に關与する患者因子について、ロジスティック回帰分析により、喫煙歴及び癌組織型が EGFR 遺伝子変異の存在に強く關連することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	390,000	2,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の目的は、GeneChip による全ゲノム SNP 解析データを用いて、非小細胞肺癌の関連遺伝子をホモ接合指紋法、およびホモ接合ハプロタイプ法にて同定することであった。

(2) いくつかの報告により、EGFR 遺伝子変異は非喫煙アジア人女性の腺癌に高率に認められることが明らかになっていた。

(3) 日本全国の肺癌死亡数が約5万名であることを考えると、その原因となる因子の検索は、国民衛生上喫緊の課題である。

(4) EGFR 遺伝子変異検査における変異検出感度、特異度、およびコストの面を全て満たす

ことができる高感度迅速検査方法として、PNA-LNA PCR clamp 法を開発した。同法は1%の変異を検出することが可能である。

(5) 临床上 EGFR 遺伝子変異検査の重要性が増し、EGFR 変異関連患者因子を明らかにする必要性が出てきた。同遺伝子変異の関連因子として、女性、腺癌、非喫煙者に多いことが報告されていた。

2. 研究の目的

(1) 2005年より当院を受診した非小細胞肺癌患者全例に対して、PNA-LNA PCR clamp 法による EGFR 変異検査を行っている。同患者検体情報を用い、EGFR 変異関連因子を明らかにする。

(2)病理診断に用いる検体の一部を使用することで、EGFR 遺伝子変異検査を行うに当たり、患者に負担のない変異検査システムを確立する。そのために、高感度に変異を検出できるシステムの確立を試みる。

(3)EGFR-TKI 治療において、gefitinib 耐性獲得変異の存在がいくつか明らかにされた。そのうち最も多い変異として、Exon 20 T790M 変異の存在が明らかにされた。Gefitinib 耐性機構のおよそ 50% 程度は、同耐性変異に起因することが報告された。よって PNA-LNA PCR clamp 法に、同耐性変異 T790M を検出するシステムを導入することを試みる。

3. 研究の方法

(1) 患者検体は、2004 年から 2008 年の間に埼玉医科大学病院を受診した、約 300 例の非小細胞肺癌患者より、同意を取得した患者検体を使用した。

各々の患者検体から得られた喀痰、胸水、気管支鏡細胞診、生検組織細胞診およびパラフィン包埋組織の病理検体は、全て 2 分割した。1 方は病理診断に使用し、病理診断上検体に肺癌細胞が存在することが確認された検体について、EGFR 遺伝子変異解析を行った。

肺癌と診断された検体の残りの 1 方を用い、PNA-LNA PCR clamp 法による EGFR 遺伝子変異解析を行った。EGFR 遺伝子変異種として、gefitinib 感受性変異種である、Ex18 G719C, G719S, Ex21 L858R, L861Q, および Ex19 deletions(7 種)を PNA-LNA PCR clamp 法によって検出した。

検体に実際に含まれる癌細胞の量を計測する為、病理診断に使用したスライドガラス検体から、ランダムに抽出した約 60 例の検体を用い、100~200 倍の顕微鏡下において、1 検体当たり 5 視野における癌細胞の存在率を計測した。

(2) 上記期間に受診した約 300 例の患者情報を用い、EGFR 遺伝子変異の有無に関しての関連性を明らかにするために、ロジスティック回帰分析による多変量解析を行った。

同時に上記期間に約 30 施設からの約 1700 検体について、EGFR 遺伝子変異を解析し、変異存在率を計測した。

(3)耐性変異 Ex20 T790M を検出するシステムを作製するため、プライマーおよびプローブ等の設計を行った。また、Ex20 T790M 変異陽性細胞株 H-1975 を用いて同システムの検出感度の確認を行った。

