

博士論文

白血球由来テロメア G-Tail 長を指標とした新規

食道がんバイオマーカーの開発

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

細胞分子生物学研究室

平成30年度入学 韓 佳延

主指導教員 田原 栄俊

目次

略語一覧.....	3
1. <u>序論</u>	4
1. 1. 食道がんの診療における課題.....	4
1. 2. テロメア G-tail 長を指標とした血液バイオマーカー開発の意義.....	5
1. 3. 本研究の目的.....	6
2. <u>実験材料・方法</u>	8
2. 1. 検体試料.....	8
2. 2. 血液からの DNA 抽出.....	8
2. 3. HPA による Telomere および G-tail 長の評価.....	9
2. 4. 統計解析.....	10
3. <u>結果</u>	12
3. 1. 食道がんの癌種による Telomere および G-tail 長の比較.....	12
3. 2. 食道がん患者と健常者の Telomere および G-tail 長の比較.....	12
3. 3. 食道がん患者と健常者の Telomere および G-tail と年齢の相関.....	12
3. 4. 食道がんの悪性化による Telomere および G-tail 長の比較.....	13
3. 5. 手術後期間の長短が Telomere および G-tail に与える影響の検討.....	13
3. 6. 食道がん患者の Telomere および G-tail と腫瘍再発の関係性.....	14
4. <u>考察</u>	25
4. 1. 食道がんにおけるテロメア G-tail 長の短縮について.....	25
4. 2. 疾患によるテロメア G-tail 長の変動について.....	26
4. 3. テロメア G-tail 長を指標とした血液バイオマーカーの実用性について.....	26
5. <u>参考文献</u>	28
6. <u>謝辞</u>	35

略語一覽

ESC	Esophageal Cancer
LTL	Leukocyte Telomere Length
ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinoma
EAC	Esophageal Adenocarcinoma
CRT	Chemoradiotherapy
HPA	Hybridization Protection Assay
IQR	Interquartile Range
RLU	Relative Light Units
TNM	Tumor-Node-Metastasis
ROS	Reactive Oxygen Species
CEA	Carcinoembryonic
SCC	Squamous Cell Cancer
CTCs	Circulating Tumor Cells

1. 序論

1.1. 食道がんの診療における課題

食道がん (ESC, esophageal cancer) は、食道の内面を覆う粘膜の表面から発生し、5 年生存率が低いがんの一つである。食道がんは食道扁平上皮がん (ESCC, esophageal squamous cell carcinoma) と食道腺がん (EAC, esophageal adenocarcinoma) の 2 種類に大別され、世界で 8 番目、死亡率では世界で 6 番目に多いがんとして知られている¹⁻³。世界における ESCC の発生率は全食道がん症例の 90% を占め、特にアジアで高い頻度で発生していることが報告されている³⁻⁶。食道がんはリンパ節に転移・再発しやすいなどの特徴を示す。がんが進行した場合、食道の壁内にあるリンパ管や血管にがんが浸潤し、肺、肝臓などの臓器へリンパ節転移を引き起こす。また、粘膜から発生した食道がんが大きくなるにつれて深層へ広がっていき、気管、肺、大動脈、心臓などの臓器へと浸潤することが知られている。食道がんの進行度は進達度、リンパ節および遠隔臓器への転移の有無などに応じて、ステージ 0～Ⅲ, IVa, IVb に分類される。ステージ 0 で適応となる内視鏡切除は安全性が高く、比較的患者の負担も少ないが、食道がんが初期の段階で発見されることは少なく、多くの患者に対して外科手術が行われている。しかし、食道がんにおける外科手術は、頸部および胸部食道を切除するため、自然な声が出せなくなることや食事がとりにくくなることにより、患者の QOL を著しく低下させることが問題である。

食道がん患者の 5 年生存率が低い (約 10%) の主な理由には、初期の臨床症状がないため、進行した段階で診断されることが多いことや進行期のがん患者は手術を受けることができないことが挙げられる^{7,8}。これまで手術や化学療法、放射線療法、化学放射線療法 (CRT, chemoradiotherapy) などの治療法の改善がなされてきたにもかかわらず⁶、食道切除術後の 5 年生存率は 15～40% と、依然として予後不良であることが報告されている⁷。食道がんの既存の診断方法には内視鏡検査、陽電子放出断層撮影、生検などがあるが^{9,10}、従来の診断方法は侵襲性が高く、早期診断に適さないという欠点が存在する。したがって、食道がんのバイオマーカーを開発し、疾患の早期段階で迅速、かつ、低侵襲的な診断を可能にすることが重要である。

リキッドバイオプシーは低侵襲、かつ、リアルタイムな方法で疾患の進展をモニターするための有用かつ強力なツールであり、異なる進行度ステージのがん患者のサーベイランスに適用可能である¹¹。血液中には白血球、血中循環腫瘍細胞 (CTCs, circulating tumor cells)、血中循環腫瘍 DNA (ctDNA, circulating tumor DNA)、細胞外小胞、分泌型 miRNA、タンパク質など多様な生体物質が存在するため、血液を用いたリキッドバイオプシーの応用は腫瘍の進行を追跡でき、早期診断、予後評価

に重要な役割を果たす可能性が報告されている。そのため、血液を含む体液を用いたバイオマーカーの探索が注目されている。例えば、ctDNA のリキッドバイオプシーは腫瘍のスクリーニングや予後、治療選択への潜在性を示す。しかしながら、ctDNA の血中濃度が低いこと、検出コストが高いことなどの応用上の課題が残されている¹¹。また、食道がんの血液検査では腫瘍マーカーとして扁平上皮癌では SCC (Squamous Cell Cancer) 抗原が用いられるが、早期診断における有用性は確立されていない。そのため、血液バイオマーカーの実用化への応用は、さらに検討される必要がある。

1.2. テロメア G-tail 長を指標とした血液バイオマーカー開発の意義

テロメアは、真核生物の染色体末端に存在する核タンパク質複合体で、5'-TTAGGG-3'のタンデム反復配列から構成され、一定の長さを持つことでテロメア同士の融合等を防ぎ、ゲノムの安定性を維持している^{12,13}。しかしながら、テロメアは末端であるがゆえに DNA 損傷として認識される恐れがある。DNA 損傷として認識されると、DNA 損傷応答が誘導され、ゲノムの不安定化を引き起こし、細胞増殖の停止や細胞死、または発がんを招く。テロメアの最末端には G-tail と呼ばれる一本鎖のテロメア DNA 構造が存在し、G-tail を形成する T-loop と呼ばれる構造によって DNA 損傷応答から DNA 末端を保護している¹²⁻¹⁴ (図 1)。テロメアまたは G-tail は細胞分裂や酸化ストレス等によって短縮する。複製の鋳型となる一本鎖のテロメア DNA の 3'末端より相補的な塩基配列が 5'末端から 3'末端側に複製されるときに、細胞分裂ごとに相補鎖の最後の 5'末端が複製されないため、細胞分裂によってテロメア DNA が短縮し、末端複製問題として知られている¹⁵。G-tail はループ構造の形成に不可欠であり、一定の長さを維持することでゲノムの安定性において重要な役割を担う^{16,17}。

過去の研究から、白血球のテロメア配列の長さは、体内の他の細胞の長さを反映することが示されており、synchrony として知られるプロセスである²⁰⁻²¹。しかしながら、肝移植においては、ドナーとレシピエントの白血球由来 G-tail 長の変化が見られず、ドナーの肝臓組織由来 G-tail 長が長いほど、ドナーの肝再生能と肝移植術後のレシピエントの生存率が低下することが報告している²²。その一方、白血球由来 Telomere 長の短縮が膀胱がん、胃がん、腎臓がんに関連していることと、乳がん、肺がん、大腸がんに関連していないことが報告されている²³。我々の以前の研究で、白血球由来 G-tail 長の短縮が老化や白質病変、内皮機能障害、がんなどの老化関連疾患と関連していることを報告している²⁴⁻²⁷。乳がんにおいては、健康な人に比べて早期の患者でテロメア G-tail 長が短いことから、G-tail 長はがん診断のための血液バイオマーカーとして有望であることが示唆されている。

テロメア長の測定方法には Southern blot 法、Q-FISH (quantitative fluorescence in situ hybridization)法などがある。しかしながら、従来の測定方法には欠点が存在する。Southern blot 法では抽出した DNA を電気泳動で得られたスメアのピックもしくは平均値よりテロメア長を算出するが、細胞や組織種類別の計測に大変時間と手間がかかり、さらにたスメアのピックもしくは平均値よりテロメア長の算出は正確性に欠くため僅かな変化を検出することが難しいという欠点がある²⁸。Q-FISH 法は個々の細胞の各染色体の短腕・長腕ごとにテロメア長の測定ができる正確性が高い方法ではあるが、やはり多くの時間と手間がかかるために汎用性に欠ける²⁹。また、テロメア G-tail 長の測定方法には PENT (primer extension-nick translation)法、3'-overhang protection assay 法などがあるが、従来の測定方法では放射線標識プローブの使用や電気泳動法による G-tail 長の算出をするため、時間と手間がかかり、ハイスループットな解析に適さないという欠点が存在する³⁰。したがって、臨床検査レベルで、迅速に、かつ、多検体の解析を可能にすることが期待されている。

当研究室は G-tail telomere hybridization protection assay (Gt-telomere HPA) と呼ばれるハイスループットな方法を開発した¹⁸。HPA 法はテロメアの配列に特異的に結合するプローブとその化学発光を利用して、臨床試料等を用いた多検体サンプルに対応でき、Telomere や G-tail 長を迅速に測定する方法である。HPA 法による G-tail 長の測定は新たな側面からがんを含む様々な疾患のリスク評価に貢献できる可能性がある。

