

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16336

研究課題名（和文）微量なEGFR T790M遺伝子変異肺癌の臨床的意義の解明と新たな検出手法の確立

研究課題名（英文）Establishing new detection procedure and elucidation of clinical significance in lung carcinoma with low-frequency EGFR T790M mutation

研究代表者

立松 勉（Tatematsu, Tsutomu）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：40721874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：EGFRチロシンキナーゼ阻害剤未治療EGFR遺伝子変異陽性肺癌切除例210例について微量なT790M変異が検出可能なCAST-PCRを施行した所、66例に微量なT790M変異が検出され、T790M変異陽性率は31.4%であったことが示された。また、微量なT790M変異の有無によって術後再発率および術後生存率に有意な差は認めないことから、予後への影響はない可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的なPCRで検出できなかった微量T790M変異をCAST-PCRで検出しえた。T790M変異を有する症例は31.4%に認め、比較的多いことが判明した。EGFR遺伝子変異陽性肺癌の最適な薬物治療を検討する上で重要なデータであり学術的意義があると考えられる。より微量な遺伝子変異を検索実際の臨床で第1～3世代のどのEGFR-TKI（第1-3世代）の選択する際に重要なデータになりうる。

研究成果の概要（英文）：We investigated low-frequency T790M mutation about 210 EGFR-mutated lung cancer patients untreated by EGFR-TKI. The incidence of T790M mutation was analyzed using CAST-PCR which can detect low-frequency T790M mutation. T790M mutations were detected in 66(31.4%) of the 210 cases. There were no significant difference about OS and RFS according to the T790M mutation status. It was shown that low-frequency pretreatment T790M mutation dose not affect the prognosis of EGFR-mutated lung cancer patients.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：T790M EGFR lung carcinoma

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌に対する分子標的治療薬が臨床的な成果を挙げている一方で、薬剤耐性化が大きな問題となっている。T790M 変異は肺癌の原因遺伝子である EGFR 遺伝子変異をターゲットにした EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) 耐性化の主な原因の一つであり、世界的に注目され種々の研究が行われている。T790M 変異が発生する明確なメカニズムは未だ解明されていないが、今までは二次的な遺伝子変異であるといわれていた。これは、ほとんどの症例で T790M 変異が EGFR-TKI 未治療の肺癌検体から検出されず、EGFR-TKI 治療中に再発した症例の検体から検出されることが大きな理由である。しかし、通常の PCR 法 (サンガーシーケンス法) では微量 (約 3% 以下) な変異は検出できない欠点がある。検出限界以下の微量な T790M 変異の存在が、分子標的治療薬の奏効率・奏効期間や予後に影響を与えるのかについては一定の見解は得られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、EGFR-TKI 未治療の EGFR 遺伝子変異肺癌組織中の極微量な T790M 変異が臨床病理学的因子や予後に与える影響を明らかにすることである。さらに CAST-PCR や Digital PCR を用いて微量な T790M 遺伝子変異の検出法の確立に必要な基盤を作ること为目标とする。

3. 研究の方法

T790M変異の頻度や同一検体内のT790M変異率の測定。

当施設で 1997 ~ 2020 年までに凍結保存された EGFR 遺伝子変異肺癌切除検体から genomic DNA を抽出して以下の測定を行う。

・ CAST-PCR法による検討

T790M の野生型、変異型にマッチした TaqMan probe を用いて CAST-PCR を施行する。データは TaqMan Mutation Detector で解析し、T790M 変異陽性症例の頻度や同一検体中の T790M 変異率を調査する。

・ Digital PCR法による検討

Quant Studio 3D Digital PCR System で T790M 変異率を測定し、変異頻度、変異率を調査する。Digital PCR では、1 well に 1 コピーで PCR 反応させることができるため、より精度の高い測定が可能となる。コピー毎に変異型、野生型、変異型+野生型をプロットする (Figure.1)。変異型+野生型は、野生型のコントロールでも認めることがあるため、変異型に含めない。変異型が 1 プロットでもあるものを T790M 変異陽性と評価する。

