

氏 名	やま だ ひとし 山 田 仁
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2118 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Detection of tumor-derived DNA in exfoliated cells of urine sediments with a novel quantitative PCR method based on allele-specific PCR (対立遺伝子特異的PCRに基づく定量的PCRを用いた尿沈渣中剥離細胞内の腫瘍由来DNAの検出について)
	(主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 藤 田 潤 教 授 一 山 智 教 授 小 川 修

論 文 内 容 の 要 旨

尿路上皮癌の約半数は異時性かつ異所性に尿路上皮に再発する特徴がある。治療侵襲を最小限に押さえながら癌の進行を防ぐためには、再発の早期発見が不可欠である。現時点においては、再発の早期発見のためには定期的な膀胱内視鏡検査と尿細胞診が一般に用いられているが、内視鏡検査は侵襲的であり、一方尿細胞診は偽陰性の頻度が比較的高い。このことから、より高感度で偽陰性の少ない非侵襲的検査法の確立が望まれている。

本研究は分子生物学的手法を応用して癌特異的な変異DNAを高感度に検出する方法を確立し、尿沈渣中に存在する癌由来DNAの検出に応用することで尿路上皮癌の非侵襲的検出法としての可能性を検討する事を目的としている。

まず、対立遺伝子特異的PCRの原理を応用して、定量的かつ高感度に癌細胞由来DNAを検出する系の確立を試みた。本法の特徴は、まず既知の突然変異部位を含む小領域をPCR法で増幅し、対立遺伝子特異的PCR法を用いてその産物を増幅することによって全DNA中の変異DNAの比を求めることにある。この方法では、対立遺伝子特異的PCRによって増幅される長さの異なる3つの産物のうち、非対称PCRで用いられる産物の量がサンプル中の全DNA量を反映するため、変異DNAの存在比を正確に判定することが可能となる。本法は微小検体を増幅後定量に用いることが出来、さらにPCR反応の再現性のばらつきを補正できる利点もあるが、最大の特徴としては対立遺伝子特異的PCRの反応サイクル数を加減することで、測定範囲を 10^{-4} から 10^{-1} まで変化させるため、広い範囲で正確な定量が可能なことである。この方法で、膀胱癌細胞株(5637)より抽出した既知の変異p53遺伝子をもつDNAと正常DNAを様々な比率で混合したサンプルを用いてコントロール実験を行ったところ、満足できる直線性が得られ、微量に存在する変異DNAの定量が可能ことが証明された。

再発性尿路上皮癌においては初発腫瘍と同じp53遺伝子内の点突然変異を認め、管腔内播種による再発の機序を明らかにしている。これを根拠に特定のp53遺伝子変異を標的として、本法を実際の尿路上皮癌患者の尿に応用した。尿路上皮癌患者3例の尿沈渣4検体を検討したところ、全例で癌細胞由来DNAを検出し得た。これらの中には尿細胞診陰性の検体や膿尿の検体が含まれている。

本研究では既知の点突然変異を分子マーカーとして用いることによって、高感度に変異細胞を検出する方法を確立し得た。用いる対立遺伝子特異的プライマーにより、検出感度は一定でないものの、定量性を付加することにより検出感度の信頼性をあげることが可能であり、概ね 10^{-4} 程度の検出感度が得られた。これにより従来の尿細胞診で陰性の検体でも検出し得、また膿尿などで正常細胞の混入が非常に多い場合でも特に検体を処理せずに検出し得ると考えられた。一方で、今回用いたマーカーとしてのp53点突然変異は症例特異的であるため、予め点突然変異が判明していることが必要で、初診のスクリーニングには用いることは出来ない。今後分子生物学的な研究が進み、尿路上皮癌で高率に変異を認める癌関連遺伝子が発見されれば、本法は非侵襲的かつ鋭敏な癌検出法として応用可能であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

尿路上皮癌は異所性かつ異時性に尿路上皮に再発する特徴を持つ。従って再発の早期発見のための定期的な検査が必須であるが、現時点において侵襲や感度の面で満足ゆく検査法はない。

本研究では対立遺伝子特異的PCRの原理を応用することによって、腫瘍由来DNAを鋭敏に検出する相対的定量系を確立している。すなわち、本検出法は、変異特異的プライマーによって指数関数的に増幅され変異DNAに比例する成分と、反応サイクル数に比例して増幅され全DNAに比例する成分とを泳動ゲル上に異なった長さのバンドとして検出し、これを比較することで変異DNA量が定量的に解析可能となるように工夫されている。この方法では検出感度は 10^{-4} まで得られ、細胞数の少なく数が一定しない検体でも正確な測定が可能である。

本法の臨床応用の可能性を検討する目的で、p 53遺伝子の点突然変異をマーカーとして、尿路上皮癌患者3例からの尿沈渣を用いて検討しているが、尿細胞診陰性例や膿尿例を含む全検体において癌細胞由来DNAの検出に成功している。

本研究は僅か一塩基の違いをマーカーとして、高い正常細胞の背景の中でも癌細胞由来DNAを検出する方法を確立し、実際に尿沈渣中に膀胱腫瘍DNAを検出できる事を示した。本検出法は尿路上皮癌以外にも、遺伝子変異の判明している癌において応用可能であり、今後の診断法の開発や癌転移動態の把握に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年2月17日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。