

テロメラーゼ阻害による大腸癌細胞の テロメア短縮誘導及び細胞増殖抑制

川崎 俊一¹⁾
片野 素信¹⁾

田内 哲三²⁾
大屋敷 一馬²⁾

中嶋 晃弘²⁾
田 渕 崇文¹⁾

¹⁾東京医科大学外科学第四講座

²⁾東京医科大学内科学第一講座

(指導: 田渕崇文主任教授)

【要旨】 テロメラーゼはテロメアと呼ばれる染色体末端を延長することによって、細胞を不死化細胞に導くことができる。人間の体細胞の多くはテロメラーゼ活性が抑制されている。しかし、多くの人間の癌においてはテロメラーゼ活性の上昇を認める。つまり腫瘍細胞の増殖にとって、テロメラーゼは大きな役割を担う因子である。

今回我々はこのテロメラーゼの触媒ユニットである human telomerase reverse transcriptase (以下 hTERT と略す) の変異型, dominant negative *hTERT* (以下 DN-*hTERT* と略す) を大腸癌細胞に導入することにより、アポトーシスの誘導に関しては有意ではなかったがテロメラーゼ活性は抑制され、テロメア長は短縮し、その結果細胞増殖が停止されるのを確認した。これらのことより、テロメラーゼ阻害によって引き起こされるアポトーシス経路は明らかでないが、hTERT の研究は今後の抗腫瘍治療の発展に重要な役割を担うと考えられた。

はじめに

腫瘍形成には癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化など、様々な遺伝子変異が蓄積することが必要であることが知られている^{1,2,3)}。その遺伝子変異は多様であり、今日まで多数の癌遺伝子、癌抑制遺伝子が発見されてきたが、これらの癌遺伝子、癌抑制遺伝子はいくつかのカテゴリーに分類されることがわかっていく。

細胞内シグナル伝達関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、チェックポイント関連遺伝子、DNA 修復関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、血管新生関連遺伝子、細胞接着関連遺伝子等でこれらは一部お互いにクロストークしている。

正常細胞の分裂回数は有限であり⁴⁾、最大の分裂回

数を越えると細胞は増殖を停止する。この第1の分裂停止期が、いわゆる senescence (老化) と呼ばれる状態である (senescence: M1: mortality stage 1)。この状態の細胞に、上記の癌遺伝子を導入すると senescence を乗り越えて再び分裂を開始し⁵⁾、延命細胞と呼ばれる。しかし、このような細胞も数十回の分裂を繰り返した後やがて再び増殖を停止する。この第2の分裂停止期がいわゆる crisis (細胞死) と呼ばれるものである (crisis: M2: mortality stage 2)⁶⁾。Crisis を迎えた細胞の中から、ごく低頻度にさらに増殖を続ける細胞集団が出現してくることがある。このような細胞は senescence と crisis という2つのステップを乗り越え、無限増殖能を獲得したわけで、不死化細胞と呼ばれる。

その分裂回数という寿命を規定しているのが、直線上染色体末端のテロメアに存在する 6 塩基反復配列

2002 年 1 月 15 日受付, 2002 年 2 月 22 日受理

キーワード: テロメラーゼ活性, hTERT, 大腸癌

(別刷請求先: 〒 300-0395 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-20-1 東京医科大学 霞ヶ浦病院 外科学第四講座 川崎俊一)

(TTAGGG) の長さである⁷⁾。この長さはその細胞の経てきた分裂回数に応じて短縮し^{8,9,10)}、ある一定の長さに短縮すると細胞は分裂を停止する。癌細胞が無限寿命を得るためにはこの機構を回避するシステムが必要となり、不死化した培養細胞ではこの反復配列を延長する酵素テロメラーゼが存在している^{11,12,13)}。実際の臨床例でも、様々な種類の癌でテロメラーゼが高い頻度で活性化されていることがわかっている。

腫瘍形成にはシグナル伝達系の活性化、細胞周期の進行、チェックポイント機構、DNA 修復機構、アポトーシス機構の破綻、そしてテロメア修復機構の存在が最低限必要であると考えられる。最近、実験系において P53 の抑制、RAS の活性化、hTERT の活性化によって正常細胞を腫瘍細胞に転換させることが可能であるとの報告が得られた¹⁴⁾。P53 は細胞周期におけるチェックポイント機構、DNA 修復機構、アポトーシス機構の上流で働く転写因子であり、RAS は細胞内シグナル伝達系のなかの RAS/RAF/MAPK カスケードの一因子であり、hTERT は酵素活性を担うテロメラーゼを構成するタンパク質分子でウイルス由来の逆転写酵素に共通にみられるモチーフを持ち、これを介してテロメア DNA を合成している。大腸癌細胞にはテロメラーゼが発現しており、このテロメラーゼを阻害することにより、癌細胞を有限分裂寿命化し死滅させることができるものと我々は考えた。

テロメラーゼ活性化のためには TERT の発現が必須であることに着眼した。そして、*DN-hTERT* を癌細胞に遺伝子導入することにより、癌細胞の hTERT の発現を抑制し、テロメア長、テロメラーゼ活性、hTERT 発現量、細胞増殖能、アポトーシスについて検討した。

研究材料および方法

1. WT-hTERT, DN-hTERT 発現細胞作成

大腸癌細胞株として CEA 産生ヒト大腸癌細胞株 CW2 (理研細胞バンク) を用い実験を行った。*DN-hTERT* は *Wild Type-hTERT* (以下 *WT-hTERT* と略す) のモチーフ 3 のコドン 710 と 711 に位置するアスパラギン酸とバリンを、アラニンとイソロイシンに置き換えて作成した (Fig. 1)。作成した *DN-hTERT* を、puromycin を薬剤耐性マーカーに持つレトロウイルスベクターである pBABE-puro に組み込み pBABE-puro-*DN-hTERT* を作成した。薬剤耐性マーカーのみを持つコントロールベクターである pBABE-

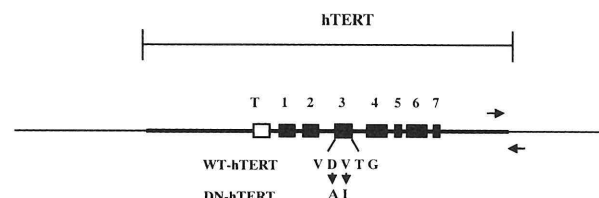


Fig. 1 Retroviral constructs used to express WT-h hTERT and DN- hTERT.

