

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22750072

研究課題名（和文）腫瘍細胞のテロメラーゼ活性検出とメチル化遺伝子の電気化学的検出による相関解析

研究課題名（英文）Correlation analysis by electrochemical detection of gene methylation detection and telomerase activity of tumor cells

研究代表者

佐藤 しのぶ (SHINOBU SATO)

九州工業大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：80510677

研究成果の概要（和文）：癌マーカーとして期待されている蛋白質 テロメラーゼは、DNA テロメラーゼ逆転写酵素、hTERT 遺伝子)の異常メチル化と相関があると言われていた。しかし既存のテロメラーゼ検出方法では高感度な検出ができず、相関関係が観察できなかった。そこで、本研究では電気化学的テロメラーゼ活性検出法と電気化学的遺伝子検出法によって、臨床サンプルのテロメラーゼ活性と hTERT 遺伝子のプロモータ領域の 5 つの CpG サイトについてメチル化度合いを調べた。

研究成果の概要（英文）：Telomerase is an enzyme which can elongate telomere DNAs and is a good candidate for a cancer marker because of its specific expression in cancer cells. The promoter region of the hTERT gene, encoding for the catalytic subunit of human telomerase, has been located in a CpG island and may therefore be regulated at least in part by DNA methylation. We analyzed the methylation status of five CpG sites within the hTERT promoter core region by FND-based electrochemical hybridization assay and electrochemical telomerase activity assay in lysates of oral cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：テロメラーゼ、TERT、DNAメチレーション、電気化学

1. 研究開始当初の背景

テロメラーゼは、テロメア DNA 配列 (TTAGGG の繰り返し配列) を伸長する酵素であり、癌細胞で特異的に発現している。

申請者らは、高感度なテロメラーゼ活性

検出方法として、電気化学的活性測定方法を構築している。電気化学的手法は、電極上に存在する数 pmol/cm² のプローブの応答変化をモニタリングできる非常に高感度な検出手法の一つである。

一方、テロメラーゼの発現に関与して

いる要因の一つに、癌抑制遺伝子や TERT (テロメラーゼの構成成分の一つである触媒ユニット) をコードする遺伝子の高頻度メチル化が挙げられる。つまり、これらの遺伝子のメチル化は癌の超初期症状を示唆していると考えられ、この検出は、癌の初期診断に適用可能である。

申請者は、これまでに遺伝子の電気化学的検出法の確立を行っているため、これまでの知見を利用して新たに電気化学的メチル化検出について検討を行う。また、早期癌検査を目指して、電気化学的に検出されたテロメラーゼ活性検出を行う。さらに遺伝子のメチル化状況、そして TERT の mRNA の発現量の相関関係を調査する。

2. 研究の目的

テロメラーゼは、ほとんどの癌でその活性が確認されていることから、あらゆる癌のマーカーとして期待されている酵素である。その発現制御の一つにテロメラーゼをコードしている TERT 遺伝子のメチル化が関与している。つまり、TERT 遺伝子のメチル化状態を検出することができれば、テロメラーゼが発現する前に癌診断を行うことが可能と

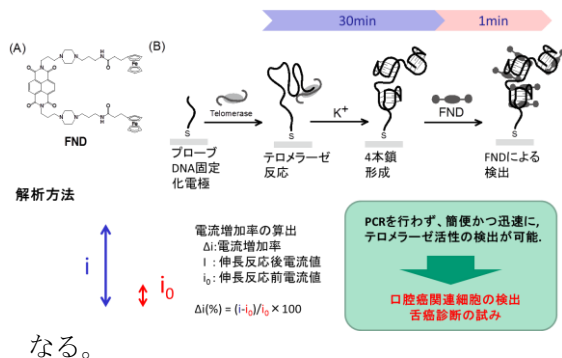


図 1. 電気化学的テロメラーゼ活性検出 (ECTA) の原理。

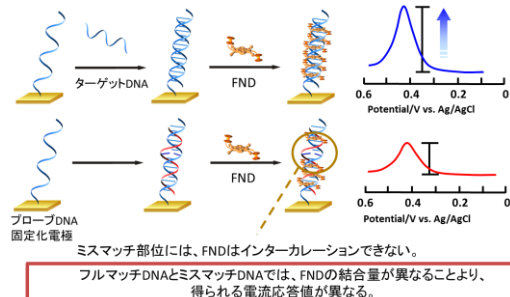


図 2. 電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイの原理。

現在、テロメラーゼの活性確認には Telomerase Repeat Amplification Protocol

(TRAP)法が用いられているが、この手法は検出可能な細胞数の下限が 50 細胞であり感度が低い。そこで、本提案では、テロメラーゼの高感度検出が可能な電気化学的手法によるテロメラーゼ活性検出 (Electrochemical telomerase assay, ECTA) 法 (図 1) と TERT 遺伝子のメチル化検出法 (図 2) を確立する。これにより、これまでは判別できなかった様なテロメラーゼの発現量が低い状態における TERT 遺伝子のメチル化とテロメラーゼ活性の相関関係について電気化学的手法による検討を行うことができると考えている。

