口腔扁平上皮癌におけるテロメラーゼ活性と テロメラーゼ構成要素との関連性

日高圭太郎

Correlation of the expression of telomerase subunits with telomerase activity in oral squamous cell carcinoma

HIDAKA Keitaro

Abstract: Telomerase activity is thought to be crucial for the sustained growth or progression of most cancer cells, and its activation is an important step in carcinogenesis. Recently, three major subunits of human telomerase, hTR, hTERT and hTERT, have been identified. In this study, we quantified the mRNA expression of these telomerase subunits in oral tissues by RT-PCR and evaluated the correlation between expression and telomerase activity. Telomerase activity was detected in oral leukoplakia (75 %) and oral squamous cell carcinoma (SCC) (66.7 %). Expression of both hTERT and hTR was detected in all tissue samples tested, including normal gingiva. In contrast, hTERT expression was detected in 12 of 22 (54.5 %) oral leukoplakia and SCC samples and was negative in normal gingiva samples. In addition, expression of hTERT well correlated with telomerase activity. Detection of hTERT expression in oral lesions might be a diagnostic biomarker of leukoplakia or oral cancer.

Key words: oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌), telomerase (テロメラーゼ), human telomerase reverse transcriptase (hTERT), human telomerase RNA (hTR), human telomerase-associated protein (hTERT)

緒 言

テロメラーゼは染色体末端に存在するテロメア反復配列を複製、延長する逆転写酵素である。テロメラーゼ活性は各種の癌細胞で高率に認められる。こうした癌細胞におけるテロメラーゼの発現は癌細胞が活発に増殖する際に喪失するテロメアを補填することで癌の発育や進展に寄与するものと考えられる。

口腔領域においても口腔扁平上皮癌はもとより、前癌病変である白板症にも高率にテロメラーゼ活性が認められる¹⁾。テロメラーゼの活性化が発癌過程の初期の条件である可能性が示唆されるが、テロメラーゼの発現と癌の発生、進展への関与の詳細なメカニズムは今なお不明な点が多い。テロメラーゼ蛋白はいくつかのテロメラーゼ構成蛋白からなる酵素複合体である。現在までにヒトテロメラーゼ構成蛋白としては、テロメアリピートの鋳型 RNA となる hTR (human telomerase RNA)²⁾、テロメア合成の触媒作用を有

する hTERT (human telomerase reverse transcriptase)^{3, 4)}、hTERT (telomerase-associated protein) などが単離されている。

本研究ではヒト口腔前癌病変と口腔扁平上皮癌におけるテロメラーゼ活性の発現を検討するとともに、テロメラーゼを構成するこれらサブユニットの mRNA の発現を検出し、テロメラーゼ活性との関連性および病理組織学的所見と比較検討を行った。

対象と方法

1. 対象

1999 年 4 月から 2002 年 10 月までに、福岡歯科大学附属病院口腔外科を受診し、口腔扁平上皮癌、口腔白板症の診断下に治療を行った患者のうち組織材料を研究目的に使用することについて承諾を得られた 22 例を対象とした。採取した組織の内訳は口腔扁平上皮癌 16 例、口腔白板症 4 例である。なお、抜歯時に歯に付着していた正常歯肉粘膜 2 例をネガティブコントロールとして用いた。各組織は手術または生検直後に病巣中央部より採取し、液体窒素にて急速冷凍後、-80℃にて保存した。

福岡歯科大学口腔・顎顔面外科学講座
(主任：大関 悟教授)

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Fukuoka Dental College (Chief: Prof. OZEKI Satoru)

受付日：2004 年 2 月 12 日

採択日：2004 年 5 月 18 日

	product size
hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' (sense) 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3' (antisense)	145bp
hTR (human telomerase RNA) 5'-AGTTCGCTTTCCTGTTGGTGGGG-3' (sense) 5'-TCAGGTTTGGGGGTTTCAACAAGC-3' (antisense)	191bp
hTEP1 (human telomerase-associated protein) 5'-TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG-3' (sense) 5'-CCCCGAGTGAATCTTCTACGC-3' (antisense)	264bp

