

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 25 年 5 月 20 現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22590537

研究課題名（和文） 生物発光検出による新規テロメラーゼ活性測定法の開発とそのがん診断への応用

研究課題名（英文） Development of novel bioluminescent assay for telomerase and its application to diagnostic of cancer

研究代表者

荒川 秀俊 (ARAKAWA HIDETOSHI)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：70129807

研究成果の概要（和文）：本研究は、ガン診断を目的とした腫瘍マーカーとしての新規テロメラーゼ分析法の開発を主として検討を行った。

研究方法は、細胞由来のテロメラーゼ活性をテロメア修復反応と PCR で生じるピロリン酸に着目し、ルシフェリン-ルシフェラーゼ発光により測定する新規な分析法を検討した。その結果、Positive、Inactive、Negative を明瞭に判別することが可能であった。本法により 1 cell でもテロメラーゼ活性の検出が可能であった。次にヒトがん由来細胞に本法を適応したところ、ヒト繊維肉腫細胞株とヒト膵臓がん細胞株の 2 種類共にテロメラーゼ活性を迅速に、かつ正確に検出することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

Telomeres are specific structures found at the end of chromosomes in eukaryotes. In human chromosomes, telomeres consist of thousands of copies of 6 base repeats (TTAGGG). Although human somatic cells induce cell-death by reduction of telomeric repeats with cell division, cancer cells induce extension of telomeric repeats by telomerase. Telomerase is a ribonucleoprotein that synthesizes and directs the telomeric repeats onto the 3' end of existing telomeres using its RNA component as a template. Therefore, telomerase participates in malignant transformation or immortalization of a cell, and attracts attention as anticancer drug screening and diagnostic tumor marker. Recently, telomeric repeat amplification protocol (TRAP) is used as universal method of telomerase assay. However, these approaches generally employ acrylamide gel electrophoresis after amplifying telomeric repeat by polymerase chain reaction (PCR); as a result, the TRAP method requires considerable time and skill for us. In this study, for rapid and high sensitive detection of telomerase activity, we developed novel telomerase assay using bioluminescent detection method; that is, pyrophosphates produced by telomerase reaction and PCR are converted ATP by pyruvate phosphate dikinase (PPDK), and ATP is detected by firefly luciferin-luciferase reaction.

As a result, the detection limit of pyrophosphate was 1.0×10^{-15} mol/assay. For optimal bioluminescent assay of telomerase activity, we designed the specific primers to the telomeric repeat and selected the efficient *Taq* polymerase for PCR. Sequences of the sense and antisense primers for PCR amplification

出系を用いるため簡便さや迅速さにおいて問題がある。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いる生物発光検出法は、電気泳動などの複雑な操作はなく迅速な検出が可能であり、さらに励起光としての光源を必要としないため安価かつ機器の小型化も可能である点で有用とされている。今回、細胞由来のテロメラーゼ活性を迅速かつ高感度に検出するために、テロメア修復反応と PCR で生じる PPi を PPDK / Luciferase 系による生物発光により検出する新たな分析法を開発した。

3. 研究の方法

テロメラーゼ反応と PCR 条件

TRAP法に準じたTelomerase Substrateとテロメアリピート (TTAGGG) に特異的なプライマーを設定した。

テロメラーゼ反応は、10 × TRAP reaction buffer 5 μL、20 pmol/μL Telomerase Substrate 1 μL、2.5 mmol/L dNTP Mixture 1 μL、sample 2 μL、PCR grade water適量を混合し、30°Cで30分反応させた。Sampleとして、Telomerase positive cell (250 cells/μL)、Telomerase inactive cell (positive cellを85°C10分加熱処理)、Telomerase negative cell (CHAPS Lysis bufferのみ)の溶解液をそれぞれ2 μL用いた。PCRは、上記溶液に20 pmol/μL Reverse primer 1 μL、Taq DNA polymerase 2 Uを加え、94°C30秒、59°C30秒、72°C1分を33 cycles行った。テロメラーゼ反応、PCRのそれぞれ最適条件を検討した。

生物発光検出

本法による生物発光検出は、得られた telomerase / PCR product 10 μLにPPDK 発光試薬100 μLを加え、120秒後から10秒間に生じる発光をLuminescence Reader (Aloka) にて測定した。

4. 研究成果

(1) PCR condition の検討

本測定法の原理は、テロメラーゼ反応と PCR 時に副生成する PPi に PPDK を作用させて ATP に変換後、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により生物発光検出する方法である。今回、テロメリックリピート (GGTTAG) に特異的な primer を設計し、PCR product を 38 bp, 44 bp, 50 bp, 56 bp . . . と GGTTAG が 6 bp ずつ増加するように設計した。この原理による発光検出で最適な条件を得るために、PCR 時の Taq DNA polymerase の種類、アニリング温度、PPDK 試薬との最適な反応時間について検討した。

