

CASE REPORT

当初 EGFR 遺伝子変異陰性であったが、遺伝子パネル検査で uncommon mutation が検出されアファチニブが奏効した 非小細胞肺癌の 1 例

遠藤 駿¹・三ツ村隆弘¹・石塚聖洋¹・本多隆行¹・
榊原里江¹・池田貞勝²・宮崎泰成¹

A Case Report of a Non-small-cell Lung Cancer Patient Who Was EGFR-negative on a Conventional Test but Was Discovered to Have an EGFR Uncommon Mutation on Comprehensive Genomic Profiling and Responded to Afatinib

Shun Endo¹; Takahiro Mitsumura¹; Masahiro Ishizuka¹; Takayuki Honda¹;
Rie Sakakibara¹; Sadakatsu Ikeda²; Yasunari Miyazaki¹

¹Department of Respiratory Medicine, ²Department of Precision Cancer Medicine, Center for Innovative Cancer Treatment, Tokyo Medical and Dental University, Japan.

ABSTRACT — **Background.** The increasing availability of tumor profiling tests using next generation sequencing (NGS) may improve access to precision cancer medicine. We herein report a case of non-small-cell lung cancer (NSCLC) with EGFR uncommon mutations. The mutations were not detected by the initial PNA LNA PCR-Clamp method but were able to be detected by NGS-based tumor profiling tests using either tumor tissue or blood. **Case.** A 70-year-old woman with pathologic Stage IIIA lung adenocarcinoma had recurrence 1 year after left upper lobectomy. Sequencing of surgical specimens using the PNA LNA PCR-Clamp method showed the EGFR gene to be wild type. A total of 11 types of conventional chemotherapies and immunotherapies were administered during the next 7 years, but all eventually failed. To identify potentially actionable genetic mutations, NGS-based tumor profiling using both blood and surgical specimens was performed. EGFR G719D and E709A were detected, and the mutations were confirmed by re-sequencing using an updated version of the PNA LNA PCR-Clamp method. Afatinib treatment led to tumor regression. **Conclusion.** The availability of targeted EGFR mutation tests has expanded. This case suggests the possibility of missed opportunity on appropriate screening such as EGFR uncommon mutations.

(JJLC. 2020;60:429-433)

KEY WORDS — EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer, EGFR uncommon mutation, Tumor profiling test, PNA LNA PCR-Clamp method, Afatinib

Corresponding author: Takahiro Mitsumura.

Received May 22, 2020; accepted July 20, 2020.

要旨 — **背景.** 次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の登場により、がんゲノム診療が広がっている。今回、従来の EGFR 遺伝子変異検査では変異陰性とされていたが、遺伝子パネル検査による再検索で uncommon mutation の存在が判明した症例を経験した。**症例.** 70 歳女性。肺腺癌 pStage IIIA、左上葉切除後 1 年で肺内

転移により再発した。手術検体を用いた PNA LNA PCR-Clamp 法による EGFR 遺伝子変異検査では陰性と報告された。その後 7 年間にわたり、化学療法・免疫療法を行ったが、progressive disease となった。遺伝子パネル検査（血液および組織）を実施し、EGFR G719D および E709A が検出された。2018 年 11 月から PNA LNA PCR-

東京医科歯科大学¹呼吸器内科、²がん先端治療部がんゲノム診療科。

論文責任者：三ツ村隆弘。

受付日：2020 年 5 月 22 日、採択日：2020 年 7 月 20 日。

Clamp法の検索領域が拡大されたため、同法を再検査したところ遺伝子パネル検査と同様の変異が検出され、アフアチニブを開始し奏効を得た。結論、EGFR遺伝子変異検査の過渡期に変異陰性と診断された非小細胞肺癌症例の中には、治療効果が期待できる uncommon mutation

をもつ症例が混在している可能性がある。

索引用語——EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌, EGFR uncommon mutation, がん遺伝子パネル検査, PNA LNA PCR-Clamp 法, アフアチニブ

