



Title	A Simple and Useful Method for Simultaneous Screening of Elevated Levels of Expression of a Variety of Oncogenes in Malignant Cells
Author(s)	中森, 正二
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36855
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	なか	もり	しょう	じ
	中	森	正	二
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8825	号	
学位授与の日付	平成元年8月12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	A Simple and Useful Method for Simultaneous Screening of Elevated Levels of Expression of a Variety of Oncogenes in Malignant Cells (腫瘍細胞における簡便な同時多種類癌遺伝子発現増大検索法の開発)			
論文審査委員	(主査)	教授 森 武貞		
	(副査)	教授 吉川 寛 教授 松原 謙一		

論文内容の要旨

〔目的〕

癌遺伝子の発現増大は様々な腫瘍細胞において報告されており、その細胞の癌化における意義が現在広く検討されている。しかし、現在までに同定されている数多くの癌遺伝子すべてについて、腫瘍細胞における発現増大を調べるには、多大の労力と時間が必要である。すなわち、従来、癌遺伝子の発現検索に使用されている RNA dot blotting 法や Northern blotting 法といった RNA blotting 法を用いると、多くの癌遺伝子一つ一つにつき hybridization, washing 等の操作を行わなければならない。そこで、本研究では、このような癌遺伝子発現増大の検索を簡素化するために、腫瘍細胞から作製した cDNA を用いることによって、一度に多種類の癌遺伝子の発現増大を検索すること (simultaneous screening) が可能かどうかを検討した。

〔方法〕

細胞から Guanidinium/CsCl¹⁾ 法により RNA を抽出、Wahili²⁾ らの方法に従って全 mRNA に対する一本鎖 cDNA を合成した。その際、cDNA 合成系に、[α -³²P]dCTP を加えることにより、³²P でラベルした cDNA を得た。これを probe として、21種類の癌遺伝子 DNA、陽性対照の β -actin DNA、陰性対照の plasmid pBR322 DNA を固定した nylon filter と hybridization を行い、autoradiography にて見いだされるスポットより、発現増大している癌遺伝子を同定した。

〔成績〕

(1) 正常細胞の20~30倍の myc 遺伝子の発現増大が報告されているヒト白血病細胞株 HL60を用いて、異なる4種類の cDNA の合成条件を cDNA probe の収率・放射性活性・伸長度・autoradiography

上のスポットの明瞭さより検討すると、鋳型 RNA は精製した mRNA でなく全 RNA を使用し、放射性活性が低い [α - 32 P]dCTP を高濃度使用した場合に、最も良好な myc 遺伝子の発現増大の確認が得られた。

- (2) H-ras 遺伝子の発現量が異なる NIH/3T3 transformant を用いて、本法 (simultaneous screening method と命名) により癌遺伝子発現を調べると、正常の 5~10 倍以上の H-ras 遺伝子の発現増大があれば、相同性の高い K-ras, N-ras 遺伝子を含めて他の癌遺伝子とは、autoradiography 上再現性よく、明瞭に識別可能であった。このとき、autoradiography 上でのスポットの density を densitometry で数量化すると、 β -actin のスポットの 1% 程度の density であった。
- (3) myc 系, ras 系遺伝子以外の癌遺伝子の発現増大が本法によって検索可能か否かを erbB, fgr, fos 遺伝子の発現増大がそれぞれ特異的に報告されている細胞を用いて検索したが、これらの癌遺伝子発現増大は、相同性を有する他の癌遺伝子と混乱することなく、特異的に検出可能であった。
- (4) これまで癌遺伝子の発現増大が検索されていないヒト腫瘍株 9 例 (大腸癌 2, 甲状腺癌 5, その他 2), Marek 病細胞株 1 例, ヒト原発固形腫瘍 10 例 (大腸癌 6, 胃癌 1, 甲状腺癌 1, その他 2) における癌遺伝子の発現増大を本法を用いて検索した結果, 9 例において 5 種類の癌遺伝子の発現増大が見いだされた (myc 6, raf 1, N-myc・N-ras 1, myc・myb 1). これらは, 従来の RNA blotting 法にても確認できた。
- (5) 放射線誘発マウス骨肉腫の DNA を用いて, DNA transfection 法で transform したハムスター細胞における発現増大癌遺伝子を本法で検索したところ, mos 遺伝子の発現増大が確認され, このハムスター細胞の transformation における mos 遺伝子の関与が示唆された。

[総括]

腫瘍細胞における癌遺伝子の発現増大を検索する方法を簡素化するために、腫瘍細胞に存在する全 RNA に対する cDNA を作製し、それを probe として filter 上に固定した多種類の癌遺伝子 DNA と hybridization を行い、同時に多種類の癌遺伝子の発現増大の検索が可能かどうかを検討した。まず、cDNA probe の合成条件を検討すると、精製した mRNA でなく全 RNA を使用し、放射性活性の低い [α - 32 P]dCTP を高濃度使用した場合が最良であり、この条件にて、正常細胞の 5~10 倍の発現増大があれば再現性よく、また相同性のある癌遺伝子と混乱することなく、特異的に癌遺伝子の発現増大の検索が可能であることがわかった。さらに、実際、本法を用いて 10 例の腫瘍細胞株、10 例の原発固形腫瘍における癌遺伝子の発現増大を検索すると、9 例において 5 種類の癌遺伝子の発現増大が見いだされ、従来の RNA blotting 法によっても確認が出来た。従って、本法を用いて癌遺伝子の発現増大の検索を行うことは可能であり、今後、腫瘍細胞における癌遺伝子の意義を検討するにあたって、本法の開発は十分意義あるものと考えられる。

- 1) : Chirgwin, J. M., et al. : Biochemistry, 18 ; 5294-5298, 1979
- 2) : Wahili, W. et al. : Develop. Biol., 67 ; 371-383, 1978

論文の審査結果の要旨

癌遺伝子は正常細胞にも存在するが、これら遺伝子の量的・質的な異常が細胞の癌化に関わっているとされている。したがって、癌細胞における癌遺伝子の発現量の量的異常を検索することは細胞の癌化機構の理解に役立つことはいうまでもなく、個々の臨床例において、この様な量的変化を捉えることが出来れば癌の診断や悪性度の判定に役立つものと思われる。現在癌遺伝子は50種類ほど同定されており、癌遺伝子すべてについて、従来のRNA blotting法で癌細胞における癌遺伝子の発現増大を検索するのは煩雑で労力を要する。本論文では、癌細胞における癌遺伝子の発現増大をcDNAを用いることにより、同時に多種類の癌遺伝子について簡便に検索する方法を開発、検討している。また、実際に、感度よく癌細胞における癌遺伝子の発現増大を見出しており、その実用性を証明している。したがって、本論文において開発された方法は、癌遺伝子発現増大検索に寄与するものと思われる。学位に値する。