図 1　ゲフィチニブの臨床試験より得られた腫瘍組織 EGFR 中のエクソン 19 の欠損（E746-A750）
EGFR-TK 領域全体（エクソン 18-24）の配列を決定し Mutation Surveyor™ ソフトウェアを用いて解析

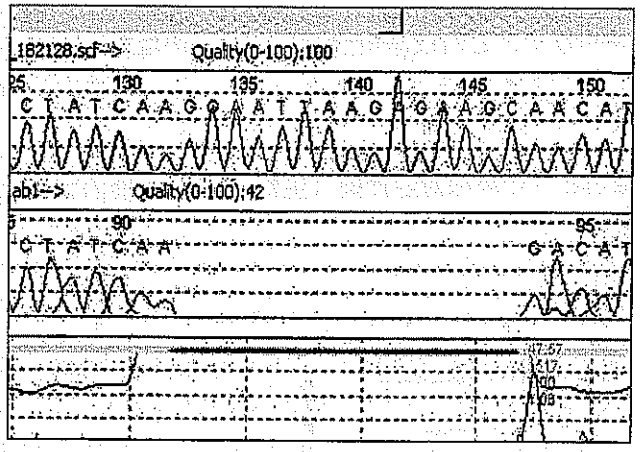
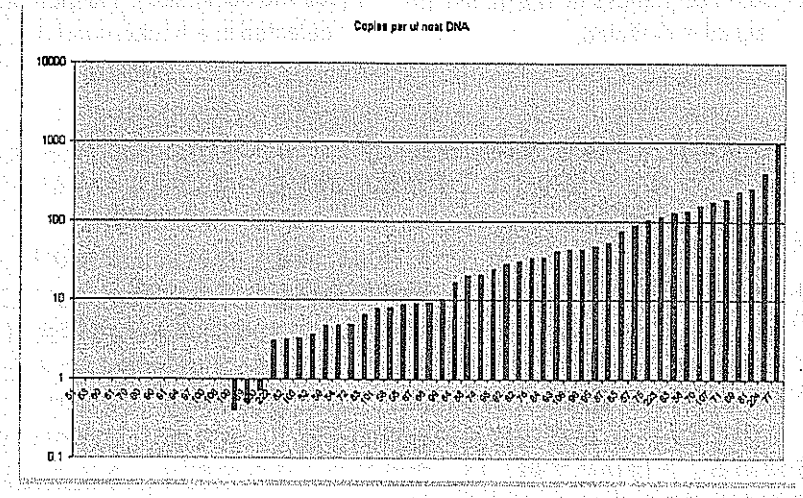


図 2　試験 709 で得られた一番目の組織サンプルロットにおける腫瘍組織から得られた DNA の定量化。解析に使用可能な DNA のコピー数は機能アッセイにより測定。
異なったパターンから広範な範囲の DNA コピーが得られた。腫瘍中に検出可能な DNA の量が少ないこれらのサンプル（このロットの 29%に相当）は、特に偽陰性の結果を導きやすい。

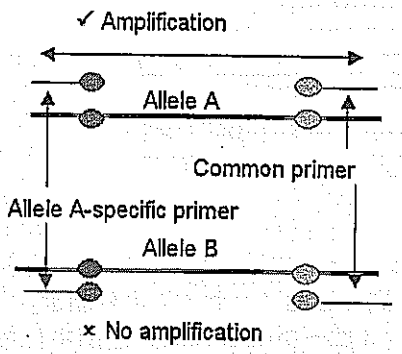


この方法の短所としては、下記があげられる。

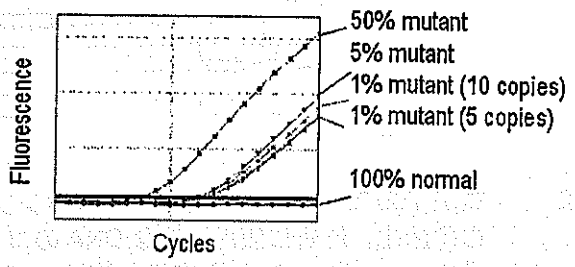
- 相対的に時間がかかり、サンプル受領から結果が出るまでに 4～6 週間を要する。
- 現在民間の検査施設には通常装備されていない専用機器やソフトウェア、さらに専門知識が必要。
- この方法の技術的感度には限界がある。異なった細胞株を混合した実験では、野生型細胞株に対し、変異のある細胞株の割合が 1/10 の場合まで確実に検出できたが、それより低い場合は検出できなかった。

