

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590634

研究課題名(和文) 組織切片上の微量 mRNA 検出を可能にする in situ RT-PCR法の樹立

研究課題名(英文) Detecting mRNA with low expression levels on tissues using in situ RT-PCR Hybridization method: a pilot study

研究代表者

梅 とも子 (TOGA, Tomoko)

島根大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：20403462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：組織切片上の微量 mRNA を検出するために逆転写 PCR を行い cDNA を作成し、次に PCR で増幅し、それをラベルして、標的 mRNA の局在を確認する条件検討を試みたが、増幅の確認ができず、in situ RT-PCR の手技実験を中止した。次に RNA を効率よく保存できると推測し、粘着フィルム(川本法)を利用した凍結切片を用いて、in situ Hybridization を行った。粘着フィルムは in situ Hybridization のプロトコルに強度的に耐えうるが、洗浄の際に組織が剥がれ落ちることが多く、またフィルムに染色残渣が残り、明確な標的 mRNA の局在を確認ができなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to detect small-quantity mRNA on a tissue section, reverse transcription PCR was given to create cDNA, next PCR was given to target mRNA. But amplification of the target gene by PCR was not completed. Then assumed to be stored efficiently RNA, using frozen sections fixed on the adhesive film (Kawamoto method) was applied to in situ Hybridization. Although the adhesive film could bear the protocol of in situ Hybridization in intensity, tissue sections often fall in the washing, and the dyeing residual substance remained in the film. In result, clear target's mRNA localization could not be found.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：in-situ RT-PCR mRNA in situ Hybridization 川本法

1. 研究開始当初の背景

NorthernあるいはReal Time-PCR法で標的遺伝子 mRNA 発現を確認することが、分子・細胞生物学研究で広くなされている。しかしながら、これらの方法は種々の細胞の集団である組織を一括して粉砕後に mRNA を解析する方法であり、標的とする遺伝子発現 mRNA の産生が組織のどの細胞で行われているのかを厳密に同定することはできない。標的 mRNA の産生細胞の局在を確認するために、*in situ* Hybridization (ISH) 法が一般的に行われている。ISH法とは、標識した核酸鎖(プローブ)と細胞組織切片内に存在する核酸とを適切な条件化で反応させ、その間にハイブリッドを形成させ、最終的に標的 mRNA の局在を可視化する方法である。mRNA をもとに合成された蛋白の局在確認については、抗原抗体反応を利用した免疫組織化学的染色(IHC)法という既に手技として標準化された手法がある。しかし、標的蛋白発現と mRNA 発現の局在細胞は異なることもあり、厳密な意味での細胞における遺伝子発現の有無は ISH 法により確定される。

しかしながら、免疫染色と *in situ* Hybridization (ISH) 法の比較研究(平成 14 年度科学研究費奨励研究 課題番号 14922141 「ヒトがん遺伝子蛋白と mRNA 発現比較研究:免疫染色法と ISH 法の比較」)において、mRNA を検出する ISH 法の手技標準化は難しいと結論づけた経緯がある。

それは、ISH 法に下記の克服すべき重要課題があるためである。そこで、今回の研究において新規に手技検討を行い、その解決を目指した。

(1) 従来の ISH 法では感度が低いために、発現量の多い mRNA は可視化できるが、発現量が少ない mRNA の可視化はできないのが実情であること。

(2) RNA は容易に消失する性質をもつため、検体組織の採取、保存および染色過程にお

いて、実際の mRNA 産生量と検体組織中の mRNA 量に大きな誤差が生じ、最終的に ISH 法の検出結果に大きく影響すること。それは RNA の分解酵素であるリボヌクレアーゼ(RNase)が汗などの体液に豊富に含まれており、さらに RNase は簡単には失活しないため、組織採取から ISH 法手技の行程の間に、RNase に容易に暴露され mRNA が消失してしまうためである。

2. 研究の目的

本研究は、上記(1)及び(2)の課題を克服するため、(1) *in situ* RT-PCR と(2) 川本法[1]を用いて微量 mRNA 検出のための新たな ISH 法の手技の開発を目的とした。

(1) *in situ* RT-PCR: 組織切片上でランダムプライマーによる逆転写 PCR を行うことにより cDNA を作成し、次に PCR で増幅した遺伝子をジゴキシゲニン(Dig)等でラベルして、組織切片上の微量 mRNA 検出を可能にする。

(2) 川本法: 川本法で得られる凍結切片は通常のスライドグラスではなく、粘着剤を貼付したフィルム(Saran または PET 樹脂素材)に貼付され、そのフィルムが薄切の際に組織支持材となり簡単に凍結切片が得られ、その作成時間は約 10 分以内と短く[1]。そのため RNA の保存状態がよいので、川本法を ISH 法に応用することで、微量 mRNA 検出を可能にする。

