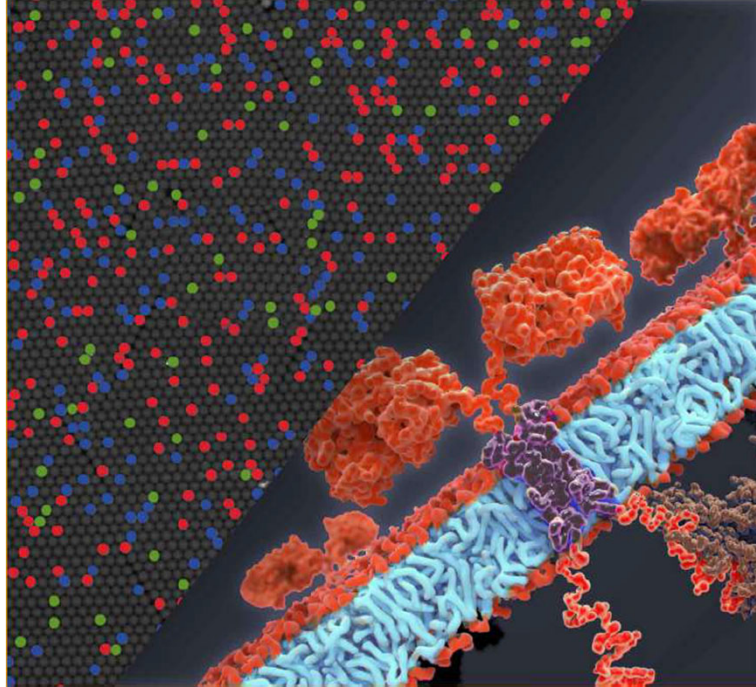




3-color Crystal Digital PCR™

EGFR 変異検出



富士フイルム 和光純薬株式会社

2つのマルチプレックスデジタルPCRアッセイによるEGFR 活性化と耐性変異の検出

非小細胞肺癌では、上皮成長因子受容体(EGFR)が一般的な治療標的ですが。EGFR 活性化変異である L858R、L861Q、エクソン19 欠失変異は、チロシンキナーゼ阻害剤(TKIs)を使用した標的療法の疾患への反応性を予測できます [1]。それとは反対に、EGFR T790M 変異は、TKIsに対する腫瘍耐性と関連しています [2]。

測定結果の精度と信頼性を犠牲にすることなく、一回のテストでこれらの変異を検出および定量化するために、2つのマルチプレックスアッセイが開発されました。Naica™ System の3つの異なる蛍光チャンネルを使用するプライマーとプローブにより、パネル1でEGFR L858R / L861Q と T790Mの検出、パネル2でEGFR エクソン19 欠失 (drop-off アッセイ)と T790M の検出が可能になります。どちらのパネルも野生型 (WT) EGFR も検出します。

Panel 1: EGFR L858R / L861Q and T790M

Primers/Probes	5' Fluorophore	Sequence	3' Quencher
L858R-Forward	-	GCAGCATGTCAAGATCACAGATT	-
L858R-Reverse	-	CCTCCTTCTGCATGGTATTCTTTCT	-
L858 WT Probe	FAM	AGTTTGG(C){C}A(G)CCCAA	BHQ-1
L858R-Probe	Cy5	AGTTTGGC(C){C}(G)CCCAA	BHQ-3
L861Q-Probe	Cy5	ACCCAG(C){T}(G)TTTGCCA	BHQ-3
T790M-Forward	-	GCAGGTA CTGGGAGCCAAT	-
T790M-Reverse	-	GCATCTGCCTCACCTCCA	-
T790M-Probe	Yakima Yellow	TGAGCT(G){C}A(T)GATG	BHQ-1

Panel 2: EGFR exon 19 deletions and T790M

Primers/Probes	5' Fluorophore	Sequence	3' Quencher
Del19-Forward	-	GTGAGAAAGTTAAAATCCCG	-
Del19-Reverse	-	CACACAGCAAAGCAGAAAC	-
Del19 ref Probe	FAM	CACATCGAGGATTTCC TTGTTGGC	BHQ-1
Del19 WT probe	Cy5	AGGAATTA(A)GA(G)AAG(C)AACATC	BHQ-3
T790M-Forward	-	GCAGGTA CTGGGAGCCAAT	-
T790M-Reverse	-	GCATCTGCCTCACCTCCA	-
T790M-Probe	Yakima Yellow	TGAGCT(G){C}A(T)GATG	BHQ-1

