テロメア研究最近の進歩

神森 眞¹⁾²⁾ 田久保海誉²⁾

〈要 約〉 テロメアは染色体末端に存在し、染色体の安定に貢献している。また、正常培養細胞における細胞老化はテロメア短縮によって説明されている。今回、我々は組織切片を用いたテロメア長測定法を開発したので、テロメア長測定法を中心に記述し、テロメア研究の進歩について述べる。従来は、細胞や組織から抽出したDNAを制限酵素で切断し泳動像のピーク値などをテロメア長としていた。1996年に培養細胞を用いた細胞分裂中期 (metaphase) の染色体個々のテロメア長測定が quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) により可能となり、癌組織では、特異的に限られた染色体のテロメアが短縮していることが報告された。培養細胞や末梢血のテロメア測定は flow cytometry による flow FISH が行われ、多くの白血病細胞におけるテロメア代謝が明らかにされた。組織切片を用いたテロメア長測定法 (tissue FISH) は、少数の論文の中で紹介されていたが良好な結果を得ることが困難であった。我々の研究グループにより確立された組織切片を用いたテロメア長の測定法を紹介し、この方法は測定が容易であると同時に、組織像と対比できる点で利点が大きく、今後の組織のテロメア代謝の解明に貢献すると思われる。

Key words : Southern blot 法, Q-FISH, Tissue FISH, Flow FISH

(日老医誌 2004; 41: 365—368)

はじめに

テロメアは染色体の末端に存在し一定以上の長さを維持することでテロメア同士の fusion や reconstructionなどを予防し、染色体内の遺伝子の恒常性の維持に関与していると考えられている。テロメアはヒトなどの脊椎動物では (TTAGGG)_n の単純な塩基配列の繰り返し (2,000 回以上) として存在し、極めて高い G-rich 塩基配列を呈し、細胞分裂と酸素被曝によって短縮する。テロメアの細胞分裂ごとによる短縮は、末端複製問題 (Replication of linear chromosomes presents a special problem) として説明される。これは複製の鋳型となる一本鎖のテロメア DNA (TTAGGG) の 3' 末端より相補的な (CCCTAA) 塩基配列が 5' 末端から 3' 末端側に複製される時に、細胞分裂ごとに相補鎖側の最後の 5' 末端部分が複製されないために生じると考えられている。

テロメアを伸長させる蛋白質として、逆転写酵素の一種であるテロメラーゼが存在し、その構成は種々の蛋白質の合成体であるが、その機能の必須成分は telomere と相補的な鋳型 RNA (hTR: the human RNA component of telomerase) と telomerase 触媒サブユニット (hTERT: human telomerase reverse transcriptase) の 2 つである。体細胞においては、テロメアは増殖のたびにその長さを短縮することが知られ、生存するための限

界の長さまで短縮すると分裂限界に至り細胞死を迎えると推測される。このように、体細胞では分裂のたびにテロメアは短縮するが、無限ともいべき細胞分裂を必要とする生殖細胞や血液幹細胞では、主にテロメラーゼによりテロメアの伸長、維持が図られている。

また、多くの癌組織 (約 90%) はテロメラーゼを発現するが、細胞増殖に伴う細胞分裂回数の増加がより激しいために正常組織に比べてテロメア長が短縮することが知られている。一方、老化の原因のひとつとして、テロメアがある一定の長さ以下に短くなると、老化細胞となり細胞増殖が停止する。すでに培養細胞や癌組織を用いてテロメア短縮が染色体内の遺伝子の不安定性を増長させることが証明されている¹⁾。以上のことから、今後、いかに個々の細胞や組織のテロメア長測定を行うかがテロメア研究の 1 つの焦点となると考えられる。今回はテロメア測定法を中心に最近のテロメア研究の進歩について述べることとする。

テロメア測定法

1. Southern blot 法

Southern blot 法では、細胞、組織より抽出した DNA を Hinf I などの制限酵素で切断し、電気泳動で得られたスミアのピークがテロメアの長さとして求められる。テロメア長測定法の中では、最も古く広く行われている手法であり、テロメア長の変化の全体像を掴むのには優れているが、極めてラフな計測法である。このため、詳細なテロメア長を測定したい場合には不適當である。特に、ヒト組織サンプルを用いた Southern blot 法による検討では、腫瘍も正常組織内にも癌細胞や正常粘膜組織以外

Recent advances of telomere research

1) Makoto Kamori: 東京大学消化管外科, 代謝栄養内分科

2) Kaiyo Takubo: 東京都老人総合研究所高齢者臓器

に fibroblast やリンパ球が混在してしまうことが重要な問題点であろう。もちろん, microdissection 等を行うことによって腫瘍細胞のみを抽出することは可能であるが大変な手間と時間がかかるのは周知の通りである。

