

学 位 論 文 題 名

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 法に用いた
Tyrosine hydroxylase mRNA および神経芽腫細胞の高感度検出法

学位論文内容の要旨

I 緒 言

神経芽細胞腫（Neuroblastoma；以下NB）は高率に骨髄に転移するという特徴を持つ。NBのステージ診断上、あるいは治療として自家骨髄移植を考慮する場合に、骨髄転移の有無を診断することは重要である。しかし、現在用いられているNBの骨髄転移診断法では腫瘍細胞と正常な骨髄細胞の一部との識別が困難な場合があり、またその検出感度も症例によって必ずしも充分とはいえない。

NBは発生学的に神経堤(neural crest)に由来し、約95%高頻度でカテコラミンを産生する。またヒトのNB組織では、カテコラミン合成経路の第一段階の酵素であるTyrosine hydroxylase (TH)の活性が高率に上昇していることが報告されている。一方、THは正常組織では交感神経や副腎髄質などかなり限られた組織で特異的に産生されていると考えられており、したがってNB患者の骨髄細胞からTHのmRNAが検出されれば骨髄転移を疑う根拠になりうると考えられる。

本研究では、reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR)法を用いて骨髄細胞におけるTH mRNA発現を検出することにより、NBの骨髄転移を高感度に診断することが可能かどうかを検討した。

II 方 法

陽性対照として神経芽細胞腫および神経節芽細胞腫の手術摘出材料6例とNB細胞株IMR32を用いた。陰性対照として完全寛解中の小児血液悪性腫瘍患者8例、回復期の一過性好中球減少症患者1例の骨髄細胞を用いた。他にNB患者の3例の骨髄細胞を分析したが、これにはいずれにも光顕的に腫瘍細胞を認めなかった。材料の骨髄細胞及び腫瘍組織からtotal RNAを分離した。TH cDNAから適当な部分を選び、PCRに用いるprimerを合成した。このprimerを

用いると検体に TH mRNA が存在する場合、299bp の cDNA フラグメントが増幅されることが期待された。

cDNA 合成は以下の反応により行った。すなわち total RNA 1 μ g, 3' 側 primer, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, dc³²P-GTP, AMV reverse transcriptase, 及び RNase inhibitor において反応液を加え全量を20 μ l として43°Cで1時間反応させた。この反応液に PCR buffer, 5' 側 primer, 3' 側 primer, Taq DNA polymerase を加え全量を100 μ l として、30回 PCR を行った後、Taq DNA polymerase を追加し、さらに30回 PCR を行った。

PCR 産物のうち5 μ l をゲル中に泳動し、変性・中和処理後、サザン法に従いナイロンメンブランにブロットした。 α ³²P-dCTP で放射性標識した TH cDNA プロブをハイブリダイズさせ、洗浄した後、X線フィルム上に露光した。また上記サザン法により検出したバンドの濃度を比較するためにコンピューターによる放射活性の定量を行った。

Ⅲ 結 果

はじめに RT/PCR を用いることにより、NB において TH mRNA を検出することが可能かどうかを検討した。RT/PCR 法を用いた結果、分析した NB 株 IMR32 と患者 6 人の NB 組織全例で TH mRNA に特異的な299bp の cDNA 断片の増幅バンドが明瞭に検出された。NB 組織 6 例で認められた増幅バンドは IMR32 の 1 ~ 3.75 倍の放射活性を示した。

次に RT/PCR 法による TH mRNA 検出の特異性をみるために陰性対照の骨髄を用いて RT/PCR を行った。その結果、9 人の対照骨髄全例において明らかな TH mRNA 由来の増幅バンドを認めなかった。また、検索した NB 患者 3 人の骨髄からも TH mRNA の増幅バンドは認められなかった。

RT/PCR 法の感度を決定するために希釈実験を行った。すなわち、完全寛解中の ALL 患者の骨髄細胞10⁷個に IMR32細胞を順次比率を変えて混合した試料各々から total RNA を抽出し、そのうちの各1 μ g の RNA から RT/PCR を行った。この結果、IMR32 10²個を混合した試料においても TH mRNA 由来の増幅バンドを検出できた。すなわちこの実験から対照骨髄細胞10⁵個中1個の IMR32細胞でも検出可能と考えられた。

V 考 察

今回用いた RT/PCR 法により分析した NB 組織全例において、TH mRNA の検出が可能であった。しかもそれらの何れにおいても IMR32 と同程度以上の濃度の増幅バンドが得られた。

今回分析した症例はその病像がまちまちであることから、他の多くの NB 組織においても同様にこの方法によって IMR32 以上の濃度の増幅バンドとして TH mRNA が検出されることが予想される。

