

機関番号：82674
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20590378
 研究課題名（和文） 口腔上皮内病変の診断と幹細胞研究における独自開発した組織 Q-FISH 法の応用
 研究課題名（英文） Diagnosis of Oral Intraepithelial Neoplasia and Study for Mucosal Tissue Stem Cells Using Our Original Tissue Q-FISH Method.
 研究代表者
 相田 順子 （AIDA JUNKO）
 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）
 ・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
 研究者番号：80425678

研究成果の概要（和文）：我々の組織 Q-FISH 法は標本上の細胞群ごとにテロメア長を計測できる。口腔扁平上皮を解析した結果、基底細胞層は上皮の他の層よりもテロメアの長い細胞が含まれ、組織幹細胞の存在が示唆された。これまで前癌病変とされてきた異型上皮には癌と同様のテロメア短縮が起きていたことから、これらも上皮内癌であることが証明できた。また癌に隣接する非癌上皮や癌と併発する一部の白板症は有意にテロメアが短縮し、染色体不安定性を伴うことから、これらは真の前癌病変と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We can measure the telomere length in each cell group on the slide by using our original tissue Q-FISH method. In analysis of oral mucosa, we could confirm that the basal cells have the longest telomeres among the epithelial layer, and that suggests the tissue stem cells are reside in the basal layer. We could also have proved some dysplastic lesions as kinds of carcinoma in situ, because of having short telomeres as same pattern as mucosal carcinomas. The epithelia adjacent to carcinomas or some leukoplakias have significantly short telomeres and chromosomal instabilities, therefore, these lesions might be the true precancerous lesions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：診断病理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は癌の発生は組織や細胞の老化と深く関わると考え、高齢者の癌が増加する原因や癌の特色について研究を行ってきた。

(2) テロメアは加齢その他の原因により短縮

し、短縮により染色体不安定性を増すことで発癌に重要な役割を果たすことで注目され、組織のテロメア計測は重要と考えられた。

(3) テロメア計測方法としてこれまでのサザンブロット法に加え、我々は組織切片を用い

た Q-FISH 法を開発した。本法は組織量が少なくても済み、過去の組織に応用できる。

(4) セントロメアを内部コントロールとして用い、テロメア/セントロメア比(TCR)でテロメア長を相対的に計測することで安定して定量できるようになった。

(5) 培養細胞セルブロックをコントロールとして用いて標準化する(NTCR を求める)ことで症例間の比較も可能となった。

(6) 粘膜扁平上皮癌の診断基準は日本と欧米とで異なり、これまで前癌病変として扱われていた病変の一部は既に悪性病変として治療すべきという考え方が出てきたが、そのために必要な客観的・科学的根拠が必要であった。その1つとしてテロメア長の計測を行なうことを着想した。

2. 研究の目的

(1) 正常粘膜扁平上皮におけるテロメア長のパターンを知ること、組織幹細胞の局在を推定する。

(2) 前癌病変とされる異型上皮と、上皮内癌の組織内におけるテロメア長パターンを知り、正常の上皮と比較することで、早期病変の診断を容易にし、治療医学にも貢献したい。

