

【5】

氏 名	いけ だ ひろ ゆき 池 田 浩 之
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第622号
学位授与の日付	平成26年3月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (皮膚科学)
学位論文題目	Q-FISH measurement of telomere length in skin with/without sun exposure or actinic keratosis (Q-FISH法による日光曝露・非曝露皮膚および日光性角化症病変部位におけるテロメア長の測定)
論文審査委員	(主査) 教授 今 井 裕 (副査) 教授 妹 尾 正 教授 小 島 勝

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

テロメア機能不全に起因する染色体およびゲノムの不安定性が、発癌に重要な役割を果たすことが知られている。日光角化症（actinic keratosis：AK）とAK周辺非病変におけるテロメア短縮について検討するために、AK周辺非病変表皮とAKを伴わない露光および非露光表皮さらにAK病変部位表皮自体の基底細胞、傍基底細胞、基底上細胞のテロメア長を、定量的蛍光in situハイブリダイゼーション（quantitative fluorescence in situ hybridization：Q-FISH）法とオリジナルソフトウェア「Tissue Telo」を用いて測定した。

【目 的】

日光角化症は高齢者の主に露光部に生じる前癌病変であり、紫外線により基底層を中心にケラチノサイトが異常角化をきたし、表皮内で異型細胞が増殖する表皮内有棘細胞癌の早期段階とも捉えられている。一方、テロメアは染色体末端に存在し、細胞分裂ごとに短縮する。テロメアの短縮は染色体の不安定性を増加させ、癌の発生や老化と関連があると言われている。本研究は日光角化症、その発生源地、正常皮膚のテロメア長を測ることにより、日光曝露によるテロメア短縮への影響を明らかにすることを目的とする。

【対象と方法】

本研究では、獨協医科大学皮膚科に保存されている患者ファイルを調査し、2011年以降のデータを

もとに、背部 (n=11)、胸部 (n=2)、腹部 (n=1)、または大腿部 (n=1) の良性腫瘍 (表皮嚢胞 (n=12) または母斑細胞性母斑 (n=3)) を有する症例15例 (男性6例、女性9例、年齢62~77歳、平均69.3歳) からなる日光非曝露対照群、顔面 (n=10) または頸部 (n=4) の良性腫瘍 (表皮嚢胞 (n=7) または母斑細胞性母斑 (n=6)) を有する症例13例 (男性8例、女性5例、年齢61~96歳、平均72.1歳) からなる日光曝露対照群、および顔面 (n=17) または手背部 (n=1) にAKを有する症例18例 (男性7例、女性11例、年齢54~94歳、平均78.0歳) のAK病変群とAK周辺非病変群の4群を設定した。

日光非曝露対照群、日光曝露対照群、AK周辺非病変群、およびAK病変部におけるテロメア長をQ-FISH法とTissu Teloを用いて測定した。また、異型性を示さない表皮の下部に存在する線維芽細胞のテロメア長も測定した。

本研究は、獨協医科大学倫理委員会、東京都老人総合研究所倫理委員会による承認を得た。

統計解析はt-検定を用いて、4種類の細胞のNTCR (normalized telomere : centromere ratios : NTCR) 値を、3つのサンプル群の対応する細胞のNTCR値と比較した。すべての比較において、 $p < 0.05$ を有意差ありとみなした。

【結 果】

1) H&E切片

日光変性と上皮萎縮は、日光曝露された皮膚、AK周辺非病変群、及びAK病変皮膚で顕著に認められた。両対照群とAK周辺非病変群において異型変化は認められなかった。

2) 各組織群における基底細胞、傍基底細胞、基底上細胞のNTCRの比較

日光非曝露対照群、日光曝露対照群およびAK周辺非病変群の、基底細胞のNTCR値は3種類の細胞種の中で最も高い値を示すことはなかった。

3) 日光非曝露群、日光曝露群、AK背景群における3種類の表皮細胞間の比較

日光非曝露群における基底細胞のNTCR値は、日光曝露群 ($p=0.049$) およびAK周辺非病変群 ($p=0.020$) と比較して有意に高かった。日光非曝露群の基底細胞 ($p=0.020$)、傍基底細胞 ($p=0.008$)、および基底上細胞 ($p=0.032$) のNTCR値は、AK背景群の対応する細胞と比較して、いずれも有意に高い値を示した。一方、日光曝露群の基底細胞 ($p=0.335$)、傍基底細胞 ($p=0.053$)、および基底上細胞 ($p=0.080$) のNTCR値は、背景群の対応する細胞と比較して、いずれも有意差は認められなかった。

