

細胞増殖のしくみ—細胞周期, 癌遺伝子, 細胞老化—

井出利憲

Mechanism of Cell Proliferation—Cell Cycle, Oncogenes, and Senescence

Toshinori IDE

Department of Cellular and Molecular Biology, Division of Integrated Medical Science,
Graduated School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi,
Minami-ku, Hiroshima City 734-8551, Japan

(Received August 2, 2006)

Cell proliferation is regulated through a transition between the G0 phase and cell cycle. We isolated a mammalian temperature-sensitive mutant cell line defective in the function from the G0 phase to cell cycle. Senescent human somatic cells fail to enter into the cell cycle from the G0 phase with stimulation by any growth factor. Telomere shortening was found to be a cause of cellular senescence, and reexpression of telomerase immortalized human somatic cells. Immortalized human somatic cells showed normal phenotypes and were useful not only for basic research but also for clinical and applied fields. The importance of p53 and p21 activation/induction is now well accepted in the signal transduction process from telomere shortening to growth arrest, but the precise mechanism is largely unknown as yet. We found that the MAP kinase cascade and histone acetylase have an important role in the signaling process to express p21. Tumor tissues and cells were found to have strong telomerase activity, while most normal somatic human tissues showed very weak or no activity. Telomerase activity was shown to be a good marker for early tumor diagnosis because significant telomerase activity was detected in very early tumors or even in some precancerous tissues compared with adjacent normal tissues. Telomere/telomerase is a candidate target for cancer chemotherapeutics, and an agent that abrogated telomere functions was found to kill tumor cells effectively by inducing apoptosis whereas it showed no effect on the viability of normal cells.

Key words—cell senescence; telomere; telomerase; cell cycle; immortalization; oncogene

1. はじめに

研究の歴史としては、昭和40年からの大学院時代や昭和45年からの助手時代の研究も含まれるが、ここでは助教授として広島大学へ赴任した昭和53年以降に限って紹介する。赴任前の仕事を1つだけ紹介すると、哺乳類細胞のDNAがスーパーコイル構造を持つことを初めて示唆した仕事¹⁾は、ちょっとしたひらめきによる成功であった。

全体を流れるテーマは『細胞増殖のしくみ』であるが、概略的には、1) 細胞周期, 2) 癌遺伝子, 3)

細胞老化の3つに分けられる。主に細胞老化を中心に紹介するが、細胞周期と癌遺伝子の話もこれに直接関係するので触れておく。

2. 細胞周期

2-1. 細胞増殖の調節 細胞増殖の調節を考えた場合の焦点は、増殖と増殖停止の間の移行のメカニズムで、細胞周期を回転して増殖している細胞が増殖を停止していわゆるG0期に入る、あるいはG0に停止している細胞が増殖誘導を受けて細胞周期に入る、その機構である。すなわち、増殖調節の焦点は『細胞周期とG0期の間の移行調節』にある。

2-2. G0期とは何か G0期は、増殖能力は保持しつつも増殖しない状態におかれている細胞の状態を指す。体内にある大部分の体細胞は、増殖能力を持ちながらG0期に止まっている。肝臓などの臓器を形成する細胞はもちろんのこと、血球などのように細胞の置き換えがいつも起きている生理的再生

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻病態探求医科学講座細胞分子生物学研究室 (〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3)

現住所: 広島国際大学薬学部 (〒737-0112 呉市広古新開 5-1-1)

e-mail: tide@ps.hirokoku-u.ac.jp

本総説は、平成17年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

系の幹細胞でも、普段は増殖していない幹細胞の方が多い。培養系でも、正常細胞の場合には、増殖因子を抜いたり細胞を飽和密度に置くことで、比較的長い間安定な増殖停止状態に置くことができ、これを G0 期と考える。

これに対して、培養系における癌細胞の挙動は異なる。癌細胞は G0 期に止めて置くことができず、増殖を続けるか、死ぬかのどちらかでしかない。癌細胞とはどのような細胞かを考える上でも、G0 期の問題は中心的課題の 1 つである。

2-3. G1 期とは何か M 期と S 期の間にある G1 期の長さは細胞によって違いがみられるが、細胞分裂を終了して次第に細胞が大きくなり、DNA 合成の準備をする時期と考えられている。今ではこの時期に何が起きているかについて多くのことが分かっているが、当時は M 期や S 期と違って生化学的特徴が分かっておらず、G1 期という名称も M 期と S 期の間 (gap 1) としてしかとらえようがなかった。具体的なことは不明ながら、細胞内反応のシーケンスがあって、そのシーケンスが終了することで S 期が開始するのだろうと考えられていた。