これに対し、解析した陰性対照の採取骨髄全例において、今回用いた方法によって TH mRNA は検出されなかった。また、解析し得た 3 例の NB 患者の骨髄では今回の方法で TH mRNA は検出されなかった。この理由として、これらの患者では実際に採取骨髄細胞中に NB 細胞が存在しないのか、あるいはこの方法では検出不可能な程度の NB 細胞が存在するのか不明である。IMR32 を用いた感受性試験では骨髄細胞 10^5 個中の腫瘍細胞 1 個でも検出可能という高い感度が得られた。

以上の実験結果から、RT/PCR 法を用いることにより、多くの NB 患者の骨髄において、 $1/10^5$ レベルの腫瘍細胞の混入を検出できる可能性が示唆された。これにより NB の微細な骨髄転移の診断あるいは経過観察への応用が期待される。また、治療として自家骨髄移植を施行する上で、採取した自家骨髄に混入する腫瘍細胞の *in vitro* purging による除去効果の判定にも応用が可能と考えられる。

V 結 語

1. RT/PCR 法を用いて TH mRNA を検出することにより、NB の骨髄転移を診断することが可能かどうかを検討した。
2. 検索した NB 組織全例において、RT/PCR 法により TH mRNA の発現が IMR32 以上に明瞭なバンドとして検出された。これに対し、検索した正常骨髄全例において同法により TH mRNA の発現は検出されなかった。
3. IMR32 と正常骨髄細胞を混合して行った希釈実験により、骨髄細胞 10^5 個中の腫瘍細胞 1 個の高感度で NB 細胞の検出が可能であった。
4. 以上から、NB の微細な骨髄転移の診断および治療後の経過観察において RT/PCR 法の有用性が期待できると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 柿 沼 光 明

神経芽細胞腫（NB と略す）は高頻度にカテコラミンを産生し、ヒトの NB 組織では、カテコラミン合成の第一段階の酵素である Tyrosine hydroxylase（TH と略す）の活性が高率に上昇している。また TH は正常組織では限られた組織で特異的に産生されているにすぎないとされている。本研究は、reverse transcription and polymerase chain reaction（RT/PCR 法）を用いて骨髄細胞における TH mRNA の発現を検出することにより、NB の骨髄転移を高感度に診断することが可能かどうかを検討した成績である。

TH 発現の陽性対照としては NB の手術摘出材料 6 例と NB 細胞株である IMR32 が用いられた。陰性対照は正常と考えられる小児科患者 9 名の骨髄細胞である。他に NB 患者 3 例の骨髄細胞も分析されたが、これらではいずれにも光顕的に腫瘍細胞を認めていない。TH cDNA から適当な部分を選ばれ、DNA 合成機を用いて PCR に使用する primer が合成された。骨髄穿刺により得た骨髄有核細胞あるいは腫瘍組織から分離した total RNA を材料として cDNA 合成を行い、合成された cDNA を材料として PCR を行っている。この研究では PCR 産物のうちの一部をゲル中に泳動し、変性・中和処理後、サザン法に従いメンブランにプロットし、さらに³²P で放射性標識した TH cDNA プローブをハイブリダイズさせ、洗浄後、X線フィルム上に露光した。

RT/PCR 法に用いた結果、分析した NB 細胞株 IMR32 と患者 6 人の NB 組織全例で TH mRNA に特異的な cDNA 断片の増幅バンドが明瞭に検出された。また、NB 組織 6 例で認められた増幅バンドはいずれも IMR32 以上の放射活性を示した。これにより RT/PCR 法を用いることにより、多くの NB において TH mRNA を検出することが可能であることが示された。次に陰性対照の骨髄を用いて RT/PCR を行った結果、9 人の対照全例において明らかな TH mRNA 由来の増幅バンドを認めず、RT/PCR 法による TH mRNA 検出の特異性を示された。分析した NB 患者 3 人の骨髄からも TH mRNA 由来の増幅バンドは認められなかったが、これらの患者の骨髄中に実際の腫瘍細胞が存在しないのか、この方法では検出不可能な程度の腫瘍細胞が存在するののかは不明であった。次に RT/PCR 法の感度を決定するために、正常骨髄細胞

胞 10^7 個に IMR32細胞を順次比率を変えて混合した試料各々から total RNA を抽出し、これを材料として同様に RT/PCR を行ったが、その結果、IMR32 10^2 個を混合した試料においても TH mRNA 由来の増幅バンドが検出された。すなわちこの実験から対照骨髓細胞 10^5 個中の IMR32細胞でも検出可能と考えられた。以上の結果から、RT/PCR 法を用いることにより、多くの NB 患者の骨髓において、 $1/10^5$ レベルの腫瘍細胞の混入を検出できる可能性が示唆され、従って NB の微細な骨髓転移の精確な診断にこの手法を応用することが診断の効率をよくし、ひいては治療の成績向上に大きく寄与するものと考えられた。副査の葛巻、柿沼両教授から転移診断上の感度、或いは結果の解釈について幾つかの質問があり、更に長島教授を交えて討議を重ねられたが、いずれの質問に関しても妥当な答えが得られたものと判断された。