

非小細胞肺癌患者における T790M変異検索の単施設後方視的検討

渡瀬麻友子[†] 里見良輔 井本早穂子 山本康博 和田咲子
村上裕亮 飯尾美和 藤本和志 額賀重成 八木一馬
船津洋平 小山孝彦 加藤良一 小山田吉孝

IRYO Vol. 73 No. 6 (297-303) 2019

要旨

日本肺癌学会が定める肺癌診療ガイドラインでは、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)による1次治療後、耐性をきたしたIV期EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者のうち、T790M変異陽性例に対してはオシメルチニブ単剤治療を行うことが推奨されている。しかしながら、2nd biopsyの部位や採取方法は様々であり、T790M変異の陽性率はそれぞれで異なることが問題である。そこでわれわれは、EGFR-TKIによる1次治療後に2nd biopsyを実施された21例のEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者について後方視的に解析を行った。組織検査は18例、血漿検査は12例に実施された。組織検査で癌組織が検出できた場合のT790M変異の陽性率は46%であったが、血漿検査におけるT790M変異の陽性率は17%であった。組織検査全体の癌組織検出率は59%であったが、生検方法によって癌組織の検出率が大きく異なっていた。気管支鏡検査では検出率が31%と低い一方で、CTガイド下生検では83%、体腔液セルブロックでは100%と検出率が高く、適切な方法で癌組織にアプローチすることが重要であると考えられた。また、血漿検査におけるT790M変異の陽性率が低い理由として、当院では組織検査においてT790M変異が陰性の場合にのみ、血漿検査を施行しているためと考えられる。また、感受性変異の検出率が50%程度であり、癌細胞から放出される血漿遊離DNAが少なかつた可能性が示唆された。新規の胸腔外転移が出現した場合に、血漿検査での感受性変異が陽性となる傾向があり、血漿検査を実施する時期が重要と考えられる。

キーワード 非小細胞肺癌, EGFR遺伝子変異, T790M変異, EGFRチロシンキナーゼ阻害薬, オシメルチニブ

国立病院機構東京医療センター 呼吸器科 [†]医師

著者連絡先: 渡瀬麻友子 国立病院機構東京医療センター 呼吸器科 〒152-0021 東京都目黒区東が丘2-5-1

e-mail: mayukokoshibe@gmail.com

(2018年10月15日受付, 2019年2月8日受理)

A Single Institute Retrospective Analysis of the Testing for the EGFR-TKI Resistance Mutation T790M in Non-small Cell Lung Carcinoma Patients

Mayuko Watase, Ryosuke Satomi, Sahoko Imoto, Sakiko Wada, Yasuhiro Yamamoto, Hiroaki Murakami, Miwa Iio, Kazuyuki Fujimoto, Shigenari Nukaga, Kazuma Yagi, Yohei Funatsu, Takahiko Oyama, Ryoichi Kato and Yoshitaka Oyamada, NHO Tokyo Medical Center Respiratory medicine

(Received Oct. 15, 2018, Accepted Feb. 8, 2019)

Key Word: Non-small cell lung carcinoma(NSCLC), EGFR mutation, T790M, EGFR tyrosine kinase inhibitor, osimertinib

