



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, 1/48, C12N 15/11, C07H 21/04	A1	(11) 国際公開番号 WO97/28281 (43) 国際公開日 1997年8月7日(07.08.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00245 (22) 国際出願日 1997年1月31日(31.01.97) (30) 優先権データ 特願平8/17830 1996年2月2日(02.02.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 土屋政幸(TSUCHIYA, Masayuki)[JP/JP] サボイスキー エリカ(SAVOYSKY, Ericka)[FR/JP] 赤松健一(AKAMATSU, Ken-ichi)[JP/JP] 〒412 静岡県御殿場市駒門一丁目135番 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR ASSAYING TELOMERASE ACTIVITY (54)発明の名称 テロメラーゼ活性の定量方法 (57) Abstract A method for assaying telomerase activity which comprises amplifying an oligonucleotide sequence synthesized by a DNA synthesis reaction using a telomerase by effecting a polymerase chain reaction in the presence of a radioisotope with the use of a primer modified with one of two substances capable of binding to each other, binding the reaction product thus obtained to fine particles coated with another of the above-mentioned two substances, and measuring the scintillation generated from the fine particles due to the binding.		

(57) 要約

テロメラーゼによるDNA合成反応によって合成されたオリゴヌクレオチド配列を、相互に結合することができる2種類の物質のいずれか一方で修飾したプライマーを用いて放射性同位元素の存在下でポリメラーゼ連鎖反応を行って増幅し、得られる反応産物を予め前記相互に結合することができる2種類の物質の他方で被覆された微小粒子と結合させ、該結合によって微小粒子から発生したシンチレーションを測定することにより、テロメラーゼ活性を定量することを特徴とするテロメラーゼ活性の定量方法。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア共和国
BB	バルバドス	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BE	ベルギー	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IE	アイアランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KR	韓国	NE	ニジェール	US	米国
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	LI	リヒテンシュタイン	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	LK	スリランカ	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ			PL	ポーランド		
DK	デンマーク			PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

テロメラーゼ活性の定量方法

技術分野

本発明は、テロメラーゼ活性の定量方法に関する。

背景技術

テロメラーゼは、テロメア末端（直鎖状染色体の末端部分）の伸長を触媒する酵素であることが知られており、数多くの研究がなされている(Greider C.W. and Blackburn E.H., (1987) Cell, 51, 887-898; Morin G.B. (1989) Cell, 59, 521-529)。

テロメラーゼの活性は、造血幹細胞など一部の細胞を除き、正常細胞では検出されない。一方、ほとんどのがん細胞で強いテロメラーゼ活性が検出できることから、がん細胞の無限増殖の維持に関わっていると考えられる。従って、テロメラーゼ活性の検出、定量は、がんの診断に重要であり、さらにその阻害剤は、正常細胞に対する副作用の少ない抗癌剤として期待することができる(Counter C.M. et al., (1989) EMBO J., 11, 1921-1929; Counter C.M. et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2900-2904; Chadeneau C. et al., (1995) Cancer Res., 55, 2533-2536; Hiyama E. et al., (1995) Nature Med., 1, 249-255, Shay J.W. et al., (1995) Mol. Cell. Biol., 15, 425-432)。

テロメラーゼを検出するためになされた最近の研究としては、繊毛虫であるテトラヒメナ (Tetrahymena)を用いたものが挙げられる (Greider and Blackburn, 1985; 1987; 1989)。この研究は、単一のプライマー伸長アッセイ系によりテロメラーゼを検出するというものである。かかるアッセイに唯一必要とされる基質は、一本鎖のテロメアのオリゴヌクレオチド配列 (TTGGGG)₃、dGTP、dTTP、及び³²Pで標識したdGTPである。テトラヒメナのテロメア配列であるTTGGGGの繰り返しは、室温で短期間インキュベーションする間にオリゴヌクレオチドプライマーの3' 端に付加される。次に、反応産物は電気泳動及びオートラジオグラフィーにより検出される。このアッセイにより、キネティクス、プライマー特異性 (Ro

mero and Blackburn, 1991; Lee and Blackburn, 1993, Collins and Greider, 1993; Autexier and Greider, 1994) に関するテトラヒメナテロメラーゼの研究及び他の織毛虫由来のテロメラーゼの研究が可能となり、テロメラーゼRNA のクローニングなどが可能となった。

一方、ヒトのテロメアは92個と少なく、そのテロメラーゼ活性は検出不能と考えられていた。しかし、ヒト子宮頸部癌由来の細胞株HeLa細胞抽出物を用いてテロメラーゼアッセイを行った結果、テロメラーゼ活性が見出され (Morin, 1989)、多数のTTAGGG反復配列をテロメアの3'-末端上に添加することが明らかにされ、テロメラーゼは全ての真核細胞中に保存された酵素であり、ヒト腫瘍細胞中で顕著に活性化されていることが示唆された (Counter et al., 1992; 1994)。

