

ヒト口腔癌におけるテロメラーゼ活性とテロメラーゼ 構成成分の発現に関する研究

道 面 仁 子

Studies on Telomerase Activity and Expression of Telomerase Components in Human Oral Cancers

Tamiko Domen

(平成11年1月21日受付)

緒 言

癌の治療成績は、画像診断法や治療法の改善により、近年著しく向上している。しかし、同一の病理組織学的診断名であっても、個々の症例で悪性度が異なったり、また前癌病変の中でも一部の症例のみが癌化するなどの諸問題があり、症例毎の悪性度を的確に推定することは、現在でもなお困難である。上記の問題を解決するために、腫瘍の予後推定に関する各種の因子の検索や p53 などの腫瘍マーカーとの関連を追求する研究が数多くなされ、現在ではこれらを診断に応用する試みがなされている。また、このような観点に加えて、多くの癌細胞に生じる細胞の不死化に関与するテロメラーゼに着目し、その現象分析から発癌機序の解析を行うと同時に、癌診断における同酵素活性の測定意義と有用性について多くの報告がなされている。

Tahara ら¹⁾ は、肝細胞癌組織におけるテロメラーゼ活性を測定し、癌部で79%、また非癌部では0%の発現結果から、癌部にはテロメラーゼ活性が特異的に認められること、また、ごく初期の高分化型肝細胞癌であっても活性の陽性率が高いことを報告している。Kuniyasu ら²⁾ は腸上皮化生26例中9例(35%)にテロメラーゼ活性が認められ、同病変の癌化が進行するに伴い、その陽性率が高くなることを報告している。

Hiyama ら³⁾ は、腭液中のテロメラーゼ活性を測定して、腭癌例の87%に活性を認めたが、腭の良性疾患では活性が認められなかったことから、腭液での同活性の測定は腭癌の補助診断法として有用であると述べている。一方、Takubo ら⁴⁾ は、進行性食道癌にはテロメラーゼの陰性例が存在したことから、テロメラーゼ活性の有無と癌の進展度には関連はないと報告している。

さらに近年、テロメラーゼ構成成分の遺伝子 {human Telomerase RNA (hTR)⁵⁾, Telomerase associated Protein 1 (TP1)^{6,7)}, human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)^{8,9)}} が相次いでクローニングされ、これらの発現とテロメラーゼ活性との相関性が検討されている。しかし、hTR と TP1 は、有限寿命細胞でも活性をもたない例でも発現することから、テロメラーゼ活性との相関性は否定されつつある^{10,11)}。hTERT は、テロメラーゼ活性を有する不死化細胞にのみ発現する^{8,12)} という報告があるが、不死化していない正常組織でも hTERT 発現が認められたとの報告もある¹³⁾。以上のごとく、テロメラーゼ構成成分の発現意義については、未だ十分な解明がなされておらず、癌診断における有用性も確定的ではない。

そこで本研究では、口腔癌組織・細胞におけるテロメラーゼ活性を測定するとともに、テロメラーゼ構成成分の発現についても検索し、これらの発現が口腔癌の診断に有用であるか否かを検討した。

材料ならびに方法

1. 検索材料

in vitro の実験材料には、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 由来細胞株として、Japanese Cancer Research Resources

広島大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任: 石川武憲教授) 本論文の要旨は、第33回日本口腔組織培養研究会 (平成8年12月, 大阪市), 第52回日本口腔科学会総会 (平成10年4月, 松山市), 第35回日本口腔組織培養研究会 (平成10年11月, 郡山市) において発表した。

Bank (JCRB) より分与されたKB¹⁴⁾, HO-1-u-1¹⁵⁾, HO-1-N-1¹⁶⁾, Ca9-22¹⁷⁾, HSC-2, HSC-3¹⁸⁾, HSC-4¹⁹⁾ と、Bristol 大学 Prime 博士から供与された H357, H376²⁰⁾ に加えて、当科で樹立した細胞株 TAC, KON²¹⁾, OS-F²²⁾ を用いた。また、唾液腺腫瘍細胞株としては、徳島大学歯学部口腔外科学第二講座の佐藤教授より供与された腺癌株 2 株 (HSG²³⁾ と HSY²⁴⁾ に加えて、当科で樹立した腺様嚢胞癌由来株 KSA²⁵⁾ を用いた。*in vivo* の実験では、本学歯学部附属病院で外科的に切除された OSCC 17 例、上皮異形成症 5 例、口腔扁平苔癬 2 例に加えて、多形性腺腫 5 例、粘表皮癌 4 例、腺様嚢胞癌 2 例、悪性筋上皮腫 1 例の組織を使用し、対照として正常歯肉 3 例と非腫瘍性顎下腺組織 5 例を用いた。被験組織の一部は、4%パラホルムアルデヒドで固定後、HE 標本作製し、組織像を確認した。

2. 細胞培養法

OSCC 由来細胞株の培養には、牛胎児血清 (Boehringer Mannheim, Germany) を 10% 含有するように調整したダルベッコ変法イーグル培地 (日本製薬, 以下 DMEM) を用い、他の細胞株の培養には RPMI 1640 (日本製薬) と DMEM を等量混和した RD 培地に牛胎児血清 (Boehringer Mannheim) を 10% 含有させた培養液を用いた。DMEM 培地にはペニシリン (明治製薬) 100 U/ml, ストレプトマイシン (明治製薬) 1 mg/ml, 硫酸カナマイシン (Sigma, USA) 0.1 mg/ml を、RD 培地にはビクシリン (明治製薬) 90 µg/ml, 硫酸カナマイシン (Sigma) 90 µg/ml, ピルビン酸 (Sigma) 110 µg/ml, ヘペス (同仁化学) 15 mM を添加し、37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で各種細胞を静置培養した。

