

研究のトピックス

肝疾患におけるテロメア長の多段階的短小化

鳥取大学医学部細胞工学教室

三浦典正・井藤久雄・押村光雄

Progressive reduction of telomeres during
human hepatocarcinogenesis

Norimasa MIURA¹, Hisao ITOH², Mituo OSHIMURA¹

¹Department of Molecular and Cell Genetics, ²Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Tottori University, Yonago 683, Japan

ABSTRACT

Telomeres are repeated sequences located on both ends of individual chromosomes in eukaryotes. The sequence of human telomere DNA consists of guanine rich tandem repeats of (TTAGGG)_n, which can be 10-15 kilobase pairs long. Telomeres progressively shorten with age or population doublings in somatic cells in culture and in vivo, since DNA and somatic cells do not have detectable levels of the enzyme, telomerase, which adds repeated telomere sequences to the 5' ends of DNA. Telomerase activity has been detected in immortalized cells in vitro and tumor cells and represents an important difference between normal and cancer cells. Telomere shortening has been assumed to cause a critical destabilization of chromosomes, growth arrest, and possibly cellular senescence. Telomerase activity and the maintenance of telomere length might be an obligatory step in the progression of human tumors and the immortalization of cells, but the basis for regulation of telomerase activity in tumor cells is unknown.

The length of terminal restriction fragment (TRF) was studied by the Southern blot analysis in hepatocellular carcinomas (HCC) and their-surrounding tissues (chronic active hepatitis; CAH or liver cirrhosis; LC) in 6 HCV antibody-positive, 7 HBV antigen-positive and 3 virus-negative patients with HCC. The average TRF in all the 3 types of HCC were significantly shorter than those of the surrounding tissues, i.e., LC or CAH ($P < 0.01$ by paired t test). In order to verify the findings, the TRF of HCC, LC or CAH in additional 6 HCV-antibody positive, 5 HBV-antigen positive and virus-negative patients were analyzed, and taken together, the results revealed that the TRF progressively shortened during hepatocarcinogenesis (normal → CAH → LC → HCC) at least in HBV- and HCV-positive patients.

Thus, the present findings strongly support the idea that a persistent cell proliferation or rapid cell turnover by damage of hepatic cells results in a multistep process of hepatocarcinogenesis, and further indicate that the TRF reduction is strongly associated with hepatocarcinogenesis.

(Accepted on January 9, 1995)

Key words : telomere, cell turnover, hepatocarcinogenesis, aging

I. はじめに

1930年, Hermann J. Mullerは, ショウジョウバエを用いたX線照射による染色体再構成の実験途上, 末端を切断された染色体修復がなされない場合, 非常に不安定で他の染色体との融合を生じたり, そのまま分解したりする現象を見出した. 彼はこの現象から, 染色体の末端部に染色体を安定に保つ働きがあると考え, ギリシャ語のtelos (= 末端) とmeros (= 体) にちなんでこの部分をテロメア (telomere) と命名した¹⁾. その後, 1978年, E. H. Blackburn とJ. G. Gallは織毛虫の一種であるテトラヒメナからテロメアを単離し, その配列がTTGGGという6塩基の反復配列からなることを明らかにした²⁾. このテロメア配列は, 種により多少の差異はあるものの生物間で共通して保存している構造であることが明らかにされた.

1) テロメアとテロメラーゼ

テロメアはあらゆる染色体の両端の構造体である. ヒトゲノムに存在する繰り返し配列と染色体 in situ hybridization を用いた研究から, (TTAGGG)_n 繰り返し配列が広く脊椎動物の染色体末端に存在することが明らかにされてきた. テロメアはタンパク質の情報をもたない領域であり, ヒトの場合, グアニンを多く含むTTAGGGという6塩基が250~1500コピー繰り返し構造をし

ており, それよりも内側には, テロメアより長いやや不規則な繰り返し配列からなるサブテロメア領域が存在する (図1). 最近になって, テロメアは, 染色体の融合・欠失などの変化を防ぎ, 染色体の安定を保持するばかりでなく, 細胞の老化・腫瘍化に深く関与していることが明らかにされてきた. また, テロメアはテロメラーゼというリボ核タンパク質により合成されることが明らかとなってきた (図2)³⁾. このテロメラーゼはテロメア配列の相補配列のRNAを酵素成分に持ち, 内因性のRNAを鋳型としてDNAのテロメア部分を合成する1種のユニークな逆転写酵素である⁶⁾⁷⁾.

2) 細胞倍加数とテロメア

ヒトのリンパ球から抽出されたDNAよりテロメア長を測定し, 加齢に伴いテロメア長が短小化することが知られている⁹⁾²¹⁾. テロメアは1回の細胞集団の倍加 (population doubling level:PDL)につき, 33~70bp短小化する. その理由は鎖状DNA複製のメカニズムで説明される (図3). すなわち, 真核細胞では直鎖状のDNAの複製に際し, その鋳型の3'末端側の複製が不完全となる. つまり, DNA合成酵素は合成開始にあたり, RNAプライマーを必要とし, 合成酵素の近傍にDNAに相補的に作られたRNAプライマーは, 鋳型DNAの3'側の末端あるいは末端近傍につき, 鋳型DNAの5'側へ向かっ

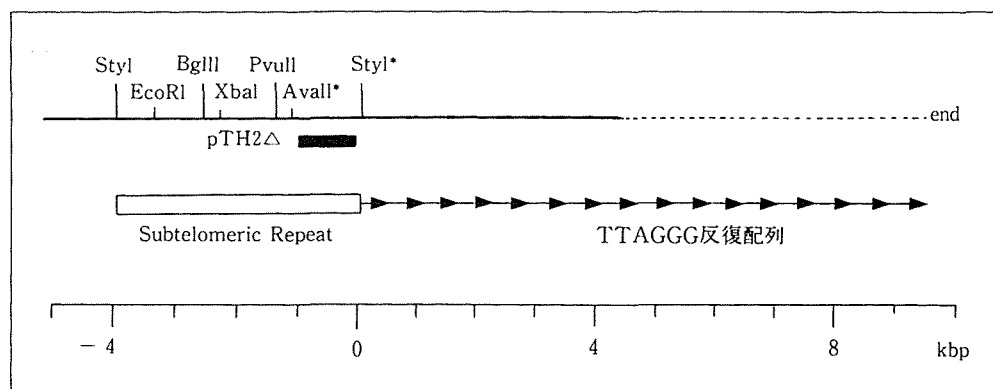


図1. ヒト染色体末端粒 (テロメア) の1例

この例では約10KbのTTAGGGの反復配列と, 約4Kbのサブテロメア領域が示されている (臨床分子医学, vol. 1, No. 9, 1993, 加治和彦, 「遺伝子から見た老化」より抜粋)



図2. テロメラーゼによるテロメアの伸長

- テロメラーゼのもつ内因性のRNA配列5'-CAACCCCAA-3'よりテロメアの末端を認識して、これに結合する
- RNAを鋳型として、テロメア部分を合成する
- テロメラーゼ自身はテロメアから離れることなく、鋳型となるRNAのみが移動して、テロメア末端を認識して結合する
- RNAを鋳型として、テロメア部分が合成され、この繰り返してテロメアが伸長されている (文献⁷⁾より抜粋)