しかしながら、従来のアッセイ系には感度、検出に要する時間、定量性、そして大量のサンプル処理に問題がある (Counter et al., 1994)。

最近、感度、検出時間の問題についてはTRAP (telomeric repeat amplification protocol) と呼ばれるポリメラーゼ連鎖反応に基づく手法により改善された (Kim N.W. et al., (1994) Science, 206, 2011-2015; Piatyszek M.A. et al., (1995) Meth. Cell Sci., 17, 1-15)。

この手法は、テロメラーゼ反応及びポリメラーゼ連鎖反応を行った後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びオートラジオグラフィーを行って反応産物を検出するというものである。テロメラーゼ活性の定量化は、出現したバンドそれぞれの強度をデンストメーター等で測定し、対照として使用された、例えばHeLa細胞抽出物の既知量と比較することにより行われる。

この方法により感度が改良され、100細胞程の少ない細胞数でもテロメラーゼ活性の検出ができる。すなわち、従来のアッセイ法と比較して 10^4 倍もテロメラーゼ活性の検出感度を増加させることができ、従来の技術と比較して飛躍的に感度が向上した。

しかし、このTRAP法でさえ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動やHPLC等による ^{32}P -標識反応産物や蛍光標識反応産物の分析を依然として必要としており、測定できるサンプル数に制限があり、 ^{32}P の場合、その取扱い (例えばゲル又は大量の廃液処理) に関する問題点もある。さらに、ゲル作成、電気泳動等分離

(分析)のための時間及び露出(検出)時間(通常は2～48時間)と一連の操作に長時間を要し、その後デンストメーター等により、検出されたバンドの強度を定量しなければならず、結果が遅延するなどの問題点があった。

これらの問題は、特にリアルタイムの分析が求められる癌の進行、予後の診断においては極めて不都合なものであり、大量のサンプル分析においても不都合となる。

発明の開示

本発明は、迅速かつ高感度にテロメラーゼ活性を検出、定量できる方法を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、テロメラーゼによるDNA合成反応を、Amersham社によって開発された(Bothworth N. and Towers P. (1989)Nature, 341, 167-168)シンチレーション近接アッセイ技術(scintillation proximity assay technology; SPA)と組み合わせたシステムを構築することにより、迅速かつ高感度にテロメラーゼ活性を検出、定量し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、テロメラーゼによるDNA合成反応によって合成されたオリゴヌクレオチド配列を、相互に結合することができる2種類の物質のいずれか一方で修飾したプライマーを用いて放射性同位元素の存在下でポリメラーゼ連鎖反応を行って増幅し、得られる配列を予め前記相互に結合することができる2種類の物質の他方で被覆された微小粒子と結合させ、該結合によって微小粒子から発生したシンチレーションを測定することにより、テロメラーゼ活性を定量することを特徴とするテロメラーゼ活性の定量方法である。

さらに、本発明は、相互に結合することができる2種類の物質のいずれか一方で修飾したプライマーを用いて放射性同位元素の存在下でテロメラーゼによるDNA合成反応を行い、得られる反応産物を予め前記相互に結合することができる2種類の物質の他方で被覆された微小粒子と結合させ、該結合によって微小粒子から発生したシンチレーションを測定することにより、テロメラーゼ活性を定量することを特徴とするテロメラーゼ活性の定量方法である。

ここで、相互に結合することができる２種類の物質としては、ビオチン及びアビジンが挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、細胞抽出物中のテロメラーゼ活性を検出し、その定量を行う方法である。本発明には、テロメラーゼによるDNA合成反応によって合成されたオリゴヌクレオチド配列（テロメア反復配列）を、相互に結合することができる２種類の物質のいずれか一方で修飾したプライマーを用いて放射性同位元素の存在下で増幅する方法が含まれる。但し、テロメア反復配列を増幅することなく反応させる方法も本発明に含まれる。次に、得られる反応産物を予め前記相互に結合することができる２種類の物質の他方で被覆された微小粒子と結合させ、該結合によって微小粒子から発生したシンチレーションを測定することにより、テロメラーゼ活性を定量する。

（１）細胞抽出物によるテロメア反復配列の増幅

テロメア反復配列を増幅するには、例えばポリメラーゼ連鎖反応法を用いることができる。ポリメラーゼ連鎖反応により高感度の検出結果が得られる。

ポリメラーゼ連鎖反応は、オリゴヌクレオチドプライマーの５'末端に相互に結合することができる２種類の物質のいずれか一方で修飾したプライマーを用いて放射性同位元素、例えば ^3H 又は ^{125}I の存在下で行う。

