

正常子宮内膜における Telomerase reverse transcriptase (TERT) の発現の検討

岩 倉 孝 雄 西 洋 孝 小 杉 好 紀
井 坂 恵 一 高 山 雅 臣

東京医科大学病院産科婦人科学講座

【要旨】 子宮内膜は、周期的に増殖、脱落と再生を繰り返す、生体内でも特徴的な組織であり、月経周期毎に盛んな増殖と分裂を繰り返す。その際、分裂のたびに染色体末端部のテロメアが短縮する末端複製障害を検討する目的で、子宮内膜の月経周期における TERT (telomerase reverse transcriptase) の発現を、RT-PCR 法を用いて mRNA レベル、および蛋白レベルについて検討した。TERT の mRNA は、増殖期後期および分泌期前期に発現率が高く、分泌期後期では低かった。また、TERT の局在は、腺細胞の細胞膜及び細胞質、特に内膜腺の内腔側の細胞膜表面に認められた。正常子宮内膜においては、分泌期後期に TERT の発現を抑制する何らかの因子が存在すると考えられた。また TERT は、細胞質で産生された後、何らかの修飾を受け、核内に輸送されるということが示唆された。

はじめに

正常体細胞の分裂回数は一定であり (Hayflick 限界あるいは細胞分裂寿命)、細胞が分裂する際には S 期において染色体が複製される必要があるが、このとき DNA 合成酵素は染色体末端のテロメア DNA を完全には合成することができない。この結果、細胞分裂のたびにテロメア DNA の繰り返し配列は短小化する。この現象は「末端複製問題」とよばれている¹⁾。テロメラーゼはテロメア DNA に新たにその繰り返し配列を合成付加する酵素として発見された。テロメラーゼの機能は、染色体の末端に存在するテロメア (TTAGGG 配列の繰り返し) を伸長させることであり、これにより細胞は、分裂、増殖を続けることができる。テロメラーゼは、template mRNA といくつかの蛋白成分から構成され^{2,3)}、その活性は一般に癌^{4~8)}や生殖細胞⁹⁾に高率に認められる。テロメラーゼを構成する TERT (telomerase

reverse transcriptase), TERC (human telomerase RNA component), TEP1 (telomerase-associated protein 1) のうち、後者 2 つはテロメラーゼ活性の有無にかかわらず多くの細胞に恒常的に発現している¹⁰⁾、テロメラーゼの酵素活性成分であり、テロメラーゼ活性を触媒していると推測される TERT の発現は、テロメラーゼ活性とよく相関することが知られている^{10~12)}。今回、我々は月経周期において機能層といわれる表層が、増殖と脱落を繰り返す増殖性および再生性の高い子宮内膜が、どのように末端複製問題を回避しているのかを検討する目的で、正常子宮内膜の各周期における TERT mRNA レベル並びに蛋白レベルでの発現を検討した。

研究材料および方法

1. 子宮内膜の採取

正常月経周期を持ち、ホルモン療法や GnRH 療法を受けていない子宮筋腫および良性卵巣囊腫の患

1999 年 5 月 31 日受付, 1999 年 6 月 8 日受理

キーワード: テロメラーゼ活性, TERT, 子宮内膜

(別刷請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学病院産科婦人科学講座 岩倉孝雄)

者から、インフォームドコンセントを得て、手術時に正常子宮内膜を採取した。症例は49例（増殖期前期11例，増殖期後期14例，分泌期前期10例，分泌期後期14例）で，組織の一部を直ちに液体窒素にて急速凍結し，RNA抽出用に -80°C で保存した。また，免疫染色用として5mm大の組織小片を作成し，OCTコンパウンドに包埋後，同様に液体窒素にて急速凍結して， -80°C にて保存した。

2. RT-PCR 法

凍結組織をホモジュナイズし，Isogen（Nippon Gene 社，Tokyo Japan.）を用いて total RNA を抽出し，cDNA 合成 kit（Pro STAR First Strand RT-PCR Kit, STRATAGENE 社，La Jolla, USA.）にて first strand cDNA の合成を行った。PCR には，プライマーとして 5'-CGGAAGAGTGTCTCGGAGCAA-3'（LT5）と，5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'（LT6）¹²⁾ を使用した。DNA の増幅は Ready To Go PCR Beads（Amersham Pharmacia Biotech 社，Piscataway, USA.）を用い，130 μl /ml に調製した cDNA 溶液 2 μl ，LT5 プライマー 1 μl （20 μM /ml），LT6 プライマー 1 μl （20 μM /ml）に蒸留水を 21 μl 加え 25 μl とし，94 $^{\circ}\text{C}$ （denature）30 秒，60 $^{\circ}\text{C}$ （annealing）30 秒，72 $^{\circ}\text{C}$ （extension）60 秒を，33 サイクルにて施行した。

