



Alternative lengthening of telomeres frequently occurs in mismatch repair system-deficient gastric carcinoma

大森, 靖弘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4486

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004486>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 大森 靖弘
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4486 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Alternative lengthening of telomeres frequently occurs in mismatch repair system-deficient gastric carcinoma

(胃癌におけるミスマッチ修復系不活化とテロメラーゼ非依存性テロメア維持機構の関係についての研究)

審 査 委 員

主 査 教 授 林 祥剛
教 授 黒田 嘉和
教 授 横野 浩一

背景と目的

テロメアは染色体末端に存在する TTAGGG の繰り返し配列であり、染色体末端を保護し末端末端結合による染色体融合やそれに伴う染色体不安定性を防ぐ働きがある。正常ヒト細胞では、テロメアは細胞分裂の際に短くなり、一定の長さになると細胞周期が停止する。これに対し、多くのヒト悪性腫瘍ではテロメラーゼの再活性化によりテロメアを伸長・維持し、これが不死化につながると考えられている。テロメラーゼは一種の逆転写酵素であり、テロメア構造の鋳型となる RNA と触媒サブユニットである human telomerase catalytic subunit (hTERT) からなる。hTERT の発現はテロメラーゼの発現に相関し、ヒト悪性腫瘍の 85-95% に認められている。しかし、一部の悪性腫瘍ではテロメラーゼ非依存性にテロメア長が維持されており、このメカニズムは alternative lengthening of telomeres (ALT) と呼ばれている。ALT は遺伝子再組み換えによりテロメア長を維持する機構であり、ALT 細胞ではサザンブロット法で terminal restriction fragment (TRF) を評価すると 2~20kb におよぶ長いスミアが得られることが知られている。また、ALT 細胞では ALT-associated promyelocytic leukemia (PML) bodies (APBs) と呼ばれるテロメア末端配列やテロメア結合蛋白を含む PML bodies が見られる。APBs には遺伝子再組み換えや修復に関連する蛋白も含まれ、APBs が再組み換え機構の重要な働きをしている可能性が示唆されている。

DNA ミスマッチ修復系遺伝子は遺伝性非ポリポーシス大腸癌で見いだされ、microsatellite instability (MSI) の原因となることが知られており、MSI は胃癌では 8-23% で見られる。DNA ミスマッチ修復系は遺伝子複製時の異常を修復するだけでなく、遺伝子再組み換えを阻害する働きもある。これまでの報告で、DNA ミスマッチ修復系の異常により酵母やヒト大腸癌細胞でテロメラーゼ非依存性のテロメア維持機構が働く可能性が示唆されているが、これまでヒト癌組織を用いて DNA ミスマッチ修復系の不活化が ALT に関連することを示した報告はない。

本研究では胃癌において DNA ミスマッチ修復系の不活化が ALT を引き起こすか否かを、マイクロサテライト解析、hTERT 蛋白発現評価、APBs 解析およびテロメア FISH 法によるテロメア長評価により検討した。

材料と方法

患者とマイクロサテライト不安定性の評価

症例は 1999 年から 2004 年までに神戸大学病院で外科的もしくは内視鏡的に切除された胃癌を対照とした。切除された標本は 10%ホルマリン固定パラフィン包埋した後、4 μ m 厚薄切を作成し、DNA 抽出、免疫組織化学、テロメア FISH 法に使用した。マイクロサテライト解析は 6 領域の独立したマイクロサテライトマーカー (BAT-25, BAT-26, BAT-40, D1S191, D5S346 と D17S250) を用いた。蛍光標識したプライマーによる PCR 産物を ABI PRISM 310 で電気泳動し、GeneScan ソフトウェアを使用して解析した。6 領域のマイク

ロサテライトマーカー中、2 領域以上が MSI を示す症例を高 MSI (MSI-H) 群、1 領域のみ MSI を示すもしくは MSI を示さない症例を non-MSI-H 群と分類した。以前に検討し MSI-H と評価した胃癌 11 例に、新たに胃癌 86 例のマイクロサテライト解析を行い MSI-H と評価した 10 例を加えて合計 21 例の MSI-H 胃癌、および対照として同数 21 例の non-MSI-H 胃癌を無作為に選び、合計 42 例で本検討を行った。