1.3. 本研究の目的

本研究では、これまでの知見を踏まえ、難治性食道がんにおける末梢血白血球由来テロメア G-tail 長の変化が診断および予後指標となる可能性を探るために、当研究室で開発された HPA 法を用いて白血球由来テロメア G-tail 長を測定することで、G-tail 長の変化が食道がん患者の体内状態とどう関連しているか、また食道がんの発生との関係も検証し、その変化が食道がんの予後にどのような関係をもたらすかを明らかにすることを目的とした。

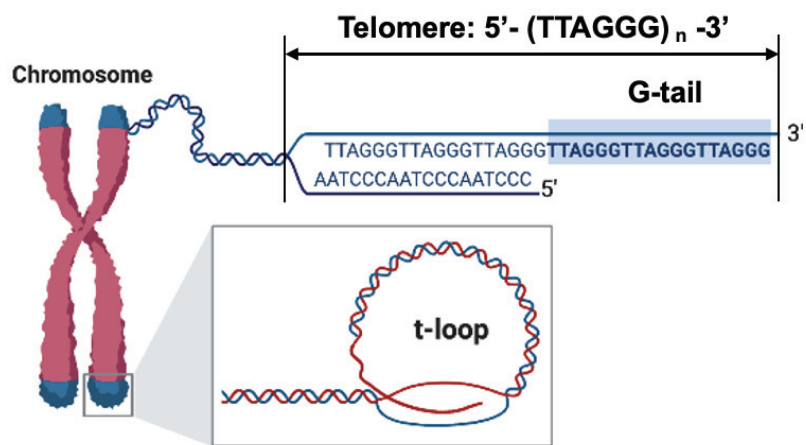


図 1. Telomere および G-tail の構造

2. 実験材料・方法

2.1. 検体試料

本研究に使用した検体試料は、広島大学疫学研究倫理審査委員会にて承認を受けた研究計画のもと、試料提供者の同意を得て採取された(承認番号: 医倫ヒ-129号)。参加者全員にインフォームドコンセントを行い、同意が得られた対象を研究対象とした。

全例が ESC と確定され、日本食道学会編【食道癌診療ガイドライン (2012 年 4 月版)】に基づいて治療が行われた。病期は、国際対がん連合 (UICC, Union for International Cancer Control) と対がん米国合同委員会 (AJCC, American Joint Committee on Cancer) 病期分類システムの第 8 版に基づいて分類された。年齢、性別、喫煙状況、アルコール摂取などのベースラインの臨床的特徴が記録された。ESC 患者参加者の選択基準は以下の通りである。(1) 40~90 歳の原発性食道癌患者である、(2) インフォームドコンセントが得られている、(3) 初回評価時に転移・再発の所見がないこと。また、除外基準は以下の通りである。(1) 複数の癌を合併している患者である、(2) 追跡不能、(3) 初回評価時に転移・再発が確認された患者である。

ESC 患者の血液検体は広島大学病院消化器 (食道) 外科において、2018 年 5 月から 2022 年 4 月にかけて、45~88 歳の ESC 患者 147 名 (中央値 69.0 歳、四分位範囲 (IQR, interquartile range) = 63.0~74.0 歳、男性 122 名と女性 25 名) から採取された。また、手術を受ける前の ESC 患者 139 名 (中央値 69.0 歳、IQR = 63.0~74.0 歳、男性 114 名と女性 25 名) と手術を受けた患者 60 名 (中央値 69.0 歳、IQR = 65.0~73.8 歳、男性 47 名と女性 13 名) から採取された。手術を受けた患者からは、主に術後約半年から 1 年経過後に採取された。

健常者の血液検体はボランティアから採取された。これらのボランティアから、本研究の ESC 患者参加者と年齢が一致する人を選んだ。健常者の選択基準は以下の通りである。(1) 40~90 歳の健康な成人ボランティアである、(2) 重度の基礎疾患を持たない、(3) インフォームドコンセントが得られている。最後に、40~80 歳の健常者 170 名 (中央値 62.0 歳、IQR = 58.0~68.3 歳、男性 88 名と女性 82 名) を対照者とし、血液検体を採取した。

2.2. 血液からの DNA 抽出

採取された血液を採血管から 15 mL 遠心チューブに移して遠心 (2330×g、10分間) し、血球成分と血漿に分かれた。上層の血漿を捨てた後、血球成分に氷冷溶血溶液

を10 mL 加え、氷上で15分間静置して赤血球を溶血させた。遠心 (800×g、5分間) して白血球を分離した後、氷冷TEバッファで洗浄した。遠心 (300×g、5分間) 後、上清を除去し、白血球ペレットに氷冷TEN溶液を1 mL 加え、タッピングして混ぜた後、TENS/ProK溶液を1 mL 加え、転倒混和を行なって、白血球を溶解した。37°C インキュベーター内で一晩加温してタンパク質を加水分解した。

全血試料から白血球を溶解した後、白血球溶液を15 mL MaXtract High Density チューブに移した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液 (25:24:1) を2 mL 加え、ローテーターで転倒混和 (45 rpm、1時間) を行なった。遠心 (2000×g、10分間) した後、再び上層の核酸溶液にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液を2 mL 加え、ローテーターで転倒混和 (45 rpm、1時間) を行なった。遠心 (2000×g、10分間) した後、上層の核酸溶液に3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2) を150 μL 加え、さらに、2-プロパノールを2 mL 加えて転倒混和し、核酸を析出させた。先切りチップを用いて、析出した核酸を1 mL のTEN/RNase A溶液を加えた新しい15 mL MaXtract High Density チューブに回収した。37°C インキュベーター内で一晩加温して RNA を加水分解した。核酸溶液に TENS/ProK溶液を300 μL 加え、37°C インキュベーター内で一時間加温してタンパク質を加水分解した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液を1.5 mL 加え、ローテーターで転倒混和 (45 rpm、10分間) を行なった。遠心 (2000×g、10分間) した後、上層の核酸溶液に3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2) を100 μL 加え、さらに、2-プロパノールを1.2 mL 加えて転倒混和し、DNAを析出させた。先切りチップを用いて析出したDNAを500 μL の70%エタノールを加えた新しい1.5 mL 遠心チューブに回収した。遠心 (20,000×g、5分間) した後、上清を除いて3分間DNAペレットを風乾した。TEバッファを150 μL 加えた後、60°Cの湯浴で30分間加温し、DNAを溶解させた。1 mL シリンジと24 G 針を用いて、DNA溶液を吸い吐きし (20回) 、DNAを剪断した。

※溶血溶液: 155 mM NH₄Cl, 10 mM NH₄HCO₃, 0.1 mM EDTA (pH 7.4)

※TE バッファ: 1 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (pH 7.4)

※TEN 溶液: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 7.4)

※TENS/ProK 溶液: TEN 溶液, 1%SDS, 100 μg/mL Proteinase K

※TEN/RNase A 溶液: TEN 溶液, 100 μg/mL RNase A

2.3. HPA による Telomere および G-tail 長の評価

血液検体から抽出したDNAの濃度は、Nanophotometer Pearl (Implen GmbH, Munich, Germany) を用いて測定し、100±5 ng/μL に調製した。サンプルを60°Cで

10分間加熱してループ構造を変性させ、そのうち半分をG-tail長測定用のサンプルとした。残りの半分のサンプルはTelomere長測定用として95°Cで10分間加熱し、二本鎖DNAを一本鎖に変性させた。熱変性したゲノムDNA 0.2 µgを用いてTelomere長、非変性ゲノムDNA 1 µgを用いてG-tail長を測定した。

次に、自動分注機 JANUSを用いてHPAを行なった。まず、20 µL のAcridinium ester (AE)で標識したテロメアHPAプローブにHybridizationバッファーを1.3 mL 加え、転倒混和を行なった。希釈したHPAプローブを96-well plateに10 µLずつ分注し、それぞれのウェルにG-tail長測定用サンプル、Telomere長測定用サンプルを10 µLずつ添加した。Plateを60°C、20分間加熱しハイブリダイズさせた後、DH (differential hydrolysis) バッファーを30 µL加え60°C、10分間加熱することにより未反応の過剰なプローブを加水分解し除去した。40 µLを測定用96-well plateに分注し、EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いてTelomereおよびG-tailに結合したHPAプローブの化学発光量を測定した。RLU (Relative Luminescence Units) として数値化し、TelomereおよびG-tail長の相対的な測定値を算出した。

すべての同じサンプルは3回測定で評価し、アッセイ間のばらつきを補正するために、ヒト大腸がん細胞株RKOから抽出したゲノムDNAをコントロールとして使用した。補正用のコントロールの平均変動係数 (CVs, coefficient of variation) は、テロメアG-tail長で5.6%、全テロメア長で5.5%であった。全てのサンプルの平均変動係数は、テロメアG-tail長で5.7%、全テロメア長で4.9%であった。

※ Hybridization バッファー: 0.1 M succinic acid, 0.23 M lithium hydroxide monohydrate, 2% lithium lauryl sulfate, 1.2 M lithium chloride, 20 mM EDTA ·2Na, 20 mM EGTA, 15 mM 2,20 -dithiodipyridine-HCl (pH 4.7)

※ DHバッファー: 0.6 M boric acid, 182 mM NaOH, 1% Triton X-100-NaOH (pH 8.5)