3. 研究の方法

(1) 正常の組織は東京都老人医療センター剖検例より入手、パラフィンブロックを作製する。組織標本により組織の検定を行なう。

(2) 連携研究者の出雲俊之博士データベースより抽出した異型上皮および上皮内癌症例のパラフィンブロックを収集、組織の検定を行なう。

(3) 培養細胞(培養正常線維芽細胞 TIG-1)によりセルブロックを作製する。

(4) 免疫組織化学的に細胞増殖マーカー、幹細胞マーカー等の検討を行なう。

(5) 正常口腔上皮、異型上皮、上皮内癌に組織

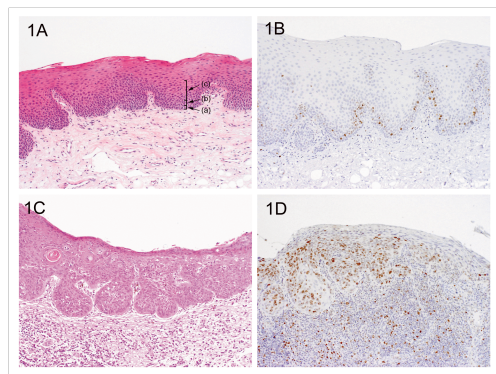


図1 (A)正常口腔粘膜 HE 基底細胞・傍基底細胞・棘細胞ごとにマーカーの検討、テロメアの解析を行なう (B)増殖マーカー Ki67 免疫染色 (C)上皮内癌 HE (D)Ki67 免疫染色 文献(3)より

Q-FISH 法を施行、デジタル画像を撮像し、オリジナルテロメア長解析ソフト Tissue Telo を用いて解析を行なう。セルブロック切片も同時に解析を行なう。

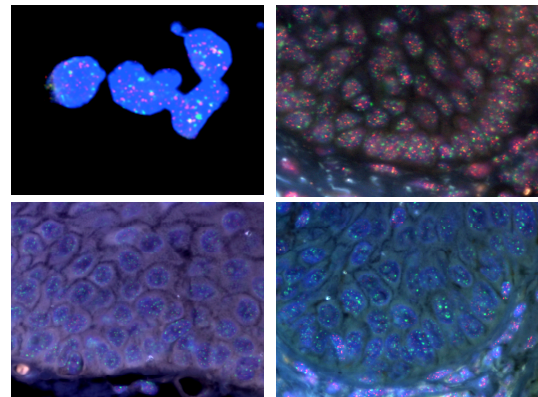


図2 左上:培養細胞セルブロック FISH 像 右上:正常口腔粘膜 FISH 像 右下:上皮内癌 FISH 像 左下:口腔異形成上皮 FISH 像

(6) 組織の NTCR を求め、統計学的に解析を行ない、比較検討する。

(7) 学会発表、英文論文を作成し発表する。

4. 研究成果

(1) 正常口腔上皮では基底細胞層のテロメアが他の傍基底細胞層や棘細胞層よりも優位に長く、年齢により減少する割合も大きい。

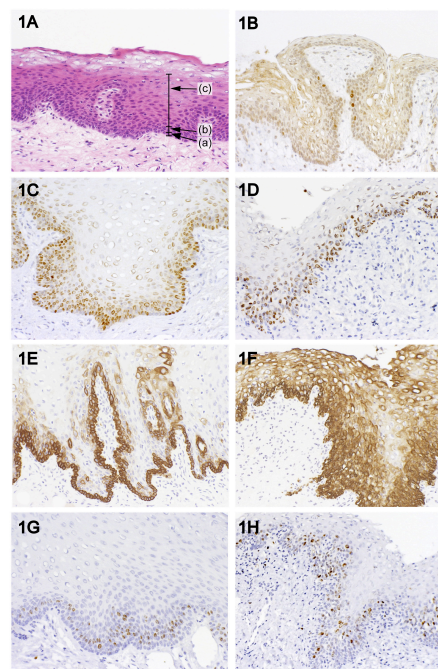


図3 1A: 正常舌粘膜 HE 1B: p27 1C: p63 1D: p63 in baby 1E: CK19, 1F: CK19 in baby 1G: Ki67 1H: Ki67 in baby 文献(1)より

免疫染色の結果も併せると、基底細胞層に組織幹細胞の存在することが示唆された。国内

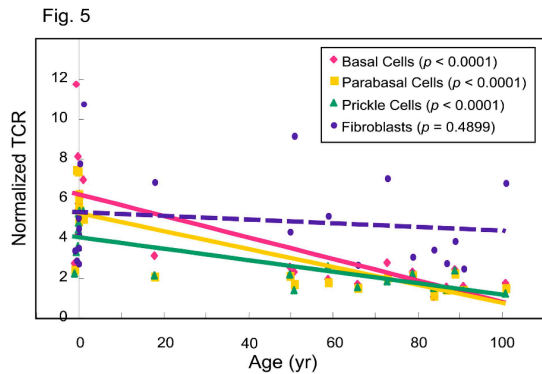


図4 正常舌粘膜(赤)基底細胞(黄)傍基底細胞(緑)棘細胞(紫)線維芽細胞 各群の年齢とテロメア長の回帰分析結果 基底細胞のテロメアが最長で、年齢と共に短縮するが、短縮率が4群で最大であった 文献(1)より