EGFR-TKI使用前のT790M変異の有無と再発時のEGFR-TKI治療効果・予後と相関性の評価。

・ EGFR 変異肺癌の T790M 変異の有無が、EGFR-TKI 治療効果に及ぼす影響や臨床病理学的因子、予後の相関についてレトロスペクティブに検討する。

EGFR変異肺癌症例について以下の項目を調査する。

- ・臨床的・病理学的背景（年齢、性別、既往歴、肺癌組織型、ステージ 等）
- ・EGFR-TKI の使用の有無、使用された EGFR-TKI の種類
- ・術後再発の有無と再発までの期間、術後生存期間

これらのデータを含め統計学的に微量な T790M 変異の有無によって EGFR-TKI 治療効果に差があるのか、術後再発率や術後生存期間に差があるのかについて検討する。統計学的手法として、Kaplan-Meier 曲線の作成、Log-rank test を用いる。(p<0.05)

4 . 研究成果

T790M変異の頻度や同一検体内のT790M変異率の測定。

CAST-PCR

当施設で 1997～2020 年までに凍結保存された EGFR 遺伝子変異肺癌切除検体 210 例を対象に、CAST-PCR を施行した。

1 検体における T790M 変異の頻度は、0.13-2.65%（平均 0.31%、中央値 0.21%）であった。微量な T790M 変異を示した症例は、210 例中 66 例（31.4%）であった。

Digital PCR

20 症例について Digital PCR を施行した。

Digital PCR で 20 症例中 8 例（40%）に、CAST-PCR では 20 例中 15 例（75%）に T790M 変異を認めた¹⁾。(2017 年、Journal of Thoracic Disease 論文発表)

Table1 20 症例の CAST-PCR および digital PCR における T790M 変異検出比較

Case number	EGFR mutation status	T790M mutation			
		CAST-PCR		Digital PCR	
		% mutation	Assessment	% mutation	Assessment
1	L858R	0.17	positive	0.02	negative
2	L858R	0.32	positive	0.06	positive
3	deletion	0.21	positive	0.03	negative
4	L858R	0.26	positive	0.01	negative
5	L858R	0.15	positive	0	negative
6	L861Q	0.23	positive	0.03	positive
7	deletion	0	negative	0	negative
8	L858R	0	negative	0.02	positive
9	deletion	0	negative	0	negative
10	L858R	0.15	positive	0.02	positive
11	L858R	0	negative	0.01	negative
12	G719S	0.21	positive	0.01	negative
13	L861Q	0.71	positive	0	negative
14	L858R	0.61	positive	0.29	positive
15	deletion	0.21	positive	0.01	positive
16	L861Q	0	negative	0.05	negative
17	deletion	0.26	positive	0	negative
18	deletion	0.4	positive	0.02	negative

19	G719R /insertion	0.13	positive	0.06	positive
20	L858R	2.65	positive	4.22	positive

EGFR-TKI 使用前の T790M 変異の有無と再発時の EGFR-TKI 治療効果・予後と相関性の評価。

I. 210 例の臨床的・病理学的背景を示す (Table 2)

Table 2 患者背景

Factor	Value	(%)
Age(years)	38-82	
Average	67	
Median	69	
Sex		
Male	79	38
Female	131	62
Pathological stage		
	167	79.5
A	7	3.3
B	9	4.3
A	21	10
B	4	1.9
	2	0.9
EGFR mutation status		
deletion	91	43.3
L858R	83	39.5
Exon20 insertion	10	4.8
G719	8	3.8
L861Q	6	2.9
L858R /Exon19 deletion	3	1.4
L858R / T790M	1	0.5
other	8	3.8

