



Title	遺伝子関連検査における測定精度保証のための新たな指標と検査法の確立
Author(s)	竹田, 真由
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34250
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

〔 題 名 〕

遺伝子関連検査における測定精度保証のための新たな指標と検査法の確立

学位申請者 竹田 真由

日本における遺伝子関連検査は、感染症検査や白血病を対象とした体細胞遺伝子をはじめ、医療で広く利用されているが、急速に発展したこともあり、検査施設によって試薬・機器などが異なる場合も多い。その中で、どの施設でも同じ結果を出すためには、検査の「標準化」が必要不可欠である。遺伝子関連検査において、検体が採取されたのちに「核酸抽出」の工程を経て検査を行うため、この抽出工程における問題点として核酸の品質が考えられる。さらに、様々な検体から核酸抽出を行う際には、化学的検査での検体採取とは異なった採取・保存が必須となり、本工程に関する標準的なプロトコルが望まれる。そして最終的には、測定・解析の工程において、正しく行われているかを確認するための標準物質を使用できる環境が必須であると考えられる。

そこで、まずRNAに着目し、抽出したRNAの品質が検査結果にどのような影響を及ぼすか、新しい品質の指標としてRNA Integrity Number (RIN) を用いた検討を行った。RINは、マイクロチップ型電気泳動装置バイオアナライザによって得られた電気泳動像より1~10までの数値で得られるものである。数値が高いほど分解していないRNAであり、品質が高いことを表す。本検討では、培養細胞を用いて細胞の保存状態(温度・期間)とRINの関連性を追究した。ヒト白血病細胞株であるK562細胞を用いて、メディウム1mlあたり 1×10^6 個の細胞数に調整したものをサンプルとし、保存する温度を室温と4℃に設定した。それぞれの温度で24時間、48時間、72時間保存した後、RNeasy(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行い、バイオアナライザー(Agilent)を用いて解析を行った。その結果、異なる期間(24時間、48時間、72時間)ではRINに差は見られなかったが、異なる温度(冷蔵、室温)では、細胞を室温保存したサンプルにおいて、冷蔵保存した場合に比べてRINの低下が見られた。同様にヒト末梢血を用いて検討を行ったところ、異なる期間(24時間、48時間、72時間)ではRINの低下が見られ、異なる温度(冷蔵、室温)では末梢血を室温保存したサンプルにおいて、RINは4℃保存した場合に比べて低下していた。しかしながら、採血後24時間以内に抽出を行った場合でもRINは高値を示さず、培養細胞のように安定した結果は得られなかった。これより、RINを用いることでRNAの分解度を数値的に判断することが可能であると同時に、実際の臨床検体におけるRINは培養細胞に比べて低い値を示すことから、完全に分解していないRNAを抽出することは困難であると考えられた。つまり、検査結果に影響のないRNAの分解レベルを数値的にみることによって、検査に使用可能なRNAであるかどうかを見極める指標が必要であることが示唆された。

次に、検体採取の工程において、PAXGeneシステム(QIAGEN)を用いた検体の安定化剤の必要性について検討した。白血病を対象とした遺伝子発現解析では骨髄液を使用することが多いが、既存のBloodシステムでは問題点も多く、PAXgene Bone Marrowシステムとして新たに開発された。本システムと培養液を使用した従来のシステムについて、保存状態(温度・期間)と抽出されたRNAの状態について比較し、臨床検体での有用性を追究した。その結果、RNAの回収量において24時間経過後から本システムを用いた場合、安定して高い回収量を得られるのに対し、従来のシステムを用いた場合では低下していた。RINにおいては、本システムを用いた場合で高いRINを示しており、従来のシステムを用いた場合では時間が経つほど低下していた。さらに臨床検

体を用いてWT1の定量PCRを行ったところ、本システムでは従来のシステムに比べて高い数値を示した。これより、PAXgene Bone Marrowシステムは検体中のRNA分解を防いでいることが明らかであり、さらに本システムを使用することにより、検出感度も良好となることが示された。

以上より、血液細胞を用いた遺伝子発現解析においてRNA品質の管理にRINは有用であるが、どの数値からが高品質であるという境界線を決定する必要性が考えられた。また、PAXGeneシステムなどの安定化剤を用いた検体の管理をすることで、臨床検体における正確な定量値を測定することが可能であり、臨床的有用性があるといえる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (竹 田 真 由)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 岩 谷 良 則
	副 査 教 授 木 原 進 士
	副 査 教 授 三 善 英 知
論文審査の結果の要旨	
<p>遺伝子解析は臨床検査の現場で利用されているが、検査施設によって試薬・機器などが異なる場合も多く、測定精度保証が困難である。遺伝子関連検査においては「標準化」が必要不可欠であり、検体採取、核酸抽出、遺伝子解析の3工程の全工程において標準化を進め、検査結果の精度保証を確立する必要がある。本研究は、抽出した核酸の品質の新たな指標を検証し、検体採取の工程の新システムを新たな指標での評価を可能とした。さらに今後のオーダーメイド医療において必要である一塩基変異の新たな検出法を検証・確立することによって、遺伝子関連検査の標準化を促進するための研究である。</p> <p>本研究では、抽出したRNAの品質について、RNA Integrity Number (RIN) を新しい指標として標準化に有用性があるかを検証し、確かな有用性を確認した。その上で、PAXGene Bone Marrowシステム (BMシステム: QIAGEN) を用いて検体採取を行い、日本の臨床検査で実施されている培養液を用いた従来システムとの比較を行った。その結果、BMシステムにて保存した培養細胞から抽出したRNAは、従来システムで保存した細胞から抽出したRNAと比較して、72時間経過後も分解せず高いRINを維持することを示し、採取当日での抽出にはBMシステムは不要であることを初めて明らかにした。さらに臨床検体9例を用いて、両システムで抽出したRNAを用い、WT1遺伝子の発現量解析を行い、9例全てにおいてBMシステムでの定量値が高値であった。とくにWT1遺伝子は治療経過をみるために重要なマーカーであり、臨床的有用性を明らかとした初めての研究である。</p> <p>また、遺伝子解析の工程において、検査施設で既に精度管理が可能な機器を用いた一塩基変異解析法としてModified allele specific primer extension reaction method (MASPER法) に着目し、Glutathione S-transferase (GST) 遺伝子の多型の検出を行い、一塩基変異を検出することが可能であった。すなわち、リアルタイムPCR装置やシーケンス装置などの専用機器を使用しないため、特殊な精度管理を要することなく変異解析を行う点において、臨床的有用性を初めて明らかにした。</p> <p>したがって、遺伝子関連検査の標準化を促進し、遺伝子解析の精度保証を確立するうえで、本研究は重要な知見を与えるものとする。</p> <p>以上のことから、本研究は博士 (保健学) の学位授与に値すると考えられる。</p>	