

平成 11 年度厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書・分担研究報告書

研究課題名 老化時計としてのテロメアの役割  
主任研究者 石川冬木（東京工業大学大学院生命理工学研究科）  
分担研究者 井出利憲（広島大学医学部）  
吉栖正生（東京大学医学部）  
中西 真（名古屋市立大学医学部）

老化時計としてのテロメアの役割に関する研究

主任研究者 石川 冬木 東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授

細胞老化が染色体テロメアの短小化により誘導される現象について、特に以下の4点について解析を行った。第一に、テロメラーゼ触媒サブユニット TERT の欠損マウスを作成した。このマウスでは、 $\Delta$ を五世代維持することで、生殖細胞、上皮細胞の萎縮を認め、テロメア老化時計の *in vivo* モデルとして今後重要な役割を果たすことが期待された。第二に、テロメラーゼ活性化によるテロメア長の伸長のみでヒト線維芽細胞の分裂寿命が回避されるかどうか検討をしたところ、テロメア長はまちがいに重要役割を果たしているが、その他の未知な因子の関与も示唆された。第三に、テロメア短小化に伴う細胞周期停止がどのような分子機構をヒト Chk1, Cds1 について検討した。最後に、特に動脈硬化と関連して、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の増殖制御機構について解析を行った。以上の研究成果より、テロメア老化時計の実態に迫る成績をおさめることができた。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

井出 利憲 広島大学医学部 教授

吉栖 正生 東京大学医学部老年病科 講師

中西 真 名古屋市立大学医学部 助教授

A. 研究目的

古くより老化の原因として、「誤り蓄積仮説」と「老化プログラム仮説」とが提唱されてきた。後者は、細胞もしくは個体に老化現象を発動する仕組みが具わっており、その信号により老化が積極的に誘起されると考える。この仮説に基づくと、老化プログラムには、いつ老化を起すかを決定する「老化時計」、老化時計が「巻き戻った」時に活性化される「老化シグナル」、そして実際に老化形質をもたらす「老化イフェクター分子」の存在が想定される。正常体細胞は有限の細胞分裂回数しか行うことができず、分裂可能回数を終え増殖刺激に対して不応となっ

た細胞は老化細胞と呼ばれる。老化細胞は個体老化や成人病の少なくとも一部、すなわち動脈硬化症や高齢者の免疫不全などを説明することができる。ある分裂回数後に細胞老化がおこることは老化プログラムの存在を示唆するものであるが、その分子の実体が知られていなかったために、「老化プログラム仮説」の真偽については長い論争の歴史があった。しかし、最近、染色体末端テロメアが「老化時計」に相当する可能性が注目されている。

染色体末端テロメアは、染色体が安定に存在するために必須な染色体の構成要素である。テロメア DNA は細胞分裂に伴う通常の DNA 複製では完全には合成されない。この結果、テロメア DNA は細胞分裂のたびに次第に短小化する。このことから、テロメア長は受精して個体が発生して以来細胞が行ってきた総細胞分裂回数を記録するレコーダーに例えられる。高齢者の体細胞や細胞培養を繰り返した老化細胞は、非常

に短いテロメア長を示し、それ以上短小化することはない。この時期に応じて細胞は老化を示す、すなわち増殖刺激に不応性となることから、テロメアの短小化と細胞老化とは何らかの因果関係にあるのではないかと近年興味を持たれてきた。

生殖細胞は世代をこえて続く数多くの細胞分裂を行うにもかかわらず、長いテロメア長を維持することができる。これは、生殖細胞に短小化したテロメアを伸長化させる酵素テロメラーズの活性が特異的に存在するためである。テロメラーズはいまだ未知の機構により胎児が発生して組織が分化するとほとんどの正常体細胞では検出されなくなる。このため、正常体細胞は加齢とともに総細胞分裂回数が更新しテロメア長が短小化する。ヒトテロメラーズの分子的実体は長らく不明であったが、1997年に我々やいくつかのグループにより独立してヒトテロメラーズをコードする遺伝子 TERT (telomerase reverse transcriptase) がクローン化された。また、TERT を本来テロメラーズ活性をもたない正常細胞に遺伝子導入しテロメラーズ活性を誘導すると、テロメア長の伸長とともに継代培養を繰り返しても細胞老化が回避されることが報告された。この事実は、実際にテロメア長が細胞老化を誘導する老化時計に相当し、テロメラーズは老化時計をリセットする酵素であることを示している。本研究の目的は、テロメアと細胞老化の因果関係が証明されたことを受けて、その間の分子的な因果律を明らかにすることである。本研究の延長には、テロメア老化時計をリセットする酵素としてのテロメラーズのアゴニストを用いることで、動脈硬化症などの細胞老化に基づく成人病を予防する手段を開発することを視野に入れている。

## B. 研究方法

### テロメラーズ欠損マウスの作成

マウス TERT cDNA を用いてマウス TERT ゲノムクローンを 129 株由来のマウスゲノムライブラリーよりスクリーニングし、陽性クローンを得た。TERT 蛋白質は、その C 端半分に活性に重要な役割を果たしている逆転写酵素モチーフを含んでいる。我々は、そのうちのいくつかのアスパラギン酸残基が活性に必須であることを既に報告しているため、今回は、これらのアスパラギン酸を含む領域が欠失するように設計したターゲッティングベクターを作成し、定法どおり、129 株由来の ES 細胞を用いてターゲッティングを行い、これを B6 由来の胚盤胞に注入してキメラマウスを得た。このキメラマウスを B6 マウスと交配させて、ターゲッティングアレルをもつヘテロマウスを作成した後、ヘテロマウスの間の交配により第一世代(G1)の TERT<sup>-/-</sup>マウスを得た。G1 同士の交配により G2 を得、以降、同様に G5 まで得た。組み換え動物の作成は、東京大学医学部において共同研究として行われた。テロメラーズ触媒サブユニット遺伝子 TERT の細胞の不死化における役割の検討

テロメラーズの触媒サブユニット hTERT の cDNA を、ヒト正常線維芽細胞、ヒト正常血管内皮細胞、およびそれらに癌遺伝子である SV40 の T 抗原を導入した細胞に導入し、導入細胞クローンを選択して継代し、分裂寿命の延長と不死化について検討した。これらの細胞について、テロメラーズ活性およびテロメア長を定法により測定した。また、ノーザン、サザン、ウエスタン解析により、種々の遺伝子機能を調べた。T 抗原の機能を調べるため、許容・非許容温度で細胞を培養し、細胞増殖、DNA 合成、種々の生化学的マーカーを解析した。

## ヒト細胞周期チェックポイント遺伝子 Chk1, Cds1 の解析

ヒト Chk1 の DNA 傷害あるいは複製チェックポイント機構における役割を明らかにするために、正常線維芽細胞、HeLa 細胞、ATM 欠失線維芽細胞を G1/S 移行期に同調させて、それぞれ UV、X 線、MMS、アフィディコリンで細胞を処理した後に、抗 Chk1 抗体を用いて Chk1 蛋白質の修飾および活性変化を測定した。Chk1 の活性測定には基質として GST-Cdc25C を用いた。同様に、ヒト Cds1 についても解析した。また、Chk1 の生理機能を明らかにする目的で、Chk1 ノックアウトマウスの作製とその解析を行った。

