

ORIGINAL ARTICLE

## 末梢血液中の循環腫瘍細胞を用いた EGFR 遺伝子変異検出の検討

磯部和順<sup>1</sup>・秦 美暢<sup>2</sup>・佐藤敬太<sup>1</sup>・佐野 剛<sup>1</sup>・  
杉野圭史<sup>1</sup>・坂本 晋<sup>1</sup>・高井雄二郎<sup>1</sup>・本間 栄<sup>1</sup>

### Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Circulating Tumor Cells in Blood Specimens in Non-Small Cell Lung Cancer

Kazutoshi Isobe<sup>1</sup>; Yoshinobu Hata<sup>2</sup>; Keita Sato<sup>1</sup>; Go Sano<sup>1</sup>;  
Keishi Sugino<sup>1</sup>; Susumu Sakamoto<sup>1</sup>; Yujiro Takai<sup>1</sup>; Sakae Homma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, <sup>2</sup>Department of Chest Surgery, Toho University Omori Medical Center, Japan.

**ABSTRACT** — **Objective.** The purpose of this study was to clarify the detection rate of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation in circulating tumor cells (CTCs) using the CellSearch<sup>®</sup> system in a blood specimen. **Method.** We counted the CTCs of 10 patients with primary lung adenocarcinoma who showed EGFR mutation in the primary site, CTCs using the CellSearch<sup>®</sup> system (Veridex). CTCs were extracted from blood specimens, and were analysed for an EGFR mutation using the polymerase chain reaction clamp method or the cyclecleave method. We were compared the incidence of EGFR mutations in CTCs with those in the primary site. **Results.** The localization of EGFR mutations in the primary site were the exon 19 deletion in 4 patients, exon 21 L858R in 4, exon 19 deletion + exon 20 T790M in 1, and exon 21 L861Q in 1. CTCs were detected in 6 out of 10 cases (60%). The numbers of CTCs per 7.5 ml were 1 in 2 patients, 2 in 2, and 4 in 2, respectively. EGFR mutations in CTCs were detected by cyclecleave method in 1 out of 6 cases (17%) with the exon 19 deletion. **Conclusion.** This study showed that the detection rate of EGFR mutation in CTCs in blood specimens was low compared with those in the primary site. Therefore, the detection technique of EGFR mutation localization in CTCs should be improved in the near future.

(JLCC. 2011;51:689-693)

**KEY WORDS** — Non-small cell lung cancer, Epidermal growth factor receptor gene mutation, Circulating tumor cells, CellSearch<sup>®</sup> system

Reprints: Kazutoshi Isobe, Department of Respiratory Medicine, Toho University Omori Medical Center, 6-11-1 Omori-Nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8541, Japan (e-mail: kazutoshiisobe@aol.com).

Received May 6, 2011; accepted June 29, 2011.

**要旨** — **目的.** CellSearch<sup>®</sup> system を用いた末梢血液中の循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells : CTCs) から上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) 遺伝子変異が検出可能か否かを明らかにする. **方法.** 原発巣において EGFR 遺伝子変異陽性が確認されている進行期肺腺癌 10 例の末梢血液検体から, CellSearch<sup>®</sup> system (Veridex) を用いて CTCs を抽出し, PCR-clamp 法, または cyclecleave 法にて EGFR 遺伝子変異を解析した. 得られた EGFR 遺伝子変異の結果について原発巣のものと比較検討した. **結果.** 原発巣の

EGFR 遺伝子変異は exon 19 deletion/exon 21 L858R/exon 21 L861Q/exon 19 deletion + exon 20 T790M が 4/4/1/1. CTCs は 10 例中 6 例 (60%) に検出され, 個数は 1 個/7.5 ml が 2 例, 2 個/7.5 ml が 2 例, 4 個/7.5 ml が 2 例であった. CTCs が検出された 6 例中, CTCs の EGFR 遺伝子変異陽性例は cyclecleave 法による 1 例 (17%) のみで exon 19 deletion であった. **結論.** CellSearch<sup>®</sup> system と PCR-clamp 法, または cyclecleave 法を用いた血液中 CTCs の EGFR 遺伝子変異の検出率は 17% と低く, 今後検出技術の向上が必要である.

東邦大学医療センター大森病院 <sup>1</sup>呼吸器内科, <sup>2</sup>呼吸器外科.

印刷請求先: 磯部和順, 東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科, 〒143-8541 東京都大田区大森西 6-11-1 (e-mail:

kazutoshiisobe@aol.com).

受付日: 2011 年 5 月 6 日, 採択日: 2011 年 6 月 29 日.

