

学位授与番号：乙 3261 号

氏 名：森川 あすか

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：令和 1 年 9 月 11 日

学位論文名：

PIK3CA and KRAS mutations in cell free circulating DNA are useful markers for monitoring ovarian clear cell carcinoma.

(卵巣明細胞癌モニタリングにおける循環セルフリーDNA を使用した PIK3CA 及び KRAS 遺伝子変異検出の有用性の検証)

学位論文審査委員長：教授 大橋十也

学位論文審査委員：教授 馬目佳信 教授 松浦知和

論文要旨

氏名	森川 あすか	指導教授名	岡本 愛光
----	--------	-------	-------

主論文

PIK3CA and KRAS mutations in cell free circulating DNA are useful markers for monitoring ovarian clear cell carcinoma

(卵巣明細胞癌モニタリングにおける循環セルフリーDNA を使用した PIK3CA 及び KRAS 遺伝子変異検出の有用性の検証)

Asuka Morikawa, Tomoatsu Hayashi, Naomi Shimizu, Mana Kobayashi,

Kenzui Taniue, Akiko Takahashi, Kota Tachibana, Misato Saito,

Ayako Kawabata, Yasushi Iida, Kazu Ueda, Motoaki Saito,

Nozomu Yanaihara, Hiroshi Tanabe, Kyosuke Yamada, Hirokuni Takano,

Osamu Nureki, Aikou Okamoto, and Ttsu Akiyama

Oncotarget. 2018 ; 9 (20) : 15266-15274

要旨

卵巣がんは本邦において年間 1 万人近く罹患し、その約半数が死亡する予後不良のがん種である。卵巣は骨盤内臓器であるため、進行するまで自覚症状が乏しく、多くの症例は進行がんで発見される。卵巣がんのうち、その大半は上皮性卵巣癌であり、代表的な組織型は漿液性、類内膜、明細胞、粘液性の 4 つである。卵巣明細胞癌 (OCCC) は欧米では稀な組織型であるが、本邦では頻度が高く、その他にも化学療法抵抗性で予後不良であること、また、子宮内膜症との関連性などの特徴が挙げられる。卵巣がんは手術を施行し初めて確定診断がなされる。現在卵巣がん用に用いられているバイオマーカーや画像検査は正確な診断や治療効果の予測に十分とは言えない。最近になり、診断やモニタリングのために腫瘍組織から血液中に放出される微量の循環セルフリーDNA (cfDNA) が注目されている。cfDNA 中の体細胞変異を検出することで腫瘍の診断に有用である可能性が多く報告されているが OCCC での報告は無い。本研究では高感度 PCR 法であるドロップレットデジタル PCR (ddPCR) 法を用いて OCCC 患者から回収した cfDNA 中に PIK3CA と KRAS 遺伝子変異の検出を試みた。結果、卵巣明細胞癌で報告の多い体細胞変異である PIK3CA-H1047R と KRAS-G12D を OCCC 患者の cfDNA 中から検出することにより、治療などのモニタリングが可能であることが示唆された。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いて野生型 PIK3CA 遺伝子のみを切断し、ddPCR 法の感度をさらに向上させることにより、PIK3CA-H1047R の検出感度をあげることが可能であった。本研究により、ddPCR 法を使用した cfDNA における体細胞変異の検出が、OCCC の診断や再発の予測に有用となり得ることが示された。

学位論文審査結果の要旨

森川 あすか氏の学位申請論文は主論文 1 からなり、主論文のタイトルは「PIK3CA and KRAS mutations in cell free circulating DNA are useful markers for monitoring ovarian clear cell carcinoma」、日本語では「**卵巣明細胞癌モニタリングにおける循環セルフリーDNA を使用した PIK3CA 及び KRAS 遺伝子変異検出の有用性の検証**」と題され、2018 年に *Oncotarget* 誌に発表された。同誌のインパクトファクターは 2016 年で 5.168 である。しかしながら理由は不明であるが本誌のインパクトファクターは 2017 以降ついていない。参考論文なしに本論文だけで学位申請論文として認めるか否かについては大学院委員会、研究科委員会で慎重審議した結果、主論文一編だけで学位申請論文として認めることとした。

以下、審査委員会における審査結果を記載する。

令和元年 7 月 31 日、馬目佳信教授、松浦知和両審査委員御出席のもとに公開学位審査会を開催し、森川氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験を実施した。試験では以下のような質問があった。

- ①. CA125 によるスクリーニングが OCCC の予後改善に役立たなかった理由は何か？
- ②. cfDNA はなぜ 140~170bp の大きさになるのか？
- ③. 使用したプライマーは何か？
- ④. cfDNA の増減を述べていたが、これは cfDNA 全体が増減するのか、変異をもったものが増減するのか？
- ⑤. RNA 量は測定しなかったのか？
- ⑥. CRISPR-Cas9 を使用すると感度が上がる理由は何か？
- ⑦. cfDNA の存在様式はどの様になっているのか？フリーで存在するのか、それとも小胞につつまれているのか？
- ⑧. cfDNA は OCCC のスクリーニングというよりは治療効果のモニタリングに適しているのではないか？
- ⑨. 原発巣と再発した場合とでは cfDNA の変異が異なるのではないか？
- ⑩. cfDNA の測定の自動化はどれくらい進んでいるのか？
- ⑪. 本方法の今後はどの様な方向性があるのか？実用化の見通しがあるのか？
- ⑫. 実用化するためには、どの様な方策があるのか？

上記質問に対して森川氏は以上の質問に既報の論文などの結果も引用し適切に回答した。その後、馬目、松浦両教授と慎重に審議した結果、今回の研究は、cfDNA は治療効果のモニタリング、再発の早期発見卵巣癌の非侵襲的な診断法、治療モニタリングに結びつく非常に重要な研究であり、学位申請論文として十分にその価値が認められると結論した。