3. 免疫染色法

免疫染色は ABC 法にて行った。検体をクライオスタットにて 5 μm に薄切し，スライドグラスに張り付け風乾後，冷アセトンにて 5 分間固定した。染色を開始する前にまず，過酸化水素水に 5 分間浸し内因性ペルオキシダーゼ阻害を行った。その後，HISTOFINE（株式会社ニチレイ，Tokyo, Japan.）を使用し，免疫染色を行った。10% ヤギ正常血清にてブロッキング後，一次抗体として 1:10 に希釈した抗 TERT ポリクローナル抗体（Rabbit Polyclonal IgG TRT H-231, Santa Cruz 社，Santa Cruz, USA.）を 3 時間反応させた。PBS にて 2 回洗浄し，2 次抗体としてはビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体，およびペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用い発色は Liquid DBA-Plus Substrate Kit（ZYMED 社，San Francisco, USA.）にて行った。

判定は“HSCORE”にて行った。“HSCORE”は，次の方程式によって求められる。“HSCORE”= $\sum P_i (i+1)$ 。このとき i は染色強度 1, 2, または 3（それぞれ弱，中，強）であり， P_i は上皮細胞に対するそれぞれの染色強度のパーセンテージである¹³⁾。

結 果

TERTm RNA の発現は，増殖期前期では 11 例中 4 例に，増殖期後期では，14 例中 12 例に認められた。分泌期前期においては 10 例中 8 例に，分泌期後期では 14 例中 4 例に認められた（Fig. 1）。

χ^2 検定の結果，増殖期後期における TERT mRNA は，他期に比べ有意に多く発現していた（ $p = 0.0157$ ）。一方，分泌期後期においては，TERT mRNA の発現は，他期に比べ有意に低下していた（ $p = 0.0150$ ）。

免疫染色法では TERT の発現は腺細胞の細胞膜および細胞質に認め，特に腺細胞膜表面の内腺腔側が強く染色された。増殖期前期（Fig. 2: A, B）増殖期後期（Fig. 2: C）分泌期前期（Fig. 2: D）で染色は強く認められたが，分泌期後期（Fig. 2: E）では，染色は殆ど認められなかった。増殖期後期において TERT mRNA および TERT 蛋白の両方が発現している症例は，14 例中 6 例（42%），両方とも発現していないものは 1 例（7%），mRNA が発現し蛋白が発現していない症例が 3 例（21%），mRNA が発現せず蛋白が発現している症例が 1 例，（7%）であった。分泌期前期については，10 例中それぞれ，7 例（70%），0 例（0%），1 例（10%），1 例（10%），増殖期前期では，11 例中 2 例（18%），2 例（18%），1 例（10%），2 例（18%），分泌期後期では，14 例中 1 例（7%），9 例（64%），3 例（21%），1 例（7%）であった（Table 1, 2）。

増殖期後期および分泌期前期に TERT mRNA，TERT 蛋白の発現の割合が高く，分泌期後期には低かった。

考 察

染色体末端部分はテロメアとよばれ染色体同士が融合することを防ぎ，染色体が安定に存在するために必要な領域である。脊椎動物ではテロメア DNA は TTAGGG の 6 塩基からなるテロメア繰り返し配列が直列に繰り返された配列から構成される¹⁴⁾。細胞が分裂する際には S 期において染色体が複製される必要がある。このとき DNA 合成酵素はテロメア DNA の真の末端を完全には合成することができない。この結果，テロメア DNA は細胞分裂の度に末端の一部が複製されず，次第に短小化する。この短小化がある程度進行すると，その細胞はそれ以上分