我々の施設では, 1996 年の正常食道のテロメア長測定²⁾にはじまり, 肝臓³⁾, 胃⁴⁾, 大腸⁵⁾, 脳⁶⁾, 心臓⁶⁾, 脾臓⁶⁾, 甲状腺⁷⁾, 副甲状腺⁷⁾, 皮膚⁸⁾などヒト全身の組織のテロメア長測定を本法にて行い, 貴重なデータを蓄積した (Fig. 1a, b その代表例の大腸を示す)。いずれの組織も胎児や新生児では, 長いテロメアが維持され加齢とともに短縮していた。しかし, 90 歳以上の超高齢者ではいずれの臓器でも年齢とテロメア短縮率で換算したテロメア長と比較すると長い傾向を示した。このことは, 長寿者ではテロメア長が長く維持され染色体体内で遺伝子の恒常性の維持が保たれていると考えられる。著者らの経験によれば 100 歳以上の超高齢者の剖検例では, 担癌者が 37% と他の年齢層の平均 (51%) と比べ有意に低いことと併せて鑑みると極めて興味深い。

2. Q-FISH (quantitative fluorescence in situ hybridization)

1996 年に Lansdorp ら⁹⁾によって培養系細胞を用いて細胞分裂中期 (metaphase) の染色体個々のテロメア長測定が従来のサザンプロット法より正確な Q-FISH (quantitative fluorescence in situ hybridization) を用いて可能となった。本法は, 培養系細胞で細胞分裂中期の細胞を強制的に作製し, これらを収穫しプレパラート上に細胞を散布し, このプレパラートをテロメアでラベルされた Peptide Nucleic Acid (PNA) プローブを用いてハイブリダイズしたのち, 蛍光顕微鏡で撮影すると Fig. 2 のように観察される。これらを TFL 型テロメア解析

Fig. 1a 29~97 歳の大腸癌と正常大腸組織を用いた Southern blot 法によるテロメア測定例である。スミアの peak がテロメアの長さである。テロメア長は正常組織 (N) と癌組織 (T) を比較するとそれぞれ 39 歳で (12.2, 8.9kbp), 47 歳で (9.1, 3.4kbp), 65 歳で (13.8, 3.5kbp), 68 歳で (7.3, 5.2kbp), 81 歳で (10.1, 5.2kbp), 89 歳で (7.8, 4.8kbp), 97 歳で (7.2, 5.1kbp) であった (Cancer Lett 158:179-184, 2000 改変)。

Fig. 1b 大腸組織を用いた Southern blot 法によるテロメア長の年齢別分布図 (124 名の大腸癌患者において, それぞれの正常組織 (白丸) と癌組織 (黒丸) をテロメア長と年齢で比較した)。正常組織と癌組織の双方で右肩下がりの直線が年齢と有意に相関して引かれた (normal: $r = -0.244$, $P = 0.0061$; cancer: $r = -0.202$, $P = 0.0243$) (Cancer Lett 158:179-184, 2000 改変)。

Fig. 2 東京都老人総合研究所で確立された培養系細胞 TIG を用いた Q FISH. 左側は細胞分裂間期 (interphase), 右側は細胞分裂中期 (metaphase). Metaphase 期のものをカリオタイプングすれば個々の染色体ごとのテロメア長を測定することができる. Red signal (telomere Cy3), blue signal (chromosome stain DAPI).

Fig. 3 乳癌組織と間質正常組織での tissue FISH. テロメアの長さは、テロメア (red) とセントロメア (green) の光度比によって求められる. 癌組織では正常組織に比べてテロメアシグナル (red) の減衰が認められる. Red signal (telomere Cy3), green signal (centromere FITC), blue signal (nuclear stain DAPI).

ソフト (Lansdorp Lab)¹⁰⁾で解析すると個々の染色体のテロメア長が計測できる. Martens ら¹⁰⁾は、ヒト血球細胞と線維芽細胞を用いた実験でテロメアの Q-FISH と染色体のカリオタイプングを行い比較すると、17p 染色体が最も短いテロメアを持ち、この染色体上に p53 などの癌抑制遺伝子が存在していることから、発癌とテロメア短縮との関連性について報告している. 当施設でも、東京都老人総合研究所で確立された胎児肺由来の TIG 細胞¹¹⁾を用いて Q-FISH によるテロメア長測定を行い老化におけるテロメア仮説を実証する実験を進行中である.

Fig. 4 当施設内で使用しているテロメア FISH 解析設備. ニコン蛍光顕微鏡 80i, 浜松ホトニクス, 高感度デジタル冷却 CCD カメラ, ORCA-ER-1394, データ解析用ソフト, Image-Pro Plus.