2-4. G0 期は細胞周期の中か外か G0 期は細胞周期の M 期 (細胞分裂期) と S 期 (DNA 合成期) との間にあることは分かっていた。DNA 含量が 2 倍体であり、増殖誘導するとやがて S 期に入って、ついで M 期へ進行するからである。ただ、G0 期とは何かについて、これを細胞周期の中に描く考え方と、周期の外に描く考え方と、2 つの考えがあった (Fig. 1)。Figure 1 の中に R ポイント (restriction point) が S 期の直前にあるが、これは、細胞周期の解析から、細胞が S 期へ進入するかどうかを決定する重要なポイントと考えられていたもので、R ポイントまでは増殖因子依存性とタンパク質合成依存性が高く、ここを過ぎれば、あとのサイクルは増殖因子がなくても自動的に進行する。現在ではむしろ G1 チェックポイントと呼ばれて、そこで起きる現象がよく分かってきた。後で詳しく述べる。

2-5. G0 期は G1 期の一部である G0 期を細胞周期の中に描く考え方は、一定の順序で起きている G1 期のシーケンス反応のどこかで止まっているのが G0 期で、G0 期の細胞を増殖誘導したとき

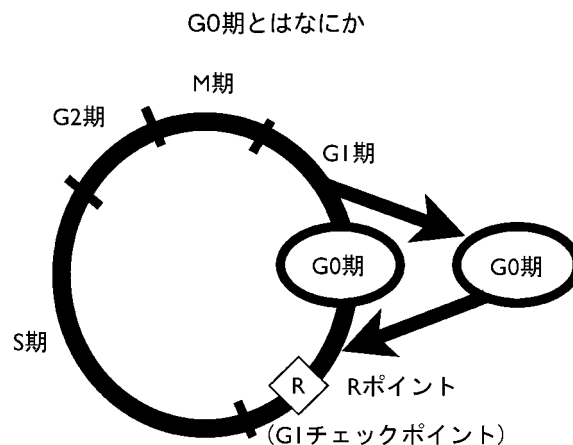


Fig. 1. Cell Cycle and G0 Phase

には、残りのシーケンスをたどって進み、やがて S 期へ入る、と考える。細胞周期から G0 期に至るプロセスは G1 期前半部分、G0 期から増殖誘導されて S 期へ入るプロセスは G1 期後半部分で、細胞周期内の G1 期を進行するプロセスとの間に特別に (質的な) 違いはないと考える。

2-6. G0 期は細胞周期の外である G0 期を細胞周期の外に描く考え方は、1 つには、G1 期の長さは一般に 10—20 時間位であるのに対し、G0 期は増殖誘導がかかるまでいくらでも (何年でも) そこに留まるという違いを、印象的に示す意味がある。この場合、細胞周期は、あくまで増殖中の (細胞周期を回転している) 細胞の状態を示し、G0 期から増殖誘導されて細胞周期へ入る細胞内で起きるプロセスは、細胞周期内を回転する G1 期のプロセスとは機構的に違うのではないかと、という期待がある。G0 期から増殖誘導されて S 期へ入るまでに細胞周期内の G1 期の時間より長く掛かるのは、G0 期からスタートした細胞が細胞周期のどこかへ合流するまでに、G1 期進行にはなかった特別なプロセスがあるものと期待する。

2-7. どうすれば違いが分かるか Figure 1 としてどちらを採用するかはどうでもよいことと思えるが、機構についてどう解析できるかと考えた。



井出利憲

広島国際大学薬学部教授。1943 年生まれ。東京都出身。1965 年東京大学薬学部卒業。1970 年同大学院薬学研究科博士課程修了。1970 年東京大学医科学研究所助手。1978 年広島大学医学部薬学科助教授。1988 年同教授を経て、2006 年より現職。

G0 期から S 期への進行には、細胞周期内の G1 期進行とは別の機能が働くなら、その機能だけが変異した変異株を取れる可能性がある。取れただけで、G0 期が G1 期の外にあると考えるのが妥当と言える。その遺伝子がどういう役割を果たしているか調べれば、さらに具体的な機構が分かる。もちろん、G0 期が G1 期の中にあるなら、そのような変異株は取れないはずである。取れなかったときは、存在するはずがないのか、存在するけれども取れなかっただけなのか、それは分からない。

