

題目

肺腺癌の Adenoma-carcinoma sequence
および発生母地における Q-FISH 法を
用いたテロメア長の研究

かめだ こうじ

亀田 光二

(病理学専攻)

防衛医科大学校

平成29年度

目 次

| | |
|---|------|
| 第1章 はじめに | 1 頁 |
| 第1節 テロメア | 1 頁 |
| 第2節 癌化の過程におけるテロメア長の短縮 | 1 頁 |
| 第3節 テロメア長の測定と Quantitative fluorescence <i>in situ</i> hybridization 法 | 2 頁 |
| 第4節 異型腺腫様過形成 (Atypical adenomatous hyperplasia) | 3 頁 |
| 第2章 背景と目的 | 5 頁 |
| 第1節 背景 | 5 頁 |
| 第2節 目的 | 5 頁 |
| 第3章 対象と方法 | 7 頁 |
| 第1節 症例 | 7 頁 |
| 第2節 Tissue microarray の作製 | 8 頁 |
| 第3節 Quantitative fluorescence <i>in situ</i> hybridization 法 | 8 頁 |
| 第1項 Fluorescence <i>in situ</i> hybridization | 8 頁 |
| 第2項 テロメア長の画像解析 | 9 頁 |
| 第3項 培養細胞株による Telomere-centromere ratio の標準化 | 10 頁 |
| 第4節 統計解析 | 11 頁 |
| 第4章 肺腺癌の Adenoma-carcinoma sequence におけるテロメア長の解析 | 12 頁 |
| 第1節 結果 | 12 頁 |
| 第1項 解析症例の臨床病理学的特徴および解析細胞数 | 12 頁 |
| 第2項 Atypical adenomatous hyperplasia と肺腺癌の Lepidic pattern 成分のテロメア長の比較 | 12 頁 |
| 第3項 背景肺のクララ細胞、Atypical adenomatous hyperplasia および肺腺癌の Lepidic pattern でのテロメア長の比較 | 12 頁 |
| 第2節 考察 | 13 頁 |
| 第5章 呼吸細気管支構成上皮細胞におけるテロメア長の解析 | 16 頁 |
| 第1節 結果 | 16 頁 |

| | | |
|------|---|------|
| 第1項 | 解析症例の臨床組織学的特徴および解析細胞 | 16 頁 |
| 第2項 | 呼吸細気管支構成上皮細胞におけるテロメア長 | 16 頁 |
| 第3項 | 喫煙歴による呼吸細気管支構成上皮細胞のテロメア長の比較検討 | 16 頁 |
| 第4項 | ADC 症例と Met 症例による呼吸細気管支構成上皮細胞のテロメア長の比較検討 | 17 頁 |
| 第5項 | 性別による呼吸細気管支構成上皮細胞のテロメア長の比較検討 | 17 頁 |
| 第6項 | 年齢による呼吸細気管支構成上皮細胞のテロメア長の検討 | 17 頁 |
| 第7項 | 喫煙歴および年齢によるテロメア長の変化 | 18 頁 |
| 第8項 | 年齢で層別化した ADC 症例と Met 症例もしくは性別でのテロメア長の比較検討 | 18 頁 |
| 第9項 | ADC 症例と Met 症例を喫煙歴もしくは性別で細分化した 4 群間でのテロメア長の比較検討 | 18 頁 |
| 第10項 | 年齢で層別化された ADC 症例および Met 症例を喫煙歴で細分化した 4 群間でのテロメア長の比較検討 | 19 頁 |
| 第2節 | 考察 | 20 頁 |
| 第6章 | 総括 | 23 頁 |
| 第7章 | 結論 | 24 頁 |
| | 謝辞 | 25 頁 |
| | 単語・略語説明 | 26 頁 |
| | 引用文献 | 27 頁 |
| | 図表 | 37 頁 |

第1章 はじめに

第1節 テロメア

テロメアは真核生物の染色体の長腕及び短腕の末端に存在し、結合する種々のタンパクと共同して染色体の融合や Deoxyribonucleic acid (DNA) の損傷、変性を防ぎ、染色体の安定に寄与している¹。ヒトを含め脊椎動物のテロメアは TTAGGG の 6 塩基対 (base pair, bp) の繰り返し配列を有しており^{2,3}、ヒトの新生児におけるテロメアの長さ(テロメア長)は、サザンブロット法による測定で、12~15 キロ塩基対 (kilo base pairs, kbp) であり、各臓器ほぼ同様である⁴。

テロメア長は細胞分裂により短縮し^{5,6}、ヒト由来の培養細胞では 1 分裂当たり 33~120 bp (*in vitro*)⁷⁻⁹、ヒトの正常体細胞では 50~120 bp ずつ短縮するとされる⁴。個々の細胞ではテロメア長にばらつきがみられ、細胞内の各染色体末端上にあるテロメア長においても一律ではない^{10,11}。細胞が持つテロメア長と分裂可能回数との間には密接な相関関係があり⁷、通常、テロメア長が 6 kbp 以下になると細胞分裂の停止(細胞老化)を迎えると考えられている¹²。ヒト組織においても例外を除いて必ず加齢に伴いテロメア長は短縮し、細胞老化に至った構成細胞の占める割合が増加することが、個体の老化の原因の一つとして知られている¹³⁻¹⁵。

第2節 癌化の過程におけるテロメア長の短縮

加齢と並んで、癌の発生母地となる慢性肝炎^{16,17}、潰瘍性大腸炎^{18,19}、慢性胃炎²⁰、バレット食道²¹などでは、テロメア長の高度な短縮が報告されている。テロメア長が過度に短縮した細胞は、染色体末端部の保護機能喪失に伴う染色体不安定性を惹起し、染色体の融合に至る^{15,22}。融合した染色体は分裂時に、核の不分離や孳細胞の染色体数異常の原因となり、最終的には形質の変化や癌化への引き金となる。通常、テロメアが機能せず細胞周期の停止や染色体に異常をきたした細胞はアポトーシスに至る。この流れは p53 遺伝子に部分的に依存している^{23,24}が、高度なテロメア機能不全に至ると、p53 遺伝子と独立した経路によるア

ポトシスを引き起こし、腫瘍への進展を抑制すると考えられている¹²。

テロメア長の伸長は主に逆転写酵素の一種であるテロメラーゼにより行われ、正常組織内では細胞分裂をほぼ無限に繰り返す生殖細胞や幹細胞にその発現が認められているほか、骨髄中の白血球²⁵や消化管の上皮細胞^{26,27}等にテロメラーゼの活性がみられ、テロメア長の維持が図られている。テロメア長が過度に短縮した細胞がさらに分裂するためには、このテロメラーゼによるテロメアの修復が必要であり、その作用により細胞死から免れる。テロメラーゼが恒常的に発現すると細胞は不死化し、癌関連遺伝子の異常を経て癌に進展する(Fig. 1)。これまで、全身臓器・組織の悪性腫瘍において高いテロメラーゼ活性が報告されており²⁸、肺腺癌(ADC)においても、69~93%にテロメラーゼの活性が認められる²⁹⁻³³。

第3節 テロメア長の測定と Quantitative fluorescence *in situ* hybridization 法

テロメア長の解析にはサザンブロット法と Quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH)法が用いられる。多くの組織や臓器でテロメア長が計測され、テロメア長の年間短縮率などが報告されてきた。サザンブロット法は様々な細胞を含む組織片全体の解析であり、細胞種ごとにテロメア長を解析することはできなかった。一方、Q-FISH法はテロメア DNA の TTAGGG 配列を標的とした蛍光標識 Peptide nucleic acid(PNA)プローブを組織切片上で *in situ* ハイブリダイゼーションし、その蛍光光度を定量的に測定する方法である。Q-FISH と画像解析の組み合わせによりテロメア長と蛍光光度が相関する¹⁰ことで、細胞種ごとのテロメア長の解析が可能となった。さらに、Q-FISH法では通常の病理保存検体のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を対象としたテロメア長の測定が可能である¹²。

Q-FISH法の概要は、切片上で異なる蛍光色素を付加したテロメアとセントロメアに対する PNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションし、そのデジタル画像から両者の蛍光光度比を算出して、Telomere-centromere ratio(TCR)を決定するものである。この際に用いるセントロメアプローブの細胞単位の光度は一定と考えられ、これを内部コントロールとしている。培養細胞株での解析で、この TCR とサザンブロット法で計測したテロメア長との間には強

い相関関係($R^2 = 0.9889$, $p = 0.0056$)が示されている⁹。更に切片毎の蛍光色素染色の差異を考慮し、対象とする細胞の TCR を同一スライド上にのせたコントロールの培養細胞株の TCR で除することにより標準化した値、即ち Normalized telomere-centromere ratio (NTCR) を求める。このように、Q-FISH 法ではテロメア長が既知のコントロール培養細胞株の TCR を基準とし NTCR を算出するため、NTCR をその細胞のテロメア長として扱うことができる。再現性を得るため、解析する細胞は 100 個以上で行うのが望ましい⁴。この Q-FISH 法の最大の利点は、細胞種ごとのテロメア長を測定することが可能なことである。例えば、舌や食道の重層扁平上皮では、同一切片上で基底細胞、傍基底細胞、有棘細胞、癌細胞、線維芽細胞を区別し個々のテロメア長の測定が可能であった³⁴。

第4節 異型腺腫様過形成 (Atypical adenomatous hyperplasia)

Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)は異型腺腫様過形成と呼ばれ、軽度から中等度の異型を有するクララ細胞 (Clara cell, CC) やII型肺胞上皮細胞に類似した細胞が肺胞上皮、時には呼吸細気管支上皮を置換性に増殖する直径5 mm以下の限局性病変と定義されている³⁵ (Fig. 2)。通常、間質に炎症や線維化を伴わない。

臨床的にAAHは、画像検査では指摘することが困難で、原発性肺癌を切除した際の組織学検査で切除肺内に偶然見つかることが多い。非担癌患者の剖検例では症例の2~4%で認められ、^{36,37}。Nakaharaら³⁸は、原発性肺癌切除症例を検討し、23%にAAHが認められ、AAHを有する症例の81%がADC症例であったと報告した。性別および喫煙歴とAAHの発生に明らかな関係性はみられない^{38,39}。AAHが多発する症例も散見され、多発肺腺癌症例でAAHの出現頻度が高いことも示されている³⁸。遺伝子変異の解析では、Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異やv-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) 遺伝子変異といったADCに高頻度で見られる癌遺伝子変異がADCと比べ頻度は低いもののAAHでもみられる⁴⁰⁻⁴³と報告されている。

このように、組織学的な背景や形態学的特徴、および遺伝子変異の解析から、AAHは末

梢型ADCの前癌病変と考えられている^{35,44,45}。末梢型ADCでは、AAHから肺胞上皮置換性に増殖する上皮内腺癌となり、やがて浸潤能を獲得して間質に浸潤をきたす浸潤性腺癌へと進展する⁴⁶ Adenoma-carcinoma sequence^{44,47,48}が想定されている(Fig. 3)。Adenoma-carcinoma sequence という用語は通常、大腸癌の発癌モデルとして用いられるが、肺のAAHから腺癌が生じる肺腺癌発生モデルとしても本用語がしばしば用いられている⁴⁹。

第2章 背景と目的

第1節 背景

テロメアは染色体末端に存在する TTAGGG の 6 塩基対の繰り返し配列で、細胞分裂により短縮する。テロメア長の短縮は老化や種々の老年病の発生、発癌と関連することが指摘されている。これまでの研究で、テロメア長の異常な短縮が染色体の不安定性を招くことや、固形癌の発生母地や前癌病変においてテロメア長の短縮が既にみられることが知られている。Q-FISH 法を用いて、細胞種ごとにテロメア長を測定することが可能となり、これまで様々な臓器を対象として構成細胞ごとのテロメア長の計測と、テロメア長の短縮と老化、発癌との関係についての研究報告が行われてきた。

前述したように、末梢型 ADC は呼吸細気管支のクララ細胞(CC)や肺胞の II 型肺胞上皮細胞から発生するとされ、その上皮細胞から前癌病変とされる AAH を経て、上皮内腺癌、浸潤性腺癌へと進展する Adenoma-carcinoma sequence が想定されている。しかしながら、末梢型 ADC の Adenoma-carcinoma sequence におけるテロメア長を測定し解析した報告は無い。さらに、肺腺癌を発症した症例における肺腺癌発生母地細胞のテロメア長の変化も解析されていない。また、正常肺の呼吸細気管支を構成する上皮細胞のテロメア長に関する検討はこれまで報告がなく、喫煙によって呼吸細気管支炎や小葉中心性肺気腫など組織学的変化を呈する呼吸細気管支において、その上皮細胞のテロメア長に対する喫煙の影響も不明である。

第2節 目的

本研究は大きく 2 つのテーマからなり、(i) AAH 及び ADC の上皮内腺癌成分(Lepidic pattern, Lep)におけるテロメア長の計測と比較、そして(ii) 肺腺癌の背景肺および非肺癌の背景肺にみられる呼吸細気管支の構成上皮細胞である CC、線毛上皮細胞(Ciliated epithelial cell, CEC)、基底細胞(Basal cell, BC)個々のテロメア長の計測と比較である。こ

これらの検討を Q-FISH 法を用いて行った。更にこれら細胞種間でテロメア長の比較を年齢や喫煙歴で層別化した検討も行った。

第3章 対象と方法

本研究は防衛医科大学校倫理委員会による承認のもと遂行された(受付番号 2143、2368)。

第1節 症例

2000年1月から2014年8月の間に防衛医科大学校病院呼吸器外科で肺葉切除術もしくは区域切除術を施行されたADC症例および転移性肺腫瘍(Metastatic carcinoma, Met)症例を対象とした。この内、手術前に研究目的での組織標本の使用に同意を得られなかった症例、肺切除術前に肺癌または他臓器の悪性腫瘍に対する化学療法もしくは放射線療法を施行された症例、肺癌治療歴のある症例を除外した。