そして、最終的には、これらを組み合わせた電気化学的超早期癌診断の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) テロメラーゼ活性測定

感度上昇を目指した条件検討を行う。検討内容は、以下の通りである。

- ①プローブ DNA 固定化条件
- ②固定化密度の最適化
- ③既存の活性測定法である TRAP 法と ECTA 法との感度の比較
- ④TERT の mRNA 発現量と ECTA により算出されたテロメラーゼ活性の比較

(2) メチル化 DNA の検出

電気化学指示薬としてフェロセン化ナフタレンジイミドを利用したハイブリダイゼーションアッセイにより検出を行う。ターゲットとして考えている遺伝子はテロメラーゼの触媒活性ユニットである TERT 遺伝子、癌抑制遺伝子である p16 遺伝子を考えている。メチル化サンプルはフルマッチ、非メチル化サンプルはミスマッチになるようプローブ設計する。

- ①プローブ DNA の配列設計
- ②固定化密度の最適化
- ③検出下限の算出
- ④ゲノム DNA による検討; メチル化特異的 PCR、亜硫酸処理シーケンス、電気化学測定結果の比較

(3) 臨床サンプルへの適用

腫瘍細胞サンプルから細胞抽出液と DNA を抽出する。細胞抽出液は電気化学的テロメラーゼ活性測定法である ECTA へ適用し、サンプル溶液中のテロメラーゼ活性を抽出する。同一の細胞サンプルから抽出された DNA については、電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイへ適用し、テロメラーゼの触媒活性ユニットである hTERT 遺伝子のメチル化 DNA 検出を行い、メチレーション度合いとテロメラーゼ活

性の相関を比較する。

- ① 臨床サンプルの電気化学テロメラーゼアッセイ
- ② 臨床サンプルの TRAP 法との比較
- ③ 臨床サンプルの電気化学ハイブリダイゼーションアッセイ

4. 研究成果

(1) テロメラーゼ活性測定

- ① プローブ DNA(TS プライマー)の固定化条件

TS プライマーの固定化方法として、次の二通りを検討した。まず、チオール化 TS プライマーを固定化したあとで、6-メルカプトヘキサノールによるマスキングを行った。もう一つは、6-メルカプトヘキサノールによるマスキングを行ったあとで、チオール化 TS プライマーの固定化を行った。前者では、TS プライマーの固定化密度が 10^{11} - 10^{12} molecules/cm² あたりで高くなり、後者は TS プライマーの固定化密度を 10^{10} - 10^{11} molecules/cm² あたりに調整することができた。

- ② 固定化密度の最適化

TS プライマー固定化密度が 1×10^{10} - 3×10^{11} molecules/cm² の範囲で異なる電極を調整し、2.5 HeLa 細胞抽出液を反応させた。反応前後で、ルテニウム錯体を利用したクロノクーロメトリー測定を行い、電極上の DNA 量の変化を観察した(図 3)。HeLa 細胞の添加に伴い、TS プライマーの伸長が観察された。伸長された DNA の度合いは、固定化密度の低下に伴い大きくなった。TS プライマーのプローブ間距離はテロメラーゼが十分に相互作用可能な距離 (4.0×10^{10} molecules/cm² の場合、プローブ間距離 50 nm, テロメラーゼ 13 nm)がある場合によく伸長が起こっていることがわかった。

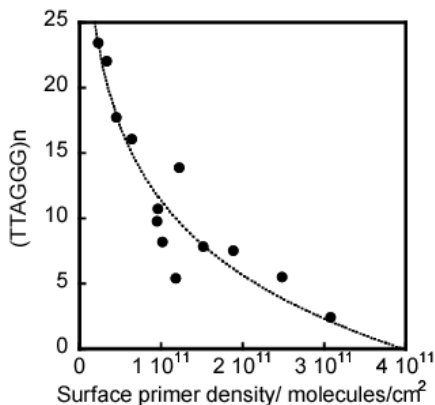


図 3. TS プライマー固定化密度とテロメラーゼ伸長度の変化.

