

Inhibition of Telomerase Recruitment and Cancer Cell Death

中嶋, 舞

<https://hdl.handle.net/2324/1441091>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（医学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）



氏 名：中嶋 舞

論文題名：Inhibition of Telomerase Recruitment and Cancer Cell Death

(テロメラーゼの動員阻害と癌細胞死)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

テロメアは、真核生物の染色体末端を保護するタンパク質-DNA 複合体である。通常の細胞では、分裂の際に DNA ポリメラーゼが DNA 鎖の両端まで完全に複製することができず (末端複製問題)、DNA 複製の度にテロメア DNA は短縮されていく。テロメアが限界まで短くなった細胞は分裂を停止し細胞老化の過程に入るが、約 90%の癌細胞はテロメラーゼという酵素を活性化させることでテロメア DNA の複製を可能とし、不死を実現している。

テロメラーゼは、テロメア DNA の鋳型となる RNA および逆転写酵素から成るリボ核タンパク質である。テロメラーゼは通常カハール体内に存在しているが、テロメア DNA を複製する際は、テロメア関連タンパク質の一つである TPP1 によってカハール体からテロメアに動員される。過去の研究で、TPP1 の N 末端オリゴヌクレオチド/オリゴ糖結合ドメインの表面に存在する、グルタミン/ロイシンに富む領域 (TEL patch) が、テロメラーゼの動員に重要であることが報告された。

本研究は、TEL patch が癌細胞の増殖にもたらす影響を明らかにするため、TEL patch の変異型 TPP1 恒常発現細胞の増殖曲線、テロメア長の経時変化、細胞死について検討した。同時に、TEL patch とテロメラーゼを同時に阻害することが、癌細胞の増殖にどのように影響するかについても検討した。全ての実験において、通常のヒール細胞、野生型あるいは TEL patch 変異 TPP1 を恒常発現するヒール細胞(安定発現株)を用いた。安定発現株には、テトラサイクリン発現誘導プロモーターおよび shTPP1、shRNA 抵抗性 TPP1-FLAG、GFP をコードする遺伝子カセットが導入されている (Figure A)。また、TEL patch 変異型として、過去にテロメラーゼの動員を阻害することが報告された 2 種類の TPP1 変異型(E169A/E171A (TEL mut1)、L212A (TEL mut2))を用いた (Figure B)。テロメラーゼの阻害には、テロメラーゼの選択的、非競合的阻害剤である BIBR1532 を使用した。

初めに、100 日間各細胞株を培養し増殖曲線を比較した所、全ての細胞株で BIBR1532 投与下において細胞増殖が抑制された。興味深いことに、TEL patch 変異株では BIBR1532 非投与下でも細胞増殖は抑制されており、また BIBR1532 による細胞増殖抑制効果も顕著に増加していた (Figure C)。このことより、TEL patch の変異とテロメラーゼの阻害は、培養早期 (約 30 日まで)に細胞増殖を抑制することが明らかになった。

次に、各細胞株のテロメア長を時系列で測定し、細胞増殖抑制とテロメア長の相関を明らかにした。まず BIBR1532 非存在下では、野生型 TPP1 安定発現株ではテロメア長の伸長がみられたが、TEL patch 変異株では 24 日 - 40 日間テロメアの伸長が抑制された。一方 BIBR1532 存在下では全ての細胞株でテロメア長の伸長を認めず、テロメアの伸長はテロメラーゼ依存性であることが示され

た。また、TEL patch 変異株におけるテロメア伸長の抑制と、細胞増殖の抑制との間に強い時期的相関が見られた。

培養早期において、TEL patch 変異株ではアポトーシスに特徴的な形態変化 (細胞の円形化、縮小) が観察された。また、アポトーシスマーカーである cleaved caspase-3 が培養早期 (28 日) に検出され、annexin V の陽性細胞率も同時期 (35 日) に上昇していた。さらに、アポトーシスは BIBR1532 の存在下において亢進され、培養早期の細胞増殖動態とも相関していた。以上より、アポトーシスが TEL patch 変異株における細胞増殖抑制の一因であることが証明された。

