

原 著

大腸腫瘍における腫瘍組織テロメラーゼ活性に関する検討

¹東京女子医科大学中央検査部²東京女子医科大学東医療センター検査科³埼玉医科大学医学部生化学教室⁴東京女子医科大学総合研究所⁵東京女子医科大学東医療センター外科⁶東京女子医科大学東医療センター病理診断科⁷南千住病院

キクノ	アキラ	カトウ	ヒロユキ	コタニ	ノリヒロ	サカモト	テルヒコ
菊野	晃 ^{1,3}	加藤	博之 ²	小谷	典弘 ³	坂本	輝彦 ²
シミズ	サトル	オオツカ	ヒロコ	ヤマダ	リエコ	ナリタカ	ヨシヒコ
清水	悟 ⁴	大塚	洋子 ²	山田	理恵子 ²	成高	義彦 ⁵
フジバヤシ	マリコ	ワタナベ	シンイチロウ	ムラコシ	タカユキ		
藤林	真理子 ⁶	渡辺	伸一郎 ⁷	村越	隆之 ³		

(受理 平成28年7月4日)

Tumor Tissue Telomerase Activity in Colorectal Neoplasia

Akira KIKUNO^{1,3}, Hiroyuki KATO², Norihiro KOTANI³, Teruhiko SAKAMOTO²,
Satoru SHIMIZU⁴, Hiroko OTSUKA², Rieko YAMADA², Yoshihiko NARITAKA⁵,
Mariko FUJIBAYASHI⁶, Shin-ichiro WATANABE⁷ and Takayuki MURAKOSHI³

¹Department of Central Clinical Laboratories, Tokyo Women's Medical University²Department of Clinical Laboratory, Tokyo Women's Medical University Medical Center East³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Saitama Medical University⁴Medical Research Institute, Tokyo Women's Medical University⁵Department of Surgery, Tokyo Women's Medical University Medical Center East⁶Department of Diagnostic Pathology, Tokyo Women's Medical University Medical Center East⁷Minamisenjyu Hospital

In order to investigate the significance of telomerase activity in colorectal adenoma (a precancerous lesion) and early colorectal cancer, we measured the telomerase activity of the tumor tissue and normal mucosa of 29 patients who had been treated endoscopically for a colorectal tumor, i.e., 17 patients treated for an adenoma (low-grade atypia in 7 cases and high-grade atypia in 10 cases) and 12 patients treated for an early colorectal cancer (mucosal cancer in 8 cases and submucosal cancer in 4 cases). The resected specimens were used to make a pathological diagnosis and to measure the telomerase activity of the lesion and normal mucosa by real-time PCR performed with a quantitative telomerase detection kit.

Telomerase activity (mean \pm SD) in the normal mucosa and tumor tissue was 0.054 ± 0.064 amol/ μ g protein and 0.472 ± 0.526 amol/ μ g protein, respectively, and it was significantly higher in the tumor tissue ($p < 0.05$). Telomerase activity in the normal mucosa was low, but detectable. The results of a ROC analysis showed that the optimal cut-off telomerase activity level for distinguishing between normal mucosa and tumor tissue was 0.146

amol/ μ g protein. Telomerase activity in the adenoma tissue was 0.468 ± 0.502 amol/ μ g protein, and was almost same as the 0.476 ± 0.580 amol/ μ g protein, in the early colorectal cancer tissue. There were no significant correlations between telomerase activity and gender, age, tumor location, macroscopic type, or tumor size, but there was a weak correlation between age and telomerase activity in the adenomatous tissue.

These findings suggest that telomerase activity is upregulated in the adenomatous stage before colorectal cancer and that tumor immortalization is about to begin at this stage, irrespective of any other clinicopathological factors.

Key Words: telomerase activity, quantitative telomerase detection kit, colorectal tumor, early colorectal carcinoma, colorectal adenoma

緒 言

「細胞分裂時計 (mitotic clock)」と呼ばれる染色体末端のテロメア配列はヒトでは TTAGGG の塩基配列の繰り返しで、その長さは 2~15 kb 程度である。正常細胞では 1 回の細胞分裂、つまり DNA 複製に伴い 50~200 塩基が短縮し、十分に短くなると細胞は分裂を停止しアポトーシスに陥る。そのため、正常細胞では細胞寿命が存在する。

一方、生殖細胞やがん細胞ではテロメアを伸長する酵素であるテロメラーゼが発現する。テロメラーゼは、テロメア反復配列の G 連続部分を認識し、これを起点に反復配列を 5'→3' 方向に伸長する。したがって、特にがん細胞では細胞分裂を繰り返してもテロメアが短くならず、長いままのテロメア配列が維持できるため、テロメア短縮による細胞寿命は、短縮するとされる。

