

Title	Highly sensitive detection of sentinel lymph node metastasis of breast cancer by digital PCR for RASSF1A methylation
Author(s)	阿部, 瑞穂
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76444
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 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	阿部 瑞穂
論文題名 Title	Highly sensitive detection of sentinel lymph node metastasis of breast cancer by digital PCR for RASSF1A methylation (メチル化RASSF1Aを標的としたデジタルPCRによる高感度乳癌リンパ節転移診断法の開発)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>乳癌の術中センチネルリンパ節(SN)生検の迅速診断には、<i>CK19</i>-mRNA発現量を指標としたOne-step nucleic acid amplification (OSNA法)が有用である。しかし、<i>CK19</i>-mRNA発現は癌細胞により異なり、SN中の転移腫瘍細胞数を必ずしも正確に反映しない。そこで我々は、腫瘍DNAを標的とし、より定量性に優れたリンパ節転移診断法の開発を試みた。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>我々は、乳癌組織で高率にメチル化の認められる<i>RASSF1A</i>遺伝子を対象に、メチル化感受性制限酵素を用いたdigital PCRによる高感度なメチル化検出法(RE-dMSP)を考案した。RE-dMSPの検出感度は約3copy/assayであり、従来のバイサルファイト処理DNAを用いたリアルタイムPCR(qMSP法)よりも約10倍優れていた。次に、当院でSN生検の診断にOSNA法を施行した原発巣<i>RASSF1A</i>メチル化陽性乳癌71症例161 SNsを対象に、OSNA-lysateの残りからDNAを抽出しRE-dMSP法で測定し、その結果、14症例22 SNsでメチル化DNA陽性であり、OSNA法との診断一致率は95% (153/161)であった。同時に、原発巣<i>PIK3CA</i> 変異陽性の症例について、lysate中の変異DNAの有無をdigital PCRで測定したところ、RE-dMSPとの診断一致率は100%であり、RE-dMSPで検出されたメチル化DNAは、いずれも転移腫瘍由来のDNAを検出しているものと考えられた。次に、RE-dMSP法とOSNA法との不一致症例について検討した。まず、OSNA陽性・RE-dMSP陰性の2例については、いずれも原発巣<i>PIK3CA</i>変異陽性かつlysate中の変異DNA陽性であることから、OSNA偽陰性の可能性が考えられた。次に、RE-dMSP陽性かつOSNA 陰性 (<250copy) の6SNsについて、原発巣のCK19免疫染色を行ったところいずれも強発現であり、CK19低発現によるOSNA偽陰性は否定された。RE-dMSPがcirculating tumor DNAを検出している可能性も考え、lysate中のメチル化DNAの断片長解析を行い、検出DNAの由来を検討した結果、解析可能であった3SNsでいずれも500bp以上のメチル化DNAが検出され、転移腫瘍細胞の存在を反映していると考えられた。最後に、乳癌細胞株11種を対象に、乳癌細胞株1細胞あたりの<i>CK19</i>-mRNAのコピー数とメチル化DNAのコピー数の偏差を調べたところ、メチル化DNAで有意に小さかった (10.5 vs 1.84, $p < 0.01$)。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>RE-dMSP法は、OSNA法と同等のリンパ節転移診断能を有していることが示され、かつ、より正確に転移腫瘍量を反映できる可能性が示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 阿部 瑞穂	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 土岐 祐一郎
	副 査 大阪大学教授 新谷 康平
	副 査 大阪大学教授 猪俣 孝典
論文審査の結果の要旨	
<p>早期乳癌の手術では、術中に腋窩リンパ節への転移の有無を評価するため、センチネルリンパ節(SN)生検が用いられ、診断には迅速病理診断や、CK19mRNAを測定するOSNA法が用いられる。これまで、OSNA法の数値を基に推測されるSN中の転移総腫瘍量が、非SNへの転移を予測する因子となることが報告されている。そこで、OSNA法よりも、より正確に転移総腫瘍量を評価することを目的とし、腫瘍によるDNA変化を対象とした新しいSN転移診断法の開発を試みた。</p> <p>乳癌で高頻度に認められるメチル化RASSF1Aを指標とし、メチル化感受性制限酵素を用いたデジタルPCR法(REDMSP法)を開発した。感度は従来法と比較し約10倍改善した。乳癌細胞株を用いた実験や、OSNA検査で使用するリンパ節可溶化液を使用した実験の結果、REDMSPは、OSNA法よりもより正確にSN中の転移総腫瘍量を評価できる可能性が示唆された。</p> <p>今回の研究により、今後、より正確なSN転移総腫瘍量の評価が可能となることが期待される。今後の臨床応用が期待される内容であり、学位に値すると考える。</p>	