

速報

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction による
HPV 16型初期遺伝子 E7, E5 mRNA の発現に関する検討

広島大学医学部産科婦人科学教室

*広島大学医学部第一病理学教室

谷本 博利 永井 宣隆 藤本 英夫 太田 さなえ
大浜 紘三 吉田 和弘* 田原 榮一*Detection of HPV Type16 Early Genes E7 and E5 Messenger
RNA in Uterine Cervical Neoplasia by Reverse
Transcriptase Polymerase Chain ReactionHirotohi TANIMOTO, Nobutaka NAGAI, Hideo FUJIMOTO, Sanae OHTA,
Koso OHAMA, Kazuhiro YOSHIDA* and Eiichi TAHARA*

Department of Obstetrics and Gynecology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima

*First Department of Pathology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima

Key words: Reverse transcriptase polymerase chain reaction • HPV mRNA •
Uterine cervical neoplasia

緒言

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法は少量の messenger RNA より逆転写酵素を用いて cDNA を合成し, その cDNA を鋳型とした PCR 法で微量な遺伝子の転写発現を検出する方法である。今回, 我々は RT-PCR 法により発癌との関連性が指摘されているヒトパピローマウイルス (HPV) 16型の初期遺伝子 E7領域と E5領域の mRNA 発現を検討し, HPV 初期遺伝子領域の転写レベルでの新たな解析法を確立したので報告する。

研究対象と研究方法

研究対象は手術時に摘出した子宮頸癌 (上皮内癌, 扁平上皮癌, 腺癌) 症例10例を用いた。方法は摘出された組織約200mg に6M guanidinium thiocyanate, 5mM sodium citrate, 0.5% sarkosyl, 1% 2-mercaptoethanol を加えポリトロンホモジェナイザーで破碎し, 9,000rpm, 30分間遠心後, 上清を5.7M CsCl-0.1M EDTA 上に重層し SW40ローターで35,000rpm, 20°C, 14時間遠心し, エタノール沈殿により全 RNA を回収した。得られた全 RNA 2 μ g に0.5 μ g oligo-dT primer, 5 units 逆転写酵素を加え37°C, 1時間反応を行い cDNA を合成した (BRL 社: AMV 逆転写酵素 system)。PCR は図1に示した HPV 16型 E7, E5 領域を含む oligonucleotide (湧永) を各 primer とし, 合成した cDNA を含む溶液に2.5U の Taq DNA polymerase (Takara) を加え, amplifica-

tion system (Cetus 社) を用いて25サイクル増幅した¹⁾。増幅した cDNA の検出は³²P 標識 HPV 16型 DNA プローブを用いた slot blot hybridization で検討した。また同時に, 抽出した全 RNA 10 μ g を用いた Northern blot hybridization による HPV 16型 mRNA の検出も行った。

研究成績

slot blot hybridization より今回検討した RT-PCR の成績を写真1に示した。10例中7例(1, 2, 3, 5, 6, 9, 10)が E7領域陽性であつたのに対し, E5領域は2例(3, 6)のみが陽性であつた。陰性対照群としては正常胎盤組織より抽出した RNA より RT-PCR で増幅した DNA (11)を, 陽性対照群としては HPV16型 DNA (12)を用いた。一方, Northern blot hybridization では HPV16型 mRNA を検出したのは2例(3, 6)のみであつた (写真2)。

考察

子宮頸癌組織中には HPV16型 DNA が高率に存在するとされ³⁾, 特に初期遺伝子 E7領域は in vitro で形質転換能を有し²⁾, HPV16型による発癌機構の重要な部分を占めている⁴⁾。よつて HPV16型 E7及びその他の初期遺伝子の転写パターンの検討は HPV による子宮頸部の癌化を解明するうえで必須である。今回の検討では E7領域の mRNA の発現は E5領域の発現と比較して高頻度であり, これは E7領域の転写発現が子宮頸部の発癌に深く関与しているのに対し, E5領域は