これらテロメラーゼ活性と各種がん形質の関連性については、多くの医学研究が行われてきた。テロメラーゼ活性測定は、従来より telomeric repeat amplification protocol (TRAP) アッセイ¹⁾や ELISA 法^{2,3)}が用いられている。これらは測定に時間がかかり、煩雑かつ特殊な装置が必要である上、解析に必要な組織量が多いため、臨床研究においては患者への負担も多いなどの欠点があった。これに対し、テロメラーゼ活性測定にリアルタイム PCR を用いる測定法が近年開発された^{4,5)}。本法は、簡便かつ迅速に結果が得られ、コンタミネーションのリスクが低く、高感度で広いダイナミックレンジ解析ができる。この理由より、上記既存法の弱点を克服し、患者組織を使用した臨床研究が容易に実施出来るようになった。

大腸癌組織のテロメラーゼ活性測定と診断についての研究は数多く報告されており^{1,3)}、他の癌と同様にテロメラーゼ活性は高いことでコンセンサスが得られている⁶⁾。また、大腸癌には腺腫という前癌病変

が存在し、遺伝子の変異が蓄積して異型度が増すことでがん化が起こり、さらなる変異で転移能を獲得するようになるという multi-hit theory が提唱されている⁷⁾。前癌段階である大腸腺腫の段階でのテロメラーゼ活性レベルが、どのようになっているのかは、癌の発生の上でも重要と考えられる。しかし、従来の TRAP 法を用いた研究ではテロメラーゼ活性について定量的に測定できず、10 mm から 20 mm の大腸腺腫でも 20% 程度の陽性率でしかなかったとの報告がある⁸⁾。また、異型度が増すにつれ段階的にテロメラーゼ活性を獲得していくが、テロメラーゼ RNA コンポーネントの発現は、腺腫の時点ですでに起こっているとの報告もあり⁹⁾、大腸癌発生段階でのテロメラーゼ活性については議論の多いところである。

今回われわれは、定量的な測定が可能である SYBR Green I を利用したリアルタイム PCR によるテロメラーゼ活性測定法を用いて、主に内視鏡的治療標本から得られた大腸腺腫と早期大腸癌の病変組織と正常粘膜のテロメラーゼ活性値を解析し、腫瘍の臨床病理学的特徴とテロメラーゼ活性値の関連性を検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

東京女子医科大学東医療センターで内視鏡的に大腸腫瘍と診断され、文書で同意の得られた大腸腫瘍患者 29 例 (男性 21 例, 女性 8 例, 平均年齢 66.8 歳) である (Table 1)。大腸腫瘍の肉眼型は、隆起型 20 例, 表面型 9 例で、切除標本の病理学的診断による内訳は、良性腫瘍 17 例 (低異型度腺腫 7 例, 高異型度腺腫 10 例), 早期大腸癌 12 例 (粘膜内癌 8 例, 粘膜下層浸潤癌 4 例) である¹⁰⁾。上記のうち、良性腫瘍および粘膜内癌の全例, 粘膜下層浸潤癌の 2 例は、内視鏡的摘除標本の腫瘍部分と正常粘膜部分を採取し、内視鏡的摘除不能であった粘膜下層浸潤癌の 2

Table 1 Patients' clinicopathological characteristics

Characteristics	Number of the patients
Sex	
Male	21
Female	8
Age	
-49 (yr)	4
50-69	11
70-	14
(Average 66.8 yr)	
Location	
Right colon	13
Left colon	13
Rectum	3
Macroscopic type	
Elevated type	20
Superficial flat type	9
Diameter of the tumor (mm)	
10-20	8
21-30	14
31-	7
Histologic type	
Tubular adenoma high-grade	7
Tubular adenoma low-grade	10
Carcinoma (M)	8
Carcinoma (SM)	4

例は、生検で腫瘍部分と正常粘膜部分を採取し分析のための標本とした。内視鏡的に採取した標本は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で血液成分を可及的に洗浄したのち、直ちに -20°C のフリーザーで凍結保管した。

なお、本研究は埼玉医科大学倫理委員会 (承認番号 750-II) および東京女子医科大学倫理委員会 (承認番号 2939-R2) の承認を得ている。

2. 方法

1) 組織の溶解

内視鏡的治療により得られた腫瘍組織 10 mg と正常粘膜組織 10 mg それぞれに Quantitative Telomerase Detection キット (Allied Biotech, 以下 QTD キット)¹¹⁾¹²⁾ 中の Lysis Buffer 50 μl を入れ、30 分水上で放置後、12,000 rpm, 4°C , 30 分で遠心し、上清を採って検体溶液とした。

