

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24年 6月15日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390109

研究課題名（和文） 独自のFISH法によるヒト癌発生母地のテロメア機能不全と染色体の不安定化の証明

研究課題名（英文） Telomere dysfunction and chromosomal instability in uninvolved tissue with carcinoma by original FISH

研究代表者

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）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：00154956

研究成果の概要（和文）：癌の発生母地のテロメア機能不全とアルコール多飲がテロメアを短縮することを証明した。Werner 症候群患者の表皮における加速したテロメア短縮を初めて証明した。ヒト下垂体テロメアの年間短縮率を報告した

研究成果の概要（英文）：1. We demonstrated telomere dysfunction in the uninvolved epithelium with esophageal squamous cell carcinoma and telomere shortening occurred due to excessive alcohol consumption. 2. We first demonstrated excessive telomere shortening of the epidermis in Werner's syndrome patients. 3. We reported the annual reduction-rate of telomere in the human pituitary gland.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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、FISH、染色体不安定性、ヒト癌

1. 研究開始当初の背景

(1)高齢者では高頻度に癌を体内に持ち、高齢者剖検例の担癌率(体内に癌を持つ割合)は、70歳以上では50%を超えています。このために、「高齢者では、なぜ癌が爆発的に発生してくるのか」を研究してきました。単に長い年月の変異の蓄積が、ある閾値を超えることが原因とは、以下により考えられません。つま

り、小児では癌腫が少なく(9%)、成人では癌腫の割合が高い(84%)ののですが、この割合の変化を単純な変異の蓄積説では説明できません

(2) 現在までの報告では、癌の爆発的増加は、発生母地の1. テロメア短縮と引き続くテロメア機能不全による染色体の不安定化、2. エピジェネティックな変化、3. 微小環境の変化、

に原因が求められています。また、加齢に伴いなぜ癌が増加するかについては、癌組織・癌細胞だけを研究することでは解決は不可能であり、担癌臓器の非癌部（発生母地）と非担癌臓器（真の正常臓器）の比較が重要です。しかし、発生母地に対する研究手法は乏しく、さらに非癌組織からの培養細胞の入手が困難なことから、発生母地の研究は極めて乏しいのが現状です。

(3)我々は現在までに非担癌臓器のテロメア長をほぼ全臓器で測定し、「正常臓器・組織では、加齢により、例外を除いてテロメアが短縮する」ことを証明しました(表1)。また、テロメア長は個体差が大であること(田久保他 Exp Gerontol. 37,523-02 など)、早老症(癌好発症候群でもあり)における加速したテロメア短縮を報告してきました。普遍化した結論を表す表1に関しては、老化専門誌の総説の中で、1 ページにわたり紹介され(Baird DM. Exp Gerontol 43: 15-19, 08)、また、9行にわたり引用され(Kappei D et al. Mech Age Dev 129:17-26,08)高く評価されました。このような普遍的結論を得る作業と同様に、「癌の発生母地ではテロメアが短く、染色体の不安定化が存在する」という仮説を多臓器・組織で証明しようと計画しました。

