P-23 口腔癌におけるテロメラーゼ活性の検討

○丸岡 由佳*・黒川 英雄*・原田 英光**・豊島 邦昭**・梶山 稔*

*九歯大・口外 2, **九歯大・口解 2

Detection of Telomerase Activity in Human Oral Cancer Cells and Tissues

○Yuka Maruoka*, Hideo Kurokawa*, Hidemitsu Harada**, Kuniaki Toyoshima** and Minoru Kajiyama* (*Oral and Maxillofacial Surgery 2 and **Oral Anatomy 2, Kyushu Dental College)

Key words: Telomerase / Oral cancer / Non-RT-TRAP

はじめに

染色体末端にあるテロメア DNA は、細胞分裂のたびに短縮し、ある限界に達すると細胞は死滅する。しかしある種の細胞は、テロメア DNA を合成する逆転写酵素・テロメラーゼをもつため、テロメア DNA の短縮が生じない。近年、アイソトープと PCR 法を用いてテロメラーゼを高感度に検出する TRAP 法が開発された。その結果、多くのヒト正常体細胞組織では、テロメラーゼ活性は陰性であるが、癌化に伴い、高率に陽性となることが知られるようになった。そこで我々は、アイソトープを用いない TRAP 法として、銀染色法あるいは SYBR Green I[®] 染色法によるテロメラーゼ活性の検出を試みた。

研究材料、方法

研究対象は、培養細胞として口腔癌由来の KB, SCC-25, OT, MB を、また、子宮頸癌由来の HeLa, SiHa, ならびに正常歯肉由来の線維芽細胞を用いた。一方、口腔癌 10 例、白板症 3 例、良性腫瘍 5 例の組織を使用した。なお対照として正常歯肉粘膜、正常唾液腺組織 10 例を用いた。

テロメラーゼ活性の測定法は粗細胞抽出液を用い、培養細胞では $2\mu\text{l}$ 、組織ではタンパク $20\mu\text{g}$ 相当量に調整しアッセイに供した。アッセイはプライマー上でテロメラーゼによりテロメア DNA を延長させ、PCR で増幅を行ったのち、PCR 産物を電気泳動し、銀染色あるいは SYBR Green I[®] 染色による検出を行った。

結果

1. 銀染色法と SYBR Green I[®] 染色法の比較

癌由来の培養細胞では、 10^5 個の細胞において、全てテロメラーゼ活性が認められたが、正常組織由来の線維芽細胞ではテロメラーゼ活性は認められなかった。そこで培養癌細胞数を各々 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 個に調整して、テロメラーゼ活性の検出を行った。検出感度は銀染色の方が SYBR Green 染色よりもわずかに良好であったが、タンパクも同時に染色されるためバックグラウンドが高かった。

2. 組織内におけるテロメラーゼ活性

口腔癌組織では 10 例中 7 例、白板症では 3 例中 2 例にテロメラーゼ活性を認めたが、良性腫瘍、正常組織ではテロメラーゼ活性を認めなかった。

まとめ

1. アイソトープを用いずにテロメラーゼ活性を検出する方法として銀染色法と SYBR Green 染色法を試みたところ、テロメラーゼ活性の測定には、銀染色法による検出が優れていた。

2. 本検出法は、口腔組織におけるテロメラーゼ活性の測定に有用であった。今後は、テロメラーゼ活性の発現や調整に関連すると思われる因子について検索する予定である。

参考文献

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, C. W. E., Weinrich, S. L. and Shay, J. W.: Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. Science. 266: 2011-2015, 1994.