Motif 3 has also been called motif A. The T region conserved among the TERTs but not among other reverse transcriptases. DN-hTERT was created by substituting the aspartic acid and alanine residues at position 710 and 711 with valine and isoleucine residues.

puro 及び pBABE-puro-*DN-hTERT*, pBABE-puro-*WT-hTERT* を、CW2 細胞株にリポフェクションにて遺伝子導入した (Fig. 2A)。遺伝子導入 48 時間後に 2 μ g/ml 濃度の puromycin にて遺伝子導入細胞の選別を行い、limiting dilution 法にてクローンの選別を行った。また、細胞数倍加時間 population doubling (PD) の計測は 100 mm のディッシュ (Iwaki 社) が飽和密度になった時点より開始した。

2. 免疫ブロット法

遺伝子導入した細胞が、hTERT を発現しているかを免疫ブロット法を用い確認した。核蛋白を抽出し hTERT 抗体 (Santa Cruz biotechnology 社) を用いて免疫ブロット法にて確認した。

3. テロメラーゼ活性検出法

Modified telomeric repeat amplification protocol (Modified TRAP) 法を用いて、細胞株のテロメラーゼ活性を測定した。1 $\times 10^5$ 個の細胞から 1 \times CHAPS 溶解液 (10 mM Tris-HCl (pH=7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM Benzamidine, 5 mM β -メルカプトエタノール, 0.5% CHAPS, 10% グリセロール) で蛋白を抽出。TRAP_{ENE} テロメラーゼ活性検出キット (Oncor 社) を使用し、30°C で 10 分間のテロメラーゼ伸長反応を行い TS プライマー (5'-AATCCGTCGAGCAG AGTT-3') の 3' 末端に、テロメア繰り返し配列 (GGTTAG) を付加した。その後、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) により伸長したテロメア配列の増幅を行った (94°C 30 秒, 53°C 30 秒, 72°C 60 秒/30 サイクル)。TS プライマーは Cy5 にてラベルしたプライマーを使用し、PCR 産物を蛍光 DNA シークエンサー (Pharmacia LKB Biotechnology 社) を用いて 12% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、その結果を多

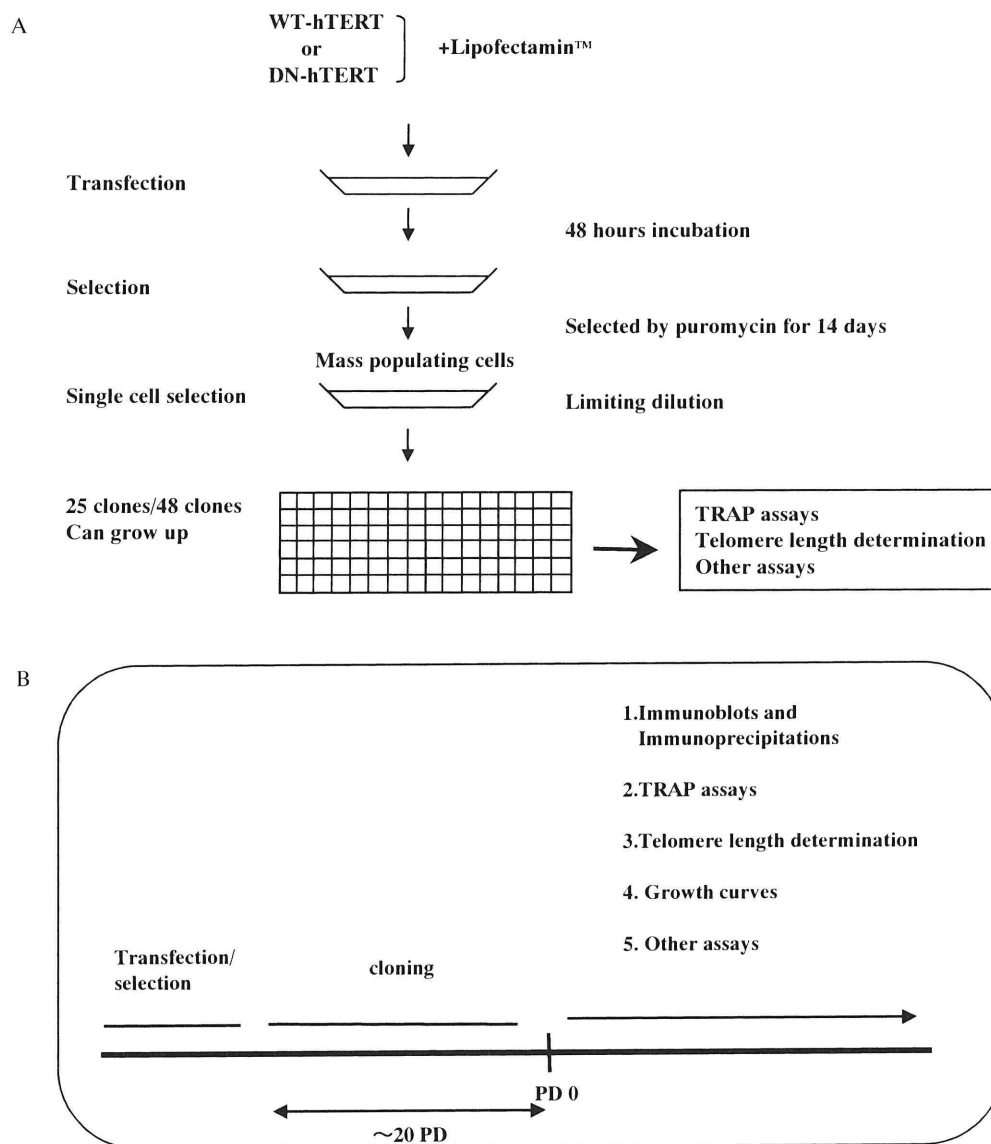


Fig. 2 Experimental design and reference time frame.

