

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460434

研究課題名(和文) HS-dPCR法を用いた肺腺癌遺伝子異常の迅速解析

研究課題名(英文) Development of high-speed droplet-polymerase chain reaction assay for detecting epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer patient

研究代表者

吉澤 明彦 (Yoshizawa, Akihiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80378645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺癌におけるEpidermal growth factor receptor (EGFR)変異を、新規に開発した高速d-PCR法にて迅速かつ正確に検出しえるかを検討した。対象は肺癌患者から採取された気管支細胞診材料80検体で、3個の代表的なEGFR変異を対象とし、コントロールの検査系と、迅速性、正確性、感度に関して検討した。結果、既存法に比し、同等の正確性を持って検出することが可能であることが判明した。また、既存検査法に比し、反応時間の短縮が可能であった(8分10秒, 1/9程度)。感度も既存検査法と同様、あるいはそれ以上に高いことが判明した(0.05-0.5%)。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel, rapid epidermal growth factor receptor gene (EGFR) mutation assay using a real-time droplet-polymerase chain reaction machine (EGFR d-PCR assay). The purpose of this study was to validate the performance of the EGFR d-PCR assay using fresh liquid cytology specimens (FLCSs) from lung cancer patients. We analyzed three major EGFR mutations in 80 FLCSs via the EGFR d-PCR assay and conventional real-time PCR assay. In addition, we performed sensitivity assays using cell lines with EGFR mutations. The EGFR d-PCR assay accurately detected 3 major EGFR mutations compared to conventional real-time PCR assay, resulting in concordant between the two assays. In addition, EGFR d-PCR assay could reduce reaction time (8 min and 10 s). Sensitivity of the EGFR d-PCR assay was 0.05-0.5%. In conclusion, the EGFR d-PCR assay markedly reduced the detection time of major EGFR mutations with high sensitivity compared with the conventional assay.

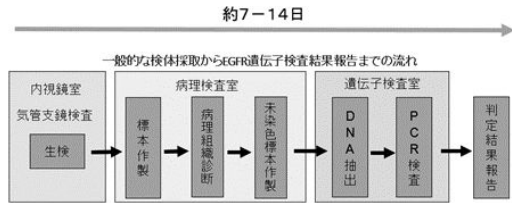
研究分野：人体病理

キーワード：肺癌 上皮成長因子受容体変異 高速d-PCR法 新鮮細胞診材料

1. 研究開始当初の背景

肺癌は罹患率、死亡率とも非常に高い悪性腫瘍で、その多くを占める切除不能な肺非小細胞癌 (non-small-cell lung cancer: NSCLC) の治療には、Epidermal growth factor receptor gene (EGFR) に対する分子標的治療薬 (EGFR-TKI) が第一選択となる。EGFR-TKI の使用には EGFR 遺伝子の変異の確認が必要であるが、臨床現場ではその判定までに時間がかかること (約 7-14 日) が問題となっている (図 1)。

図 1

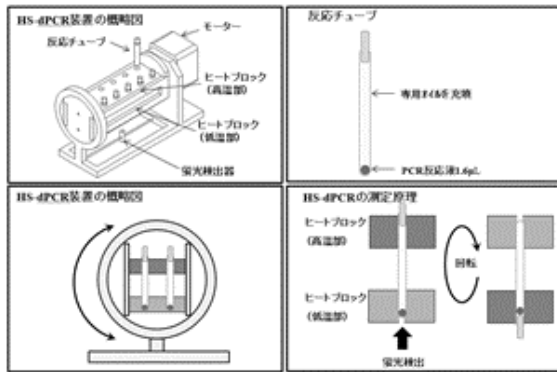


従って、EGFR 遺伝子変異をいかに迅速、正確に検査するかは临床上非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、新規に開発した高速 d-PCR 法 (図 2) が EGFR 変異を迅速かつ正確に検出できるかにつき検討を行った。

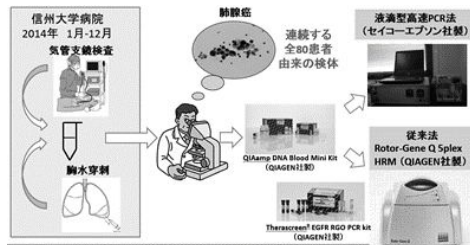
図 2



3. 研究の方法

検討の流れを図 3 に示す。対象は信州大学医学部附属病院にて肺癌疑いで気管支鏡検査をされた患者から採取された細胞診材料で、検鏡の後、腺癌、NSCLC とされた 80 材料とした。

図 3



対象遺伝子は、EGFR の遺伝子変異として多い L858R (exon 21), E746_A750 del (exon 19), そして薬剤耐性遺伝子である T790M (exon 20) とした (図 4)。また、反応条件を図 5 に記した。

