Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 48, No. 4, pp. 277—278, 1996 (平8, 4月)

速　報

Telomeric Repeat Amplification Protocol Assay 法による子宮癌のテロメラーゼ活性

[1]広島大学医学部産科婦人科学教室（主任：大濱紘三教授）
[2]広島大学医学部総合薬学科（主任：井出利憲教授）
永井　宣隆[1]　村上　順子[1]　田原　栄俊[2]

Telomerase Activity of Uterine Cancer Examined by Telomeric Repeat Amplification Protocol Assay

Nobutaka NAGAI[1], Junko MURAKAMI[1] and Hidetoshi TAHARA[2]
[1]*Department of Obstetrics and Gynecology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima (Director : Prof. Koso Ohama)*
[2]*Department of Cellular and Molecular Biology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima (Director : Prof. Toshinori Ide)*

Key words: Telomerase・Telomeric repeat amplification protocol assay・Uterine cancer

緒　言

酵素テロメラーゼは染色体の末端に存在するテロメア配列5′-TTAGGG-3′を特異的に認識し延長反応を行い，テロメア長を維持する機能を有している[1]．テロメラーゼ活性は生殖系，造血系を除く正常細胞では存在せず，細胞分裂に伴うテロメアの短縮は最終的に細胞を死滅させる．

近年，不死化した細胞株，癌組織由来細胞ではテロメラーゼ活性が検出される事実が報告され，テロメラーゼ活性の発現と癌細胞の不死化の関連性を明らかにすることは発癌過程を解析するうえで大変重要である．我々は最近開発されたPCRを用いた高感度のテロメラーゼアッセイ(telomeric repeat amplification protocol assay : TRAPアッセイ)法により[2]，子宮癌におけるテロメラーゼ活性を検討したので報告する．

研究方法

対象は広島大学医学部附属病院で治療した子宮頸癌8例(扁平上皮癌6例，腺癌2例/臨床進行期Ib期5例，IIb期2例，IIIb期1例)，子宮体癌10例(腺癌8例，腺棘細胞癌2例/臨床進行期Ia期2例，Ib期3例，II期2例，III期3例)で，癌組織ならびに同一症例の対応する正常子宮組織を用いた．方法は−80°Cに凍結保存した組織を細切し，CHAPS (3-[(3cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate) を含む溶解バッファーで溶解し，遠沈後上清中蛋白をCoomassie Brilliant Blueアッセイで測定した．TRAPアッセイ法は1検体あたり細胞抽出液6μg蛋白にPCRバッファー，α-^{32}P-dCTP 4μCi/アッセイ，Tsプライマー(5′-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3′)，Taq DNA polymeraseを加え，テロメラーゼによるプライマー上でのTTAGGG鎖の延長を20°C30分間行った．反応後Cxプライマー (5′-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTTA$_{3}$3′) を加え31サイクルのPCRでテロメラーゼ産物を増幅した．これを電気泳動しオートラジオグラフィーにて40basesのバンドを起点にGGGTTAの6basesのladder(46，52…)を検出した例をテロメラーゼ陽性とした[2]．

研究成績

子宮頸癌8例の全例，子宮体癌の10例中Ia期1

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

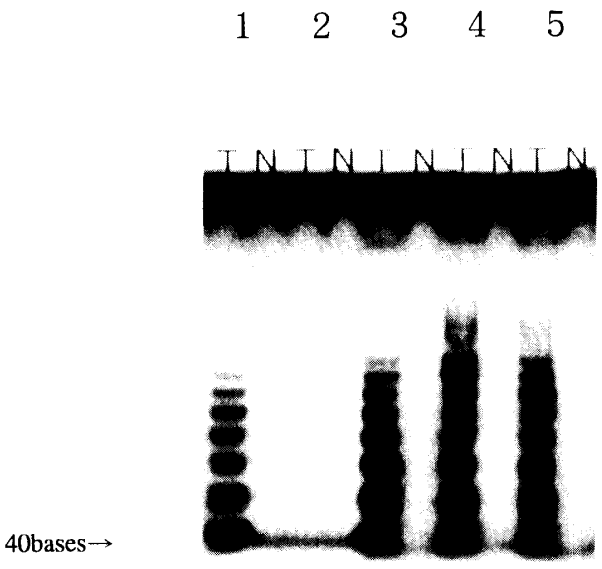

写真1 子宮体癌例のテロメラーゼ活性
40basesのバンドを起点に6 bases (GGGTTA) のladder形成が症例1，3，4，5の腫瘍組織に検出された．症例2は陰性例．

例を除いた9例に6 bases ladderを検出したが(写真1)，正常な子宮組織では認められなかった．またテロメラーゼ活性が検出された子宮癌は発生部位(頚部，体部)，組織型，臨床進行期による差はなかった．

考 察

TRAPアッセイ法という高感度測定法の開発によりテロメラーゼ活性の検出は，①細胞抽出液の調整が簡単なこと，②少量のアイソトープ量で済むこと，③非RIでも可能なこと，④サンプル量が少量で済むこと，⑤操作が短時間であるなどの利点により容易となった[3]．テロメラーゼは鋳型RNAをもったRNA酵素であり，テロメアDNA部分の3′末端をプライマーとして6 basesずつを一つの単位として延長する1種の逆転写酵素である．その結果，TRAPアッセイ法ではテロメラーゼ活性があると6 basesごとのladderが形成される（写真1）．

今回子宮癌において体癌の1例を除き，テロメラーゼ活性が検出され，正常組織では認められなかった．子宮癌からも他臓器癌と同様，高頻度にテロメラーゼ活性が検出されたことで[2]，細胞の不死化を反映するテロメラーゼ活性の測定は癌の診断に有用と思われた．一方，子宮体癌の1例にテロメラーゼ活性が検出されなかったが，この症例ではいまだ癌細胞の不死化が起こっていないのか，保存期間中のテロメラーゼ活性の失活であったのか今後検討が必要である．

以上，TRAPアッセイ法による子宮癌のテロメラーゼ活性の検出は前癌病変においては細胞の不死化を起こす発癌段階の検索にも有用であり，将来的には遺伝子診断への応用が期待される．

文 献

1. *Morin GB.* The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes. TTAGGG repeats. Cell 1989; 59: 521—529
2. *Kim NW, Piatyzek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich ST, Shay IW.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266: 2011—2015
3. **田原栄俊，井出利憲．** テロメラーゼの発現調節と分裂寿命．実験医学 1995; 13: 1505—1510

(No. 7733 平8・1・12受付)

NII-Electronic Library Service