

In situ PCR法の開発と その組織化学染色法の確立に関する研究

(課題番号 07557001)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金
(基盤研究 A (2)) 研究成果報告書

平成10年 3月

研究代表者 木村 宏
(滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター)
(神経形態学部門)



1997024277

はしがき

研究組織

研究代表者：木村 宏（滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター・神経形態学部門）

研究分担者：遠山育夫（滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター・神経化学部門）

研究経費

平成7年度	4、900千円
平成8年度	4、500千円
平成9年度	2、400千円
計	11、800千円

研究発表

- Iwai N, Hanai K, Tooyama I, Kitamura Y, Kinoshita M: Regulation of neuronal nitric oxide synthase in rat adrenal medulla. *Hypertension* 25:431-436, 1995.
- Yasuhara O, Matsuo A, Tooyama I, Kimura H, McGeer EG, McGeer PL: Pick's disease immunohistochemistry: new alterations and Alzheimer's disease comparisons. *Acta Neuropathol.* 89:322-330, 1995.
- Tooyama I, Kawamata T, Akiyama H, Kimura H, Moestrup SK, Gliemann J, Matsuo A, McGeer PL: Subcellular localization low density lipoprotein receptor-related protein
- Hanai K, Matsuoka Y: Potentiation of tentacle ball formation by a trypsin-like protease and accompanying augmented ingestion in glutathione-induced feeding in *Hydra*. *Zool. Sci.* 12:185-193, 1995.
- Matsuoka Y, Kitamura Y, Tsukihara T, Terai K, Tooyama I, Kimura H, Taniguchi T: Neuroprotective effects of NBQX on hypoxia-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neuroreport* 6:2205-2208, 1995.
- Takahashi M, Yamada T, Tooyama I, Morro I, Kimura H, Yamamoto T, Okada H: Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 204:201-204, 1996.
- Li AJ, Oomura Y, Hori T, Aou S, Sasaki K, Kimura H, Tooyama I: Fibroblast growth factor receptor-1 in the lateral hypothalamic area regulates food intake. *Exp. Neurol.* 137:318-323, 1996.
- Aimi Y, McGeer PL: Lack of toxicity of human neuromelanin to rat brain dopaminergic neurons. *Parkinsonisms & Related Disorders* 2:69-74, 1996.
- Oomura Y, Sasaki K, Li AJ, Kimura H, Tooyama I, Hanai K, Nomura Y, Kitamura Y, Yanaiharu N, Yago H: Memory facilitation by an endogenous satiety substance, acidic fibroblast growth factor (aFGF). *Prog. Obes. Res.* 7:433-438, 1996.
- Kitamura Y, Takahashi H, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Nomura Y, Taniguchi T: In vivo induction of inducible nitric oxide synthase by microinjection with interferon-g and lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Glia* 18:233-243, 1996.
- Nakao S, Adachi T, Murakawa M, Shinomura T, Kurata J, Shichino T, Shibata M, Tooyama M, Kimura H, Mori K: Halothane and diazepam inhibit katamine-induced c-fos expression in the rat cingulate cortex. *Anesthesiology* 85:874-882, 1996.
- Suzuki M, Kitano H, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Takeda T, Kimura H, Tooyama I: Detection of C-type natriuretic peptide (CNP) and atrial natriuretic peptide (ANP-B) receptor mRNAs in rat inner ear. *Neuroreport* 8:439-443, 1997.

13. Tooyama I, Sasaki K, Oomura Y, Li AJ, Kimura H: Effect of acidic fibroblast growth factor on basal forebrain cholinergic neurons in senescence accelerated mice. *Exp. Gerontol.* 32:171-179, 1997.
14. Kitano H, Takeda T, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Kimura H, Tooyama I: Vasopressin and oxytocin receptor mRNAs are expressed in the rat inner ear. *Neuroreport* 8:2289-2292, 1997.
15. Takenaka H, Kishimoto S, Tooyama I, Kimura H, Yasuno H: Protein expression of fibroblast growth factor receptor-1 in keratinocytes during wound healing in rat skin. *J. Invest. Dermatol.* 109:108-112, 1997.
16. Kimura H, Yasuhara O, Tooyama I: Recent advances in neuroscience for Alzheimer's disease. *Adv. Leg. Med.* 3:280-283, 1997.
17. Aimi Y, Wakabayashi Y, Yasuhara O, Matsuo A, Kwok YN, McGeer PL, Kimura H: Immunohistochemical localization of low-affinity nerve growth factor receptor in the enteric nervous system of adult rats. *Histochem. J.* 29:529-537, 1997.
18. Renda T, Erspamer V, Tooyama I, Kimura H: Mesencephalic d-opioid peptidergic ascending projection with special reference to the mesolimbocortical system. In: Motta P. M. ed. *Recent Advances in Microscopy of Cells, Tissues and Organs.* (Antonio Delfino Editore, Rome) PP.239-246, 1997.
19. Kitamura Y, Furukawa M, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Nomura Y, Taniguchi T: In vitro and in vivo induction of heme oxygenase-1 in rat glial cells: Possible involvement of nitric oxide production from inducible nitric oxide synthase. *Glia* 22:138-148, 1998.

研究成果概要

本研究の基本的な目的は、組織切片においてmRNAに特異的なポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)を行い、高い特異性と感受性を持つmRNA検出法を開発することである。まず、本研究初段階で、切片上の逆転写の至適条件を決定できたので、この技術を用いて切片内に含まれるcRNA(ビオチンなし)をその後のPCR法の鋳型として作成することに着手した。この技術の確立のためには、このcRNAを最も効果的に増殖し可視化するためのPCR至適条件を決定することである。具体的には、1) 適正なPCR法の条件決定、2) 効果的なビオチン化の条件PCR(標識をPCR伸長反応過程に導入または標識プライマーを使用)、3) 標識産物の可視化の最適条件決定(免疫組織化学的手法の応用)、4) 画像解析装置を用いた定量解析(マックアスペクト使用)、などである。このうち、1)に関してはほぼ満足のいく条件が決定できたが、通常の試験管内におけるPCR条件とはいくつかの点で異なっており、その理論的根拠を現在なお探索中である。次に2)のビオチン化の条件に関しては標識プライマーを用いるよりは標識をPCR伸長反応過程に導入する方が効率および安定性の面で勝っていることが明らかとなった。ただし、過剰量のビオチンを導入した場合、PCR法におけるハイブリダイゼーションの効率が低下することも判明したので、感受性を向上するための導入比率を厳格に規定することが重要である。3)の可視化条件に関しては、研究の進展がみられ、浮遊切片を用いる独自のin situ ハイブリダイゼーション組織化学の確立ができると自信を持つことができた。4)の目標も基礎的な問題は解決し、単に染色部分の、面積を測定することばかりでなく、染色の濃淡をも定量解析できる方法の開発に取り組んでいる。

以上、本研究の目的はある程度達成されたと言えるが、技術的に習熟すべき点が残されており、一般的な実用化にはいまだ少し時間がかかる。この最終段階の問題点を解決できれば、論文として発表可能と期待できる。