## 血管内皮細胞・平滑筋細胞の増殖制御の解析

血管内皮細胞の増殖制御を明らかにする目的で、細胞周期制御因子の一つであるサイクリン A 遺伝子の発現調節機構を解析した。

血管平滑筋細胞の遊走の実験は、老化していないラット大動脈血管平滑筋細胞 rat aortic smooth muscle cells (RASMC) を用いて、Boyden-chamber 法により、PDGF-BB (10 ng/ml) 6 時間の刺激による RASMC の遊走を定量した。Red Wine Polyphenol (RW-PF) は adsorption chromatography により精製し (Suntory 基礎研究所)、細胞培養液中に添加し、その RASMC 遊走に対する影響を検討した。

また、カッターにより一定面積の培養細胞を剥離し、引き続き PDGF-BB や、10%血清で刺激を行ない細胞の再生面積を評価する、損傷治癒モデルを作成した。この系を用いて RW-PF の前投与が RASMC 再生面積に与える影響を、老化させていないウシ頸動脈内皮細胞 bovine carotid endothelial cells (BCEC) (10%血清刺激) を対照として検討した。この方法は、平滑筋細胞においては、主として遊走能を見ているが、血管内皮細胞においては、細胞の遊走と増殖の

積算である「内皮再生」の能力の評価にも用いることができる有用な系である。RW-PF の血管内皮細胞機能に対する影響を検討するため、増殖因子添加による内皮細胞接着因子発現誘導 (病的な状態に相当する) に対する、RW-PF 前処置の影響の検討も行った。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、それぞれの研究施設の学内研究指針に則り行われた。ヒト由来プライマリー細胞を用いた研究に関しては、廃棄される臍帯を提供者の同意のもとに得て、それから細胞を単離した企業から、通常の販売経路を通じて購入したものである。

## C. 研究結果

### テロメラーズ欠損マウスの作成 (石川)

ヘテロマウス間の交配により G1 は、メンデル遺伝より期待される頻度に生まれ、野生型マウス、ヘテロマウスと比較して異常な表現型を示さなかった。しかし、野生型では高いテロメラーズ活性が認められる胎児由来線維芽細胞、肝臓、精巣について、G1 マウスでは全くテロメラーズ活性が認められなかった。このことは、TERT 遺伝子が唯一のテロメラーズ触媒サブユニットをコードする遺伝子であることを示している。ホモ欠失マウス同士の交配を続けることで、G5 マウスまでを作成した。この間、G4 マウスから G5 マウスが生まれる時に、一腹あたりの出生数が低下していた。さらに、G5 マウスは、出生後、体重が対照マウスと比較して有意に減少していた。さらに、G5 マウスは以下のような著明な組織所見が得られた。(1) 精巣では、精細管内にあるべき精原細胞、精母細胞、精子が全く認められず、体細胞であるセルトリ細胞のみが認められた。(2) 卵巣では、卵胞がほとんど認められなかった。(3) 消化管上皮陰窩部分にアポト

ーシスの亢進が認められた。(4) 皮膚が脱毛し、その部分の毛嚢上皮にアポトーシスの亢進が認められた。

テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子 TERT の細胞の不死化における役割の検討 (井出)

#### (1) ヒト正常線維芽細胞への hTERT の導入

ヒト胎児由来の正常線維芽細胞 TIG-3 は、約 80 代で老化し増殖を停止する。hTERT の導入によってテロメラーゼ活性が発現し、テロメア短縮が阻止され、分裂寿命が延長するが、不死化することはなかった。他方、TIG-3 細胞に SV40 の T 抗原遺伝子を導入した場合、分裂寿命が延長するが、テロメアは短縮し、やがて死滅した。T 抗原導入細胞に hTERT を導入すると、ほぼすべてのクローンが 300 代を越えて増殖を続け、不死化したものと判断された。すなわち、線維芽細胞の不死化には、テロメラーゼの発現とともに、SV40 の T 抗原機能があれば十分条件となることが分かった。T 抗原は多くの機能を持つ蛋白質であり、これらのうち、どの特異的な機能が細胞の不死化に貢献しているのかを明らかにする必要がある。

導入した T 抗原遺伝子は、温度感受性変異であるので、導入細胞を非許容温度で培養すると、T 抗原機能の多くが失われる。実際、導入細胞を非許容温度下におくと、T 抗原遺伝子発現に対する自己抑制機能、p53 蛋白質との結合能、細胞の接触阻止能を失わせ細胞がパイルアップして増殖する形質を導く能力などの機能が失われた。T 抗原導入によって延命している線維芽細胞では、非許容温度に移すとただちに増殖を停止した。しかしながら、ここで用いた T 抗原遺伝子を含めて、多くの温度感受性 T 抗原は、宿主細胞の DNA 合成誘導能は非許容温度でも維持されることが知られている。実際、T 抗原を導入した若い線維芽細胞では、許容温度では飽和密度を越え

てパイルアップして増殖するが、非許容温度では細胞増殖は飽和密度に達すると停止し、接触阻止能があらわれるように見えるにも関わらず、細胞 DNA 合成は継続するため、多倍体細胞が蓄積することが分かった。T 抗原導入によって延命している線維芽細胞では、非許容温度に移すとただちに細胞増殖を停止したが、この場合にも、DNA 合成は継続し、多倍体細胞が蓄積することが分かった。

しかし、hTERT 遺伝子と T 抗原遺伝子の導入によって不死化した細胞を非許容温度で培養した時、T 抗原機能は失われたにもかかわらず、細胞は順調に増殖を続け、さらに継代を続けることができた。線維芽細胞が不死化するためにテロメラーゼの発現と共に必要な T 抗原の機能として、ふたつの可能性が考えられる。ひとつは、線維芽細胞を不死化する際に必要な T 抗原機能は、不死化の成立に際してのみ必要で、成立後は不要である可能性である。もうひとつは、非許容温度にしても残存する T 抗原機能が、不死化の維持にも必要とされる可能性である。後者に関しては更にふたつの場合にわけられる。ひとつは、T 抗原自身の持つ DNA 複製促進などの残存機能の可能性である。もう一つは、T 抗原遺伝子から異なるスプライシングによってできる mRNA がつくる t 抗原機能の可能性である。

本研究では、これらの可能性から、t 抗原機能が線維芽細胞の不死化に必要である可能性を調べるため、t 抗原のみを産生する発現プラスミドを構築し、これを hTERT のみを導入した線維芽細胞に導入して、不死化細胞が得られるかどうかを検討した。現在、導入細胞をクローニングし、継代培養を続けている。他方、t 抗原の機能として現在報告されているのは、PP2A (protein phosphatase 2A) と結合してその酵素活性を阻害するというものであるが、宿主細胞の DNA 合成