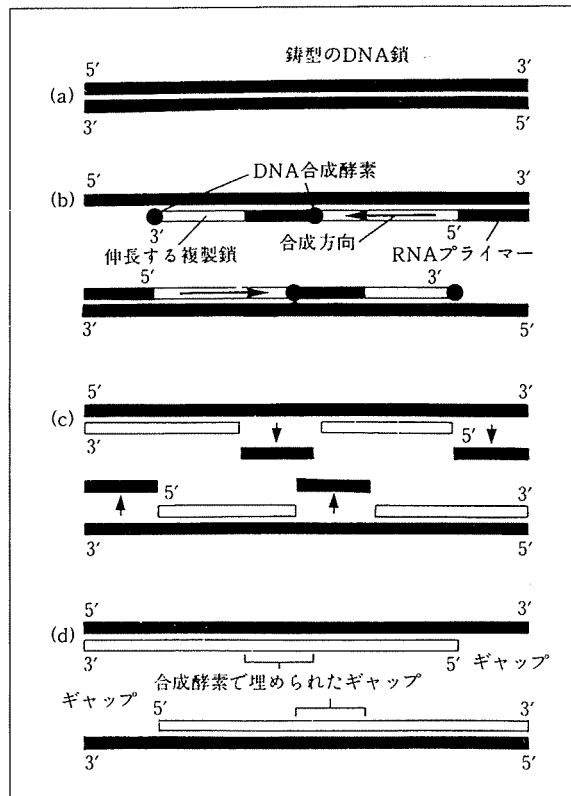


図3. 鎖状DNAのテロメアが、DNA複製時に短小化するメカニズムの模式図

(臨床分子医学, vol. 1, No. 9, 1993, 加治和彦, 「遺伝子から見た老化」より抜粋)

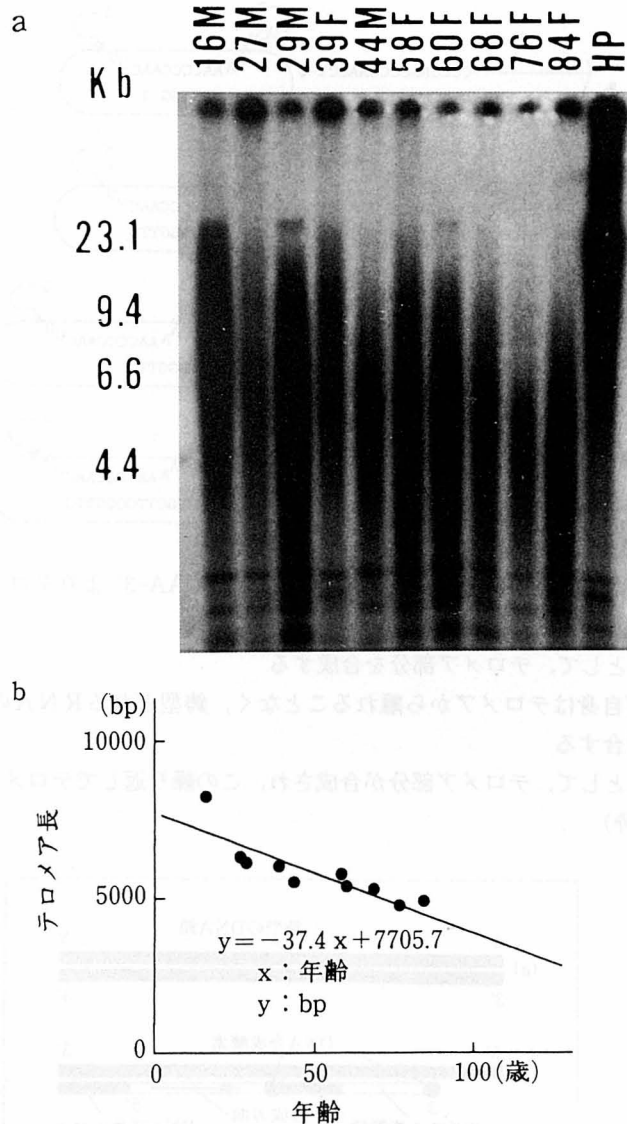


図4. 正常ヒトリンパ球を用いたテロメアの検出

a. テロメア長の測定に用いたプロットの図

加齢に伴いテロメア長が短小化する傾向が認められる。HP=human placenta

b. aのプロットをもとに年齢とテロメア長についてプロットしたグラフ。

直線の傾きは、 -37.4bp/year で、テロメアは1年当たり37.4bp短くなる計算になる。

(日本臨床, 51, 7, 1993, 大村宏「テロメアと細胞老化・腫瘍化」より抜粋)

てDNAを合成していく。RNAプライマーはDNA合成後切り出されてギャップが生じるが、このギャップは、その両端に新しく作られたDNAがあれば合成酵素で埋められ、修復される。しかし、鋳型DNAの3'末端部分はRNAプライマーの切り出し後もギャップとして残存することになる。一方、鋳型DNAの5'末端側、すなわち、新生DNAの3'末端側は上流にある最寄りのRNAプライマーにより完全にDNA合成が行われ

る。このように、鋳型DNA鎖より新生DNA鎖の方が1回のDNA複製につき、少なくともRNAプライマー分の短小化を生じることになる。このことから、老化によるテロメアの短小化は、細胞分裂の度に消費される回数券型短小化と例えられ得る。

ヒトリンパ球のテロメア長をサザンプロットで示すと(図4)、加齢と共にテロメア長は短くなり、1年間あたり約37bp短小化している⁸⁾。これ

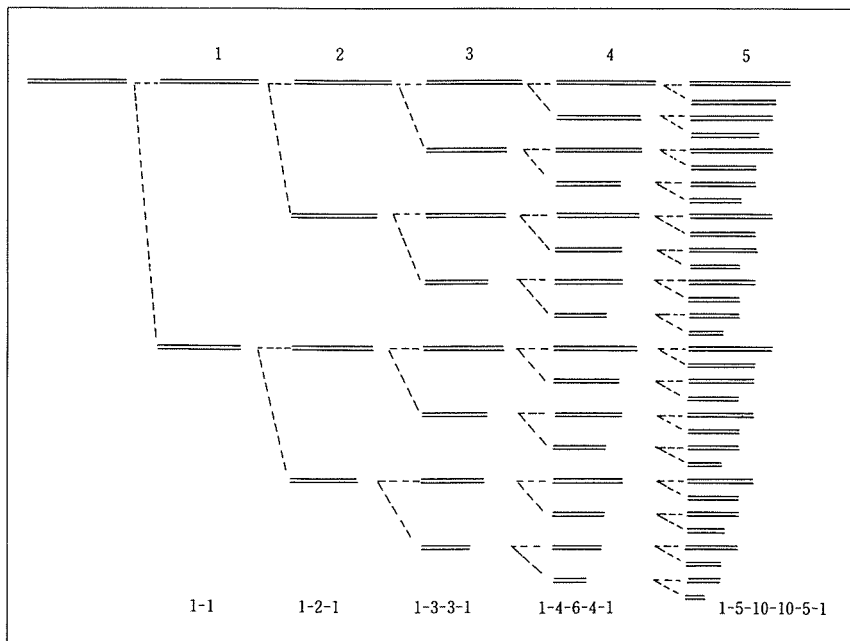


図5. DNA複製に伴うテロメアの短縮

=は、染色体の片側のテロメアを表す。複製に際し、親染色体のテロメアと同じ長さの娘テロメアと短縮された娘テロメアが1つずつ生じる。

(臨床分子医学, vol. 1, No. 9, 1993, 加治和彦, 「遺伝子から見た老化」より抜粋)