索引用語 — 非小細胞肺癌, 上皮成長因子受容体遺伝子変異, 循環腫瘍細胞, CellSearch® system

はじめに

進行期非小細胞肺癌において上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) 遺伝子変異の有無は治療薬を選択する上で非常に重要である。<sup>1,3</sup> このため、変異アレルのモニタリングに適した非侵襲的で反復可能な EGFR 遺伝子変異検出方法の開発が望まれる。今回、進行期非小細胞肺癌患者の末梢血液中の循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells : CTCs) を確認するとともに、日常臨床で用いられている EGFR 遺伝子変異検出方法で検出可能か否かを明らかにすることを目的として pilot study を行った。

対象および方法

原発巣において EGFR 遺伝子変異陽性 [polymerase chain reaction (PCR)-clamp 法 : 8, direct sequence 法 : 2] が確認されている肺腺癌患者 10 例から、末梢血液を 7.5 ml 採取し CellSearch® system (Veridex) を用いて CTCs を抽出した。<sup>4</sup> すなわち、CellTracks® AutoPrep® を用いて免疫磁気ビーズ法により CTCs を検出した後、MagNest® にセットされたカートリッジに分注し、CellTracks® アナライザー II を用いて蛍光測定と解析を行った。この解析結果を 2 名の臨床検査技師の目視により CTCs 数を判定した。CTCs 数測定後、このカートリッジから CTCs を含む細胞を分取し、PCR-clamp 法、<sup>5</sup> または cycleave 法<sup>6</sup> で EGFR 遺伝子変異を解析した。得ら

れた EGFR 遺伝子変異の解析結果について原発巣の解析結果と比較検討した。次に、CTCs からの遺伝子変異検出方法別に検出率を比較検討した。最後に CTCs 抽出検体中の総細胞数をカウントした。本研究は東邦大学医療センター大森病院の倫理委員会で承認されている (審査番号 19-1)。

結果

患者背景を Table 1 に示す。平均年齢は 64.6 歳 (45~79 歳)、男性 1 例、女性 9 例、臨床病期は IV 期が 9 例、術後再発が 1 例であった。全例遠隔転移を有しており、骨転移が 8 例、脳転移が 7 例、肺内転移は 2 例、肝転移が 1 例であった。PS は 0~2 が 4 例、4 が 6 例であった。原発巣の EGFR 遺伝子変異は exon 19 deletion が 4 例、exon 21 L858R が 4 例、exon 21 L861Q が 1 例、exon 19 deletion + exon 20 T790M が 1 例であった。EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR tyrosine kinase inhibitor : EGFR-TKI) は 10 例中 9 例に既に投与されており、gefitinib のみが 3 例、gefitinib 投与後の erlotinib が 6 例であった。また、EGFR-TKI を投与された 9 例中 8 例では既に EGFR-TKI に耐性を認め、投与が中止されていた。CTCs 検査後の観察期間は 13~228 日であった。

CTCs は 10 例中 6 例 (60%) に検出され、個数は 1 個/7.5 ml が 2 例、2 個/7.5 ml が 2 例、4 個/7.5 ml が 2 例であった。CTCs が検出された 6 例中、CTCs からの EGFR 遺伝子変異検出例は 1 例 (17%) のみで、CTCs

Table 1. Patient Characteristics

Case	Age	Sex	Path	Clinical stage	Metastases	PS	Primary site		Previous EGFR-TKI	EGFR-TKI resistance	Prognosis
							EGFR mutation	Method			
1	77	F	Ad	IV	OSS, BRA	4	19Del	Cl	-	-	14d dead
2	45	F	Ad	IV	PUL, HEP, BRA, OSS	4	L858R	Cl	G, E	+	81d dead
3	75	F	Ad	IV	OSS, BRA	4	19Del + T790M	Cl	G, E	+	76d dead
4	79	F	Ad	IV	OSS	4	L858R	Cl	G	+	225d dead
5	51	M	Ad	IV	PUL	0	L858R	Cl	G	+	311d alive
6	70	F	Ad	Rec	OSS, BRA	4	19Del	Cl	G, E	+	13d dead
7	74	F	Ad	IV	BRA	4	L861Q	Cl	G, E	+	34d dead
8	59	F	Ad	IV	OSS	2	L858R	D	G	-	299d alive
9	62	F	Ad	IV	OSS, BRA	2	19Del	D	G, E	+	195d alive
10	54	F	Ad	IV	OSS, BRA	1	19Del	Cl	G, E	+	228d alive

Path: pathological classification, Ad: adenocarcinoma, Rec: recurrence, OSS: bone metastases, BRA: brain metastases, PUL: pulmonary metastases, HEP: liver metastases, PS: performance status, EGFR: epidermal growth factor receptor, 19Del: exon 19 deletion, L858R: exon 21 L858R, L861Q: exon 21 L861Q, T790M: exon 20 T790M, Cl: PCR-clamp method, D: direct sequence method, EGFR-TKI: epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, G: gefitinib, E: erlotinib, Prognosis: prognosis after CTCs examination, d: day.