図1 RT-PCR に用いたプライマーセットと増幅産物のサイズ

2. テロメラーゼ活性の測定

Kim ら⁵⁾ による TRAP assay をもとに感度, 定量性を向上させた独自の改良 TRAP 法にてテロメラーゼ活性を測定した. すなわち凍結保存した各組織より 30mg を採取し, 0.1mM Lysis バッファー 600 μ l 内でホモジナイズし, 30 分間氷上に静置し Lysis バッファーに溶解した. 遠沈 (15,000rpm $\times$ 2) 後に得られた上清をテロメラーゼ活性を示す未精製酵素標品として使用した. この細胞抽出液に基質となる TS-2 プライマー (5'-ATTGCCAATCCGTC GAGCAGAGTT-3'), TRAP バッファー (20mM Tris-HCl, 63mM KCl, 0.005 % Tween20, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 2.5mM MgCl₂), dNTP を加え, テロメラーゼによる合成伸長を 30 $^{\circ}$ C で 30 分間行った. 反応後, 85 $^{\circ}$ C 10 分間加熱処理し, テロメラーゼを失活させ, Taq DNA polymerase, ビオチン化した ACT-CX プライマー (5'-ACTCCCTAACCC TAACCCTAACCC-3') を加え 94 $^{\circ}$ C 1 分間, 62 $^{\circ}$ C 1 分間, 74 $^{\circ}$ C 1 分間で 26 サイクルの PCR 反応を行った. PCR 産物を 6 % ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後, DNA をナイロンメンブレンに転写, Phototope-Star Detection Kit (New England BioLabs, Inc.; U.S.A.) を用いた化学発光法にて DNA ラダーを検出した. 測定結果の定量は NIH image にて行った. 測定値はポジティブコントロールである B-32F (ヒト線維芽細胞を SV-40 にてトランスフォームした不死化細胞) のタンパク量 1 μ g の測定値を 100 % とし, それに対する百分率で表した相対値とした.

3. RT-PCR によるテロメラーゼサブユニットの検出

1) total RNA の抽出

凍結保存の各組織より病変部を 15mg 採取し, RNeasy mini kit (QIAGEN Inc.) にて total RNA を抽出した.

2) cDNA の合成

Total RNA 2 μ g より cDNA CYCLE KIT (invitrogen) にて cDNA を合成した.

3) テロメラーゼサブユニットの検出

cDNA 2 μ l に Gene Amp 社製 10 $\times$ PCR Gold buffer (150mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), dNTP, Ampli Taq Gold とおよび各 mRNA のプライマーを加え, PCR を行った. 使用したプライマーを図 1 に示す. hTERT および hTEP1 は 94 $^{\circ}$ C 4 分, 94 $^{\circ}$ C 45 秒, 55 $^{\circ}$ C 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 45 秒間にて 30 サイクルの PCR 反応を行った. hTR は 94 $^{\circ}$ C 4 分, 94 $^{\circ}$ C 45 秒, 60 $^{\circ}$ C 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 45 秒間で PCR 反応を 30 サイクル行った. PCR 産物を 2 % アガロースゲルにて電気泳動を行い, SYBER GREEN II (Molecular probes) にて染色後, CCD カメラにて撮影した. 測定結果は NIH image にて定量化した. 測定値は GAPDH をポジティブコントロールとし, それに対する百分率で表した相対値とした. また定量化したテロメラーゼ活性と hTERT mRNA 発現の相関を Pearson の相関係数を用いて測定した.

4. 病理組織学的分類

口腔扁平上皮癌において組織の一部から Hematoxylin-Eosin 染色による病理標本を作製し, 山本・小浜による腫瘍浸潤様式 (Y-K 分類)⁶⁾ および分化度による分類を行った. 分類結果とテロメラーゼ活性およびテロメラーゼサブユニットとの関係を Fisher's exact test にて検定を行った.

結 果

1) テロメラーゼ活性

口腔組織検体のテロメラーゼ活性の代表的な検出結果を図 2 に示す. ポジティブコントロールとして B-32F を用いた. 正常歯肉粘膜 2 例にはテロメラーゼ活性を認めず (0 %), 白板症は 4 例中 3 例 (75%) に, 扁平上皮癌は 16 例中 11 例 (68.8 %) にテロメラーゼ活性が認められた (表 1).

2) hTR, hTEP1, hTERT mRNA の発現

口腔組織検体における hTR, hTEP1 mRNA は正常歯肉粘

図2 口腔白板症, 口腔扁平上皮癌における TRAP assay テロメラーゼ活性の検出

B-32F (ヒト線維芽細胞を SV-40 にてトランスフォームした不死化細胞); ポジティブコントロール, 白板症①②; ヒト口腔白板症, 扁平上皮癌①②; 口腔扁平上皮癌.