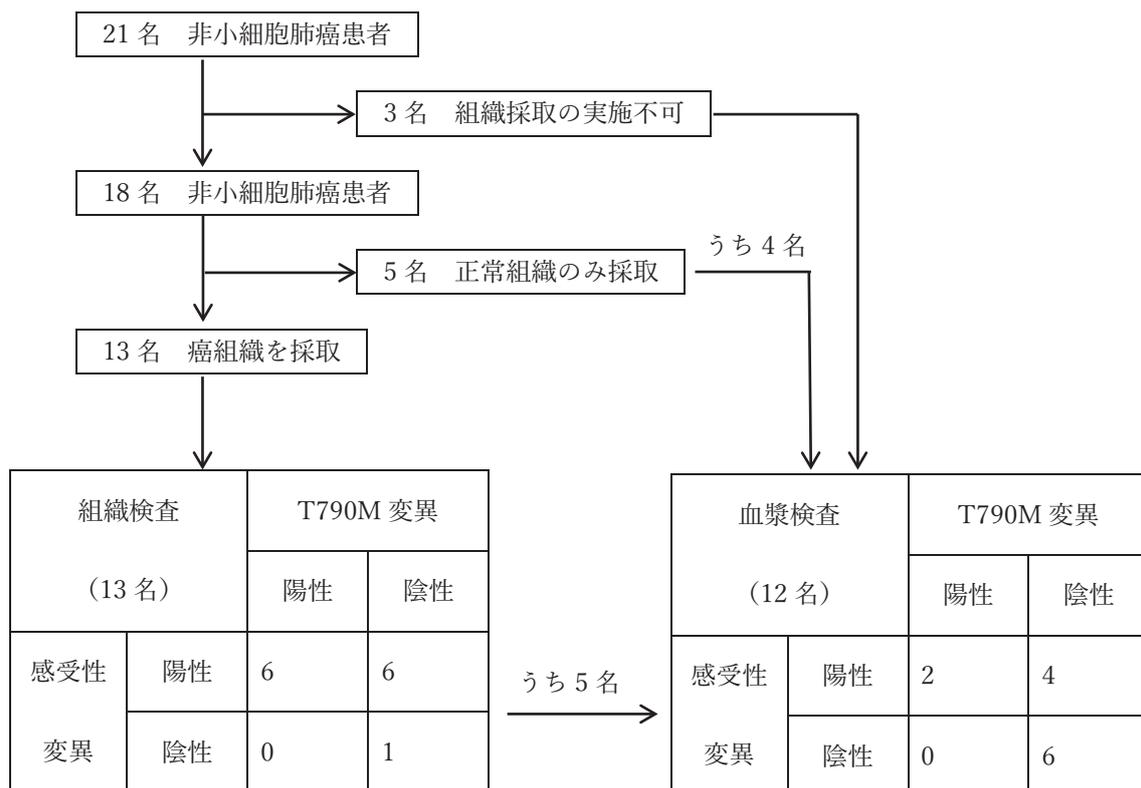


図1 21名の非小細胞肺癌患者に対する2nd biopsyの概要

緒言

肺癌は大きく小細胞肺癌と非小細胞肺癌に分類され、後者には腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌などが含まれ、肺癌全体の約75%を占める¹⁾。その中で日本人における腺癌のEGFR (epidermal growth factor receptor) 遺伝子変異は約45%に発現しているとされる²⁾。

EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌のうち、exon19欠失あるいはexon21のL858R変異の感受性変異 (sensitizing mutation : SM) を持つ患者が約90%を占めており、それらの患者に対する1次治療として、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) が用いられる³⁾。さらに1次治療として第1世代、第2世代EGFR-TKIを用いた際に、薬剤耐性を生じる遺伝子変異としてT790M変異があり、約50-60%に発現していることがわかっている⁴⁾⁻⁶⁾。

T790M変異陽性例に対する2次治療として、オシメルチニブによる治療がガイドライン上推奨されている³⁾。また過去の報告では、T790M変異陽性例に対するオシメルチニブ治療の無増悪生存期間は11.1カ月、全生存期間は16.9カ月と、殺細胞性抗癌

剤と比較して長期生存が可能であった⁷⁾。このことからT790M変異を診断することが治療選択において重要と考えられるが、T790M変異の検索方法は多岐にわたるため、検体や採取部位により陽性率が異なる⁸⁾ことが問題である。そこで我々は当院におけるT790M変異検索の実態について後方視的に検討を行った。

対象と方法

2016年5月から2017年2月までの9カ月間に、当院において、T790M変異の検索のために組織または血漿いずれかの検体を採取 (以下、2nd biopsy) されたEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の症例を対象とした。なお、EGFR遺伝子変異およびT790M変異の検査キットはRoche Diagnostics社のコバス®EGFR変異検出キットv2.0を用い、同時に検索した。なお、本文中での検定はFisherの正確確率検定で行った。p<0.05の場合、統計学的有意差があったとした。