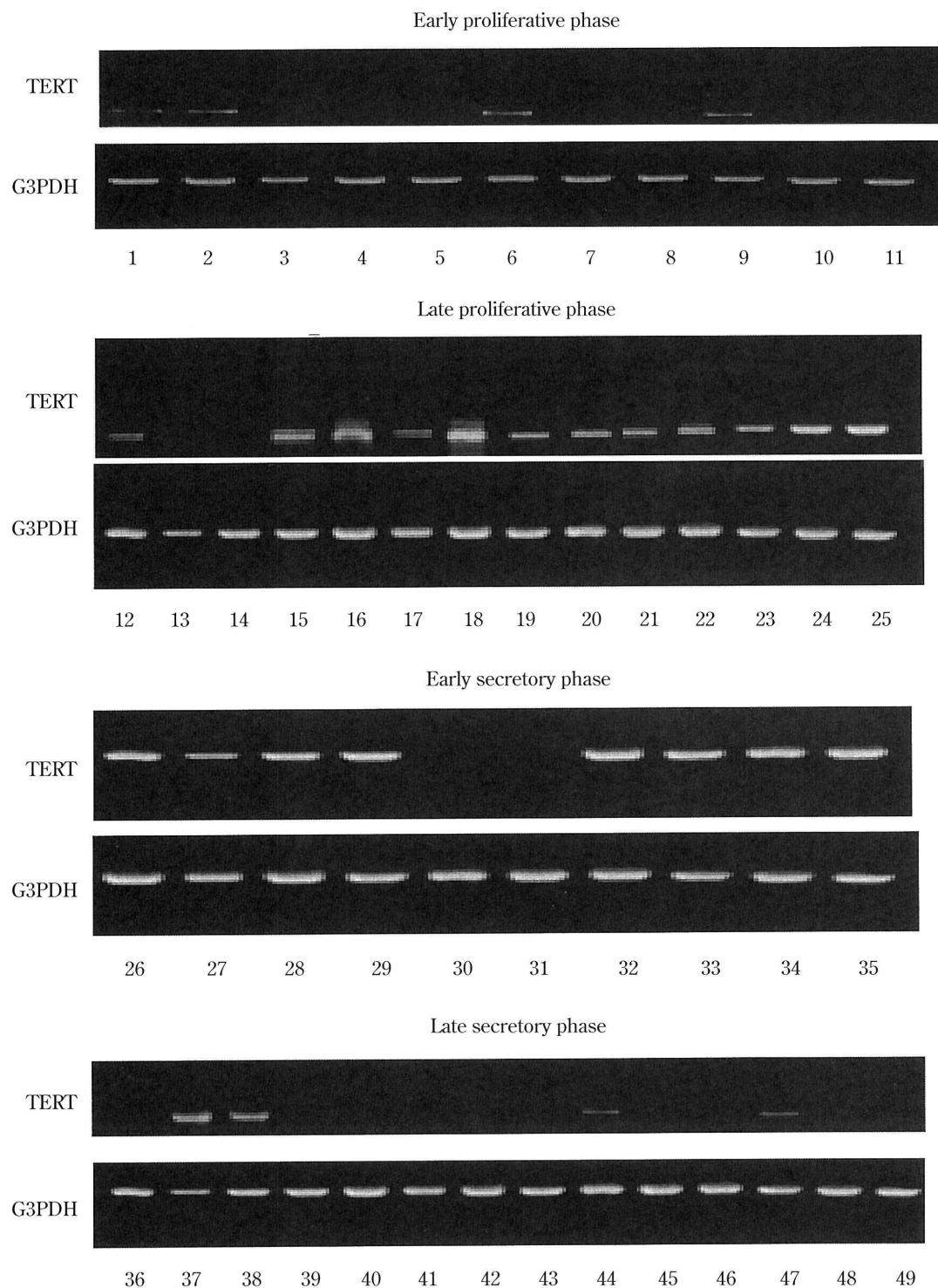


Fig. 1 Expression of TERT mRNA by RT-PCR.

裂や増殖ができなくなる。この短小化したテロメアDNAを伸長させる機能を持つ酵素がテロメラーゼである。

テロメラーゼ活性は、不死化細胞や各種悪性腫瘍の85～100%に認められる。多くの婦人科癌におい

てもテロメラーゼ活性の上昇が認められるということは、諸家の報告で明らかになっている^{15～19}。テロメラーゼ活性は癌細胞に特異的であると考えられていた。しかし最近の研究によってリンパ球²⁰、毛嚢²¹、皮膚²²、絨毛⁹や内皮細胞²³の様な増殖性あ