3. テロメラーゼ活性の測定法

テロメラーゼ活性の測定には、Shay らの開発した TRAP 法²⁶⁾ を用いた。

1) テロメラーゼの抽出法

100 µl の溶解バッファー (10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5), 1 mM 塩化マグネシウム, 1 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸, 0.1 mM AEBSF, 5 mM 2-メルカプトエタノール, 0.5% CHAPS, 10% グリセロール, 4 mM DTT, 0.5U RNase inhibitor) 中でホモジェナイズした培養細胞や組織を氷中に 30 分放置後、4°C で 15,000 rpm, 20 分遠沈し、上清を回収した。次に、CBB color solution (ナカライテスク) を用いて、上清中の蛋白を定量した。

2) TRAP-PCR 法

抽出したテロメラーゼ 0.1 µg に、TRAP 反応液 (20

mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3), 1.5 mM 塩化マグネシウム, 68 mM 塩化カリウム, 1 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸, 0.05% ツウィーン 20, 50 µM dNTPs, 5attog ITAS²⁷⁾, 344 nM TS primer (5'-AATCCGTCGAG CAGAGTT-3'), 2U DNA Polymerase (Perkin-Elmer, USA) を加え、ミニサイクラー (MJ Research, USA) 上で 20°C 30 分インキュベートし、テロメア DNA の延長反応を行った。続いて 93°C で 3 分間インキュベート後、CX primer (5'-CCCTTACCCTTACCCTTTACCCTTA-3') を 2 µl 加え、ミニサイクラー上で 94°C 45 秒, 50°C 45 秒, 72°C 60 秒を 1 サイクルとし、27 サイクルの反応を行い反応産物を増幅させた。

3) テロメラーゼ産物の検出法

反応産物 8 µl を 12.5% 非変性ポリアクリルアミドゲル上に展開し、展開後のゲルを TBE (44.5 mM トリス, 44.5 mM 硼酸, 5 mM EDTA) で希釈したサイバグリーン (FMC Bioproducts, USA) に 30 分間浸漬して染色後、テロメラーゼ産物を検出した。

4. テロメラーゼ構成成分の検索法

テロメラーゼ構成成分のうち、hTERT と TP1 の発現検索では、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて被験材料から抽出した total RNA 1 µg を鑄型として、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia-LKB, Sweden) を用いて cDNA を合成した。次いで、合成した cDNA 溶液 (3 µl) に hTERT-p1 (5'-CGGAA GAGTGTCTGGAGCAA-3') と hTERT-p2 (5'-GGATG AAGCGGAGTCTGGA-3') primer, または TP1-p1 (5'-TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG-3') と TP1-p2 (5'-CCCAGTGAATCTTCTACGC-3') primer を加えミニサイクラーで PCR 反応を行った。反応産物の 10 µl を 4% アガロースゲルに展開した後、オートラジオグラフィにより検出した。なお、PCR の条件は Nakamura ら²⁸⁾ の方法に準じた。

結 果

1. テロメラーゼ活性

OSCC 由来細胞株と唾液腺腫瘍細胞株でテロメラーゼ活性を測定した結果、全例にその活性が検出された (図 1)。

OSCC 組織では、17 例中、症例 4 と 35 を除く 15 例にテロメラーゼ活性が検出された (図 2, 表 1)。また、上皮異形成症 5 例と口腔扁平苔癬 2 例の全例にテロメラーゼ活性が検出された。対照とした正常歯肉には、テロメラーゼは発現しなかった (図 3, 表 2)。

