

別記様式第6号（第16条第3項，第25条第3項関係）

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	栗原 将
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Circulating Free DNA as Non-invasive Diagnostic Biomarker for Childhood solid Tumors (小児固形腫瘍患児の非侵襲的診断バイオマーカーとしての循環遊離 DNA の検討)			
論文審査担当者			
主査	教授	杉山 一彦	印
審査委員	教授	田代 聡	
審査委員	准教授	大上 直秀	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>小児固形がんは小円形細胞腫瘍のびまん性増殖像を呈することが多く、現在、その診断において遺伝子変異、欠失、転座、増幅などの分子生物学的解析を行うことは、必須となってきた。例えば、ウィルムス腫瘍における <i>WT1</i> 遺伝子の異常、肝芽腫における <i>CTNBI</i> 遺伝子の変異や欠失などはその診断に有用であり、また、神経芽腫においては、<i>MYCN</i> 増幅を認める場合、高リスク群に分類され、治療強度を高める必要となっている。その為、画像上や臨床的に神経芽腫の診断が確定しても、現時点では外科的生検にて腫瘍細胞を採取し、分子生物学的解析を行うことが必要である。</p> <p>循環遊離 DNA (cfDNA) は血清もしくは血漿内に存在する DNA の二重らせんの断片であり、担癌患者においては、腫瘍細胞由来の cfDNA が存在していることが知られている。本研究は、固形腫瘍患児の血漿から分離した cfDNA にディープシーケンシングを行い、遺伝子変異や欠失の検出を行った。さらに、<i>MYCN</i> 遺伝子増幅に関しては、10 コピー以上の増幅が有意とされていることから、高感度に定量可能なデジタル PCR での cfDNA での <i>MYCN</i> 増幅解析を試みた。さらに、本研究では、手術前後で cfDNA の量を測定することで、外科的切除における完全切除の評価として利用が可能かどうかについても検討した。</p> <p>対象は 2010 年から 2014 年に広島大学病院にて入院加療を行った約 200 人の固形腫瘍患児の中で、同意の得られた 44 症例を対象とした。それぞれの症例について、生検や摘出標本において、腫瘍組織の遺伝子変異や増幅の有無について検討している。すべての症例で腫瘍に対する治療前に血漿を採取した。44 症例のうち 12 症例においては、腫瘍摘出後の 1 - 30 日後に血漿採取を行った。</p> <p>cfDNA は 0.4ml の血漿より、QIAamp circulating nucleic acid kit にて回収し、ピコグリーン染色にて定量した。50-100ng の cfDNA を 50 個の遺伝子について検出可能な Ion AmpliSeq™ Caner Hotspot Panel v2 を用いてライブラリーを作成し、次世代シーケンサー (NGS:IonTorrent, Life Technologies) にて分析を行った。データの解析は IonTrent Variant Caller にて検出した。また、神経芽腫患児においては、10-20ng の cfDNA を既にリアルタイム PCR にて増幅定量可能であったプライマーで digital PCR (dPCR) を用いて検討した。それぞれの症例で回収できた cfDNA の量は 54-825ng で、その量は腫瘍の組織型や腫瘍の大きさとの関連はなく、臨床病期と関連し、ステージ 4 の患児では有</p>			

意に増加した ($P < 0.001$)。

NGS による分析では 15 症例の術前検体において遺伝子変異を検出した。それぞれ、神経芽腫で *ALK* と *RET*, 骨肉腫で *TP53*, 肝芽腫で *CTNMB1* と *APC*, 腓芽腫と横紋筋肉腫で *SMARCB1* の変異を認めた。これらの変異は、それぞれの症例の腫瘍組織検体でも同様の遺伝子変異が確認され、全症例で一致した。また 15 症例のうち 3 症例を除いた 12 症例で、腫瘍摘出後の血漿中 cfDNA の検討では遺伝子変異は検出されなかった。この 3 症例は遠隔転移があり、術後も腫瘍が残存していた症例であった。

また神経芽腫の 10 例のうち 2 例で、cfDNA 内に dPCR を用いて 10 コピー以上の *MYCN* 遺伝子の発現が検出された。この 2 例は腫瘍組織での *MYCN* 遺伝子のリアルタイム PCR にてそれぞれ 125 倍と 96 倍と著明に増幅していた症例であり、*MYCN* 増幅のコピー数もほぼ一致した。この 2 例の腫瘍切除後の血漿中 cfDNA からは *MYCN* 増幅は検出できなかった。

本研究の結果として、cfDNA を用いての遺伝子変異検出は、その症例の腫瘍組織検体の遺伝子異常の検出を可能とし、今後、少量の血液検体で可能で非侵襲的な分子生物学的解析法として利用可能であることが示された。また現在の腫瘍生検においての問題として、腫瘍内に heterogeneity が存在している場合、遺伝子変異を有する組織を必ずしも生検部位として採取できない可能性があり、そのような腫瘍においても末梢血中の cfDNA は腫瘍全体から由来した DNA である為、より正確な分子診断となりうる可能性が示唆された。本法の欠点としては、点変異に比べ挿入や欠失の検出率が下がる傾向にあり、実際、肝芽腫症例における *CTNMB1* の大きな欠失が本法では検出されなかったこと、さらに、融合遺伝子の検出に関しては、今回の検出システムでは検出が困難であり、早期例では測定に十分な cfDNA が回収できない可能性など、臨床応用に関して解決すべき問題点も見出された。

以上から、小児がん患者において、次世代シーケンサーを使用した末梢血中の cfDNA から腫瘍細胞の遺伝子異常を検出する方法は、侵襲も少なく一度に多くの遺伝子を検索できる点で臨床応用の可能性があり、特に初診時に腫瘍組織採取が困難な症例の診断や経過観察に有用な方法となりうると結論した。

以上の結果から、本論文は、小児固形悪性腫瘍患者の遺伝子変異を末梢血循環遊離 DNA を用いた次世代シーケンサーやデジタル PCR 法にて検出する方法が、侵襲が少なく診断の一助となりうることの検討を行った点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。