2-8. G0 期特異的温度感受性変異株を狙う 増殖に係わる必須の遺伝子に変異した場合、変異株は増殖できなくなる可能性がある。40°C（非許容温度）では変異した遺伝子からの産物（タンパク質）の高次構造が変わって機能を果たせないが、34°C（許容温度）ではタンパク質が正常の構造・機能を持つという、温度感受性変異株を狙った。狙いとする変異株は、G0 期に導入した細胞は、増殖誘導したとき 34°C なら細胞周期に入って増殖するが、40°C では細胞周期に入れない（DNA 合成ができない）。これに対して、細胞周期を回っている状態では、34°C でも 40°C でもよく増殖を続けるはずである。

実験に使用したラットの繊維芽細胞である 3Y1 細胞は、非常に安定に G0 期に留めることができ、

増殖再開によく反応し、高温にも比較的強いなど、他の哺乳類細胞と比べて際立ってよい性質を持っている。G0 期に導入した 3Y1 細胞を 40°C で増殖誘導したとき、DNA 合成を開始できる大部分の細胞（野生株）を殺すことで、目的とする変異株細胞を濃縮する。生き残った細胞の中から、細胞周期回転中は変異表現型を示さないものを選択する。これは相当に大変なことで、様々な工夫をこらした上に大変な労力を要した。

2-9. G0 期特異的変異株細胞が取れた 目的とする性質を持った *tsJT60* と名付けた変異株細胞が一株取れた (Fig. 2).²⁾ 白丸は 34°C, 黒丸は 40°C を示す。Figure 2 に示すように、飽和密度と増殖因子除去によって G0 期に導入した *tsJT60* は、増殖因子として血清を添加することで増殖誘導すると、34°C では 15 時間位ののちに DNA 合成を開始するが、40°C では全く DNA 合成が起きない (Fig. 2 (A)). 細胞数の変化 (Fig. 2 (B)) をみると、34°C では血清を加えてから 2 日後には細胞数が 2 倍になるが、40°C では全く増えない。2 倍になったところで増殖が止まるのは、増える余地がなくなるからである。G0 期に導入した細胞を剥がして、血清を含む培地にまき直した場合も同様で、34°C では増殖を開始して順調に増えるが、40°C では全く増えることはできない (Fig. 2 (C)). これに対して、34°C

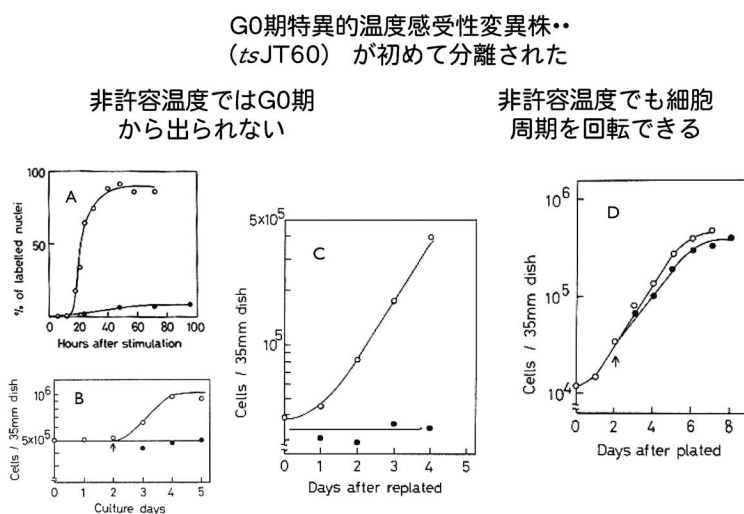


Fig. 2. Isolation of G0-specific Temperature-sensitive Mutant Cell Line, *tsJT60*

(A) *tsJT60* cells were arrested in G0 phase at 34°C, and stimulated to grow with fetal bovine serum at both temperatures. Frequencies in cells entering S phase were monitored by labeling cells with tritiated-thymidine. ○: 34°C, ●: 40°C. (B) *tsJT60* cells were arrested in G0 phase at 34°C, and stimulated to grow with fetal bovine serum at both temperatures. Changes in cell number were monitored. ○: 34°C, ●: 40°C. (C) *tsJT60* cells were arrested in G0 phase at 34°C, and stimulated to grow by replating in fresh medium at both temperatures. Changes in cell number were monitored. ○: 34°C, ●: 40°C. (D) Temperature of *tsJT60* cells grown logarithmically at 34°C was shifted (arrow) to 40°C (●) or maintained at 34°C (○) and the cell number was monitored.