本研究は当院の倫理委員会において2017年5月25日に承認された。

表 1 組織検査, 血漿検査の内訳

<単位:例>	症例数	Sensitizing mutation	
		exon19 欠失	L858R 変異
全対象人数	21	9	12
組織検査	18	7	11
癌組織検出例	13	7	6
T790M 変異陽性	6	4	2
感受性変異陽性	12	6	6
T790M 変異陽性 / 陰性	6/6	4/2	2/4
感受性変異陰性	1	1	0
T790M 変異陽性 / 陰性	0/1	0/1	0/0
血漿検査	12	4	8
T790M 変異陽性	2	0	2
感受性変異陽性	6	1	5
T790M 変異陽性 / 陰性	2/4	0/1	2/3
感受性変異陰性	6	3	3
T790M 変異陽性 / 陰性	0/6	0/3	0/3

結 果

1. 患者背景

21例のEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対して2nd biopsyが実施された。内訳は男性12例, 女性9例であり, 年齢は54歳から86歳(中央値75歳)であった。全例が腺癌であり, EGFR遺伝子変異型はexon19欠失が9例, L858R変異が12例であった。

2. 2nd biopsyの概要

図1, 表1に2nd biopsyの概要を示す。組織における2nd biopsy(以下, 組織検査)を施行できたのは86%(18/21例)であり, うち癌組織を得られたのは72%(13/18例)だった。癌組織が検出できた症例におけるT790M変異陽性率は, 46%(6/13例)であった。感受性変異が検出された12例のうち, T790M変異陽性率は50%(6/12例)であった。感受性変異が検出されなかった1例ではT790M変異は認められなかった。

一方, 血漿を用いたliquid biopsy(以下, 血漿検査)は, 再発部位へのアプローチが困難で組織検査を施行できなかった3例, 組織検査で癌組織が採取できなかった5例中4例, 癌組織は採取できたが組織検査でT790M変異陰性であった7例中5例の計12例

に施行された。T790M変異陽性率は17%(2/12例)であった。感受性変異が検出された6例のうち, T790M変異陽性率は33%(2/6例)であった。組織検査同様, 感受性変異が検出されなかった6例すべてでT790M変異は陰性であった。

組織検査で癌組織が検出できた場合のT790M変異の陽性率と, 血漿検査におけるT790M変異の陽性率の間に有意差は認めなかった($p=0.202$)。

3. EGFR遺伝子感受性変異の種類によるT790M変異陽性率

感受性変異が検出され, T790M変異検索に十分なDNA量が採取されたと考えられる症例と比較した場合, T790M変異陽性率はexon19欠失で57%(4/7例), L858R変異で44%(4/9例)であり, その間に有意差は認めなかった($p=0.657$)。なお, 組織と血漿で複数回検査を施行した症例があるが, これらは1例として数えた。

4. 生検方法による癌組織採取率の違い

組織検査は18例に対して23回施行された(1回施行:13例, 2回施行:5例)。生検方法は, 気管支鏡下生検, CTガイド下生検, 体腔液のセルブロック作成, 喉頭鏡下生検であった。それぞれの生検方

表2 組織検査の検査方法と癌組織検出数, T790M変異陽性数の割合

<単位: 回>	施行回数	癌組織検出数	T790M 変異陽性数
		(癌組織検出数 / 施行回数)	(T790M 変異陽性数 / 癌組織検出数)
気管支鏡	13	4 (31%)	1 (25%)
CT ガイド下生検	6	5 (83%)	3 (60%)
体腔液セルブロック	3	3 (100%)	2 (67%)
胸水セルブロック	2	2 (100%)	1 (50%)
腹水セルブロック	1	1 (100%)	1 (100%)
喉頭鏡下生検	1	1 (100%)	0 (0%)
合 計	23	13 (57%)	6 (46%)

