

機関番号：32653

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591555

研究課題名 (和文) 遺伝子・染色体 FISH とテロメア組織 Q-FISH 法を用いた乳癌予後診断の臨床応用

研究課題名 (英文) Clinical application and prognostication in human breast cancer using tissue quantitative fluorescence in situ hybridization.

研究代表者

神森 眞 (KAMMORI MAKOTO)

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50292868

研究成果の概要 (和文)：Q-FISH法でテロメア長を測定した結果、すべての乳癌細胞のテロメア長は正常細胞に比べ短縮していた。その中で、癌細胞のテロメア長が極めて短縮している検体が4例存在し、これらの組織学的腫瘍径は、その他の例に比べ有意に大きかった。

研究成果の概要 (英文)：We analyzed the telomere length by tissue Q-FISH. Almost breast cancer cells had shortened telomere in comparison with the normal cells. In specific four cases that showed the extremely short telomere length, the tumor size was significantly higher than other cases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：乳癌、遺伝子・染色体、FISH、テロメア、予後診断

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌および食道組織で、組織切片上でQ-FISH法により細胞ごとのテロメア長を比較する方法を確立し、これを報告した(Oncology, Kammori et al)。この方法を利用し、甲状腺乳頭癌では、腫瘍径が20mm(T2)を超え内深頸リンパ節領域まで転移を示す進行癌で他の正常組織と比較し有意にテロメア短縮が出現していた。また、正常濾胞細胞は老化に伴い有意にテロメア短縮を示したが、その他の正常細胞(線維芽細胞等)では有意差を認めなかった。甲状腺乳頭癌の未分化転化に

は、老化と腫瘍の増大が関与していると推測される。腫瘍径に依存してテロメア短縮が起きていることとその背景因子である濾胞細胞が老化によるテロメア短縮を認めることは、これらを支持する結果である。甲状腺未分化癌の培養細胞である OCUT-1 を用いた実験(Int J Mol Med, Kammori et al)では、未分化癌はテロメラーゼ活性を維持しつつも他の正常細胞と比較して有意に短いテロメア長を有していた。

乳癌におけるテロメア長の研究では、Southern blotting 法や slot blot 法を用い

た解析がなされており、乳癌組織においてもテロメア長が短縮していた。しかし、これらのデータは、組織学的グレードや予後といった臨床的な要素と必ずしも一致していない。これらの不一致は、Southern blotting 法や slot blot 法の限界によるものであると思われる。すなわち、Southern blotting 法や slot blot 法では、個々の細胞のテロメア長を測定することができず、炎症性の細胞や他の間質細胞が混在した状態での測定しかできない。

FISH 法は、組織切片上で細胞ごとに遺伝子検索ができるので、この技術を応用した乳癌の基礎研究をおこなう必要があるという考えに至った。

## 2. 研究の目的

乳癌診療における遺伝子診断の利用が日常診療に応用されるためには prospective な臨床研究でその有用性が検証される必要があると思われる。そこで、FISH 技術を応用し乳癌組織検体とその対応する正常乳腺組織検体および乳腺細胞診検体を用いて HER2 gene, BRCA1 gene, BRCA2 gene, p53, hTERT gene などの乳癌関連遺伝子とその遺伝子の局在する染色体 (Chr17 など) の異数体発現と組織 Q-FISH による telomere 長測定 (我々の開発した国内特許 (特願 2005-55726) : テロメア長測定による正常細胞と癌細胞の鑑別法) を行い、乳癌遺伝子診療の臨床応用への基礎研究として検討したい。この研究により、乳癌外科学と乳癌診療に貢献できればと考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織検体

2005 年から 2007 年に東京女子医科大学で乳癌と診断されたため乳房切除術を行った患者約 60 人の乳腺組織を用いた。常法に従いパラフィン包埋後、4 $\mu$ m の切片を作成した。組織は癌部と正常部で比較検討した。

