九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Liquid biopsy with multiplex ligation-dependent probe amplification targeting cell-free tumor DNA in cerebrospinal fluid from patients with adult diffuse glioma

尾辻, 亮介

https://hdl.handle.net/2324/7182338

出版情報：Kyushu University, 2023, 博士（医学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：© The Author(s) 2022.

KYUSHU UNIVERSITY

氏　名：　尾辻　亮介

論文名：　Liquid biopsy with multiplex ligation-dependent probe amplification targeting cell-free tumor DNA in cerebrospinal fluid from patients with adult diffuse glioma
（脳脊髄液中 cell-free DNA を用いた multiplex ligation-dependent probe amplification（MLPA）法による成人びまん性神経膠腫の liquid biopsy）

区　分：　甲

論　文　内　容　の　要　旨

【背景】　成人原発性悪性脳腫瘍の 8 割を占めるグリオーマにおいて，分子診断は診断および治療選択に極めて重要である．従来，分子診断は手術で組織を採取する必要があり，脳幹部や視床など深部の病変や，言語野や運動野等，重要な脳機能を担う部位における手術治療は高リスクで時に施行不能である．更に，治療効果判定や再発評価など，臨床経過のモニタリングのために繰り返し手術を行うことは現実的ではない．こうした背景から，血液や脳脊髄液等の患者の体液を用いた生検「リキッドバイオプシー」が期待されている．我々は過去，脳脊髄液中を浮遊する cell-free DNA（cfDNA）を用いて digital PCR によるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ（isocitrate dehydrogenase, *IDH*）点変異およびテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター（promoter of telomerase reverse transcriptase, p*TERT*）点変異を検出する方法を確立し報告した．Digital PCR は低コストで実施でき，高感度かつ反応時間も短い利点がある優れた手法である一方，1 回の検査で検出できる変異の数は限られていた．最新の脳腫瘍分類である WHO 2021 分類では，分子診断にコピー数異常が盛り込まれ，IDH-wildtype グリオーマでは上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor, *EGFR*）の増幅，および染色体 7 番のコピー数増加と染色体 10 番のコピー数減少(Chr7+/10-)が，IDH-mutant グリオーマでは cyclin-dependent kinase inhibitor 2A（*CDKN2A*）の homozygous deletion が診断基準となった．手術で取得した腫瘍組織からは multiplex ligation-dependent probe amplification（MLPA)法による解析でコピー数異常を検出しているが，同法をグリオーマのリキッドバイオプシーに用いた報告はない．本研究では脳脊髄液から抽出した cfDNA を用いて MLPA 法による分子診断を初めて行った．

【対象と手法】　腰椎穿刺により脳脊髄液を採取し，術後にコピー数異常が確定した成人グリオーマ 25 例を対象とした（右図 1）．cfDNA の抽出後，Qubit 2.0 Fluorometer による濃度測定と 4150TapeStation system による DNA 断片長のチェックを行った．MLPA に必要な濃度，長さが担保された 12 例で MLPA の反応を行った．MLPA は市販の P105 probemix（MRC-Holland)を使用し，製造者が推奨する Coffalyser を用いてコピー数解析を行った．本研究は倫理審査 30-332「Liquid biopsy による脳腫瘍新規診断バイオマーカーの探索」の承認を得た．全ての患者に書面による同意を取得した．