※ AE で 標 識 し た テ ロ メ ア H P A プ ロ ー ブ : 5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTA-3' [*AE position, 8×10⁷ RLU/pmol probe DNA, custom ordered from Fujirebio Inc., (Tokyo, Japan)]

2.4. 統計解析

GraphPad Prism version 8.4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com) を用いて、データの統計学的処理を行なった。変数の正規分布はD'Agostino–Pearson omnibus normality 検定と QQ plot により評価した。正規

分布の変数については unpaired t 検定を行い、非正規分布の変数については Mann-Whitney U 検定を用いた。データは、正規分布の変数については平均値および標準偏差、非正規分布の変数については中央値 (IQR)、カテゴリー変数については観測数 (%) として示した。すべての解析において、有意水準を 0.05 に設定し、unpaired t 検定、Mann-Whitney U 検定、one-way ANOVA、Kruskal-Wallis 検定、Dunn's multiple comparisons 検定を用いて評価した。Non-significant (n.s.) は $p \geq 0.05$ 、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示している。Telomere 長、G-tail 長とその他の変数間の相関は、Spearman's correlation coefficient 検定と linear regression 分析を用いて検討した。

3. 結果

3.1. 食道がんの癌種による Telomere および G-tail 長の比較

ESC における白血球由来 Telomere および G-tail 長の変化が診断および予後指標となる可能性を探るために、ESC 患者の検体を用いて、HPA 法により白血球由来 Telomere および G-tail 長を測定し、変化を検討した。まず、ESC の癌種によって Telomere および G-tail 長がどのように変化するかを調べた。その結果、ESCC と EAC とその他の癌種のどちらの群においても、Telomere および G-tail 長に有意差は見られなかった (図 2-1.)。このことから、ESC における白血球由来 Telomere および G-tail 長の変化は癌種との関連がないことが示唆された。

3.2. 食道がん患者と健常者の Telomere および G-tail 長の比較

次に、Telomere および G-tail 長の変化は ESC の発症とどう関連しているかを検討するために、147 名の ESC 患者の検体と 170 名の健常者の検体を用いて (表 1.)、Telomere および G-tail 長の評価を行なった。我々の以前の研究と同様に²⁶、がん患者と健常者の Telomere および G-tail 長を比較した結果から、患者において G-tail 長が有意に短縮していることが観察された。その一方で、Telomere 長では ESC 患者で有意差が見られなかった (図 2-2.)。このことから、G-tail 長の短縮は腫瘍からのストレスに影響を受け、がんの進行度や腫瘍のステータスを反映するのではないかと考えた。

3.3. 食道がん患者と健常者の Telomere および G-tail と年齢の相関

過去の研究で Telomere 長は加齢に伴う変化することが明らかになったことから^{31,32}、我々はこの関係性について検証した。ESC 患者において、G-tail 長が短縮する要因を検討するため、まず初めに加齢が Telomere および G-tail 長に与える影響を確認した。その結果、Telomere および G-tail 長はどちらの群においても年齢と逆相関しており、加齢と共に短縮していくことが観察された (図 3-1.)。ESC 患者の Telomere 長は加齢に伴う短縮の度合いが健常者のものと一致することが観察されたが、その一方で、ESC 患者と健常者の G-tail 長の短縮の度合いが異なることが観察された (図 3-1.)。また、50 歳以上の ESC 患者と健常者間での G-tail 長の差が大きくなる傾向があることが観察された (図 3-1.)。この点について、さらに詳しく解析するため、年齢分布を 40~49 歳、50~90 歳の 2 つのグループに分け、Telomere および G-tail 長の比較を行なった。その結果、Telomere および G-tail 長はどちらの群においても、ESC 患者と健常者間で有意な短縮は見られなかったが、ESC 患者の Telomere 長は 40~59 歳において、健常人と比較して短縮する傾向にあることが観察された (図 3-2.)。そして、ESC 患者の G-tail 長にも有意差は見られなかったが、50~90 歳にお

いて、健常人と比較して短縮する傾向にあることが観察された（図 3-3.）。これらの結果から、50 歳以上の ESC 患者と健常人間での G-tail 長の短縮傾向が異なることから、G-tail 長の短縮は患者の体内状態、腫瘍の進行を反映する可能性と ESC のリスク評価に有用であることが示唆された。

3. 4. 食道がんの悪性化による Telomere および G-tail 長の比較

G-tail 長は疾患に伴う酸化ストレスや炎症によって短縮する可能性があることも報告された³³。我々は、G-tail 長の測定により、がんを含む様々な疾患の早期発見やリスクの評価が可能かもしれないと考えた。そこで、ESC のステージ早期におけるリスク診断や、悪性化リスクの評価ができるかどうかを検討するため、ESC 患者をステージ I～IV に分類し、Telomere および G-tail 長の比較を行なった。その結果、健常人の Telomere 長と比較して、ESC 患者で有意な変化が見られなかったが、その一方で、G-tail 長は健常人と比較してステージ II の患者で有意に短縮していることが示した（図 4-1.）。また、有意差が見られなかったが、健常人と比較してステージ I においてはやや伸長していることと、ステージ III においてはやや短縮していることが観察され、ステージ IV では G-tail 長に大きな違いは見られなかった。臨床病期について、腫瘍の悪性化を示す指標として TNM 分類が用いられる。病期は、がんが食道壁のどの深さまで広がっているかを示す T 因子、リンパ節転移の程度を示す N 因子、別の臓器への転移の有無を示す M 因子の組み合わせにより決まる。次は、さらに腫瘍の悪性化が Telomere および G-tail 長に与える影響を評価するため、ESC 患者を TNM 分類の T、N、M に分類し、Telomere および G-tail 長の比較を行なった。その結果、T、N、M において、Telomere 長は健常人と比較して ESC 患者で有意な変化が見られなかった。このことから、ESC 患者の Telomere 長は腫瘍の進達度（図 4-2.）、リンパ節転移の程度（図 4-3.）および遠隔転移の有無（図 4-4.）に影響を受けていない可能性が示唆された。その一方で、ESC 患者の G-tail 長は健常人と比較して T3 で有意に短縮しているが、N、M において、有意な変化が見られなかった（図 4-2., 4-3., 4-4.）。このことから、G-tail 長の短縮は原発腫瘍の進達度に関連し、影響を受けている可能性が示唆された。

3. 5. 手術後期間の長短が Telomere および G-tail に与える影響の検討

これまでの結果から、G-tail 長は腫瘍からのストレスに影響を受けていることが示唆されており、治療経過に伴って G-tail 長は変化するかもしれないと考えた。この仮説を検証するために、139 名の手術を受ける前の患者（術前）と 60 名の手術を受けた患者（術後）の検体を用いて（表 2.）、術前や術後といった経時的な G-tail 長の評価を行なった。その結果、Telomere および G-tail 長はどちらの群においても有意な差は見られなかった（図 5-1.）。手術治療後、時間が経過するにつれて Telomere および G-tail 長が変化する可能性を考慮するため、術後から経過時間を 9 日～6 ヶ月、7～12 ヶ月の 2 つのグループに分け、Telomere および G-tail 長の比較を行なった。

その結果、Telomere および G-tail 長はどちらの群においても有意な差は見られなかった (図 5-2.)。最後に同一患者の手術治療前後において、術後期間の長短によって Telomere および G-tail 長がどのように変化するかを調べ、ESC の手術治療効果を予測する因子となりうるかどうかの検討を行なった。8 名の ESC 患者の Telomere および G-tail 長の変化を評価しました。その結果、術前に短かった Telomere および G-tail は術後に伸長する傾向があることが観察された (図 5-3., Case 8)。しかしながら、術前と比較して、術後から 1 年経過後において G-tail 長の短縮も観察された (図 5-3., Case 5)。今回、術後に化学療法や放射線療法を追加しているかどうか、転移や再発発生の有無を検討できなかったが、化学療法などのストレスや腫瘍の再発によって術後に Telomere および G-tail 長が短縮したのではないかと考えた。

我々の予測に反して、手術治療後期間の長短が Telomere および G-tail 長に顕著な影響は認められなかった。しかしながら、有意差が見られなかったが、術後 7~12 ヶ月において、Telomere および G-tail 長はやや伸長していることが観察された (図 5-2.)。そのため、Telomere および G-tail 長は患者の体内状態を反映し、再発も評価できるのではないかと考えた。

3. 6. 食道がん患者の Telomere および G-tail と腫瘍再発の関係性

Telomere および G-tail 長は ESC の再発を評価するリスク指標となりうるかどうかを調べた。手術を受ける前の患者を対象として、非再発群と再発群の 2 つのグループに分け、健常者に比べて Telomere および G-tail 長の評価を行なった。その結果、Telomere 長はどの群でも有意な変化が見られなかったが、その一方で、G-tail 長は非再発群と再発群間では有意に短縮しており、さらに、健常者群と再発群間でも有意に短縮していることが観察された (図 6.)。このことから、G-tail 長は再発に先行して短縮しており、患者の体内状態を反映していることが示唆された。