2) BCA 法によるタンパク質量の測定・調整

検体溶液は Reducing Agent Compatible キット (Thermo 社) を用いて、キット中のビスニコニン酸 (Bicinchoninic acid) 試薬と混和し、 37°C , 30 分恒温槽でインキュベートし、Nano-drop2000 (Thermo 社) を用い波長 562 nm における吸光度を測定し、スタ

ンダーの標準直線からタンパク質濃度を求めた。すべての検体のタンパク質量は、Lysis Buffer をもちいて希釈し、500 ng/ μl に調整した。

3) テロメラーゼ活性値の測定

QTD キット中の Pre-mix 12.5 μl , 組織上清検体 1 μl と水 11.5 μl をチューブに入れ、96 ウェルトレイに 20 μl ずつ分注し、Step One Plus (Applied Biosystems, 以下 StepOne) で 25°C , 20 分間テロメア伸長反応を行った。次に伸長したテロメアを SYBR Green I によるインターカレーション法を用いたりアルタイム PCR 法で増幅した。PCR の条件は初期熱変性を 95°C , 10 分, サイクリングは、熱変性を 95°C , 30 秒, アニーリングを 60°C , 30 秒, 伸張反応を 72°C , 30 秒で 40 サイクルとした。増幅曲線に Threshold Line を引き交点を Ct 値とした。

検体と同時に QTD キット中のテロメアプライマーに類似した連鎖を持つオリゴヌクレオチドである標準物質 (TSR : 0.5 amol/ μl) の Lysis Buffer で希釈した液を用いて増幅を行い、標準曲線を作製した。最後に検体の Ct 値を標準曲線にプロットし、検体のタンパク質量あたりのテロメラーゼ活性値 (amol/ μg protein) を求めた。

4) 測定結果の評価

分析結果から同一症例の腫瘍組織と正常粘膜組織のテロメラーゼ活性値を比較検討した。次に、腫瘍におけるテロメラーゼ活性値のカットオフ値を、各腫瘍組織と正常粘膜組織の値から ROC 曲線 (Receiver Operating Characteristic curve) を用いて設定した。

続いて、臨床病理学的因子別にテロメラーゼ活性の活性値と陽性率に関しての評価を行った。腫瘍組織型は、病理学的所見により、低異型度腺腫、高異型度腺腫、粘膜内癌、粘膜下層浸潤癌に分け、腫瘍組織のテロメラーゼ活性値を比較検討した。また、大腸腫瘍におけるテロメラーゼ活性値と年齢の関係については、ピアソン法で相関性を検討した。

統計学的処理は平均値 \pm 標準偏差または 95% 信頼区間で記載し、同一症例の腫瘍細胞と正常細胞のテロメラーゼ活性値の比較は、マッチドペアでの t 検定、臨床病理学的因子別の比較では、2 群間は Wilcoxon 検定、3 群の比較には分散分析 (ANOVA)、陽性率の比較にはカイ 2 乗検定を用いて検討し、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。なお、統計処理ソフトは JMP11 (SAS 社) を使用した。

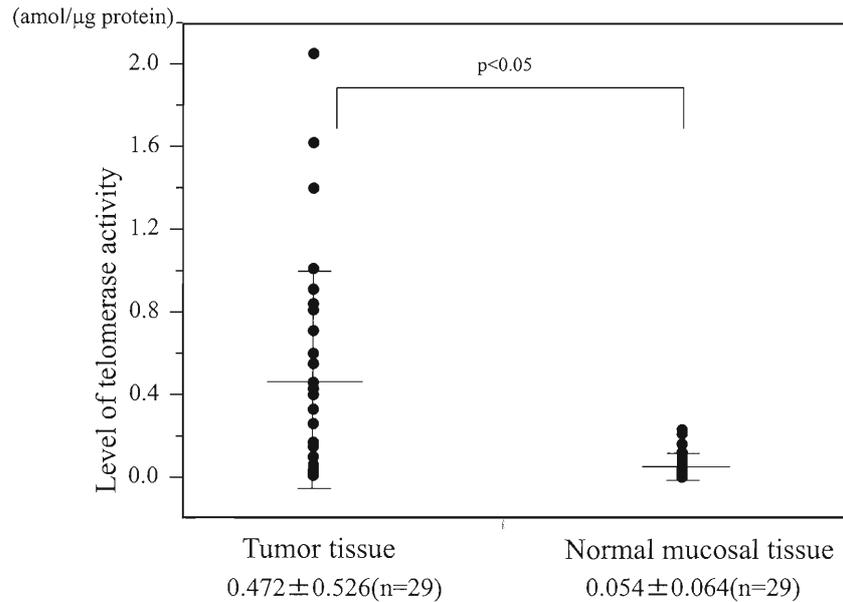


Fig. 1 Telomerase activity of tumor tissue and normal mucosal tissue Bars depict the mean \pm SD
Significant difference between tumor and normal mucosa was detected by the t-test of matched-pair analysis.