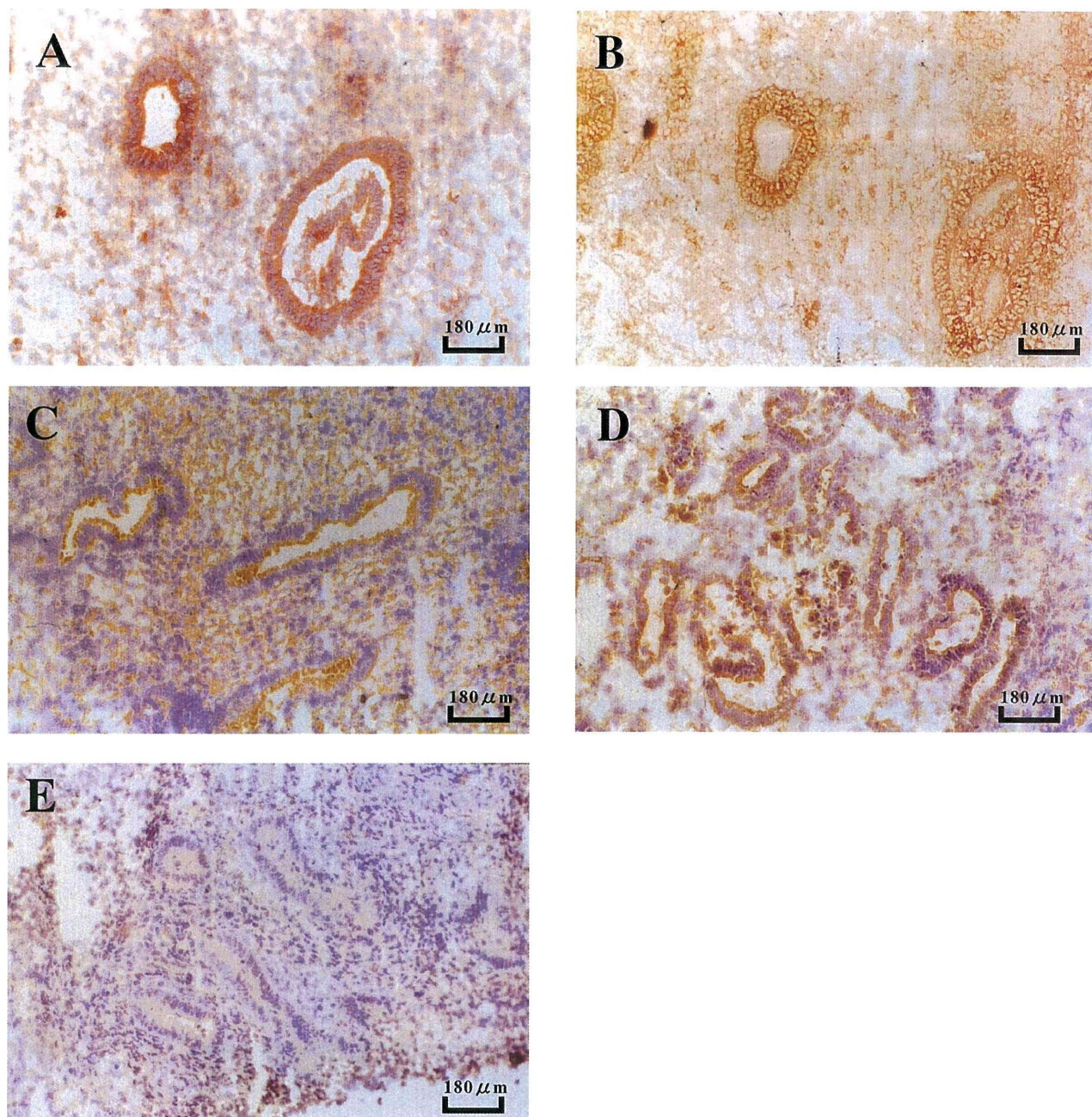


Fig. 2 Expression of TERT by immunostain (B).

Stained by hematoxylin after immunostaining. (A, C, D, E)

A, B : Expression of TERT in early proliferative phase. (Positive on cell membrane and cytoplasm.)

B : Only immunostain of the A sequence slice.

C : Expression of TERT in the late proliferative phase. (Positive on cell membrane.)

D : Expression of TERT in the early secretory phase. (Positive on cell membrane.)

E : Expression of TERT in the late secretory phase. (Negative) Stained by hematoxylin after immunostain(A, C, D, E).

