

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590411

研究課題名(和文) ヒト気管支上皮細胞のテロメア長と癌化に関する研究

研究課題名(英文) Telomere length and carcinogenesis of human bronchial epithelium, study using tissue quantitative fluorescence in situ hybridization

研究代表者

相田 真介 (AIDA, Shinsuke)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：10531387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：中枢型肺扁平上皮癌手術切除例24例と非肺癌解剖症例72例について、気管支上皮テロメア長をQ-FISH法にて測定した。非肺癌症例では、非喫煙者に比べ、喫煙者のテロメア長が有意に延長していた。肺癌例はほぼ全例が喫煙者で、テロメア長は非肺癌例の喫煙者と非喫煙者の中間の値であった。

これらの結果から、喫煙によりテロメラゼが誘導されて、テロメア長が延長しているものと考えられる。またテロメア長の短縮による遺伝子の不安定性が発癌に関与していることがいくつかの臓器で報告されているが、喫煙関連肺癌に関しては発癌メカニズムが異なっていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Telomere lengths of the bronchial epithelium of 72 non-lung cancer adult autopsy cases and 24 surgically resected cases of lung squamous cell carcinoma were measured using Q-FISH method, and were expressed in normalized telomere:centromere ratios (NTCRs). The autopsied individuals included 27 current smokers (CuS), 33 never-smokers (NeS), 8 ex-smokers (ExS), and 4 unknown cases. The NTCRs of CuS, NeS and ExS were 1.515, 1.372 and 1.204, respectively. The bronchial epithelial telomeres of CuS were significantly longer than those of non-current smokers (NeS+ExS). The NTCRs of the bronchial epithelium of lung cancer cases and lung cancer tissue are 1.514 and 1.385, respectively. Our findings suggest that smoking causes telomeric elongation in the bronchial epithelium. The mechanism of carcinogenesis in smoking-related carcinomas is suggested to differ from that of many other carcinomas in which genetic instability due to aging-related telomeric shortening is considered to play a role.

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基盤研究C

キーワード：テロメア 気管支上皮 喫煙 肺癌 Q-FISH

1. 研究開始当初の背景

テロメアは真核生物の染色体末端にみられる DNA の繰り返し配列と蛋白からなる構造で、染色体の融合や組換えを防ぐ機能があると考えられている。1回の分裂で50~200bp短縮し(1)、テロメアの短縮は老化や悪性腫瘍の発生に参与している可能性が示唆されている(2,3)。

テロメア長の測定には Southern blot 法と Quantitative- fluorescence in situ hybridization (以下 Q-FISH)法があり、組織内の特定の細胞のテロメア長を測定するためには、細胞像あるいは組織像を確認しながら測定できる Q-FISH 法が必須である。しかし Q-FISH 法は蛍光強度の比較による相対的なテロメア長の測定であり、Southern blot 法のようなテロメアの絶対長の測定はできず、適切な対照を同時に測定する必要がある。また組織切片を用いて測定する場合、目的とする細胞の核の一部しか切片に含まれないことが多い、などの問題点がある。

我々は Q-FISH 法に独自の改良を加えてきた。すなわち、テロメア長を測定細胞のセントロメアとの比 (Teromere:Centrometre Ratio 以下 TCR)として測定する。セントロメアはテロメアとともに核内に均一存在し、セントロメアは種々の状態でほとんど変動しないと考えられることから、核の一部しか含まれない組織切片による計測でも TCR はテロメア長を正確に反映すると考えられる (Figure 1)。さらにテロメア長既知の培養細胞 cell block を同一スライド上において同時に測定して補正を加えた値 (Normalized TCR 以下 NTCR)を測定結果とすることにより、様々な要因による測定値の変動を補正することができる。また独自開発の画像解析ソフト (TissueTelo ver 3.0)により、短時間で多数の細胞のテロメア長を測定できるようにした。

