

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

■ 研究成果のポイント

- 染色体テロメア配列を認識するピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドを用いて、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。
- PI ポリアミドを用いると 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。

■ 概要

国立遺伝学研究所の前島一博教授、佐々木飛鳥大学院生らのグループは、細胞老化・がん化に重要な役割を担うテロメア配列を組織切片の細胞において簡便かつ迅速に標識する方法を開発しました。

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一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⁽¹⁾法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「ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミド化合物⁽²⁾」(図 1)を用いた標識法を開発してきました。

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。PI ポリアミドは免疫染色⁽³⁾と併用できるため、組織切片において細胞増殖マーカー⁽⁴⁾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、PI ポリアミド化合物は、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⁽⁵⁾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。

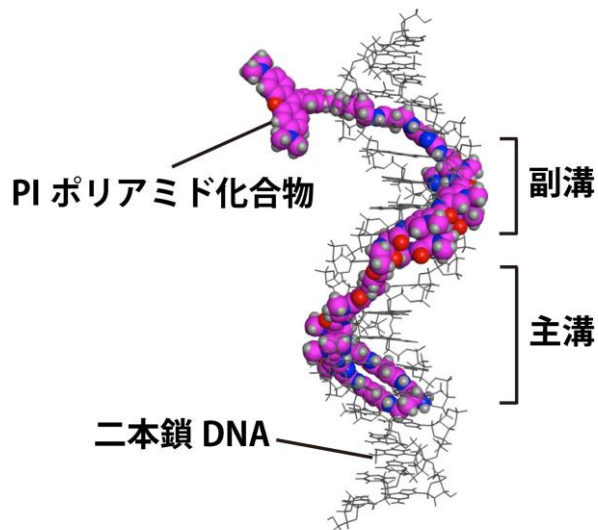


図1. 二本鎖 DNA に結合する PI ポリアミド

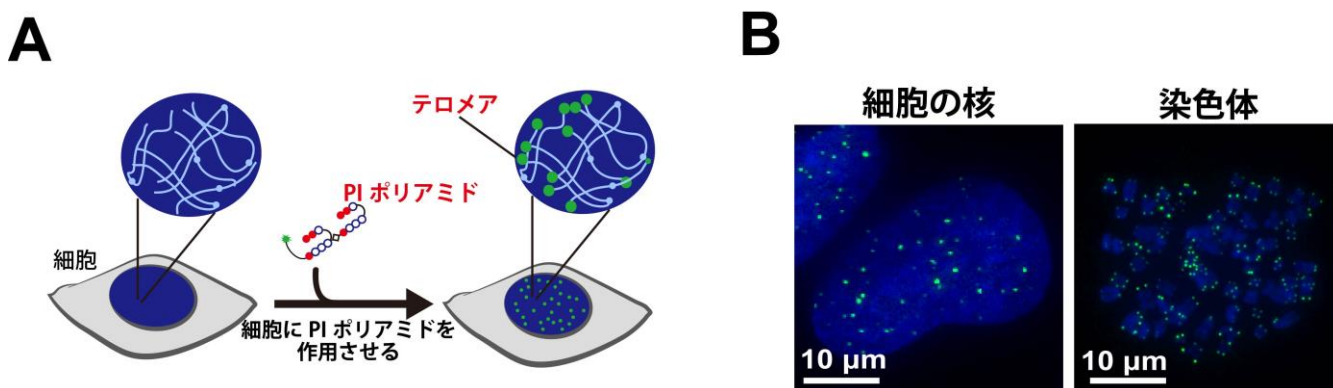


図 2. PI ポリアミドによるテロメア染色。(A) テロメア染色の概要図。緑の丸は蛍光色素。(B) 間期の細胞(左)および分裂期の染色体スプレッド⁽⁶⁾(右)を PI ポリアミドで標識した画像。青色は DNA 染色を示す。染色体末端の標識されたテロメアが緑色のドット状で示されている。

