

The 23rd Lung Cancer Workshop

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 遺伝子変異アッセイ方法の比較と問題点

萩原弘一¹

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutation Tests

Koichi Hagiwara¹

¹Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University, Japan.

ABSTRACT — **Purpose.** Increasing number of studies have reported that information on the epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation is useful when choosing the regimen for treating non-small cell lung cancers. Currently several methods are used to investigate EGFR mutation. The characteristics of these methods need to be clarified. **Method.** Summarize the characteristics of the direct sequencing method, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid (PNA-LNA) PCR clamp method, the Scorpion amplification refractory mutation system (ARMS) method, the mutant-enriched PCR method, the cycleave method, the high-resolution mutation analysis method and the smart amplification process (SMAP) method using information from the literature. **Results.** For surgically excised specimens consisting mostly of cancer cells, direct sequencing is a good choice to test the mutation. The cancer cell content of the cytological specimens is often much less. When the presence of the cancer cells is confirmed by a pathological examination, the content of cancer cells is usually more than 1%, and high sensitivity detection methods are able to detect mutations. **Conclusion.** A high sensitivity detection method should be used to detect EGFR mutations from the cytological specimens. A quality management system for the mutation detection tests needs to be established.

(JLCC. 2009;49:928-933)

KEY WORDS — EGFR mutation, PNA-LNA PCR clamp, PCR invader, Scorpion ARMS, Cycleave

Reprints: Koichi Hagiwara, Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University, 38 Morohongo, Moroyama-machi, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan (e-mail: hagiwark@saitama-med.ac.jp).

要旨 — **目的.** 非小細胞肺癌患者の治療方針決定において、EGFR 遺伝子変異検査の有用性を示すデータが報告されてきている。現在利用可能な EGFR 遺伝子変異法を比較検討する。**方法.** ダイレクトシーケンス法、PNA-LNA PCR clamp 法、PCR invader 法、Scorpion ARMS 法、Mutant-enriched PCR 法、Cycleave 法、High-resolution mutation analysis 法、SMAP 法に関して文献的に考察する。**結果.** 肺癌臨床検体のうち、手術切除検体は多量の癌細胞を含むため、ダイレクトシーケンス法で EGFR 遺伝子変異検査が行なえると考えられるが、

細胞診検体では癌細胞の含有率が少なくなる可能性がある。病理検査で癌細胞が確認された場合、癌細胞の含有率は 1% 以上と思われる。この場合、高感度法を用いれば、EGFR 遺伝子変異が検出可能である。**結論.** 細胞診検体からの EGFR 遺伝子変異の検出には高感度法が必要である。今後、EGFR 遺伝子変異検査法の品質管理が必要となると考えられる。

索引用語 — EGFR 遺伝子変異、PNA-LNA PCR clamp、PCR invader、Scorpion ARMS、Cycleave

¹埼玉医科大学呼吸器内科。
別刷請求先：萩原弘一，埼玉医科大学呼吸器内科，〒350-0495

埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38 (e-mail: hagiwark@saitama-med.ac.jp).

はじめに

2004年、非小細胞肺癌に上皮増殖因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR)遺伝子変異が存在し、EGFR 遺伝子変異のある肺癌では gefitinib が奏効することが見いだされた。^{1,2} これより、EGFR 遺伝子変異検査を行なって陽性者のみに gefitinib を投与することにより、有用な肺癌治療が行なえる可能性が出てきた。しかしながら、これは前向き研究によって確認する必要がある事項である。複数の小規模前向き研究の結果、およびそれらの統合解析により、EGFR 陽性患者への gefitinib 投与が有用であり、EGFR 遺伝子変異検査が gefitinib 有用性を判定する効率的なマーカーであることが確実なものとなりつつある。EGFR 遺伝子変異検査の有用性は、肺癌診療に携わり、遺伝子変異を検索した多くの医師が感じるのだが、それがエビデンスで裏付けられてきている (Figure 1)。

最近のエビデンス

EGFR 遺伝子変異検査の有用性を示す、最近のエビデンスを3つ示す。Takano らの historical data,³ 日本での第II相前向き試験統合解析 (American Society of Clinical Oncology Annual Meeting 2008 #8108, 2008),^{4,5} 救済イレッサ臨床試験⁶ である。Takano らは、 gefitinib 承認前後の肺癌治療成績を、保存臨床検体の EGFR 遺伝子変異の有無を検討して比較した。Gefitinib 承認前後で、EGFR 遺伝子変異陰性患者の生存期間は変わらなかったが、EGFR 遺伝子変異陽性患者の生存期間は有意に延長していた (13.6ヶ月→26.2ヶ月)。日本での第II相前向き試験統合解析は、EGFR 遺伝子変異を解析してから gefitinib の効果を見た日本の7つの前向き第II相試験を、試験結果発表後のデータも追跡調査してまとめ

