

古賀宣勝氏の学位論文審査の要旨

論文題目 イムノビーズによる便中大腸癌細胞の分離と大腸癌診断実用化研究
(Non-invasive methods for diagnosing colorectal cancer using
colonocytes isolated from feces by immuno-magnetic beads)

大腸癌の死亡者数は全悪性腫瘍のうち上位を占め日本でも年々増加している。かかる状況において大腸癌検診法として便潜血反応検査が広く普及しているが、便中の微量なヘモグロビンを診断するものであり、大腸癌を特異的に診断できない問題点がある。以前、著者らは抗 epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)抗体が結合した磁気ビーズ(イムノビーズ)を用い、自然排泄便からの癌細胞回収法を報告した。そこで本研究では、便分離細胞を用いた新しい大腸癌検診法の開発を目的として、イムノビーズを用いた便中剥離細胞の回収法の改良、回収剥離細胞における遺伝子発現解析や臨床病理学的因子との比較検討などを行った。

まず、自然排泄便の保存条件を検討するために、便を当日処理群、4°Cあるいは37°C下で1、2、3日間保存群の7群に分け、それぞれから便中剥離細胞を分離回収しDNAおよびRNAを抽出後、核酸量の比較を行った。つぎに便から効率よく剥離細胞を回収するために、粒子径の異なるイムノビーズに抗体価の異なるEpCAM抗体を結合させ、培養細胞での回収効率や大腸癌患者便を用いた便分離細胞数の比較を行った。最後に、大腸癌患者166名と健常者134名の自然排泄便を対象に、便分離細胞のmRNAを抽出し、定量性real-time PCRによる遺伝子発現解析を行った。その結果、4°Cで3日間保存した便からは当日処理群と比べて同等の細胞が回収可能だった。一方で37°Cで保存した便は1日間でも有意に回収細胞数が減少していた。また便中剥離細胞を効率よく回収するためには、粒子径が小さく抗体価の高いEpCAM抗体を結合させたイムノビーズが最も有用であった。遺伝子発現解析が検討可能であった大腸癌患者127例、健常者101例について4種類の遺伝子を用いて検討すると、感度58.3%および特異度88.1%という結果であった。また感度は腫瘍の占拠部位(P=0.01)、および腫瘍径(P=0.02)と関連があったが、深達度(P=0.06)や進行度(P=0.37)とは関連がなかった。

本研究により、便中剥離細胞は冷蔵保存が可能であり、大規模な検体を処理する癌検診には適したサンプルであることが示された。また粒子径の小さいビーズと高力価の抗体を結合させることにより、便中剥離細胞を効率よく回収できることが明らかになった。さらに便中剥離細胞便から回収しうるRNA量は極微量であることから、標的遺伝子として癌組織に高発現している遺伝子を解析する必要性が示唆された。

審査の過程において、EpCAM抗体結合イムノビーズを用いた便中剥離細胞回収法の詳細と妥当性、便中剥離細胞の回収率ならびに正常細胞と癌細胞の回収比率、EpCAMの機能と発現の局在、便潜血免疫反応検査の有用性と限界、回収した便中剥離細胞からのRNAを用いた遺伝子解析におけるinternal controlの妥当性、adenomaや炎症性腸疾患における有用性の検討、今後の展望などについて質問がなされ、申請者からは概ね適切な回答と考察が得られた。

本研究は、自然排泄便中の癌細胞を効率よく回収し、遺伝子発現の解析を通して大腸癌を効率よくスクリーニングする新たな方法論を確立した点で、学位の授与に値するものと評価した。

審査委員長 消化器内科学担当教授

審査結果

学位申請者名：古賀宣勝

専攻分野：消化器外科学

学位論文題名： イムノビーズによる便中大腸癌細胞の分離と大腸癌診断実用化研究
(Non-invasive methods for diagnosing colorectal cancer using
colonocytes isolated from feces by immuno-magnetic beads)

指 導：馬場秀夫 教授

判定結果：

可

不可

不可の場合：本学位論文名での再審査

可

不可

平成 21 年 7 月 7 日

審査委員長 消化器内科学担当教授

伊藤 裕

審査委員 機能病理学担当教授

伊藤 隆明

審査委員 病態情報解析学担当教授

安東 由喜雄

審査委員 免疫識別学担当教授

西村 泰裕