3. Tissue FISH (tissue quantitative fluorescence in situ hybridization)

2002 年頃より、前記の Q-FISH 法を応用発展させた Tissue FISH (tissue quantitative fluorescence in situ hybridization) が、O'Sullivan¹⁾, Meeker¹²⁾¹³⁾らによって開発された. 著者の一人神森も 2002 年 5 月から 2004 年 1 月にかけてテロメアの FISH 測定の先駆的施設であるカナダ、バンクーバーの Terry Fox Lab (Lansdorp 研究室)に留学し、Q-FISH から tissue FISH への応用を共同開発してきた. tissue FISH は、すでに作られたパラフィンブロック (固定はアセトン, 4% ホルムアルデヒドが好ましい) より起こせることとそれぞれの細胞ごと (たとえば癌細胞と間質の正常細胞など) の比較が出来る事が利点である. このテロメア測定は細胞分裂間中期 (interphase) のテロメアシグナルとセントロメアシグナルの比として求められる. O'Sullivan ら¹⁾は、潰瘍性大腸炎患者を対象に正常大腸組織、非活動性潰瘍性大腸炎粘膜、活動性潰瘍性大腸炎粘膜、潰瘍性大腸炎由来の大腸癌で tissue FISH によるテロメア測定を行い、他の組織に比較して前癌病変である活動性潰瘍性大腸炎粘膜でテロメア短縮が有意に生じており、テロメア短縮は前癌病変で最も短縮し、癌ではテロメラーゼ活性獲得などによりテロメア長が回復すると報告している. 当施設でも 2004 年 2 月、Fig. 3 のようなテロメア FISH 用の蛍光顕微鏡解析設備を導入し、Q-FISH および tissue FISH によるテロメア長測定を可能にした. 特に、tissue FISH によるテロメア長測定の成功は、本邦初であり、現在、食道癌、乳癌症例 (Fig. 4) で解析が進行中であり、同様の結果が得られている.

4. Flow FISH (flow fluorescence in situ hybridization)

1998年ごろより flow cytometry を用いた FISH 法が血液細胞や培養系細胞を用いて施行され、細胞分裂間期(interphase)のテロメア長測定が盛んに行われるようになった¹⁴⁾¹⁵⁾。Flow FISH の利点は、血液細胞であれば T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞などの分類をした上でそれぞれのテロメア長測定ができることである。Roth¹⁶⁾らは、T cell に hTERT を導入した系を用いて Flow FISH によるテロメア測定と real time PCR による hTERT の定量を行い、T cell では hTERT を強制導入しても不死化せず、他の体細胞同様 hTERT の減衰とともにテロメア長が短縮し細胞死を迎えることを報告している。B cell の hTERT の導入系が不死化することを考えると、もともと hTERT を発現させているリンパ球でもその作用機序は異なっていることが予想される。

テロメア研究の今後の展開

Tissue FISH と flow FISH の開発によりいろいろな組織、細胞での詳細なテロメア測定が可能となった。これらの技術革新と我々のテロメア測定法の改良により病理医、臨床医がテロメア測定を容易にできるようになった。テロメア短縮が染色体内の遺伝子の恒常性の不安定性を増大させることとそれに関連した遺伝子異常を検証していくことは、ゲノム解析によってもたらされた情報に根拠をもたすであろう。また、FISH 法の応用技術である sky FISH 法を用いて、異常遺伝子の存在部位を確認(表現型として認識)することが可能である。細胞分裂の度に生じるテロメアの短縮は、普遍的な法則であるが、癌化によるテロメラーズの獲得や活性酸素被曝によるテロメア短縮の促進と絡み合った結果として各組織、細胞でのテロメア長の違いとして測定されるのである。

謝辞

株式会社三啓東海林邦彦氏、及び株式会社プラネトロ ン田口一洋氏の技術協力に深謝します。

文 献

- 1) O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, Finley JC, Shenl W, Emerson S, et al.: Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* 2002; 32: 280—284.
- 2) Takubo K, Nakamura K, Izumiyama N, Sawabe M, Arai T, Esaki Y, et al.: Telomere shortening with aging in the esophageal mucosa. *Age* 1999; 22: 95—99.
- 3) Takubo K, Nakamura K, Izumiyama N, Furugori E, Sawabe M, Arai T, et al.: Telomere shortening with aging in human liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000; 55: B533—536.
- 4) Furugori E, Takubo K, Nakamura K, Kammori M, Esaki Y, Hirayama R: Telomere shortening in gastric carcinoma with aging despite telomerase activation. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 481—485.
- 5) Nakamura K, Furugori E, Esaki Y, Arai T, Sawabe M, Okayasu I, et al.: Correlation of telomere lengths in normal and cancers tissue in the large bowel. *Cancer Lett* 2000; 158: 179—184.
- 6) Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, et al.: Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* 2002; 37: 523—531.
- 7) Kammori M, Nakamura K, Kawahara M, Mimura Y, Kaminishi M, Takubo K: Telomere shortening with aging in human thyroid and parathyroid tissue. *Exp Gerontol* 2002; 37: 513—521.
- 8) 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. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1014—1019.
- 9) Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, et al.: Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 685—691.
- 10) Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, et al.: Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genetol* 1998; 18: 76—80.
- 11) Ohashi M, Aizawa S, Ooka H, Ohsawa T, Kaji K, Kondo T, et al.: A new human diploid cell strain, TIG-1, for the research on cellular aging. *Exp Gerontol* 1980; 15: 121—133.
- 12) Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, Platz EA, et al.: Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol* 2002; 160: 1259—1268.
- 13) Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, et al.: Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 6405—6409.
- 14) Hultdin M, Gronlund E, Norrback K, Eriksson-Lindstrom E, Just T, Roos G: Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3651—3656.
- 15) Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM: Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 743—747, 1998.
- 16) Roth A, Yssel H, Pene J, Chavez EA, Schertzer M, Lansdorp PM, et al.: Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes. *Blood* 2003; 102: 849—857.