表3 血漿検査における感受性変異の陽性・陰性と胸腔外病変の有無の関連

感受性変異	年齢 / 性別	胸腔内病変	胸腔外病変(臓器転移)
陽性	54/F	右上葉, 胸膜結節	脾臓, 肝臓, 骨
	55/F	右上葉	脳
	55/F	右中葉	脳, 肝臓, 骨
	56/M	多発肺内転移	脳, 腹膜播種, 骨
	75/F	右下葉	脳, 副腎, 骨
	77/M	右中葉, 同側肺内転移	中咽頭, 肝臓
陰性	67/F	右下葉(術後), 左胸水	なし
	75/M	右下葉	骨
	77/M	右上葉, 癌性心膜炎	骨
	79/F	右肺(術後)	なし
	80/M	右下葉	なし
	82/M	左肺(術後), 左胸水	なし

法の施行回数と癌組織の検出率, T790M変異陽性率を表2に示す。癌組織の検出率は気管支鏡下生検で31% (4/13回), CTガイド下生検で83% (5/6回), 体腔液セルブロックで100% (3/3回), 喉頭鏡下生検で100% (1/1回)であった。肺生検の際に検査の選択で悩まれると思われる, 気管支鏡検査とCTガイド下生検での二群間比較を行うと, 有意差はないものの気管支鏡下生検において検出率が低い傾向にあった (p=0.0573)。

CTガイド下生検を実施した6例中3例は, 気管支鏡下生検で癌組織が採取できなかった症例であ

り, 事前にPET/CTを施行し, 診断薬フルオロデオキシグルコース (fluorodeoxyglucose: FDG) の集積が強い病変を確認してからCTガイド下生検を実施した。その結果, 3例中2例で癌組織を得ることができ, うち1例はT790M変異が陽性であった。

5. 血漿検査における感受性変異の検出症例の検討

血漿検査で感受性変異が陽性となった症例と陰性であった症例の特徴を表3にまとめた。感受性変異が陽性となった6例に関しては, 血漿検査を施行した時点で全例に胸腔外病変を認めていた。一方, 陰性となった6例に関しては胸腔外病変として骨転移を2例に認めたものの, いずれも不変かわずかに増悪している程度であった。有意差はないものの, 胸腔外病変がある場合に感受性変異が陽性になる傾向がみられた (p=0.0606)。

6. 組織検査と血漿検査の比較

最後に, 組織検査と血漿検査の両方を施行した5症例について検討した。その全例において, 組織検査で癌組織が得られたもののT790M変異が陰性であったため, 血漿検査を施行していた。表4に感受性変異およびT790M変異の発現状況を両検査間で比較したものを示す。組織検査でT790M変異が陰性であったものの, 血漿検査でT790M変異を検出した症例を1例認めた。

考 察

EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌におけるT790M変異検出において, 組織検査における陽性率は一般的に約50-60%⁴⁾⁻⁶⁾と報告されている。本研

表4 組織検査と血漿検査における感受性変異 (Sensitizing mutation : SM), T790M変異の一致率

年齢 / 性別	生検方法 (生検部位)	感受性変異 (SM)	組織		血漿		オシメルチニブ投与
			SM	T790M	SM	T790M	
80/M	CTガイド下生検 (右下葉)	exon19欠失	-	-	-	-	なし
79/F	気管支鏡 (左B4)	L858R変異	+	-	-	-	なし
54/F	気管支鏡 (右B3)	L858R変異	+	-	+	-	なし
77/M	喉頭ファイバースコープ下生検 (中咽頭左舌根部)	exon19欠失	+	-	+	-	なし
55/F	気管支鏡 (左B1+2)	L858R変異	+	-	+	+	あり

究では癌組織を得られた症例におけるT790M変異陽性率は46%であり、既報とほぼ同程度であった。

T790M変異の陽性率に関して感受性変異に着目すると、当院の結果では症例数が少ないためかexon19欠失を持つ患者のT790M陽性率67%とL858R変異を持つ患者のT790M陽性率44%に有意差はなかったが、Matsuoら⁹⁾やNosakiら¹⁰⁾の報告ではexon19欠失を持つ患者がL858R変異を持つ患者よりも有意にT790M変異の陽性率が高い。

