

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08986

研究課題名(和文) 血中cell-free DNAの基準範囲及び測定前変動要因の決定

研究課題名(英文) Cell-free DNA reference intervals and preanalytical variables

研究代表者

宇野 直輝 (UNO, Naoki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：60624781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血液中にはcell-free DNAと呼ばれる細胞外に遊離して存在するDNAが存在する。微量な核酸を検出する技術の進歩に伴い、cell-free DNAは臨床検査の重要な対象になってきているが、その測定は標準化されておらず、測定結果に影響を及ぼす要因も十分に調べられていない。本研究は、臨床現場でよく起こる採血時の機械的溶血がcell-free DNAを著明に増加させることを明らかにした。この結果は、機械的溶血が起こっている血液では標的cell-free DNAの割合が実際よりも低くなることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cell-free DNA検査の測定結果はしばしば正常な遺伝子に対する標的遺伝子の相対量で表される。この場合、標的遺伝子の増減とは無関係に正常な遺伝子の増減が結果に影響を及ぼす。臨床現場では採血時に赤血球が壊れる機械的溶血がしばしば起こる。本研究の結果は、溶血が起こった血液では正常な遺伝子のcell-free DNAが増加することを示しており、その結果、標的遺伝子の割合が実際よりも低く見積もられることを示している。これは臨床的に注意すべき重要な報告である。

研究成果の概要(英文)：Cell-free DNA is circulating DNA in blood. Although cell-free DNA has recently been tested in clinical laboratories, its measurement has not been standardized and preanalytical variables have not been well investigated. The present study demonstrated that mechanical damage of blood cells causes significant increase in cell-free DNA. This result indicates that the ratio of target cell-free DNA to reference cell-free DNA could be underestimated when blood cells are damaged during blood draw.

研究分野：分子診断技術

キーワード：cell-free DNA 溶血

1. 研究開始当初の背景

血中 cell-free DNA (cfDNA)はこれまで臨床検査の対象になっていなかったが、微量な核酸を正確に定量する技術の進歩に伴い、その臨床検査的価値が高まっている。現在、がん細胞に特異的な変異を有する cfDNA と胎児由来の cfDNA がそれぞれがんの検査(リピードバイオプシー)と出生前検査に用いられている。今後、cfDNA 検査対象は広がり、臨床検査の分野で重要な検査に位置付けられると予想される。しかしながら、cfDNA 検査は血液検体の分離方法から、核酸抽出方法、核酸増幅方法、検出方法、定量方法まで論文によってばらばらで、全く統一されていない。健常人の基準範囲も十分に知られておらず、測定結果に影響を及ぼす測定前要因も十分に調べられていない。

2. 研究の目的

本研究は cfDNA の基準範囲と測定結果に影響を及ぼす測定前要因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

私たちはまず CLSI の基準範囲決定ガイドラインを参考にして、研究対象となる健常人を集めるための質問表を作成した。インフォームドコンセントを得るための説明書と同意書を作成し、質問表と共に大学の倫理委員会に申請し、承認を得た。次に、大学病院に勤務する 10 名のボランティアにインフォームドコンセントを行い、採血した。

基準範囲の決定には 20 名以上の健常人が必要であるため、私たちはまず臨床検査でしばしば問題になる採血時の機械的溶血が cfDNA 検査に及ぼす影響を検討した。機械的溶血は臨床現場でよく起こる問題でありながら、cfDNA に及ぼす影響はこれまで十分に調べられていなかった。私たちは採血で得られた血液を細い注射針に通して機械的に血球に障害を与えた後に血漿を分離し、血漿から DNA を抽出し、二つのレファレンス遺伝子をデジタル PCR で定量した。血球の破壊の程度を評価するために遊離ヘモグロビンと乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定し、これらと cfDNA 量との相関を調べた。

4. 研究成果

採血後の血液に機械的障害を与えることで血漿中の遊離ヘモグロビンと LDH は増加し、二つのレファレンス遺伝子量も増加することが明らかになった(図 1)。二つのレファレンス遺伝子の濃度と遊離ヘモグロビン及び LDH 濃度には良好な相関が認められた(図 2)。この結果は、機械的溶血によって赤血球のみならず白血球も障害を受けて破壊され、その結果、細胞内のゲノム DNA が cell-free DNA として細胞外に放出されたことを示している。