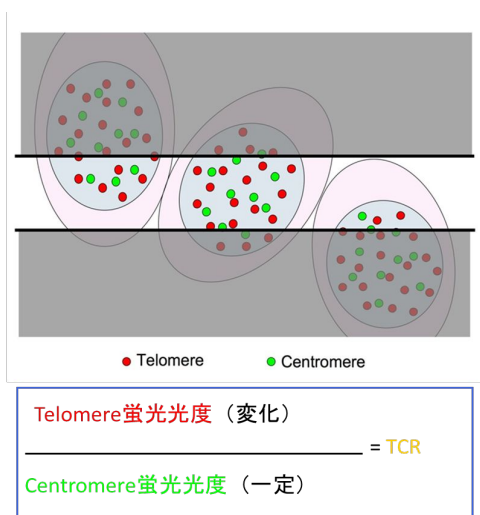


Figure 1. Schematic explanation of Teromere-Centromere ratio (TCR)

改良を加えた Q-FISH 法により、既に口

腔(4)、胃(5)、乳腺(6)、食道(7)の腫瘍と背景粘膜のテロメア長を測定して報告している。

(文献)

1. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of molecular biology.* 1992;225(4):951-60.
2. Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Experimental gerontology.* 2002;37(4):523-31.
3. Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Aoyagi Y, Fujiwara M, et al. Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium. *The Journal of investigative dermatology.* 2002;119(5):1014-9.
4. Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Kammori M, et al. Basal cells have longest telomeres measured by tissue Q-FISH method in lingual epithelium. *Experimental gerontology.* 2008;43(9):833-9..
5. Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishii A, Ishikawa N, Honma N, et al. Telomere length variations in 6 mucosal cell types of gastric tissue observed using a novel quantitative fluorescence in situ hybridization method. *Human pathology.* 2007;38(8):1192-200.
6. Kurabayashi R, Takubo K, Aida J, Honma N, Poon SS, Kammori M, et al. Luminal and cancer cells in the breast show more rapid telomere shortening than myoepithelial cells and fibroblasts. *Human pathology.* 2008;39(11):1647-55.
7. Shiraishi H, Mikami T, Aida J, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Arai T, et al. Telomere shortening in Barrett's mucosa and esophageal adenocarcinoma and its association with loss of heterozygosity. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2009;44(5):538-44.

2. 研究の目的

改良した組織 Q-FISH 法を用いて、肺癌手術切除症例および非肺癌成人解剖症例の気管支粘膜上皮のテロメア長を測定し、特に喫煙との関連、喫煙と密接な関連がある中枢型肺扁平上皮癌例と非肺癌例の差異を検討する。

3. 研究の対象症例および方法

(1)対象症例

非肺癌症例： 肉眼的に明らかな肺病変を

認めない非肺癌成人解剖例 72 例(男 46、女 26、年齢 51-100、平均 83.5 歳)

肺癌症例: 区域気管支までに発生した 3cm 以下の中枢型肺扁平上皮癌手術切除例 24 例(男 23、女 1、年齢 45-76、平均 62.6 歳)

(2)方法

ホルマリン固定肺組織を用い、気管支のパラフィン切片を作成し、同一スライド上にテロメア長 8.50Kbp の培養細胞 TIG-1 の cell block の切片をおき、Cy3 標識テロメア PNA Probe(Telo C-Cy3 probe: 5'-CCCTAACCTAACCTAA-3'; catalogue number F1002, Fasmac, Japan)と FITC 標識セントロメア PNA Probe(Cenp1-FITC probe: 5'-CTTCGTTGGAACGGGGT-3'; custom-made, Fasmac)を用いて hybridization を行った。FISH 標本の蛍光顕微鏡画像を CCD カメラでコンピューターに取り込み、気管支粘膜上皮基底細胞と培養細胞の TCR を tissue telo ver 3.0 を用いて測定し、気管支上皮基底細胞 TCR/培養細胞 TCR を算出して NTCR とした (Figure 2)。

