

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13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：22590343
 研究課題名（和文） 食道上皮における ALDH 遺伝子型とテロメア長および染色体不安定性の
 関連について
 研究課題名（英文） The relationship among the genotypes of ALDH, telomere length, and
 chromosomal instability in the esophageal epithelium.
 研究代表者
 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・助手
 研究者番号：10158751

研究成果の概要（和文）：研究成果の概要（和文）：食道扁平上皮癌好発因子である ALDH 遺伝子多形とテロメア長との関連について検討した結果、ヨード不染帯の大きさや数はテロメア長と相関するが ALDH 遺伝子多形は相関が見られなかった。このことからテロメア短縮は直接発癌に関与するのではなく容易に発癌しやすい状態を形成するのに関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The investigation of the telomere lengths in the esophageal epithelium revealed that there is no difference among the ALDH genotype in telomere lengths, but the epithelium has short telomeres in the large iodine-unstained lesions with multiplicity. Telomere shortening may not generate cancer directly, but may create conditions under which SCC can develop more easily, depending on subsequent exposure to carcinogens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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・人体病理学

キーワード：テロメア、ALDH、Q-FISH、食道

1. 研究開始当初の背景

癌は高齢になると爆発的に発生することから、組織、細胞の老化と深く関係すると考えられています。これまで我々は、高齢者の癌が増加する原因や高齢者の癌の特色についての研究を行ってきました（Nakamura K, Exp Gerontol 2007. Aida J, Hum Pathol 2009. Takubo K, The Best Prac Res Gastroenterol 2008. Takubo K, Histopathology 2007）。爆

発的な癌の発生には発生母地のテロメア短縮などが関係すると考えられてきました。

一方、染色体末端に存在するテロメアは細胞分裂により短縮し、平均 6 kbp まで短縮すると細胞は分裂を停止します（細胞老化）。しかし、p53 や Rb 遺伝子の変異などにより分裂を再開・継続することでテロメアはさらに短縮し、これにより染色体の不安定性が増加します。さらにテロメラーゼ活性の獲得に

より細胞の不死化や腫瘍化が生じると考えられています。我々はテロメア短縮による染色体の不安定性が細胞老化と癌化の関係において重要な役割を果たすと考え、これらの関係解明を目的として1997年より全身諸臓器の正常および癌についてテロメア長の解析を行なってきました。

またサザンブロット法(SB法)に加えて、5年前から独自に開発した組織Q-FISH法(特許取得済)により、組織の細胞ごとのテロメア解析を行なっています(Aida J, Scand J Gastroenterol 2009. Aida J, Eur J Cancer 2010. Aida J, Exp Gerontol 2008. Aida J, Hum Pathol 2007. Kammori M, Oncology 2006)。組織Q-FISH法は、組織量が少量で済み過去の病理組織にも応用できること、また各組織を構成する種々の細胞ごとに計測が可能なのが利点です。内部コントロールとして同一細胞内に存在し、安定度が高いセントロメアを指標とし、テロメア・セントロメアの蛍光光度比(TCR)として検討する事を独自に考案し、測定ソフト(Tissue Telo)を開発しました。これにより各細胞群で100-200個以上の細胞での計測が容易になり、同一個体(組織)内においては、各細胞のテロメア長の大小を正確に反映する事を明らかにしました。また継代した正常培養線維芽細胞の解析によりSB法データと強い相関を得ており、正確さと再現性が証明されています。さらに、このTCRをテロメア長が既知の培養細胞セルブロック(培養細胞を薄切用のパラフィンブロックとした)により標準化する方法を新たに考案しました。正常肺由来培養線維芽細胞(TIG-1;テロメア長は34 PDL 8.7 kbp=SB法で計測)を用いてセルブロックを複製し、組織切片と同一スライドガラス上で同時にFISHを行い、解析することにより2つの内部コントロールとして用います。組織Q-FISH法により得られたTCRを同時にFISHした培養細胞のTCRで除することにより標準化(Normalized)TCR=NCRを得ることができ、これを用いてFISH時の室温など微妙に異なる条件の補正を行い各個体間の比較が可能としました。これまでの過度に短縮したテロメアについて、潰瘍性大腸炎や肝炎などの炎症が癌の発生母地となり、そのテロメアが短縮していることが指摘されてきました。しかし、本法により舌上皮内癌およびその背景粘膜では、炎症を伴わない場合でもテロメアの有意な短縮が認められ、染色体の不安定性も有していることが分かり(Aida J, Eur J Cancer 2010)、食道においても既に同様の結果を得ています。

一方、食道扁平上皮癌の発生は飲酒と喫煙に深く関係し、特にアセトアルデヒド脱水素酵素(ALDH-1B, 2)の遺伝子型と関連性が高いことがわかっています。ALDH-2のヘテロ欠損