たものである。初回治療、二次治療を問わず、いずれかの時点で gefitinib を使用した場合、EGFR 遺伝子変異陽性者での全生存期間は2年を超える。これら2つの研究より想定される gefitinib の効果を Figure 2 に示す。この結果は大規模試験で確認する必要があるが、両研究ともバイアスが入りにくい設定で行なわれた研究であることより、大規模試験の結果もこの図で示されたものと大きくは変わらないと思われる。救済イレッサ臨床試験は、今まで治療の対象とならなかった PS 3~4 症例への gefitinib の効果を見たものである。通常、PS 3~4 患者の生存期間は4ヶ月以下と想定される。この試験でも3.5ヶ月だったが、遺伝子変異陽性の場合、 gefitinib 投与により PS 1~2 への改善が79%の患者に見られ、生存期間中央値は17.8ヶ月に延長した。現在まで、PS 3~4 非小細胞肺癌患者には支持療法以外の確立された治療選択肢がなかった。EGFR 遺伝子変異陽性患者では、PS 3~4 でも有効な治療が可能ながことが初めて示されたことになる。

EGFR 遺伝子変異検査

EGFR 遺伝子変異陽性患者への gefitinib 投与の有効性が明らかとなりつつある現在、EGFR 遺伝子変異検査は、単に研究や臨床上の興味で行なう検査から、肺癌実地臨床で行なうことが不可欠の検査になってきた。

EGFR mutation test

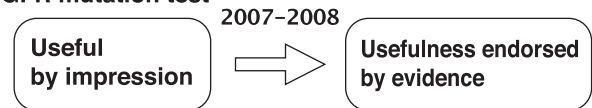


Figure 1. Change in the value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation test in clinical medicine. Many lines of evidence have indicated the usefulness of EGFR mutation test in clinical medicine.

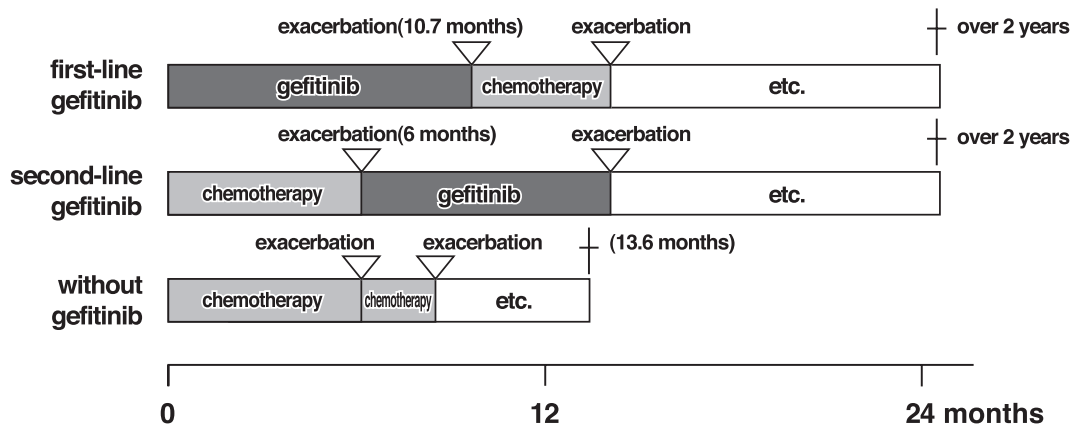


Figure 2. Clinical courses of non-small cell lung cancer patients with EGFR mutations summarizing the information in the literature. A large-scale clinical trial is required for confirmation.

