

原発性肺癌におけるテロメラーゼ活性およびテロメア長測定の意義

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 俵矢, 香苗 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9435

原発性肺癌におけるテロメラーゼ活性およびテロメア長測定の意義

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺 洋宇教授)

金沢大学がん研究所細胞制御研究部門細胞分化研究分野教室 (主任: 高橋 守信教授)

俵 矢 香 苗

テロメアは染色体末端に存在する5'-TTAGGG-3'の6塩基対を基本構造とする繰り返し配列である。細胞が分裂を重ねるとテロメア長は次第に短縮し、染色体の安定性が失われ細胞死に帰結する。テロメラーゼはテロメアを伸長させる酵素であり、その活性発現によってテロメア短縮に伴う染色体不安定化が回避されることになる。肺癌を含む多くの癌組織において高いテロメラーゼ活性が報告されているが、正常組織のそれは極めて低い。テロメラーゼ活性およびテロメア長変化と癌の病態との関連性については現在盛んに研究されているが、特に肺癌については不明の点が多い。本研究では、非小細胞肺癌組織におけるテロメラーゼ活性、テロメア長を測定し、臨床病理学的因子 (T因子, N因子, 病期, 組織型, 静脈侵襲, リンパ管侵襲, 胸膜浸潤, 分化度, 核分裂指数) との関係を検討した。さらに肺癌患者の喀痰のテロメラーゼ活性を測定し、肺癌のスクリーニング検査としての有用性を検討した。テロメラーゼ活性はTRAPeze Telomerase Detection Kitを用いたトラップ (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) 法で測定し、半定量化して相対的テロメラーゼ活性 (total product generated, TPG) を算出した。テロメア長は、テロメア反復配列をプローブとしたサザン法を用いて測定した。非小細胞肺癌組織106例中75例 (70.8%), 炎症性肺組織5例中1例 (20.0%) がテロメラーゼ活性陽性であったが、隣接正常肺組織は25例全例が陰性であった。一方、非小細胞肺癌組織のTPG値は 40.1 ± 100 単位, 隣接正常肺組織は 0.048 ± 0.082 単位, 炎症性肺組織 (5例) は 0.135 ± 0.078 単位であり、非小細胞肺癌組織のTPGは正常肺組織, 炎症性肺組織に比し有意に高値を示した ($p < 0.01$)。非小細胞肺癌組織におけるテロメラーゼ活性陽性率と臨床病理学的諸因子との相関は認められなかった。しかしながらTPG値とT因子との相関については、T2症例はT1症例に比しTPG値が有意に高く ($p < 0.01$)、T3-4症例はT1症例に比し高い傾向にあった ($p = 0.06$)。TPG値とN因子とは相関しなかった。病期別にはI期症例に比しII期, III-IV期症例が高いTPG値を示す傾向にあった ($p = 0.06$)。また組織型とTPGとの相関はなかったが、胸膜浸潤陽性例は陰性例に比しTPGが有意な高値を示した ($p < 0.05$)。組織型別に分化度とTPG値の相関をみると、扁平上皮癌において中, 低分化型は高分化型に比し有意に高値を示した ($p < 0.05$)。また核分裂指数とTPG値の間には有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。非小細胞肺癌83例のテロメア長は、隣接正常肺組織に比して延長例が83例中9例 (10.8%), 短縮例が17例 (20.5%), 不変例が57例 (68.7%)であった。テロメラーゼ活性についてはテロメア長延長例では短縮例, 不変例に比し有意に高いTPG値を示した。しかし、テロメアが延長しかつテロメラーゼ活性陰性の症例も見出された。また、肺癌患者24例中14例 (58.3%) で喀痰のテロメラーゼ活性が陽性であった。さらに喀痰細胞診でクラスI-IIIであった18例中9例 (50.0%) がテロメラーゼ活性陽性であった。以上の結果より、肺癌組織のテロメラーゼ活性は腫瘍の増大や周囲組織への浸潤とともに増加すること、テロメア長の維持にはテロメラーゼ活性発現以外の機構も存在することが示唆された。また肺癌患者の喀痰のテロメラーゼ活性の測定は肺癌のスクリーニング検査として有用であることが初めて示唆された。

Key words non-small cell lung cancer, telomere, telomerase, TRAP assay

テロメアは、染色体の末端に存在するTTAGGGの6bの繰り返し配列であり、ヒト染色体では約10 Kbの長さを有する。細胞分裂に伴うDNA複製の過程でテロメアはその長さを減じ¹⁾、4-6 Kbに至ると染色体の安定性保持が困難となり細胞は死滅する²⁾³⁾。したがって、テロメアの伸長能をもたない細胞では、テロメア長によって残余分裂能が規定されることになる。テロメラーゼはテロメア配列を鋳型として染色体末端のテロメアを合成、追加する逆転写酵素である。テロメラーゼの発現を

介して細胞分裂に付随するテロメア長短縮が防止されれば、細胞は際限のない増殖能を獲得することになる⁴⁾。ヒト細胞の場合、極めて高い増殖能をもつ生殖細胞は強いテロメラーゼ活性を示すが、正常体細胞は通常活性をもたない⁵⁾。また種々の臓器の癌組織においてテロメラーゼ活性が高率に発現していることが報告されている⁶⁾⁻¹⁵⁾。テロメラーゼ活性の陽性率は甲状腺癌では50%⁶⁾、胃癌⁷⁾、大腸癌⁸⁾、膵癌⁹⁾、乳癌¹⁰⁾では85-95%である。

平成11年6月14日受付, 平成11年7月21日受理

Abbreviations: TRAP, telomeric repeat amplification protocol; TPG, total product generated; TNM, the tumor-node-metastasis stage

肺癌においては非小細胞癌で78-84%¹¹⁾¹²⁾、小細胞癌では100%¹¹⁾の症例でテロメラーゼ活性が陽性であったと報告されている。テロメラーゼ活性やテロメア長の変化と癌の臨床病態については、現在盛んに研究されているが、特に肺癌については不明の点が多い。例えばテロメラーゼ活性と肺癌の予後との関連に関してHiyamaら¹¹⁾は、テロメラーゼ活性の高い腫瘍では予後が悪い傾向があると述べている。またYashimaら¹⁰⁾は、肺の上皮内癌のテロメラーゼ活性は、進行癌に比べると低値であったと報告している。一方、テロメラーゼ活性と予後は相関しないという報告¹⁷⁾もある。テロメア長に関しては、テロメア長の変化のみられる症例は予後不良であるという報告¹⁷⁾¹⁸⁾と、関連しないという報告¹²⁾がある。

また、ヒトテロメラーゼのRNAコンポーネント (human telomerase RNA component, TERC) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを反応させることにより、ヒト癌由来継代細胞株においてテロメラーゼ活性が抑制され、さらに細胞増殖も抑制されたという報告もあり¹⁹⁾、このようなテロメラーゼ活性阻害物質が癌治療に用いられる可能性もある。テロメラーゼ活性と癌の臨床病態との関連性を明らかにすることは、テロメラーゼ阻害物質による癌治療が臨床応用可能かどうかを予測する一助にもなる。テロメラーゼ活性が癌組織で高率に発現し、正常組織ではほとんど検出されないという特徴から、テロメラーゼ活性の測定は癌の早期診断にも有用であることも期待される。

本研究では、非小細胞肺癌組織のテロメラーゼ活性とテロメア長を測定し、T、N因子、病期、組織型、静脈侵襲、リンパ管侵襲、胸膜侵襲の有無、核分裂指数との関係について検討した。また肺癌患者および非肺癌患者の喀痰のテロメラーゼ活性を測定し、肺癌のスクリーニング検査としての有用性を検討した。