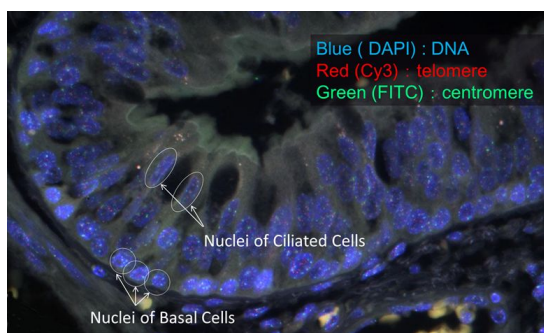


Figure 2. FISH image of bronchial epithelium. Telomere lengths of basal cells were measured as TCR (Telomere signal intensity/Centromere signal intensity) by Tissue Telo (original software which calculates TCR automatically by circumscribing the nuclei)

4 . 研究成果

(1)結果

非肺癌解剖症例は、現喫煙者 27 例、非喫煙者 33 例、過去喫煙者 8 例、喫煙歴不明 4 例を含んでいた。

気管支基底細胞の NTCR は現喫煙者 1.515、非喫煙者 1.372、過去喫煙者 1.204 で、現喫煙者のテロメア長は、非現喫煙者(非喫煙者 + 過去喫煙者)に対して有意に延長していた ($p=0.032$)。男女別にみると、男性では現喫煙者が、非現喫煙者に対して有意なテロメアの延長を示した ($p=0.016$)。女性に関しては、特に女性喫煙者の症例が少ないため結論は得られなかったが、検索し得た範囲では女性

現喫煙者の NTCR1.365 に対して、女性非現喫煙者 1.381 と明らかな差はみられなかった (table 1)。

Table 1 Telomere length in bronchial epithelium of non-cancer cases.

	N	Mean NTCR (SD)
Current smokers		
Female	1	1.365 (-)
Male	26	1.520 (0.323)*
Subtotal	27	1.515 (0.325)#
Non-current smokers (Never and Ex-smokers)		
Female	24	1.381 (0.323)
Male	17	1.280 (0.291)*
Subtotal	41	1.339 (0.317)#
Never-smokers		
Female	23	1.390 (0.327)
Male	10	1.330 (0.268)
Subtotal	33	1.372 (0.317)
EX-smokers		
Female	1	1.182 (-)
Male	7	1.207 (0.306)
Subtotal	8	1.204 (0.307)
Unknown smoking history		
Female	1	1.314 (-)
Male	3	1.531 (-)
Subtotal	4	1.477 (0.207)
Total		
Female	26	1.378 (0.316)
Male	46	1.432 (0.329)
Subtotal	72	1.413 (0.324)

NTCR, normalized telomere:centromere ratio; SD, standard deviation;

* Significant difference ($p=0.016$)

Significant difference ($p=0.032$)

今回検索した 51-100 歳の範囲では、テロメア長と年齢の間に有意な相関はみられなかった (Figure 3)。

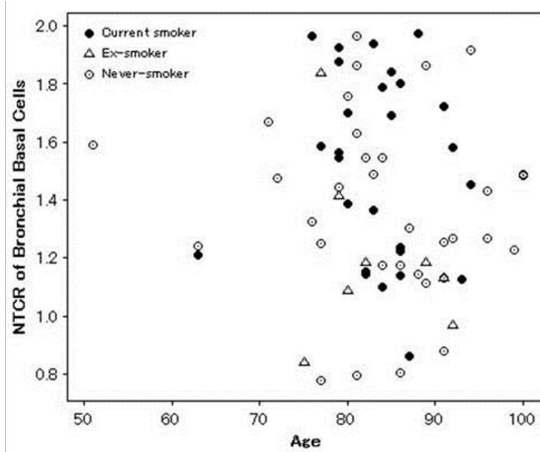


Figure 3 Age distribution of normalized telomere/centromere ratio (NTCR) bronchial basal cells

肺癌症例は 4 例の喫煙歴不明を除く前例が喫煙者で、気管支基底細胞の NTCR は 1.514 と非肺癌症例の喫煙者とほぼ同様の値であっ

た。肺癌組織の NTCR は 1.385 と非肺癌解剖例の喫煙者と非喫煙者の中間の値であった (table 2)。

	N	Bronchus	Tumor tissue
		Mean NTCR (SD)	Mean NTCR (SD)
Current smokers			
Female	1	1.245 (-)	1.402 (-)
Male	19	1.539 (0.775)	1.417 (0.630)
Subtotal	20	1.524 (0.757)	1.417 (0.613)
Non-current smokers			
	0	-	-
Unknown smoking history			
Female	0	-	-
Male	4	1.464 (0.433)	1.227 (0.348)
Subtotal	4	1.464 (0.433)	1.227 (0.348)
Total			
Female	1	1.245 (-)	1.402 (-)
Male	23	1.526 (0.725)	1.384 (0.589)
Subtotal	24	1.514 (0.712)	1.385 (0.576)

