

（様式6-A） A. 雑誌発表論文による学位申請の場合

高瀬 貴章 氏から学位申請のため提出された論文の審査要旨

論文題目

Highly sensitive detection of a *HER2* 12-base pair duplicated insertion mutation in lung cancer using the Eprobe-PCR method

(Eprobe-PCR法を用いた肺癌における*HER2* 12塩基重複挿入変異の高感度検出系の構築)

Published February 2, 2017, DOI:10.1371/journal.pone.0171225

著者名

Yoshiaki Takase, Kengo Usui, Kimihiro Shimizu, Yasumasa Kimura, Tatsuo Ichihara, Takahiro Ohkawa, Jun Atsumi, Yasuaki Enokida, Seshiru Nakazawa, Kai Obayashi, Yoichi Ohtaki, Toshiteru Nagashima, Yasumasa Mitani and Izumi Takeyoshi

論文の要旨及び判定理由

human epidermal growth factor receptor-related 2 gene (*HER2*)における体細胞変異は、肺癌におけるdriver mutationの1つである。*HER2*変異は肺腺癌の約2%に認められる。*HER2*変異が予後予測因子となると考えられ個別化医療に寄与すると考えられる。これまでは従来法のサンガー法や次世代シーケンサー(NGS)によるスクリーニングに基づいた報告がなされているが、コスト面や煩雑性において簡便で高感度な解析手法が求められている。近年、蛍光色素によるリアルタイムPCR法であるEprobe-PCR法が理化学研究所で開発された。これにより定量的PCRと融解曲線解析が1本のprobeで行うことが可能である。今回このEprobe-PCR法を用いて、肺癌における*HER2*変異を迅速、簡便、高感度に同定するアッセイを開発した。

*HER2*変異型(12塩基重複挿入変異)のみをより増幅させるように、allele specific PCRの原理を応用してprimerおよびprobeを設計した。forward primerとreverse primerは1:5の非対称PCRとし、より効率的に変異型配列を増幅するような反応組成とした。本アッセイの定量感度を確認するためにin vitroによる検討を行った。*HER2*変異型配列を含む変異Plasmid DNAを野生型Plasmid DNAで希釈して検討したところ0.1%まで変異型配列を検出可能で、高感度検出系であることが確認された。次に臨床検体から抽出したDNAを用いて、サンガー法およびNGSとEprobe-PCRとの結果を比較検討した。当院で切除された原発性肺癌635症例の腫瘍の凍結検体およびホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体よりDNAを抽出し検討した。FFPE検体に関しては正常組織の混入を最小限とするためにmacrodissectionを行った。サンガー法では635例中7例が*HER2*変異陽性と判定された。この7例は全てEprobe-PCRでも変異陽性と判定された。この7例を含む9例がNGSで変異陽性と判定され、Eprobe-PCRでも同様の結果であった。上記9例のFFPE検体から抽出したDNAを用いてEprobe-PCRを行ったところ、凍結検体と同様に9例全て変異陽性と判定された。簡便で迅速かつサンガー法と同等以上の検出感度が得られた。NGSによるvalidationではDNAの断片化が危惧されるFFPE検体からも変異同定が可能であり、本法の実臨床への導入が期待される。

本研究は肺癌における*HER2*変異を同定する高感度検出系を構築した初めての報告で、博士（医学）の学位に値するものと判定した。

平成29年5月8日

審査委員

主査	群馬大学教授（医学系研究科） 肝胆膵外科学分野担任	調 憲	印
副査	群馬大学教授（医学系研究科） 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野担任	近松 一朗	印
副査	群馬大学教授（医学系研究科） 分子細胞生物学分野担任	石崎 泰樹	印

参考論文

1. Atsumi J, Hanami T, Enokida Y, et al. Eprobe-mediated screening system for somatic mutations in the KRAS Locus ONCOLOGY REPORTS 2015 Jun;33(6):2719-27