対象および方法

I. 使用細胞及び臨床材料

1. 細胞培養およびその条件

ヒト癌由来継代細胞株HCT-15を直径6 cmのシャーレ内で培養した。培養液にはRPMI-1640培地 (Gibco, Grand island, USA) にウシ胎児血清 (Gibco), 100単位/mlペニシリン (コスモバイオ, 東京), 100 µg/mlストレプトマイシン (コスモバイオ) を添加したものを使用した。培養細胞は、5%二酸化炭素通気培養装置内において37℃で培養し、対数増殖期にある細胞をPBSにて2回洗浄後、トリプシンEDTA [0.05%トリプシン (Sigma, St. Louis, USA), 0.53 mM EDTA (和光純薬, 大阪)] で採取、遠心後、PBSにて一回洗浄を行った。遠沈させた細胞は解析に使用するまで-80℃で保存した。

2. 組織検体

1996年10月から1998年6月までに、金沢大学医学部第一外科学講座にて切除された原発性非小細胞肺癌106例および炎症性肺疾患5例を対象とした。いずれも術前化学療法は施行されていない。肺癌症例の性別は男性75例、女性31例、年齢は25-90才 (平均66.6才)、組織型は腺癌65例、扁平上皮癌31例、大細胞癌6例、腺扁平上皮癌4例であった。TNM (the tumor-node-metastasis stage, TNM) 20分類に基づく病期分類はI期50例、II期16例、III期38例、IV期2例であった。肺癌組織、隣接正常肺組織および炎症性肺組織は切除後直ちに液体窒素に

て急速凍結し、解析に使用するまで-80℃で保存した。

3. 喀痰

1998年2月から同年7月までに金沢大学医学部第一外科学講座で手術を施行された肺癌症例24例と、同時期に入院していた非肺癌症例16例を対象とした。肺癌症例の組織型は腺癌15例、扁平上皮癌5例、小細胞癌2例、大細胞癌1例、腺扁平上皮癌1例であった。非肺癌症例は結核8例、気管支炎2例、肺膿瘍2例、腺腫様過形成1例、その他3例であった。自然に喀出された喀痰1回分を材料とした。喀痰採取後直ちにその一部を細胞診用にスライドガラス2枚に塗抹し、95%エタノール固定後パパニコロウ染色を行った。残りの喀痰にトリプシン溶液 [0.5%トリプシン (Sigma), 0.5%塩化カルシウム (和光純薬), 0.01M PBS] を加え室温で10分間静置したのち、1,500gで5分間遠心した。次いで上清を除き、沈殿に氷冷したPBS10mlを加えて洗浄後、4℃、1,500gで5分間遠心した。この操作を2回行った後、上清を取り除き沈殿を解析に使用するまで-80℃で凍結保存した。

II. テロメラーゼ活性の測定

テロメラーゼ活性は継代細胞、臨床検体、喀痰より抽出した蛋白を用いて、トラップ (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) 法にて測定した。なお、TRAP法にはTRAPeze Telomerase Detection Kit (ONCOR, Gaithersburg, USA) を使用した。

1. 蛋白の抽出

継代細胞株については、 2×10^6 のHCT-15細胞の凍結沈殿をキット付属の1×CHAPS溶解液 (0.5%CHAPS, 10 mM Tris-HCl, 1mM塩化マグネシウム, 1 mM EDTA, 5 mM β-メルカプトエタノール, 0.1 mM ベンザミジン, 10%グリセロール) 200 µlで再懸濁し、氷上で30分間静置した。その後4℃で12,000g, 20分間遠心し、上清を蛋白抽出液とした。組織検体については、クリオスタットにて薄切した凍結組織50 µgにキット付属の1×CHAPS溶解液200 µlを加えて、マイクロホモジナイザー (コスモ・バイオ) を用い10秒間ホモジナイズした。ホモジナイズ液を氷上で30分間静置した後、4℃で12,000g, 20分間遠心し、上清を蛋白抽出液とした。抽出液の蛋白濃度をBioRad-Protein Assay染色液 (日本バイオラッド, 東京) を用いて測定し、蛋白濃度0.5 µg/µlに調整した。喀痰については、凍結沈殿全量に1×CHAPS溶解液200 µlを加え、継代細胞株の方法に準じて蛋白抽出を行った。すべての蛋白抽出液は解析に供するまで-80℃で保存した。

2. TRAP法

蛋白抽出液2 µl (蛋白量1 µg) につき、キット付属のTRAP反応緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.3) 5 µl, 68 mM 塩化カリウム, 1.5 mM 塩化マグネシウム, 1 mM EDTA, 0.08% Tween 20], デオキシリボヌクレオチド混合液 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP各200 µM), TS (telomeric substrate, TS) プライマー (5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3') 0.1 µg, およびプライマーミックス [RPプライマー, K1プライマー, TSK1 テンプレート各0.1 µgを含有] 各1 µl, Taq (thermus aquaticus, Taq) DNAポリメラーゼ (宝酒造, 京都) 0.4単位を加え、滅菌蒸留水により全量50 µlとした。RPプライマーはテロメラーゼ生成物を増幅するアンチセンスプライマーであり、K1プライマーおよびTSK1 テンプレートは36 bpの内部標準の配列を増幅するプライマーである。PCR反応にはProgram Temp Control System PC-800 (ア

ステック, 福岡) を使用した。30℃で30分間テロメラーゼによるオリゴヌクレオチド伸長反応をさせた後, 94℃5分間でテロメラーゼを失活させた。その後94℃30秒間の熱変性, 56℃30秒間のアニーリング, 72℃45秒間のDNA伸長反応を1サイクルとするPCR反応を30サイクル行った。このPCR産物50 μ lにつき5 μ lの色素緩衝液 [全量5 mlにつきグリセロール 2.5 ml (和光純薬), 1.25%プロモフェノールブルー 1.0 ml (和光純薬), 1.25%キシレンシアノール 1.0 ml (和光純薬), 0.5 M EDTA (pH 8.0) 0.5 ml] を加え, 12%ポリアクリルアミドゲルにて定電圧150 V, 2時間の電気泳動を行った。泳動終了後, 10,000倍希釈のSYBRTMGreen I液 (Molecular Probes, Oregon, USA) にて染色し, 蛍光イメージアナライザー-SI (モレキュラーダイナミクスジャパン, 東京) にて画像を取り込み, 画像解析ソフトIMAGE QUANT (Molecular dynamics, California, USA) にて濃度解析を行った。

3. テロメラーゼ活性の半定量

定量化コントロールの信号強度を基準値として以下の式を用いて相対的テロメラーゼ活性 (total product generated, TPG) を計算した。

$$\text{TPG (U)} = \frac{(x - x_0) / c}{(r - r_0) / c_R} \times 100$$

x, 非加熱処理試料の信号強度; x_0 , 加熱処理試料の信号強度; r, コントロールテンプレート (TSR 8 0.1 amol) の信号強度; r_0 , テロメラーゼ活性陰性対照の信号強度; c, 非加熱処理試料試料内の内部標準の信号強度; c_R , 定量化コントロールの内部標準の信号強度)

隣接正常肺組織25例のTPGの平均値+2SD [0.212 単位 (Units, U)] をカットオフ値とし, それよりTPGが高値であればテロメラーゼ活性陽性と定義した。肺癌のテロメラーゼ活性測定においても, 凍結検体に準じてTPG = 0.212 U以上をテロメラーゼ活性陽性とした。

4. TPG値の定量性の検討

2 $\times 10^6$ のヒト癌由来継代細胞株HCT-15細胞からの蛋白抽出液を10倍から10⁴倍に段階希釈してTRAP法を行い, TPGを測定して検量線を作成した。

Ⅲ. テロメア長の測定

テロメア長の測定は, 臨床検体よりゲノムDNAを抽出し, 制限酵素で完全消化したのちアガロース電気泳動を行い, テロメア反復配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション法を行って測定した。