4. 研究成果

(1) EGFR 遺伝子変異を検出するシステムとして、4 つの Step に分けて解析を行うシステムを構築した。4 つの Step について、以下に簡単に記す(図 1)。Step1: 検体を 2 分割する。Step2: 一方を病理診断に使用し癌細胞の存在を確認する。Step3:肺癌の病理診断が確定した残りの 1 方を用い、PNA-LNA PCR clamp 法による EGFR 遺伝子変異解析を行う。Step4:PNA-LNA PCR clamp 法では検出できないいくつかの Ex19 deletions 種について、PNA-LNA PCR clamp 合成産物を direct sequence によって解析することで、変異種を同定した。

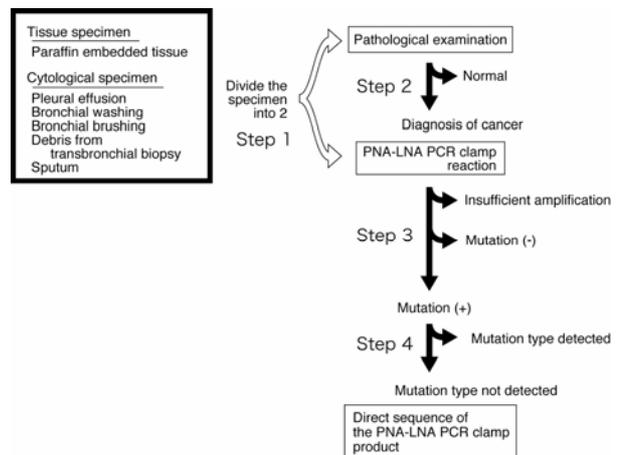


図 1 PNA-LNA PCR clamp 法を用いた EGFR 遺伝子変異検査システムの流れ

上記 EGFR 遺伝子変異検査システムにおいて、病理診断時における癌細胞の存在率を計測する為、病理診断に使用されたスライドガラス上の癌細胞数を計測し、その存在率を求めた。ランダムに抽出した約 60 例の検体において、いずれも 1%以上の癌細胞が存在することが解った(図 2)。また、1%程度の癌細胞を含む検体においても、EGFR 遺伝子変異を検出することが可能であった(図 2)。

上記に記した 4 つのステップを介した EGFR 遺伝子検査システムを確立した。このシステムを用い、約 30 以上の研究協力施設からの臨床検体を用いたスクリーニングを行い、変異解析を含む第二相臨床試験(終了済)および第三相臨床試験に参加した。同臨床試験において解析結果の個別化治療へ応用が検討され、同システムを臨床的に応用することが可能となった。

(2) 当院を受診した非小細胞肺癌患者約 300 例の患者情報(性別、年齢、喫煙歴、肺癌組織型、病期等)と PNA-LNA PCR clamp 法による EGFR 遺伝子変異解析システムにて解

析した EGFR 遺伝子変異との相関性について明らかにするため、各々の因子について、カイ2乗検定による相関解析を行った。その結果、性別、組織型および喫煙歴との関連が見られた(表1)。この結果は、以前より EGFR 遺伝子変異と関連する因子(女性、腺癌、非喫煙者)として報告されている結果と一致した(表1)。