「相互に結合することができる２種類の物質」とは、例えば、酵素と基質、ビオチンとアビジン、抗原と抗体、レクチンとその受容体、ホルモンとその受容体、神経伝達物質とその受容体などが挙げられる。

プライマーは、増幅させるテロメア配列に応じて設計することができる。例えば、配列番号１記載のプライマー（TSプライマー）又は配列番号２に記載のプライマー（CXプライマー）が挙げられる。なお、プライマーの５'末端をリガンドと結合させる（例えばビオチン化する場合）には公知方法を用いることができる。また、この手法は通常のアッセイ緩衝液中で行うことができる。

また、テロメラーゼによるDNA合成反応の際、例えばビオチン化標識プライマーを用いることで、直接に新たに合成されたオリゴヌクレオチド配列をSPA技術により検出することが可能である。

(2) 微小粒子の調製

微小粒子としては、例えばアマシャム社によって供給される逆転写酵素活性検出キット（商品番号NK9020）中に添付されるSPAビーズを用いることができる。

(3) 伸長オリゴヌクレオチド配列と微小粒子との結合反応及び検出

次に、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅された上記伸長オリゴヌクレオチド配列を、上記予め前記相互に結合することができる2種類の物質の他方で被覆された微小粒子と結合させる。プライマーがビオチン化されている場合は、当該2種類の物質の他方の物質であるストレプトアビジンを被覆した微小粒子を用いることができる。増幅オリゴヌクレオチドは放射性同位元素（ ^3H 又は ^{125}I 等）で標識されているので、増幅オリゴヌクレオチドが微小粒子と結合した結果、 ^3H 又は ^{125}I から放出される低エネルギーの β 線により微小粒子が刺激され、微小粒子から光が発せられる（シンチレーション）。そして、該シンチレーションをシグナルとして測定することにより目的オリゴヌクレオチドの存在を検出することができる。

検出されるシグナルの強度は、当該微小粒子に結合した反応生成物の量、すなわちテロメラーゼの活性に比例する。従って、シグナルが高い場合はテロメラーゼの活性が高いことを意味する。

テロメラーゼ活性の定量は、標準サンプルをコントロールとして用い、上記に従って蛍光強度で測定される。

(4) 本発明の方法では、上記増幅法を用いなくてもテロメラーゼ活性を検出することができる。例えば、テロメラーゼによるDNA合成反応によって合成されたオリゴヌクレオチド配列を、相互に結合することができる2種類の物質のいずれか一方で修飾したプライマーを用いて放射性同位元素の存在下で反応させる。次に、得られる反応産物を、予め前記相互に結合することができる2種類の物質の他方で被覆された微小粒子と結合させ、該結合によって微小粒子から発生したシンチレーションを測定することにより、テロメラーゼ活性を定量する。

「相互に結合することができる2種類の物質」の意味、微小粒子の調製法、並びに伸長オリゴヌクレオチド配列と微小粒子との結合反応及び検出法については

前記と同様である。

本発明の方法により、従来の検出方法と比較して明らかに高い感度を得られる。しかも、低エネルギーの β -放出が要求されるのみであるため特殊な廃棄処理設備を必要とせず、反応産物と、取り込まれなかった放射性同位元素とを分離させる必要もない。その結果、検出を迅速に行うことができるという主要な改良点の一つが提供される。すなわち、本発明の検出方法により、1時間以内に結果を得ることができるため、全体として1日以内で全ての測定プロセスを完了することができる。

以上により、本発明により、テロメラーゼ活性を再現性よく定量することが容易にでき、大量のサンプルを容易に取り扱うことができる。

例えば、臨床的に得られた組織のテロメラーゼ活性を定量することは、癌の診断及び進行や治療の予後をモニターしていくためにきわめて有用である(Hiyama et al., 1995)。

