〔シンポジウム：新技術による遺伝子診断〕

テロメア機能構造による遺伝子不安定性の解析

石 川 冬 木

SUMMARY

The chromosome ends, called telomeres, are essential for stable transmission of chromosomes. Recent progress in molecular understanding of telomere structures and functions have enabled us to reason how telomere insufficiencies lead to chromosome instability. Examples that can be explained by this hypothesis include cellular aging and cancer progression.

Key words: telomere, telomerase, aging, cancer.

染色体テロメアとは

我々ヒトをはじめ、全ての真核生物は線状の染色体を持ち、その両末端部分はテロメアと呼ばれている。対照的に、大腸菌などの原核生物は、多くの場合環状染色体をもつ。この進化上、非常に保存された際だった対比がいかなる理由により生じるのかは明らかではない。

線状ゲノム DNA をもつために、真核生物は染色体を安定に維持する上で重要な問題点をかかえこむ。一般に、化学的性質から複数の DNA は末端同士で融合してより長い DNA を作る傾向がある。しかし、正常なヒト細胞がもつ DNA の本数は 46 本で一定であり、染色体同士が融合して本数が少なくなることはない。すなわち、線状染色体は末端同士が融合しないようにする何らかの仕組みをもっている。この機能は、テロメア構造、すなわちテロメア DNA とテロメア特異的あるいは非特異的蛋白質からなる巨大な構造体により果たされている。逆に何らかの理由で染色体がテロメア機能を失った場合には、染色体はお互いに融合を繰り返し非常に不安定になると考えられる。すなわち、テロメア機能は染色体の安定な維持に必須である。

末端複製問題

線状ゲノムの末端部分は、末端同士の融合のほかに、DNA 複製の上でも特殊な性質を有する。すなわち、DNA 複製酵素はその生化学的な性質から、DNA の最も

末端部分を完全には複製できないことが知られている。このため、細胞分裂が起こるたびに、DNA 末端部分すなわちテロメア DNA はしだいに短小化する。このことは、末端複製問題として古く 1970 年代初頭に仮説として提唱されたのであるが^{1,2)}、1980 年代後半にヒトテロメア DNA の塩基配列が TTAGGG の繰り返し構造であることが明らかになると、実際に生体内で起きていることが証明された (図 1 A, B)^{3,4)}。すなわち、さまざまな年齢の個体について同じ組織のテロメアの長さを調べてみると、加齢とともにしだいに短小化することが示された。

テロメア DNA を伸長させる酵素テロメラーゼ

染色体テロメアが細胞分裂のたびに短小化するとすれば、なぜ染色体はテロメアからどんどん短小化してついにはなくならないのであろうか。それは、生物には短くなったテロメア DNA を伸長させるテロメラーゼと呼ばれる特殊な酵素が備わっているからである⁵⁻⁹⁾。テロメラーゼは、TTAGGG 繰り返し配列であるテロメア DNA の末端に、さらに TTAGGG を合成付加することでこれを伸長させる働きをもつ (図 2)。テロメラーゼは単一の蛋白質からなる酵素ではなく、RNA と蛋白質の複合体である。RNA 成分は、TTAGGG という決まったテロメア DNA 配列を合成するためにそれと相補的な配列である CCCUAA を含み、この配列を鋳型として用いて蛋白質部分がテロメア DNA 配列を正確に合成する。

Genomic instability due to telomere insufficiencies.

Fuyuki Ishikawa; 東京工業大学生命理工学研究科

Correspondence address: Fuyuki Ishikawa, Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan.

第 49 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

図1. テロメアと細胞増殖に伴うテロメアの短小化。

A. テロメアは線状 DNA の末端部分を保護するために、蛋白質と DNA 末端とから構成される複合体である。テロメア DNA は、TTAGGG の繰り返し配列からなる。B. 様々な年齢の健康人より末梢血液細胞を採取し、サザンハイブリダイゼーションにより細胞の平均テロメア長を求め図示したもの。加齢とともに平均テロメア長がしだいに短小化することがわかる。

