

# レーザーマイクロダイセクション法を用いた、 病理組織からのターゲット組織の回収と 遺伝子解析の試み

*Trial for isolation and gene analyses of the target tissues from histological sections by  
laser microdissection technique.*

代田欣二<sup>1</sup>, 萩原喜久美<sup>2</sup>, 中山裕之<sup>3</sup>

<sup>1</sup>麻布大学附置生物科学総合研究所

<sup>2</sup>麻布大学大学院環境保健学研究科

<sup>3</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科

Kinji Shirota<sup>1</sup>, Kikumi Ogihara<sup>2</sup>, Hiroyuki Nakayama<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Bioscience, Azabu University

<sup>2</sup>Graduate School of Environmental Health, Azabu University;

<sup>3</sup>Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

**Abstract:** Recent development of the laser microdissection (LMD) technique has been expected for the great contribution to the biomedical sciences as a novel laboratory tool. However, the application of the technique has not been well developed yet. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the technique for gene analyses using RT-PCR or realtime PCR in the dissected target tissues of rats and to obtain the basic data for gene analysis using LMD technique to clarify the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the tumors and nephropathies of animals. The results of this study revealed that LMD technique was very useful to detect and quantify local mRNA expression of VEGF and its receptor in the renal glomeruli of rats. Moreover, the LMD technique enable us to localize and quantify gene expression of some factors associating with development of ovarian follicles and drug-metabolizing enzymes and their relating factors in the liver. The immunohistochemical study and RT-PCR experiments on normal or neoplastic tissues of dogs revealed the gene and protein expression of VEGF in these tissues and provided us the basic information for the quantitative analyses of VEGF gene expression in dissected pathological tissues by LMD technique, especially those of the renal diseases and tumors.

## 目 的

近年、医学・生物学分野におけるタンパクや遺伝子の解析の為のツールとして、レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法が注目されている。<sup>1-3)</sup> こ

れは、組織切片からレーザーを用い、特定の細胞や組織を切り抜き回収する方法で、回収した組織内の mRNA やタンパクを定量化したり、遺伝子変異を確認したりする事が可能である。この方法を応用する事により、従来のホールティッシュを用いたウエス

タンブロット法やRT-TCR法、遺伝子発現部位を確認できる *in situ* ハイブリダイゼーション法に優る成果がもたらされる事が期待できるが、実際の研究への応用は始まったばかりで、データは蓄積されていない。

そこで本研究は、1) LMD法によってラットの組織より特定の組織を切り出し、RT-PCR法あるいはリアルタイムPCR法によって標的遺伝子の増幅と定量を試み、LMD法の遺伝子解析における有用性を確認すること、2) 動物における腎糸球体疾患および腫瘍の病態と血管内皮増殖因子 (VEGF) の関連をLMD法を用いて遺伝子解析から明らかにするため、その基礎的データを得ることを目的として行われた。

## 実験

### 1) 卵巣からの卵胞採取と遺伝子発現の解析

卵巣の凍結切片上にある発育程度の異なる卵胞からLMD法により顆粒膜細胞層を採取し、そこに発現するチトクローム P450 aromatase (Arom) およびインヒビン $\alpha$ サブユニット (Inh $\alpha$ ) のmRNAを定量した。

24日齢のWister系雌ラット4匹を断頭屠殺して卵巣を1個宛採取し、凍結包埋剤を用いて液体窒素中で急速凍結した。凍結材料から連続切片を作成して、連続する4枚をLMD用特殊スライドに添付した。これらの前後各2枚の切片にはヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色および抗Inh $\alpha$ 抗体による免疫染色を施して、各卵巣からLMDに供する卵胞として口径が300 $\mu$ m以上の健康な卵胞 (large) を10個、および口径が200 $\mu$ m以下で卵胞腔の形成されていない健康な卵胞 (small) を30個選択した。選択した各卵胞から、顆粒膜細胞層を採取し、largeとsmallに分けて個体毎に総RNAを抽出した。逆転写後、TaqManプローブを用いたreal-time RT-PCR法によりInh $\alpha$ 、Arom mRNAの発現量を測定し、ハウスキーピング遺伝子GAPDH mRNA発現量に対する相対値を算出した。

Inh $\alpha$  mRNA発現量は、largeとsmallの間で差を認めなかった。一方、largeにおけるArom mRNAは、smallのそれと比較して著しく高かった。これらのことから、個々の顆粒膜細胞におけるInh $\alpha$ 遺伝子の転写量は、卵胞の発育程度に関わらずほぼ一定である

のに対し、Arom遺伝子の転写は、既報のように卵胞の発育に伴って亢進することが示唆され、*in situ*における遺伝子発現の定量にLMD法が有用であることが確認された。