るいは再生性の高い正常細胞にもテロメラーゼ活性が認められることが明らかになった。また、正常子宮内膜においてもテロメラーゼ活性が認められることが報告されている^{24~27)}。今回の我々の実験結果では正常子宮内膜に TERT の発現が認められ、正

常細胞であっても増殖性、再生性の高い組織に TERT は高率に発現するということが示唆された。子宮内膜においては増殖期、分泌期を通じ TERT の発現を認めたが、特に増殖期後期から分泌期前期に強く発現し、分泌期後期に消失していることが、

Table 1, 2 Relation between TERT mRNA expression and TERT expression.

	case	TERT mRNA の発現	免疫染色		case	TERT mRNA の発現	免疫染色
増殖期 前期	1	+	+	分泌期 前期	26	+	+
	2	+	+		27	+	+
	3	—	+		28	+	+
	4	—	—		29	+	+
	5	—	+		30	—	ND
	6	+	ND		31	—	+
	7	—	ND		32	+	—
	8	—	—		33	+	+
	9	+	—		34	+	+
	10	—	ND		35	+	+
	11	—	ND	分泌期 後期	36	—	—
増殖期 後期	12	+	+		37	+	—
	13	—	—		38	+	—
	14	—	+		39	—	—
	15	+	+		40	—	—
	16	+	+		41	—	—
	17	+	—		42	—	—
	18	+	—		43	—	—
	19	+	ND		44	+	+
	20	+	+		45	—	—
	21	+	+		46	—	—
	22	+	+		47	+	—
	23	+	—		48	—	—
	24	+	ND		49	—	+
	25	+	ND	子宮内膜における TERT の発現			

1) + : 陽性 2) - : 陰性 3) DN : Not Determined

mRNA レベルおよび蛋白レベルで明らかになり (Fig. 1), 子宮内膜においても TERT の発現がテロメラーゼ活性と相関することが判明した。月経周期ごとに盛んな増殖, 分裂を繰り返す内膜細胞において, 月経周期の一時期に TERT が発現することにより, テロメアの短縮, すなわち末端複製問題を回避している可能性が示唆された。

最近, c-myc が TERT の転写を活性化させることが報告された²⁸⁾。正常細胞におけるテロメラーゼ活性と悪性腫瘍におけるそれとの違いは, 正常細胞におけるテロメラーゼ活性は抑制されるということである。今回の実験結果から推察すると, 分泌期後期

に何らかの因子が TERT を抑制している可能性があるのではないかと考えられた。

免疫染色では TERT は腺細胞の細胞質および細胞膜, 特に腺腔側に認められた (Fig. 2)。TERT が核内で染色体に作用するという事を考えると, これは予想に反する結果である。事実, 胃癌においては, TERT は免疫染色によって核内に認められたという報告もある⁷⁾。TERT の細胞内での動態は, 今のところ不明であるが, TERT が蛋白質である以上, その産生は細胞質のリボソームで行われているはずであり, このことを考えると細胞質に認められる可能性もあると思われる。つまり, TERT は細胞質で

合成され、何らかの修飾を受けた後に核内に輸送されているということ、あるいは正常細胞においては TERT の核内への輸送が何らかの形で阻害されているのではないかなどが考えられる。

結 論

正常子宮内膜の月経周期における TERT の発現を検討した。mRNA レベルでも蛋白レベルでも、いずれも増殖期後期、分泌期前期にその発現を多く認め、分泌期後期ではその発現は抑制されていた。正常子宮内膜においては TERT に対する抑制因子が存在することが示唆された。

免疫染色では TERT 蛋白は腺細胞の細胞質、および腺腔側の細胞膜に認められた。TERT は細胞質で産生後、何らかの修飾を受け核内に輸送されるか、あるいは正常細胞においては TERT の核内への輸送が何らかの形で阻害されているのではないかということが示唆された。

