

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590327

研究課題名（和文） 膀胱癌の異型度の進展解析：独自開発ソフトによるテロメア長測定と染色体の不安定化

研究課題名（英文） Analysis of progress of grades in urinary bladder cancer: telomere measurement with original software and chromosomal instability

研究代表者

仲村 賢一（Nakamura Kenichi）

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：60159069

研究成果の概要（和文）：

テロメア光度と染色体数の関係を明らかに出来た。異型度を増すに従い染色体の本数が増加し、テロメア長は短縮しアナフェースブリッジの出現による染色体の不安定性とテロメア機能不全との関係を明らかに出来た。加えて、染色体本数の増加とアナフェースブリッジ出現の間には有意な相関があることもみいだしました。

研究成果の概要（英文）：

In order to evaluate the relationships existing among three histologic types of urothelial tumors, chromosomal instability, and telomere length, we examined 37 consecutive cases of papillary urothelial neoplasm, from which we obtained 26 (70.3%) that were suitable for karyotype analysis, comprising 7 PUNLMP, 10 low-grade papillary urothelial carcinomas (PUCs), and 9 high-grade PUCs. We subjected these cases to karyotype and anaphase bridge analyses, and measured their telomere lengths by Q-FISH. PUNLMP always showed diploidy and had anaphase bridges. Low-grade PUC showed diploidy ($n = 2$), hypoploidy ($n = 4$) and polyploidy ($n = 4$), and high-grade PUC revealed diploidy ($n = 1$) and polyploidy ($n = 8$); both had anaphase bridges. The incidence of anaphase bridges did not differ significantly between PUNLMP and high-grade PUC ($p = 0.105$). The telomere lengths of PUNLMP, low-grade PUC, and high-grade PUC, expressed as mean telomere fluorescence units (TFU) \pm SD, were 7906 ± 3197 , 4893 ± 1567 , and 3299 ± 1406 , respectively. The differences among the three groups were significant. However, 42.9% of PUNLMPs had shorter telomeres than the mean value for low-grade PUC, and 30.0% of the low-grade PUCs had shorter telomeres than those for high-grade PUC. There was an inverse correlation between telomere length and the incidence of anaphase bridges. It is suggested that PUNLMP progresses to low- and high-grade PUC in association with telomere shortening and chromosomal instability. Our data support the idea that critically shortened telomeres cause chromosomal instability during progression of papillary urothelial neoplasms..

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理

キーワード：膀胱癌、テロメア、FISH、染色体不安定性

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、昨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しています。

2. 研究の目的

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うことを計画しました。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 (G1=papillary urothelial neoplasms of low malignant potential (PUNLMP), G2=low-grade, G3=high-grade papillary urothelial carcinomas) 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。

3. 研究の方法

独自に開発した組織 FISH 測定ソフト Tissue Telo ver3 を用いて細胞種別のテロメア長を測定する。

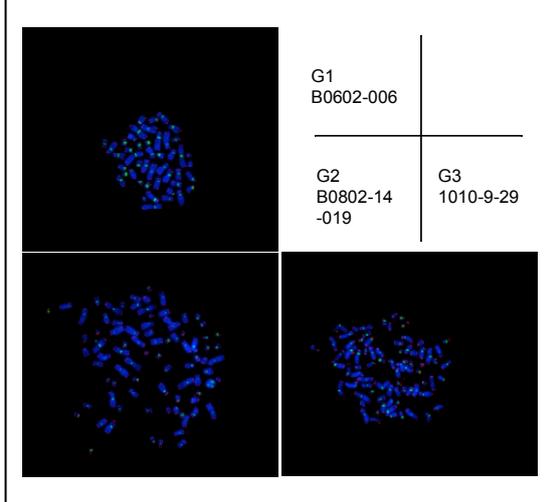
また、1 次培養で得られた膀胱癌細胞の染色体短・長腕別テロメア長を TFL-Telo（公開ソフト）を用いて測定し染色体別のテロメア長解析を行い、G1~G3 の群別に悪性度の進展状況とテロメア長の関係を明らかにする。加えて病理組織学的診断を加味し、総合的な悪性度の進展状況とテロメア長の関係を明らかにする。

4. 研究成果

膀胱癌は通常、組織学的異型度に従い3種類に分類される。膀胱癌の異型度が増す過程が、テロメア短縮によるテロメア機能不全と染色体の不安定性が一因であることを証明することを目的としてこの実験を計画した。

H22, 23年度は前記3種の乳頭状癌の初代培養細胞の各染色体別テロメア長をQ-FISH法（分裂中期染色体の184個のテロメアを測定。図1）を用いて測定し、染色体ごとのテロメア