1. ゲノムDNAの抽出

クリオスタットにて薄切した凍結検体50 μ gを600 μ lの氷冷ホモジナイズ緩衝液 [20 mM Tris HCl (pH7.5) (Sigma), 0.1 M 塩化ナトリウム (和光純薬), 1.5 mM 塩化マグネシウム (和光純薬)] 中でマイクロホモジナイザーを使用して10秒間ホモジナイズした後, ホモジナイズ液を4℃, 4,000gで5分間遠心分離した。上清を捨て沈殿にTNE溶液 [10 mM Tris HCl (pH7.5), 0.1 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA] 600 μ lを加えて懸濁し, 10% SDS (和光純薬) 30 μ lおよび, 10 mg/mlのプロテイナーゼK (Sigma) 6 μ lを加え, 混合後50℃で16時間加熱した。これにTE緩衝液 [1 mM Tris HCl (pH8.0), 1 mM EDTA] 飽和フェノール600 μ lを加え室温で4時間穏やかに転倒混和し, 15,000g, 10分間遠心分離したのち水層を採取した。この水層にクロロホル

ム300 μ l, TE緩衝液飽和フェノール300 μ lを加え2時間穏やかに転倒混和し, 15,000g, 10分間遠心分離し水層を分離した。分離した水層約600 μ lに対し, エタノール1 ml, 3 M 酢酸ナトリウム20 μ lを加え, -20℃で16時間以上静置したのち15,000g, 4℃, 20分間遠心分離し, エタノール沈殿を行った。沈殿させたDNAは80%エタノール1 mlで洗浄し, 減圧乾燥させTE緩衝液100 μ lで溶解した。このDNA溶液の260 nmにおける吸光度を測定し, DNA濃度を計算した (1 OD=50 μ g/ml)。

2. プローブの標識

テロメア反復配列 [TTAGGG]_n をプローブとして用いた。プローブ150 ngに対し, T4ポリヌクレオチドキナーゼ10単位 (宝酒造), 10 \times T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 [500 mM Tris HCl (pH8.0), 100 mM 塩化マグネシウム, 50 mM DTT] 5 μ l, [γ -³²P] ATP 1.85 MBq (アマシヤムジャパン, 東京) を加え, 滅菌蒸留水にて全量50 μ lにした。37℃で60分酵素反応を行い5'末端を標識し, MicroSpinTMG-25Columns (ファルマシア・バイオテック, 東京) にて標識DNAを精製した。

3. サザンハイブリダイゼーション

DNA 5 μ gを制限酵素Hinf I (宝酒造) 50単位にて完全消化した。消化したDNA溶液を10 μ lに調整し色素液3 μ lを加え, 0.7%アガロースゲルにて定電圧100 V, 6時間の電気泳動を行った。泳動後0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイド液 (和光純薬) にて染色し, サザン法に準じてトランスファーを行った。すなわち染色後のゲルを加水分解液 (0.25 N 塩酸) に浸し10分間穏やかに振盪したのち, 変性溶液 (1.5 M 水酸化ナトリウム, 0.5 M 塩化ナトリウム) に浸し室温で30分間振盪してDNAを変性させた。DNAはナイロンメンブレンフィルターHybondTM-N⁺ (アマシヤムジャパン, 東京) に, アルカリトランスファー緩衝液 (0.4 N 水酸化ナトリウム) を用いてトランスファーした。2分間の紫外線照射を行い, DNAをナイロンメンブレンフィルターに固定した。フィルターはプレハイブリダイゼーション緩衝液 [2 \times Prehybridization/Hybridization Buffer (Gibco) 5 ml, 0.5% SDS, 蒸留水を加えて10 mlに調整] 中で50℃で2時間のプレハイブリダイゼーションを行った。その後, 標識したプローブを加えたハイブリダイゼーション緩衝液 [2 \times Prehybridization/Hybridization Buffer 5 ml, 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 蒸留水を加えて10 mlに調整] 中で, 50℃で4時間のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションしたフィルターは4 \times SSC (0.18 M 塩化ナトリウム, 18 mM クエン酸ナトリウム) および0.1% SDSを含む溶液中で55℃で30分間洗浄し, 引き続き2 \times SSC及び0.1% SDSを含む溶液中で55℃で30分間洗浄した。BAS-1000 IP plate (富士写真フィルム, 東京) にてオートラジオグラフィーを行い, Mac BAS ver2.0 (富士写真フィルム) にて32P取り込みのピークを検出し, その移動度を測定してテロメア長とした。Hiyamaら¹¹⁾, Shirohaniら²¹⁾の報告に準じ, 隣接正常肺組織のテロメア長に対する肺癌組織のテロメア長の比が1.2以上をテロメア長延長, 0.8より大きく1.2未満を不変, 0.8以下を短縮と定義した。

Ⅳ. 核分裂指数の算出

腫瘍組織のHE染色標本を400倍の視野で鏡検し, 腫瘍細胞2,000細胞中の分裂中の細胞の数を計測しこれを百分率で表した。

Ⅴ. 統計的処理

TPGおよびテロメア長の測定結果は平均値 \pm 標準偏差で表し

た。TPG値と臨床病理学的因子との相関の検討において、2群間の検討にはMann-Whitney U検定を、多群間の検討にはKruskal-Wallis検定を用いた。TPG値と核分裂指数、年齢との相関関係の検討にはPearsonの相関係数を用い、TPGの直線性の検討には回帰分析を用いた。テロメラーゼ陽性率、テロメア長変化と臨床病理学的因子との相関、喀痰のテロメラーゼ活性陽性率の差の検定には χ^2 検定を用いた。腫瘍組織と正常肺組織のテロメア長の差の検定にはt検定を用いた。いずれも危険率5%未満を有意差ありとした。

成 績

I. テロメラーゼ活性の検討

1. TPGの直線性の検討

HCT-15細胞の抽出液を段階希釈してテロメラーゼ活性を測定し(図1)、作成したTPG検量直線より、その定量性について検討したところ、2個の細胞からテロメラーゼ活性の検出が可能であり、既知細胞数に対する蛋白抽出液のTPGは細胞数2個

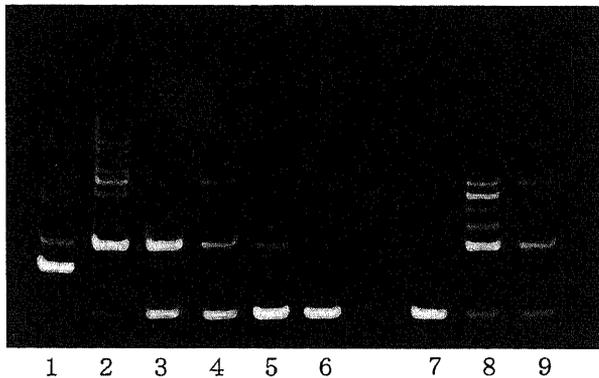


Fig. 1. Telomerase activity in various cell numbers of in colon cancer cell line, HCT-15.

Lane 1, 4×10^4 cells; Lane 2, 4×10^3 cells; Lane 3, 4×10^2 cells; Lane 4, 40 cells; Lane 5, 4 cells; Lane 6, heat treated extract from 4×10^3 cells; Lane 7, CHAPS buffer (as negative control); Lane 8, control template (TSR8 0.1 amole); Lane 9, 200 HCT-15 cells (as positive control)

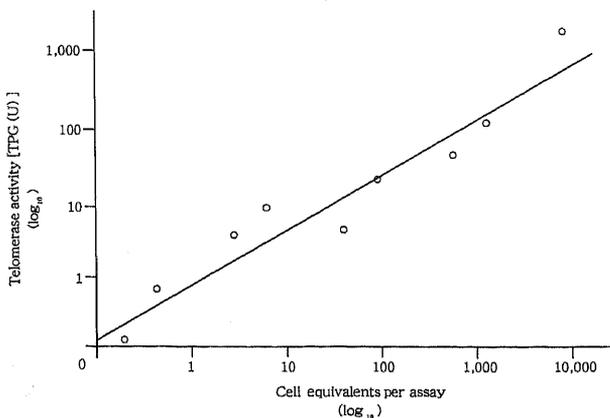


Fig. 2. Total products generated (TPG), as a measure of the level of telomerase activity in primary non-small cell lung cancer. The dose-response curve shows the continuity of the activity. The solid line was obtained from computer fitted data.