図面の簡単な説明

図1は、プライマーの濃度に対する本発明の検出結果を示す図である。

図2は、細胞数に対する本発明の検出結果を示す図である。

図3は、各種細胞に対する本発明の検出結果を示す図である。

図4は、ポリメラーゼ連鎖反応のサイクル数に対する本発明の検出結果を示す図である。

図5は、細胞数に対する本発明の検出結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されない。

〔実施例1〕

I. 材料及び方法

(1) 細胞抽出物の調製

細胞抽出物は、公知の方法(Kim N.W. et al., (1994)Science, 206, 2011-2015)に

いくつかの改良を加えて調製した。すなわち、ヒト赤白血病細胞株 H E L を培養し、対数増殖期にある細胞を2000rpmで5分間遠心分離し、細胞を回収した。氷冷のPBSで2回洗浄し、氷冷のRNaseを含まない洗浄用緩衝液(10mM Hepes pH7.5, 1 mM MgCl₂、10mM KCl及び1 mM DTT) で1回洗浄した。細胞のペレットを、RNase を含まない溶解緩衝液(10mM Tris-HCl pH7.5、1 mM MgCl₂、1 mM EGTA 、0.1mM PMSF、5 mM β -メルカプトエタノール、0.5 % CHAPS (Cholamidopropyl-dimethyl-ammonio-1-propanesulfonate) 及び10%グリセロール) 中に 5×10^5 細胞/ μ lで再懸濁した。軽く攪拌し、氷上で30分インキュベートしたのち、15,000rpmで30分遠心分離することにより溶解物中の不純物を取り除いた。上清を小分けし、-80 °Cで貯蔵した。

(2) プライマーの合成

TSプライマー(配列番号1)及びCXプライマー(配列番号2)を、ABI社のDNA合成機を用いて合成した。CX及びTSプライマーをビオチン化したものについては、オリゴヌクレオチドの5'末端にビオチンLCビオチン-ONTMホスホルアミダイト(Clontech)をカップリングさせることにより合成した。ABI OPCカラムを用いてプライマーを精製し(精製は製造業者の使用説明書に基づいて行った)、凍結乾燥し、DEPC(ジエチルピオロカーボネート)で処理した水中に再懸濁させた。

(3) TRAP/SPAによるテロメラーゼ活性の定量的検出

本発明のTRAP-SPAアッセイは、公知の方法(Kim N.W. et al., (1994) Science, 266, 2011-2015; Piatyszek M.A. et al., (1995) Meth. Cell Sci., 17, 1-15))にいくつかの改良を加えて以下のように行った。

所定の量(0、0.01、0.05、0.1 μ g/アッセイ)のビオチン化CXプライマー(Biot-CX)をHot-Start チューブ(GIBCO-BRL)のワックス層下にトラップさせた。

次に、テロメラーゼによるDNA合成反応として2 μ lの細胞抽出物(10^4 細胞)を、20mM Tris-HCl pH8.3、1.5 mM MgCl₂、63mM KCl、0.005% Tween 20、1 mM EGTA、それぞれ50 μ MのdATP及びdCTP、2 μ MのdTTP、50 μ MのdGTP、2 μ Ci [Me-³H]TTP(Amersham, 114Ci/mmol)、0.1 μ g/ μ l BSA、2 U Taq ポリメラーゼ、並びに0.1 μ g又は所定量のTSプライマーを含む50 μ lの最終反応混合物中のワックスバリア上で、室温で30分インキュベートした。

次に、合成されたテロメアオリゴヌクレオチドを増幅するため、混合物を90℃で90秒加熱し、次いで94℃で30秒、50℃で30秒及び72℃で45秒を1サイクルとして、これを31サイクルでポリメラーゼ連鎖反応を行った。

なお、大量のサンプル（具体的には、96ウェルマイクロタイタープレートを使用）の場合は、アッセイはワックスバリアなしで行い、ポリメラーゼ連鎖反応直前にBiot-CXを加え、ミネラルオイルで混合物を覆った。

反応産物（40 μ l）を96ウェルプレート（Wallac）に移し、50 μ lのストレプトアビジン被覆の微小粒子フルオロマイクロスフィア（0.56M EDTA中、1 : 4の溶液）を加え、37℃で10分インキュベートし、ビオチニル化した³H標識反応産物をストレプトアビジンビーズに結合させた。

プレートは、MicroBeta シンチレーションカウンター（Wallac）上でカウントした。

比較として、従来のTRAP（TRAP とポリアクリルアミドゲル電気泳動とを組み合わせた手法；TRAP-PAGE）を以下のように行った。

すなわち、ビオチン化プライマーを非ビオチン化のCXプライマーに置き換え、dGTP濃度を20 μ M に変更し、dTTPを50 μ M に増加し、2 μ Ciの[Me-³²H]TTP（Amersham, 114Ci/mmol）を[α -³²P]dGTP（Amersham, 800Ci/mmol）に置き換えて上記と同様に行った。

ポリメラーゼ連鎖反応終了後、反応産物を0.3 × TBE 中で10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）にかけ、フォスフォロイメジャー（Fuji Imaging Plate）に露出することにより、反応産物（40 μ l）の解析を行った。

（4）テロメラーゼによるDNA合成反応／SPAによるテロメラーゼ活性の定量的検出

まず、テロメア伸長反応としてHEL細胞CHAPS抽出物（10⁴及び10⁵個の細胞に相当する量）、20mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、63mM KCl、0.005 % Tween20、1mM EDTA、それぞれ50 μ MのdATP及びdGTP、1 μ M dTTP、2 μ Ci Me-³H TTP（Amersham、114Ci/mmol）、0.1 μ g BSA、並びに0.1 μ gのビオチン化したプライマー（TTAGGG）₄を含む50 μ lの反応液を室温にて30分間インキュベートした。

