



組織中mRNAの測定による消化管ホルモン産生の検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 昌文 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1363

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 86号	学位授与年月日	平成 2年 3月16日
氏 名	鈴木 昌 文		
論文題目	組織中 mRNA の測定による消化管ホルモン産生の検討		

論文の内容の要旨

各種組織でのホルモン産生を検討する場合、ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay: RIA) によりその濃度を測定することが一般的である。RIA系を確立するには、抗体作製のための免疫物質、標準品、標識抗原としてホルモンの一部あるいは全部の純品が必要であり、その純品を得ることは困難なことが多い。抗体作製には数カ月を要することもあり、また得られた抗体が必ずしもRIA系に適するとは限らない。このように、ホルモン濃度の測定系を確立することは必ずしも容易ではない。さらに、組織が実際にそのホルモンを産生しているか否か、あるいは産生の機序を検討するにはホルモン濃度だけでなく、ホルモンのmRNAの存在について知ることにも重要な意義があると考えられる。しかし、ホルモン濃度とそのmRNAの量との関連については未だに十分な検討がなされてはいない。近年、遺伝子組み換え技術の進歩により多くの蛋白のmRNAの構造が明らかにされてきており、mRNAの存在を検討することはホルモン産生能の評価に役立つものと考えられる。本研究では、合成DNAプローブを用いた簡便なmRNAの検出法により、代表的な消化管ホルモンであるガストリン、ソマトスタチンおよびガストリン放出ペプチド (gastrin-releasing peptide: GRP) と主に甲状腺で産生され消化管ホルモン産生腫瘍でも検出されるカルシトニンの4種のmRNAが、臨床検体で検出可能であるかを検討した。組織中のホルモン濃度はRIAにより同時に測定した。対象とした組織は正常胃幽門部粘膜、ガストリノーマ、カルチノイド腫瘍および無症候性膵内分泌腫瘍である。ガストリンmRNAと考えられるバンドは正常胃幽門部粘膜およびガストリノーマで、ソマトスタチンmRNAと考えられるバンドはカルチノイド腫瘍で、GRPおよびカルシトニンmRNAと考えられるバンドは無症候性膵内分泌腫瘍で検出された。プローブとして各mRNAのホルモンをコードする部分に対応するDNAを用いたこと、従来報告されている各々のホルモンのmRNAと同じ分子量のバンドが検出されたこと、各mRNAが検出された組織に高濃度のホルモン免疫活性が検出されたことから、これらの組織で検出されたバンドは各ホルモンのmRNAであると考えられた。合成DNAプローブを用いたmRNAの検出法は、mRNAの構造が既知であれば特異性の高いプローブが短期間に容易に作製でき、一本鎖であるためhybridizationの際プローブを変性する必要がないなどの利点がある。また、同一の検体について複数の種類のプローブによる検討が可能であるという、プロット法の利点も有している。このことから、本法による消化管ホルモンのmRNAの存在に関する検討が可能で、消化管ホルモンの研究にも有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

各種組織におけるホルモン産生を検討する一般的方法としてラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay: RIA) が用いられ、各ホルモンの濃度の測定と免疫組織学的検索がなされてきた。ところがこの方法では実際に組織又は細胞がホルモンを産生していることを断定することが出来ない、又RIA系の確立は各ホルモンに対する抗体作製の困難等が重なって容易ではない。そこで申請者は目的とするホルモンの遺伝子構造が明らかな場合、そのmRNAの存在と量をNorthern blot hybridization法で検索可能であると考え、その方法を確立し、組織レベルのホルモン産生の有無、相対量、産生機序等を検討し、臨床応用への道を開いた。

今回検討したホルモンはgastrin、somatostatin (SS)、gastrin-releasing peptide (GRP) 及び calcitonin (CT) の消化管ホルモンで、各組織のmRNAの保存と抽出状態は β -actinを基準とした。対象組織は正常胃幽門部粘膜3例、gastrinoma 2例、直腸カルチノイドの肝転移巣1例及び無症候性膵内分泌腫瘍1例で、用いた合成DNAプローブは各ホルモン及び β -actinの特異性を示す塩基配列部分を合成し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて標識した。一方従来のRIA法にて上記ホルモンを測定して比較検討を行った。

本研究で明かにされた成績は以下のごとくである。

1) 各組織1gから0.2mg～1.0mgの全RNAがguanidinium/cesium chloride法により抽出され、合成DNAプローブを用いたNorthern blot hybridization法にて目的のホルモンmRNAの測定条件が確立された。

2) gastrin mRNAは胃幽門部粘膜3例中3例及びgastrinoma 2例中2例で、成熟型mRNAと考えられる約0.5kbのバンドが検出され、直腸カルチノイド及び無症候性膵内分泌腫瘍では検出されなかった。

3) SS mRNAは直腸カルチノイドで成熟型mRNAと考えられる約0.9kbのバンドが検出され、正常胃幽門部粘膜、gastrinoma及び無症候性膵内分泌腫瘍では検出されなかった。

4) GRP及びCT mRNAは無症候性膵内分泌腫瘍で成熟型GRP mRNAと考えられる約0.9kbのバンド及び成熟型CT mRNAと考えられる約1.0kbのバンドが検出された。

5) 従来のRIA法による消化管ホルモン濃度と今回のmRNA検出結果の比較：検索した4種ホルモンのmRNA量と免疫活性の間に高い相関のあることが見いだされた。しかし胃粘膜の場合、GRPは神経線維に存在するので免疫活性を示したが、神経細胞が組織中になのでmRNAは検出不可能であった。

以上の成績に対して、次のような質問が出され、申請者は的確な討論をすることができた。

- 1) RIA法で用いた抗体はmonoclonalか、polyclonalか、抗体作製に用いた動物の種類はなにか。
- 2) RIA法とNorthern blot hybridization法の感度、特異性および簡便度等はどうか。
- 3) 測定しているmRNAは典型的な成熟型mRNAか。
- 4) 各組織で β -actinはどうして一定なのか。
- 5) 合成DNAプローブは自家製か。
- 6) この合成DNAプローブを用いてin situ hybridizationは可能か。
- 7) 直腸カルチノイドでSSが検出されたが、セロトニンを測定したか、また電顕で検討したか。
- 8) 組織をどれくらいの温度で保存したか。RNAの安定性はどうか。
- 9) mRNAを測定してホルモンの産生の可否を論じているが、もしmRNAが検出されホルモンが検出されないという結果が出た場合何を考えるか。
- 10) mRNAの測定に際して特異性と感度をあげる方法は何か。

以上の審査の結果、本審査委員会では全員一致でこの研究が学位授与にふさわしいものと判定した。

論文審査担当者 主査 教授 吉 田 孝 人

副査 教授 喜 納 勇 副査 教授 藤 田 道 也

副査 教授 吉 見 輝 也 副査 助教授 馬 場 正 三