テロメラーゼは卵や精子などの生殖細胞を作る生殖細胞系列で活性が著しく高い。神経や心臓など我々の体を構成し機能する大部分の体細胞は、個体の死とともに死すべき運命にあるが、生殖細胞は受精し子孫を作ることによって次世代に伝わる事ができる。このように考えると、生殖細胞は世代を超えて種の続く限り細胞増殖を永遠に行う細胞であるといえよう。生殖細胞では、テロメラーゼが存在するおかげで細胞増殖にともなうテロメアの短小化に拮抗してこれをある長さに維持することができる。このため、生殖細胞はテロメアを失うことなく無限に細胞増殖を続ける。生殖細胞と対照的に体細胞ではテロメラーゼ活性は例外を除き検出されない¹⁰⁾。それでは、体細胞は細胞増殖の末にテロメアを失ってしまうことがあるのであろうか。

細胞老化：正常体細胞の細胞分裂可能回数の有限性

線維芽細胞などの細胞分裂可能な正常体細胞を個体より採取し継代培養を続けると、はじめは盛んに増殖を続けるが、必ず有限の細胞分裂回数の後に増殖を停止する。この現象は、1961年に米国の L. Hayflick により胎児由来の線維芽細胞について発見され、その後、さまざまな年齢の個体由来の種々の細胞について当てはまる現象であることが確かめられた¹¹⁾。高齢者より採取した細胞は若年者のものと比較すると、少ない分裂回数の後に増殖を停止する。このことから、個体発生以来すでに生体内で行った分裂回数と継代培養に移行してから行うことのできる分裂回数の和が一定であると想定され、試験管内の増殖停止は高齢者個体内で実際に起きている細胞老化の少なくとも一部を反映

テロメア配列へテロメア配列を付加する：テロメアの伸長作用

非テロメア配列へテロメア配列を新規に付加する：切断染色体切断端の修復

図2. テロメラーゼの機能。

テロメラーゼは、生理的には既にテロメア配列をもつテロメア末端に新たにテロメア DNA を付加することでテロメアを伸長させる働きをもつ。しかし、テロメラーゼの基質特異性が低いために、しばしばテロメア配列以外の DNA 末端にも新たにテロメア配列を付加することがある。これは、テロメア配列をもたない切断染色体の末端にテロメア機能を新たに付与して異常染色体を安定化することに相当する。

しているものと考えられている。正常体細胞の細胞分裂回数が一定であることを、Hayflick 限界あるいは細胞分裂寿命と呼び、細胞分裂寿命により細胞増殖を停止することを細胞老化という。老化細胞は決して死んでしまうわけではなく、基礎的代謝活動を行っている。しかし、増殖因子などの増殖刺激に対して反応して細胞分裂を行う能力を欠いている。

我々の体を構成する臓器・組織の中には、造血細胞や上皮細胞のように、日々一定量の細胞が死にゆく一方、新しい細胞が再生産されて不足分をおぎなう動的平衡状態の上にはじめて維持されるものがある。このような組織で、細胞増殖回数の有限性のゆえに死にゆく細胞の数に見合うだけの細胞が再生産されないとしたら、組織はその機能を維持し得ないであろう。すなわち、細胞老化は生体の老化の一部を説明する可能性がある。このような考え方による動的再生産組織の老化機構モデルが細胞老化仮説である。

テロメアの短小化が細胞老化を誘導する

細胞老化が生じるためには、それまで行ってきた総細胞分裂回数を記録する仕組みが必要であるが、その具体的な分子機構は長らく不明であった。しかし、この数年間の研究により染色体末端部分テロメアがその役割を果たしていることが明らかになりつつある¹²⁾。すでに述べたように、テロメラーゼ活性をもたないほとんどの正常体細胞は細胞増殖のたびにテロメア長が短小化する。テロメアは染色体

の安定性にとって非常に重要な役割を果たすので、細胞はテロメアが完全に失われないようにするメカニズムをもっている。テロメラーゼをもたない細胞では、テロメア短小化の原因である細胞増殖を抑制することによってこのことが達成される。すなわち、テロメアはその長さによって細胞が行ってきたのべ分裂回数を測定し、それが一定の閾値まで短くなると細胞増殖を停止させるような信号を発するものと考えられている (図3)。

