

南臺灣非小細胞肺癌病患的表皮生長因子接受器 突變分佈

林燕秀^{1,2}、*李健逢^{1,3}

¹南臺科技大學生物科技系、²國立成功大學附設醫院內科部、³奇美醫療財團法人奇美醫院臨床病理科
angelo.p@yahoo.com.tw

摘要

表皮生長因子接受器 (*Epithelial Growth Factor Receptor, EGFR*) 突變是非小細胞肺癌病患常見的突變之一，檢測 *EGFR* 類型有助於標靶藥物的選擇，除此之外其突變類型在不同的族群中可看到不同的分佈，但這之間的關聯性在台灣地區尚未非常清楚。本研究收集自 2013 年 11 月到 2016 年 10 月期間共 949 筆檢驗 *EGFR* 基因突變的資料，檢測檢體類別包含石蠟包埋組織、細胞切片、胸肋膜液、腹水等。*EGFR* 基因檢測使用 theascreen *EGFR* RGQ PCR Kit version 2 (Qiagen) 試劑，接著將其結果與病患的臨床特徵以 Chi-square test 進行統計分析。949 名病患臨床特徵分佈為男性 481 名，女性 468 名；年齡從 29 歲到 94 歲，中位數 67 歲；64.6% 未抽菸、22.1% 戒菸、13.3% 持續抽菸；85.1% 肺腺癌、10.2% 非小細胞肺癌未指定組織型態、3.5% 鱗狀細胞癌、0.9% 混合二種組織型態、0.3% 支氣管肺泡癌；臨床第 I 期 10.6%、臨床第 II 期 3.6%、臨床第 III 期 11.1%、臨床第 IV 期 74.7%。我們發現在受檢的非小細胞肺癌中 60.3% 的患者有 *EGFR* 突變，肺腺癌中有 65.5% 突變率。以 *EGFR* 突變率來看肺腺癌比鱗狀細胞癌高，未抽菸比戒菸和抽菸高，女性要比男性高，TNM-M1 比 TNM-M0 高，年齡、TNM-T、TNM-N 則與 *EGFR* 突變沒有差異。*EGFR* 突變類型以 Exon21 L858R(27.1%)及 Exon19 deletion (26.1%) 佔大多數。*EGFR*-TKI 抗藥性類型則以 T790M(2.3%)最多。本研究透過大樣本數的分析以更加了解台灣地區 *EGFR* 突變分佈狀況，有提供臨床醫師作為治療參考的價值。

關鍵詞：非小細胞肺癌、表皮生長因子接受器

Mutations in the Epithelial Growth Factor Receptor gene in Non-small Cell Lung Cancer in Southern Taiwan

^{1,2} Yen-Hsin Lin, ^{1,3} Chien-Feng Li

¹Department of Biotechnology, Southern Taiwan University, ²Department of Internal Medicine, National Cheng Kung University Hospital, ³Department of Pathology, Chi-Mei Medical Center

Abstract

Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) mutations are common in non-small cell lung cancer (NSCLC). Detection of *EGFR* mutation status is mandatory for the selection of targeted therapeutics. Few if any previous studies have focused on the associations between *EGFR* mutation and clinicopathologic features in Southern Taiwan. We analyzed *EGFR* mutation patterns from 949 treatment-naïve patients tested in Chi Mei Medical Center from November 2013 to October 2016 in a retrospective manner. The mutation analyses were investigated by theascreen *EGFR* RGQ PCR Kit version 2 (Qiagen). The statistical analyses were performed by Chi-square test.

Received: June 8, 2017; first revised: Aug. 30, 2017; accepted: Oct, 2017.

Corresponding author: C.-F. Li, Department of Biotechnology, Southern Taiwan University of Science and Technology, Tainan, Taiwan; Department of Pathology, Chi-Mei Medical Center, Tainan, Taiwan.

The NSCLC patients consisted of 481 males and 468 females aged 29 to 94 (median 67). Among them, 64.6% were never smokers, 22.1% were ex-smokers and 13.3% were current smokers. There were 85.1% adenocarcinoma, 10.2% NSCLC (NOS), 3.5% SCC, 0.9% combined carcinoma and 0.3% bronchioloalveolar carcinoma which were diagnosed at stage I (10.6%), stage II (3.6%), stage III (11.1%), and stage IV (74.7%), respectively. Overall, 60.3% patients with NSCLC had *EGFR* mutations. 65.5% patients with Adenocarcinoma had *EGFR* mutations. Adenocarcinoma was mutated more often than SCC. Mutations were found more often in non-smokers than ex-smokers and current smokers. Mutation rate in females was higher than in males. More TNM-M1 was found than TNM-M0. No difference in age, TNM-T and TNM-N regarding mutation status was observed. Exon21 L858R (27.1%) and Exon19 deletion (26.1%) were the most common mutation types. T790M, the drug resistant mutation can be identified in 2.3% of patients. Throughout this analysis, we have clarified the molecular epidemiology of *EGFR* mutations in Southern Taiwan, suggesting that *EGFR* mutation further provides indication for clinical targeting therapy.