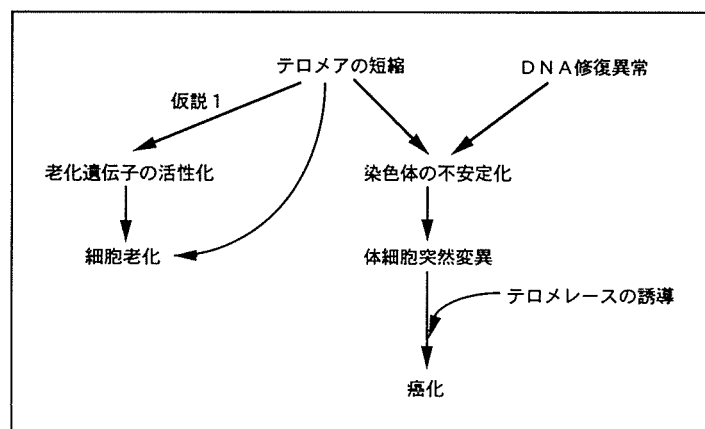


図6. テロメアの短小化に伴う細胞老化と癌化

(臨床分子医学, vol. 1, No. 9, 1993, 加治和彦, 「遺伝子から見た老化」より改変)

はHaisteら⁹⁾の33bpの報告と矛盾しないものであり, *in vivo*ではこの程度であると推測されている。プロット上において, テロメアのバンドの幅がスメア状に見える理由として, 例えば染色体の右端のテロメアにのみ注目すれば, 1回のDNA複製に際し, もとの長さと同じテロメアと1ユニット(一定の短小化する長さの単位)だけ短くなったテロメアの2種類のいずれかを持つことになる。従って, 分裂回数が多くなれば, 更に多様な長さを有するテロメアが生じ, 同一の細胞集団の

各細胞間でテロメア長に差異が導かれ, バンドの幅として表されるからである(図5)。このようにテロメアは細胞分裂回数の指標であり, テロメア長が短小であることは, その細胞もしくは細胞集団が細胞分裂亢進により老化していることを示す。

3) 癌化とテロメア長

近年, 老化(加齢)に伴うテロメア長の変化のみならず, 癌化に伴ってテロメア長が短小化することが注目されている(図6)。1980年頃より,

-
- 1984: B cell prolymphocytic leukemia
 - 1985: malignant fibrous histiocytoma
 - 1986: pre T cell acute lymphoblastic leukemia
 - 1987: human renal tumor
cardiac myxomas
 - 1990: human colorectal carcinoma
ovarian tumor
lung tumor
 - 1992: acute leukemia and remission
neuroblastoma
 - 1993: chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic
leukemia
acute myelocytic leukemia
hepatocellular carcinoma
-

図7. ヒトの疾病とそのテロメアもしくはテロメア長に関する報告

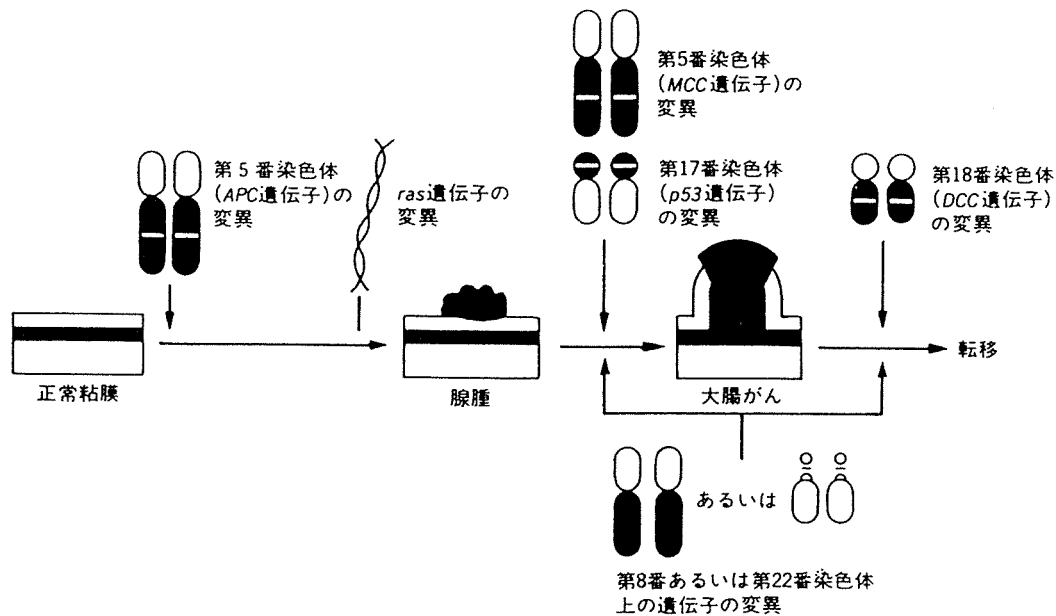


図8. 大腸癌の多段階的発癌における各過程での遺伝子の関与

(細胞工学, Vol. 12, No. 2, 1993, 中村祐輔「大腸腫瘍の発生・進展過程と遺伝子異常」より抜粋)

染色体末端部の融合や転座を検討し、テロメアの染色体安定保持機能に関する報告がなされ¹³⁾¹⁵⁾, 1990年代に入り、白血病や固型癌のテロメア長がサザンプロット法で正確に測定・評価されるようになってきた。さらに、1994年までに癌化に伴うテロメア長の短小化の報告が散見されるようになった(図7)²⁸⁾。たとえば、胃癌-正常組織間、腸上皮化生粘膜-胃平滑筋間でいずれも前者の方

が短小化していることが横崎らにより報告された²⁹⁾。この他に卵巣癌、肺癌でのテロメアの短小化も報告されている。さらに、病変の増悪、病期の進行に伴いテロメアが短小化する報告が大腸癌⁹⁾、神経芽細胞腫¹¹⁾、白血病²²⁾でなされた。例えば大腸癌患者3例について、癌、正常腸粘膜に加えて、腺腫組織のDNAでも検討され、腺腫組織で既にテロメア長の短小化が確認された。また、

表1. HCV抗体陽性患者の各肝病変のテロメア長.