まず、AAHとADCの間でのテロメア長の比較検討においては、組織標本を再検鏡したうえで組織診断結果を確認し、切除肺内にAAHの併存が認められたADC症例26例を抽出した。

次に、背景肺のCCにおけるテロメア長を調べるため、発生母地群として、切除肺内にAAHの併存が認められず、脈管侵襲、胸膜浸潤、肺内転移ならびにリンパ節転移が認められないADC症例で、肺野に明らかな炎症、肺気腫、線維化、肉芽種、良性腫瘍等、他病変が認められない例31例を選択した。一方、対照群として、切除肺内にAAHを含まないMet症例で、同様に肺野に明らかな炎症、肺気腫、線維化、肉芽種、良性腫瘍等、他病変が認められない例14例を選んだ。これらの検討では、背景肺にある呼吸細気管支を構成するCCを測定対象とした。

さらに、ADC症例およびMet症例の背景肺における呼吸細気管支構成上皮細胞のCC、CEC、BCのテロメア長の比較検討においては、上記の切除肺内にAAHを含まないADC症例31例とその対照となるMet症例14例を用いて、背景肺にある3種の上皮細胞を測定対象とした。

臨床病理学的因子については、年齢、性別、喫煙歴、肺腫瘍の組織型を症例の臨床記録および病理報告書から調査した。喫煙歴については、肺切除時まで喫煙習慣の継続もしくは禁煙中にかかわらず、過去に習慣的な喫煙歴を有する症例はすべて喫煙者とし、過去に習慣的な喫煙が一切確認できなかった症例を非喫煙者と定義した。

第2節 Tissue microarray の作製

防衛医科大学校病院検査部に保管されているホルマリン固定後パラフィン包埋検体を用いて、各検体の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色標本を作製した。AAH を含む症例では AAH の領域および ADC の上皮内腺癌成分である Lep の領域をそれぞれ組織学的に同定し、HE 標本上にマーキングした。AAH を含まない ADC および Met 症例においては背景肺の呼吸細気管支を同定し、HE 標本上にマーキングした。パラフィン標本上でこれらのマーキングに対応する部分を組織マイクロアレイヤー (KIN-1; Tissue microprocessor, Azumaya, Japan) を用いて円柱状 (3 mm 径) にくり抜いた。この円柱を 4×4 列に配列して再度パラフィン包埋を行い、Tissue microarray (TMA) ブロックを作製した。円柱の径は呼吸細気管支や AAH を十分含むことができるよう、3 mm とした。TMA ブロックを 3 μm および 2 μm 厚に薄切し、前者を HE 染色、後者を Q-FISH に使用した。

第3節 Quantitative fluorescence *in situ* hybridization 法

第1項 Fluorescence *in situ* hybridization

2 μm 厚に薄切された未染標本を過去の報告^{9,20,21,34,50-55}と同様の方法で Q-FISH を施行した。薄切した切片を乗せたスライドガラスを室温で *o*-キシレンに 7 分間浸した後、100%エタノールにくぐらせ、乾燥させた。次に、0.2 mol/L 塩酸に室温で 20 分間静置した後、室温で 10 分間、蒸留水で洗浄した。1 mol/L チオシアン酸ナトリウム (NaSCN) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) にスライドを浸漬し、80 °C で 30 分間インキュベーションし、その後、蒸留水で洗浄した。1 mg/mL ペプシン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.,

Osaka, Japan) (0.2N HCl, pH 2.0)に浸し 37 °Cで 15 分間インキュベーションして、再度蒸留水で洗浄し 100%エタノールに浸したのち、乾燥させた。スライドを 0.5 µg/mL リボヌクレアーゼ A (ribonuclease A: R4875, Sigma, St. Louis, USA)に 37 °Cで 10 分間浸し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、70%、90%、100%のエタノールに順に浸して脱水してから乾燥させた。

組織切片上に蛍光色素の Cy3 を付加したテロメアに対する 30 µg/mL (6.04 mmol/L) PNA テロメアプローブ (Telo C-Cy3 probe: 5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAA-3'; catalogue number F1002, Fasmac, Atsugi, Japan) と Fluorescein isothiocyanate (FITC) を付加したセントロメアに対する PNA セントロメアプローブ (Cenp1-FITC probe: 5'-CTTCGTTGGAAACGGGGT-3'; custom-made, Fasmac) にのせて 80 °C、3 分間熱変性させ、1 時間室温でハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション溶液内のプローブの最終濃度は、Cy3: 1.5 µg/mL; 0.30 µmol/L、FITC: 0.6 µg/mL; 0.12 µmol/L とした。その後、70%ホルムアミドバッファー (formamide buffer) で 15 分ずつ、4 回洗浄した。続いて、TBST (0.1 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.08% Tween 20) で 5 分間ずつ、計 4 回洗浄した。その後、核を 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) で染色し、蛍光染色用封入剤の Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い、カバーガラスで切片を覆った。

第 2 項 テロメア長の画像解析

Q-FISH を施行した標本のデジタル画像を撮影した。この際、DAPI/FITC/Cy3 に対応する triple band-pass filter (Part #61 010; Chroma Technology Corp, Rockingham, VT, USA) および 40 倍対物レンズ (Plan Fluor ×40/0.75; Nikon, Tokyo, Japan) を搭載した落射蛍光顕微鏡 (80i; Nikon) に装着された CCD カメラ (RETIGA-2000DC; QIMAGING, Surrey, BC, Canada) を使用した。顕微鏡の操作と撮影は the Image-Pro Plus software package (version 7.0; Media Cybernetics Co Ltd, Silver Spring, MD, USA) で行った。撮影した FISH

画像を専用の解析ソフト Tissue Telo Ver. 3.1 を使用し、過去の報告と同様^{9,20,21,34,50-55}、個々の細胞核における Telomere-centromere ratio (TCR) を算出した。Q-FISH 標本を撮影した合成カラー画像 [DAPI (青)、FITC (緑)、Cy3 (赤)] を Tissue Telo 上で展開し、解析する細胞の核の辺縁をそれぞれ手動で縁取るようにマーキングした。解析する細胞の Q-FISH 切片上での同定は、同時に作成した 3 μm 厚の HE 染色標本の組織像を参考にした。マーキングした核ごとにテロメアとセントロメアのシグナルの蛍光光度を画素単位で解析し、それぞれ蛍光光度を測定した (Fig. 4)。両シグナルとも核内に複数のシグナルが認められ、蛍光光度の上位 5% は解析核内における非特異的なシグナルを除去するため、下位 20% は自家蛍光を補正するためにいずれも除外し、O'sullivan らの方法⁵⁶ および Aida らの方法⁵⁵ に則って行った。2 μm 厚の切片内に核の全体が含まれているとは限らないため、それぞれの核において解析したテロメアのシグナルの蛍光光度を集積し、積分光学濃度 (the integrated optical density) を求めた。本方法では、セントロメアの蛍光光度は一定であることを前提とし²⁰、テロメアの積分光学濃度を同様に算出した同一核内のセントロメアの積分光学濃度で除して、細胞個々の TCR を決定した。各症例で、個々の細胞の TCR を細胞種ごと集計し、その中央値をそれぞれの細胞種の TCR とした^{52,57} (Fig. 5)。

第 3 項 培養細胞株による Telomere-centromere ratio の標準化

TCR 値のみでは、試料調合や組織切片の処理により蛍光色素染色が一様にならない場合があり、算出された TCR により変動が生じ得る。そこで基準となるコントロール群を用いて TCR を標準化し、Normalized telomere-centromere ratio (NTCR) を算出した (Fig. 5)。コントロール群には培養ヒト胎児由来線維芽細胞株 TIG-1⁵⁸ から作製されたセルブロックを使用した。使用する TIG-1 は東京都健康長寿医療センター研究所老人病理学研究チームで培養された 34 集団倍化レベルの細胞 (樹立の初期段階から 34 回倍化増幅した細胞に相当) で、サザンブロット法での計測において 8.6 kbp のテロメア長を有している^{4,9}。セルブロックは TMA 切片と同じスライド上でハイブリダイゼーションされ、同様に解析してコントロール群の TCR を

算出した。症例ごとに各細胞種の TCR を同一スライド上のコントロール群の TCR で除して標準化し、各症例における細胞種ごとの NTCR をそれぞれ決定した。本 Q-FISH 法では NTCR をその細胞種のテロメア長として採用した。

第 4 節 統計解析

年齢を除く臨床病理学的因子の比較では Pearson χ^2 検定を行った。解析した各群においてデータの分布に偏りがあるためノンパラメトリック検定を用い、2 群間の比較は Wilcoxon 順位和検定で行い、多群間比較は Steel-Dwass 検定による多重比較分析を行った。年齢とテロメア長の相関関係は Spearman の順位相関係数で評価した。統計解析は統計解析ソフト JMP Pro 12 を使用し、有意確率が $p < 0.05$ の時、統計学的に有意と判定した。

第 4 章では、AAH 群と ADC の Lep 群についてテロメア長の中央値の比較を行い、両群を喫煙者群と非喫煙者群に分けた比較も行った。次に、これらに ADC 背景肺の CC 群、Met 背景肺の CC 群を加えた 4 群間でテロメア長の中央値の比較を行った。さらに、各群を喫煙者群と非喫煙者群に分けて、これら 4 群間でのテロメア長の中央値の比較検討を行った。

第 5 章では、AAH が認められなかった ADC 症例および Met 症例の背景肺における CC、CEC、BC についてテロメア長の中央値を計測し、ADC 症例と Met 症例を合わせた全例での計測値の比較を行った。続いて、ADC 症例と Met 症例、喫煙者群と非喫煙者群、あるいは男女間で両背景肺における CC、CEC、BC のテロメア長について検討した。次に、テロメア長 (NTCR) と年齢の相関関係を全例及び喫煙歴で分けて解析した。さらに、年齢 (65 歳) で層別化して ADC 症例と Met 症例、喫煙者群と非喫煙者群、あるいは性別による比較検討を行ったほか、ADC 症例と Met 症例をさらに喫煙歴で細分化した 4 群間で多群間比較を行った。

第4章 肺腺癌の Adenoma-carcinoma sequence におけるテロメア長の解析

第1節 結果

第1項 解析症例の臨床病理学的特徴および解析細胞数

Q-FISH 法にて解析した 26 症例において、年齢の中央値は 65 歳、男女比は男性 15 例 (58%)、女性 11 例 (42%) で、喫煙歴は喫煙者 16 例 (62%)、非喫煙者 10 例 (38%) であった。原発巣の組織像は全例浸潤性腺癌で、上皮内癌成分の Lep を有する混合型肺腺癌の像を呈していた (Table 1)。AAH 単発合併症例は 9 例 (35%)、2 病変以上の多発合併症例 (2~18 個) は 17 例 (65%) で、合計 90 病変の AAH を解析した。ADC では最も早期の癌成分のテロメア長を知るため、上皮内腺癌成分である Lep の領域で解析することとし、最終的に解析できたのは 19 病変 (64%) だった。解析細胞数は、AAH が合計 10892 個 (121.0 個/病変)、Lep が合計 2068 個 (108.8 個/病変) であった。

第2項 Atypical adenomatous hyperplasia と肺腺癌の Lepidic pattern 成分のテロメア長の比較

AAH と Lep のテロメア長の中央値はそれぞれ 1.15 と 1.48 で、Lep のテロメア長が AAH より有意に長かった ($p = 0.021$) (Fig. 6)。末梢型 ADC では喫煙歴の有無により癌遺伝子変異の出現頻度に違いがあり^{59,60}、発癌の機序が異なることが推察されているため、AAH および Lep を喫煙者群と非喫煙者群に分けて、それぞれで AAH と Lep のテロメア長を比較した。しかしながら、喫煙者群、非喫煙者群のどちらにおいても AAH と Lep の間でテロメア長に差はみられなかった (データ未記載)。

第3項 背景肺のクララ細胞、Atypical adenomatous hyperplasia および肺腺癌の Lepidic pattern でのテロメア長の比較

末梢型 ADC の Adenoma-carcinoma sequence におけるテロメア長の変化を発生母地

の段階から検討するため、ADCを発症した症例(ADC 症例)のCCを発生母地群、ADCを伴わない症例(Met 症例)のCCを対照群と定義した。上述のAAH群およびLep群に発生母地群、対照群を加えた4細胞種間でテロメア長の多群間比較を行った。

発生母地群は31例、対照群は14例であり、AAH群およびLep群との臨床病理学的因子についての比較では有意な違いはみられなかった(Table 2)。解析細胞数は、発生母地群が合計3771個(121.6個/症例)、対照群が合計1832個(130.9個/症例)であった。

多重比較分析で、対照群と比べAAHのテロメア長が有意に短縮していた(対照群 vs. AAH: 1.50 vs. 1.15, $p = 0.025$)(Fig. 7a)。

上記の4群をそれぞれ喫煙者群と非喫煙者群に分けて多群間比較した。喫煙者群および非喫煙者群において、それぞれ4群間に年齢および性別に有意差はみられなかった。喫煙者群では、多重比較分析でテロメア長を比較し、発生母地群は対照群と比較し有意にテロメア長が短縮していた($p = 0.034$)(Fig. 7b)。一方、非喫煙者群ではこれら4群間においてテロメア長に差はみられなかった(Fig. 7c)。

第2節 考察

AAHはこれまでの癌遺伝子変異の頻度などの分子生物学的検討により末梢型ADCの前癌病変と考えられている³⁵。これまで、ADCのテロメア長はサザンブロット法を用いて計測されている^{61,62}。一方、AAHにおいてはサザンブロット法での報告はなく、FISHを用いて相対的にテロメア長を比較した報告のみであった。Kawaiらの報告⁶³では“benign cells”(細気管支や肺胞を構成する正常細胞群)と比較し、AAHおよび上皮内腺癌はシグナル数が減少し、テロメア長が短縮していると結論付けられた。Lantuejoulら⁶⁴は、蛍光光度を視覚的に評価してスコア付けし、正常のII型肺胞上皮細胞、AAH、上皮内腺癌、stage I-II ADC、stage III-IV ADCの5群間で比較し、上皮内腺癌の蛍光光度が最も弱かったが、群間内で明確な有意差はつかなかった($p = 0.05$)とした。両報告ともヒト検体を使用しているが、年齢や喫煙歴などの情報はなく、シグナル個数の比較や内部コントロールとの比較によるテロメア長の相

