

報 文

口腔がんのスクリーニングに関連する *hTERT* 遺伝子のメチル化 検出のための電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイ

佐藤しのぶ^{1,2}, 原口 和也³, 早川 真奈³, 富永 和宏³, 竹中 繁織^{*1,2}

テロメラーゼの触媒活性因子である *human telomerase reverse transcriptase* (*hTERT*) 遺伝子のプロモータ領域のメチル化パターンががんの進行と深くかかわっていることが報告されている。したがってこのプロモータ領域のメチル化パターンが検出できれば、がんの早期発見の手法として発展できると期待される。著者らは、*hTERT* 遺伝子のプロモータ領域中の五つの CpG サイトを含む 24 塩基をターゲットとし、10 種類のプローブ DNA を有するマルチ電極チップを作製した。このチップを用いた電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイ (Electrochemical hybridization assay, EHA) によって *hTERT* 遺伝子のメチル化パターンによる口腔がん診断を試みた。ここでは、病院での簡易診断を目指して口腔がん、白板症、健常者から得られた口腔ぬぐい液を用いて、ゲノムを採取し、亜硫酸処理したのち、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (Methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) を行った。得られた MSP 産物を EHA により評価したところ、サンプルのメチル化頻度とがんの進行度に相関が示された。白板症、健常者を含むすべてのサンプルからメチル化頻度の高い DNA プローブに対する電気シグナルの Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を用いて口腔がんの正診断率を算出したところ、91 % であった。

1 緒 言

がんは早期発見によって根治が可能な疾病である。そのため、簡便かつ迅速で信頼性の高いがんの早期診断方法の確立が求められている。

一般に疾病の診断方法を評価は、感度と特異度及び正診断率で行われている。感度は疾患罹患者を正しく「疾病である (検査陽性)」と評価した割合であり、感度が高い手法は疾患罹患者を誤って陰性とするのが少ない、すなわち偽陰性が少ない手法となる。特異度は疾患非罹患者を正しく「疾病でない (検査陰性)」と評価した割合であり、特異度が高い手法は疾患非罹患者を誤って陽性とするのが少ない、すなわち偽陽性が少ない手法となる。正診断率とは、検査において疾病罹患者と疾患非罹患者をそれぞれ正しく陽性、陰性と評価した割合のことであり、正診断率の高い検査手法の確立が求められている。

がんの診断方法としては、臨床現場で一般に血中の癌^{がん}マーカーや細胞診断、組織診断や画像診断であるレントゲ

ン、コンピュータ断層撮影 (CT)、磁気共鳴画像 (MRI) などにより行われている^{1)~5)}。Table 1 にはがんの代表的な検査方法の感度と特異度をまとめた。胃がんや肺がんは X 線や CT、陽電子放射断層撮影 (PET) など画像診断による診断が行われるが、感度、特異度にはばらつきがある。子宮頸がんなどの細胞診では高い信頼性を示すが、細胞診はがん種によっては侵襲性が高い診断方法となる。著者らはこれまでにがんで特異的に発現しているテロメラーゼのがんマーカーとしての可能性を検討してきた⁵⁾⁶⁾。テロメラーゼ活性を DNA チップで電気化学的手法によって検出することによって、高い感度、特異度を示し、非常に有用性の高い検査方法であることを提示した⁵⁾⁶⁾。ここでは、テロメラーゼの触媒活性因子である *human telomerase reverse transcriptase* (*hTERT*) 遺伝子のプロモータ領域のメチル化パターンの電気化学的に検出法について検討し、癌マーカーとして有用性について検討した。

近年、遺伝子の異常メチル化が発がんに関与していることが報告されている⁷⁾。遺伝子のメチル化とは一般に CpG のシトシン (C) の 5 位がメチル化される現象であり、例えばがん抑制遺伝子である *p16* 遺伝子などのプロモータ領域では CpG のシトシンがメチル化されることによって、その発現が制御されている⁸⁾。大腸がんなどでは *p16* 遺伝子⁹⁾ や *O6-methylguanine DNA methyltransferase* (*MGMT*) 遺伝子¹⁰⁾ の CpG サイトが過剰メチル化していることが報告さ