でよく増殖している細胞を 40°C にしても増殖を続け、何回も細胞周期を回転できる (Fig. 2(D)). どちらの温度でもやがて増殖が遅くなるのは、シャーレー杯になったからである。

このような変異株細胞が得られたことは、この変異細胞で変異している遺伝子の機能は、G0 期から細胞周期に戻るときだけに必要で、細胞周期内を回転するには必要がないことを明瞭に示している。つまり G0 期を細胞周期の外に描くのが妥当である (Fig. 1)。このような性質を示す変異細胞は、それまでに例がないものであった。

2-10. この変異株はどのような性質であるか

たくさんのことを調べた。³⁻¹¹⁾ 様々な増殖因子とその組み合わせの中で、実に不思議なことに、血清と EGF (表皮増殖因子) を一緒に与えると、40°C でも G0 期から脱出できた。^{6,8)} それぞれ単独ではいくら濃度を上げてみてもだめだった。これがなぜなのか、今でも分かっていない。癌ウイルスである SV40 を感染させると、40°C でも G0 期から細胞周期に入れた。⁵⁾ 後で述べるように、これについては今なら説明がつく。

当時、細胞を増殖誘導したときに細胞内で起きる反応、細胞内シグナル伝達経路の研究が少しずつ進んでいた。増殖誘導の初期に起きる、いわゆる初期シグナル伝達経路は調べた限り 40°C でも 34°C と同じように起きていた。⁴⁾ それだけでなく、細胞周期の詳しい解析から、S 期に至るプロセスの大部分は 40°C でも進行しており、S 期直前の R ポイント付近までは問題なく進行しているのではないかと考えられた。^{3,4)} しかし、40°C ではそこを超えられない、しかし、細胞周期内を回ってきたときは 40°C でも超えられる。

現在では、サイクリンや CDK (サイクリン依存タンパク質キナーゼ)、p53、RB といった役者とそれぞれの働きがずいぶん分かっているが、当時はほとんど分かっていなかった。細胞周期と G0 期の間の移行は、増殖調節の機構として最も中心的な命題であり、癌細胞とは G0 期に留まれなくなった細胞であることを考えれば当然のことながら、G0 期の調節を遺伝子レベル、分子生物学レベルで解析する手掛かりとなる初めての細胞が得られたことは大きな注目を集めた。

この辺りのことについて、1986 年の生化学とい

う雑誌に 41 頁に渡る総説『動物細胞の細胞周期—G0 期の周辺』を書く機会を与えられ、¹²⁾ また、1989 年に共立出版社から出した『細胞増殖のしくみ』という本は 10 刷りまで行った。¹³⁾

2-11. 変異した遺伝子のクローニング 変異細胞に正常な細胞 (野生株) から取った DNA を導入して、表現型が正常に戻った細胞 (野生型復帰株) を単離し、ここから導入した DNA 部分を回収することで、変異した遺伝子に対する正常型の遺伝子をクローニングするという研究が、哺乳類細胞でも始まっていた。変異した遺伝子の機能・役割を知るにはこれが一番直接的であることは明らかなので、変異細胞を取った直後からこれを試みた。長い間、手を替え品を替えて努力したが、結論から言えば、不成功に終わった。不成功と一言で終わってもよいのであるが、少しこの辺りの背景、経緯を紹介したい。

2-12. クローニングの問題点 問題点はいくつかあった。正常 DNA を導入して野生型に復帰した細胞を濃縮・単離するには、40°C で増殖誘導したとき G0 期から脱出できる、という性質を使うほかはない。しかし、元の変異細胞自身が 40°C でも 100 個に 1 個位は G0 期から出て増殖する。原因は、100% の細胞をきちんと G0 期に留めることができないため、3Y1 以外の細胞ではこの値はもっと高くなる。DNA 導入による野生復帰株は、せいぜい 10^{-6} 程度しか得られないと考えられるので、バックが高すぎる。

2 つ目は、自然復帰変異株の頻度である。温度感受性変異株というのは、遺伝子のわずかな違い (1 塩基置換) によって作られるタンパク質の高次構造が温度によって微妙に変化することを狙ったもので、細胞を継代維持する間に正常に復帰 (自然復帰) する可能性が高い。一般には 10^{-6} 程度は起きる可能性があるが、tsJT60 ではもっと高いことが分かった。つまり、バックが高い。