から 4×10^4 個の範囲、TPG値は2 Uから1,000Uの範囲で正の相関関係が得られた(図2)。

2. 肺癌組織、隣接正常肺組織、炎症性肺組織におけるテロメラーゼ活性

テロメラーゼ活性の測定は非小細胞肺癌組織106検体、隣接正常肺組織25検体、炎症性肺組織5検体について行った。腫瘍組織でのTRAPアッセイの電気泳動の代表例を図3に示す。レーン3は中等度のテロメラーゼ活性陽性例(TPG=12.0 U)、レーン5はテロメラーゼ活性高陽性例(TPG=116.3 U)であり、レーン7はテロメラーゼ活性陰性例である。非小細胞肺癌組織のテロメラーゼ活性陽性率は70.8%で、隣接正常肺組織に比し有意に高率であった($p < 0.01$)。また、非小細胞肺癌組織のTPGの平均値は隣接正常肺組織、炎症性肺組織に比し有意に高値であった($p < 0.01$)。なお、炎症性肺組織では1例がテロメラーゼ活性陽性であったがそのTPGは0.35 Uで非小細胞肺癌組織の平均値に比べ低値であった(表1)。

3. 非小細胞肺癌組織のテロメラーゼ活性と臨床病理学的因子との相関

テロメラーゼ活性陽性率と腫瘍径、T、N因子、病期との間に相関を認めなかった。TPGについてみると、T2症例はT1症例に比し有意に高いTPG値を示し($p < 0.01$)、T3-4症例もT1症例に比し高いTPG値をとる傾向にあった($p = 0.06$)。N因子とTPGとの間に相関は認めなかった。病期別に検討するとI期症例に比しII期やIII-IV期症例が高いTPGを示す傾向があった($p = 0.06$) (表2)。組織型別にTPGを比較したが、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌、腺扁平上皮癌の間でTPG値に有意差は認めなかった。また、リンパ管侵襲、静脈侵襲の有無とTPG値との間にも有意な相関を認めなかった。一方、胸膜浸潤陽性例は陰性例に比しTPGが有意に高値であった($p < 0.05$) (表3)。腺癌

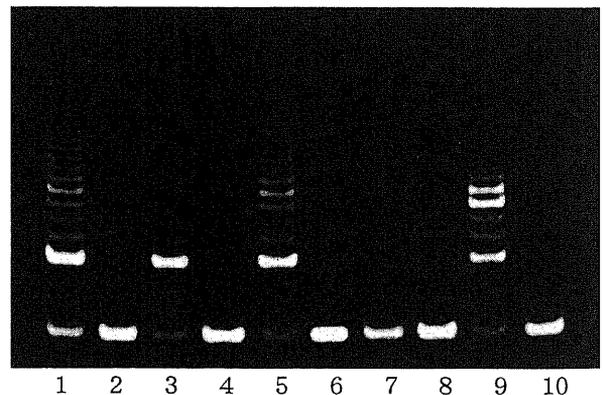


Fig. 3. Telomerase activity in non-small cell lung cancers by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP assay).

Lane 1, 200 HCT-15 cells (as positive control); Lane 2, heat treated extract from 200 HCT-15 cells; Lane 3, non-small cell lung cancer with moderate telomerase activity (TPG=12.0 U); Lane 4, heat treated extract from the same samples as lane 3; Lane 5, non-small cell lung cancer with high telomerase activity (TPG=116.3 U); Lane 6, heat treated extract from the same samples as lane 5; Lane 7, non-small cell lung cancer with no telomerase activity (TPG=0 U); Lane 8, heat treated extract from the same samples as lane 7; Lane 9, control template (TSR8 0.1 amole); Lane 10, CHAPS buffer (as negative control)

Table 1. Telomerase activity in primary non-small cell lung cancer tissues, adjacent normal lung tissues and inflammatory lung tissues.

Histology	No. of samples	No. of telomerase positive samples (%)	TPG ^{a)} (U) ($\bar{x} \pm SD$)
Non-small cell lung cancer	106	75 (70.8)	40.1 ± 100
Adjacent normal lung tissue	25	0 (0)	0.048 ± 0.082
Inflammatory lung tissue	5	1 (20)	0.135 ± 0.078

a) TPG, total product generated.

* p<0.01.

Table 2. Comparison of tumor size, tumor stage (T factor), lymph node metastasis (N factor) and pathological stage with telomerase activity in primary, resected in non-small cell lung cancer

Variables	No. of samples	No. of telomerase positive samples (%)	TPG (U) ($\bar{x} \pm SD$)
Total	106	75 (70.8)	40.1 ± 100
Tumor size			
≤ 2cm	21	14 (67.7)	25.1 ± 41.5
> 2cm	85	61 (71.8)	43.8 ± 110
T factor			
T1	36	22 (61.1)	15.0 ± 26.0
T2	39	31 (79.5)	58.5 ± 139
T3-4	31	22 (71.0)	46.2 ± 94.9
N factor			
N0	64	46 (71.9)	31.8 ± 72.1
N1	10	5 (50.0)	38.3 ± 69.4
N2	28	21 (75.0)	52.4 ± 148
N3	4	4 (100)	91.5 ± 83.0
Pathological stage			
I	50	35 (70.0)	17.4 ± 34.7
II	16	12 (75.0)	67.1 ± 84.5
III-IV	40	28 (70.0)	57.6 ± 147

* p<0.01.

Table 3. Comparison of tumor histology, lymphatic vessel invasion, venous invasion and pleural invasion with telomerase activity in non-small cell lung cancer

Variables	No. of samples	No. of telomerase positive samples (%)	TPG (U) ($\bar{x} \pm SD$)
Histology			
Squamous cell carcinoma	31	22 (71.0)	38.9 ± 63.6
Adenocarcinoma	65	46 (70.8)	36.6 ± 109
Large cell carcinoma	6	4 (66.7)	10.4 ± 20.2
Adenosquamous carcinoma	4	3 (75.0)	149 ± 199
Lymphatic vessel invasion			
ly (-)	68	49 (72.1)	48.5 ± 47
ly (+)	38	26 (68.4)	56.1 ± 33
Venous invasion			
v (-)	46	31 (67.4)	31.7 ± 77.3
v (+)	60	44 (73.3)	46.6 ± 116
Pleural invasion			
p0-1	60	40 (66.7)	28.6 ± 103
p2-3	30	25 (83.3)	67.1 ± 108

* p<0.05.

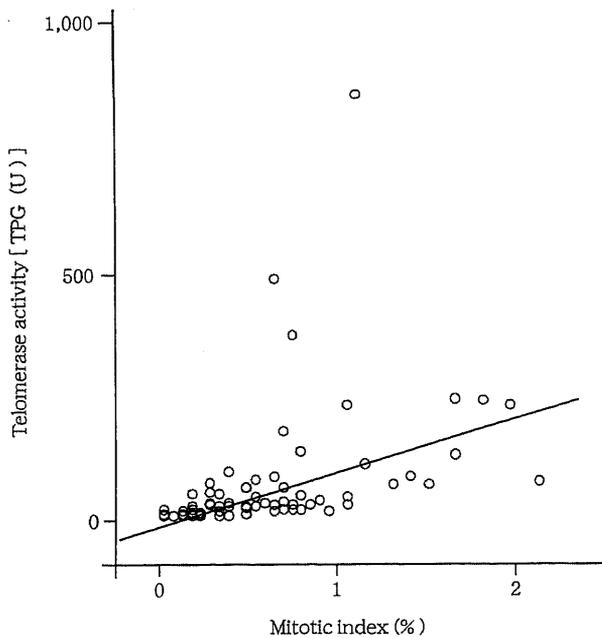


Fig. 4. Correlation between telomerase activity and mitotic index. Mitotic index has positive association to TPG ($R=0.231$, $p<0.01$).