**Table 2.** Relationship Between Number of CTCs and Incidence of EGFR Mutation

Case	No. of CTCs (/7.5 ml)	CTCs	
		EGFR mutation	Method
1	4	-	Cl
2	4	-	Cy
3	2	-	Cy
4	2	-	Cy
5	1	-	Cy
6	1	19Del	Cy
7	0	-	Cl
8	0	-	Cy
9	0	-	Cy
10	0	-	Cy

CTCs: circulating tumor cells, EGFR: epidermal growth factor receptor, 19Del: exon 19 deletion, Cl: PCR-clamp method, Cy: cycleave method.

**Table 3.** Comparison of Detection Method of EGFR Mutations and Incidence of Positive CTCs and EGFR Mutation in CTCs

Detection method of mutation in primary lesion	Detection method of EGFR mutation in CTCs	
	PCR clamp (n=2)	Cycleave (n=8)
Incidence of positive CTCs	50% (1/2)	62.5% (5/8)
Incidence of EGFR mutation in CTCs	0% (0/1)	20% (1/5)

CTCs: circulating tumor cells, EGFR: epidermal growth factor receptor.

数が1個/7.5 mlのCase 6であった (Table 2).

CTCsからのEGFR遺伝子変異検出方法はPCR-clamp法が2例, cycleave法が8例であった. PCR-clamp法の2例では原発巣のEGFR遺伝子変異検出法にPCR-clamp法が用いられており, CTCsは2例中1例で検出されたが, EGFR遺伝子変異は検出されなかった. cycleave法の8例では原発巣のEGFR遺伝子変異検出にdirect sequence法が2例, PCR-clamp法が6例に用いられていた. CTCsは8例中5例で検出され, 5例中1例にexon 19 deletionが検出され, 原発巣のEGFR遺伝子変異と同一のものであった (Table 3).

CTCsを抽出した検体内には白血球が多数混在しており, CTCs陽性症例における抽出検体中の総細胞数は1,200~5,700/7.5 mlであった. EGFR遺伝子変異陽性例のCTCs/総細胞数比は0.02%と他の検体の値より低値であった (Table 4).

**Table 4.** Comparison of CTCs (Total Cell Counts) and Detection of EGFR Mutation

Case	CTCs No.	Total cell counts (/7.5 ml)	CTCs/Total cell counts (%)	Detection of EGFR mutation
1	4	2,200	0.18	-
2	4	2,400	0.17	-
3	2	5,700	0.04	-
4	2	2,500	0.08	-
5	1	1,200	0.09	-
6	1	4,100	0.02	+

CTCs: circulating tumor cells, EGFR: epidermal growth factor receptor.

### 考 察

CTCsは測定機器の進歩により, 高感度に検出することが可能となった.<sup>7</sup> 肺癌だけでなく, 乳癌, 大腸癌, 前立腺癌において, 治療開始前および初回治療後のCTCs数が, 無増悪生存期間および全生存期間で強い相関を示し, CTCs数を測定することで治療効果や予後の予測が可能であることが報告されている.<sup>8-12</sup> 原発性肺癌でも, 病期の進行によってCTCs検出率が上昇することが知られている.<sup>13</sup> Tanakaら<sup>13</sup>はCellSearch® systemを用いてIV期の非小細胞肺癌16例中10例(63%)に平均5.5個/7.5 ml(0~42個)のCTCsを検出したことを報告している. 今回の研究では, 末梢血液中のCTCsは10例中6例で検出され, 検出率は60%であった. これは, Tanakaらの報告の頻度とほぼ一致していた.

また, CTCsは固形癌のバイオマーカーの検出に有用である.<sup>14</sup> Mengら<sup>15</sup>は独自に開発したCTCs抽出法を用いて乳癌患者のCTCsでfluorescence *in situ* hybridization法によるhuman epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)遺伝子増幅を検討した. 原発巣においてHER-2遺伝子増幅が陰性であった24例中9例にCTCsでのHER-2遺伝子増幅を確認し, うち4例にHER-2受容体抗体であるtrastuzumabを投与したところ4例中3例にpartial response以上の効果が得られたことを報告している. 原発性肺癌ではMaheswaranら<sup>16</sup>が, 低速の層流を用いたCTC-chipとScorpion-ARMS法によって, 12例中11例(92%)でCTCsからT790Mを含めたEGFR遺伝子変異の変異アレル検出が可能であったことを報告している. 進行肺癌の全例で多数のCTCsを抽出することができ, EGFR遺伝子変異のモニタリングとして期待がもたれるが, 多施設共同試験としては同様の成績は報告されておらず, 再現性や臨床応用には課題が残る可能性が考えられる. Punnooseら<sup>17</sup>は培養細胞および臨床検体を用いてCTC-chipとCellSearch®を比較し, 検

