

ORIGINAL ARTICLE

## EGFR 遺伝子変異陰性非小細胞肺癌の Erlotinib 治療例における EGFR 遺伝子変異の再解析

小原さやか<sup>1</sup>・牛島友則<sup>2</sup>・棚井千春<sup>1</sup>・田中良明<sup>1</sup>・野田裕道<sup>1</sup>・堀内 啓<sup>2</sup>・臼井一裕<sup>1</sup>

### Reanalysis of the EGFR Mutation Status in Non-small Cell Lung Cancer Patients Without an EGFR Mutation Treated with Erlotinib

Sayaka Ohara<sup>1</sup>; Tomonori Ushijima<sup>2</sup>; Chiharu Tanai<sup>1</sup>; Yoshiaki Tanaka<sup>1</sup>; Hiromichi Noda<sup>1</sup>; Hajime Horiuchi<sup>2</sup>; Kazuhiro Usui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Respiriology, <sup>2</sup>Department of Diagnostic Pathology, NTT Medical Center Tokyo, Japan.

**ABSTRACT** — **Objective.** This study aims to clarify whether there are epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation false-negative results among non-small cell lung cancer (NSCLC) patients without an EGFR mutation who exhibit a good response to erlotinib treatment. **Methods.** We analyzed NSCLC patients without an EGFR mutation who received erlotinib treatment at NTT Medical Center Tokyo. The EGFR mutation status was reexamined using the modified PNA-LNA PCR clamp method. The efficacy of erlotinib and the prognosis were re-estimated. **Results.** Of the 20 patients, seven were male and 13 were female, with a median age of 64 years (range: 44 to 77). The histological subtype was adenocarcinoma in 18 patients and NSCLC NOS in two patients. Thirteen patients had c-Stage of IV disease, two patients had IIIB disease and five developed postoperative recurrence. The performance status of the patients was PS 0-1: 16, PS 2: 4, and the median number of erlotinib treatment days was 144. The median progression-free survival and overall survival since erlotinib treatment were 127 days and 357 days, respectively. Of the 20 patients enrolled, six showed a partial response (PR), five exhibited stable disease (SD) and nine exhibited progressive disease (PD), giving a response rate of 30.0%. Of the 16 patients in whom the EGFR mutation status was reanalyze using the modified PNA-LNA PCR clamp method, eight patients were found to have an EGFR mutation. The response rate of the eight patients without an EGFR mutation was 0%, whereas that of the eight patients with an EGFR mutation was 62.5%. Among the patients without an EGFR mutation, the median progression-free survival and overall survival since erlotinib treatment were 47 days and 218 days, respectively. Among the patients with an EGFR mutation, the median progression-free survival and overall survival since erlotinib treatment were 387 days and 836 days, respectively. **Conclusions.** There are false-negative results regarding the EGFR mutation status determined using the PNA-LNA PCR clamp method.

(JLCC. 2013;53:324-328)

**KEY WORDS** — Erlotinib, Non-small cell lung cancer (NSCLC), PNA-LNA PCR clamp method, Wild type EGFR, Formalin-fixed paraffin-embedded

Reprints: Sayaka Ohara, Division of Respiriology, NTT Medical Center Tokyo, 5-9-22 Higashi-Gotanda, Shinagawa-ku, Tokyo 141-8625, Japan (e-mail: ohara.sayaka@east.ntt.co.jp).

Received March 13, 2013; accepted July 18, 2013.

**要旨** — **目的.** Erlotinib が有効な EGFR 遺伝子変異陰性非小細胞肺癌において、EGFR 遺伝子変異偽陰性が存在するかを明らかにする。 **方法.** 当院で Erlotinib 治療を受けた EGFR 遺伝子変異陰性非小細胞肺癌の EGFR 遺

伝子変異を modified PNA-LNA PCR clamp 法で再検査し、Erlotinib の治療効果、予後について検討した。 **結果.** 患者数 20。年齢中央値：64 (44~77) 歳。性別：女性 13。組織型：腺癌 18, 分類不能 2。臨床病期：IIIB 2, IV 13,

NTT 東日本関東病院 <sup>1</sup>呼吸器内科, <sup>2</sup>病理診断部。

別刷請求先：小原さやか, NTT 東日本関東病院呼吸器内科,  
〒141-8625 東京都品川区東五反田 5-9-22 (e-mail: ohara.sayaka@

east.ntt.co.jp)。

受付日：2013 年 3 月 13 日, 採択日：2013 年 7 月 18 日。

術後再発5. PS 0~1/2~: 16/4. Erlotinib 投与日数中央値: 144 日. Erlotinib 開始後生存期間中央値 (OS): 357 日. Erlotinib 開始後無増悪生存期間中央値 (PFS): 127 日. 最良効果: PR 6, SD 5, PD 9. 奏効率: 30.0%. EGFR 遺伝子変異再解析が可能であった16例中8例 (50.0%)で陽性. 奏効率: 陰性 0%, 陽性 62.5%. PFS:

陰性 47 日, 陽性 387 日 ( $p=0.0022$ ). OS: 陰性 218 日, 陽性 836 日 ( $p=0.1118$ ). **結語.** 従来法では, EGFR 遺伝子変異偽陰性が存在する.