以上の結果をまとめると、G-tail 長の短縮は ESC 患者の体内状態を反映しており、腫瘍の再発を早期に評価するリスク指標として利用できる可能性を見出した。

表 1. 使用した検体試料情報

Variable	Case (n = 147)	Control (n = 170)
Age	69.0 (63.0–74.0)	62.0 (58.0–68.3)
Gender		
Male	122 (83.0%)	88 (51.8%)
Female	25 (17.0%)	82 (48.2%)
Cancer type		
Squamous cell CA	123 (89.1%)	-
Adeno CA	10 (7.2%)	-
Basaloid squamous cell CA	2 (1.4%)	-
Neuroendocrine CA	1 (0.7%)	-
Small cell neuroendocrine CA	1 (0.7%)	-
Small cell CA	1 (0.7%)	-
Cancer stage		
I	23 (17.7%)	-
II	28 (21.5%)	-
III	43 (33.1%)	-
IV	36 (27.7%)	-
TNM stage (T category)		
1	29 (21.6%)	-
2	12 (9.0%)	-
3	73 (54.5%)	-
4a	5 (3.7%)	-
4b	15 (11.2%)	-
TNM stage (N category)		
0	52 (38.8%)	-
1	40 (29.9%)	-
2	34 (25.4%)	-
3	8 (6.0%)	-
TNM stage (M category)		
0	114 (85.1%)	-
1	20 (14.9%)	-
Therapeutic status	107	-
Preoperative		
Chemotherapy-only	11 (10.3%)	-
CRT-only	5 (4.7%)	-
Non-treated	79 (73.8%)	-
Postoperative		
Cancer-related surgery-only	7 (6.5%)	-
Chemotherapy	4 (3.7%)	-
CRT	1 (0.9%)	-
Recurrence status	114	-
Preoperative		
Non-recurrence	67 (58.5%)	-
Recurrence	38 (33.3%)	-
Postoperative		
Non-recurrence	5 (4.4%)	-
Recurrence	4 (3.5%)	-

データは、正規分布の変数については平均値および標準偏差、非正規分布の変数については中央値 (IQR)、カテゴリー変数については観測数 (%) として示した。-, not applicable; CA, carcinoma; CRT, chemoradiotherapy; IQR, interquartile range; TNM, tumor-node-metastasis.

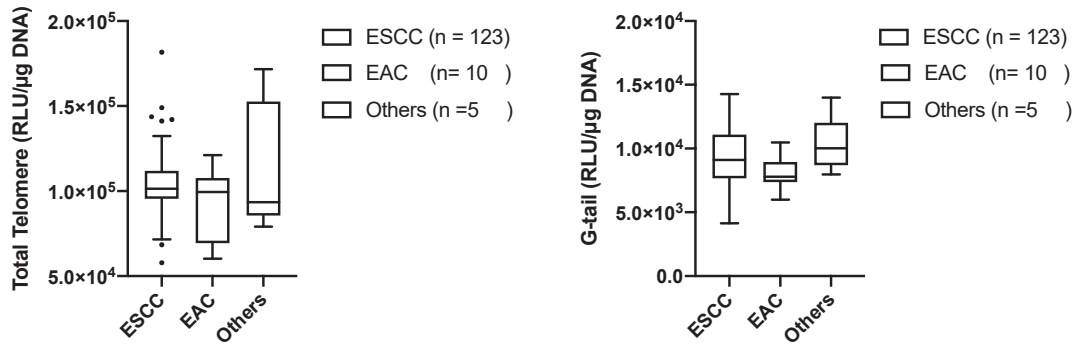


図 2-1. 食道がんの癌種による Telomere および G-tail 長の比較

左図：食道がん患者の検体を用いて、癌種によって Telomere 長の変化評価。

右図：食道がん患者の検体を用いて、癌種によって G-tail 長の変化評価。

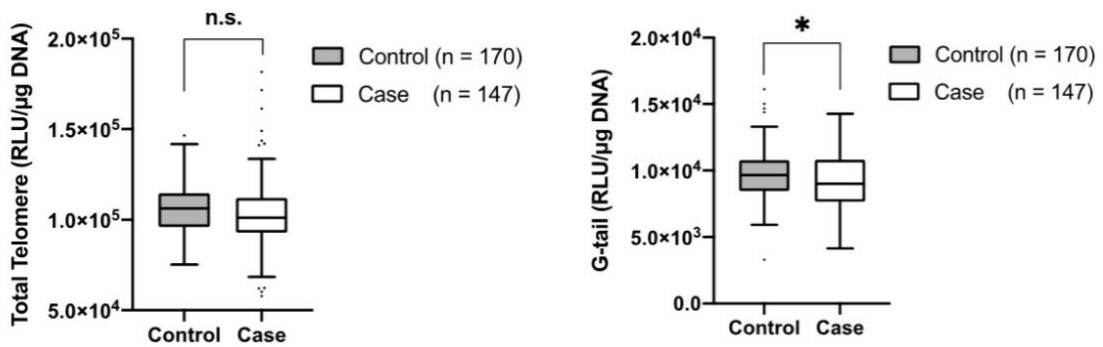


図 2-2. 食道がん患者と健常者の Telomere および G-tail 長の比較

左図：健常者と比較して、食道がん患者の Telomere 長の変化評価。

右図：健常者と比較して、食道がん患者の G-tail 長の変化評価。

Non-significant (n.s.) は $p \geq 0.05$ 、*は $p < 0.05$ を示している。

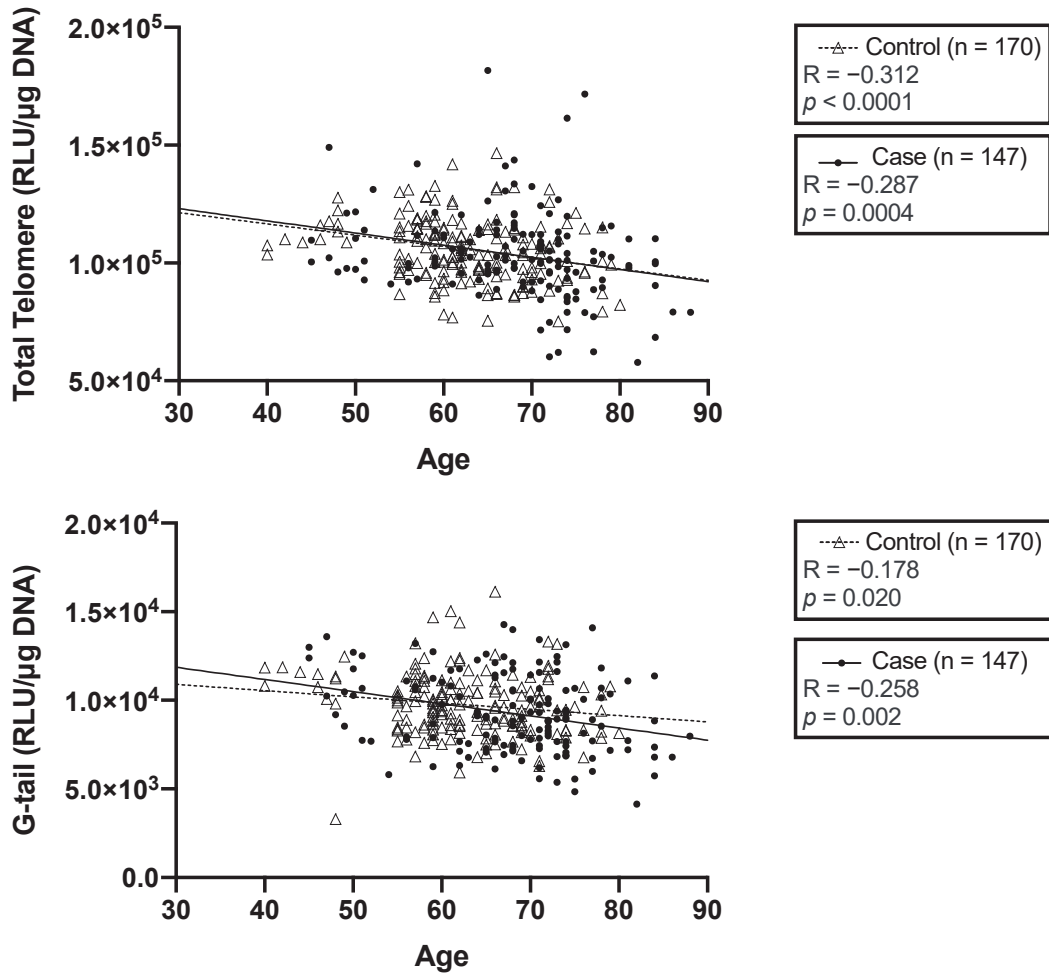


図 3-1. 食道がん患者と健常者の Telomere および G-tail と年齢との相関
 上図：食道がん患者と健常者の Telomere と年齢の相関分析
 下図：食道がん患者と健常者の G-tail と年齢の相関分析