- ③ 既存の活性測定法である TRAP 法とフェロセン化ナフタレンジイミド(FND)による電気化学的テロメラーゼ活性検出法(ECTA)との感度の比較。

口腔癌に関連する培養細胞である SAS, Ca9-22, HSC-2, HSC-3 について TRAP アッセイと ECTA を行った。その結果、TRAP 法では 100 細胞以上で明瞭なテロメラーゼ活性が観察されたのに対し、ECTA では 10 細胞であってもすべての細胞でテロメラーゼ活性を観察することができ、ECTA の方がおよそ 10 倍高感度であることがわかった。

- ④ TERT の mRNA 発現量と電気化学的手法により算出されたテロメラーゼ活性の比較。

培養細胞である SAS, Ca9-22, HSC-2, HSC-3 について、テロメラーゼの触媒活性因子である hTERT 遺伝子の mRNA の発現解析を行ったところ、各細胞 10 細胞を作用させたときの ECTA における電流増加率と mRNA の発現量について正の相関を確認することができた。これより電気化学応答はテロメラーゼの発現量を反映していることが明らかとなった。

(2) メチル化 DNA の検出

- ① プローブ DNA の配列設計

プローブ DNA として、テロメラーゼの触媒活性因子 hTERT 遺伝子のプロモーター領域の一部をターゲットとし、これを認識する 24 mer のプローブ DNA を設計した。このプローブ DNA には 5 カ所のメチル化部位がある。そのためメチル化頻度の異なる 10 種類のプローブ DNA を設計した。

- ② 固定化密度の最適化

ターゲット DNA として、プローブと同じ長さのオリゴヌクレオチドと PCR 産物を用いた。これらを異なる固定化密度のプローブ DNA 固定化電極に作用させたところ、PCR 産物の検出には、 1×10^{12} molecules/cm² 程度の固定化密度が適していることがわかった。

- ③ 検出下限の算出

5 つのメチル化部位に関して、すべてメチル化しているプローブを用意し、メチル化もしくは非メチル化 hTERT 遺伝子の一部を増幅した 105 mer の PCR 産物をハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション前後で、電気化学的 2 本鎖 DNA 検出試薬である FND 溶液によって電気化学的

測定を行ったところ、ハイブリダイゼーション後に、電流増加を確認し、電流増加率を算出した。PCR産物の濃度変化を観察したところ(図4)、0.5 ng/ μ L の PCR 産物でメチル化 DNA と非メチル化 DNA を識別することができた。

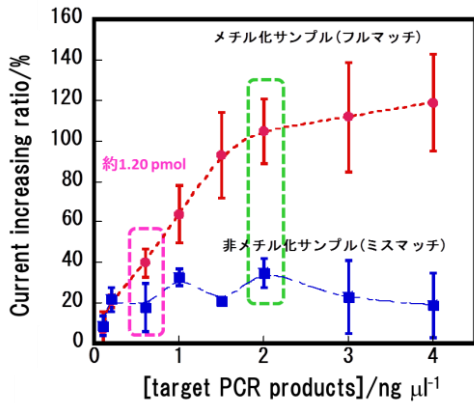


図4. PCR産物の電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイ.

④ ゲノム DNA による検討; メチル化特異的 PCR、亜硫酸処理シーケンス、電気化学測定結果の比較。

亜硫酸処理を行ったゲノム DNA(M, U)について、メチル化特異的 PCR とシーケンスを行った。M と U ともにメチル化特異的 PCR では、DNA が増幅されたことから、ともにメチル化シトシンを有していることがわかった。シーケンスによる配列の検討では、M、U ともにメチル化シトシンと非メチル化シトシンの混合物であるものの、M はメチル化シトシンが多く、U はメチル化シトシンの含量が少ないことが示された。このサンプルの電気化学測定を故なったところ、M は 5 つすべてがメチル化しているプローブに対して最も大きな電流増加率を示し、U は、一つだけメチル化しているプローブに対して最も大きな電流増加率を示したことから、電気化学測定の結果がシーケンスを反映していることを確認することができた。

(3) 臨床サンプルへの適用

① 臨床サンプルの ECTA

舌がん由来の組織切片(tissue)、舌がん患者の口腔内全剥離細胞(EOC)について、ECTA を適用したところ、すべてのサンプルにおいて、電流増加を観察することができた(図5)。健常者における同様なサンプルでは、電流増加は観