**索引用語** — Erlotinib, 非小細胞肺癌, PNA-LNA PCR clamp 法, EGFR 遺伝子変異陰性, ホルマリン固定パラフィンブロック

## はじめに

Erlotinib は epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) であり, EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する key drug である.<sup>1-3</sup> 一方で, EGFR 遺伝子変異陰性の非小細胞肺癌においても有効性を示すことがあり,<sup>4</sup> EGFR 遺伝子変異陰性例のうち, Erlotinib によってより高い効果が得られる患者群を同定しようとする試みがなされている. BR.21 試験のサブ解析では, 非喫煙者で良好な成績が示されており (hazard ratio (HR) 0.42), OLCSG0705 試験の喫煙歴別のサブ解析においても, 喫煙者の無増悪生存期間 (progression-free survival: PFS) 中央値が 1.9 ヶ月, 中央生存期間 (median survival time: MST) が 8.6 ヶ月であったのに対して, 非喫煙者の PFS は 4.3 ヶ月, MST は 12.9 ヶ月と良好であった.<sup>5</sup> EGFR 遺伝子変異陰性の非喫煙者および軽度喫煙者のみに限定して, 2次治療以降での Erlotinib 単剤療法の有用性を検討した NEJ006/TCOG0903 試験では, 主要評価項目である奏効率が 15.2%, stable disease (SD) 以上の抗腫瘍効果が得られた患者における PFS 中央値は 303 日と良好な成績が得られている.<sup>6</sup> しかしながら, NEJ006/TCOG0903 試験では, EGFR 遺伝子変異の有無を再検査したところ, 陽性例が含まれていることが報告されている. EGFR 遺伝子変異陰性患者を対象とした Erlotinib の臨床試験には, EGFR 遺伝子変異の偽陰性例が少なからず含まれていることが予想され, 真の EGFR 遺伝子変異陰性症例での Erlotinib の臨床効果については不明な点が多い.

今回, 我々は, EGFR 遺伝子変異偽陰性症例を減らすため, nested PCR 法を加えた modified PNA-LNA PCR clamp 法を開発した. この方法を用いて, 当院で診断時 EGFR 遺伝子変異陰性と診断され, Erlotinib 治療を受けた肺癌患者を対象に, 診断時に用いられた検体から DNA を抽出し, EGFR 遺伝子変異の有無を再検討し, Erlotinib の臨床効果との関係を検討した.

## 方法

### 対象と方法

2006 年から 2012 年までの間に非小細胞肺癌と診断され, NTT 東日本関東病院にて Erlotinib 治療が行われた 58 例のうち, Erlotinib 治療前の臨床検体から PNA-LNA PCR clamp 法<sup>7</sup>で EGFR 遺伝子変異を認めなかった 20 例を対象とした.

各症例の年齢, 性別, 組織型, 病期分類, performance status (PS), 喫煙歴, 治療, 予後について retrospective に調査した.

さらに, 肺癌診断時の検体から再抽出した DNA を用いて, modified PNA-LNA PCR clamp 法にて EGFR 遺伝子変異の有無を再検査した.

### EGFR 遺伝子変異検査方法

再検査可能な症例については, 以下の nested PCR 法を加えた modified PNA-LNA PCR clamp 法で, EGFR 遺伝子変異を再検査した. いずれも, Erlotinib 治療前に採取された, 50  $\mu$ m 厚のパラフィン包埋切片, ないしは細胞診検体から DNA を抽出し, EGFR 遺伝子変異検査を実施した.