を誘導維持する機能を有するか否かを検討中である。

## (2) ヒト正常血管内皮細胞への hTERT の導入

ヒト臍帯血管由来の正常血管内皮細胞に hTERT、T 抗原遺伝子それぞれ単独であるいは両者を導入して、クローニングし、継代培養した。正常血管内皮細胞は、65 代で老化し、増殖を停止した。T 抗原のみを導入した細胞は、2 クローンを除いてすべて若干の延命の後に 90 代までに増殖できなくなった。2 クローンのみは 200 代を越えて継代でき、不死化したものと思われた。これらの不死化細胞では、テロメレーズの発現がなかったが、染色体外テロメア配列の存在とテロメアサイズの異常な伸長が確認され、テロメレーズ非依存的テロメア維持機構による不死化と考えられた。これらのうちの 1 株は、200 代を越えて増殖する間にテロメレーズ発現細胞があらわれ、やがて染色体外テロメア配列が失われて、テロメレーズ依存的な不死化細胞集団にかわったが、他の 1 株はテロメレーズ非依存的テロメア維持機構を維持したまま現在も継代されている。

T 抗原と hTERT 遺伝子の両方を導入した細胞クローンは、テロメアが延長し、増殖速度が早くなり、すべて 200 代を越えて増殖を続けており、不死化したものと考えられた。hTERT のみを導入した細胞は、増殖速度は正常細胞と変わらずゆっくりであるが、テロメアが延長し、現在 160 代をこえてまだ増殖中であり、このまま不死化する可能性があるものと考えられた。線維芽細胞と血管内皮細胞では、不死化のための十分条件に違いがあることが推察された。なお、hTERT を導入した細胞のみならず、T 抗原と hTERT を導入した細胞でも、エンドセリンの産生やコラーゲンゲル中での血管形成能などの正常細胞としての機能を維持していることが、予

備的検討からわかった。

## ヒト細胞周期チェックポイント遺伝子 Chk1、Cds1 の解析 (中西)

ヒト Chk1 はいかなる DNA 傷害にも反応せず、その活性に変化を認めなかった。興味あることにヒト Chk1 はアフィディコリン処理による DNA 複製阻害に反応してリン酸化を受けることが分かった。Cds1 は Chk1 と異なり、正常線維芽細胞および HeLa 細胞においてはすべての DNA 傷害に反応してリン酸化を受けて活性化した。しかしながら、ATM 欠失細胞においては UV および MMS による DNA 傷害には反応するが、X 線によるものには全く反応しなかった。このことは ATM 欠損患者の臨床症状とよく一致する。ヒト Cds1 の発現を各種がん細胞を用いて調べたところ、p53 欠失がん細胞では Cds1 の発現が高く、正常 p53 を有するものでは Cds1 の発現が非常に低いことが分かった。Cds1 の発現は SV40 T 抗原、パピローマウイルス E6, E7 などの DNA ウイルスがん遺伝子で形質転換すると強く誘導されることが分かった。さらに野生型 p53 発現アデノウイルスをこれらの細胞に感染させたところ、SV40 T 抗原および E6 により誘導された Cds1 の発現は強く抑制されたが、E7 により誘導されたものは影響を受けなかった。Chk1 ノックアウトマウスの作製とその解析を行ったところ、Chk1 ノックアウトマウスは胎生初期に致死的であった。E3.5 日卵の解析から Chk1 ノックアウト卵では異常核を認めた。この異常核は DNA 複製阻害において増強されたが、DNA 傷害では増強されなかった。

## 血管内皮細胞・平滑筋細胞の増殖制御の解析 (吉栖)

血管内皮細胞増殖機構の解析については、共同研究者の鈴木らが、接触阻止により細胞周期を停止した血管内皮細胞が、フォスファターゼの阻害剤により再び細胞周期に入ることを示し

た(論文発表 5)。この結果は、細胞周期制御因子の一つであるサイクリンA遺伝子の発現が、接触阻止によって抑制される機序において、サイクリンAのプロモータ領域の ATF サイトが重要であることや、サイクリンA遺伝子の転写調節において ATF サイトに結合する転写因子群のリン酸化がプロモータ活性の活性化に必要であることを示した我々のこれまでの結果にも合致する。

Boyden-chamber 法による検討では、RW-PF は PDGF 刺激による RASMC の遊走能を濃度依存性に抑制した。(RW-PF 10, 30, 100 mg/ml においてそれぞれ 66%, 24%, 3%に抑制) さらに wound healing assay においても RW-PF は、RASMC の再生のみを濃度依存性に抑制したが、BCEC に対しては最大濃度 100 mg/ml においても「内皮再生」を抑制しなかった。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において、RW-PF の前投与は、TNF- $\alpha$ 刺激によるヒト VCAM-1 mRNA 発現を濃度依存的に抑制した。これは、RW-PF の前投与が、病的状態にある血管内皮細胞の機能を正常化する作用があることを示唆する。現在、その機序を検討しているが、興味深いことに gel shift assay による検討において、VCAM-1 mRNA 発現に必要な、NF- $\kappa$ B サイトへの転写因子の結合の抑制は認められず、NF- $\kappa$ B 経路抑制以外の機序を介していると考えられる。

#### D. 考察

井出の研究により、テロメア老化時計は、明らかに細胞老化に重要な役割を果たすことが改めて証明されるとともに、これとは別の老化シグナルの存在が示唆された。今後、この分子の実体を明らかにすることが重要である。一方、石川の研究により、これまで利用できなかったテロメア老化時計をマウス個体において研究す

るモデル系が完成した。今後、培養細胞のみならず、個体レベルで実際の組織・臓器の老化と絵テロメア短小化との関連を研究することが可能になると思われる。さらに、中西の研究により、ヒト Cds1 が DNA 損傷応答に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。テロメアが過度に短小化した細胞あるいはマウス個体において Cds1 が活性化されているか否かを検討する予定である。最後に、吉栖の研究により、細胞老化が深く関係すると思われる動脈硬化症において血管平滑筋細胞および血管内皮細胞の増殖能、遊走能を制御する興味深い因子が明らかにされようとしている。このような因子は、基礎研究により明らかにされたテロメア老化時計による動脈硬化症発症の予防薬として臨床的に有用である可能性がある。

#### E. 結論

今年度の本研究により、テロメア老化時計より伝達される「老化シグナル」と「老化イフェクター分子」を明らかにし、将来の臨床的な応用を開拓する端緒が得られた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(石川冬木)

1. Hatakeyama, S., M. Osawa, M. Omine and F. Ishikawa. JTB, a novel membrane protein gene at 1q21 rearranged in a jumping translocation. *Oncogene*, 18: 2085-2090 (1999).
2. Tahara, H., W. Yasui, E. Tahara, J. Fujimoto, K. Ito, K. Tamai, J. Nakayama, F. Ishikawa, E. Tahara and T. Ide. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene*, 18:

- 1561-1567 (1999).
- Ishikawa, F., Why do we have linear chromosomes? - a matter of Adam and Eve. *Mut. Res.* 434: 99-107 (1999).
  - Nagata, T., Y. Kurihara, G. Matsuda, J. Saeki, T. Kohno, Y. Yanagida, F. Ishikawa, S. Uesugi and M. Katahira. Structure and Interactions with RNA of the N-Terminal UUAG-specific RNA-binding Domain of hnRNP D0. *J. Mol. Biol.*, 287: 221-237 (1999).
  - Yasui, W., E. Tahara, H. Tahara, J. Fujimoto, K. Naka, J. Nakayama, F. Ishikawa, T. Ide and E. Tahara. Immunohistochemical Detection of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Normal Mucosa and Precancerous Lesions of the Stomach. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 589-595 (1999).
  - Matsuura, A., T. Naito and F. Ishikawa. Genetic control of telomere integrity in *Schizosaccharomyces pombe*: *rad3+* and *tell1+* are parts of two regulatory networks independent of the downstream protein kinases *chk1+* and *cds1+*. *Genetics.* 152: 1501-1512 (1999).
  - Yuan, X., S. Ishibashi, S. Hatakeyama, M. Saito, J. Nakayama, R. Nikaido, T. Haruyama, Y. Watanabe, H. Iwata, M. Iida, H. Sugimura, N. Yamada and F. Ishikawa. Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes to Cells* 4: 563-572 (1999).
  - Ishikawa, F., Aging clock, the watchmaker's masterpiece. *Cell. Mol. Life Sci.* in press (2000).
  - Kitamoto, M and Ide, T. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer*, 85: 245-246, 1999
  - Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., Fujimoto, J., Ito, K., Tamai, K., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Tahara, E., and Ide, T. Immunohistochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene*, 18: 1561-1567, 1999
  - Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y. Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mech. Ageing Dev.*, 107: 51-60, 1999
  - Nakamura, A., Matsuura, S., Tauchi, H., Hanada, R., Ohashi, H., Hasegawa, T., Honda, K., Masuno, M., Imaizumi, K., Sugita, K., Ide, T., and Komatsu, K. Four novel mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Japanese patients. *J. Hum. Genet.*, 44: 48-51, 1999
  - Yasui, W., Tahara, E., Tahara, H., Fujimoto, J., Naka, K., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Ide, T., and Tahara, E. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 589-595, 1999
  - Kakuo, S., Asaoka, K., and Ide, T. Human is a unique species among primates in terms of telomere length. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263: 308-314, 1999
  - Harada, K., Kurisu, K., Arita, K., Sadamoto, T., Tahara, H., Tahara, E., Ide, T., and Uozumi, T. Telomerase activity in central nervous system

(井出利憲)



- malignant lymphoma. *Cancer*, 86: 1050-1055, 1999
8. Nakamura, Y., Hirose, M., Matsuo, H., Tsuyama, N., Kamisango, K., and Ide, T. Simple, rapid, sensitive and quantitative detection of telomere repeats in cell lysate by hybridization protection assay (HPA). *Clin. Chem.*, 45: 1718-1724, 1999
  9. Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y. Incorrect use of "immortalization" for B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, 73: 9690-9691, 1999
  10. Ishii, Y., Tsuyama, N., Maeda, S., Tahara, H., and Ide, T. Telomerase activity in hybrids between telomerase-negative and telomerase-positive immortal human cells is repressed in the different complementation groups but not in the same complementation group of immortality. *Mech. Ageing Dev.*, 110: 175-193, 1999
  11. Nakamura, Y., Tahara, E., Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., and Ide, T. Quantitative re-evaluation of telomerase activity in cancerous and noncancerous gastrointestinal tissues. *Mol. Carcinog.* 26: 312-320, 1999
- (吉栖正生)
1. Hashimoto M, Eto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Iijima K, Kim S, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y: Correlation between flow-mediated vasodilatation of the brachial artery and intima-media thickness in the carotid artery in Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2795-2800, 1999.
  2. Sibinga NE, Wang H, Perrella MA, Endege WO, Patterson C, Yoshizumi M, Haber E, Lee ME: Interferon-gamma-mediated inhibition of cyclin A gene transcription is independent of individual cis-acting elements in the cyclin A promoter. *J Biol Chem* 274:12139-12146, 1999.
  3. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y: Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 101:805-811, 2000.
  4. Nagano K, Toba K, Akishita M, Watanabe T, Kozaki K, Eto M, Hashimoto M, Sudoh N, Ako J, Yoshizumi M, Ouchi Y: Prostanoids regulate proliferation of vascular smooth muscle cells induced by arginine vasopressin. *Eur J Pharmacol* 389:25-33, 2000.
  5. Suzuki E, Nagata D, Yoshizumi M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y: Reentry into the cell cycle of contact-inhibited vascular endothelial cells by a phosphatase inhibitor. Possible involvement of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:3637-3644, 2000.
- (中西 真)
1. Kaneko, Y., Watanabe, N., Morisaki, H., Akita, H., Fujimoto, A., Tominaga, K., Terasawa, M., Tachibana, A., Ikeda, K., Nakanishi, M. Cell cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene* 18, 3673-3681, 1999.
  2. Nakanishi, K., Nakanishi, M., Kukita, F. Dual intracellular recording of neocortical neurons in a neuron-glia co-culture system. *Brain Res. Protocol.* 4, 105-114, 1999.

3. Nakanishi, M., Kaneko, K., Matsuhime, M., Ikeda, K. Direct interaction of p21 cyclin-dependent kinase inhibitor with the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 35-40, 1999.
  4. Kaneko, Y., Ikeda, K., Nakanishi, M. Phorbol ester inhibits DNA damage-induced apoptosis in U937 cells through activation of protein kinase C. *Life Science* 65, 2251-2258, 1999.
  5. Tominaga, K., Morisaki, H., Kaneko, Y., Fujimoto, A., Tanaka, T., Ohtsubo, M., Hirai, M., Okayama, H., Ikeda, K., Nakanishi, M. Role of human Cds1(Chk2) kinase in DNA damage checkpoint and its regulation by p53. *J. Biol. Chem.* 274, 31463-31467, 1999.
  6. Kitamura, K., Takayama, M., Hamajima, N., Nakanishi, M., Endo, Y., Takemoto, T., Kimura, H., Iwaki, M., Nonaka, M. Characterization of the Human DRP-2 (dihydropyrimidinase-related protein 2) Gene. *DNA Research* 6, 291-297, 1999.
  7. Mitsui, K., Nakanishi, M., Ohtsuka, S., Norwood, T.H., Obayashi, K., Miyamoto, M., Tanaka, K., Yoshimura, A., Ohtsubo, M. A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 115-122, 1999.
  8. Morisaki, H., Ando, A., Nagata, Y., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R., Ikeda, K., Nakanishi, M. Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: role of p16, p21 and cyclin D1. *Exp. Cell Res.* 253, 503-510, 1999.
  9. Ogawa, K., Kimoto, N., Asamoto, M., Nakanishi, M., Takahashi, S., Shirai, T. Aberrant expression of p27Kip1 is associated with malignant transformation of the rat urinary bladder epithelium. *Carcinogenesis* 21, 117-121, 2000.
  10. Takahashi, H., Menjo, M., Kaneko, Y., Ikeda, K., Matsushime, H., Nakanishi, M. Cdk4 activation is dependent on the subunit rearrangement in the complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 388-393, 2000.
  11. Fuse, T., Tanikawa, M., Nakanishi, M., Ikeda, K., Tada, T., Inagaki, H., Asai, K., Kato, T., Yamada, K. p27Kip1 expression by contact inhibition as a prognostic index of human glioma. *J. Neurochem.* in press.
  12. Akita, H., Iizuka, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ikeda, K., Nakanishi, M. Induction of KAI-1 Expression in Metastatic Cancer Cells by Phorbol Esters. *Cancer letters* in press.
  13. Tojima, A., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., and Nakanishi, M. NAK is an I kappa B kinase-activating kinase. *Nature* in press.
2. 学会発表  
多数につき略
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