3 番目は、DNA の導入効率である。遺伝子の導入効率のよい細胞では遺伝子 (cDNA) を導入したとき、導入細胞は数 10% もの頻度で得られる。ところが、tsJT60 は異常に導入効率が悪く、 10^{-6} 程度しかなかった。特定の cDNA を導入した場合でさえこの程度の頻度なので、ゲノム DNA を導入して、特定の遺伝子部分 (変異した遺伝子に対する正常な部分) を取り込んで野生型に復帰する細胞の頻

度は、さらに 10^{-6} 以下と考えられ、成功の可能性はほとんどない。

2-13. 問題点への挑戦 それでも1つ目の問題については、意外な展開があった。様々な癌遺伝子を導入してトランスフォーム細胞を取ったところ、^{6,7)} 驚いたことに、アデノウイルスのE1Aという癌遺伝子（正確には、E1AとE1Bの癌遺伝子のうちE1Bが変異したもの）でトランスフォームした変異細胞に限って、 34°C では旺盛に増殖するが、 40°C では急速に死滅した（Fig. 3）。^{9,10)} DNA導入細胞中の復帰株（これは生き延びてシャーレに残る）が 10^{-8} 程度でも回収できる可能性がある。この性質は、*tsJT60*のほかに得られた同じ性質の変異株をトランスフォームしたときにもみられ、変異した遺伝子によるものと考えられた。2番目の問題は工夫しようがなかったが、3番目の問題については、DNA導入法を様々な工夫して、cDNAの導入なら 10^{-3} 位にまで導入頻度を高めることができた。¹¹⁾ ゲノムDNAを使うかcDNAを使うかはそれぞれ利害得失があるが、両方について実際にいろいろ工夫し、最近に至るまで新たな可能性を考えつくたびに試してみた。

結局それでも成功には至らなかった。成功しなかった試みはどんな研究もあることで、一例として紹介した次第である。なお、これ以外にもたくさんの

面白い性質を持った温度感受性変異株を得て解析した¹⁴⁻²¹⁾が、省略する。また、変異株細胞とは別に、細胞周期に関して細胞骨格との関係を含めていくつかの結果を得た²²⁻²⁹⁾が、省略する。

3. 癌遺伝子

3-1. T抗原という癌遺伝子 当時、癌遺伝子が癌を起こす原因であることが少しずつ分かってきていた。DNA癌ウイルスSV40の持つT抗原という癌遺伝子（タンパク質も同じ名前）は、使い易いこともあって、広大赴任前から使っていた。細胞周期との関係では、T抗原を導入すると、宿主細胞のDNA合成を強力に誘導することが分かっていた。増殖因子の欠乏や飽和密度で培養したG0期の細胞にDNA合成を誘導することは、強力な増殖因子として働くだけのように見えるが、普通なら到底DNA合成できないような条件、例えば、最終分化して増殖能力を失った細胞とか、軟寒天培地に浮遊させた細胞にもDNA合成を誘導する。それだけでなく、先ほど紹介したように、G0期変異細胞である*tsJT60*にも 40°C でDNA合成を誘導^{5,7)}し、後述するように老化細胞にさえDNA合成を誘導する。

