The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	New approach for Detection of Amplification in Cancer DNA Using Restriction Landmark Genomic Scanning.
Author(s)	広常, 真治
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38168
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【12】

氏　　名	広　常　真　治（ひろ つね しん じ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　10620　号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	New approach for Detection of Amplification in Cancer DNA Using Restriction Landmark Genomic Scanning. （RLGS法を用いた癌組織におけるDNA増幅の検出。）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　松原　謙一 （副査） 教　授　谷口　維紹　　教　授　吉川　　寛

論 文 内 容 の 要 旨

（目　　的）

細胞の癌化において癌遺伝子の活性化は重要な役割を果たしている。この活性化のメカニズムとして癌遺伝子を含む領域のDNA増幅が挙げられる。神経芽細胞腫におけるN-mycの増幅や乳癌におけるhis,int-2の増幅に見られるように，特定の癌と特定のDNA増幅は強く相関していることが多い。従って癌組織においてDNAの増幅を検出することは発癌に重要な遺伝子を解明する上でも，また未知の癌遺伝子を発見する上でも重要なステップである。従来はDNA probeを用いたSouthern blot，あるいはin gel renaturation法によってDNA増幅は検出されていた。しかし前者genomの多数の点を一度に調べるのに不向きであり，後者は低倍率の増幅を検出するのに限界があった。それら従来法の欠点を克服するために今回私は畑田らが報告したRestriction Landmark Genomic Scanning（RLGS）を用いて癌組織におけるDNA増幅の検出を試みた。本法はDNAを制限酵素で切断後，末端標識し二次元電気泳導によって分離するものである。RLGS法はprofile上のスポットひとつひとつがgenome上の一点に対応し，一度に2000－3000箇所のlandmarkを検索することができるのみならず1 copyの増幅も検出することができる。RLGS法を用いて乳癌，神経芽細胞腫，甲状腺癌を解析したので以下に報告する。

（方　　法）

用いた癌組織　乳癌，神経芽細胞腫，甲状腺癌

癌組織は癌細胞の選択的切り出しを行った。

RLGS　RLGSは次の8ステップよりなる。

1．blocking（DNApolymeraseIをdeoxy NTP analogue存在下に反応させDNAのnick，gap等を埋めbackgroundを落す。）
2．Landmark cleavage（DNAをNotIにて切断する。）
3．end labeling（2によって生じたDNA fragmentをsequenase ver. 2を用いて［$\alpha-^{32}$P］dGTP，［$\alpha-^{32}$P］dCTPにより末端標識する。）
4．1st cut（EcoRV，BglII等平均鎖長の短い制限酵素で切断する。）
5．1st fractionation（薄層アガロースゲルにて分離する。）
6．2nd cut（アガロース中にてHinfIで切断する。）

7．2nd fractionation（アガロース電気泳導と垂直方向にアクリル電気泳導を行う。）

8．dry up と autoradiography

RLGS profile のスポットの同定と増幅度の測定

癌部と正常部の RLGS profile を比較して癌部で強度が増強しているスポットを選び出した。次にRLGS profile より推定される制限酵素マップから乳癌においては int-2，神経芽細胞腫においては N-myc の増幅が示唆され，それら癌遺伝子の領域を含む genomic clone を正常部に混ぜて RLGS を試み癌部において増幅しているのと同じスポットが増強されることを確認した。また，増幅度は PDQUEST を用いてスポットの強度を測定し，その比率から計算した。

Southern blot

乳癌においては int-2 領域の DNA probe ss－6，神経芽細胞腫においては N-myc 領域の PMY-951 を用いて Southern blot を試み各々 int-2，N-myc の増強を確認した。

（成　績）

RLGS profile 上乳癌においては 10 個癌部において増幅しているスポットがあり int-2 領域を含む DNA clone を混ぜることによりそのうち 3 個が int-2 であることを確認した。

また神経芽細胞腫においても 5 個癌部において増幅しているスポットがあり，N-myc 領域を含む DNA clone を混ぜることによりそのうち 2 個が N-myc であることを確認した。さらに PDQUEST による測定の結果 int-2 は 6 倍，Nmyc は 85 倍の増幅であることがわかった。次に今まで DNA 増幅の報告のない甲状腺癌に対しRLGS を適用した結果，3 例中 1 例において 1 個の増幅したスポットを検出することが出来た。また，PDQUEST による解析の結果 5 倍の増幅であった。

（総　括）

RLGS 法は genome を一挙に 2000－3000 箇所検索することが可能であり，しかも 2 倍の copy 数の変化も検出することができる。甲状腺癌における未知の増幅の検出に見られるように従来の方法では解析が困難だったものに対しても適用可能である。今回報告した DNA 増幅の検出だけでなく，現在染色体の欠失に対する応用も検討中であり発癌のメカニズム解明に有用な方法となると考える。

論文審査の結果の要旨

本大学院院生，広常真治は Restriction Landmark Genomic Scanning（RLGS）法の研究開発に従事しゲノム DNA の二次元展開技術を世界で初めて開発し，それを応用してがんにおけるゲノム DNA の変化を容易に検出できることを示した。特にがんによって決まったゲノム DNA の断片が再現性高く増幅するという事実の発見はがん研究に主要な貢献をなすものである。RLGS 法は独創的でがん遺伝子の研究にかかわらず応用範囲が広く，広常真治のこれにかかわる役割はめざましいものがあり学位授与が相当と考える。