

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.



(別紙様式2)

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
論文調査委員	主査 九州大学 教授 小田 義直 副査 九州大学 教授 前田 高宏 副査 九州大学 教授 磯部 紀子

論文審査の結果の要旨

成人びまん性神経膠腫においてコピー数異常 (copy number alteration, CNA) は診断基準のひとつであり非常に重要である。CNAの評価の手法として、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法があり、腫瘍組織から抽出したDNAを用いて標的遺伝子座のコピー数を解析する手法として確立している。そこで申請者らは脳脊髄液由来の cell-free DNA (cfDNA) を利用して、MLPA法による成人びまん性神経膠腫の分子診断が可能か検討を行った。

術前に腰椎穿刺で脳脊髄液を採取した成人 diffuse glioma のうち、EGFR amplification, Ch 7+/10-, PDGFRA, CDK4 amplification, CDKN2A homozygous deletion のいずれか1つ以上のCNAを持つ25例を選択した。脳脊髄液より cfDNA を抽出し、P105-D3 probe mix を用いたMLPAの反応を行った。Capillary sequencerでフラグメント解析を行い、コピー数を解析した。

25例の脳脊髄液から抽出した cfDNAの濃度は中央値 0.213 ng/ μ L (範囲0.075-1.355 ng/ μ L) でありMLPAの至適濃度 (≥ 10 ng/ μ L) を著しく下回った。正常コピー数のリファレンスDNAを希釈した条件検討を行い、MLPAの反応を行うcfDNAの条件として、濃度 0.15 ng/ μ L 以上かつ 100 bp 以下に断片化されていないものと定めた。この条件に合致する12例では、全例MLPAの反応は成功し、かつ検出されたCNAは腫瘍組織と一致した。EGFR amplification, Ch 7+/10-, PDGFRA, CDK4 amplification, CDKN2A homozygous deletion は正常コピー数と明確に区別され、感度はそれぞれ 75%, 88.9%, 100%, 100%, 75%であり特異度は100%であった。更にEGFR variant III は exonのコピー数を基に正確に同定可能であった。

特定の条件を満たせば、成人びまん性神経膠腫において脳脊髄液cfDNA を用いたMLPA法によるコピー数解析は可能であった。Liquid biopsy として臨床への応用が期待できると考えられた。

以上の成績はこの方面の研究の発展に重要な知見を加えた意義あるものと考えられる。本論文についての試験はまず論文の研究目的、方法、実験成績などについて説明を求め、各調査委員より専門的な観点から論文内容及びこれに関連した事項について種々質問を行ったが適切な回答を得た。なお本論文は共著者12名であるが、予備調査の結果、申請者が主導的役割を果たしていることを確認した。

よって調査委員合議の結果、試験は合格と決定し、博士 (医学) の学位に値すると認める。