

市販キットによる *in situ* hybridization 法の有用性

Application of *in situ* hybridization method with a commercial kit

黒田奈々美^{1,2)}, 菊池玲実花^{1,2)}, 藤内美佑紀^{1,2)},
指導教員 梅村隆志^{1,2)} 研究協力者 石井雄二²⁾, 高須伸二²⁾

- 1) ヤマザキ動物看護大学 動物看護学部 動物看護学科 動物病理学研究室
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

In situ hybridization 法 (ISH 法) は部位特異的な mRNA の発現解析が可能であるが、再現性が乏しい等の問題点があった。そこで市販キットを用いてホルマリン固定後切片ならびに新鮮凍結切片のプロトコールの条件検討を行うとともに、その有用性を *Ccne 1*、*Notch 4* 遺伝子の mRNA 検出により検討した。RT-PCR 法の結果と一致してそれぞれの発現が確認されたこと、それぞれの遺伝子の発現部位が報告されている部位と一致したことから市販キットの有用性が確認された。

キーワード : *In situ* hybridization、RT-PCR、マウス肝臓

1 目的

mRNA 発現解析法の一つである RT-PCR 法は、臓器より抽出した mRNA から逆転写により合成された cDNA を用いて PCR を行う方法であり、定量性に優れていることから広く一般的に用いられているが、抽出臓器内のどの細胞からのシグナルかは特定できない。一方、*in situ* hybridization 法 (ISH 法) は組織切片上で標的の RNA に相補的なプローブを hybridization 後、プローブを可視化するもので、部位特異的な mRNA の発現解析が可能である。しかし従来の ISH 法には、手順中の RNA の安定性の確保や適切なプローブの設計・作成が困難であること、また、検出感度が低く、操作も煩雑であることからデータの再現性に乏しいなどの問題点があった。近年、このような問題を改善・解決した簡易キットが販売され、その有用性が期待されている。そこで本研究では 市販の RNA scope[®] (ACD 社製、USA) を用いてホルマリン固定後切片ならびに新鮮凍結切片を用いて、それぞれのプロトコールの条件検討を行うとともに、その有用性を細胞増殖等に関わる *Ccne 1*、細胞分化等に関わる *Notch 4* 遺伝子の mRNA 検出により検討した。

2 材料・方法

2-1 市販キットと関連試薬

RNAscope[®] 2.5 HD Reagent Kit-BROWN (キット名)、RNAscope[®] Control Slide-Mouse 3T3 Cell Pellet (コントロールスライド)、RNAscope[®] Positive Control Probe- Mm-Pipib (ポジティブコントロール・プローブ)、RNAscope[®] Negative Control Probe- DapB (ネガティブコントロール・プローブ)、ACD HybEZ[™] II Hybridization System (110v) With ACD EZ-Batch[™] Slide System (ハイブリダイゼーシ

ョン用オープン)、ImmEdge[™] Hydrophobic Barrier Pen、RNAscope[®] Protease III and Protease IV Reagents、RNAscope[®] Probe - Mm-Ccne1、RNAscope[®] Probe - Mm-Notch4

2-2 RT-PCR に関する試薬・機器類

RNA 抽出用試薬 : RNA later-ICE (Invitrogen[™], USA)、Isogen (ニッポン・ジーン)、クロロホルム (富士フィルム和光純薬)、2-プロパノール (富士フィルム和光純薬)、エタノール (富士フィルム和光純薬)、RNase Free Water (QIAGEN, DE)、Mixer Mill MM300 (QIAGEN, DE)
RNA 純度測定機器 : NanoDrop[™] (Thermo Scientific[™])
cDNA 合成試薬・機器 : High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems[™], USA)、2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems[™], USA)

RT-PCR 測定用試薬・機器 : TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[™], USA)、TaqMan Gene Expression Assays (FAM 標識) (Applied Biosystems[™], USA)、TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems[™], USA)、7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems[™], USA)

2-3 使用サンプル

農薬の Piperonyl butoxide (PBO) を 6000 ppm の濃度で 6 週齢の雄性 ICR 系マウスに 43 週間混餌投与し、解剖後、肝を摘出し、肉眼的結節部位を採取し、半分を病理組織学的検索用にホルマリン (固定時間不明) ならびに凍結切片用コンパウンドに包埋して液体窒素に浸漬、残りを液体窒素に凍結保存した。病理組織学的に肝細胞腺腫、非病変部と診断されたホルマリン固定切片ならびに凍結

