

授与番号	甲第 1823 号
------	-----------

## 論文内容の要旨

Frequency of cis and trans EGFR T790M and activation mutations in tumors treated with EGFR inhibitors

EGFR 阻害薬で治療された腫瘍における T790M 耐性変異および活性型変異のシスおよびトランス頻度

(平野邦夫, 渡邊香奈, 秋山真親, 千葉亮祐, 長島広相, 佐藤英臣, 菅井万優, 寺崎浩司, 福原達朗, 前門戸任)

(Journal of Iwate Medical Association 72 巻 4 号に 2020 年 10 月掲載予定)

### I. 研究目的

EGFR 遺伝子変異が発見され、それに適合する分子標的薬が開発され肺がん治療に個別化医療への道が開かれた。活性型 EGFR 変異は exon19 欠失変異と L858R 突然変異が大半を占めるが、耐性遺伝子変異として exon20 T790M 変異がある。これまでの第 3 世代オシメルチニブの耐性機序の研究では、T790M 耐性遺伝子変異と C797S 耐性遺伝子変異が同一アレルに発生 (シス変異) するか、それぞれ別々のアレルに発生する (トランス変異) かによって、第 1 世代 EGFR-TKI の効果が異なり、トランス変異で効果があるとする報告がある。今回はこれを元に活性型遺伝子変異と T790M 変異の局在を検討し、EGFR-TKI の効果との相関を評価する。

### II. 研究対象ならび方法

2016 年 5 月から NSCLC 患者で、活性型変異 (エクソン 19 欠失 [Ex19del] または L858R 点変異) と T790M の EGFR 変異の両方が検出され、オシメルチニブが投与されたケースをカルテより抽出した。T790M と活性型遺伝子変異が存在する組織検体がある症例について解析を行った。本研究で分析する検体は、第 1/2 世代 EGFR-TKI 治療中、または、第 1/2 世代 EGFR-TKI 治療後に病態が進行した後に、もしくは前治療が毒性中止となった後に採取された。採取された組織検体で、以下の検査を行った。① 拡散の抽出 (Total RNA の抽出: RNeasy FFPE Kit (QIAGEN))、② 逆転写酵素: SuperScript II (Thermo Fisher Scientific)、③ EGFR 遺伝子変異の有無確認 (PNA-LNA PCR Clamp 法)、④ driver 変異と T790M の Cis/Trans 確認 (サンガーシーケンス法)。

### III. 研究結果

活性型変異と T790M 遺伝子変異が認められた分析可能な組織検体は、19 症例であった(岩手医科大学 5 例、宮城県立がんセンター14 例)。RNA を抽出し、RT-PCR を行った結果、活性型変異、T790M 変異ともに PCR 検査可能となったものは、19 例中 7 例であった。検査可能群と検査不能群の患者背景では、検査可能群に男性が多い傾向があり、検体採取方法では、気管支鏡検査で検査可能であった症例が多く、手術検体で検査不能例が多い傾向があった。検査可能だった 7 例を検査不能だった 12 例と比較すると、RNA の持ち込み量は、可能群：中央値 290ng、不可能群：平均 134.5ng と可能群に RNA 量が多い傾向が認められた。また、RNA 抽出に検体の保存期間が影響している可能性もあり、比較すると検査不能群に保存期間が長い傾向があった(検査可能群中央値 571 日、不可能群中央値 741 日、 $P=0.128$ )。PCR でそれぞれの変異が検出された 7 例いずれも cis 型であった。T790M 変異のみが認められたクローンがないことより、7 例中の Trans 変異はなかったことが示されている。また、T790M のアレル頻度は症例により異なることが判明した。症例数が少なく、確定的なことは言えないが、前治療が第 1/2 世代 EGFR-TKI いずれか、EGFR-TKI の治療期間、化学療法治療期間があるか図 4 より見てとれるが、明らかな傾向は認められなかった。オシメルチニブの治療効果は奏効率 70% (5/7) で、治療期間は 2 例のみが 1 年以内に投与終了しており、その他 5 例では長期投与が可能であった。T790M アレル頻度と治療期間との関連は認められなかった。

### IV. 結 語

RNAcDNA を作製し大腸菌にトラレスフェクトするコロニーハイブリダイズ法により、活性型遺伝子変異と耐性遺伝子変異はすべて Cis 型であった。この方法は、NGS が普及した中であっても遺伝子変異座を確定する一つの方法として利用可能である。

## 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 伊藤 薫樹 (臨床腫瘍学講座)

副査 教授 松本 主之 (内科学講座: 消化器内科消化管分野)

副査 教授 斎藤 元 (呼吸器外科学講座)

上皮成長因子受容体 (EGFR) 活性化変異陽性の非小細胞性肺癌に対し EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) は優れた抗腫瘍効果を示すが、その後治療抵抗性となり、T790M変異が EGFR-TKI 耐性例の約半数の症例で認められる。本研究本論文では、新たな遺伝子検出法を用いて T790M 変異及び EGFR 活性化遺伝子変異のアリル上の配置関係を検討し、EGFR-TKI の効果との関係を検証した論文である。PNA-LNA PCR Clamp 法により EGFR 遺伝子変異の有無を確認し、コロニーPCR 法及びサンガーシークエンス法でアリル上の位置関係を確認したところ、全例がシス配置を示していた。第 1/2 世代の EGFR-TKI 治療中に生じる T790M 変異がシスに配置することを初めて示した論文である。

本論文は、非小細胞性肺癌の耐性機構の解明や複数の遺伝子変異の対立遺伝子配置の検出に役立つ有益な知見を示した論文といえる。学位に値する論文である。

## 試験・試問の結果の要旨

検出法の原理、限界、結果の解釈の妥当性、今後の課題とその解決策等について試問を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃/盗作等の研究不正は無いことを確認した。

## 参考論文

- 1) Retrospective study to examine the relationship between secreted protein acid and rich in cysteine expression and prognosis in lung cancer using surgical resection specimens  
(切除検体を用いた分泌型酸性高システイン蛋白質と肺癌の予後に関する後方視的検討)  
(堀井洋祐, 他 10 名と共著)  
Current Analysis in Oncology, 2 巻 (2019) : p1-7.
- 2) 術後の慢性心嚢液貯留に合併した化膿性心外膜炎の一例 (肥田親彦, 他 4 名と共著)  
盛岡赤十字病院紀要, 26 巻, 1 号 (2017) : p12-19.