はじめに

現在、次世代シーケンサー (next generation sequencing; NGS) を用いた遺伝子パネル検査の登場により、がんゲノム解析とその結果に基づくがんゲノム診療が急速に広まっている。^{1,2} また、EGFRをはじめとしたドライバー遺伝子異常を調べる検査法も、ゲノム解析技術ならびにチロシンキナーゼ阻害薬 (tyrosine kinase inhibitor; TKI) の開発とともに検査精度の向上と変遷を遂げてきた。^{3,4}

我々は、当初EGFR遺伝子変異陰性と診断されていたが、遺伝子パネル検査によりEGFR uncommon mutationが同定された症例を経験した。本症例の経過は、EGFR遺伝子変異検査の変遷とともに考察することで理解が可能となる教訓的な症例と考えて報告する。

症例

症例：70歳、女性。

既往歴：肺動脈血栓塞栓症 (68歳)、甲状腺機能低下症、副腎機能低下症 (69歳)。

喫煙歴：なし。

家族歴：特記すべき事項なし。

現病歴：X-8年に胸部異常陰影で近医を受診し、胸部CTで左肺S¹⁺²に30mm大の結節影を指摘された。当院呼吸器外科で胸腔鏡下左上葉切除と2群リンパ節郭清を施行され、術後診断は肺腺癌 pT2aN2M0 Stage IIIAであった。シスプラチン+ビノレルビンによる術後化学療法を4コース行った。しかしX-7年に肺内転移で再発し (Figure 1A)、PNA LNA PCR-Clamp法で行った手術検体のEGFR遺伝子変異検査は、この時点では陰性の報告であった。同月から薬物療法として、シスプラチン (2コース目からカルボプラチンに変更)+ペメトレキセド4コース、ペメトレキセド維持療法2コース、X-6年3月からカルボプラチン+パクリタキセル6コースを投与し、progressive diseaseとなった。X-5年には当時EGFR陰性例でも使用されることのあったエルロチニブを開始し、stable diseaseを得たが (Figure 1B)、Grade 3の皮疹のため1年2ヶ月で中止した。

その後、ドセタキセル、ニボルマブ (副腎機能低下症、

甲状腺機能低下症を発症)、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤、ナブパクリタキセル、ゲムシタピン、アムルピシン、アテゾリズマブを投与した後、progressive diseaseとなった。その他の遺伝子検査についても、ALK/ROS1融合遺伝子およびBRAF遺伝子変異は陰性であった。標準治療が終了していると考え、治療標的遺伝子の探索を目的に遺伝子パネル検査を行った。

現症：Eastern Cooperative Oncology Group performance status (PS) 1, 身長150cm, 体重62.5kg, BMI 27.7 kg/m², 左鎖骨上リンパ節を触知する、呼吸音に異常なし。

胸部単純X線：両肺の多発結節影を認める。

胸部CT：両肺に多発結節影・粒状影を認め、縦隔・両側肺門部リンパ節腫大を認める (Figure 1C)。

臨床経過：腫瘍組織の再生検を検討したが、肺病変から安全に十分量の組織を採取できる病変がなかった。そのため、本院における臨床研究 (G2017-002) に参加し、血液によるリキッドバイオプシーならびに手術検体を用いて、それぞれGuardant360[®]ならびにFoundationOne[®] CDxによる遺伝子パネル検査を行った。リキッドバイオプシーではEGFRエクソン18番上のG719DならびにE709Aをはじめ、Table 1に示す遺伝子異常が検出された。そのうち、変異アレル頻度 (同一の遺伝子座にありながら塩基配列が異なる変異体である対立遺伝子が一定の集団内に存在する頻度, variant allele fraction) の高かった、EGFR G719DならびにE709A、TP53 R282Wは手術検体からも同様に検出された (Table 1)。X-7年に施行したPNA LNA PCR-Clamp法ではEGFR遺伝子変異が陰性と報告されたが、今回の遺伝子パネル検査では変異陽性の報告であった。この原因を調べると、2018年11月からPNA LNA PCR-Clamp法 (LSIメディエンス社) で探索できる uncommon mutation が追加されており、今回遺伝子パネルで変異を認めた箇所については2018年11月以前に行われた検査で探索されていないことが判明した (Table 2)。手術検体を用いて再度現行のPNA LNA PCR-Clamp法で解析したところ、EGFR G719DとE709Aが検出された。