Keywords: Non-small Cell Lung Cancer, Epithelial Growth Factor Receptor, T790M

壹、研究目的與背景

一、研究背景

根據 WHO GLOBOCAN 2012 癌症統計資料顯示全球每年有 1410 萬名新增癌症病例，其中 183 萬名是肺癌，發生率 13% 排名第一位，當中的 58% 發生在開發中國家，男性與女性發生比率是 2 比 1，男性肺癌發生率排名第一，女性則是排名第三，男性發生率較高的地區為中歐東歐(53.5/十萬人)和東亞(50.4/十萬人)，而中非(2.0/十萬人)及西非(1.7/十萬人)發生率較低，女性發生率較高的地區為北美(33.8/十萬人)及北歐(23.7/十萬人)主要和抽菸史相關，因此發生率與地理區域有密切關聯，肺癌死亡率 19%，五年存活率只有 5.8% 是所有癌症中死亡率最高的癌症[1]。根據美國國家癌症研究所 (NCI) 統計，美國肺癌發生率 13.3% (2016 年)排名第二位，死亡率 26.5% (2016 年)，五年存活率 17.7% (2006 至 2012 年)，年齡分佈上最常見於 65 至 74 歲的人群，在所有統計裡面只有 1.3% 發生在 44 歲以下[2]，英國癌症研究中心指出，肺癌在英國癌症發生率 13% 排名第三，死亡率 22%，五年存活率 10%[3]，在台灣根據衛生福利部統計 2013 年癌症新病例有 9.9 萬名，其中肺癌 1.1 萬名，發生率 11% 排名第三位，男女比 1.6:1，死亡率 19% 排名第一位，五年存活率 21%[4]，綜合以上各國公佈的統計數據得知肺癌目前是全球死亡率最高的癌症。台灣的肺癌患者約有 88% 是屬於非小細胞肺癌 (NSCLC) 它生長較慢，轉移也較緩慢，預後較小細胞肺癌(12%)好，肺腺癌是非小細胞肺癌當中較為常見的組織型態，約佔 50% 至 70%，一般生長在肺部週邊，遠處轉移的速度較慢，早期沒有徵兆，患者通常較晚期才診斷，導致絕大多病患死於該疾病，是女性和非抽菸者最常見的類型，也是台灣最常見的肺癌，目前肺癌患者抽菸男女比是 60% 及 4%，抽菸一直是肺癌最重要的危險因子，抽菸比不抽菸者高 10 倍罹癌風險，但近年來女性罹患肺癌患者多為不抽菸，因此女性罹患肺癌應仔細考慮其他因素所導致的，例如被動吸入二手煙、空氣污染(PM2.5)、廚房油煙、先前感染後遺症、基因易感性(genetic susceptibility)等等因素[5]，然而最重要的關鍵因素為何是目前研究最重要的課題。

肺癌的形成過程中表皮生長因子接受器 (*EGFR*) 扮演重要的角色，正常細胞內的 *EGFR* 激活是短暫性的，但是當有一部分 *EGFR* 的酪氨酸激酶結構發生突變時，腫瘤細胞就不需要配體(ligand)的刺激，即可以活化下游途徑，另一部分原因是 *EGFR* 過度表現，這些都會形成生生不息的訊息傳導，使得癌細胞不停的增生、分化及轉移。根據研究調查顯示 *EGFR* 基因突變發生在非小細胞肺癌患者約有 7~66%，在不同地區 *EGFR* 突變率有所差異，普遍來說歐美地區 *EGFR* 突變率 7~40%，亞洲地區 36~66%，女性有較高的 *EGFR* 突變率，在組織型態學中以肺腺癌的患者突變率較高，相較於抽菸患者未抽菸患者有較高

的 *EGFR* 突變率，這些調查顯示 *EGFR* 突變與非小細胞肺癌患者的臨床特徵有密切相關，主要出現在女性肺腺癌患者當中[6-7]。如今隨著分子醫學的進步 *EGFR* 酪胺酸激酶抑制劑(*EGFR*-TKI)標靶藥物的出現，它與 *EGFR* 突變有較好結合能力，能夠標的腫瘤細胞阻斷它們的生長進而改善患者的存活率[8]。

二、研究目的

表皮生長因子接受器 (*EGFR*) 是細胞膜上酪胺酸激酶受體家族成員之一，*EGFR* 突變在肺癌病患是常見的基因突變之一，目前肺癌的治療除了早期發現可以進行傳統手術，其他較晚期診斷的病患只能做化學治療或放射治療，隨著醫學的進步肺腺癌病患已經可以常規檢測 *EGFR*，其結果可做為臨床醫師申請健保給付標靶藥物的依據，目前第一線標靶藥物為酪胺酸激酶抑制劑(*EGFR*-TKI)第一代 Gefitinib、Erlotinib 及第二代藥物 Afatinib，這些藥物都可能有效，但使用與否需要藉由 *EGFR* 突變檢驗報告作為指引。再者 *EGFR* 突變分佈情形在許多國家皆已發表，不難發現每個地區間臨床生物特徵分佈有所差異，但 *EGFR* 突變之分子流行病學特徵在南台灣仍不清楚，本研究的目的即藉由大規模分析奇美醫學中心非小細胞肺癌病患在臨床特徵與 *EGFR* 突變之間的關聯性建立南台灣 *EGFR* 突變之分子流行病學資料，提供臨床醫師作為治療參考。

三、研究方法及架構

本研究收集自 2013 年 11 月到 2016 年 10 月期間共 949 位先前未經標靶藥物治療的病患檢驗 *EGFR* 基因突變的資料，檢測檢體類別包含石蠟包埋組織、細胞切片、胸肋膜液、腹水等。*EGFR* 基因檢測使用 theascreen *EGFR* RGQ PCR Kit version 2 (Qiagen) 試劑，接著將其結果與病患的臨床特徵以 Chi-square test 進行統計分析。