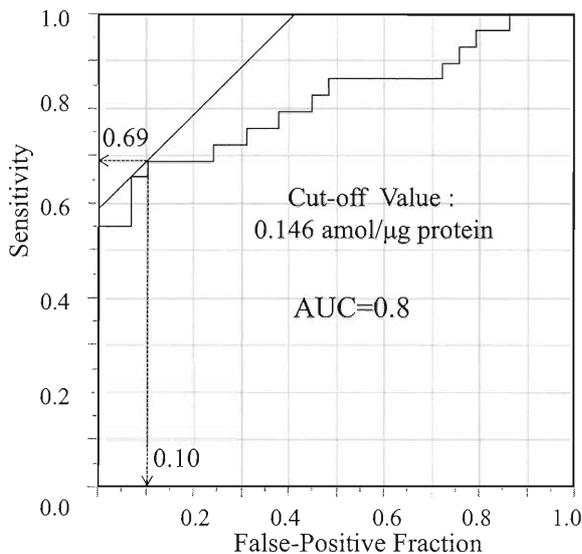


Fig. 2 ROC curve by the telomerase activity of tumor tissue and normal mucosal tissue

結 果

大腸腫瘍患者 29 例の大腸腫瘍組織と正常粘膜組織のテロメラーゼ活性値を測定した結果、腫瘍組織では 0.472 ± 0.526 amol/ μ g protein で、正常粘膜組織では 0.054 ± 0.064 amol/ μ g protein であり、テロメラーゼ活性値は正常粘膜組織に比べ腫瘍組織では約 10 倍程度高く、両群間で有意差が認められた ($p < 0.05$) (Fig. 1).

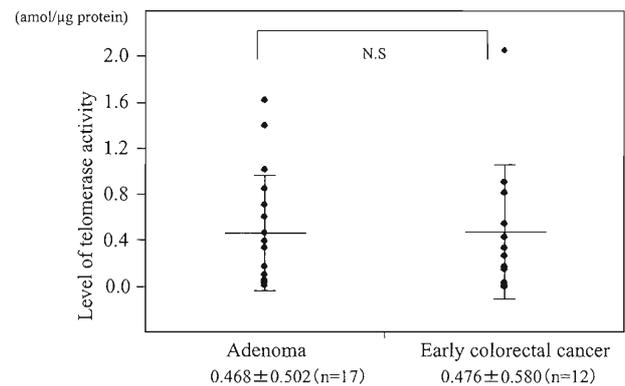


Fig. 3 Telomerase activity value of colorectal adenomas and early colorectal cancer
Bars depict the mean \pm SD. Difference was not detected by Wilcoxon-test.

腫瘍組織のテロメラーゼ活性値と正常粘膜組織のテロメラーゼ活性値から ROC 曲線を描くと、カットオフ値として 0.146 amol/ μ g protein が設定でき、1-特異度 (偽陽性率) は 0.10 、感度は 0.69 、AUC 値は 0.8 であり、比較的特異度の高い結果となった (Fig. 2).

腫瘍組織を腺腫および早期大腸癌の 2 群に分類し比較したところ、腺腫ではテロメラーゼ活性値は 0.468 ± 0.502 amol/ μ g protein、陽性率は 65.0% で、早期大腸癌では、それぞれ 0.476 ± 0.580 amol/ μ g protein、 75.0% であり、2 群間には有意差はなかった (Fig. 3). さらに、病理学的に低異型度腺腫、高異型