次いで、この反応産物40 μ lを96ウェルプレートに移し、50 μ lのストレプトアビジン被覆の微小粒子フルオロマイクロスフィア(0.56M EDTA中、1:4の溶液)と混合して37°Cで10分間インキュベートし、ビオチン化した³H標識反応産物をストレプトアビジンビーズに結合させた。

これを、MicroBetaシンチレーションカウンター(Wallac)でカウントした。

比較として、従来のポリアクリルアミド電気泳動後オートラジオグラフィーにて検出する方法を行った。

上記のテロメラーゼ反応の混合物において、dGTPの濃度を5 μ Mに変更して2 μ Ci(α 32P)dGTP(Amersham、800Ci/mmol)を加え、dTTPの濃度は50 μ Mに増加させた。

7Mの尿素を含む8%ポリアクリルアミドゲルにて反応産物40 μ lを電気泳動し、4日間イメージングプレートに露出した。

II. 結果

(1) プライマー濃度の効果

プライマー濃度の効果は、本発明の方法及び従来の方法ともに同一であった(図1上及び下パネル)。図1下パネルの電気泳動の図において、レーン1~4は、それぞれプライマー濃度0、0.01、0.05、0.1 μ g/アッセイであり、図1上パネルのプライマー濃度と対応する。

従って、本発明の方法は電気泳動後オートラジオグラフィーを行わずにテロメラーゼ活性を検出でき、しかも定量的に測定できることを示している。

(2) 本発明の方法の感受性

本発明のSPA検出の感受性は、HEL CHAPS 抽出物(HEL 細胞のCHAPS 抽出液)を段階的に希釈させて行った従来のTRAPアッセイ(TRAP-PAGE)と比較することにより測定した。従来のTRAP-PAGE アッセイでは、検出限界はアッセイあたり約100細胞であるが(図2、下パネル)、本発明のTRAP-SPAアッセイの場合は、テロメラーゼ活性はわずか10細胞でも明瞭に検出できる(図2、上パネル)。なお、図2下パネルのレーン番号1~7は、図2上パネルの細胞数0、10、10²、10³、10⁴、10⁵細胞/アッセイ並びに10⁴及びRNaseの混合物にそれぞれ対応する

。

また、TRAP-PAGE により予めスクリーニングされた多発性骨髄腫 (MM3)、肝癌 (Hep-3B、Hep-G2、Hu-H7)、及びJurkat細胞等の他の細胞系を用いても同様の結果が得られ、観察された取り込みは、ポリアクリルアミドゲルでのバンドパターンのそれぞれの強度とほぼ完全に一致した (図3)。最も強いシグナルは、本発明及び従来の方法ともに多発性骨髄腫から得られたが、対照として用いた正常細胞であるケラチノサイトでは活性は検出されなかった。なお、図3下パネルのレーン番号1～8は、図3上パネルの各種細胞HEL、MM3、Hep-3B、Hep-G2、Hu-H7、Jurkat、Kerat. 及び細胞不含の対照にそれぞれ対応する。

従って、本発明の方法により、より高感度に、そして定量的にテロメラーゼ活性を検出できる。

ポリメラーゼ連鎖反応によるテロメラーゼ産物の蓄積に対するサイクル数の効果についても、本発明の方法と従来の方法とを比較した。ゲル電気泳動でのバンドのパターン又はSPAによる³Hの顕著な取り込みは、少なくとも増幅の27サイクル後に観察された (図4)。検出されたシグナルの強度は、両ケースともにサイクル数に伴って増加し、二つの方法間で極めて良好な関係が得られた。なお、図4の下パネルのレーン番号1～5は、上パネルのサイクル数27、28、29、30及び31にそれぞれ対応する。

(3) テロメラーゼによるDNA合成反応／SPAによるテロメラーゼ活性の定量的検出

テロメア反復配列を増幅しない場合でも、前記と同様にテロメラーゼ活性を検出・定量することができた (図5)。図5に示すように、細胞数に対するテロメラーゼ活性は、本発明の方法 (上段) 及び従来の方法 (下段) とともに同様であった。

産業上の利用可能性

本発明により、迅速かつ高感度にテロメラーゼ活性を検出、定量できる方法が提供される。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列の特徴

他の情報 : TS Primer

配列 :