テロメレーズの構造と機能解析に関する研究

主任研究者 石川 冬木 東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授

マウステロメレーズの触媒サブユニットをコードする遺伝子 mTERT の欠損マウスを遺伝子ターゲティングにより作成した。TERT-/-マウスはテロメレーズ活性を完全に失っていたが、第1世代では何ら表現型を示さなかった。しかし、ホモマウス同士の交配を重ねて作成した第5世代 TERT-/-マウスでは、生殖細胞の著明な萎縮による妊性の低下、脱毛、消化管上皮細胞や皮膚上皮細胞のアポトーシスなどの所見を認めた。マウスではテロメア長が長いことが知られており、これらのマウスでは、テロメレーズ活性が失われたために、細胞増殖を盛んに行う生殖細胞や上皮細胞について、世代が進んだマウスではじめて細胞老化が起きたものと考えられた。従って、このマウスは細胞老化機構を個体レベルで研究する良いモデルを提供するものと期待された。

A. 研究目的

染色体テロメア長は、細胞分裂のたびに短小化するが、それがある閾値に到達したときに細胞老化が誘導されるものと考えられる。テロメレーズは、テロメア DNA を伸長させ、テロメア老化時計をリセットすることで細胞老化を阻止する役割をもつ。昨年度までの本研究で、テロメレーズ触媒サブユニット TERT 遺伝子の発現がテロメレーズ活性の有無に重要な役割を果たしていることを明らかにした。そこで、本年度においては、TERT 欠損マウスを作成し、テロメレーズ活性が失われたマウスがどのような表現型を示すのかを明らかにした。このマウスは、細胞老化の良いモデル生物になると期待される。

B. 研究方法

我々がクローニングしたマウス TERT cDNA を用いてマウス TERT ゲノムクローンを 129 株由来のマウスゲノムライブラリーよりスクリーニングし、陽性クローンを得た。TERT 蛋白質は、

我々および他のグループの報告により、そのC端半分に活性に重要な役割を果たしている逆転写酵素モチーフを含んでいる。我々は、そのうちのいくつかのアスパラギン酸残基が活性に必須であることを既に報告しているので、今回は、これらのアスパラギン酸を含む領域が欠失するように設計したターゲティングベクターを作成し、定法どおり、129 株由来の ES 細胞を用いてターゲティングを行い、これを B6 由来の胚盤胞に注入してキメラマウスを得た。このキメラマウスを B6 マウスと交配させて、ターゲティングアレルをもつヘテロマウスを作成した後、ヘテロマウスの中の交配により第一世代(G1)の TERT-/-マウスを得た。G1 同士の交配により G2 を得、以降、同様に G5 まで得た。組み換え動物の作成は、東京大学医学部において共同研究として行われた。

(倫理面への配慮)

学内規則に則り実験を行った。

### C. 研究結果

ヘテロマウスの間の交配により G1 は、メンデル遺伝より期待される頻度に生まれ、野生型マウス、ヘテロマウスと比較して異常な表現型を示さなかった。しかし、野生型では高いテロメラーゼ活性が認められる胎児由来線維芽細胞、肝臓、精巣について、G1 マウスでは全くテロメラーゼ活性が認められなかった。このことは、TERT 遺伝子が唯一のテロメラーゼ触媒サブユニットをコードする遺伝子であることを示している。ホモ欠失マウス同士の交配を続けることで、G5 マウスまでを作成した。この間、G4 マウスから G5 マウスが生まれる時に、一腹あたりの出生数が低下していた。さらに、G5 マウスは、出生後、体重が対照マウスと比較して有意に減少していた。さらに、G5 マウスは以下のような著明な組織所見が得られた。(1) 精巣では、精細管内にあるべき精原細胞、精母細胞、精子が全く認められず、体細胞であるセルトリ細胞のみが認められた。(2) 卵巣では、卵胞がほとんど認められなかった。(3) 消化管上皮陰窩部分にアポトーシスの亢進が認められた。(4) 皮膚が脱毛し、その部分の毛囊上皮にアポトーシスの亢進が認められた。

### D. 考察

テロメラーゼは、触媒サブユニット TERT と鋳型 RNA 成分 TR とからなるコアエンザイムをもち、これらの二つの因子はいずれも活性に必須である。すでに、米国の de Pinho 等によって TR 欠損マウスが作成され、詳しく解析されている。それによると、マウスは平均約 50 kb のヒトと比べても長いテロメア長をもち、その一方で一世代の長さがヒトよりも短いため、テロメラーゼを欠損させて一世代が経過してもテロメア長が有意に短小化せず、表現型が現れないが、欠損

マウスの間の交配を約 5 世代行わせると、テロメア長が有意に短小化して最終的に細胞老化を示すことが示されている。今回、我々がもう一つの活性に必須なテロメラーゼ構成要素 TERT の欠損マウスを作成した結果、その表現型は de Pinho らが報告している TR の欠損マウスとほぼ同一であることが分かった。

マウステロメア長がヒトと比べて長い一方で、世代時間がヒトよりも短いことは、テロメア長の短小化による細胞老化はマウスの個体老化には何ら役割を果たしていないことを示している。このように自然淘汰によって生じた非適応的な形質である老化は、全ての生物種に共通な機構で生じるわけではない。また、テロメア短小化による細胞老化がヒトの個体老化の全てを説明することができない。このことから、個体老化は様々な組織において、異なる老化機構がモザイク状に作用し、その総和として現れる現象であることを意味しており、そのモザイクパターンも生物種により、あるいは、個体の非遺伝学的因子により変化しうることを意味している。

テロメア短小化による細胞老化研究を行うためには個体レベルでのモデル生物が重要である。マウスは最も研究が進んでいるほ乳類モデル生物であるが、既に述べたように長いテロメア長を持つためにこれをもってテロメア老化時計の研究を行うことはできない。しかし、本研究で作成されたテロメラーゼを欠失させたマウスは、その後期世代においてテロメアが十分に短小化して早老症の兆候を示すことから、テロメア老化時計を個体レベルで検討するよいモデルを与えるものと期待される。今後、本マウスを用いて、これまでに本研究で得られてきた各種蛋白質がどのように細胞老化に関与するのかを明らかにしていきたい。