3-2. T抗原は細胞をG0期に留まれなくする

細胞周期という観点からは、T抗原は『細胞をG0期に留まれないようにする』ことによって、癌細胞の『自立的増殖能』を付与することが明らかである。

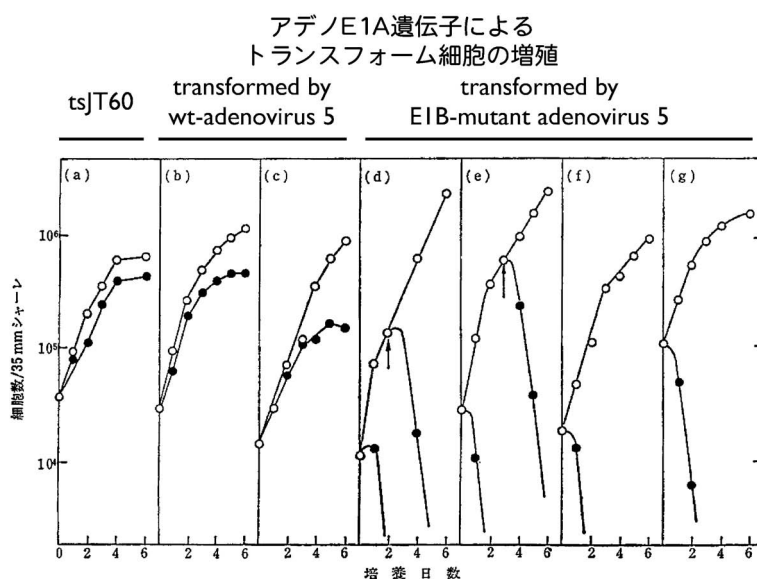


Fig. 3. Growth of *tsJT60* Cells Transformed with Adenovirus 5 Virus

○: 34°C , ●: 40°C . (a) Original *tsJT60* cells. (b, c) *tsJT60* cells transformed with adenovirus 5 wild type virus. (d-g) *tsJT60* cells transformed with adenovirus 5 E1B mutant virus (E1A gene is intact).

癌細胞の特徴は、『よく増殖する』ということではなく、『生体内では本来 G0 期に留まるべき環境でも細胞周期回転を続けてしまう』、言い換えれば『生体内における増殖の調節機構を外れてしまう』ことにある。もちろん、これだけが癌細胞の特徴ではないが、例えば、癌細胞の持つもう 1 つの大きな性質である『転移』と言う現象に関しても、正常細胞なら、本来の場所とは別の場所へ移植された細胞は、周囲の環境によって G0 期に留まらざるを得ないのが普通であって、この調節が生きていれば、仮に転移しても転移先の細胞は増殖できない。G0 期に留まることなく増殖を継続することが、転移という現象の成立に関しても大きな役割を果たしている。

T 抗原はどのようにして細胞を G0 期に留まれないか注目して、いろいろと仕事をした。³⁰⁻³³⁾ 大した成果とは言えないかもしれないが、少し前の仕事を ProcNAS³²⁾、その他³³⁾ に発表し広大へきてからの仕事が Nature に載った。³⁴⁾ 最も、Nature の仕事は、実験解釈上大きな問題のあることがのちに分かった。

3-3. T 抗原の働きに関する現在の理解 われわれの貢献はささやかなものでしかないが、T 抗原は様々な働きをするタンパク質であることが現在では分かっている。1 つは、T 抗原にはヘリカーゼの活性があり、ウイルスの DNA 複製開始に係わる必須の因子であることが分かっている。2 つ目は、それ自身が転写因子として、SV40 の初期遺伝子の発現抑制と後期遺伝子の発現促進に係わるだけでなく、様々な細胞遺伝子の発現抑制、発現促進に働いている。3 つ目は、癌抑制遺伝子の産物である p53 や RB タンパク質と結合して、それらの働きを阻害する。癌抑制遺伝子は正常な細胞で機能していて、そこからできるタンパク質は、細胞が勝手に増殖しないように抑制する増殖のブレーキとして機能し、T 抗原はこの働きを阻害する結果として、細胞が DNA 合成へ向かって容易に進行できるようになる。それが細胞周期における T 抗原の重要な働きである。

3-4. 実はそう単純ではない 一応そう理解されているのではあるが、事態はもう少し複雑で、現在でも未解決の問題がある。温度感受性変異のある T 抗原遺伝子を持った SV40 ウイルスは、非許容温度ではウイルスの増殖もできないし、細胞をトラン

スフォームすることもできない。詳しくみると、非許容温度ではヘリカーゼとしての働きも、転写因子としての働きも失われているし、p53 と RB とも結合できない、p53 の重要な機能の 1 つである p21 の発現も現れるなど、T 抗原の働きが完全に失われているように見える。ところが、この条件下でも細胞 DNA 合成は誘導される。³⁵⁻³⁸⁾ これは上記の T 抗原の機能だけでは説明困難で、細胞の持つ R ポイント機構を理解する上でも、新たな機構の発見につながる可能性がある重要なことと考え、しつこく追いかけた。T 抗原が p53 や RB 以外の細胞タンパク質と結合していることが、細胞 DNA 合成誘導に関係している可能性がある。T 抗原のほかに同じ遺伝子から作られる small t 抗原というタンパク質に係わる可能性もある。この辺りについて定年間際まで追いかけたが、それぞれ困難な隘路があり、残念ながら結論が得られていない。

4. ヒトの老化と細胞老化

4-1. 老化と寿命 生まれてから成長期には様々な意味での体の活性、生理活性は上り坂にある。成熟期からしばらくは高い活性が保たれたとしても、やがて次第に下降していく。生体の持つ恒常性維持機構はこのカーブを維持しようとするが、生体を障害する様々な要因が押し下げる。このせめぎ合いの中で、比較的早く老化するヒトも、比較的ゆっくり進むヒトもある。機能維持が限界に達するところが老衰による死である。

