

Title	Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR $\beta$ 2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay
Author(s)	Yamamoto, Noriaki
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/26286">https://hdl.handle.net/11094/26286</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

### Synopsis of Thesis

〔論文題名：Thesis Title〕

Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR $\beta$  2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay.

(One-step methylation-specific PCR法による乳癌患者血清中DNAのGSTP1, RASSF1A, RAR $\beta$  2プロモーター異常メチル化の検出)

学位申請者： 山本 憲明  
Name

〔目的〕

遺伝子の異常なメチル化は乳癌をはじめとする多くの癌で観察され遺伝子の発現調節に関与している。また、癌において、癌抑制遺伝子のプロモーター領域にメチル化が観察されることから、遺伝子のメチル化は発癌過程において重要な役割を担っていると考えられている。したがって、遺伝子のメチル化は癌マーカーとしての使用が期待される。また、癌特異的なプロモーターのメチル化は癌患者の血清中に浮遊するDNAにおいても観察されることが知られている。したがって血中浮遊ゲノム遺伝子のメチル化解析は、癌の診断を可能にすると考えられている。しかし、これまでの遺伝子のメチル化解析方法は、複雑で時間を要し、DNAのロスが多いことから、臨床検査に応用するのは困難であった。そこで、迅速かつ効率の良いDNAメチル化解析法One-step methylation specific PCR法 (OS-MSP法) を構築し、血中浮遊ゲノム遺伝子のメチル化解析による癌診断法の臨床有用性を検討することを目的とした。

〔方法〕

- 1) OS-MSP法：血中浮遊ゲノムDNAを効率よく採取するために、300 $\mu$ lの血清からゲノムDNAの抽出を経ずタンパク質可溶化処理およびバイサルファイト処理を行い、シトシンからチミンへの塩基変換を行った。変換されたDNAの精製を行い、得られたDNA溶液を用い、methylation specific PCR (MSP) をTaqman probeを用いたreal time PCR法により検出した。
- 2) 乳癌マーカー遺伝子の決定：既に乳癌特異的な異常メチル化が報告されている遺伝子のうち15遺伝子、17CpGアイランド領域について、バイサルファイト反応後に塩基配列解析を行うことで、各遺伝子の乳癌におけるメチル化状態を検証した。
- 3) 乳癌切除術を施行された原発巣組織94例および53例の正常部位組織により組織中のDNAのメチル化状態を検討した。また、Stage I-IIIに分類される乳癌患者101例および遠隔転移乳癌58例における血清、対照群として健常者87例の血清により、血中浮遊ゲノムDNAのメチル化状態を検討した。

〔成績〕

- 1) OS-MSP法は、工程を2時間に短縮でき、これまでの解析方法と比較して約200倍高い感度を示した。また、バイサルファイト処理による塩基変換効率も高いことが示された。
- 2) 乳癌を検出するメチル化遺伝子マーカーとして、既存の15種類の遺伝子の有用性を再評価した。その結果、GSTP1、RASSF1A及び、RAR $\beta$  2が、乳癌を検出するメチル化マーカーとして有用であることが示された。
- 3) GSTP1、RASSF1A及び、RAR $\beta$  2 をメチル化遺伝子マーカーとして、遠隔転移患者由来血清サンプルおよび、健常者由来血清サンプルをOS-MSP法により解析した。その結果、3遺伝子のうち、少なくとも1遺伝子がメチル化されているものを陽性とした場合、乳癌組織 (n=94) では98%の陽性率であった。また、初発乳癌患者血清 (n=101) では22%の陽性率であり、遠隔転移乳癌患者では陽性率は、55% (n=58) であった。一方、健常者血清 (n=87) の偽陽性率は、7%であった。従来使用されている癌マーカーCEAおよびCA15-3と比較した場合、stage I (24% vs. 8%), Stage II (26% vs. 8%), Stage III (18% vs. 19%), 遠隔転移 (55% vs. 59%) の結果が得られ、早期乳癌において、OS-MSP法が高い感度を示した。また、従来の癌マーカーCEAおよびCA15-3とOS-MSP法を併用した場合、遠隔転移乳癌患者では陽性率が78%を示した。

〔総括〕

本研究により、少量の血清により短時間に高感度かつ簡便に血清中DNAのメチル化を検出可能なOS-MSP法が構築された。さらにOS-MSPと従来の癌血清マーカーCEAやCA15-3を併用することにより、遠隔転移乳癌をさらに高い感度で検出が可能となることが示された。本研究結果により血液を用いた侵襲性の低い新しい癌診断法が実現されたことから、今後様々な癌種に対する検査への応用が期待される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 山本 憲明	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 野口 眞三郎
	副 査 大阪大学教授 奥村 日之進
	副 査 大阪大学教授 森井 英一

**論文審査の結果の要旨**

本研究の目的は、迅速で効率の良いメチル化DNA検出法であるOne-step methylation specific PCR法 (OS-MSP法) を構築し、乳癌患者の血清中のcirculating tumor genome (CTG) の検出へ応用することである。OS-MSP法は、メチル化DNA検出の工程を大幅に短縮することを可能とし、また、従来法と比較して高い検出能 (感度は約200倍) を有している。本申請者は、GSTP1、RASSF1A及び、RAR $\beta$ 2 をターゲットとしたOS-MSP法を構築し乳癌患者由来血清サンプルおよび健常者由来血清サンプルに適応した結果、OS-MSP法は、従来の腫瘍マーカー (CEA、CA15-3) よりも高い感度を示すこと、更には、OS-MSP法と従来の腫瘍マーカーを併用することにより、更に感度を向上できることを示した。

OS-MSP法を構築し、臨床応用 (乳癌の早期発見、再発の早期発見、予後予測、治療効果モニタリング等) への可能性を示した本研究は学位論文に値するものと判断する。