学会発表、英文論文は老化学分野では発表により、幹細胞に関連して国外からも注目された。

(2) 異型上皮と上皮内癌についてテロメア長の検討から、これまで前癌病変と考えられた病変でも上皮内癌と同様の”基底細胞層で著明なテロメア短縮が起きる”という現象が証

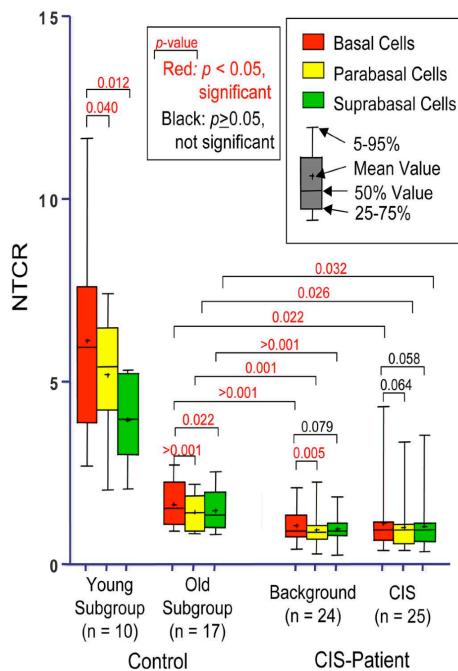


図5 左から正常若年者、正常成人、口腔上皮内癌隣接上皮、上皮内癌の(赤)基底細胞(黄)傍基底細胞(緑)棘細胞 各群のテロメア長を示す箱ヒゲグラフ 上皮内癌隣接上皮は正常非担癌者の上皮よりもテロメアが短縮している 文献(3)より

明され、テロメアの観点からは上皮内癌と同等の病変と考えられた。また、上皮内癌に隣接する非癌上皮でも既に正常上皮よりもテロメアが短縮しており、前癌状態と考えられた。国内学会発表と英文論文を発表した。

(3) 上皮内癌と高頻度に併発し、真の前癌病変と考えられる正角化異型上皮を認め、テロメアの検討を行なった所、著明なテロメア短縮と染色体不安定性を証明した。従って、前癌病変とは、テロメアの短縮して染色体不安定性の生じた状態と定義できるのではないかと考えた。国内学会発表を行なった。英文論文投稿中。

5. 主な発表論文等

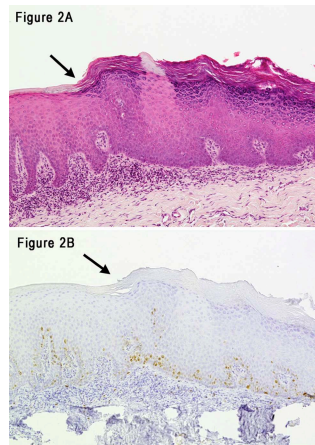


図6 2A: 正角化を伴う異型上皮 HE 2B: 同 Ki67 免疫染色 矢印左側が正常、右側が異型上皮正角化層過形成と顆粒細胞の増生 (投稿中)

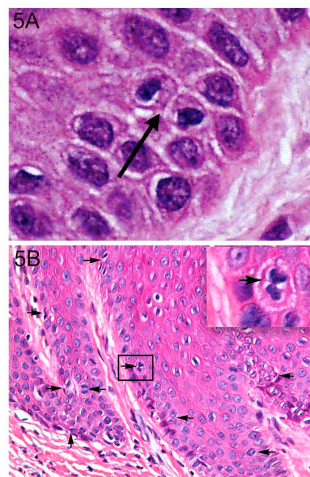


図7 染色体不安定性の指標とされる分裂後期架橋の HE 像 テロメアの短縮した上皮に見られる 5A: 正常口腔上皮に見られた分裂後期架橋 5B: 異型上皮に多数見られた分裂後期架橋 (投稿中)