表1 ヒト組織別の年間テロメア短縮率報告一覧

組織	年間短縮率 bp	検体サンプル数	年齢幅 歳	発表年と著者
1. 末梢血	33	47	20-85*	1990 Hastie et al.
2. 表皮細胞	19.8	21	0-92	1991 Ludesz et al.
3. 縦横平滑筋	15	43	0-93	1992 Alessi et al.
4a. 末梢リンパ球	41	140	0-107	1993 Vaziri et al.
4b. 末梢リンパ球 (twin pairs)	31	123	2-95	1994 Singhoom et al.
4c. CD4+ T cells	35	121	0-94	2000 Son et al.
CD8+ T cells	26	121	0-94	2000 Son et al.
CD19+ B cells	19	121	0-94	2000 Son et al.
5. 小腸および大腸粘膜	42	53	0-89	1996 Hiyaama et al.
6. 食道上皮	60	177	0-102	1999 Takubo et al. ††
7a. 血管内皮細胞	47-147	13	3-102	1999 Chang et al.
7b. 血管内皮細胞	25	51	1m-90	1999 Okada et al.
8. 血管中膜	25	51	1m-80	1999 Okada et al.
9a. 腎皮質	29	24	0-88	2000 Meik et al.
9b. 腎皮質	46	137	0-101	2002 Takubo et al. ††
10. 腎皮髄質	96/13	20	0-88	2000 Meik et al.
11. 胃粘膜	47	58	0-99	2000 Furugori et al. †
12a. 肝組織	120	23	17-81	2000 Aikata et al.
12b. 肝組織	55	94	0-101	2002 Takubo et al. ††
12c. 肝組織	60	191	0-104	2002 Takubo et al. ††
13. 大腸粘膜	59	129	0-97	2000 Nakamura et al. †
14a. 大腸皮質	NSD	137	0-104	2002 Takubo et al. ††
14b. 大腸皮質	NSD	72	0-100	2007 Nakamura et al. ††
15. 大腸白質	20	72	0-100	2007 Nakamura et al. ††
16. 心筋	NSD	168	0-104	2002 Takubo et al. ††
17. 脾	29	30	0-102	2002 Takubo et al. ††
18. 甲状腺	90	44	0-98	2002 Kamori et al. ††
19. 甲状腺	94	19	0-83	2002 Kamori et al. ††
20a. 皮膚表皮	36	52	0-101	2002 Nakamura et al. ††
20b. 皮膚表皮	9	100	2006 Sugimoto et al.	
21. 真皮	11	60	2006 Sugimoto et al.	
22. 骨髄	30	48	0-101	2002 Nakamura et al. ††
23. 骨髄	72*	100	16-70	2003 Takasaki et al. ††
24. 脾	36	69	0-100	2006 Isha et al. †
25. 下垂体	25	65	0-100	我々の最近のデータ †
26. ウェルナー症候群の皮膚	165	8	30-62	我々の最近のデータ †
27. ウェルナー症候群の筋肉	261	4	39-61	我々の最近のデータ †

NSD = 有意差なし bp = base pair; m = 月齢; * = 概数; † = 本グループの報告

2. 研究の目的

(1)過去の基盤研究により「ヒト組織は加齢によりテロメアが短縮する」という仮説を実証し、「癌の発生母地のテロメアは非担癌正常組織より短い」という仮説を多臓器・組織で証明する。

(2)癌の発生母地におけるテロメア短縮(テロメア機能不全を惹起)による染色体の不安定性(癌の入り口)の存在を証明する。テロメア長の測定には、独自開発の組織 Q-FISH 法(世界の 11 施設で可能ですが、本方法が正確で、容易に多数細胞を測定可能であり、細胞種ごとに測定します。

(3)染色体 p q 腕ごとに測定(Q-FISH 法、本邦で報告なし)し、染色体別測定により特異的に短縮する染色体の有無を知ります。さらに、染色体の不安定性の指標(染色体の癒合、分裂後期架橋、異数体)を培養細胞や組織切片で定量して、指標を持つ染色体のテロメア長と比較します。以上により、テロメア短縮と染色体の不安定性の指標を関連付け、テロメア短縮によるテロメア機能不全が「癌の入り口」であることを証明する。

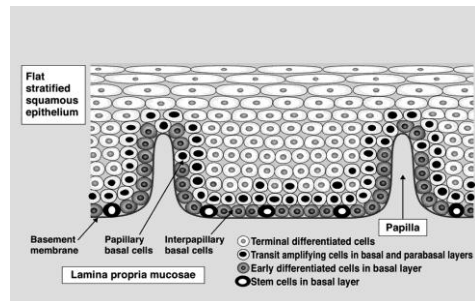
3. 研究の方法

(1)研究材料の収集:テロメア長測定を行う対象臓器・組織剖検例からの非担癌正常凍結組織は、厚労科学研究費による姉妹施設にある「健康長寿医療センター病理解剖バイオリソースセンター」(連絡先:沢辺元司病理部長)に蓄積済みです(ICあり)。