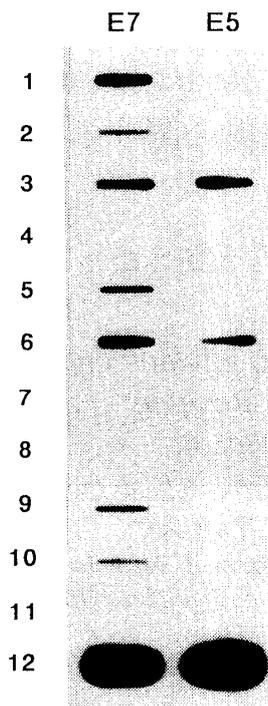


写真1 slot blot hybridization

1. CIS : E7陽性, 2. CIS : E7陽性, 3. Sq cell ca : E7陽性 E5陽性, 4. CIS, 5. CIS : E7陽性, 6. Sq cell ca : E7陽性 E5陽性, 7. CIS, 8. CIS, 9. CIS : E7陽性, 10. Adenoca : E7陽性, 11. normal placenta (陰性対照), 12. HPV16 (陽性対照)
 CIS : Carcinoma in situ, Sq cell ca : Squamous cell carcinoma, Adenoca : Adenocarcinoma

HPV16型 DNA が癌細胞中に integrated form で存在する際に欠落しているか、あるいは転写が抑制されている可能性を示唆するものであつた。また、扁平上皮癌及び腺癌の 3 例全例に E7領域陽性であつたのに対し上皮内癌では 7 例中 4 例 (57%) が陽性であつた。上皮内癌の場合 sampling の際に十分な病変が得られなかつた可能性もあり、今後の検討が必要と考えられた。

以上、RT-PCR 法の導入により従来 Northern blot hybridization 法では検出しえなかつた微量の HPV16型 mRNA の検出が可能になり、HPV 初期遺伝子の転写レベルでの解析に有益な方法と考えられた。

文 献

1. 永井宣隆, 太田さなえ, 藤本英夫, 谷本博利, 木岡寛雅, 藤原 篤 : Polymerase Chain Reaction による HPV16 型, 18 型初期遺伝子 E7 領域の増幅検出法に関する検討. 日産婦誌, 42 : 635, 1990.
2. Kanda, T., Furuno, A. and Yoshiike, K. : Human papillomavirus type 16 open reading

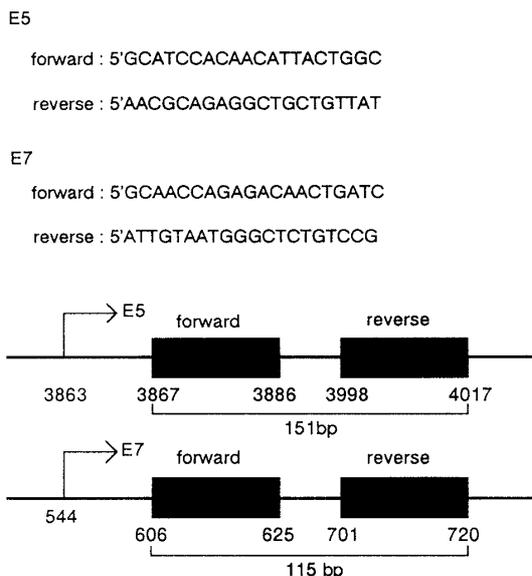


図1 HPV の primer と位置

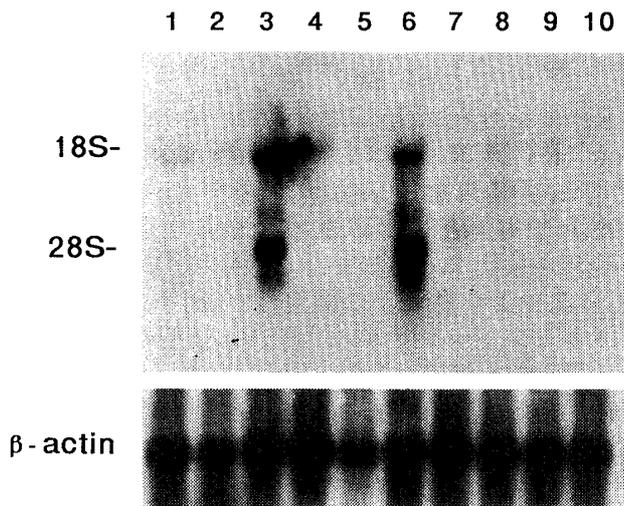


写真2 HPV16型 DNA プローブを用いた Northern blot hybridization による HPV16型 mRNA の検出. 3, 6 に陽性バンドがみられる。

frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. J. Virol., 62 : 610, 1988.

3. Matsukura, T., Koi, S. and Sugase, M. : Both episomal and integrated form of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. Virology, 172 : 63, 1989.
4. Smotkin, D. and Wettstein, F.O. : Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancerderived cell line and identification of the E7 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83 : 4680, 1986. (No. 6997 平 3・5・11 受付)