テロメア FISH と APBs

APBs の評価はテロメア FISH と PML の蛍光免疫染色を組み合わせて行った。テロメア FISH は FITC で蛍光標識した (TTAGGG)₃ PNA プローブを用いてハイブリダイズし、続いて PML 抗体を Cy3 で蛍光免疫染色を行った後、DAPI により核を染色した。テロメア FISH によるテロメア長の解析は WinROOF ソフトウェアを使用し評価した。APBs に関しては、核内でテロメア (緑; FITC) と PML (赤; Cy3) の 2 つが重なる APBs (黄) を含む細胞が、腫瘍細胞の 5% 以上に見られるものを APBs 陽性と評価した。

免疫組織化学

免疫組織化学的検索は抗 hTERT 抗体を用いて行い、核の染色が腫瘍全体の 25% 以上に認めるものを (2+), 10-25% で認めるものを (1+), 10% 未満でしか認めないものを (-) と評価した。

統計解析

ストウデント *t* 検定およびカイ二乗検定を使用して、*P* 値が 0.05 未満であれば、統計学的有意差があるものと判定した。全ての統計解析は、Statview 5.0 ソフトウェアを使用して行った。

結果

マイクロサテライト不安定性の有無と telomere intensity (TI) ratio の解析

まず胃癌におけるマイクロサテライト不安定性とテロメア長の関係を調べた。テロメア長の評価は以下の方法で行った。TI = 核における FITC 光量の合計/DAPI 光量とし、無作為に選んだ癌細胞および周辺の非腫瘍性粘膜上皮細胞それぞれ 100 個の核での TI 値を測定し平均化した。さらに組織間の条件の違いを考慮して、TI ratio = 癌の TI 値/周辺非腫瘍上皮の TI 値としてテロメア長を評価した。MSI-H 胃癌では平均 TI ratio = 0.91 (min 0.455-max 1.929)、non-MSI-H 胃癌では平均 TI ratio = 0.82 (min 0.305-max 1.341) であり両群間には有意差は見られなかった (*P* = 0.33)。

マイクロサテライト不安定性と hTERT 蛋白発現状態の解析

次にマイクロサテライト不安定性の有無と hTERT 蛋白の発現状態との関係を調べたところ、non-MSI-H 胃癌では 18/21 (86%) で hTERT 蛋白発現陽性 (1+ もしくは 2+) であるのに対し、MSI-H 胃癌では 10/21 (48%) と有意に発現が少なかった (*P* = 0.02)。

マイクロサテライト不安定性と APBs の解析

さらにマイクロサテライト不安定性の有無とテロメア維持機構との関係を詳しく調べる

ために、APBsの検討を行った。non-MSI-H胃癌ではAPBs陽性を示すものが4/21(19%)しか見られなかったのに対し、MSI-H胃癌では12/21(57%)で見られ、MSI-H胃癌ではAPBs陽性が有意に多いという結果であった($P = 0.026$)。APBsとhTERT蛋白発現状態は逆相関を示した($P = 0.032$)。またTI ratioとテロメア維持機構の関係を解析したが、hTERT陰性APBs陽性群(平均TI ratio = 1.10)はhTERT陽性APBs陰性群(平均TI ratio = 0.78)に比べて有意にTI ratioが大きかった($P = 0.011$)。

考察

ヒト悪性腫瘍においてマイクロサテライト不安定性とテロメラーゼ活性の関係を検討した報告はいくつかあるが、一定した結論は得られていない。これは一つには、標本の状態やテロメラーゼ活性およびマイクロサテライトの解析方法に起因する可能性が考えられる。これまでの研究では、テロメラーゼ活性の評価をtelomerase repeat amplification protocol (TRAP)法にて行われていたが、TRAP法には定量性に難がある上、感度が高く活性化リンパ球の混入などにより疑陽性となるなどの問題点がある。本研究では、テロメラーゼ活性の評価をhTERT蛋白の免疫組織化学的解析によって行うことにより、組織学的に癌の部分のテロメラーゼ活性のみを評価できた。Bethesda criteriaに準じたマイクロサテライト解析を行った上で、本研究で明らかになったMSI-H胃癌ではhTERT蛋白発現陽性例の頻度が有意に少ないことのみならず、APBs陽性のものが有意に多いという結果は、胃癌においてDNAミスマッチ修復系不活化とAPBsの関連を示した初めての報告である。