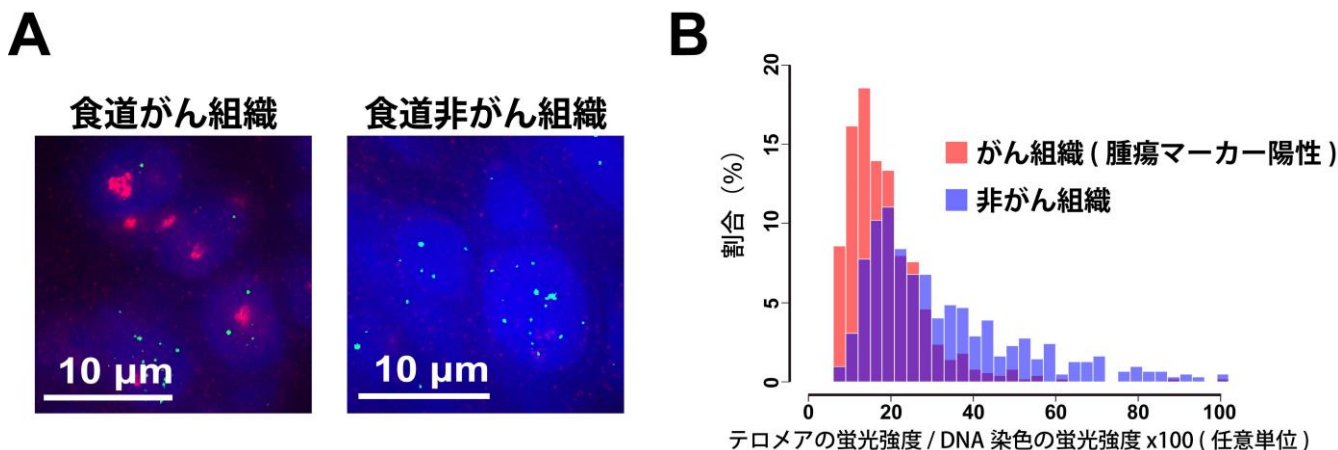


図 3. ヒト食道がん・非がん組織切片におけるテロメア標識。(A) がん・非がん組織切片を染色した画像。緑がテロメア(PI ポリアミドで染色)、赤色が腫瘍マーカー陽性(抗 Ki-67 免疫染色)、青色が DNA(DAPI 染色)を示す。がん組織切片では細胞増殖マーカーが陽性である細胞、がん細胞が観察される。(B) がん・非がん組織切片におけるテロメアの蛍光強度を定量した。がん組織切片におけるテロメアの蛍光強度は、非がん組織切片よりも小さく、テロメアが短くなっていることが確認された。がん組織でのテロメアシグナルの分布は赤色、非がん組織でのテロメアシグナルの分布は青色、2つの分布が重なっている領域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

■ 成果掲載誌

- 本研究成果は、平成 28 年 7 月 6 日(英国時間 10 時)に英国オンラインジャーナル Scientific Reports に掲載されます。(www.nature.com/articles/srep29261)
- 論文タイトル: Telomere Visualization in Tissue Sections using Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes (ピロール・イミダゾールポリアミド化合物を用いた組織切片におけるテロメア配列の可視化)
- 著者: Asuka Sasaki, Satoru Ide, Yusuke Kawamoto, Toshikazu Bando, Yukinori Murata, Mari Shimura, Kazuhiko Yamada, Akiyoshi Hirata, Kiyoshi Nokihara, Tatsumi Hirata, Hiroshi Sugiyama, Kazuhiro Maeshima (佐々木飛鳥、井手聖、河本佑介、板東俊和、村田行則、志村まり、山田和彦、平田晃義、軒原清史、平田たつみ、杉山弘、前島一博)

■ 研究の詳細

<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。たった一つの受精卵から約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した。また、FISH 法を用いたテロメア標識は、1日以上時間が掛かるため、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>

本グループは、テロメア配列特異的に結合する蛍光標識 PI ポリアミドを 2001 年に開発しました。2013 年には大量合成法の開発に成功し、2014 年にはテロメア配列への特異性を上げた改良型の PI ポリアミドの開発にも成功しました。PI ポリアミドの特徴は、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、PI ポリアミドは熱や変性剤処理を必要とせず、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 PI ポリアミドを混ぜるだけで、簡単に免疫染色を同時に行うことができます(図 1、2)。

本研究では、マウスおよびヒト凍結組織切片での改良型の PI ポリアミド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、PI ポリアミドと始原生殖細胞マーカー⁽⁷⁾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、PI ポリアミド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)。

<今後の期待>

PI ポリアミドは、熱や変性剤によるダメージを伴わずに、簡便かつ感度良くテロメアを標識することができるため、FISH 法に代わる新たなテロメア標識法として臨床研究に広く用いられることが期待されます。

また近年、超解像顕微鏡技術を用いたクロマチン⁽⁸⁾構造の研究が盛んに行われています。超解像顕微鏡技術と本テロメア標識法を組み合わせることによって、核内でテロメアクロマチンがどのような形態をとっているのか、本来の細胞内空間情報を保持した状態で観察できると考えられます。今後は、テロメア付近のクロマチン構造の変化を詳細に捉えることで、老化やがん化におけるテロメアの役割が明らかになると期待されます。

■ 用語解説

(1) 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。

(2) ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミド化合物

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。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。本ポリアミド化合物は(株)ハイペップ研究所が製造・販売。

(3) 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。

(4) 細胞増殖マーカー

増殖している細胞を見分ける一つの指標。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。

(5) 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。超解像顕微鏡には、STORM、PALM、STED などの種類が存在する。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 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。

■ 研究体制と支援

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、平田晃義主任研究員、国立遺伝学研究所 平田たつみ教授との共同研究です。本研究の遂行にあたり、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」(研究総括: 東京大学大学院 菅野純夫教授) (研究課題名「超解像 3 次元ライブイメージングによるゲノム DNA の構造、エピゲノム状態、転写因子動態の経時的計測と操作」、研究代表者: 岡田 康志) および遺伝研共同利用研究費 (2015-B) の支援を受けました。