* E-mail: shige@che.kyutech.ac.jp

¹ 九州工業大学大学院工学研究院物質工学研究系: 804-8550 福岡県北九州市戸畑区仙水町 1-1

² 九州工業大学バイオマイクロセンシング技術研究センター: 804-8550 福岡県北九州市戸畑区仙水町 1-1

³ 九州歯科大学歯学部歯学科: 803-8580 福岡県北九州市小倉北区真鶴 2-6-1

Table 1 Sensitivity and specificity of cancer diagnosis methods

	Method	Sensitivity/%	Specificity/%	Ref.
Stomach	X-ray	70–80	90	1
Colon	stool analysis	30–93		1
Colon	CEA (carcinoembryonic antigen)	36	87	2
Colon	PAI-1 (plasminogen activator inhibitor1)	94	84	2
Lung	X-ray	63–88	95–99	1
Lung	PET (positron emission tomogram)	70	84	3
Lung	sputum cytology	25–78	99	1
Uterus	Biopsy	95	99	1
Breast	Mammography	84	91	4
Oral	TRAP assay	14	59	5
Oral	Electrochemical Telomerase assay	93	86	5

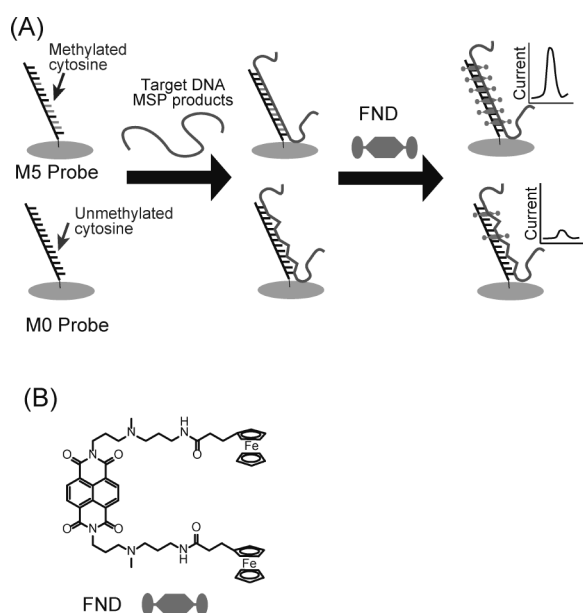


Fig. 1 (A) Principle of electrochemical hybridization assay using ferrocenylnaphthalene diimide (FND) and (B) structure of FND

れている。メチル化シトシンを検出する方法として、一般に bisulfite sequencing 法¹¹⁾、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (Methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 法¹²⁾、Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) 法¹³⁾などが知られている。これらは亜硫酸処理によってシトシンがウラシルに変換される際メチル化によってその変換反応が遅いことを利用している。これまで簡便かつ高精度なメチル化シトシン検出手法が検討されてきている。岡本ら¹⁴⁾は、オスミウム錯体誘導体はメチル化シトシンよりもシトシンと素早く反応することを利用したメチル化遺伝子の検出法を検討している。また、加藤ら¹⁵⁾¹⁶⁾は電子サイクロトロン共鳴 (Electron Cyclotron Resonance, ECR) スパッタ法によって作製されたナノカーボン薄膜電極によって、メチル化シトシンと非メチル化シトシンの酸化電位の違いを利用してメチル化シトシンの電気化学的検出に成功している。Bartošik ら¹⁷⁾は懸垂水銀滴下電極 (hangingmercurydropelectrode, HMDE) で同様

に、メチル化シトシンと非メチル化シトシンの酸化電位の違いを利用してメチル化シトシンの電気化学的検出に成功している。

著者らはこれまでに 2 本鎖 DNA に特異的に結合するフェロセン化ナフタレンジイミド (Ferrocenylnaphthalene diimide, FND) を用いた電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイ (Electrochemical hybridization assay, EHA, Fig. 1) を確立してきた^{18)~25)}。EHA では、調べたい遺伝子の断片 (20 塩基程度) に相補的なチオール化オリゴヌクレオチドを固定化した金電極をプローブ電極とする。この電極にターゲット DNA を含むサンプルを添加すると、プローブとターゲットが相補的な時は、これらが 2 本鎖 DNA を形成する。ハイブリダイゼーション反応前後で FND を含む電解液でディファレンシャルパルスボルタンメトリー (Differential Pulse Voltammetry, DPV) 測定によって電流を測定し、得られた電流をそれぞれ i_0 , i とし、電流増加率 $\Delta i/\% = (i/i_0 - 1) \times 100$ で評価する。 i_0 , i は、それぞれ DNA プローブのみの際に静電的に濃縮された FND 量と 2 本鎖形成によってインターカレートされた FND 量に基づく。これまでに亜硫酸処理後、MSP によって増幅されたサンプルを EHA で検出することによって *p16* 遺伝子²¹⁾、*Cadherin 4 (CDH4)* 遺伝子²²⁾²³⁾、*hTERT* 遺伝子²⁴⁾のメチル化シトシン検出に成功した。一方、テロメラーゼ活性は、がんの 80% で発現していることが知られており、その活性部位の遺伝子である *hTERT* 遺伝子のプロモータ領域のメチル化パターンががんの進行と深くかかわっていることが知られているので、がん診断のため、口腔がん及び口腔がんの前がん病変である白板症由来のサンプルに対して、この領域のメチル化パターンの検出を試みた。