対的評価に留まっており、テロメア長の計測は行われていない。本研究では、Q-FISH法を用いてAAHおよびLepのテロメア長を計測し、AAHよりADCのLepのテロメア長が長いことが示された。この結果から、Adenoma-carcinoma sequenceにおけるAAHからLepの移行(癌化)に伴ってテロメア長が伸長することが窺われた。

AAH群、Lep群、発生母地群および対照群の4細胞種間でのテロメア長の多群間比較において、Lep群は発生母地群や対照群と比べてテロメア長に違いはみられなかった。さらに喫煙者群と非喫煙者群に分けても検討し、同様の結果であった。これまでのサザンブロット法による報告では、ADCや肺扁平上皮癌のテロメア長は背景肺と差がない⁶²とされている。本研究では線維芽細胞や白血球等の混入を排して腫瘍細胞と背景肺の上皮細胞のみでテロメア長の比較を行っており、本結果の意義はより大きいと考えられる。

末梢型ADCの発生母地は、呼吸細気管支から肺胞にかけて存在するCCもしくはII型肺胞上皮細胞と推定され^{36,46,64}、これらの上皮細胞からAAH、上皮内腺癌を経て浸潤性腺癌へと進展するAdenoma-carcinoma sequence^{44,46-48}のモデルが考えられている。本研究では、上記4群間の比較において、非喫煙者群では4群間内にテロメア長に差が認められなかった一方、喫煙者群では、ADC背景肺のCC(発生母地群)で非ADC症例(Met)背景肺のCC(対照群)に比べ有意にテロメア長が短縮していた。これらの結果から、喫煙習慣によって発生母地細胞にテロメア長の短縮が生じた可能性が示唆された。また、AAHにおいては全症例の検討で対照群と比べてテロメア長の短縮がみられ、発癌に至る過程でテロメア長の短縮が窺われた。

癌はテロメア長が過度に短縮した組織から発生するという仮説が提唱されて以降^{12,65}、これまで多くの組織や臓器で癌の発生母地におけるテロメア長の解析が報告されてきた。大腸癌やその前癌病変を有する潰瘍性大腸炎患者の腸粘膜¹⁸や肝臓癌の発生母地である慢性肝炎^{16,17}ではテロメア長の高度な短縮が認められているほか、舌⁹や食道⁶⁶の癌症例における扁平上皮やBarrett食道²¹では非担癌の対照群よりテロメア長が短いことが示されている。乳腺では癌の発生母地とされる管腔上皮細胞にテロメア長の短縮が

認められ⁵⁰、慢性炎症などの特別な病態を背景としなくても、癌の発生母地ではテロメア長が短縮していることが示唆された。肺腺癌の発生母地におけるテロメア長の解析は本研究以前には報告されていないが、本研究の結果から、潰瘍性大腸炎や慢性肝炎など他臓器癌の背景で見られたのと同様、喫煙者群においては、ADC 発症例の発生母地細胞にテロメア長の短縮が認められ、ADC 発症例の発生母地細胞は喫煙の影響を受けやすく、この影響により癌化予備群となりうる細胞へ変化していた可能性がある。

一方、非喫煙者群では 4 細胞種間でテロメア長に有意差が認められなかった。非喫煙者と喫煙者とでは、末梢型 ADC に起こる癌遺伝子変異の特徴に相違がある³⁵ことが知られている(Fig.3)。前述の如く発生母地と考えられている CC において既にテロメア長変化の状態が異なっていたことから、両者における ADC の成因の違いを表している可能性がある。

前癌病変とされる AAH では背景肺の CC(発生母地群)と比較してテロメア長に差はみられず、一方で AAH より Lep のテロメア長の方が長かったことは、これらの原因として、テロメアを修復するテロメラーゼの発現が関与している可能性が考えられる。腫瘍細胞が永久的に細胞分裂を繰り返す(不死化)するためにはテロメラーゼの発現が必要で、実際、癌の多くでテロメラーゼが発現していることが知られている。ADC においては、症例の 69~93%にテロメラーゼの活性が認められ²⁹⁻³³、上皮内腺癌に限っては症例の 40~98%にみられた^{30,63,67}。AAH では、Kawai⁶³は AAH(21 症例)の 66%にテロメラーゼ活性がみられたとした。Kawai⁶³および Nakanishi⁶⁷は AAH と上皮内腺癌のテロメラーゼ活性を比較し、上皮内腺癌で活性が有意に増加していると報告している。また、肺の扁平上皮癌では、正常気管支細胞から扁平上皮化生、前癌病変とされる扁平上皮異形成、扁平上皮癌へと進展する過程で、組織内のテロメラーゼ活性が漸増することが示されている⁶⁸⁻⁷⁰。本研究で背景肺の CC と AAH および Lep とのテロメア長の比較から、癌になって初めてテロメア長を維持する機構が働いていることが示唆されたが、Q-FISH の同一切片上でテロメラーゼ活性を評価する手法ははまだ開発されておらず、テロメア長を解析した細胞でテロメラーゼ活性を分析することは今後の課題である。

第5章 呼吸細気管支構成上皮細胞におけるテロメア長の解析

第1節 結果

第1項 解析症例の臨床組織学的特徴および解析細胞

本章で解析した ADC 症例と Met 症例における臨床病理学的因子を Table 3 に示す。解析した 45 症例での肺切除時の年齢は中央値 65 歳(46~77 歳)であった。Met 症例 14 例における原発腫瘍の内訳は、直腸癌 6 例、結腸癌 3 例、尿路上皮癌 2 例、胃癌 1 例、腺様嚢胞癌(下顎)1 例、平滑筋肉腫(大腸)1 例であった。非喫煙者群と喫煙者群との比較では、非喫煙者群は年齢が高く($p = 0.020$)、女性が多かった($p = 0.0084$)が、肺腫瘍の組織型の割合に差はなかった(Table 3)。呼吸細気管支を構成する上皮細胞である CC、CEC および BC の解析細胞数は、CC: 5603 個(124.5 個/症例)、CEC: 5397 個(119.9 個/症例)、BC: 3571 個(79.4 個/症例)であった。

第2項 呼吸細気管支構成上皮細胞におけるテロメア長

呼吸細気管支構成上皮細胞である CC、CEC、BC におけるテロメア長(NTCR)を ADC 症例と Met 症例を合わせた 45 例について計測したところ、テロメア長の中央値はそれぞれ 1.25、1.18、1.27 であった。

第3項 喫煙歴による呼吸細気管支構成上皮細胞のテロメア長の比較検討

ADC 症例と Met 症例を合わせた 45 例全例について、喫煙者群と非喫煙者群に分けて背景肺の CC、CEC、BC のテロメア長を計測した。CC、CEC、BC のテロメア長の中央値は、喫煙者ではそれぞれ 1.20、1.07、1.19、非喫煙者ではそれぞれ 1.30、1.22、1.38 で、いずれの細胞種においても喫煙者群と非喫煙者群の間に有意差はみられなかった(CC: $p = 0.31$ 、CEC: $p = 0.33$ 、BC: $p = 0.20$)。

第4項 ADC 症例と Met 症例による呼吸細気管支構成上皮細胞のテロメア長の比較検討

全症例を ADC 群と Met 群に分けてテロメア長を比較した。両群間で喫煙者の割合および年齢、男女比に有意差はみられなかった。テロメア長の比較では、ADC 症例のテロメア長はいずれの細胞種においても Met 症例より短縮していたが、明確な有意差はみられなかった (ADC vs. Met; CC: 1.20 vs. 1.50, $p = 0.053$, CEC: 1.12 vs. 1.29, $p = 0.15$, BC: 1.20 vs. 1.33, $p = 0.35$)。

第5項 性別による呼吸細気管支構成上皮細胞のテロメア長の比較検討

全症例を性別で分けた検討では、CC、CEC、BC のテロメア長の中央値は男性群でそれぞれ 1.30、1.09、1.28、女性群ではそれぞれ 1.21、1.20、1.23 であり、いずれの細胞種においても両群に有意差はみられなかった (CC: $p = 0.70$, CEC: $p = 0.73$, BC: $p = 0.69$)。

第6項 年齢による呼吸細気管支構成上皮細胞のテロメア長の検討

ADC 症例と Met 症例を合わせた 45 例における検討では、CC、CEC、BC における年齢とテロメア長には有意な相関関係はみられなかった(データ未記載)。

上述の検討(第3項)で喫煙者全体としてはテロメア長に差はみられなかったが、喫煙者群と非喫煙者群で分けて検討したところ、テロメア長と年齢の関係において、非喫煙者群では CC、CEC、BC いずれの細胞種においても年齢とテロメア長の間を負の相関関係が認められ (CC: $|\rho| = 0.4000$, $p = 0.035$; CEC: $|\rho| = 0.4233$, $p = 0.025$; BC: $|\rho| = 0.4115$, $p = 0.030$)、加齢によるテロメア長の短縮が示された。一方、喫煙者群ではどの細胞種においても加齢によるテロメア長の有意な短縮傾向はみられなかった (Fig. 8)。

また、同様に上記の 45 例を ADC 症例と Met 症例、あるいは性別で分けて相関関係を解析したところ、いずれの検討においても年齢とテロメア長には明らかな相関関係はみられなかった(データ未記載)。

第7項 喫煙歴および年齢によるテロメア長の変化

第6項の検討で、散布図(Fig.8)において非喫煙者群と喫煙者群の間でテロメア長の傾向が65歳辺りを境目に異なる傾向が窺え、いずれの細胞種でも非喫煙者群と喫煙者群の回帰直線が65歳辺りで交差したことから、全症例を年齢の中央値である65歳で若年者群(65歳未満)と高齢者群(65歳以上)に分けた上で、各年齢群における喫煙とテロメア長を解析した。若年者群では、いずれの細胞種においても喫煙者群のテロメア長が非喫煙者群よりも有意に短縮していた(喫煙者群 vs. 非喫煙者群, CC: 1.17 vs. 1.61, $p = 0.038$; CEC: 1.07 vs. 1.36, $p = 0.045$; BC: 1.17 vs. 1.53, $p = 0.012$)。しかし、高齢者群では喫煙によるテロメア長に差はみられなかった(Fig. 9)。

第8項 年齢で層別化したADC症例とMet症例もしくは性別でのテロメア長の比較検討

第7項と同様に、全症例を若年者群(65歳未満)と高齢者群(65歳以上)に分けた上で、CC、CEC、BCにおいてADC症例とMet症例および性別によるテロメア長の変化を解析した。

ADC症例とMet症例での比較では、若年者群においてCCおよびCECでADC症例のテロメア長がMet症例と比べ有意に短縮していた(ADC症例 vs. Met症例, CC: 1.19 vs. 2.24, $p = 0.017$; CEC: 1.08 vs. 1.58, $p = 0.012$)。しかし、BCではテロメア長に有意差はみられなかった(BC: 1.19 vs. 1.61, $p = 0.058$) (Fig.10)。一方、高齢者群ではいずれの細胞種においてもADC症例とMet症例との間でテロメア長に差はみられなかった。

性別による比較では、若年者群、高齢者群ともに、いずれの細胞種においても男女間でテロメア長に差はみられなかった。

第9項 ADC症例とMet症例を喫煙歴もしくは性別で細分化した4群間でのテロメア長の比較検討

ADC症例とMet症例でのテロメア長の比較では、いずれの細胞種においても有意差は認められなかった(第4項)が、第4章において喫煙者群ではADC症例のCC(発生母地群)と

Met 症例の CC(対照群)の間にテロメア長の差が窺えたため、ADC 症例と Met 症例において喫煙歴、年齢、並びに性別を加味してテロメア長の検討を行った。

ADC 症例と Met 症例をそれぞれ喫煙者群と非喫煙者群に分けて 4 群に細分化し、これら 4 群間で背景肺の CC、CEC、BC におけるテロメア長を多群間比較した。多重比較分析において、CC で ADC 症例・喫煙者群のテロメア長は Met 症例・喫煙者群と比べ有意に短縮していた(ADC 症例・喫煙者群 vs. Met 症例・喫煙者群: 1.12 vs. 1.55, $p = 0.034$)。一方、CEC および BC では、4 群間にテロメア長に有意差はみられなかった(Fig. 11)。4 群間における年齢の違いを確認したが、年齢の中央値に差はみられなかった(データ未記載)。

ADC 症例と Met 症例をそれぞれ男性群と女性群に分けて 4 群に細分化し、これら 4 群間で背景肺の CC、CEC、BC におけるテロメア長を多群間比較した。多重比較分析において、いずれの細胞種においても 4 群間にテロメア長の差はみられなかった(データ未記載)。

第 10 項 年齢で層別化された ADC 症例および Met 症例を喫煙歴で細分化した 4 群間でのテロメア長の比較検討

若年者(65 歳未満)では喫煙者群と非喫煙者群の間にテロメア長の違いがみられ(第 7 項)、ADC 症例と Met 症例の間にもテロメア長に差がみられた(第 8 項)ことから、若年者群と高齢者群に層別化した上で、ADC 症例と Met 症例をそれぞれ喫煙者群と非喫煙者群に分けて、これら 4 群間で背景肺の CC、CEC、BC におけるテロメア長の多群間比較を行った。多重比較分析において、若年者群の CC では、ADC 症例・喫煙者群のテロメア長が ADC 症例・非喫煙者群と比べ有意に短縮していた(ADC 症例・喫煙者群 vs. ADC 症例・非喫煙者群: 1.05 vs. 1.30, $p = 0.036$)(Fig. 12)。一方、若年者群の CEC、BC では 4 群間でテロメア長に差はみられず、高齢者群では、いずれの細胞種においても 4 群間に有意差はみられなかった。