尚、本稿の一部は、第 51 回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

文 献

- 1) Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH : DNA sequences of telomerase maintained in yeast. *Nature* **310** : 154~157, 1984
- 2) Nelson NJ : Researchers debate clinical role of telomerase activity. *J Natl Cancer Inst* **88** : 1021~1023, 1996
- 3) Greider CW, Blackburn EH : A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337** : 331~337, 1989
- 4) Shay JW, Wright WE : Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* : 66~71, 1996
- 5) Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW : Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* **88** : 116~122, 1996
- 6) Mehle C, Piatyszek MA, Ljungberg B, Shay JW, Roos G : Telomerase activity of renal cell carcinoma. *Oncogene* **13** : 161~166, 1996
- 7) Yasui W, Tahara H, Tahara E, Fujimoto J, Nakayama J, Ishikawa F, Ide T, and Tahara E : Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* **89** : 1099~1103, 1998
- 8) Sumida T, Hamakawa H, Sogawa K, Sugita A, Tanioka H, and Ueda N : Telomerase components as a diagnostic tool in human oral lesions. *Int J Cancer* : **80** 1~4, 1999
- 9) Nishi H, Yahata N, Ohyashiki K, Isaka K, Shiraishi K, Ohyashiki JH, Toyama K, Takayama M : Comparison of telomerase activity in normal chronic villi to trophoblastic disease. *Int J Oncol* **12** : 81~85, 1998
- 10) Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR : Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcript. *Cancer Res* **58** : 4168~4172, 1998
- 11) Horikawa I, Oshimura M, Barrett JC : Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Molecular Carcinogenesis* **22** : 65~72, 1998
- 12) 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
- 13) Lessey BA, Ilesanmi AO, Yeh IT, Korzeniowski P, Kastelbaum AJ, Sun J, Fritz MA, Chwalisz K : Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertility and Sterility* **65** : 477~483, 1996
- 14) Greider CW : Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* **65** : 337~365, 1996
- 15) Gorham H, Yoshida K, Sugino T, Marsh G, Manek S, Charnock M, Tarin D, Goodison S : Telomerase Activity in human gynecological malignancies. *J Clin Pathol* **50** : 501~504, 1997
- 16) Shroyer KR, Stephens JK, Silverberg SG, Markham N, Shryer AL, Wilson ML, Enomoto T : Telomerase expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia, and endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* **16** : 225~232, 1997
- 17) Brien TP, Kallakury BV, Lowry CV, Ambros RA, Muraca PJ, Malfetano JH, Ross JS : Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. *Cancer Res* **57** : 2760~2764, 1997
- 18) Kyo S, Ueno H, Kanaya T, Inoue M : Telomerase activity in gynecological tumors. *Clin Cancer Res* **2** : 2023~2028, 1996
- 19) Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, and Inoue M : Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues : *Int J Cancer* **80** : 60~63, 1999

- 20) Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M : Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* **155** : 3711~3715, 1995
- 21) Ramirez RD, Wright WE, Shay JW, Taylor RS : Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol* **108** : 113~117, 1997
- 22) Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, Ide T, Utakoji T : Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* **13** : 433~439, 1996
- 23) Hsiao R, Sharma HW, Ramakrishnan S, Keith E, Narayanan R : Telomerase activity in normal human endothelial cells. *Anticancer Res* **17** : 827~832, 1997
- 24) Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M : Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* **57** : 610~614, 1997
- 25) Bonatz G, Klapper W, Barthe A, Heidorn K, Jonat W, Krupp G, Parwaresch R : Analysis of telomerase expression and proliferative activity in the different layers of cyclic endometrium. *Biochem Biophys Res Commun* **253** : 214~221, 1998
- 26) Yokoyama Y, Takahashi Y, Morishita S, Hashimoto M, Niwa K, Tamaya T : Telomerase activity in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* **4** : 173~177, 1998
- 27) Tanaka M, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Sagawa T, Yamashita K, Okada Y, Hiyama E, Inoue M : Expression of telomerase activity in human endometrium is localized to epithelial glandular cells and regulated in a menstrual phase-dependent manner correlated with cell proliferation. *Am J Pathol* **153** : 1985~1991, 1998
- 28) Wu K-J, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-favera R : Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* **21** : 220~224, 1999

Expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) in Human Endometrium.

Takao IWAKURA, Hirotaka NISHI,
Yoshinori KOSUGI, Keiichi ISAKA
(Director : Prof. Masaomi TAKAYAMA)

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical University

Abstract

Since DNA polymerase requires a labile primer to initiate unidirectional 5'-3' synthesis, some bases at the 3' end of each template strand are not copied unless a special mechanism overcomes this "end-replication" problem. Immortal eukaryotic cells, including transformed human cells, apparently use telomerase, an enzyme that elongates telomeres, to overcome incomplete end-replication. Telomerase is composed of template mRNA and some proteins and its activity is observed in most malignant tumors and germ cells. It is also observed in normal cells which have proliferating potential such as hair follicle, skin and endothelial cells. Endometrium exhibits dramatic changes in proliferative activity during the menstrual cycle. In this study we examined the expression of TERT in each phase of the menstrual cycle using RT-PCR for the mRNA level, and immunostaining for the protein level. Both methods showed that TERT was expressed at a high rate in the late proliferative phase and early secretory phase.

〈Key words〉 Telomerase Activity, TERT, Endometrium