この「テロメア=老化時計」仮説は、最近、以下のような実験で証明された。先にも述べたように、テロメラーゼはほとんどの体細胞では活性がなく、そのためにテロメア長が細胞分裂のたびに短小化する。テロメラーゼは、合成すべきテロメア配列の鋳型 RNA をコードしている TERC 遺伝子と触媒サブユニットをコードしている TERT 遺伝子により作られる。TERT 遺伝子は、最近、我々のグループをはじめ、いくつかの研究グループにより独立して同定された遺伝子である^{13~15)}。我々は細胞の種類によりテロメラーゼ活性の有無が異なるのは、主に TERT 遺伝子の発現の有無によることを明らかにした¹⁵⁾。すなわち、テロメラーゼ活性のない正常体細胞では TERT 遺伝子の発現がなく、活性が高い生殖細胞や癌細胞においては、発現が認められる。さらにテロメラーゼ活性のないヒト正常線維芽細胞に TERT 遺伝子を遺伝子導入法により強制発現すると、テロメラーゼ活性が誘導されることを示した。そこで、米国のベンチャー企業 Geron

図3. テロメア短小化に伴う細胞老化。

末端複製問題のため、テロメラーゼ活性のない正常体細胞は細胞分裂のたびにしだいにテロメア長が短小化する。テロメアがある閾値まで短小化した時に、それを認識するセンサー (目で模式的に示してある) が活性化されて、テロメア機能不全をきたさないように、細胞増殖を抑制する信号が活性化されると考えられている。このため、テロメア長は細胞老化がいつ起こるかを規定している老化時計にしばしばとえられる。正常体細胞にテロメラーゼ遺伝子を安定に導入すると、テロメラーゼ活性が常に存在し、生殖細胞と同じように何回分裂を行ってもテロメア長が短小化しない状態を作ることができる。ある場合には、このような細胞は細胞老化を示さず、正常細胞のまま無限に増殖できるようになることが報告されている。

の科学者たちは、正常線維芽細胞に TERT 遺伝子を安定に発現させて常にテロメラーゼが存在する状態にすると、正常細胞では総細胞増殖回数の亢進とともにテロメア長が短小化し約 50 回の分裂回数で増殖停止してしまうものが、遺伝子導入されテロメラーゼ活性が誘導された場合にはテロメア短小化がみられず、同時に細胞増殖も少なくとも 200 回以上にわたって持続できることを見いだした¹⁶⁻¹⁸⁾。このことは、テロメアの短小化が細胞老化の引き金となることを端的に示したものである。

悪性腫瘍とテロメア

ヒト細胞テロメラーゼは活性が非常に低いために、それを測定することは長らく困難であった。しかし、我々の開発したストレッチ PCR 法¹⁹⁾や Geron の開発した TRAP 法²⁰⁾など、PCR を応用した高感度測定法が開発されて、現在では、容易に様々な細胞について活性を検出することができるようになってきている。正常細胞、癌細胞のテロメラーゼ活性については莫大な数の報告が存在するが、それらを総覧すると、明らかな悪性腫瘍の約 9 割の症例でテロメラーゼ活性が検出されている¹⁰⁾。前癌状態である大腸ポリープから明らかな癌である大腸癌へと悪性化する過程を追跡した結果から、テロメラーゼは細胞の癌化の初期では活性がない場合も見受けられ、明らかに悪性形質を獲得する発癌後期に一樣に活性が認められることがわかった。

テロメラーゼが癌細胞で高率に活性化される理由について、いくつかの見解が存在する。癌細胞は正常細胞と比較すると莫大な数の細胞分裂を行う。そこで、一般には、癌細胞のテロメラーゼは細胞増殖にともなうテロメアの短小化により、染色体が失われてしまうことを防ぐために存在すると考えることが多い。テロメラーゼを全くもたないヒト正常線維芽細胞が約 50~70 回の細胞分裂でテロメアが閾値まで短小化し細胞老化を迎えていることを考えれば、無限に増殖する癌細胞由来の細胞株などでは明らかにテロメラーゼによってテロメアを完全に失うことを防いでいると考えてよいであろう¹⁰⁾。