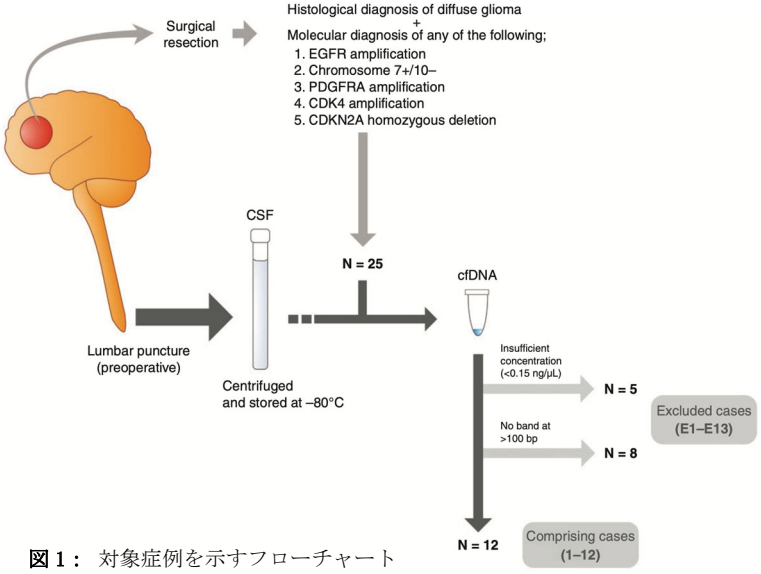

図 1： 対象症例を示すフローチャート

Variable assessed	All cases (n = 25)	Sufficient quality (n = 12)	Insufficient quality (n=13)	p value
Age, median (range)	59 (29–84)	59.5 (29–74)	58.5 (33–84)	0.5859
Male sex (%)	15 (60)	8 (66.7)	7 (53.8)	0.6882
Tumor size [mm], median (range)	**54 (25–78)**	**55 (25–78)**	**37 (25–66)**	**0.0384***
Contact with lateral ventricles (%)	20 (80)	11 (91.7)	9 (69.2)	0.1857
Contrast-enhancement (%)	22 (88)	11 (91.7)	11 (84.6)	0.5313
Radiological dissemination (%)	**4 (16)**	**4 (33.3)**	**0 (0)**	**0.0391***
IDH mutant (%)	2 (8.3)	1 (8.3)	1 (7.7)	0.7400
TERTp mutant (%)	15 (60)	9 (75)	6 (46.1)	0.1442
1p/19q codeletion (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	–
MGMT promoter methylation (%)	12 (48)	4 (33.3)	8 (61.5)	0.2377
Copy number alteration (%)				
EGFR amplification	7 (28)	4 (33.3)	3 (23.1)	0.6366
Ch 7+/10- (*EGFR* +/*PTEN*-)	14 (58.3)	9 (75)	5 (41.7)	0.1069
PDGFRA amplification	2 (8)	1 (8.3)	1 (7.7)	1.0000
CDK4 amplification	1 (4)	1 (8.3)	0 (0)	0.4800
CDKN2A homozygous deletion	18 (69.2)	9 (75)	9 (64.3)	0.5503
ctDNA conc. [ng/μL], median (range)	**0.213 (0.075–1.355)**	**0.421 (0.15–1.355)**	**0.182 (0.075–0.619)**	**0.0167***

表 1： 対象症例の背景

Case	MLPA (tumor tissue)					MLPA (CSF)				
	EGFR	Chr 7+/10-	*PDGFRA*	*CDK4*	*CDKN2A*	*EGFR*	Chr 7+/10-	*PDGFRA*	*CDK4*	*CDKN2A*
1	Amp (vIII)	+	Neut	Neut	Homo	Amp (vIII)	+	Neut	Neut	Homo
2	Amp	+	Neut	Neut	Homo	Gain	+	Neut	Neut	Hemi
3	Amp	-	Neut	Neut	Neut	Amp	-	Neut	Neut	Ni
4	Gain	+	Amp	Neut	Homo	Gain	+	Amp	Hemi	Hemi
5	Neut	-	Neut	Neut	Homo	Neut	-	Neut	Neut	Homo
6	Gain	+	Neut	Neut	Neut	Gain	+	Neut	Neut	Hemi
7	Neut	-	Neut	Neut	Homo	Neut	-	Neut	Neut	Homo
8	Gain	+	gain	Amp	Neut	Gain	+	Neut	Amp	Neut
9	Gain	+	Neut	Neut	Homo	Gain	+	Neut	Neut	Homo
10	Amp	+	Neut	Neut	Homo	Amp	+	Neut	Neut	Homo
11	Gain	+	Neut	Neut	Homo	Neut	-	Neut	Neut	Hemi
12	Gain	+	Neut	Neut	Homo	Gain	+	Neut	Neut	Homo