4-2. 老化の外因と内因 老化に係わる要因をごく概略的に外因と内因とに分ける。主な外的要因は損傷の蓄積である。DNA の損傷が歳とともに蓄積し、タンパク質の変性や、過酸化脂質の蓄積もいわれている。原因の 1 つは活性酸素である。分子レベルの損傷だけでなく、細胞レベル、組織レベル、個体レベルでも様々な原因によって損傷が蓄積する。損傷の多くは修復されるが、修復は不完全で損傷の蓄積は不可避である。内的要因には遺伝子に係わる。長寿の家系が持つ長寿遺伝子には、成人病を発症させ難い体質の原因となる SNP (single nucleotide polymorphism) があり、こういった遺伝子レベルの違いの集積が、恒常性維持機構の強弱にも影響する。遺伝的早老症の原因遺伝子の多くは、ゲノム維持に係わる遺伝子である。DNA の老化への係わりとしてテロメア短縮があるが、あとで詳述す

る。

4-3. 生存曲線 先進国では平均寿命の伸びが顕著であるが、18世紀には先進国といえども10歳まで生きられるのは全体の半分もなかった。その後も感染症で死ぬヒトが多く、平均寿命は短かった。ただ、最大寿命は、昔も今も大きく変わっていない。整理すれば、1) 平均寿命の伸びは、衛生環境の改善や医療の進歩によって、人生の途中でなくなるヒトが減ったためである。2) 若々しく元気な老人が増え、老化の進行が遅くなっているようにみえるのは、衛生・医療だけでなく、生活環境全般の改善のためである。3) 最大寿命（ヒトでは120歳と言われる）は伸びている訳ではなく、生物学的寿命の限界は変化していない。現在の日本では、医療環境、衛生環境、栄養環境などの改善による平均寿命（ゼロ歳児の平均余命）延長の上に、長寿になる可能性を持った遺伝的素因が有効に発揮できるようになって、百寿者が増加していると考えられる。

4-4. 老化と細胞再生能力 老化の過程で起きる事象については膨大なデータの蓄積があるが、細胞再生能力の低下による、細胞数の減少、組織・臓器の萎縮は共通的な特徴である。細胞数だけではなく細胞機能の低下もみられ、両者相まってシステムとしての劣化が進行する。老化を考える際には、コラーゲンなど細胞間基質の劣化も考慮する必要があるが、細胞間基質の代謝も細胞が果たしていることであり、細胞自身の老化が重要である。

体細胞全体を増殖能力から2つに大別すると、増殖能力を持った細胞と、増殖能力を失った細胞とがある。神経細胞や骨格筋細胞などは増殖能力がなく、組織再生することはほとんどない。終末分化した血球や表皮細胞などの体細胞には増殖能力がないが、幹細胞の分裂によって供給される。大部分の体細胞には増殖能力があり、必要に応じて再生する能力を持っている。ただ、体幹細胞を含むすべての体細胞には細胞分裂できる回数に限界があり、老化する。この辺りについて以下に詳述する。

5. 細胞老化

5-1. 細胞老化とは ヒト胎児の細胞を培養すると、一定の分裂回数ののちに増殖停止することがヘイフリックによって1961年に報告された。³⁹⁾ これを細胞の『分裂寿命』と言う。ヒト細胞は『有限分裂寿命』である。分裂寿命（分裂できる回数）は

臓器によって異なり、同じ臓器に由来する細胞は同じ分裂寿命を持つ。誕生後のヒト体細胞は分裂寿命が短く、年齢が高いほど分裂寿命が短い。分裂寿命によって『細胞老化』が起き、細胞老化はヒトの老化の原因になると考えられた。細胞老化の原因となる機構については長い間不明であったが、1990年代になって、テロメア短縮が原因であることが分かった。

5-2. 老化細胞の注目点 一定回数の分裂ののちに不可逆的な増殖停止状態に陥る老化細胞は、G0期と細胞周期との移行に注目していたわれわれにとって重要なテーマでもあり、以下のことを念頭に仕事を進めた。1) なぜ一定回数分裂すると老化するのか。2) 細胞周期へ戻れなくなるしくみは何なのか。3) 増殖能力を失った終末分化細胞とどこが違うのか。4) ヒトの老化と関係があるのか。これらのテーマは形を変えながら現在まで続いている。