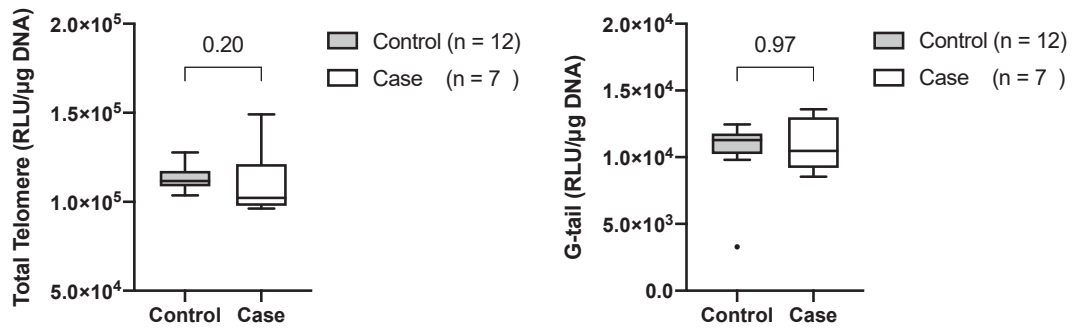


図 3-2. 40～49 歳における食道がん患者と健常者の Telomere および G-tail 長の比較

左図：健常者と比較して、食道がん患者の Telomere 長の変化評価。

右図：健常者と比較して、食道がん患者の G-tail 長の変化評価。

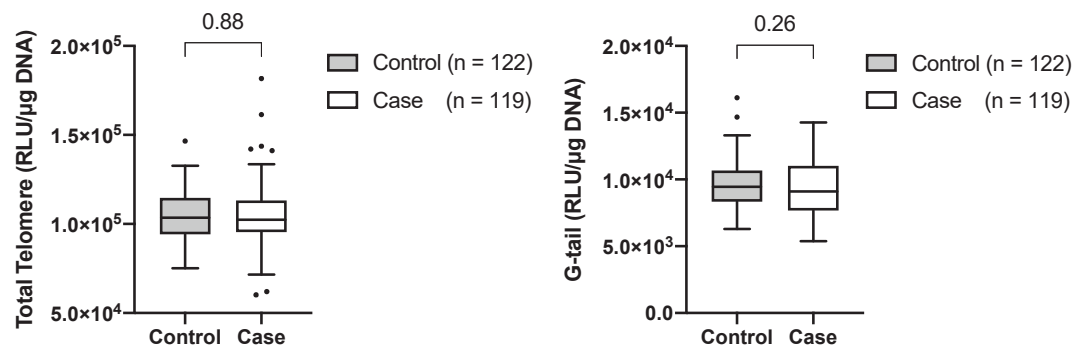


図 3-3. 50～90 歳における食道がん患者と健常者の Telomere および G-tail 長の比較

左図：健常者と比較して、食道がん患者の Telomere 長の変化評価。

右図：健常者と比較して、食道がん患者の G-tail 長の変化評価。

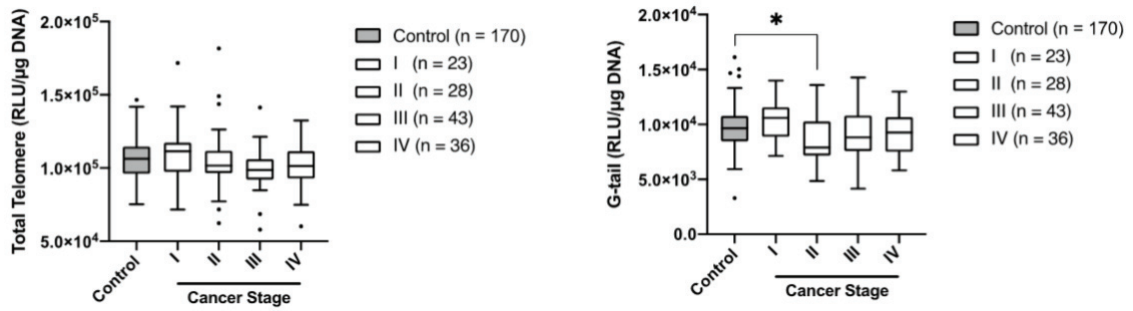


図 4-1. 食道がんの悪性化による Telomere および G-tail 長の比較

左図：食道がん患者をステージ I～IV に分類し、健常者と比較して、Telomere 長の変化評価。

右図：食道がん患者をステージ I～IV に分類し、健常者と比較して、G-tail 長の変化評価。

*は $p < 0.05$ を示している。

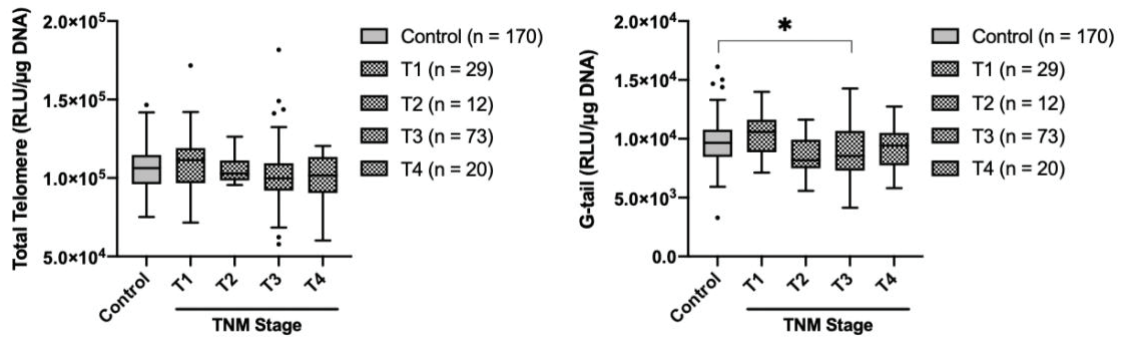


図 4-2. 食道がんの悪性化による Telomere および G-tail 長の比較

左図：食道がん患者を TNM 分類の T1～4 に分類し、健常者と比較して、Telomere 長の変化評価。

右図：食道がん患者を TNM 分類の T1～4 に分類し、健常者と比較して、G-tail 長の変化評価。

*は $p < 0.05$ を示している。

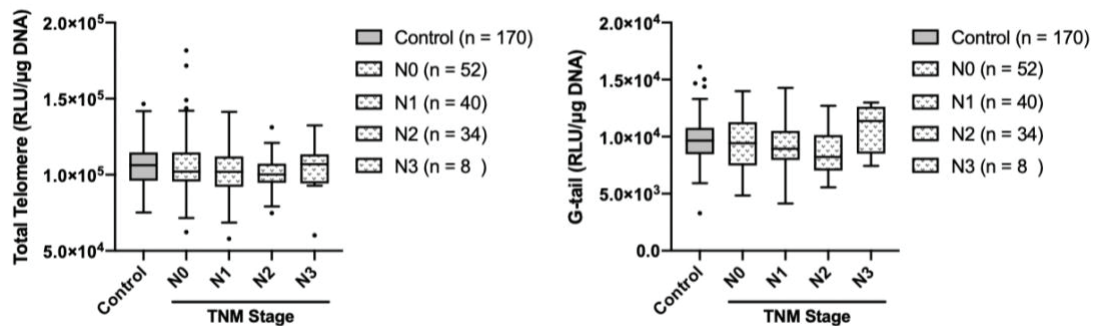


図 4-3. 食道がんの悪性化による Telomere および G-tail 長の比較

左図：食道がん患者を TNM 分類の N0～3 に分類し、健常者と比較して、Telomere 長の変化評価。

右図：食道がん患者を TNM 分類の N0～3 に分類し、健常者と比較して、G-tail 長の変化評価。

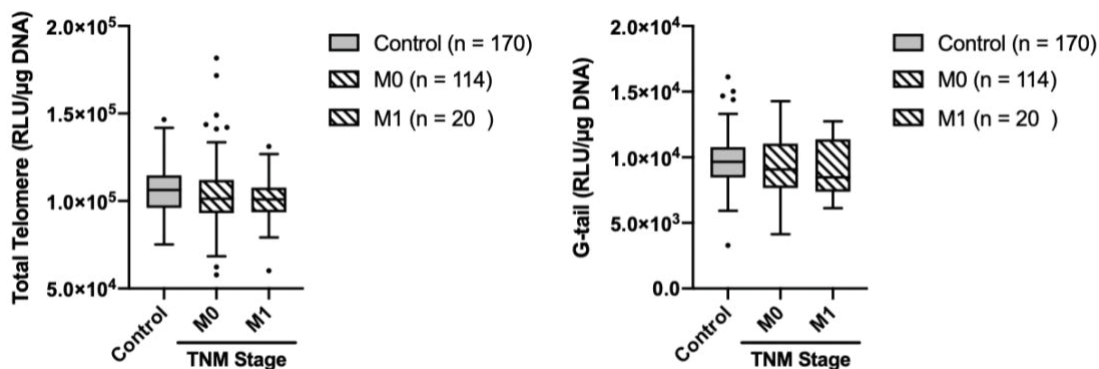


図 4-4. 食道がんの悪性化による Telomere および G-tail 長の比較

左図：食道がん患者を TNM 分類の M0 と 1 に分類し、健常者と比較して、Telomere 長の変化評価。

右図：食道がん患者を TNM 分類の M0 と 1 に分類し、健常者と比較して、G-tail 長の変化評価。

表 2. 使用した術前と術後の検体試料情報

Variable	Preoperative Case (n = 139)	Postoperative Case (n = 60)
Age	69.0 (63.0–74.0)	69.0 (65.0–73.8)
Gender		
Male	114 (82.0%)	47 (78.3%)
Female	25 (18.0%)	13 (21.7%)
Duration after operation		
within 6 months	-	39 (65.0%)
7–12 months	-	19 (32.0%)
13–16 months	-	1 (2.0%)
24 months	-	1 (2.0%)

データは、正規分布の変数については平均値および標準偏差、非正規分布の変数については中央値 (IQR)、カテゴリー変数については観測数 (%) として示した。-, not applicable.

