

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460430

研究課題名(和文)膀胱乳頭状尿路上皮腫瘍の組織学的悪性度の進行の原動力は何か

研究課題名(英文)What are the motive forces in the development of histological grade in papillary urothelial carcinoma?

研究代表者

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・研究助手

研究者番号：10158751

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)：膀胱乳頭状尿路上皮腫瘍の一次培養を用いたメタフェーズFISHを実施して、テロメア長の比較解析を行った。7例の解析を行うことができた(Qバンド)。しかし、FISH標本では1例(全てAneuploidyであるため)を除いて、6例で46本とAneuploidy群のテロメア長を比較解析した(91個のMetaphase spreadを解析)。この結果、5例のサンプルでDiploidyを示す染色体標本では、Aneuploidyのそれよりもテロメアは長かった(1例有意差なし)。テロメアの短縮が染色体の不安定性(Aneuploidy)を引き起こし、その結果として悪性度が高まるとする説に合致する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We examined 37 consecutive cases of papillary urothelial neoplasm of the urinary bladder, from which 26 (70.3%) were suitable for karyotype analysis. In the 26, karyotype showed association of diploidy and aneuploidy in 7 tumors by Q-band analysis (61-88 yr). We could measure telomere length in the 7 tumors (total 91 metaphase spreads) by Q-FISH with a software, TFL-Telo version 2. In the Q-FISH samples from the 7 tumors, one tumor showed aneuploidy, alone. In 6 of the 7 tumors, karyotypes with diploidy and aneuploidy were mixed in the same cases. Mean telomere length of diploidy karyotype in each case was significantly longer than that of aneuploidy. Anaphase bridge (AB) analysis revealed that cases with prominent aneuploidy (more than 60 chromosomes) had more frequently AB than those with less than 50. Our data suggest that critically shortened telomeres cause chromosomal instability (aneuploidy) during progression of papillary urothelial neoplasms.

研究分野：テロメア

キーワード：膀胱癌 テロメア 染色体分析

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は泌尿器癌のなかで比較的頻度が高い。その罹患率は、日本人10万人あたり男約6人、女約2人である。この数字は前立腺癌の四分の一であり、腎癌とほぼ同数である。患者の80%が60歳以上と高齢者の癌で、再発を繰り返し悪性度(異型度)が進行し膀胱切除術に至ることがある。これは高齢者のQOLの低下の原因となる。他方、膀胱癌は二つの発癌経路が報告され、それぞれの初期病変は乳頭状腫瘍と上皮内癌である。一方、テロメアは染色体の安定性に必須であり染色体末端に存在する。また、発癌や老化と深い関係がある。我々は乳頭状尿路上皮腫瘍における組織学的悪性度の進行のメカニズムを研究してきた。まず乳頭状腫瘍を新分類(WHO)に基づき三者: papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP)、low-grade papillary urothelial carcinoma (LPUC)、high-grade papillary urothelial carcinoma (HPUC)に分類した。次にこれらの染色体分析と染色体別にテロメア長解析を行い、以下の事実を見出し報告した(Urol Oncol 2013)。

