

(69)

氏名(生年月日)	岡野晃
本籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第1694号
学位授与の日付	平成9年1月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	RNA-arbitrarily primed (AP)-PCR-SSCP 法によるヒト肝細胞がん細胞株 mRNA 異常の検出の試み
論文審査委員	(主査) 教授 林 直諒 (副査) 教授 内山 竹彦, 大森 安恵

論文内容の要旨

〔目的〕

肝細胞がん(HCC)の未解析遺伝子の異常検索を目的とし、RNA-arbitrarily primed-polymerase chain reaction(RNA-AP-PCR)により得たcDNAを、一本鎖DNA高次構造多型(SSCP)解析するRNA-AP-PCR-SSCP法を開発し、HCC細胞mRNAの解析を試みた。

〔対象および方法〕

対象は、4種類のヒトHCC由来および2種類の正常ヒト肝由来細胞株である。これらの細胞株よりRNAを抽出し、3種類のプライマーを用いたRT反応で得られたcDNAを鋳型として、同一プライマーによるAP-PCRを施行後、SSCP解析を行った。

〔結果〕

1. RNA-AP-PCR-SSCP法により、mRNA異常を示唆するシフト領域を多数検出した。

2. 選択したシフト領域の塩基配列決定の結果、HCC細胞株Hep 3Bのヒトリボゾーム蛋白S20 cDNA(GEN-L06498)コドン65に1塩基置換を見出した。また、alternative splicingに由来すると考えられる3個のcDNA断片を得たが、その共通塩基配列部分はヒト胎児脳cDNA(GEN-420F08)と相同であり、その3'端側にHep 3B特異的な1塩基欠失を見出した。

〔考察〕

RNA-AP-PCR-SSCP法は事前の塩基配列情報を必要とせず、微細なmRNA構造異常を広範に検出し得

るため、HCCをはじめとした各種がん細胞における、新たな遺伝子異常を検索する有力な方法であると考えられた。

〔結論〕

1. 新たに開発したRNA-AP-PCR-SSCP法を用いて、HCC細胞株のmRNAを解析した。

2. 検出された多数のシフト領域のうち、4領域について塩基配列を決定した結果、HCC細胞株Hep 3Bに特異的な塩基配列変化を見出し、がん進行に伴うmRNAの異常であると考えた。

3. RNA-AP-PCR-SSCP法は、未解析mRNAの微細な塩基配列異常の広範な検索法として有用であると考えられた。

論文審査の要旨

著者らの開発した RNA-AP-PCR-SSCP 法は遺伝子塩基配列未確認領域における mRNA 構造異常を検出し得る方法である。これを用いて肝細胞癌における遺伝子異常の検出を試みた。対象はヒト肝細胞癌由来株と 2 種類の正常肝細胞癌由来株である。プライマーは p53 遺伝子イントロン由来の 3 種 (RAP-1, RAP-2, RAP-3) を使用した。オートラジオグラフィの解析で見られた変位 4 カ所の塩基配列を検討した。結果：プライマー-RAP-3 で得られたシフト領域では A → G の塩基置換が確認された。プライマー-RAP-1 で得られたシフト領域の塩基配列相同性検索ではヒト胎児脳 cDNA 末端塩基配列と極めて高い相同性を認めた。Hep 3B 細胞では cDNA 断片の共通塩基配列部分の 3' 端側に AA からの A の、この細胞特異的な 1 塩基欠失を認めた。以上のごとく、この手段によって、肝細胞癌由来の細胞株で遺伝子異常を確認できた。今後この方法により癌細胞に遺伝子異常のスクリーニングが可能となった。

主論文公表誌

RNA-arbitrarily primed (AP)-PCR-SSCP 法によるヒト肝細胞がん細胞株 mRNA 異常の検出の試み

東京女子医科大学雑誌 第66巻 第9・10号
729-735頁 (平成8年10月25日発行) 岡野 晃,
村上善則, 関谷剛男

副論文公表誌

- 1) 著明な腹水を呈した B 型慢性肝炎の 1 例. 東女医大誌 63(9) : 1025-1030 (1993) 岡野 晃, 富松昌彦, 内田恵理, 高橋春樹, 名富仁美, 森 治樹
- 2) AP-PCR-SSCP 法によるがん DNA の解析. 蛋・核・酵 41(5増刊号 PCR 法最前線) : 1620-1625 (1996) 岡野 晃, 関谷剛男
- 3) Indocyanine green (ICG) 腹腔内注入により診断し, 胸膜癒着術にて軽快した肝性胸水の 1 例. 東女医大誌 62(12) : 1620-1625 (1992) 藤野智子,

- 富松昌彦, 千島功子, 福与光昭, 霜山直人, 高橋春樹, 岡野 晃, 中島博子, 名富仁美, 森 治樹
- 4) 高齢者における C 型肝炎の検討. 老年消病 5(1) : 39-43 (1993) 高橋春樹, 富松昌彦, 中島博子, 岡野 晃, 千島功子, 名富仁美, 森 治樹, 戸松 成, 大井 至
 - 5) A case of chronic hepatitis C with a clearance of serum HCV-RNA and a significant improvement of hepatocyte injury by treatment with prednisolone and interferon (プレドニゾンおよびインターフェロン治療により血清 HCV-RNA の陰性化と肝細胞障害の著明な改善を認めた慢性 C 型肝炎の 1 例). 東女医大誌 65(10) : 850-854 (1995) 富松昌彦, 玉井紀男, 高橋春樹, 遠藤 仁, 中島博子, 岡野 晃, 千島功子, 森 治樹