免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint in-

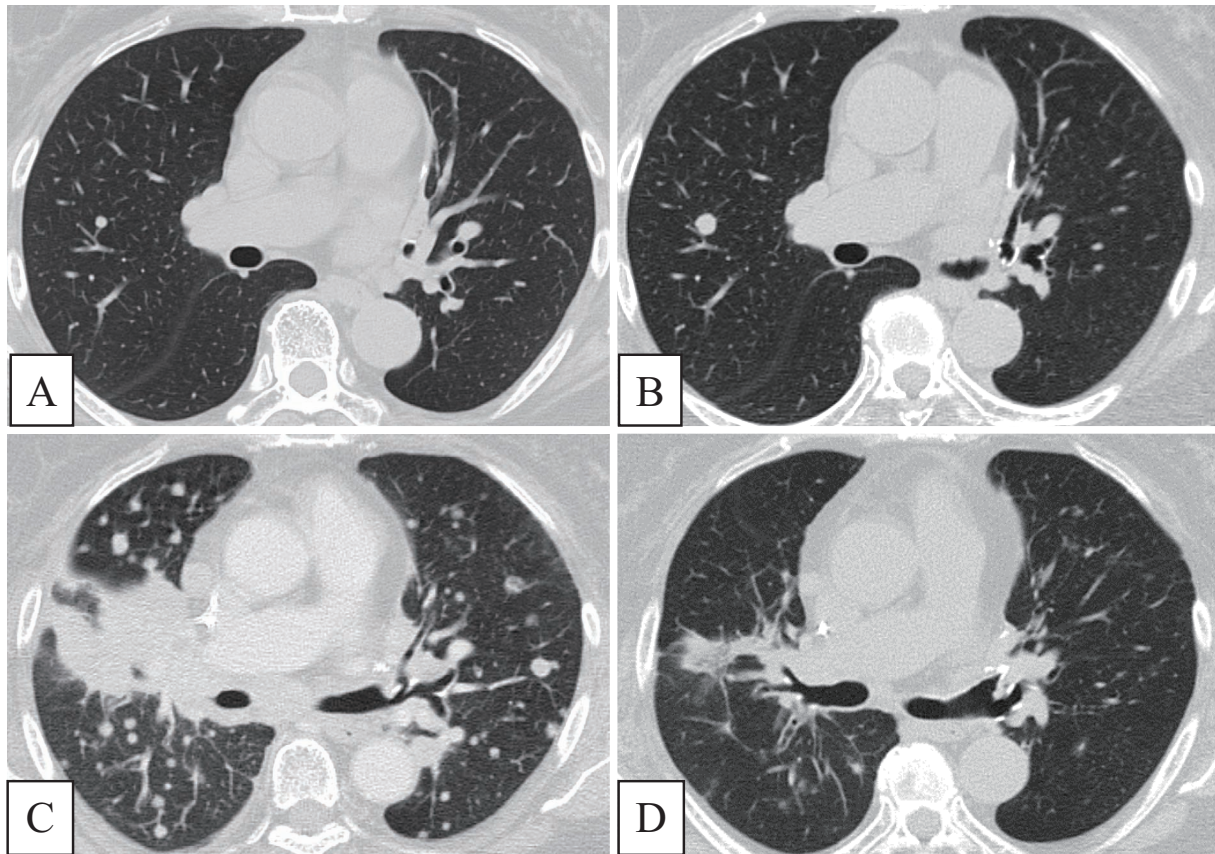


Figure 1. The sequential images of the patient. (A) Chest computed tomography (CT) at the time of recurrence shows a small nodule in the right upper lobe. (B) CT at 12 months after the initiation of erlotinib (3rd line) shows a small nodule growing in the right upper lobe. (C) CT just before genomic profiling shows metastases in both lungs. (D) CT of the patient after 6 weeks of afatinib administration shows a therapeutic response.

