

Title	Quantitative polymerase chain reaction analysis with allele-specific oligonucleotide primers for individual IgH VDJ regions to evaluate tumor burden in myeloma patients
Author(s)	佐多, 弘
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51975
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	佐多 弘
論文題名 Title	Quantitative polymerase chain reaction analysis with allele-specific oligonucleotide primers for individual IgH VDJ regions to evaluate tumor burden in myeloma patients (多発性骨髄腫患者特異的定量PCR法を用いた腫瘍量の評価)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕多発性骨髄腫は、近年サリドマイドやレナリドミド、ボルテゾミブといった治療効果の高い新規薬剤の出現により、治療後、完全寛解 (CR) が得られるようになり、CRの意義が再確認されるようになった。さらにCRの程度を検討するためフローサイトメトリー法やPCR法といった、より感度の高い検査による微小残存病変 (MRD) の評価・測定が重要とされつつある。骨髄腫細胞が有するIgH遺伝子の再構成部位を標的として作成した患者特異的プライマーを用いたASO(allele-specific oligonucleotide)-PCR法は最も感度が高いことが知られている一方で、プライマーを設計できない症例があること、非常に高価な検査であること、煩雑で手間がかかることなどの問題点がある。既報の多くは定性や半定量で、定量PCRについては報告されておらず、また、測定している検体も多くは骨髄細胞を用いたもので、末梢血細胞や血清のcell-free DNAなどを用いて測定している報告はない。そこで、多発性骨髄腫患者の骨髄細胞、末梢血細胞、血清のcell-free DNAの検体を用いて定量ASO-PCR法を施行し、多発性骨髄腫患者の腫瘍量の評価を行い、その臨床的意義について検討する。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕2011年12月より2012年11月までにエントリーされた阪大病院と阪大関連病院の19施設で新規薬剤を用いてCRを目指して治療する多発性骨髄腫の患者30名を対象に、診断時の患者特異的プライマーを作成し、診断時と治療開始半年後、1年後の骨髄単核球 (BMMNC)、末梢血単核球 (PBMNC)、血清 (serum) の定量ASO-PCR値と診断時の骨髄中のCD20陽性B細胞分画の定量ASO-PCR値を測定する観察研究を行った。骨髄を単核球分離して、CD38^{high}CD20⁻の細胞集団 (骨髄腫細胞分画) とCD38⁻CD20⁺の細胞集団 (B細胞分画) にFACSを用いてソーティングし、CD38^{high}CD20⁻の腫瘍細胞を用いてVDJ領域の症例特異的なプライマーを作成した。骨髄の単核球と末梢血の単核球からmRNAを抽出しreal-time RT-PCRを用いて定量化を行った。定量値は内因性コントロールβ-Actinを用いてIgH/β-Actin (定量ASO-PCR値) として算出した。血清のcell-free DNAについては血清からDNAを抽出し、real-time PCRにて測定を行った。また、診断時の骨髄中のCD20陽性B細胞の単核球から抽出したmRNAからも同様に定量ASO-PCR値の測定を行った。患者背景は症例数30例で、年齢中央値は64.5歳、男女比は16:14で、IgG型18例、IgA型7例、BJP型5例であった。IgG型18例中15例、IgA型7例中6例、BJP型5例中1例で定量ASO-PCR値を測定することが可能であった。BMMNCとPBMNCを用いて測定した定量ASO-PCR値が診断時、治療開始後6ヶ月、12ヶ月のいずれの時点においても有意な相関を認めた。診断時の骨髄中B細胞を用いた定量ASO-PCR値は、22例中17例で測定が可能で、診断時のBMMNCとPBMNCを用いて測定した定量ASO-PCR値と相関していることが明らかになった。また、血清のcell-free DNAを検体として用いてもASO-PCRが行えたが、その値は診断時のみBMMNCとPBMNCを用いて測定した定量ASO-PCR値と相関する傾向を認めた。 〔総 括(Conclusion)〕本研究において、患者特異的プライマーを用いた定量ASO-PCR法によりBMMNCとPBMNCの値が相関を認めたことから、検査法を工夫し感度をあげることにより、PBMNCを用いてより侵襲の少ないMRD測定法を確立できることが明らかになった。また、BMMNC、PBMNC以外にCD20⁺CD38⁻B細胞分画や血清のcell-free DNAを用いて定量ASO-PCR値の測定を行うことができたことから、これらの検体を用いた定量ASO-PCR法が骨髄腫の病態理解や新たな治療効果判定法に有用であることが示された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 佐多 弘		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 金 倉 謙
	副 査	大阪大学教授 下 羽 伸 一郎
	副 査	大阪大学教授 竹 原 徹 郎

論文審査の結果の要旨

多発性骨髄腫の治療効果判定は、骨髄腫細胞が産生するM蛋白（IgGやIgAやペンスジョンズ蛋白など）の定量によって行うことが一般的であるが、M蛋白消失が認められても骨髄中の微小残存病変(MRD)が検出されることは周知の事実である。MRDを評価するのに骨髄腫細胞のIGH遺伝子配列の患者特異的プライマーを用いたASO-PCR法は、最も高感度の測定方法である。本測定法は骨髄細胞を検体として用いることが一般的であるが、本研究では末梢血細胞、骨髄中Bリンパ球、血清セルフリーDNAを検体としてASO-PCR法による腫瘍量の定量を行い、その意義を検討した。その結果、末梢血細胞を用いてMRDの評価を行うことが可能であることを明らかにし、骨髄穿刺という侵襲の高い検査を行わずに病状を把握することが可能となることを示している。また、骨髄中Bリンパ球や血清セルフリーDNAを用いても定量ASO-PCR値の測定を行え、本測定法が骨髄腫の病態理解や新たな治療効果判定に有用であることも示している。以上より本研究は学位に値すると考える。