

	よこた たかし
氏 名	横 田 隆 司
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大博(医)第1713号
学位授与の日付	平成19年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博 士 論 文 名	Telomere Length Variation and Maintenance in Hepatocarcinogenesis (肝細胞癌発癌過程におけるテロメア長のばらつきとその維持)
論文審査委員	主査 教授 畠 山 勝 義 副査 教授 木 南 凌 副査 教授 青 柳 豊

博士論文の要旨

[背景と目的] 肝細胞癌が、主として慢性肝疾患に伴う持続的な肝細胞の壊死と再生を背景に発癌してくることは臨床的によく知られている。しかし、肝細胞癌発癌の多くに、かつ特異的に関与していると考えられる癌遺伝子、あるいは癌抑制遺伝子は未だ明らかにされていない。また、複製エラーに伴うマイクロサテライト不安定性も比較的低頻度にしか生じていないことが我々を含めた複数のグループから報告されており、肝細胞癌発癌の具体的な分子機構は未だ明らかでない。

我々はこれまでに、肝細胞癌周辺非癌部肝組織中におけるテロメア反復数が、背景肝疾患の種類を問わずに細胞の寿命を引き起こす程度まで減少しており、テロメア短縮に伴うクライシスとそれに引き続くゲノム不安定性が、肝細胞癌発癌の重要な要因となりうることを報告してきた。また細胞内のテロメア反復数は染色体間で一律ではなく、染色体のサイズに比例して大きなばらつきを示すことを報告してきた。

今回我々は、一般に測定されている平均テロメア長ではなく、細胞内でより長い、あるいはより短いテロメア長に注目し、肝細胞癌発癌とテロメア長との関係、さらにはテロメア長とその主たる制御因子であるテロメラーゼやテロメア結合蛋白の発現量との関係を、慢性肝疾患肝組織を用いて検討した。

[対象と方法] 外科的に切除された肝細胞癌 20 例の癌部 (HCC) と周辺非癌部肝組織 (NCL)、ならびに非担癌慢性肝疾患 10 例の生検肝組織標本 (DOC) を対象とした。一般に測定されている方法に従い、terminal restriction fragment (TRF) 解析における最大シグナル強度で既定される長さを平均テロメア長 (TRF-A) とした。さらに正規分布に近い分布を示す TRF スメアのシグナル範囲から、標準偏差相当のシグナルである 90 パーセントイル範囲を算出し、その上限ならびに下限をそれぞれ長鎖テロメア長 (TRF-L)、短鎖テロメア長 (TRF-S) と定義した。また、 $(TRF-L - TRF-S) / (TRF-A)$ をテロメア分散と定義した。各種メッセージの発現量は、competitive RT-PCR により半定量した。

[結果] テロメア分散は、NCLに比較しHCCで、さらにDOCに比較しNCLで有意に大きな値であった(それぞれ $P=0.012$ 、 $P=0.048$)。TRF-AとTRF-Sは、HCCにおいてNCLに比較し有意に低値であった(それぞれ $P=0.0026$ 、 $P=0.0018$)。また、術後1年以上経過観察が可能であった症例に関して、1年以内に早期残肝再発を来した7例におけるTRF-AとTRF-Sは、それ以外の10例におけるそれらとに比し有意に低値を示した($P=0.018$ 、 $P=0.0097$)。

さらに、テロメア短縮活性を持つテロメア結合蛋白の1つであるTRF1のHCCとNCL間における発現変化量と、テロメア伸長活性を有するテロメラーゼの活性中心蛋白であるhTERTのHCCにおける発現量との間の比率は、TRF-LのHCCとNCL間における変化量との間に有意な正の相関を示した($r=0.69$ 、 $P=0.0046$)。一方、hTERTとTRF1のHCCにおける発現量の比は、HCCにおけるTRF-Sとの間に有意な負の相関関係を示した($r=-0.81$ 、 $P=0.00020$)。

[考察と結論] 以上の結果より、肝組織中のテロメア長には染色体間のばらつきがあり、慢性肝疾患の進行に伴うその短縮は一様に生じるのでは無く、より短いテロメアの分画が優先的に増加する可能性が示唆された。またその短縮の度合いが、腫瘍の生物学的悪性度の良い指標となる可能性が示唆された。さらに、細胞内でより長い、あるいはより短いテロメア長がテロメア結合蛋白やテロメラーゼの発現制御にフィードバックし、自身のテロメア長制御に関与している可能性が示唆された。すなわち、長鎖テロメア長の伸長は細胞内におけるテロメア伸長/短縮活性のバランスを短縮方向へ、短鎖テロメア長の短縮は伸長/短縮活性のバランスを伸長方向へシフトさせ、癌細胞におけるテロメア長をある程度の範囲内に維持する機構として機能している可能性が示唆された。

(論文審査の要旨)

申請者は、これまでにテロメア短縮に伴うゲノム不安定性が、肝発癌の重要な要因となりうることを報告してきた。今回、長鎖(TRF-L)、短鎖テロメア長(TRF-S)ならびにその調節因子としてのテロメラーゼ(hTERT)やテロメア結合蛋白(TRF1)を計測しその発癌における意義を検討した。

【対象と方法】外科切除20例の癌部(HCC)と非癌部肝組織(NCL)ならびに非担癌慢性肝疾患10例の生検標本(DOC)を用い、平均テロメア長(TRF-A)、TRF-L、TRF-Sを計測し、 $(TRF-L-TRF-S)/(TRF-A)$ をテロメア分散と定義した。各種調節因子のメッセージの発現量は、competitive RT-PCRにより半定量した。

【結果と考察】テロメア分散は、NCLに比較しHCCで、さらにDOCに比較しNCLで有意に高値であった。またTRF-AとTRF-Sは、HCCにおいてNCLに比較し有意に低値であり、早期残肝再発例においては、それ以外の例に比較し有意に低値を示した。さらに、テロメア短縮活性を持つTRF1のHCC

と NCL 間の差に対するテロメア伸長因子 hTERT の比率は、TRF-L との間に有意な正の相関を示した。一方、hTERT と TRF1 の比は TRF-S との間に有意な負の相関関係を示した。以上の結果は、より短いテロメア分画が肝癌の生物学的悪性度の良い指標となる可能性が示唆され、さらに細胞内でより長い、あるいはより短いテロメア長がテロメア結合蛋白やテロメラーゼの発現制御にフィードバックし、自身のテロメア長制御に関与している可能性が示された。

以上、本研究は肝癌組織におけるテロメアの伸長調節の意義を明らかにしたものであり、この点に学位論文としての価値を認める。