①バレット食道腺癌 200 例の内視鏡的切除標本:ドイツ Bayreuth の Stolte 教授から提供済みで、組織所見については論文採択済み。癌細胞、非癌細胞、扁平上皮細胞の 3 細胞種のテロメア長を反映する NTCR (以下の 4 に説明)を測定(分担:倉林、上垣、潮、佐々木)。

②食道粘膜:担癌非癌部上皮凍結組織は収集済み(600 例以上)。基底細胞、傍基底細胞の 2 細胞種を測定(分担:田久保)。培養細胞は担癌非癌部を 9 例収集済みで、正常上皮は剖検時採取した上皮から培養細胞を作製します。通常の病理所見は論文採択済み(業績 12)。非担癌正常上皮では、基底層のテロメ

ア長が長いことを報告済み(図 1)。基底層に長いテロメアを持つ細胞が多く傍基底層と棘細胞層のテロメア長は同じです。以上から幹細胞が基底層、Transit amplifying cell が傍基底層にあると推定



ア長が長いことを報告済み(図 1)。

③胃粘膜:担癌非癌部粘膜は多数例から収集済みで、非担癌正常部は、胃潰瘍例の生検標本を使用。担癌非癌部、癌、胃潰瘍粘膜の 3 細胞種を測定予定(分担:倉林)。一部は報告済み(業績 14)。

④皮膚:担癌非癌部は都老人医療センターに保存されている基底細胞癌と老人性角化症

の標本を用います (各 20 例)。非担癌例 (凍結済み) は日光曝露部 (頸部、40 例) と非曝露部 (腹部 210 例) を剖検例から採取済み。非腫瘍部 3、腫瘍 2、線維芽細胞、非担癌正常部 3 種類の合計 9 細胞種を測定 (分担: 池田)。

⑤ 早老症組織: ワーナー症候群 6 例の表皮、Dyskeratosis congenita 2 例 (都駒込病院と京都府立医大から大腸と食道組織) を収集済み。ワーナー症候群の表皮は基底細胞、傍基底細胞、棘細胞、早老症の大腸癌、非癌部、線維芽細胞、食道癌、非癌部、線維芽細胞の 9 細胞種を測定予定 (分担: 田久保、池田)。

⑥ 肝臓: 剖検例肝を収集済み。肝癌、非癌部肝硬変、非担癌肝硬変、非担癌解剖例の 4 細胞種を測定予定 (分担: 潮、上垣、佐々木)。

⑦ 副甲状腺: 凍結副甲状腺組織では、癌 (1 例) 腺腫 (40 例)、透析に伴う肥大 (32 例) を収集済み (日赤医療センター藤原睦憲部長から、IC あり)。剖検例副甲状腺 (主細胞、好酸性細胞)、腺腫、腺腫例非腺腫組織、肥大の 5 細胞種を測定予定 (分担: 田久保、積田)。

⑧ 甲状腺: 担癌濾胞細胞と非担癌濾胞細胞を測定予定 (20 例、分担: 柏尾)

⑨ 大腸: 非担癌、腺腫、癌の 3 細胞種を測定 (分担: 潮、予備実験でクリプト底部細胞が短い)。

(2) サザンプロット法によるテロメア長測定: 組織の十分に得られている場合には、従来と同様にサザンプロット法によりテロメア長を測定します (分担: 白石)。

(3) 組織 Q-FISH 法による組織切片のテロメア長の測定:

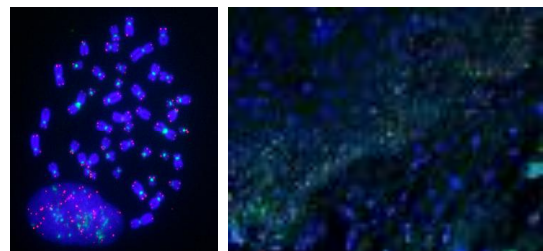
組織切片は、0.2N-HCl および 1M-NaSCN にて処理し、ペプシン処理を行い RNase 処理の後、脱水し暗室内にて、異なる蛍光色素でラベルした PNA プロブを用いてテロメアとセントロメアにハイブリダイズさせます。水洗後 TNT で処理し PBS で洗浄後脱水透徹し封入します。蛍光顕微鏡 (所内の設備) により同一切片上で各種細胞を 1000 個 CCD カメラで撮影します。1 細胞ごとのテロメアとセントロメアシグナルを連結したパソコンのテロメア測定用のオリジナルソフトウェア:

Tissue-Telo (特許: 業績 1) により、半自動化して両者の比 (TCR) を得ます (図 2)。以上の TCR を TIG-1 のセルブロックの TCR で除して、標準化 TCR (NTCR) (業績 6) を求め、症例間の比較時の精度をを向上させます。食道、皮膚、甲状腺、大腸、肝から測定を開始します。

(4) Q-FISH 法による分裂中期細胞のテロメ

ア長の測定法: 分裂中期標本 (Metaphase spread) を用いて FISH を行い (図 2)、各 pq 腕上のテロメアの蛍光量を蛍光顕微鏡下 CCD カメラで測定し、キャリブレーション済みのデータ (事前に TIG 細胞の 10、30、50PDL のサザンプロット法によるテロメア長と、それらのテロメア蛍光光度を測定し、キャリブレーション; 図 3) の入力させた進化させたソフトにより、テロメア長を知ります。Q-FISH 法により各染色体上のテロメア (カリオタイプが $2n=46$ の場合 184、異数体では約 80 染色体 $\times 4=$ 約 320 テロメア) 長を測定し、カリオタイプ分析の結果と照合して、特異的な短縮

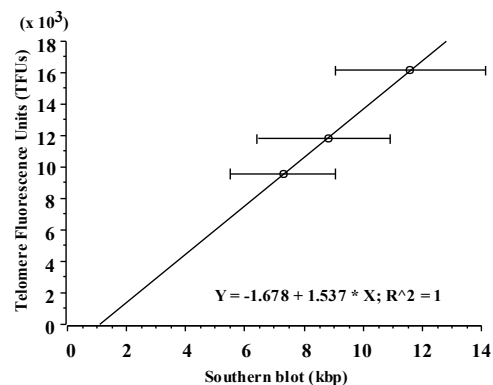
図 2 分裂中期展開標本と食道粘膜切片の組織 Q-FISH



を示す部位を明らかにします (癌遺伝子の載る染色体上のテロメアなど)。21 年度は食道上皮細胞から測定を開始します (分担: 西村、池田)。

(5) 染色体の不安定性の指標の検討: 培養細胞 (発生母地、非担癌部からの 1 次培養) をテロメア、セントロメアプローブで FISH を行い、癒合、分裂後期架橋 (anaphase bridge) を観察します。染色体の増加 (gain) と消失 (loss) に関しては、DNA セントロメアプローブ、DNA サブテロメアプローブ (組み合わせにより全染色体を同定できます) を用いて FISH を行い、分裂間期において、染色体の増加と消失数を調べます (食道から、分担: 倉林、池田)。組織切片でも調べます (食道から、分担: 相田)

図 3 Calibration: テロメアシグナル光度とサザンプロット法による測定値の相関

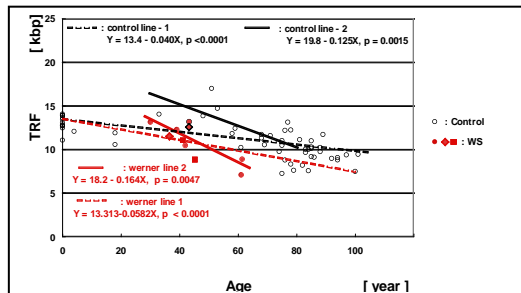


4. 研究成果

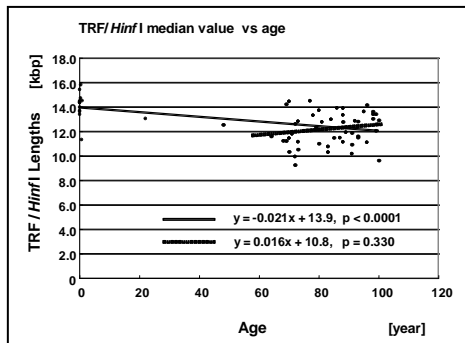
(1) 癌の発生母地のテロメア機能不全とアルコール多飲がテロメアを短縮することを証明した。