者は日本人で約35%おり、この型は飲酒により血中および唾液中の発癌物質であるアセトアルデヒド濃度が長時間高く維持されることから、食道癌が約13.5倍、口腔咽頭癌の発生が約29倍にもなると言われています(Yokoyama A, Carcinogenesis 2001)。さらに、この遺伝子型患者では食道や口腔咽頭が多発癌が多いと報告されています(Yokoyama A, Ca Epidemiol Biomark Prev 2002)。また、ALDH-1Bの低活性型患者では血中アルコール濃度が長時間多角維持され、食道癌発生の危険率が4倍、ALDH-2ヘテロ欠損と重なると正常の約30倍になるとも報告されています(Yokoyama A, Carcinogenesis 2002)。非癌食道組織においてテロメア長の検討と染色体の不安定性を検討し、これらの遺伝子型のタイプごとに比較することにより、遺伝子型による危険因子とテロメア短縮との関連性が解明できると考えました。

2. 研究の目的

我々が独自に開発したQ-FISH (quantitative fluorescent in situ hybridization)法は組織中の細胞ごとにテロメア長を計測することができ、再現性があります。これまで本法を用いた口腔粘膜、食道、皮膚のテロメア解析から上皮内癌例では正常上皮と比較して、発生母地の段階から既に適度のテロメア短縮があり、染色体の不安定性が存在することを証明してきました。次の段階として、過度のテロメア短縮を引き起こす原因究明を行う目的で、食道癌の好発に関するアセトアルデヒド脱水素酵素(ALDH)1Bおよび2型遺伝子の遺伝子型によりテロメア長の差の有無を検討するため、Q-FISH法を用いて生検組織のテロメア解析を行い、癌の好発する遺伝子型とテロメア長との関係を明らかにし、さらにanaphase bridgeを計測することにより染色体不安定性との関係についても解明します。

3. 研究の方法

(1) 検体の入手・収集：対照となる正常組織は、当センター病院病理部、沢辺元司部長の管理する高齢者正常食道組織50例程度(IC取得済み、倫理委員会承認済み)を使用します。ALDH遺伝子型検索済みの患者から採取された食道生検組織は、独立行政法人国立病院機構久里浜アルコールセンターにおける病理診断後にパラフィンブロックの提供を受けます(久里浜アルコールセンター倫理委員会における承認済み)。これらの症例は遺伝子情報、病理診断および年齢・性別のみの情報を共に提供されますが、検体のテロメアおよびanaphase bridge検討が終了するまでは情報

を伏せた状態で解析を行います。(分担：泉山、仲村)

(2) 組織の検定：食道上皮のテロメア解析には基底細胞および傍基底細胞におけるテロメア長の検討が必要なため、基底細胞の明瞭に認められない検体は解析から除きます。(分担：相田)

(3) 組織 FISH 法によるテロメア長測定のコントロールとなるセルブロックの作製：TIG-1 細胞のセルブロックを作製します。各セルブロックは安定した実験結果(TCR)を示すこと(予備実験済み)から、一定の厚さに薄切し、目的とする組織切片と同一のスライドグラス上で FISH を行い、解析を行います。

(分担：泉山)

(4) 免疫組織化学的検定：食道生検パラフィンブロックを薄切し、免疫組織化学的染色により細胞増殖マーカー(Ki-67)による増殖帯の把握、サイトケラチン(CK13, 17, 19)の分布等を検討します。(分担：相田)

(5) 組織 Q-FISH 法による食道生検組織切片からのテロメア長を測定：食道生検パラフィンブロックから FISH 用組織切片を作製します。組織 FISH 法は、切片を以前に報告した方法(Aida J, Hum Pathol, 38; 1192-1200, 2007)により蛍光色素でラベルした PNA プローブを用いて行います。FISH 標本は撮影用ソフト Image Pro Plus ver. 7.0 を用いて撮影し、独自に開発したテロメア長測定ソフト(Tissue Telo ver. 3)を用いて TCR を求めることによりテロメア長を解析・比較します。コントロールとして同一スライドグラス上において FISH を行ったセルブロックの TIG-1 細胞のテロメア長を解析・比較します。コントロールとしてセルブロックの TIG-1 細胞 TCR により除した NTCR を用いることで症例・各個体間の比較が可能になります(セルブロックは切片の厚さ、FISH の機会を異にしても十分一致した値を示しますが、さらに正確を期します)。各症例ごとに約 500 細胞(各細胞群ごとに約 150-200 細胞)の解析を行うため、極めて大きな労力が必要です。(分担：泉山、仲村、相田)

(6) 正常粘膜についての結果のまとめと統計学的検定：正常食道組織については基底細胞・傍基底細胞に分類して NTCR を測定し各群について比較検討します。(分担：泉山、仲村)

4. 研究成果

我々独自のテロメア Q-FISH 法を用いることで、口腔や食道の上皮内癌例では正常上皮と比較して発生母地の段階から既に過度のテロメア短縮があり、染色体の不安定性が存在することを証明してきた。今回は過度のテロメア短縮を引き起こす原因の究明を行なうため、食道癌の好発に関連するアルコールの