AATCCGTCGA GCAGAGTT

配列番号 : 2

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列の特徴

他の情報 : CX Primer

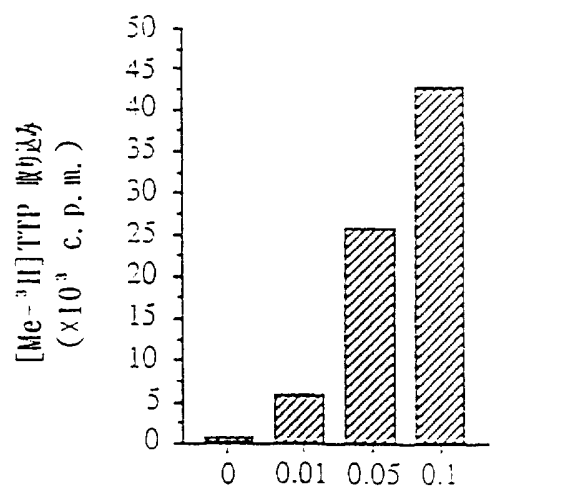
配列 :

CCCTTACCCT TACCCTTACC CTAA

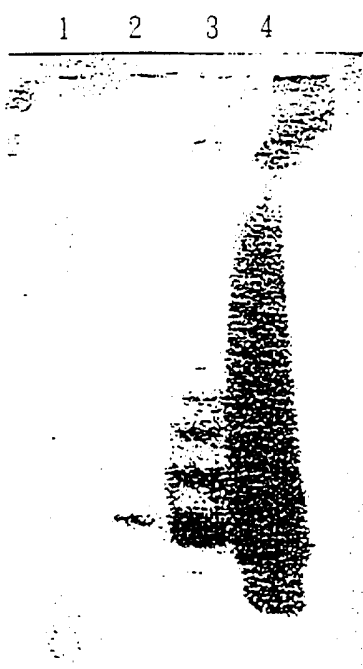
請 求 の 範 囲

1. テロメラーゼによるDNA合成反応によって合成されたオリゴヌクレオチド配列を、相互に結合することができる2種類の物質のいずれか一方で修飾したプライマーを用いて放射性同位元素の存在下でポリメラーゼ連鎖反応を行って増幅し、得られる反応産物を予め前記相互に結合することができる2種類の物質の他方で被覆された微小粒子と結合させ、該結合によって微小粒子から発生したシンチレーションを測定することにより、テロメラーゼ活性を定量することを特徴とするテロメラーゼ活性の定量方法。
2. 相互に結合することができる2種類の物質のいずれか一方で修飾したプライマーを用いて放射性同位元素の存在下でテロメラーゼによるDNA合成反応を行い、得られる反応産物を予め前記相互に結合することができる2種類の物質の他方で被覆された微小粒子と結合させ、該結合によって微小粒子から発生したシンチレーションを測定することにより、テロメラーゼ活性を定量することを特徴とするテロメラーゼ活性の定量方法。
3. 相互に結合することができる2種類の物質がビオチン及びアビジンである請求項1又は2記載のテロメラーゼ活性の定量方法。

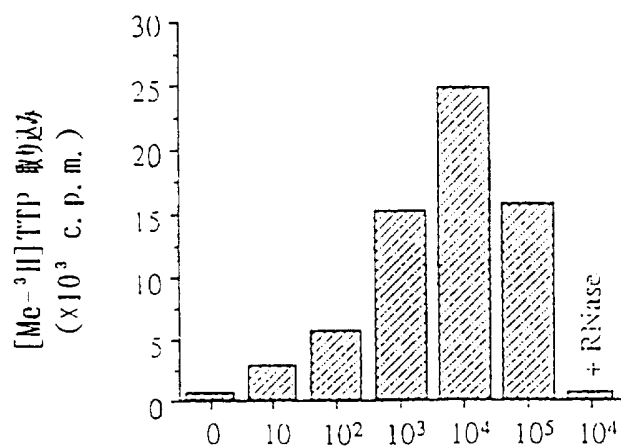
第 1 図



Biot-CX プライマー濃度 (μg/アッセイ)