A. The resulting mutant was completely sequenced and subcloned into the vector pBABE-puro. CW-2 cells were transfected with the expression vector, pBABE-puro, pBABE-puro-WT-hTERT or pBABE-puro-DN-hTERT by the lipofection method. Beginning 48 hours after lipofection, cells were selected with 2 μ g/ml of puromycin and cloned by the limiting dilution method. Population doubling (PD) 0 was defined as the time at which cultures reached confluence in 10-cm culture dishes.

B. The process of obtaining clonal isolates required approximately 20 population doublings before the designation of PD 0.

型解析ソフトの Fragment Manager program (Pharmacia LKB Biotechnology 社) を用い、テロメラーゼにより生じた 50 bp から始まり 6 bp ずつ増加するラダーと、36 bp に存在する内部標準との強度比を用いて活性を数値化し相対評価した。

4. テロメア長測定法

細胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ /ml を 2 ml の lysis buffer (5 M 塩化ナトリウム 150 mM, 0.5 M EDTA 50 mM, 2 M Tris (pH=8.0), 20 mM) に溶解し, Proteinase K (タカラ酒造) 200 μ g と 10% SDS 0.2 ml を加え, 室温にて 24 時

間放置, フェノール, クロロホルム, イソアミルアルコール (25:24:1) 混合溶液による抽出を 2 回行った。Lysate に 2M 酢酸ナトリウム (pH=5.5) 0.2 ml と イソプロパノール 2 ml を加え DNA を抽出した。抽出した DNA を制限酵素 *Hinf*I, *Rsa*I を用いて消化後, 0.7% アガロースゲルにて電気泳動を行った。泳動後, 0.25 M 水酸化ナトリウム, 0.5 M 塩化ナトリウムでゲルを変性し, 0.3 M 塩化ナトリウム, 0.25 M Tris-HCl で中和した後, ナイロンフィルターに転写した。Telo TAGGG telomere length assay kit (Roche Molecular Biochemicals 社) を用いてハイブリダイ

ゼーションを行い、平均テロメア長の測定にはデンシトメーター (Imagemaster, Pharmacia 社) を用いて各々のレーンの中心線上の透過度を取り込み、その最大透過度の部分を平均テロメア長とした。

5. 細胞増殖能

20% ウシ胎仔血清+DMEM (GIBCO BRL 社) の培地を使用し 60 mm ディッシュ (Iwaki 社) に 10^4 個の pBABE-puro, pBABE-puro-*WT-hTERT*, pBABE-puro-*DN-hTERT* を遺伝子導入した CW2 細胞株を播き、10 日目、20 日目、30 日目、40 日目、50 日目、60 日目に細胞数を計測した。

6. アポトーシス解析法

APO2.7 モノクローナル抗体は 38 kDa のミトコンドリア膜蛋白 (7A6 抗原) に対する抗体でアポトーシス細胞と反応する。

アポトーシス解析は FITC 標識した APO2.7 モノクローナル抗体 (Oncor 社)^{15,16,17} を使用しフローサイトメーター (EPICS XL, Coulter 社) を用いてアポトーシス細胞の比率を解析した。

pBABE-puro, pBABE-puro-*WT-hTERT*, pBABE-puro-*DN-hTERT* を遺伝子導入した CW2 細胞株について、各々2つのクローンに対し解析をおこない、統計学的検討は χ^2 検定にて行った。

結 果

1. 遺伝子導入細胞における免疫ブロットを用いた hTERT 過剰発現の解析

WT-hTERT, *DN-hTERT* 過剰発現の長期細胞培養での影響を解析するため、大腸癌細胞株、CW2 にレトロウィルスベクター、pBABE-puro, pBABE-puro-*WT-hTERT*, pBABE-puro-*DN-hTERT* をリポフェクタミンを用いて遺伝子導入を行った。外来性 hTERT を発現していることを核蛋白抽出物を用いた免疫ブロットにより解析したところ、*WT-hTERT*, *DN-hTERT* 遺伝子導入細胞では PD10, PD25 において hTERT の過剰発現が確認され、レトロウィルスベクターによる遺伝子導入効果が安定していることが確認された (Fig. 3)。

2. 遺伝子導入細胞におけるテロメラーゼ活性の解析

WT-hTERT 遺伝子導入細胞ではテロメラーゼ活性

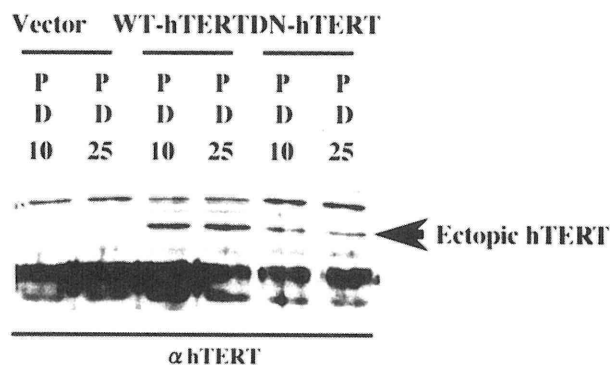


Fig. 3 Expression of virally expressed *WT-hTERT* and *DN-hTERT* (ectopic hTERT). Expression of virally expressed *WT-hTERT* and *DN-hTERT* (ectopic hTERT) analyzed by immunoblotting was performed as described previously. Anti-hTERT (L-20) antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). *WT-hTERT* and *DN-hTERT* were expressed reliably.

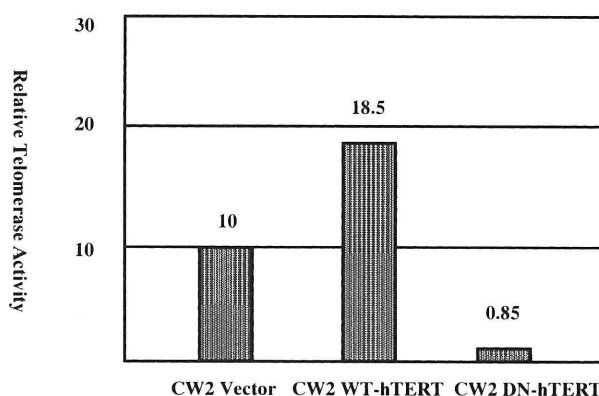


Fig. 4 Effects of *WT-hTERT* and *DN-hTERT* on telomerase activity.