Bases between {} are Locked Nucleic Acid (LNA) bases

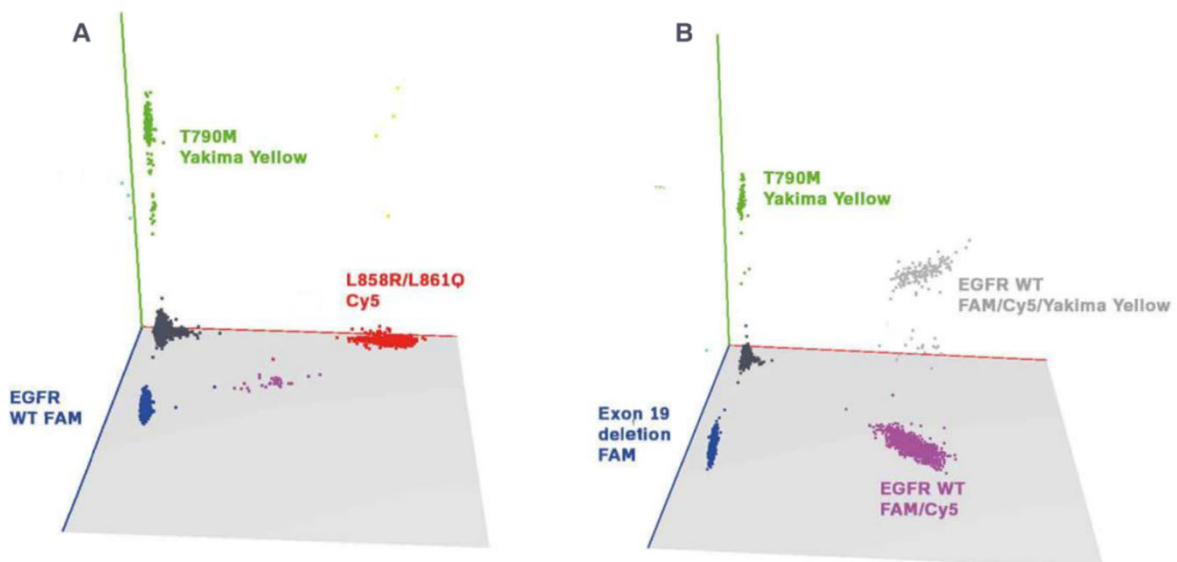


図 1: EGFR 変異および ポジティブコントロールのWT EGFR 測定結果を Crystal Miner ソフトウェアで3Dドットプロット表示。
A: EGFR パネル1、B: EGFR パネル2

3カラーアッセイにより、EGFR 変異を確実に信頼性高く検出

ターゲットとなるEGFR 変異は、最終濃度で 1 μL あたり 1 および 0.4 コピー (copies / μL) まで95% 信頼区間で検出されました。すべてのアッセイは、400 copies/ μL の野生型DNAをバックグラウンドとして加えて実行されたため、EGFR 濃度は、それぞれ 0.25% と0.1% の対立遺伝子頻度を表しています (図2)。