4) AK病変部の3種類の細胞と表皮細胞の比較

AK病変部位の基底細胞 ($p < 0.001$)、傍基底細胞 ($p=0.001$)、および基底上細胞 ($p=0.008$) のNTCR値は、日光非曝露対照群の対応する細胞と比較して、いずれも低値を示した。AK病変部位の基底細胞 ($p=0.011$) および傍基底細胞 ($p=0.013$) のNTCR値は、日光曝露対照群の対応する細胞と比較して低値を示した。また、AK病変部位の基底細胞 ($p=0.025$) のNTCR値は、AK周辺非病変群の基底細胞と比較して低値を示した。

5) 線維芽細胞の3群間における比較

線維芽細胞のNTCR値は、AK群と比較して、日光非曝露対照群 ($p=0.002$) および日光曝露対照群 ($p=0.003$) において高値を示した。

【考 察】

我々は日光に曝露されている皮膚は曝露されていない皮膚よりも短いテロメアを有していると予想したが、実際に、日光曝露部に多いAKおよびその周辺非病変部では、日光非曝露群よりテロメアは短かった。一方、基底細胞、傍基底細胞の日光曝露群とAK周辺非病変群のテロメア長に有意差は認められなかった。この結果について我々は、検討したサンプル数が少なかったためであると考えている。また、日光曝露に対する感受性および日光の累積効果に個人差があり、これらの要因がテロメア長に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

日光が表皮および真皮において過剰なテロメア短縮を誘導するメカニズムを詳細に明らかにするためには、今後、同一人物において、日光に曝露されている皮膚と曝露されていない皮膚におけるテロメア長とテロメラーゼ活性を測定する必要があると考えられる。

【結 論】

今回我々の結果は、日光照射がテロメアの短縮を引き起こし、組織学的異形性がなくともAKがテロメアの短縮した表皮から生じることを示唆した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

テロメア機能不全に起因する染色体およびゲノムの不安定性が、発癌に重要な役割を果たすことが知られている。申請論文は、日光角化症（actinic keratosis：AK）とAK周辺非病変におけるテロメア短縮について検討することを目的に、AK周辺非病変表皮とAKを伴わない露光および非露光表皮さらにAK病変部位表皮自体の基底細胞、傍基底細胞、基底上細胞のテロメア長を、定量的蛍光in situハイブリダイゼーション（quantitative fluorescence in situ hybridization：Q-FISH）法とオリジナルソフトウェア「Tissue Telo」を用いて測定している。

その結果、日光非曝露対照群、日光曝露対照群、ならびにAK周辺非病変群の表皮に異型性変化は認められず、これらの3種類の細胞のうち、基底細胞のテロメア長が最高値を示さなかったことから、組織幹細胞が基底細胞中に存在していない可能性が示唆された。日光曝露対照群における基底細胞のテロメア長は、日光非曝露対照群におけるそれよりも短かく、AK周辺非病変群、AK病変群、およびAK病変部位の線維芽細胞のテロメアは、対照群のテロメアと比較して有意に短かった。以上の結果から、日光曝露は表皮および真皮におけるテロメア短縮を誘導し、AKは組織学的異型性を示さないがテロメア短縮を示す表皮から発生すると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

本研究では、獨協医科大学皮膚科に保存されている患者ファイルを調査し、①背部、胸部、腹部、大腿部の良性腫瘍または母斑細胞性母斑を有する症例からなる日光非曝露対照群、②顔面、頸部の良性腫瘍または母斑細胞性母斑を有する症例からなる日光曝露対照群、③顔面または手背部にAKを有する症例のAK病変群、④AK周辺非病変群の4群を設定し、それぞれにおけるテロメア長をQ-FISH法とTissu Teloを用いて適切に測定している。また、研究目的を明確に設定し、AKとテロメア短縮

との関係を適切に評価し、t検定を用いて客観的な統計解析を行っている。以上より本研究方法は、妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

表皮においては、加齢または光老化が腫瘍形成に関連する重要な因子である可能性があると推測した。本研究は、食道および口腔粘膜において報告されているように、定量的にテロメア長を測定し、組織学的には細胞の異型性を示さずとも、テロメアの過剰短縮のある部位から前癌病変であるAKが発生することを明らかにした初めての研究である。この点において、本研究は新奇性、独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

本研究は、実証されている確立された実験手法と統計解析を用いて行われた。すでに様々な疫学調査などで紫外線と皮膚がん、前癌状態の関係について報告されているが、そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものでなく、皮膚科学、病理学、分子生物学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

テロメア機能不全に起因する染色体およびゲノムの不安定性が、発癌に重要な役割を果たしていることから、皮膚の日光曝露とテロメア短縮についての本研究は当該領域において重要な情報であり、光老化、テロメア研究に大いに寄与する大変意義深い研究として評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は皮膚科学の理論と臨床を学んだ上で、作業仮説を立て、研究計画を立案した後、適切に本研究を遂行し貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域において定評あるHuman Pathologyに掲載が受理されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Human Pathology

45 : 473-480, 2014