Telomerase activity was examined by a telomere repeat amplification protocol (TRAP) assay using a TRAP_{ENE} telomerase detection kit (Oncor, Gaithersburg, MD, USA). The PCR products were subjected to 12% acrylamide denaturing electrophoresis in an automated laser fluorescence DNA sequencer II (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Uppsala, Sweden) and analyzed by the Fragment Manager program (Pharmacia LKB Biotechnology). Activity in the extract-based PCR TRAP assay was detected as a periodic 6-bp peak of telomerase products and in each sample relative telomerase activity was calculated semiquantitatively in comparison to a 36-bp internal standard.

Expression of *DN-hTERT* decreased in comparison with the vector. In contrast, expression of *WT-hTERT* increased in comparison with the vector. Thus several point mutations in hTERT results in the disruption of telomerase activity.

の上昇が (コントロール比 18.5 倍), *DN-hTERT* 遺伝子導入細胞ではテロメラーゼ活性の著しい低下 (コントロール比 0.85 倍) を確認した (Fig. 4)。以上のこ

とよりレトロウィルスベクターによる遺伝子導入により, *DN-hTERT* 遺伝子導入細胞ではテロメラーゼ活性の抑制が持続的かつ安定していると考えられる。

3. 遺伝子導入細胞におけるサザンブロット法によるテロメア長の解析

レトロウィルスベクターによる *WT-hTERT*, *DN-hTERT* 遺伝子導入がテロメア長に影響をおよぼしているかを解析するために Telo TAGGG telomere length assay kit (Roche Molecular Biochemicals 社) を用いてサザンブロット法によりテロメア長の計測を行った (Fig. 5). ベクターのみを遺伝子導入した CW2 細胞株ではテロメア長は 4.8 kb であった. *WT-hTERT* を遺伝子導入した細胞株ではテロメア長は PD10 及び PD25 にて 5.3 kb とテロメア長の延長が見られた. これに対し, *DN-hTERT* を遺伝子導入した CW2 細胞株では細胞分裂を繰り返すに従い PD10 では 4.6 kb, PD25 では 2.8 kb とテロメア長が短縮することが確認できた. CW2 細胞株では *DN-hTERT* を遺

伝子導入することによりテロメラーゼ活性は低下し, 細胞分裂を繰り返す度にテロメア長が短縮してゆくと考えられる。

4. 遺伝子導入細胞における細胞増殖能の解析

テロメア動態の変化が細胞増殖に対しおよぼす影響を解析するために, *WT-hTERT*, *DN-hTERT* 遺伝子導入 CW2 細胞株を一定期間長期培養し, 細胞数より細胞増殖曲線を作成した (Fig. 6). *WT-hTERT* 遺伝子導入細胞ではコントロールと細胞動態に変化はみられなかった. これに対し, *DN-hTERT* 遺伝子導入細胞では PD20 よりコントロールと比較して細胞増殖能の低下が見られ, PD25 にて細胞分裂を停止した. 以上のことよりテロメラーゼ活性の低下によるテロメア長の短縮によりテロメア維持機構が障害され, 細胞分裂が停止したものと考えられる。

5. フローサイトメーターを用いたアポトーシス誘導の解析

WT-hTERT, *DN-hTERT* 遺伝子導入 CW2 細胞株の PD25 におけるアポトーシス誘導細胞の頻度を, APO2.7 モノクローナル抗体を用いフローサイトメーター解析にて検討した. *DN-hTERT* を遺伝子導入した CW2 細胞株の APO2.7 陽性細胞の比率は 21.2%, 22.4% であるのに対し, コントロール及び *WT-hTERT* 導入細胞株では 14.1% から 16.5% であり, 有意な差異は認められなかった (Fig. 7). CW2 細胞株ではテロメア維持機構の障害による細胞分裂の停止が直接アポトーシス誘導につながらないと考えられる。

考 察

染色体末端部分に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がある. 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¹⁸⁾. 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. 脊椎動物ではテロメア 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. テロメラーゼは

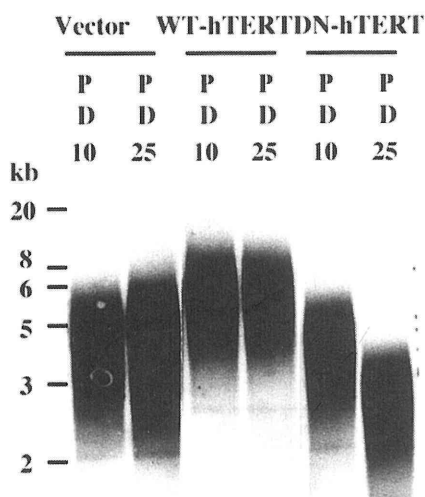


Fig. 5 Effects of WT-hTERT and DN-hTERT on telomere length.

To measure TRF, genomic DNA was digested with the restriction enzymes *HinfI* and *RsaI*, fractionated on 0.7% agarose gels and transferred onto nylon membranes. Hybridization was performed by using the Telo TAGGG telomere length assay kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

We assessed peak telomere length in the cw2 cell clones expressing either WT- or DN-hTERT. The telomere length in the cw2 are ordinarily maintained 4.8 kb in length. As cw2 cell clones expressing DN-hTERT were passaged, gradual telomere shortening occurred. In contrast, cells expressing the control vectors demonstrated stable telomere length, and cells expressing WT-hTERT had a telomere length of 5.8 kb.