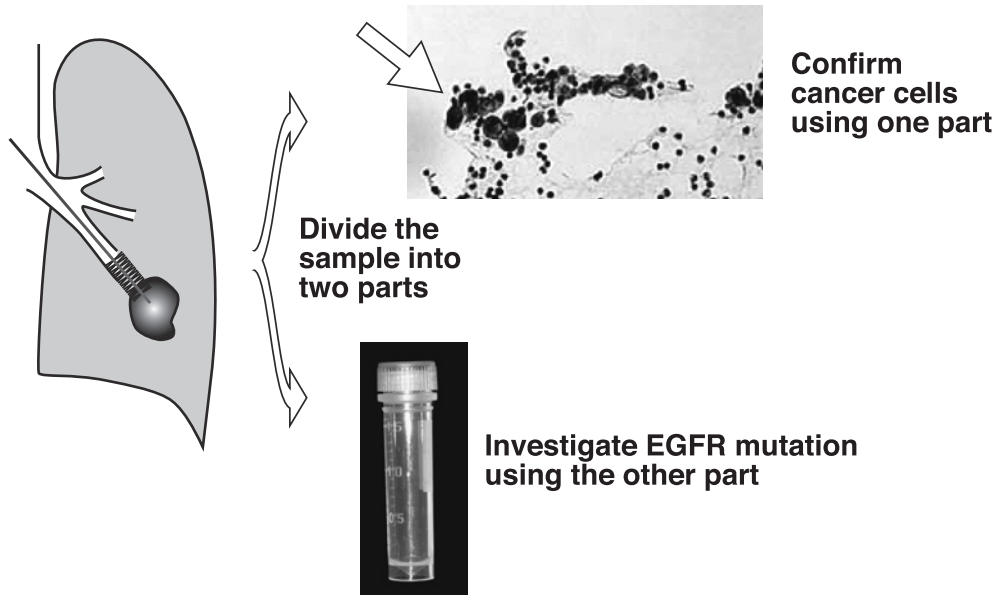


Figure 3. Recommended procedure for the preparation of the specimen used for the EGFR mutation test. A clinical specimen is divided into two parts. One part is submitted to the pathology department to confirm the presence of cancer cells. When cancer cells are present, the other part is submitted for the EGFR mutation test.

EGFR 遺伝子変異検査を行なう上での基礎知識をまとめる。

EGFR 遺伝子変異検査は、後に述べる高感度法を使用すれば、肺癌を病理診断する全ての検体（喀痰、気管支洗浄液、経気管支腫瘍生検、針吸引細胞診、胸水）で施行可能である。まず、採取した検体を2つに分け、1つを病理検査に提出、1つを遺伝子検査用の溶液（例えば AL buffer：検査会社より供与される）で保存する。病理検査で癌細胞が検体中に存在することを確認した上で、保存した検体を EGFR 遺伝子変異検査に提出する（Figure 3）。この手順を踏まない検査は意味がない。病理で癌細胞を確認せず、癌細胞がない検体を検査してしまうと、EGFR 遺伝子変異のある肺癌患者の検体でも EGFR 遺伝子変異検査は陰性となる。結果として患者の治療機会を奪うことになる。

なぜ高感度法が必要なのか

臨床検体は、肺癌細胞以外に多量の正常細胞を含む。これは、手術検体、細胞診検体に関わらず、全ての検体に当てはまる。正常細胞は正常の EGFR 遺伝子を持っている。癌細胞がわずかだと、正常細胞の正常 EGFR 遺伝子に覆い隠されるため、変異 EGFR 遺伝子の検出は難しくなる（Figure 4）。多数の正常 EGFR 遺伝子存在下でも変異 EGFR を検出できる高感度法が必要な理由である。

病理検査の感度

それでは、Figure 3 の手順を取ったときに、どの程度の感度の検査を行なったら良いのだろうか。病理検査で class IV, V と診断された検体を多数集め、その中の癌細胞の割合をコンピュータで計数した（Figure 5）。全ての検体で癌細胞の割合は 1% 以上であった。⁷ このことより、Figure 3 の手順を経て、病理で癌細胞の存在が確認された検体は、1% 以上の癌細胞を含んでいると仮定して扱って良いと思われる。そして、100 個の細胞中に 1 個の EGFR 遺伝子変異陽性細胞を含む検体で EGFR 遺伝子変異を検出できる検査を用いれば、全ての臨床検体で EGFR 遺伝子変異検査が可能となる。

なお、Figure 5 でパラフィン切片のデータを見ると、組織検体では 10% 以上の感度で大丈夫と思われる。これは、組織ではほとんどが癌であるような部位を肉眼的に選択することが可能なためであろう。

EGFR 遺伝子変異検査の種類と特徴

ダイレクトシーケンス

ダイレクトシーケンスは感度が悪く 10% 以上癌細胞を含む検体には使用できるが、それ以下の検体に使用できないことは周知の事実である。よって、EGFR 遺伝子変異検査としては組織検体のみが適合する。細胞診検体に使用すると偽陰性が問題となるため、使用すべきでは