図 4

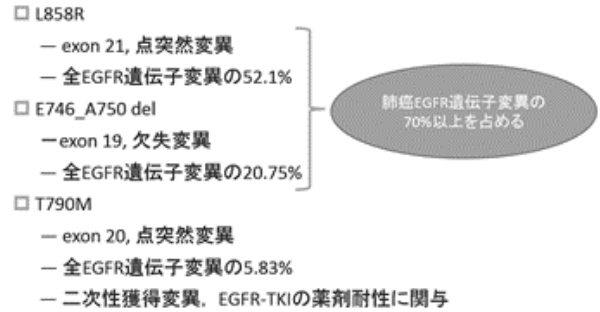


図 5

□ 反応条件

L858R	40サイクル	
ホットスタート	変性	アニール・伸長
98°C, 10秒	98°C, 5秒	60°C, 6秒

E476_A750 del, T790M	40サイクル	
ホットスタート	変性	アニール・伸長
98°C, 10秒	98°C, 5秒	55°C, 6秒

コントロールの検査系としては Scorpion ARMS 法 (Therascreen) を用いた。また、肺癌細胞株 (PC9, H1975, A549) を用い d-PCR 法による感度もあわせて検討した。

4. 研究成果

L858R に関して、d-PCR 法、Therascreen とともに 16 例の陽性例が検出され、完全に一致していた。(図 6)

図 6

	Therascreen		
	L858R 陽性	L858R 陰性	
液滴型高速 PCR 法			
L858R 陽性	16	0	16
L858R 陰性	0	64	64
	16	64	80

E746_A750 del に関して、d-PCR 法にて 8 例が陽性となった一方、Therascreen では、11 例が陽性となった。d-PCR 法にて陰性、Therascreen にて陽性となった 3 例に関して、direct sequence 法を用いて確認したところ、1 例は L747-S752 P753S del が、2 例は L747-S752 del であったことが判明した。これは、d-PCR 法での検討で、設定していない probe であり、結果として 2 つの検査系としては、完全一致と判断された。(図 7)

図 7

液滴型高速 PCR法	Therascreen		
	Deletion 陽性	Deletion 陰性	
E746_A750 del 陽性	8	0	8
E746_A750 del 陰性	3* L747-S752 P753S (1検体) L747-S752 (2検体)	69	72
	11	69	80

* : Direct Sequenceで確認

T790M に関して, d-PCR 法, Therascreen とともに 1 例の陽性例が検出され完全一致が確認された。(図 8)

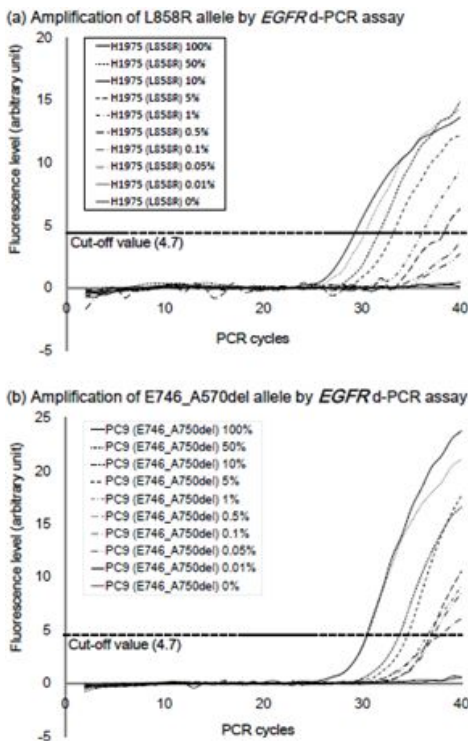
図 8

液滴型高速 PCR法	Therascreen		
	T790M 陽性	T790M 陰性	
T790M 陽性	1	0	1
T790M 陰性	0	79	79
	1	79	80

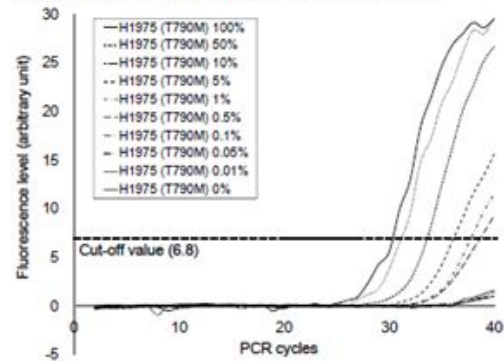
以上, 検査系同士の一貫率は最終的に 100% であった。

d-PCR 法の感度は, L858R で 0.5%, E746_A750del で 0.05%, T790M で 0.5% であった。(図 9)