## E. 結論

細胞老化を個体レベルで検討する上で良いモデルとなるテロメラーズ欠損マウスを作成した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hatakeyama, S., M. Osawa, M. Omine and F. Ishikawa. JTB, a novel membrane protein gene at 1q21 rearranged in a jumping translocation. *Oncogene*, 18: 2085-2090 (1999).
2. Tahara, H., W. Yasui, E. Tahara, J. Fujimoto, K. Ito, K. Tamai, J. Nakayama, F. Ishikawa, E. Tahara and T. Ide. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene*, 18: 1561-1567 (1999).
3. Ishikawa, F., Why do we have linear chromosomes? - a matter of Adam and Eve. *Mut. Res.* 434: 99-107 (1999).
4. Nagata, T., Y. Kurihara, G. Matsuda, J. Saeki, T. Kohno, Y. Yanagida, F. Ishikawa, S. Uesugi and M. Katahira. Structure and Interactions with RNA of the N-Terminal UUAG-specific RNA-binding Domain of hnRNP D0. *J. Mol. Biol.*, 287: 221-237 (1999).
5. Yasui, W., E. Tahara, H. Tahara, J. Fujimoto, K. Naka, J. Nakayama, F. Ishikawa, T. Ide and E. Tahara. Immunohistochemical Detection of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Normal Mucosa and Precancerous Lesions of the Stomach. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 589-595 (1999).
6. Matsuura, A., T. Naito and F. Ishikawa. Genetic control of telomere integrity in *Schizosaccharomyces pombe*: rad3+ and tel1+

are parts of two regulatory networks independent of the downstream protein kinases chk1+ and cds1+. *Genetics*. 152: 1501-1512 (1999).

7. Yuan, X., S. Ishibashi, S. Hatakeyama, M. Saito, J. Nakayama, R. Nikaido, T. Haruyama, Y. Watanabe, H. Iwata, M. Iida, H. Sugimura, N. Yamada and F. Ishikawa. Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes to Cells* 4: 563-572 (1999).
8. Ishikawa, F., Aging clock, the watchmaker's masterpiece. *Cell. Mol. Life Sci.* in press (2000).

### 2. 学会発表

多数につき略

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

テロメラーゼ強制発現による細胞寿命の延長に関する研究

分担研究者 井出 利憲 広島大学医学部 教授

ヒト正常線維芽細胞は、テロメラーゼの活性を発現させることによってテロメアサイズが延長するが、不死化にはいたらなかった。SV40 の T 抗原の共存によって容易に不死化した。不死化に必要な T 抗原の機能は、多機能の T 抗原機能のうちのごく一部であると考えられた。これに対して、ヒト正常血管内皮細胞は、テロメラーゼを発現させることで不死化するものと思われた。

A. 研究目的

ヒト正常細胞にはテロメラーゼ活性がなく、テロメアは細胞分裂とともに短縮し、これが分裂寿命の有限性を決める分裂時計となっているものと考えられる。他方、無限分裂寿命を獲得した不死化細胞には、多くの場合、テロメラーゼが発現していて、細胞分裂にともなうテロメラーゼ短縮がさまたげられている。テロメラーゼが発現することが不死化の十分条件であるか否かは不明であったが、前年度の研究から、ヒト線維芽細胞を不死化するためにはテロメラーゼの発現だけでは不十分であることが明らかになった。本研究では、線維芽細胞を不死化させるためにテロメラーゼ以外に必要な機能は何か、多くの機能を持つ T 抗原の中のどの機能が必要か、線維芽細胞以外の細胞ではどうかを調べることを目的とする。

B. 研究方法

石川らがクローニングした、テロメラーゼの触媒サブユニット hTERT の cDNA を、ヒト正常線維芽細胞、ヒト正常血管内皮細胞、およびそれらに癌遺伝子である SV40 の T 抗原を導入した細胞に導入し、導入細胞クローンを選択して継

代し、分裂寿命の延長と不死化について検討した。これらの細胞について、テロメラーゼ活性およびテロメア長を常法により測定した。また、ノーザン、サザン、ウエスタン解析により、種々の遺伝子機能を調べた。T 抗原の機能を調べるため、許容・非許容温度で細胞を培養し、細胞増殖、DNA 合成、種々の生化学的マーカーを解析した。

（倫理面への配慮）

本研究で用いたヒト培養細胞は、細胞バンクから入手あるいは販売業者から購入したものであり、これを培養系でのみ用いている限り、ヒト材料の採取および利用に関わる倫理面での問題はないと考える。

C. 研究結果

(1) ヒト正常線維芽細胞への hTERT の導入

ヒト胎児由来の正常線維芽細胞 TIG-3 は、約 80 代で老化し増殖を停止する。hTERT の導入によってテロメラーゼ活性が発現し、テロメア短縮が阻止され、分裂寿命が延長するが、不死化することはなかった。他方、TIG-3 細胞に SV40 の T 抗原遺伝子を導入した場合、分裂寿命が延長するが、テロメアは短縮し、やがて死滅した。

T 抗原導入細胞に hTERT を導入すると、ほぼすべてのクローンが300代を越えて増殖を続け、不死化したものと判断された。すなわち、線維芽細胞の不死化には、テロメラーズの発現とともに、SV40 の T 抗原機能があれば十分条件となることが分かった。T 抗原は多くの機能を持つ蛋白質であり、これらの機能のうちの何が必要かが問題である。

導入した T 抗原遺伝子は、温度感受性 T 抗原を発現する変異を持つので、導入細胞を非許容温度で培養すると、T 抗原機能の多くが失われる。実際、T 抗原遺伝子発現に対する自己抑制機能、p53 蛋白質との結合、細胞の接触阻止能消失（パイラップ増殖）などの機能が失われた。T 抗原導入によって延命している線維芽細胞では、非許容温度に移すとただちに増殖を停止した。しかしながら、ここで用いた T 抗原遺伝子を含めて、多くの温度感受性 T 抗原は、宿主細胞の DNA 合成誘導能は非許容温度でも維持されることが分かっている。実際、T 抗原を導入した若い線維芽細胞では、許容温度では飽和密度を越えてパイラップして増殖するが、非許容温度では細胞増殖は飽和密度に達すると停止し、接触阻止能があらわれるように見えるにも関わらず、細胞 DNA 合成は継続するため、多倍体細胞が蓄積することが分かった。T 抗原導入によって延命している線維芽細胞では、非許容温度に移すとただちに細胞増殖を停止したが、この場合にも、DNA 合成は継続し、多倍体細胞が蓄積することが分かった。