生検方法に関して、本研究では気管支鏡検査における癌組織の検出率が低い傾向にあった。これは、治療による組織の癒着のため活動性のある部位を採取できなかったことが原因として考えられる。気管支鏡下生検で癌組織が得られなかった3例においてPET/CTで病変の活動性を評価した上で、CTガイド下生検を実施したところ、2例で癌組織を採取できた。このことから事前にPET/CTで病変の活動性を評価し、その結果に応じて生検方法を検討する必要性が示唆される。また、体腔液検査に関しては、セルブロックを作成した3例全例で癌組織が得られ、うち2例(67%)でT790M変異が陽性であった。Takahamaらによれば、胸水・腹水検体におけるT790M変異陽性率は87.0%と高かった¹¹⁾。体腔液の採取は比較的侵襲の少ない検査である。体腔液におけるT790M変異の陽性率を考えると、体腔液が認められた場合には積極的に採取することが勧められる。

本研究では癌組織が取れていながら、EGFR遺伝子感受性変異が陰性であった症例が1例認められた。本症例はEGFR-TKI加療後に化学療法を繰り返し施行している症例で、既報のように化学療法によ

りEGFR遺伝子変異が陰性化した症例であると考えられた¹²⁾。

また、血漿検査での感受性変異の陽性率は50%という結果であったが、この頻度はTakahamaら¹¹⁾の報告でも46.2%の陽性率という報告でありおおむね一致していた。しかし、当院での血漿検査における

T790M変異の陽性率は17%で、Takahamaら¹¹⁾の報告である28.8%と比較して低い。当院での血漿検査は、組織検査でT790M変異が陰性の場合のみ施行しているため、T790M陽性率が低下したものと考えられた。また、本研究では胸腔外転移が存在している場合に感受性変異が有意に陽性になる傾向があったが、遠隔転移があると血漿検査において遺伝子変異が陽性となり得るという報告¹³⁾にも一致している。胸腔外転移の出現は、血漿検査を行う時期のひとつの目安と思われ、血漿検査を行う時期を見極めることで感受性変異の検出率を上昇させ、最終的にはT790M陽性率を上昇させる事ができると考えられた。

本研究で、感受性変異が陰性であった症例は全例でT790M変異も陰性であった。コバス[®]EGFR変異検出キットv2.0において、感受性変異よりもT790M変異の方が最小検出感度において優れていることがある¹⁴⁾ためか、感受性変異が陰性でT790M変異のみ陽性例の報告¹⁰⁾もある。しかし、こうした報告は少数にとどまり、感受性変異が陰性の場合にはT790M変異検査に必要なDNA量が得られていない可能性が高く、T790M変異の結果は信頼できないと考えられる。その一方で、感受性変異が陽性の場合には十分なDNA量が得られていると考えられ、T790M変異の結果は信頼に足ると考えられる。

本研究の限界として、組織検査でT790M変異が陽性であった症例に対しては保険診療上、血漿検査を実施できなかった。これらの症例に対する厳密な比較は実施できておらず今後の課題としたい。また、症例数が少なく統計学的有意差が認められなかった。今後、症例の増加や他の研究結果も重ねて評価する必要がある。

結 語

当院におけるT790M変異検索の現状を報告した。組織検査で様々な方法で効率よく癌組織を採取することが重要であると考えられた。一方、血漿検査については、検査実施の時期を図ることが重要と考えられた。

利益相反について：本論文発表内容に関連して申告なし。

[文献]