一方、癌細胞のテロメラーゼ活性は単にテロメアの過度の短小化を防いでいる以外の重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。マウスはヒトと比較して非常に長い約 50 kb のテロメア長を維持している。テロメラーゼ活性に必須な RNA 成分をコードする TERC 遺伝子を破壊したノックアウトマウスの報告がある。このマウスは遺伝子破壊後、5 世代まではほとんど表現型を示さず、第 6 世代となつてはじめてテロメアが過度に短小化し細胞老化様徴候を示した。マウス生殖系列は 1 世代あたり約 60 回の細胞分裂を行うと推定されており、これはマウスがもともと 50 kb にわたる長いテロメア長をもっていたために、ヒトでは約 50 回の細胞分裂で細胞老化に至るところが、マ

ウスでは $60 \times 5 = 300$ 回程度の細胞分裂を行ってはいじめてテロメアが有意に短小化したためと理解できる²¹⁾。一方、マウスの悪性腫瘍もまた、ヒトと同じように非常に高い頻度でテロメラーゼ活性を示す。しかし、一つの細胞から悪性腫瘍が形成されるためには、300 回の細胞分裂は必要としない。このことは、マウス悪性腫瘍はいまだテロメア長が十分に長いにもかかわらずテロメラーゼを活性化させたことを意味する。すなわち、テロメラーゼの悪性腫瘍における高頻度の活性化には、単なるテロメアの維持目的以外に理由があると推測される。

テロメラーゼによる切断染色体の修復作用

テロメラーゼは既にあるテロメア末端にさらにテロメア DNA を合成付加する酵素であるが、その基質特異性は低く、しばしばテロメア配列以外の DNA 末端にも作用してテロメア配列を付加する (図 2 B)。これを細胞内についてあてはめてみると、染色体が切断された時にできる非テロメア末端にテロメア配列を付加してテロメア化することに相当する。癌細胞では、細胞周期チェックポイント機能の異常により染色体が切断される機会が多い。しかし、このような切断染色体の末端部分にはテロメア配列が存在しないために、このままではお互いに融合して染色体は失われてしまう。しかしテロメラーゼにより切断端にテロメア配列が新たに付与されてテロメアとして切断端が修復された切断染色体は安定に存在しうようになる。このような染色体は欠失染色体と呼ばれ、癌細胞ではしばしば観察される染色体異常である。欠失染色体はしばしば欠失部分に癌抑制遺伝子をもち、欠失により癌抑制遺伝子のコピー数を少なくすることで細胞の悪性化に貢献する。以上のことから、癌細胞に認められる強いテロメラーゼ活性は、既にあるテロメアを伸長して細胞増殖の持続を保証するとともに、異常染色体の産生に貢献することで癌の悪性化に寄与するものと考えられる²²⁾。

テロメラーゼの臨床応用

テロメラーゼの臨床応用として、(1) 正常では存在しない体細胞にテロメラーゼを人為的に誘導して効果を期待する、(2) 癌細胞の高いテロメラーゼ活性を抑制することで効果を期待する、の二通りの場合が考えられる。

1. 正常細胞へのテロメラーゼの誘導²³⁾

すでに述べたようにテロメラーゼを過剰発現することでテロメア長を伸長させ細胞寿命を回避することができるのであれば、テロメラーゼを利用した老化を阻止する何らかの治療法が考えられないであろうか。まず最初に述べねばならないことは、個体の老化の原因の中で細胞老化はその一部にすぎず、たとえば細胞増殖を行わない神経細胞の老化の原因とはなり得ないことである。すなわち、仮に完全

に細胞老化を抑制することができたとしても、個体老化の全てを阻止することはできず、したがってテロメラーゼは「不老不死」の薬とはなり得ないことは明らかである。しかし、少なくとも一部の細胞老化過程については興味深い応用の可能性を考えることができる。骨髓移植はドナーの骨髓を採取して、治療や病気のために造血能力を完全に失ったレシピエントに注入し、ドナー由来の造血細胞がレシピエントで機能して造血することを企図した治療法である。近年、骨髓移植は多くの施設で活発に行われるようになり、白血病など他の治療法では治療させることの難しい疾患の患者に福音をもたらしている。しかし、一部の症例ではドナー由来の造血細胞がレシピエント内でうまく機能せず患者の造血能力が回復しないことが起こる。その原因はいくつかの理由によるが、高齢者のドナー由来の造血細胞が比較的成績が悪いのは、それらの細胞が既に細胞老化をきたしつつあるためであるといわれている。高齢者ドナー由来の短いテロメア長をもった骨髓細胞に試験管内でテロメラーゼを作用させ、そのテロメア長を伸長させ「老化時計を巻き戻す」ことができれば、これらの細胞を用いた骨髓移植の成功率も高くなる可能性がある。