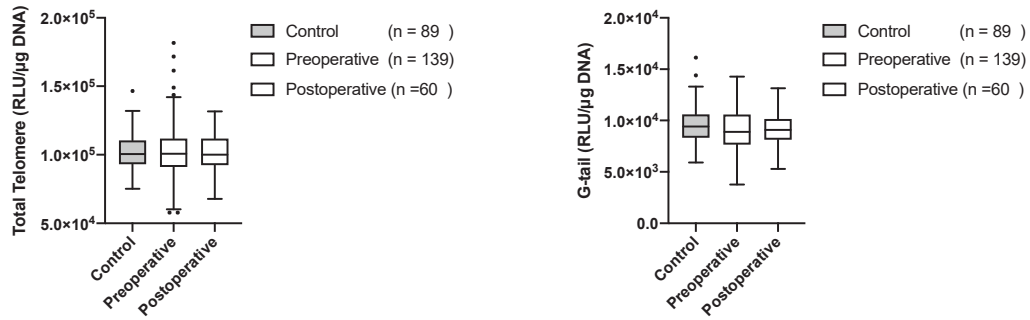


図 5-1. 術前後において、経時的な Telomere および G-tail 長の比較

左図：健常者と比較して、術前や術後といった経時的な Telomere 長の変化評価

右図：健常者と比較して、術前や術後といった経時的な G-tail 長の変化評価

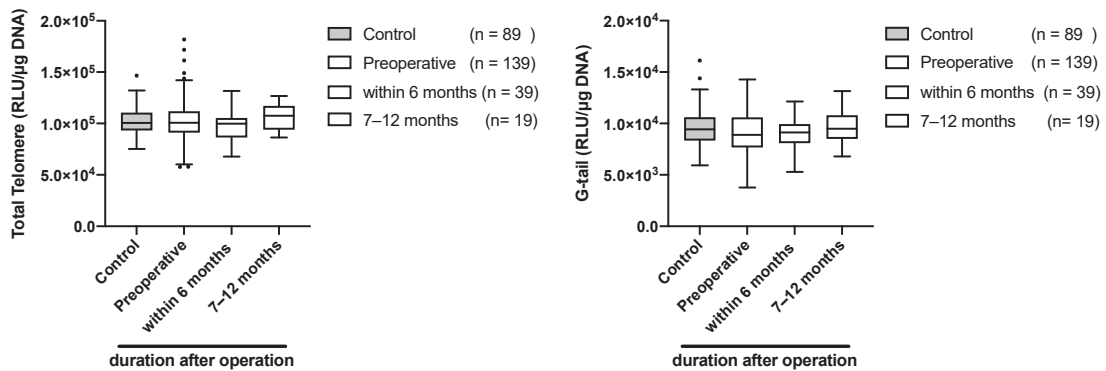


図 5-2. 食道がん患者の Telomere および G-tail と術後期間の長短との関係

左図：術後から経過時間を 9 日～6 ヶ月、7～12 ヶ月の 2 つのグループに分け、経時的な Telomere 長の変化評価。

右図：術後から経過時間を 9 日～6 ヶ月、7～12 ヶ月の 2 つのグループに分け、経時的な G-tail 長の変化評価。

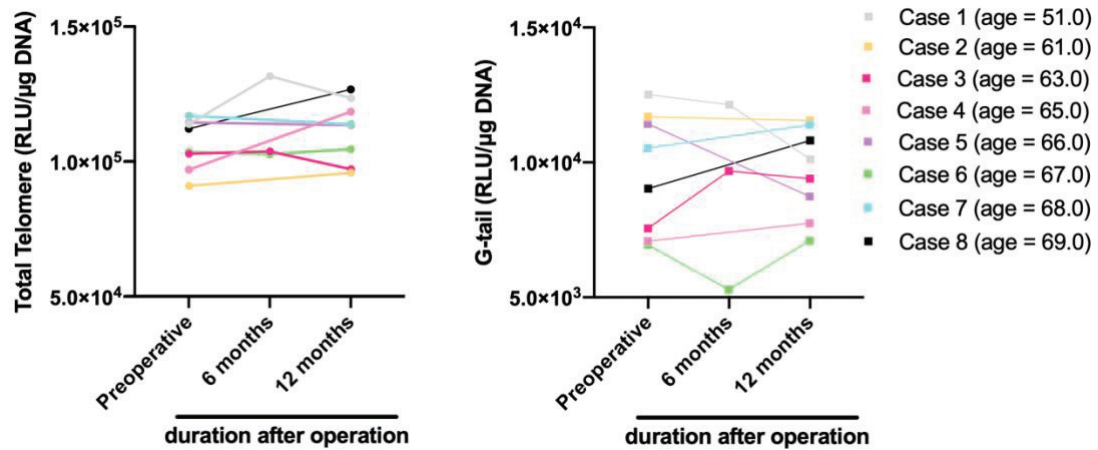


図 5-3. 術前後において、術後期間の長短による Telomere および G-tail 長の比較
 左図：同一患者の術前後において、術後から経過時間を 6 カ月と 12 カ月の 2 つのグループに分け、経時的な Telomere 長の変化評価。
 右図：同一患者の術前後において、術後から経過時間を 6 カ月と 12 カ月の 2 つのグループに分け、経時的な G-tail 長の変化評価。

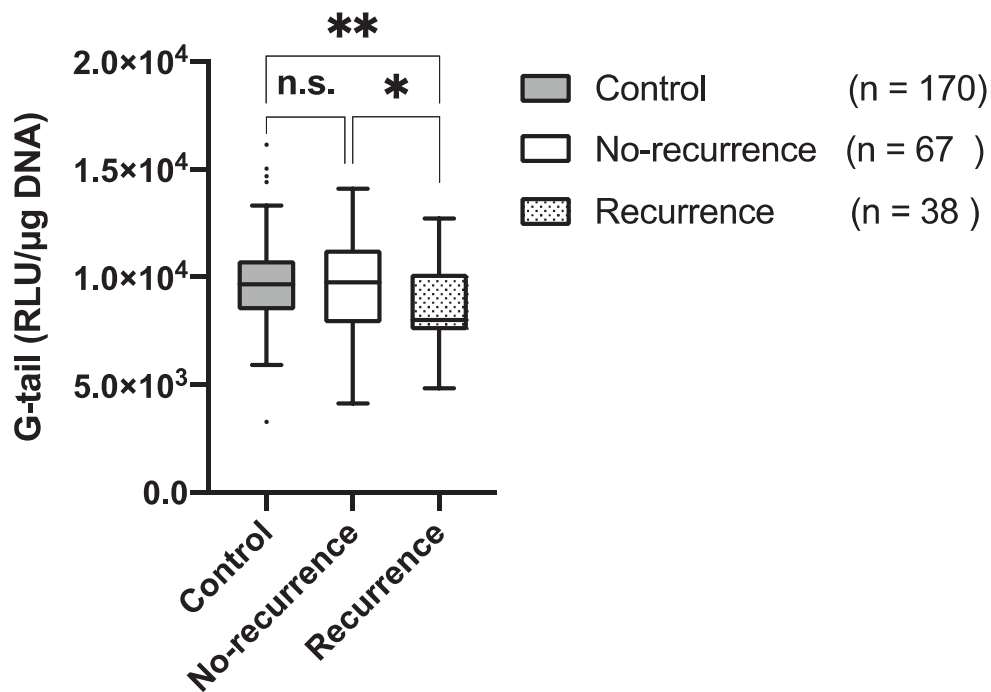
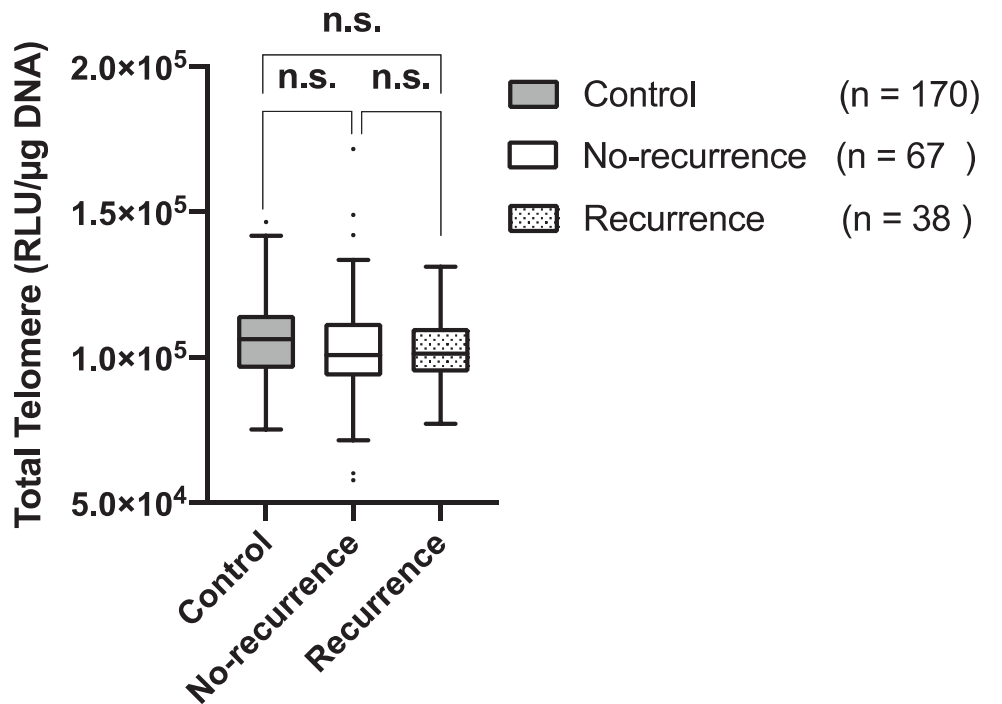


図 6. 食道がん患者の Telomere および G-tail と腫瘍再発との関係

上図：食道がん患者を非再発群と再発群に分類し、健常者に比べて Telomere 長の変化評価。

下図：食道がん患者を非再発群と再発群に分類し、健常者に比べて G-tail 長の変化評価。

Non-significant (n.s.) は $p \geq 0.05$ 、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示している。