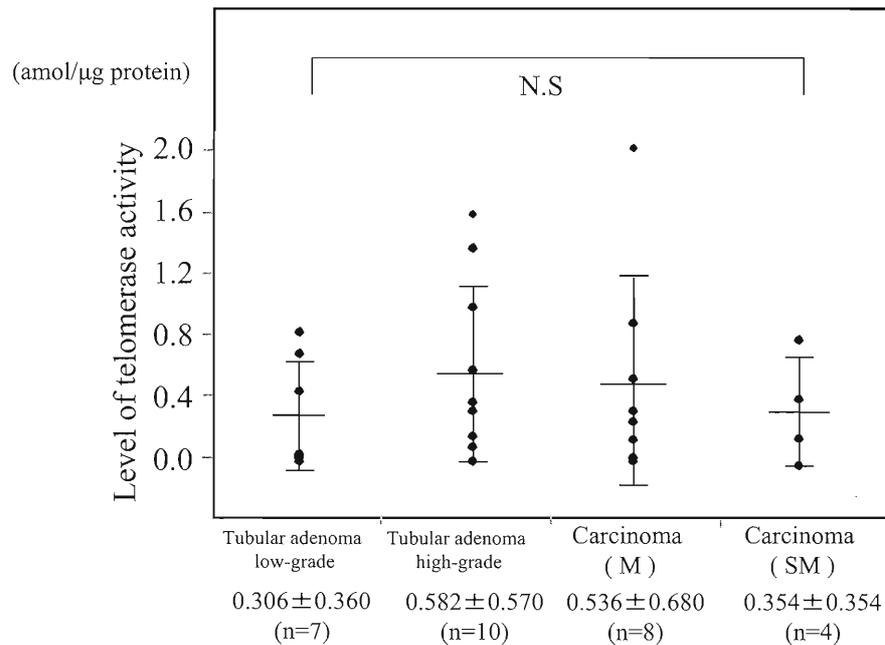


Fig. 4 Pathological classification and telomerase activity value
 Bars depict the mean ± SD. Significant difference was not detected by analysis of variance (ANOVA).

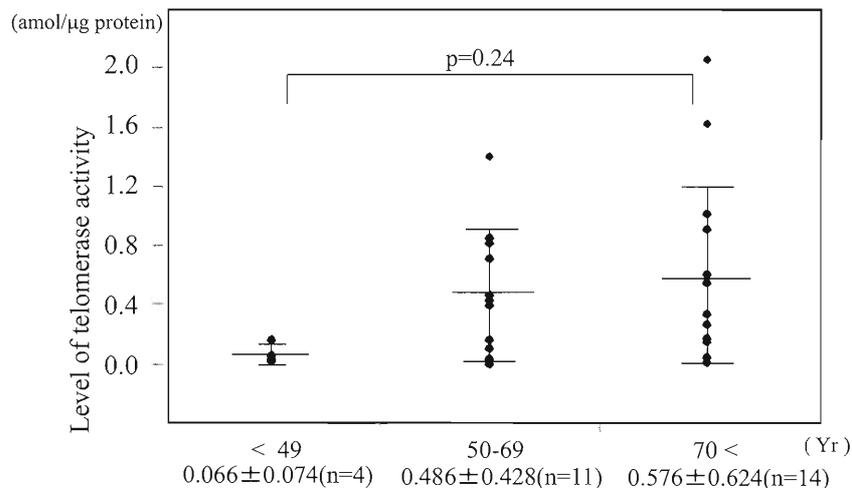


Fig. 5 The relationship of telomerase activity and generation
 Bars depict the mean ± SD. Significant difference was not detected by analysis of variance (ANOVA).

度腺腫, 粘膜内癌, 粘膜下層浸潤癌に分けても, テロメラーゼ活性値, 陽性率ともに差はなかった (Fig. 4).

また, 年齢, 性別, 肉眼形態, 腫瘍の大きさ, 占居部位でそれぞれ, テロメラーゼ活性値, 陽性率を検討したが差はなかった (Fig. 5, Table 2). 年齢においては, 高齢者でテロメラーゼ活性がやや高い傾向があったので, さらにテロメラーゼ活性値と年齢の関係についてピアソン法で相関性を検討した. 結果, 年齢とテロメラーゼ活性値の相関は, 腺腫では相関

係数 0.44 で相関関係を認めたが, 早期大腸癌では -0.07 であり, 相関関係はなかった (Fig. 6).

考 察

大腸癌は, 2013 年の統計によると, 本邦のがんの部位別死亡率において女性で 1 位, 男性で 3 位であり, その対策が急がれている¹³⁾. 大腸癌の治療成績は他のがんと同様に早期癌では良好であり, Stage が進行するにつれ 5 年生存率は悪くなるので, 早期発見・早期治療が重要である. また, 大腸癌では正常

Table 2 Level of telomerase activity and positive rate

	Number of the patients	Level of telomerase activity (mean \pm SD)	Median value	p-value	Positive rate
Gender					
Male	21	0.452 \pm 0.550	0.264	N.S	67 %
Female	8	0.524 \pm 0.486	0.428		75 %
Macroscopic type					
Elevated type	9	0.552 \pm 0.740	0.166	N.S	56 %
Superficial flat type	20	0.436 \pm 0.414	0.332		75 %
Diameter of the tumor (mm)					
10-20	8	0.370 \pm 0.282	0.382	N.S	75 %
21-30	14	0.422 \pm 0.490	0.216		64 %
31-	7	0.686 \pm 0.778	0.460		71 %
Location					
Right colon	13	0.508 \pm 0.550	0.332	N.S	62 %
Left colon \cdot Rectum	16	0.442 \pm 0.522	0.300		75 %