多形性腺腫 6 例のいずれにもテロメラーゼ活性は認められなかった。対照とした唾液腺組織では、6 例中

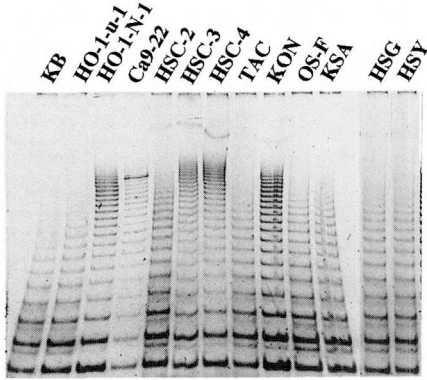


図1 各種口腔癌由来細胞株におけるテロメラーゼ活性 (PCR-TRAP 法).
培養細胞株の全例にテロメラーゼ活性が検出された。

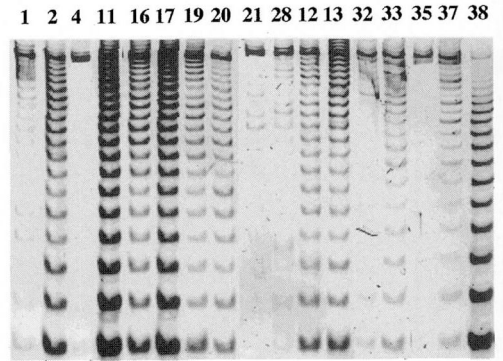


図2 OSCC 組織におけるテロメラーゼ活性 (PCR-TRAP 法).
症例4と35を除く OSCC 組織全例に活性が検出された。

表1 OSCC におけるテロメラーゼ活性と hTERT と TP1 の発現

症例	年齢	性別	部位	組織型 ^{a)}	TNM (期) ^{a)}	テロメラーゼ ^{b)} 活性	hTERT ^{b)}	TP1 ^{b)}
1	87	F	舌	中分化	T ₂ N ₀ M ₀ (II)	+	+	+
2	57	F	頬粘膜	高分化	T ₄ N ₁ M ₀ (IV)	+	-	-
4	56	F	舌	高分化	T ₂ N ₀ M ₀ (II)	-	-	+
11	81	F	口底	高分化	T ₄ N ₀ M ₀ (IV)	+	+	+
16	63	M	舌	高分化	T ₃ N ₁ M ₀ (III)	+	+	+
17	60	M	口底	高分化	T ₃ N ₀ M _x (III)	+	+	+
19	75	M	歯肉	高分化	T ₂ N ₁ M ₀ (III)	+	-	+
20	79	M	舌	高分化	T ₁ N ₀ M _x (I)	+	+	+
21	57	M	歯肉	高分化	T ₄ N ₂ M ₀ (IV)	+	+	+
28	45	F	舌	低分化	T ₄ N ₂ M ₀ (IV)	+	-	-
12	68	M	舌	高分化	T ₂ N ₀ M ₀ (II)	+	-	-
13	91	F	歯肉	高分化	T ₁ N ₀ M ₀ (I)	+	-	-
32	68	M	歯肉	高分化	T ₃ N ₀ M _x (III)	+	-	+
33	90	F	歯肉	高分化	T ₄ N ₁ M ₀ (IV)	+	n.d.	n.d.
35	63	F	頬粘膜	高分化	T ₃ N ₀ M ₀ (III)	-	+	-
37	73	M	舌	高分化	T ₂ N ₀ M ₀ (II)	+	+	+
38	62	F	舌	高分化	T ₁ N ₀ M ₀ (I)	+	-	+

a) 日本頭頸部腫瘍学会 (1991) の取り扱い規約。
高分化；高分化型 SCC，中分化；中分化型 SCC，低分化；低分化型 SCC
b) +；陽性，-；陰性，n.d.；検索不能

1例にテロメラーゼ活性が認められた (図4, 表3)。悪性唾液腺腫瘍では、粘表皮癌5例、腺房細胞癌2例、悪性筋上皮腫1例の全例にテロメラーゼ活性が検出された (図5, 表3)。

2. 検索組織の病理組織像

今回検索した OSCC 組織は、高分化型15例，中分化

型1例，低分化型1例であった。また、炎症細胞浸潤の程度が強かった例は11例，弱かった例は6例であった (図6)。上皮異形成症，口腔扁平苔癬，正常歯肉の全例に、程度差はあったが、炎症細胞浸潤が認められた (図7)。テロメラーゼ活性を示した症例56の唾液腺では、組織学的に導管構造は維持されていたが、放射線治療の結果、腺房細胞は殆ど消失していた。また、

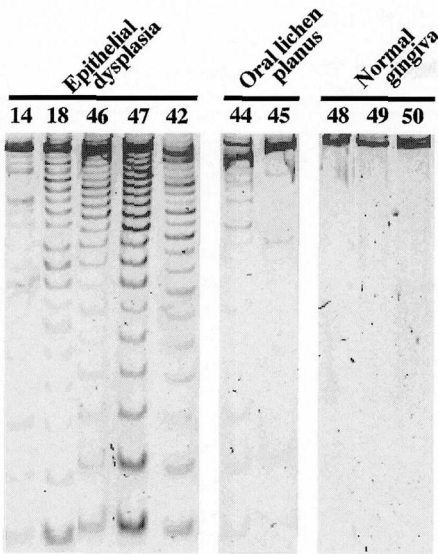


図3 上皮異形成症, 口腔扁平苔癬, 正常歯肉組織におけるテロメラーゼ活性 (PCR-TRAP 法).
 上皮異形成症と口腔扁平苔癬の全例に活性が検出された.
 正常歯肉には検出されなかった.

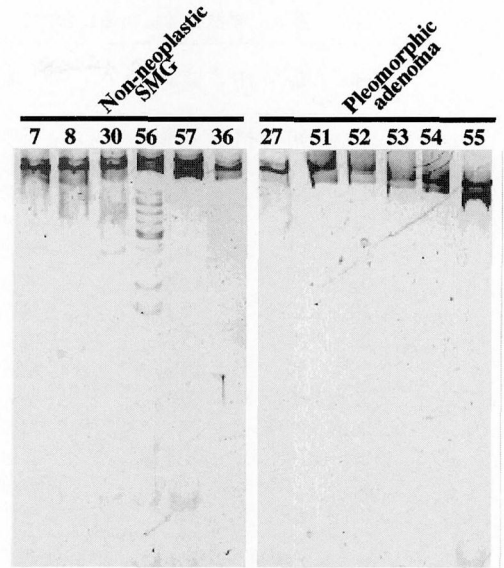


図4 非腫瘍性唾液腺, 多形性腺腫組織におけるテロメラーゼ活性 (PCR-TRAP 法).
 症例56の照射唾液腺組織に活性が検出された.
 多形性腺腫には検出されなかった.

表2 上皮異形成症におけるテロメラーゼ活性と hTERT と TP1 の発現

症例	年齢	性別	組織型 ^{a)}	テロメラーゼ ^{b)} 活性	hTERT ^{b)}	TP1 ^{b)}
14	61	M	中等度	+	+	+
18	84	F	中等度~高度	+	n. d.	n. d.
46	62	F	軽度~中等度	+	n. d.	n. d.
47	42	F	軽度~中等度	+	-	+
42	55	M	高度	+	-	+

a) 日本頭頸部腫瘍学会 (1991) の取り扱い規約。
 b) + ; 陽性, - ; 陰性, n.d. ; 検索不能

同例では広範な炎症細胞浸潤が観察された。今回、検索した多形性腺腫の多くは、腺腔形成を示す上皮成分と硝子様基質を伴う間葉系成分から構成されており、本腫瘍に定型的な間葉様構造を伴った混合像は、検索した5例中1例にしか認められなかった。また、リンパ球浸潤はいずれの例にも軽度であった。粘表皮癌5例のうち、高分化型は3例、低分化型は2例であった。腺房細胞癌では、定型的な漿液腺腺房様細胞よりなる充実性胞巣が観察されていた。悪性筋上皮腫では、腫瘍細胞に異型性を伴い、壊死像を伴っていた。検索したいずれの悪性唾液腺腫瘍例においても、炎症細胞浸潤は殆どみられなかった。

