

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0125

研究課題名(和文) 幹細胞における老化機序解明と組織再生へ向けた試み

研究課題名(英文) Mechanisms of aging in the tissue progenitor cells and tissue regeneration

研究代表者

松田 陽子 (Matsuda, Yoko)

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：20363187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：テロメアは染色体末端の保護装置であり、テロメア短縮によって染色体不安定性が惹起されることが発癌過程において重要な役割を担う。本研究では、テロメアが長い細胞を膵臓の組織前駆細胞として同定し、その加齢による変化や癌との関連を検討した。その結果、膵管>腺房中心細胞>腺房の順に、組織前駆細胞様の細胞が多く存在していた。加齢とともに組織前駆細胞は数の減少とテロメア長の短縮を示した。また、担癌者では、非腫瘍部のテロメア長の短縮を認めた。以上の結果より、加齢に伴って組織前駆細胞でのテロメアの異常が引き起こされ、発癌に至ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、組織前駆細胞と発がんとの関連が明らかとなった。これにより、がんの予防、診断、治療法開発につながる基礎的情報が入手できた。また、加齢による膵臓の変化が明らかになったことから、高齢者の発がんや膵臓の機能異常の機序の解明に繋がる可能性がある。膵臓だけでなく、他の臓器にも応用可能であり、その波及効果は広いと考える。

研究成果の概要(英文)：Telomeres are regions with tandem repeats of nucleotide sequences (TTAGGG) at each end of a chromatid in eukaryotes, and plays a key role in preventing chromosomal instability. In this study, we analyzed telomere length in exocrine cells of the human pancreas with and without cancer. The telomere length was the longest in ducts, followed by centroacinar cells, and acinar cells. Telomere length in duct, centroacinar and acinar cells decreased with age. The rate of decline in telomere length due to age was greater in duct cells, followed by centroacinar cells, and acinar cells. The length of telomeres in the duct and centroacinar cells of pancreatic cancer cases was shorter than that in the cells of the cases without cancers. In conclusion, critical telomere dysfunction in the centroacinar-acinar region is possibly due to high annual telomere attrition, which leads to chromosomal instability and carcinogenesis in the pancreas.

研究分野：腫瘍病理

キーワード：老化 テロメア 膵癌 組織前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2.

膵臓はインスリン、グルカゴン等のホルモンを血中に分泌する内分泌腺であるラ氏島と、膵液を小腸に分泌する外分泌腺である腺房細胞、膵管から成る。加齢に伴い、膵からのインスリン分泌障害と末梢組織におけるインスリン抵抗性によって、糖尿病を発症し、さらに糖尿病が重大な心血管障害や悪性腫瘍の発症を促進する。インスリン抵抗性や高血糖の状態は酸化ストレスを増加させ、寿命の短縮につながる (Kappeler, et al. Plos Biol, 2008)。また、加齢に伴い、膵癌の前駆病変 (前癌病変) が高頻度に形成され、難治性の膵癌の発症が増加する。したがって、膵臓の老化に伴う変化は健康寿命に大きな影響を及ぼす。

多分化能、自己複製能を有する組織幹細胞は膵臓にも存在し、損傷を受けた際に、内分泌細胞、及び外分泌細胞に分化し、膵臓の恒常性維持と組織再生を担う。哺乳動物では老化によって恒常性と再生能が徐々に失われるため、組織幹細胞の老化は個体老化の中心的役割を担うと考えられる。しかし、膵臓の組織幹細胞の存在部位や発現マーカーについては、動物実験や培養細胞を用いた検討が中心であり、ヒトでは解明されていない。幹細胞は、組織内のニッチと呼ばれる微小環境により制御を受け、生涯を通して未分化性を維持する。そのため培養細胞系ではなく、ヒト生体内での幹細胞の同定と解析が重要と考えられる。幹細胞はテロメラーゼ活性を有し、細胞分裂を繰り返してもテロメア長が維持されるため、テロメアが長い細胞は組織幹細胞とみなすことが可能である。そこで本研究では、ヒト組織検体でテロメア長を定量評価可能な quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) 法を用い、膵組織内の各細胞のテロメア長を測定し、テロメア長が最も長い細胞を決定、組織幹細胞の候補として解析する。この方法を用いることでヒトの生体内での組織幹細胞の局在を正確に解析可能である。本研究によって、組織幹細胞を標的とした修復機能改善による治療的老化制御法の開発につなげられる。また、本研究は膵臓だけでなく、他の臓器の幹細胞研究にも応用可能であり、その影響は広範囲に及ぶものと考えられる。膵内分泌細胞から分泌されるインスリンは、栄養状態の調節や酸化ストレスを介して、体全体の老化の進行に重要な役割を担うため、組織幹細胞の老化からアプローチした、膵臓、及び体全体の老化制御機構の解明へ向けた新たな知見が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、テロメア長維持という幹細胞の重要な性質に着目し、組織幹細胞を同定する。本研究により、加齢に伴うヒト生体内での組織幹細胞の役割を解明し、組織幹細胞の老化制御による膵臓の老化予防を目指す。