### (2) 腫瘍の分類

腫瘍の分類は組織学的分類、病期分類 (stage)、TNM 分類を The International Agency for Research on Cancer, World Health Organization classification, Union for International Cancer Control に従い分類した。

### (3) Tissue Q-FISH

脱パラフィンしたスライドを、ペプシン、RNase で前処理をした。その後、peptide nucleic acid (PNA) に Cy3 を結合した telomere probe (telo C CY3 probe : 5'-CCCTAACCTaaCCCTAA-3')、および FITC を結合した centromere probe (Cenp 1 probe : 5'-CTTCGTTGGAACGGGGT-3') で hybridize した。核染は、47,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。

### (4) テロメア長の測定

FISH イメージ (図 1) を DAPI/FITC/Cy3 のフィルターをセットした蛍光顕微鏡で観察し、CCD カメラで画像を保存した。保存した画像についてオリジナルのソフトウェア (Tissue Telo) 用い、DAPI (blue channel)、FITC (green)、Cy3 (red) のカラーイメージで蛍光強度を測定し、テロメアとセントロメアの比 (telomere-to-centromere ratio (TCR)) を求め、出現頻度で表した (図 2)。

## 4. 研究成果

乳癌と診断されたため乳房切除術を行った患者 60 人の平均年齢は 54 $\pm$ 13 才であった。採取した乳腺の組織学的分類は、硬癌 21 例、充実腺管癌 19 例、乳頭腺管癌 18 例、浸潤性小葉癌 1 例、その他 (小葉癌) 1 例であった。触診径および組織学的腫瘍径は、それぞれ 2.5 $\pm$ 1.2 cm、2.1 $\pm$ 1.4 cm であった。また、病期診断の Stage は、0 が 3 例、I が 22 例、IIa が 24 例、IIb が 5 例、IIIa が 1 例、IIIb が 2 例、IIIc が 1 例であった。

乳頭腺管癌 5 例、充実腺管癌 3 例、硬癌 6 例についてそれぞれの癌細胞、それに対応する正常細胞のテロメア長を組織 Q-FISH 法で測定し比較検討したところ、14 検体すべての癌細胞で正常細胞に比べ、テロメア長の短縮が認められた (図 1、2)。その中でも、TCR が 0~1 に多く認められ、癌細胞のテロメア長が極めて短縮している検体が 4 例存在した (図 2A)。また、これら 4 例とその他の 10 例 (図 2B) の組織学的腫瘍径は、それぞれ 3.6 $\pm$ 1.5 cm、1.7 $\pm$ 1.0 cm であった。両者間には有意差が認められた (P=0.016)。

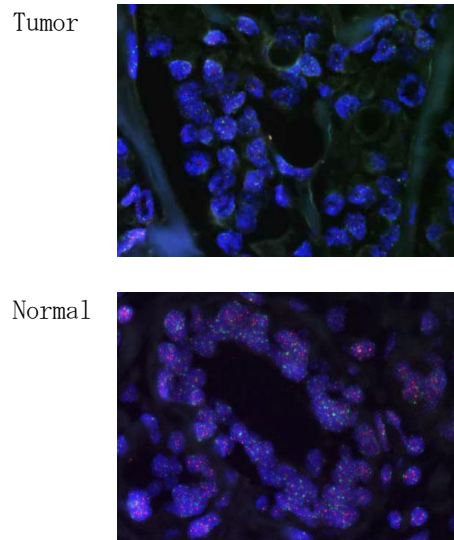


図 1 : Q-FISH 法による画像 (X400)  
癌組織 (上)、正常組織 (下)  
テロメア; Red (Cy3)、セントロメア;  
green (FITC)、核; blue (DAPI)

