

2016年7月6日 プレスリリースから 国立遺伝学研究所 科学技術振興機構(JST) 京都大学
 国立国際医療研究センター研究所 株式会社ハイペップ研究所

さまざまな組織切片の染色体テロメアの長さを3時間で検出できる方法を開発

染色体テロメア配列を認識するPIPA (N-メチルピロールとN-メチルイミダゾールがアミド結合により連なる化合物)を用いて、ヒトのがん病理標本におけるテロメア短縮を簡便かつ迅速に検出することに成功した。PIPAを用いて1細胞レベルでテロメア長を定量的に測定でき、免疫染色との併用も可能。従来のテロメア標識法に代わる新たな標識法として、基礎研究のみならず老化やがん化などの臨床研究への応用も期待される。染色体の末端はテロメアと呼ばれる繰り返し配列により短縮から保護されています。ある種のがん細胞では、テロメアの長さが短くなっていることから、テロメア長はがん診断の1つの指標になると考えられています。これまでテロメア長の測定にはFISHが利用されてきましたが、解析に1日以上を要する上に、細胞内の構造を壊す恐れのある熱処理も必要とすることが課題でした。研究グループは、これらの問題点を克服する新化合物PIPA (図1)を用いた標識法を開発した。本研究では、マウスやヒト凍結組織切片にこの標識法を応用することに成功しました。PIPAは免疫染色と併用できるため、組織切片において細胞増殖マーカーでがん細胞を特定しながらテロメア長を測定することに成功しました(図3)。本研究の成果により、PIPAは、簡便かつ高精度な1細胞レベルでのテロメア長の測定法として、基礎研究のみならず臨床分野において広く用いられることが期待されます。また本技術は、細胞内の空間情報を保持したままテロメアを標識できるので、超解像顕微鏡技術と組み合わせることにより、細胞が持つテロメア構造の本来の姿を捉えることで、老化やがん化の研究に寄与することが期待されます。

<背景> 染色体の末端はテロメアと呼ばれる繰り返し配列により保護されています。たった1つの受精卵から約60兆個からなる私達の体ができるまでの過程で、テロメア配列は細胞分裂ごとに少しずつ短くなっていきます。ある種のがん細胞では、テロメアの長さが極端に短くなっており、テロメア長はがん診断のバイオマーカー(指標)になると考えられています。これまでFISH法を用いたテロメア長の測定が広く行われており、いくつかの症例でテロメア長の短縮が報告されています。しかしFISH法では、熱や変性剤を用いて二本鎖DNAを解離させる操作が必要です。この操作は細胞内の構造を壊す危険性があり、組織切片において特定の細胞(がん細胞など)をラベルするための免疫染色との併用を困難にしています。また、FISH法を用いたテロメア標識は、1日以上時間がかかるため、臨床試験などサンプルが多い場合、多くの時間と労力が必要となっていました。

<結果> テロメア配列特異的に結合する蛍光標識PIPAのテロメア配列への特異性を上げた改良型のPIPAの開発に成功しました(2014年: HPTH59)。PIPAの特徴は、二本鎖DNAの副溝における塩基配列を認識して特異的に結合することです。そのため、PIPAは熱や変性剤処理を必要とせずに、培養細胞の標本と混ぜるだけでテロメアを標識でき、また抗体とPIPAを混ぜるだけで、簡単に免疫染色を同時に行うことができます(図1、図2)。本研究では、マウスおよびヒト凍結組織切片でのPIPAによるテロメア標識に成功しました。また、子孫に伝わる細胞である生殖細胞の染色体のテロメア長を調べるために、PIPAと始原生殖細胞マーカーを同時に用いてマウス精巣を染色しました。その結果、始原生殖細胞のテロメアと体細胞のテロメアを区別して観察することに成功しました。さらに、腫瘍マーカーと併用して、ヒト食道がん・非がん組織切片のテロメアを染色し、PIPAの蛍光強度を定量した結果、腫瘍マーカー陽性細胞におけるテロメア長の短縮を確認することができました(図3)。

本研究は、京都大学 杉山 弘 教授、板東 俊和 准教授、河本 佑介 大学院生のグループ、国立国際医療研究センター研究所 志村 まり 室長、村田 行則 主任、山田 和彦 医長のグループ、株式会社ハイペップ研究所 軒原 清史 代表、平田 義典 主任研究員、国立遺伝学研究所 平田 たつみ 教授との共同研究です。