膵組織幹細胞に関する研究は、重症糖尿病に対する膵島移植の方面から盛んに研究が成されている。培養細胞や動物実験では、胚性幹細胞や iPS 細胞等の多能性幹細胞からインスリン分泌細胞を作成する試みが行われている。しかし、ヒトの生体内で膵組織幹細胞は同定されておらず、老化と膵組織幹細胞の関連については解明が進んでいない。加齢に伴う膵臓の機能の変化の解明や病的状態に対する治療法開発のために、組織幹細胞の加齢における変化を解明することは重要であると考えられる。また、加齢における組織幹細胞が与える影響を解明することは、老化の機序解明においても新たな知見が得られる可能性がある。

3. 研究の方法

材料

## 病理解剖 186 症例の膵臓のホルマリン固定パラフィンブロック

### 方法

2 $\mu$ m厚に薄切し、テロメア (telo C-Cy3 probe, '5-CCCTAACCCCTAACCCCTAA-3'; Fasmac, Kanagawa, Japan) とセントロメア (Cenp1-FITC probe, '5-CTTCGTTGGAAACGGGGT-3'; Fasmac) に対するPNAプローブを用い、Q-FISH法を行った。画像を撮影し (ORCA-ER-1394, Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu, Japan)、画像解析ソフトTissueTelo Ver. 3.1にてテロメアとセントロメアの蛍光強度を測定した。同スライドガラス上にコントロール切片を載せ、同様にQ-FISHを実施し解析に用いた。

それぞれ100細胞以上の蛍光強度を測定し、テロメアとセントロメアの比を算出し、コントロール切片との比を算出することで、相対的なテロメア長の測定値とした。

腺房、腺房中心細胞、膵管それぞれの細胞のテロメア長を測定し、年齢、膵癌の有無との関連を統計解析した。

## 4. 研究成果

### ヒト膵組織における加齢に

#### よるテロメア長の変化

FISH法にてヒト膵組織の各細胞のテロメア長を測定した。その結果、いずれの細胞もテロメア長は加齢とともに短縮した (図 1)。生下時には、テロメア長は膵管 > 腺房中心細胞 > 腺房の順に長く、加齢に伴うテロメア長の短縮のスピードもこの順に速かった。

生下時には、膵管、腺房中心細胞、腺房において、テロメア長は細胞ごとに異なっていたが、加齢とともに短縮し、高齢者ではほぼ同じ値を示した。

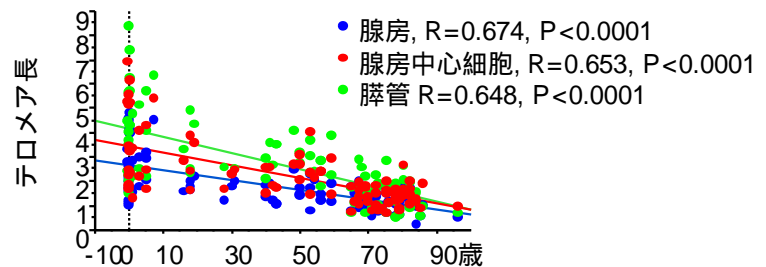


図1 膵組織における加齢によるテロメア長の短縮

### ヒト膵組織における加齢による長いテロメアを有する細胞の割合の変化

上述のテロメア長の測定結果から、長いテロメアを有する細胞の割合を算出した。その結果、長いテロメアを有する細胞の割合は、いずれの細胞においても加齢とともに減少した (図 2)。生下時には、長いテロメアを有する細胞は、膵管 > 腺房中心細胞 > 腺房の順に多く、加齢に伴う数の減少のスピードもこの順に速かった。

以上の結果より、生下時には長いテロメア長を有する組織前駆細胞が、膵管 > 腺房中心細胞 > 腺房の順に多く

存在していることが示唆される。また、加齢とともに組織前駆細胞の数は減少すること、組織前駆細胞のテロメア長が短縮し増殖能力が低下することが示唆される。

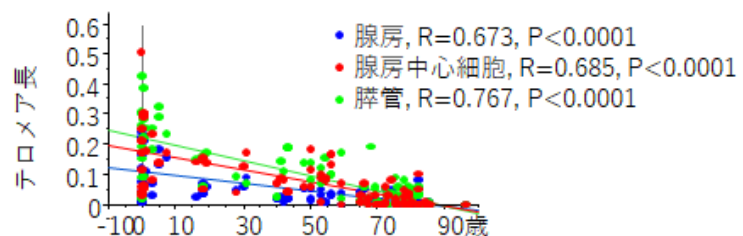


図2 膵組織における加齢による長いテロメアを有する細胞の減少

## 膵癌症例におけるテロメア長の変化

各細胞のテロメア長について、膵癌症例と非膵癌症例に分けて比較検討した。その結果、腺房中心細胞と膵管では、膵癌症例で非膵癌症例に比べて、テロメア長が短縮していた(図3)。腺房では有意差を示さなかった。

