

氏名	藤田 一喬		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9570 号		
学位授与年月	令和 2 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	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		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤 幸夫
副査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤 浩昭
副査	筑波大学講師	博士（医学）	鈴木 久史
副査	筑波大学助教	博士（医学）	川崎 綾

## 論文の内容の要旨

藤田一喬氏の博士学位論文は、肺癌での細胞検体や血漿 cell free DNA を用いたドライバー遺伝子変異の迅速かつ高感度な検出法を開発したものである。その要旨は以下のとおりである。

### 要旨

#### [目的]

本邦では肺癌は主に気管支鏡を用いて診断されるが、GS-EBUS/EBUS-TBNA など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、採取される検体量は少なくなった。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。そのため、著者は低侵襲に採取された細胞検体、および、血漿 cell-free DNA (cfDNA) から遺伝子変異の検査法の開発を目的とした。

#### [方法]

著者は迅速、かつ、高感度に遺伝子変異を検出する検査方法を開発し、PNA-LNA dual PCR (PLDP) 法と命名し、臨床検体を用いて検証した。

PLDP 法は、変異のない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を明瞭に検出する 2nd PCR の 2 Step から構成されており、今回は、EGFR Ex19del type1/2、T790M、L858R、KRAS G12C、BRAF V600E の検出に対応させている。Ex19del および KRAS Ex2 mutation には LNA + TaqMan probe で設計したタイプ以外の minor type が存在することから、1st PCR (or 2nd PCR) 増幅産物の Sanger sequence を併用している。

また、PLDP の検出下限は、遺伝子変異の配列中で、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が否定され、正確な検証が可能となった。PLDP 法の検出下限については、Human Genomic DNA (HGD) 50ng (=15000copies) に  $10^{10}$  copies から 1/10 ずつ希釈した人工遺伝子を混合し、検出下限の DNA 混合量で、48tubes から 100%検出されるものとし、PNA-LNA PCR clamp (PLPC) 法とも比較している。

著者は 2016 年 12 月 16 日から 2019 年 3 月 11 日までに 435 症例 (475 検体) の検体が登録し、非小細胞肺癌の診断で、同時の血液検体が提出された 276 症例 (308 検体) について最終的な解析を行った。病期は StageIVB が 89 検体、StageIVA が 68 検体で、検体の種類では気管支鏡検体が 261 検体、病理診断では肺腺癌が 212 検体と多くを占めていた。PLDP の結果は、同じ細胞検体を multiplex PCR/RT-PCR 後に NGS で解析する MINtS 法の結果の他、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 (既存の PCR) の結果と比較した。

#### [結果]

PLDP 法 vs PLPC 法の検出下限の人工遺伝子のコピー数は、Ex19del で  $10^2$  (0.67%) vs  $10^3$  (6.7%)、T790M で  $10^1$  (0.067%) vs  $10^3$  (6.7%)、L858R で  $10^2$  (0.67%) vs  $10^3$  (6.7%)、KRAS G12C で  $10^2$  (0.67%) vs  $10^3$  (6.7%)、BRAF 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、HGD 50ng のみを用いて、PLDP 法で 48tube を検証したが、いずれの変異でも偽陽性は認めなかったとしている。

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たのは 89 検体で、そのうち PLDP、MINtS、および、既存の PCR の 3 者が行われたものは、66 検体であった。PLDP vs MINtS vs 既存の PCR 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た。『初回検査例』では、StageIIIA 以下ではほぼ認めず、StageIIIB 以上では、Ex19del が 60.0%、L858R が 33.3%、KRAS Ex2 mutation が 72.7%であった。EGFR-TKI の投与歴のある『再検査例』では、Ex19del、L858R、T790M の検出率は、38.9%、20%、66.7%であった。

#### [考察]

細胞検体について、PLDP は、Ex19del において既存の PCR と同等で、MINtS よりも優れており、L858R においては 2 者と同等であったとしている。著者は T790M は EGFR-TKI 後獲得耐性であり、正常細胞に対する driver mutation を含有する腫瘍細胞の割合より T790M を含有する腫瘍細胞がさらに低くなるため、より高感度の PLDP の検出数が有意に多くなったと考えている。

血漿 cfDNA に関して、『再検査例』の T790M では 7 割近くの検出であった。『初回検査例』では、Ex19del、KRAS Ex2 mutation に比べ、L858R の検出率が低かったが、検出下限の検証では明らかに他検査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としている。

#### [結論]

著者は PLDP は高感度であり、分子標的薬が存在するような高頻度の遺伝子変異において、低侵襲で迅速な検出が可能であるとしている。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

藤田一喬氏は、非小細胞肺癌の細胞検体、および、血漿 cell-free DNA (cfDNA) から遺伝子変異の検出を可能とする PNA-LNA dual PCR (PLDP) 法を開発し、分子標的薬が存在するような高頻度の遺伝子変異において、低侵襲で迅速な検出を可能とした。従前の検査法に比し、より少量の検体で高感度の検出が可能であり、今後臨床応用が期待できると評価できる。

令和 2 年 1 月 14 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。