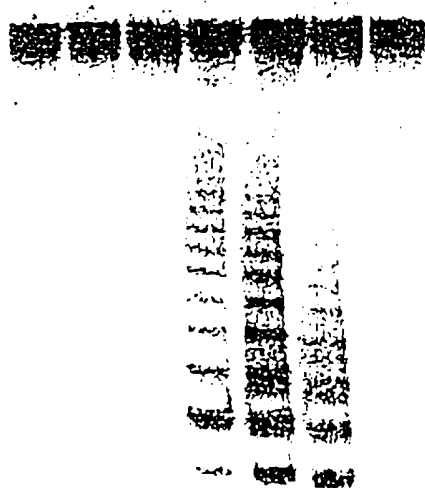


第 2 図

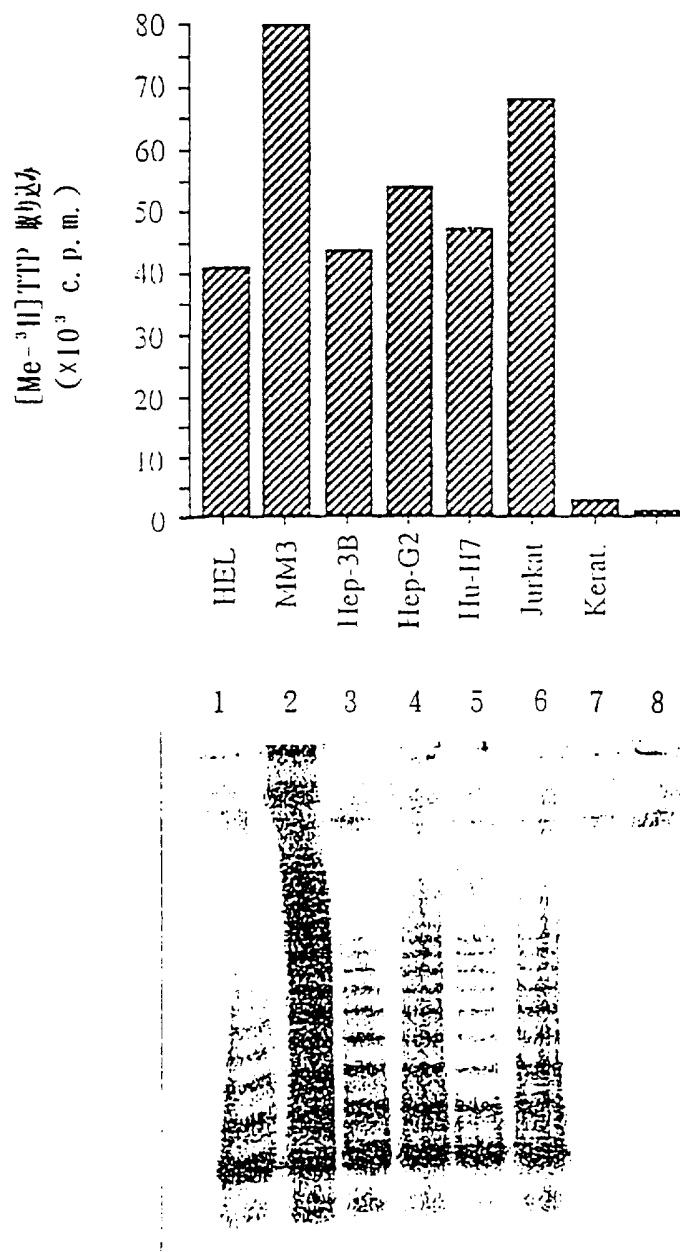


細胞数 / アッセイ

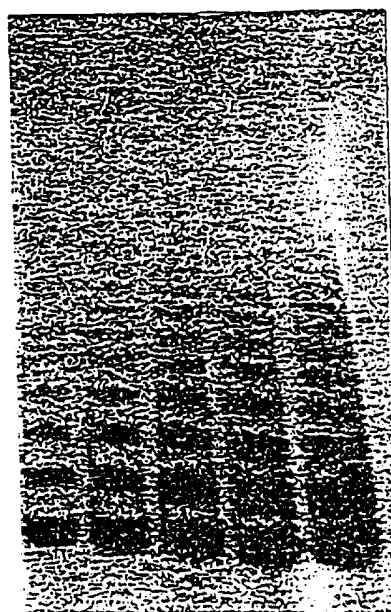
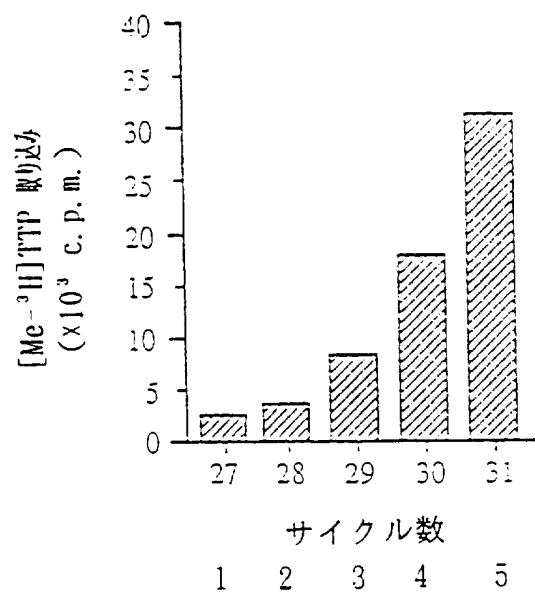
1 2 3 4 5 6 7