第2節 考察

これまで線維芽細胞や白血球等、様々な細胞を含んだ肺組織や肺癌組織のテロメア長を測定した報告がなされているが、ヒトの呼吸細気管支を構成する個々の上皮細胞に対しテロメア長を測定し、また、これらの細胞において加齢や喫煙がテロメアに対して及ぼす影響について解析した報告はない。本研究では、ヒト組織標本を用いて呼吸細気管支構成上皮細胞である3種類の細胞 CC、CEC、BC のテロメア長を Q-FISH 法で個々に解析し、以下の3点の結果が得られた; (i) ADC 症例および Met 症例を合わせた45例の背景肺での検討において、非喫煙者群では3細胞種いずれにおいても加齢によるテロメア長の短縮がみられた、(ii) 65歳未満の症例ではいずれの細胞種においても喫煙者群のテロメア長が短縮していた一方、65歳以上の症例では有意差はみられなかった、(iii) 65歳未満のCCにおいてADC症例・喫煙者群のテロメア長がADC症例・非喫煙者群と比較し有意に短縮していた。

結果 (i) は、これまでサザンブロット法もしくは Q-FISH を用いて解析された他臓器での報告⁴と同様に、呼吸細気管支上の CC、CEC、BC において加齢によるテロメア長の短縮が喫煙者において認められた。肺では、Walters らが健康な非喫煙者と呼吸機能に異常を認めない健康な喫煙者において細気管支上皮のテロメア長をサザンブロット法で解析し、非喫煙者では年齢とテロメア長が逆相関したが、喫煙者では相関関係はみられなかったと報告している⁷¹。また、末梢肺では、Tsuji らが非喫煙者、健康な喫煙者、肺気腫患者において肺胞内のII型上皮細胞と血管内皮細胞で FISH によるテロメアの蛍光光度を比較し、両細胞とも非喫煙者に対して健康な喫煙者及び肺気腫患者の蛍光光度が弱く、テロメア長が短縮していたと報告した⁷²。しかし、これらの研究では内部コントロールが不明で、3群間だけの相対的な評価であった。末梢肺や呼吸細気管支を構成する細胞において、そのテロメア長を定量的に解析した報告は未だなく、呼吸細気管支構成上皮細胞でテロメア長が加齢により短縮することが本研究により初めて示された。

一方で、このような加齢に伴う背景肺の上皮細胞におけるテロメア長の短縮は、非喫煙者に限られており、喫煙者ではむしろ既に40歳、50歳代の時点で有意なテロメア長の短縮が

生じていた(Fig.8)。結果(ii)で示された喫煙者での若い世代からのテロメア長の短縮には、喫煙習慣による呼吸細気管支上皮の破壊が関わっているかもしれない。喫煙は呼吸細気管支の傷害により小葉中心性肺気腫を引き起こす⁷³⁻⁷⁶。Fraigは、手術切除肺による検討で、喫煙継続中の患者の100%、過去に喫煙歴のある患者の49%に呼吸細気管支炎が認められるが、非喫煙者では8%しか見られないと報告した⁷⁶。Niewoehnerは、肺に主要な病変が認められない病理解剖症例で検討し、若い喫煙者(平均年齢 25.7 ± 1.2 歳)の全例に呼吸細気管支炎が認められたが、同年代の非喫煙者ではほとんど見られないことを示した⁷³。本研究では組織学的に明らかな炎症や肺気腫が認められた症例を除外したにもかかわらず、若年者群(65歳未満)では既にテロメア長が短縮していた。つまり、呼吸細気管支を構成する上皮細胞であるCC、CECおよびBCでは、喫煙による呼吸細気管支炎や気腫性変化が組織学的にごく軽度もしくは認められる以前からテロメア長の短縮が既に始まっていることが示唆される。

Walters⁷¹は、呼吸機能検査で異常が認められない健康な喫煙者の細気管支上皮で、非喫煙者と比較しテロメア長が短縮していたことを報告している。サザンブロット法での解析ではあるが、非喫煙者の1例を除き全て60歳以下の症例で解析しており、本結果と類似している。一方、末梢血白血球を用いたテロメア長と喫煙の関係の研究報告では、健康な喫煙者と非喫煙者ではテロメア長に差はみられなかった⁷⁷が、COPD患者では健康な喫煙者および非喫煙者に比べテロメア長が短縮していた^{77,78}。喫煙のテロメアへの影響は、タバコの煙に直接接触する末梢気道上皮の方が、白血球より鋭敏に反映するのかもしれない。

結果(iii)について、65歳未満の症例では末梢型ADCの発生母地とされるCCにおいて、多重比較分析でADC症例・喫煙者群のテロメア長が同・非喫煙者群と比べ有意に短縮していたことは、末梢型ADCの発生過程を考察する上で非常に興味深い。同じADC背景肺におけるCECおよびBCでは喫煙による有意なテロメア長の短縮はみられず、若年者では、末梢型ADCの発生母地にあたるCCが最も喫煙によって影響を受け、末梢型肺腺癌の発生に関与していた可能性がある。

末梢型ADCで生じる癌遺伝子の変異は、非喫煙者と喫煙者で傾向に違いがあることが知

られている³⁵。例えば、非喫煙者では *EGFR* 遺伝子変異の頻度が多い一方、喫煙者では *KRAS* 遺伝子変異の頻度が高く^{59,60}、喫煙量の増加に伴いその頻度も上昇する⁶⁰。65 歳未満で非喫煙者群と喫煙者群との間で発生母地細胞のテロメア長に違いがみられたことは、癌遺伝子変異の機序にテロメア長の短縮が関与している可能性がある。テロメア長の過度な短縮が生じた細胞では染色体の不安定性が生じて^{18,79,80}、遺伝子変異を引き起こしやすくなり²²、癌化に至る^{81,82}と考えられており、喫煙者群の発生母地細胞で見られたテロメア長の短縮が *KRAS* 遺伝子変異に関連するのかもしれない。

高齢者(65 歳以上)では、いずれの細胞種においても非喫煙者群と喫煙者群のテロメア長に有意差がみられなかった。本邦で行われた COPD の疫学調査⁸³では、COPD の有病率は 50~59 歳で 5.8%、60~69 歳で 15.7%、70 歳以上で 24.4%であり、60 歳以降で急増することが示されている。本研究では、組織学的に明らかな炎症や肺気腫が認められた症例を除外したため、高齢者では喫煙による影響の少ない症例だけが解析対象となり、結果に影響を与えた可能性がある。Aida らは非肺癌の剖検例で中枢側の気管支上皮細胞のテロメア長を解析し、非喫煙者より喫煙者のテロメア長が長かったと報告し⁵⁴、本研究の結果とは一致しなかった。彼らは中枢側にある気管支(亜区域支および小葉気管支以降の末梢気管支)の上皮細胞を対象にしており、本研究では呼吸細気管支の上皮細胞を対象としたので、部位や種類の違いによって上皮細胞のタバコへの感受性が異なるのかもしれない。また、解析症例の平均年齢の違い(Aida: 83.7 歳、本研究: 61.1 歳)や喫煙量の違い(Aida: 平均 47.1 pack-year、本研究: 平均 28.0 pack-year)が結果に影響を及ぼした可能性もある。

第6章 総括

今回の研究により、外科手術症例での呼吸細気管支を構成する3種の上皮細胞、AAH、Lepを対象にテロメア長の測定と解析を行うことで、有意な所見を見出すに至った。CCにおけるテロメア長の短縮とADCとの関わり、およびADC背景肺におけるCCのテロメア長の短縮と年齢、喫煙との関連について、その一端を解明することができたものとする。

本研究の限界や今後の課題として以下の点が挙げられる。まず、本研究におけるCC、AAH、Lepのテロメア長のデータは同一症例の中で比較されたのではなく、別々の症例群の中央値の比較から導き出されたものである。今後、同一症例内でのCC、AAH、Lepの比較データを蓄積することで肺のadenoma-carcinoma sequenceにおけるテロメア長の短縮と肺腺癌の発生、進展の関連について実態がより明らかにできるとも思われる。

次に、喫煙者の若年者において上皮細胞におけるテロメア長の短縮がどの時点で生じているのかが未だ不明である。さらに、非喫煙者では年齢を重ねるにつれて上皮細胞のテロメア長が短縮していたのに対し、喫煙者において早期に短縮したテロメア長が、その後年齢を重ねても有意に短縮しないという結果についても、現時点では説明が難しい。

受動喫煙による影響などについても疫学的データは不十分で、今回の検討では調べられていない。

今後、症例を増やし、解析を重ねることで、上記の課題を一つ一つ解明し、発生母地を含む肺腺癌の発癌過程でテロメア長の短縮が果たす役割を明らかにしていきたい。

第7章 結論

末梢型 ADC の Adenoma-carcinoma sequence における AAH および Lep、そして呼吸細気管支を構成する上皮細胞である CC、CEC、BC において、Q-FISH 法によってテロメア長を計測し、臨床病理学的因子との関係を解析して、下記の結論を得た。

- (i) Adenoma-carcinoma sequence における AAH と Lep とのテロメア長の比較により、癌化した時点からテロメア長の延長がみられた。
- (ii) ADC 背景肺において、ADC の発生母地とされている CC のテロメア長が対照群と比べて有意に短縮していた。また、ADC 背景肺の中でも、65 歳未満の若年者では喫煙者群の CC のテロメア長は非喫煙者群に比べて有意に短縮していた。
- (iii) 呼吸細気管支を構成する CEC、BC、CC において、非喫煙者群では加齢に伴ってテロメア長が短縮し、65 歳未満の症例では喫煙によりテロメア長が有意に短縮していた。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会をお与えくださり、終始、熱心なご指導ご鞭撻を賜りました本校臨床検査医学講座 中西邦昭教授に心より感謝申し上げます。また、本論文をご精読いただき、大変有用なご意見を頂戴いたしました本校病態病理学 津田均教授に深く感謝致します。本論文の査読並びにこれまで呼吸器外科の全般にわたりご指導くださり、研究への動機を持たせて頂いた本校外科学 尾關雄一准教授に心より感謝申し上げます。

Q-FISH 法でのテロメア長の解析において、東京都健康長寿医療センター研究所 田久保海誉先生、相田順子先生、および下村七生貴氏には懇切丁寧なご指導を賜りました。また、同研究所 西村幸子氏に Q-FISH 標本の作製にご協力いただきました。心より感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、国際医療福祉大学三田病院 相田真介教授には、本研究に対し貴重なご意見ご助言を賜りました。また、本校医療情報部 脇坂仁准教授には統計解析についての的確なご助言を頂きました。心より感謝致しております。

最後に、医学研究科入校の際、臨床検査医学講座に私を招き入れ、ご指導くださいました河合俊明前教授、並びに多くのご指導ご助言を頂き、大変お世話になりました本校臨床検査医学講座ならびに防衛医科大学校病院検査部の皆様に心より感謝申し上げます。ありがとうございました。

単語・略語説明

AAH: Atypical adenomatous hyperplasia

ADC: Adenocarcinoma

BC: Basal cell

bp: base pairs

CC: Clara cell

CEC: Ciliated epithelial cell

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DNA: Deoxyribonucleic acid

EGFR: Epidermal growth factor receptor

FISH: Fluorescence *in situ* hybridization

FITC: Fluorescein isothiocyanate

HE: Hematoxylin-Eosin

kbp: kilo base pairs

KRAS: v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

Lep: Lepidic pattern

Met: Metastatic carcinoma

NTCR: Normalized telomere-centromere ratio

PNA: Peptide nucleic acid

Q-FISH: Quantitative fluorescence *in situ* hybridization

TCR: Telomere-centromere ratio

TMA: Tissue microarray

引用文献

1. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991;350(6319):569–73.
2. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6622–6.
3. Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(12):4611–27.
4. Takubo K, Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Ishikawa N, Sawabe M, Kurabayashi R, et al. Changes of telomere length with aging. *Geriatr Gerontol Int*. 2010;10 (SUPPL. 1):S197–206.
5. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*. 1972;239(94):197–201.
6. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*. 1992;225(4):951–60.
7. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458–60.
8. Vaziri H, Schächter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet*. 1993;52(4):661–7.
9. Aida J, Izumo T, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Matsuura M, et al. Telomere lengths in the oral epithelia with and without carcinoma. *Eur J Cancer*. 2010;46(2):430–8.
10. 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(5):685–91.
11. Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, et al. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet.* 1998;18(1):76–80.
 12. 田久保海誉, 仲村賢一, 下村七生貴, 石川直, 相田順子. テロメア. *日本臨床.* 2009;67(7):1293–7.
 13. Pontén J, Stein WD, Shall S. A quantitative analysis of the aging of human glial cells in culture. *J Cell Physiol.* 1983;117(3):342–52.
 14. Karatza C, Stein WD, Shall S. Kinetics of in vitro ageing of mouse embryo fibroblasts. *J Cell Sci.* 1984;65:163–75.
 15. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature.* 2000;408(6808):53–6.
 16. Kitada T, Seki S, Kawakita N, Kuroki T, Monna T. Telomere shortening in chronic liver diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;211(1):33–9.
 17. Ohashi K, Tsutsumi M, Nakajima Y, Kobitsu K, Nakano H, Konishi Y. Telomere changes in human hepatocellular carcinomas and hepatitis virus infected noncancerous livers. *Cancer.* 1996;77(8 Suppl):1747–51.
 18. O’Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall T, Finley JC, Shen W-T, Emerson S, et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet.* 2002;32(2):280–4.
 19. Risques RA, Lai LA, Himmetoglu C, Ebaee A, Li L, Feng Z, et al. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer arises in a field of short telomeres, senescence, and inflammation. *Cancer Res.* 2011;71(5):1669–79.
 20. Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishii A, Ishikawa N, Honma N, et al. Telomere length variations in 6 mucosal cell types of gastric tissue observed using a novel quantitative fluorescence in situ hybridization method. *Hum*

