



Title	Identification of a Novel Gene Marker Specific for Epithelial Cells by Utilizing a 3'-directed cDNA Library
Author(s)	大西, 直
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41211
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

氏名	大西直
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14259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	Identification of a Novel Gene Marker Specific for Epithelial Cells by Utilizing a 3'-directed cDNA Library (3'-directed cDNA library を用いた新規の上皮細胞特異的遺伝子マーカーの同定)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 青笹 克之 教授 野口眞三郎

論文内容の要旨

[背景および目的]

近年、組織特異的に発現する遺伝子をマーカーとして、リンパ節、血液、骨髓などの中に微量に存在する癌細胞をRT-PCRを用いて検出する方法が報告され、より正確な癌の進展度診断への応用が期待されている。それらの方法では 10^5 から 10^7 個の正常細胞に混じる1個の癌細胞を検出できると報告されているが、逆に高感度な条件下では対象となる正常組織でも陽性の結果が出ることが知られており、そのためには感度を制限する条件設定が必要となるばかりでなく正確な診断が困難となる。そこで特異性に優れた新規の組織特異的遺伝子マーカーが同定できればより信頼性のある癌細胞の検出法の構築につながると考える。本研究では大腸癌をモデルに、新規の遺伝子マーカーの検索を試みた。

[方法および成績]

(1) 候補遺伝子の選択 大腸組織特異的発現を示す遺伝子の候補は大腸粘膜の3'-directed cDNA library (Okubo, DNA Res. 1, 37-, '94) より選択した。この種のlibraryは、細胞株やなるべく単一の細胞集団になるように採取された組織を材料としている。それぞれより抽出したmRNAのpoly(A)のすぐ上流の平均300塩基の配列(gene signature, GS)を収集し、各々に相当する遺伝子をGenBankを通じて同定した後、組織や細胞別に発現の強いものから順に並べたものである。大腸粘膜の3'-directed cDNA libraryは658の発現遺伝子を表す959のGSから構成され、これとHepG2, HL-60, granulocytoid, monocyteoidの各細胞のlibraryとを比較し、大腸粘膜のlibraryにのみ現れるGSの中で比較的発現の強いと思われる8個を候補遺伝子として選択した。(2) 一次スクリーニング これら8個のGSの大腸正常粘膜、大腸癌、正常リンパ節、正常肝組織の各組織における発現をRT-PCRにて検討したところ、GS02801とGS04094の2個は大腸正常粘膜と大腸癌でのみ発現(+)であり、候補遺伝子とした。この2つはいずれも未知の遺伝子であった。(3) 二次スクリーニング 2つのGSの様々な組織、細胞における発現をDNase処理後のRT-PCRにて確認したところ、いずれも3組の大腸正常粘膜と癌では発現(+), 3個の正常リンパ節、正常肝組織では発現(-)であった。一方大腸癌細胞株のLoVoではいずれも発現(+)であったが、HCT116ではGS04094が、SW480ではいずれも発現

(-)であった。また GS04094は大腸以外に胃や回腸でも発現を認めた。(4) GS04094の上流配列の決定および特異性, 感度の検討 GSは元来エクソン-インtron接合部を含んでいる可能性は低いので, GS04094の上流の未知の配列を 5'RACE にて決定した。その結果をもとにゲノムの PCR と RT-PCR とで異なった長さの産物を得る新規のプライマーが設計できた。このプライマーを用いた RT-PCR により, GS04094は10個の大腸癌および4個の大腸癌肝転移巣のすべてで発現(+), 5個の正常リンパ節, 2個の正常肝組織, 健常人10人の末梢血白血球のすべてで発現(−)であることが確認された。また同条件の RT-PCR にて感度検定を行ったところ, 正常リンパ節 total RNA 1 μg 中に大腸癌 total RNA を 10^{-6} μg を混ぜたものまで GS04094の発現を検出できた。GS04094については, 更に多くの大腸癌組織, 転移巣, 細胞株などにおける発現を確認した上で臨床応用を考えている。今回利用した大腸の library にもまだ候補遺伝子が多数残されており, また大腸以外の組織や細胞株の library も利用できる。従って本法により多種の癌の複数の新規遺伝子マーカーを検索することができ, 更に特異性に優れたマーカーの同定も期待できる。(5) GS04094mRNA 5'RACE で得た配列は BLAST search にてウシのイオンチャンネルに相同性を認めた。またこの配列をプローブとした Northern blot にて GS04094mRNA の全長は約2.9 kb であることがわかった。

[総括]

組織特異的に発現する遺伝子を効率よく検索できる方法を考案し, 新規の上皮組織特異的遺伝子マーカーを同定した。3'-directed cDNA library は組織特異的に発現する遺伝子の検索に有用であった。

論文審査の結果の要旨

近年, 組織特異的発現を示す遺伝子をマーカーとして, RT-PCR 法により癌の微小転移を高感度に検出する方法が数多く報告されている。本論文では大腸癌をモデルに, 組織特異的発現を示す遺伝子を検索し, その中から新規の遺伝子マーカーを同定する方法を考案し報告している。

候補遺伝子の選択にあたり, 数少ない組織特異的な遺伝子発現の報告に頼らず, 多くの候補遺伝子が選択できる 3'-directed cDNA library に着目した。このライブラリーは特定の組織や細胞で発現している遺伝子のポピュレーションを反映するように作成されており, このデータをもとに組織特異的な発現を示す遺伝子を検索することができる。

この方法を用いて大腸粘膜特異的に発現すると考えられた 8 個の候補遺伝子を選択した。これらの中から 2 回にわたる RT-PCR を用いたスクリーニングを経て, 大腸粘膜及び大腸癌では発現を認めるが, 正常リンパ節や正常肝組織では発現を認めない 2 個の新規の大腸組織特異的遺伝子を同定した。

この方法を応用すれば, 種々の臓器の癌に特異的な新規の遺伝子マーカーも検索可能であり, 本研究は学位論文に値すると考える。