

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460447

研究課題名(和文) ヒト表皮のテロメア長と日光老化・癌の発生

研究課題名(英文) Telomere Length of epithelium in sun burn and incidence of cancer

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚の日光曝露による老化と癌の発生に関する研究を行った。曝露の有無にかかわらず1検体中の表皮内の構成細胞のテロメア長に差は乏しかった。曝露部表皮ではテロメアが有意に短かった。日光角化症(AK)の背景表皮では、テロメア短縮が証明された。つまり、AKはテロメアの短い表皮から発生した。同一個体の曝露部表皮と(頸部)と非曝露部(腹部)のテロメア長は、日光曝露部のテロメア長が短縮している傾向にあった。また、線維芽細胞ではAK周囲で短かった。AKの発生母地ではAKのない曝露部線維芽細胞よりも有意にテロメアが短く、前癌病変であるAKの発生に紫外線UV-BとともにUV-Aの影響があることが想像できた。

研究成果の概要(英文)：To study telomere shortening in the skin surrounding actinic keratosis (AK), we measured telomere lengths of epidermal cells with (AK group) and without (sun-protected and sun-exposed groups) AK and in AK itself, as well as in dermal fibroblasts in the three groups, using Q-FISH. Telomeres of basal cells were not the longest, indicating that tissue stem cells may not be located among basal cells. Telomeres of the epidermis in the sun-exposed group were shorter than those in the sun-protected. Telomeres of fibroblasts in AK group were significantly shorter than those in the sub-exposed and controls. We considered that UV-A had important role in the process of telomere shortening of fibroblasts in the skin. Our findings demonstrate that sun exposure induces telomere shortening, and that AK arises from epidermis with shorter telomeres and fibroblasts with short telomere, despite the absence of any histological atypia.

研究分野：テロメア

キーワード：テロメア 癌化 日光曝露

1. 研究開始当初の背景

既に 1997 年からヒト組織のテロメアに関して 35 報の論文を重ねてきた (PubMed)。加齢に伴うテロメア短縮率の多くは私のグループ (☆印) が報告した (表 1)。このため老化専門誌からはテロメア研究の Key labs の一つと評価されている (Duncan MB. Exp Gerontol 2008; 43:15-9)。

また、2002 年の論文で表皮は加齢に伴い年に約 36 bp のテロメアが短縮することを証明し、2011 年にはウェルナー症候群患者皮膚のテロメア短縮の亢進を証明した。また、皮膚の加齢性変化は紫外線曝露の有無で異なることが推測される。

表1 ヒト組織における年間テロメア短縮率の報告一覧

組織	短縮率 (bp)	テロメア長 (kb)	年齢 (歳)	発表年と著者
1. 末梢血	35	47	20-95*	1990 Hastie et al.
2. 表皮細胞	19.8	21	0-92	1991 Lindsey et al.
3. 線維芽細胞	15	43	0-93	1992 Allsopp et al.
4a. 末梢リン/球	41	140	0-107	1993 Vaziri et al.
4b. 末梢リン/球 (twin pairs)	31	123	2-95	1994 Slagboom 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 Hiyama 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	3.5-102	1995 Chang et al.
7b. 血管内皮細胞	28	65	1m-80	1999 Okuda et al.
8. 血管中膜	25	51	1m-80	1999 Okuda 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. 腎皮質	98.13	20	0-88	2000 Meik et al.
11. 胃粘膜	47	38	0-99	2000 Furugon et al. ☆
12a. 肝組織	120	23	17-81	2000 Akita et al.
12b. 肝組織	55	94	0-101	2000 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. 大腸粘膜	NSD	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. 副甲状腺	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. 舌粘膜	30	48	0-101	2002 Nakamura et al. ☆
23. 歯髄	72*	100	16-70	2003 Takasaki et al.
24. 脾	36	69	0-100	2006 Ishii et al. ☆
25. 子宮体	25	65	0-100	2012 Ishikawa et al. ☆
26. ウェルナー症候群の皮膚	153	8	30-62	2011 Ishikawa et al. ☆
27. ウェルナー症候群の筋肉	261	4	39-61	2011 Ishikawa et al. ☆

NSD = 有意差なし; bp = base pair; m = 月齢; * = 風乾; ☆ = 我々のグループの報告

一方、高齢者の皮膚は乾燥し、その程度は加齢に伴い増悪する。高齢者の皮膚では真皮や皮下組織の減少などの変化、皮脂分泌や汗腺機能の低下などの生理的変化、セラミドやアミノ酸量の低下などの生化学的変化が見られる。他方、太陽紫外光の中で UV-B 領域 (280-320nm) の紫外線が表皮細胞の DNA 損傷をもたらす、紫外線を浴びた皮膚がより老化する光老化も知られ、癌の発生と関係も知られている。

