

氏名(本籍)	ふじ わら まさ ちか 藤原正親(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第2119号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Telomeric regulation in cancer cells with low telomerase activity (テロメラーゼ活性の低い癌細胞におけるテロメア調節)
主査	筑波大学教授 医学博士 川上 康
副査	筑波大学教授 医学博士 大塚 盛男
副査	筑波大学教授 医学博士 長田 道夫
副査	筑波大学教授 医学博士 三輪 正直
副査	筑波大学教授 獣医学博士 八神 健一

論文の内容の要旨

(目的)

癌細胞が無限増殖能を獲得し株化するためには、高いテロメラーゼ活性が必須であると考えられてきた。本研究では、稀なテロメラーゼ活性の低いヒト癌細胞株のテロメア調節機構を検討した。

テロメラーゼ活性は human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の転写に加えてその選択的スプライシングによっても調節されるが、その解明は十分ではない。ヒト肺癌細胞における hTERT の発現および選択的スプライシング・パターンを、とくにテロメラーゼ活性が低い細胞に着目して検討した。

また、テロメラーゼによらないテロメア維持機構 (Alternative lengthening of telomeres : ALT) も例外的に存在することが知られている。副腎皮質癌がテロメラーゼ活性陽性である頻度が低いと報告されていることから、副腎皮質癌細胞株 H295R における ALT の有無、およびテロメア調節因子の発現について検討した。

(対象と方法)

ヒト肺癌細胞 6 株のテロメラーゼ活性を TRAP 法により測定した。リアルタイム定量 RT-PCR によって hTERT mRNA 発現量を測定し、さらに RT-PCR により hTERT の 4 つの splicing Variant のうちの活性型 full-length variant の割合を求め、テロメラーゼ活性との関係を検討した。また、Southern 法により各細胞のテロメア長 (TRF 長) を測定した。

H295R 細胞のテロメラーゼ活性を TRAP 法により測定した。パルスフィールド電気泳動を用いて TRF 長を解析し、fluorescence in situ hybridization (FISH) によりテロメア DNA の局在パターンを検討した。また、テロメラーゼ構成成分 (hTERT, hTR, hTEP1)、テロメア結合蛋白 (TRF1, TRF2) の発現を RT-PCR により調べた。さらに、一本鎖テロメア DNA 結合蛋白である URNP A2 および B1 の発現を Western 法により調べ、対照 (293 細胞, HeLa 細胞) と比較した。

(結果)

対照 293 細胞と同等のテロメラーゼ活性を有していた 4 株では、hTERT の発現量は比較的多く、その full-length variant の割合も高かった。テロメラーゼ活性が 293 細胞の 46% であった TKB-4 細胞ときわめて低値 (同 4%) であった TKB-20 細胞では、hTERT の発現量は同等に低いレベルであったが (それぞれ 293 細胞の 4%, 7%), その full-length variant の割合は、TKB-4 では 15.4% であったのに対し、TKB-20 ではごくわずか (0.3%) であった。肺癌細胞株の平均 TRF 長は 4.1 – 11.6kb で、この値と各細胞のテロメラーゼ活性との間には相関はみられなかった。

H295R 細胞ではテロメラーゼ活性が検出されなかった。そのテロメア長は ALT 細胞に特徴的な長く不均一な分布を示しており、さらに FISH でのテロメア・シグナルは個々の細胞間のばらつきが大きく、ALT-associated promyelocytic leukemia (PML) body と考えられる大きく明るいシグナルも認められた。H295R 細胞ではテロメラーゼの構成成分のうち、hTERT が検出されなかった。テロメア結合蛋白 TRF1, TRF2 の発現は、H295R 細胞でも 293 細胞や HeLa 細胞と同様にみられた。H295R 細胞では URNP A2 に対する B1 の発現比率が高く、B1 / A2 比は 293 細胞の約 2 倍、HeLa 細胞の約 6 倍であった。

(考察)

肺癌細胞のテロメラーゼ活性は一様ではなかった。テロメラーゼ活性の低い細胞では、hTERT の転写レベルの調節に加え、選択的スプライシングによる抑制的調節が働いていると考えられる。また、肺癌細胞のテロメア長はテロメラーゼ活性と相関しておらず、テロメラーゼ以外の要因もその調節に関与していると考えられる。

H295R 細胞では、テロメアは ALT により維持されていると考えられる。ALT によるテロメアの維持は、テロメア DNA の組み換えによりなされていると想定されているが、これに一本鎖テロメア結合蛋白 URNP B1 が関与している可能性がある。

(結論)

テロメラーゼ活性の低い肺癌細胞において、テロメラーゼ活性は hTERT の転写に加えて、転写後の選択的スプライシングによっても調節されていることを明らかにした。さらに、副腎皮質癌細胞 H295R がテロメラーゼによらないテロメア維持機構 (ALT) を持つことを明らかにした。H295R 細胞はヒト癌における ALT の意義やメカニズムを研究するためのモデルとして有用であると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

染色体末端に存在するテロメアの機能・構造の変化は腫瘍細胞で認められるゲノムの不安定性に寄与する一つの要因として注目されている。著者が検討したテロメラーゼ活性の低い癌細胞におけるテロメア維持機構は癌細胞における遺伝情報維持機構の破綻を解明する手がかりとなるだけでなく、正常細胞におけるテロメア短小化のメカニズムを分子レベルで解明できる可能性がある。テロメラーゼ活性についても、様々な実験手法により詳細に検討しており非常に貴重な研究であり、今後さらなる研究の発展が期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。