察されなかった。癌患者特異的にテロメラーゼ活性を検出することに成功した。

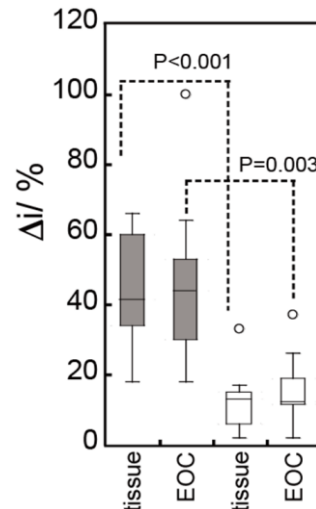


図5. 癌患者(灰色)と健常者(白)の tissue、EOC サンプルの電気化学的テロメラーゼ活性検出結果.

② 臨床サンプルの TRAP 法との比較
舌がん由来の tissue、EOC について、ECTA と TRAP 測定を行い、テロメラーゼ陽性率を評価した。その結果、TRAP 法では癌組織で 50% の陽性率を示したが、EOC ではテロメラーゼ活性を検出することができなかった。しかし、電気化学的手法では、組織、EOC ともに 80% 以上の高い陽性率を示すことが明らかになった(図6)。

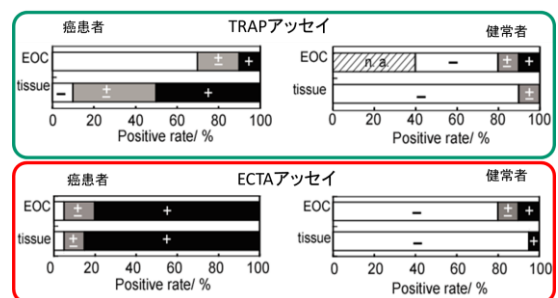


図6. 電気化学的手法(ECTA)とTRAP法によるテロメラーゼ陽性率の比較.

③ 臨床サンプルの電気化学ハイブリダイゼーションアッセイ

ECTA によって電流増加が観察された癌患者由来の tissue サンプルについて、電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイによって、メチル化度合いの特定を試みた。プローブは、表1に示すとおり 5 種類のメチル化度合いの異なるプローブ DNA 固定化電極を用意した。

これに tissue サンプルから抽出した DNA を亜硫酸処理して、PCR 増幅したものを準備した。2.0 ng/ μ L の PCR 産物を作用させたところ、図 7 に示すように M5 固定化プローブで最も大きな電流増加率 80% を示した。しかし、M1、M3、M4 サンプルでも 50% の電流増加率を示したことから、M5 サンプルの含量が最も多いが、M1、M3、M4 サンプルも一部含まれており、サンプル中のメチル化部位が 100% メチル化されていないこと、メチル化頻度の異なる混合物であることが示された。このことから、臨床サンプルであっても異なるメチル化頻度のプローブ DNA をいくつか固定化したマルチチップを利用することで、サンプルのメチル化頻度を明らかにすることができるということがわかった。

表 1. プローブ DNA 配列

	プローブDNA配列(24mer)
M5	3'- TAG TCG CGT TTA CGC GTT TTC GTT -5'-SH
M4	3'- TAG TCG CGT TTA CGC GTT TTT GTT -5'-SH
M3	3'- TAG TCG CGT TTA CGT GTT TTT GTT -5'-SH
M1	3'- TAG TCG TGT TTA TGT GTT TTT GTT -5'-SH
M0	3'- TAG TTG TGT TTA TGT GTT TTT GTT -5'-SH

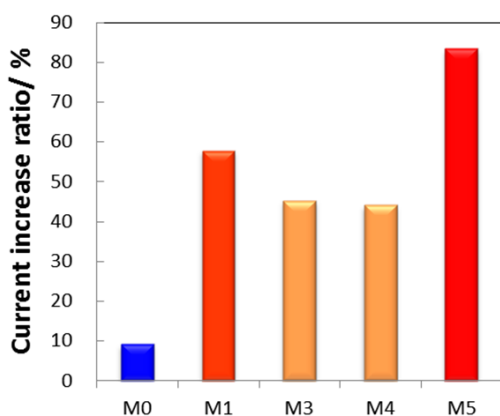


図 7. メチル化頻度の異なるプローブ DNA 固定化電極に対して臨床サンプル(癌, tissue)を処理したときの電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイの結果。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) 佐藤しのぶ (他 7 名、1 番目)
フェロセン化ナフタレンジイミドと電極チップを利用したテロメラーゼ測定：電気化学的舌癌診断、分析化学、査読有り、61 巻、2012、243-250.