- Pathol. 2007;38(8):1192–200.
21. Shiraishi H, Mikami T, Aida J, Nakamura K-I, Izumiyama-Shimomura N, Arai T, et al. Telomere shortening in Barrett's mucosa and esophageal adenocarcinoma and its association with loss of heterozygosity. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(5):538–44.
 22. De Lange T. Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:197–204.
 23. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science.* 1999;283(5406):1321–5.
 24. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003;426(6963):194–8.
 25. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood.* 1995;85(9):2315–20.
 26. Bachor C, Bachor OA, Boukamp P. Telomerase is active in normal gastrointestinal mucosa and not up-regulated in precancerous lesions. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999;125(8–9):453–60.
 27. Hiyama E, Tatsumoto N, Kodama T, Hiyama K, Shay J, Yokoyama T. Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol.* 1996;9(3):453–8.
 28. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266(5193):2011–5.
 29. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, et al. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst.*

- 1997;89(21):1609–15.
30. Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, Chella A, Quattrocchio G, Angeletti CA, et al. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2077–81.
 31. Kumaki F, Kawai T, Hiroi S, Shinomiya N, Ozeki Y, Ferrans VJ, et al. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol.* 2001;32(2):188–95.
 32. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(12):895–902.
 33. Fujiwara M, Okayasu I, Takemura T, Tanaka I, Masuda R, Furuhashi Y, et al. Telomerase activity significantly correlates with chromosome alterations, cell differentiation, and proliferation in lung adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 2000;13(7):723–9.
 34. Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SSS, Kammori M, et al. Basal cells have longest telomeres measured by tissue Q-FISH method in lingual epithelium. *Exp Gerontol.* 2008;43(9):833–9.
 35. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, editors. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th ed. Lyon: International agency for research on cancer (IARC); 2015.
 36. Sterner DJ, Mori M, Roggli VL, Fraire AE. Prevalence of pulmonary atypical alveolar cell hyperplasia in an autopsy population: a study of 100 cases. *Mod Pathol.* 1997;10(5):469–73.
 37. Yokose T, Ito Y, Ochiai A. High prevalence of atypical adenomatous hyperplasia

- of the lung in autopsy specimens from elderly patients with malignant neoplasms. *Lung Cancer*. 2000;29(2):125–30.
38. Nakahara R, Yokose T, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A. Atypical adenomatous hyperplasia of the lung: a clinicopathological study of 118 cases including cases with multiple atypical adenomatous hyperplasia. *Thorax*. 2001;56(4):302–5.
 39. Weng SY, Tsuchiya E, Kasuga T, Sugano H. Incidence of atypical bronchioloalveolar cell hyperplasia of the lung: relation to histological subtypes of lung cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420(6):463–71.
 40. Westra WH, Baas IO, Hruban RH, Askin FB, Wilson K, Offerhaus GJ, et al. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. *Cancer Res*. 1996;56(9):2224–8.
 41. Yoshida Y, Shibata T, Kokubu A, Tsuta K, Matsuno Y, Kanai Y, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2005;50(1):1–8.
 42. Takamochi K, Ogura T, Suzuki K, Kawasaki H, Kurashima Y, Yokose T, et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 9q and 16p in atypical adenomatous hyperplasia concomitant with adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol*. 2001;159(5):1941–8.
 43. Soh J, Toyooka S, Ichihara S, Asano H, Kobayashi N, Suehisa H, et al. Sequential molecular changes during multistage pathogenesis of small peripheral adenocarcinomas of the lung. *J Thorac Oncol*. 2008;3(4):340–7.
 44. Miller RR, Nelems B, Evans KG, Müller NL, Ostrow DN. Glandular neoplasia of the lung. A proposed analogy to colonic tumors. *Cancer*. 1988;61(5):1009–14.
 45. Mori M, Rao SK, Popper HH, Cagle PT, Fraire AE. Atypical adenomatous

- hyperplasia of the lung: a probable forerunner in the development of adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2001;14(2):72–84.
46. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6(2):244–85.
 47. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525–32.
 48. Miller RR. Bronchioloalveolar cell adenomas. *Am J Surg Pathol.* 1990;14(10):904–12.
 49. Chapman AD, Kerr KM. The association between atypical adenomatous hyperplasia and primary lung cancer. *Br J Cancer.* 2000;83(5):632–6.
 50. Kurabayashi R, Takubo K, Aida J, Honma N, Poon SSS, Kammori M, et al. Luminal and cancer cells in the breast show more rapid telomere shortening than myoepithelial cells and fibroblasts. *Hum Pathol.* 2008;39(11):1647–55.
 51. Takubo K, Fujita M, Izumiyama N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, et al. Q-FISH analysis of telomere and chromosome instability in the oesophagus with and without squamous cell carcinoma in situ. *J Pathol.* 2010;221(2):201–9.
 52. Aida J, Yokoyama A, Izumiyama N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, et al. Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus. *J Pathol.* 2011;223(3):410–6.
 53. Aida J, Kobayashi T, Saku T, Yamaguchi M, Shimomura N, Nakamura K, et al. Short telomeres in an oral precancerous lesion: Q-FISH analysis of leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(5):372–8.

54. Aida S, Aida J, Hasegawa K, Kumasaka T, Shimazaki H, Tamai S, et al. Telomere length of human adult bronchial epithelium and bronchogenic squamous cell carcinoma measured using tissue quantitative fluorescence in situ hybridization. *Respiration*. 2015;90(4):321–6.
55. Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Terai M, Matsuda Y, et al. Determination of Telomere Length by the Quantitative Fluorescence in situ Hybridization (Q-FISH) Method. *Am J Anal Chem*. 2014;5(12):775–83.
56. O’Sullivan JN, Finley JC, Risques R, Shen W-T, Gollahon K a, Moskovitz AH, et al. Telomere length assessment in tissue sections by quantitative FISH: image analysis algorithms. *Cytometry A*. 2004;58(2):120–31.
57. Aida J, Yokoyama A, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Terai M, et al. Telomere shortening in the esophagus of Japanese alcoholics: relationships with chromoendoscopic findings, ALDH2 and ADH1B genotypes and smoking history. *PLoS One*. 2013;8(5):e63860.
58. Ohashi M, Aizawa S, Ooka H, Ohsawa T, Kaji K, Kondo H, et al. A new human diploid cell strain, TIG-1, for the research on cellular aging. *Exp Gerontol*. 1980;15(2):121–33.
59. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res*. 2004;64(24):8919–23.
60. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D’Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res*. 2012;18(22):6169–77.
61. 井出利憲, 檜山英三, 檜山桂子. *がんとテロメア・テロメラーゼ*. 東京都: 南山堂;

- 1999.
62. Frías C, García-Aranda C, De Juan C, Morán A, Ortega P, Gómez A, et al. Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008;60(3):416–25.
 63. Kawai T, Hiroi S, Nakanishi K, Meeker AK. Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(2):254–62.
 64. Lantuejoul S, Raynaud C, Salameire D, Gazzeri S, Moro-Sibilot D, Soria J-C, et al. Telomere maintenance and DNA damage responses during lung carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2010;16(11):2979–88.
 65. Cheung ALM, Deng W. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Front Biosci*. 2008;13:2075–90.
 66. Kammori M, Poon SSS, Nakamura K-I, Izumiyama N, Ishikawa N, Kobayashi M, et al. Squamous cell carcinomas of the esophagus arise from a telomere-shortened epithelial field. *Int J Mol Med*. 2007;20(6):793–9.
 67. Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hiroi S, Mukai M, Ikeda E. Expression of human telomerase RNA component and telomerase reverse transcriptase mRNA in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Hum Pathol*. 2002;33(7):697–702.
 68. Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino H, Baba M, Saitoh Y, Iizasa T, et al. Increased telomerase activity and elevated hTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer*. 2001;92(4):849–55.
 69. Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res*. 1997;57(12):2373–7.

70. Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Sabatier L, et al. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res.* 2005;11(5):2074–82.
71. Walters MS, De BP, Salit J, Buro-Auriemma LJ, Wilson T, Rogalski AM, et al. Smoking accelerates aging of the small airway epithelium. *Respir Res.* 2014;15:94.
72. Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(8):886–93.
73. Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med.* 1974;291(15):755–8.
74. Cosio MG, Hale KA, Niewoehner DE. Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways. *Am Rev Respir Dis.* 1980;122(2):265–71.
75. Wright JL, Lawson LM, Pare PD, Wiggs BJ, Kennedy S, Hogg JC. Morphology of peripheral airways in current smokers and ex-smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1983;127(4):474–7.
76. Fraig M, Shreesha U, Savici D, Katzenstein A-LA. Respiratory bronchiolitis: a clinicopathologic study in current smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(5):647–53.
77. Sadr M, Noori Mugahi SMH, Hassanzadeh G, Nadji SA, Kiani A, Abedini A, et al. Telomere shortening in blood leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tanaffos.* 2015;14(1):10–6.
78. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(7):566–71.

79. Gisselsson D, Jonson T, Petersén A, Strömbeck B, Dal Cin P, Höglund M, et al. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(22):12683–8.
80. Montgomery E, Wilentz RE, Argani P, Fisher C, Hruban RH, Kern SE, et al. Analysis of anaphase figures in routine histologic sections distinguishes chromosomally unstable from chromosomally stable malignancies. *Cancer Biol Ther*. 2003;2(3):248–52.
81. DePinho R a. The age of cancer. *Nature*. 2000;408(6809):248–54.
82. Londoño-Vallejo JA. Telomere instability and cancer. *Biochimie*. 2008;90(1):73–82.
83. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, Adachi M, Nagai A, Kuriyama T, et al. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*. 2004;9(4):458–65.

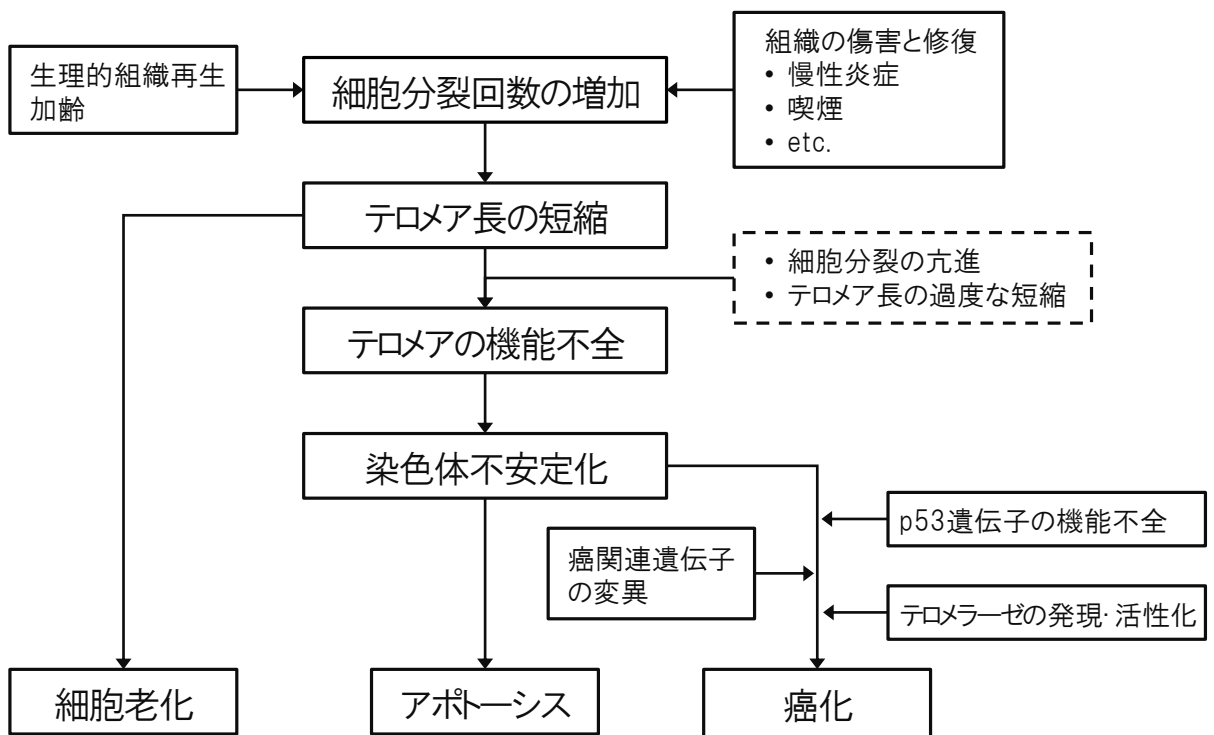


Fig 1. テロメア長の短縮による細胞老化、アポトーシスおよび癌化への経路の模式図。加齢や喫煙、炎症などによりテロメアは短縮し、6 kbp以下になると分裂の停止（細胞老化）が起こる。高度なテロメア長の短縮は染色体の不安定化を惹起し、染色体の癒合やDNAの損傷が起こり、やがてアポトーシスに至る。p53遺伝子の機能不全などにより、アポトーシスを免れたものは、テロメラーゼの発現により不死化し、癌関連遺伝子の異常を経て癌化に至る。

kbp, kilo base pairs; DNA, Deoxyribonucleic acid

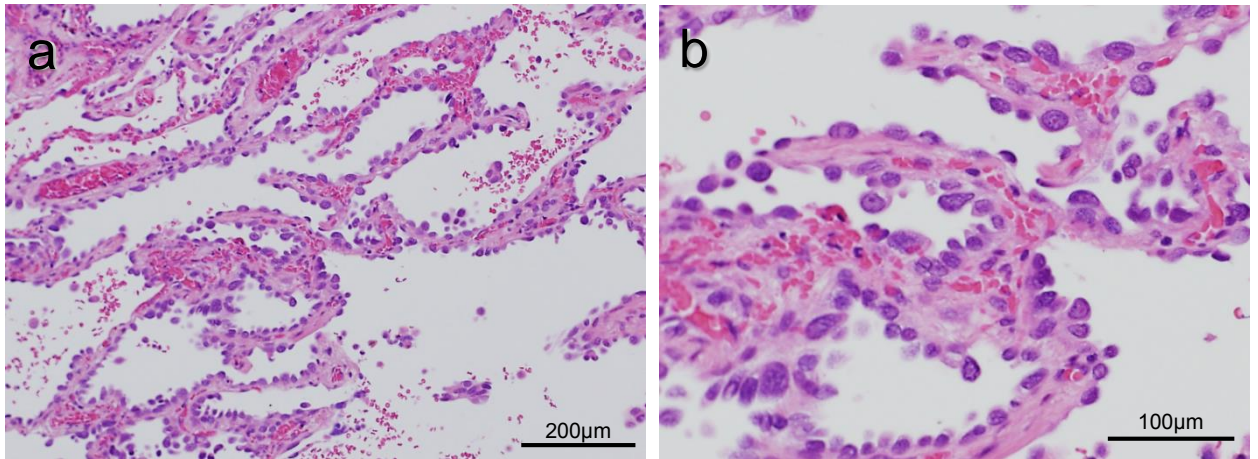


Fig 2. Atypical adenomatous hyperplasia (AAH) のHematoxylin-Eosin (HE) 染色像。
軽度から中等度の異型を有するクララ細胞やII型肺胞上皮細胞に類似した細胞が肺胞上皮置換性に増殖している。AAHでは炎症細胞浸潤や線維化は目立たない。弱拡大 (a) および強拡大 (b)。