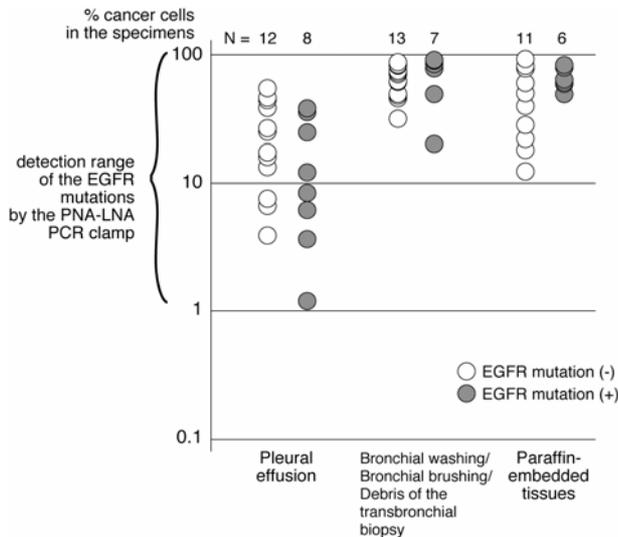


図2 病理細胞診検体に含まれる癌細胞の存在率

	Negative	Positive	χ^2 value	P-value
Sex				
Male	155	52	33.015	< .0001
Female	41	60		
Histology				
Adenocarcinoma or Adeno-squamous cell carcinoma	138	104	20.201	< .0001
Squamous cell carcinoma and others	58	8		
Smoking history#				
Less than 20 pack-year or never	37	59	41.398	< .0001
More than 20 pack-year	150	43		
Age				
Younger than 65 years.	70	54	4.125	0.0423
Older than 65 years.	126	58		
Clinical stage				
Stage I-II	27	12	0.612	0.7364
Stage III-IV	146	86		
Post-operative	23	14		

表1 EGFR 遺伝子変異と患者背景因子との関連性について(1)

喫煙歴および組織型は、各々が性差と強い関連性を持つことが知られている。また喫煙歴と組織型についても強い関連性を持つことから、これらの交絡関係の影響を考慮し、患者背景因子と EGFR 遺伝子変異との相関性について、ロジスティック回帰分析による多変量解析を行った。その結果、EGFR 遺伝子変異と強い関連性を示す因子として、肺癌組織型(腺癌および腺扁平上皮癌; odds ratio = 3.18; p-value = 0.006)および喫煙歴(20

pack-year 未満; odds ratio = 3.84; p-value < 0.0001)に強い相関性を持つことが解った(表2)。同時に、性差による影響について、有意差がないことが明らかになった(男性; odds ratio = 0.69; p-value = 0.3)(表2)。

EGFR 遺伝子変異には大きく分けて二群ある。すなわち、点突然変異(Exon18 および Exon21)と、欠失変異(Exon19)が存在する。これらの変異種に関連する患者因子について、サブグループ解析としてのロジスティック回帰分析を行った。その結果を(表3)に示すが、Exon19 欠失変異は、性別特に男性と強い関連性があることが明らかとなった(odds ratio = 5.10; p-value = 0.0011)。一方、EGFR 遺伝子変異の有無と強い関連性を示した組織型および喫煙歴に関しては、変異種に対する関連性は低いことが明らかとなった(表3)。

		Odds ratio (95% confidence interval)	P value
Age	less than 64 yrs / over 65 yrs	1.57 (0.90-2.70)	0.12
Gender	Male / female	0.69 (0.35-1.38)	0.30
Histology	Adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma / squamous cell carcinoma and others	3.18 (1.39-7.23)	0.006
Smoking history	Packs a year < 20 / 20 ≤ packs a year	3.84 (1.92-7.65)	< .0001
Stage	Stages I and II / Stages III and IV	0.84 (0.37-1.90)	0.67

表2 EGFR 遺伝子変異と患者背景因子との関連性について(2)

		Odds ratio (95% confidence interval)	P value
Age	less than 64 yrs / over 65 yrs	2.16 (0.87-5.36)	0.10
Gender	male / female	5.10 (1.92-13.54)	0.0011
Histology	adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma / squamous cell carcinoma and others	2.26 (0.43-11.8)	0.34
Smoking history	pcyear < 20 / 20 ≤ pcyear	0.64 (0.25-1.64)	0.35
Stage	Stage III to IV / Stage I to II	2.94 (0.67-12.8)	0.15

表3 EGFR 遺伝子変異種と患者背景因子との関連性について

2004年から2008年の間に約30施設からの約1700検体について、EGFR 遺伝子変異を解析した。そのうち、検体情報があり解析が可能であった約1200検体分についての変異存在率を図3に示す。陽性率は31%であり、この結果は EGFR 変異存在率について幾つか報告されている結果および全ての1700検体の解析結果とほぼ一致した。