1. PUNLMPは全て二倍体で、LPUCでは polyploidyが各々40%を占め、HPUCはほぼ全てが高度のpolyploidy。

2. テロメア長(平均)は、PUNLMP > LPUC > HPUCであったが、3群でSDが極めて大。

3. テロメア長と染色体の不安定性の指標は逆相関。

4. 組織学的悪性度の進行や異数体の出現よりも前に、(PUNLMPでも)テロメア短縮と染色体の不安定性が認められる。

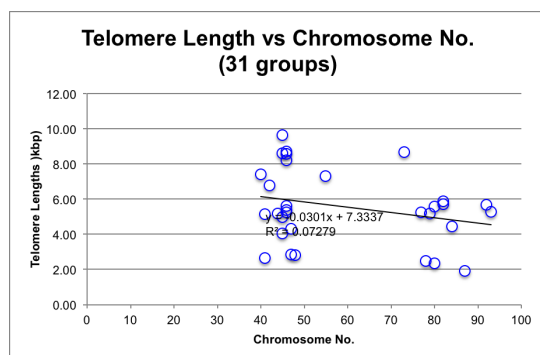
以上により、乳頭状尿路上皮腫瘍の組織学的悪性度の進行には、テロメア短縮と染色体の不安定性が原因となっていることが示唆された。しかし、異数体の原因となる染色体の消失、ゲインや癒合においては、染色体の消失や癒合によりテロメアが消失しテロメア長の測定が不可能であり、短縮したテロメアと異常染色体の直接的な証明は不可能であった。一方、前記の研究の中で、LPUCの中に、染色体分析により二倍体と異数体の両者を同時に持つ腫瘍(モザイク)があることに気づいた。そこで、一つの腫瘍から得られた細胞中でモザイク示すサンプルを利用して、異数体における染色体の消失やゲイン染色体と癒合した染色体番号を既報論文(Urol Oncol 2013)と同様の方法(同じ番号の二倍体染色体におけるテロメア長を測定)により明らかにしテロメアが短いことを証明することを着想した。さらに、全染色体ペイント法により、染色体不安定性の指標である分裂後期架橋(AB)内にテロメアの短縮した染色体の存在を証明する。以上により、過度に短縮したテロメアを持つ染色体が染色体の異常(不安定性)に関与し、ひいては腫瘍の組織学的悪性度の進行の原因となっている根拠を得たいと考えた。

次に、短縮したテロメアを持つ染色体とその染色体上の既知の癌遺伝子の関係も解析する。

2. 研究の目的

1. 膀胱乳頭状尿路上皮腫瘍の組織学的悪性度の進行が、過度に短縮したテロメアに原因することを証明する。2. 初代培養細胞が二倍体と異数体を同時に示す腫瘍を抽出し(染色体分析)、異数体における消失、ゲイン、癒合などの異常染色体を知り、それらのテロメア長を二倍体において測定する。3. テロ

図 1



メア短縮に伴う染色体の不安定性の指標であるABに關与する染色体を明らかにする(全染色体ペイント法)。4.異常染色体のテロメアが短いことと、架橋部分に異常染色体があることを証明して、冒頭の命題を証明する。5. また、再発に最も關与する因子(組織像、染色体型、ABの頻度、テロメア長)を明らかにして、尿路上皮腫瘍の再発予測因子を明らかにして、尿路上皮腫瘍の診療に貢献する。

3. 研究の方法

研究材料の収集:

癌研病理部の連続した膀胱乳頭状癌を用いる。すでに収集した膀胱乳頭状尿路腫瘍組織からの初代培養細胞(カルノア固定)31細胞(LPUC)中、7例に二倍体と異数体を同時に認め、使用予定(最長7年間の追跡症例を含む)。癌研病理部 石川雄一副所長)から全面的協力の確約を得ている。

組織診断:(PUNLMP、LPUC、HPUCの鑑別)は癌研石川雄一副所長が行い、泉山七生貴にはブラインドにする。

染色体分析と長短腕別テロメア長測定:本測定方法は6報の論文で使用し確立した方法と認められている。方法論に關し過去の論文投稿時にreviewerからコメントがない。テロメア長測定時に、組織型(PUNLMP、LPUC、HPUC)はブラインドで行う。切除されたサンプルより得た初代培養細胞をコルセミド処理後に回収する。膨化处理後、カルノア液で固定し展開標本を作製する。この際、対照としてTIG-1細胞を同一スライドグラス上に滴下し、同様に展開標本とする。つまり、1枚のプレパラートに検体と対照が載り、両者の展開標本をPNAプローブ(テロメアプローブ(CCCTAA)3にCy3付加、セントロメアプローブ(CTTCGTTGGAACGGGGT)にFITC)を用いたFISHを実施する。対照によりFISH時のハイブリ条件のバラツキを校正し、症例間の比較の精度が格段に高まる。これを画像処理ソフトIsis

