

論文内容の要旨

報告番号		氏名	西川 武
Molecular analysis of liquid-based cytological specimen using virtually positive sputum with adenocarcinoma cells. (液状化細胞診材料を用いた遺伝子解析による腫瘍特異的遺伝子検出感度の検討)			

論文内容の要旨

喀痰の液状化細胞診(Liquid-based cytology; 以下 LBC)法は、非侵襲的な肺癌の補助診断として有用な方法である。LBC 法は細胞形態学的診断に日常的に行われる方法であるが、固定された細胞から DNA や RNA を抽出することで遺伝子検査を行うことができる。しかしながら市販の LBC 固定液はホルマリンを含むキットもあり、核酸に対する種々のホルマリンの影響で遺伝子解析の質が低下し、適切な結果が出せないことが多い。今回、申請者は喀痰に EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌細胞株を加えることで、擬似的陽性喀痰を調製し、ホルマリンを含む固定液により LBC 検体を作成して形態学的に細胞診評価と、ホルマリンの影響を回避する核酸抽出方法を検討した。

まず、ヒト非小細胞肺癌細胞株を用いて、PCR 効率、EGFR 遺伝子変異の検出感度および検出限界を検討した。細胞は EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株(HCC827, H1975)、野生型非小細胞肺癌細胞株(H1299)を用いた。H1299 細胞株を種々の固定液で固定し、DNA、RNA 各々2種類の核酸抽出キットで核酸抽出を行い、検出感度を検討した。H1299 と H1975 を既知の割合で混合した細胞を CytoRich red preservative (BD 社)で固定し、EGFR 遺伝子変異の検出限界を検討した。RNA は TTF-1 mRNA および Actin mRNA で、DNA は EGFR で定量的 PCR 法により PCR 効率を評価し、EGFR 遺伝子変異の検出限界は fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based preferential homoduplex formation assay (以下 F-PHFA)で評価した。ホルマリンを含む LBC 固定液を用いた細胞からは FFPE 用の抽出キットを用いることで、ホルマリンによる障害を効率的に回避することができ、定量的 PCR 法による DNA および RNA の検出感度が有意に改善した。EGFR 遺伝子変異検出限界は 5%の EGFR 変異陽性細胞を検出することができた。

擬似的腫瘍陽性検体を用いた検討では、HCC827(ex19 del)を加えた場合、喀痰中に陽性細胞が 1.5%以上あれば検出された。一方 H1975 (T790M/L858R)を加えた擬似的陽性喀痰では陽性細胞が 13%以上で検出された。次世代シーケンサー(next generation sequencing; 以下 NGS)を用いた変異パネル解析では、EGFR 遺伝子変異の検出限界は、F-PHFA 法より低かった。細胞診では陽性細胞が 0.1%以上で検出できた。

申請者の研究結果により LBC 検体が通常の細胞診断に合わせて遺伝子解析が可能であることが示されたが、従来の形態学的アプローチと比較し、遺伝子解析では偽陰性となる可能性があることには配慮が必要である。