表1 口腔組織検体のテロメラーゼ活性

	Telomerase activity (+)	Telomerase activity (-)
正常歯肉	0/ 2 (0%)	2/ 2 (100%)
白板症	3/ 4 (75%)	1/ 4 (25%)
扁平上皮癌	11/16 (68.8%)	5/16 (31.3%)

膜を含む口腔組織検体全 22 例の全例 (100 %) に発現を認めた. hTERT mRNA の発現は正常歯肉粘膜には認めず (0 %), 白板症, 扁平上皮癌の 20 例中 12 例 (60 %) に認めた. 白板症において 4 例中 3 例 (75 %) に, 扁平上皮癌では 16 例中 9 例 (56.3 %) に hTERT mRNA の発現を認めた (図 3, 表 2).

3) テロメラーゼ活性と hTERT mRNA 発現との相関

正常歯肉粘膜を除く口腔組織検体全 20 例中, テロメラーゼ活性を認め, かつ hTERT mRNA の発現を認めたのは 12 例 (60 %) であった. テロメラーゼ活性を認めず, かつ hTERT mRNA の発現も認めなかったのは 7 例 (35 %) であった. テロメラーゼ活性を認めた口腔組織検体の 14 例中 2 例 (14.3 %) には hTERT mRNA の発現を認めなかった. 全 20 例のテロメラーゼ活性と hTERT mRNA 発現の関係を図 4 に示す. 両者は危険率 0.1 % と高い相関を認めた.

4) 病理組織学所見との関係

Y-K 分類では, 2 型: 4 例, 3 型: 8 例, 4C 型: 4 例であった. 分化度による分類では高分化型 14 例, 中分化型 2 例であった. 病理組織学的分類とテロメラーゼ活性, hTERT mRNA の発現との関係を表 3 に示す. Y-K 分類の 2 型と 3 型は Fisher's exact test の結果から, テロメラーゼ活性の発現および hTERT mRNA の発現に同程度の発現傾向を認めた. 2 型と 4C 型では, 2 型は 4C 型に比較してテロメラーゼ活性の発現および hTERT mRNA の発現に高い傾向を認めた. 分化度では高分化と中分化の間にはテロメラーゼ活性の発現, hTERT mRNA の発現に特に傾向を認めなかった.

考 察

1995 年に PCR を用いたテロメラーゼ活性の高感度検出法である TRAP assay が開発されて以降, 各種の臓器, 組織におけるテロメラーゼ活性の発現が検討されてきた. その結果, 癌組織の約 70 % 前後に活性が検出されている⁷⁾. 今回検討を行った口腔扁平上皮癌におけるテロメラーゼ活性の発現率も 68.8 % と比較的高率であった. こうした事実から癌組織中に不死化細胞が含まれておりテロメラーゼの存在は癌が成立し, 維持されるために必要であると考えられる.

テロメラーゼは複数のタンパクサブユニットからなる酵素複合体である. 近年ヒトテロメラーゼの構成要素のうち

図3 RT-PCRによるhTR, hTEP-1, hTERT mRNAの検出
正常歯肉：ヒト正常歯肉組織，白板症①②：ヒト白板症，扁平上皮癌①②：ヒト扁平上皮癌におけるhTR, hTEP1, hTERT mRNAの発現をRT-PCR法にて検出した。結果は代表例を示す。

表2 RT-PCRによる口腔組織検体のhTEP1, hTR, hTERT mRNAの発現

	hTR	hTEP1	hTERT
正常歯肉	2/ 2 (100%)	2/ 2 (100%)	0/ 2 (0%)
白板症	4/ 4 (100%)	4/ 4 (100%)	3/ 4 (75%)
扁平上皮癌	16/16 (100%)	16/16 (100%)	9/16 (56.3%)

図4 テロメラーゼ活性とhTERT mRNA発現の関係
テロメラーゼ活性の測定値はポジティブコントロールであるB-32Fを100%とした相対値，hTERT mRNAの測定値はコントロールであるGAPDHを100%とした相対値で示す。