膵癌症例では、非腫瘍部の背景膵組織においても、テロメア長の

短縮が認められることが明らかとなった。背景膵組織のテロメアの異常と発がんとの関連が示唆される。

### テロメア長短縮と染色体不安定性との関連

染色体不安定性の組織学的指標である異常核分裂像 anaphase bridge とテロメア長との関連を調べた。その結果、テロメア長は異常核分裂像の数と負の相関を示した(Matsuda, Pancreatology, 2016)。テロメア長の短縮により、染色体不安定性が惹起されることを組織学的に明らかにした。

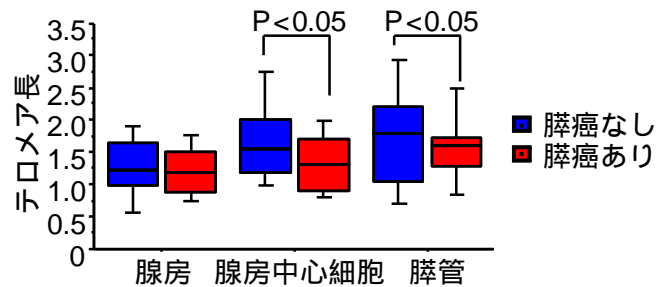


図3 膵癌症例におけるテロメア長の短縮

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Clinicopathological features of 15 occult and 178 clinical pancreatic ductal adenocarcinomas in 8339 autopsied elderly patients. Matsuda Y, Ishiwata T, Yachida S, Suzuki A, Hamashima Y, Hamayasu H, Yoshimura H, Honma N, Aida J, Takubo K, Arai T. *Pancreas*. 45(2):234-40, 2016
2. Mitotic index and multipolar mitosis in routine histologic sections as prognostic markers of pancreatic cancers: A clinicopathological study. Matsuda Y, Yoshimura H, Ishiwata T, Sumiyoshi H, Matsushita A, Nakamura Y, Aida J, Uchida E, Takubo K, Arai T. *Pancreatology*. 16(1):127-32, 2016
3. Systemic Administration of Small Interfering RNA Targeting Human Nestin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Metastasis. Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamashita S, Ushijima T, Arai T. *Pancreas*. 45(1):93-100, 2016
4. Do 2-cm pancreatic tumors localize in the pancreas? Analysis of the greatest and smallest diameter of the autopsied pancreas. Matsuda Y, Ishiwata T, Seki A, Nonaka K, Aida J, Takubo K, Kimura W, Arai T. *Bulletin of the Yamagata University. Medical science: Yamagata medical journal*. 34:37-41, 2016
5. Nestin phosphorylation at threonines 315 and 1299 correlates with proliferation and metastasis of human pancreatic cancer. Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamahatsu K, Minamoto T, Arai T. *Cancer Sci*. 108(3):354-361, 2017
6. The Prevalence and Clinicopathological Characteristics of High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Autopsy Study Evaluating the Entire Pancreatic Parenchyma. Matsuda Y, Furukawa T, Yachida S, Nishimura M, Seki A, Nonaka K, Aida J, Takubo K, Ishiwata T, Kimura W, Arai T, Mino-Kenudson M. *Pancreas*. 46(5):658-664, 2017
7. Relationship between pancreatic intraepithelial neoplasias, pancreatic ductal adenocarcinomas, and single nucleotide polymorphisms in autopsied elderly patients. Matsuda Y, Tanaka M, Sawabe M, Mori S, Muramatsu M, Mieno MN, Furukawa T, Arai T. *Genes Chromosomes Cancer*. 57(1):12-18,

2017

8. Clinicopathological characteristics of distant metastases of adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and urothelial carcinoma: An autopsy study of older Japanese patients. Matsuda Y, Seki A, Nonaka K, Kakizaki M, Wang T, Aida J, Ishikawa N, Nakano Y, Kaneda D, Takata T, Takahashi-Fujigasaki J, Murayama S, Takubo K, Ishiwata T, Sawabe M, Arai T. *Geriatr Gerontol Int.* 18(2):211-215, 2018

9. Telomere length determined by the fluorescence in situ hybridisation distinguishes malignant and benign cells in cytological specimens. Matsuda Y, Suzuki A, Esaka S, Hamashima Y, Imaizumi M, Kinoshita M, Shirahata H, Kiso Y, Kojima H, Matsukawa M, Fujii Y, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Ishiwata T, Nishimura M, Arai T. *Cytopathology.* 29(3):262-266, 2018

10. Age-related pathological changes in the pancreas. Matsuda Y. *Frontiers in Bioscience, Elite.* 10, 178-183, 2018

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Clinicopathological characteristics of precancerous lesions of the pancreas in autopsies. Matsuda Y. 62<sup>nd</sup> Autumn Meeting of Japanese Society of Pathology, Lecture B, 2016.