### 2) 腎臓からの糸球体採取と遺伝子発現の解析<sup>4)</sup>

実験モデルに見られる腎糸球体病変における様々なサイトカインの関与を検討するために、LMD法が研究ツールとして有用であるかどうか、糸球体局所における遺伝子発現について検討した。

まず、遺伝子の定量を行う際、LMD法で回収したサンプルから再現性のあるデータが得られるかを確認するため、正常ラット2個体の糸球体200個から得たRNAを用いて、通常のRT-PCR法によりGAPDH、血管内皮増殖因子 (VEGF) とその特異的レセプターflk-1について検討した。その結果、2個体のサンプルともに電気泳動にて検索遺伝子の特異的バンドが確認された。これにより、LMD法で回収した組織から抽出したRNAは、遺伝子発現の検討に用いることが可能で、再現性があるデータを得ることができることを確認した。

次に、複数の遺伝子発現を定量する場合、安定したデータを得るために必要な糸球体数について検討した。LMD法により正常ラット糸球体を10~100個回収し、GAPDHとVEGFについてリアルタイムPCR法で検討した。その結果、10個回収したとき、遺伝子の増幅は確認されたものの、一部のサンプルは増幅せず、同一サンプル間にばらつきがみられたが、100個回収した場合は、安定したデータを得ることができたので、100個以上回収して定量実験を行うことにした。さらに、ラットの抗Thy-1腎炎モデルに見られる糸球体病変の寛解とVEGFの関与を検討するため、本モデルの糸球体200個を回収し、遺伝子を定量した。抗体投与3日後のメサンギウム崩壊糸球体において、VEGF mRNA発現量は対照群に比べ少なく、投与後7日の実験群のうち、病変が高度で細胞増殖が著しい個体の糸球体において、その発現量は多いという傾向が認められた。

現在、個体数を増やしてさらに詳細に検討するとともに、flk-1やbFGFなどその他のサイトカインの遺伝子発現についても検討している。

### 3) 肝臓における薬物代謝酵素の小葉内分布に関する研究への応用

3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB126) 暴露ラットの出生子肝臓に誘導される cytochrome P4501A1 (CYP1A1) の分布は、経時的に瀰漫性から小葉中心性に移行する。このような肝臓における CYP1A1 の局在や分布の変化と CYP1A1 遺伝子発現、さらに CYP1A1 遺伝子の転写誘導に必須の Ah 受容体 (AhR), 共役因子の ARNT の遺伝子発現がどのように関連するのかを LMD 法により検索した。

コーン油 (1群) 又は PCB126 の 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (2群), 又は 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (3群) を妊娠 15 日目の SD 系雌ラットに 1 回経口投与し, 出生雌の肝臓を 24 日齢で採取して CYP1A1 と ARNT を免疫組織化学的に検索した。また, LMD 装置により肝臓凍結切片から中心帯と辺縁帯を 20 個採取して総 RNA を抽出し, これを鋳型として cDNA を合成し, リアルタイム PCR 装置を用いて AhR, ARNT, CYP1A1 遺伝子発現量を測定した。

免疫染色では, CYP1A1 は 2 群で小葉中心性に, 3 群では瀰漫性の誘導が確認され, ARNT は 3 群とも全ての肝細胞核内に発現していた。CYP1A1 mRNA の発現量は 1 群で中心帯の方が高かった。PCB 暴露群は 1 群と比較して発現量は有意に高く, 中心帯が高い傾向を示したが有意差は認められなかった。AhR と ARNT mRNA はいずれも 2 群では中心帯が, 3 群では辺縁帯がやや高い傾向を示したが, 有意差は認められなかった。以上より, PCB126 暴露ラット出生子肝臓における CYP1A1 分布は, 転写段階における調節よりも翻訳段階の調節により変化していると推測された。

### 4) 犬の腫瘍における VEGF の役割に関する基礎的研究

VEGF は正常・病的状態において血管内皮に特異的に作用し, 内皮細胞の増殖刺激や前駆細胞の遊走, 透過性の亢進など多様な活性を示す。VEGF はマクロファージ・血小板・平滑筋細胞等種々の細胞により産生されるが, 腫瘍細胞も VEGF を産生し, 正常組織よりも強い発現が見られることがあり, ヒトの多くの固形癌で VEGF の高発現が予後不良因子となると報告されている。一方, 獣医学領域では VEGF

と疾病の関連に関する報告は少なく, 病理組織における VEGF 等の標的遺伝子の解析に LMD 法は極めて有効な研究ツールであると考えられる。今回我々は, その基礎的研究の一環としてイヌの正常および腫瘍における VEGF 遺伝子ないし蛋白発現を検索した。

