

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659159

研究課題名(和文) 死後臓器組織からの高品質核酸抽出法の考案：病理解剖の分子生物学的探究基盤の確立

研究課題名(英文) Extraction of high quality genomic DNA from postmortem tissue

研究代表者

高屋敷 典生 (TAKAYASHIKI, NORIO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00364521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)： 病理解剖はヒトの病気の原因や病態を解明するために、最も重要な医学的解析方法のひとつである。一方、死後臓器組織の核酸は死後に劣化がすすむため、分子生物学的な解析に限界があることが予想される。しかし、死後臓器組織における核酸の劣化に関する詳細な検討は、これまでほとんど成されていなかった。本研究においてヒトの死後臓器組織には、臓器組織の種類および死後の経過時間に関わらず-80℃に凍結保存されてさえいれば、高分子量のゲノムDNAは保たれていることが明らかとなった。さらに、それらのゲノムDNAは次世代シーケンズ解析にも適用できる可能性が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)： Autopsy is the one of the most important method for elucidating the cause and mechanism of the disease. The problem is that nucleic acids in postmortem tissue are easy to degenerate momentarily, so it is very important that we know the extent of the degeneration of the nucleic acids in postmortem tissue.

In this research, we showed clearly that high molecular weight genomic DNA was preserved in the postmortem tissue frozen at -80℃, regardless of kinds of the organ and postmortem time. Furthermore, it was suggested these postmortem DNA could be applied to the next-generation sequencing analysis.

研究分野：人体病理学、外科病理診断学、病理解剖

キーワード：病理解剖 DNA 死因究明 病理学 次世代シーケンズ バイオバンク

1. 研究開始当初の背景

病理解剖は、医学的にヒトの病気の病因や病態を解明するために、最も重要な解析方法のひとつである。そしてヒトの病理解剖検体はすべての臓器から充分量の組織が採取でき、死後に病因や病態生理を知るための大変有用な研究材料である。しかし死後臓器組織試料の核酸は、死後の経過時間や保存状態により劣化がすすむため、分子生物学的な解析に限界があった。また死後のヒト臓器組織における核酸の劣化に関する詳細な検討や系統立てた解析も、これまでほとんど成されていない。

一方、我々は calcein AM をプローブに用いてエステラーゼ活性陽性細胞（以下、生細胞）を検出する予備的な検討で、死後8時間の病理解剖例の肝臓、腎臓、肺から採取した組織片に生細胞が少数残存していることを明らかにした。また手術で摘出されたヒト肝臓などの非病変部組織片を4に冷蔵保存した場合、切除後5日の時点においても、肝細胞の一部は生存しているという結果が得られた。

もし死後臓器組織から、少量であっても変性の少ない細胞のみを選別回収できれば、質の高いゲノムDNAを抽出できるのではないか。そしてそれらから得られた高品質なDNAを用いれば、病理解剖検体においても次世代シーケンサーで個体のSNPsなど遺伝学的背景、細胞におけるDNAのメチル化などepigeneticsの側面からも病態を詳細に解析できるようになるのではないか。

2. 研究の目的

本研究では、死後のヒト臓器組織から変性の進んでいない細胞のみを選別回収し、それらから質の高い核酸を抽出して、必要であればPCR法を用いて増幅し、病理解剖材料を用いた質の高い分子生物学的探索の基盤を確立することを目指した。

研究開始当初は、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1)ヒトの死後臓器組織において、死後時間に応じてどれだけ生細胞が残存しているかを明らかにする。

(2)各臓器において、死後時間に応じたゲノムDNAの劣化の程度を明らかにする。

(3)各臓器組織から、変性の進んでいない細胞のみを選別、回収する方法を検討する。

(4)病理解剖症例から回収した細胞より抽出したDNAで、エクソンシーケンズ解析を試みる。

3. 研究の方法

(1)死後臓器組織ゲノムDNAの断片化探索
手術摘出肺のゲノムDNAの経時的観察

ヒト死後臓器組織におけるゲノムDNA断片化の検討

次世代シーケンズ解析の適否評価

試料： 筑波大学附属病院にて研究用臓器組織試料の採取に承諾が得られた手術例の肺（診断に影響のない非病変部）3例、病理解剖例19例からの臓器組織（肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓）を用いた。