前癌病変とも言われる Actinic keratosis (日光角化症) は日光曝露部に発生し、中高齢者に好発する。年間 UV-B 量が兵庫県約 2 倍の沖縄県が約 4 倍高い有病率を示したとの報告がある。近年、Actinic keratosis の有病率が急速に上昇している (1980 年代の約 2 倍)。このため、環境問題として世界的な話題となっている成層圏オゾン層の破壊による紫外線量の増加と皮

膚癌との関係から、Actinic keratosis は非常に注目されている。

また、癌研究のバイブルとなっている Weinberg RA 著「がんの生物学」(p395, Garland Science 2007)には、高齢者の癌の爆発的発生はテロメアの崩壊による可能性が極めて大きいと記されているが実証されてはいない。そこで、表皮において Weinberg の仮説を証明することを着想した。

一方、2002 年の論文で使用した表皮は腹部 (日光非曝露部) である。今回、独自に開発した Q-FISH 法 (特許申請: 特願 2005-055726) により、組織切片を用いて日光の曝露部と非曝露部の表皮構成細胞別 (基底細胞、棘細胞など) のテロメア長を測定し、細胞間のテロメア長の差異を知ると同時に、すでに食道、口腔上皮では前癌病変を持つ発生母地上皮や担癌非癌部上皮は、非担癌上皮よりもテロメアが短く染色体の不安定性があることを我々は証明した (Eur J Cancer 46:430-438, 2010、J Pathol 221:201-9, 2010)。そこで同様に表皮でも、Actinic keratosis を持つ非腫瘍部表皮と、持たない表皮のテロメア長を比較解析することを着想した。つまり、1. 日光による表皮のテロメア短縮と、2. 前癌病変はテロメアの短縮した染色体の不安定性のある表皮から発生することを証明する研究を計画した。

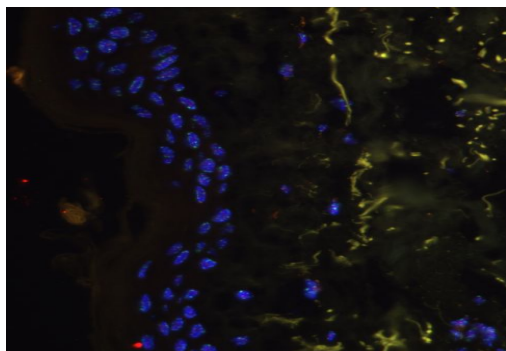
2. 研究の目的

表皮のテロメアと日光曝露・癌の発生に関する研究を計画した。我々は 2002 年にヒト表皮と舌上皮のテロメア長をサザンブロット法で測定し加齢に伴うテロメア短縮を明らかにした (仲村他 .J. Invest. Dermatol. Impact factor 6.3 皮膚科 1 位)。また、多くのヒト組織の加齢に伴うテロメア短縮を証明した。近年、我々のグループは組織 Q-FISH 法を考案し、組織の構成細胞別にテロメア長を測定する手法を確立した。テロメア短縮における日光の役割と癌発生との関係を解明するため、表皮の構成細胞別にテロメア長を測定し、表皮各細胞のテロメア動態を明らかにし、日光曝露とテロメアの関係、癌発生母地のテロメア短縮と染色体の不安定性について解析する。

3. 研究の方法

研究材料は Actinic Keratosis と診断され、皮膚科で切除された病変部とその周辺の正常組織を使用し、日光曝露部の良性腫瘍の周辺正常表皮と剖検例の頸部と腹部から採取した皮膚を正常対照群として使用する。症例数は各群で 50 例を予定しており Actinic keratosis 例については既に 30 例の収集を終えた。定法に従いパラフィン包埋し薄切後に組織 Q-FISH を実施する (図

1)。細胞別のテロメア光度を独自に開発した測定ソフト Tissue Telo で測定する測定する細胞は基底細胞、傍基底細胞(基底細胞に接する)、棘細胞を予定している。また、染色体不安定性の指標である Anaphase bridge analysis も行う。以上、細胞のテロメア長と染色体不安定性の解析を Actinic keratosis 例の非腫瘍部、日光曝露、日光非曝露部の 3 者で比較解析する。