貳、研究方法

一、資料來源

本研究設計採 Retrospective Hospital-based Cohort Study，研究進行地點為台南市奇美醫學中心，研究計畫經奇美醫院人體試驗委員會核可(IRB 編號 10603-012)。資料經由報告系統查詢，包含性別、年齡、TMN 腫瘤分期、整體臨床分期，抽菸史分成未抽菸、戒菸及抽菸，組織學診斷由病理專科醫師確認。為使資料一致性，排除不屬於非小細胞肺癌 48 例、抽菸史不詳 4 例，最後收案的共有 949 例檢體。

二、變數說明

為利於統計分析將年齡分成小於 65 歲一組，另一組為 65 歲以上，根據 WHO 腫瘤分類[9]，組織學將類型較少的腺鱗癌 5 例、混合小細胞癌及非小細胞癌 1 例、混合小細胞癌及肺腺癌 1 例、混合非小細胞癌及淋巴上皮瘤樣癌 1 例合併到混合二種組織型態癌，TNM 分期中的 T 將 T1a 和 T1b 合併成 T1，T2a 和 T2b 合併成 T2；M1a 和 M1b 合併成 M1；整體臨床分期 IA 和 IB 合併成 I 期，IIA 和 IIB 合併成 II 期，IIIA 和 IIIB 合併成 III 期。

三、*EGFR* 基因檢測

石蠟包埋組織及細胞切片檢體經由病理專科醫師確定腫瘤組織百分後便可視組織大小取 10 μ m 切片 1~10 片，將檢體放入 1.5ml eppendorf 加入 160 μ l 的 Deparaffinization solution (廠牌 QIAGEN)，以振盪器震盪至蠟完全溶解，進行後續脫蠟。胸肋膜液及腹水檢體視體液細胞多寡取 100 μ L~2mL 不等，不需進行脫蠟。接著利用 QIAamp DNA FFPE kit (廠牌 QIAGEN) 進行消融及純化 DNA。純化後的 DNA 利用 Real-time PCR (Rotor-Gene Q 5 plex HRM) 以 Therascreen *EGFR* RGQ PCR Kit 偵測 *EGFR* 基因共 29 個突

變點[10]，其原理包括二個方式：(1)ARMS (Amplification Refractory Mutation System): 設計好的 primers 只會和突變位點上的基因配對結合，再讓 Taq DNA polymerase 啟動 PCR 反應，若檢體是未突變 wild type，primer 就不會結合上，則 Taq DNA polymerase 將無法去啟動 PCR 反應。(2) Scorpions：它是一個具有雙功能的分子，包含一個 PCR primer 共價結合到一個 Probe 上，Probe 序列的設計為能與將來新複製出來的突變序列互補，而 Probe 二端也設計有螢光和抑制子(Quencher)他們二個會產生交互作用而抑制螢光反應，Scorpions primer 一端接阻斷基團可防止 DNA 聚合酶複製 probe 序列，當 scorpions primer 結合上突變 target DNA 序列時，在 DNA 聚合酶作用下進行序列延伸複製。在 real-time PCR 儀內，溫度升高之後，新複製延伸的 Scorpions primer 雙股 DNA 打開形成單股，這時 PCR 反應溫度下降後，Scorpions probe 發生結構變化，與新複製出來的單股 DNA 互補鍵結，因為螢光不再受抑制子 Quencher 的抑制，所以會開始發光，其他未被複製的 Scorpions 將會重新黏合受抑制子作用。

四、分析統計

分析病人臨床特徵與 *EGFR* 突變之間的關聯性，使用 Microsoft excel 及 IBM SPSS Statistics 24 進行統計分析，分析方法為卡方檢定(Chi-square)，統計結果以 $p < 0.05$ 表示有關聯性， $p > 0.05$ 表示不相關。

參、研究結果

一、非小細胞肺癌病患臨床特徵與 *EGFR* 基因突變的關聯

我們將 949 位病患分別以年齡、性別、抽菸史、組織學分組分別與 *EGFR* 基因分析結果利用 chi-square 分析比對(表 1)，病人年齡範圍為 29 歲到 94 歲，中位數 67 歲，我們將年齡分成二組，小於 65 歲 415 例，大於 65 歲 534 例，年齡與 *EGFR* 突變相關性其 P 值為 0.515 在統計學上沒有顯著意義，代表此依變數是獨立的。性別方面男性有 481 例 (50.7%)、女性有 468 例 (49.3%)，性別與 *EGFR* 突變分析的關聯性為 $P < 0.001$ ，在統計學上女性病患有明顯較高 *EGFR* 突變率，男性 *EGFR* 未突變(Wild type)佔 53.2%，*EGFR* 突變佔 46.8%；女性 *EGFR* Wild type 佔 25.9%，*EGFR* 突變佔 74.1%，男性以 *EGFR* Wild type 表現居多；女性則是以 *EGFR* 突變佔多數，*EGFR* 突變發生率男女比為 1:1.6。另外將具有 *EGFR* 突變的族群獨立出來，可觀察到男性佔 39.3%，女性有 60.7%，男女比約 1:1.5 (表 1)。