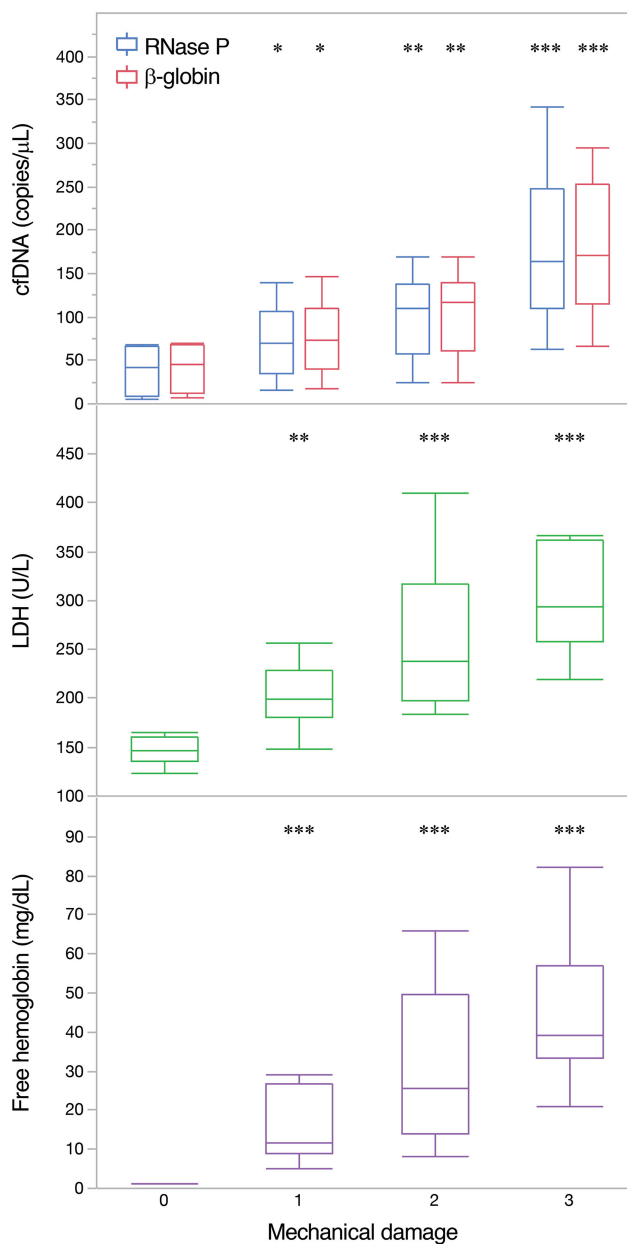


図 1. 機械的障害による血球障害と cfDNA の増加

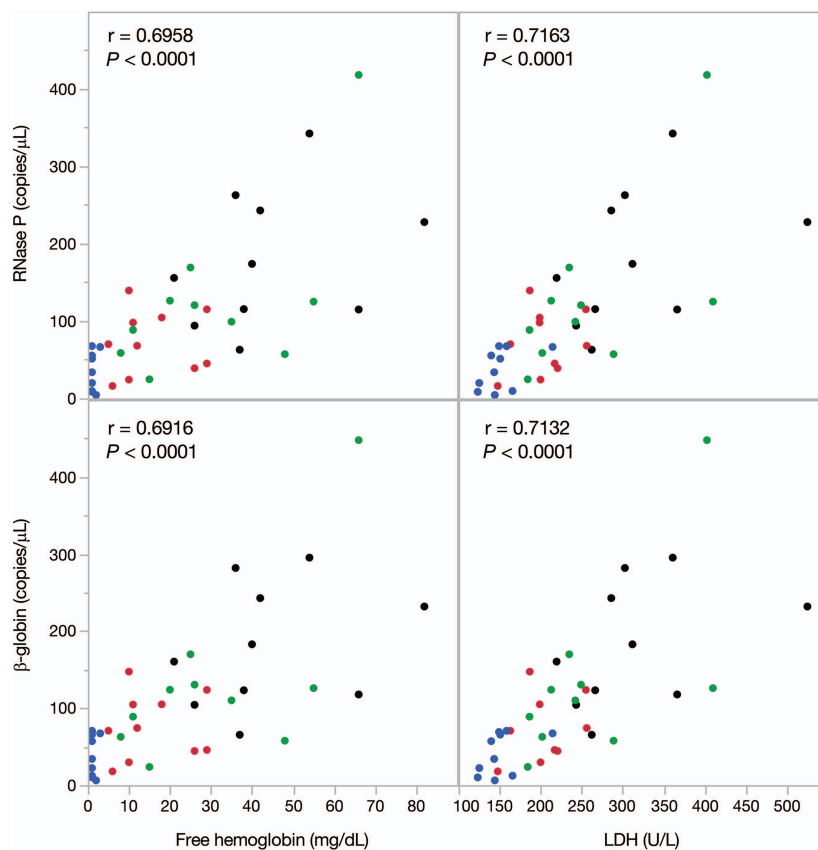


図 2. 血球障害と cfDNA の相関

標的遺伝子の cfDNA の結果はしばしばレファレンス遺伝子に対する割合で評価される。この場合、標的遺伝子の増減とは無関係にレファレンス遺伝子量が結果に影響を及ぼす。機械的溶血によって増加するのは標的細胞に由来する標的遺伝子ではなく、正常な血球に由来するレファレンス遺伝子であるため、溶血検体では、標的遺伝子の割合は実際よりも低く見積もられる。溶血検体から得られた血漿のレファレンス遺伝子は溶血前に比して明らかに増加しており(図 3)、これは、リキッドバイオプシー検査においては、がん遺伝子の偽低値や偽陰性に繋がり、出生前検査では偽陰性に繋がる。したがって、臨床的観点から本研究の結果は重要であり、溶血検体の cfDNA 検査に注意を喚起する重要な報告となる。

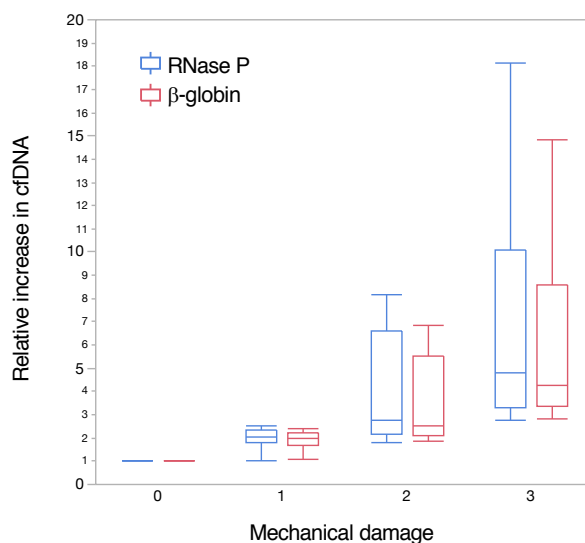


図 3 機械的溶血による cfDNA の相対的増加

溶血の影響を論文として発表するために予想以上の時間を要したため、研究期間内に基準範囲を決定することはできなかった。しかしながら、本研究は cfDNA 検査の質を向上させるために、これからも進めるべき重要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura F, Uno N, Chiang PC, Kaku N, Morinaga Y, Hasegawa H, Yanagihara K	4. 巻 4(2)
2. 論文標題 The Effect of In Vitro Hemolysis on Measurement of Cell-Free DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Appl Lab Med	6. 最初と最後の頁 235-240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1373/jalm.2018.027953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島本 佳奈、田浦 茉弥、西村 典孝、石原 香織、宇野 直輝、柳原 克紀
2. 発表標題 cfDNA 測定における溶血の影響
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 典孝、田浦 茉弥、川良 洋城、宇野 直輝、長谷川寛雄、柳原 克紀
2. 発表標題 溶血における cfDNA 中のリファレンス遺伝子の変化
3. 学会等名 第58回日本臨床化学学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西村 典孝  (NISHIMURA Fumitaka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------