(図 1) 皮膚の Q-FISH 法 (×100)
赤：テロメア-Cy3、緑：セントロメア-FITC、青：DNA-DAPI

4. 研究成果

26 年～28 年度までの結果として：

1. 日光非曝露群、日光曝露群および日光角化症（前癌病変、AK）背景の基底細胞の NTCR（テロメア長を反映）は、表皮を構成する 3 細胞種（基底、傍基底、傍基底上細胞）の中で、常に最も大きな値ではなかった（検索症例数の問題もあるが、基底層に表皮の組織幹細胞が所在しない可能性がある）。

2. 日光非曝露群における基底細胞の NTCR 値は、日光曝露群と比較して有意に大であった。つまりテロメア長が長かった（日光によるテロメア短縮の証明、特に表皮に障害を与える紫外線 UV-B (315-280nm) の表皮細胞に対するテロメア短縮効果の可能性）。

3. 日光曝露群の 3 種の細胞の NTCR 値は、AK 背景の対応する細胞と比較して、いずれも有意差はなかった（真皮では有意差あり）。

4. AK 病変内の基底膜に接する細胞の NTCR 値は、AK 背景表皮の基底細胞と比較して小さな値を示した（AK がテロメアは最短）。以上から AK の背景および AK において、テロメアの短縮が証明された。つまり、前癌病変（AK）はテロメアの短い表皮から発生した。

5. 皮膚疾患をもたない同一個体の日光曝

露部表皮（頸部）と非曝露部表皮（腹部）を用いて、日光曝露による皮膚テロメア長の基底細胞と真皮線維芽細胞について検討すると、基底細胞と真皮線維芽細胞の年齢との相関について回帰分析を行ったが、いずれも有意差は認めなかった。基底細胞と真皮線維芽細胞のどちらにおいても、日光曝露部と非曝露部テロメア長の間には有意差は認めなかったが、わずかに日光曝露部表皮のテロメア長の方が短縮している傾向にあった（検索症例数が少なく症例を増加すれば有意と考察）。

6. 日光曝露部と非曝露部どちらにおいても、すべての症例で基底細胞のテロメア長が、真皮線維芽細胞のテロメア長よりも有意に短かった（日光曝露によるテロメア短縮効果は表皮で顕著）。

7. 真皮線維芽細胞のテロメア長は、日光曝露の有無にかかわらず同様の NTCR 値であった。また AK 周囲の線維芽細胞は、全 2 者よりも短かった（AK 周囲の線維芽細胞では、真皮に到達する紫外線 UVA (320-400nm) のテロメア短縮効果が大であった可能性がある）

以上からは、通常、皮膚癌の発生（慢性皮膚障害 = 光老化）には、UV-B の皮膚障害が大きいと言われている。しかし、真皮線維芽細胞では、コントロールと日光曝露部のテロメア長に差がなく、AK 周囲の線維芽細胞では明らかにテロメア長が短かったことから、AK の発生には線維芽細胞のテロメアを短くする UV-A の関与があることが強く示唆された。

さらに考察すると、UV-A は朝や冬でも減衰することが少ないことから、長時間屋外で日光曝露していることが示唆され、実際実験に用いた皮膚材料の対象症例は、屋外労働者が大部分であった。

今後の展望：AK の発生母地領域における老化関連の β -Gal 染色が陽性結果を示せばテロメア短縮→老化細胞の発生→AK→癌の発生母地化の細胞動態が示せたことになると考えている。以上の結果と考察を原著とし執筆中である。今後は表皮培養細胞を使った研究を展開する。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ishikawa N, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Matsuda Y, Arai T, Takubo K. Changes of telomere status with aging: An update. *Geriatr Gerontol Int*. 査読あり 2016 Mar;16 Suppl 1:30-42. doi: 10.1111/ggi.12772. PubMed PMID: 27018281.

所・研究助手

研究者番号： 10158751

Ikeda H, Aida J, Hatamochi A, Hamasaki Y, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Fujiwara M, Tomita K, Hiraishi N, Kuroiwa M, Matsuura M, Sanada Y, Kawano Y, Arai T, Takubo K. [Quantitative fluorescence in situ hybridization measurement of telomere length in skin with/without sun exposure or actinic keratosis](#). Hum Pathol. 査読有 2014 Mar;45(3):473-80.doi:10.1016/j.humpath.2013.10.009. Epub 2013 Oct 19.PMID: 24411948

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：
出願年月日：
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

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

(2) 研究分担者

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