と扁平上皮癌についての組織学的分化度とテロメラーゼ活性陽性率, TPGの関係を表4に示す. 腺癌では分化度とテロメラーゼ活性陽性率およびTPG値との間に相関はみられなかった. 扁平上皮癌においてもテロメラーゼ活性陽性率と分化度の相関は認めなかったが, 低分化型, 中分化型は高分化型に比しTPGが有意に高値であった ($p<0.05$).

4. テロメラーゼ活性と核分裂指数との関係

核分裂指数はテロメラーゼ活性陽性症例では $0.537 \pm 0.056\%$, 陰性症例では $0.071 \pm 0.016\%$ であり, 陽性症例の核分裂指数は陰性症例に比し有意に高率であった ($p<0.01$). また, 核分裂指数と TPG 値との間には有意な正の相関を認めた ($p<0.05$) (図4).

II. テロメア長の検討

テロメア長の測定は非小細胞肺癌組織83検体, 隣接正常肺組織83検体について行った. テロメア長は非小細胞肺癌組織では平均 9.01 ± 2.7 kb, 隣接正常肺組織では平均 9.44 ± 2.1 kb であり両群間で有意差は認めなかった. テロメア長延長は非小細胞肺癌組織83検体中9検体 (10.8%), 短縮は17検体 (20.5%) に認め, 57検体 (68.7%) ではテロメア長は不変であった. テロメア長の変化と臨床病理学的諸因子との間には相関はみられな

Table 4. Comparison of cell differentiation state in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma with telomerase activity

Histology	No. of samples	No. of telomerase positive samples (%)	TPG (U) ($\bar{x} \pm SD$)
Adenocarcinoma	65	46 (70.8)	36.6 ± 109
Well diff. ^{a)}	39	27 (69.2)	24.2 ± 58.5
Moderately diff.	14	8 (91.7)	85.7 ± 213
Poorly diff.	12	11 (91.7)	20.0 ± 21.1
Squamous cell carcinoma	31	22 (71.0)	38.9 ± 63.6
Well diff.	6	3 (50.0)	5.45 ± 2.22
Moderately diff.	18	13 (72.2)	46.6 ± 15.8
Poorly diff.	7	6 (85.7)	50.0 ± 29.2

* $p<0.05$.

a) diff., differentiated.

Table 5. Comparison of tumor size, tumor stage (T factor), lymph node metastasis (N factor) and pathological stage with terminal restriction fragment length

Variables	No. of samples	Alteration of terminal restriction fragment length		
		Reduced (%)	No alteration (%)	Elongated (%)
Tumor size				
≤ 2 cm	16	3 (18.8)	10 (62.5)	3 (18.8)
> 2 cm	67	14 (20.9)	47 (70.1)	6 (9.0)
T factor				
T1	29	5 (17.2)	20 (69.0)	4 (13.8)
T2	32	7 (21.9)	23 (71.9)	2 (6.3)
T3-4	22	5 (22.7)	14 (63.6)	3 (13.6)
N factor				
N0	52	10 (19.2)	35 (67.3)	7 (13.5)
N1-3	31	7 (22.6)	22 (71.0)	2 (6.5)
Pathological stage				
I	40	8 (20.0)	27 (67.5)	5 (12.5)
II	13	4 (30.8)	8 (61.5)	1 (7.7)
III-IV	30	5 (16.7)	22 (73.3)	3 (10.0)

Table 6. Comparison of alteration of tumor histology, lymphatic vessel invasion, venous invasion, and pleural invasion with terminal restriction fragment length

Variables	No. of samples	Alteration of terminal restriction fragment length		
		Reduced (%)	No alteration (%)	Elongated (%)
Histology				
Adenocarcinoma	51	8 (15.7)	40 (78.4)	3 (5.9)
Squamous cell carcinoma	25	7 (28.0)	14 (56.0)	4 (16.0)
Large cell carcinoma	3	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (0.0)
Adenosquamous carcinoma	4	0 (0.00)	2 (50.0)	2 (50.0)
Lymphatic vessel invasion				
ly (-)	54	12 (22.2)	35 (64.8)	7 (13.0)
ly (+)	29	5 (17.2)	22 (75.9)	2 (6.9)
Venous invasion				
v (-)	36	8 (22.2)	24 (66.7)	4 (11.1)
v (+)	47	9 (19.1)	33 (70.2)	5 (10.6)
Pleural invasion				
p0-1	50	10 (20.0)	35 (70.0)	5 (10.0)
p2-3	22	3 (13.6)	16 (72.7)	3 (13.6)

Table 7. Comparison of alteration of terminal restriction fragment length with telomerase activity

Alteration of terminal restriction fragment length	No. of samples	No. of telomerase positive samples (%)	TPG ^{a)} (U) ($\bar{x} \pm SD$)
Reduced	17	14 (82.4)	34.4 ± 69.8
No alteration	57	41 (71.9)	40.2 ± 114
Elongated	9	8 (88.9)	118 ± 147

* p<0.05.

Table 8. Telomerase activity of sputum obtained from lung cancer patients and non-lung cancer patients

Samples	No. of samples	No. of telomerase positive samples (%)
Sputum of lung cancer patients	24	14 (58.3)
Sputum of non-lung cancer patients	16	3 (18.8)

* p<0.05.

Table 9. Correlation between sputum cytology and telomerase activity in lung cancer patients

Sputum cytology	No. of samples	No. of telomerase positive samples (%)
Class I - III	18	9 (50.0)
Class IV - V	6	5 (83.3)
Total	24	14 (58.3)

かった (表5, 6).

Ⅲ. テロメラーゼ活性とテロメア長の変化との相関

テロメラーゼ活性陽性率とテロメア長の変化との間には相関はみられなかった。テロメア長が延長していた9検体のうち、

8検体がテロメラーゼ活性陽性、1検体が陰性であった (表7)。テロメア長が延長していた検体では、不変であった検体に比べ TPGは有意に高値を示した (p<0.05)。

Ⅳ. 喀痰のテロメラーゼ活性

肺癌症例および非肺癌症例の喀痰のテロメラーゼ活性を表8に示す。テロメラーゼ活性陽性症例は肺癌症例では24例中14例 (58.3%)、非肺癌症例では16例中3例 (18.8%)であった。テロメラーゼ活性陽性率は肺癌症例において有意に高率であった (p<0.05)。喀痰のテロメラーゼ活性による肺癌診断の感度は0.583、特異度は0.813、偽陽性率は0.188であった。肺癌症例24例の喀痰のテロメラーゼ活性と細胞診との関係を表9に示す。喀痰細胞診クラス I-IIIの18症例中9例 (50%)がテロメラーゼ活性陽性であった。一方喀痰細胞診クラス IV-Vの6例のうち5例 (83.3%)がテロメラーゼ活性陽性であった。