これらの短所に対応するため、現在アストラゼネカ社では英国 DxS 社製の Amplificaiton Refractory Mutation System (ARMS)[3] 等の方法を検討している。この方法では試薬製造業者が供給する標準試薬が使用され、また結果は数値表示（図 3参照）で得られるため専門的技能を必要とする度合いが低い。またこの方法は配列決定法よりもスピードが速く、腫瘍組織中に含まれる変異の割合が小さい場合でも検出可能であると思われる。さらに、この方法ではサンプル中の変異型と野生型の定量化が可能で、これは結果が陰性の場合の解釈に有用である。この方法の唯一の欠点は新規の変異の検出が出来ないことである。今後、この方法が現行のアッセイ法に替わる方法にできるかどうか検討を進めている。

図 3　ARMS の原理と、変異株対野性型（正常）DNA の検出を示すアウトプットの例



The principle of ARMS. If sequences match, a signal is detected. If sequences do not match, no signal is detected.



Example of a K-ras ARMS/TaqMan™ assay (cell line admixture). 1% mutant DNA can be detected in a background of normal DNA.

ISEL 試験における患者の EGFR 変異に関するデータは大半が 5 月に得られる予定である。また、今後 EGFR 変異アッセイを進める上での制限要因や妥当性に関する情報が得られると思われる。

非小細胞肺癌組織におけるチロシンキナーゼ領域に関連した遺伝子変異の数と種類は増えつづけている。Lynch ら[1]の最初の公表文献では、明確な変異として 7 変異（エクソン 19 と 21 の欠損と置換）が報告された。それより約 1 カ月後に開催された米国臨床腫瘍学会（ASCO：American Society of Clinical Oncology）で種々の研究者グループが発表したデータによると、エクソン 18 から 24 を含む少なくとも 31 の明確な変異が確認されたことが示唆されており、この数は今も増えつづけている。このことから、治療法の選択を目的として、具体的にどの変異をスクリーニングすればよいかを決めることは極めて難しい。またこのような状況は、今後数カ月のうちにさらに急速に進展するものと考えられる。

腫瘍組織の EGFR 変異検出は現在まだ進化途上であり、色々な研究グループによりそれぞれ長所も短所も持つ、異なった技術が使用されている。アストラゼネカ社は、上記の 6 段階 DNA 配

[3] K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. Clayton SJ, Scott FM, Walker J, Callaghan K, Haque K, Liloglou T, Xinarianos G, Shawcross S, Ceuppens P, Field JK, Fox JC. Clin Chem. 2000 Dec;46(12):1929-38.

列決定法が現在使用可能な方法のなかでは最も厳密な方法であると考えるが、ただこの方法は日本の施設も含め民間の検査施設でまだ一般的に採用されていない。現在アストラゼネカ社は学会や業界のパートナー（たとえば三菱化学安全科学研究所など）と協力し、日本の肺癌治療医や患者がこのような解析によるデータが得られるようにするため努力している。

遺伝子変異検出の技術的側面を考慮すると、EGFR 検出結果に偽陽性や偽陰性の内容が含まれるが、問題はこの偽陽性で、偽陽性は腫瘍 DNA 内で PCR 反応のプライミングミスにより発生する。これは DNA 量が少ない場合や DNA が分解していた場合に起こりやすい。そのため ISEL 試験では、腫瘍 DNA から得られた独立した PCR 産物 3 つのうち少なくともひとつを順方向及び逆方向に遺伝子配列を決定し、それにより EGFR 遺伝子に変異が検出された時は、当該患者は遺伝子変異陽性であるとみなす。陽性結果は腫瘍 DNA より得られた別の PCR 産物さらに使用することによりもうひとつ別の方法（例：ARMS 法）で確認する。

EGFR 変異検出における偽陰性結果はより一般的に発生すると考えられており、患者に変異があるにもかかわらずそれが検出できない場合、下記も含めさまざまな理由がある。

- 腫瘍組織の量が十分にない
- 腫瘍組織中に十分な DNA がないかまたは DNA がひどく劣化していて当該の EGFR エクソンが増幅できない
- 腫瘍組織中、変異の割合が非常に小さく（腫瘍中の遺伝的異質性のため[4]）、使用したスクリーニングシステムの検出限界以下である