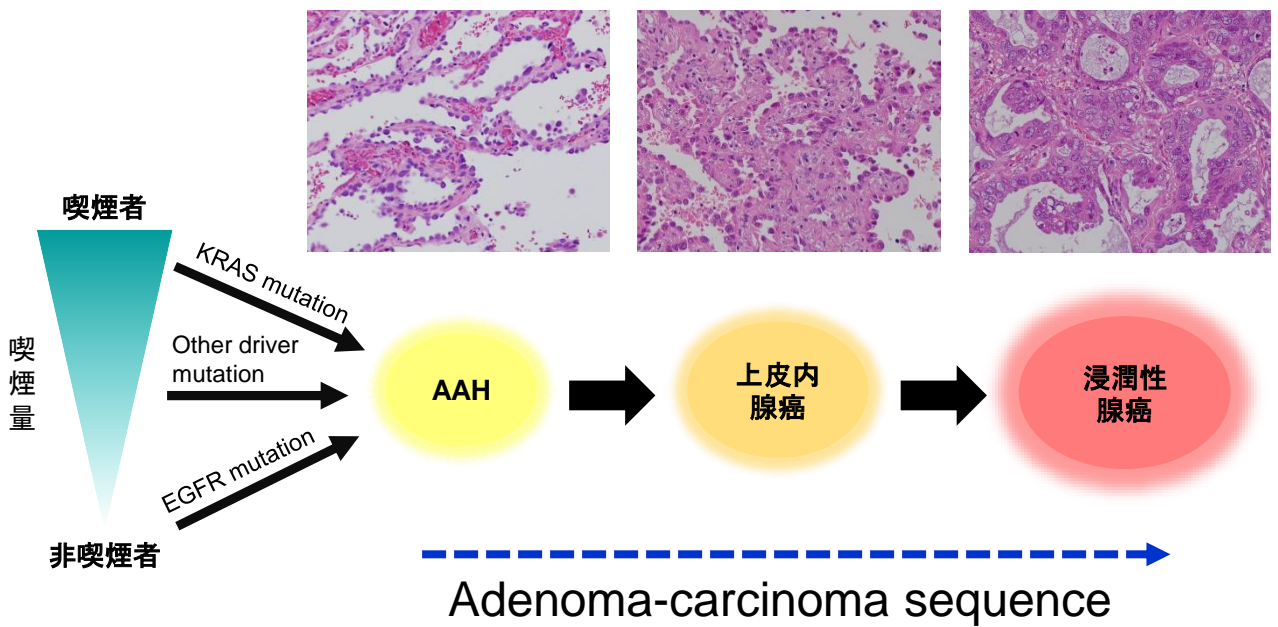


Fig 3. 末梢型肺腺癌におけるAdenoma-carcinoma sequence の模式図。喫煙者では喫煙が要因となり、癌遺伝子の変異が起こり、喫煙量が増えるほど*KRAS*遺伝子変異陽性肺腺癌の頻度が増える。非喫煙者では背景要因ははっきりしないが、*EGFR*遺伝子変異陽性肺腺癌が多く見られる。前癌病変のAAHから癌化した上皮内腺癌は肺胞上皮置換性に進展するが、やがて浸潤能を獲得して浸潤性腺癌へと移行する。

AAH, Atypical adenomatous hyperplasia; *KRAS*, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *EGFR*, Epidermal growth factor receptor

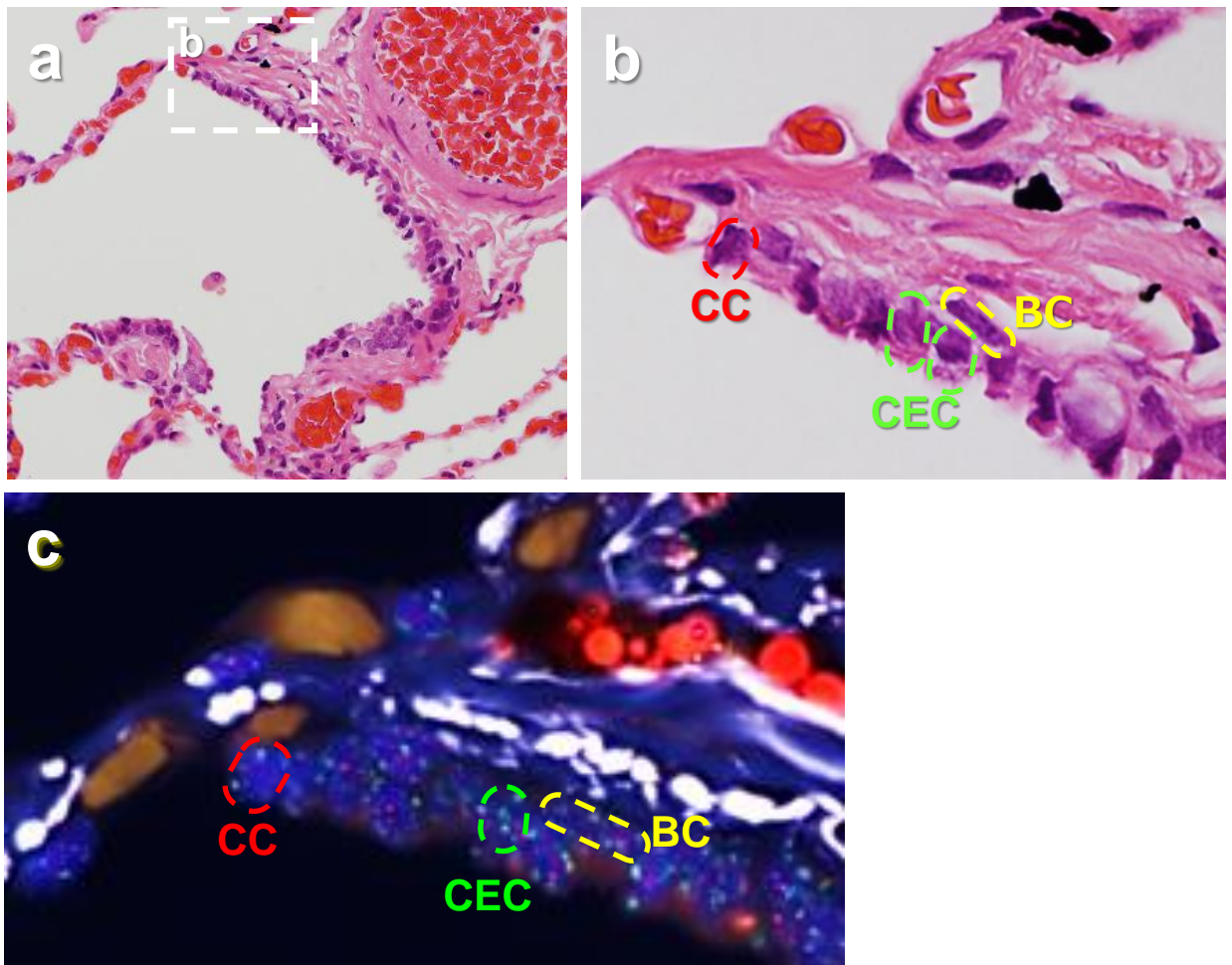


Fig 4. 呼吸細気管支のHematoxylin and eosin (HE) 染色の組織像とQuantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) の蛍光顕微鏡像。Tissue microarray (TMA) 標本上の呼吸細気管支のHE染色像。低倍率 (a): 弱拡大、(b): (a) 内に示した破線枠内の強拡大、(c): (b) の部位におけるQ-FISHの蛍光顕微鏡画像、強拡大。Q-FISH切片の蛍光顕微鏡写真を撮影し、専用の解析ソフト Tissue Teloでこの画像を展開した。TMAのHE染色標本を参考に呼吸細気管支上のCC、CEC、BCを同定し、細胞ごと核を縁取るようにマーキングして、マーキングされた個々の細胞で蛍光光度を解析した。核はDAPIにより青色を呈し、赤色のシグナルがCy3で検出されたテロメア、緑色のシグナルがFITCで検出されたセントロメアである。

CC: クララ細胞; CEC: 線毛上皮細胞; BC: 基底細胞

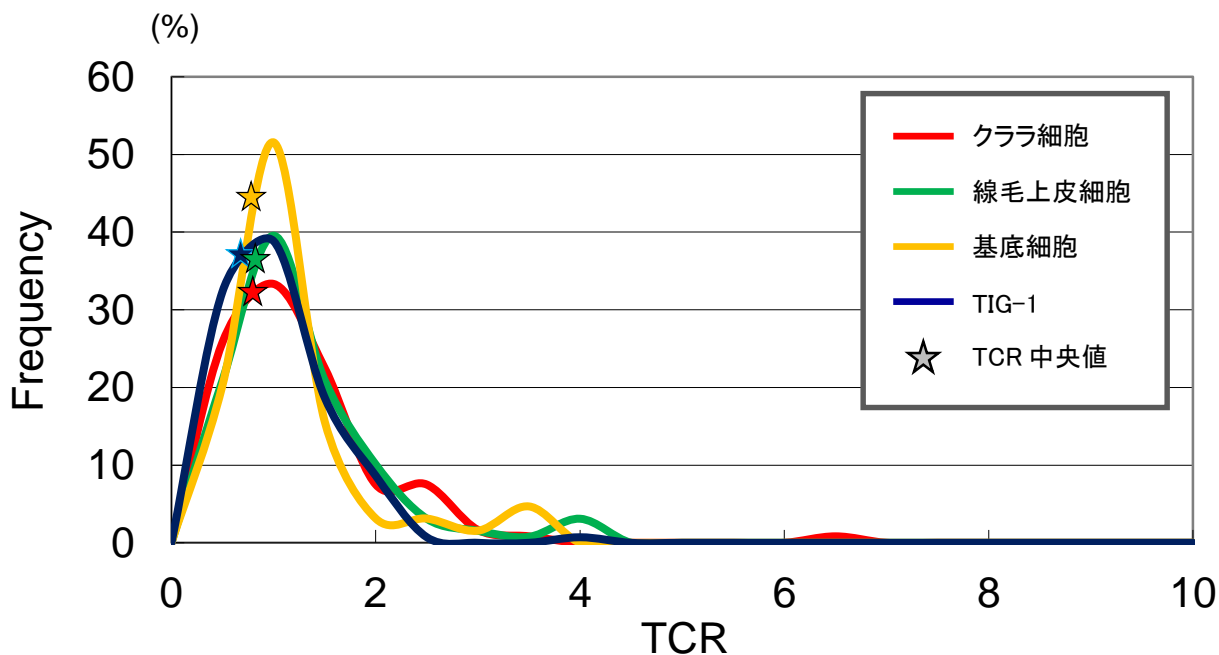


Fig 5. 細胞種ごとに集計した細胞個々のTelomere-centromere ratio (TCR)の分布図とNTCRの決定。各症例で個々の細胞のTCRを細胞種ごとに集計し、TCRの中央値をそれぞれ細胞種のTCRとした。同一切片上でQ-FISHを行ったコントロール群(TIG-1培養細胞株)のTCR(中央値)を同様に算出し、症例ごと、細胞種のTCRをコントロール群のTCRで除して標準化し、Normalized telomere-centromere ratio (NTCR) を決定した。本Q-FISH法では、NTCRをテロメア長として扱った。

赤線, クララ細胞 (解析細胞数: 120); 緑線, 線毛上皮細胞 (129); 黄線, 基底細胞 (64); 青線, TIG-1 (139)。

Table 1. AAH解析症例の臨床病理学的特徴

| | | n (%) |
|--------|--------------|------------|
| 症例数 | | 26 |
| 年齢(歳) | 中央値[範囲] | 65 [46-79] |
| 喫煙歴 | 非喫煙者 | 10 (38) |
| | 喫煙者 | 16 (62) |
| 性別 | 男性 | 15 (58) |
| | 女性 | 11 (42) |
| 肺腺癌組織型 | 混合型肺腺癌 | 26 (100) |
| 背景AAH | 単発症例 | 9 (35) |
| | 多発症例 (2~18個) | 17 (65) |
| 解析病変数 | 腺癌 | 19病変 |
| | AAH | 90病変 |
| | (1症例当たり | 3.5病変) |

