

遺伝子関連検査を支える 核酸自動抽出装置 Maxwell® RSC, FFPE 編



日本大学 医学部
腫瘍病理学
中西陽子 先生

イントロダクション

一般的に抽出された組織検体は、病理診断のため、ホルマリン固定・パラフィン包埋の処理を経て、FFPE として加工されます。近年では、病理診断で使用した FFPE を材料とした遺伝子検査が増加しています。FFPE は調達しやすく、かつ比較的安定的に保存できる検体であることから、病理診断後も長期間保存されていることが多く、新たな検査のたびに組織を採取する必要がなくなるなど、研究目的としても有用なサンプルとして広く利用されるようになりました。

このように、遺伝子検査のためのサンプルとして FFPE の価値が再認識されると同時に、メーカーからも様々な FFPE 専用の核酸抽出キットが発売され、誰でも比較的簡単に核酸を精製することができるようになりました。しかし、FFPE から核酸を抽出する手順において、脱パラフィン処理、脱クロスリンク処理など煩雑な前処理プロトコルや、実験者の技量によるばらつきに悩んでいる方も多く存在します。本稿ではこれらの諸問題を解決する自動核酸抽出装置 Maxwell® RSC Instrument を用いた RNA の抽出例について日本大学の中西先生にご執筆いただき、FFPE 対応 DNA 抽出キットの特性についてもご紹介いたします。

RNA 抽出：FFPE 検体から自動抽出した RNA を用いた融合遺伝子の検出

これまでホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体は、固定の影響から分子生物学的解析には向かない検体と言われてきました。しかし、患者さんから採取される組織検体のほとんどは FFPE として扱われます。FFPE は、形態情報だけではなく治療法とその効果や予後など、患者さん個々の臨床情報を有する貴重な医療資源となるので、FFPE を用いた遺伝子実験の成功は、標的遺伝子の臨床的意義についての検討に必須です。さらに、レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法を用いて標的細胞や組織だけを回収すれば、組織や細胞の形態と、分子の状態をより厳密にリンクさせた解析が可能となります。研究レベルでの RNA 解析は、マイクロアレイや定量 RT-PCR 法による発現定量解析が主体となるかと思われませんが、臨床の場においての RNA 解析は、特に腫瘍の鑑別診断に重要な融合遺伝子の検出に用いられます。臨床現場での遺伝子解析は、作業の標準化や精度管理の点からも、機械化、自動化の普及が望まれます。

今回、四肢に発生する骨軟部腫瘍の中で 3 番目に多く、SYT (SS18) -SSX 融合遺伝子が責任遺伝子として同定されている滑膜肉腫症例の FFPE を対象として、Maxwell® を用いた RNA の自動抽出を行い、同融合遺伝子の検出を行いました (図 1, 2)。SYT (SS18) -SSX 融合遺伝子の迅速な検出は治療法の決定や予後予測のための鑑別診断に有用であることが示されました。

NGS の普及によって、FFPE からの DNA、RNA 解析は患者さんの個別化治療の実践や新規治療薬の開発にますます必須となってくると考えられます。解析の Key となる Pre-analytic phase とされる検体処理が、解析方法の進歩に追従していくことが求められます。

DNA 抽出：FFPE 検体からの DNA 抽出キットの使い分け

Maxwell® には、FFPE から DNA を抽出するキットが 2 種類用意されています。右表に示すように、それぞれのキットには主に前処理において大きな違いがあります。Maxwell® RSC DNA FFPE Kit - PKK, Custom (カタログ番号 AX2500) では、FFPE をそのまま Proteinase K 反応液に加え、70℃ で一晩インキュベーションした後にこの溶解液を Maxwell® 専用カートリッジに加えるだけです (脱パラフィン処理・脱クロスリンク処理不要)。前処理が飛躍的に簡略化された本キットは、多くの FFPE からルーチンに DNA 抽出を行い、TaqMan 法やサンガーシークエンスのような PCR による変異解析を目的とする研究者の方々に最適です。一方、Maxwell® RSC FFPE DNA Kit (カタログ番号 AS1450) は、脱パラフィン処理・脱クロスリンク処理などの前処理を必要とします。これらの前処理により高品質な DNA を高収量で得ることができます。このキットでは、FFPE の処理において、キシレンのような有害な有機溶剤は不要なため、より安全にご使用いただけます。このように抽出された高純度かつ高収量の DNA は、NGS を始めとするあらゆるアプリケーションに適します。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Maxwell® RSC Instrument	1 式	AS4500	2,800,000
Maxwell® RSC RNA FFPE Kit	48 回分	AS1440	41,000
Maxwell® RSC DNA FFPE Kit - PKK, Custom	48 回分	AX2500	41,000
Maxwell® RSC DNA FFPE Kit	48 回分	AS1450	41,000

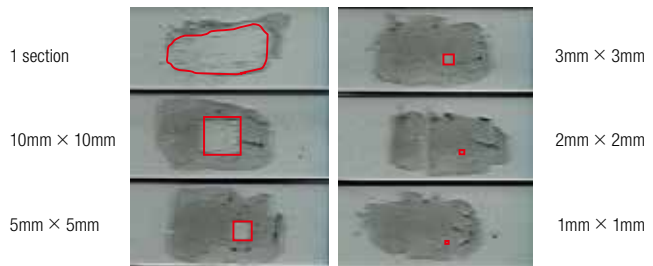


図 1. FFPE から回収したサンプルの大きさ

日常的に病理で薄切される切片の厚さは 4 μm です。この切片を脱パラフィンして、図のように大きさを变更后腫瘍細胞をメスで削り取って回収しました。チューブに入れて、前処理を行います。腫瘍細胞含有量を増やすためには、切片の状態を脱パラフィンを行った後から標的部位的組織や細胞を回収すると前処理の手間も減り一石二鳥です。特に RNA の解析では検査対象となる腫瘍組織や腫瘍細胞のみを回収することは重要で、標的の領域が図の赤枠のように大きければ LMD でなくてもメスで十分に回収可能です。

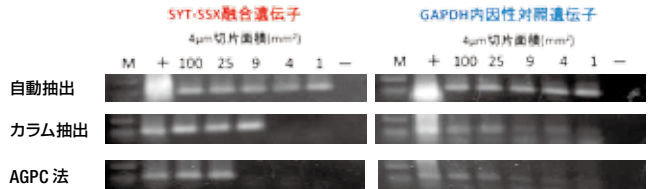


図 2. FFPE から回収したサンプルの大きさおよび抽出法の違いによる RT-PCR の結果の比較
吸光度で RNA を定量するとフェノール混入の影響が、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法が最も RNA 回収量が多く見られました。しかし、実際に RT-PCR を行ってみると、今回試したピース法による自動抽出が、標的融合遺伝子転写産物を含めて最も良く抽出できていることが示されました。ただし、断片化の影響も考慮し、PCR 産物が 100-150 bp 程度になるようなプライマー設計も必要です。定量 RT-PCR でも同様の結果が得られています。

2 つの FFPE DNA 抽出キットの特徴比較

製品名	DNA FFPE Kit - PKK, Custom	DNA FFPE Kit
カタログ番号	AX2500	AS1450
DNA 収量	低い	高い
前処理の工程	極めて簡単	一般的
推奨の用途	主に PCR や qPCR	NGS を含む全てのアプリケーション
収量 (ng)	5 μm × 4 枚あたり	5 μm × 1 枚あたり
肝臓	304	50-500
脾臓	414	1,500-2,250
脳	193	100-200