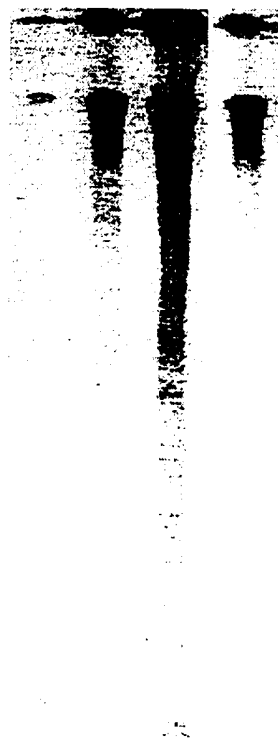
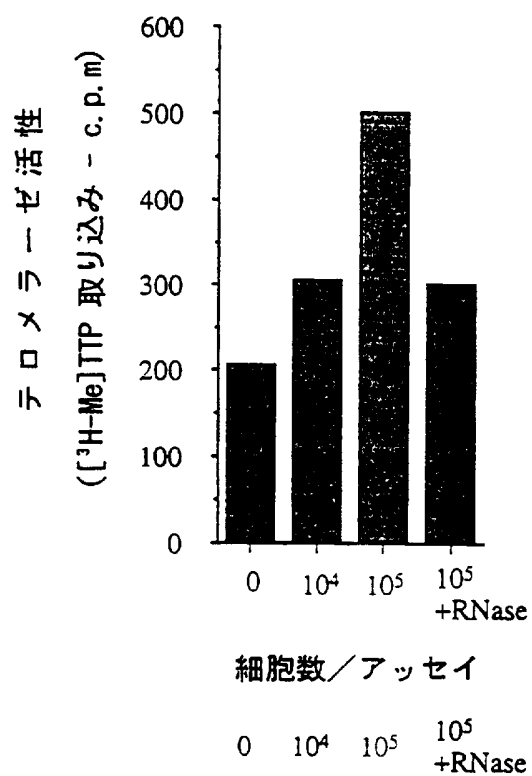
第 3 図



第 4 図



第 5 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/11, C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/11, C07H21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSYS, MEDLINE, CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Nucleic Acids Research, Vol. 24(6) (1996-Mar) Savovskiy E. et al. "Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay (SPA)" p. 1175-1176	1 - 3
Y	Science, Vol. 266(1994-Dec) Kim N. W. et al. "Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer" p. 2011-2015	1 - 3
Y	Analytical Biochemistry, Vol. 228(1995) Schoenfeld A. et al. "Semiquantification of Polymerase Chain Reaction Product Using a Bead Scintillation Proximity Assay and Comparison with the Southern Blot Method" p. 164-167	1 - 3
Y	Journal of Virological Methods, Vol. 47(1994) Rawal B. K. et al. "Quantification of cytomegalovirus DNA in Blood specimens from bone marrow transplants by the polymerase chain	1 - 3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 2, 1997 (02. 04. 97)

Date of mailing of the international search report

April 15, 1997 (15. 04. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00245

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	reaction" p. 189-202 Journal of Virological Methods, Vol. 50 (1994) Hughes D. S. et al. "Quantification of latent Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus in M. brassicae insects using a PCR- scintillation proximity assay" p. 21-28	1 - 3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int Cl ⁶ C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/11, C07H21/04		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int Cl ⁶ C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/11, C07H21/04		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, BIOSYS, MEDLINE, CA		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Nucleic Acids Research, Vol. 24[6] (1996-Mar) Savoyesky E. <i>et al.</i> 「Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay (SPA)」 p. 1175-1176	1-3
Y	Science, Vol. 266 (1994-Dec) Kim N. W. <i>et al.</i> 「Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer」 p. 2011-2015	1-3
Y	Analytical Biochemistry, Vol. 228 (1995) Schoenfeld A. <i>et al.</i> 「Semiquantification of Polymerase Chain Reaction Product Using a Bead Scintillation Proximity Assay and Comparison with the Southern Blot Method」 p. 164-167	1-3
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.04.97	国際調査報告の発送日 15.04.97	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 藤田 節 印	4B 9453
電話番号 03-3581-1101 内線 3449		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Journal of Virological Methods, Vol. 47(1994) Rawal B.K. <i>et al.</i> 「Quantification of cytomegalovirus DNA in Blood specimens from bone narrow transplants by the polymerase chain reaction」 p. 189-202	1 - 3
Y	Journal of Virological Methods, Vol. 50(1994) Hughes D.S. <i>et al.</i> 「Quantification of latent <i>Mamestra brassicae</i> nuclear polyhedrosis virus in <i>M. brassicae</i> insects using a PCR-scintillation proximity assay」 p. 21-28	1 - 3