

論文審査の結果の要旨

Surgical specimens of colorectal cancer fixed with the PAXgene Tissue System preserve high-quality RNA

PAXgene Tissue System により固定された
大腸癌手術切除標本からは良質な RNA が採取できる

日本医科大学大学院医学研究科 臓器病態制御外科学分野
大学院生 原 敬介
Biopreservation and Biobanking 掲載予定 (2015年)

腫瘍外科学においては従来の臨床病理学的病期分類に加え、mRNA の発現解析を用いた治療選択法が開発されている。しかし、組織固定法による mRNA の劣化が解析結果に影響を与えることが問題となってきた。申請者は大腸癌手術検体 10 例において、新規組織固定法である PAXgene Tissue System (PAX) を用いて固定された標本から抽出した mRNA を、各種ホルマリン固定標本あるいは凍結標本より抽出した mRNA と比較検討し、PAX の有用性を検討した。

RNA の質は、断片化を評価する指標である RNA Integrity Number (RIN) と RNA の量を評価する cycle threshold 値 (Ct 値) で行い、RNA の増幅を凍結検体と比較した $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて検討した。

各種ホルマリン固定検体由来 mRNA の断片化は顕著であり、RIN は 2.0 前後で凍結検体由来の mRNA と比較し有意に低値であった ($P < 0.01$)。一方、PAX 検体由来の RIN は平均 6.5 で凍結検体由来の mRNA よりは有意に低下していたが ($P < 0.01$)、ホルマリン固定検体よりは有意に高値であり ($P < 0.01$)、mRNA の断片化は軽度と考えられた。real-time PCR における *GAPDH*, *GPXI*, *VDAC2*, *ABL1*, *EGR1* の Ct 値は PAX 検体と凍結検体では同等であったが、ホルマリン固定検体では両者と比較して有意に高値であった ($P < 0.01$)。mRNA の増幅の判定では、凍結検体と PAX 検体が *GPXI*, *VDAC2*, *ABL1*, *EGR1* すべてで $\Delta\Delta Ct < 2$ であったのに対し、ホルマリン検体では約 20% の検体で $\Delta\Delta Ct > 2$ となり、解析結果が異なった。特に 3000bp 以上の長い遺伝子ではこの乖離が高率に見られた。病理組織学的検討では、HE 染色による組織・細胞形状、および免疫組織染色の染色強度については PAX 検体とホルマリン検体で差を認めなかった。

ホルマリンは固定時間の延長とともに mRNA を劣化させるが、PAX 固定は時間による mRNA の劣化はみられない。また、凍結検体ではフリーザーを必要とするが、PAX は常温保存が可能で保管も簡便で、施設間の移送も容易であるなどの有用性が確認された。

第二次審査では、上記実験内容に加え、PAX の汎用性、費用、臨床応用における有用性および今後の展望について幅広い質疑が行われたが、いずれも適切な回答がなされた。

本研究は大腸癌切除検体において PAX 固定が mRNA 発現解析に有用であり、今後のバイオマーカー解析精度および治療選択における信頼性を向上させる可能性を明らかにしたもので、今後の大腸癌治療の発展に寄与すると考えられた。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。