基本的にはALTはテロメラーゼ活性が見られず、ヘテロなテロメアであり、APBsを持つことなどが特徴であるが、テロメラーゼ経路とALT経路の共存を示唆する報告もある。ただいずれも実験的な環境においてのみであり、実際に両方の経路が共存する癌細胞の存在は明らかではない。本研究では42例中7例(16.7%)でhTERT蛋白発現およびAPBsが共に陽性を示したが、これらの症例ではhTERT蛋白発現弱陽性(1+)例が多く見られ、APBs陽性細胞の割合が少なかった。両方の経路が共存する細胞が存在することを直接示すことはできなかったが、これらの結果はhTERT蛋白発現陽性癌細胞とAPBs陽性癌細胞が共存している可能性を示していると考えられた。

本研究ではテロメアFISHにより組織検体でのテロメア長の検討を行った。ALTの性質から考えてALT胃癌のTI ratioはテロメラーゼ依存性胃癌に比べて大きいことが期待されたが、ALT胃癌の一部では、全体の平均値(0.86)よりも小さいもの見られた。このような結果が得られた理由の一つとして、癌細胞はテロメラーゼを再活性化させてテロメアを伸長するのに対し、慢性炎症を起こした消化管上皮細胞では細胞周期の回転が早くテロメアの短縮が進み、両者の比で示されるTI ratioが大小様々な値を示すことにつながったのではないかと考える。様々な癌でFISH法でのテロメア長の定量を行った報告があるが、いずれも必ずしも癌でテロメア長が短くなる訳ではないことを示している。また再組み換えによるテロメア長の伸長は、危機的なテロメア長の短縮状態でのみ起こるとの報告もある。

これらによりTI ratioは様々な値を示したと考えられた。

本研究から、ミスマッチ修復系不活化を背景としたMSI-H胃癌では、non-MSI-H胃癌に比べて、テロメラーゼ非依存性テロメア維持機構が高頻度に見られることが示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1977号	氏 名	大森 靖弘
論文題目 Title of Dissertation	Alternative lengthening of telomeres frequently occurs in mismatch repair system-deficient gastric carcinoma 胃癌におけるミスマッチ修復系不活化とテロメラーゼ非依存性テロメア維持機構の関係についての研究		
審査委員 Examiner	主 査 杯 祥剛 Chief Examiner 副 査 黒田嘉和 Vice-examiner 副 査 横野浩一 Vice-examiner		
審査終了日	平成21年 1月 21日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

テロメアは染色体末端に存在する TTAGGG の繰り返し配列であり、染色体末端を保護している。正常ヒト体細胞では、テロメアは細胞分裂の際に短くなり、一定の長さになると細胞周期が停止する。これに対し、多くのヒト悪性腫瘍ではテロメラーゼの再活性化によりテロメアを伸長・維持する。これが不死化につながると考えられている。テロメラーゼ活性はヒト悪性腫瘍の 85-95%に認められているが、一部の悪性腫瘍ではテロメラーゼ非依存性にテロメア長が維持されており、このメカニズムは遺伝子再組み換えによりテロメア長を維持する機構であり alternative lengthening of telomeres (ALT) と呼ばれている。