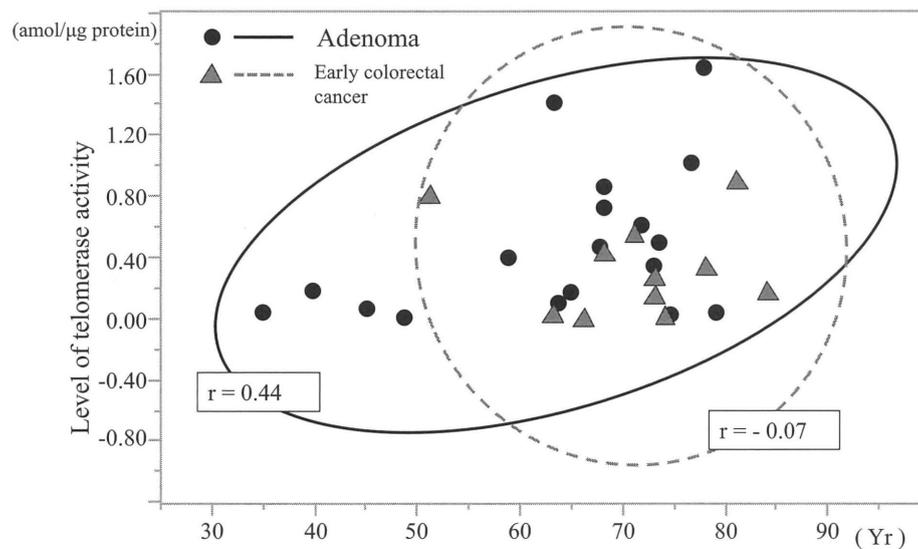


Fig. 6 The relationship between age and the telomerase activity value
Weak correlation between age and telomerase activity values in adenoma group was detected by Pearson method, but not in early colorectal cancer group.

粘膜から腺腫，そしてがん化へ段階的な病理学的変化が起こると考えられている。そして腺腫もしくは早期癌の段階で発見することにより低侵襲な内視鏡治療を行うことは，大腸癌の治療成績の向上や患者のQOL向上の面からも非常に重要とされている¹⁴⁾。本研究では，予防的腺腫摘除の妥当性を考える上での一つの知見を得るため，腺腫を含む大腸腫瘍とテロメラーゼ活性に注目し検討した。

テロメアは染色体末端にある特殊な構造を持つDNAの繰り返し配列で，染色体の融合や変質を防ぎ安定化に重要な役割をもつ¹⁵⁾。ヒト細胞のテロメアは，DNA3'末端のTTAGGG塩基配列の繰り返しである。DNAポリメラーゼは3'末端のDNAを完全

に複製できないため，細胞分裂のDNA複製時にテロメアが短縮していく¹⁶⁾。ある程度短縮するとテロメアを保護するタンパク複合体であるシュルテリンが機能できずアポトーシスが起き細胞死が起こるとされている¹⁷⁾。しかし，がん細胞ではテロメアを伸長する酵素であるテロメラーゼを発現することにより，細胞分裂を安定化していると言われている。したがって，がんの増殖にとってテロメラーゼ活性の獲得は，がん細胞がいわゆる不死化を起し増殖をし続けるために重要である。

大腸癌におけるがん化やその進展には様々な分子経路が考えられており，多くの遺伝子やエピジェネティックな変化が関わる。例えば，がん抑制遺伝

子である adenomatous polyposis coli (APC) や *p53* の機能障害, *K-ras* のようながん遺伝子の機能獲得といった多段階の遺伝子変化が関与しているといわれている¹⁸⁾¹⁹⁾。その過程で, 大腸腫瘍が細胞分裂を安定的に行うことに寄与するテロメラーゼ活性の獲得は, どのようなメカニズムで, どの時点で起こるのか議論のあるところである。Engelhardt ら⁷⁾および Tang ら⁸⁾は大腸癌と大腸正常粘膜組織のテロメア長とテロメラーゼ活性を測定し, 正常粘膜組織ではテロメラーゼ活性はみられないこと, 大腸癌ではポリプや炎症組織よりテロメア長は短縮し, テロメラーゼ活性は高い値であり, さらに進行癌の方が早期癌よりテロメラーゼ活性が高いと報告している。従来の TRAP 法による測定では, 腺腫の段階ではテロメラーゼ活性はあるが陽性率は少なく, 浸潤がんになると高くなるとの報告が多い⁷⁾⁸⁾。すなわち, 腺腫の段階では不死化の獲得を示唆する所見は少ないというのが定説であった。