3. 研究の方法

(1) *in situ* RT-PCR 手技検討について

検体: ヒト膵臓手術摘出標本のホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片で、DTP (Danenbergs Tumor Profile)法により Thymidylate Synthase (TS)-mRNA 発現量を測定した既得データが保存されている。今回は DTP 法に使用した物と同一のパラフィン包埋標本から得た薄切切片をスライドグラスに貼付し、*in situ* RT-PCR を試み、その結果を DTP 法で得られた mRNA 発現量と照合することとした。なお、この

ヒト検体については、島根大学倫理委員会の承認を得た後に本研究に使用した。

標的遺伝子、プローブとプライマー

標的遺伝子：TS-mRNA (GenBank Accession No. X02308) とし、プローブ配列とそのプローブ配列を挟んだ前後のプライマー配列を設計し、オリゴ DNA 合成を業者に依頼した。プローブは下記塩基配列の 5' 側に Dig 標識した。

Antisense プローブ：

GGCATGGCATGGAGGCGCGCCATCAGAGGAAGA

Sense プローブ：

TCTTCCTCTGATGGCGCTGCCATGCCATGCC

Left プライマー：ttcaggacagggagttgacc

Right プライマー：catgtctccgatctctggt

逆転写反応および PCR

脱パラフィンを行った切片に Reverse buffer 滴下後切片の乾燥と RNase 暴露を避けるために密封容器に入れて逆転写酵素を滴下し、1) インキュベーター および 2) マイクロウェーブ迅速処理装置で、約 37 90 分でインキュベートをした。その後、PCR 用試薬を滴下、カバーガラスをかけて周りをペーパーバンドでシール後、サーマルサイクラーで PCR 反応を行った。

ISH 法

ハイブリダイゼーション手順および検出試薬については、鶴尾吉宏、菱川善隆他のプロトコル [2, 3] に準じた。

(2) 川本法を用いた ISH 法の手技検討について

検体は マウスの脾臓 腎臓について
1) 未固定、2) 4% PFA 固定、3) RNA later™ (Sigma) 浸漬の処理施行後それぞれを検体とし、組織の凍結、包埋、薄切を川本法の手順に従い行った [1, 4-6]

標的遺伝子とプローブおよび ISH 法プロトコルは、ISH 条件検討に有用であると菱川善隆、小路武彦により公開さ

れた 28SrRNA 検出系に準じた [3]

4 . 研究成果

(1) *insitu* RT-PCR 手技検討について：
逆転写反応, PCR, ISH の行程を進むごとに切片が剥落することが多くなり、手技的に難しいことを認識した。特に蛋白分解酵素処理を施すと切片が傷む。染色終了後に残った組織に染色残渣状のものが観察されるが、それは、陰性コントロールとして使用した Sense プローブでも同様な結果であったことから非特異的であり、結局、信頼できる陽性反応結果を得ることができなかった。また、逆転写反応、PCR 反応の成否確認ができないため、どの行程で問題かが不明であった。そのために手技検討自体が難しいと感じ、早々にこの手技検討を断念することとした。

しかし、対照実験として行った発現量の多い 28SrRNA を用いた通常の ISH では、陽性像を得られた。したがって逆転写反応および PCR の行程に問題があると推測された。PCR は温度管理が重要であるが、今回使用したサーマルサイクラーは通常の PCR 用機器を転用しており、PCR 反応は通常温度コントロールブロックの穴に置いたマイクロチューブ内で行うが、今回はスライドガラスをコントロールブロック上に置いた状態で行ったので、スライドガラスの温度はサーマルサイクラーの表示温度とは異なることが推測され、温度管理が問題点として考えられた。

in situ RT-PCR 法については、理論上では可能であるが、その実際の成果報告についてほとんどみななかった。しかし、近年、菱川善隆、小路武彦の報告で *In situ* PCR 法についての記載があり、PCR で増幅する際にジコキシゲニンやピオチン、或いは FluorX や Cy-3 などの蛍光標識をした塩基を加えておいて、増幅しながら同時に標識を行う直接法のプロトコル及びその染色組織画像が示されている [3] さて、本科学研究費で行った方法

は PCR で特定の遺伝子を増幅した後に、増幅された領域に特異的なプローブを用いて ISH を行う間接法であった。間接法は PCR による増幅産物がある場から拡散流失する可能性が考えられる。要するに *in situ* の意味を失う。その観点から間接法より直接法が妥当なプロトコルと推測された。

(2) 川本法を用いた ISH 法の手技検討について: ISH 法には 1) 凍結包埋未固定組織を川本法により薄切後、冷 4% PFA で数分固定した切片、及び 2) 4% PFA で 24 時間から 48 時間 固定した組織を凍結包埋後に川本法により薄切したものを使用した。3) RNAlater に浸漬した組織は凍結後も硬化せず、そのため、クリオスタットで薄切することができなかった。上記 1) 2) の切片で ISH 法を行った結果、28SrRNA の陽性像を得ることができた。しかし、再現性にまだ乏しい。ISH 法の行程は長く、また蛋白分解酵素処理、0.2N 塩酸処理、あるいは SSC 溶液中で約 35 から 60 の温浴処理など過酷であるが、その行程でも粘着フィルム (IIC9 サラン樹脂製) は強度的に耐えた。しかし、スライドガラスとは異なり、柔らかいフィルムであるので染色や洗浄操作時に折れ曲がり、あるいは実験容器に張りつくなど、取り扱いが難しい。その操作時に貼付された組織が剥落することが多かった。また粘着フィルムに組織残渣もしくは色素残渣が残ることがあった [4-6]