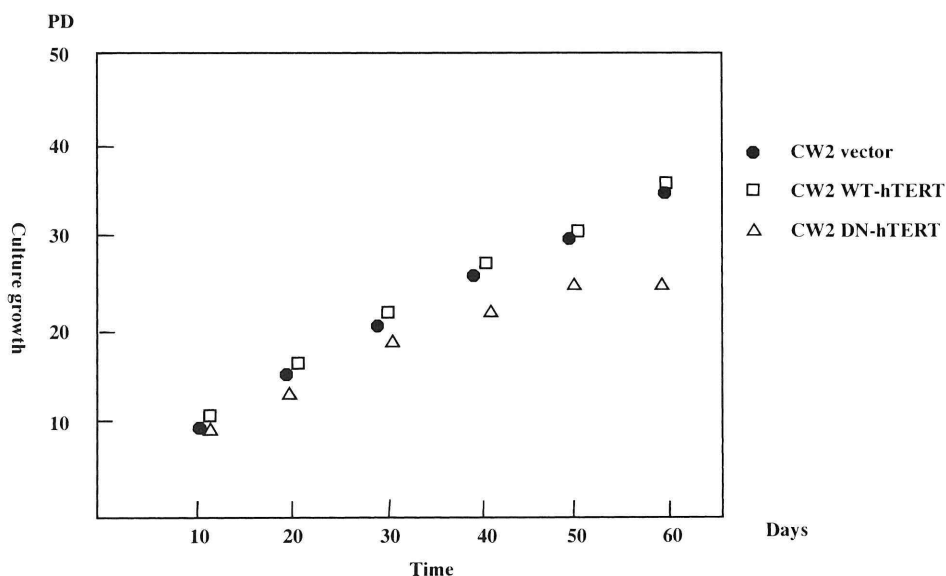


Fig. 6 Effects of WT-hTERT and DN-hTERT on cell proliferation.

Equal numbers of viable cw2 cells transfected with either pBABE-puro, pBABE-puro-hTERT or pBABE-puro-DN-hTERT were plated in 0.35% noble agar in 20% fetal calf serum-containing DMEM medium at a density of 104 cells per 6 cm² plate. The growth kinetics of cell expressing WT-hTERT did not differ substantially from those of cells carrying a control retrovirus vector.

Cw2 cells containing sufficient levels of DN-hTERT to inhibit telomerase activity showed slow growth and eventually stopped proliferation.

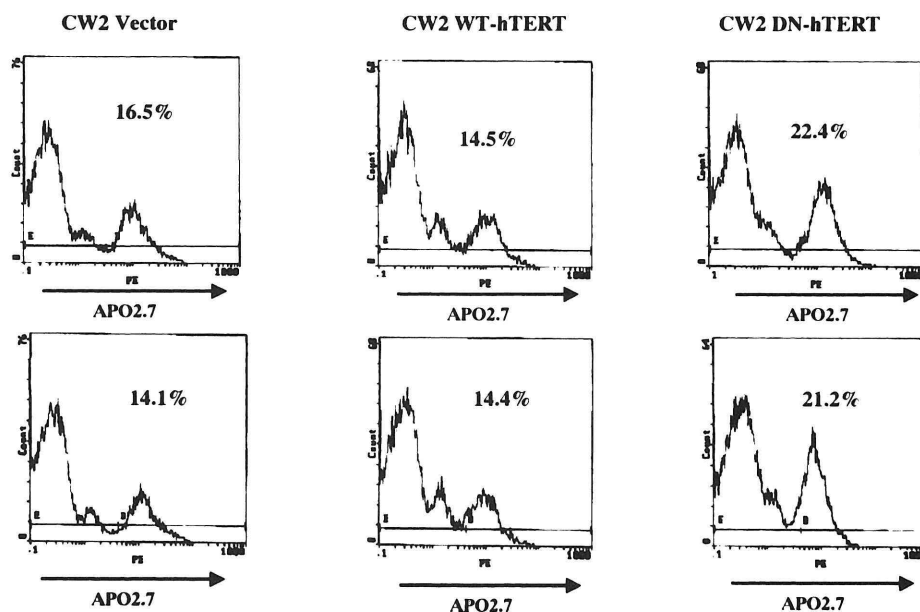


Fig. 7 Effects of WT-hTERT and DN-hTERT on apoptosis.

The incidence of apoptosis was determined by flow cytometric analysis with the FITC-conjugated APO2.7 monoclonal antibody which was raised against the 38 kDa mitochondrial membrane protein (7A6 antigen) and is expressed by cells undergoing apoptosis.

After a time of PD25, 21.2% & 22.4% of cw2 cells transfected by DN-hTERT were observed to undergo apoptosis. Also, cw2 cells transfected by WT-hTERT and control vector underwent 14.1–16.5% rates of apoptosis throughout the experimental period.

1985 年に Greider ら¹⁹⁾ によって、原生動物である繊毛虫類テトラヒメナにおいて初めて同定され、1994 年に Kim ら²⁰⁾ により簡便なテロメラーゼ活性検出法である TRAP 法が登場し癌とテロメラーゼとの高い相関が報告されるようになった。1997 年には中山ら²¹⁾ によりその構成要素が同定されるなど、近年の分子生物学的手法の発展によりその研究は大きく進展した。また、テロメラーゼは ribonucleoprotein であり、触媒サブユニットをはじめとする蛋白サブユニット (群) と RNA サブユニットから構成されている。触媒サブユニット (TERT)^{22,23,24,25)} は逆転写酵素の性質を有し、RNA サブユニット²⁶⁾ 内のテロメア配列に相補的な部分を鋳型として、テロメア DNA の伸長反応を行う。そして、TERTmRNA の発現量とテロメラーゼ活性との間の相関がいくつかのグループから報告された^{22,23,24,25,27,28)}。テロメラーゼ活性を発現しない組織、細胞においては TERTmRNA の発現は認められず、テロメラーゼ活性を発現する癌細胞などでは TERTmRNA の発現が検出される。正常ヒト体細胞の不死化に伴いテロメラーゼ活性の発現が起こるとき、TERTmRNA の出現が酵素活性の上昇と挙動をともにする。また、ある種の癌細胞の分化誘導時においては、TERTmRNA の低下とともにテロメラーゼ活性の低下が観察される。このように、細胞の不死化あるいは分化の過程はそれぞれ、TERTmRNA の発現亢進あるいは発現抑制を介して、テロメラーゼ活性を調節している。本研究では、腫瘍形成にはシグナル伝達系の活性化、細胞周期の進行、チェックポイント機構、DNA 修復機構、アポトーシス機構の破綻、そしてテロメア修復機構の存在が、最低限必要であると考えられることをふまえ、テロメア修復機構を TERT を抑制することにより阻害し、癌細胞を有限分裂寿命化し、死滅させることができるかを検証するために遺伝子導入実験を計画した。