2 実 験

2.1 MSP サンプルの調製

ターゲット配列は T_m を考慮して MSP 用のプライマー解析ソフトである CpGWare (http://apps.serologicals.com/CPGWARE/dna_form2.html) で決定した。

鋳型 DNA は亜硫酸処理後、ポリメラーゼ連鎖反応

Table 2 Sequence of probe DNA immobilized on the electrodes

Probe DNA	Sequence
M5	5'-SS-TAG <u>T</u> CG <u>C</u> GT TTA <u>C</u> GC GTT <u>T</u> TC GTT-3'
M4	5'-SS -TAG <u>T</u> CG <u>C</u> GT TTA <u>C</u> GC GTT <u>T</u> TT GTT-3'
M4'	5'-SS -TAG <u>T</u> TG <u>C</u> GT TTA <u>C</u> GC GTT <u>T</u> TC GTT-3'
M3	5'-SS- TAG <u>T</u> CG <u>C</u> GT TTA <u>C</u> GT GTT <u>T</u> TT GTT-3'
M3'	5'-SS -TAG <u>T</u> TG <u>T</u> GT TTA <u>C</u> GC GTT <u>T</u> TC GTT-3'
M2	5'-SS- TAG <u>T</u> CG <u>C</u> GT TTA <u>T</u> GT GTT <u>T</u> TT GTT-3'
M2'	5'-SS -TAG <u>T</u> TG <u>T</u> GT TTA <u>T</u> GC GTT <u>T</u> TC GTT-3'
M1	5'-SS -TAG <u>T</u> CG <u>T</u> GT TTA <u>T</u> GT GTT <u>T</u> TT GTT-3'
M1'	5'-SS -TAG <u>T</u> TG <u>T</u> GT TTA <u>T</u> GT GTT <u>T</u> TC GTT-3'
M0	5'-SS -TAG <u>T</u> TG <u>T</u> GT TTA <u>T</u> GT GTT <u>T</u> TT GTT-3'

*5' -SS- : 5'-HO-(CH₂)₆-S-S-(CH₂)₆-

(PCR) されたものを想定し, メチル化シトシンはシトシンとし, シトシンはチミンに変換した配列をジーンネットよりカスタム合成したものを購入した. 配列は以下に示す通りである (下線部はプローブ DNA と対応する部分, 破線部は MSP プライマー部分). メチル化ターゲット DNA, M5(-): 5'-GAG GTA TTT CGG GAG GTT TCG CGT GTT CGT TTA GGG AG T AAT GCG TTT TCG GGT TCG TTT TTA GTC GCG TTT ACG CGT TTT CGT TTT TTT TTT TAC GTT CGG TAT TCG TGG TGT TCG GAG T-3', 非メチル化ターゲット DNA, M0(-): 5'-GAG GTA TTT CGG GAG GTT TCG CGT GTT TGT TTA GGG AGT AAT GTG TTT TTG GGT TTG TTT TTA GTT GTG TTT ATG TGT TTT TGT TTT TTT TTT TAT GTT CGG TAT TCG TGG TGT TCG GAG T-3'.

M5(-), M0(-) は, プライマーとして, F-Primer: 5'-GAG GTA TTT CGG GAG GTT TCG C-3', R-Primer: 5'- ACT CCG AAC ACC ACG AAT ACC G -3' (ジーンネット) を用いて増幅した. MSP における DNA 増幅 (Polymerase chain reaction, PCR) は, 1×ZymoTaq PreMix (Zymo Reserch), 0.4 μmol L⁻¹ F- Primer, 0.4 μmol L⁻¹ R-Primer, and 40 pmol L⁻¹ M5(-) もしくは M0(-) を調製し, 94 °C, 1分→54 °C, 1分→72 °C, 1分を40回繰り返した. 得られたPCR産物はPCR Purification kit (Qiagen) で精製した. ハイブリダイゼーション前に, PCR産物は2×SSC溶液に調製し, 95 °C で10分インキュベートし, 直ちに急冷したものをを用いた.

