



Mechanisms Regulating Telomerase Activity in Murine T Cells¹

生越, まち子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-10-15

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2166

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002166>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍） 生 越 まち子 （島根県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学位記番号 博ろ第1589号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成9年10月15日

学位論文題目 Mechanisms Regulating Telomerase Activity in Murine T Cells'
（マウスT細胞におけるテロメラーゼ活性の調節機構の研究）

審査委員 主査 教授 市 橋 正 光

教授 前 田 盛 教授 藤 原 美 定

論文内容の要旨

テロメアとは、すべての染色体の両端に位置する短いDNA繰り返し配列と蛋白よりなる構造物で、染色体の安定に必要と考えられている。テロメアは、正常の人間の体細胞では細胞が分裂する度に短縮し、ある一定の閾値以下に短くなったテロメアは、細胞の増殖を止めるシグナルを発するとされる。テロメラーゼはRNAと蛋白よりなる酵素で、テロメアにDNA繰り返し配列を付け加える作用がある。成人の体細胞ではテロメラーゼ活性をほとんど認めないのに対し、生殖細胞は高いテロメラーゼ活性を有し、また、生殖細胞ではテロメアの長さは短縮しない。従って、テロメラーゼはテロメアの長さを一定に保つことにより、細胞を無限に増殖することを可能にすると考えられている。この仮説を裏付けるごとく、多くの悪性腫瘍の組織、あるいは、不死化した培養細胞の約90%以上にテロメラーゼ活性上昇を認めたのに対し、正常組織あるいは不死化しない培養細胞はほとんどテロメラーゼ活性を有しないことが発見された。

一方、テロメラーゼの調節機構についてはほとんど知られていない。最近、テロメラーゼは正常のヒトリンパ球にも存在し、さまざまなマイトジェン刺激により細胞増殖と伴に活性を上昇させることが報告された。このことは、テロメラーゼが細胞増殖と密接な関係を持つことが示唆するが、その関係は、未だ明らかでない。我々は今回マウスのリンパ球を用い、T細胞活性化に伴う細胞増殖とテロメラーゼの調節機構について調べた。

【対象と方法】

ヒトおよびマウスのT細胞はそれぞれ末梢血と脾臓から分離した。マウス Tcell line は $\gamma \delta$ 陽性 7-17, $\alpha \beta$ 陽性 CTLL2 を用いた。ヒトT細胞はPHA (2 μ g/ml), マウスT細胞はConA (3 μ g/ml), anti-CD3抗体, サイトカイン (IL-2, 4, 7, 15) で刺激した。増殖は [3 H]-thymidine の取り込みで測定した。In vivo の系として, Balb/c マウスを0.5% DNFBで感作し, 5日後にソケイ及び腋かのリンパ節を採取, T細胞を分離した。すべての標本はバッファーで溶解抽出し, TRAP (telomeric repeat amplification protocol) を用いてテロメラーゼ活性を測定した。

【結 果】

1. 無刺激のヒト及びマウスリンパ球のテロメラーゼは検出以下であった。PHAで刺激したヒトリンパ球、Con Aで刺激したマウスリンパ球は伴に刺激後48時間より著明なテロメラーゼ活性の上昇を示した。この上昇は $[^3\text{H}]$ -thymidineの取り込みの上昇と相関していた。RNase前処理によりテロメラーゼ活性は失われ、このことは我々の測定したテロメラーゼが特異的であることを示す。次にマウスリンパ球をanti-CD3抗体で刺激した。高濃度 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) のanti-CD3で刺激すると、48時間後にテロメラーゼ活性の上昇と増殖反応が認められ、T細胞受容体 (TCR) /CD3の刺激がテロメラーゼ活性化に働くことが示唆される。ところが、anti-CD3抗体の濃度を $0.03\mu\text{g}/\text{ml}$ に下げるとテロメラーゼ活性の上昇も増殖反応もみられなくなった。ここに外因性のIL-2を加えると、増殖とともにテロメラーゼ活性の上昇が認められた。この結果より、テロメラーゼはTCRのみならずサイトカイン受容体の刺激により上昇することが示唆される。更に胸腺細胞、Con A芽球を用いた実験でも同様の所見が観察された。すなわちアダルトマウスの胸腺細胞は高濃度 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) のanti-CD3抗体単独、外因性のサイトカイン (IL-2, 4, 7, 15) (それぞれ $10\text{ng}/\text{ml}$) 単独では増殖もテロメラーゼ活性も起こさず、両者の存在下で初めて増殖するとともにテロメラーゼ活性を上昇させた。また、Con A芽球はanti-CD3抗体単独、あるいはIL-2単独にて増殖するとともに、テロメラーゼ活性を上昇させた。以上の結果より、我々は、T細胞のテロメラーゼ活性はサイトカイン受容体によっても起こると結論した。

2. 生体内でも同様にT細胞の活性化によりテロメラーゼ活性化が起こるかどうかをみるため、マウスをDNFBで感作し5日後にリンパ節を採取しT細胞を分離した。コントロールの非感作群ではテロメラーゼは検出以下であったが、感作群ではテロメラーゼ活性は有意に上昇していた。