研究計画当初は RNA 保存試薬として汎用される RNAlater に浸漬した組織の凍結切片を川本法により作成して、ISH 法に使用する計画であった。ISH 法の行程で、凍結組織は薄切後、室温、あるいは氷上で解凍される。その際に内在性の RNase により急速に mRNA は消失すると推測される。RNAlater 浸漬組織凍結切片を ISH 法に応用できれば mRNA の消失

を避けることができると思われたが、薄切は不可能であった。凍結組織中の RNA は固定パラフィン包埋組織中の RNA よりも保存状態がよいことは自明である。しかし、今回 28SrRNA を標的とした ISH 法の染色結果を粘着フィルムに貼付した凍結切片とスライドガラスに貼付したパラフィン切片と比較すると、切片の取り扱いが容易であること、組織構造がよりよく保存されるという点において、パラフィン切片が凍結切片より優れていた。しかし、発現量の少ない mRNA をターゲットとして ISH 法を行う際に、RNA の保存の良さという利点から、今後も凍結切片を使用することを選択し検討を続ける。しかし、形態の保存と切片の強度が高まることから、検体は凍結前に 4% PFA 浸漬を 4 から 24 時間程度施す予定である。4% PFA 浸漬により、ある程度、RNase が働きにくくなる可能性も考えられる。また、2本鎖になった状態で RNA は消失しにくくなるため、ハイブリダイゼーションを行うまでの過程を迅速に行うことが重要と考え、短時間で凍結切片が作成できる川本法は有効な手段であり、今後も検討を続ける。しかし、ハイブリダイゼーションに至るまでに切片が暴露する RNase を最小限にするためには、粘着フィルム中に RNase があることも推測され、その失活法などが検討課題として残る。

予備的な検討実験で粘着フィルムに単純に ISH 法で使用される染色液を置き 30 分インキュベートした後に洗浄した結果では、川本法の粘着フィルムに残渣は認められなかった [5] 従って、ISH 法の行程後の粘着フィルムの残渣は ISH 法の行程で剥がれ落ちた組織切片に由来すると推測する。組織切片剥落防止にはフィルムの取り扱いに習熟すること、蛋白分解酵素処理を弱くすることで解決ができると思われた。

参考文献

[1] 川本忠文: 非脱灰硬組織凍結切片標

本作成技術(川本法 2008)とその応用. 病理技術, 第 72 巻 2 号, 2009, pp76-83

- [2] 鶴尾吉宏: Insitu ハイブリダイゼーションの基礎と応用. pp53-68 組織細胞化学 2009 (日本組織細胞化学会編), 学際企画, 東京
- [3] 菱川善隆、小路武彦: Insitu ハイブリダイゼーションの基礎と応用. pp47-60 組織細胞化学 2010(日本組織細胞化学会編), 学際企画, 東京
- [4] 梅とも子他: 硬組織における遺伝子発現解析研究への非脱灰凍結切片作成技術(川本法)の応用. 第 57 回日本法医学会学術近畿地方集会講演要旨集, 2010, p21
- [5] 梅とも子他: しじみ貝の殻を含む全体組織染色-非脱灰凍結標本作成技術(川本法)を応用して 生物学技術研究会報告 第 22 号, 2011, pp126-127
- [6] 梅とも子: ヒト石灰化病変の川本法を応用した非脱灰凍結切片の組織染色 生物学技術研究会報告 第 23 号, 2012, pp37-39

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Muro T, Fujihara J, Imamura S, Nakayama H, Kimura-Kataoka K, Toga T, Iida R, Yasuda T, Takeshita H. Determination of ABO genotypes by real-time PCR using allele-specific primers. Legal Medicine, 査読有, 14(1), 2012, 47-50

[学会発表] (計 9 件)

梅とも子, ヒト石灰化病変の川本法を応用した非脱灰凍結切片の組織染色 第 23 回生物学技術研究会, 2012.2.17,

岡崎コンファレンスセンター(岡崎市)
梅とも子他, しじみ貝の殻を含む全体組織染色-非脱灰凍結標本作成技術(川本法)を応用して, 第 22 回生物学技術研究会, 2011.2.17-18, 岡崎コンファレンスセンター(岡崎市)

梅とも子他, 硬組織における遺伝子発現解析研究への非脱灰凍結切片作成技術(川本法)の応用, 第 57 回日本法医学会学術近畿地方集会, 2010.11.13, 関西医科大学附属病院(枚方市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅とも子 (TOGA, Tomoko)
島根大学・医学部・技術専門職員
研究者番号: 20403462

(2) 研究分担者

竹下 治男 (TAKESHITA, Haruo)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 90292599