



Title	Screening of Specific Changes in mRNAs in Thyroid Tumors by Sequence Specific Differential Display : Decreased expression of c-fos mRNA in Papillary Carcinoma
Author(s)	劉, 剛
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41678
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	劉剛
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14506号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Screening of Specific Changes in mRNAs in Thyroid Tumors by Sequence Specific Differential Display : Decreased expression of c-fos mRNA in Papillary Carcinoma (SS-DDによる甲状腺癌で特異的に発現量が変化する遺伝子の解析 : c-fos mRNA 発現の甲状腺乳頭癌での減少)
論文審査委員	(主査) 教授 綱野 信行
	(副査) 教授 野口眞太郎 教授 萩原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

分子生物学的手法の発達により、癌の発生や進展に関与する癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が明らかにされつつある。我々は組織で特異的に発現している遺伝子を迅速にスクリーニングするために従来の Differential Display 法に改良を加えて配列特異的 Differential Display 法 (Sequence Specific Differential Display, SS-DD) を開発した。

従来法である Differential Display 法はさまざまな癌細胞特異的に発見する遺伝子を同定するのに有効な手段であり広く用いられている。しかし、技術的制約として mRNA の 3' 非翻訳領域を中心に比較的短い PCR 産物を增幅するため偽陽性のバンドが見られることなどの問題点があり、癌組織から抽出した RNA を対象にした多数症例でのスクリーニングに直接使用するのはほぼ不可能であった。これら問題を解決するために SS-DD では 5' primer を arbitrary decamer ではなく 20mer の degenerate primer にすることにより PCR の annealing 温度を高め、さらに Ex-Taq polymerase を用いることで長鎖の PCR 産物を生じさせるようにして個人差による偽陽性を防いだ。

この研究では small G protein に対する degenerate primer を使い、甲状腺癌組織において特異的に発見が増減している mRNA を SS-DD でスクリーニングすることを試みた。

【方法】

- 1) 材料の調製：手術時に摘出された甲状腺正常組織12例、濾胞腺腫9例、乳頭癌15例を収集し、AGPC 法により total RNA を抽出した。
- 2) RNA から cDNA の逆転写：RNA を DNase 処理したのち、oligo dT にて逆転写して cDNA を合成した。
- 3) SS-DD：3' primer を poly A tail にアンカーする primer, 5' primer を small G protein ファミリーの 5' 側のコンセンサス配列に対する degenerate primer とした。Ex Taq Polymerase とホットスタート法を用いて PCR を行った。

PCR の反応条件は下記のとおりである。

94°C 2'	1 cycle
94°C 1' 40°C 2' 72°C 5'	2 cycles
94°C 1' 55°C 1' 72°C 3'	35 cycles

PCR 産物は非変性3.5%アクリルアミドゲルで電気泳動を行い、SYBR Green I による染色して蛍光イメージアナライザーによるスキャンをした後、正常組織と癌組織とでバンドの出方を比較し、正常あるいは癌組織に特異的に出現、消失しているバンドを回収し、再増幅した後プラスミドベクターと連結し、宿主大腸菌への形質転換した。得られたクローンは自動蛍光シークエンサーにより塩基配列を決定した。さらにクローニングした遺伝子の特異性を Semi-quantitative RT-PCR と Northern blotting で確認した。

【成績】

SS-DD によるスクリーニングで甲状腺乳頭癌で発現低下のみられた遺伝子のうち、その一つは、塩基配列解析で c-fos mRNA であることが確認された。Semi-quantitative RT-PCR、および Northern blotting で発現量を検討した結果、c-fos mRNA は12例すべての正常甲状腺組織で恒常的な発現が検出されたのに対し、乳頭癌15例中14例、濾胞腺腫9例中7例の組織では正常に比べて発現が低下していた。

【総括】

本研究により、c-fos mRNA は正常甲状腺組織の中で恒常的に発見しているのに対し、甲状腺乳頭癌においては減少していることがわかった。この結果より、c-fos は癌化に直接関与しているのではなく、むしろ正常甲状腺細胞の機能維持に重要な働きを担っているのではないかということが示唆される。SS-DD は腫瘍組織における mRNA の発現量の差を多数例で迅速にスクリーニングすることができるため、癌化のメカニズムの解析に有力な方法であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

甲状腺癌の癌化のメカニズムを解明するために本研究では従来の Differential Display 法に改良を加えた Sequence Specific Differential Display (SS-DD) 法を開発し、これを用いて甲状腺癌組織での mRNA の発現量をスクリーニングした。

SS-DD 法によって c-fos mRNA が甲状腺乳頭癌で減少していることを見出し、さらにこの結果を Semi-quantitative RT-PCR と Northern blotting 法によって確認した。すべての正常甲状腺組織で c-fos が検出されたのに対して乳頭癌ではほとんど検出されなかった。

本研究は SS-DD 法が従来の Differential Display 法の弱点を克服した有用なものであることを証明し、さらに甲状腺癌における c-fos の発現に関し新たな知見を加えたものである。以上より本研究は学位の授与に値すると考えられる。