

京都大学	博士（医学）	氏名	富田(植弘) 奈津恵
論文題目	<b>Circulating cell-free DNA-based epigenetic assay can detect early breast cancer</b> (血中循環細胞外遊離 DNA を用いたエピジェネティック分析は早期乳癌を検出できる)		
(論文内容の要旨) 血中循環細胞外遊離 DNA は癌の進行や治療効果、薬剤耐性などのバイオマーカーを含有していると考えられており、近年研究が盛んに行われている。しかし、癌の早期診断における血中循環細胞外 DNA の有用性についてはほとんど報告されていない。また、血中循環細胞外 DNA のメチル化異常を利用して乳癌を検出する研究も報告されているが、その検出能は乳癌のスクリーニングに用いるには不十分であった。本研究の目的は血中循環細胞外遊離 DNA を用い、エピジェネティックバイオマーカーとデジタル PCR を利用した高感度乳癌検出システムの開発である。 DNA メチル化アレイを用い、54 例の乳癌組織および 2 例の乳腺組織、34 例の細胞株、29 例の健常者血液について網羅的な DNA メチル化解析を行い、乳癌共通マーカー 4 種 (JAK3、RASGRF1、CPXM1、SHF)、ルミナル乳癌優位マーカー 4 種 (DNM3、CAV2、HOXA10、B3GNT5)、トリプルネガティブ乳癌優位マーカー 4 種 (ST3GAL6、DACH1、P2RX3、chr8:23572595) の合計 12 種のメチル化マーカーを選択した。これに血中循環細胞外遊離 DNA 量測定のため、公共データベースのデータに基づき、DNA のコピー数異常の少ない遺伝子である内部コントロールマーカー 4 種 (CREM、GLYATL3、ELMOD3、KLF9) を加え、16 種のマーカーからなるデジタルメチル化特異的 PCR パネルを作成した。 145 例の乳癌患者と 133 例の健常者からなる合計 278 例の血中循環細胞外遊離 DNA サンプルを 167 例 (80 例の健常者および 87 例の乳癌患者) の学習群と 111 例 (53 例の健常者および 58 例の乳癌患者) の検証群に分け、測定を行った。乳癌検出アルゴリズムの作成にはサポートベクターマシンを利用し、学習群のデータを使用した。測定データを対数化し、12 種それぞれのメチル化マーカー測定値と 3 種のパラメーター (メチル化マーカー平均値、陽性メチル化マーカー数、内部コントロールマーカー平均値) を算出して 15 変数とし、全ての変数の組み合わせを検討して最も ROC 曲線の AUC 値が高い乳癌検出アルゴリズムを選択した。選択された乳癌検出アルゴリズムには RASGRF1、CPXM1、HOXA10、DACH1 の 4 種のメチル化マーカー測定値およびメチル化マーカー平均値、内部コントロールマーカー平均値が採用されており、AUC 値は 0.916、感度は 0.908、特異度は 0.825 であった。この乳癌検出アルゴリズムを、検証群の測定データを用いて検討したところ、AUC 値は 0.876、感度は 0.845、特異度は 0.793 であった。早期乳癌患者 (Stage0-I) に限定しても、AUC 値は学習群で 0.911、検証群で 0.854 であり、感度は学習群で 90.0%、検証群で 81.0% と、現在乳癌のスクリーニングに用いられているマンモグラフィの感度、特異度と遜色がないことが示された。 今回開発したエピジェネティックバイオマーカーとデジタル PCR を利用し			

た乳癌検出システムは、血中循環細胞外遊離 DNA を用いて健常者と乳癌患者を高精度で分類できた。早期乳癌患者においても、マンモグラフィによるスクリーニングと同程度の精度を有しており、今後の乳癌スクリーニング法の一つとして開発を進める意義があると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

現在乳癌の診断は主に画像診断により行われており、血液を用いた早期乳癌検出法はない。本研究では、乳癌におけるメチル化異常に着目し、血中循環細胞外遊離 DNA を用いた早期乳癌検出法の開発を行った。

組織標本 (乳癌および乳癌近接正常組織、良性腫瘍)、培養細胞 (乳癌細胞および非乳癌細胞)、健常者血液由来の DNA を用いて網羅的 DNA メチル化解析を行い、乳癌の全サブタイプに共通するメチル化マーカー 4 種類および乳癌のサブタイプ (Luminal 乳癌、Triple negative 乳癌) に特徴的なメチル化マーカー各 4 種類を選定した。これらに循環細胞外遊離 DNA 量を反映する内部コントロールマーカー 4 種類を加えた 16 種類のマーカーからなるデジタルメチル化特異的 PCR パネルを作成した。

健常者 133 例、乳癌患者 145 例をランダムに学習群と検証群の 2 群に分割、学習群を用いて乳癌検出アルゴリズムを作成、次に検証群にて評価を行った。乳癌検出アルゴリズムには 4 種のメチル化マーカー (RASGRF1、CPXM1、HOXA10、DACH1) と 2 種のパラメーター (メチル化マーカーの平均値、内部コントロールマーカーの平均値) を採用したが、AUC は学習群で 0.916、検証群で 0.876 であった。Stage0-I の早期乳癌も検出可能だった (AUC: 学習群 0.911、検証群 0.854)。

以上の研究は、循環細胞外遊離 DNA のメチル化が乳癌の検出に有用であることを見出し、血液による早期乳癌検出法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 10 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降