ところが、培養後期 (約 40 日から) においては、TEL patch 変異株の細胞増殖およびテロメア長は回復していた。驚くべき事に、遺伝子カセット上の TPP1-FLAG 配列と TEL patch 変異は保持されているにもかかわらず、TEL patch 変異株の培養後期における TPP1-FLAG の発現量は顕著に低下していた。さらに、同遺伝子カセット上の GFP、shTPP1 も発現量が低下していることが明らかとなり、培養後期に生存している TEL patch 変異細胞は、遺伝子カセットのサイレンシングにより TEL patch 変異型 TPP1 の発現を停止し、内在性 TPP1 の発現を回復することで長期生存を可能にしていることが証明された。

以上の結果より、本研究において、TEL patch が癌細胞の生存能に重要であることが示された。また、TEL patch 変異株における細胞増殖抑制の一因がアポトーシスであることが明らかになった。TEL patch 変異株におけるテロメア短縮と細胞分裂抑制の詳細な関連性は未だ明らかでないが、ほ乳類細胞でテロメアの機能不全がアポトーシスを誘導することは過去に証明されている。また、TEL patch の変異による細胞増殖抑制効果は、テロメラーゼ阻害剤の併用により相乗的に増幅されることから、TEL patch とテロメラーゼの両者を標的とした新たな癌治療戦略の有効性が示唆された。

Figure

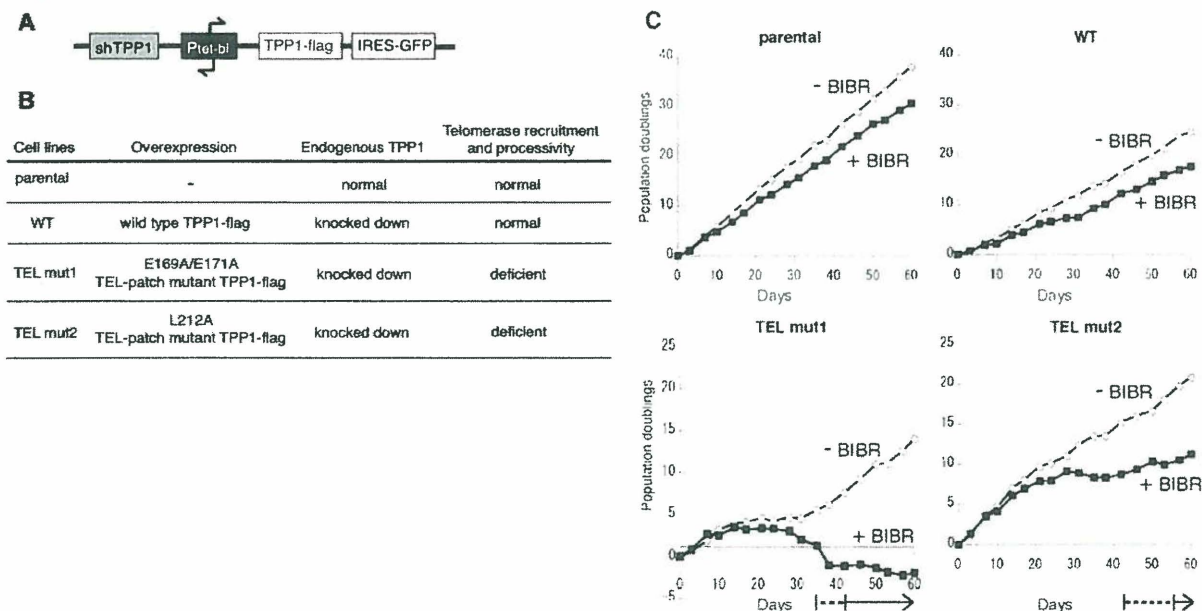


Figure: A. TPP1恒常発現株に導入されている遺伝子カセット。内在性TPP1を標的とするshRNA (*shTPP1*)、shRNA抵抗性TPP1-FLAG (*TPP1-FLAG*)、internal ribosome entry siteを有するGFP (*IRES-GFP*)、両方向性テトラサイクリン発現誘導プロモーター (*Ptet-bi*) がコードされている。B. 本研究で用いた細胞株の一覧。C. 各細胞株のBIBR1532非存在下 (-BIBR)または20 μ MのBIBR1532存在下 (BIBR+)における増殖曲線。TEL mut1, 2の下部の点線はTPP1-FLAGの発現が失われるまでの期間、実線矢印は発現が停止されたこと示す。

parental: ヒーラ細胞/WT: 野生型TPP1恒常発現株/TEL mut1 and TEL mut2: 変異型TPP1恒常発現株