ベクターを導入した細胞株における hTERT の発現は *WT-hTERT*、*DN-hTERT* 発現細胞共に外来性 hTERT の持続的な発現が確認できた (Fig. 3)。テロメラーゼ活性は活性の強い順に *WT-hTERT* を発現させた CW2 細胞株、コントロールベクターを導入した CW2 細胞株、*DN-hTERT* を発現させた CW2 細胞株の順 (Fig. 4) であった。これは *WT-hTERT* を発現させた CW2 細胞株においては外来性の hTERT が発現しその結果テロメラーゼ活性が著明に増加したと考えられる。それに対し *DN-hTERT* を発現させた CW2

細胞株においては *DN-hTERT* が発現しドミナントネガティブ効果を発揮し内来性 hTERT を抑制、外来性 hTERT は RT モチーフ^{29,30)} の 2 カ所にアミノ酸置換を受けているため逆転写がおこらず、細胞全体のテロメラーゼ活性が減少したと考えられる。*DN-hTERT* の内来性 hTERT の抑制の機序が単純に競合的に働き抑制しているのか、変異型 p53 のドミナントネガティブ機序³¹⁾ と同様に、内来性 hTERT とヘテロ多量体を作成するのか、どのような機序が働いているかは現在不明であるが、hTERT が多量体を形成することは現在のところ否定的であり、hTERT が他の蛋白と結合し働いていること^{32,33,34,35)} はすでに確認されていることより、外来性 hTERT が競合的に内来性 hTERT に働きドミナントネガティブ効果を発揮していると予想される。また、myc 遺伝子^{36,37)} が hTERT のプロモーター領域に結合してテロメラーゼ活性が上昇することやエストロゲンにより hTERT の発現が活性化されることが示され hTERT 発現の調節機構の解明にも興味をもたれるところである。

ここでテロメラーゼ活性の増減が実際にテロメア長に影響を及ぼしているかどうかであるが、*DN-hTERT* を発現した CW2 細胞株つまりテロメラーゼ活性が低下した細胞株ではテロメア長は有意に短縮し、*WT-hTERT* を発現した CW2 細胞株つまりテロメラーゼ活性が増加した細胞株のテロメア長は延長していた。つまりはテロメラーゼ活性の増減が実際のテロメア長に相関的に働いているのが確認された。

また、正常腸管粘膜のテロメア長³⁸⁾ は年齢とともに短縮し 10 歳で 12 kb、70 歳で 9 kb 程度であり、一般的に大腸癌のテロメア長は 30% 程度の頻度で短縮している。今回使用した大腸癌細胞株 CW2 のオリジナルのテロメア長は 4.8 kb と正常腸管粘膜と比較すると短縮していたが、これは大腸癌細胞株 CW2 も現在考えられている消化器癌の発生モデルと同様にまずなんらかの遺伝子変異が起こり、growth advantage を得たクローンが発生し、分裂速度が増加しテロメア長が短縮。さらにクローン性の選択を繰り返し分裂寿命 (M2 stage) に達し、テロメラーゼが活性化された細胞、つまり不死化細胞のみが更に選択を受け増殖するという過程をとったと考えられる。

次に細胞株各々の細胞分裂とテロメア長との関係を見ると、*DN-hTERT* を発現させた CW2 細胞株は細胞分裂の度にテロメアの短縮がおこっていることがわかる。コントロールベクターを導入した CW2 細胞

株, *WT-hTERT* を発現させた CW2 細胞株は PD10 と PD25 とでは特にテロメア長に変化を認めないが (Fig. 5), これはテロメラーゼの活性の持続がテロメア長を延々と延長させるわけではないことを示している。癌細胞などの不死化細胞はすでに遺伝子変異により分裂速度が増加しているため, 細胞分裂毎にテロメア長が短縮しない程度のテロメア修復が起こっているためと考えられる。これは臨床の固形癌においてもテロメア長がある一定の長さで安定していることと矛盾しない。またテロメラーゼ陽性不死化細胞においてはテロメア結合蛋白 TRF1 がテロメア 2 本鎖 DNA に結合してテロメラーゼによるテロメア伸長反応を制御することでテロメア長を規定しているとの報告^{39,40)} もある。

テロメラーゼ活性の阻害が細胞増殖にどのような効果を及ぼすかは抗腫瘍治療としてテロメラーゼ阻害を考えるには重要な項目である。

コントロールベクターを導入した CW2 細胞株及び *WT-hTERT* を発現させた CW2 細胞株の成長動態は同様の成長動態を示し観察期間の間増殖し続けた (Fig. 6)。対照的にテロメア長の短縮を認めた *DN-hTERT* を発現させた CW2 細胞株は *DN-hTERT* 発現後, 初期にはテロメラーゼを抑制していない細胞株群と同様に細胞分裂をしていたが PD20 より増殖速度が低下し PD25 には増殖は停止しそれ以後も変化を認めなかった (Fig. 6)。細胞増殖能はテロメアがある時点まで短くなり始めて細胞分裂能の限界に到達し細胞分裂が停止する。つまり, テロメラーゼ抑制の細胞増殖に対する効果は各々の細胞のテロメア長により決定されることが示唆される。CW2 細胞株においては *DN-hTERT* を発現させた CW2 細胞株の PD25 の時点のテロメア長が CW2 の分裂寿命であると考えられる。

DN-hTERT を発現した CW2 細胞株は PD25 のテロメア長は 2.8 kb である (Fig. 5)。一方正常細胞においてはテロメア長は 5 kb 位まで短縮すると増殖が停止する機構が働くと考えられている。