Case No. (Sex, Age)	Diag.(Ed.Gr.)	HCC size* (mm)	chemo.	TRF (Kb)										
					3	4	5	6	7	8	9	10		
HCV 1 (M,46)	HCC (Ⅲ) CAH	36	+	5.1	[Solid bar from 3 to 5]									
					8.3	[Hatched bar from 3 to 8]								
2 (M,56)	HCC (Ⅰ) CAH	55	-	4.9		[Solid bar from 3 to 5]								
					9.4	[Hatched bar from 3 to 9]								
3 (M,59)	HCC (Ⅲ) CAH	108	+	4.7		[Solid bar from 3 to 4]								
					6.8	[Hatched bar from 3 to 7]								
4 (F,64)	HCC (Ⅱ) L C	50	+	4.2		[Solid bar from 3 to 4]								
					5.2	[Hatched bar from 3 to 5]								
5 (F,70)	HCC (Ⅰ>Ⅱ) L C	20	-	3.7		[Solid bar from 3 to 4]								
					5.2	[Hatched bar from 3 to 5]								
6 (M,72)	HCC (Ⅲ) L C	42	-	3.6		[Solid bar from 3 to 4]								
					5.0	[Hatched bar from 3 to 5]								
7 (M,57)	HCC (Ⅱ>Ⅲ)	45	+	5.0		[Solid bar from 3 to 5]								
8 (M,60)	HCC (Ⅰ>Ⅱ)	60	-	5.2	[Solid bar from 3 to 5]									
9 (M,63)	HCC (Ⅰ)	17	+	3.6	[Solid bar from 3 to 4]									
10 (F,66)	HCC (Ⅱ>Ⅲ)	25	-	4.8	[Solid bar from 3 to 5]									
11 (M,74)	HCC (Ⅱ>Ⅰ)	66	+	3.5	[Solid bar from 3 to 4]									
12 (M,54)	L C	N.A.	N.A.	6.2	[Hatched bar from 3 to 6]									

性別, 年齢, 病変組織の診断, エドモンドソン分類, 腫瘍径, 化学療法の有無, TRFを示す. (Diag. : Diagnosis, ED. Gr. : Edmondson grade, chemo. : chemotherapy)

神経芽細胞腫でのテロメア長の短小化が, 病変の進行 (stage I~IV, IV-S) と密接に関わって生じていることが示された. さらに, 小児白血病の診断時と寛解時の末梢血 (または骨髓液) DNAのテロメア長を比較すると, 診断時のテロメアが寛解時のそれよりも短小化していることが認められた. 大村らは慢性骨髄性白血病 (CML) で急性転化を起こす症例は, 他のマーカーが正常範囲と安定していても, テロメア長が徐々に短小化しており, これを急性転化の指標にし得るとし, 臨床的にもテロメア長の測定が有意義であると報告している (未発表).

一般に, 発癌はDNA修復機構の破綻, 染色体DNAもしくは遺伝子の不安定性の亢進, 癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化・喪失などを誘導する多種多様な体細胞突然変異の蓄積によ

て生じると考えられている. 例えば, 大腸癌発生の過程では, APC, K-ras, DCC, p53, MCCの遺伝子変異が大腸粘膜→大腸腺腫→大腸癌の各過程でそれぞれ単独もしくは多因子的に関与しており (図8), 胃癌, 乳癌, 肺癌, 子宮頸癌をはじめ多くの腫瘍で多段階発癌の可能性が示唆されている. 多段階発癌過程において, テロメアの短小化は遺伝的不安定性の誘導と関係があり, 多種多様な遺伝子変異をもたらすと推察されている. 事実, 次に示すように, テロメア長の段階的発癌は, 肝細胞の老化と肝癌発癌に極めて重要な関わりがあることが明らかとなった.

II. 肝癌発癌とテロメア長

肝癌発癌のメカニズム解明のための基礎的データを得る目的で, 以下について検討した.

表2. HBs抗原陽性患者の各肝病変のテロメア長.

Case No. (Sex, Age)	Diag.(Ed.Gr.)	HCC size* (mm)	chemo.	TRF (Kb)										
					3	4	5	6	7	8	9	10		
HBV 1 (F,43)	HCC (Ⅱ) CAH	147	+	6.2										
				6.8										
2 (M,55)	HCC (Ⅲ) CAH	40	+	3.2										
				6.0										
3 (M,62)	HCC (Ⅱ) CAH	100	+	5.2										
				5.4										
4 (M,65)	HCC (Ⅲ) CAH	65	+	3.6										
				5.4										
5 (F,56)	HCC (Ⅱ) L C	20	+	4.2										
				5.2										
6 (M,60)	HCC (Ⅰ) L C	22	+	5.2										
				5.4										
7 (F,63)	HCC (Ⅰ) L C	19	+	5.9										
				6.6										
8 (M,43)	HCC (Ⅱ)	129	-	3.9										
9 (M,53)	HCC (Ⅲ)	100	+	6.1										
10 (M,56)	L C	N.A.	N.A.	5.4										
11 (M,62)	L C	N.A.	N.A.	6.0										
12 (M,41)	CAH	N.A.	N.A.	10.1										

性別, 年齢, 病変組織の診断, エドモンドソン分類, 腫瘍径, 化学療法の有無, TRFを示す.

①肝細胞癌部(HCC)とその非癌部(肝硬変:L C, 慢性活動性肝炎:CAH)でのテロメア長の変化.

②正常肝からCAH, L C, HCCの3病変へと, 肝癌発癌をきたす過程でのテロメア長の変化.

③肝細胞癌については, ウイルスの種類と有無, 腫瘍径, 腫瘍の分化度(Edmondson分類), 化学療法の有無とテロメア長との相関.

1) 材料と方法

症例は, 鳥取大学外科学第1講座, 鳥取大学病理学第1講座の関連施設, 国立ガンセンターで外科的に切除され凍結保存された病変組織であり, HCCとその非癌部(L CおよびCAH)を16例(そのうち6例がHCV抗体陽性, 7例がHBs抗原陽性, 3例がウイルス陰性であった.), また病理解剖により正常肝細胞を4例, 外科的に切除

されたが癌部・非癌部のペアで得られなかった肝病変(HCC, L C, CAH)を12例, 計32例を得て, テロメア長を測定した. このうち17例で化学療法が施行され, 化学療法後, 壊死に陥ったHCCの1部分は極力排除し, L Cの間質の占める比率を10%以下に抑えるため, 鳥取大学病理部第1講座で病理学的な確認を経た.

それぞれの検体よりフェノールクロロホルム法によりDNA抽出し, そのDNA 5 μ gを制限酵素Hinf Iで切断した. このDNA断片を0.7%アガロースゲル中において, 20~40Vで, 12~16時間電気泳動した. 泳動後, DNAをナイロンフィルターへトランスファーし, このフィルターを³²Pで末端標識した(TTAGGG)₄オリゴヌクレオチドをプローブとして, 50℃で一晩ハイブリダイズした. 50~53℃で2回フィルターを洗い, 余

表3. ウイルス陰性患者の各肝病変のテロメア長.

Case No. (Sex, Age)	Diag. (Ed.Gr.)	HCC size* (mm)	chemo.	TRF (Kb)										
					3	4	5	6	7	8	9	10		
NV-1 (M,59)	HCC (II) LC	74	+	4.0										
				5.4										
2 (F,65)	HCC (I) CAH	20	+	4.8										
				9.4										
3 (M,68)	HCC (II) preLC	36	-	5.2										
				6.0										
4 (M,66)	HCC (II,III)	42	+	6.6										
N-1 (M,13)	Normal Liver	N.A.	N.A.	10.6										
2 (M,61)	Normal Liver	N.A.	N.A.	7.8										
3 (M,70)	Normal Liver	N.A.	N.A.	8.3										
4 (M,79)	Normal Liver	N.A.	N.A.	8.9										

性別, 年齢, 病変組織の診断, エドモンドソン分類, 腫瘍径, 化学療法の有無, TRFを示す. 表1, 表2の結果も合わせて, 正常肝のTRFとの比較を試みている.