摘出肺の一部組織を採取し、9分割したのうち、4冷蔵下でそれぞれ0、3、6、12、24、48、72、168時間放置し、その後-80で凍結保存した。病理解剖例では、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓の組織を一部採取し、同様に-80で凍結保存した。

それぞれの臓器試料を溶解した後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿にてゲノムDNAを抽出した。

抽出したゲノムDNAは1%アガロースゲルで電気泳動で確認した。

Real time qPCR： 遺伝子増幅産物のサイズが約100bpと約500bp程度になるように7種類のプライマー(beta-globin、beta-actin、GAPDH、TTF-1、stratifyn、surfactant protein B、claudin5)を設計作製し、前述のDNAに対して市販キットの推奨された方法でreal time qPCRを実施した。

DNA断片化の状態を評価するために、Nicklasらの報告を参考に、約100bpの増幅産物のCt値に対する約500bpの増幅産物のCt値の比をdegradation ratio(DR)として算出した。そのうち、DR1.0を少なくとも約500bp未満の断片化は免れていると判定し、DR1.5以上を500bp未満の断片化が顕著になった状態と判定した。

<引用文献>

Nicklas, J.A., Noreault-Conti, T., Buel, E. Development of a real-time method to detect DNA degradation in forensic samples. Journal of Forensic Science, 57, 2012, 466-471

long range PCR： beta-globin に対し、遺伝子増幅産物が1.3kbp、2.7kbp、3.6kbp、8.5kbpになるようプライマーを作製した。前述のDNAに対して、市販キットの推奨されたプロトコルに従いlong range PCRを実施した。増幅産物は0.8%アガロースゲル電気泳動に確認した。

ゲノムDNAの質の評価： 次世代シーケンズ解析の際に、対象となるゲノムの質の評価のための市販キットの推奨プロトコルに従い、上記の死後臓器組織におけるDNAのreal time qPCRを行った。判定基準は、Ct値から自動算出されるquality check(QC) scoreが0.04以下でhigh quality、0.04より大きい場合にlow qualityと判定された。

(2) ヒト死後骨髄造血組織における生細胞の確認

骨髄単核細胞分離、染色、蛍光観察
FACS 解析

病理解剖 10 例（死後時間 209 分から最長 684 分まで）から採取された骨髄細胞懸濁液から、比重遠心法により単核細胞を分離した。分離された骨髄単核細胞に対して、PI 単染色、calcein AM と ethidium homodimer-1 の二重染色を実施し、蛍光顕微鏡による観察と FACS 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肺手術例の DNA 断片化の経時的変化

アガロースゲル電気泳動の検討で、手術肺組織の 4 保冷下では 24 時間以降から DNA の断片化が顕在化する傾向がみられたが、切除後最長 168 時間後においても 30kb 付近の高分子量ゲノム DNA は保たれていた。また real time qPCR での検討で、7 種類全ての遺伝子増幅産物が全ての経過時間において検出されて、少なくとも 500bp 未満の断片化はそれほど顕著ではないことが分かった。

(2) 死後臓器の DNA 断片化の程度

病理解剖の肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓について検討した。

アガロースゲル電気泳動の検討で、肺では全ての症例で 30kb 付近の高分子量ゲノム DNA は保たれていた。肝臓、脾臓、膵臓、腎臓については、一部の症例をのぞきほぼ全ての例に同様な高分子量の DNA が保存されていた。Real time qPCR での検討で、7 種類全ての遺伝子増幅産物では、臓器組織の種類や死後経過時間（最短 72 分、最長 1084 分）の違いに関わらず、500bp 未満の断片化はそれほど顕著ではないことが分かった。さらに beta-globin については、long range PCR の結果、死後経過時間 1084 分の症例においても 8.5kb の遺伝子増幅産物が検出された。