表 1 非小細胞肺癌病患臨床特徵與 *EGFR* 的關聯

特徵	數目(%) (N=949)	<i>EGFR</i> 突變 數目(%)	<i>EGFR</i> 未突變 數目(%)	P-value	<i>EGFR</i> 突變比 率*(N=572)	
年齡	<65 歲	415 (43.7)	255 (61.4)	0.515	44.6	
	≥65 歲	534 (56.3)	317 (59.4)		217 (40.6)	55.4
性別	女	468 (49.3)	347 (74.1)	<0.001	60.7	
	男	481 (50.7)	225 (46.8)		256 (53.2)	39.3
抽菸史	從不抽菸	613 (64.6)	434 (70.8)	<0.001	75.9	
	已戒菸	210 (22.1)	90 (42.9)		120 (57.1)	15.7
	目前正抽菸	126 (13.3)	48 (38.1)		78 (61.9)	8.4
組織型態	腺癌	808 (85.1)	530 (65.6)	<0.001	92.7	
	非小細胞肺癌未指 定組織型態	97 (10.2)	28 (28.9)		69 (71.1)	4.9
	鱗狀上皮細胞癌	33 (3.5)	9 (27.3)		24 (72.7)	1.6
	混合二種型態	8 (0.9)	4 (50.0)		4 (50.0)	0.7
	細支氣管肺泡癌	3 (0.3)	1 (33.3)		2 (66.7)	0.2

* *EGFR* 突變比率是指 *EGFR* 突變數目中案例比率，算式： $EGFR$ 突變數目/ $EGFR$ 突變總數*100。(例如：女性 47/572*100=60.7%)

根據抽菸史分成三組分別為未抽菸 613 例(64.6%)、戒菸 210 例(22.1%)、抽菸 126 例(13.3%)，與 *EGFR* 突變分析的關聯性為 $P < 0.001$ ，在統計學上有明顯差異，未抽菸者有 70.8% *EGFR* 突變，戒菸有 42.9%、抽菸 38.1%，戒菸與抽菸多為 *EGFR* Wild type，分別為 57.1%、61.9%，未抽菸者只有 29.2% 是 Wild type，在 *EGFR* 突變族群中佔多數的是未抽菸組高達 75.9%，其次是戒菸 15.7% 及抽菸 8.4%。不管是在 NSCLC 病患還是 *EGFR* 突變組內都可看到未抽菸組與 *EGFR* 突變呈正相關。

依據組織學形態分成五組分別為肺腺癌 808 例(85.1%)、非小細胞肺癌未指定組織型態 97 例(10.2%)、鱗狀細胞癌 33 例(3.5%)、混合二種組織型態 8 例(0.9%)、細支氣管肺泡癌 3 例(0.3%)，與 *EGFR* 突變分析的關聯性為 $P < 0.001$ ，在統計學上有明顯差異。肺腺癌有 65.6% *EGFR* 突變，混合二種組織型態有 50% *EGFR* 突變，細支氣管肺泡癌 33.3%，非小細胞肺癌未指定組織型態 28.9%，鱗狀細胞癌 27.3%，*EGFR* Wild type 多為非小細胞肺癌未指定組織型態與鱗狀細胞癌，分別為 71.1% 及 72.7%，在 *EGFR* 突變族群中肺腺癌比率高達九成，其次是非小細胞肺癌未指定組織型態有 4.9%。

二、非小細胞肺癌病患 TNM 分期、整體臨床分期與 *EGFR* 的關聯

我們將 949 例病患將 TNM 分期與整體臨床分期分組分別與 *EGFR* 突變分析比對(表 2)，TNM (腫瘤分期)-T0 期 4 例、T1 期 126 例、T2 期 195 例、T3 期 149 例、T4 期 475 例與 *EGFR* 突變分析比對，*EGFR* 突變分佈為 T0 期 3 例、T1 期 77 例、T2 期 116 例、T3 期 88 例、T4 期 288 例，P 值為 0.967 在統計學上沒有顯著差異(表 2)。TNM-N0 期 269 例、N1 期 66 例、N2 期 253 例、N3 期 361 例與 *EGFR* 突變分析比對，*EGFR* 突變分佈 N0 期 176 例、N1 期 40 例、N2 期 153 例、N3 期 203 例，P 值為 0.141 在統計學上沒有顯著差異。TNM-M0 期 240 例、M1 期 709 例與 *EGFR* 突變分析比對 $P = 0.004$ ，在統計學上有明顯差異，*EGFR* 突變分佈 M0 期 126 例(52.5%)、M1 期 446(62.9%)，由此觀察到 M1 期 *EGFR* 突變率較 M0 期高，佔突變比率 78.0%。

整體臨床分期-Stage I 期 101 例、II 期 34 例、III 期 105 例、IV 期 709 例與 *EGFR* 突變分析比對 $P < 0.001$ ，在統計學上有明顯差異，*EGFR* 突變率整體臨床分期 I 期 70 例(69.3%)、II 期 18 例(52.9%)、III 期 38 例(36.2%)、IV 期 446 例(62.9%)，第 III 期 *EGFR* 突變率較低，第 I 期突變率最高，病人人數第 II 期最少(3.6%)。

表 2 非小細胞肺癌病患 TNM 分期、整體臨床分期與 *EGFR* 的關聯

特徵	數目(%) (N=949)	<i>EGFR</i> 突變 數目(%)	<i>EGFR</i> 未突變 數目(%)	P-value	<i>EGFR</i> 突變比率* (N=572)	
腫瘤分期-T	0	4 (0.4)	3 (75.0)	0.967	1 (25.0)	0.5
	1	126 (13.3)	77 (61.1)		49 (38.9)	13.5
	2	195 (20.5)	116 (59.5)		79 (40.5)	20.3
	3	149 (15.7)	88 (59.1)		61 (40.9)	15.4
	4	475 (50.1)	288 (60.6)		187 (39.4)	50.3
腫瘤分期-N	0	269 (28.3)	176 (65.4)	0.141	93 (34.6)	30.8
	1	66 (7.0)	40 (60.6)		26 (39.4)	7.0
	2	253 (26.7)	153 (60.5)		100 (39.5)	26.7
	3	361 (38.0)	203 (56.2)		158 (43.8)	35.5
腫瘤分期-M	0	240 (25.3)	126 (52.5)	0.004	114 (47.5)	22.0
	1	709 (74.7)	446 (62.9)		263 (37.1)	78.0
整體臨床分期-stage	I	101 (10.6)	70 (69.3)	<0.001	31 (30.7)	12.2
	II	34 (3.6)	18 (52.9)		16 (47.1)	3.2
	III	105 (11.1)	38 (36.2)		67 (63.8)	6.6
	IV	709 (74.7)	446 (62.9)		263 (37.1)	78.0