3. 正常T細胞ではテロメラーゼ活性化と増殖反応は常に相関していた。ところが、T cell lineの中に例外を発見した。すなわち、 $\alpha\beta$ 陽性CTLL-2はIL-2, 4, 15添加により著明に増殖したが、テロメラーゼ活性はサイトカイン添加前から高く、添加後の上昇は2倍以下にとどまった。一方 $\gamma\delta$ 陽性細胞である7-17はanti-CD3抗体, IL-2, 7, 15により著明に増殖したが、テロメラーゼ活性はすべての標本において検出以下であった。以上の結果よりテロメラーゼは必ずしも細胞の増殖に必要ではなく、また、テロメラーゼ陽性の細胞が必ずしも増殖しているわけでもないことが示された。

【考 察】

テロメラーゼの活性化機構については、既に正常ヒトリンパ球を用い、レクチン、anti-CD3抗体による刺激でテロメラーゼが活性化されることが示されてきた。今回我々は、マウスリンパ球でも同様の機構が働くことを示し、更にこのテロメラーゼ活性化がTCR/CD3のみならず、サイトカイン受容体によっても起こることを示した。

我々の系では、正常T細胞においては常にテロメラーゼ活性化と増殖は同時に観察された。しかし、全てのT細胞で相関していたわけではない。すなわち、テロメラーゼ活性化を伴わないで増殖するT細胞や、増殖しない状態でもテロメラーゼ活性を持つT細胞があることより、テロメラーゼは必ずしもT細胞の増殖に必要ではないことが示唆された。

近年、テロメラーゼ活性は80-90%の悪性腫瘍に検出され、癌の診断、及び、治療のターゲットとして注目されている。しかし、我々は以前に、炎症の皮膚疾患でもテロメラーゼ活性の上昇を認めたため、組織に浸潤する活性化正常リンパ球がテロメラーゼを産生する可能性を示唆したが、今回の結果はその可能性を裏付ける。今後のテロメラーゼの臨床応用のために、その調節機構を知ることは意

義あるものと思われた。

論文審査の結果の要旨

テロメア（染色体の両端）のDNAは人間の体細胞では細胞が分裂するに従って短縮する。やがて、一定の長さより短くなったテロメアDNAは細胞の分裂を止めるシグナルを発し、細胞を老化に導く。テロメラーゼはテロメアDNAを延長する酵素であり、成人の体細胞にその活性をほとんど認めないのに対し、生殖細胞に高い活性を認める。かつ、生殖細胞のテロメアDNAの長さは、体細胞と異なり一定であることより、テロメラーゼはテロメアDNAの長さを一定に保ち、そのため細胞を無限に増殖することを可能にすると考えられている。この仮説を裏付ける如く、癌細胞のほぼ90%にテロメラーゼ活性が認められた。現在、テロメラーゼは癌の診断、ひいては、治療に有用であると考えられているが、テロメラーゼの調整機構については今まで殆ど知られていない。

近年、テロメラーゼ活性は腫瘍細胞のみならず、いくつかの正常細胞、例えば皮膚、腸管の基底細胞、末梢血のリンパ球にも存在することが示された。更にリンパ球はレクチンで刺激されると、テロメラーゼ活性をさらに上昇させることが報告された。そこで、我々はヒトおよびマウスT細胞を各種マイトゲンで刺激し、リンパ球におけるテロメラーゼ活性の調節機構を解析した。

成人ヒト末梢血およびマウス脾臓より分離したT細胞は、レクチン刺激後48時間より、増殖するとともに著明にテロメラーゼ活性を上昇させた。次にマウスT細胞のT細胞受容体を、抗CD3抗体を用いて刺激すると、同様の時間経過で細胞増殖とテロメラーゼ活性の上昇を認めた。このことよりテロメラーゼ活性を刺激するシグナルはT細胞受容体を通じて伝達されている可能性が示された。しかし、抗CD3抗体の濃度を下げていくと、T細胞は増殖しなくなるとともにテロメラーゼ活性も上昇せず、そこに外因性のサイトカインを加えて初めてテロメラーゼ活性を上昇させた。このことよりテロメラーゼは、T細胞受容体のみならず、サイトカイン受容体にも支配されていることが示唆される。更にマウスの胸腺細胞を抗CD3抗体のみで刺激しても増殖もテロメラーゼ上昇も認められなかったが、抗CD3抗体、外因性サイトカイン両者の存在下で増殖するとともにテロメラーゼ活性を上昇させた。マウス脾臓より分離したT細胞を5日間、抗CD3抗体とIL-2で刺激したリンパ芽球は、T細胞受容体のみによる刺激と同様、サイトカイン受容体の刺激のみでテロメラーゼ活性を上昇させ、サイトカイン受容体からのシグナルもテロメラーゼ調節に重要であることを示唆した。

一方、正常リンパ球では常に増殖反応とテロメラーゼ活性の上昇が同時に見られたのとは異なり、トランスフォームされた培養細胞系では必ずしもテロメラーゼ活性と増殖反応が同時に起るわけではなかった。すなわち高いテロメラーゼ活性を示すのに増殖していない細胞系、増殖しているのにテロメラーゼ活性の認められなかった細胞系があり、テロメラーゼは必ずしも増殖に必要でも充分でもないことが示唆された。

テロメラーゼは癌に比較的特異な酵素で、癌の診断、治療に今後有用と考えられている。その臨床応用において、調節機構を調べた本研究は意義あるものと思われる。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。