

氏名 (本籍)	高橋 雄一郎 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 409 号
学位授与日付	平成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	女性生殖器およびその腫瘍のテロメラーゼ活性の臨床的意義とテロメラーゼ RNA を標的にしたハンマーヘッドリボザイムを用いた癌治療についての基礎的研究
審査委員	(主査) 教授 玉 舎 輝 彦 (副査) 教授 森 秀 樹 教授 岡 野 幸 雄

論文内容の要旨

テロメラーゼは染色体末端のテロメア長を伸長する酵素である。この活性は近年、TRAP ASSAYといPCRを基調とした方法が開発され、注目を集めるようになった。ヒト正常体細胞ではこの活性は発生途上で消失してしまい、細胞癌化によって再び出現してくることから、テロメラーゼ活性の獲得は細胞癌化の重要な因子と考えられている。また癌では90%以上の症例に陽性が認められ、一部をのぞいて正常体細胞では陰性となるという癌細胞特異性から、テロメラーゼは癌治療の有用な標的分子と考えられる。我々は未だ報告の少ない、婦人科領域におけるテロメラーゼ活性の検討として以下の実験をおこなった。

- A) 女性内性器およびその腫瘍におけるテロメラーゼ活性の有無とその局在, 癌診断における意義
B) テロメラーゼのRNA成分 (hTR) に対する, ハンマーヘッド型リボザイムを用いた癌遺伝子治療の可能性の検討

研究方法

- A) 1) 患者の同意を得て, 得られた手術標本227例のテロメラーゼ活性を測定した。その内訳は, 正常卵巣 (閉経前) 10例, 卵巣嚢腫15例, 卵巣癌25例, 卵管28例 (閉経後10例), 子宮内膜44例, 子宮内膜癌28例, 子宮腔部12例, 子宮頸部12例, 子宮頸癌20例, 子宮筋層18例, 子宮筋腫15例であった。これらの組織約100 mgより, 蛋白抽出液を採取し, TRAP ASSAYを施行した。アイソトープにてラベルされたPCR産物を, 電気泳動し, オオトラジオグラフィーにて活性を検出した。陽性例では6塩基毎のラダー形成を認める。
- 2) 患者の同意を得て, 手術中に得られた正常増殖期内膜10例を洗浄, 細切した後コラゲナーゼにて消化した。その後, 2種類のナイロンメッシュを通して, 上皮細胞分画と間質細胞分画とに分離培養した。培養細胞から蛋白を抽出し, TRAP ASSAYを行い, 子宮内膜におけるテロメラーゼ活性の局在について検討した。
- 3) テロメラーゼ活性の定量化のために, 個々のオオトラジオグラフィーのTRAPラダーの濃度とinternal standardのラダーの濃度からTelomerase activity unit (TAU) を算出した。婦人科癌とその正常組織において, TAUを算出しテロメラーゼ活性の強度を比較検討した。
- B) 1) hTRの3カ所 (36, 170, 315リボザイム) に対するハンマーヘッド型リボザイムのDNA templateを作成し, RNA polymeraseにてリボザイムRNAを作成した。また, hTRを*In vitro*にて合成し, *In vitro* cleavage反応をおこない, リボザイムがhTRを切断するかを検討した。
- 2) 子宮内膜癌細胞株であるIshikawa細胞に3種類 (前記) のリボザイムを, リポフェクション法にて遺伝子導入し, 24時間後, 48時間後におけるテロメラーゼ活性の減弱の有無を検討した。
- 3) 2) において最も効果の高かったリボザイムを用いて, プラスミドベクター-ph β APr-1-neoにサブクローニングし, これを同じ子宮内膜癌細胞株である, AN3 CAに遺伝子導入した。G418耐性クローンが得られた。これらのtransfectantの中から無作為に10クローン選択し, 以下の実験を行った。
- a) 各transfectantのテロメラーゼ活性を測定し, 活性の減弱の有無を測定した。

- b) 各transfectantにおけるリボザイム発現の有無を、RT-PCR-Southern blotting法を用いて検討した。プローブはリボザイムの酵素中心配列の相補配列を、アイソトープラベルし、オオトラジオグラフィにて検出した。
- c) transfectantよりtotal RNA 20 μ gを抽出し、Northern blotting法をおこない、hTRの発現量の検討をおこなった。プローブはhTR cDNAとG3PDH cDNAをアイソトープラベルしたものをを用いて、オオトラジオグラフィにて活性を検出した。

結 果

- A) 1) 各組織におけるテロメラーゼ活性の陽性率は生殖年齢女性の卵管、子宮内膜、子宮頸管上皮、子宮膈部上皮は、89%、89%、92%、92%と高率に陽性であった。閉経後の卵管は30%の陽性率であった。卵巣、子宮筋層は30%、11%と低い陽性率であった。腫瘍では、卵巣嚢腫、子宮筋腫が40%、27%であったのに対し、悪性腫瘍は子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌で100%、95%、96%と高率に陽性を示した。また正常子宮内膜は増殖後期から、分泌初期において陽性であった。
 - 2) 10例の増殖期内膜の上皮細胞分画のうち9例でテロメラーゼ活性が陽性であったのに対し、間質細胞分画では全症例において陰性であり、テロメラーゼは内膜組織のうち腺上皮に存在する可能性が示唆された。
 - 3) 子宮頸癌、卵巣癌ではTAUを用いると正常組織にくらべ有意に高い活性が認められるといえるが、子宮内膜癌では有意差が認められなかった。TAUを求めるのは簡便ではなく、婦人科領域では癌診断への応用は現状では困難と思われる。
- B) 1) *In vitro cleavage*反応において、3種のリボザイムは基質RNAをよく切断した。
 - 2) 48時間後における36リボザイムがテロメラーゼ活性をよく減弱させた。
 - 3) 36リボザイムとph β APr-1-neoをサブクローニングし、transfectantsとしてクローンを得た。
 - a) そのうちスクリーニングしたtransfectantではテロメラーゼ活性の減弱が認められた。
 - b) スクリーニングしたtransfectantすべてにリボザイム発現が認められた。
 - c) transfectantのhTRはコントロールとくらべ有意に減少していた。

女性生殖器において、テロメラーゼ活性は広範に存在しており、特に生殖年齢における増殖期子宮内膜などで高率に陽性であり、女性ホルモンの影響をうけている可能性が示唆された。子宮内膜では腺上皮にその活性があることが示唆された。癌組織では高率に陽性を示すものの、正常組織でも陽性を示すため癌診断への応用は限界があると思われる。

テロメラーゼhTRの鋳型領域を標的とした36リボザイムを用いた遺伝子治療の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 高橋雄一郎は女性生殖器、およびその腫瘍のテロメラーゼ活性の分布を明らかにし、とくに正常子宮内膜では、性周期による変化と、腺組織における局在を明らかにした。また、リボザイムを用いたテロメラーゼhTRを標的とした遺伝子治療の可能性を明らかにした。本研究の成果は婦人科領域における、癌の遺伝子治療の進展に少なからず寄与できるものと思われる。

[主論文公表誌]

女性生殖器およびその腫瘍のテロメラーゼ活性の臨床的意義とテロメラーゼRNAを標的としたハンマーヘッドリボザイムを用いた癌治療についての基礎的研究

岐阜大医紀 : 印刷中