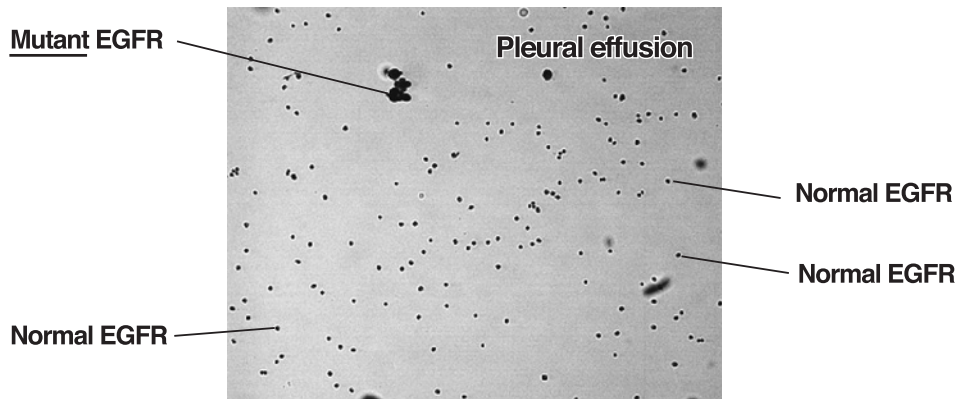


Figure 4. Clinical specimen used for the EGFR mutation test. Most specimens contain normal cells in addition to cancer cells. Normal cells have 2 copies of normal EGFR gene, which obscures the signal from the mutated EGFR gene in the cancer cells.

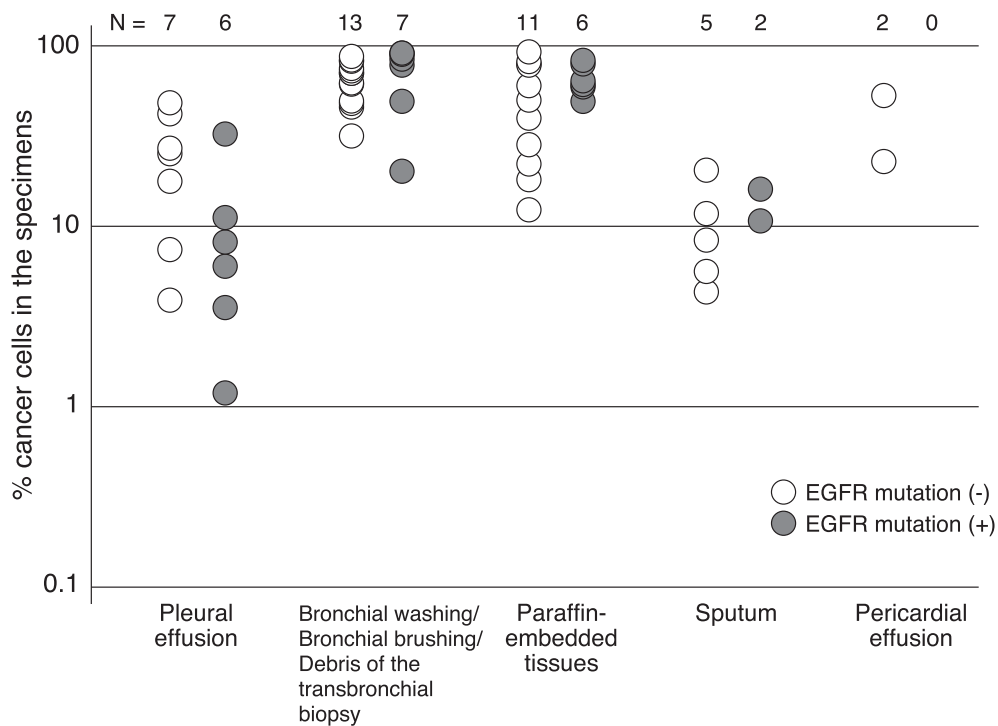


Figure 5. Proportion of the cancer cells in the specimens classified as class IV or class V.

ない。

高感度法

細胞診検体を確実に検索するためには、1% 以上癌細胞を含む検体に使用できる高感度法を用いるべきである。

現在使用されている高感度法を Table 1 に示す。現時点では、十分な論文が発表されており、使用経験数も多い PNA-LNA PCR clamp 法（三菱化学メディエンス）、Scorpion ARMS 法（DxS）、Mutant-enriched PCR 法

（AVSS）が第一選択となる。PCR-invader 法（ビーエムエル）は、高感度法と思われるが、論文が全く存在せず、検査内容も不明なため、エビデンスレベルが低く、臨床検査として使用するには問題が多い。早急な情報公開、および論文の整備が望まれる。