アルコール症患者は食道、口腔の扁平上皮癌の頻度は対照より4-10倍の頻度である。アルコール症患者の食道上皮のテロメアは短く染色体の不安定性のあることを証明し、アルコール多飲がテロメアの短縮因子であり、癌の発生に役割を果たしていることを報告した (Aida J et al. J Pathol 2011) (カナダBCがんセンター、癌研癌ゲノム解析センター、鳥取大医学部生命工学科との共同研究)。

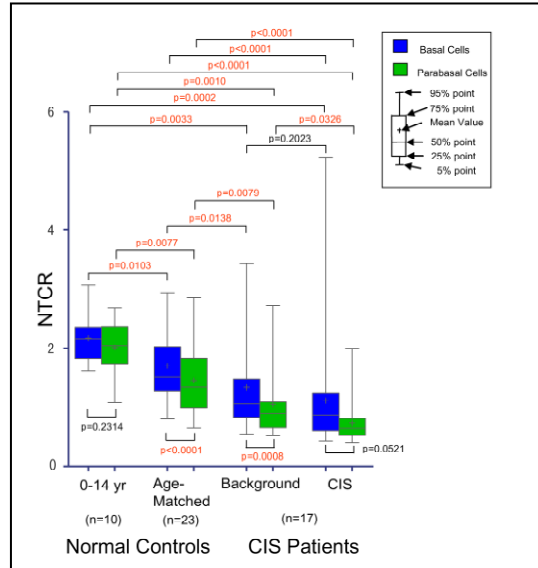
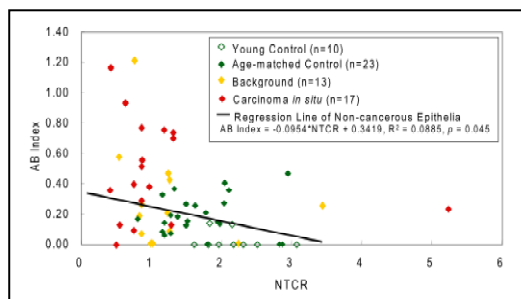
(2) 早老症の一つであるWerner症候群患者の表皮における加速したテロメア短縮を初めて証明した (Ishikawa N et al. Aging 2011



)。 (3) ヒト下垂体テロメアの年間短縮率を報告した (Ishikawa N et al. Age 2011 in press)。



(4) ヒト食道上皮組織において組織Q-FISH法を用いて細胞種ごとのテロメアを測定し、癌の発生母地におけるテロメア短縮 (テロメア機能不全を惹起) による染色体の不安定性 (発癌の入り口) の存在を証明した (Takubo et al. J Pathol. 2010)



(5) その他下記の臓器でテロメア研究が進行中である。

肺癌 (粘膜内扁平上皮癌)、食道癌とアルコール、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の有無 (英文校正中)、膀胱癌細胞の異型度別 (G1、G2、G3、10例程度)、早老症 (18・21トリソミー、各10例、投稿中)、皮膚腫瘍の有無と日光被曝部の皮膚、口腔内前癌病変 (leukoplakia、論文採択済み)、肝移植組織片 (Sanada Y et al. World J Surg 2012.)。副甲状腺主細胞と好酸性細胞 (投稿中)、膵 (外分泌、導管、内分泌、線維芽細胞など) など多数。

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10件)

① Aida J, Kobayashi T, Saku T, Yamaguchi M, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Maruyama S, Chen J, Poon SSS, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Short telomeres in an oral precancerous lesion: Q-FISH analysis of leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 査読有 2012; 41: 372-378

