

学位授与番号：乙 3 1 6 2 号

氏 名：関 好孝

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 10 月 12 日

学位論文名：

**Picoliter-Droplet Digital Polymerase Chain Reaction-Based Analysis of Cell-Free Plasma DNA to Assess EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma That Confer Resistance to Tyrosine-Kinase Inhibitors**

学位論文名（翻訳）：

（Picoliter-Droplet Digital PCR 法を用いた肺腺がん患者の血漿中細胞外 DNA を用いた EGFR-TKI 耐性の解析）

学位審査委員長：教授 森川利昭教授

学位審査委員：教授 馬目佳信教授 教授 相羽恵介教授

# 論文要旨

論文提出者名	関 好孝	指導教授名	桑野和善
主論文			
<p>Picoliter-Droplet Digital Polymerase Chain Reaction-Based Analysis of Cell-Free Plasma DNA to Assess EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma That Confer Resistance to Tyrosine-Kinase Inhibitors</p> <p>(Picoliter-Droplet Digital PCR 法を用いた肺腺がん患者の血漿中細胞外 DNA を用いた EGFR-TKI 耐性の解析)</p> <p>Yoshitaka Seki, Yutaka Fujiwara, Takashi Kohno, Erina Takai, Kuniko Sunami, Yasushi Goto, Hidehito Horinouchi, Shintaro Kanda, Hiroshi Nokihara, Shun-ichi Watanabe, Hitoshi Ichikawa, Noboru Yamamoto, Kazuyoshi Kuwano, Yuichiro Ohe. <i>The Oncologist</i>. 21:156–164, 2016</p>			
<p>【背景】EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)領域の遺伝子変異の解析は非小細胞肺がん (non-small cell lung cancer : NSCLC) の治療方針の決定に重要だが、低侵襲での判定方法が望まれている。血漿中 cell-free (cf) DNA を用いた遺伝子変異の検出は低侵襲であるため、簡便かつ高精度の手法である picoliter-droplet digital PCR(picoliter-ddPCR)法を用いて NSCLC 患者の EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor : TKI) 治療前後の血漿中 EGFR 遺伝子変異を定量する前向き研究を実施した。</p>			
<p>【方法】進行/再発 NSCLC 患者で EGFR-TKI 感受性 EGFR 遺伝子変異 (exon19 欠失または exon21 の L858R 変異) が検出されている患者において、EGFR-TKI による治療前または後の血漿から cfDNA を抽出し、picoliter-ddPCR で EGFR 変異アレル(exon19 欠失または exon21 の L858R 変異および exon20 T790M 耐性変異)を定量した。</p>			
<p>【結果】EGFR-TKI 耐性患者 16 人 (うち 5 人からは治療前も採取) と EGFR-TKI 治療開始前の患者 19 人から、合計 40 の血漿サンプルを収集し cfDNA を抽出した。EGFR-TKI 治療前の cfDNA からは 24 人中 9 人 (38%) で、EGFR-TKI 耐性時の 16 人中 15 人で TKI 感受性変異が検出された。耐性症例のうち 7 例 (44%) は T790M が陽性であった。10 人の TKI 耐性患者は耐性獲得時に再生検を受けており、うち 8 人で再生検組織と cfDNA の T790M status は一致した。T790M 陽性例では、T790M 変異 cfDNA 量と TKI 感受性変異 cfDNA 量の比率は様々であった (7.4-96.6%)。1 例の患者は EGFR-TKI 治療に反応せず、急激な病勢の増悪が認められ治療が中止された。この患者では次世代シーケンサーを用いた cfDNA の網羅的な耐性機序解析を実施し、希少変異である L747P 変異が検出されたため、標準的な感受性変異に比し治療効果が低かったことが判明した。</p>			
<p>【結語】picoliter-ddPCR による cfDNA 検査は、EGFR-TKI 治療中の T790M 陽性がんの趨勢を非侵襲的かつ迅速に評価でき、臨床応用が期待できると考えられる。</p>			

## 学位審査の結果の要旨

関 好孝氏の学位請求論文は、和文名「Picoliter-Droplet Digital PCR 法を用いた肺腺がん患者の血漿中細胞外 DNA を用いた EGFR-TKI 耐性の解析」と題したものである。原文は、The Oncologist 2016 年 21 号に掲載され、英文名“Picoliter-Droplet Digital Polymerase Chain Reaction-Based Analysis of Cell-Free Plasma DNA to Assess EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma That Confer Resistance to Tyrosine-Kinase Inhibitors ”である。同誌の 2015 年の Impact Factor 2.01 である。指導教授は桑野和善教授である。

公開学位審査は平成 27 年 9 月 7 日、審査委員長森川利昭、審査委員 馬目佳信教授、相羽恵介教授により、桑野教授ご臨席の下行われた。

関氏の研究内容発表に続いて質疑応答が行われ、以下の通り多くの質問が出された。

- DNA 抽出に用いた機材とその手法はどのようなものか？
- 使用した DNA 量と患者ごとのばらつきはどれくらいか？
- 検定に標準偏差ではなく標準誤差を用いた理由は何か？
- 腫瘍部位によって EGFR 変異のない部分がないか？
- 感受性変異と TKI 耐性変異の比率の算出方法はどのようなものか？
- 治療耐性化の判定基準はどのようなものか？
- 早期検出について腫瘍マーカーと比較して相関はあるか？
- 治療中の cfDNA 解析の結果の変動についてどのように考えるか？
- T790M 偽陰性の場合の結果の生物学的意義はどうか？
- T790M 以外の変異の検出は可能か？
- 本実験系の長所と短所は何か？
- 本実験系の臨床応用は可能か？
- さらに有用性の高い解析にするためにはどのような改良が必要か？

関氏はこれらの質問に対し、自身の成績や文献データに基づいて明解かつ的確に回答を行った。学位審査委員会は慎重審議の結果、本論文は Picoliter-Droplet Digital PCR 法を肺腺がん患者の血液に応用し、EGFR-TKI 耐性を低侵襲で解析できる方法の有用性を示したことから、学位論文として十分価値あるものと認めた次第である。