EGFR 遺伝子変異検査法の品質管理の重要性

EGFR 遺伝子変異は、肺癌臨床で初めて使用される遺伝子変異検査である。今後も基礎研究の進展に伴い、新

Table 1. High Sensitivity Tests for the Detection of EGFR Mutations

<ul style="list-style-type: none"> • PNA-LNA PCR clamp <ul style="list-style-type: none"> Nagai, Cancer Res 2005 (Establishment of the method) Sutani, Br J Cancer 2006 (Prospective phase II study) Tanaka, Cancer Sci 2007 (Validation of the test) Miyazawa, Cancer Sci 2008 (Expanded the system to include the T790M mutation) Inoue, J Clin Oncol 2009 (Application to PS 3-4 patients. Prospective phase II study) • Scorpion ARMS <ul style="list-style-type: none"> Kimura, Cancer Sci 2006 (Studied pleural effusion from 24 patients) Horiike, Chest 2007 (Studied TBAC samples from 94 patients) Kimura, Br J Cancer 2007 (Comparison of the results from tumor and blood samples) Maheswaran, N Engl J Med 2008 (Studied on circulating tumor cells) • Mutant-enriched PCR <ul style="list-style-type: none"> Asano, Clin Cancer Res 2006 (Establishment of the method. Studied 146 samples) Inukai, Cancer Res 2006 (High sensitivity detection of the T790M mutation) Soh, Int J Cancer 2006 (Comparison of the results with the PNA-LNA PCR clamp using 29 patients) Soh, Lung Cancer 2007 (Studied the T790M mutation in pleural effusion) Otani, J Thorac Oncol 2008 (Studied aspiration biopsy samples from 53 patients) • Cycleave <ul style="list-style-type: none"> Kosaka, Clin Cancer Res 2006 (Establishment of the method. Studied T790M mutation) Yoshida, J Thorac Oncol 2007 (Prospective study with 66 patients) • High-resolution mutant analysis <ul style="list-style-type: none"> Nomoto, Am J Clin Pathol 2006 (Establishment of the method. Studied 66 patients) Takano, Clin Cancer Res 2007 (Studied 217 patients) • SMAP <ul style="list-style-type: none"> Hoshi, Clin Cancer Res 2007 (Establishment of the system. Studied 45 patients) Kawai, Biologicals 2008 (Improvement using Taq MutS) • PCR invader <ul style="list-style-type: none"> No reports present.
--

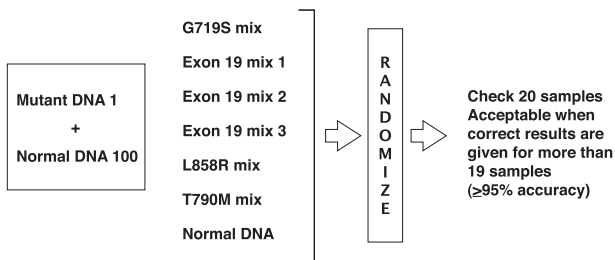


Figure 6. Proposed scheme for the quality assurance of the EGFR mutation test. Academic societies should take an initiative role.

たな遺伝子マーカーが発見され、臨床に導入されると思われるが、その前例となるものであり、基盤整備を行ないながら使用していく必要がある。

高感度法の重要性は上記の通りである。EGFR 遺伝子変異検査の結果が治療法の選択に直接つながり、Figure 2 に示したように患者予後に影響を与えることが示され

つつある現在、検査法の品質は直接患者予後を左右する。品質管理は重要である。

Figure 6 は、品質管理の私案である。各受託検査会社に、変異内容を伏せた検体を一定数検査依頼し、最低限（例えば 95%）以上の正解率があった会社のみ学会として認定する、という手法である。より厳しい基準が必要かもしれない。患者の生命に直接関わる検査となってきた現在、このような品質管理を行なうことが、より良い肺癌治療を行なうために必要であろう。

おわりに

EGFR 遺伝子変異検査は、非小細胞肺癌治療に不可欠のものとなってきた。より良い肺癌治療を行なうため、検査手順の厳守、適切な検査法の選択、検査会社に対する認定制度の整備が望まれる。

REFERENCES

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S,

- Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-2139.
2. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497-1500.
 3. Takano T, Fukui T, Ohe Y, Tsuta K, Yamamoto S, Nokihara H, et al. EGFR mutations predict survival benefit from gefitinib in patients with advanced lung adenocarcinoma: a historical comparison of patients treated before and after gefitinib approval in Japan. *J Clin Oncol*. 2008;26:5589-5595.
 4. Morita S, Okamoto I, Kobayashi K, Yamazaki K, Asahina H, Inoue A, et al. Combined survival analysis of prospective clinical trials of gefitinib for non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4493-4498.
 5. Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009;27:1394-1400.
 6. Kobayashi K, Inoue A, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, et al. First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. *J Clin Oncol*. 2008;26(Suppl):abstr 8070.
 7. Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Sutani A, et al. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*. 2007;98:246-252.