

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19590375
研究課題名 (和文) 独自に開発した FISH テロメア長測定法による膀胱癌を用いた悪性化の進展過程の解明
研究課題名 (英文) Malignant transformation of urinary bladder carcinoma cells compared by telomere length measured by original Q-FISH method
研究代表者 泉山 七生貴 (IZUMIYAMA NAOTAKA) 財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・東京都老人総合研究所・助手 研究者番号：10158751

## 研究成果の概要：

Diploid5 例の平均テロメア長は 6.7 kbp であり、G3 を含む悪性度の高い例でテロメアが短かった。5 例に共通してテロメアが有意に短縮する染色体は存在しないが、12p(Kras 遺伝子搭載) は 5 例中 3 例で有意に短縮していた。染色体不安定性の指標であるアナフェーズブリッジの出現頻度はテロメア長と逆相関を示し、テロメアの短縮が染色体不安定性に深く関与していることが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・泌尿生殖器

キーワード：テロメア、セントロメア、Q-FISH

## 1. 研究開始当初の背景

なぜ高齢者や超高齢者では癌が爆発的に発生してくるのでしょうか。この疑問の解明のために、我々は老化と癌化の接点を解明することを目的として、加齢・老化に伴い短縮するテロメアを指標として、様々な癌について解析を行ってきています。これまでに食道癌、胃癌、大腸癌、甲状腺癌、肺癌、乳癌、膵臓等についてサザンブロット法に加えて、平成 18 年度からは新たに開発した Tissue-FISH 法 (組織切片上で細胞ごとにテロメア長を測定します) により組織の細胞ごとのテロメア長解析を行っています。加えて培養細胞の

PDL 増加に伴う各染色体のテロメア長の変化を Q-FISH 法 (分裂中期染色体の各テロメア 92 本のテロメア長を測定します) により解析し、テロメア短縮に起因する染色体の癒合 (telomeric association) や染色体の欠失、サブテロメア解析による転座、anaphase bridge 等を見いだしてきました。

## 2. 研究の目的

今回、膀胱癌の時間経過とともに悪性度が増す過程が、テロメア短縮によりテロメア機能不全を生じ染色体の異常に原因があることを、新たに開発した Tissue-FISH 法 (組織切

片上で細胞ごとにテロメア長を測定します)を用いて膀胱癌組織の細胞ごとのテロメア長解析を行います。加えて培養細胞のPDL増加に伴う各染色体のテロメア長の変化をQ-FISH法(分裂中期染色体の各テロメア92本のテロメア長を測定します)を用いて解析し、カリオタイプにより染色体ごとのテロメア長の変化を知ります。2n=46のカリオタイプを示す腫瘍細胞のテロメア長がG1>G2>G3の順に短縮することを証明し、テロメア短縮により染色体の異常の発生と約80本の異数体を獲得する経過を明らかにします。また同じ異型度でもカリオタイプにより予後の異なることが予想され、G2でも80本の染色体を有するものと、G3では2n=46を有しないものが、予後不良であることを証明したいと考えました。

### 3. 研究の方法

① DNAの抽出と検定：これまで蓄積したサザンブロット法によるデータとの比較は重要なことと考え、膀胱癌組織についてもサザンブロット法用のDNA抽出を行います。抽出キットを用いずにフェノール・クロロホルム法にて抽出します。これはキットによる抽出では100kbp程度のDNAを抽出することが難しいためです。また、抽出したDNAについてはジェノフィールド電気泳動法によるDNAの変性の有無について検定を加えます(分担：泉山、石井)

② サザンブロット法によるテロメア長の測定：各組織のDNA 5 $\mu$ gを制限酵素HinfIで切断し、これを0.8%アガロースゲルにて電気泳動を行い、サザンブロット法によりBAS-2500Macを用いてテロメア長を求めます(分担：石井)。

③ Q-FISHについて：カルノア固定で保存されている120サンプルについてカリオタイプ分析が完了しており、G1は全てが2n=46、G2の多くは2n=46、G3の多くは80本程度の染色体数であることが既知です。G2、G3ではモザイクがあり、2n=46と80本が混在しこれらのモザイクサンプル(展開標本)を用いて、Q-FISHを行い1サンプル20メタフェーズの解析を行い、染色体ごとのテロメア長解析により染色体ごとのテロメアを比較解析します。また、全染色体の平均をサンプルごとに比較します(分担：仲村)。

