

速 報

ビオチン標識 RNA プロブを用いた In situ ハイブリダイゼーションによる HPV16型, 18型初期遺伝子 E₆/E₇mRNA の子宮頸部前癌病変における局在の検討

広島大学医学部産科婦人科学教室

永井 宣隆 木岡 寛雅 重政 和志 藤原 篤

湧永製薬中央研究所細胞工学研究部

穂積 豊治

Detection of HPV Types 16 and 18 E₆/E₇ Gene mRNA in Cervical Precancerous Lesions by In situ Hybridization with Biotinylated RNA Probes

Nobutaka NAGAI, Hiromasa KIOKA, Kazushi SHIGEMASA
and Atsushi FUJIWARADepartment of Obstetrics and Gynecology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima
Toyoharu HOZUMIDepartment of Molecular and Cellular Biology, The Reserch Institute,
Wakunaga Pharmaceutical Co., Hiroshima

Key words: HPV E₆/E₇ gene mRNA • In situ hybridization • Biotinylated RNA probes • Cervical precancerous lesions

緒 言

近年, 子宮頸癌に高率に分離されるヒトパピローマウイルス (HPV) 16型や18型 DNA の初期遺伝子 E₆/E₇領域が NIH 3T3細胞の形質転換(癌化)をおこし発癌関連遺伝子と推測されている²⁾. 今回, 子宮頸部前癌病変である高度異形成と上皮内癌症例を対象に E₆/E₇に対するビオチン標識 RNA プロブによる in situ ハイブリダイゼーションから HPV16型, 18型 E₆/E₇mRNA の発現の有無を組織上で検討した.

研究材料と研究方法

研究材料は当教室で HPV16型や18型 DNA が検出された高度異形成や上皮内癌の症例を用いた. ビオチン標識 RNA プロブは E₆/E₇領域を, 16型は制限酵素 EcoRI と PstI で, 18型は BamHI と PvuII で切り出し, ベクター pSPT18に組み込んだ. ベクター pSPT18は, SP6, T7の二つの promotor をもち, 酵素 SP6 polymerase で mRNA と相補的塩基配列をもつ RNA プロブ (antisense)を, T7 polymerase で mRNA と同一

塩基配列をもつ RNA プロブ (sense) を作製した¹⁾. そして, 表1に示す方法から, 同一症例の連続切片で2種類の RNA プロブにより特異的な16型, 18型 E₆/E₇mRNA の検出を行なった. また正常子宮頸部上皮にも同様に検討した.

表1 ビオチン標識 HPV RNA プロブによる in situ ハイブリダイゼーション

1. 脱パラフィン後, 0.1N 塩酸室温 5 分間浸漬
2. 1 μ g/ml proteinase K 室温10分間処理
3. 再固定: 5%パラホルムアルデハイド室温30分間
4. アセチレーション: 0.25%無水酢酸, 0.1M Tris•HCl (pH8.0) 室温10分間
5. ハイブリダイゼーション: ビオチン標識 HPV RNA プロブ (antisense, sense) 2 μ g/ml, 50%ホルムアミド溶液42℃24時間
6. 洗滌: 2×SCC 50℃10分間 2 回, 0.2×SCC 50℃10分間 2 回
7. 1 μ g/ml ストレプトアビジン・アルカリフォスファターゼ室温10分間反応
8. 基質 (NBT, BCIP)*加え, 暗所で反応

*NBT: nitroblue tetrazolium, BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate

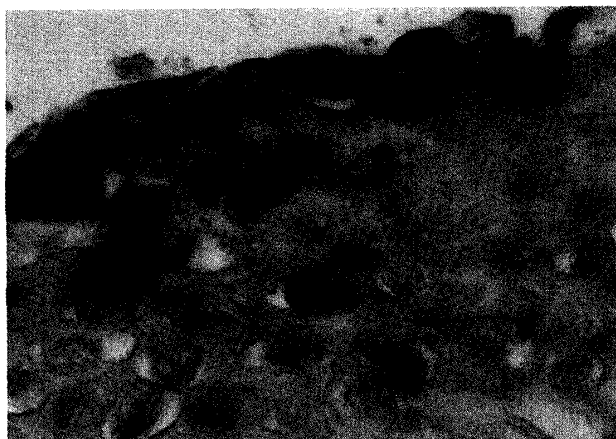


写真1 子宮頸部高度異形成における HPV16型 DNA 局在. 16型 DNA が異型細胞, koilocytosis の核に局在している. (×100)



写真2 高度異形成(同一症例)における HPV16型の E₆/E₇mRNA 局在. E₆/E₇mRNA が異型細胞, koilocytosis の主に細胞質に観察される. (×200)



写真3 上皮内癌における HPV18型の E₆/E₇mRNA 局在. E₆/E₇mRNA が腫瘍細胞の細胞質に認められる. (×200)

研究成績

今回, 正常子宮頸部上皮にいずれの HPV E₆/E₇mRNA の局在も認めなかつた. 高度異形成症例で, HPV16型 DNA が異型細胞や koilocytosis の核に証明され(写真1), antisense RNA プロブによる in situ ハイブリダイゼーションから E₆/E₇mRNA 局在を示す呈色反応が koilocytosis や異型細胞の主に細胞質に観察された(写真2). また, 18型 DNA 陽性の上皮内癌症例で18型 E₆/E₇mRNA が腫瘍細胞の細胞質に検出された(写真3). 一方, sense RNA プロブによる検討では, E₆/E₇mRNA はすべて検出されなかつた.

考 察

子宮頸部前癌病変を対象に HPV 感染頻度を検討すると, われわれの調査でも16型は異形成の進行とともに増加し, HPV16型感染が子宮頸部の発癌性との関連で重要な役割を演じていることが推測される. そこで, 16型や18型ゲノムの中で癌化と関連深い遺伝子 E₆/E₇に対する mRNA を検出することは, 発癌関連遺伝子の情報が感染細胞に転写されている証明となり, 発癌機構の解析に重要な所見と思われる. また, ビオチン標識プロブの使用で, 放射性同位元素のもつ特定施設の必要性もなく, 組織中で鮮明な mRNA の観察が可能となつた.

以上, 上皮内癌を含め子宮頸部前癌病変で HPV16型や18型の発癌関連遺伝子 E₆/E₇の発現が組織上で確認され, 子宮頸部前癌病変の経過判定の指標へも応用できることが十分示唆された.

文 献

1. Melton, D.A., Krieg, P.A., Maniatis, T.M. and Green, M.R.: Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucl. Acids. Res., 12: 7035, 1984.
2. Tsunokawa, Y., Takebe, N., Kasamatsu, T., Terada, M. and Sugimura, T.: Transforming activity of human papillomavirus type 16 DNA sequences in a cervical cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 2200, 1986.

(No. 6390 昭63・6・7 受付)