(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 8 件)

<http://www.ttaggg-rtgp.org/telomere> に (3), (4), (7)について概要あり。

(1) Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SSS, 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* (査読あり) 43: 833-839, 2008

(2) Shiraishi 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* (査読あり) 44(5):538-44, 2009

(3) Aida J, Izumo T, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Matsuura M, Poon SS, Fujiwara M, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Telomere lengths in the oral epithelia with and without carcinoma. *Eur J Ca* (査読あり) 46: 430-8, 2010

(4) Takubo K, Fujita M, Izumiya N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Fujiwara M, Sawabe M, Matsuura M, Grabsch H, Arai T, Aida J. Q-FISH analysis of telomere and chromosome instability in the oesophagus with and without squamous cell carcinoma in situ. *J Pathol* (査読あり) 221(2): 201-9, 2010.

(5) Takubo K, Aida J, Izumiya-Shimomura N, Ishikawa N, Sawabe M, Kurabayashi R, Shiraishi H, Arai T, Nakamura K. Changes of telomere length with aging. *Geriatric Gerontol Int* (査読あり) 10(s1): Special Issue: Gerontology and Geriatrics Science: Gene to Longevity, S197-S206, 2010

(6) Takubo K, Aida J, Izumiya N, Ishikawa N, Fujiwara M, Poon S.S.S, Kondo H, Kammori M, Matsuura M, Sawabe M, Arai T, Baird D.M, Nakamura K. Chromosomal instability and telomere lengths of each chromosomal arm measured by Q-FISH in human fibroblast strains prior to replicative senescence. *Mech Age Dev* (査読あり) 131: 614-624, 2010

(7) Aida J, Yokoyama A, Izumiya-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SSS, Fujiwara M, Sawabe M, Matsuura M, Arai T, Takubo K. Telomere length in the esophagus of alcoholics measured by Q-FISH. *J Pathol* (査読あり) 223(3): 410-416, 2011

(8) 田久保海誉、相田順子、仲村賢一、石川直、新井富生、下村七生貴 老化と癌化におけるテロメア長 生体の科学 (査読なし) 62(1): 63-68, 2011

[学会発表] (計 25 件)

(1) 相田順子、他 正常口腔粘膜及び口腔上皮内癌における Anaphase bridge の出現とテロメア長について 第 19 回日本臨床口腔病理学会学術集会 2008.8 (東京)

(2) 倉林理恵、他 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 (名古屋)

(3) 相田順子、他 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 (名古屋)

(4) 田久保海誉、他 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 回日本癌学会シンポジウム 2008.10 (名古屋)

(5) 仲村賢一、他 Q-FISH 法による膀胱腫瘍細胞のテロメア長と悪性度の関係 第 98 回日本病理学会総会 2009.5 (京都)

(6) 池田浩之、他 日光角化症とその発生母地及びコントロール表皮のテロメア長と日光暴露 第 98 回日本病理学会総会 2009.5 (京都)

(7) 相田順子、他 癌はテロメアの短縮した上皮に発生する—舌粘膜の組織 Q-FISH 法によるテロメア長測定と染色体不安定性 第 98 回日本病理学会総会 2009.5 (京都)

(8) 積田雅央、他 Q-FISH 法を用いた副甲状腺組織の各構成細胞種別テロメア長 日本病理学会総会 2009.5 (京都)

(9) 石川直、他 ウェルナーヘリカーゼ遺伝子異常は in vivo および in vitro でテロメア長を短縮させる 第 98 回日本病理学会総会 2009.5 (京都)