Table 1. Tumor Profiling Test Findings

FoundationOne® CDx (Surgical specimen)	Guardant360® (Blood)	
• EGFR G719D	• EGFR G719D	1.9%*
• EGFR E709A	• EGFR E709A	1.6%
• TP53 R282W	• CTNNB1 G34E	0.7%
• ERBB2 K682N	• TP53 R282W	1.5%
	• ERBB2 A622T (VUS)	0.3%

*the variant allele fraction (% cell-free DNA).

hibitor ; ICI) の投与後ではあったものの、病状の進行が早く、リスクを説明した上でアファチニブを選択した。X年3月から以前に認めた副作用である皮疹の忍容性を考慮し、アファチニブ 20 mg/日と減量して投与を開始した。投与後速やかに胸部 X 線で両肺の多発結節は縮小し、胸部 CT で著明な肺転移の縮小を認めた (Figure 1D)。Grade 2 の皮疹が出現したが、外用薬やミノサイクリン塩酸塩の内服で自製内となり、アファチニブ開始 12 ヶ月後の現在も治療継続中である。

考 察

非小細胞肺癌に多いドライバー遺伝子である EGFR 遺伝子変異のうち、85~90% はエクソン 19 番上の欠失変異あるいはエクソン 21 番上の点変異 (L858R) であり、^{5,6} それ以外の変異は uncommon mutation と称される。この uncommon mutation に対する EGFR-TKI の効果は、common mutation よりもやや劣るとされる。⁷ 肺癌診療ガイドライン 2019 年版においては uncommon mutation に対して、ゲフィチニブ、エルロチニブあるいはアファチニブのいずれかを用いた治療が推奨されているが、薬剤の優劣については結論付けられていない。⁸ Kohsaka らは、これまでゲノム解析で報告された EGFR 遺伝子上の変異を細胞株に導入して、EGFR-TKI による薬剤感受性試験を行い、エクソン 18 番上の G719X や E709A の点変異において、アファチニブが高い感受性を示すことを報告している。⁹ これを裏付けるかのように、LUX-Lung 2, 3, 6 試験の統合解析から、T790M とエクソン 20 上の挿入変異以外の uncommon mutation 症例

Table 2. The Targeting Gene Regions of EGFR in Companion Diagnostics as of March 2020

	PNA LNA PCR-Clamp		Cobas®	therascreen®	Oncomine Dx Target Test®	
	Until October 2018	From November 2018				
Exon18	G719A	G719A	G719A	G719A	G719A	R108G
	G719C	G719C	G719C	G719C	G719C	R108K
	G719S	G719S	G719S	G719S	G719S	A289T
		G719D*			G719D	A289D
		G719R			E709A	A289V
		E709A*			E709G	S492R
		E709K			E709K	G598V
		S720F			E709V	G598A
Exon19	Deletions	Deletions	Deletions	Deletions	Deletions	
Exon20	T790M	T790M	T790M	T790M	T790M	
			S768I	S768I	S768I	
			Insertions	Insertions		
Exon21	L858R	L858R	L858R	L858R	L858R	
	L861Q	L861Q	L861Q	L861Q	L861Q	
		L861R			L861R	
		L858M			L858M	
		T854A				
		K860I				

*EGFR G719D and E709A were detected on a re-examination of the PNA LNA PCR-Clamp method in this case.

に対して、アファチニブは71.1%の奏効率が示された。¹⁰ とくにエクソン18番上のG719Xに対する治療効果については、第一世代EGFR-TKIの奏効率32%に対し、アファチニブの奏効率は78%であった。^{6,10} 本症例ではこれらを踏まえてアファチニブを導入した結果、副作用の懸念から減量したにもかかわらず、良好な治療効果が得られた。