(3) 次世代シーケンス解析への適用

キットを用いた推奨された方法で、病理解剖の肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓から抽出されたゲノム DNA は、死後経過時間に関わらず高品質であると判定され、次世代シーケンス解析に適用できる可能性が高いことが明らかになった。

(4) 死後骨髄組織における生細胞の存在

はじめに、死後約 5 時間の症例から得られた骨髄細胞の中に、PI(-)または calcein AM(+)細胞すなわち生細胞の存在が確認された。

その後 10 症例から採取した骨髄細胞について、FACS 解析を実施した結果、リンパ球以外の単核細胞については、全症例で死後経過時間の長短とは無関係に（死後時間最長約 11 時間）PI(-)または calcein AM(+)細胞すなわち生細胞が約 75%以上の割合で検出され

た。

本研究で検討した病理解剖例においては、少なくとも 500bp 未満の断片化は免れており、高分子量のゲノム DNA は種々の程度に保たれていることが明らかとなった。

とくに注目すべき点は、研究開始当初の予想とは異なり、臓器組織の種類や死後の経過時間の長短の違いに関わらず、-80 凍結保存下ならば、高分子量のゲノム DNA は保たれているという結果であった。

さらにこれら死後臓器組織から得られた DNA は、次世代シーケンス解析に適用できる質が保たれていることも示された。

以上のように当初の計画では、変性の少ない細胞のみを選別回収して、より質の高い DNA を抽出することを目標としていたが、予想外に臓器組織全体から抽出したゲノム DNA の質が高いことが明らかとなった。そのことはゲノム DNA の解析目的であるならば、病理解剖までの死後経過時間に関わらず、採取した組織を-80 凍結保存さえすれば、比較的品質の高いゲノム DNA を保存しておけるということの意味している。設備の整った研究機関ではなくても、一般医療機関においても-80 凍結保存が可能なディープフリーザーさえ設置されていれば、他に特別な機器導入はせずとも、将来の医学研究のために死後臓器試料の DNA を品質を保ちながら容易に保存できることは大きな利点である。

現在、国内数カ所の機関において、ヒト臓器組織を凍結保存して将来の医学研究に用いようとするバイオバンク事業が実施されている。本研究の結果から、病理解剖により得られる臓器組織試料をバイオバンク事業のように凍結保存しておくことで、将来的に病因や病態解明のための質の高いゲノム解析が可能であることが示唆される。

本研究ではさらに、死後臓器組織内に生細胞はどの程度存在しているのか、病理解剖で採取された骨髄単核細胞について検討した。その結果、検討した全症例で死後経過時間の長短に関わらず、死後時間最長約 11 時間の状態であっても、約 7 割以上の骨髄単核細胞が生細胞と判定しえる状態で、予想以上に生細胞と判定しえる細胞が残存していることが分かった。

このことは、臓器が異なるため断定的なことは言えないが、前述した死後の臓器組織において高分子量のゲノム DNA が保たれる理由と関連しているのかもしれない。さらに将来的には、死後臓器組織から得られた生細胞を用いて、核酸や蛋白など細胞の機能解析、iPS 細胞実験など病因や病態の解析ができる可能性も示唆されたと考えている。

以上、病理解剖で得られたヒトの死後臓器組織試料には、臓器組織の種類、および死後の経過時間に関わらず、高分子量のゲノム

DNA は保たれており、次世代シーケンス解析にも適用できる可能性が高いことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

中川智貴、高屋敷典生、野口雅之、病理解剖の死後臓器組織におけるDNA保存状態の検討、第104回日本病理学会総会、2015年4月30日、名古屋国際会議場、名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高屋敷 典生 (TAKAYASHIKI, NORIO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00364521

(2) 研究分担者

野口 雅之 (NOGUCHI, MASAYUKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00198582

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

中川 智貴 (NAKAGAWA, TOMOKI)