### Modified PNA-LNA PCR clamp 法

検体から抽出した DNA を用いて, EGFR 遺伝子の exon 18, 19, 21 に対する 6 種類の primer (exon 18 forward primer CTTACACCCAGTGGAGAAGC, backward primer GGACCTTACCTTATACACCG; exon 19 forward primer TGTCATAGGGACTCTGGATCC, backward primer AGCAGAAACTCACATCGAG; exon 21 forward primer CTTGGAGGACCGTCGCTTG, backward primer CCACCTCCTTACTTTGCTC) を各 300 nM, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, AmpliTaq Gold<sup>®</sup> (Life Technologies) 1 unit を加え, 全体で 10  $\mu$ l となるように調整し, Multiplex PCR 反応を 25 サイクル (95°C, 20 秒→52°C, 120 秒→72°C, 120 秒) 実施した. Multiplex PCR 法での DNA 増幅が特異的に起こっていることを確認するため, PCR 産物を 4000 倍に希釈して template とし, EGFR 遺伝子の各 exon に対する 2 種類の primer を 300 nM, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2X SYBR Premix Ex Taq (タカラ

**Table 1.** Patient Characteristics

Total number of patients	20
Age (median, range)	64, 47-77
Gender	
Female	13
Male	7
Histology	
Adenocarcinoma	18
NSCLC NOS	2
Clinical stage of NSCLC	
IIIB	2
IV	13
Recurrence	5
Smoking status	
Never	11
Current/Ex-smoker	9
Pack-years of smokers (median)	34
Performance status	
0-1	16
2-	4
Number of treatments before erlotinib treatment	
None	2
1	2
2	8
3	5
4	3

NSCLC: non-small cell lung cancer; NOS: not otherwise specified.

バイオ)を加え、全体を25 µlに調整し、real time PCR法(95℃, 5秒→56℃, 30秒)を35サイクル行った。各exonに対するprimerを用いたreal time PCR法でのCt値が13~20サイクルであることを確認後、melting curve analysisによりDNAの非特異的増幅がないことを確かめた。最後に、Multiplex PCR法で得られたPCR産物を用いて、通常のPNA-LNA PCR clamp法を実施した。

**統計学的解析**

PFS, 全生存期間(overall survival : OS)は、Erlotinib治療開始日を起点として調査し、Kaplan-Meier法を用いて算出した。統計学的解析には、IBM SPSS statics 20を使用した。p<0.05を統計学的に有意と判定した。

**結果**

**臨床背景**

症例背景はTable 1に示す。EGFR遺伝子変異陰性非小細胞肺癌20例の年齢中央値は64歳(47~77歳)、性別は男性7例、女性13例であった。喫煙者が9症例で、喫煙者のsmoking index中央値は34 pack-yearsであった。病理組織型は腺癌が18例、non-small cell lung cancer, not otherwise specified (NSCLC NOS)が2例であっ

**Table 2.** Response to Erlotinib Treatment

Response	
CR	0
PR	6
SD	5
PD	9
ORR (%)	30.0% (95%CI: 8.0-52.0)
DCR (%)	55.0% (95%CI: 31.1-78.9)

CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease, ORR: overall response rate; DCR: disease control rate; 95%CI: 95% confidence interval.

た。検体は、経気管支肺生検検体組織12例、手術検体組織5例、胸水や心嚢液の細胞は3例であった。

臨床病期はIV期が13例、IIIB期が2例、術後再発が5例であった。Erlotinib投与期間中央値は144日(2~773日)であった。

**治療成績**

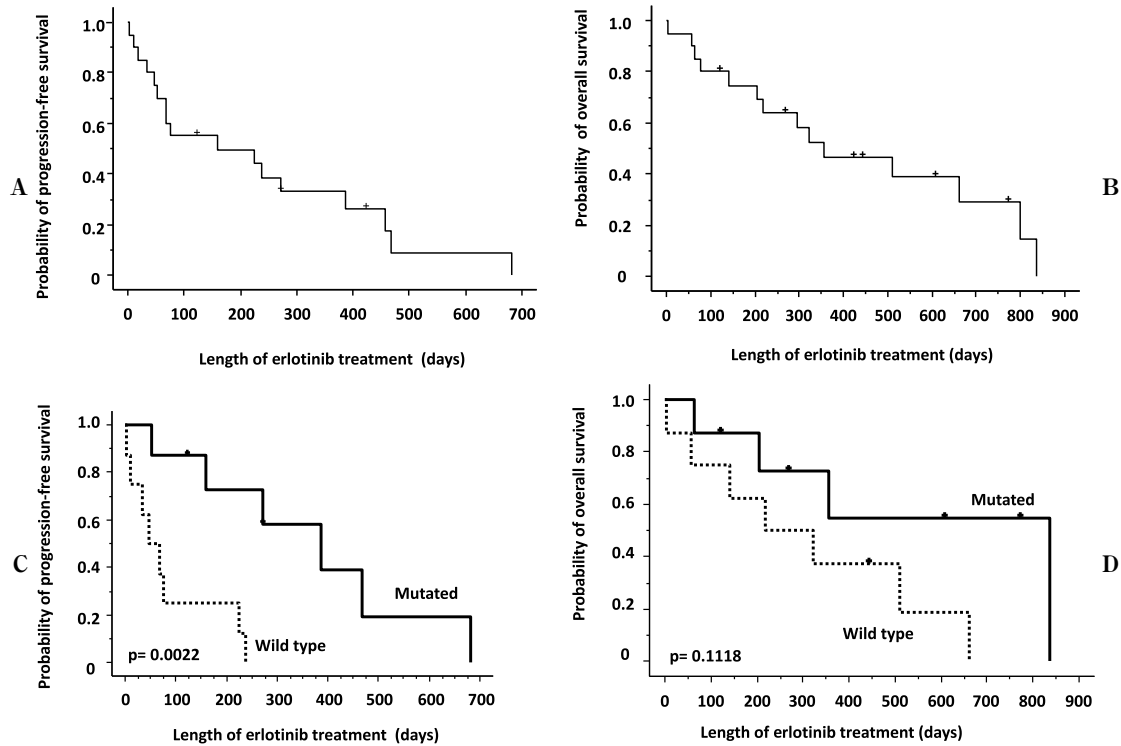
治療成績をTable 2に示す。Partial response (PR) 6例, SD 5例で、奏効率は30.0%, 病勢制御率は55.0%であった。Erlotinib投与開始後のPFS中央値は127日(Figure 1A), OS中央値は357日であった(Figure 1B).