4. 考察

4.1. 食道がんにおけるテロメア G-tail 長の短縮について

ESC に対する治療法は手術、化学療法、放射線療法、CRT など進歩しているが⁶、手術後の5年生存率が15-40%と、依然として予後不良である⁷。したがって、ESCの早期段階で迅速、かつ、非侵襲的な診断や治療効果、予後などを予測できるバイオマーカーの開発が求められる。本研究では、ESC患者の末梢血白血球由来 Telomere および G-tail 長を測定することで、診断に加え再発を評価できるバイオマーカーの開発を試みた。ESC患者と健常者の血液検体から DNA を精製し、HPA法を用いて Telomere および G-tail 長を測定し比較した。その結果、健常者と比較して ESC患者では G-tail 長が有意に短縮していた。加えて、G-tail 長の短縮は ESCの再発リスクと関連していることが観察された。これらの結果から、G-tail 長の評価は低浸潤、かつ、簡便な検査として、食道がんを早期に評価するリスク指標として利用できる可能性が示唆された。

G-tail はゲノムの安定性において重要な役割を担っており、Telomere や G-tail が短縮すると細胞老化を誘導することが知られている³⁵。したがって、Telomere や G-tail 長の短縮は、加齢性疾患の原因になると考えられている³⁶。我々の以前の研究でも、G-tail の短縮は、心血管疾患や乳がんなど様々な疾患の発症や進行と関連していることを報告している^{26,27}。本研究では、ESC患者と健常者のどちらの群においても G-tail 長は年齢と逆相関しており、加齢と共に短縮していくことが観察された。健常者に比べ、50歳以上の ESC患者における G-tail 長の短縮傾向はより急速であった。ESCの発症率が50~69歳で有意に増加していることを考慮すると³⁸、これらの結果は、G-tail の短縮が主に ESCの発症によって引き起こされていることを示唆された。

G-tail にはグアニン塩基の繰り返しがあり、毒性を持つ ROS (Reactive Oxygen Species) によって酸化され、G-tail 長の短縮につながるということが知られている³⁹。DNA酸化損傷は 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の生成を引き起こし、G-Tあるいは G-A トランスバージョン変異を引き起こす。加齢に伴う ROS の蓄積⁴⁰、または、ESCの既知のリスク因子の一つであるアルコール摂取によって ROS の過剰産生が^{41,42}、G-tail 長の短縮につながる可能性があると考えられる。健常者においても過度のアルコール摂取は G-tail 短縮を引き起こす可能性を考慮すると、ESC患者の G-tail 短縮をより正確に評価するためには、健常者と ESC患者のアルコール摂取レベルを調べる必要がある。

G-tail長は非再発群と再発群の間では有意に短縮しており、さらに、健常者群と再発群の間でも有意に短縮していることが観察されたが、Telomere長ではどの群でも有

意差は認められなかった。今後は再発前後において、G-tail長の変化をさらに検討する必要があるが、本研究から得られた結果はG-tail長の短縮がESC再発のリスク上昇と関連することが初めて示され、ESC再発の予測に有用なリスクマーカーとなる可能性が示唆された。

しかしながら、TelomereおよびG-tail長の評価で有意な差が見られず、短縮する傾向にあることがしばしば観察された（図 3-2., 3-3.）。統計学的有意性と臨床的有意性の両方を達成することが理想的であるが、白血球由来TelomereおよびG-tail長は疾患のドライバー遺伝子のように発現量が顕著に変動する可能性が低いいため、統計的有意差による偽陰性結果になった可能性があり、統計学的有意性よりも臨床的有意性を評価する必要がある。

4.2. 疾患によるテロメア G-tail 長の変動について

白血球由来 G-tail 長は疾患に伴う酸化ストレスや炎症によって短縮する可能性があるため³⁴、G-tail 長の測定は、疾患のリスクの評価することができる。しかしながら、G-tail の疾患特異性は低い。前述したとおり、白血球由来 G-tail 長の短縮は、心血管疾患や乳がんなど様々な疾患の発症や進行と関連していることが報告されている^{26,27}。

本研究では血球全白血球由来 Telomere および G-tail 長を評価した。しかしながら、血中白血球の数と分画は疾患によって変化することが知られている。例えば、糖尿病のサブタイプによってT細胞の構成が変動すること⁴³、心血管疾患において白血球の構成的変動は疾患リスクの上昇と相関することなどを報告されている⁴⁴。そのため、白血球の各分画において、G-tail 長の疾患特異性を見出す可能性がある。

4.3. テロメア G-tail 長を指標とした血液バイオマーカーの実用性について

ESC における既存の腫瘍マーカーとして、SCC 抗原や CEA (Carcinoembryonic) 抗原が使用されている⁴⁵。腫瘍マーカーの有用性により、患者の診断、予後、治療モニタリングの向上が期待されている⁴⁶。血清 SCC 抗原の異常上昇は食道切除術後の生存率の低下を伴う進行食道癌を予測することと⁴⁶、血清 CEA 抗原の異常上昇は食道癌細胞の転移能を反映することが報告されているが⁴⁷、これらの腫瘍マーカーは病気の進行に伴い発現していくため、腫瘍マーカーの血液濃度が低い時に ESC の早期診断に用いるには不可能である。一方、今回の研究により、G-tail 長の評価は ESC の再発予測に有用であることが示唆され、従来のマーカーと比較して、簡便で侵襲性が低く、早期から患者の体内状態を評価することができる。そのため、G-tail

や他の ESC 診断マーカーなどと組み合わせることで、より正確に ESC の診断や再発予測をすることが可能である。

細胞外に分泌された miRNA は血清、血漿などの体液中で安定して存在する。分泌型 miRNA は体液中を循環し、他の細胞に取り込まれることで、細胞間の様々なシグナル伝達に関与しているが報告されており⁴⁸、さらに、近年、がんなどの疾患の発症や悪化に miRNA が影響を与えることが明らかとなった⁴⁹。人の体液に含まれる分泌型 miRNA の種類やコピー数は、疾患の有無や病態の進行状況に応じた変化をするため、それらの解析が新規のバイオマーカーや治療法の開発につながるとして期待されている。我々の以前の研究で、血液中に分泌された miRNA プロファイルは食道がんと関連していることを報告している⁵⁰。また、がん患者の血液中には、CTCs は腫瘍組織から離脱して存在する。CTCs は患者のがんの特有の変異を共有し、個別化血液バイオマーカーとして注目され、CTCs や CTCs から分泌された DNA、RNA などのがん患者の体内状態を反映すると考えられている^{51,52}。過去の研究から、ESC において CTCs の有無は臨床的予後との関連が示され、CTCs は ESC の再発リスクを高める因子として報告された⁵³。

我々の研究結果から、G-tail 長の短縮は ESC 患者の体内状態を反映し、腫瘍の再発を早期に評価するリスク指標として利用できる可能性を見出した。しかしながら、G-tail 長は様々な疾患のリスク評価をできるが、疾患特異性は低いである。そこで、我々は G-tail 長と前述の分子の評価を組み合わせることで、より高感度、かつ、低浸潤性な食道がんの診療を可能にさせ、新規のバイオマーカーの開発が可能と考える。今後、より多くのサンプル数を用いることによって、G-tail 長の短縮と予後との相関や白血球各分画において G-tail 長の変化などについて、より多くのサンプル数を用いて詳細に検討していくことが必要である。

5. 参考文献

1. Enzinger, P.C.; Mayer, R.J. Esophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003, 349, 2241–2252.
2. Holmes, R.S.; Vaughan, T.L. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 2007, 17, 2–9.
3. Uhlenhopp, D.J.; Then, E.O.; Sunkara, T.; Gaduputi, V. Epidemiology of esophageal cancer: Update in global trends, etiology and risk factors. *Clin. J. Gastroenterol.* 2020, 13, 1010–1021.
4. Abnet, C.C.; Arnold, M.; Wei, W.Q. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* 2018, 154, 360–373.
5. Abbas, G.; Krasna, M. Overview of esophageal cancer. *Ann. Cardiothorac. Surg.* 2017, 6, 131.
6. Ohashi, S.; Miyamoto, S.; Kikuchi, O.; Goto, T.; Amanuma, Y.; Muto, M. Recent advances from basic and clinical studies of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* 2015, 149, 1700–1715.
7. Huang, F.L.; Yu, S.J. Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment. *Asian J. Surg.* 2018, 41, 210–215.
8. Rice, T.W.; Zuccaro, G., Jr.; Adelstein, D.J.; Rybicki, L.A.; Blackstone, E.H.; Goldblum, J.R. Esophageal carcinoma: Depth of tumor invasion is predictive of regional lymph node status. *Ann. Thorac. Surg.* 1998, 65, 787–792.
9. Tan, C.; Qian, X.; Guan, Z.; Yang, B.; Ge, Y.; Wang, F.; Cai, J. Potential biomarkers for esophageal cancer. *Springerplus* 2016, 5, 467.
10. Thamir, N.N.; Mohammed, F.G. Early Esophageal Cancer detection using Deep learning Techniques. *J. Phys. Conf. Ser.* 2021, 1963, 012066.
11. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection[J]. *Human genomics*, 2019, 13(1): 1-10.