ゲフィチニブで良好な抗腫瘍効果が得られたにもかかわらず見かけ上患者に EGFR 変異が認められない場合は、上記のような理由のいずれかが関与しているかも知れない。

さらにアストラゼネカ社では、同一の患者より採取された、異なる腫瘍サンプル間で遺伝的異質性が認められた症例をいくつか観察している。例えば、ある患者では、肺腫瘍生検で得られた組織には変異が含まれていたが、リンパ節腫瘍からの生検サンプルには変異は含まれていないように見えた。これは病勢の悪化を示した患者で EGFR 変異が検出される理由の説明となる可能性のある特に興味深い所見である。推測ではあるが、腫瘍の中では遺伝子は常に不安定であるため、肺腫瘍中の変異は病勢進行の原因となった転移癌の中では失われたのかも知れない。同一患者における同一の腫瘍内、及び異なった腫瘍間における遺伝子的異質性については、研究が継続中である。

以上のことから、遺伝子診断用の検査試薬・キットの開発を進めるに当たっては、遺伝子変異解析に適した生検組織サンプルの調達方法、簡便で、分析時間が短く、正確かつ検出感度が高い分析方法の確立、ゲフィチニブの効果を予測する真の EGFR 遺伝子変異の数と種類の同定、遺伝子変異が普遍的であるかどうかの確認が必要であり、これらの解決が必要であると考えられる。

---

[4] Ito S, Ohga T, Saeki H, Nakamura T, Watanabe M, Tanaka S, Kakeji Y, Maehara Y., p53 Mutation Profiling of Multiple Esophageal Carcinoma Using Laser Capture Microdissection to Demonstrate Field Carcinogenesis Int. J. Cancer: 113, 22–28 (2005)

（2）	生検によりすべての患者の EGFR 遺伝子の変異を検査することとした場合の技術的問題点について、手技及び検査手法の観点から施設や医師が限定される可能性があるかどうかについても含め、説明すること。

【回答】

現時点では研究レベルであり、可能な施設であれば手術時の切片、確定診断時の組織切片、気管支鏡による組織の採取、など様々な方法で腫瘍細胞を得ている。

検査は、まず腫瘍細胞を入手することから始まり、凍結組織標本もしくはホルマリン固定されたパラフィン包埋した腫瘍細胞を含んだ組織から、腫瘍組織を取りだす。この際、できる限り正常細胞を含まないように、腫瘍細胞を切り出すことが必要とされている。

その後、腫瘍細胞から DNA を抽出し、PCR 法で目的とするエクソン部分の EGFR 遺伝子を増幅するか、あるいは凍結組織からmRNA を抽出し、逆転写酵素を用い cDNA を合成し（reverse transcription）これを用いて PCR を行う（RT-PCR）し、EGFR 遺伝子を増幅し、ダイレクトシークエンス法により遺伝子配列を決定する。変異の有無を検出できる感度として、弊社の研究所で検討した結果では、この方法では、腫瘍の DNA のうち変異が 10%を超える場合、蛍光法を用いて EGFR 遺伝子の変異の有無を検出することができる。

普及に向けての問題点として、これら腫瘍組織検体調整、PCR による遺伝子の入手、DNA 配列の手技は研究室レベルでしか行われておらず、多くの労力と費用を必要とすることである。

今後、腫瘍組織が簡便に入手できるような技術の確立、DNA 抽出から配列の決定、変異の有無の判定の感度や自動化の可能性、さらには、例えば DNA チップなどの技術で変異を簡便に検出できることができるようになるか、このような技術的な課題を解決することが今後一般化していくためには必要になると考えられる。

この EGFR 遺伝子変異の解析には腫瘍のダイセクション、及び遺伝子配列解析の専門知識と装置が必要とされる。現在このような専門知識を持つのは、米国及び日本の少数の大学関連研究施設のみである。この検査法が広く使用されるようになるには、組織のダイセクションと配列解析技術が大幅に進歩し、手法が単純化され、解析時間が短縮されるのを待たなければならない。現在マサチューセッツ総合病院や Dana Faber Cancer Centres でも腫瘍サンプルの処理と配列確認に約 4 週間を必要としている。

以上のことから、生検によりすべての患者の EGFR 遺伝子変異を検査するには、検体入手の簡便化、検査方法の簡便化が必要であり、現行の手技を用いる場合は、実施可能な施設や医師が限定される可能性がある。