今回われわれは, 感度が高く, わずかな活性値も測定可能である QTD キットを用いたリアルタイム PCR 法で大腸腺腫と早期癌の 29 例の腫瘍組織と正常粘膜のテロメラーゼ活性値を測定した。大腸正常粘膜において平均 0.054 amol/ μ g protein と低い値であるが, わずかに活性値が検出された。Hiyama ら²⁰⁾もヒトの正常腸管粘膜の下 1/3 の腺管に局在してテロメラーゼ活性が存在すると報告しており, これは腸管幹細胞由来と推測されている。また, 大腸腫瘍 29 例のテロメラーゼ活性は 0.472 amol/ μ g protein と正常粘膜組織の 10 倍近くであり, 有意に高かった。

定量法によるテロメラーゼ活性値には, これまで腫瘍判別のカットオフ値が設定されていないため, ROC 曲線を用いて検討したところ, 腫瘍と正常粘膜の間に 0.146 amol/ μ g protein という値が便宜的に設定できた。このカットオフ値は, 正常粘膜の平均値の約 3 倍弱で, 腫瘍判別の特異度 90%ということになる。腫瘍部を腺腫と早期大腸癌の 2 群でそれぞれのテロメラーゼ活性を比較すると, 腺腫でもテロメラーゼ活性は平均 0.468 amol/ μ g protein と高く, 陽性率は 65.0%であり, 早期大腸癌組織のテロメラーゼ活性 0.476 amol/ μ g protein (陽性率 75.0%)と比較しても差がないことが分かった (Fig. 3)。対象にした腺腫は, 10 mm 以上であったが, 内視鏡的摘除の対象となるレベルの腺腫において, すでに高頻度にテロメラーゼ活性が十分高くなっていた。これま

での報告では⁷⁾⁸⁾, 腺腫ではテロメラーゼ活性がない, もしくは弱く検出されるという報告が多かったが, 早期大腸癌の活性とほぼ同じ活性が検出されたことは興味深い点である。Naito らは, 異型度が増すにつれ段階的にテロメラーゼ活性を獲得していくが, テロメラーゼ RNA コンポーネントの発現は, 腺腫の時点ですでに起こっており, 異型度が増しても変わらない, と報告している⁹⁾。また, human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の値はテロメラーゼ活性の信頼できるマーカーとされているが, リアルタイム PCR 法を用いて測定された hTERT の値は, 正常大腸粘膜に比較して有意に大腸腫瘍で高値であり, 腺腫と癌との差はないと報告されており²¹⁾, 腺腫の時点でテロメラーゼに変化が出ていることは, 確かであると考ええる。

また患者の性別, 肉眼形態, 腫瘍の大きさおよび占居部位に関してテロメラーゼ活性とは関連がなかった。年齢が高齢になると体細胞のテロメア長は短くなるとされており, 高齢者では, テロメラーゼ活性が賦活されやすいと考えられる。年齢ごとに腫瘍のテロメラーゼ活性をみると高齢の方が高い傾向にあった。そこで, 腺腫と早期癌に分けて年齢とテロメラーゼ活性値との相関をみると, 早期癌では年齢とテロメラーゼ活性との関連はなかったが, 腺腫では, 弱い相関が認められた。高齢者の腺腫発生においては, テロメラーゼ活性は上昇しやすい傾向が考えられたが, 症例数が少ないので, 更なる検討が必要であると考ええる。

このように, 大腸腫瘍においては, 腺腫の時点で正常粘膜組織と比較して有意に高いテロメラーゼ活性を持っているがその他の因子とは関連がないことが分かった。これは, 大腸癌の発生過程を考える上で, 腫瘍として発生した腺腫はすでに不死の状態を獲得する準備ができていることが示唆された。腺腫は細胞分裂を繰り返してもアポトーシスに陥ることなく, その状態で大きくなり, さらに遺伝子異常が蓄積されるにつれてその異型度が増しがん化するという, Vogelstein ら²²⁾の Adenoma-Carcinoma sequence の概念を裏づける結果と考えられた。Nishihara ら²³⁾は, 約 87,000 名を対象とした 22 年にわたるコホート研究により大腸癌の内視鏡検診受診者は未受診者よりも大腸癌の死亡率が低く, さらに腺腫性ポリプを切除した群は大腸内視鏡検査を受けない群に比較し大腸癌の死亡リスクが 43%低いと報告している。また, 近年患者への身体的負担が軽いとさ