* *EGFR* 突變比率是指 *EGFR* 突變數目中案例比率，算式： $EGFR$ 突變數目/ $EGFR$ 突變總數*100

三、肺腺癌病患臨床特徵與 *EGFR* 的關聯

由本研究數據指出大部分的 *EGFR* 突變都是肺腺癌，為了更進一步了解肺腺癌與臨床特徵之間的關係，我們進一步分析。我們篩選肺腺癌病患共有 808 例檢體分別再以年齡、性別、抽菸史與 *EGFR* 結果分析比對。年齡方面小於 65 歲 352 例，大於 65 歲 456 例，年齡與 *EGFR* 突變分析，P 值為 0.445 在統計學上沒有顯著差異(表 3)。

性別方面女性有 423 例(52.4%)、男性有 385 例(47.6%)與 *EGFR* 突變分析的關聯性為 $P < 0.001$ ，在統計學上有明顯差異，可看出男性在肺腺癌裡 *EGFR* 突變比率由非小細胞肺癌群組的 46.8% 增加到 54.0%，在肺腺癌族群裡男性產生不一樣的 *EGFR* 分佈；女性 *EGFR* 突變仍有 76.1%，*EGFR* 突變發生率男女比為 1:1.6，在 *EGFR* 突變組中，男性 39.2%，女性 60.8%。抽菸史方面，未抽菸 550 例(68.1%)、戒菸 161 例(19.9%)、抽菸 97 例(12.0%)，與 *EGFR* 突變分析的關聯性為 $P < 0.001$ ，在統計學上有明顯差異，未抽菸者有 74.0% *EGFR* 突變，戒菸與抽菸多為 *EGFR* Wild type 分別為 50.9%、54.6%，在 *EGFR* 突變中未抽菸有 76.8%，佔最多，其次是戒菸 14.9% 及抽菸 8.3%，從數據可觀察到戒菸及抽菸在肺腺癌群組當中 *EGFR* 突變率都有些微上升。肺腺癌病患未抽菸例數最多有 550 例，*EGFR* 高達 74% 突變率，由此可知未抽菸與抽菸和 *EGFR* 突變相關聯，而 *EGFR* 高突變率與不抽菸呈正相關。

表 3 肺腺癌病患臨床特徵與 *EGFR* 的關聯

特徵	數目 (%) (N=808)	<i>EGFR</i> 突變 數目 (%)	<i>EGFR</i> 未突變 數目 (%)	P-value	<i>EGFR</i> 突變比率* (N=530)
年齡 <65 歲	352(43.6)	236(67.0)	116(33.0)	0.445	44.5
>=65 歲	456(56.4)	294(64.5)	162(35.5)		55.5
性別 女	423(52.4)	322(76.1)	101(23.9)	<0.001	60.8
男	385(47.6)	208(54.0)	177(46.0)		39.2
抽菸史 從不抽菸	550(68.1)	407(74.0)	143(26.0)	<0.001	76.8
已戒菸	161(19.9)	79(49.1)	82(50.9)		14.9
目前抽菸	97(12.0)	44(45.4)	53(54.6)		8.3

* *EGFR* 突變比率是指 *EGFR* 突變數目中案例比率，算式： $EGFR$ 突變數目/ $EGFR$ 突變總數*100

四、整體非小細胞肺癌病患 *EGFR* 突變類型分佈

非小細胞肺癌總計 949 例，*EGFR* 突變類型分佈為 Exon21 L858R 257 例(27.1%)、Exon19 deletion 248 例(26.1%)、Exon21 L861Q 12 例(1.3%)、Exon20 insertion 10 例(1.1%)、Exon18 G719X 突變 8 例(0.9%)、Exon20 S768I 突變 4 例(0.4%)、二種突變有 33 例(3.4%)、Wild type 377 例(39.6%)，突變率 60.3% (表 4)。

肺腺癌 808 例病患 *EGFR* 突變類型分佈為 Exon21 L858R 242 例(30.0%)、Exon19 deletion 224 例(27.7%)、Exon21 L861Q 12 例(1.5%)、Exon20 insertion 10 例(1.2%)、Exon18 G719X 突變 8 例(0.9%)、Exon20 S768I 突變 4 例(0.5%)、二種突變有 30 例(3.7%)、Wild type 278 例(34.5%)，突變率 65.5%，由非小細胞肺癌與肺腺癌二群組可觀察出 *EGFR* 突變類型 Exon21 L858R 比率最高，Exon19 deletion 次之。

接下來細分非小細胞肺癌中 *EGFR* 對 TKI 藥物 Gefitinib, Erlotinib 感受性分佈情形，可觀察到對 *EGFR*-TKI 敏感性類型有 Exon21 L858R 44.6%、Exon19 deletion 43.9%、Exon21 L861Q 2.5%、Exon18 G719X 2.1% 共 93.1%，而最常見的二種突變為 Exon21 L858R、Exon19 deletion 共佔 88.5%；*EGFR*-TKI 抗藥性或是反應仍有待釐清的有 Exon20 T790M 3.6%、Exon20 insertion 1.7%、Exon20 S768I 1.6% 共佔 6.9%。