DOI: 10.1111/j.1600-0714.2011.01120.x

② Sanada Y, Aida J, Kawano Y, Nakamura KI, Shimomura N, Ishikawa N, Arai T, Poon SS, Yamada N, Okada N, Wakiya T, Hayashida M, Saito T, Egami S, Hishikawa S, Ihara Y, Urahashi T, Mizuta K, Yasuda Y, Kawarasaki H, Takubo K. Hepatocellular Telomere Length in Biliary Atresia Measured by Q-FISH. *World J Surg*. 査読有 2012; 36: 908-916

DOI:10.1007/s00268-012-1453-z

③ Ishikawa N, Nakamura K, Izumiya N, Aida J, Sawabe M, Arai T, Kishimoto H, Fujiwara M, Ishii A, Takubo K. Telomere dynamics in the human pituitary gland:

robust preservation throughout adult life to centenarian age. *AGE*. 査読有 2011; in press.

DOI:10.1007/s11357-011-9280-y

(Published online:07 July 2011)

④Aida J, Vieth M, Ell C, May A, Pech O, Hoshihara Y, Kumagai Y, Kawada K, Hishima T, Tateishi Y, Sawabe M, Arai T, Matsuura M, Takubo K. Palisade vessels as a new histologic marker of esophageal origin in ER Specimens from columnar-lined esophagus. *Am J Surg Pathol*. 査読有2011; 35:1140-1145.

DOI:10.1097/PAS.0b013e3182206c0e

⑤Ishikawa 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.

PMCID: PMC3117457

⑥Arai T, Aida J, Nakamura K, Ushio Y, Takubo K. Clinicopathologic characteristics of basaloid squamous carcinoma of the esophagus. *Esophagus*. 査読有2011; 8: 169-177.

DOI: 10.1007/s10388-011-0280-x

⑦Aida J, Yokoyama A, Izumiya-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SSS, Fujiwara M, Sawabe M, Matsuura M, Arai T, Takubo K. Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus. *J Pathol*. 査読有 2011; 223: 410-416.

<http://www.thejournalofpathology.com>

DOI:10.1002/path.2817

⑧Takubo K, Aida J, Izumiya N, Ishikawa N, Fujiwara M, Poon SSS, Kondo H, Kamori M, Matsuura M, Sawabe M, Arai T, Baird DM, 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*. 査読有 2010; 131: 614-624.

DOI:10.1016/j.mad.2010.08.007

⑨Takubo 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*. 査読有2010; 221: 201-209.

<http://www.thejournalofpathology.com>

DOI:10.1002/path.2704

⑩Takubo K, Aida J, Izumiya-Shimomura N, Ishikawa N, Sawabe M, Kurabayashi R, Shiraishi H, Arai T, Nakamura K. Changes

of telomere length with aging. *Geriatr Gerontol Int*. 査読有 2010; 10(s1): S197-S206.

DOI:10.1111/j.1447-0594.2010.00605.x

[学会発表] (計 8 件)

①田久保海誉、相田順子、他 6 名. テロメア短縮とヒトの老化、癌化. 第 100 回日本病理学会総会, 2011. 4. 28-30. 横浜

②相田順子、田久保海誉、他 7 名. アルコール症患者の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. 28-30. 横浜

③仲村賢一、田久保海誉、他 5 名. 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. 28-30. 横浜

④沢辺元司、田久保海誉、他 6 名. 低リポタンパク血症では担癌率が高い: 高齢者専門病院の連続病理解剖例での検討. 第 100 回日本病理学会総会, 2011. 4. 28-30. 横浜

⑤泉山七生貴、田久保海誉、他 7 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法の開発と脾臓細胞種別テロメア長解析. 第 100 回日本病理学会総会, 2011. 4. 28-30. 横浜

⑥相田順子、田久保海誉、他 10 名. 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. 27-29. 東京

⑦仲村賢一、田久保海誉、他 4 名. 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. 27-29. 東京

⑧眞田幸弘、田久保海誉、他 11 名. 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. 27-29. 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

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)・東京都健康長寿医療センター研究
所・研究部長
研究者番号：0154956

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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