12. Greider, C.W. Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 1996, 65, 337–365.
13. Blasco, M.A. Telomere length, stem cells and aging. *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 640–649.
14. Von Zglinicki, T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000, 908, 99–110.
15. Levy M Z, Allsopp R C, Futcher A B, et al. Telomere end-replication problem and cell aging[J]. *Journal of molecular biology*, 1992, 225(4): 951-960.
16. De Lange, T. T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 323–329.
17. De Lange, T. Shelterin-mediated telomere protection. *Annu. Rev. Genet.* 2018, 52, 223–247.
18. Tahara, H.; Kusunoki, M.; Yamanaka, Y.; Matsumura, S.; Ide, T. G-tail telomere HPA: Simple measurement of human single-stranded telomeric overhangs. *Nat. Methods* 2005, 2, 829–831.
19. Frenck, R.W., Jr.; Blackburn, E.H.; Shannon, K.M. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 5607–5610.
20. Granick, M.; Kimura, M.; Kim, S.; Daniali, L.; Cao, X.; Herbig, U.; Aviv, A. Telomere dynamics in keloids. *Eplasty* 2011, 11, e15.
21. Gardner, J.P.; Kimura, M.; Chai, W.; Durrani, J.F.; Tchakmakjian, L.; Cao, X.; Lu, X.; Li, G.; Peppas, A.P.; Skurnick, J.; et al. Telomere dynamics in macaques and humans. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2007, 62, 367–374.

22. Liu B, Anno K, Kobayashi T, et al. Influence of donor liver telomere and G-tail on clinical outcome after living donor liver transplantation[J]. Plos one, 2019, 14(3): e0213462.
23. Sanders D S, Wilson C A, Bryant F J, et al. Classification and localisation of carcinoembryonic antigen (CEA) related antigen expression in normal oesophageal squamous mucosa and squamous carcinoma[J]. Gut, 1994, 35(8): 1022-1025.
24. Sanders, J.L.; Newman, A.B. Telomere length in epidemiology: A biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol. Rev.* 2013, 35, 112–131.
25. Gampawar, P.; Schmidt, R.; Schmidt, H. Leukocyte Telomere Length is related to brain parenchymal fraction and attention/speed in the elderly: Results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Front. Psychiatry* 2020, 11, 100.
26. Koi, Y.; Tsutani, Y.; Nishiyama, Y.; Kanda, M.; Shiroma, Y.; Yamamoto, Y.; Sasada, S.; Akita, T.; Masumoto, N.; Kadoya, T.; et al. Diagnostic performance of peripheral leukocyte telomere G-tail length for detecting breast cancer. *Cancer Sci.* 2020, 111, 1856–1861.
27. Nezu, T.; Hosomi, N.; Takahashi, T.; Anno, K.; Aoki, S.; Shimamoto, A.; Maruyama, H.; Hayashi, T.; Matsumoto, M.; Tahara, H. Telomere G-tail length is a promising biomarker related to white matter lesions and endothelial dysfunction in patients with cardiovascular risk: A cross-sectional study. *EBioMedicine* 2015, 2, 960–967.
28. Baird DM. New developments in telomere length analysis. *Exp Gerontol* 2005; 40: 363-8.

29. Lansdorp P M, Verwoerd N P, Van De Rijke F M, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes[J]. *Human molecular genetics*, 1996, 5(5): 685-691.
30. *Telomeres and telomerase in cancer*[M]. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2009.
31. Aviv A, Kark J D, Susser E. Telomeres, atherosclerosis, and human longevity: a causal hypothesis[J]. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 2015, 26(3): 295.
32. Aubert G, Lansdorp P M. Telomeres and aging[J]. *Physiological reviews*, 2008, 88(2): 557-579.
33. Hirashio S, Nakashima A, Doi S, et al. Telomeric g-tail length and hospitalization for cardiovascular events in hemodialysis patients[J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2014, 9(12): 2117-2122.
34. Hirose, M.; Abe-Hashimoto, J.; Ogura, K.; Tahara, H.; Ide, T.; Yoshimura, T. A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997, 123, 337–344.
35. Ben-Porath, I.; Weinberg, R.A. When cells get stressed: An integrative view of cellular senescence. *J. Clin. Investig.* 2004, 113, 8–13.
36. Epel, E.S.; Blackburn, E.H.; Lin, J.; Dhabhar, F.S.; Adler, N.E.; Morrow, J.D.; Cawthon, R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 17312–17315.
37. Wennerström, E.C.M.; Risques, R.A.; Prunkard, D.; Giffen, C.; Corley, D.A.; Murray, L.J.; Whiteman, D.C.; Wu, A.H.; Bernstein, L.; Ye, W.; et al.

- Leukocyte telomere length in relation to the risk of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Cancer Med.* 2016, 5, 2657–2665.
38. Chen, H.Y.; Chen, I.C.; Chen, Y.H.; Chen, C.-C.; Chuang, C.-Y.; Lin, C.-H. The Influence of Socioeconomic Status on Esophageal Cancer in Taiwan: A Population-Based Study. *J. Pers. Med.* 2022, 12, 595.
 39. Kawanishi, S.; Hiraku, Y.; Oikawa, S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* 2001, 488, 65–76.
 40. Speakman, J.R.; Selman, C. The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *Bioessays* 2011, 33, 255–259.
 41. Radojicic, J.; Zaravinos, A.; Spandidos, D.A. HPV, KRAS mutations, alcohol consumption and tobacco smoking effects on esophageal squamous-cell carcinoma carcinogenesis. *Int. J. Biol. Markers* 2012, 27, 1–12.
 42. Kubo, N.; Morita, M.; Nakashima, Y.; Kitao, H.; Egashira, A.; Saeki, H.; Oki, E.; Kakeji, Y.; Oda, Y.; Maehara, Y. Oxidative DNA damage in human esophageal cancer: Clinicopathological analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and its repair enzyme. *Dis. Esophagus* 2014, 27, 285–293.
 43. Ratter-Rieck J M, Maalmi H, Trenkamp S, et al. Leukocyte counts and T-cell frequencies differ between novel subgroups of diabetes and are associated with metabolic parameters and biomarkers of inflammation[J]. *Diabetes*, 2021, 70(11): 2652-2662.
 44. Horne B D, Anderson J L, John J M, et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk?[J]. *Journal of the american college of cardiology*, 2005, 45(10): 1638-1643.

45. Yang, Y.; Huang, X.; Zhou, L.; Deng, T.; Ning, T.; Liu, R.; Zhang, L.; Bai, M.; Zhang, H.; Li, H.; et al. Clinical use of tumor biomarkers in prediction for prognosis and chemotherapeutic effect in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2019, 19, 526.
46. Kosugi S, Nishimaki T, Kanda T, et al. Clinical significance of serum carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 19-9, and squamous cell carcinoma antigen levels in esophageal cancer patients[J]. *World journal of surgery*, 2004, 28(7): 680-685.
47. Wentzensen I M, Mirabello L, Pfeiffer R M, et al. The Association of Telomere Length and Cancer: a Meta-analysisThe Association of Telomere Length and Cancer[J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2011, 20(6): 1238-1250.
48. Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., Lee, M.J., Galas, D.J. and Wang, K. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56, 1733-1741. 10.1373/clinchem.2010.147405.
49. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S. and Ghaffari, S. H. (2019) An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology* vol. 234.
50. Ibuki Y, Nishiyama Y, Tsutani Y, et al. Circulating microRNA/isomiRs as novel biomarkers of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0231116.
51. Azad, T.D.; Chaudhuri, A.A.; Fang, P.; Qiao, Y.; Esfahani, M.S.; Chabon, J.J.; Hamilton, E.G.; Yang, Y.D.; Lovejoy, A.; Newman, A.M.; et al. Circulating tumor DNA analysis for detection of minimal residual disease after

- chemoradiotherapy for localized esophageal cancer. *Gastroenterology* 2020, 158, 494–505.e6.
52. Ishiba, T.; Hoffmann, A.C.; Usher, J.; Elshimali, Y.; Sturdevant, T.; Dang, M.; Jaimes, Y.; Tyagi, R.; Gonzales, R.; Grino, M.; et al. Frequencies and expression levels of programmed death ligand 1 (PD-L1) in circulating tumor RNA (ctRNA) in various cancer types. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 500, 621–625.
53. Reeh M, Effenberger K E, Koenig A M, et al. Circulating tumor cells as a biomarker for preoperative prognostic staging in patients with esophageal cancer[J]. *Annals of surgery*, 2015, 261(6): 1124-1130.

6. 謝辞

本論文の実施および本論文の執筆にあたり、研究の着想から、実験指導、論文執筆まで多大なるご指導とご鞭撻をいただきました田原栄俊 教授(広島大学大学院医系科学研究科・細胞分子生物学研究室)、高橋陵宇 准教授(広島大学大学院医系科学研究科・細胞分子生物学研究室)、山本佑樹 助教(広島大学大学院医系科学研究科・細胞分子生物学研究室)に衷心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、多大なるご協力とご助言をいただきました岡田守人教授(広島大学原爆放射線医科学研究所 放射線災難医療研究センター・腫瘍外科/病院 消化器(食道)外科・呼吸器外科・乳腺外科)、広畑良輔 先生(広島大学原爆放射線医科学研究所 放射線災難医療研究センター・腫瘍外科/病院・消化器(食道)外科)、黒川知彰 先生(広島大学原爆放射線医科学研究所 放射線災難医療研究センター・腫瘍外科)に心より感謝申し上げます。

本研究の実施に際して、共に研究に努めてきました林壮一郎さん、田代水月さんに心より感謝いたします。

そして経済面で温かい支援してくださった公益財団法人八幡記念育英奨学会の皆様方に深く御礼申し上げます。

最後に、日本での学生生活において、お世話になった皆様に心より感謝申し上げますと共に、研究成果における哀歓を共に、支え励ましてくださった家族、親友、細胞分子生物学研究室内の皆様方に心より深謝いたします。