代謝酵素(ADH1B および ALDH2)の遺伝子型ごとのテロメア長の検討を試みた。独立行政法人国立病院機構久里浜アルコール症センターにおけるアルコール多飲者のヨード不染帯から得られた非癌部食道生検組織を用いてテロメア長の解析を行ない、癌の好発する遺伝子型とテロメア長との関係を検討した。内視鏡所見や喫煙についても検討した。

その結果、アルコール症症例のテロメア長平均値は非アルコール症対照群のテロメア長よりも有意に短縮していた。しかし、アルコール代謝酵素の遺伝子型については、アルデヒド脱水素酵素(ADH2*1/*1=active)および(ADH2*1/*2=inactive)各群、またアルコール脱水素酵素(ADH1B*1/*2 or *2/*2=active)および(ADH1B*1/*1=less active)の各群で比較しても有意な差は見られなかった。一方内視鏡所見ではヨード不染帯の大きさが小さい(<10mm)よりも大きい(>=10mm)群、不染帯が多発していない(内視鏡 1 視野で 10 個未満)群よりも多発している(1 視野で 10 個以上)例で有意にテロメアの短縮が見られた。喫煙については喫煙指数が 800 以上では 800 以下の群よりも短縮していましたが、有意な結果が得られなかった。

以上より、今回の検討では検討対象をアルコール多飲者としたためにアルコールの多飲によりテロメアが既に過度の短縮を生じていて差が明らかにならなかった可能性、ヨード不染帯からの生検を用いていることから、ヨード不染帯という所見が既にテロメア短縮を来した状態である可能性が考えられた。

【結論】アルコールは代謝酵素の genotype に関わりなく、アルコールの多飲はテロメア長を短縮させることが証明されました。アルコール症患者には食道扁平上皮癌が好発することから、食道上皮の 10 mm 以上のヨード不染帯や不染帯の多発は癌の発生に關与している可能性が示されました。

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 4 件)

1. Aida J, Shimomura N, Nakamura K. (他 9 名), Telomere Shortening in the Esophagus of Japanese Alcoholics: Relationships with Chromoendoscopic Findings, ALDH2 and ADH1B Genotypes and Smoking History, PLOS One, 査読有, 2013, 8: e63860
2. Sanada Y, Aida J, Kawano Y, Nakamura K, Shimomura N. (他 16 名), Hepatocellular telomere length in biliary atresia measured by Q-FISH, World J Surg, 査読有,

2012, 36(4):908-16

3. Ishikawa N, Nakamura K, Izumiya-Shimomura N, Aida J, Ishii A, Goto M, Ishikawa Y, Asaka R, Matsuura M, Hatamochi A, Kuroiwa M, Takubo K.

Accelerated in vivo epidermal telomere loss in Werner syndrome, Aging, 査読有, 2011, 3: 417-429

4. Aida J, Yokoyama A, Izumiya-Shimomura N, Takubo K. 他. Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus. J Pathol, 査読有, 223, 2011, 410-416

〔学会発表〕(計2件)

1. 田久保海誉、相田順子、泉山七生貴、仲村賢一、他3名、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、2011年3月28日、横浜

2. 相田順子、田久保海誉、泉山七生貴、仲村賢一、他3名、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年3月29日、横浜

3. 仲村賢一、田久保海誉、相田順子、泉山七生貴、他4名、Q-FISH法による膀胱癌の悪性度とテロメア長、2011年3月30日、横浜

4. 泉山七生貴、仲村賢一、田久保海誉、相田順子、他3名、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方法と睥島細胞種別テロメア長の解析、2011年3月30日、横浜

5. Aida J, Izumiya-Shimomura N, Nakamura K, N, Takubo K. 他, Telomere Shortening in Esophageal Epithelium of Alcoholics: Differences in Terms of ADH-1B and ALDH-2 Genotypes and Chromoendoscopy Findings, 101st Annual Meeting of United States & Canadian Academy of Pathology, Vancouver, Canada, 2012.3.19, Vancouver, Canada

6. 石川 直, 仲村賢一, 田久保海誉、相田順子、泉山七生貴、他3名、ウェルナー症候群患者皮膚テロメア長は正常人群と比べ急速に短縮する -TRF データの重回帰統計解析-, 第101回日本病理学会総会、2012年4月26日、東京

7. 相田順子、泉山七生貴、仲村賢一、他6名、食道扁平上皮癌の危険因子とテロメア: ALDH2, ADH1Bのgenotypeと色素内視鏡所見、第101回日本病理学会総会、2012年4月27日、東京

8. 眞田幸弘, 田久保海誉、相田順子、泉山七生貴、仲村賢一、他2名、胆道閉鎖症肝のテロメア長と細胞老化関連β-galactosidaseの解析、第101回日本病理学会総会、2012年4月28日、東京

9. 相田順子、下村七生貴、仲村賢一、他5名、アルコール症患者における食道上皮のテロメア短縮: 色素内視鏡所見、ADH-1Bおよ

びALDH-2ジェノタイプによる検討、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、札幌

〔その他〕

ホームページ等

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 高齢者がんグループホームページ

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

東京都健康長寿医療センター

<http://www.tmghig.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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・助手

研究者番号: 10158751

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

相田 順子 (AIDA JYUNKO)

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