表 4 非小細胞肺癌病患 EGFR 突變類型分佈

突變位點	數目	百分比	累積百分比
L858R	257	27.1%	27.1%
Ex.19 Deletion	248	26.1%	53.2%
L861Q	12	1.3%	54.5%
Insertion	10	1.1%	55.5%
G719X	8	0.9%	56.4%
S768I	4	0.4%	56.8%
T790M+Ex.19 Deletion	15	1.6%	58.4%
T790M+L858R	7	0.7%	59.2%
G719X+S768I	3	0.3%	59.5%
S768I+L858R	3	0.3%	59.8%
Ex.19 Deletion+L858R	2	0.2%	60.0%
G719X+L861Q	1	0.1%	60.1%
L858R+L861Q	1	0.1%	60.2%
Ex.19 Deletion+L861Q	1	0.1%	60.3%
未突變 Wild type	377	39.7%	100.0%
總數	949	100.0%	

非小細胞肺癌 Exon19 deletion 及 Exon 21 L858R 在 EGFR-TKI 敏感性突變類型中佔了 88.5%，我們想了解這二種基因類型在年齡、性別、抽菸史上是否有所差異 (表 5)。在年齡方面小於 65 歲 227 例，65 歲以上 278 例與 Exon19 deletion 及 Exon 21 L858R 的關聯性為 $P=0.001$ ，在統計學上有明顯差異，在小於 65 歲 Exon19 deletion 130 例(57.3%)佔多數而在 65 歲以上則是以 Exon 21 L858R 160 例(57.6%)居多，性別方面女性 313 例，男性 192 例與 Exon19 deletion 及 Exon 21 L858R 的關聯性為 $P=0.075$ 在統計學上沒有差異，由此可知女性雖有 62% EGFR 突變，但在男女性別上突變類型 Exon19 deletion 及 Exon 21L858R 之間並無特別明顯的差異。抽菸史方面未抽菸有 385 例，戒菸 80 例，抽菸 40 例與 Exon19 deletion 及 Exon 21 L858R 的關聯性為 $P=0.008$ 在統計學上有顯著差異，未抽菸以 Exon 21 L858R 佔多數有 210 例 (54.5)%，而戒菸與抽菸皆以 Exon19 deletion 佔多數，分別為 46(57.5%)、27(67.5%)。肺腺癌病患臨床特徵與 EGFR Exon19 deletion 及 Exon 21 L858R 的關聯性與非小細胞肺癌病患有一致的結果。

表 5 非小細胞肺癌病患臨床特徵與 EGFR Exon19 及 Exon21 關聯

特徵	數目(%) (N=505)	EGFR 突變種類		P-value
		Exon 19 deletion 數目(%)	Exon 21 L858R 數目(%)	
年齡	<65 歲	130 (57.3)	97 (42.7)	0.001
	≥65 歲	118 (42.4)	160 (57.6)	
性別	女	144 (46.0)	169 (54.0)	0.075
	男	104 (54.2)	88 (45.8)	
抽菸史	從不抽菸	175 (45.5)	210 (54.5)	0.008
	已戒菸	46 (57.5)	34 (42.5)	
	目前抽菸	27 (67.5)	13 (32.5)	

肆、結論

一、研究結果討論

隨著分子診斷技術的進步個人化醫療時代的來臨，台灣地區非小細胞肺腺癌病患常規性接受腫瘤 *EGFR* 基因檢測，利用 *EGFR* 檢測結果指引臨床醫師使用標靶藥物治療的依據，腺癌患者若有 *EGFR* 突變，選擇 *EGFR*-TKI 標靶藥物治療效果比傳統化療來的好。本研究結果提供台灣地區非小細胞肺癌包括肺腺癌 *EGFR* 突變的分佈情形與生物特徵及病理特徵之間的關聯性。在非小細胞肺癌 *EGFR* 基因分析結果中突變型與 Wild type 和年齡是不相關的，這與其他研究報告一致[11-13]，在性別方面是有關聯的 ($P < 0.001$)，女性 *EGFR* 突變率(74.1%)較男性(46.8%)高。在許多其他的研究指出女性病患有高突變率，不論是白種人及黃種人都有看到相同的結果，有一部分與女性未抽菸比率較高有關，但是女性比男性有較高的 *EGFR* 突變，這些性別上的差異原因是未知的。根據抽菸史分析，我們的分佈為 64.6%未抽菸、22.1%戒菸、13.3%抽菸，*EGFR* 突變率為未抽菸 70.8%、戒菸 42.9%、抽菸 38.1%，未抽菸病患較抽菸病患高出 1.8 倍的突變率。An SJ et al.提及抽菸與非抽菸的腫瘤在分子機制上是有所差異的[14]。抽菸者通常有較高頻率的 *KRAS* 基因突變，而在非抽菸者身上卻是 *EGFR* 突變居多[15]。而本研究中受測的病患未抽菸比率有 64.6%比丹麥(6.2%)、日本(30%)、中國南方(45.7%)比率高，這可能是造成本研究中 *EGFR* 突變率 60.3%較其他研究報告還高的原因[11, 12, 16]。多篇研究指出肺腺癌的病患比其他組織類型有較高的 *EGFR* 突變率[12, 16-19]，在我們的結果也看到關聯性，肺腺癌病患 *EGFR* 突變率為 65.6%，比鱗狀細胞癌 27.3%高，不同的組織型態對 *EGFR*-TKI 藥物的反應不同，這可以呼應 Chiu CH et al.指出 *EGFR*-TKI 藥物使用在於肺腺癌 *EGFR* 突變病患身上有較佳的效果，反之用在鱗狀細胞癌患者身上反應較差[20]。