分なプローブを落とした後, 12~15時間オートラジオグラフィを行った. 得られたスメア状のシグナルの濃度のピークをデンスノメーターで検出し, その移動度からテロメアの長さ (terminal restriction fragment: TRF) を求め, 表1~表3を得た. このようにサザンプロット法により測定したTRFの各データを癌部・非癌部のペア間ではpaired *t* test, 病変間ではone way ANOVA, Mann-Whitney testにより, 統計学的に処理した.

2) 結果

テロメア長と病変 (ウイルス, 性別, 年齢, 病理診断, Edmondson 分類, 腫瘍径, 化学療法の有無) との相関について,

1. 同一患者の肝癌部 (HCC), 非癌部 (LCおよびCAH) のテロメア長の比較により, 全例において癌部のテロメア長の方が短小であった (図9).

2. 各病変間 (正常肝→慢性活動性肝炎→肝硬変→肝細胞癌) で, 病変の進行増悪に伴い, 加齢と無関係にテロメア長の短小化が認められた (図10).

3. HCC, LCにおいてテロメア長は, ウイルスの種類や有無にほとんど影響されなかった.

4. HCCでは, その腫瘍径, 分化度 (Ed-

mondson 分類 I~III), 化学療法の有無との相関は統計学的に認めなかった.

5. 非癌部のTRFで, 5.0Kb未満のものはなかった.

以上の結果より, 肝細胞の「老化」と「癌化」という2つの現象とテロメアとの関連について示唆される知見と考察を以下に述べる.

3) 考察

肝疾患の大部分が, 肝炎ウイルスを原因とし, その中でも特にB型肝炎ウイルス, C型肝炎ウイルスが高率に肝炎, 肝硬変, 肝癌へと増悪させることは周知の事実である. 臨床的にもインターフェロン療法などの慢性肝炎の治療, 肝硬変の治療, 微小肝癌の発見のための腹部エコー (US), CT, MRI, 血管造影 (Angiography) などの画像診断, 腫瘍マーカーでの診断など早期発見, 経皮的エタノール注入療法 (PEIT) や外科的治療などの早期治療について課題が山積している. ウイルス感染のルートを断ち切ることこそ, 肝疾患を激減させる最善策に違いないが, 一旦ウイルス感染を受け, それが排除されない場合では, 感染後の病態について分子生物レベルの解明が重要となる. そのことこそ肝疾患の診断治療につながるに違いないと考えられる. 一般に, ウイルス感染による肝障害は, ウイルス感染を受けた肝細胞

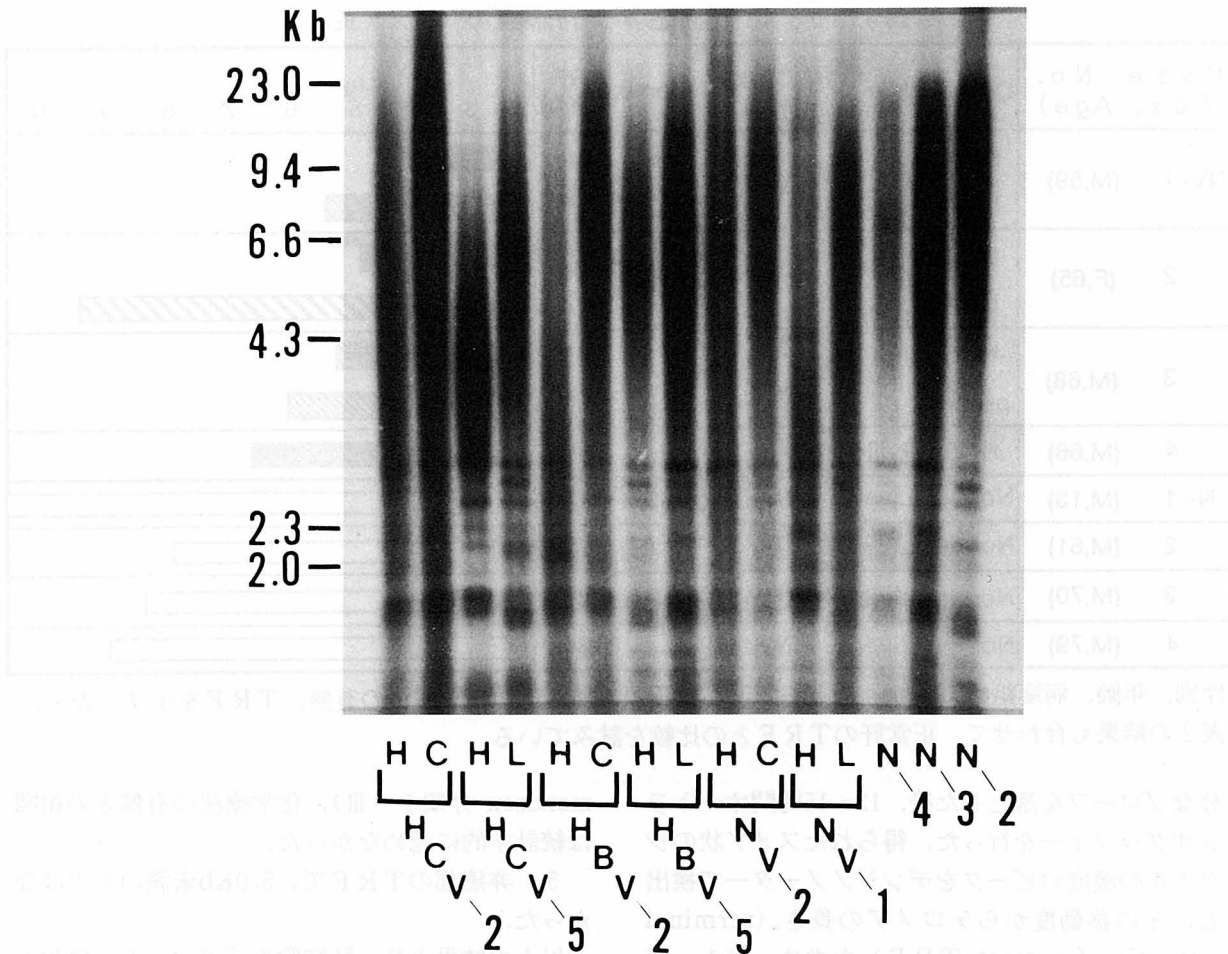


図9. HCC, LC, CAHそして正常肝のテロメア長を示すサザンブロット. 非癌部と比較して癌部のテロメア長は長く, 正常肝と比較して各肝病変 (HCC, LC, CAH) のテロメア長は短い.

の直接的もしくは免疫反応を介して間接的傷害¹⁾, 壊死を生じる. そして, その傷害は肝細胞の細胞分裂の亢進を通して, 再生が繰り返される過程とその結果を意味する. この壊死再生の過程を意味する持続的な炎症は, 肝細胞増殖因子の1つであるHGFの上昇をもたらす. これに続いて上昇するTGF- β との均衡の中で, HGFに対するTGF- β の優位により導かれる細胞外マトリックス分子の産生促進や線維芽細胞の増殖促進などにより, 肝線維症, 肝硬変へと病変を増悪させると考えられている¹⁴⁾.