細胞の増殖停止の機構を考えると, 増殖停止に関わる因子は癌細胞においてはすでに変異を起こし, 増殖の抑制が阻害されていることが考えられる。つまり, 正常細胞ではテロメア短縮により細胞増殖を停止する機構が働くが, 癌細胞ではすでに増殖を停止する機構が阻害されているため, 正常細胞のテロメア長の限界を超えてテロメアの短縮が起こっているのではな

いかと考えられる。限界を超えてテロメアが短縮すると, 最後にはテロメア DNA の消失によって染色体の安定性が保てず細胞は M2 期に到達し死滅する。つまり, *DN-hTERT* を発現した CW2 細胞株は増殖停止機構が働いて増殖が停止したのではなく, テロメラーゼ活性の獲得により一度は乗り越えた M2 期 (crisis: M2: motility stage 2) に到達し増殖が停止したと考えられる。

次にこれらの細胞株群を形態学的に観察すると, PD25 以降の *DN-hTERT* を発現した CW2 細胞株では明白な細胞死に付随して認める形態学的変化を認めた。また, TERT を阻害することによりテロメラーゼ活性を抑制した細胞は高率でアポトーシスが誘導されることが報告されている³⁴⁾。そこで各々の細胞株におけるアポトーシスの発現率を調べてみると, 若干 *DN-hTERT* を発現した CW2 細胞株のアポトーシスの発現率が, *WT-hTERT* を発現した CW2 細胞株, 及びコントロールベクターを導入した CW2 細胞株でのアポトーシスの発現率より高かったが有意な差は認めなかった (Fig. 7)。

固形癌細胞は固形癌出現時の固形癌内部の環境因子のため, アポトーシス耐性を示しやすいとされている。固形癌内部では血管形成が十分ではなく, 正常組織ではみられない低酸素やグルコース飢餓状態を生存するために, アポトーシス耐性を獲得した癌細胞が増殖し固形癌を形成していく。そのため, そこから得られた細胞株はアポトーシスを起こしにくいとされている。

しかし, 低酸素等の要因のアポトーシス誘導は p53 の欠損や変異によって抑制されるとされているが, hTERT の阻害によるアポトーシス誘導は p53 欠損細胞³⁴⁾ でも認められており p53 依存性のアポトーシス経路^{35,41)} 以外に p53 に依存しないアポトーシス誘導経路も働いていると考えられている。

これらのことより, 今回我々が使用した CW2 細胞株においては, p53 依存のアポトーシス誘導経路, 及び p53 非依存性のアポトーシス誘導経路が共に抑制されており, アポトーシスの発現率が低かったのではないかと考えられる。

TERT を阻害することによりテロメラーゼ活性を抑制することは, 大腸癌細胞の増殖を抑制し臨床の大腸癌に対する抗腫瘍効果も期待できると考えられた。テロメラーゼを阻害する方法としてアンチセンスオリゴヌクレオチド^{42,43)}, ハンマーヘッドリボザイム⁴⁴⁾,

ヌクレオチド誘導体⁴⁵⁾を使用する方法が報告されているが、これらの方法はテロメラーゼ活性阻害を継続して発現させるのが困難である。しかし、今回我々が用いた方法はテロメラーゼ阻害活性を継続して発現でき、細胞増殖を著明に抑制し得た。しかし、このことが直接的に抗腫瘍効果、つまり癌腫瘍のボリュームの減少につながるわけではない。

テロメラーゼ活性の抑制から細胞増殖抑制までには、テロメアが限界まで短縮するまでのタイムラグがあり、1 グラムサイズの癌組織のテロメラーゼ活性を完全に阻害できたとしても、残存テロメア長によって 10 回の分裂が許されれば、1 キログラムまで大きくなる可能性がある。臨床応用を考えると、たとえテロメラーゼを完全に阻害でき癌細胞の分裂寿命が尽きて死ぬとしても、癌細胞が増殖を停止するまでに腫瘍の増大により人間の生命機能に影響を与えてしまっている意味がない。

しかし、原発巣に対しては、可能な限り外科手術、抗癌剤、放射線その他の手法を併用して、残存癌細胞数を減らし、残りの分裂可能回数を消費させることにより十分な効果が期待できると思われる。また、転移巣に関しては、もともと少数の転移細胞から出発すると考えられるので、仮に 1 個の転移細胞が 1 グラムサイズまで成長するには、少なくとも 30 回の分裂を必要とするため十分な効果が得られる可能性は高い。

このようにテロメラーゼ阻害療法と他の療法を組み合わせるにより、十分な効果が期待できる。また、テロメラーゼ活性は多くの癌で認められるため大腸癌のみにとどまらず多くの種類の癌において有効な治療法と成り得る可能性がある。

今後、数種の癌細胞株を用い、マイクロアレイ等を併用してテロメラーゼの阻害における mRNA の動態を検索することによるアポトーシス経路の解明なども興味を持たれるところである。

結 語

DN-hTERT をレトロウィルスベクターを用いて大腸癌細胞株に発現させ不死化細胞におけるテロメラーゼ阻害の影響を生化学的、生理学的に検討した。

WT-hTERT, *DN-hTERT* 共に細胞内での持続的発現を認めた。*DN-hTERT* の発現によりテロメラーゼ活性の減弱とテロメア長の短縮が確認された。テロメラーゼ阻害により細胞増殖の停止を認め、*DN-hTERT* 導入によるテロメラーゼ阻害は抗癌剤として有用と