平均年齢は 67 歳、女性が 131 例 (62%) と多かった。

病理病期は I 期が 167 例 (79.5%) と最も多かった。IV 期は 2 例 (0.9%) に含まれていた。組織型はすべて腺癌であった。

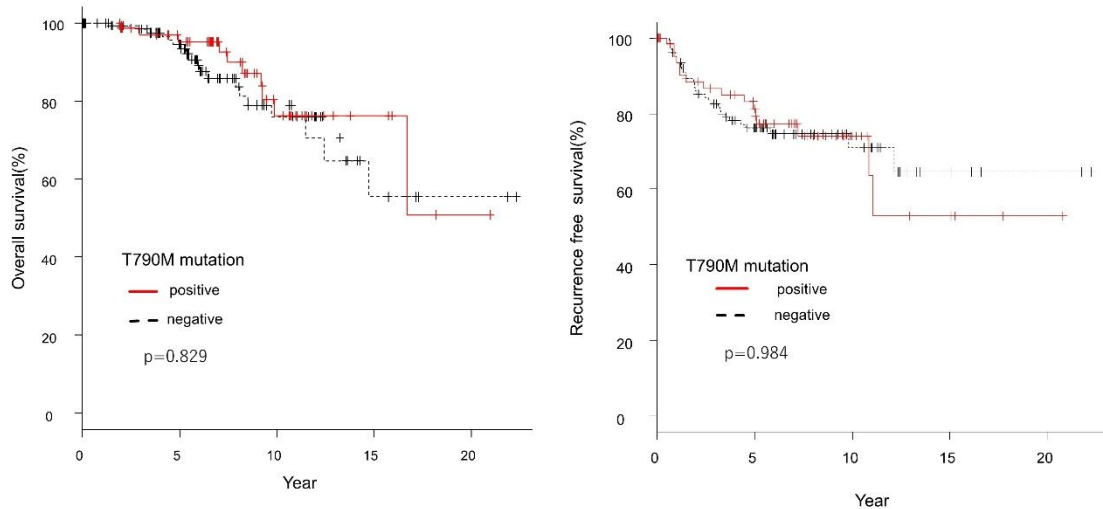
EGFR mutation status は、Exon19 deletion 91 例 (43.3%)、L858R 83 例 (39.5%)、L858R/Exon19 deletion 3 例 (1.4%)、1 例に L858R+T790M 変異陽性例を認めた。

II. EGFR-TKI 使用前の T790M 変異の有無と術後再発率および生存率の相関性について

T790M 変異陽性例と野生型で術後再発率および生存率に有意な差は認めなかった。

(術後再発率：p=0.984，生存率：p=0.828) (Figure 1)

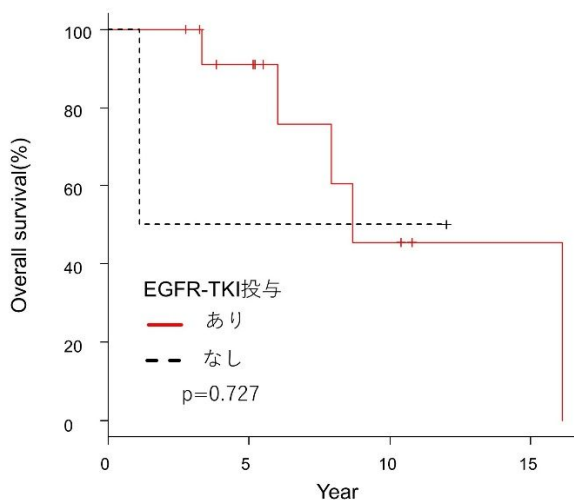
Figure 1



III. T790M 変異陽性例における再発後の EGFR-TKI 治療の有無と生存率の相関について

EGFR-TKI 治療前に微量な T790M 変異陽性で再発した症例 15 例について、EGFR-TKI 治療の有無による生存率には有意差を認めなかった。(p=0.727) (Figure 2)

Figure 2



考察

・ CAST-PCR によって EGFR 変異陽性肺癌切除例の 31.4% で微量な T790M 変異を認めた。二次的な変異以外でも T790M 変異が比較的存在であることを証明できた。しかし、Digital PCR との結果比較結果から、偽陽性例が含まれている可能性がある。より精度の高い検査法の開発が望まれる。

・ 我々の検討では EGFR-TKI 未治療非小細胞肺癌において T790M 変異陽性の有無によって術後再発率や生存率に差は認めなかった。さらに再発した T790M 変異陽性例における EGFR-TKI 治療の有無によって生存率に差は認めなかった。今回の検討では、微量な T790M 変異は明らかな予後への影響がないことを示すことができた。しかし、近年、T790M 変異に効果のある EGFR-TKI も開発されており、今後、これらの微量な T790M 変異の証明が臨床的な治療方針の決定に役立つ可能性があると考えられた。

< 引用文献 >

1 . Tatematsu T, Okuda K, Suzuki A, Oda R, Sakane T, Kawano O, Haneda H, Moriyama S, Sasaki H, Nakanishi R. The detectability of the pretreatment EGFR T790M mutations in lung adenocarcinoma using CAST-PCR and digital PCR. Journal of Thoracic Disease. 9:2397-2403, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	奥田 勝裕 (Okuda Katsuhiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関