

Title	スルホン化DNAプローブを用いた組織in situ hybridization法の検討：ヒト腭および顎下腺組織におけるアミラーゼmRNAの局在
Author(s)	森元, 秀起
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35668
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	もり 森	もと 元	ひで 秀	き 起
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8002	号	
学位授与の日付	昭和63年3月1日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	スルホン化DNAプローブを用いた組織in situ hybridization法の検討 —ヒト膵および顎下腺組織におけるアミラーゼmRNAの局在			
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞			
	(副査) 教授 松原 謙一 教授 藤田 尚男			

論文内容の要旨

[目的]

遺伝子工学の進歩によって各種の細胞増殖因子やレセプター、ホルモン、酵素等をコードする遺伝子が次々と分離同定され、細胞の遺伝子レベルにおける解析が急速に進みつつある。本研究は、こうした細胞生物学的研究の成果を臨床病理学の分野に導入することを目的として、免疫組織学的に検出可能な非放射性スルホン化DNAをプローブとした組織内mRNA-DNA in situ hybridization法について検討を加えたものである。

[方法ならびに成績]

1. スルホン化DNAプローブの作製

Budowsky (1972) らに従い、0.1mg/mlに調整したDNAをheat-denatureの後、1 M o-methylhydroxylamineおよび2 M bisulfiteの混合液と室温で12時間反応させることにより、DNAのcytidine残基にhaptenとしてのsulfone基を化学的に結合させた。ニトロセルロース膜上でのdot blot hybridizationでは、膜上に固着させた約1.25pgの標的核酸の検出が可能であった。

2. ヒト膵および顎下腺組織におけるアミラーゼmRNAの検出

外科的に切除されたヒト膵および顎下腺をただちに各種固定液にて固定し、パラフィン包埋の後、3~4 μ の切片とした。これらの切片に対し、0.2N塩酸処理、65°C加熱、蛋白分解酵素等による種々の前処理をおこなった後、種々の長さ(1.3kbp~50bp)に調整したヒト唾液腺型アミラーゼcDNAをプローブとして、42°Cの条件下でhybridizationをおこなった。特異的hybridsの検出は、スルホン化DNAに対するモノクローナル抗体(Orgenics社)を第一抗体とする酵素抗体法(ABC法)でおこなった。

プローブの長さを100~1000bpとしたときに膵の腺房細胞および顎下腺の漿液細胞の細胞質に特異的なsignalが得られた。signalは主に、粗面小胞体の豊富な核膜周囲および基底膜側に認められた。組織の固定は10%冷緩衝ホルマリンが最も良好で、パラホルムアルデヒドがこれに次ぎ、Carnoy固定では特異的シグナルは減弱した。一方、非特異的核酸をプローブとした場合やRNaseで切片を前処理したnegative controlでは、反応は認められなかった。

3. 培養細胞における癌遺伝子mRNAの検出

Ha-ras gene (T24)にてtransformしたNIH/3T3細胞をスライドガラス上に付着培養の後、冷緩衝ホルマリンで固定した。この標本に対し、スルホン化v-Ha-ras (800bp)をプローブとしてin situ hybridizationをおこなったところ、細胞質全体に強い反応が得られた。また、正常のNIH/3T3細胞に対しては、反応は得られなかった。一方、c-myc遺伝子の転写亢進が知られているヒト前骨髄球性白血病細胞(HL-60)のホルマリン固定パラフィン切片に対し、v-myc (900bp)をプローブとしてhybridizationをおこなったところ、約半数の細胞にmyc遺伝子のmRNAが検出された。

4. ヒト大腸癌、および胃癌組織における癌遺伝子mRNAの検出

ヒト大腸癌新鮮切除標本を直ちに冷緩衝ホルマリンで短時間固定後、パラフィン切片を作製した。これらに対し、v-Ha-rasおよびv-mycをプローブとしたin situ hybridizationをおこなったところ、大腸癌33例中10例にHa-ras、13例にmyc遺伝子のmRNAが検出されたが、これらの転写亢進は癌巢に一樣にみられるのではなく、部位によって強弱のあることが示された。また、これらの転写活性の亢進は同時におこなったNorthern blot法でも確認された。一方、胃癌組織では、検索した10例中1例にのみmyc遺伝子の転写亢進がみられた。

[総括]

非放射性スルホン化DNAプローブによる組織内mRNA-DNA in situ hybridization法の検討をおこない、以下の結論を得た。

1. 組織の固定は冷緩衝ホルマリンが良好で、パラフィン切片でも十分にmRNAの検出が可能である。
2. 本法に用いる至適プローブ長は100~1000bpである。
3. 病理標本において癌遺伝子mRNAの検出も可能であり、本法は臨床病理学の分野に応用可能である。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト膵および唾液腺組織におけるアミラーゼmRNAを対象として、非放射性スルホン化プローブを用いたhisto-in situ hybridization (HISH)法の基礎的検討をおこなったものである。その結果、用いるプローブの長さ、組織調整法、hybridizationにおける至適条件がしめされ、また、検出感度も明らかにされた。著者らによって開発された本法は、現在もっとも優れた非放射性HISHであると考えられ、癌遺伝子mRNAなどの組織発現の研究に幅広い応用が期待される。学位に値する論

文として高く評価したい。