成り得る可能性が見いだせた。しかしアポトーシスの誘導は有意ではなく、テロメラーゼ阻害によるアポトーシス経路の更なる検討が必要と思われた。

尚、本稿の一部は第 59 回日本癌学会総会 ミニシンポジウム (テロメア、テロメラーゼの新展開) において発表した。

文 献

- 1) Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R: Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* **244**: 207-211, 1989
- 2) Sugimura T: Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science* **258**: 603-607, 1992
- 3) Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* **87**: 159-170, 1996
- 4) Hayflick L: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636, 1965
- 5) Ide T, Tsuji Y, Ishibashi S: Reinitiation of host DNA synthesis in senescent human diploid cells by infection with Simian Virus 40. *Exp Cell Res* **143**: 343-349, 1983
- 6) Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Bacchetti SB, Hirte HW, Counter CM, Greider CW, Piatyszek MA, Wright WE, Shay JW: Telomerase, Cell Immortality, and Cancer. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **59**: 307-315, 1994
- 7) Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10114-10118, 1992
- 8) Allshire RC, Dempster M, Hastie ND: Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucl Acids Res* **17**: 4611-4627, 1989
- 9) Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-460, 1990
- 10) Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC: Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**: 866-868, 1990
- 11) Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**: 521-529, 1989
- 12) Harley CB: Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutant Res* **256**: 271-282, 1991
- 13) Counter CM, Avilion AA, Lefevre CE, Stewart NG, Gleider CW, Harley CB, Bacchetti S: Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* **11**: 1921-1929, 1992

- 14) Hahn WC, Counter CM : Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* **400** : 464-468, 1999
- 15) Carthy CM, Granville DJ, Jiang H, Levy JG, Rudin CM, Thompson CB, McManus BM, Hunt DW : Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with a porphyrin-derived photosensitizer. *Lab Invest* **79** : 953-956, 1999
- 16) Koester SK, Schlossman SF, Zhang C, Decker SJ, Bolton WE : Apo2.7 defines a shared apoptotic-necrotic pathway in a breast tumor hypoxia model. *Cytometry* **33** : 324-332, 1998
- 17) Bussing A, Verweken W, Wagner M, Wagner B, Pfüller U, Schietzel M : Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry* **37** : 133-139, 1999
- 18) Greider CW : Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* **65** : 337-365, 1996
- 19) Greider CW, Blackburn EH : Identification of a specific telomerase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43** : 405-413, 1985
- 20) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266** : 2011-2015, 1994
- 21) 中山潤一, 石川冬木 : 哺乳類テロメラーゼ. *実験医学* **15** : 1823-1828, 1997
- 22) Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA : hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90** : 785-795, 1997
- 23) Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR : Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277** : 955-959, 1997
- 24) Kilian A, Bowtell DDL, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA : Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* **6** : 2011-2019, 1997
- 25) Harrington L, Zhou W, Mcphail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass MB, Robinson MO : Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev* **11** : 3109-3115, 1997
- 26) Feng J, Funk WD, Wang SS, Winrich SL, Avilion AA, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J : The RNA component of human telomerase. *Science* **269** : 1236-1241, 1995
- 27) Nakayama J, Tahara H, Tahara E, Saito M, Ito K, Nakamura H, Nakanishi T, Tahara E ; Ide T, Ishikawa F : Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* **18** : 65-68, 1998
- 28) Ramakrishnan S, Eppenberger U, Mueller H, Shinkai Y, Narayanan R : Expression profile of the putative catalytic subunit of the telomerase gene. *Cancer Res* **58** : 622-625, 1998
- 29) Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Weinberg RA : The catalytic subunit of Yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 9202-9207, 1997
- 30) Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR : Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276** : 561-567, 1997
- 31) Brachmann RK, Vidal M, Boeke JD : Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots. *Proc Natur Acad Sci USA* **93** : 4091-4095, 1996
- 32) Harrington L, Mcphail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO : A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **275** : 973-977, 1997
- 33) Nakayama J, Saito M, Nakamura H, Matsuura A, Ishikawa F : TLP1 : A gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* **88** : 875-884, 1997
- 34) Hahn CW, Stewart AS, Brooks WM, York GS, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen LR, Knoll HMJ, Meyerson M, Weinberg AR : Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Medicine* **5** : 1164-1170, 1999
- 35) Polyak K, Xia Y, Zweier JL : A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389** : 300-305, 1997
- 36) Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ : Myc activates telomerase. *Genes Dev* **12** : 1769-1774, 1998
- 37) Fujimoto K, Takahashi M : Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against c-myc mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **241** : 775-781, 1997
- 38) Hiyama E, Hiyama K, Tatsumoto N, Kodama T, Shay JW : Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* **9** : 453-458, 1996
- 39) Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T : A human telomeric protein. *Science* **270** : 1663-1667, 1995
- 40) Van Steensel B, de Lange T : Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385** : 740-743, 1997

- 41) Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T: p53 and ATM dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**: 1321-1325, 1999
- 42) Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J: The RNA component of human telomerase. *Science* **269**: 1236-1241, 1995
- 43) Norton JC, Piatyszek MA, Wright WE, Shay JW, Corey DR: Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nature Biotechnol* **14**: 615-619, 1996
- 44) Kanazawa Y, Ohkawa K, Ueda K, Mita E, Takehara T, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N: Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of telomerase activity in extracts of human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res. Commun* **225**: 570-576, 1996
- 45) Fletcher TM, Salazar M, Chen SF: Human telomerase inhibition by 7-deaza-2'-deoxypurine nucleoside triphosphates: *Biochemistry* **35**: 15611-15617, 1996

Inhibition of telomerase induces reduction of telomere length and limits growth of human colon cancer cells

Shunichi KAWASAKI¹⁾, Tetsuzo TAUCHI²⁾, Akihiro NAKAJIMA²⁾,
Motonobu KATANO¹⁾, Kazuma OHYASHIKI²⁾, Takafumi TABUCHI¹⁾

¹⁾Fourth Department of Surgery, Tokyo Medical University

²⁾First Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University

(Director: Prof. Takafumi TABUCHI)

Abstract

Telomerase activity confers cell immortality through stabilization of the chromosome. In most human somatic cells, telomerase expression is repressed. In contrast most human tumors express telomerase. Telomere maintenance is essential to the proliferation of tumor cells. Although the telomerase-inhibited CW2 cells did not exhibit the features of apoptosis, ectopic expression of DN-hTERT resulted in complete inhibition of telomerase activity and reduction of telomere length in CW2. These findings overall suggest that the apoptosis pathway by inhibition of telomerase is not clear, but disruption of telomere maintenance limits the cellular lifespan in human colon cancer cells, and human telomerase reverse transcriptase is an important target for development of anti-neoplastic therapies.

〈Key words〉 Telomerase Activity, hTERT, Colon cancer