分析非小細胞肺癌 TNM 分期、整體臨床分期與 *EGFR* 突變之間的關聯性，我們的結果顯示 TNM-M 期、整體臨床分期與 *EGFR* 突變相關(分別 $P = 0.004$; $P < 0.001$)，TNM-M1 期 *EGFR* 突變發生率較高(62.9%)，整體臨床分期第 I 期的 *EGFR* 突變率最高(69.3%)、第 III 期 Wild type 居多(63.8%)，這項結果與其他研究有所不同，有些研究指出 TNM 及整體臨床分期與 *EGFR* 突變無關，有些研究卻發現 TNM-T 期、TNM-N 期與 *EGFR* 突變有關[16]，可能是因為族群造成的差異，真正的原因我們尚未了解，可能需要更多的研究調查才能探討。

因為健保局對標靶藥物用藥的規範，在本研究受測的非小細胞肺癌病患以肺腺癌居多，我們進一步檢驗肺腺癌病患臨床生理特徵是否與 *EGFR* 相關，在年齡方面與針對非小細胞肺癌的分析類似同樣不具關連性、性別和抽菸史都與非小細胞肺癌族群有相同的結果，在肺腺癌中男女性的 *EGFR* 突變率皆提高，這表示肺腺癌的病患有較高 *EGFR* 突變，抽菸史也有同樣情形，未抽菸人數由 64.6%提升到 68.1%，*EGFR* 突變率也從 70.8%提升到 74%。肺腺癌病患在非抽菸及女性中我們都看到 *EGFR* 突變率較非小細胞肺癌族群高，相同的結果也被 Tokumo M et al.報導過[11]。

根據我們的統計非小細胞肺癌病患 *EGFR* 突變類型分佈最多的為 Exon21 L858R(27.1%)及 Exon19 deletion (26.1%) 這和大多數的研究一樣。探討 Exon19 deletion 和 Exon21 L858R 與年齡相關，小於 65 歲主要是 Exon19 deletion，大於 65 歲是 Exon21 L858R，抽菸與戒菸主要是 Exon19 deletion，未抽菸是 Exon21 L858R，性別方面是不相關的，這些結果與其他的研究不盡相同，例如 Lai Y 等人就說明這些突變類型與性別和抽菸無關[21]，Wei WE 等人指出男性主要 Exon19 deletion，女性主要 Exon21 L858R[16]，Isaka T 團隊與我們的結果一致抽菸病患 Exon19 deletion 較多，未抽菸病患以 Exon21 L858R 為主[22]，影響這些突變類型的原因，在各個研究中沒有完全一致的結果。

在整體 *EGFR* 突變中，*EGFR*-TKI 敏感性的突變類型佔 93.1%，抗藥性類型 6.9%，抗藥性突變中最常見的類型是 T790M 以 methionine 取代 threonine，此突變增強了對 ATP 的親和力而產生對 gefitinib 及 erlotinib 的抗藥性。Exon 20 Insertion 與原發性 TKI 抗藥性相關，它可以促進 *EGFR* 激酶結構區域的激活影響 *EGFR* 對 gefitinib、erlotinib 的親和力產生抗性，有 Exon 20 Insertion 突變的患者應該接受不可逆的

抑製劑 afatinib，而不是 gefitinib、erlotinib [23]。在我們的研究中共有 22 例出現 T790M，這些與抗藥性有關的檢驗結果提供臨床醫師用藥重要依據。

二、總結

透過本研究，我們確認南台灣非小細胞肺癌患者中 60.3%有 *EGFR* 基因突變，肺腺癌中有 65.5%突變率。在非小細胞肺癌中就 *EGFR* 突變率來看肺腺癌突變(65.6%)比鱗狀上皮細胞(27.3%)更高，未抽菸(70.8%)比戒菸(42.9%)和抽菸(38.1%)高，女性(74.1%)比男性(46.8%)高，TNM-M1 比 TNM-M0 高。對第一線 TKI 敏感性的 *EGFR* 突變類型有 93.1%，抗藥性類型有 6.9%。Exon21 L858R (27.1%)及 Exon19 deletion (26.1%)佔大多數，這二種類型與性別不相關，與年齡有明顯差異，小於 65 歲主要是 Exon19 deletion，大於 65 歲是 Exon21 L858R，抽菸與戒菸主要是 Exon19 deletion，未抽菸是 Exon21 L858R。本研究透過臨床特徵與 *EGFR* 突變交叉分析，讓我們更加了解台灣地區非小細胞肺癌 *EGFR* 分佈情形及關聯性。