考 察

哺乳類細胞のテロメラーゼ活性の測定には、1994年にKimら²²⁾により報告されたPCRを応用したTRAP法が一般的に用いられている。TRAP法の原理は以下の如くである。テロメラーゼによるDNA伸長反応の基質となる配列であるTSオリゴヌクレオチドとテロメラーゼ抽出液を反応させると、テロメラーゼがTSオリゴヌクレオチドにテロメア配列を付加する。次いで、TSオリゴヌクレオチドをセンスプライマーとして用いたPCR反応を行い、テロメラーゼ生成物を増幅して検出する。以上の方法を用いて癌組織のテロメラーゼ活性を測定する場合の問題点として、第1に各反応ごとにPCR効率に差が生じるため異なる検体間での活性の高低を比較できないことが挙げられる。第2に癌組織内にPCR反応の阻害物質が含まれている場合には偽陰性となる可能性があり、かかる阻害物質の影響を除外できないことである。これらの問題点を解決する方法として、TRAP反応系にテロメラーゼの基質にはならず、かつTRAP法で用いるプライマーによって増幅されるDNAを内部標準として加える方法が現在用いられている²³⁾。検体にPCR阻害物質が含まれていると、内部標準の増幅が阻害されPCR阻害物質の有無が判定できる。また内部標準の増幅産物とテロメラーゼ産物のラダーの濃度をデシントメーターにより定量することによって、テロメラーゼ活性を半定量化することも可能である。Wrightら²⁴⁾は、ラットのミオゲニン遺伝子150 bpの両端にプライマー配列の一部を付加したDNAを内部標準として用い、乳癌由来の不死化細胞株(SCC70)100細胞のテロメラーゼ活性を基準値として比活性を算出した。この方法では、テロメラーゼ活性の高い検体において150 bpの内部標準によるバンドがテロメラーゼ産物によるラダーバンドに重なるため濃度解析が不正確になる。また細胞株での活性を基準値としているため、多施設間でのデータの比較が困難であるという問題点がある。本研究で使用したTRAP_{eze} Telomerase Detection Kitでは36 bpの内部標準を使用しているため、内部標準産物のバンドとテロメラーゼ産物のラダーバンドとの重なりが回避される。また、8個のテロメア繰り返し配列で伸長したTSプライマーと同一の配列をもつオリゴヌクレオチドTSR8を定量化コントロールとして用い、定量性を高めている。Holtら²⁵⁾は、同キットによる測定法とWrightら²⁴⁾の測定法を比較し、同キットによる測定法が定量性、感度ともにより優れていると報告している。本研究ではまず、同キットを測定に使用するにあたりTPG値が定量性をもつ範囲をヒト癌由来細胞HCT-15を用いて検討した。その結果TPG値が2 Uから1,000 Uの範囲では抽出蛋白量とTPG値との間に直線性が得られた。大木ら²⁶⁾も同様の検討を行い、TPG値が1 Uから1,000 Uの範囲内で同様の直線性が得られたと述べている。本研究において非小細胞肺癌106例のTPGの最大値は791 Uであり、TPGを用いてテロメラーゼ活性の高低を比較することは妥当であると考えられた。

本研究では、非小細胞肺癌106例中75例(70.8%)でテロメラーゼ活性が陽性であった。Hiyamaら¹¹⁾は、非小細胞肺癌125例中98例(78.4%)、Albanellら¹²⁾は99例中84例(84.8%)でテロメラーゼ活性が陽性であったと報告している。本研究では、非小細胞肺癌のテロメラーゼ活性陽性率はHiyama¹¹⁾らと同程度であったが、Albanellら¹²⁾より低かった。Albanellら¹²⁾はテロメラーゼ陽性のカットオフ値を明示しておらず、カットオフ値

のとり方の違いによって陽性率に差が生じた可能性がある。また本研究では、各検体の加熱処理抽出液の信号強度をバックグラウンドとしてTPG値の計算に用いたが、Albanellら¹²⁾は陰性対照を用いている。このため本研究ではTPG値がAlbanellら¹²⁾より低く算出された可能性も考えられる。

炎症性肺組織のTPGは非小細胞肺癌組織より有意に低値を示した。また、炎症性肺組織の5例中1例でテロメラーゼ活性が陽性であったが、陽性例のTPGは非小細胞肺癌組織と比べると低値であった。炎症性肺組織に弱いテロメラーゼ活性を認めた原因の一つとして、組織中のリンパ球の影響が考えられる。骨髄中及び末梢血中のリンパ球は弱いテロメラーゼ活性を有し、マイトージェン刺激にて活性が上昇する²⁷⁾。また癌の転移のないリンパ節からもテロメラーゼ活性が検出されている²⁸⁾。炎症性組織には抗原刺激を受けて活性化されたリンパ球が浸潤しており、このためテロメラーゼ活性が検出された可能性がある。また表皮細胞の基底層²⁹⁾や、腸粘膜の陰窩の細胞³⁰⁾からも弱いテロメラーゼ活性が検出されており、上皮細胞の基底層にある再生能をもった細胞にテロメラーゼ活性があると考えられている。気管支粘膜の基底層にも同様の細胞があり、炎症組織ではこの細胞の増殖能が亢進しており、かかる細胞の存在が炎症性組織におけるテロメラーゼ活性陽性例の存在に関与している可能性もある。

非小細胞肺癌組織のテロメラーゼ活性陽性率と臨床病理学的因子との相関に関してAlbanellら¹²⁾はT因子、N因子、術後病理病期との間には相関を認めなかったと報告している。本研究でもテロメラーゼ活性陽性率はいずれの因子とも相関を認めなかった。一方、TPGと臨床病理学的因子との相関に関して、Albanellら¹²⁾はT3症例はT1-2症例に比し、N1-2症例はN0症例に比し、術後病理病期ⅢA期症例はⅠ期症例に比しTPGが高値であったと報告している。本研究ではT2症例はT1症例に比してTPGが有意に高値を示し、T3-4症例はT1症例に比して高値を示す傾向を認めたが、N因子別には有意差を認めなかった。また、胸膜浸潤陽性例は陰性例に比べTPGが有意に高値を示した。病期別にはⅡ期、Ⅲ-Ⅳ期症例はⅠ期症例に比しTPGが高値を示す傾向を認めた。すなわち、多くの肺癌組織においてテロメラーゼ活性は病期が早期の段階からすでに認められ、TPGは病期が進行するにしたがって高値を示すことが明らかになった。大腸癌³¹⁾や甲状腺癌³²⁾、乳癌³³⁾において、テロメラーゼ活性陽性例では陰性例に比し、核分裂指数や増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen)染色率、Ki-67染色率が高いと指摘されている。本研究の非小細胞肺癌の症例でも核分裂指数について同様の結果が得られた。また、核分裂指数が高値であるほどTPGも高値を示した。不死化細胞株において、テロメラーゼ活性はG1, S₁, G2₁, M期で高く、細胞周期を離脱させG0期に誘導するとテロメラーゼ活性が低下すると報告されている³⁴⁾。さらに再び細胞周期に戻すとテロメラーゼ活性の再上昇が認められるとされている。従ってテロメラーゼ活性は細胞の分裂増殖の盛んな癌細胞ほど高値を示すと考えられる。本研究でみられた核分裂指数とTPG値の相関は、癌組織中でも不死化細胞株と同様に、分裂増殖の盛んな癌細胞を多く含む組織ほど、テロメラーゼ活性は高値であることを示している。

肺扁平上皮癌と肺腺癌について組織学的分化度とTPG値の相関を検討したところ、扁平上皮癌においては高分化型に比し中、低分化型ではTPG値が有意に高かった。なお、中分化型

と低分化型の間では差を認めなかった。しかし、腺癌では分化度とTPG値との相関を認めなかった。さらに分化度とテロメラーゼ活性陽性率との間には腺癌、扁平上皮癌ともに相関を認めなかった。Albanellら¹²⁾は肺癌組織の分化度とTPG値あるいはテロメラーゼ活性陽性率との間には相関を認めなかったと述べている。一方藤原ら³⁵⁾は、肺腺癌において中分化型、低分化型は高分化型に比しテロメラーゼ活性が高かったと報告している。彼らは染色体の不安定性も検討しており、中、低分化型では高分化型に比し染色体の不安定性の出現頻度が高かったと述べている。Okayasuら³¹⁾は、大腸癌においてテロメラーゼ活性は腫瘍径や深達度とは相関せず、分化度や細胞増殖速度と相関すると述べている。一方、大腸癌ではその分化度とテロメラーゼ活性は相関しないとする報告もある¹³⁾。また、胃癌では高分化型でテロメラーゼ活性が高いとの報告もあり³⁶⁾、テロメラーゼ活性と腫瘍の分化度との相関に関しては症例数を増やして更なる検討が必要と考えられる。

