

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における末梢血無細胞遊離核酸、ホルマリン固定標本由来 DNA を用いた遺伝子解析法の確立に関する研究

名古屋大学医学部附属病院

血液内科

入山智沙子

【背景】

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) におけるゲノム情報は重要性を増している。しかし、生検検体から遺伝子解析に使用できる腫瘍細胞を十分に得ることは極めて困難であるため、代替となる簡便で安定したゲノム遺伝子抽出方法の確立が望まれる。

【目的】

「末梢血無細胞遊離核酸 (cfDNA)」及び「ホルマリン固定標本由来 DNA (FFPE DNA)」の抽出方法を確立し、性質を評価し、ゲノム解析への応用を目指す。

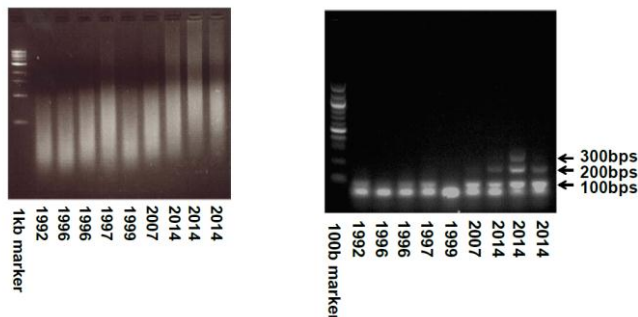
【方法】

cfDNA は QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit、FFPE DNA は QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いてゲノム DNA 抽出を行った。抽出した DNA のクオリティー評価は、アガロースゲル電気泳動、吸光度計、BioMed PCR 法による multiplex PCR にて行った。

【結果】

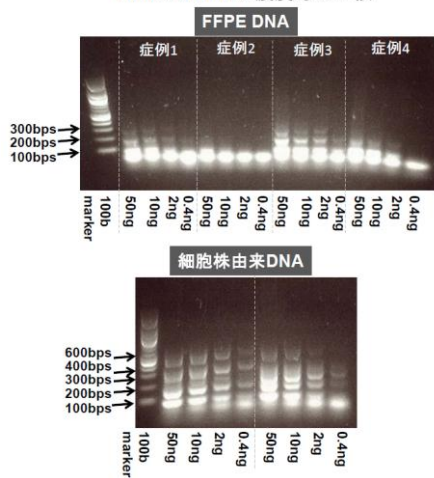
アガロースゲル電気泳動を施行した場合、FFPE 抽出 DNA はどの検体もスメア状に分解されているが、採取された年代の古い検体においてはより短い塩基長のものが増加している傾向が認められた (図 1)。

図1 FFPE DNAアガロースゲル電気泳動 図2 FFPE DNAを用いたBiomed PCR



BioMed PCR 法では 100、200、300、400、600bps の PCR 産物を Multiplex PCR によって同時に増幅するが、FFPE DNA を用いて増幅される PCR 産物は、100bps 程度から 300bps 程度と検体毎にばらつきを認めた。検体採取年と Multiplex PCR による増幅効率との関連については、検体が新しい方が増幅効率が良い傾向が認められた (図 2)。

図3 FFPE DNA、細胞株由来DNAを用いた Biomed PCRの濃度毎の比較



同じ濃度の生細胞株から抽出した DNA を用いた PCR と比較した場合、20 μ l での PCR を施行した際、細胞株由来 DNA は 0.4ng でも 400-600bps と比較的長鎖の増幅が可能であるが、FFPE DNA では 10ng 程度から長鎖の増幅効率が低下してきており、DNA 濃度のみならず質の検討も重要であることが示唆された (図 3)。

cfDNA を用いた BioMed PCR の結果は DNA の濃度が得られれば 400-600bps の増幅が可能であった。

1つの FFPE スライスから得られる DNA 量は検体の大きさに左右され、針生検等の微小検体を用いた場合は 50ng から 165ng と少量ながらも DNA を抽出することは可能であった。今後症例数を増やし、検体の採取時期、検体の大きさ等と、DNA の質との関連をより詳細に調べていく。

その他、脳脊髄液、胸水からの DNA 抽出も試みたところ、通常法の PCR に対応可能な DNA 検体を得ることができた。

これらの検体を用い、200bps 前後の PCR 産物を用いた direct sequence 法を *CD79B*、*MYD88*、*CARD11*、*ID3*

遺伝子について施行し、点突然変異の検出が可能であった (図 4)。

【考察】

FFPE DNA、cfDNA とも、スミア化や断片化を認めるものの、短鎖 PCR を用いた遺伝子変異解析には利用可能であった。ただし、PCR 増幅効率は細胞株由来 DNA や生検検体由来 DNA より劣る部分があり、経年的変化も認められることに留意する必要がある。

今後は症例数を増やし、遺伝子異常と臨床病態との関連をさらに検討していく。また、FFPE DNA や cfDNA の次世代シーケンサーを用いた解析への応用を検討する予定である。

【結語】

- (1) FFPE DNA は 20 年前の検体からでも抽出可能であり、PCR による特定遺伝子の増幅が可能である
- (2) FFPE DNA の質は症例毎に異なる。古い検体ほど分断化が進んでいる傾向にあり、概して 300bp 以上の増幅は困難となる
- (3) cfDNA はラダー状に認められ、PCR による特定遺伝子の増幅が可能である

- (4) FFPE DNA、cfDNA は 200bps 前後の PCR 産物を用いた direct sequence 法に利用可能である