

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	医学研究科呼吸器内科学講座 氏名 馬場啓介
(論文題目) Simultaneous Detection of the T790M and L858R Mutations in the EGFR Gene by Oligoribonucleotide Interference-PCR. (※2 オリゴリボヌクレオチド干渉 PCR による EGFR 遺伝子の T790M 変異と L858R 変異の同時検出)	
(内容の要旨) 背景： チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) をはじめとする分子標的薬は、癌などの難治性疾患の治療において頻繁に使用されている[1、2]。 Thr790Met (T790M)、Leu858Arg (L858R)、エクソン 19 欠失 (Ex19 Del) など、EGFR 遺伝子領域のいくつかのアミノ酸変異が肺癌で同定されている[3]。L858R 変異および Ex19 Del は、すべての EGFR 遺伝子変異の 90%を占める[4、5]。T790M 変異は通常、第一世代 (ゲフィチニブおよびエルロチニブ) および第二世代 EGFR-TKI (アファチニブおよびダコミチニブ) による臨床治療中の選択圧によって引き起こされる獲得変異として認められる[6、7]。EGFR 遺伝子変異の種類は EGFR-TKI による治療方針を決定するため、肺癌細胞におけるこれらのアミノ酸変異に対応する EGFR 遺伝子変異を特定することが重要である。したがって、このような EGFR 遺伝子変異を検出するための簡単で正確な方法が不可欠であろう。 ゲノム DNA (gDNA) の変異を検出するために、サンガーシーケンス解析は信頼できる手法だが、時間がかかり、感度は低くなる。次世代シーケンシング (NGS) は、突然変異を特定するためのより包括的で偏りの少ない方法である。しかし、NGS ははるかに高価であり、既知の遺伝子変異の簡便な同定のためには過剰な技術であろう。PCR は、臨床的に既知の変異を検出するために最も広く使用される方法である[8]。たとえば、ペプチド核酸 (PNA) やロックド核酸 (LNA) などの人工核酸を使用したブロッキング PCR (PNA-LNA クランプ PCR と呼ばれる) は、曖昧な増幅を回避し、一塩基変異を正確に検出する[9、10]。ただし、PNA および LNA の化学合成は高額であり、診断コストが増大することにもなる。 過去に藤井研究室では、オリゴリボヌクレオチド (ORN) をブロッカーとして使用して PCR における増幅をブロックできることを実証した。ORN を用いたブロッキング PCR の技術を ORN 干渉 PCR (ORNi-PCR) と呼ぶ[11]。ORN の化学合成は安価であるため PNA または LNA より優れたブロッカーでありうる。さらに、ORNi-PCR は一塩基変異を野生型の配列から高精度に区別できることも実証されている[12、13]。したがって、ORNi-PCR は、臨床における簡便な一塩基変異の検出に役立つ可能性があると言える。ただし、ORNi-PCR が、1つのチューブ内の反応で、複数の一塩基変異を同時にかつ高感度に検出できるかどうかは明らかになっていない。	
方法： 今回我々は、ORNi-PCR を用いて、肺癌細胞の EGFR 遺伝子の de novo の L858R 変異と獲得耐性としての T790M 変異に対応する 2つの一塩基変異の同時検出を行った。ゲノム DNA (gDNA) および相補的 DNA (cDNA) を肺癌細胞株 (例えば NCI-H1975)	

から抽出し、希釈し、ORNi-PCR に使用した。

結果：

まず、肺癌細胞から抽出された gDNA から 2 つの遺伝子変異を同時に検出する ORNi-PCR の最適な実験条件を確立した。確立された条件は、抽出された RNA から逆転写された cDNA を用いた ORNi-PCR にも適用可能だった。さらに、ORNi-PCR は、野生型配列を含む多数の細胞と 2 つの変異を有する肺癌細胞を混合した際に、肺癌細胞数が全細胞数のわずか 0.2% の場合でも、同様に変異を検出できることを実証した。

結論：

ORNi-PCR は、臨床検査において L858R 変異と T790M 変異を同時に検出するための有用な方法であることが証明された。ORNi-PCR の感度は、PNA-LNA クランプ PCR 法の感度に匹敵する。さらに、ORNi-PCR の費用は、PNA-LNA クランプ PCR の費用の 10 分の 1 未満である。今回確立された方法が患者の臨床検体に適用可能であることを示すことは重要であり、そのための研究が進行中である。

なお、本論文は Baba, K., et al. (2019) *Int. J. Mol. Sci.* 20, E4020. として掲載された。

参考文献：

1. Lee Y.T. et al., *Eur J Pharmacol* **2018**, *834*, 188-196, doi:10.1016/j.ejphar.2018.07.034.
2. Krause D.S. et al., *N Engl J Med* **2005**, *353*, 172-187, doi:10.1056/NEJMr044389.
3. Shi Y. et al., *J Thorac Oncol* **2014**, *9*, 154-162, doi:10.1097/jto.0000000000000033.
4. Kobayashi Y. et al., *Cancer Sci* **2016**, *107*, 1179-1186, doi:10.1111/cas.12996.
5. Beau-Faller M. et al., *Ann Oncol* **2014**, *25*, 126-131, doi:10.1093/annonc/mdt418.
6. Oxnard G.R., *Nat Med* **2016**, *22*, 232-234, doi:10.1038/nm.4058.
7. Pao W. et al., *PLoS Med* **2005**, *2*, e73, doi:10.1371/journal.pmed.0020073.
8. Pytela R., *Methods Enzymol* **1994**, *245*, 420-451.
9. Dominguez, P.L., *Oncogene* **2005**, *24*, 6830-6834, doi:10.1038/sj.onc.1208832.
10. Nagai, Y., *Cancer Res* **2005**, *65*, 7276-7282, doi:10.1158/0008-5472.can-05-0331.
11. Tanigawa N. et al., *PLoS One* **2014**, *9*, e113345, doi:10.1371/journal.pone.0113345.
12. Fujita T. et al., *DNA Res* **2018**, *25*, 395-407, doi:10.1093/dnares/dsy012.
13. Fujita T., *Sci Rep* **2018**, *8*, 17195, doi:10.1038/s41598-018-35479-0.