(2) Taq DNA polymerase の検討

本法における最適な telomerase / PCR product を得るために、5 種類の Taq DNA polymerase を用いて検討を行った。Gene Taq、Titanium Taq DNA polymerase、TaKaRa Ex Taq、Prime STAR HS DNA polymerase、KOD Dash を用いて比較した。その結果、Titanium Taq DNA polymerase が最も良好な増幅が可能であった。

次に、これら 5 種類の Taq DNA polymerase で増幅した telomerase / PCR product を用いて生物発光検出した。Fig. 1 に Taq DNA polymerase の種類による生物発光検出の検討 (S/N 比) の結果を示す。

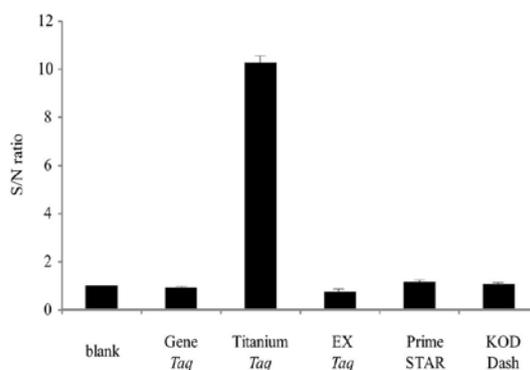


Fig. 1 Effect of the kind of Taq DNA

polymerase on bioluminescent assay (S/N ratio)

(3) アニーリング温度の検討

本法における最適な telomerase / PCR product を得るために、PCR におけるアニーリング温度の検討を行った。その結果、テロメラーゼ反応物の増幅には、アニーリング温度を 59°C にすることとした。

(4) telomerase / PCR product の最適な発光時間の検討

本分析法による PPKD 試薬と telomerase / PCR product の最適な反応時間を検討するため、発光の経時的変化を検討した。その結果、100 秒から 120 秒付近で最大発光強度が得られた。

(5) PCR cycle 数としての検出限界

前項で検討した PCR condition を用いて、PCR cycle 数の検討をした。すなわち、PCR は非常に効率よく遺伝子を増幅する技術であるが、より分析時間を短縮させるために、本分析法における PCR cycle 数の検出限界を検討した。その結果、25 cycles まで検出が可能であった。

(6) テロメラーゼ陽性細胞数としての検出限界

本法によるテロメラーゼ陽性細胞数としての検出限界を検討した。細胞数は、1、5、10、50、100、250、500 cells/assay で行った。その結果、本検出系では 1 cell/assay まで検出が可能であった。また、1 cell から 50 cells までは徐々に発光量は増大し、50 cells 以上で発光はほぼプラトーに達した。このことは、本分析法においては 50 cells 以上のテロメラーゼ陽性細胞数があることにより、最適な発光強度が得られることを意味している。また、

癌細胞の有無を調べるための検査では、1 細胞分のみで癌診断ができる可能性を示している。Fig.2 に、テロメラーゼ陽性細胞数の検出限界の検討結果 (S/N 比) を示す。

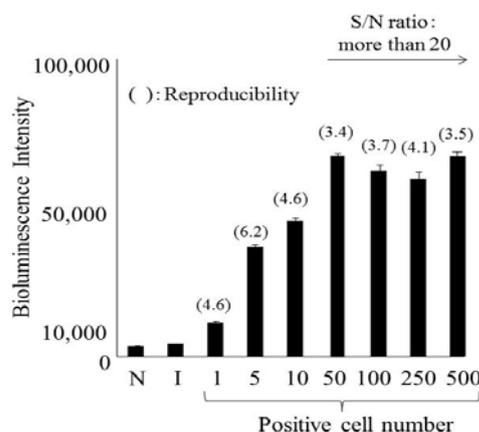


Fig. 2 Detection limit of telomerase positive cell numbers

(7) 再現性

本分析法による再現性 (CV%, n=5) を検討した結果、Negative cell は 5.8 %、Inactive cell は 6.2 %、Positive cell は 4.1 % と良好な結果が得られた。

(8) ヒト癌由来細胞株への応用

本法を実際の臨床現場に適用するために、ヒト癌由来細胞株を用いてテロメラーゼ活性の検出を試みた。細胞株は、ヒト繊維芽細胞株 (HT1080) とヒト膵臓癌細胞株 (MIA capa2) を用いた。はじめにこれら 2 種類の細胞をダルベッコ変法イーグル培地上で培養し、培養した細胞を取り出し、250 cells/ μ L になるよう CHAPS Lysis buffer に細胞を溶解した。これらのサンプルを標準細胞液と同様にテロメラーゼ反応と PCR を行い、PPDK / Luciferase 系による生物発光検出を行った。その結果、HT1080 の S/N 比は 27.8、MIAcapa2 の S/N 比は 18.2 と明瞭に判別でき、ヒト癌由