### 4. 研究成果

① DNAの抽出と検定：これまで蓄積したサザンブロット法によるデータとの比較は重要なことと考え、膀胱癌組織についてもサザンブロット法用のDNA抽出を行った。しかし、カルノア固定カリオタイプ分析用標本からは、十分なDNA量が得られずジェノフィールド電気泳動法によるDNAの変性の有無やサザ

ンブロット法によるテロメア長の測定ができないことがわかった。

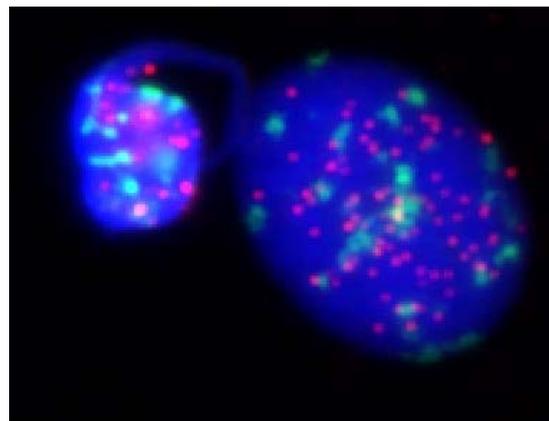
② Q-FISHによる分裂中期展開標本のテロメア長測定：カルノア固定で保存されている120サンプルについて、カリオタイプ分析が完了しているものを含めて再度分析を行った。組織学的異型度がG1からのサンプルは2n=46が多く、G2の多くは2n=46とそれ以上、G3の多くは80本程度の染色体数であることがわかった。これらのモザイクサンプルを用いて、2n=46のカリオタイプを示す染色体のテロメア長を求めてG1と比較検討した。

外科的切除された6例の膀胱癌組織の初代培養癌細胞で染色体46本のDiploid 5例(年齢55~82歳、男2例、女3例)と46本以上1例について検討した。Diploid 5例の平均テロメア長は6.7kbpでした。その他の1例はNeuroendocrine carcinoma例で46本とそれ以上の染色体を含むもので、このカリオタイプは未実施でその平均テロメア長は6.3kbpであった。G2、G3混在型が46本のうちでは最も短縮しておりテロメア長と異型度の関係が示唆された。

染色体のp、q腕別の測定結果では5例に共通して有意に短縮する染色体はないが、Kras遺伝子搭載12pは5例中3例で有意に短縮していた。

染色体不安定性の指標であるアナフェーズブリッジの出現頻度はテロメア長と逆相関を示し、テロメア短縮が染色体不安定性に深く関与していることが明らかになった。

写真はアナフェーズブリッジを示しており、二個の核が分断できずにアナフェーズブリッジによって連結されています。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7件)

- ①Shiraishi H, Mikami T, Aida J, Nakamura K, Izumiya-Shimomura N, Arai T, Watanabe M, Okayasu I, Takubo K. Telomere shortening in Barrett's mucosa and esophageal adenocarcinoma and its association with loss of heterozygosity. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(5):538-44 査読有り.
- ②Kurabayashi R, Takubo K, Aida J, Honma N, Poon SS, Kammori M, Izumiya-Shimomura N, Nakamura KI, Tsuji EI, Matsuura M, Ogawa T, Kaminishi M. Luminal and cancer cells in the breast show more rapid telomere shortening than myoepithelial cells and fibroblasts. *Hum Pathol*. 2008 Jul 24. 査読有り.
- ③ Hatakeyama H, Nakamura K, Izumiya-Shimomura N, Ishii A, Tsuchida S, Takubo K, Ishikawa N. The teleost *Oryzias latipes* shows telomere shortening with age despite considerable telomerase activity throughout life. *Mech Ageing Dev*. 2008 Sep;129(9):550-7. 査読有り.
- ④Aida J, Izumiya-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Kammori M, Sawabe M, Arai T, Matsuura M, Fujiwara M, Kishimoto H, Takubo K. Basal cells have longest telomeres measured by tissue Q-FISH method in lingual epithelium. *Exp Gerontol*. 2008 Sep;43(9):833-9. 査読有り.
- ⑤ Kammori M, Poon SS, Nakamura K, Izumiya N, Ishikawa N, Kobayashi M, Naomoto Y, Takubo K. Squamous cell carcinomas of the esophagus arise from a telomere-shortened epithelial field. *Int J Mol Med*. 2007 Dec;20(6):793-9. 査読有り.
- ⑥ Nakamura K, Takubo K, Izumiya-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Kishimoto H, Fujiwara M, Kato M, Oshimura M, Ishii A, Ishikawa T. N. Telomeric DNA length in cerebral gray and white matter is associated with longevity in individuals aged 70 years or older. *Exp Gerontol*. 2007 Oct;42(10):944-50. 査読有り.
- ⑦Aida J, Izumiya-Shimomura N, Nakamura K, Ishii A, Ishikawa N, Honma N, Kurabayashi R, Kammori M, Poon SS, Arai T, Takubo K. Telomere length variations in 6 mucosal cell types of gastric tissue observed using a novel quantitative fluorescence in situ hybridization method.