これらの現象をテロメア長の観点からみれば, テロメア長は細胞分裂回数の指標であり, 持続的な炎症による肝傷害は, 染色体のテロメア長を確実にかつ持続的に短小化させると考えられる. 肝細胞DNAにランダムに組み込まれるB型ウイルスDNA²⁷⁾やB型ウイルスのX遺伝子の発現, さ

らにC型ウイルスのHV R (hypervariable region)の変異¹⁰⁾など, ウイルスと発癌との関係が重要と考えられる. しかし, テロメア長の短小化は, ウイルスの種類や有無, その機能とは無関係であり, TRFは肝疾患の病態に依存することから, 本研究におけるテロメア長の段階的短小化は, 肝細胞の再生の歴史を示していると考えられる.

正常肝→慢性活動性肝炎→肝硬変→肝細胞癌へと病変が進行増悪するに伴い認められるテロメア長の短小化は, 各病変間では, 図10よりHCV抗体陽性の場合, 約1470bpであり, HBs抗原陽性の場合, 約1310bpであり, ややC型ウイルスの方に慢性化しやすい傾向が認められたものの大きな差異は認めなかった. しかし, 1年当たりのテロメア長の短小化が33~70bpとすれば, C型ウイルスの1470bpは, 各病変間で21~45年

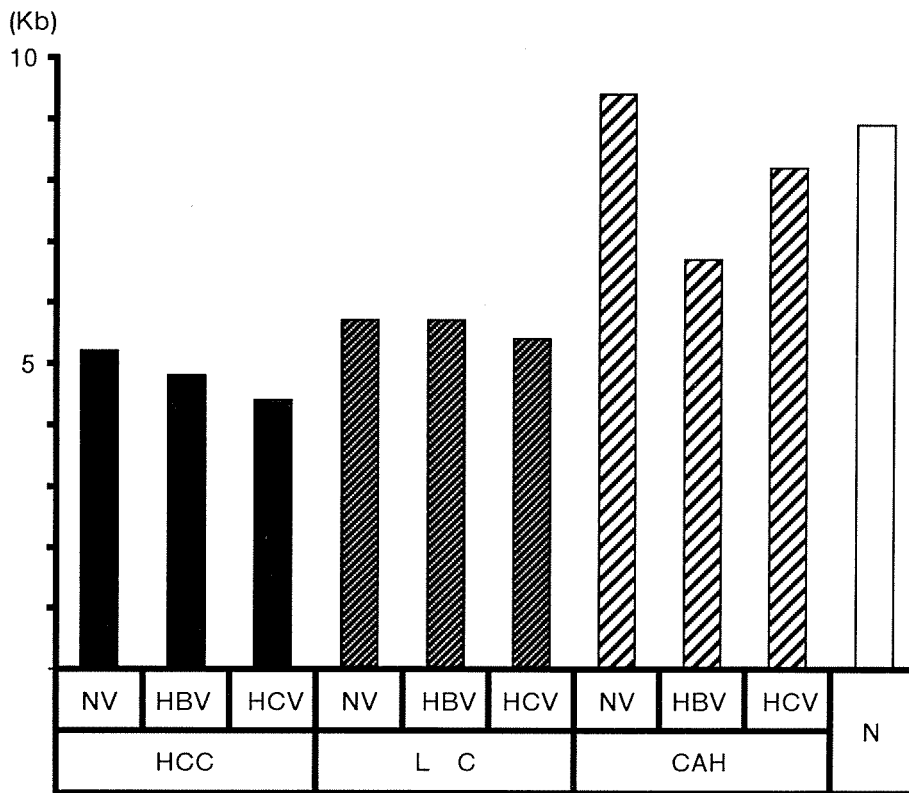


図10. 病変の増悪に伴うテロメアの短小化. それぞれの病変をウイルスの種類と有無で分類した肝疾患の各病変間での平均テロメア長.

分, 発癌まで63~135年分の肝細胞の老化による肝細胞DNAの不安定性を意味し, B型ウイルスの場合における1310bpは, 各病変間で19~40年分, 発癌まで57~120年分に相当する. 正常肝細胞, 慢性肝炎の肝細胞, 肝硬変の肝細胞は, それぞれ機能面での違いは認められるものの, 病理学的, 形態学的には, 一見まったく同一の肝細胞である. しかし, テロメア長の結果から, 肝細胞レベル, あるいは肝細胞の染色体DNAレベルでの老化は確実にすすんでおり, この老化によるDNA不安定性の蓄積が, 癌化の契機になると推察される.

このように, 細胞分裂の亢進による肝細胞の老化が余儀なくされ, テロメア長が短小化する事実は, 肝硬変までの肝障害ではクローナルな変化ではないため, 老化の側面をみているに過ぎない. しかし全例において非癌部よりも癌部のテロメア長が短小であることは, 老化だけでなく癌化の際にもDNAの不安定性が高まることを示すと考えられる. 肝硬変に至るまでのDNAの不安定性の亢進が, 発癌の主因となり, 発癌に関わる遺伝子群の重大な変化をもたらすと考えられる (図11).

事実, 現在まで, N-ras, lca, c-myc, est2, HIP, IGF-IIなどのオンコジーンやプロトオンコジーンの活性メカニズムに加え¹²⁾²³⁾, PKC (α -type)などの発癌への関与や, さらにヘテロ接合性の喪失 (LOH: Loss of heterozygosity) が染色体1p²⁴⁾, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q⁴⁾, 11p, 13q, 16p, 16q, 17q, 22q²⁰⁾で報告がみられることから, 癌抑制遺伝子の多様かつ多段階的な不活化が推測されてきた. 肝癌では, 癌抑制遺伝子 p 5 3 の喪失が進行癌では50%以上と高頻度に認められ¹⁷⁾, 最も肝癌の進展に関与していると考えられている. また p 5 3 が Xgene が複合体を形成したり, cell cycle の G 1 / S 移行期で C d k 2 (cyclin dependent kinase 2) と複合体を形成するサイクリンAの遺伝子にB型肝炎ウイルスDNAが組み込まれることがあるという, 感染細胞の細胞周期へのウイルス関与なども判明しつつあり²⁶⁾, 癌抑制遺伝子と細胞周期とは密接な関係があることから, この分野における今後のデータの蓄積が期待されている.

