

## 主論文の要旨

# Development of an immuno-wall device for the rapid and sensitive detection of *EGFR* mutations in tumor tissues resected from lung cancer patients

肺癌患者から切除された腫瘍組織における、迅速かつ高感度な  
*EGFR* 遺伝子変異検出のためのイムノウォールデバイス開発

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：橋本 直純 准教授)

與語 直之

## 【緒言】

肺癌は世界の癌関連死亡の主原因であり、肺癌の約 85%が非小細胞肺癌(NSCLC)に分類されている。上皮成長因子受容体(*EGFR*)は NSCLC 細胞の増殖、運動性、分化に重要な役割を果たしている。*EGFR* 変異はその大部分が活性型変異であるエクソン 19 の E746\_A750 欠失変異、またはエクソン 21 の L858R 点突然変異であり、活性型変異が NSCLC 患者の *EGFR* チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)に対する感受性と関連することが様々な研究で報告され、現在 *EGFR* 変異検査は NSCLC 患者において標準となっている。*EGFR* 変異検査として、これまで PCR-Invader 法や PNA LNA PCR-Clamp 法などの PCR ベース法が開発され、これらは感度が高く、癌細胞含有量が少ない検体でも検査可能である一方、コストや高度な技術を要するなどの課題がある。

我々はこれまでに、迅速かつ高感度な分析を目的としたマイクロ流体免疫デバイスを開発してきた。本研究では、新たに開発したイムノウォールデバイスを用いて、NSCLC 患者から外科的切除された肺癌組織中の変異 *EGFR* タンパク質を特異的に検出する能力を評価した。

## 【対象及び方法】

名古屋大学大学院医学系研究科の倫理審査委員会で承認された臨床研究(承認番号: 2014-0171)に基づき、2010年11月から2015年8月までの間に名古屋大学医学部附属病院で病理学的に NSCLC と診断された患者が登録された。

本デバイスは Fig. 1 に示す構造となっており、プラスチック基板内に 40 本のマイクロ流路が形成されている。フォトリソグラフィ技術を用いてマイクロ流路の中心に壁状構造を構築し、そこにビオチン化した捕捉抗体をアビジン-ビオチン相互作用により固定化しイムノウォールを作成した。アッセイは一般的なサンドイッチ型イムノアッセイと同様に行い、最後に蛍光顕微鏡での撮影及び浜松ホトニクス株式会社と共同開発した蛍光イムノアッセイリーダーでの蛍光強度測定を行った。

## 【結果】

*EGFR* 変異細胞株(E746\_A750 欠失変異は HCC827、L858R 点突然変異は H3255)と野生型細胞株(H358)をそれぞれ 0~10%の変異細胞割合で混合した溶解液を、それぞれの変異型 *EGFR* 特異抗体を捕捉抗体として分析し得られた蛍光画像を Fig. 2 に示す。蛍光は、*EGFR* 変異細胞割合に伴い増強した。また多くは 2 本の蛍光で示されており、抗原抗体反応はイムノウォール側面で起こっていることが示唆された。これは捕捉抗体が主にイムノウォール側面に固定化されているためと考えられる。また、H3255 の割合が 0%の検体で観察された微弱な蛍光は、L858R 特異抗体と野生型 *EGFR* タンパク質の交差反応性を示していると考えられる。

*EGFR* 変異細胞株を用いて作成した蛍光強度曲線を Fig. 3 に示す。検出限界(LOD)は、 $3\sigma$  法(各変異型 *EGFR* 特異抗体を用いて H358 を分析することにより得られた蛍光強度平均+標準偏差の 3 倍)により設定した閾値を基に計算した。その結果、HCC827

及び H3255 含有割合の LOD はそれぞれ 1%及び 0.1%と推定された。H3255 のバックグラウンド蛍光は HCC827 よりも僅かに高かったが、これも L858R 特異抗体の交差反応性によるものと考えられる。

一方、*EGFR* 変異細胞株の希釈系列を用いて分析したところ、両変異株共にタンパク質濃度の LOD は 0.01mg/mL と推定された。また高濃度検体では、増加した蛍光強度はオーバーラップしていた。(Fig. 4)