2. Single nucleotide polymorphisms in ARHGAP17 are associated with pancreatic intraepithelial neoplasia. Matsuda Y, Tanaka M, Suzuki A, Seki A, Nonaka K, Nishimura M, Ishiwata T, Yoshimura H, Takubo K, Arai T. The 107<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR), 2016.

3. High-grade PanIN/carcinoma *in situ* of the pancreas associated with cystic changes and fibrosis – analysis of the entire pancreas in autopsies. Matsuda Y, Furukawa T, Yachida S, Nishimura M, Seki A, Nonaka K, Aida J, Takubo K, Ishiwata T, Kimura W, Arai T, Mino-Kenudson T. 47<sup>th</sup> Annual meeting of the American Pancreatic Association, 2016.

4. Immunohistochemical Analysis of Pancreatic Cancers by Using EUS-FNA Samples. Matsuda Y, Esaka S, Imaizumi M, Hamashima Y, Shirahata H, Kinoshita M, Matsukawa M, Suzuki A, Nishimura M, Arai T. 19<sup>th</sup> International Congress of Cytology, 2016.

5. Pathologic assessment of tumor regression after neoadjuvant therapy for locally advanced/borderline resectable pancreatic cancer. Matsuda Y, Wo JY, Castillo CF, Blaszkowsky LS, Ryan DP, Matsushita A, Nakamura Y, Ferrone CR, Uchida E, Ishiwata T, Arai T, Hong TS, Mino-Kenudson M. 20<sup>th</sup> meeting of the International Association of Pancreatology, 2016.

6. Pathological evaluation of neoadjuvant chemoradiotherapy of the pancreatic cancer. Matsuda Y. 106<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Pathology, Workshop, 2017.

7. Characteristics of cytology, histology, and radiologic images of nodular and cystic lesions of the pancreas. Matsuda Y. 58<sup>th</sup> Spring Meeting of Japanese Society of Clinical Cytology, Workshop, 2017.

8. Pathological characteristics of cystic and nodular lesions of the pancreas. Matsuda Y. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Pancreas Society, Workshop, 2017.

9. Clinicopathological characteristics of ANCA-associated vasculitis from autopsy patients. Matsuda Y, Itabashi M, Takei T, Shimizu A, Yumura W, Arai T. The 18<sup>th</sup> International Vasculitis & ANCA Workshop, 2017.

10. Telomere shortening in pancreatic cancer is correlated to KRAS mutation. Matsuda Y, Izumiya N, Fujiwara M, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Ishiwata Y, Arai T. The 108<sup>th</sup> Annual Meeting

of American Association for Cancer Research (AACR), 2017.

11. Clinicopathological Characteristics of Recurrent Pancreatic Cancer: Analysis of Autopsies. Matsuda Y, Seki A, Nonaka K, Kakizaki M, Wan T, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Ishiwata T, Arai T. 48<sup>th</sup> Annual meeting of the American Pancreatic Association, 2017.

12. Mechanisms of Aging in Stem/Progenitor cells of the Pancreas. Matsuda Y. International Symposium of Cancer Research Institute, Kanazawa University, 2017.

13. Age related changes of the pancreas. Matsuda Y. 11<sup>th</sup> Korea-Japan Gastrointestinal Pathology Seminar, 2018.

14. Concordance of tumor regression grade after neoadjuvant therapy for locally advanced/borderline resectable pancreatic cancer (LA-PDAC). Matsuda Y, Kojima M, Fukumura Y, Hirabayashi K, Yamaguchi H, Ishiwata T, Arai T, Mino-Kenudson M. United States & Canadian Academy of Pathology, 2018 Annual Meeting. 2018.

〔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〕

ホームページ等 特記事項なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：石渡俊行

ローマ字氏名：Toshiyuki Ishiwata

所属研究機関名：東京都健康長寿医療センター研究所

部局名：

職名：研究部長

研究者番号(8桁): 90203041

研究分担者氏名：松下晃

ローマ字氏名：Akira Matsushita

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 70449263

### (2)研究協力者 特記事項なし