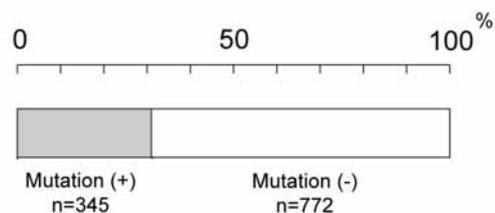


図3 EGFR 遺伝子変異陽性率

同変異検査結果について、変異種別の存在率は、Exon 18 = 3%、Exon 19 = 55.7%、Exon 21 = 41%、Exon 19 + Exon 21 = 0.3%であった。変異陽性率およびこれらの変異存在率は、埼玉医科大学に受診した約 300 検体の解析結果とほぼ一致した。

EGFR 遺伝子変異の有無と患者背景因子に関して、交絡関係を考慮した統計学的解析結果の報告は、今回の研究結果が始めてである。ロジスティック回帰分析の結果、EGFR 遺伝子変異の存在に対する性差の寄与が低いことが明らかになった。よって、非小細胞肺癌患者に対する gefitinib 治療において、性別による治療の選択は行わないことが望ましいと考えられる。

(3) PNA-LNA PCR clamp 法による gefitinib 耐性変異の Exon20 T790M を検出するために、陽性コントロールとして NCI-H1975 細胞株を使用した。同細胞株はヘテロな T790M 変異を有する。変異陰性であるコントロールゲノム DNA 1 に対して、NCI-H1975 細胞由来ゲノム DNA を 1, 0.1, 0.01, 0.001 添加し、PNA-LNA PCR clamp 法による変異検出を行った。結果を図 4 に示すが、変異 1%を含む条件下でも十分感度よく変異を検出することができた(図 4)。

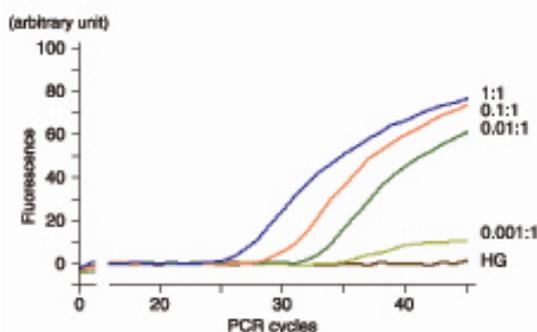


図 4 Ex20 T790M 変異の検出

当院受診の患者に関して、T790M の変異有無について解析を行ったところ、4 例の T790M 変異を検出した。何れの患者も gefitinib 治療前には T790M 変異は検出されなかったが、治療開始後に治療抵抗性になった検体から T790M 変異が検出された。

現在、PNA-LNA PCR clamp 法による変異解析システムに Exon20 T790M 解析系を導入し、全ての検体に対して解析スクリーニングを施行中である。T790M 変異に関して、体細胞変異を有する場合があるとの報告がなされていることから、同検出システムを導入することで、gefitinib 治療前における治療抵抗性変異の情報を付加し、個別化治療戦略に重要な情報を提供できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Miyazawa H, Tanaka T, 他16名, PNA-LNA PCR clamp-based detection test for gefitinib-refractory T790M EGFR mutation., *Cancer Science*, 99, 595-600, (2008), 査読有

Tanaka T, 他16名, Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes., *Int. J. Cancer*, Early View, (2009), 査読有

[学会発表](計 4 件)

Tanaka T, The PNA-LNA PCR clamp as a feasible and reliable system to screen the EGFR mutation in clinical practice., *American Association of Cancer Research*, Los Angeles, USA., 2007. 4. 18.

Tanaka T, Reliability of the PNA-LNA PCR Clamp-Based Test for EGFR Mutations Integrated into the Clinical Practice for Non-Small Cell Lung Cancers., *American Thoracic Society*, San Francisco, USA., 2007. 5. 20.

田中 知明, Spectrum of the EGFR mutations detected from 300 clinical specimens. *日本癌学会*, 名古屋, 2008.10.29.

田中 知明, EGFR 遺伝子変異と関連する患者因子について. *日本薬学会*, 京都, 2009.3.28.

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 知明 (TANAKA TOMOAKI)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60433653

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし