

京都大学	博士（医学）	氏名	牧野 恭秀
論文題目	<b>Prognostic stratification for <i>IDH</i>-wild-type lower-grade astrocytoma by Sanger sequencing and copy-number alteration analysis with MLPA</b> (サンガーシークエンスとMLPAを用いたコピー数変異解析で <i>IDH</i> 野生型低悪性度星細胞腫の予後を層別化できる)		
(論文内容の要旨) <b>【背景】</b> <i>IDH</i> 変異、1p/19q 共欠失、ヒストン H3 変異など神経膠腫の特徴となる遺伝子変異と予後の関連が明らかになってきた。しかし、これらを有しない神経膠腫、特に低悪性度星細胞腫の特徴は依然として明らかではない。cIMPACT-NOW update 3 では、 <i>IDH</i> 野生型低悪性度星細胞腫のうち、chromosome 7 gain と chromosome 10 loss の両者、 <i>EGFR</i> amplification、 <i>TERT</i> プロモーター変異の3項目に1つ以上合致するものは予後不良として悪性度因子に採用することを推奨した。これらの <i>EGFR</i> 、chromosome 7 と 10 の両腕のコピー数解析をする方法として、SNP アレイ、DNA メチル化アレイ、染色体マイクロアレイ、次世代シーケンサーなどによる全ゲノム解析などがあるが、手法、コストの面から日常的に使用できるものではない。Multiplex ligation-dependent probe amplification(MLPA)は、標的のコピー数変異を比較的低コストで検出できる手法である。本研究では、サンガーシークエンスと MLPA を組み合わせて悪性度因子を検出することで、予後不良の星細胞腫を同定できるかを検証し、さらにその他の予後因子を検索した。 <b>【方法】</b> 42 症例を対象に、摘出手術標本から DNA を抽出し、サンガーシークエンスと MLPA、メチル化特異的 qPCR を行った。サンガーシークエンスは <i>IDH1/2</i> 、 <i>TERT</i> プロモーターと <i>H3F3A</i> 、 <i>HIST1H3B</i> を対象として行った。MLPA は SALSA MLPA KIT probemix P105 を使用し、 <i>EGFR</i> 、 <i>PTEN</i> 、 <i>PDGFRA</i> などを標的としたコピー数解析を行った。メチル化特異的 qPCR では <i>MGMT</i> プロモーターのメチル化を検索した。初回手術以降の臨床経過が追跡可能である 40 症例を対象に生存解析を実施した。P105 で検出した chromosome 7 と chromosome 10 のコピー数変異を検証するために、全症例に対して SALSA MLPA KIT probemix P309 と P370 を用いて MLPA 解析を行い、さらに 9 症例に対して染色体マイクロアレイ解析を行った。 <b>【結果】</b> 21 症例が cIMPACT-NOW update3 における悪性度因子を有し、予後不良群に分類された。これらは全例が <i>TERT</i> プロモーター変異、もしくは <i>EGFR</i> amplification を有しており、サンガーシークエンスと MLPA によって特定することが可能であった。P105 で検出した chromosome 7 と chromosome 10 のコピー数変異検証では、P105 で <i>EGFR</i> gain と <i>PTEN</i> loss の両者を示す症例のすべてが、chromosome 7 gain と chromosome 10 loss を示しており、この対象群において MLPA での <i>EGFR</i> gain と <i>PTEN</i> loss の検出が、chromosome 7 と chromosome 10 のコピー数異常の検出に高い信頼性を持つことを明らかにした。予後解析では、悪性度因子を有する予後不良群がその他の群に比較して予後不良であることを同定した。COX 比例ハザード解析では、 <i>PTEN</i> loss と <i>PDGFRA</i> amplification が独立した予後不良因子であることを明らかにした。 <b>【結語】</b> サンガーシークエンスと MLPA を用いたコピー数変異解析は、 <i>IDH</i> 野生型低悪性度星細胞腫の生存予後の層別化が可能であった。さらに、 <i>PTEN</i> loss と <i>PDGFRA</i> amplification が新たな独立した予後因子であることを示唆した。			

(論文審査の結果の要旨)

WHO2021 中枢神経腫瘍分類では、*IDH*野生型星細胞腫において *TERT* promoter 変異、*EGFR* amplification、chromosome 7 gain と chromosome 10 loss の共存という 3 項目が膠芽腫の診断基準として提唱された。しかし、本分類に必要なとなる遺伝子解析は、コスト面・手間などの問題があり、実臨床で本分類を使用することは困難であった。また、これら 3 項目を有しない *IDH* 野生型星細胞腫の中に予後不良を示す腫瘍が存在し、他の予後不良因子の存在が示唆されていた。

本研究では、*IDH* 野生型星細胞腫の手術標本から採取した DNA を使用して、サンガーシークエンスと Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) による遺伝子解析を行った。その結果、サンガーシークエンスと MLPA の組み合わせによる遺伝子情報で、予後不良群の分類が可能であった。染色体マイクロアレイ解析の結果では、MLPA による *EGFR* と *PTEN* のコピー数解析が chromosome 7 と 10 の状態を反映していた。多変量解析により新規の予後不良因子として *PTEN* loss と *PDGFRA* amplification を同定した。

本研究結果は、サンガーシークエンスと MLPA の組み合わせによる遺伝子情報により、*IDH* 野生型星細胞腫の予後不良群を分類できること、*PTEN* loss と *PDGFRA* amplification が *IDH* 野生型星細胞腫の予後不良因子となることを示した。

以上の研究成果は、*IDH* 野生型星細胞腫の予後不良群を実臨床で分類する遺伝子解析法の確立に大きく貢献するものであり、予後不良因子を標的とする新たな治療法の開発に寄与するところが大きい。

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、令和 4 年 1 月 5 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。