ところで, テロメアが短くなるから発癌するのか, 癌という病態がテロメア長を規定しているの

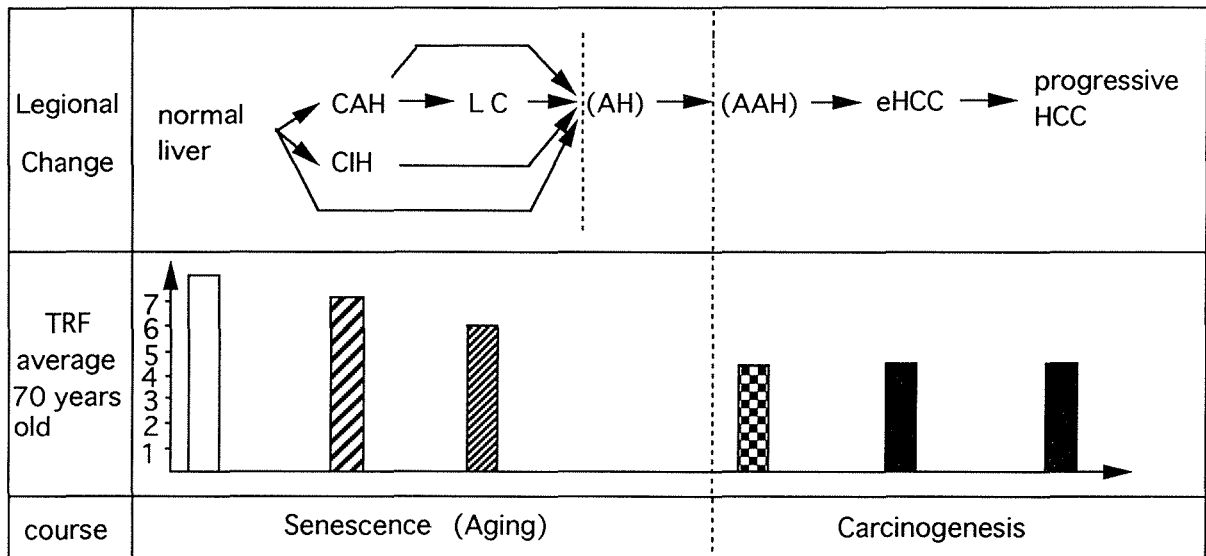


図11. 肝病変の増悪に伴うテロメア長と老化, テロメア長と癌化, の相関を示す模式図

かという問題がある。多段階発癌を説明する際、DNAの不安定性が発癌をもたらすという因果関係は広く受け入れられており、これに従えば、テロメア長の短小化が発癌をもたらす可能性が考えられる。DNAの不安定性が発癌をもたらすという方向性は一見正しいが、テロメア長はDNAの不安定性の1指標に留まらず、癌細胞においてはテロメラーゼというテロメア伸長酵素の要因を抜きにして語られるべきではない。従って、癌化をもたらすTRFと癌化した癌細胞のTRFは本質的に異なると考えられ得る。本研究では、5.0bp未満のテロメア長の短小化が認められる非癌部は観察されなかった。癌化するには一定のレベル以下のテロメア長である必要があり、テロメラーゼ活性の存在を考慮すれば、その臨界値は5.0bpよりも小さな値であると想像される。なぜなら、細胞はテロメア長の一定の長さを失うと死に至るとされているが、テロメア長の短小化により癌細胞自身が細胞死に至らないのは、体細胞では活性がないテロメラーゼが、癌細胞でも活性化され²⁾、自らを死に至らしめない程度にテロメアを伸長させていると考えられるからであり、さらに、癌細胞自身が新しい変化を生み出す可能性を常に保持し続けるために、肝癌では一定の長さ(約5.0kb?)を超えずに調節されている、と考える方が理に適っているようである。つまり、癌細胞では簡略的に、テロメア長=DNAの不安定性の指標としてのテロメアの短縮度+テロメラーゼ活性によるテ

ロメアの伸長度、と表現できるのかもしれない。

ところで、Hela細胞はTRFが15Kb以上と長い。もっともこのような場合は稀であるが、cell lineの中にはテロメラーゼ活性が上昇した安定性の高いものもあり、cell lineと生体内の環境とは異なることから、cell lineの不安定性は生体内での癌細胞の不安定性とは異質であり、TRFのデータもそれを念頭に置いて考察しなければならない。テロメアの短小化は発癌の重大な因子であるが、癌という状態を規定しているのではなく、むしろ癌化したという状態がテロメア長を決定しているとも考えられる。

しかし、肝癌発癌の過程でテロメアが短小化するとしても、この過程でのinitiationの鍵を握る遺伝子変異については、依然として理解されていない。ウイルスの種類・有無や肝癌の腫瘍径(17~12mm)と無関係に癌部のテロメア長が非癌部のそれに比して短小化する必然性は、肝癌の進行例におけるp53遺伝子の不活化と同程度かつ重大な遺伝子変異がinitiationの時点で生ずる可能性を示唆する。未知なるDNA修復遺伝子の異常が関与しているのかも知れない。

Ⅲ. 肝癌の前癌病変としての異型腺腫様過形成のテロメア長

肝癌発癌時でのテロメア長の変化を調べるために、肝細胞癌の前癌病変とされる異型腺腫様過形成(Atypical adenomatous hyperplasia: AAH)

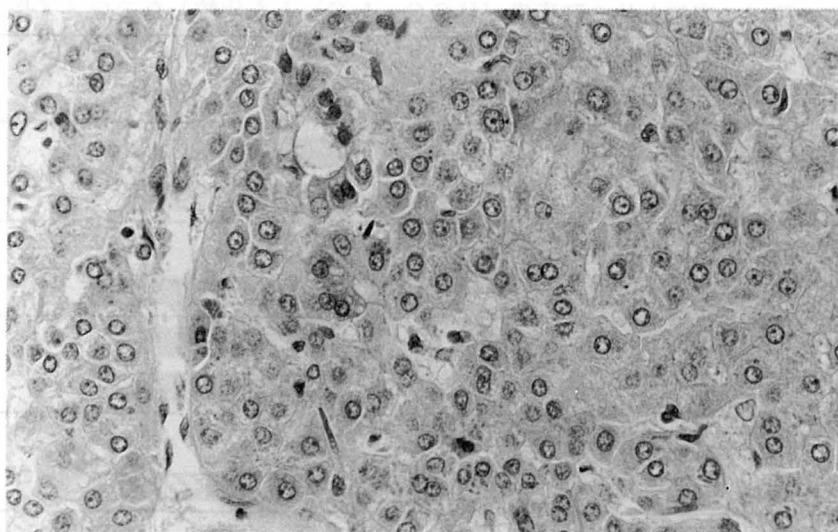


図12. 異型腺腫様過形成 (AAH) の病理組織 (HE染色) (×300)

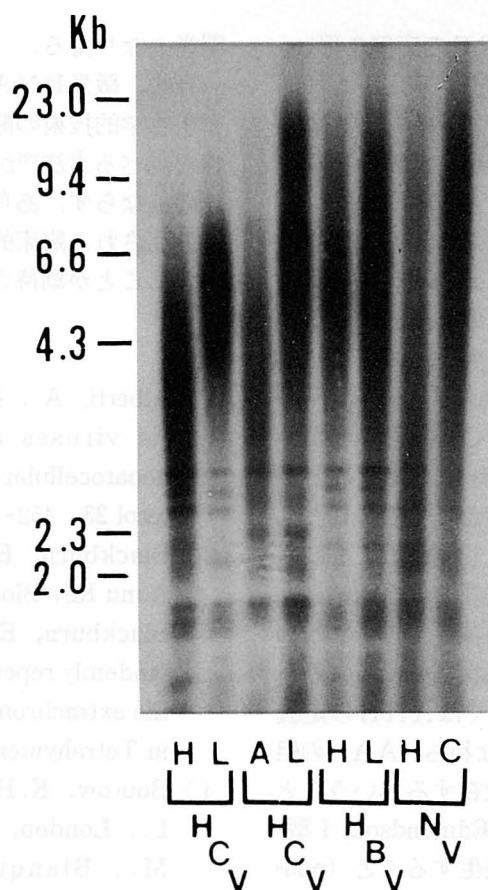


図13. AAH患者の腫瘍部と非腫瘍部をHCC患者の癌部と非癌部で比較したサザンプロット. (L : LC, A : AAH, H : HCC)

(図12) を非腫瘍部とともにテロメア長 (TRF) を測定し, それらの差異に注目することは有意義と考えられる. 著者らが経験した症例では非腫瘍部組織 (LC) より腫瘍部 (AAH) の方が, TR

Fが短小化しており (図13), AAHのTRFは4.0kb, LCのTRFは6.1kbであった (表4). サザンプロットでは, AAHの症例と同時にHCV抗体陽性のHCCの症例, HBs抗原陽性のH

表4. 図12の症例と他の肝疾患 (HCC, LC) とを比較したテロメア長.