**EGFR 遺伝子変異検査結果**

20例のうち16例については、肺癌診断時の検体からDNAを抽出してmodified PNA-LNA PCR clamp法にてEGFR遺伝子変異を再検査した。結果はTable 3に示す。再検査できた16例のうち8例においてEGFR遺伝子変異陽性(exon 19欠失5例, L858R変異3例)を認めた。Modified PNA-LNA PCR clamp法によるEGFR遺伝子変異の有無別の治療成績をTable 3に示す。EGFR遺伝子変異陰性8例では、SD 1例, progressive disease (PD) 7例で、奏効率0%, 病勢制御率0%であった。EGFR遺伝子変異陽性8例においては、PR 5例, SD 2例, PD 1例で奏効率62.5%, 病勢制御率87.5%と、陽性例においてErlotinibの臨床効果が高かった。Erlotinib投与開始後のPFS中央値はEGFR遺伝子変異陰性例で47日である一方、陽性例で387日(p=0.0022, Figure 1C)と陽性例で有意な延長がみられた。OS中央値においても陰性例218日、陽性例836日(p=0.1118)で、陽性例で延長した(Figure 1D)。以上からmodified PNA-LNA PCR clamp法を用いたEGFR遺伝子変異検査での陽性症例はErlotinibの有効性を認めた。

**考察**

当院でErlotinib治療を行った、EGFR遺伝子変異陰性進行非小細胞肺癌20例をretrospectiveに検討したとこ



**Figure 1.** A) Progression-free survival of the patients without an EGFR mutation treated with erlotinib. B) Overall survival of the patients without an EGFR mutation treated with erlotinib. The median progression-free survival and overall survival times estimated according to the Kaplan-Meier method were 127 days and 357 days, respectively. C) Progression-free survival of the 16 patients treated with erlotinib with/without an EGFR mutation analyzed according to the modified PNA-LNA PCR clamp method. D) Overall survival of the 16 patients treated with erlotinib with/without an EGFR mutation analyzed according to the modified PNA-LNA PCR clamp method. The median progression-free survival estimated according to the Kaplan-Meier method was 47 days in the patients with a wild type EGFR mutation and 387 days in the patients with an EGFR mutation ( $p=0.0022$ ). The overall survival time estimated according to the Kaplan-Meier method was 218 days in the patients with a wild type EGFR mutation and 836 days in the patients with an EGFR mutation ( $p=0.1118$ ). +: censored patient.

**Table 3.** EGFR Mutation Status Determined Using the Modified PNA-LNA PCR Clamp Method and the Response to Erlotinib Treatment in 16 Patients

	EGFR mutation status	
	Wild type	Mutation type
	8	Exon 19 deletion: 5 L858R: 3
Response		
CR	0	0
PR	0	5
SD	1	2
PD	7	1
ORR (%)	0.0%	62.5% (95%CI: 19.2-100)
DCR (%)	12.5% (95%CI: 0-42.1)	87.5% (95%CI: 57.9-100)

EGFR mutation status: EGFR mutation status reanalyzed using the modified PNA-LNA PCR clamp method.

