

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	HANA KHAIRINA PUTRI FAISAL
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Cell-Free DNA Analysis for EGFR mutations in Lung Adenocarcinoma Patients by Droplet Digital PCR （デジタル PCR による遊離 DNA を用いた肺腺癌患者の EGFR 変異解析の検討）			
論文審査担当者			
主 査 教 授 岡田 守人 印 審査委員 教 授 一戸 辰夫 審査委員 講 師 藤高 一慶			
〔論文審査の結果の要旨〕 担癌患者では，非癌細胞および癌細胞に由来する短い二本鎖 DNA である遊離 DNA（cfDNA）が血流中を循環し，腫瘍特異的な突然変異の遺伝子情報が検出されるため，この血液中の cfDNA 分析は肺腺癌患者に対する非侵襲的診断アプローチとなりうる。このため，癌診断のための非侵襲的アプローチとしてのリキッドバイオプシーとして，cfDNA はよく用いられる生体材料の 1 つとなっている。しかし，血液中の癌細胞由来の変異 cfDNA アレル割合（AF）が低いことが検出率を低下させている。最近，デジタル PCR（ddPCR）が突然変異に高感度解析に応用されており，本研究では，リキッドバイオプシーとしての検出率において cfDNA 解析における ddPCR の有用性を評価し，さらに悪性度との相関について腫瘍検体の解析結果と比較検討した。 対象は，同意が得られている 2010 年から 2017 年までの広島大学病院で治療した肺腺癌患者 19 人とした。全患者が生検を受け，肺腺癌と診断され，生検標本中の EGFR 遺伝子変異は，クランプ PCR によってすでに評価されていた症例とした（L858R 変異 13 例，E746-A750del 欠失 3 例，および陰性 3 例）。19 例の原発または転移巣生検のホルマリン固定パラフィン包埋標本（FFPE）から腫瘍 DNA（tDNA）を分離した。これらは，14 例は経気管支肺生検（TBLB），5 例は外科的生検で，すべての生検標本は化学療法前に採取したものをを用いた。腫瘍における EGFR L858R 変異細胞の割合を評価するために，EGF 受容体 L858R 変異体特異的モノクローナルウサギ抗体を用いた免疫組織染色検査を 12 例に実施した。また，変異および欠失の陽性コントロールとして NCI-H1975 細胞株および Le-Ad1 細胞株を使用した。化学療法開始前の診断時に採取した 17 例の血清サンプルから cfDNA を単離した。さらに，4 人の健常成人の血漿から cfDNA を単離した。健常成人の cfDNA および胎盤 DNA を ddPCR アッセイ分析の検出限界に使用した。ddPCR アッセイの検出限界を決定するために，野生型ヒトゲノム DNA（胎盤 DNA）を用いた NCI-H1975 および PC9 細胞株 DNA の連続希釈を行った。検出限界は，健常成人の cfDNA の擬陽性レベルを超えた希釈細胞株の AF とした。 解析結果は以下の通りで，ddPCR による AF の検出限界は，EGFR L858R で 0.024%，EGFR E746-A750del では 0.003%以下であった。tDNA 検体において，EGFR 点突然変異および欠失は，それぞれ 13 および 3 例において検出された。17 例の cfDNA 採取可能例において，EGFR 遺伝子変異 EGFR L858R および欠失 E746-A750del は，ddPCR でそれぞれ 8/11（61.5%）および 3/3（100%）に検出された。残りの変異のなかった 3 例では，いずれも cfDNA で 変異は検出されなかった。変異が検出できた tDNA では，EGFR L858R の AF は 5.7%から 71%（平均 32.7%），EGFR E746-A750del は 7.5%から 34.7%（平均 19.4%）であった。cfDNA では，は 0.04%から 5.12%（平均 1.3%）の範囲であり，EGFR E746-A750del は 0.07%から 18.6%（平均 6.3%）の範囲で tDNA と比較して，AF 値は低値であった。生検検体の免疫組織化学染色による EGFR L858R 陽性細胞の割合は，33.6%から 73.2%（平均 52.3%）の範囲で，TBLB 検体では 3.4%から 93%（平均 35.9 %）であった。			

ddPCRによるtDNAのAFと免疫組織化学によるEGFR L858R陽性細胞の割合はある程度相関を認めた($r = 0.53$, $p = 0.1$, $N = 12$)が、cfDNAのAFとtDNAのAF($r = -0.11$, $p = 0.69$, $n = 17$)の間、およびcfDNAのAFとEGFR L858R陽性細胞の割合($r = -0.56$, $p = 0.09$, $n = 10$)との間に相関はなかった。TBLB法による原発腫瘍生検検体で、EGFR L858R陽性細胞の割合が最も低い(16.1%)症例のcfDNAのAFが最も高かった(5.12%)。一方、最も高いEGFR L858R陽性細胞率(67.7%)を認めた症例ではcfDNA中に変異AFは検出されなかった。予後、腫瘍の大きさ、リンパ節転移、遠隔転移、病期などの臨床病理学的因子とcfDNAの変異のAF率との間に有意な相関は認めなかった。しかし、cfDNAのAFが0.1%以下と0.1%以上の2群に分けると、cfDNAのAFが0.1%以上の例は全例リンパ節転移と遠隔転移を有していた。

以上から、血漿中の腫瘍細胞由来cfDNAは、正常細胞由来のcfDNAで希釈されているため、cfDNAの変異および欠失のAFは非常に低くなることから、高感度で変異を検出できるddPCRを用いたcfDNA解析に有用であった。組織検体のEGFR L858R変異細胞の割合は、tDNAのAFと比較的相関していたが、cfDNAとtDNAのAFの間に相関はなかった。cfDNAのAFは、組織中の変異細胞数ではなく、リンパ節転移や遠隔転移などの腫瘍特性と関連している可能性が示唆された。

以上から、ddPCRによる肺腺癌患者のcfDNA解析は、EGFR L858RおよびE746-A750del変異に対して高い検出率を示し、Precision Medicineのための腫瘍生検に補足的なデータを提供しうると結論した。

以上の結果から、本論文は肺腺癌患者の血漿中の遊離DNA(cfDNA)解析によるEGFR遺伝子変異EGFR L858Rおよび欠失E746-A750del検出における高感度なデジタルPCR法の有用性とその臨床的意義を明らかにし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。

別記様式第 7 号（第 16 条第 3 項関係）

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	HANA KHAIRINA PUTRI FAISAL
学 位 授 与 の 条 件	学位規則第 4 条第①・ 2 項該当		
論 文 題 目 Cell-Free DNA Analysis for EGFR mutations in Lung Adenocarcinoma Patients by Droplet Digital PCR (デジタル PCR による遊離 DNA を用いた肺腺癌患者の EGFR 変異解析の検討)			
最終試験担当者 主 査 教 授 岡田 守人 印 審査委員 教 授 一戸 辰夫 審査委員 講 師 藤高 一慶			
〔最終試験の結果の要旨〕 判 定 合 格 上記 3 名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成 31 年 2 月 7 日の第 78 回広島大学研究科発表会（医学）及び平成 31 年 2 月 7 日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。 1 血漿中の腫瘍遊離 DNA の由来とその分離方法 2 デジタル PCR による血漿中の腫瘍遊離 DNA による遺伝子変異検出限界と感度 3 変異 DNA のアレル変異率と気管支生検組織，外科切除組織との関連 4 血漿中の腫瘍遊離 DNA における変異アレル率と臨床的因子の関連 5 血漿中の腫瘍遊離 DNA における変異検出のタイミングと有用性 これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			