来細胞株にも本分析法を適用可能であった。また、それぞれの再現性 (CV%, n=5) は、HT1080 は 3.7 %、MIA capa2 は 4.3 %といずれも 5 %以内で良好な結果が得られた。Fig. 3 にヒト癌由来細胞株の検討 (S/N 比) の結果を示す。

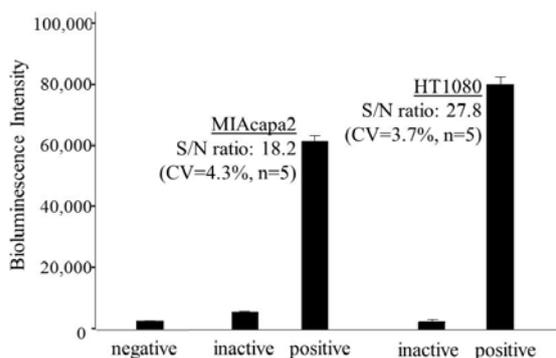


Fig.3 Bioluminescent assay of telomerase / PCR product extracted from human cancer cells

(9) 研究のまとめ

本研究では、PPDK / Luciferase 系の生物発光検出による新規テロメラーゼ活性測定法を開発した。初めに、感度向上や迅速な分析のためにテロメラーゼ活性により伸長したテロメア領域の PCR 条件を検討した。5 種類の Taq DNA polymerase を検討した結果、Titanium Taq DNA polymerase が非常に効率よく増幅が可能であった。Titanium Taq DNA polymerase を用いた PCR cycles の検討では、25cycles まで検出が可能であった。今回、telomerase / PCR product を生物発光検出した結果、テロメラーゼ陽性細胞数として 500 cells/assay の分析で S/N 比 39.5 と高感度に検出ができた。また、分析時間は PPDK 試薬と反応後は約 100 秒~120 秒で測定が終了することができ、再現性 (CV%) も 4.1 ~ 6.2 %と良い結果が得られ、簡易かつ迅速に検出することができた。さらに、2 つのヒト癌由来

細胞株 (HT1080 と MIA capa2) に応用した結果、テロメラーゼ陽性細胞数として 500 cells/assay の分析で、HT1080 は S/N 比 27.8、MIAcapa2 は S/N 比 18.2 と良好に検出することができ、テロメラーゼ活性の測定は臨床検体への応用も可能であることが示唆された。本法の検出時間は、PPDK / Luciferase 系による生物発光検出は数分で検出することができ、アクリルアミドゲル電気泳動を検出に用いた場合と比較して、数十分~数時間の短縮が可能である。よって、本研究で開発したテロメラーゼ活性測定法は、臨床現場での分析を考慮し、安価で簡易かつ高感度な迅速遺伝子分析法であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) T. Minekawa, A. Kambegawa, K. Shindome, H. Ohkuma, K. Abe, H. Maekawa and H. Arakawa
Development of bioluminescent enzyme immunoassay for S-Equol using firefly luciferase and its application to the assessment of Equol-producer status. Chem. Pharm. Bull. **59**, 84-87, 2011,
- (2) Y. Sano, M. Seki, S. Abe, S. Suzuki and H. Arakawa
Bioluminescent assay for nitric oxide utilizing the biological enzyme activity of soluble guanylate cyclase. Analytical Letters, **44**, 2832-2840, 2011.
- (3) T. Minekawa, H. Ohkuma, K. Abe, H. Maekawa and H. Arakawa ,
Practical application of bioluminescence enzyme immunoassay using enhancer for firefly luciferin-luciferase bioluminescence. Luminescence, **26**, 167-171, 2011.
- (4) K. Karasawa, Y. Sano, H. Arakawa,

Development of novel telomerase assay using
PPDK-luciferin-luciferase detection system.
Luminescence, DOI 10.1002/bio.2501. 2013

研究者番号：

〔学会発表〕（計 4 件）

1. Molecular diagnostics summit Europe
2011, 10, 12（ドイツ）
2. 第 25 回バイオメデカル分析科学シンポ
ジウム 2012, 8, 8（東京）
3. 日本臨床化学会（招待講演）
2012, 9, 6（盛岡）
4. 17th International Symposium on
Bioluminescence and Chemiluminescence
2012, 5, 28（カナダ）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 秀俊 (ARAKAWA HIDETOSHI)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：70129807

(2) 研究分担者

(0)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(0)