ろ、6例(30%)でErlotinibが奏効していた。Nested PCR法を応用したmodified PNA-LNA PCR clamp法により、16例でEGFR遺伝子変異を再検査したところ、8例(50%)にEGFR遺伝子変異(exon 19欠失変異5例、L858R変異3例)が認められた。Modified PNA-LNA PCR clamp法でEGFR遺伝子変異陽性となった患者で奏効が認められたのに対し、陰性患者では奏効が認められなかった。Erlotinib使用に際しては、EGFR遺伝子変異の有無を確定することが重要であり、modified PNA-LNA PCR clamp法はその一助となると考えられた。

診断当初EGFR遺伝子変異が検出されず、再検査でEGFR遺伝子変異が確認された症例は、すべてホルマリン固定パラフィンブロックから抽出したDNAを用いていた。従来法でEGFR遺伝子変異が検出されなかった理由としては、ホルマリン固定などによりDNAの断片化が起こるため、良質なDNAを抽出できず、正確な遺伝子

変異検査ができなかったことが考えられる。PNA-LNA PCR clamp 法による EGFR 遺伝子変異検査の感度をあげるためには、腫瘍検体から良質な DNA を抽出することが重要である。ホルマリン固定パラフィンブロックからではなく、気管支鏡擦過細胞などの固定前の検体から DNA を抽出し、検査を実施することが望ましい。しかし、実臨床では、DNA 検査に不適当なホルマリン固定パラフィンブロックから抽出された検体で、EGFR 遺伝子変異検査を実施せざるを得ない場合もある。今回、我々はホルマリン固定パラフィンブロックから抽出された検体においても modified PNA-LNA PCR clamp 法を用いて、より高感度な EGFR 遺伝子変異検査を実施することができることを示した。そして、より高感度な EGFR 遺伝子変異検査により検出された EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対して、Erlotinib が高い臨床効果を示していたことが明らかとなった。

本研究の限界としては、retrospective な少数例を対象とした単一施設の検討であり、他の高感度遺伝子変異検査方法との比較検討は実施していないため、他の検査方法で偽陰性例が存在するかは不明である。また、良質な検体が得られやすい細胞診検体から直接抽出された DNA で偽陰性例が存在するのかは不明である。

EGFR-TKI の適正な使用をする上で、EGFR 遺伝子変異検査は必須である。IPASS 試験では、Gefitinib の有益性があるのは、EGFR 遺伝子変異陽性群であり、陰性群では殺細胞性抗がん剤の有益性が勝っていることが示されている。<sup>8,9</sup> したがって、EGFR-TKI を選択する場合、より正確な EGFR 遺伝子変異検査結果による治療選択が望まれる。Modified PNA-LNA PCR clamp 法を併用することで、一定の頻度で偽陰性症例を減らすことが可能と思われるが、ホルマリン固定後の検体からの DNA を使用して EGFR 遺伝子変異を検討するには限界があり、より良質な DNA 検体による正確な EGFR 遺伝子変異検査のために、rebiopsy も検討すべきと考える。

EGFR 遺伝子変異陰性 Erlotinib 治療例の EGFR 遺伝子変異を再解析したところ、偽陰性例が存在することが明らかとなった。従来の臨床試験における EGFR 陰性肺癌に対する EGFR-TKI の臨床試験の結果の解釈には、偽陰性症例が含まれている可能性があり、検体の種類や遺伝子変異検査方法を踏まえての解釈が必要であると思われる。また、適切な分子標的薬剤を患者に届ける上でも、適切な検体の採取、処理、検査を考える必要があると思

われる。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

## 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. 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.
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. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:123-132.
5. Yoshioka H, Hotta K, Kiura K, Takigawa N, Hayashi H, Harita S, et al. A phase II trial of erlotinib monotherapy in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer who do not possess active EGFR mutations: Okayama Lung Cancer Study Group trial 0705. *J Thorac Oncol.* 2010;5:99-104.
6. Ishii Y, Maemondo M, Okudera K, Takamura K, Demura Y, Kobayashi K, et al. A phase II study of erlotinib monotherapy in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) without EGFR gene mutation who have never/light smoking history: NEJ006/TCOG0903. *J Clin Oncol.* 2012;30(Suppl): abstr 7561.
7. Sutani A, Nagai Y, Udagawa K, Uchida Y, Koyama N, Murayama Y, et al. Gefitinib for non-small-cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor gene mutations screened by peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Br J Cancer.* 2006;95:1483-1489.
8. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361:947-957.
9. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong SS, Sriuranpong V, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol.* 2011;29:2866-2874.