

論文内容要旨

研究目的

テロメアは染色体末端構造物で、ヒトにおいてはTTAGGGの繰り返し配列が約5kbから15kb続いている。このテロメアは一細胞分裂毎に短縮していくことが知られていると同時に、ヒト体細胞ではテロメアを伸長させるテロメラーゼの発現が認められない、又は微弱に認められるだけであるといわれている。このことよりヒト体細胞におけるテロメア長は、過去の細胞分裂回数を表す指標と考えられている。一方、潰瘍性大腸炎は、大腸粘膜を主座とする慢性炎症性疾患であり、その活動期において大腸粘膜細胞の細胞回転が速いことが知られている。そこで潰瘍性大腸炎長期経過例において大腸粘膜テロメアが短縮していないか確認することを目的として研究を行った。

研究結果（方法）

対象は直腸炎型を除いた潰瘍性大腸炎症例17例、その内2例が異型上皮巢を有する症例であった。非大腸炎症例（対照）として大腸癌患者17例であった。検体は、全例内視鏡下生検にて採取し、更に潰瘍性大腸炎3例においては手術標本より粘膜上皮細胞を調製して測定に供した。潰瘍性大腸炎症例では、緩解期罹患部直腸粘膜と非罹患部盲腸粘膜より採取しテロメア長の比較を、非大腸炎症例では非癌部正常直腸粘膜、盲腸粘膜より（腫瘍より5cm以上離して）採取しテロメア長の比較検討を行った。テロメア長の検討はterminal restriction fragments (TRFs) をサザンブロット法にて測定し、検出系は化学発光法を用いて行った。

各検体よりフェノール/クロロフォルム法によりDNAを抽出した。0.3%アガロースゲル電気泳動によりすべての精製DNAが高分子DNAであることを確認した。この精製DNAを制限酵素Hinf Iにて消化後、1%アガロースゲル電気泳動、ナイロンメンブランにトランスファー、テロメア特異的配列プローブでハイブリダイゼーションを施行した。メンブラン洗浄後、30分X線フィルムに曝写した。テロメアに相当するシグナルはスメア状であるため、デンシトメーターにて平均長を算出し、盲腸と直腸粘膜の比較を行った。また各症例で以下の短縮率を算出し、潰瘍性大腸炎群と非大腸炎群の比較を行った。

$$\text{短縮率 (\%)} = (1 - \text{rectal mean TRF length} / \text{cecal mean TRF length}) \times 100$$

テロメアの検出系の再現性について同一検体繰り返し測定にて検討した。その変動係数は4.3%と良好な再現性を示した。

また大腸粘膜におけるテロメラーゼ活性の測定を高感度測定系であるTelomeric Repeat

Amplification Protocol (TRAP) 法を用いて検討した。検体は、大腸癌患者 5 例の手術標本より正常粘膜を採取した。

研究結果

潰瘍性大腸炎患者 17 例における平均テロメア長 (TRF length) は、直腸粘膜で 7.87kb, 盲腸粘膜で 8.77kb であり、有意に直腸粘膜テロメア長が盲腸テロメア長に比較し短縮していた (Wilcoxon signed rank test, $p=0.0015$)。一方非大腸炎患者 17 例における平均テロメア長は直腸で 7.91kb, 盲腸で 7.97kb であり、有意な差を認めなかった (Wilcoxon signed test, $p=0.30$)。また短縮率について潰瘍性大腸炎群 (平均 10.6%) と非大腸炎群 (平均 0.8%) について比較すると、有意に潰瘍性大腸炎群にて短縮率の値が高いことが確認された (Mann-Whitney Utest, $p=0.0024$)。

潰瘍性大腸炎群のテロメア短縮率と罹患期間との相関関係は認められなかった。

潰瘍性大腸炎患者 17 例中 4 例において、著明な (短縮率 $>20\%$) 直腸粘膜テロメア長の短縮を認めた。その 4 例中 2 例が、異型上皮巣を有する症例であった。

また正常部大腸粘膜上皮を検体として、テロメラーゼ活性の発現を TRAP 法にて検討したところ、5 例ともにテロメラーゼ活性を確認できなかった。

研究の意義・独創的な点

潰瘍性大腸炎罹患部粘膜においてテロメアが短縮していることを確認した。この短縮は、大腸炎により粘膜構成細胞の細胞回転が速くなったことに起因すると考えられ、テロメア短縮の程度が、症例全経過の炎症の集積を表すと予想された。

審査結果の要旨

本論文は、潰瘍性大腸炎罹患部粘膜においてテロメアが短縮していることを明らかにした論文である。テロメアは染色体末端構造物で、テロメアを伸長させるテロメラーゼの発現が弱い状況下において、一細胞分裂毎に短縮していくことが知られている。テロメラーゼ活性が存在しないと信じられているヒト体細胞では、一細胞分裂毎に短縮すると予想されている。一方、潰瘍性大腸炎活動期粘膜において細胞回転が速くなっていることが知られており、潰瘍性大腸炎罹患部テロメア長は短縮していると仮説をたてた。

そこで本研究では、潰瘍性大腸炎罹患部直腸粘膜と同一症例の非罹患部盲腸粘膜におけるテロメア長を、対照として大腸癌症例における正常直腸粘膜と盲腸粘膜のテロメア長を比較検討した。更に現在最も高感度である検出系を用いてヒト大腸上皮細胞にテロメラーゼ活性を検出できるか検討した。

まず、大腸内視鏡下生検にて、各部位の粘膜を採取し、フェノール/クロロフォルム法にてDNAを精製した。DNAを制限酵素 *Hinf*I にて消化後、1%アガロースゲルにて電気泳動、さらにナイロンメンブランに転写した。テロメア特異的配列合成核酸をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行い、化学発光にてテロメアのシグナルを検出した。テロメアに相当するシグナルはスミア状であるため、平均長をデンストメーターにて算出し比較に用いた。この測定系は、同一検体繰り返し測定で変動係数 4.6%であった。テロメラーゼ活性の測定法は、Kimらの方法を用い、検体は大腸癌手術標本より正常粘膜を採取し用いた。また陽性コントロールとして大腸癌細胞株 T84 を用いた。

対照 17 例のテロメア長は、直腸粘膜で平均 7.91kb、盲腸粘膜で 7.97kb と有意差を認めなかった。一方、潰瘍性大腸炎 17 症例では、罹患部直腸で平均 7.87kb、非罹患部盲腸で平均 8.77kb と有意に直腸粘膜テロメア長が短縮していた (Wilcoxon signed rank test, $p=0.0015$)。また潰瘍性大腸炎群と対照群の各症例におけるテロメア短縮率を比較すると、有意に潰瘍性大腸炎群で高値を示した (Mann-Whitney *U* test, $p=0.0024$)。ヒト正常大腸粘膜 5 検体におけるテロメラーゼ活性の検討では、全例で活性を検出できなかった。

以上の成績より、テロメラーゼ活性の発現のない、又は低いヒト大腸粘膜において、慢性炎症による細胞分裂回数増加により罹患部粘膜テロメア長の短縮が起こると考察した。

本研究では、潰瘍性大腸炎罹患部粘膜においてテロメア長が短縮していることを明らかにした。この研究は、粘膜テロメア長測定が腸管局所の炎症持続や程度を評価する指標として有用であることを強く示唆し、臨床的に colitic cancer と慢性炎症を研究する際の有用なマーカーとなりえることを示唆した成績である。臨床研究の学位論文として、十分に値するものと判定する。