次に、PCR ベース法で *EGFR* 野生型、または活性型変異を有すると確認された 22 名の NSCLC 患者から得た臨床検体の分析を行った。Fig. 5 に示す結果から、L858R 特異抗体を用いた分析では E746\_A750 欠失変異や野生型 *EGFR* を有する臨床検体において微弱な蛍光を示し、これは *in vitro* の所見 (Fig. 2) と一致していたが、蛍光強度は閾値よりも低く、偽陽性とはならなかった。*EGFR* 活性型変異を有する臨床検体において、本デバイスは 85%以上の診断感度を示したが、各変異の内それぞれ 1 例は蛍光が弱く偽陰性となった。さらに、PCR ベース法で E746\_A750 以外のエクソン 19 欠失変異を有すると確認された 15 名の NSCLC 患者から得た臨床検体を、E746\_A750 特異抗体を用いて分析した (Table 1) と、全て微弱な蛍光を示し野生型と診断された。以上より、*EGFR* 活性型変異に対する 100%の診断特異度が示された。

### 【考察】

本デバイスは、アビジン-ビオチン相互作用を利用し捕捉抗体を高密度にイムノウォールに固定でき、かつその側面が 3 次元反応場となることで蛍光が積分されるため、検出感度がより向上する可能性がある。さらに、一般的に血液や組織を含む臨床検体には細胞屑やフィブリンなどの夾雑物が多く含まれるが、壁状構造により洗浄バッファ注入による夾雑物の容易な除去が可能となったため、本デバイスでは特別な前処理は不要であった。また、マイクロ流路のため抗原や抗体などの分子間距離が小さく、その結果反応時間が短縮し、20 分以内に検査を完了することが可能となり、ポイントオブケア診断を含む臨床応用に適したデバイスとなった。

いくつかの研究において、肺癌の *EGFR* 変異が免疫組織化学 (IHC) によって検討されており、本研究でも使用した変異特異抗体を用いて、感度は 24~100%、特異度は 77~100%であることが示されている。IHC は日常的に利用されている費用対効果の高い方法だが、検査方法やスコアリングシステムの違いによって結果が左右される可能性がある。本研究では、H358 の分析によって得られた蛍光強度に基づいて客観的な閾値を設定した。また、その閾値に基づき LOD (変異細胞割合) は 0.1~1%と推定された (Fig. 3) が、これは、癌細胞含有割合が 20%以下の検体でも変異を検出できる高感度検査を推奨する CAP/IASLC/AMP ガイドラインの要件を満たしている。本研究は分析した臨床検体数は多くないものの、PCR ベース法で得られた結果と比較し、本デバイスの高い診断感度及び診断特異度が示された。*EGFR* 活性型変異検査における PCR ベース法と本デバイス間での不一致例については、腫瘍細胞の含有量のばらつきや臨床検体内の腫瘍の不均一性が関連している可能性がある。

エクソン 19 に E746\_A750 とは異なる欠失変異を持つ臨床検体について、E746\_A750 特異抗体を用いた分析では全て微弱な蛍光を示した。これは、抗体の有効性が特定の突然変異により低下する可能性を示唆するものの、活性型変異は *EGFR* 変異の 70%以上を占めるため、本デバイスを用いて NSCLC 患者のスクリーニングを行うことで、EGFR-TKI 治療候補者をより迅速に特定できるという臨床的有用性は十分にあると考える。

本研究には以下の限界がある。第一に、本研究は後方視的な単施設研究であり、選択バイアスが影響を与えた可能性がある。第二に、IHC におけるスコアリングのばらつきのため、本デバイスと IHC の直接比較は行わなかった。よって、IHC に対する優越性は明らかではない。また、*EGFR* 変異検査は PCR ベース法が現在の標準であるため、ELISA との直接比較も行っていない。第三に、高濃度では蛍光強度にオーバーラップが見られ (Fig. 4)、定量性の低下が示唆された。ただし、これは臨床的には許容可能と考えられる。また、小さな生検または細胞診検体は今回分析できていない。以上から、今後より大規模な前方視的多施設研究で検証する必要がある。

#### 【結語】

本研究では、新たに開発した本デバイスを用いて 37 名の NSCLC 患者の外科的切除検体にて *EGFR* 活性型変異を分析した結果、診断感度は 85%以上、診断特異度は 100%であった。さらに、検査は 20 分以内で完了でき迅速に結果が得られた。本デバイスは、次世代の診断法として有望な候補であることが示唆された。