図 9

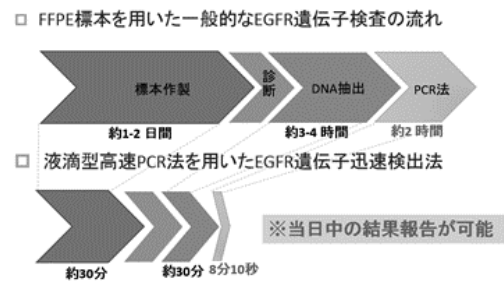


(c) Amplification of T790M allele by EGFR d-PCR assay



反応時間に関して, Therascreen での反応時間が 1 時間 45 分であるのに対し, d-PCR 法は 8 分 10 秒であり, 非常に短い時間で, 検索が可能であることが示された。(図 10) これは, 従来の FFPE 標本を用いた EGFR 遺伝子変異の検出時間と比べ, 短時間で結果を検出することができ, 気管支鏡を試行した当日の結果報告も可能であることが示された。

図 10



結論:

近年肺癌治療のオプションは増加している。特に肺腺癌の EGFR 遺伝子変異のある患者に対しての gefitinib, elrotinib などの EGFR-TKI はここ 10 年の世界の肺癌の治療方針を一変させた。しかしながら, EGFR の検出系は感度の低い direct sequence 法から高感度系 (ScorpionARMS 法, PNA LNA PCR-Clamp 法, PCR-invader 法, Cycleave 法など) へと変貌していったが, 患者数の増加と検査体勢が及んでいないことにより, 治療導入までに時間がかかることが臨床現場では問題になっている。また, ALK 融合肺癌をはじめとした他の治療オプションを持つ腫瘍に対する検査も同時に進める必要もあり, 時間的問題, コスト的問題からいかに早く, 簡便, 高感度に EGFR の検出できるかが臨床現場では必須事項となっている。

今回検討を行った高速 d-PCR 法は, 新規に開発された PCR アッセイで, シリコンオイルを容れた非常に細い反応チューブに微量な検査対象 (1.6 μ L) を混ぜ, それを高温度と低温度のヒートブロックに対し回転させることで DNA 増幅を行う装置で, 高感度で迅速に対象遺伝子を検出することができる。これまでに申請者の施設ではヒトインフルエン

ザウイルス, promyelocytic leukemia (PML) - retinoic acid receptor alpha (RARA)融合遺伝子などの迅速検査系を確立してきた。今回、臨床現場にてその検査時間の遅延が問題となっている肺癌の EGFR 遺伝子変異が検出できないかを検討した。本検討では、高速 d-PCR 法が、従来法 (ScorpionARMS 法) と比較して DNA 抽出までの時間、PCR 反応時間ともに短縮できることが示された。これは、高速 d-PCR 法を用いることで、EGFR 遺伝子変異の結果報告までの Turn around time (TAT) の短縮に寄与することが想定される。現在、EGFR 遺伝子変異検出に関して、多数の検査系が提案されているが、これほど迅速に EGFR 遺伝子変異を検出できる方法はなく、EGFR-TKI を用いた早期治療開始へ貢献が期待される結果であった。また、高速 d-PCR 法は従来法と同等あるいはそれ以上の検出感度が得られた。これは、腫瘍細胞濃度の低い液状検体でも十分実用化が可能であることも示された。

高速 d-PCR 法による EGFR 遺伝子変異の検索問題点としては、以下の点が上げられる。肺癌における EGFR 遺伝子変異は変異部位が多岐にわたっている。しかしながら、現行の高速 d-PCR 法では、1 反応系で 1 遺伝子変異しか検出できず、すべての遺伝子変異を一度には検出できない。今後は複数の変異を同時に検出できるマルチプレックス法の開発を行うことを計画している。

最後に、本検討では、高速 d-PCR 法にて、肺癌の細胞診材料から、迅速、高感度に EGFR 遺伝子変異を同定できることが示された。今後は、前述したマルチプレックス化に加え、肺癌における他の遺伝子異常 (ALK, KRAS, BRAF, HER2, PI3CA, ROS1, RET など) にも対象を広げていくことで、手術適応のない肺癌患者の早期治療開始に寄与する検査系の確立の検討を予定している。

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 0 件)
(投稿中 1 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 浅香志穂, 吉澤明彦, 他, 新規液滴型高速 d-PCR 装置を用いた肺腺癌 EGFR 遺伝子変異の迅速検査法の開発, 第 62 会日本臨床検査医学会学術集会, 平成 27 年 11 月 21 日, 岐阜
- 2) 浅香志穂, 吉澤明彦, 他, 液滴型高速 d-PCR 法を用いた肺腺癌 EGFR 遺伝子変異迅速検出方法の開発, 第 104 会日本病理学会総会, 平成 27 年 5 月 2 日, 名古屋
- 3) Shiho Asaka, Akihiko Yoshizawa, et al.

A novel high-speed droplet-polymerase chain reaction can detect epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung carcinoma in less than 10 minutes, 104th United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, March 23th, 2015, Boston

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤明彦 (YOSHIZAWA, Akihiko)
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 80378645

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし