The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	RAPID SCREENING OF SPECIFIC CHANGES IN mRNA IN THYROID CARCINOMAS BY SEQUENCE SPECIFIC-DIFFERENTIAL DISPLAY : DECREASED EXPRESSION OF ACID CERAMIDASE mRNA IN MALIGNANT AND BENIGN THYROID TUMORS
Author(s)	前田, 育宏
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44476
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　前田育宏（まえだいくひろ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17363　号

学位授与年月日　平成14年12月3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　RAPID SCREENING OF SPECIFIC CHANGES IN mRNA IN THYROID CARCINOMAS BY SEQUENCE SPECIFIC-DIFFERENTIAL DISPLAY : DECREASED EXPRESSION OF ACID CERAMIDASE mRNA IN MALIGNANT AND BENIGN THYROID TUMORS.
（シーケンススペシィフィックディファレンシャルディスプレイ法による甲状腺癌におけるmRNAの特異的変化の迅速スクリーニング：甲状腺悪性・良性腫瘍におけるacid ceramidase mRNA発現の減少）

論文審査委員　（主査）
教授　網野　信行

（副査）
教授　金倉　譲　教授　野口眞三郎

論文内容の要旨

〔目　的〕

Differential Display（DD）法は、2群のmRNAを比較する方法として広く活用されている。しかし、mRNAの3' 側非翻訳領域をRT-PCRで増幅するため、個人差の影響をうけ、また疑陽性が多いためヒトの癌組織の分析には不適であった。今回、その問題を解決すべく16～18 merのdegenerate primerを用いたDD法の改良法であるSequence Specific-Differential Display（SS-DD）法を用い、甲状腺の正常組織と腫瘍組織との間でmRNAの発現量の差のある遺伝子を検出する試みを行なった。

〔方法および成績〕

1．SS-DD法

甲状腺の正常組織9例、乳頭癌5例、濾胞腺腫2例および濾胞癌2例からそれぞれ抽出したRNAを逆転写し、得られたcDNAを試料として下記に示すプライマーとPCR反応条件でSS-DD法によるスクリーニングを行なった。5' プライマーは、SH2ドメインの塩基配列をもとにデザインした。PCR反応は従来のDD法よりアニーリング温度を高くして行った。

PCR条件：

5' プライマー：TTCCTGGTG(A/C)G(A/G)(G/C)A(G/C)(A/T/U)(G/C)

3' プライマー：GTTTTTTTTTTTTTTTTTTT(G/A/C)

94℃/2 min→（94℃/1 min→40℃/3 min→72℃/5 min）2 cycle→（94℃/1 min→55℃/1 min→72℃/5 min）40 cycle（5 secオートセグメントエクステンション）

この検討で腫瘍組織に比し正常組織で特異的に発現しているSN1、SN2およびSN3の3つのcDNAフラグメントを得た。これらのフラグメントについてゲル抽出後再増幅し、pMOS *Blue* ベクターへ組み込んでクローニングし塩基配列解析を行なった結果、SN2がacid ceramidase（AC）mRNAであることが分かった。他の2つのフラグメントについては、既知の遺伝子に対してホモロジーがなかった。

2．ノーザンブロット解析

AC mRNA に特異的にハイブリダイゼーションするプローブを作成し、甲状腺の正常組織および乳頭癌組織由来の total RNA を試料としてノーザンブロット解析を行なった結果、乳頭癌組織での AC mRNA の減少が確認された。

3．AC mRNA の半定量的 RT-PCR 解析

甲状腺正常組織 6 例、濾胞腺腫 6 例、腺腫様甲状腺腫 2 例、乳頭癌 7 例および濾胞癌 2 例の各組織由来の cDNA について AC mRNA の塩基配列よりデザインしたプライマーを用いて半定量的 RT-PCR 解析を行なった結果、腫瘍組織の大部分において正常甲状腺組織に比して AC mRNA の発現低下が認められた。

4．定量的リアルタイム RT-PCR 解析

正常甲状腺組織 35 例、濾胞腺腫 14 例、腺腫様甲状腺腫 11 例、乳頭癌 19 例、濾胞癌 6 例、未分化癌 2 例および悪性リンパ腫 1 例の各組織由来の cDNA について GAPDH（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）mRNA を内部標準物質として AC mRNA の定量解析を行なった。その結果、濾胞腺腫、乳頭癌および濾胞癌各組織における AC mRNA 発現の低下が認められた。

〔総　括〕

1．SS-DD 法により甲状腺の正常組織と腫瘍組織を比較した際、腫瘍組織で著明に発現が低下している 3 つの遺伝子を検出した。
2．これら 3 つの遺伝子のうち、2 つは既知の遺伝子に対してホモロジーが認められなかったが、残り 1 つについては AC mRNA であることが確認された。
3．AC mRNA について定量的リアルタイム RT-PCR 解析を行なったところ、特に癌組織においてにその発現が減少していた。
4．このことから AC が甲状腺細胞の機能に重要な役割を担っている事が示唆され、今後さらに AC の機能解析等の検討を進めることが有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、甲状腺における腫瘍形成の生物学的特徴を理解するために Differential Display（DD）法の改良法である Sequence Specific-Differential Display（SS-DD）法を用いて甲状腺の正常組織と腫瘍組織との間で mRNA の発現量に差のある遺伝子を検出することを目的としており、SS-DD 法によるスクリーニングを行なった結果、甲状腺の正常組織に比べて、腫瘍組織で著明に発現が低下している 3 つの遺伝子を検出した。このうち 2 つのフラグメントについては、いずれの遺伝子とも既知の遺伝子にホモロジーがなかったが、残り 1 つについては acid ceramidase（AC）mRNA であることを明らかにした。そして、甲状腺の正常組織および各種腫瘍組織中の AC mRNA 発現についてノーザンブロット解析、半定量的 RT-PCR 解析および定量的リアルタイム RT-PCR 解析を行なった結果、正常組織に比べて濾胞腺腫、乳頭癌および濾胞癌各組織において AC mRNA 発現量が著明に低下していることを明らかにした。本研究では、ホルモン分泌をする甲状腺正常組織および腺腫様甲状腺腫組織で AC mRNA が多く発現していることを明らかにしたことから AC が甲状腺ホルモン分泌あるいは合成において重要な役割を担っていると考えられ、今後の甲状腺研究に大きく貢献すると考える。よって、本研究が学位授与に値すると考える。