れる EMR (内視鏡的粘膜切除術)¹⁴⁾²⁴⁾ や ESD (内視鏡的粘膜下層剥離術) など²⁵⁾ の内視鏡技術が進歩し、大きな腺腫性ポリープや早期大腸癌でも安全、確実な治療が可能となってきた。腺腫の時点でテロメラーゼ活性が高くなり、すでに不死化が始まっていると考えると、腺腫や早期大腸癌に対する内視鏡的治療法は、妥当性のある予防的治療法となることが強く示唆された。

結 論

大腸腫瘍患者 29 例の正常組織と腫瘍組織のテロメラーゼ活性値を測定した結果、テロメラーゼ活性は大腸腺腫ですでに高く、年齢、病理組織や大きさに関わらず腫瘍の不死化の準備が始まっていることが示唆された。

開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) **Ishibashi K, Hirose K, Kato H et al:** Determining the telomerase activity of exfoliated cells in intestinal lavage solution to detect colorectal carcinoma. *Anticancer Res* **19**: 2831-2836, 1999
- 2) **Hoos A, Hepp HH, Kaul S et al:** Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer* **79**: 8-12, 1998
- 3) **Izgi A, Gunal A, Gunduz U:** Significance of Telomerase Activity and Gene Expression in Colorectal Cancer. *Research In Cancer and Tumor* **2**: 49-56, 2013
- 4) **Akare S, Jean-Louis S, Chen W et al:** Ursodeoxycholic acid modulates histone acetylation and induces differentiation and senescence. *Int J Cancer* **119**: 2958-2969, 2006
- 5) **Lança V, Zee RY, Rivera A et al:** Quantitative telomerase activity in circulating human leukocytes: utility of real-time telomeric repeats amplification protocol (RQ-TRAP) in a clinical/epidemiological setting. *Clin Chem Lab Med* **47**: 870-873, 2009
- 6) **Shay JW, Bacchetti S:** A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**: 787-791, 1997
- 7) **Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J et al:** Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **3**: 1931-1941, 1997
- 8) **Tang R, Cheng AJ, Wang JY et al:** Close correlation between telomerase expression and adenomatous polyp progression in multistep colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* **58**: 4052-4054, 1998
- 9) **Naito Y, Takagi T, Handa O et al:** Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and catalytic subunits in precancerous and cancerous colorectal lesions. *Tumour Biol* **22**: 374-382, 2001
- 10) 「大腸癌取扱い規約(第8版)」(大腸癌研究会編), 金原出版, 東京 (2013)
- 11) **Yamaza T, Miura Y, Bi Y et al:** Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents. *PLoS One* **3**: e2615, 2008
- 12) **Mateizel I, Spits C, Verloes A et al:** Characterization of CD30 expression in human embryonic stem cell lines cultured in serum-free media and passaged mechanically. *Hum Reprod* **24**: 2477-2489, 2009
- 13) 厚生労働省 2013 年人口動態統計(確定数)の概況. http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei13/dl/11_h7.pdf (参照 2015 年 10 月 27 日)
- 14) **Kato H, Haga S, Endo S et al:** Lifting of lesions during endoscopic mucosal resection (EMR) of early colorectal cancer: Implications for the assessment of resectability. *Endoscopy* **33**: 568-573, 2001
- 15) **Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW:** Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* **12**: 1133-1138, 2006
- 16) **Harley CB, Futcher AB, Greider CW:** Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-460, 1990
- 17) **Palm W, de Lange T:** How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* **42**: 301-334, 2008
- 18) **Markowitz SD, Bertagnolli MM:** Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* **361**: 2449-2460, 2009
- 19) **Pino MS, Chung DC:** The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* **138**: 2059-2072, 2010
- 20) **Hiyama E, Tatsumoto N, Kodama T et al:** Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* **9**: 453-458, 1996
- 21) **Saleh S, Lam AK, Ho YH:** Real-time PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in colorectal cancer. *Pathology* **40**: 25-30, 2008
- 22) **Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al:** Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**: 525-532, 1988
- 23) **Nishihara R, Wu K, Lochhead P et al:** Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. *N Engl J Med* **369**: 1095-1105, 2013
- 24) **Kato H, Sakamoto T, Yamada R et al:** Endoscopic mucosal resection (EMR) for colorectal lesions and lesion-lifted condition as an indicator of the tumor invasion. *Ann Cancer Res Ther* **16**: 25-30, 2008
- 25) **Kato H, Sakamoto T, Otsuka H et al:** Endoscopic Diagnosis and Treatment for Colorectal Cancer. *In* *Colorectal Cancer — From Prevention to Patient Care* (Ettarh R ed), pp327-348 (2012)