およびカリオタイプ解析機能を備えたCCDカメラ装着の蛍光顕微鏡(カールツァイスAxio Imager MAT)で撮影し、核型分析の専門家も動員しIsisカリオタイプソフトを使用し、核型分析を実施する。対象ならびに対照細胞のメタフェーズ画像はテロメア解析ソフトTFL-Teloにより染色体末端のテロメア光度を長短腕別に自動的に測定し、テロメア光度を得る。さらに、コントロールとして培養細胞の光度を同時に測定することにより高い精度を得た。

二倍体のテロメア解析で有意に短いテロメアをもつ染色体について、全染色体ペイント法を行う。例えば、Xと21染色体を例示する。Xと21染色体では、XPC X-kit with FITC label incl. P&S, MetaSystems、XPC 21-kit with Texas Red label incl. P&S, MetaSystemsなどを用いる。

AB解析:撮影済みのFISHイメージを用いる。初代培養細胞1000細胞あたりのABの割合を解析する。本方法は現在まで7報の論文で行ってきた。

全染色体ペイント法による架橋部分の染色体の検出:本方法はすでに1報の論文の中で行った。

データ解析と論文執筆:統計ソフトRを用いデータを解析し論文を作成する。

4. 研究成果

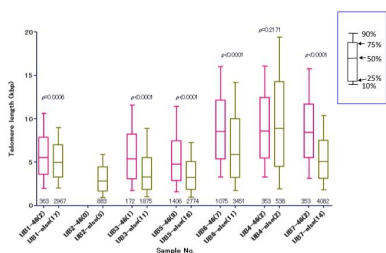
膀胱乳頭状尿路上皮腫瘍の一次培養細胞からは良好なメタフェーズ像が得られにくいことはよく知られている。今回のサンプリングにおいてもその傾向は変わらなかった。しかし、比較的良好的な7例の解析を行うことができた(Qバンド)。FISH標本では1例(全て異数体であるため)を除いて6例で二倍体とそれ以外の本数(異数体)の群のテロメア長を比較解析した(97個のMetaphase spreadを解析できた)。

染色体数の多いメタフェーズはテロメアが短かった(図1:全症例のFISHサンプル

中の染色体数とテロメア長の関係)

5例(図2、1例二倍体なし、1例有意差なし)の同一症例のサンプルで2倍体を示す染色体標本では、異数体のそれよりもテロメアは有意に長かった。

図2



AB解析では、染色体数が47以下の症例ではAB皆無であった。しかし、染色体数が48以上のメタヘーズを有する症例では、存在した(0.1-1.0%)。

以上は、テロメアの短縮が染色体の不安定性(異数体)を引き起こし、その結果として悪性度が進展すると考えられている説に合致する結果が得られた。これまでの我々の他臓器における主張を支持する結果でもあった。悪性度の進行には染色体の本数の異常とテロメア短縮が強く関与するとの我々の論文(Urol Oncol 2014)を補強する結果であった。また、悪性度の進行よりも前に、染色体異常とテロメア短縮のあることが観察された。

原著論文を作成したが、採択とならず現在論文を改訂している。

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 3件)

1. Ishikawa N, Nakamura K, Izumiya-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, 1:30-42.

2. Aida, J., Izumiya-Shimomura, N., Nakamura, K., Ishikawa, N., Terai, M., Matsuda, Y., Aida, S., Arai, T, Takubo, K. Determination of Telomere Length by the Quantitative Fluorescence in Situ Hybridization (Q-FISH) Method. Am J Anal Chem, 査読あり2014;5, 775-783.

3. Nakamura K, Ishikawa N, Izumiya N, Aida J, Kuroiwa M, Hiraishi N, Fujiwara M, Nakao A, Kawakami T, Poon SS, Matsuura M, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Telomere lengths at birth in trisomies 18 and 21 measured by Q-FISH. Gene. 査読あり2014;533:199-207.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

6. 研究組織
(1)研究代表者
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・研究助手

研究者番号： 1 0 1 5 8 7 5 1

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：