

Title	Methylation of the SEPT9_v2 promoter as a novel marker for the detection of circulating tumor DNA in breast cancer patients
Author(s)	松井, 早紀
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61592
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">大阪大学の博士論文について 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	松井 早紀
論文題名 Title	Methylation of the <i>SEPT9_v2</i> promoter as a novel marker for the detection of circulating tumor DNA in breast cancer patients (乳癌患者における <i>SEPT9_v2</i> 遺伝子の新規メチル化マーカーとしての意義)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 癌患者の血中には腫瘍由来DNA (circulating tumor DNA ; ctDNA)が存在し、その検出には変異やメチル化など腫瘍由来のDNA変化が利用される。乳癌患者においてctDNAは、予後予測や治療モニタリングに有用である可能性が報告されている。大腸癌では、血中のメチル化<i>SEPT9_variant2</i> (<i>SEPT9_v2</i>) 遺伝子 (m<i>SEPT9</i>) が診断スクリーニング検査として商品化されている。本研究では、乳癌細胞株および乳癌組織における<i>SEPT9_v2</i>のメチル化状態を調べ、発現との関係を明らかにし、臨床病理学的意義についても検討した。また、血漿中m<i>SEPT9</i>を測定し、乳癌における新規メチル化マーカーとしての有用性を検討した。 〔方 法(Methods)〕 まず、乳癌細胞株12種、正常乳腺細胞株1種、原発性乳癌19例の乳癌・正常乳腺のペア凍結組織を対象とし、次世代シーケンサー (NGS) を用いて<i>SEPT9_v2</i>-methylation index (MI)を測定した。細胞株の発現量測定にはqRT-PCR法を用い、脱メチル化実験を行った。次に、当科にて術前化学療法 (NAC) を施行した乳癌患者107例を対象とし、NAC前に採取した凍結検体についてNGSでMIを測定した。この中の20例についてはFISH法でmRNA発現を評価した。さらに、<i>SEPT9_v2</i>と抗癌剤感受性の関連を検討するために、乳癌細胞株 (MDA-MB-468) を用いてsiRNAによる<i>SEPT9_v2</i> 特異的なknockdown実験を行った。最後に、原発性乳癌患者82人、転移性乳癌患者50人、健常人51人を対象とし、血漿中 (2ml) m<i>SEPT9</i>をmethylation specific PCR (MSP)法で検出した。 〔成 績(Results)〕 <i>SEPT9_v2</i>のメチル化 (MI$\geq$10%) は、乳癌細胞株の67% (8/12)および乳癌組織の53% (10/19)でみられたが、正常乳腺細胞株と乳腺組織ではみられなかった (いずれも0%)。乳癌細胞株では、MIと<i>SEPT9_v2</i> mRNA発現量の間に強い逆相関がみられ、脱メチル化剤によりmRNA発現が誘導された。乳癌組織のFISH法による検討では、低メチル化組織10例のうち8例で<i>SEPT9_v2</i>高発現であり、高メチル化組織では全例陰性を示し、乳癌組織においても<i>SEPT9_v2</i>発現とMIは逆相関していた。 NAC症例の解析では、乳癌サブタイプ別では、MIはnon-basal type (13.0%, n=84)においてbasal type (3.0%, n=23)より有意に高値であった (p<0.001)。また、抗癌剤感受性と<i>SEPT9_v2</i>のメチル化には有意な関連を認めなかった (多変量解析 p=0.440)。乳癌細胞株を用いたパクリタキセルとエピルビシンに対する抗癌剤感受性実験では、<i>SEPT9_v2</i>のknockdownはこれらの薬剤のIC50に有意な変化を認めず、<i>SEPT9_v2</i>の発現と抗癌剤感受性は関与しなかった。 血漿中m<i>SEPT9</i>の解析では、原発性乳癌患者の11% (9/82)、転移性乳癌患者の52% (26/50)でm<i>SEPT9</i>が検出されたが、腫瘍そのものに<i>SEPT9_v2</i>メチル化を認めた症例に限ると陽性率は34% (17/50)であった。一方、健常人では血漿中m<i>SEPT9</i>は全例陰性であり (0/51)、特異度は100%であった。 〔総 括(Conclusion)〕 乳癌において、<i>SEPT9_v2</i>のメチル化は癌細胞特異的にみられ、<i>SEPT9</i> mRNA発現を制御していた。乳癌患者の血漿中にm<i>SEPT9</i>が検出され、乳癌においても新規メチル化マーカーとなりうる可能性が示唆された。	

【

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 松井 早紀		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	野 口 真 三 郎
	副 査 大阪大学教授	森 村 英 一
	副 査 大阪大学教授	土 岐 祐 一 郎
論文審査の結果の要旨 本研究は、乳癌組織における <i>SEPT9_v2</i> のメチル化状態を調べ、血漿中の <i>SEPT9_v2</i> メチル化DNA (mSEPT9) の検出を試みたものである。<i>SEPT9_v2</i>-methylation index (MI) を測定したところ、<i>SEPT9</i> のメチル化は、乳癌細胞株の67%(8/12)および乳癌組織の53%(10/19)でみられたが、正常乳腺細胞株と乳腺組織ではみられなかった。乳癌細胞株ではMIと <i>SEPT9_v2</i> mRNA発現量の間に強い逆相関がみられ、脱メチル化剤により発現が誘導された。MIはnon-basal type (13.0%, n=84) でbasal type (3.0%, n=23) より有意に高値であった。次に、血漿中のmSEPT9を測定したところ、原発性乳癌患者の11%(9/82)、転移性乳癌患者の56%(26/50)でmSEPT9が検出されたが、健常人では検出されなかった(0/51)。mRNA発現を制御する <i>SEPT9</i> のメチル化は乳癌組織特異的に検出され、乳癌の新規メチル化マーカーとなり得る可能性を示唆した本研究は、学位に値すると考える。		