NTCR, normalized telomere:centromere ratio;
SD, standard deviation

(2) 考察

喫煙者の気管支上皮のテロメア長に関する論文はみあたらず、本研究が世界初と考えられる。気管支上皮におけるテロメラーゼに関しては既にいくつかの報告があり、喫煙者においてテロメラーゼ mRNA の発現や活性の上昇が報告されており(8,9,10)、今回の我々の研究は、喫煙によるテロメラーゼの発現に加えて、それによるテロメア長の延長が実際に起きていることを明らかにしたものである。但し、結果で述べたように今回の研究では、男性に関しては現喫煙者での有意なテロメアの延長が示されたが、女性に関しては結論が得られず、女性では、男性と異なり、喫煙による気管支上皮テロメア長の延長が起きない可能性も考えられる。

胃、食道、口腔では癌の背景粘膜において、テロメア長の短縮がみられ、それによる遺伝子の不安定性が、発癌に関与していると考えられている。喫煙者の気管支上皮では逆にテロメアの延長が起きていることが今回の研究で明らかになり、喫煙関連肺癌の発癌メカニズムは、上記のテロメア短縮による遺伝子の不安定性とは異なると考えられる。

従来から喫煙者の肺癌と非喫煙者の肺癌では、p53、EGFR、ALK などの遺伝子変異や転座の頻度が有意に異なることが報告されており(11,12)、今回の我々の研究結果は、喫煙関連肺癌とその他の癌では、発癌のメカニズム自体が異なる可能性を示唆するものと考えられる。

(文献)

8. Shibuya K, Yano E. Regression analysis of trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Japan, 1972-2001. International journal of epidemiology. 2005;34(2):397-402.

9. Capkova L, Kalinova M, Krskova L, Kodetova D, Petrik F, Trefny M, et al. Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. Cancer. 2007;109(11):2299-307.

10. Yim HW, Slebos RJ, Randell SH, Umbach DM, Parsons AM, Rivera MP, et al. Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells. Cancer letters. 2007;246(1-2):24-33.

11. Liu X, Lin XJ, Wang CP, Yan KK, Zhao LY, An WX, et al. Association between smoking and p53 mutation in lung cancer: a meta-analysis. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2014;26(1):18-24.

12. Yamaguchi N, Vanderlaan PA, Folch E, Boucher DH, Canepa HM, Kent MS, et al. Smoking status and self-reported race affect the frequency of clinically relevant oncogenic alterations in non-small-cell lung cancers at a United States-based academic medical practice. Lung Cancer. 2013;82(1):31-7.

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 0 件)

(英文誌に投稿準備中)

〔学会発表〕(計 2 件)

相田真介、相田順子、長谷川佳代、熊坂利夫、島崎英幸、玉井誠一、田久保海誉、長村義之: 組織切片を用いた Q-FISH 法による気管支粘膜上皮のテロメア長の研究。第 102 回日本病理学会総会、ロイトン札幌、さっぽろ文芸会館北海道 / 札幌市、平成 25 年 6 月 7 日

Aida S, Aida J, Hasegawa K,

Kumasaka T, Shimazaki H, Tamai S,

Takubo K, Osamura Y. Telomere length

of human adult bronchial epithelium

measured by tissue Q-FISH method. 第

20 回国際老年学会, InterContinental

Seoul COEX, 韓国 / ソウル, 平成 25 年 6

月 25 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相田 真介 (AIDA, Shinsuke)

国際医療福祉大学・三田病院病理部・教授

研究者番号：10531387

(3)連携研究者

相田 順子 (AIDA, Junko)

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・研究員

研究者番号： 80425678