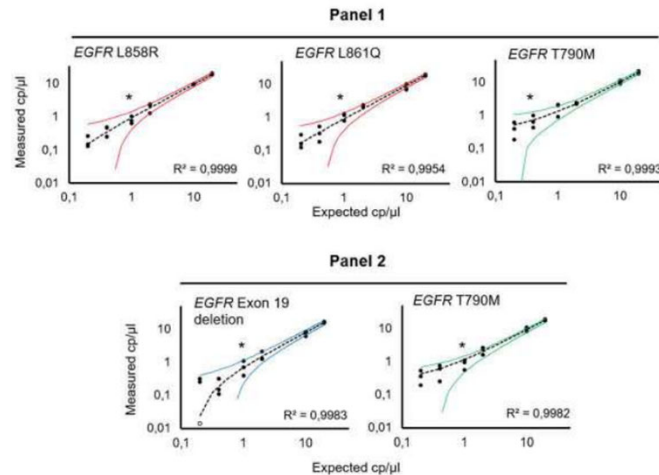


図 2: EGFR マルチプレックスアッセイに対する Crystal Digital PCR パフォーマンスの評価。濃度設定 20 ~ 0.20 copies/ μL のEGFR L858R、EGFR L861Q、EGFR T790M、およびEGFR エクソン19欠失を400 copies/ μL のWT EGFR (25 μL 反応あたり 10,000 コピー) のバックグラウンドで測定。95% 信頼区間の理論値は色付きの曲線で表されます。★は95% 信頼区間での理論上の検出限界を示します (25 μL 反応あたり10,000コピーの野生型DNAを含む30回の複製で測定されたブランク限界から導く)。ブランク限界と検出限界を決定する方法の詳細については、www.gene-pi.com のラーニングセンターにアクセスしてください。

非小細胞肺癌患者のサンプルにおけるEGFR 変異の検出

2つのEGFR 3カラーデジタルPCRパネルを非小細胞肺癌患者から抽出した変異DNAで評価し、次世代シーケンシング (NGS) 測定と比較しました。測定されたEGFR 突然変異遺伝子の頻度は、高い相関を示しました (図3)。

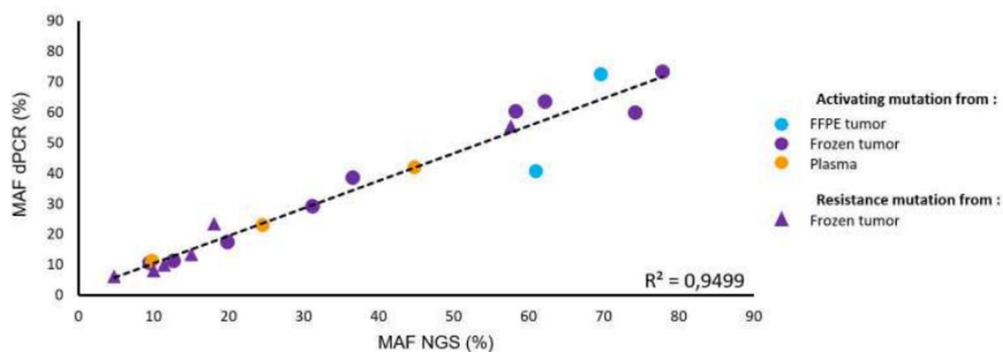


図 3: EGFR パネル1および2を使用してデジタルPCR と NGS で測定した、凍結がん組織 (紫)、FFPE (青)、および血漿 (赤) から抽出されたDNAのEGFR 活性化変異 (●) および耐性変異 (▲) の突然変異頻度 (MAF)。測定サンプル間の比較では良好な相関を示し、有意な相関係数を得ました ($R = 0.9746$; $P < 0.05$)。

[1] Nan X, Xie C, Yu X, Liu J. EGFR TKI as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017 Aug 9;8(43):75712-75726

[2] Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, Kris MG, Miller VA, Ladanyi M, Riely GJ. 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 Apr 15;19(8):2240-7

アプリケーションノートハイライト



Naica 3-color Crystal Digital PCR™ System は、EGFR 活性化および耐性変異を確実に信頼性高く検出します。



EGFR 変異は野生型 DNA のバックグラウンド下で検出され、EGFR 変異に応じて 95% の信頼性区間で 0.25% から 0.1% の対立遺伝子頻度まで測定できました。



希釈系列実験では、予測EGFR ターゲット濃度と測定EGFR ターゲット濃度の間に優れた相関関係が示されました。



3カラーデジタルPCR と次世代シーケンシングによって測定されたがん組織および血漿からのEGFR 変異対立遺伝子頻度は、強い相関関係と有意な相関係数を示しました ($R = 0.97$, $P < 0.05$)。



デジタルPCRの詳細については、StillaのデジタルPCRラーニングセンターを参照ください。
www.gene-pi.com

富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
TEL: 06-6203-2759 (機器システム部)
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
TEL: 03-3270-8124 (機器システム部)

●九州営業所 TEL: 092-622-1005 (代) ●中国営業所 TEL: 082-569-8095 (代)
●東海営業所 TEL: 052-772-0788 (代) ●筑波営業所 TEL: 029-858-2278 (代)
●東北営業所 TEL: 022-222-3072 (代) ●北海道営業所 TEL: 011-271-0285 (代)
●横浜営業所 TEL: 045-225-8041 (代)

URL : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/index.htm>