テロメア長の変化については83例中26例でテロメア長の変化を認めており延長例9例(10.8%)、短縮例17例(20.5%)であった。肺癌の手術材料のテロメア長についてHiyamaら¹⁸⁾は延長例3%、短縮例23%、Albanellら¹²⁾は延長例6%、短縮例18%と報告しており、本研究の症例より延長例が少なかった。Hiyamaら¹⁸⁾、Albanellら¹²⁾は、1%のアガロースゲルを電気泳動に使用しているが、本研究では0.7%のゲルを使用している。DNAの高分子領域での分離能はゲルの濃度が低いほど良く、このため高分子領域の評価が異なったことも一因であろう。テロメア長の変化と、腫瘍径、組織型、病期などの臨床病理学的因子との間には有意の相関を認めなかった。

テロメラーゼ活性とテロメア長の変化との相関について、本研究ではテロメア長延長例のTPG値は不変例に比し有意に高かったが、短縮例と不変例との間には差を認めなかった。Albanellら¹²⁾、平島ら¹⁷⁾はヒト肺癌についてテロメア長の変化とテロメラーゼ活性との間に相関を認めなかったとしている。またNakashioら³⁷⁾も肝細胞癌においてAlbanellら¹²⁾と同様の結果を報告している。テロメラーゼ活性はテロメア長を制御する単独因子ではない。テロメア長はDNA複製の度に起こるテロメアの短縮、テロメラーゼによるテロメアの伸長、テロメア結合蛋白によるテロメア配列の安定化の3つにより制御されていると考えられている³⁸⁾。非小細胞肺癌のTPG高値症例では、高い分裂能を差し引いてもテロメラーゼによるテロメア長の延長が認められた。

テロメア長変化のみられた26例中4例(短縮例3例、延長例1例)のテロメラーゼ活性は陰性であった。テロメラーゼ活性陰性でかつテロメア長が短縮している症例では、腫瘍がテロメラーゼ活性を獲得していない可能性が考えられる。しかし、テロメラーゼ活性が陰性であるにもかかわらずテロメア長が延長している症例の存在は、テロメラーゼによるテロメア維持機構のみでは説明できない。酵母では、テロメラーゼによらない染色体組み替えによるテロメア長維持機構の存在が指摘されている³⁹⁾⁴⁰⁾。哺乳類細胞ではこの機構の存在は具体的には証明されていないが、Bryanら⁴¹⁾はテロメラーゼ活性は陰性で、テロメア長が非常に長かったヒト腫瘍由来不死化細胞株をあげ、ヒト細胞でのこの機構の存在を示唆した。これまでに臨床検体においてテロメラーゼ活性が陰性かつテロメア長が延長している癌組織の存在を述べた報告はなく、その意味で本研究におけるか

かる症例の存在は貴重といえる。

テロメラーゼ活性は種々の癌組織で高率に発現し、正常組織ではほとんど発現していないことから癌の早期診断に応用できる可能性がある。テロメラーゼ活性は、活性を有する数個の細胞から検出可能であるので、極微量の検体を用いて判定することができる。肺癌に関しては、気管支洗浄液のテロメラーゼ活性を測定した報告があり、その陽性率は約80%であった⁴²⁾⁴³⁾。気管支洗浄液は気管支鏡下で採取され、多少なりとも侵襲を伴う。しかし、癌のスクリーニング検査としては非侵襲的方法が望ましく、本研究では喀痰のテロメラーゼ活性測定の有用性を検討した。本研究では喀痰採取後直ちに検体をトリプシン処理し、細胞ペレットとして凍結保存し、テロメラーゼの失活を防止した。その結果、肺癌症例24例中14例の喀痰のテロメラーゼ活性が陽性であり、感度は0.583であった。また、肺癌症例のうち細胞診でクラスI-IIIと診断された18例中9例がテロメラーゼ活性陽性であった。早期肺癌のスクリーニングに最も有用であるとされている喀痰細胞診で陰性と判定された症例で、テロメラーゼ活性陽性であった意義は極めて大きいものと思われる。細胞診では採取された喀痰の一部しか鏡検しないが、テロメラーゼは採取された喀痰全体のペレットより抽出し測定するため、細胞診では捕捉できなかった癌細胞のテロメラーゼ活性を検出できたものと考えられる。しかし、非肺癌患者の喀痰でも16例中3例(18.8%)でテロメラーゼ活性が検出されており、癌細胞以外の活性化マクロファージや、リンパ球などのテロメラーゼ活性を測定している可能性がある。一方細胞診でクラスIV-Vと診断された6例中5例がテロメラーゼ活性陽性、1例が陰性であった。陰性例の1例では肺癌組織のテロメラーゼ活性も陰性であった。細胞診がクラスIV-Vでテロメラーゼ活性が陰性である他の原因として、喀痰中で癌細胞が死滅しテロメラーゼ活性が失活するか、剥離癌細胞の数が非常に少ない可能性が考えられる。非癌細胞由来のテロメラーゼ活性を考慮した適切なカットオフ値の設定や検体の処理および保存方法、テロメラーゼ活性測定法の煩雑さなどの問題点を有するものの、喀痰中のテロメラーゼ活性測定は今後肺癌早期診断の有用な方法になるものと思われる。

結 論

非小細胞肺癌切除および隣接正常肺組織に対しテロメラーゼ活性測定、テロメア長測定を行った。また肺癌患者の喀痰中のテロメラーゼ活性を測定し、以下のような結論を得た。

1. テロメラーゼ活性は、非小細胞肺癌組織では70.8%で陽性であったが、隣接正常肺組織ではすべて陰性であった。TPGは、非小細胞肺癌組織では隣接正常肺組織に比し有意に高値を示した。

2. 非小細胞肺癌組織において、テロメラーゼ活性陽性率とT、N因子、病期、組織型、分化度との間に相関を認めなかった。TPGはT因子や病期が進行した症例で高値を示す傾向にあった。またTPG値と核分裂指数には正の相関があった。

3. 非小細胞肺癌組織83例中26例(31.3%)でテロメア長の変化を認めた。短縮例は17例、延長例は9例であった。テロメア長変化とT、N因子、病期、組織型、分化度との相関は認めなかった。テロメア長延長例では不変例に比し有意にTPGが高値であった。

4. 肺癌患者24例中14例(58.3%)、非肺癌患者16例中3例

(18.8%) の喀痰がテロメラーゼ活性陽性であった。肺癌患者24例中18例が喀痰細胞診クラスI-IIIで、うち9例の喀痰がテロメラーゼ活性陽性であった。6例がクラスIV-Vでそのうち1例の喀痰のテロメラーゼ活性は陰性であった。

以上の結果より、非小細胞肺癌では比較的早期の段階からテロメラーゼ活性は高率に発現し、病期の進行とともに、また細胞増殖速度を反映して高活性となることが明らかになった。さらに肺癌患者の喀痰中のテロメラーゼ活性測定は肺癌の早期診断に有用であることが初めて示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇親なる御指導と御校閲を頂いた恩師渡辺洋宇教授ならびに金沢大学がん研究所細胞制御研究部門細胞分化研究分野教室の高橋守信教授に深甚なる謝意を表します。また直接のご指導を賜りました、同教室藤本幸太郎助手および金沢大学医学部第一外科学講座川上和之助手に感謝致します。さらに終始本研究の遂行にご協力頂きました、田中洋子技師をはじめ金沢大学医学部第一外科学講座の皆様へ深く感謝致します。