2.2 臨床サンプル (exfoliated oral cell, EOC) の調製

九州歯科大学の倫理委員会です許可 (許可番号 1445) を得たのち, 患者へのインフォームドコンセントののち, 同意が得られた口腔がん (oral squamous cell, OSCC), 白板症 (oral leukoplakia, OL), 健常者 (healthy volunteer, HL) からサンプルを採取した⁵⁽⁶⁾. サンプル採取は, スポンジブ

ラシを頬の内側を左右で10回ずつぬぐい, 生理食塩水20 mLに懸濁させた²⁰⁾. 10000 rpmで5分遠心分離後, 上清を除き, ペレットとして剝離口腔細胞 (exfoliated oral cell, EOC) を得た. これに500 μLの細胞破碎液を加え, 4 °Cのアイスバス上で30分インキュベートし, 上清を得た. この溶液100 μLからDNeasy Blood and Tissue Kit, BisulFlash DNA Modification Kitによってゲノムを抽出し, 亜硫酸処理した. ZymoTaq Premixを用いて, 2:1と同様にMSP産物を得た.

2.3 電極調製

プローブ DNA (Table 2) は, ジーンネットよりカスタム合成したものを購入した. 10電極を有するマルチ金薄膜電極 (φ1 mm, 田中貴金属に依頼作製) はプラズマ照射により前処理を行った. 0.05 μmol L⁻¹ プローブ DNA, 100 mmol L⁻¹ NaCl 溶液を2.0 μmol L⁻¹ 電極に添加し, 25 °C で2時間インキュベートした. 水洗後, 1 mmol L⁻¹ 6-メルカプトヘキサノール溶液2.0 μLを電極に添加し, 25 °C で1時間インキュベートしたのち, 水洗してプローブ DNA 固定化電極とした.

2.4 電気化学測定

FNDは過去の報告例に従って合成した²⁵⁾. プローブ DNA 固定化電極は, 5.0 μmol L⁻¹ FND, 0.10 M 酢酸カリウム (pH 5.5), 0.10 mol L⁻¹ KCl 溶液でDPV測定 (Initial Voltage = -0.1 V, final Voltage = 0.3 V, Increasing Voltage = 10 mV, amplitude = 0.05 V, pulse width = 0.025 s, sample width = 0.005 s, pulse period = 0.01 s, quiet time = 2 s, resistance = 510 kΩ.) を行った (*i*₀ 測定). 電極を水洗後, サンプル DNA を金電極上に2.0 μL添加し, 20 °C で2時間インキュベートした. その後, 再度5.0 μmol L⁻¹ FND, 0.10 mol L⁻¹ 酢酸カリウム (pH 5.5), 0.10 mol L⁻¹ KCl 溶液でDPV測定を行った (*i*測定). 得られた電流より, 電流増加率 Δ*i*/ % = (*i*/*i*₀ - 1) × 100 を算出した.

2.5 Receiver Operating Characteristic analysis (ROC 解析)

がんの検出において, すべての臨床サンプルの Δ*i*_{M4+M4'+M5} の値をがんの場合1, がんでない場合0とし, エクセル統計ソフトでReceiver Operating Characteristic analysis (ROC 解析) を行った. 閾値を^{しきい}変化させたときの真陽性の割合 (True Positive Fraction, TPF) を横軸に偽陽性の割合 (False Positive Fraction, FPF) を縦軸にプロットした (Fig. 2). これによって得られたプロットの面積 (曲線下面積, Area under the Curve, AUC) を算出した. 0.9 < AUC < 1.0 の時, 非常に高い信頼性をもつ診断システムである. ROC 解析で得られた閾値は, Δ*i*_{M4+M4'+M5} の値において最も高い真

陽性の割合と最も低い偽陽性を示したので、この閾値を用いて Table 3 に示すような混同行列 (Confusion matrix) を作成した。これより、真陽性 (A)、真陰性 (B)、偽陽性 (C)、偽陰性 (D) となる検体数が分かり、この個数から、感度、特異度をそれぞれ、感度 = $A/(A+D) \times 100$ 、特異度 = $B/(B+C) \times 100$ を算出した。

3 結果と考察

3.1 検出システム

亜硫酸処理されたゲノムのメチル化シトシンはシトシンへと変換され、メチル化特異的なプライマーを用いた PCR (MSP) によって目的とする 100 塩基程度の領域が増幅される (このとき、シトシンのままである)。一方、亜硫酸処理されたゲノムの非メチル化シトシンはウラシルへと変換され、MSP 後、チミンへと変換される。すなわち、ターゲットはメチル化シトシンであればシトシンとなり、非メチル化シトシンであればチミンへと変換される。この違いをプローブ DNA 固定化電極でハイブリダイゼーションによって検出する。

ターゲット DNA は *hTERT* 遺伝子のプロモータ領域の -622 から -502 までの 121 塩基 (メチル化ターゲット DNA: 5'-GAG GTA TTT CGG GAG GTT TCG CGT GTT CGT TTA GGG AGT AAT GCG TTT TCG GGT TCG TTT TTA GTC GCG TTT ACG CGT TTT CGT TTT TTT TTT TAC GTT CGG TAT TCG TGG TGT TCG GAG T-3') を MSP によって調製した。メチル化シトシンの検出では、ターゲッ