參考文獻

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, DM. Parkin, D. Forman, and F. Bray. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-86.
- [2] N. Howlader, A. M. Noone, M. Krapcho, D. Miller, K. Bishop, S. F. Altekruse, C. L. Kosary, M. Yu, J. Ruhl, Z. Tatalovich, A. Mariotto, D. R. Lewis, H. S. Chen, E. J. Feuer, and K. A Cronin. (eds). (2016) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute, retrieved from: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/
- [3] Lung cancer statistics, Cancer Research UK 2016 (n.d.). retrieved from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/lung-cancer>
- [4] Cancer Registry Annual Report, 2013 Taiwan 2016. (n.d.). retrieved from: <http://tcr.cph.ntu.edu.tw/main.php?Page=N2>
- [5] C. Printz. (2013). Smokers have 10 times more genetic damage in lung cancer tumors. *Cancer*, 119(2), 248-249.
- [6] S. Gahr, R. Stoehr, E. Geissinger, J. H. Ficker, W. M. Brueckl, A. Gschwendtner, S. Gattenloehner, F. S. Fuchs, et al. (2013). EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. *British Journal of Cancer*, 109(7), 1821-1828.
- [7] R. Rosell, T. Moran, C. Queralt, R. Porta, F. Cardenal, C. Camps, M. Majem, G. L. Vivanco, D. Isla, M. Provencio, et al. (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(10), 958-967.
- [8] A. Sutani, Y. Nagai, K. Udagawa, Y. Uchida, N. Koyama, Y. Murayama, T. Tanaka, H. Miyazawa, M. Nagata, M. Kanazawa, et al. (2006). Gefitinib for non-small-cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor gene mutations screened by peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *British Journal of Cancer*, 95, 1483-1489.
- [9] W. D. Travis, E. Brambilla, A. P. Burke, A. Marx, and A. G. Nicholson. (Eds). (2015). *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*, 4th edition. Lyon, France: IARC Press.

- [10] J. P. Reynolds, R. R. Tubbs, E. C. Minca, S. MacNamara, F. A. Almeida, P. C. Ma, N. A. Pennell, and J. C. Cicensia. (2014). EGFR mutational genotyping of liquid based cytology samples obtained via fine needle aspiration (FNA) at endobronchial ultrasound of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 86(2), 158-63.
- [11] M. Tokumo, S. Toyooka, K. Kiura, H. Shigematsu, K. Tomii, M. Aoe, K. Ichimura, T. Tsuda, M. Yano, K. Tsukuda, M. Tabata, H. Ueoka, M. Tanimoto, H. Date, A. F. Gazdar, and N. Shimizu. (2005). The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clinical Cancer Research*, 11(3), 1167-1173.
- [12] B. G. Skov, E. Høgdall, P. Clementsen, M. Krasnik, K. R. Larsen, J. B. Sørensen, T. Skov, and A. Mellemgaard. (2015). The prevalence of EGFR mutations in non-small cell lung cancer in an unselected Caucasian population. *APMIS*, 123, 108-115.
- [13] T. Tanaka, M. Matsuoka, A. Sutani, A. Gemma, M. Maemondo, A. Inoue, S. Okinaga, M. Nagashima, S. Oizumi, K. Uematsu, Y. Nagai, G. Moriyama, H. Miyazawa, K. Ikebuchi, S. Morita, K. Kobayashi, and K. Hagiwara. (2010). Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *International Journal of Cancer*, 126, 651-655.
- [14] S. J. An, Z. H. Chen, J. Su, X. C. Zhang, W. Z. Zhong, J. J. Yang, Q. Zhou, X. N. Yang, L. Huang, J. L. Guan, Q. Nie, H. H. Yan, T. S. Mok, and Y. L. Wu. (2012). Identification of enriched driver gene alterations in subgroups of non-small cell lung cancer patients based on histology and smoking status. *PLoS One*, 7(6), e40109.
- [15] A. M. Chapman, K. Y. Sun, P. Ruestow, D. M. Cowan, and A. K. Madl. (2016). Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. *Lung Cancer*, 102, 122-134.
- [16] W. E. Wei, N. Q. Mao, S. F. Ning, J. L. Li, H. Z. Liu, T. Xie, J. Zhong, Y. Feng, C. H. Wei, and L. T. Zhang. (2016). An Analysis of EGFR Mutations among 1506 Cases of Non-Small Cell Lung Cancer Patients in Guangxi, China. *PLoS One*, 11(12), e0168795.
- [17] S. P. D'Angelo, M. C. Pietanza, M. L. Johnson, G. J. Riely, V. A. Miller, C. S. Sima, M. F. Zakowski, V. W. Rusch, M. Ladanyi, and M. G. Kris. (2011). Incidence of EGFR exon 19 deletions and L858R in tumor specimens from men and cigarette smokers with lung adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 2066-70.
- [18] Å. Helland, H. M. Skaug, L. Kleinberg, M. L. Iversen, A. K. Rud, T. Fleischer, C. Sagerup, S. Solberg, L. Jørgensen, S. Ariansen, and O. T. Brustugun. (2011). EGFR gene alterations in a Norwegian cohort of lung cancer patients selected for surgery. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(5), 947-50.
- [19] P. Perez-Moreno, E. Brambilla, R. Thomas, and J. C. Soria. (2012). Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clinical Cancer Research*, 18(9), 2443-51
- [20] C. H. Chiu, T. Y. Chou, C. L. Chiang, and C. M. Tsai. (2014). Should EGFR mutations be tested in advanced lung squamous cell carcinomas to guide frontline treatment? *Cancer Chemother. Pharmacol*, 74, 661-665.
- [21] Y. Lai, Z. Zhang, J. Li, D. Sun, Y. Zhou, T. Jiang, Y. Han, L. Huang, Y. Zhu, X. Li, and X. Yan. (2013). EGFR mutations in surgically resected fresh specimens from 697 consecutive Chinese patients with non-small cell lung cancer and their relationships with clinical features. *International Journal of Molecular Science*, 14, 24549-24559.

- [22] T. Isaka, T. Yokose, H. Ito, M. Nagata, H. Furumoto, T. Nishii, K. Katayama, K. Yamada, H. Nakayama, and M. Masuda. (2015). Correlations between the EGFR mutation status and clinicopathological features of clinical stage i lung adenocarcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 94(42), e1784.
- [23] W. Pao, V. A. Miller, K. A. Politi, G. J. Riely, R. Somwar, M. F. Zakowski, M. G. Kris, and H. Varmus. (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2(3), e73.