

免疫学的組織障害機序解明のための nonradioactive in situ hybridization 法の確立

奥村 康、飯郷 裕

Digoxigenin標識cDNA probe を用いたnonradioactive in situ hybridization法を確立し、マウスNK細胞株における Pore forming protein mRNAの局在を実証した。これより遺伝子レベルでの免疫学的組織障害機序解明のひとつの可能性を示した。

in situ hybridization, Pore forming protein, Perforin, 組織障害

緒言

腎障害の要因には数多くのものが考えられるが、その発症および進展には免疫学的な関与が非常に大きなウェイトを占めると考えられる。一方、免疫異常を背景とした組織障害機序を解析する手段は、近年の分子遺伝学の進歩とその導入により著しく進展してきた。我々は、T細胞、Killer細胞、Natural Killer(NK)細胞による自己組織破壊機序を検索する目的で研究を進め、細胞障害性リンパ球の最終effector物質の一つであるPore forming protein(Perforin ; PFP)の遺伝子の同定に成功した¹。本研究では、この遺伝子を用いて、実際、組織障害の場に出現しているリンパ球の機能を検索することを目的とし、nonradioactive in situ hybridization法を確立し、解析を行った。

材料及び方法

細胞：マウスNK細胞株は、北大・服部氏らにより分離、確立されたSPB 2.4,SPB T5 (服部氏より供与)を用いた²。また、マウスmyeloma細胞株P3U1およびT lymphoma RL♂1は、当教室で継代、維持しているものを用いた。

実験においては、各細胞を0.01%グルタルアルデヒドPBS溶液で固定し、 4×10^4 個ずつCytospin 2 (Shandon社製)を用いてスライドガラスに付着させ、4%パラホルムアルデヒドPBS溶液で固定後、風乾し、実験に供した。

probeの調整：標識cDNA probeの調整は、cDNA labeling and detection kit (Boehringer社製)を用い、行った。すなわち、図-1のごとく1.7kbマウスPFPcDNA fragmentを鋳型とし、Random priming法によりDigoxigenin

標識d-UTPをKlenow enzymeを用いて probeに組み込んだ。このDigoxigenin 標識 cDNA probeを用いて in situ hybridizationを行った。

in situ hybridization : in situ hybridizationの原理を図-2に示した。スライドガラスに付着させた細胞の mRNAに標識 probeを hybridizeさせ、アルカリフォスターゼ標識抗 Digoxigenin抗体を反応させた後、X-phosphate, NBTを基質として発色させた。実験の詳細は、図-3に示した。被験標本を、0.2N HClに浸漬することにより、RNaseや塩基性蛋白を除去し、probeの細胞への浸透性を高めた。Proteinase Kの処理により、RNase およびDNaseを失活させ、probe DNAの組織への非特異的結合を阻止するため、標本をアセチル化した。そして、4%パラホルムアルデヒドで後固定し、mRNAの保存度を高め、グリシン処理により残存アルデヒドを中和した。さらに prehybridizationにより非特異的結合を阻止し、42°Cで probeを hybridizeさせた。hybridization後は、標本を十分に洗浄し、非特異的に結合した probeを除去した。その後、アルカリフォスターゼ標識抗 Digoxigenin抗体を用いた酵素抗体法を行い、呈色反応後、必要に応じ Mayer's hematoxyrineで核染色し、ポリビニルアルコール・グリセリン混合液で封入した。なお、陰性対照標本は、probeを除いた Mixtureで反応させ、その後同様の処理を施した。

結果及び考察

2x10⁴個ずつの SPB 2.4ならびに RL♂1を同一のスライドガラスにプレパレートし、in situ hybridizationを行った結果を写真-1に示した。両者の細胞は形

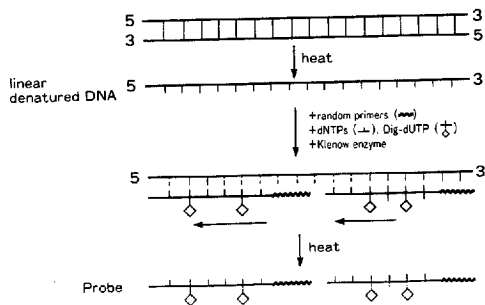
態的に大きく異なり、RL♂1に比較し、SPB 2.4は非常に大型で、PFPの mRNAに対するシグナルは大型の細胞、SPB 2.4にのみ認められた。シグナルはすべて細胞上のみ見られ、細胞外の非特異的シグナルは認められなかった。また probeを除いた陰性コントロールでは、シグナルは観察されず、酵素抗体法による非特異的反応は非常に低いと考えられた。