3. テロメラーゼ構成成分の発現

RT-PCR法により、テロメラーゼ構成成分の発現を検索した結果、全細胞株に hTERT mRNA と TP1 mRNA の発現が認められた (図8)。OSCC 組織では、16例中8例に hTERT mRNA が発現したが、12例に TP1 mRNA が発現した (図9, 表1)。hTERT mRNA と TP1 mRNA が共発現したのは8例であった。上皮異形成症3例中1例に hTERT mRNA が発現し、2例に TP1 mRNA が発現した (図10, 表2)。hTERT mRNA と TP1 mRNA が共発現したのは1例であった。検索可能であった口腔扁平苔癬の1例では hTERT mRNA はみられなかったが、TP1 mRNA が発現していた。

一方、唾液腺組織におけるテロメラーゼ構成成分の発現結果 (図11, 表3) は、以下の通りであった。非腫瘍性唾液腺組織と多形性腺腫では hTERT mRNA が発現しなかったのに対し、放射線照射をうけた唾液腺組織2例と多形性腺腫3例には、TP1 mRNA の発現が認められた。粘表皮癌では、4例中3例に hTERT mRNA が認められたが、TP1 mRNA は発現しなかった。腺房細胞癌では hTERT mRNA 発現していなかったが、TP1 mRNA は発現していた。OSCC での結果とは異なり、hTERT mRNA と TP1 mRNA の共発現を示した唾液腺腫瘍例はなかった。

表3 唾液腺腫瘍組織におけるテロメラーゼ活性とhTRTとTP1の発現

症例	年齢	性別	部位	組織型 ^{a)}	テロメラーゼ ^{b)} 活性	hTRT ^{b)}	TP1 ^{b)}
27	60	M	口蓋	多形性腺腫	—	—	+
51	69	F	顎下腺	多形性腺腫	—	—	+
52	52	F	口蓋	多形性腺腫	—	—	+
53	50	F	耳下腺	多形性腺腫	—	—	—
54	51	F	耳下腺	多形性腺腫	—	n.d.	n.d.
55	68	F	口蓋	多形性腺腫	—	n.d.	n.d.
10	52	F	耳下腺	粘表皮癌	+	+	—
22	60	F	口底	粘表皮癌	+	+	—
26	80	M	口底	粘表皮癌	+	+	—
39a	66	M	口底	粘表皮癌	+	—	—
39b			リンパ節転移	粘表皮癌	+	n.d.	n.d.
29	70	F	耳下腺	腺房細胞癌	+	—	+
58	59	F	粘膜	腺房細胞癌	+	n.d.	n.d.
34	79	F	歯肉	悪性筋上皮腫	+	n.d.	n.d.

a) 日本頭頸部腫瘍学会 (1991) の取り扱い規約。

b) +; 陽性, —; 陰性, n.d.; 検索不能

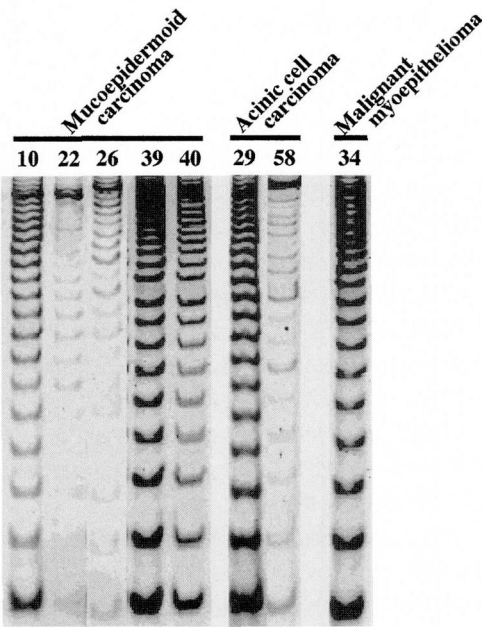


図5 悪性唾液腺腫瘍組織におけるテロメラーゼ活性 (PCR-TRAP法)。

悪性唾液腺腫瘍の全例に活性が検出された。

考 察

テロメラーゼ活性は、胃癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌など種々の癌で検出され²⁹⁻³¹⁾、80%以上の腫瘍例でテロメラーゼが陽性であったと報告されている。リンパ球が多数混在する検体では偽陽性となる可能性もあ

り^{32,33)}、判定には十分な注意が必要である。今回検索したOSCCの組織では、テロメラーゼ活性の陽性率は88%であり、OSCCについての他の報告と同程度の陽性率を示した。テロメラーゼ活性を示さなかったのは、症例4と35の2例(12%)だけであった。症例4は腫瘍細胞の多くが壊死状態にあり、また症例35は含有腫瘍細胞数が極めて少ない例であったことを考慮する必要がある。データには示さないがテロメラーゼ陽性例のバンド数とHE標本での腫瘍細胞数や細胞の活性の程度は、多くの例で相関傾向を示していた。したがって、症例4と35で活性が認められなかったのは、検索した組織中に腫瘍細胞が少なかったためと推察される。

Maoら³⁴⁾は、頭頸部の病変でテロメラーゼ活性を測定した結果、上皮異形成症および過形成病変で100%の陽性率を認めたが、過角化症の例と正常粘膜では陰性であったと報告している。また、Mutiranguraら³⁵⁾は、口腔の白板症と紅板症の26症例でテロメラーゼ活性を測定した結果、38%の陽性率を得ている。この結果から、彼らは、発癌の初期段階にテロメラーゼの再活性化が関与すると結論づけている。しかし一方で、リンパ球に由来した活性が関与した可能性も考慮している。

今回検索した上皮異形成症と口腔扁平苔癬では、全例にテロメラーゼ活性を認めたが、標本内にリンパ球浸潤の随伴も認められたため、検出されたテロメラーゼ活性が上皮細胞に由来したのか否かを特定できなかった。しかし、リンパ球浸潤を伴う原発巣周囲の非癌部や、正常歯肉には活性が検出されなかったことか