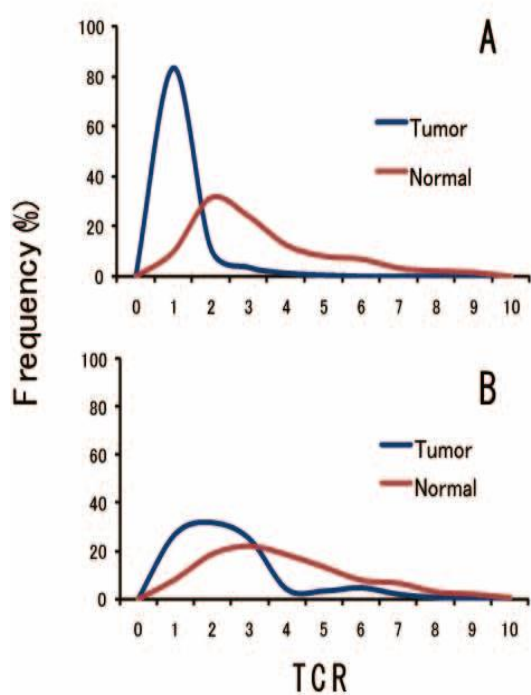


図2：TCR の出現頻度  
乳癌組織（青）と対応する正常組織（赤）

これらの結果より、腫瘍が大きい症例ではテロメア長が顕著に短縮する傾向が認められた。

今後さらに、多くの乳癌組織について検討を行う予定である。

## 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 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. *Mechanisms of Ageing and Development* 131:614-624, 2010. 査読有

② Kurabayashi R, Takubo K, Aida J, Honma N, Poon SSS, Kammori M, Izumiya-Shimomura N, Nakamura K, Tsujil E, Matsuura M, Ogawa T, Kaminishi M. Luminal and cancer cells in the breast show more rapid telomere shortening than myoepithelial cells and fibroblasts. *Human Pathology* 39, 1647-1655, 2008. 査読有

③ Aida J, Izumiya-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SSS, Kammori M, Sawabe M, Arai T, Fujiwara F, Kishimoto K, 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

④ Kammori M, Kurabayashi R, Kashio M, Sakamoto A, Yoshimoto M, Amano S, Kaminishi M, Tetsu Yamada, Takubo K. Prognostic utility of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for determination of HER2 gene amplification in breast cancer. *Oncology Reports* 2008. 19:651-656. 13(16-3, 16). 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

① 神森真、テロメラーゼ活性と hTERT 発現による副甲状腺癌補助診断への応用、第 22 回日本内分泌外科学会、2010. 6. 11-12、大阪

② 神森真、組織 Q-FISH 法によるテロメア長解析とテロメラーゼ活性を用いた甲状腺濾胞癌の補助診断、第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010. 4. 8-10、名古屋

③ Kammori M, Demonstration of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human parathyroid tumors, The 21th APEC, 2010. 1. 9, Taiwan

④ Kammori M, Takubo K, Yamada T. Demonstration of telomere measurement in human papillary carcinoma of the thyroid by tissue quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH). The 20<sup>th</sup> APEC, Guam, 2009. 1. 11-12,

⑤ 神森真、小川 利久、小野瀬 裕之、山田 恵美子、清水 一雄、二村 浩史、瀬戸 泰之、山田 哲；h-TERT 発現による甲状腺濾胞癌の診断-基礎から臨床応用への展望。第 70 回日本臨床外科学会総会。（パネルディスカッション 7. 甲状腺濾胞癌に対する最新の診断法と治療）。東京。2008. 11. 27-29,

⑥ 神森真、柏尾光彦、倉林理恵、坂本 明子、天野定雄、田久保海蒼；甲状腺乳頭癌と甲状腺正常組織の組織 Q-FISH 法を用いたテロメア長解析。第 108 回日本外科学会定期学術集会 (SF)。長崎 2008. 5. 15-17,

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

神森 真 ( KAMMORI MAKOTO )

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：50292868

(2)研究分担者

岡本 高宏 ( OKAMOTO TAKAHIRO )  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70194397

(3)連携研究者

小林 槇雄 ( KOBAYASHI MAKIO )  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80060086