PFPの Northern Blot Hybridizationの結果¹より判明した message量の異なる3種の細胞株について、in situ hybridizationを行い比較した。その結果、message量の非常に多い SPB 2.4, messageがわずかに認められる SPB T5では、シグナルが明瞭に認められたのに対し、messageが見られない P3U1ではシグナルは認められず、本法が非常に特異性の高い検出法であることを示唆した。

今回確立したシステムは、ヌクレオチドの標識に放射性同位元素を使用せずに高い特異性を得ることができるとともに、個々の細胞レベルでの解析が可能となり、今後の研究に有用な手段となることが期待される。

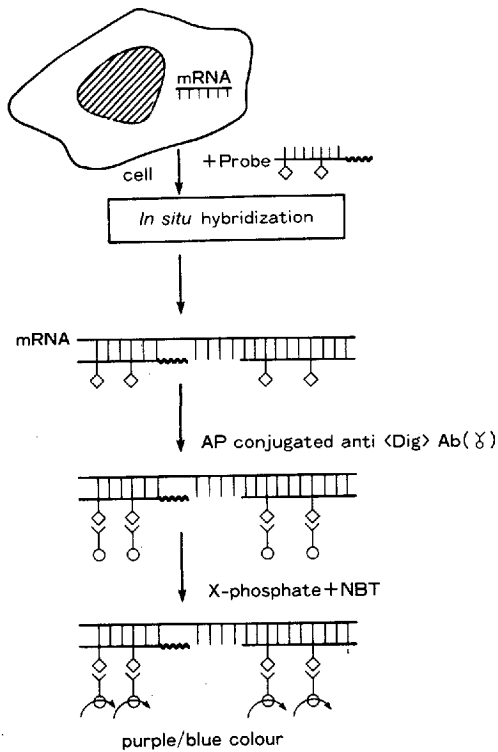
参考文献

1. Shinkai, Y., Takio, K., Okumura, K. : Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). Nature. 334:525-527, 1988.
2. Hattori, M., Sudo, T., Iizuka, M., Kobayashi, S., Nishio, S., Kano, S. and Minato, N. : Generation of continuous large granular lymphocyte lines by interleukin 2 from the spleen cells of mice infected with Moloney leukemia virus. Involvement of interleukin 3. J. Exp. Med. 166: 833, 1987.



Random priming

☒-1



***In situ* hybridization**

☒-2

sample plate
 ↓
 wash in PBS, room temp, 5' × 3
 ↓
 0.2N HCl, r.t., 20'
 ↓
 1μg/ml Proteinase K/PBS, 37C, 10'
 ↓
 wash in PBS, r.t. 5' × 3
 ↓
 acetylation in 0.25% acetic anhydride/0.1M triethanolamine (pH8.0), r.t., 10'
 ↓
 fixation in 4% paraformaldehyde/PBS, r.t. 5'
 ↓
 wash in PBS, r.t. 5' × 2
 ↓
 2mg/ml glycyl/PBS, r.t., 15' × 2
 ↓
 50% formamide/2 × SSC, r.t. 1'
 ↓
 Prehybridization in Prehyb.-Mix. 42 C, over night
 ↓
 Hybridization in Hyb.-Mix. 42°C, over night
 ↓
 wash in 50% formamide/2 × SSC, 37C, 60' × 5
 ↓
 wash in 2 × SSC, r.t., 15' × 2
 ↓
 in PBS
 ↓
 (ELISA)

Protocol of nonradioactive *in situ* hybridization

☒-3

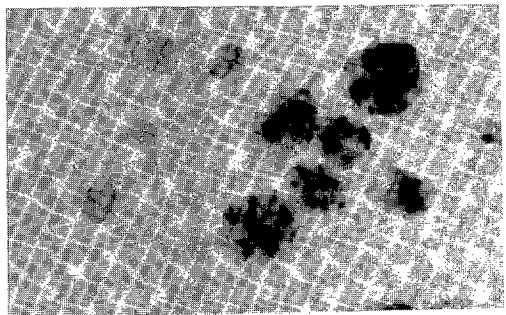
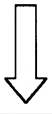


写真-1



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



Digoxygenin 標識 cDNA probe を用いた nonradioactive in situ hybridization 法を確立し、マウス NK 細胞株における Pore forming protein mRNA の局在を実証した。これより遺伝子レベルでの免疫学的組織障害機序解明のひとつの可能性を示した。