トがメチル化シトシンの場合、フルマッチとなり、非メチル化の場合 mismatches となる。ここでは、プローブをプラス鎖、ターゲットをマイナスと設定した。このようにすることで、メチル化状態のプラス鎖をもつプローブと非メチル化 DNA による mismatches はより不安定な C-A ペアとなる²⁰⁾²⁶⁾。逆の場合、mismatches の組み合わせは G-T ペアとなる。この組み合わせは安定な 2 本鎖を形成することが知られているため²⁰⁾²⁶⁾、フルマッチとの識別が難しくなると期待されるので上述の組み合わせとした。

プローブ DNA は Table 2 に示す五つの CpG サイトを持つ 24 塩基の配列とし、10 種類のメチル化パターンのプローブを準備した。

Fig. 3A には M5(+) プローブに対して、すべてメチル化されたシトシンを有する 121 塩基の合成オリゴヌクレオチドを鋳型とした PCR 産物、M5(-) とすべてのシトシンがチミンに変換されたオリゴヌクレオチドを鋳型とした PCR 産物、M0(-) を $0.1 \sim 4.0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 作用させたときの $\Delta i/\%$ を示した。電極上のプローブ M5 に相補的な M5(-) のみ、M5(-) の濃度増加に応じて Δi が増加した。さらに、M0, M1, M2, M3, M4, M5 プローブに対して、M5(-) をハイブリダイゼーションさせたとき、M5 から M0 にかけて、mismatches の個数が増えるごとに、 Δi は減少した (Fig. 3B)。M0(-) をハイブリダイゼーションさせると、M5 から M0 にかけて、 Δi は増加した (Data not shown)。これらの結果は、ターゲット検出においてある程度の定量的を有することを示している。

3.2 臨床サンプルの電気化学測定

次に、臨床サンプルについて検討を行った。口腔がんと白板症と健常者から得られたサンプル (口腔内ぬぐい液) からゲノムを抽出後、亜硫酸処理し、MSP 産物を得た。これらについて、電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイを行った。Table 2 に示す 10 種類のプローブを固定化した電極を用意し、それぞれに対して MSP 産物を処理し、DPV 測定を行った。Fig. 4A にそれぞれのプローブに対する Δi を示した。すべてのプローブにおける Δi は、健常者 < 白板症患者 < がん患者の順で、大きくなった。MSP はメチル化特異的であるため、がんはメチル化非頻度の高い

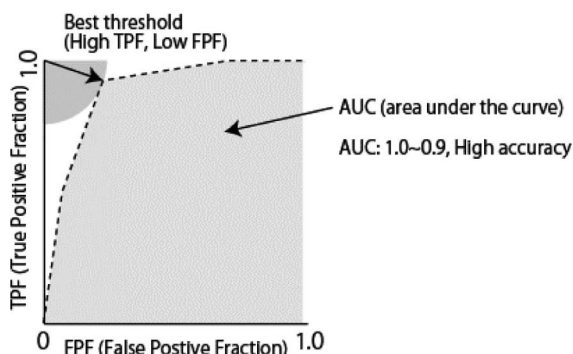


Fig. 2 Principle of ROC analysis

Table 3 Confusion matrix

		True condition	
		Positive	Negative
Predicted condition	Positive	True Positive (A)	False Positive (C)
	Negative	False Negative (D)	True Negative (B)
		Sensitivity = $\frac{A}{A+D} \times 100$	Specificity = $\frac{B}{B+C} \times 100$

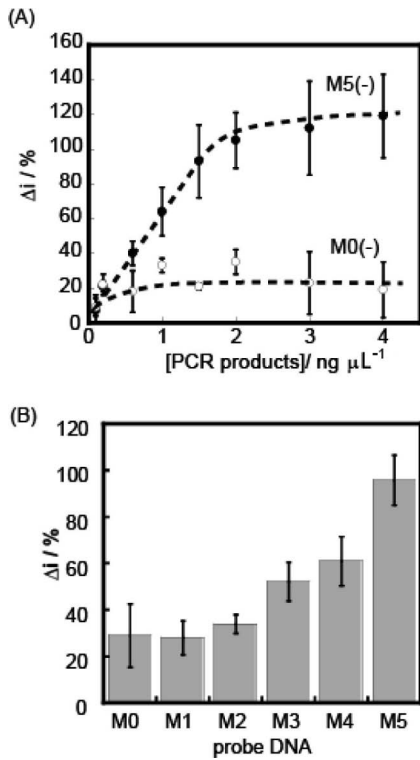


Fig. 3 (A) Δi value of the M5(+) DNA probe-immobilized electrode after hybridization with 0.1–4.0 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ of M5(-) or M0(-) DNA sample and (B) the Δi value for the DNA probe-immobilized electrodes carrying M0–M5(+) after hybridization of the 2.0 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ PCR probes carrying M5(-)

The electrochemical measurements were conducted in 0.10 mol L^{-1} AcOH-AcOK (pH 5.5) containing 5.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ FND and 0.10 mol L^{-1} KCl at 20 °C.