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.61.243

(2) Shinobu Sato (他 3 名、1 番目)
Detection of an aberrant methylation of CDH4 gene in PCR product by ferrocenylnaphthalene diimide-based electrochemical hybridization assay、Analytica Chimica Acta、査読有り、715 巻、2012、42-48.

DOI: 10.1016/j.aca.2011.12.010

(3) Shinobu Sato, Shigeori Takenaka
PCR-free telomerase assay using Chronocoulometry coupled with RuHex、Analytical Chemistry、査読有り、84 巻、2012、1772-1775.

DOI: 10.1021/ac202233m

(4) Shinobu Sato (他 2 名、1 番目)
Electrochemical detection of aberrant methylated gene using naphthalene diimide derivative carrying four ferrocene moieties、Journal of Organometallic Chemistry、査読有り、695 巻、2010、1858-1862

DOI: 10.1016/j.jorgchem.2010.04.034

[学会発表] (計 14 件)

(1) 佐藤しのぶ (他 6 名、1 番目)
PCR を必要としない電気化学的テロメラーゼ検出法による口腔癌診断の試み、日本化学会第 92 春季大会、2012 年 3 月 26 日、慶応義塾大学 (東京都)

(2) Shinobu Sato, Shigeori Takenaka
Chronocoulometric telomerase assay、5th International Symposium of Nanomedicine、2012 年 3 月 16 日、名古屋大学 ES ホール (愛知県)

(3) Shinobu Sato (他 3 名、2 番目)
PCR-free electrochemical telomerase assay、Third International Meeting on G-Quadruplex and G-assembly、2011 年 6 月 29 日、the Grand Hotel Vesuvio (イタリア)

(4) Shinobu Sato (他 7 名、1 番目)
Cancer diagnosis based on PCR-free electrochemical telomerase assay、ICAS 2011 (IUPAC 2011 国際分析科学会議)、2011 年 5 月 26 日、国立京都国際会館 (京都)

(5) Shinobu Sato

Tongue cancer diagnosis using FND-based electrochemical telomerase assay、日本化学会第91春年会・アジア国際シンポジウム、2011年3月28日、神奈川大学(神奈川)

(6) 佐藤しのぶ

フェロセンを利用した電気化学的バイオセンシングシステムの構築とその応用、FIBERフォーラム2010、2010年12月25日、甲南大学(兵庫県)

(7) Shinobu Sato (他3名、1番目)

Electrochemical detection of aberrant methylated genes by using ferrocenylnaphthalene diimide、The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)、2010年12月18日、ハワイコンベンションセンター(ハワイ)

(8) Shinobu Sato (他6名、1番目)

Electrochemical detection of telomerase activity using ferrocenylnaphthalene diimide、The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)、2010年12月17日、ハワイコンベンションセンター(ハワイ)

(9) Shinobu Sato (他3名、1番目)

Electrochemical detection of nuclease activity with ferrocenyloligonucleotide-immobilized electrodes、The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)、2010年12月16日、ハワイコンベンションセンター(ハワイ)

(10) Shinobu Sato

FND-based electrochemical telomerase assay aiming at tongue cancer diagnosis、第三回バイオセンシング技術に関する日韓シンポジウム(3rd JKBT)、2010年11月18日、九州工業大学(福岡県)

(11) 佐藤しのぶ (他5名、1番目)

PCR-Freeなテロメラーゼ活性検出の確立とその応用、第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月26日、大阪大学(大阪府)

(12) 佐藤しのぶ (他6名、4番目)

電気化学的テロメラーゼ検出法による舌癌診断、第58回分析化学会、2010年9月15日、東北大学(宮城県)

(13) 佐藤しのぶ (他2名、1番目)

四本鎖DNA検出試薬としての種々のリンカー長を有するフェロセン化ナフタレンジイミド誘導体の性能評価、2010年5月15日、島根大学(島根県)

(14) 佐藤しのぶ (他3名、1番目)

フェロセン化ナフタレンジイミドを利用した電気化学的異常メチル化遺伝子の検出、ナノ学会第8回大会、2010年5月13日、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

[図書] (計1件)

(1) Shinobu Sato、Shigeori Takenaka, M. Wanunu, Y. Tor Eds. CRC Press、Electrochemical approaches to the study of DNA-drug interactions、Methods for Studying Nucleic Acid Drug Interactions、2011、241-257

[その他]

ホームページ等

<http://takenaka.che.kyutech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤しのぶ (SATO SHINOBU)

九州工業大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：80510677