Case No. (Sex, Age)	Diag. (Ed.Gr.)	Tumor size (mm)	chemo.	TRF (Kb)	3	4	5	6	7	8	9	10
HCV 1 (M,59)	HCC (I > II)	20	-	3.7								
	LC			5.4								
HCV 2 (M,54)	AAH	20	-	4.0								
	LC			6.1								
HBV 3 (F,56)	HCC (II)	20	+	5.0								
	LC			5.4								
NV 4 (F,70)	HCC (II)	74	+	3.0								
	CAH			5.7								

ウイルス, 性別, 年齢, 病変組織の診断, エドモンドソン分類, 腫瘍径, 化学療法の有無, TRFを示す.

CCの症例, ウイルス陰性のHCCの症例を用い, それらをTRFの比較対象としている. AAHの結果は, 言うまでもなく, 今まで経験した非腫瘍部の範疇ではなく, 癌部 (HCC) 相当のTRFであった.

AAHは, HCCの前癌状態と考えられ¹⁸⁾, 腺腫様過形成 (adenomatous hyperplasia: AH) と共に, 臨床的には外科的適応を考慮に入れつつ慎重に経過観察されることが多い疾患である. しかし, 両者ともクローナルな発育, 進展を示し⁵⁾²⁵⁾, 殊にAAHでのテロメア長がHCCと同等の短小化を示しDNAの不安定性を有していることから, AAHでは老化の最終状態としてのLCとは明らかに異なる遺伝子変化が生じていることになる. この時点でAAHは肝癌発癌の前癌状態というよりむしろ初めて癌としての特質を獲得し始めた状態と言える. AAHが前癌状態ではなく癌に等しいということは, AHもしくはAAHの定義に一石を投じることとなる. すなわち, AAHの組織内にHCC (高分化型) が散在するということは, あたかも高分化型HCC (Edmondson I型) 内にさらに低分化なHCCが発生すること (nodule in nodule) とクローナルな発生過程では互いに同様であり, AAHは肝癌の分化型による分類の1つとみなされて不思議ではない. 純粋なAHのテロメア長が測定されれば, さらに興味深い結果がわかるに違いない. このようにAAHは肝癌発癌のinitiationでの遺伝子変化を検討する最適な疾患であり, AHと共に発癌のメカニズム解明の

曙光となり得る.

今後, 微量DNAからテロメア長を測定する分子生物学的技術の開発がなされ, テロメラーゼ活性を調べる方法¹⁹⁾が確立されることによって, 肝癌のみならず, あらゆる癌そのものの性質, 機能が解明され, 臨床的にも診断・遺伝子治療へ応用されることが期待される.

文 献

- 1) Alberti, A., Pontisso, P. (1991). Hepatitis viruses as aetiological agents of hepatocellular carcinoma. *Ital J Gastroenterol* 23, 452-456.
- 2) Blackburn, E.H. (1992). Telomerases. *Annu Rev Biochem* 61, 113-129.
- 3) Blackburn, E.H. & Gall, J.G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* 120, 33-53.
- 4) Boutow, K.H., Murray, J.C., Israel, J.L., London, W.T., Smith, M., Kew, M., Blanquet, V., Brechot, C., Redeker, A. & Govindarajah, S. (1989). Loss of heterozygosity suggests tumor suppressor gene responsible for primary hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 86, 8852-8856.
- 5) Eguchi, A., Nakashima, O., Okudaira, S., Sugihara, S. & Kojiro, M. (1992).

- A adenomatous hyperplasia in the vicinity of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 15, 843-848.
- 6) Greider, C. W. (1990). Telomeres, Telomerase and Senescence. *BioEssays* 12, 363-369.
 - 7) Greider, C. W. (1991). Telomerase is processive. *Mol Cell Biol* 11, 4572-4580.
 - 8) Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
 - 9) Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K. & Allshire, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.
 - 10) Hijikata, M. et al. (1991). Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biophys Res Commun* 175, 220-228.
 - 11) Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Ichikawa, T. & Matsuura, Y. (1992). Length of telomeric repeats in neuroblastoma: Correlation with prognosis and other biological characteristics. *Jpn J Cancer Res* 83, 159-164.
 - 12) Jian-ren Gu. (1988). Molecular aspects of human hepatic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 9, 697-703.
 - 13) Kovacs, G., Muller-Brechlin, R. & Szucs, S. (1987). Telomeric association in two human renal tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 28, 363-366.
 - 14) Matsumoto, K., Tajima, H., Okazaki, H. & Nakamura, T. (1992). *J Biol Chem* 267, 24917-24920.
 - 15) Morgan, R., Jarzabek, V., Jaffe, J. P., Hecht, B. K. & Sandberg, (1986). Telomeric fusion in pre-T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hum Genet* 73, 260-263.
 - 16) Muller, H. J. (1938). The remarking of chromosomes. *Collecting Net* 13, 181-198.
 - 17) Murakami, Y., Hayashi, K., Hirohashi, S. & Sekiya, T. (1991). Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 51, 5520-5525.
 - 18) Nakamura, Y., Terada, T., Ueda, K., Terasaki S., Nonomura, A. & Matsui, O. (1993). Adenomatous hyperplasia of the liver as a precancerous lesion. *Liver* 13, 1-9.
 - 19) Nilson, P., Mehle, C., Remes, K. & Roos, G. (1994). Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene* 9, 3043-3048.
 - 20) Nishida, N., Fukuda, Y., Kokuryu, H., Sadamoto, T., Isowa, G., Honda, Kazuo., Ymaoka, Y., Ikenaga, M., Imura, H. & Ishizaki, K. (1992). Accumulation of allelic loss on arms of chromosomes 13q, 16q and 17p in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 51, 862-868.
 - 21) Ohmura, H. & Oshimura, M. (1993). Telomere, cellular senescence and transformation. *Nippon Rinsho* 51, 1-8.
 - 22) Ohmura, H., Oshimura, M. (unpublished)
 - 23) Schirmacher, P., Rogler, C. E. & Dienes, H. P. (1993). Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis. *Virchow Archiv B Cell Pathol* 63, 71-89.
 - 24) Simon, D., Knowles, B. B. & Weith, A. (1991). Abnormalities of chromosome 1 and loss of heterozygosity on 1p in primary hepatomas. *Oncogene* 6, 765-770.
 - 25) Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., et al. (1988). Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 95, 1664-1666.
 - 26) Wang, J., Zindy, F., Chenivesse X., Lamas, E., Henglein, B. & Brecht, C. (1992). Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. On-

- pression by hepatitis B virus DNA intergation in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 7, 1653-1656.
- 27) Yaginuma, K., Kobayashi, H., Kobayashi, M., Morishima, T., Matsuyama, K. & Koike, K. (1987). *J. Virol*, 61, 1808-1813.
- 28) Yamada, O., Oshimi, K. & Mizoguchi, H. (1993). Telomere reduction in hematologic cells. *Int. J. Hematol*, 57, 181-186.
- 29) Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Nakayama, H. & Tahara, E. (1992). 腸上皮化生における遺伝子異常. *病理と臨床*. 10, 1130-1134.