



Title	Extraction and Analysis of Diagnostically Useful Proteins from Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections
Author(s)	池田, 公正
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41183">https://hdl.handle.net/11094/41183</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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	池 田 公 正
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 5 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 2 月 12 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Extraction and Analysis of Diagnostically Useful Proteins from Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections (ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片からの蛋白の抽出および解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門田 守人 (副査) 教 授 青 笹 克 之 教 授 野 口 真 三 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目的]

病理組織診断に汎用されているホルマリン固定パラフィン切片から蛋白を抽出する新しい手法を開発し, Western blotting と免疫組織化学染色を同一材料で行うことで診断的価値の高い蛋白発現の詳細な検討を可能にすることを目的とした。

#### [材料および方法]

(組織材料) 大腸癌および腺腫の切除標本を10%リン酸緩衝ホルマリンで4°C・24~48時間の固定を行った後, パラフィン包埋した。

(蛋白抽出) 隣接切片のH-E染色を観察しながら, 50 μm厚の切片3枚から5mm角の癌組織を切り出した。腺腫および正常粘膜も同様に切り出した。さらにこれを細切り, 0.1%または2.0% SDS含有RIPA bufferを加え, 様々な条件下(0°C×2hr, 37°C×2hr, 60°C×2hr, 100°C×20minの後60°C×2hr)でincubationを行った。incubationの後, tissue lysateを遠沈し, 上清を回収, 蛋白濃度測定を行った。

(SDS-PAGE および Western blotting) 5mm角・50 μm厚1枚分のlysateでポリアクリルアミド電気泳動を行い, Coomassie染色で抽出蛋白の分子量を調べた。

Western blottingでは, polyvinylidene difluoride membraneに転写後, 1次・2次抗体でincubationを行った。さらにsensitivityを調べるために, lysateのsequential dilutionを行いproliferating cell nuclear antigen (PCNA)に対するWestern blottingを施行した。また, 正常粘膜・腺腫・癌組織におけるcyclin D1およびCDK2の発現量をdensitometryにより比較した。

### [成績]

(蛋白抽出) 0.1% SDS 含有 RIPA buffer では蛋白は抽出されず、2 % SDS 含有 RIPA buffer では、5 mm 角・50  $\mu\text{m}$  厚 1 枚分の癌組織から  $0^\circ\text{C} \times 2 \text{ hr}$  で平均  $13.6 \mu\text{g}$ ,  $37^\circ\text{C} \times 2 \text{ hr}$  で  $14.3 \mu\text{g}$ ,  $60^\circ\text{C} \times 2 \text{ hr}$  で  $15.2 \mu\text{g}$  と微量の蛋白しか抽出できなかった。これに対し  $60^\circ\text{C} \times 2 \text{ hr}$  の前に  $100^\circ\text{C} \times 20 \text{ min}$  の preincubation を加えることにより  $121.5 \mu\text{g}$  と抽出効率 ( $164.2 \mu\text{g}/\text{mg}$  乾燥癌組織) が飛躍的に向上した。Coomassie 染色の結果、10 kD から 120 kD の分子量の蛋白が確認された。

(Western blotting) 正常粘膜および癌組織での PCNA の発現を確認し、さらに sequential dilution では 32 倍希釈まで検出可能であった。その他、核蛋白である p53・cyclin D1・cyclin E・CDK2・CDK4、細胞質蛋白である  $\beta$ -catenin、細胞膜結合蛋白である E-cadherin が検出された。

(手技の応用) 正常粘膜・腺腫および癌組織での cyclin D1 と CDK2 の発現量を比較した結果、正常粘膜に比べ腺腫では cyclin D1 は 2.1 倍、CDK2 は 1.4 倍の発現を示した。さらに癌組織ではおのおの 3.6 倍・3.3 倍と発現量が増加していた。

### [総括]

ホルマリン固定標本では、ホルマリンによる化学的架橋のため蛋白抽出は不可能であると報告されてきた。標本を高濃度界面活性剤で高温下に処理する本手法によってはじめて、ホルマリン固定標本からも新鮮凍結標本からと同様に蛋白抽出・分析が可能となった。

PCNA の sequential dilution の結果では、Western blotting には 1 mm 角・50  $\mu\text{m}$  厚 1 枚分のパラフィン包埋組織で十分であると計算された。この手法で種々の核蛋白や細胞質蛋白および膜結合蛋白が抽出可能であったが、これの中には、組織切片の免疫組織染色でも検出が難しい蛋白も含まれている。これは、2 % SDS 含有 RIPA buffer を用いて高温下に incubation することで架橋が解離し、抗原性が回復したためと考えられる。免疫組織染色では antigen retrieval の目的で microwave の熱効果が頻用されているが、本手法もこれと同様の機序に基づくものと思われる。

この手技の有用性は、まず第一に顕微鏡観察下に微小病変を分割的に切り出し、contamination を抑えることによって精密な解析ができることがある。第 2 に、これまで蓄積された膨大な量のホルマリン固定標本が利用可能となる点である。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、微量のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片から蛋白を抽出し、Western blotting にて解析する新しい手法の開発を目的としたものである。ホルマリン固定パラフィン包埋切片から、目的とする病変を顕微鏡観察下に microdissection を行い、細片化の後、高温下で高濃度の界面活性剤を用いて incubation することにより、高率に蛋白を抽出することができた。Western blotting では、核・細胞質・膜結合すべての分画の種々の蛋白が検出可能であった。本手法は、形態を参照しながら微小な病変を個別に採取・解析することができる故、新鮮凍結標本が採取不可能な病変、または contamination のため肉眼的に採取困難な病変に対し有用であると考えられる。本研究は、これまで定量的判定が不可能であった病変において、初めて詳細な蛋白発現の検討を可能にしたものであり、学位に値する業績と考える。