AAH, Atypical adenomatous hyperplasia

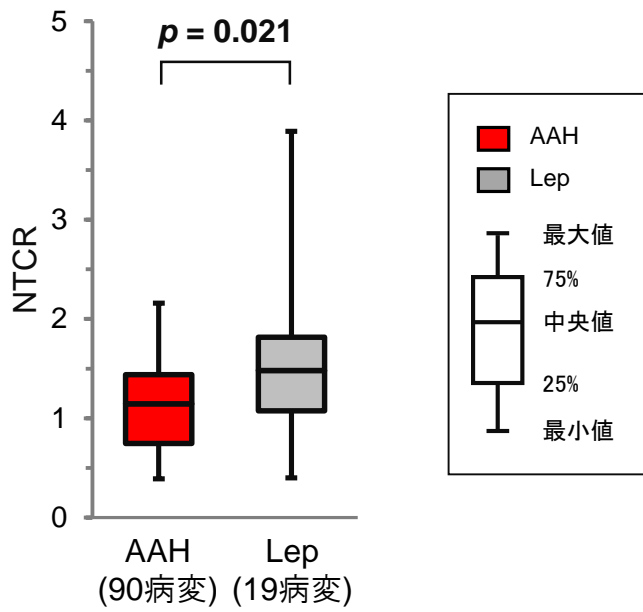


Fig 6. AAHとLepとのテロメア長の比較。テロメア長の中央値は1.15と1.48で、有意にLepのテロメアが長かった ($p = 0.021$)。

AAH, Atypical adenomatous hyperplasia; Lep, lepidic pattern; NTCR, normalized telomere-centromere ratio。

Table 2. 肺腺癌のAdenoma-carcinoma sequenceと発生母地における各細胞種群の臨床的特徴

| 細胞種群 | 対照群 | 発生母地群 | AAH群 | Lep群 | <i>p</i> |
|-----------|---------------|---------------|---------|-----------------|----------|
| 解析細胞 | Met背景肺の CC | ADC背景肺の CC | AAH | 上皮内腺癌 成分の癌細胞 | |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | |
| 症例数 | 14 | 31 | 26 | 19 | |
| 年齢(歳) 中央値 | 65 | 65 | 65 | 64 | 0.90 |
| [範囲] | [46-76] | [50-77] | [46-79] | [51-79] | |
| 喫煙歴 | | | | | |
| 非喫煙者 | 8 (57) | 20 (65) | 10 (38) | 7 (36) | 0.13 |
| 喫煙者 | 6 (43) | 10 (35) | 16 (62) | 12 (63) | |
| 性別 | | | | | |
| 男性 | 8 (57) | 10 (32) | 15 (58) | 12 (63) | 0.10 |
| 女性 | 6 (43) | 21 (68) | 11 (42) | 7 (36) | |

AAH, Atypical adenomatous hyperplasia; Lep, Lepidic pattern; CC, Clara cell

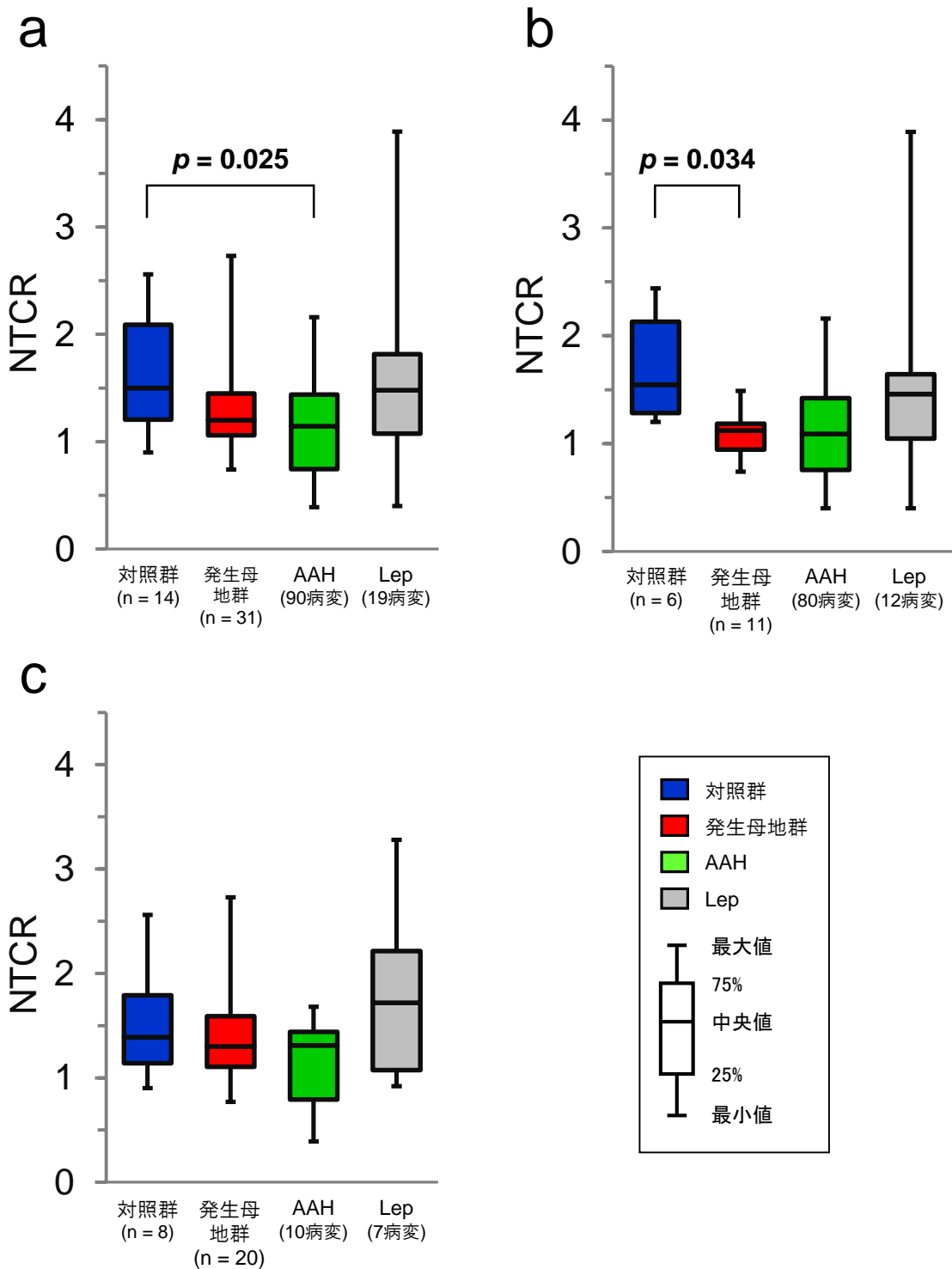


Fig 7. 4細胞種間におけるテロメア長の多群間比較。Met症例のCC(対照群)、ADC症例のCC(発生母地群)、AAH、Lepの4細胞種間でテロメア長を多群間比較した。全症例での検討(a)では、AAHのテロメア長が対照群と比べ有意に短縮していた($p = 0.025$)。喫煙者群と非喫煙者群に層別化すると、喫煙者群 (b)では発生母地群のテロメア長は対照群と比べ有意に短縮していた($p = 0.034$)。一方、非喫煙者群 (c) ではこれら4細胞種間に差はみられなかった。

Met, 転移性肺腫瘍; CC, クララ細胞; ADC, 肺腺癌

AAH, Atypical adenomatous hyperplasia; Lep, lepidic pattern

Table 3. 喫煙の有無における解析症例の臨床組織学的特徴

| | | 全症例 n=45 (%) | 非喫煙者群 n=28 (%) | 喫煙者群 n=17 (%) | p値 |
|-------|--------|-----------------|-------------------|------------------|---------------|
| 年齢(歳) | 中央値 | 65 | 65.5 | 61 | 0.020 |
| | 範囲 | 46-77 | 55-76 | 46-77 | |
| 性別 | 男性 | 18 (40) | 7 (25) | 11 (65) | 0.0084 |
| | 女性 | 27 (60) | 21 (75) | 6 (35) | |
| 肺腫瘍 | 肺腺癌 | 31 (69) | 20 (71) | 11 (65) | 0.64 |
| | 転移性肺腫瘍 | 14 (31) | 8 (29) | 6 (35) | |

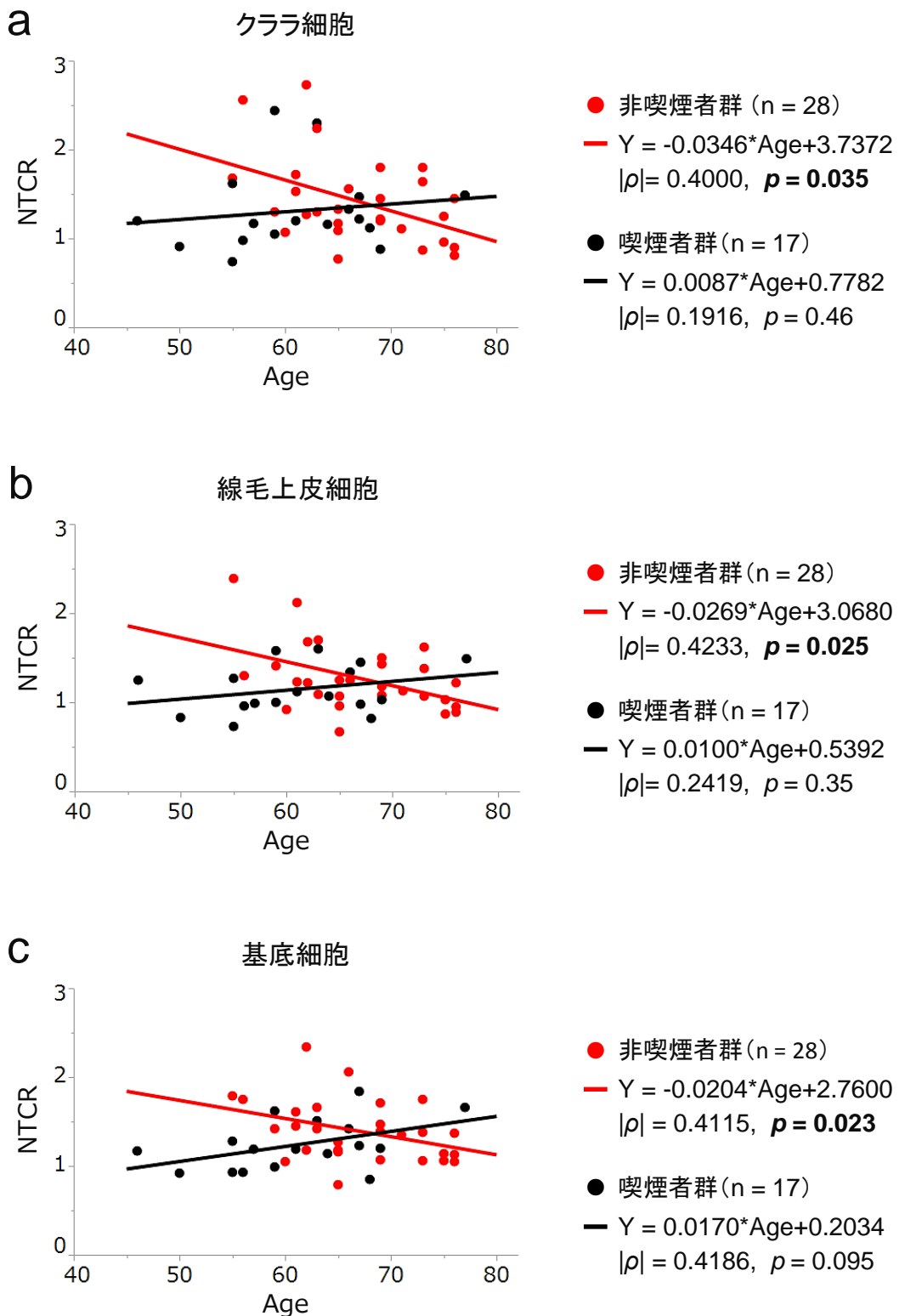


Fig 8. 喫煙の有無で層別化したテロメア長と年齢との相関関係についての散布図と回帰直線。解析したクララ細胞 (a)、線毛上皮細胞 (b) および基底細胞 (c) では、いずれの細胞種においても非喫煙者群でテロメア長 (NTCR) と年齢との間に負の相関関係が認められた。一方、喫煙者群ではいずれの細胞種においてもテロメア長と年齢に相関関係はみられなかった。相関係数 ρ および p 値は Spearman の順位相関係数で算出した。

NTCR, Normalized telomere-centromere ratio.