本邦におけるEGFR遺伝子変異検査は、EGFR-TKIの新規開発と同期するように変遷を遂げてきた。2007年からは薬事承認検査法 (laboratory developed test ; LDT相当法) が登場し、2012年以降は体外診断用医薬品 (in vitro diagnostics ; IVD法) が承認され、2016年からはIVD法がコンパニオン診断薬として使用されるようになった。PNA LNA PCR-Clamp法はLDT法、therascreen® EGFR変異検出キットおよびコバス® EGFR変異検出キットはIVD法に含まれる。⁴ また、2019年からはNGSによるコンパニオン診断薬の利用が始まった。¹¹ 上述のように保険診療上の検査法の位置付けが変遷するだけでなく、これらの検査は検索可能な変異領域を拡大させており、そのことが本症例で見られた逆説的な検査結果の原因であった。具体的にはEGFR uncommon mutationの薬剤感受性の理解の深まりに伴い、2018年11月からPNA LNA PCR-Clamp法の検索対象範囲が拡大した一方で、2020年3月現在でIVD法の

コバス® EGFR変異検出キット、therascreen® EGFR変異検出キットの検索対象変異には、EGFRエクソン18番上のG719DやE709Aは含まれていない (Table 2)。PNA LNA PCR-Clamp法の過渡期にEGFR遺伝子変異検査を行った症例や、IVD法をコンパニオン診断薬として使用していた症例については、本症例のようにEGFR遺伝子陰性と報告されている可能性がある。LUX-Lung 2, 3, 6試験の統合解析では、uncommon mutation保有者は、女性が57~62%、非喫煙者が57~65%と多い傾向にあり、¹⁰ 女性、非喫煙者などの臨床的背景をもつ場合、より詳細な遺伝子検索を検討する価値があると考えられる。

Guardant360®による血液のリキッドバイオプシーと組織検体でのNGSによる解析において、EGFR、ALK、ROS1およびBRAFの異常の一致率は98.2%と報告されている。¹² 本症例では再生検は行わなかったものの、エルロチニブを含めた治療後のリキッドバイオプシーの結果は、薬物治療前の手術検体の遺伝子変異と共通していたことが判明した。加えて、リキッドバイオプシーでEGFR T790Mなどの耐性遺伝子の検出がなかったことを参考に手術検体でのPNA LNA PCR-Clamp法の再検査を行い、その結果を踏まえた上でアファチニブを選択した。一方、ICI投与後のEGFR-TKI投与では有害事象の増加する可能性が示唆されており、¹³ ICIを含めた

様々な治療後にゲノム解析により遺伝子変異が検出され、EGFR-TKIを導入するには十分な注意が必要である。

本症例は当初EGFR遺伝子変異陰性と診断され、7年の経過を経て、遺伝子パネル検査によりEGFR uncommon mutationの存在が判明した。EGFR遺伝子変異検査の改定の過渡期に検査を施行された症例については、検査結果の解釈のために検索対象を十分に理解することが重要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：宮崎泰成 [日当・講演料] 日本ベーリンガーインゲルハイム

REFERENCES

1. Jameson JL, Longo DL. Precision medicine—personalized, problematic, and promising. *N Engl J Med*. 2015;372:2229-2234.
2. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*. 2017;23:703-713.
3. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2018;13:323-358.
4. 日本肺癌学会バイオマーカー委員会. 肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き (第4.2版). 2019.
5. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM, Nanni-Metellus I, Lacave R, Lacroix L, et al. Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Ann Oncol*. 2014;25:126-131.
6. Kobayashi Y, Mitsudomi T. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci*. 2016;107:1179-1186.
7. Wu JY, Yu CJ, Chang YC, Yang CH, Shih JY, Yang PC. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on “uncommon” epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17:3812-3821.
8. 日本肺癌学会, 編集. 肺癌診療ガイドライン 2019年版. 金原出版; 2019.
9. Kohsaka S, Nagano M, Ueno T, Suehara Y, Hayashi T, Shimada N, et al. A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaan6566.
10. Yang JC, Sequist LV, Geater SL, Tsai CM, Mok TS, Schuler M, et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol*. 2015;16:830-838.
11. 日本肺癌学会バイオマーカー委員会. 肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の手引き (第1.1版). 2019.
12. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, Daniel DB, Divers SG, Reckamp KL, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25:4691-4700.
13. Schoenfeld AJ, Arbour KC, Rizvi H, Iqbal AN, Gadgil SM, Girshman J, et al. Severe immune-related adverse events are common with sequential PD-(L)1 blockade and osimertinib. *Ann Oncol*. 2019;30:839-844.