切片を用いて ISH 法の検討を行った。加えて、8 週齢 C57/BL 系マウス（日本チャールス・リバー）の腎臓・脾臓を 24 h ホルマリン固定し、ISH 法のホルマリン固定後切片の条件検討に使用した。

2-4 ISH 法による解析

[ホルマリン固定後切片]

キット内のスライドサンプルを用いたホルマリン固定後切片用標準プロトコールの手順の確認を行った。Mouse 3T3 Cell Pellet を使用し、ホルマリン固定後切片用プロトコールに準じて実施した。ポジティブプローブ、ネガティブプローブ各 1 枚、計 2 枚のスライドで手順書記載の条件で処理を行った。上記 3 種のホルマリン固定標本を用いて適正なホルマリン固定時間の検討をホルマリン固定後切片用プロトコールに準じて行った。それぞれポジティブプローブ、ネガティブプローブとして 2 枚ずつ、計 6 枚使用した。

[新鮮凍結切片]

肝細胞腺腫および非病変部肝臓を用いた新鮮凍結切片用標準プロトコールの確認を行った。新鮮凍結切片用プロトコールによる *Ccne 1* および *Notch 4* 遺伝子の発現とその局在を確認した。

2-5 RT-PCR 法による解析

凍結切片から肝細胞腺腫部分と基礎飼料対照群の肝臓をレーザーマイクロダイセクション（Leica, Microsystems, DE）により採取し、RNA 抽出、RNA 純度測定後、25°C・10 min、37°C・120 min、85°C・5 min、4°C・∞の条件で cDNA 合成を行った。検量線法を用いて、95°C・10 min、95°C・15 sec、60°C・1 min を 40 サイクルの条件で RT-PCR を行った。

4 結果

4-1 ISH 法による解析

[ホルマリン固定後切片]

キット内の Mouse 3T3 Cell Pellet を用いたホルマリン固定後切片用標準プロトコールの手順の確認を行った結果、ポジティブプローブではシグナル反応が明瞭に観察することができ、ネガティブプローブではシグナルは観察されなかった。そこで、標準プロトコールを用いて適性ホルマリン時間の検討を行った結果、24 h で固定した Mouse 腎臓・脾臓はシグナル反応が明瞭に観察できたが、ホルマリン固定時間不明の標本ではシグナル反応が観察されなかった。

[新鮮凍結切片]

新鮮凍結切片用標準プロトコールの確認の結果、細胞形態が不明瞭でシグナル反応が非常に弱かった。そこで切片の作成・固定条件の検討が必要であると考え、作成条件である乾燥を十分に行うための検討として、組織薄切後、スライドに乗せ -20°C で切片を 1 h 乾燥させたスライド (-20°C)、風乾で 1 h 乾燥させたスライド (RT) を用意した。加えて、それぞれのスライドに固定条件であるプロテアーゼを 1・8・15・30 min で計 8 枚のスライド

でプロテアーゼの最適時間を合わせて検討した結果、-20°C と RT に差は認められなかったことから以降の乾燥は RT で実施した。プロテアーゼの最適時間は 30 min であった。肝細胞腺腫・非病変部肝臓を用いた新鮮凍結切片用プロトコールによる *Ccne 1* および *Notch 4* 遺伝子の発現状態とその局在を確認した結果、*Ccne 1* は肝細胞に、*Notch 4* は類洞（血管）に発現が確認された。

4-2 RT-PCR 法による解析

肝細胞腺腫の *Ccne 1* mRNA レベルは基礎飼料対照群に比して 2.61 倍、*Notch 4* は 2.65 倍の高値となった。

5 考察

本試験で使用したキットの条件検討により、ホルマリン固定後切片におけるホルマリン固定時間は 24 時間が適正であることが明らかとなった。新鮮凍結切片はサンプルスライド作成の乾燥を十分に行うことで利用できることが確認された。また、RT-PCR 法の結果と一致して *Ccne 1* と *Notch 4* の mRNA 発現が ISH 法でも確認でき、市販キットを用いた本方法の有用性が確認された。さらにそれぞれの遺伝子の発現部位が報告されている部位と一致したことから、その有用性が明らかとなった。また、標本サンプルとしては、形態保持の観点から 24 時間のホルマリン固定標本が優れていることが分かった。