*Hum Pathol*. 2007 Aug;38(8):1192-200. 査読有り.

[学会発表] (計 12件)

- ①仲村賢一. Q-FISH法による先天性疾患の責任遺伝子搭載染色体のpq腕別のテロメア長の解析. 第97回日本病理学会. 2008.5.15. 石川県立音楽堂.
- ②笠原一郎. 前処置を工夫した組織Q-FISH法によるヒト表皮細胞テロメア長加齢の変化. 第97回日本病理学会. 2008.5.15. 石川県立音楽堂.
- ③泉山七生貴. ヒト下垂体の加齢に伴うテロメア短縮: 第2報. 第97回日本病理学会. 2008.5.16. 石川県立音楽堂.
- ④相田順子. 舌上皮内腫瘍性病変のテロメア-組織Q-FISH法による構成細胞別アプローチ. 第97回日本病理学会. 2008.5.17. 石川県立音楽堂.
- ⑤川野陽一. 小児生体肝移植後長期経過例におけるドナーとレシピエント肝のテロメア長-tissue Q-FISH法を用いた検討. 第97回日本病理学会. 2008.5.17. 石川県立音楽堂.
- ⑥相田順子. 組織Q-FISH法による舌癌発生母地のテロメア短縮の証明と分裂後期架橋. 第67回日本癌学会. 2008.10.28. 名古屋国際会議場.
- ⑦倉林理恵. 組織Q-FISH法による乳癌組織構成5細胞のテロメア長測定. 第67回日本癌学会. 2008.10.28. 名古屋国際会議場.
- ⑧田久保海誉. 食道癌の背景上皮と非担癌上皮のテロメア長と染色体の不安定性. 第67回日本癌学会. 2008.10.30. 名古屋国際会議場.
- ⑨柏尾光彦. 組織Q-FISH法を用いた甲状腺乳頭癌のテロメア長解析. 第66回日本癌学会. 2007.10.4. パシフィコ横浜.
- ⑩石川直. 大脳白質および灰白質のテロメア長は癌死亡率と反比例し長寿命と正相関する. 第66回日本癌学会. 2007.10.4. パシフィコ横浜.
- ⑪白石廣照. Telomere shortening in Barrett's mucosa and Adenocarcinoma and its significant association with loss of heterozygosity. 第66回日本癌学会. 2007.10.4. パシフィコ横浜.
- ⑫仲村賢一. 食道の扁平上皮癌はテロメア短縮領域から発生する. 第66回日本癌学会. 2007.10.5. パシフィコ横浜.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

泉山 七生貴 (IZUMIYAMA NAOTAKA)

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・

東京都老人総合研究所・助手

研究者番号：10158751

(2)研究分担者

仲村 賢一 (NAKAMURA KEN-ICHI)

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・

東京都老人総合研究所・研究員

研究者番号：60159069

田久保 海誉 (TAKUBO KAIYO)

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・

東京都老人総合研究所・研究部長

研究者番号：00154956

石井 章雄 (ISHII AKIO)

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・

東京都老人総合研究所・助手

研究者番号：60167244

(3)連携研究者

無し