材料として, 犬の正常・腫瘍 (外科材料, 移植腫瘍) の組織を用い, パラフィン切片における免疫染色 (IHC) による VEGF 蛋白, RT-PCR 法による VEGF mRNA の検出を試みた。

正常組織では心, 脾, 腎, 副腎, 精巣, 卵巣に VEGF の, 4 つのアイソフォームの mRNA 発現が見られ, IHC では脾, 腎, 肝で蛋白の発現を確認した。また IHC により血管周皮腫・血管肉腫・肺癌・肝癌・乳腺癌の腫瘍細胞に陽性部が確認された。乳腺癌では腫瘍周囲の間質にも見られた。肺癌では浸潤したマクロファージにも強く発現していた。移植腫瘍細胞については, 検索した悪性黒色腫, リンパ腫両腫瘍で遺伝子発現を確認した。

また, 外科材料のパラフィン切片を用いて遺伝子発現を解析する場合には蛋白分子の cross-linking による固定よりも precipitation による固定液を使用した方が, RNA の保存状態が良い事も確認された。

以上のように, 犬の正常および腫瘍組織に VEGF が発現している事が明らかになったことから, 今後ホールの組織ではなく, LMD 法によって正常および腫瘍細胞を別々に採取, 解析し, 犬の腫瘍や腎疾患における VEGF の役割を解析することが可能となった。

○本研究は, 下記の共同研究者の協力を得て遂行された。(敬称略)

村上 賢, 斑目広郎, 信田卓男 (獣医学部)

井上 薫, 櫻田陽右 (大学院獣医学研究科)

川畑 敦史, 長井佳代子 (獣医学部生)

代田真理子 (財・食品薬品安全センター秦野研究所)

大町 哲夫 (パソラボ)

○研究成果は下記にて報告した。

口頭発表

1) 井上薫, 他: レーザーマイクロダイセクション

ン (LMD) 法を用いた糸球体局所での VEGF mRNA 発現量の評価。第 45 回日本腎臓学会学術総会 (2002), 大阪市

- 2) 川畑敦, 他: レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法を用いたコブラナー PCB 曝露ラット出生子肝臓における CYP1A1 の誘導と, AhR 及び ARNT 遺伝子発現の比較。第 134 回日本獣医学会学 (2002), 岐阜市
- 3) 代田欣二, 井上薫: レーザーマイクロダイセクション法。第 9 回岐山毒性病理セミナー (2002), 岐阜市
- 4) 櫻田陽右, 他: 幼若ラットの卵巣の顆粒膜細胞に発現する遺伝子の定量的解析への laser microdissection 法の応用。第 96 回繁殖生物学会大会 (2003), 帯広市
- 5) 長井佳代子, 他: イヌの正常および腫瘍における血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現。第 136 回日本獣医学会 (2003), 青森市

誌上発表

Inoue, K. et al. : Detection of gene expression of VEGF and flk-1 in the renal glomeruli of the normal rat kidney using the laser microdissection system. *Virchows Archiv* 442: 159-162, 2003.

### 要 約

近年, 医学・生物学分野でタンパクや遺伝子の解

析の為のツールとして, レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法が注目され, その成果が期待されているが, 実際の研究への応用は始まったばかりで, データは蓄積されていない。そこで本研究は, 1) LMD 法によってラットの組織より特定の組織を切り出し, RT-PCR 法あるいはリアルタイム PCR 法によって標的遺伝子の増幅と定量化を試み, LMD 法の遺伝子解析における有用性を確認すること, 2) 動物における腎糸球体疾患および腫瘍の病態と血管内皮増殖因子 (VEGF) の関連を, LMD 法を用いて遺伝子解析から明らかにするための基礎的データを得ることを目的として行われた。その結果, 腎糸球体での VEGF とその受容体遺伝子, 卵巣における発育段階の異なる卵胞に発現するインヒビリン等の遺伝子, 肝臓における薬物代謝酵素および関連遺伝子の発現の定性/定量解析が本法で可能なことが明らかになった。また, 免疫組織学的検索や RT-PCR 法による検索によって, 犬の腎疾患や腫瘍などの病理組織内のターゲット細胞/組織における VEGF 遺伝子発現の解析に関する基礎的データが得られた。

### 文 献

- 1) Boylan, S., et al., *Lab. Invest.*, 81: 1167-1169, 2001.
- 2) Cohen, C. D., et al., *Kidney Int.*, 61: 125-132, 2002.
- 3) Goldsworthy, T. L., et al., *Mol. Carcinog.*, 25: 86-91, 1999.
- 4) Inoue, K. et al., *Virchows Archiv.*, 442: 159-162, 2003.