ものが増幅されているが、白板症や健常者ではプライマー部分はメチル化されているがプライマー以外の内部はメチル化されていないような一部がメチル化されている配列が増幅されているため、 Δi が低くなっているのだと予想している。また、口腔がんはM0からM5にかけメチル化頻度が上がるにつれて、 Δi は上昇した。白板症は、M2, M2', M3, M3'で高い Δi を示した。健常者では全体的に Δi は小さいものの、M5からM0にかけメチル化頻度が下がるにつれて、 Δi は上昇した。メチル化頻度の高い領域であるM4, M4', M5に着目するとがんではM5よりもM4'に対して、高い Δi を示した。100%メチル化しているものもあるが、80%程度メチル化しているもののほうが多いと思われる。がんのスクリーニングとして、M5のみで識別を試みたが (Fig. 4B), がんと白板症の応答が重なっていたため、M4, M4', M5における Δi の和 (Δi) で評価することとした。その結果から箱ひげ図を作成した (Fig. 4C)。各データのボックス部分はデータ分布の25~75%の領域を示しており、この範囲がそれぞれの症例で重なっていなかった。Student-tテストによる有意差判定においても、がんと

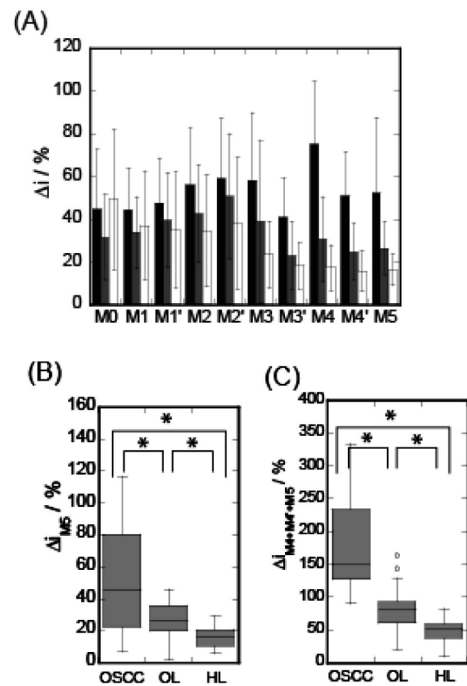


Fig. 4 (A) Δi value for the multi-electrode chip after hybridization with the genomic DNAs from the EOC from OSCC (Black bar), oral leukoplakia (Gray bar) and healthy volunteers (White bar) treated with bisulfite modification and MSP. (B) Box plots of Δi_{M5} value of EHA in EOC. (C) Box plots of $\Delta i_{M4+M4'+M5}$ value of EHA in EOC. *: $p < 0.01$.

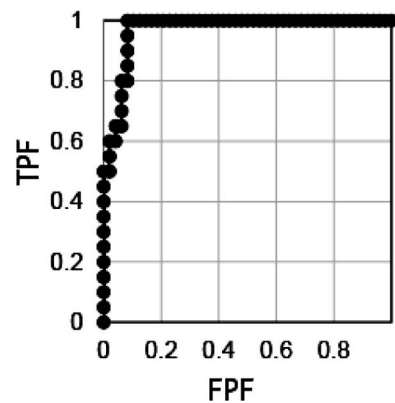


Fig. 5 ROC analysis of EOC
TPF: True Positive Fraction, and FPF: False Positive Fraction.

白板症、白板症と健常者を有意の差 ($p < 0.05$) で識別することができたため、M4, M4', M5における Δi の和 ($\Delta i_{M4+M4'+M5}$) を用いることで高精度な診断が可能になると思われる。

3・3 統計解析

$\Delta i_{M4+M4'+M5}$ の値をROC解析によって評価した (Fig. 5)。本手法では、また、ROC解析で得られた曲線下面積

Table 4 ROC analysis in the case of the detection of OSCC from all samples

		M5+M4+M4'/OSCC			
	OSCC	OL	HL	accuracy rate	AUC
EOC	20/21	5/19	0/29	91 % (63/69)	0.97

