

論 文 概 要

○ 論文題目 PNA-LNA dual-PCR；肺癌での細胞検体や血漿 cfDNA を用いたドライバー遺伝子変異の迅速高感度な検出系の開発

○ 指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 檜澤 伸之教授

(所属) 筑波大学人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏名) 藤田 一喬

目的：

肺癌は、主に気管支鏡検査により診断がなされるが、GS-EBUS/EBUS-TBNA などその技術の進歩により末梢病変へのアプローチが可能となった反面、採取される検体は少量となった。その一方、治療方針選択のための遺伝子変異の検査項目は多様化してきた。我々は、高感度に遺伝子変異を検出する方法を用いれば、低侵襲に十分量採取しうる細胞検体、および、血漿 cell-free DNA (cfDNA) により、遺伝子変異の検出が可能になると考え、PNA-LNA dual PCR (PLDP) 法を開発し、臨床検体を用いて検証した。

対象と方法：

PLDP 法は、通常の遺伝子配列の増幅を抑制する peptide nucleic acid (PNA) および高正確性の KOD DNA polymerase を用いて遺伝子変異を増幅させる 1st PCR と、locked nucleic acid (LNA) + TaqMan probe を用いて遺伝子変異の明瞭な検出を可能とする 2nd PCR の 2step PCR から構成されており、今回、EGFR Ex19del、T790M、L858R、KRAS G12C、BRAF V600E の検出を可能とした。それぞれの遺伝子変異に対し、反応を阻害せず、自然界に存在しない形で 2 塩基を変更した人工遺伝子を用いることで、PCR の偶発的な増幅ミスを否定し、既存の PNA-LNA PCR clamp (PLPC) 法と比較することで、より正確に検出下限と特異度を検証できた。

2016 年 12 月 16 日から 2019 年 3 月 11 日までに 435 症例 (475 検体) の検体が登録され、非小細胞肺癌と診断され、血液検体の提出も伴っていた 276 症例 (308 検体) について最終的な解析を行った。提出検体では気管支鏡検体が 261 検体、胸水が 27 検体と多く、病期では、StageIVB が 89 検体、StageIVA が 68 検体、病理診断では、肺腺癌が 212 例、扁平上皮癌が 62 例と多くを占めていた。PLDP の結果を、同じ細胞検体を multiplex PCR/RT-PCR 後に NGS で解析する MINtS 法の結果と、臨床側で組織検体を用いて提出された cobas® EGFR Mutation Test v2 および PLPC 法 (Convnt) の結果を比較した。

結果：

検出下限については、Human Genomic DNA 50ng (15000copies) に人工遺伝子を 10^{10} copies から 1/10 ずつ希釈したものをそれぞれ混合して、検出下限の DNA 混合量で 48tubes から 100%検出されるものとした。PLDP 法 vs PLPC 法の検出下限の人工遺伝子のコピー数は、Ex19del-AG/MN で 10^2 (0.67%) vs 10^3 (6.7%)、T790M-AG/MN で 10^1 (0.067%) vs 10^3 (6.7%)、L858R-AG/MN で 10^2 (0.67%) vs 10^3 (6.7%)、G12C で 10^2 (0.67%) vs

10^3 (6.7%)、V600E で 10^2 (0.67%) vs 10^4 (66.7%) と、10~100 倍、PLDP 法の検出感度は優れていた。また、PLDP 法で Human Genomic DNA 50ng のみを用いて、48tube ずつ検証したが偽陽性は認めなかった。

EGFR Ex19del および KRAS Ex2 mutation には LNA で設計したタイプ以外の minor な type が豊富に存在することから、1st PCR (or 2nd PCR) 増幅産物の Sanger sequence を併用した。細胞検体において、いずれかの検査法で EGFR 遺伝子変異が検出されているのは 89 検体で、そのうち PLDP、MINtS、および、Convrt のすべてが行われた検体は、66 検体であった。PLDP vs MINtS vs Convrt と比較して、Ex19del は、34 例 vs 24 例 vs 32 例、L858R は、30 例 vs 25 例 vs 30 例、T790M は 16 例 vs 7 例 vs 5 例から検出された。

血漿 cfDNA については、PLDP の cfDNA と細胞検体の検出数の比から検出率を求め、『初回検査例』と、EGFR-TKI の投与歴のある『再検査例』とに分けて検証した。初回検査例では、StageIIIA 以下では、EGFR Ex19del からの 1 例のみの検出であったが、StageIIIB 以上では、Ex19del が 60.0%、L858R が 33.3%、KRAS Exon2 mutation が 72.7% であった。再検査例では、Ex19del、L858R、T790M の検出率は、それぞれ、38.9%、20%、66.7% であった。

考察：

細胞検体について、PLDP は、EGFR Ex19del や L858R、T790M の検出において、Convrt と同等以上であり、MINtS よりも優れていた。EGFR-TKI 治療後獲得耐性である T790M の検出に関しては、T790M が正常細胞に対する遺伝子変異を含有する腫瘍細胞の割合が driver mutation よりもさらに低くなり、より高感度の検査方法の PLDP の検出数が多かったのではないかと考えた。

血漿 cfDNA に関して、『再検査例』では、driver mutation は EGFR-TKI の投与の影響のためか検出率は高くはなかったが、T790M に関しては 7 割近くの検出であった。『初回検査例』に関しては、EGFR Ex19del、KRAS Exon2 mutation に比べ、L858R の検出率が低かったが、検出下限の検証では、他検査に明らかに劣ることはなかったため、症例数を増やしての検証が必要である。

結論：

高感度検出法の PLDP は、分子標的薬が存在するような高頻度の遺伝子変異の検出において、低侵襲で、迅速な遺伝子変異の検出に有用である。