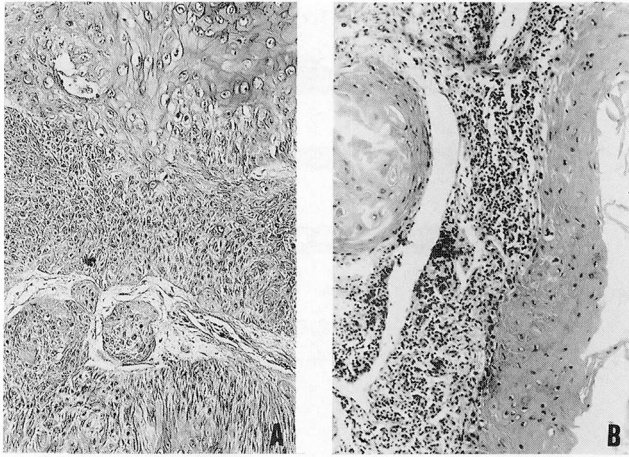


図6 OSCC組織の組織像。
 A：炎症細胞浸潤の少ない中分化型 OSCC。(HE, ×130)
 B：高度の炎症細胞浸潤を伴った高分化型 OSCC。(HE, ×130)

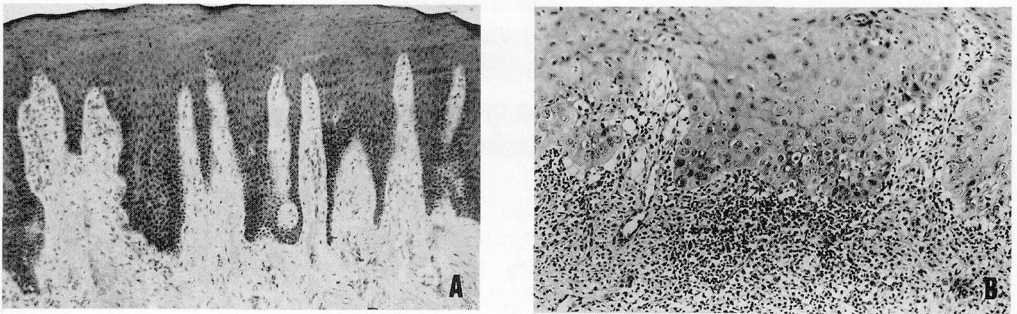


図7 正常歯肉と上皮異形成症の組織像。
 A：軽度の炎症細胞浸潤を伴った正常歯肉。(HE, ×130)
 B：高度の炎症細胞浸潤を伴った上皮異形成症。(HE, ×130)

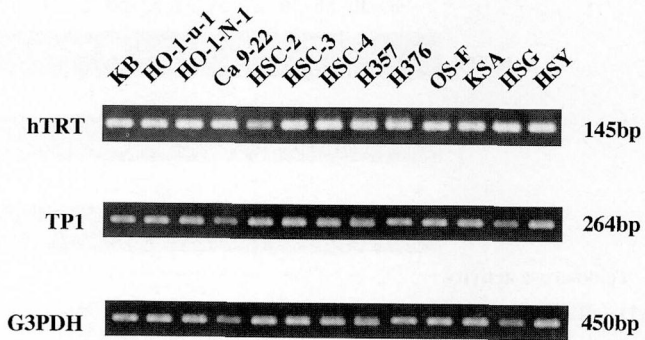


図8 各種口腔癌由来細胞株におけるテロメラーゼ構成成分の mRNA 発現 (RT-PCR 法)。
 口腔癌由来培養細胞株の全例に hTRT と TP1 の発現が認められた。最下段はテロメラーゼ活性を示す。

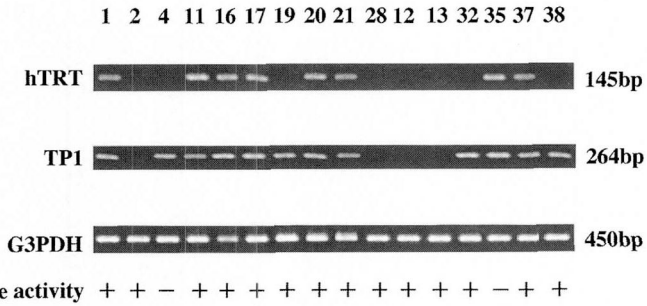


図9 OSCC組織におけるテロメラーゼ構成成分の mRNA 発現 (RT-PCR 法).
145 bp と 264 bp に検出された増幅産物. 最下段はテロメラーゼ活性を示す.

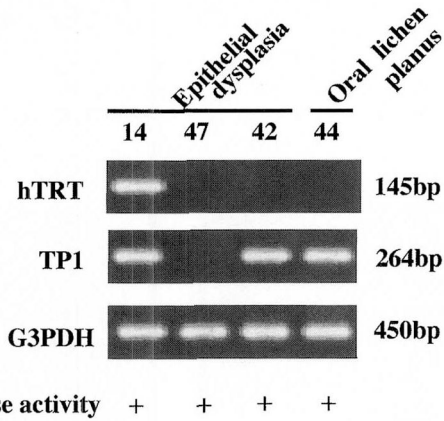


図10 上皮異形成症, 口腔扁平苔癬におけるテロメラーゼ構成成分の mRNA 発現 (RT-PCR 法).
145 bp と 264 bp に検出された増幅産物. 最下段はテロメラーゼ活性を示す.