出感度は同程度であったと報告している。予想に反して CTC-chip の感度が高くなかったことについて、培養細胞を用いた実験では臨床検体中の腫瘍細胞と異なる結果をもたらした可能性があること、Punnooseらの用いた CTC-chip が Maheswaran らのものと細部の仕様が異なる可能性があること、Maheswaran らと異なり臨床検体を搬送して行ったため搬送中の扱いや時間が CTCs に影響を与えた可能性があること、を理由として考察している。今回の検討では日常臨床で使用可能である CellSearch® system を用いたが、EGFR 遺伝子変異の検出率は Maheswaran らの報告と比較して低く、10 例中 1 例（10%）のみであった。

本研究で CTCs からの EGFR 遺伝子変異の検出率が低かった理由は、cycleave 法は約 5%、PCR-clamp 法は 1% の腫瘍細胞由来の DNA が含まれていれば検出可能であると報告されているが、<sup>18</sup> CellSearch® system では CTCs 抽出検体中の白血球を含めた総細胞数が多く、cycleave 法や PCR-clamp 法の検出感度以下となったことが一因として考えられた。CTCs から EGFR 遺伝子変異が検出された症例の CTCs 数は 1 個/7.5 ml で CTCs/総細胞数比も 0.02% と少なかった。逆に、この症例で検出された EGFR 遺伝子変異が CTCs 由来ではない可能性も否定できない。すなわち、CTCs と判定されなかった癌細胞あるいは癌細胞片や、血清中の遊離 DNA から EGFR 遺伝子変異が検出される可能性も考慮しておく必要がある。<sup>19</sup> また、CTCs より EGFR 遺伝子変異が検出された Case 6 では予後が 13 日後死亡と非常に短かった点も興味深い。また、個体全体の腫瘍量と CTCs 数や治療効果と CTCs 数の相関についても、さらなる検討が必要であると考えられた。

以上、末梢血液中の CTCs からの EGFR 遺伝子変異検出率は原発巣と比較して低く、今後 CTCs を効率良く回収できるような機器の開発や、より高感度な EGFR 遺伝子変異検出法の確立が喫緊の課題であると考えられた。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

謝辞：CTCs の測定、診断に際し、御指導頂いた株式会社 SRL の夏目聡士氏、井上義男氏、柿本篤志氏、下田勇治氏に深謝する。

## REFERENCES

1. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010;362:2380-2388.
2. 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.
3. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:121-128.
4. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6897-6904.
5. Nagai Y, Miyazawa H, Huqun, Tanaka T, Udagawa K, Kato M, et al. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res*. 2005;65:7276-7282.
6. Yatabe Y, Hida T, Horio Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. *J Mol Diagn*. 2006;8:335-341.
7. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*. 2010;2010:617421.
8. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:781-791.
9. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:3213-3221.
10. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res*. 2011;17:827-835.
11. Armakolas A, Panteleakou Z, Nezos A, Tsouma A, Skondra M, Lembessis P, et al. Detection of the circulating tumor cells in cancer patients. *Future Oncol*. 2010;6:1849-1856.
12. Khoury JD, Adcock DM, Chan F, Symanowski JT, Tiefenbacher S, Goodman O, et al. Increases in quantitative D-dimer levels correlate with progressive disease better than circulating tumor cell counts in patients with refractory prostate cancer. *Am J Clin Pathol*. 2010;134:964-969.
13. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6980-6986.
14. 松阪 論. 抗体医薬に対するバイオマーカー 末梢循環癌細胞 (CTC), 末梢循環血管内皮細胞 (CEC), 末梢循環血管内皮前駆細胞 (CEP). 医学のあゆみ. 2009;228:

- 1105-1108.
15. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:9393-9398.
  16. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in *EGFR* in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med*. 2008; 359:366-377.
  17. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh RF, et al. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One*. 2010;5:e12517.
  18. 光富徹哉, 谷田部恭, 萩原弘一, 弦間昭彦, 西尾和人, 秋田弘俊, 他. 肺癌患者における *EGFR* 遺伝子変異検査の解説. *肺癌*. 2009;49:i-xix.
  19. Schwarzenbach H, Alix-Panabières C, Müller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X, et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:1032-1038.