日消外会誌　29 (11)：2225，1996年

研究速報

肝細胞癌における蛍光標識プライマーを用いたmodified TRAP法によるテロメラーゼ活性の検討

金丸　太一　　太田　恭介　　森田　　康
山本　正博　　斎藤　洋一

はじめに：ヒトの染色体末端部分に5′-TTAGGG-3′の6塩基の繰り返し配列として存在するテロメアDNA[1]は，体細胞分裂の度に短縮し，限界まで短縮すると，細胞は死滅するといわれている．近年，種々の腫瘍細胞にテロメアDNAを伸長させるテロメラーゼ[2]の存在が明らかとなり，注目されている．今回，肝細胞癌（以下，HCCと略記）切除症例を用い，摘出された癌部，非癌部肝組織中のテロメラーゼ活性を蛍光標識プライマーを用いたTRAP Assay法にて解析し，その出現頻度について検討した．

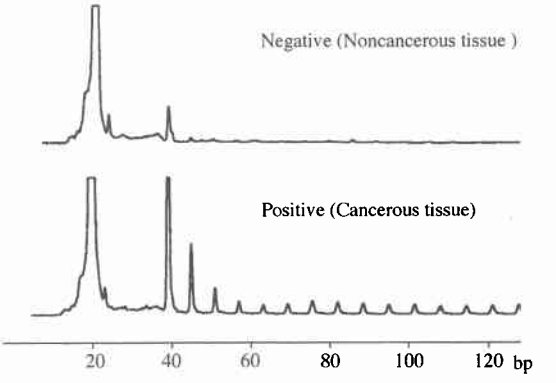
材料と方法：HCC切除症例10例の癌部・非癌部肝組織を各10mgと，陽性コントロールとしてHepG2を用い既報のTRAP (telomeric repeat amplification protocol) Assay法[2]を用いて測定した．PCR反応終了後の溶液に蛍光標識したTSプライマーを加え，さらに5 cycleのPCR反応を行い，ALF red™ DNA sequencer (Pharmacia Biotech) および，Fragment Manager (同社) を用いて解析した．本方法によりテロメラーゼ活性は，46bpから52bp，58bp，64bp…とテロメラーゼのDNA伸長単位である6塩基ごとのシグナルピークとして確認される (**Fig. 1**)．なお陽性例についてはサザンブロットにても6塩基ごとのラダーとして確認している．

なお用いた症例の平均年齢は59歳，腫瘍径は平均4.5 cm (1.9〜7.0)，組織型は高分化型2例，中分化型8例であった．非癌部肝組織は組織学的に全例，慢性肝炎あるいは肝硬変であった．

結果：腫瘍径2cm以下の症例2例を含むすべてのHCC切除例の癌部組織からテロメラーゼ活性が確認された．一方，同一患者非癌部組織ではテロメラーゼ活性は全例確認されなかった．

考察：近年，HCCにおいてはp53遺伝子をはじめとする種々の遺伝子異常が確認されているが，これら遺伝子異常は，進行したHCCでは多く認められるものの，早期HCCでの検出率は低く，現在のところ，単一の遺伝子でHCCの診断を行うことは困難である．テロメラーゼ活性は種々の癌細胞にその活性が確認されており，HCCについてTaharaら[3]はRIを用いたTRAP法を用い，84.8%に活性を認めたと報告している．今回の検討でテロメラーゼ活性は細小肝癌2例を含む癌部全例に確認され，非癌部肝組織においては全例その活性は確認されなかった．本法は，蛍光標識したプライマーの使用により，特別な施設を必要とせず，その診断率も高く，HCC診断を行ううえで新しい手法として有用であると推察された．

Fig. 1 Fluorescence intensity curve of modified TRAP assay. All samples exhibited two signal peaks at 18bp (TS primer) and 40bp (primer-dimer formation between TS and CX primers). In positive cases, several additional peaks appeared with increments of 6bp over 40bp.



Key word: telomerase activity in hepatocellular carcinoma

文献：1) Blackburn EH: Structure and function of telomeres. Nature **350**: 569—573, 1991　2) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science **266**: 2011—2015, 1994　3) Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M et al: Telomerase activity in human liver tissues. Cancer Res **55**: 2734—2736, 1995

Telomerase Activity in Hepatocellular Carcinoma with the use of Modified TRAP Assay

Taichi Kanamaru, Kyosuke Ohta, Yasushi Morita, Masahiro Yamamoto and Yoichi Saitoh
First Department of Surgery, Kobe University School of Medicine

＜1996年9月11日受理＞別刷請求先：金丸　太一　〒650　神戸市中央区楠町7－5－2　神戸大学医学部第1外科