表 2： MLPA 施行例の背景と分子診断

【結果】　脳脊髄液から cfDNA を抽出した 25 例の濃度の中央値は 0.213 ng/μL であり，MLPA の反応における推奨濃度である 10 ng/μL を著しく下回った（表 1）．しかし予備実験の結果をもとに設定した 2 つの基準（濃度 ≥0.15 ng/μL，DNA 長>100bp）を満たした 12 例は MLPA の反応が成功し，コピー数解析の結果，腫瘍組織と概ね一致する結果であった（表 2）．基準を満たした群は腫瘍径が大きく播種の頻度が高かった．補足的に，基準をクリアしなかった 13 例では全て解析結果は成功しなかった．

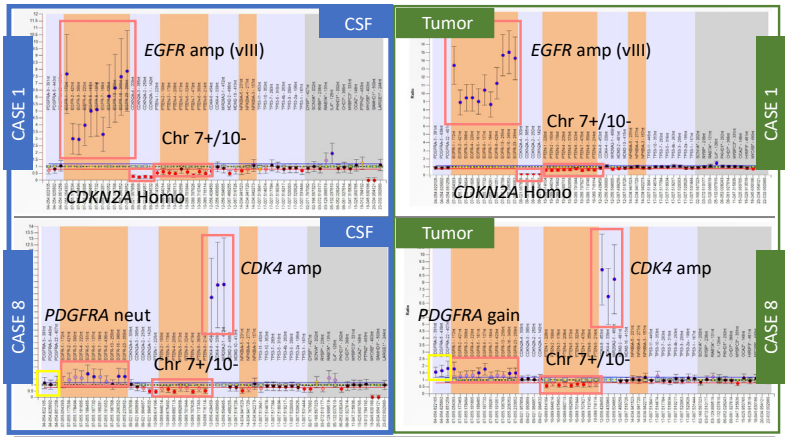

図 2： 代表例の脳脊髄液と腫瘍組織のコピー数解析の対比

cfDNA を用いたコピー数解析では単に増幅/欠失を示すのみならず，EGFR の各 exon の増幅パターンから variant Ⅲと正確に判定できるなど定量性も担保されていた(上図 2・症例 1)．症例 1 と 12 では染色体 10 番の hemizygous deletion を，*CDKN2A* が homozygous deletion を示し，欠失の度合いを正確に評価することが可能であった．MLPA の検出精度については，Chr7+/10− は 88.9%（9 例中 8 例），EGFR 増幅と *CDKN2A* homozygous deletion はそれぞれ 75.0%（4 例中 3 例）と 60%（10 例中 6 例）であり，特異度はいずれも 100%であった．

【考察】　脳脊髄液由来の cfDNA を用いた MLPA 法によるコピー数解析が可能であり，*EGFR* 増幅，Ch 7+/10−，*CDKN2A* homozygous deletion といったグリオーマ診断に必須のコピー数異常を同定できた．これらの分子診断は，digital PCR で検査するにはサンプル数が不足し実現困難であった．MLPA では 1 度に最大 50 の標的に反応させることができ，半定量的なコピー数解析ができるため，digital PCR と組み合わせることで最新の診断基準に合わせた分子診断が可能となる．また現在，次世代シーケンサーの活用が期待されているが，利用できる環境が限られる上，高額なコストがかかるため障壁が大きい．その反面 MLPA は DNA フラグメント解析を行う従来の実験設備で実施可能で 1 反応あたりのコストも安価である．これはモニタリングを前提としたリキッドバイオプシーに親和性の高い利点である．

今後の重要な課題は MLPA の感度である．本研究では，コピー数異常を伴う 25 例のうち，最終的に正確なコピー数解析に至ったのは 12 例であった（感度 48%）．MLPA のプロトコールの改良，および高品質の cfDNA サンプルの取得が重要である．特に，MLPA から除外された 13 例のうち 9 例では，一定の DNA 濃度があるにも関わらず，cfDNA は高度に断片化されていた．脳脊髄液中の cfDNA の半減期が短いため，手技の最適化を図り高品質の cfDNA サンプルを得る工夫が必要である．また本研究の最大の限界として，サンプルサイズの小ささが挙げられる．単一施設で症例数が限定される上，コピー数異常を有する例を対象としたため，低悪性度例を含むコピー数正常例は今回除外された．

【結論】　脳脊髄液由来の cfDNA を用いた，MLPA 法による成人グリオーマのコピー数解析に成功した．本法は，診断と病勢モニタリングを実現するリキッドバイオプシーの発展を促進すると期待される．