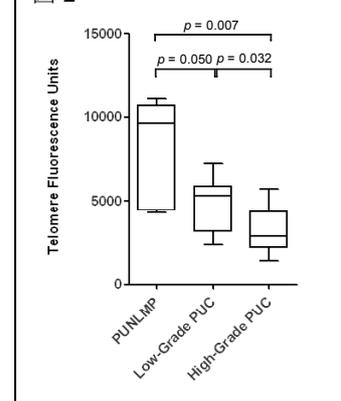
図 1



長の変化を解析した。各異型度を示す癌からの初代培養細胞を用い（同じ癌からでもカリオタイプにモザイクあり）、細胞群中で2n=46

のカリオタイプを示す細胞のテロメア長が異型度(G1>G2>G3)の順に短縮することを証明し（図2）、テロメア短縮による染色体異常の発生との関連を明らかにしました。染色体の本数についても異型度が進行するに従い有意に増加し、G1群においては全てが2n=46でありました（図3-A, B）。また異型度別に染色体不安定性の指標であるアナフェースブリッジ

図 2



有意に増加し、G1群においては全てが2n=46でありました（図3-A, B）。また異型度別に染色体不安定性の指標であるアナフェースブリッジ

(AB)の出現頻度を比較解析した結果、異型度別には有意差を認めませんでした(図4)。しかし、テロメア長の減少と有意に相関してABの出現頻度が増加する

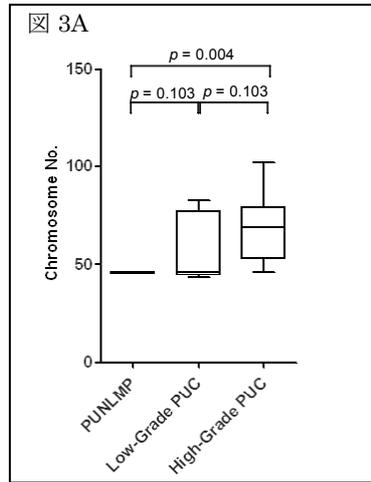
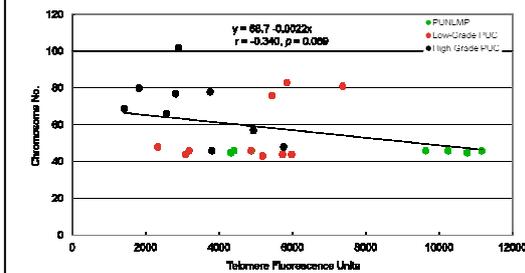
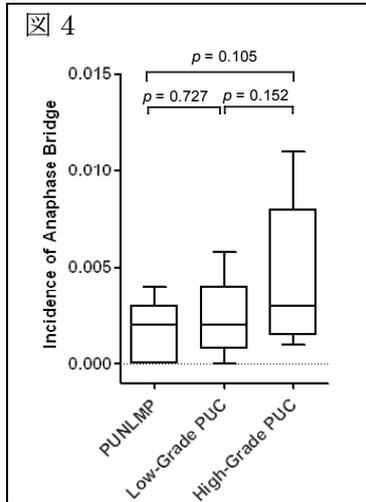


図 3B

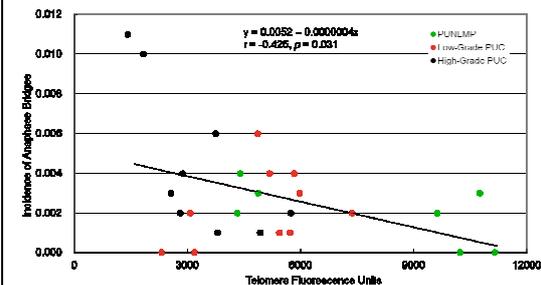


ことを明らかにしました(図5)。また、ABと染色体本数の解析を行い染色体本数の増加とアナフェーズブリッジ出現の間に有意な相関があることもみいだした(図6)。H23



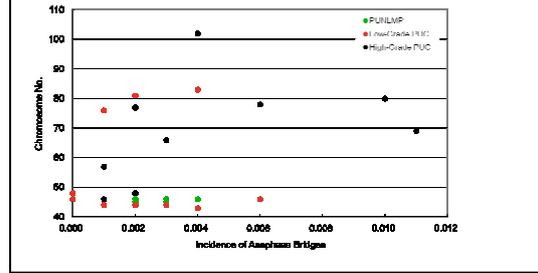
年度の病理学会(4/28-30、「Q-FISH法による

図 5



膀胱癌の悪性度とテロメア長」横浜)にお

図 6



いて発表しました。

H24年度には、特定の染色体(9番、11番、18番、X)についてABへの関与についてホールクロモゾームペインティングで検討したが特記すべき結果が得られなかった。テロメア光度と組織型、テロメア光度と染色体数の関係を明らかに出来たことを主題にして論文を作成しアクセプトになった(Urol Oncol 2013; in press)。

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1件)

Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Hiraishi N, Fujiwara M, Ishikawa Y, Inoshita N, Yonese J, Matsuura M, Poon SS, Arai T, Takubo K. Short telomeres and chromosome instability prior to histologic malignant progression and cytogenetic aneuploidy in papillary urothelial neoplasms. *Urol Oncol* 2013; in press

[学会発表] (計1件)

仲村賢一、藤原睦憲、泉山-下村七生貴、相田順子、石川直、石川雄一、田久保海誉. 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 2011. 4. 28-30, 横浜

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲村 賢一 (Nakamura Kenichi)

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：

60159069

(2)研究分担者

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)・東京都健康長寿医療センター研究所・
研究員

研究者番号：

10158751

(3)連携研究者

()

研究者番号：