- 1) Bethune G, Bethune D, Ridgway N et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *J Thorac Dis* 2010 ; **2** : 48-51.
- 2) 日本肺癌学会, バイオマーカー委員会編. 肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き 第4.0版. 2018.
- 3) 日本肺癌学会編. 肺癌診療ガイドライン2017年度版 IV期非小細胞肺癌薬物療法. 第1版. 東京: 金原出版, 2017.
- 4) Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 2013 ; **19** : 2240-7.
- 5) Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res* 2011 ; **17** : 1169-80.
- 6) Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clinical Cancer Res* 2006 ; **12** : 5764-9.
- 7) Lin CC, Shin JY, Yu CJ et al. Outcomes in patients with non-small-cell lung cancer and acquired Thr790Met mutation treated with osimertinib: a genomic study. *Lancet Respir Med* 2018 ; **6** : 107-16.
- 8) Hata A, Katakami N, Yoshioka H et al. Rebiopsy of non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor: Comparison between T790M mutation-positive and mutation-negative populations. *Cancer* 2013 ; **119** : 4325-32.
- 9) Matsuo N, Azuma K, Sakai K et al. Association of EGFR Exon 19 Deletion and EGFR-TKI Treatment Duration with Frequency of T790M Mutation in EGFR-Mutant Lung Cancer Patients. *Sci Rep* 2016 ; **6** : doi : 10. 1038/srep 36458.
- 10) Nosaki K, Satouchi M, Kurata T et al. Re-biopsy status among non-small cell lung cancer patients in Japan : A retrospective study. *Lung Cancer* 2016 ; **101** : doi : 10. 1016/j.lungcan. 2016. 07. 007.
- 11) Takahama T, Sakai K, Takeda M et al. Detection of the T790M mutation of EGFR in plasma of advanced non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors (West Japan oncology group 8014LTR study). *Oncotarget* 2016 ; **36** : 58492-9.
- 12) Bai H, Wang Z, Chen K et al. Influence of chemotherapy on EGFR mutation status among patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Oncol* 2012 ; **30** : 3077-83.
- 13) Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M et al. Monitoring EGFR T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Sci* 2016 ; **107** : 162-7.
- 14) ロシュ・ダイアクノスティクス株式会社. コバス®EGFR変異検出キットv2.0 添付文書. 2016年3月作成 (第2版) 2016年12月改訂 (第3版).

A Single Institute Retrospective Analysis of the Testing for the EGFR-TKI Resistance Mutation T790M in Non-small Cell Lung Carcinoma Patients

Mayuko Watase, Ryosuke Satomi, Sahoko Imoto, Yasuhiro Yamamoto,
Sakiko Wada, Hiroaki Murakami, Miwa Iio, Kazuyuki Fujimoto,
Shigenari Nukaga, Kazuma Yagi, Yohei Funatsu, Takahiko Oyama,
Ryoichi Kato and Yoshitaka Oyamada

Abstract

Osimertinib is recommended by the Japanese Lung Cancer Society to be used for patients with T790M EGFR mutation with progressive disease after treatment with 1st-line EGFR-TKIs for stage IV EGFR mutant non-small cell lung carcinoma (NSCLC). However, 2nd biopsy to confirm T790M status can be challenging because of different tumor locations and biopsy procedures.

We retrospectively investigated the characteristics of 21 NSCLC patients who had undergone 2nd biopsy after the 1st-line EGFR-TKI treatment. Tissue biopsy and liquid biopsy were performed for 18 and 12 patients, respectively. T790M mutation was positive in 46% of patients with tissue biopsy and in 17% of those with liquid biopsy. We detected carcinoma at the frequency of 59% by all kinds of tissue biopsies. However, there was a discrepancy in the sensitivity for carcinoma among biopsy procedures. In bronchoscopy, the sensitivity was as low as 31%, while the sensitivity was 83% in CT guided biopsy and 100% in cell blocks using pleural or ascitic fluid. Therefore, an appropriate biopsy procedure is essential. T790M mutation rate was lower in liquid biopsy because it was performed only in patients with negative tissue biopsy. Furthermore, the low sensitivity for mutation rate (50%) indicates small amount of cell-free tumor DNA. The sensitivity for mutation rate tended to be higher in cases with newly developed extra-thoracic metastases than in cases without these lesions, which suggests that the time of liquid biopsy is also an important factor.