



Title	Detection of ctDNA with Personalized Molecular Barcode NGS and Its Clinical Significance in Patients with Early Breast Cancer
Author(s)	吉波, 哲大
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/77607
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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	吉波 哲大
論文題名 Title	Detection of ctDNA with Personalized Molecular Barcode NGS and Its Clinical Significance in Patients with Early Breast Cancer (早期乳癌患者における、分子バーコードを用いた症例特異的次世代シーケンサー解析によるctDNAの検出とその臨床的有用性について)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 癌患者血中の循環腫瘍DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) は微量のため、検出には高い感度が必要である。さらに、乳癌は多様な遺伝子変異を有するため、ctDNA検出には任意の変異に対応する技術が求められる。そこで我々は、設計自由度の高い標的次世代シーケンス解析法 (next generation sequencing; NGS) を分子バーコード (molecular barcode; MB) で高感度化したMB-NGS法を開発し、本法による症例特異的な変異ctDNAの検出を行い、乳癌患者の診断や予後予測等におけるctDNAの臨床有用性を検討した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 2007年から2012年に大阪大学医学部附属病院で手術を施行された、術前治療歴を有しないStage1/2の原発性乳癌100症例を対象とした。まず、乳癌原発巣の手術標本から抽出したDNA 120 ngを用いて、乳癌で高頻度に変異が報告されている13遺伝子を対象に全エクソンシーケンスを行った。各症例の白血球DNAをreferenceとして症例固有の塩基多型を除外した。その結果、100例中62例に、57種類、95個の変異が確認され、それらは35種類のsingle nucleotide variantと22種類のinsertion/deletionから構成されていた。これらすべての変異を網羅するように41種類のMB付きプライマーセットを設計した。MBにはランダム15塩基を用い、PCR法で増幅したライブラリーをMiSeqもしくはHiSeq (Illumina) で解析した。健常者血漿DNA (3 ng) を用いて背景エラーを検証し、すべての解析対象部位において0.076 %以下であることが確認されたため、MB-NGSによるctDNA検出限界を0.1 %とした。次に、原発巣に変異を同定した62症例の手術前血漿DNAに対して、原発巣変異を標的としたMB-NGSによるctDNA検索を行った。投入DNA量は中央値4.9 ng (range = 2.1 - 13.2 ng) であった。その結果、62例中10例 (16.1 %) でctDNAが検出され、血漿中の変異アレル頻度は0.10 ~ 2.51 % であった。ctDNA陽性10例の白血球DNAも同様にMB-NGSで解析され、clonal hematopoiesisが存在しないことが確認された。ctDNA陽性は、大きな腫瘍径 ($P = 0.004$)、リンパ節転移陽性 ($P = 0.009$)、高いStage ($P < 0.001$)、高い組織学的グレード ($P < 0.001$)、エストロゲンレセプター陰性 ($P = 0.018$)、プロゲステロンレセプター陰性 ($P = 0.017$)、HER2陽性 ($P = 0.046$) と有意な関連を認めた。また、ctDNAは乳癌血清腫瘍マーカー (CEA/CA15-3) より陽性率が高く (16% vs 9%, $P = 0.267$)、特にStage2ではその差が顕著であった (39 % vs 4 %, $P = 0.013$)。さらに、ctDNA陽性症例は陰性症例に比べ、高率に遠隔再発を認め (40.0 % (4/10) vs 1.2 % (3/52), $P = 0.004$)、遠隔無再発生存期間が短く (log-rank $P < 0.001$)、術前血漿中のctDNAは有意な予後不良因子であると考えられた。 〔総括(Conclusion)〕 症例特異的MB-NGSにより、乳癌原発巣に生じる多彩な変異を対象として高感度なctDNA検出が可能であった。また、本法で検出されたctDNAは、乳癌の診断や予後予測に有用な情報となる可能性が示唆された。原発巣の解析対象遺伝子を拡大して変異の同定率を上げることで、より多くの症例で変異ctDNAを固有の診断マーカーとして活用することが可能と考えられる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		吉波 哲大	
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	大阪大学教授	岡津 研三
	副 査	大阪大学教授	新谷 康
	副 査	大阪大学教授	保仙 通毅

論文審査の結果の要旨

本研究では、従来のctDNA検出法の欠点を克服するために、まず多様な遺伝子変異を検出することが可能となる次世代シーケンス解析法(next generation sequencing; NGS)を分子バーコード(molecular barcode; MB)で高感度化したMB-NGS法を開発した。それを用いて症例特異的な変異を標的としctDNAの検出を行い、乳癌の予後予測におけるctDNAの意義を検討した。その結果、MB-NGS法は、原発巣に生じる任意の変異を対象としても高感度にctDNA検出が可能であった。さらに、検出されたctDNAは早期乳癌の予後予測に有用であることが示唆された。本研究によって、MB-NGS法は、より包括的な原発巣変異解析と組み合わせることで、早期乳癌全例を対象とした症例固有の予後予測マーカー検出のために活用できることが期待される。以上から、本研究は学位に値すると考えられる。