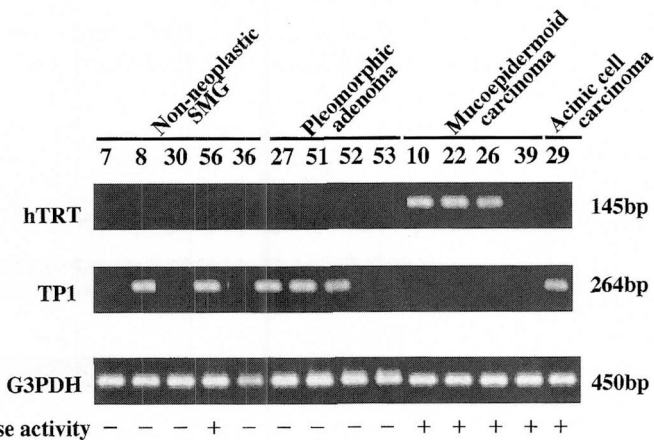


図11 唾液腺組織におけるテロメラーゼ構成成分の mRNA 発現 (RT-PCR 法).
145 bp と 264 bp に検出された増幅産物. 最下段はテロメラーゼ活性を示す.

ら推察すると, 本研究で検出されたテロメラーゼ活性の主体は上皮成分に由来したものと考えられる。さらに, 上皮異形成症と口腔扁平苔癬に認められたテロメ

ラーゼ活性が上皮由来である理由として, 口腔の上皮異形成症と扁平苔癬のテロメラーゼ活性を測定した Sumida ら³⁶⁾ の報告で, 上皮異形成症の 7 例中 4 例に

活性が検出されたが、扁平苔癬では2例とも陰性であったことがあげられる。少なくとも一部の上皮異形成症や扁平苔癬病巣の口腔上皮がテロメラーゼ活性を有することは、両病変が前癌病変や前癌状態にあることを裏付けるものと考えられる。いずれにせよ、この問題に結論を下すには、今後 *in situ* TRAP法³⁷⁾ による検討が必須であると思われる。

一方、今回検索した唾液腺腫瘍組織では、炎症細胞浸潤は殆ど観察されず、検出されたテロメラーゼ活性は唾液腺上皮由来であることが示唆された。1972年のWHO分類で良性型もありうるとして癌腫とは別個に粘表皮癌、腺房細胞癌として分類されていた両腫瘍の全例がテロメラーゼ活性を示したことは、1991年の新分類でこれらが癌腫に分類されたことの妥当性を裏付けるものと考えられる。今回の検索では、良性腫瘍として多形性腺腫のみを対象としたが、5例ともテロメラーゼ陰性であった。一方、丸山ら³⁸⁾ は胃の腸上皮化生、腺腫、高分化型腺癌におけるテロメラーゼ活性を測定し、それぞれ12例中2例(15%)、22例中10例(45%)、9例中8例(89%)に活性を認めたと報告している。またSumidaら³⁶⁾ は、検索した4例のエナメル上皮腫の全てでテロメラーゼ活性が検出されたと報告している。胃の腺腫は前癌病変と考えられ、また良性腫瘍であるエナメル上皮腫が、転移や局所の浸潤性増殖を示し、悪性腫瘍に転化することがあることから判断すると、病理組織学的に良性とされる疾患におけるテロメラーゼ活性の発現は、同病変における潜在的な悪性化の可能性を反映しているかもしれない。

照射を受けた唾液腺の症例56が、テロメラーゼ活性を示した理由としては、浸潤リンパ球の活性による可能性と、組織修復時に唾液腺細胞の賦活化が生じて活性を示した可能性があげられる。しかし、同様のリンパ球浸潤を示した他の照射唾液腺例がテロメラーゼ活性を示さなかったことから、症例56における活性が浸潤リンパ球に起因したものでないと推定される。また、本研究で用いたHSG株が照射唾液腺組織から樹立された株細胞であることを考え併せると、照射を受けた組織の細胞は、修復時にはテロメラーゼ活性を有し、時には腫瘍化する可能性があると考えられる。

以上から総合的に判断すると、テロメラーゼ活性の測定は口腔癌の補助診断に極めて有用と考えられる。また、近年では、癌患者の腸管洗浄液³⁹⁾ や尿液⁴⁰⁾ などを対象として測定されたテロメラーゼ活性の診断的意義と有用性が報告されている。口腔領域でも含嗽液中のテロメラーゼ活性が測定され、口腔癌組織での活性との比較検討が行われている。Califanoら⁴¹⁾ は、口腔癌組織での活性が認められた19例中7例(36.8%)

で、Sumidaら³⁶⁾ は15例中4例(27%)で含嗽液にもテロメラーゼ活性が検出されたと報告している。またSumidaら³⁶⁾ は、潰瘍形成を示した例でのみ含嗽液で活性が検出されたと報告している。これらいずれの研究結果においても、含嗽液中の活性陽性率は低かったが、その原因としては、含嗽液中に混在した食物残渣がPCR反応を阻害するなどの技術的問題も含まれている。この問題の解消のためには、食物残渣を可及的に除去する等の対策を講じる必要がある。上記の如くこの方法を改良し、テロメラーゼ測定の信頼度が高まれば、無侵襲的に施行可能であることから、極めて有用性が高い。

診断学的な意味からは、癌組織の分化度や癌の転移、進展度とテロメラーゼ活性との相関性に興味を持たれる。分化度の点では、今回検索したOSCCの殆どが高分化型で、中分化型と低分化型は各1例しかなかったために議論できないが、Sumidaら³⁶⁾ は検索した高分化型10例、中分化型4例、低分化型6例の全ての症例に活性が検出されたと報告している。すなわち原発巣の大きさやWHOのstage分類とテロメラーゼ活性との相関は認められなかった。食道癌を対象とした池口および貝原⁴²⁾ の報告でも、テロメラーゼ陽性例と陰性例の間で腫瘍径に差はみられなかった。しかし、彼らはstage III、IVの進展例に陰性を示す率が高かったと報告している。また彼らは、Ki-67を用いて検索した細胞増殖活性とテロメラーゼ活性との間に相関性はなかったと述べている。本研究でも少数の唾液腺腫瘍例で両者の関連につき検索したが、相関性は認められなかった。