しかし、hTERT 遺伝子と T 抗原遺伝子の導入によって不死化した細胞を非許容温度で培養した時、T 抗原機能は失われたにもかかわらず、細胞は順調に増殖を続け、さらに継代を続けることができた。線維芽細胞が不死化するためにテロメラーズの発現と共に必要な T 抗原の機能と

して、ふたつの可能性が考えられる。ひとつは、線維芽細胞を不死化する際に必要な T 抗原機能は、不死化の成立に際してのみ必要で、成立後は不要である可能性である。もうひとつは、非許容温度にしても残存する T 抗原機能が、不死化の維持にも必要とされる可能性である。後者に関しては更にふたつの場合にわけられる。ひとつは、T 抗原自身の持つ残存機能の可能性である。もう一つは、T 抗原遺伝子から異なるスプライシングによってできる mRNA がつくる t 抗原機能の可能性である。

本研究では、これらの可能性から、t 抗原機能が線維芽細胞の不死化に必要な可能性を調べるため、t 抗原のみを産生する発現プラスミドを構築し、これを hTERT のみを導入した線維芽細胞に導入して、不死化細胞が得られるかどうかを検討した。現在、導入細胞をクローニングし、継代培養を続けている。他方、t 抗原の機能として現在報告されているのは、PP2A (protein phosphatase 2A) と結合してその酵素活性を阻害するというものであるが、宿主細胞の DNA 合成を誘導維持する機能を有するか否かを検討中である。

## (2) ヒト正常血管内皮細胞への hTERT の導入

ヒト臍帯血管由来の正常血管内皮細胞に hTERT、T 抗原遺伝子それぞれ単独あるいは両者を導入して、クローニングし、継代培養した。正常血管内皮細胞は、65代で老化し、増殖を停止した。T 抗原のみを導入した細胞は、2クローンを除いてすべて若干の延命の後に90代までに増殖できなくなった。2クローンのみは200代を越えて継代でき、不死化したものと思われた。これらの不死化細胞では、テロメラーズの発現がなかったが、染色体外テロメア配列の存在とテロメアサイズの異常な伸長が確認され、テロメラーズ非依存的テロメア維持機構に

よる不死化と考えられた。これらのうちの1株は、200代を越えて増殖する間にテロメレース発現細胞があらわれ、やがて染色体外テロメア配列が失われて、テロメレース依存的な不死化細胞集団にかわったが、他の1株はテロメレース非依存的テロメア維持機構を維持したまま現在も継代されている。

T 抗原と hTERT 遺伝子の両方を導入した細胞クローンは、テロメアが延長し、増殖速度が早くなり、すべて200代を越えて増殖を続けており、不死化したものと考えられた。hTERT のみを導入した細胞は、増殖速度は正常細胞と変わらずゆっくりであるが、テロメアが延長し、現在160代をこえてまだ増殖中であり、このまま不死化する可能性があるものと考えられた。線維芽細胞と血管内皮細胞では、不死化のための十分条件に違いがあることが推察された。なお、hTERT を導入した細胞のみならず、T 抗原と hTERT を導入した細胞でも、エンドセリンの産生やコラーゲン中での血管形成能などの正常細胞としての機能を維持していることが、予備的検討からわかった。

#### D. 考察

ヒト正常線維芽細胞は、テロメレース遺伝子 (hTERT) の導入によるテロメアの延長だけでは不死化することができず、SV40の T 抗原だけでも不死化することができない。両者の機能が共存して始めて不死化することができた。しかし、ここで必要な T 抗原遺伝子の機能に関しては、複雑なものがある。通常、正常細胞の分裂寿命の限界では、p53を中心とする DNA integrity を監視する機構が働き、細胞周期の進行をとめる p21などの遺伝子の発現が亢進することが増殖停止の原因と考えられている。正常細胞に T 抗原遺伝子を導入したときに分裂寿命が

延長 (延命) するのは、T 抗原が p53と結合して p53の機能を失わせる結果 p21などの発現を抑制し、宿主細胞の DNA 合成を継続させるためであると理解されている。実際、このような延命細胞を非許容温度において T 抗原を失活させると、細胞増殖は直ちに停止する。しかし、DNA 合成は継続するため、多倍体細胞が蓄積する。非許容温度では P53の機能が復活するにも関わらず、DNA 合成が継続する理由は不明である。hTERT と T 抗原で不死化させた細胞を非許容温度においたとき、p53との結合能を含めた多くの T 抗原が失われるが、細胞増殖は全く影響を受けない。このことは、G1/S 期の進行ではなく、G2/M 期の進行に関して、不死化前と不死化後の細胞に違いが有るように見える。T 抗原を導入した不死化前の延命細胞はテロメアが著しく短く、hTERT と T 抗原を導入して不死化した細胞ではテロメアが著しく長いことを考えると、テロメアの長さが G2/M 期の進行に大きなかわりがあることをうかがわせる。これについては今後更に検討することが必要である。

これに対して、ヒト正常血管内皮細胞は T 抗原遺伝子導入だけでは不死化できず、90代以前に増殖停止するが、hTERT のみを導入した場合には160代をこえても増殖を続けていて、このまま不死化する可能性がある。線維芽細胞と血管内皮細胞の間で見られる不死化に対するこのような違いの原因も不明であり、今後の検討が必要である。

#### E. 結論

ヒト正常線維芽細胞は、テロメレース遺伝子の導入によるテロメアの延長だけでは不死化することができず、SV40の T 抗原だけでも不死化することができない。両者の機能が共存して始めて不死化することができた。これに対して、



ヒト正常血管内皮細胞は、T 抗原のみの導入ではほとんど不死化しないことは線維芽細胞と同様であるが、hTERT の導入のみで不死化する可能性があることが分かった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kitamoto, M and Ide, T. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer*, 85: 245-246, 1999
2. Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., Fujimoto, J., Ito, K., Tamai, K., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Tahara, E., and Ide, T. Immunohistochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene*, 18: 1561-1567, 1999
3. Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y. Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mech. Ageing Dev.*, 107: 51-60, 1999
4. Nakamura, A., Matsuura, S., Tauchi, H., Hanada, R., Ohashi, H., Hasegawa, T., Honda, K., Masuno, M., Imaizumi, K., Sugita, K., Ide, T., and Komatsu, K. Four novel mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Japanese patients. *J. Hum. Genet.*, 44: 48-51, 1999
5. Yasui, W., Tahara, E., Tahara, H., Fujimoto, J., Naka, K., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Ide, T., and Tahara, E. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 589-595, 1999
6. Kakuo, S., Asaoka, K., and Ide, T. Human is a unique species among primates in terms of telomere length. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263: 308-314, 1999
7. Harada, K., Kurisu, K., Arita, K., Sadamoto, T., Tahara, H., Tahara, E., Ide, T., and Uozumi, T. Telomerase activity in central nervous system malignant lymphoma. *Cancer*, 86: 1050-1055, 1999
8. Nakamura, Y., Hirose, M., Matsuo, H., Tsuyama, N., Kamisango, K., and Ide, T. Simple, rapid, sensitive and quantitative detection of telomere repeats in cell lysate by hybridization protection assay (HPA). *Clin. Chem.*, 45: 1718-1724, 1999
9. Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y. Incorrect use of "immortalization" for B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, 73: 9690-9691, 1999
10. Ishii, Y., Tsuyama, N., Maeda, S., Tahara, H., and Ide, T. Telomerase activity in hybrids between telomerase-negative and telomerase-positive immortal human cells is repressed in the different complementation groups but not in the same complementation group of immortality. *Mech. Ageing Dev.*, 110: 175-193, 1999
11. Nakamura, Y., Tahara, E., Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., and Ide, T. Quantitative re-evaluation of telomerase activity in cancerous and noncancerous gastrointestinal tissues. *Mol. Carcinog.* 26: 312-320, 1999