(10) 川野陽一、他 小児生体肝移植後長期経過したドナーとレシピエント間での組織 Q-FISH 法を用いた肝テロメア長比較—第 2 報— 第 98 回日本病理学会総会 2009.5 (京都)

(11) 眞田幸弘、他 胆道閉鎖症の肝組織におけるテロメア長の解析—胆道閉鎖症の肝移植適応の検討— 第 98 回日本病理学会総会 2009.5 (京都)

(12) 相田順子、他 食道癌はテロメアの短縮した上皮に発生する—組織 Q-FISH 法による解析 第 63 回日本食道学会 2009.6 (横浜)

(13) 相田順子、他 口腔正角化型異型上皮における構成細胞のテロメア長と染色体不安定性について Q-FISH 法による解析 第 20 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会 2009.7 (札幌)

(14) 相田順子、他 食道癌は過度にテロメアが短縮し染色体不安定性を伴う粘膜から発生する;Q-FISH 法による解析 第 68 回日本癌学会学術総会 2009.10 (横浜)

(15) 仲村賢一、他 Q-FISH 法による培養線維芽細胞を用いたテロメア短縮と染色体異常 第 99 回日本病理学会総会 2010.4 (東京)

(16) 眞田幸弘、他 胆道閉鎖症の肝組織におけるテロメア長の解析 第 99 回日本病理学会総会 2010.4 (東京)

(17) 相田順子、他 正角化型口腔異型上皮における構成細胞のテロメア長と染色体不安定性について Q-FISH 法による解析 第 99 回日本病理学会総会 2010.4 (東京)

(18) Aida J., et al. Q-FISH analysis of telomere

and chromosome instability in the esophags with and without squamous cell carcinoma in situ. 12th World Congress of the International Sociaty for Diseases of the Esophagus, Kagoshima, JAPAN 2010.9

(19) 相田順子、他 アルコール症患者の食道におけるテロメア Q-FISH による検討 第69回日本癌学会学術総会 2010.9 (大阪)

(20) Ishikawa N., et al. Chromosomal instability and shortened telomere lengths measured by Q-FISH in human fibroblast strains prior to replicatie senescence. The 10th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, Tokyo, Japan 2011.2

(21) Aida J., et al. Telomere shortening and chromosomal instability in the esophageal mucosa with and without squamous cell carcinoma The 10th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, Tokyo, Japan 2011.2

(22) 田久保海誉、他 テロメアの短縮とヒトの老化、癌化 第100回日本病理学会総会ワークショップ 2011.4 (横浜)

(23) 相田順子、他 アルコール症患者は食道上皮のテロメアが短縮している 第100回日本病理学会総会 2011.4 (横浜)

(24) 仲村賢一、他 Q-FISH 法による膀胱癌の悪性度とテロメア長 第100回日本病理学会総会 2011.4 (横浜)

(25) 泉山七生貴、他 Q-FISH 法と免疫蛍光抗体法を用いた細胞種別テロメア長の測定法の開発と隣島細胞種別テロメア長の解析 第100回日本病理学会総会 2011.4 (横浜)

[その他]

ホームページ等

・研究グループホームページ (研究内容の概要、論文の解説、業績) など

<http://www.ttaggg-rtgp.org/>

・研究所ホームページ (研究内容の概要、業績の一部)

http://www.tmig.or.jp/J_TMIG/J

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相田 順子 (AIDA JUNKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・老年病理学研究チーム・研究員

研究者番号：80425678

(2) 連携研究者

仲村 賢一 (NAKAMURA KEN-ICHI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・老年病理学研究チーム・研究員

研究者番号：60159069

(3) 連携研究者

泉山 七生貴 (IZUMIYAMA NAOTAKA)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・老年病理学研究チーム・助手

研究者番号：10158751

(4) 連携研究者

田久保 海誉 (TAKUBO KAIYO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・老年病理学研究チーム・研究部長

研究者番号：00154956

(5) 連携研究者

出雲 俊之 (IZUMO TOSHIYUKI)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：80322709