



Title	Detection of ESR1 mutations in plasma and tumors from metastatic breast cancer patients using next-generation sequencing
Author(s)	柳川, 雄大
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69430
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、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

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 柳川 雄大		
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	石井 菜一
	副 査 大阪大学教授	土岐 祐一郎

論文審査の結果の要旨

発表者は、エストロゲン受容体(ER)陽性乳癌のホルモン療法耐性の獲得に、ERをコードする*ESR1*遺伝子の点突然変異が関与していることに着目し、ER陽性乳癌患者の原発巣16例・転移巣46例・転移再発患者の血漿38例に対して、次世代シーケンサー(NGS)を用いて網羅的に*ESR1*遺伝子の全エクソン解析を行った。その結果、これまでに未報告の3変異; E279V・L536H・G557Rを同定した。また、これらの変異を導入した細胞実験により機能解析を行ったところ、L536H変異にエストロゲン非依存性の活性が認められ、ホルモン療法耐性への関与が疑われた。

多症例の乳癌患者の血中循環腫瘍DNAを対象として*ESR1*遺伝子をNGSで解析した報告は本論文が初めてであり、また、NGSによりホルモン療法耐性化に関わる未知の変異が同定できることの可能性を論じた本論文は博士課程学位の授与に値すると考えられる。

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	柳川 雄大
論文題名 Title	Detection of <i>ESR1</i> mutations in plasma and tumors from metastatic breast cancer patients using next-generation sequencing (転移性乳癌患者の血漿および腫瘍における次世代シーケンサーを用いた <i>ESR1</i> 変異の検出)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
エストロゲン受容体(ER)陽性乳癌に対してはホルモン療法が有効であるが、近年、ホルモン療法特にアロマターゼ阻害剤(AI)に対する耐性の獲得に、ERをコードする<i>ESR1</i>遺伝子の点突然変異(Y537S、D538G)が関与することが報告された。またそれらの解析にはデジタルPCRが汎用されているが、解析領域が限定されるデメリットがある。そこで本研究では、ER陽性乳癌患者の原発巣・転移巣・転移再発患者のcirculating tumor DNA(ctDNA)に対して、次世代シーケンサー(NGS)を用いて<i>ESR1</i>遺伝子のwhole exon sequencing (WES)を行い、網羅的に解析した。また、新規に同定した変異については、<i>in vitro</i>で機能解析を行いホルモン療法耐性との関連を検討した。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
ER陽性転移再発性乳癌患者の原発巣16例・転移巣46例・血漿38例を対象とした。<i>ESR1</i>エクソンの97.91%をカバーするプライマーを設計し、PCR法でライブラリ作成を行い、次世代シーケンサー;Ion Torrent PGMで解析した。腫瘍解析ではMutant allele frequency(MAF)は10%、血漿解析では3%をthresholdとした。結果、原発巣では変異は認めず、転移巣では4/46例(8.7%)に6変異、血漿では5/38例(13.2%)に7変異を認めた。なお、AI既治療例に限ると変異陽性率は転移巣では22.2%(4/18例)、血漿では15.3%(5/33例)であった。また、未報告の3変異;E279V・L536H・G557Rを認めた。なお、変異陽性症例全例にAI治療歴があり、術後補助療法としてAIを使用した症例(Adjuvant setting)よりも転移再発後の治療として使用した症例(Metastatic setting)に変異がみられる傾向にあった(4.8% vs 25.0%, $P = 0.071$)。しかし、AI治療期間の長さとの関連はみられなかった。 また、各種変異<i>ESR1</i>発現ベクター(wild type, Y537S, E279V, L536H, G557R)を導入した乳癌細胞株(AU565・SK-BR-3)を用いて機能解析を行った。転移巣で変異陽性であった症例のER免疫染色および導入細胞株のER蛍光免疫染色で発現部位を確認したが、いずれも核であった。しかし、ルシフェラーゼアッセイにて変異ERのプロモーター活性を測定したところ、E2非投与下でY537Sに次いで今回検出された3変異のうちL536Hのみ有意な活性上昇を認め、ホルモン療法耐性に関与する可能性が示唆された。また、Western blotによるNon-genomic pathway中のリン酸化シグナル測定では、MAPK・AKT共にリン酸化亢進はみられなかったが、ERのリン酸化はY537SとL536Hで亢進していた。	
〔総 括(Conclusion)〕	
ER陽性転移性乳癌の原発巣・転移巣および血漿のDNAに対してIon PGMで<i>ESR1</i>のWESを行い、未報告の変異E279V・L536H・G557Rを同定し、L536Hはactivating mutationであった。Hot spotに限定しないsequencingによる網羅的解析が有用であると考えられた。	