なお本研究の要旨の一部は、第36回日本癌治療学会総会(1998年、福岡)および、第39回日本肺癌学会総会(1998年、金沢)において発表した。

文 献

- 1) Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 18: 569-573, 1991
- 2) Ishikawa F. Telomere crisis, the driving force in cancer cell evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 1-6, 1997
- 3) Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256: 271-282, 1995
- 4) Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Baccetti S, Hirte HW, Counter CM, Grieder CW, Piatyszek MA, Wright WE, Shay JW. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 307-315, 1994
- 5) Shay JW, Wright WE, Wrebin W. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochem Biophys Acta* 1072: 1-7, 1991
- 6) Yashima K, Vuitch F, Gazdar AF, Fahey TJ. Telomerase activity in benign and malignant thyroid diseases. *Surgery* 122: 1141-1146, 1997
- 7) Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 55: 3258-3262, 1995
- 8) Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 2353-2356, 1995
- 9) Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 57: 326-331, 1997
- 10) Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 88: 116-122, 1996
- 11) Hiyama K, Hiyama E, Ishikawa S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small cell and non small cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87: 895-901, 1995
- 12) Albanell J, Linaldo F, Rusch V, Engelhardt M, Langerfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MA, Dmitrovsky E. High telomerase activity in primary lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 89: 1609-1615, 1997
- 13) Tahara H, Kuniyasu H, Yoshizaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T, Tahara E. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1: 1245-1251, 1995
- 14) Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Medicine* 1: 249-255, 1995
- 15) Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, Kajiyama G, Ide T. Telomerase activity in human liver tissues. *Cancer Res* 55: 2734-2736, 1995
- 16) Yashima K, Litzky A, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, Milchgrub S, Strivastava S, Piatyszek MA, Shay JW, Gazdar AF. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res* 57: 2373-2377, 1997
- 17) 平島智徳, 小宮武文, 新田 隆. 非小細胞肺癌のテロメラーゼ長の予後因子としての意義. *日本臨床* 56: 1264-1271, 1998
- 18) Hiyama K, Ishioka S, Shirotani Y, Inai K, Hiyama E, Murakami I, Isobe T, Inamizu T, Yamakido M. Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and Rb. *Oncogene* 10: 937-944, 1995
- 19) Kondo K, Kondo Y, Li G, Silverman RH, Cowell JK. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene* 16: 3323-3330, 1999
- 20) International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumors. 5th ed, p93-97, A John Wiley & Sons Sobin, LH Wittkind Ch, New York, 1997
- 21) Shirotani Y, Hiyama K, Ishioka K. Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. *Lung Cancer* 11: 29-41, 1994
- 22) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015, 1994
- 23) 田原栄俊, 井出利憲, 田原栄一. 消化器がんのテロメラーゼ. *最新医学* 52: 73-79, 1997
- 24) Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modification of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res* 23: 3794-3795, 1995
- 25) Holt SW, Norton JC, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomeric repeat amplification protocol (TRAP) to the new TRAPeze telomerase detection kit. *Methods Cell Science* 18: 237-248, 1996
- 26) 大木進司, 佐藤久芳, 渡辺文明. 大腸癌の発癌進展におけるテロメラーゼ活性. *癌と化学療法* 25: 469-474, 1998
- 27) Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 155: 3711-3715, 1995

- 28) Yashima K, Piatyszek MA, Saboorian HM. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. *J Clin Pathol* 50: 110-117, 1997
- 29) Bachor HC, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of epidermis in human skin and immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6476-6481, 1996
- 30) Hiyama E, Hiyama K, Tatsumoto N. Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 9: 453-458, 1996
- 31) Okayasu I, Mitomi H, Yamashita K. Telomerase activity significantly correlates with cell differentiation, proliferation and lymph node metastasis in colorectal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 124: 444-449, 1998
- 32) Okayasu I, Osakabe T, Fujiwara M. Significant correlation of telomerase activity in thyroid papillary carcinomas with cell differentiation, proliferation and extrathyroidal extension. *Jpn J Cancer Res* 88: 965-970, 1997
- 33) Landberg G, Nielsen NH, Emedin SO, Cajandar J, Ross G. Telomerase activity is associated with cell cycle regulation in breast cancer. *Cancer Res* 57: 549-554, 1997
- 34) Holt SW, Wright WE, Shay JW. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol* 16: 2932-2939, 1996
- 35) 藤原陸憲, 岡安 勲, 武村民子, 押村光男. 肺腺癌の分化度とテロメラーゼ活性・染色体異常の相関. *日本臨床* 56: 1258-1263, 1998
- 36) 小川健治, 若杉慎司, 勝部隆男, 広瀬国隆, 梶原哲郎. 胃癌組織におけるテロメラーゼ活性と臨床病理学的諸因子との関連. *日本臨床* 56: 102-106, 1998
- 37) Nakashio R, Kitamoto M, Nakanishi T, Tahara H, Ide T, Asahara T, Kajiyama G. Alteration of telomeric repeat length in hepatocellular carcinoma is independent of telomerase activity. *Int J Oncol* 11: 139-143, 1997
- 38) Grieder CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65: 337-365, 1996
- 39) Lunbald V, Blackburn EH. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescue est1-senescence. *Cell* 73: 347-360, 1993
- 40) Wang SS, Zaikan VA. Telomere-telomere recombination provides an express pathway for telomere acquisition. *Nature* 345: 456-458, 1990
- 41) Bryan TM, Englezou A, Guputa J. Telomerase elongation in immortal human cell without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14: 4240-4248, 1995
- 42) Yahata N, Ohyashiki K, Ohyashiki JH et al. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst* 90: 684-690, 1998
- 43) 出口博之, 四ノ宮成祥, 尾関雄一. 気管支洗浄液のテロメラーゼ活性測定の肺癌診断における有用性. *肺癌* 38: 815-823, 1998

Telomerase Activity and Telomere Length in Lung Cancers. Kanae Tawaraya, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. *Juzen Med Soc.*, **108**, 443 - 454 (1999)

Key words non-small cell lung cancer, telomere, telomerase, TRAP assay

Abstract

Human telomeres are specialized nucleoprotein structures located at the ends of chromosomes and containing the 5'-TTAGGG-3' repeats. Conventional DNA polymerases cannot replicate the ends of linear chromosomes, resulting in gradual telomere shortening as a cell divides. Telomerase is a specialized DNA polymerase that is able to synthesize de novo telomeric DNA which can be added to the chromosome ends, thus compensating for the normal, gradual loss of telomeres. High telomerase activity is expressed in most human tumors including lung cancers but is rarely detected in normal somatic cells. The present study was undertaken to assay for telomerase activity and the telomere length in surgical specimens from non-small cell lung cancer patients and to correlate these results with various clinical and pathological findings (tumor histology, pathological stage, tumor stage, lymph node metastasis, cell differential stage, and mitotic index). We further assayed for telomerase activity in sputum samples collected from 24 lung cancer patients and the results were evaluated for suitability as an early diagnostic test.

The telomerase assay was performed according to the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay using a TRAP_{eze} Telomerase detection kit. Results were quantitated as the total product generated (TPG). The telomere length was determined by Southern blot analysis using telomere repeats DNA as the probe. Telomerase activity was detected in 75/106 (70.8%) of non-small cell lung cancer tissues, but in none of adjacent normal tissues. The telomerase activity level (TPG) of non-small cell lung cancers (40.1 ± 100 u) was significantly higher than that of either adjacent normal tissues (0.048 ± 0.082 u) or inflammatory lung tissues (0.135 ± 0.078). Statistically significant positive relationships were detected between the level of telomerase activity and the tumor stage, pathological stage and mitotic index of the tumor cells. In contrast, no significant relationship was detected between TPG and the lymph node metastasis stage or tumor histology. However, tumor tissues from patients with pleural invasion showed generally higher TPGs. Less differentiated squamous cell carcinoma

exhibited higher TPG than more differentiated cells. Of the 83 non-small cell lung cancer specimens examined, 9 cases (10.8%) showed elongated telomere length in comparison with the adjacent normal tissues, while 17 cases (20.5%) showed reduced and 57 cases (68.7%) unaltered telomere lengths. Statistically higher telomerase activity was associated with lung cancer tissues with elongated telomere lengths. Telomerase activity was detected in 14/24 (58.3%) sputum specimens collected from non-small cell lung cancer patients and 3/16 (18.8%) sputum specimens from non-lung cancer patients. 9/18 (50.0%) sputum specimens from class I - III patients and 5/6 (83.3%) sputum specimens from class IV - V patients were found telomerase positive, these results suggesting the potential usefulness of a telomerase assay of sputum as a non-invasive screening test for lung cancers.