

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 平野 雅規

論文題目

A novel high-sensitivity assay to detect a small fraction of mutant *IDH1* using droplet digital PCR

(droplet digital PCR を用いた微量 *IDH1* 変異検出のための新規高感度アッセイ)

論文審査担当者


名古屋大学教授

主査 委員

門松 健治 


名古屋大学教授

委員

長谷川 好規 


名古屋大学教授

委員

勝野 雅央 

名古屋大学教授

指導教授

若林 俊彦 

論文審査の結果の要旨

2016年 WHO 脳腫瘍分類の改訂により、glioma においては *IDH1* 変異の有無を調べることが必須となったが、従来の Sanger 法では変異アリの検出限界はせいぜい 6%程度とされ、特にびまん浸潤性に進展する glioma においては、偽陰性が一定数存在すると考えられる。今回我々は、新規 droplet digital PCR を用いて *IDH1* 変異検出を高感度に行えるアッセイを確立した(変異アリ頻度:MAF 0.05%(凍結検体), 0.5%(FFPE)以上)。これにより、Sanger 法では組織学的診断と矛盾が生じた 1 例において矛盾のない診断がなされ、また更に lower grade glioma 患者の髄液由来 DNA から初めて *IDH1* 変異を検出することができた。





本研究に対し、以下の点を議論した。

1. glioma においてドライバー変異となる *IDH1* 変異を ddPCR で検出したという報告はこれまでにされていたが、検出可能な変異アリ頻度については検証されておらず、当研究が最初の報告となる。また、今回決定した検出限界に基づいて、従来の Sanger 法では遺伝子診断が困難であった 1 例が矛盾なく診断されたのに加え、初発 lower grade glioma 患者の髄液由来 DNA から初めて *IDH1* 変異を検出することができた。
2. glioma はびまん浸潤性に進展する腫瘍として知られており、腫瘍検体中に多数の正常細胞が含まれることも多い。従来の Sanger 法の検出限界は MAF 6.6%-20%と報告されているが、特に機能的な問題から腫瘍周辺部からしか検体を採取できない例においては偽陰性が一定数存在すると考えられる。ddPCR の原理からは非常に小さい MAF サンプルにおいても変異が検出できると考えられ、当研究において実際の腫瘍由来 DNA を用いて検出可能な MAF 値を決定した(凍結検体 0.05%, FFPE 0.5%)。これにより従来よりも正確な遺伝子診断を行うことが可能であることが示された。
3. 今回の系では、ネガティブコントロールとして *IDH1* 変異の報告のない他組織由来 DNA や水を用いても、僅かに陽性シグナルが認められたため、全サンプルにつきコントロールと同一条件で複数回実験し、統計学的有意差を出すことで問題を解決した。
4. *IDH1* 変異の有無は予後予測因子であり、近年は *IDH1* 変異タンパクを標的とした阻害薬も開発されており、従来法で変異陰性とされた例について偽陰性の可能性を除外するための検査として運用する予定である。さらに髄液由来 DNA を用いた遺伝子診断(liquid biopsy)への応用の他、極めてびまん浸潤性の強い脳腫瘍の一群(gliomatosis cerebri)の ddPCR を用いた再検討も予定している。

本研究により、glioma の診断に必須の *IDH* 変異の有無を従来よりもはるかに高精度に判定することのできるアッセイが確立された。

以上の理由により、本研究は博士(医学)の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	平野雅規
試験担当者	主査 門松 俊治  長谷川 好規  勝野 雅央  指導教授 若林 俊彦 			

(試験の結果の要旨)

主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。

1. ddPCR を用いた遺伝子変異検出の方法はこれまでは程度確立されていたと考えられるが、今回の研究における新規性は何か
2. mutant allele frequency(MAF)を議論する意義について
3. 鋭敏な検出系では偽陽性が問題となると考えられるが、どう対処したか
4. 今回得られた成果を今後どのように応用していくか

以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、脳神経外科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。