AUC: area under the curve, Threshold: EOC 96.6 %

(AUC) が 1.0 に近い場合、その診断手法の信頼性は非常に高く、0.5 に近いと信頼性はほとんどない。そのため、曲線下面積も算出した。その結果、0.97 となり、本手法は診断手法として非常に高い信頼性を有することが分かった。さらに、ROC 解析ではがんを検出するための閾値を算出することができる。これによって最も偽陽性と偽陰性が小さな閾値が算出される。今回のデータでは閾値は 96.6 % であり、96.6 % 以上ではがんの可能性が非常に高く、96.6 % より小さい場合、がんの可能性がかなり低いことが分かった。この値を用いて、 $\Delta i_{M4+M4'+M}$ の値とサンプル情報を比較し、正誤判定を行った結果を Table 4 に示した。この閾値では、がんでは 21 サンプル中わずかに 1 サンプル (4.8 %) で偽陰性を示した。健常者は 100 % 健常者であると診断できており、白板症の一部の患者でがんと同程度の $\Delta i_{M4+M4'+M5}$ を示していることが分かった。この結果から感度 (がんの人を正しくがんと評価できた割合) を算出すると、95 % (=20/21×100)、特異度 (がんでない人を正しくがんでない人と評価できた割合) を算出すると 90 % [= (14+29)/(19+29)×100] であった。正診断率は、91 % [= (20+14+29)/(21+19+29)×100] であり、非常に高い正診断率を有することが分かった。生化学診断では感度と特異度がともに高い診断方法は少なく、本手法は口腔内ぬぐい液から抽出したサンプルからのアッセイであるが、AUC の結果からも信頼性が非常に高い手法であるといえる。

4 結 言

FND を利用した電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイによって、口腔がん、白板症、健常者由来の臨床サンプルの診断を試みた。メチル化頻度の高い 3 種類のプローブの電気化学応答の和からがんの検出を試みた。ここでは、健常者とがん以外に白板症を含むという、より実際の状況に近い状況で診断を行い、感度 95 %、特異度 90 %、正診断率 91 % で検出することができた。閾値下げれば疾病としてがんと白板症を検出することも可能であり、患者へのリスクを伝えることができる。また、がんをより高精度に検出するために、閾値を下げて、偽陰性を限りなく低くする (その代わりに偽陽性の割合は増大する) こともできる。メチル化頻度の検出はがんの予後診断等にも期待されている。電気化学的手法は高感度で簡便な測定法であ

り、小型化も可能であるため、持ち運び可能な装置とすることで、医師のチェアサイドやベッドサイドでの診断が可能になるものと期待される。

謝 辞

本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム (P-DIRECT) の助成を受けたものです。ここに謝意を表します。

文 献

- 1) 国立がん研究センター がん情報サービスホームページ: “がん検診”, available from <http://ganjoho.jp/med_pro/pre_scr/screening/index.html>, (accessed 2017-2-14).
- 2) N. Sawabu, H. Watanabe, Y. Yamaguchi, K. Ohtsubo, Y. Motoo: *Pancreas*, **28**, 263 (2004).
- 3) W. De Wever, S. Stroobants, J. Coolen, J. A. Verschakelen: *Eur. Respir. J.*, **33**, 201 (2009).
- 4) NCI-funded Breast Cancer Surveillance Consortium: “Sensitivity and Specificity by Indication for Examination for 363,048 Diagnostic Mammography Examinations from 2004 - 2008 - based on BCSC data through 2009”, available from <<http://www.bcsc-research.org/statistics/benchmarks/diagnostic/2009/tatableSensSp.html>>, (accessed 2017-2-14).
- 5) K. Mori, S. Sato, M. Kodama, M. Habu, O. Takahashi, T. Nishihara, K. Tominaga, S. Takenaka: *Clin. Chem.*, **59**, 289 (2013).
- 6) M. Hayakawa, M. Kodama, S. Sato, K. Tomoeda-Mori, K. Haraguchi, M. Habu, S. Takenaka, K. Tominaga: *Electroanal.*, **28**, 503 (2016).
- 7) M. Berdasco, M. Esteller: *Developmental. Cell*, **19**, 698 (2010).
- 8) P. A. Jones, S. B. Baylin: *Cell*, **128**, 683 (2007).
- 9) J. G. Herman, A. Merlo, L. Mao, R. G. Lapidus, J.-P. J. Issa, N. E. Davidson, D. Sidransky, S. B. Baylin: *Can. Res.*, **55**, 4525 (1995).
- 10) J. G. Herman, A. Umar, K. Polyak, J. R. Graff, N. Ahuja, J. P. Issa, S. Markowitz, J. K. Willson, S. R. Hamilton, K. W. Kinzler, M. F. Kane, R. D. Kolodner, B. Vogelstein, T. A. Kunkel, S. B. Baylin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6870 (1998).
- 11) M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, C. L. Paul: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1827 (1992).
- 12) J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin, S. B. Baylin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9821 (1996).
- 13) Z. Xiong, P. W. Laird: *Nucleic Acid Res.*, **25**, 2532