テロメラーゼ活性を示したOSCCの組織で、hTERT mRNAとTP1 mRNAのいずれも発現しなかったものは4例であった。この解釈として、①4例中3例は、組織中での腫瘍細胞数が少なくRT-PCR法でのmRNAの増幅が充分起こらなかった、②テロメラーゼ活性により、テロメアDNAが充分つくられたため、hTERT mRNAとTP1 mRNAによるテロメラーゼ活性の誘導が終了したなどの可能性が考えられる。しかし、②についてはTRF(Terminal restriction fragment)の測定^{43,44)} が必要と思われる。テロメラーゼ陽性OSCC例でのhTERT mRNA発現率は46.6%、TP1 mRNA発現率は53.3%であり、テロメラーゼ活性とテロメラーゼ構成成分の発現との間に相関性は認められなかった。

唾液腺ではテロメラーゼ活性陰性例(多形性腺腫)ではhTERT mRNAは発現しなかった。また、テロメラーゼ陽性を示した多くの粘表皮癌でhTERT mRNAが発現し、その発現とテロメラーゼ活性との間には相関性があると推定される。一方、多形性腺腫の4例中3

例に TP1 mRNA の発現が認められたのに対し、粘表皮癌ではその発現は全く認められず、テロメラーゼ活性と TP1 mRNA との間には、相関性はないと推定される。

結 論

OSCC や唾液腺腫瘍におけるテロメラーゼ活性とテロメラーゼ構成成分の発現を検討し、以下の結果を得た。

(1) 検索した全癌細胞株にテロメラーゼ活性および hTERT mRNA と TP1 mRNA の発現が認められた。

(2) 上皮異形成症と OSCC 組織の 91.7% にテロメラーゼ活性が認められたが、対照とした正常歯肉にその活性は認められなかった。

(3) 唾液腺の多形性腺腫では検索した全 5 例にテロメラーゼ活性が認められなかったのに対して、悪性唾液腺腫瘍の全例に活性が認められた。また、対照とした非腫瘍性唾液腺組織 6 例のうち、照射を受けた 1 例のみ活性が認められた。

(4) テロメラーゼ陽性を示した上皮異形成症と OSCC 組織では、hTERT mRNA は 8/18 (44%)、TP1 mRNA は 11/18 (61%) の症例に認められ、TP1 mRNA の陽性率が高かった。

(5) テロメラーゼ陽性を示した唾液腺腫瘍組織では、hTERT mRNA は 3/5 (60%)、TP1 mRNA は 2/5 (40%) の症例に認められ、hTERT mRNA の陽性率が高かった。

以上の研究結果より、テロメラーゼ活性の測定は口腔癌診断の補助診断として極めて有用であることが示されたが、テロメラーゼ活性とテロメラーゼ構成成分の発現との間には相関性をみいだせなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の遂行に終始御懇切なる御指導と後校閲を賜った広島大学歯学部口腔外科学第二講座石川武憲教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重な御助言、御校閲を賜った本学の口腔病理学講座、二階宏昌教授と本学口腔生化学講座、加藤幸夫教授に深謝致します。

さらに本研究の遂行および本論分の作成に、御指導と御助言を賜った本学医学部薬学科井出利憲教授、中村泰浩先生、本学歯学部口腔外科学第二講座杉山勝助教授に謹んでお礼を申し上げます。また、御支援を戴きました本学歯学部口腔外科学第二講座原田直講師並びに教室員各位に感謝の意を表します。

文 献

1) Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio,

R., Shay, J.W., Tahara, E., Kajiyama, G. and Ide, T.: Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* **55**, 2734-2736, 1995.

- 2) Kuniyasu, H., Domen, T., Hamamoto, T., Yokozaki, H., Yasui, W., Tahara, H. and Tahara, E.: Expression of human telomerase RNA is an early event of stomach carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* **88**, 103-107, 1997.
- 3) Hiyama, E., Kodama, T., Shinbara, K., Iwao, T., Itoh, M., Hiyama, K., Shay, J.W., Matsuura, Y. and Yokoyama, T.: Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res.* **57**, 326-331, 1997.
- 4) Takubo, K., Nakamura, K., Izumiyama, N., Mafune, K., Tanaka, Y., Miyashita, M., Sasajima, K., Kato, M. and Oshimura, M.: Telomerase activity in esophageal carcinoma. *J. Surg. Oncol.* **66**, 88-92, 1997.
- 5) Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avillion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., Le, S., West, M.D., Harley, C.B., Andrews, W.H., Greider, C.W. and Villeponteau, B.: The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241, 1995.
- 6) Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A. and Ishikawa, F.: TLP1: A gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* **88**, 875-884, 1997.
- 7) Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M.B., Arruda, I. and Robinson, M.O.: A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **275**, 973-977, 1997.
- 8) Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A. and Weinberg, R.A.: hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785-795, 1997.
- 9) Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D.S., Mar, V., Bass, M.B. and Robinson, M.O.: Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes* **11**, 3109-3115, 1997.
- 10) Avillion, A.A., Piatyszek, M.A., Gupta, J., Shay, J.W., Bacchetti, S. and Greider, C.W.: Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* **56**, 645-650, 1997.
- 11) Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Tanaka, M. and Inoue, M.: Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in

