OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Highly sensitive detection of ESR1 mutations in cell-free DNA from patients with metastatic breast cancer using molecular barcode sequencing
Author(s)	増永, 奈苗
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72541
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

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）増永　奈苗

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	吉井英一
副　査	大阪大学教授	土岐祐一郎

論文審査の結果の要旨

発表者は、血中循環腫瘍DNA(ctDNA)の遺伝子変異を検出するために、次世代シークエンサー(NGS)に分子バーコード(MB)を導入し(MB-NGS)、血中の遺伝子変異をより高感度かつ網羅的に検出する方法を開発し、実際に34例のエストロゲン受容体(ER)陽性乳癌組織における*ESR1*遺伝子（変異のhotspotを含む一領域）の変異検索を行った。

その結果、通常のNGS解析(cutoff; 1%)では6例(17.6%)に7個の変異を認めたが、MB-NGS(cutoff; 0.1%)によりさらに4例追加の合計10例(29.4%)に13個の変異を認め、従来報告のないnon hotspot変異も同定できた。

分子バーコードによりbackground errorを減らし、高感度(>0.1%)なNGS解析が可能となったことで、今後MB-NGSの解析領域を広げ、より網羅的なctDNA解析に発展させることで、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	増永　奈苗
論文題名 Title	Highly sensitive detection of *ESR1* mutations in cell-free DNA from patients with metastatic breast cancer using molecular barcode sequencing （分子バーコードを用いた次世代シークエンサーによる転移性乳癌患者血中*ESR1*遺伝子変異の高感度検出）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

エストロゲン受容体(ER)陽性乳癌組織における*ESR1*遺伝子変異は、アロマターゼ阻害剤(AI)耐性の一因であり、その多くはligand binding domain (LBD)のhotspotに認められる。これらの変異は、血中循環腫瘍DNA(ctDNA)のdigital-PCR(dPCR)解析で多く報告されているが、dPCRによる解析は限定された一部のhotspot変異が対象となる一方、次世代シークエンサー(NGS)はhotspotに限定しない網羅的解析が可能だが、ctDNAの検出には感度が不十分である。そこで我々はNGSに分子バーコード(MB)を導入し(MB-NGS)、血中の*ESR1*遺伝子変異をより高感度かつ網羅的に検出する方法を開発した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

我々は、*ESR1*-LBDの変異のhotspotを含む領域(c.1600-1713)を対象にMB-NGSを開発した。15bpのランダムな塩基で構成された分子バーコードをPCR法で血中DNA断片に付加し、その後増幅しライブラリーを作成し、MiSeq (Illumina)でシークエンスした。解析は独自の解析パイプラインを構築し、1familyに30reads以上含むものを解析対象とし、family内で80%以上が変異であった場合、かつ、dual assayで共に検出された変異を真の変異とした。まず、*ESR1*-Y537S変異プラスミド(pFN21A HaloTag-ESR1_Y537S)をwild-type DNA(健常人白血球DNA)中に段階希釈(mutant allele frequency; MAF = 3%, 1%, 0.3%, 0.1%, 0.03%)した混合サンプルを用いて変異検出感度を検討した。通常のNGS解析ではMAF=0.3%のY527S変異はbackground errorとの判別が困難であったが、MB-NGSではbackground errorを 0.03%以下に抑制してMAF=0.1%のY537S変異を検出可能であった。次に健常人血漿(n=15)を用いて解析を行った。健常人血漿の検討では、解析領域のほぼ全域(98.5%)でbackground errorが0.1%以下であった。0.1%以上のerrorを認めた5ヶ所については以降の患者血漿の解析対象からは除外した。最後に、ER陽性転移再発乳癌患者の血漿(n=34)についてMB-NGSで*ESR1*変異の検出を行った。その結果、転移再発乳癌患者の解析では、通常のNGS解析(cutoff; 1%)では6例(17.6%)に7個の変異(MAF=2.25-10.09%)を認めたが、MB-NGS(cutoff; 0.1%)によりさらに4例追加の合計10例(29.4%)に13個の変異(MAF=0.30-10.09%)を認め、従来報告のないnon hotspot変異も同定できた。同定した変異についてdPCRで検証したMAFは、MB-NGSのMAFと良好な相関がみられた($r=0.850$, $p<0.01$)。

〔総　括(Conclusion)〕

分子バーコードによりbackground errorを減らし、高感度(>0.1%)なNGS解析が可能であった。今後MB-NGSの解析領域を広げ、より網羅的なctDNA解析に発展させたい。