- (1997).
- 14) K. Tanaka, K. Tainaka, T. Umemoto, A. Nomura, A. Okamoto : *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 14511 (2007).
 - 15) D. Kato, N. Sekioka, A. Ueda, R. Kurita, S. Hirono, K. Suzuki, O. Niwa : *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 3716 (2008).
 - 16) D. Kato, M. Komoriya, K. Nakamoto, R. Kurita, S. Hirono, O. Niwa : *Anal. Sci.*, **27**, 703 (2011).
 - 17) M. Bartošík, M. Fojta, E. Paleček : *Electrochim. Acta*, **78**, 75 (2012).
 - 18) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo : *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
 - 19) H. Miyahara, K. Yamashita, M. Kanai, K. Uchida, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka : *Talanta*, **56**, 829 (2002).
 - 20) K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka : *Anal. Biochem.*, **306**, 188 (2002).
 - 21) S. Sato, H. Kondo, K. Hokazono, T. Irie, T. Ueki, M. Waki, T. Nojima, S. Takenaka : *Anal. Chim. Acta*, **578**, 82 (2006).
 - 22) S. Sato, M. Tsueda, S. Takenaka : *J. Organomet. Chem.*, **695**, 1858 (2010).
 - 23) S. Sato, M. Tsueda, Y. Kanazaki, S. Takenaka : *Anal. Chim. Acta.*, **715**, 42 (2012).
 - 24) S. Sato, T. Saeki, T. Tanaka, Y. Kanazaki, M. Hayakawa, K. Haraguchi, M. Kodama, T. Nishihara, K. Tominaga, S. Takenaka : *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **174**, 869 (2014).
 - 25) S. Sato, S. Takenaka : *J. Orgmet. Chem.*, **693**, 1177 (2008).
 - 26) T. Brown, O. Kennard, G. Kneale, D. Rabinovich : *Nature*, **315**, 604 (1985).

Electrochemical Hybridization Assay for Methylation Detection of the *hTERT* Gene Connected with Oral Cancer Screening

Shinobu SATO^{1,2}, Kazuya HARAGUCHI³, Mana HAYAKAWA³, Kazuhiro TOMINAGA³ and Shigeori TAKENAKA^{*1,2}

* E-mail : shige@che.kyutech.ac.jp

¹ Department of Applied Chemistry, Kyushu Institute of Technology, 1-1, Sensuicho, Tobata-ku, Kitakyushu-shi, Fukuoka 804-8550

² Research Center for Biomicrosensing Technology, Kyushu Institute of Technology, 1-1, Sensuicho, Tobata-ku, Kitakyushu-shi, Fukuoka 804-8550

³ Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Science of Physical Functions, Kyushu Dental University, 2-6-1, Manazuru, Kokurakita-ku, Kitakyushu-shi, Fukuoka 803-8580

(Received February 26, 2017; Accepted April 6, 2017)

The *human telomerase reverse transcriptase (hTERT)* gene is encoded as a catalytic unit of telomerase. Since the methylation pattern of the CpG islands in the promoter region of *hTERT* gene is related with cancer development, this should serve as a suitable cancer marker. Electrochemical hybridization assay was applied to this detection using ferrocenylnaphthalene diimide (FND) as a hybrid indicator. Ten different 24-meric DNA probes were designed and immobilized on the individual electrodes of multi-electrode chip, which can hybridize with sample DNAs carrying different methylation patterns: M0, M1, M1', M2, M2', M3, M3', M4, M4', or M5, where number refers to the number of methylated cytosine of CpG islands in the promoter region of *hTERT* gene. Aiming for simple diagnosis of oral cancer, the total exfoliated oral cells as clinical samples were obtained from oral cancer patients (oral squamous cell carcinoma, OSCC), oral leukoplakia as precancerous lesion, and healthy volunteers. The clinical samples were amplified by a methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) with bisulfite treated genome DNA from the total exfoliated oral cells and hybridized with 10-probe DNA immobilized multi-electrode chip. The current increase ratio of M4, M4', M5 probe for detecting methylation was increased with cancer progress according to the following order: healthy volunteers, oral leukoplakia, and OSCC. Receiver operating characteristic curve of the obtained data gave the threshold values in the case of the detection of OSCC from all samples to obtain 91 % of the accuracy rate for total exfoliated oral cells using 96.6 % of the threshold values.

Keywords: telomerase; human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene; oral cancer screening; electrochemical hybridization assay, aberrant methylation.