



Title	Methylated DNA and Total DNA in Serum Detected by One-Step Methylation-Specific PCR Is Predictive of Poor Prognosis for Breast Cancer Patients
Author(s)	藤田, 倫子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59827">https://hdl.handle.net/11094/59827</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	藤 田 倫 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 9 4 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Methylated DNA and Total DNA in Serum Detected by One-Step Methylation-Specific PCR Is Predictive of Poor Prognosis for Breast Cancer Patients (One step methylation specific PCR 法により検出された血精中メチル化 DNA と全 DNA 量測定による乳癌患者の予後予測)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 野口 眞三郎 (副査) 教 授 野々村 祝夫 教 授 土岐 祐一郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

乳癌の予後予測因子として、リンパ節転移、腫瘍径、HG、ER、PR、HER2などが知られているが、精度は不十分であり、より簡便で精度の高い予後予測因子が必要である。近年、癌患者（肺癌、大腸癌、乳癌など）の血液に腫瘍由来のDNAが浮遊しており、癌患者の血中のDNA量やメチル化DNAが、予後との相関を認めたと報告されている。しかし、血中のDNA量は非常に少なく、乳癌において癌診断や予後予測として未だ臨床応用されていない。我々は血清中メチル化DNAを高感度に検出するone-step methylation-specific PCR (OS-MSP) 法を開発した。本研究では、血清中のGSTP1, RASSF1A, RARB遺伝子のメチル化をターゲットとして、乳癌患者の予後予測におけるOS-MSP法の有用性を検討した。

〔方法ならびに成績〕2000年から2004年10月までに大阪大学・乳腺内分泌外科で手術を施行したStage I, IIの乳癌患者336人を対象とした。観察期間は12-127ヶ月（中央値90ヶ月）であった。術前に採取した血清サンプル1mlを用いてOS-MSP法とReal-time PCR アッセイで血清中メチル化DNAと全DNA量を測定した。評価基準はメチル化については3遺伝子のうち少なくとも1つ陽性であった症例をメチル化陽性と判定し、DNA量は上三分位値をカットオフとし高DNA量群と低DNA量群に分類して比較した。結果、血清中メチル化DNA陽性例(n=33)は陰性例(n=303)よりもDisease-free survival (DFS)、Overall survival (OS)においていずれも有意に予後不良であった(術後100ヶ月の再発率 74% vs 88%, p=0.032; 術後100ヶ月の生存率 78% vs 95%, p=0.002, log rank test)。また、血清中全DNA量が高値群(n=112)は低値群(n=224)よりも有意に予後不良であった(術後100ヶ月の再発率 77% vs 91%, p=0.001; 術後100ヶ月の生存率 86% vs 97%, p=0.001, log rank test)。Cox比例ハザードモデルを用いた多変量解析において、DFSではメチル化は予後不良な傾向を示し(HR:2.225, 95%CI:0.99-5.00, p=0.052)、血清中全DNA量は独立した予後因子

であった(HR:2.698, 95%CI:1.47-4.94, p=0.001)。OSではメチル化、全DNA量はともに独立した予後因子であった(メチル化 HR:3.173, 95%CI:1.12-8.97, p=0.029; 全DNA量 HR:4.030, 95%CI:1.60-10.13, p=0.003)。更に、血清中メチル化DNA陽性かつ全DNA量が高値の患者(n=18)はそれ以外の患者に比して高度に予後不良であった(術後100ヶ月の再発率 57% vs 88%, p<0.001; 術後100ヶ月の生存率 65% vs 94%, P<0.001, log rank test)。多変量解析ではDFS, OSにおいてともに独立した有意な予後因子であった(HR:3.864, 95%CI:1.67-8.95, p=0.002; HR:5.981, 95%CI:2.01-17.81, p=0.001)。背景因子別にOSのハザード比を検討したが、いずれの背景因子においても血清中メチル化DNA陽性かつ全DNA量が高値の患者は予後不良な傾向を示した。

### 〔総 括〕

OS-MSP法によって検出された血清中メチル化DNAや全DNA量は既存の臨床病理学的因子とは独立した予後因子であり乳癌の予後予測に有用であることが示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本申請者は、申請者らの教室で開発された血清中メチル化DNA (GSTP1, RASSF1A, RARB遺伝子)を高感度に検出するone-step methylation-specific PCR (OS-MSP) 法の早期乳癌患者の予後予測における有用性を検討した。2000年3月から2004年10月までに手術を施行したStageI, IIの乳癌患者336人を対象とし、術前に採取した血清1mlを用いてOS-MSP法とReal-time PCRアッセイで血清中メチル化DNAと全DNA量を測定した。その結果、メチル化DNA陽性例(n=33)は陰性例(n=303)に比して無再発生存率および全生存率の何れにおいても有意に予後が不良であった。また、同様に全DNA量高値群(n=112)は低値群(n=224)に比して有意に予後不良であった。Cox比例ハザードモデルによる多変量解析においても、メチル化、全DNA量は全生存率に対する有意な予後不良因子であった。

OS-MSP法によって検出された血清中メチル化DNAや全DNA量が早期乳癌患者の予後予測に有用であることを示唆した本研究は、学位に値するものと認める。