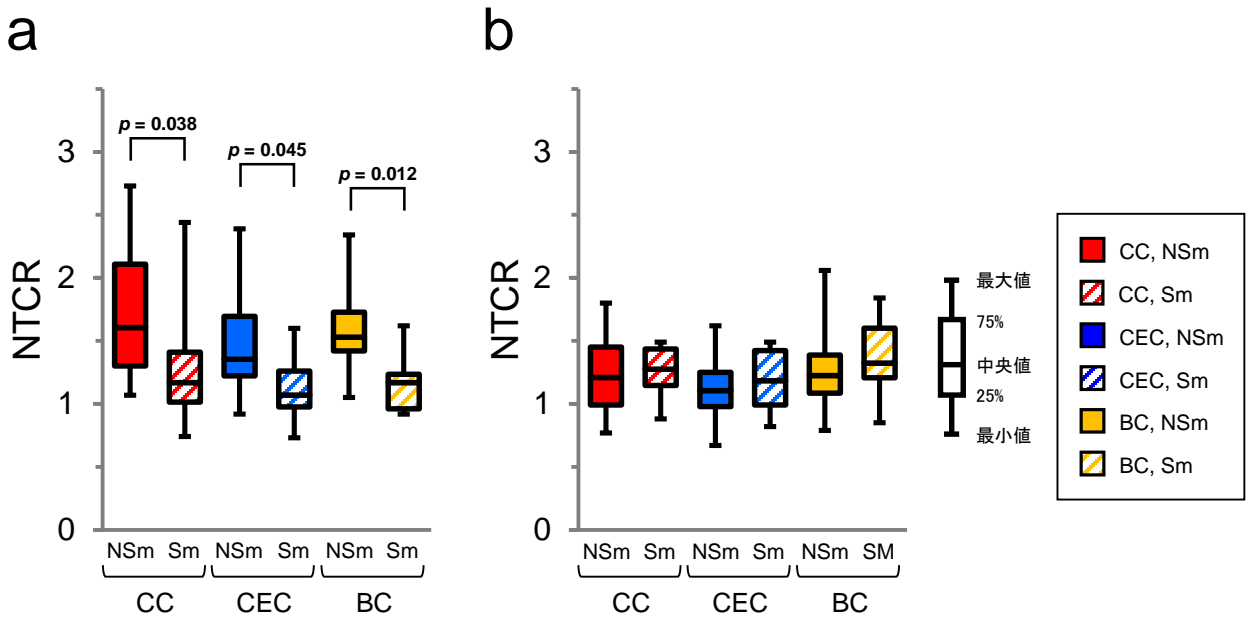


Fig 9. 若年者(65歳未満)群と高齢者(65歳以上)群で層別化した背景肺の各細胞種における、喫煙者群と非喫煙者群によるテロメア長の比較。若年者群 (a) では、どの細胞種においても喫煙者群(Sm, n = 11)のテロメア長が非喫煙者群(NSm, n = 10) に比べ有意に短縮していた(CC: $p = 0.038$; CEC: $p = 0.045$; BC: $p = 0.012$)。一方、高齢者群 (b) ではいずれの細胞種においても、喫煙者群(n = 6)と非喫煙者群 (n = 18)との間でテロメア長に有意差は見られなかった。

NTCR, Normalized telomere-centromere ratio;

CC, クララ細胞; CEC, 線毛上皮細胞; BC, 基底細胞; NSm, 非喫煙者群; Sm, 喫煙者群。

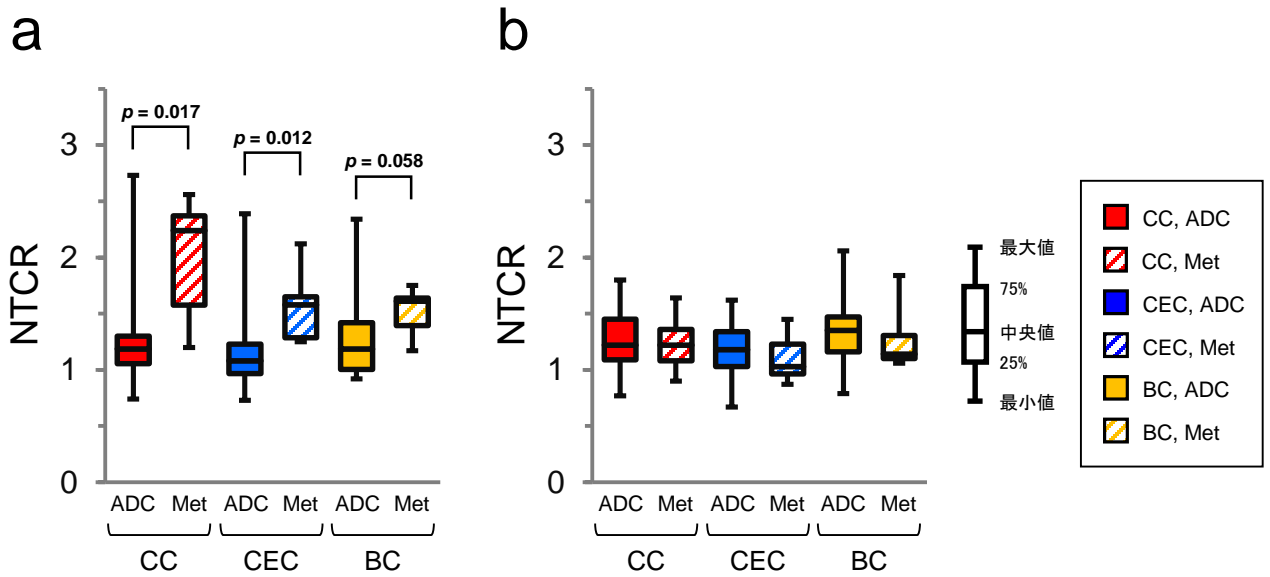


Fig 10. 若年者(65歳未満)群と高齢者(65歳以上)群で層別化した、背景肺の各細胞種における肺腺癌症例と転移性肺腫瘍症例によるテロメア長の比較。若年者群 (a) では、CC およびCECにおいても肺腺癌症例(ADC, n = 14)のテロメア長が転移性肺腫瘍症例(Met, n = 7) に比べ有意に短縮していた(CC: $p = 0.017$; CEC: $p = 0.012$)。しかし、BCにおいては両群間に有意差はみられなかった(BC: $p = 0.058$)。一方、高齢者群 (b) ではいずれの細胞種においても、ADC症例(n = 17)とMet症例(n = 7)との間でテロメア長に有意差は見られなかった。

NTCR, Normalized telomere-centromere ratio;

CC, クララ細胞; CEC, 線毛上皮細胞; BC, 基底細胞; ADC, 肺腺癌; Met, 転移性肺腫瘍。

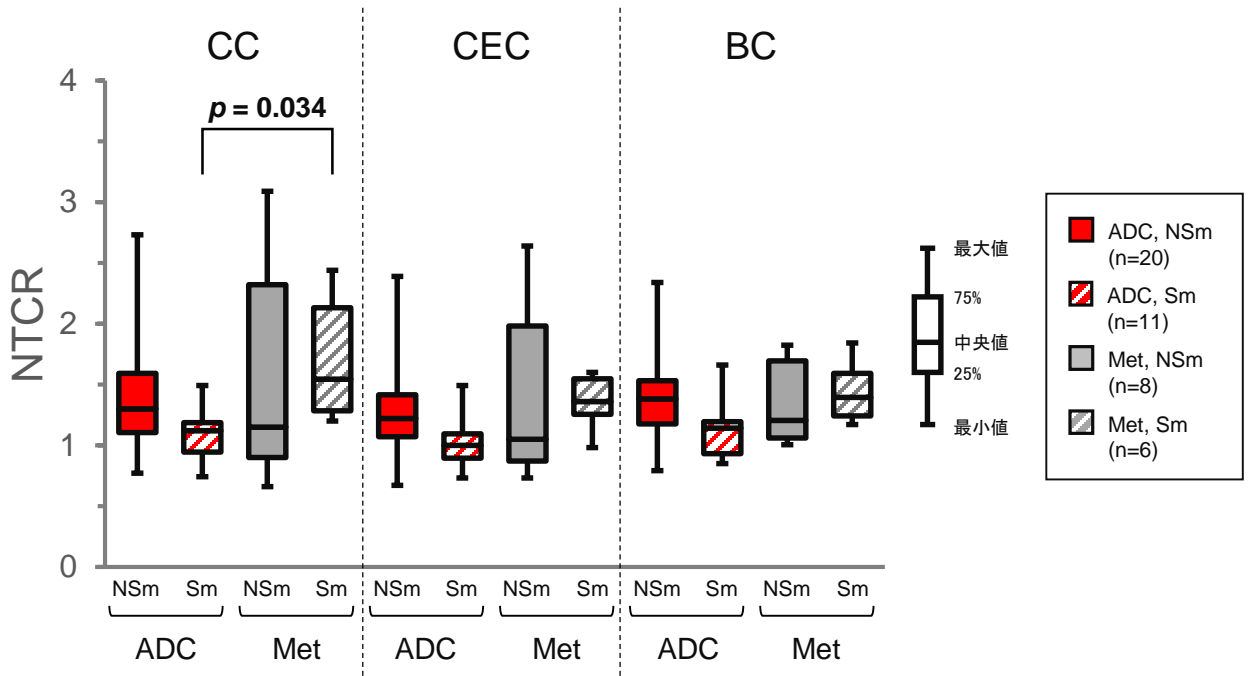
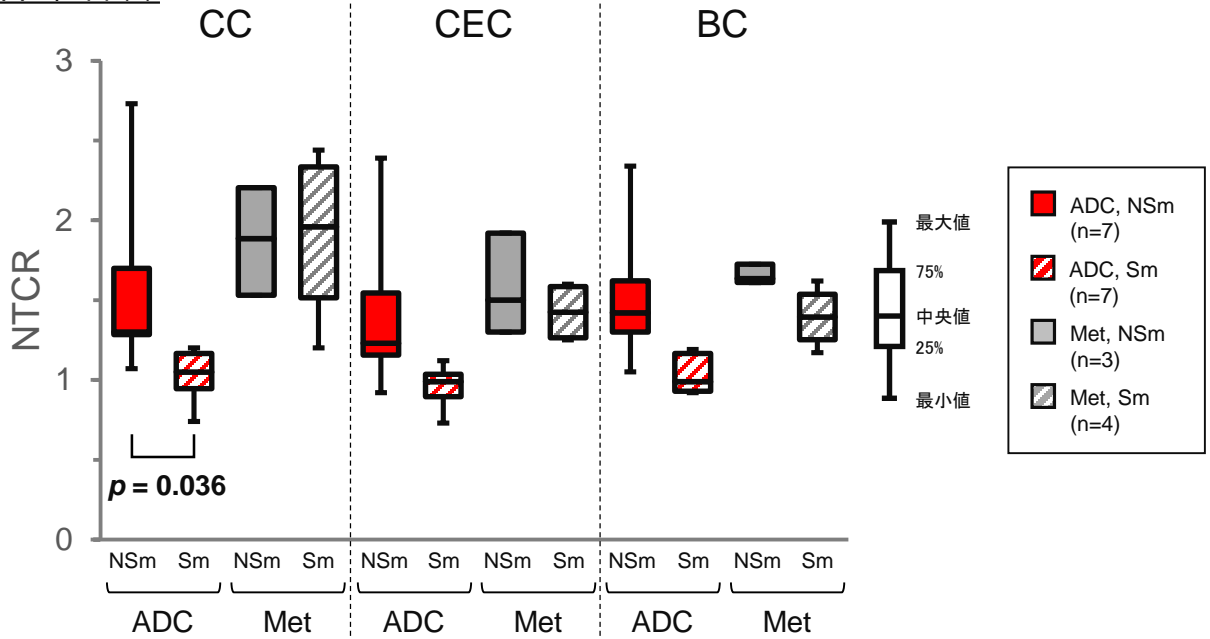


Fig 11. 背景肺の各細胞種において肺腺癌症例と転移性肺腫瘍症例をそれぞれ喫煙者群と非喫煙者群に細分化した4群間でのテロメア長における多重比較分析。CCにおいてADC症例・喫煙者群はMet症例・非喫煙者群と比べテロメア長が有意に短縮していた($p = 0.034$)。一方、CECおよびBCでは有意差はみられなかった。

ADC, 肺腺癌; Met, 転移性肺腫瘍; CC, クララ細胞; CEC, 線毛上皮細胞; BC, 基底細胞; NSm, 非喫煙者群; Sm, 喫煙者群。

若年者群



高齢者群

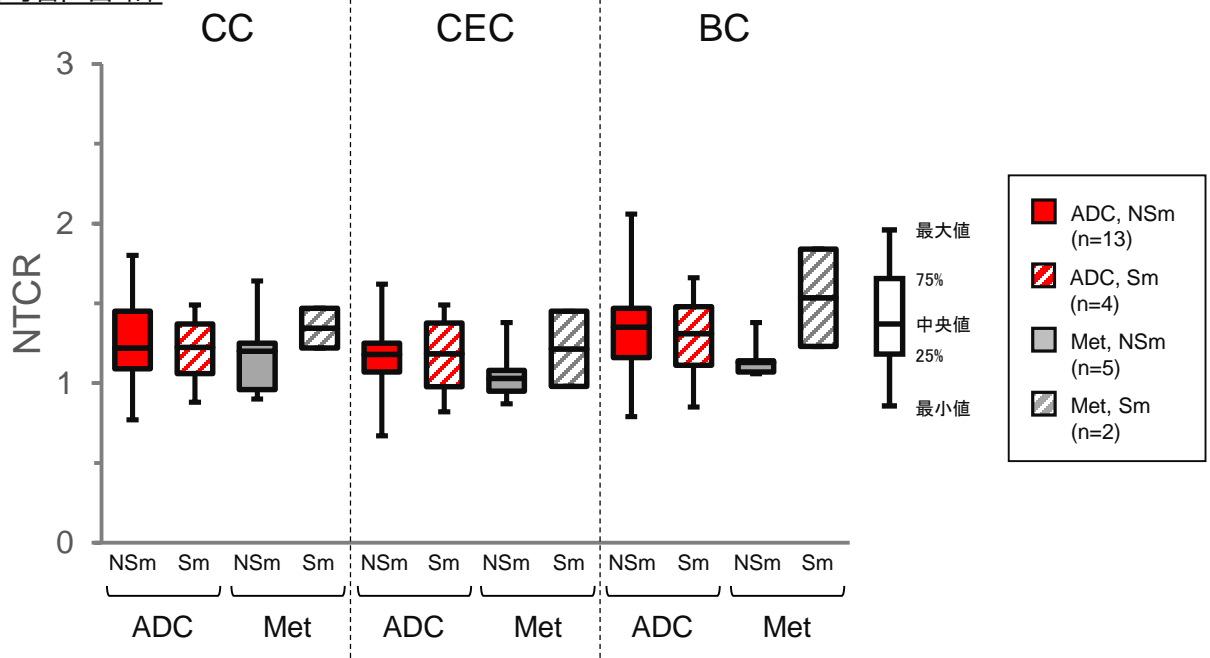


Fig 12. 若年者群 (65歳未満) および高齢者群 (65歳以上)に層別化し、背景肺の3細胞種において肺腺癌症例と転移性肺腫瘍症例を喫煙者群と非喫煙者群にそれぞれ細分化した4群間でのテロメア長の多重比較分析。若年者群では、CCにおいてADC症例・喫煙者群は同・非喫煙者群と比べてテロメア長が有意に短縮していた($p = 0.036$)。一方、CECおよびBCでは有意差はみられなかった。高齢者群では、いずれの細胞種においても、これら4群間の中にテロメア長の違いはみられなかった。

ADC, 肺腺癌; Met, 転移性肺腫瘍; CC, クララ細胞; CEC, 線毛上皮細胞; BC, 基底細胞; NSm, 非喫煙者群; Sm, 喫煙者群。