- cervical cancer. *Cancer Res.* **58**, 1558–1561, 1998.
- 12) 押村光雄, 久郷裕之: テロメラーゼ活性制御遺伝子群. *日本臨床* **56**, 16–22, 1998.
 - 13) Ramakrishnan, S., Eppenberger, U., Mueller, H., Shinkai, Y. and Narayanan, R.: Expreision profile of the putative catalytic subunit of the telomerase gene. *Cancer Res.* **58**, 622–625, 1998.
 - 14) Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**, 326–364, 1995.
 - 15) 宮内 忍, 諸山隆正, 阪本知二, 岡本哲治, 高田和彰: ヒト口底癌由来細胞株 (Ueda-1) の樹立. *日口外誌* **31**, 1347–1351, 1985.
 - 16) Moroyama, T., Miyauchi, S., Akemi, T., Sugata, T. and Takada, K.: Establishment and characterization of a human tumor cell line (Nakata-1) derived from squamous carcinoma of the buccal mucosa. *Proc. Jpn. Can. Assoc.* **44**, 242, 1986.
 - 17) 堀越 勝, 木村義孝, 名倉英明, 小野富昭, 伊藤秀夫: 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立 (第1報). *日口外誌* **20**, 10–16, 1974.
 - 18) Rikimura, K., Toda, H., Tachikawa, N., Enomoto, S. and Kamata, N.: Growth of the malignant and nonmalignant human squamous cells in a protein-free defined medium. *In vitro Cell Dev. Biol.* **26**, 849–856, 1990.
 - 19) Miyazaki, K., Takaku, H., Umeda, M., Fujita, T., Huang, W., Kimura, T., Yamashita, J. and Horio, T.: Potent growth inhibition of human tumor cells in culture by arginine deiminase purified from a culture medium of a Mycoplasma-infected cell line. *Cancer Res.* **50**, 4522–4527, 1990.
 - 20) Prime, S.S., Nixon, S.V.R. and Crane, I.J.: The behaviour of human oral squamous cell carcinoma in cell culture. *J. Pathol.* **160**, 259–269, 1990.
 - 21) 小原 勝, 安井 淳, 石川武憲: ヒト口腔扁平上皮癌 (KON) の樹立とその性状. *日口外誌* **41**, 19–25, 1995.
 - 22) 佐野倫三: ヒト口腔扁平上皮癌培養細胞株 OS-F の樹立と口腔癌の浸潤機序に関する研究. *広大歯誌* **30**, 219–231, 1999.
 - 23) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* **48**, 745–752, 1981.
 - 24) Yasunaga, T., Hayashi, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yura, Y. and Sato, M.: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athmic nude mice. *Virchows Archiv B* **51**, 187–195, 1986.
 - 25) Ikemoto, K., Murakami, K., Yasui, A., Ishikawa, T., and Shimosato, T.: Biological properties of newly-established cell line (KSA) from human adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Tissue Culture in Dentistry* **26**, 41–43, 1989.
 - 26) Kim, N.W., Piatszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. and Shay, J.W.: Specific association of human telomerase activity with immortalized cells and cancer. *Science* **266**, 2011–2015, 1994.
 - 27) Wright, W.E., Shay, J.W. and Piatyszek, M.A.: Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acid. Res.* **23**, 3794–3795, 1995.
 - 28) Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B. and Cech, T.R.: Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955–959, 1997.
 - 29) Tahara, H., Kuniyasu, H., Yokozaki, H., Yasui, W., Shay, J.W., Ide, T. and Tahara, E.: Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1245–1251, 1995.
 - 30) Zhang, W., Kapustra, L.R., Slingerland, J.M. and Klotz, L.H.: Telomerase activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium. *Cancer Res.* **58**, 619–621, 1998.
 - 31) 檜山桂子, 石岡伸一, 檜山英三, 山本戸道郎: 肺癌の腫瘍マーカーとしてのテロメラーゼ活性測定の意義. *日本臨床* **56**, 161–165, 1998.
 - 32) Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatsyzek, M.A., Shay, J.W., Ishioka, S. and Yamakido, M.: Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* **155**, 3711–3715, 1995.
 - 33) Yashima, K., Litzky, L.A., Kaiser, L., Rogers, T., Lam, S., Wistuba, I.L., Milchgrub, S., Srivastava, S., Piatsyzek, M.A., Shay, J.W. and Gazdar, A.F.: Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res.* **57**, 2373–2377, 1997.
 - 34) Mao, L., El-Naggar, A.K., Fan, Y., Lee, J.S., Lippman, S.M., Kayser, S., Lotan, R. and Hong, W.K.: Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res.* **56**, 5600–5604, 1996.
 - 35) Mutirangura, A., Supiyaphun, P., Trirekapan, S., Sriuranpong V., Sakuntabhai, A., Yenrudi, S. and Voravud, N.: Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 3530–3533, 1996.
 - 36) Sumida, T., Sogawa, K., Hamakawa, H., Sugita, A., Tanioka, H. and Ueda, N.: Detection of telomerase activity in oral lesions. *J. Oral Pathol. Med.* **27**, 111–115, 1998.

- 37) Ohyashiki, K., Ohyashiki, J., Nishimaki, J., Toyama, K., Ebihara, Y., Kato, H., Wright, W.E. and Shay, J.W.: Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric amplification protocol assay. *Cancer Res.* **57**, 2100–2103, 1997.
- 38) 丸山保彦, 花井洋行, 金子栄蔵: 胃の腸上皮化生, 腺腫, 分化型腺癌におけるテロメア長, テロメラーゼ活性. *日本臨床* **56**, 94–97, 1998.
- 39) 石橋敬一郎, 若杉慎司, 小川健治, 加藤博之, 遠藤俊吾, 若松和彦, 芳賀駿介, 広瀬国孝, 梶原哲郎: 腸管洗浄液中テロメラーゼ活性測定による大腸癌診断の試み. *日本臨床* **56**, 117–121, 1998.
- 40) 岩尾年康, 土田 明, 檜山英三, 梶山梧朗: 尿液中 telomerase 活性測定による膀胱癌術前診断. *日本臨床* **56**, 137–141, 1998.
- 41) Califano, J., Ahrendt, S.A., Meininger, G., Westra, W.H., Koch, W.M. and Sidransky, D.: Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res.* **56**, 5720–5722, 1996.
- 42) 池口正英, 貝原信明: 食道癌における癌巢, 非癌部粘膜のテロメラーゼ活性. *日本臨床* **56**, 84–88, 1998.
- 43) Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. and Harley, C.B.: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 10114–10118, 1992.
- 44) Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W.: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460, 1990.