DNA ミスマッチ修復系遺伝子は microsatellite instability (MSI) の原因となることが知られており、MSI は胃癌では 8-23%で見られる。DNA ミスマッチ修復系は遺伝子複製時の異常を修復するだけでなく、遺伝子再組み換えを阻害する働きもある。これまでの報告で、DNA ミスマッチ修復系の異常により酵母やヒト大腸癌細胞で ALT が働く可能性が示唆されているが、これまでヒト癌組織を用いて DNA ミスマッチ修復系の不活化が ALT に関連することを示した報告はない。本研究では胃癌において DNA ミスマッチ修復系の不活化が ALT を引き起こすか否かを、検討した。神戸大学病院で外科的もしくは内視鏡的に切除された胃癌の 10%ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた。マイクロサテライト解析は 6 領域のマイクロサテライトマーカー中、2 領域以上が MSI を示す症例を MSI-H 群、それ以外の症例を non-MSI-H 群と分類した。MSI-H 胃癌 21 例および対照として同数 21 例の non-MSI-H 胃癌を無作為に選び、合計 42 例で本検討を行った。ALT-associated promyelocytic leukemia (PML) bodies (APBs) の評価はテロメア FISH と PML の蛍光免疫染色を組み合わせて行った。テロメア FISH は FITC で蛍光標識した (TTAGGG)_n PNA プローブを用いてハイブリダイズし、続いて PML 抗体を Cy3 で蛍光免疫染色を行った後、DAPI により核を染色した。テロメア FISH によるテロメア長の解析は WinROOF ソフトウェアを使用し、TI = 核における FITC 光量の合計/DAPI 光量とし、TI ratio = 癌の TI 値/周辺非腫瘍上皮の TI 値としてテロメア長を評価した。APBs は腫瘍細胞の 5%以上に見られるものを APBs 陽性と評価した。免疫組織化学的検索は抗 hTERT 抗体を用いて行い、核の染色が腫瘍全体の 25%以上で認められるものを (2+)、10-25%で認められるものを (1+)、10%未満でしか認められないものを (-) と評価した。得られた結果は以下の如しである。

マイクロサテライト不安定性の有無と telomere intensity (TI) ratio の解析では MSI-H 胃癌では平均 TI ratio = 0.91、non-MSI-H 胃癌では平均 TI ratio = 0.82 であり両群間には有意差は見られなかった ($P = 0.33$)。マイクロサテライト不安定性と hTERT 蛋白発現状態を解析したところ、non-MSI-H 胃癌では 18/21 (86%) で hTERT 蛋白発現陽性 (1+もしくは 2+) であるのに対し、MSI-H 胃癌では 10/21 (48%) と有意に発現が少なかった ($P = 0.02$)。さらにマイクロサテライト不安定性や hTERT 蛋白発現状態と APBs の解析を行った。Non-MSI-H 胃癌では APBs 陽性を示すものが 4/21 (19%) しか見られなかったのに対し、MSI-H 胃癌では 12/21 (57%) と有意に APBs 陽性が多かった ($P = 0.026$)。APBs と hTERT 蛋白発現状態は逆相関を示した ($P = 0.032$)。また TI ratio とテロメア維持機構の関係を解析したが、

hTERT 陰性 APBs 陽性群 (平均 TI ratio = 1.10)は hTERT 陽性 APBs 陰性群 (平均 TI ratio = 0.78)に比べて有意に TI ratio が大きかった ($P=0.011$)。

ヒト悪性腫瘍においてマイクロサテライト不安定性とテロメラーゼ活性の関係を検討した報告はいくつかあるが、一定した結論は得られていない。これは一つには、標本の状態やテロメラーゼ活性およびマイクロサテライトの解析方法に起因する可能性が考えられる。これまでの研究では、テロメラーゼ活性の評価を telomerase repeat amplification protocol (TRAP)法にて行われていたが、TRAP 法には定量性に難がある上、感度が高く活性化リンパ球の混入などにより疑陽性となるなどの問題点がある。本研究では、テロメラーゼ活性の評価を hTERT 蛋白の免疫組織化学的解析によって行うことにより、組織学的に癌の部分のテロメラーゼ活性のみを評価できた。マイクロサテライト解析は Bethesda criteria に準じて行った。

本研究は、胃癌において DNA ミスマッチ修復系の不活化が ALT を引き起こすか否かについて、ヒト胃癌のパラフィン包埋検体を用いて APBs の役割について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった MSI-H 胃癌では hTERT 蛋白発現陽性例の頻度が有意に少ないことのみならず、APBs 陽性のものが有意に多いという結果は、胃癌において DNA ミスマッチ修復系不活化と APBs の関連を示した重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。