### 2. 学会発表

多数につき略

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

細胞老化制御と転写調節機構の解析に関する研究

分担研究者 吉栖 正生 東京大学医学部老年病 講師

抗酸化物質の老化抑制作用を検討している過程で、食品中の抗酸化物質である Red Wine Polyphenol (RW-PF) が、血管平滑筋細胞の増殖だけでなく、遊走を抑制することを見出した。また、RW-PF が、病的状態になって低下した血管内皮細胞機能を回復させる可能性があることを見出した。

A. 研究目的

老化した血管内皮細胞は、その増殖能が低下するため血管傷害後の修復機転が障害される可能性がある。動脈硬化性病変に対する侵襲的治療は、一時的にせよ内皮を損傷するため、方法の普及にともない、内皮の修復は臨床的に大きな問題となっているため、引き続き血管内皮細胞増殖機構の基礎的検討を続けている。

一方、血管内皮細胞の老化においては、その増殖能の低下が問題となるだけでなく、内皮細胞のもつ生理的機能（血管拡張調節能、抗凝固能など）の障害が注目されている。我々は以前より、食品中の自然の抗酸化物質に着目し、それが血管内皮細胞機能を改善し、老化制御に発展する可能性を検討する過程において、Red Wine Polyphenol (RW-PF) が、コントロールとして用いた血管平滑筋細胞の増殖を抑制すること、そしてその増殖抑制がサイクリンA遺伝子発現の転写レベルでの抑制と関連していることを見出し報告した。血管平滑筋細胞においては、引き続き、動脈硬化との関連において、その抗酸化物質 RW-PF が血管平滑筋細胞の遊走に対する影響を持つか否かを検討している。

本来の血管内皮細胞機能に関しては、RW-PF が病的状態にある血管内皮細胞機能の悪化を抑

制する可能性を認め、その機序を解析している。

B. 研究方法

血管内皮細胞増殖機構の解析については、これまでと同様、セル・サイクル制御因子の一つであるサイクリンA遺伝子の発現調節機構からアプローチする方法で検討を続けている。

血管平滑筋細胞の遊走の実験は、老化していないラット大動脈血管平滑筋細胞 rat aortic smooth muscle cells (RASMC) を用いて、Boyden-chamber 法により、PDGF-BB (10 ng/ml) 6 時間の刺激による RASMC の遊走を定量した。RW-PF は adsorption chromatography により精製し (Suntory 基礎研究所)、細胞培養液中に添加し、その RASMC 遊走に対する影響を検討した。

また別のモデルとして、カッターにより一定面積の培養細胞を剥離し、引き続き PDGF-BB や、10%血清で刺激を行ない細胞の再生面積を評価する、wound healing のモデルを作成した。この系を用いて RW-PF の前投与の、RASMC 再生面積に与える影響を、老化させていないウシ頸動脈内皮細胞 bovine carotid endothelial cells (BCEC) (10%血清刺激) をコントロールとして検討した。この方法は、平滑筋細胞においては、主として遊走能を見ているが、血管内皮細胞

胞においては、細胞の遊走と増殖の積算である「内皮再生」の能力の評価にも用いることが出来る有用な系である。

RW-PF の血管内皮細胞機能に対する影響を検討するため、サイトカイン添加による内皮細胞接着因子発現誘導（病的な状態に相当する）に対する、RW-PF 前処置の影響の検討も行った。

（倫理面への配慮）

本年度の研究は、直接、人間を対象としていない。人間由来の培養細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を使用した実験は、廃棄される臍帯を提供者の同意のもとに得て、それから細胞を単離した企業から、通常の販売ルートを通じて購入したものである。動物由来の細胞は、麻酔下に組織を摘出し、継代培養したものである。

### C. 研究結果

血管内皮細胞増殖機構の解析については、共同研究者の鈴木らが、接触阻止によりセル・サイクルを停止した血管内皮細胞が、フォスファターゼの阻害剤により再びセル・サイクルに入ること示した（論文発表5）。この結果は、セル・サイクル制御因子の一つであるサイクリンA遺伝子の発現が、接触阻止によって抑制される機序において、サイクリンAのプロモータ領域の ATF サイトが重要であることや、サイクリンA遺伝子の転写調節において ATF サイトに結合する転写因子群のリン酸化がプロモータ活性の活性化に必要であることを示した我々のこれまでの結果にも合致する。

Boyden-chamber 法による検討では、RW-PF は PDGF 刺激による RASMC の遊走能を濃度依存性に抑制した。（RW-PF 10, 30, 100 mg/ml においてそれぞれ 66%, 24%, 3%に抑制）さらに wound healing assay においても RW-PF は、RASMC の

再生のみを濃度依存性に抑制したが、BCEC に対しては最大濃度 100 mg/ml においても「内皮再生」を抑制しなかった。

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）において、RW-PF の前投与は、TNF- $\alpha$  刺激によるヒト VCAM-1 mRNA 発現を濃度依存的に抑制した。これは、RW-PF の前投与が、病的状態にある血管内皮細胞の機能を正常化する作用があることを示唆する。現在、その機序を検討しているが、興味深いことに gel shift assay による検討において、VCAM-1 mRNA 発現に必要な、NF- $\kappa$ B サイトへの転写因子の結合の抑制は認められず、NF- $\kappa$ B 経路抑制以外の機序を介していると考えられる。

### D. 考察

正常の状態にある血管内皮細胞は、血管壁の恒常性を保ち、動脈硬化を抑制する役割を担っている。内皮細胞の加齢による増殖能力の低下と、生理的機能の低下は、ともにその抗動脈硬化作用を減弱させると考えられる。

「内皮再生」能力を評価できる wound healing assay により、今後、老化細胞の機能を、より生体内に近いかたちで評価できるようになる。

一方、異常増殖が問題となる血管平滑筋細胞は、加齢による増殖能の低下は軽微とされている。抗酸化作用を持つ物質、特に天然の食品中の抗酸化物質が、血管平滑筋細胞の増殖抑制効果だけではなく、遊走抑制作用を持つことは、生体における老化制御といえる動脈硬化予防法の開発につながるものとして重要と考えられる。

### E. 結論

老化による血管内皮細胞の増殖能の低下と、生理的血管保護機能の低下のメカニズムを、そ