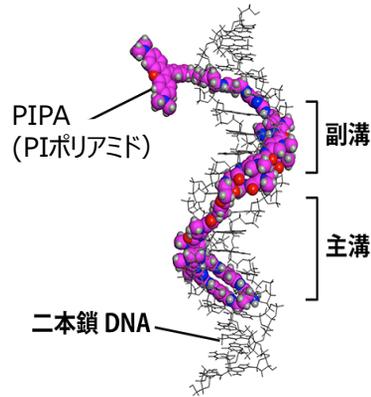


図1 二本鎖DNAに結合するPIPA

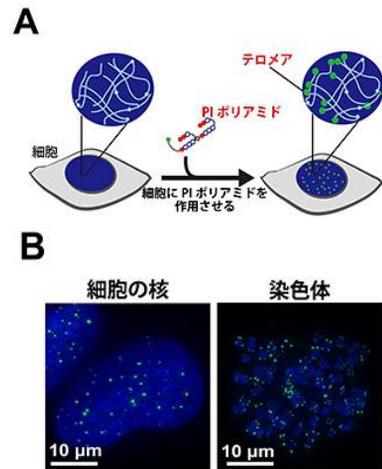


図2 PIPAによるテロメア染色
 (A) テロメア染色の概要図。緑の丸は蛍光色素。
 (B) 間期の細胞(左)および分裂期の染色体スプレッド注8(右)をPIPAで標識した画像。青色はDNA染色を示す。染色体末端の標識されたテロメアが緑色のドット状で示されている。

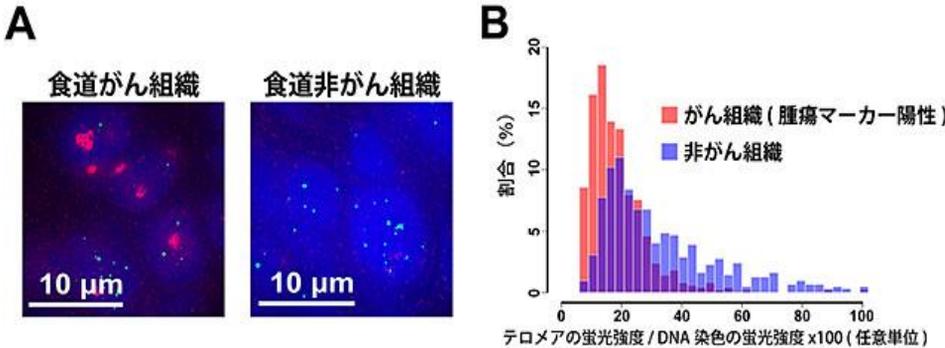


図3 ヒト食道がん・非がん組織切片におけるテロメア標識
 (A) がん・非がん組織切片を染色した画像。緑がテロメア(HPTH59で染色)、赤色が腫瘍マーカー陽性(抗Ki-67免疫染色)、青色がDNA(DAPI染色)を示す。がん組織切片では細胞増殖マーカーが陽性である細胞、がん細胞が観察される。
 (B) がん・非がん組織切片におけるテロメアの蛍光強度を定量した。がん組織切片におけるテロメアの蛍光強度は、非がん組織切片よりも小さく、テロメアが短くなっていることが確認された。がん組織でのテロメアシグナルの分布は赤色、非がん組織でのテロメアシグナルの分布は青色、2つの分布が重なっている領域は紫色で示している。

FISH法: 蛍光in situハイブリダイゼーション法。蛍光色素などで標識した核酸プローブを用いて、標的塩基配列を可視化する方法。

PIPA=ピロール-イミダゾールポリアミド化合物:ピロールとイミダゾールの組み合わせにより、結合するDNAの配列を任意に変えることができる。PIPAは(株)ハイペップ研究所が製造・販売。

免疫染色: 抗体を用いて、その抗体に結合する抗原が発現している細胞・組織を染める手法。

細胞増殖マーカー: 増殖している細胞を見分ける1つの指標。代表的なものとして、Ki-67やトポイソメラーゼが知られている。

超解像顕微鏡技術: 従来の光学顕微鏡では不可能であった、回折限界(200 nm)以下の解像度で構造を捉えることができる顕微鏡。

始原生殖細胞マーカー: 精子や卵子のもととなる細胞だけに存在するタンパク質。免疫染色により、そのタンパク質を検出することで、組織内の生殖細胞を特定できる。

クロマチン: 核内に存在するDNA、ヒストン、および非ヒストンタンパク質からなる複合体。

染色体スプレッド: それぞれの染色体が識別できるようにガラス平面に展開させた染色体標品。

論文 "Telomere Visualization in Tissue Sections using Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes" *Scientific Reports*, doi10.1038/srep29261 (2016年7月6日付)