表3 浸潤様式 (Y-K分類) と分化度とテロメラーゼ活性, hTERT mRNAの発現

		telomerase activity (+)		hTERT (+)	
浸潤様式	2型	3/ 4 (75%)	# 1	3/ 4 (75%)	# 3
	3型	7/ 8 (88%)		6/ 8 (75%)	
	4C型	1/ 4 (25%)		1/ 4 (25%)	
		# 1 P < 1.0	# 2 P < 0.07	# 3 P < 1.0	# 4 P < 0.49
分化度	高分化	9/14 (64%)	# 5	7/14 (50%)	# 6
	中分化	2/ 2 (100%)		2/ 2 (100%)	
		# 5 P < 0.54		# 6 P < 0.48	

主たるものとして hTR, hTEP1, hTERT がクローニングされている。hTR はテロメラーゼ自身がつテロメア配列と相補的な配列をもつ RNA であり、これを鋳型としてテロメラーゼはテロメア配列に結合する²⁾。テロメラーゼ付属タンパク質 hTEP1 は hTERT, hTR mRNA と同一の複合体に含まれるタンパクであるがその機能の詳細は明らかではない⁸⁾。今回の検討では、正常歯肉組織、白板症を含む全例で hTR, hTEP1 mRNA の発現が認められ、その発現の程度に差は認められなかった。したがって、これらのテロメラーゼ構成タンパクはテロメラーゼ活性の発現に必要なが、活性の発現には直接的に関与しないと考えられる。

触媒サブユニットである hTERT はレトロウイルスなどでみられる一連の逆転写酵素で保存されているモチーフを保持しており RNA をテンプレートとしてテロメア繰り返し配列を合成する酵素活性の中心となるタンパクである。今回の口腔組織を用いた検討結果から hTERT mRNA の発現は正常歯肉組織には認められず、白板症、扁平上皮癌に高率に認められた。また、hTERT mRNA の発現とテロメラーゼ活性との間には密接な相関関係が認められたことから hTERT mRNA の発現量がテロメラーゼ活性の発現を制御していると考えられた。一方で、口腔扁平上皮癌において hTERT mRNA の発現とテロメラーゼ活性の発現が一致しない例外も存在することからテロメラーゼ活性の発現には hTERT 以外の因子によって制御されている可能性も示唆された。口腔扁平上皮癌および白板症において hTERT は高い発現率を認めること、また RT-PCR 法による hTERT mRNA の検出は taq polymerase のインヒビターを含む細胞抽出液を用いる TRAP 法によるテロメラーゼ活性の検出よりも鋭敏であると考えられることから、hTERT mRNA の検出は今後、口腔扁平上皮癌の診断の指標の 1 つとして利用する価値があると考えられた。

結 語

1. ヒト口腔白板症、扁平上皮癌組織においてテロメラーゼ活性の上昇を認めた。

2. hTERT mRNA の発現は正常歯肉組織では認めず、白板症、扁平上皮癌組織において認められた。一方 hTR, hTEP-1 は正常組織を含む全例に一律な発現を認めた。

3. テロメラーゼ活性の発現と hTERT mRNA の発現との間に高い相関関係を認めた。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究においてご指導いただきました福岡歯科大学口腔顎顔面外科学講座大関 悟教授ならびに三浦正資先生に深甚なる感謝の意を表します。また本研究にご協力くださいました口腔顎顔面外科学講座教室員各位に感謝申し上げます。

本論文の要旨は第 21 回日本口腔腫瘍学会総会（2003 年 1 月、那覇市）において発表した。

引 用 文 献

- 1) 井出利憲：テロメア・テロメラーゼの臨床応用の可能性と今後の展望。医学のあゆみ 194: 148-151 2000.
- 2) Feng, J., Funk, W.D., et al.: The RNA component of human telomerase. Science 269: 1236-1241 1995.
- 3) Meyerson, M., Counter, C.M., et al.: hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell 90: 785-795 1997.
- 4) Nakamura, T.M., Morin, G.B., et al.: Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. Science 277: 955-959 1997.
- 5) Kim, N.W., Piatyszek, M.A., et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266: 2011-2015 1994.
- 6) Yamamoto, E., Kohama, G., et al.: Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cancer 15: 2175-2180 1983.
- 7) 国安弘基, 安井 弥：テロメアとテロメラーゼ 癌におけるテロメラーゼ発現の意義胃癌を中心として。医学のあゆみ 194: 138-141 2000.
- 8) 京 哲, 高倉正博, 他：癌におけるテロメラーゼの活性化の謎にせまる。産婦の実際 49: 2033-2042 2000.