骨髓細胞にかぎらず、皮膚上皮や肝細胞などの正常細胞は細胞老化を示すため、試験管内で無限に増殖させることができない。このため、皮膚移植や肝細胞移植などの治療に用いる細胞は、患者もしくは第三者の正常組織を一部採取して用いているのが現状である。もしテロメラーゼを誘導して試験管内でこれらの細胞を正常形質を維持したまま無限に増やすことができれば、このような移植治療にとっても大きな意義をもつであろう。

2. 悪性腫瘍のテロメラーゼ活性の抑制²²⁾

悪性腫瘍は高率に高いテロメラーゼ活性をもつことから、テロメラーゼ活性を阻害することで何らかの抗腫瘍効果が得られるのではないかと期待されている。テロメラーゼを阻害することにより最も単純に予想される効果は、癌細胞がテロメラーゼなしで増殖するとついにテロメアを失ってしまい癌細胞が死ぬのではないかと、という期待である。すでにある程度の長さのテロメアをもつ癌細胞に対してテロメラーゼ阻害が完全に可能であったとしても、どれだけの期間の後に癌細胞が完全にテロメアを失い死ぬのかをわからないため、この効果に疑問をもつ意見もある。また、正常細胞の中でも生殖細胞や造血幹細胞はテロメラーゼ活性をもつことが知られているので、これらの細胞に副作用が及ぶのではないかと懸念される。

第二の効果として期待されるのは、癌細胞のテロメラーゼを阻害することで、異常染色体が修復され欠失染色体として癌の悪性化に貢献することを防ごうとする考え方である。欠失染色体のテロメラーゼによる修復は、テロメア配列以外の DNA にテロメラーゼがテロメア DNA を付加す

る反応であるので、テロメア DNA にテロメラーゼが作用するよりも起こりにくい反応であると考えられる。したがって、この作用機序に基づく効果は、テロメラーゼを完全に阻害するよりは低い IC50 をもつであろう。すなわち、この程度のテロメラーゼ阻害では正常細胞の生理的なテロメラーゼ反応を阻害することなく副作用が少ないと創造される。また、このように分子作用点に基づきながら殺細胞効果ではなく悪性度進展の阻害をめざした抗腫瘍剤はこれまでに報告がなく、治療が難しい症例など、従来治療が困難であった症例に広く応用することができると期待される。

文 献

- 1) Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 1972; 239: 197-201.
- 2) Olovnikov AM. A theory of marginotomy. *J Theor Biol* 1973; 41: 181-90.
- 3) Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-62.
- 4) Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; 345: 866-8.
- 5) Blackburn EH. Telomeres. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 113-29.
- 6) Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985; 43: 405-13.
- 7) Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987; 51: 887-98.
- 8) Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989; 337: 331-7.
- 9) Shippen-Lentz D, Blackburn EH. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 1990; 247: 546-52.
- 10) Harley CB, Villeponteau B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 249-55.
- 11) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
- 12) Harley CB. Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb? *Mut Res* 1991; 256: 271-82.
- 13) 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* 1997; 277: 955-9.
- 14) 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* 1997; 90: 785-95.
- 15) 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* 1998; 18: 65-8.
- 16) Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
- 17) Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 1999; 21: 115-8.
- 18) Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 1999; 21: 111-4.
- 19) Tatematsu K, Nakayama J, Danbara M, Shionoya S, Sato H, Omine M, Ishikawa F. A novel quantitative "stretch PCR assay", that detects a dramatic increase in telomerase activity during the progression of myeloid leukemias. *Oncogene* 1996; 13: 2265-74.
- 20) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
- 21) Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91: 25-34.
- 22) Ishikawa F. Telomere crisis, the driving force in cancer cell evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230: 1-6.
- 23) Ishikawa F. FISH goes with the flow. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 723-4.