



Title	Rapid Genetic Diagnosis With the Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction System for Cancer Micrometastasis
Author(s)	石井, 孝明
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46249
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	石井 孝明
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19764 号
学位授与年月日	平成 17 年 8 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Rapid Genetic Diagnosis With the Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction System for Cancer Micrometastasis (RNA 増幅システム TRC を用いた癌迅速遺伝子診断法の確立)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 金倉 譲 教授 野口眞三郎

論文内容の要旨

〔目的〕

近年の分子生物学的手法の進歩により、各種固形腫瘍において、従来の病理学的検索では検出されない微小転移が存在し、又、この微小転移の臨床的意義が報告されはじめている。我々はこれまで LightCycler を用いた RT-PCR 法による癌微小転移診断法を確立し、食道癌手術における臨床導入してきた。しかし、PCR 法を基盤にした遺伝子診断では、時間的制約と手技の煩雑さ、さらに、微妙な thermal cycler の温度変化にともなう增幅効率の変化等、日常検査として導入していくうえでの問題があるのも事実である。本研究では、全く新しい、RNA 増幅システムである、転写、逆転写協奏増幅法 (TRC、Transcription-Reverse transcription Concerted Reaction) を導入し、より簡便で迅速な微小転移診断法を確立し、その臨床応用における有用性の検討を行なった。

〔方法ならびに成績〕

I、TRC 反応による癌微小転移診断法の確立。

消化器癌、乳癌、肺癌に特異的発現を示す CEA (Carcinoembryonic antigen) を標的とする微小転移診断法を確立した。CEA を増幅するために、CEA の塩基配列に特異的な、3 種類の検出 primer (Scissor probe、Anti-sense primer、Promoter primer) を設定し、この増幅 CEA を特異的に検出するための蛍光プローブ (INAF probe) を作成した。

II、基礎的検討：合成 CEA mRNA、胃癌細胞株、を用いて、TRC 法の検出感度、定量性、再現性を検討した。

- (1) Full-length CEA mRNA を合成し、希釈系列を作成した ($0, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^7$ copies)。TRC 法により検出感度を測定した。CEA mRNA = 100 copies の検出が可能であった。CEA mRNA の初期コピー数と TRC 反応時間は相関し、検量線が作成可能であった。
- (2) 正常白血球細胞 (10^3 個) に胃癌細胞株 (MKN-45 細胞 0、1、10、 10^2 、 10^3 個) を混入させ、RNA を抽出し、癌細胞の検出感度を測定した。1 個の MKN-45 cell の検出が可能であった。
- (3) 正常白血球細胞 (10^3 個) に胃癌細胞株 (MKN-45 細胞 0、1、10、 10^2 、 10^3 個) を混入させ、RNA を抽出し、TRC 法と RT-PCR 法によりそれぞれ測定した。結果は、検出感度、定量性とも同等であった。
- (4) 正常白血球細胞 (10^3 個) に胃癌細胞株 (MKN-45 細胞 10 個) を混入させ、RNA を抽出し、TRC と LightCycler

で各5回ずつ測定し、定量値の再現性を検討した。結果は、再現性もほぼ同等であった。

III、臨床検体を用いた検討：胃癌切除リンパ節及び腹腔内洗浄液中の癌細胞の検出と臨床的意義。

- (1) 胃癌手術時の摘出リンパ節を半割し、TRC法とRT-PCR法による転移診断を行なった。TRCとLightCyclerのCEA定量値に強い相関が見られ、TRCとLightCyclerが臨床サンプルにおいても同等の定量性をもつことが示された。
- (2) 検査に要する時間は、RT-PCR法が全行程170分であるのに対し、TRCは60分で終了し、検査手技も簡便であった。
- (3) 術前無治療の進行胃癌60例について、開腹時に採取した腹腔洗浄液よりRNAを抽出し、TRC法にて遺伝子診断を行なった。非癌手術症例の腹腔洗浄液においては全例CEA mRNAは検出されなかつた。一方、胃癌症例では、TRC陽性群は、陰性群に比べ、深達度(T)、腹膜播種(P)、進行度(Stage)、腹腔細胞診(CY)、予後、腹膜再発において、有意に進行したもの、不良なもののが多かつた。

[総括]

従来のLightCyclerによるRT-PCRを用いた癌遺伝子診断法と比較し、TRCを用いることにより、簡便で、迅速な転移診断が可能となつた。又、TRCは、従来のRT-PCR法と比較して、感度、定量性は、ほぼ同等であり、再現性も、同等以上であった。胃癌開腹時の腹腔洗浄液診断において、TRC診断は、予後、腹膜再発予測に有用であることが示された。

TRCの迅速性と簡便性は、遺伝子診断の日常検査への応用、特に、術中転移診断への応用を可能にするものである。将来、本診断に基づく適確な術式の選択が可能となれば、癌治療成績の向上につながるものと考える。

論文審査の結果の要旨

近年、分子生物学的手法の進歩により、従来の病理学的検索では検出されない微小転移が検出されるようになり、この臨床導入が期待されている。しかし、これまでの、RT-PCRを基盤とした遺伝子診断では、時間的制約や手技の煩雑さ等、臨床検査として導入していくうえで問題がある。本研究では、新しい、RNA増幅システムである、転写、逆転写協奏増幅法(TRC、Transcription-Reverse transcription Concerted Reaction)を導入し、より簡便で迅速な微小転移診断法を確立することを目的とした。

基礎的検討：CEA mRNAをTRCにより増幅検出する微小転移診断法を確立するため、合成したCEA mRNA、胃癌細胞株MKN-45、胃癌転移リンパ節を用いて、TRCの検出感度、定量性、再現性を検討した。従来のRT-PCRを用いた癌遺伝子診断法では170分を要したが、TRC導入により60分で癌遺伝子診断が可能となつた。TRCは、従来のRT-PCR法と比較して、検出感度、定量性、再現性も同等であった。

臨床的検討：胃癌リンパ節を用いたTRC診断で、病理診断陽性例は全例CEA mRNAが検出された。病理診断陰性例にCEA mRNAが検出された例があり、微小転移が存在した可能性が示唆された。胃癌腹腔洗浄液を用いた癌微小転移診断を行い、TRCの臨床的意義を検討した。胃癌腹腔洗浄液を用いたTRC診断は、予後、腹膜再発の予測に有用であった。

TRCを用いることにより、簡便で、迅速な癌微小転移診断が可能となつた。本研究は、遺伝子診断の日常検査への応用、特に、術中転移診断への応用を可能にするものである。将来、本診断に基づく適確な術式の選択が可能となり、癌治療成績の向上に寄与することが期待される。よって、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。