5-3. どんなことが分かったか 本実験開始前の先人の追試を含めて、様々な実験の結果いろいろなことが分かった。1) 分裂回数が問題なのであって、他の因子によるのではない。2) 老化細胞はすぐ死ぬのではなく、長期間生存し続ける。3) どのような増殖因子を加えてもDNA合成を再開できない。⁴⁰⁾ 4) 増殖因子に対する増殖の応答性は、若い細胞からの継代過程でほとんど変わらないが、老化する少し前から急速に低下する。⁴⁰⁾ 5) 増殖因子を加えたとき、初期シグナル伝達経路は、若い細胞と同じように起きる。⁴²⁻⁴⁴⁾ 6) G0期変異株細胞のように、増殖誘導後の細胞内反応の多くは起きるが、Rポイント付近を通過できないことがDNA合成を開始できない原因らしい。このような老化細胞の性質は、G0期特異的細胞周期変異株が非許容温度で示す性質と一見よく似ており、変異株細胞の解析によって、細胞老化と言う雲をつかむような現象にも解決の糸口がつかめるかもしれないという期待を持って進めた。

5-4. 分かったことその2 7) SV40の感染によってDNAを再開できる。³⁶⁾ 8) 他のDNA癌ウイルスの感染でもDNA合成を再開する。⁴¹⁾ 9) SV40を感染あるいはT抗原遺伝子を導入した細胞は、分裂寿命が延長（延命）する。³⁵⁾ 10) 分裂寿命を延長した細胞はしばらく増殖を継続するが、やがて異常な形態の細胞が急に増えて死滅する（crisisと呼

ぶ第2の増殖限界).^{35,38)} 11) 正常細胞の老化前の代数でT抗原を失活させると、正常細胞様の表現型になり、飽和密度になるまでよく増殖する。^{35,37,38)} 12) 正常細胞の老化後の代数(延命)でT抗原を失活させると、増殖は直ちに停止する(老化細胞様になりすぐには死なない)。^{35,37,38)}

T抗原遺伝子の導入による分裂寿命の延長は、T抗原が細胞老化に至る過程を遅延させるためなのか、それとも、老化に至る過程には影響せず老化と言う限界を乗り越えさせる結果なのか、問題であった。後者が正しいればいつまでも増殖を続けるだろうから、延命した細胞も結局は限界に達する事実からは前者が妥当であろうと予想していたが、結果は11), 12) に要約した通り、後者が正しいとする結果が得られた。現在では、細胞の老化はテロメア短縮によって起きることであり、その過程にはT抗原は影響を与えず、テロメアが短縮した時点で稼働する増殖停止機構をT抗原が阻害することで細胞は延命することが分かった。

5-5. 分かったことその3 13) 老化細胞を若い細胞と細胞融合すると、融合細胞では両方の核でDNA合成しなくなる(老化細胞の表現型が優性)。14) 老化細胞にはDNA合成開始を阻止する因子が存在する。^{48,50,51)} 15) 老化細胞で発現が亢進する遺伝子と低下する遺伝子があり、*differential hybridization*によっていくつかをクローニングした。^{45-47,55)} 最後の項目について若干付記すると、老化した繊維芽細胞では、 $\beta 2$ ミクログブリンの発現、⁴⁶⁾ インターフェロンの発現、インターフェロンで誘導される遺伝子の発現が上がる。^{46,55)} これらは偶発的現象に過ぎないのか、老化細胞では特定遺伝子のプロモータが共通に活性化されるのか、これらの遺伝子の発現は老化細胞の機能として意味があるのかなどの疑問が残ったが、十分な展開はできなかった。その他にも老化細胞に係わる仕事がある^{49,52,54)} が、省略する。

6. テロメアとは何か

1989年と1990年に、ヒトの組織でも培養細胞でもテロメアが短縮することが示され、これが、細胞の分裂寿命あるいは細胞老化の原因として、一躍脚光を浴びた。

6-1. テロメアとは何か 真核生物のゲノムDNAは直鎖状で、直鎖状DNAの末端部分は短い

塩基配列の繰り返しからなる特殊な塩基配列からできている。5'から3'へ向かう鎖には、塩基としてGが多く含まれていて、哺乳類では共通して5'-(TTAGGG)-3'という6塩基からなる繰り返しがあり、ヒトの体細胞ではおよそ10 kbpの長さを持っている。これをテロメアDNAと言う(Fig. 4)。ただ、多くの哺乳類のテロメアDNAは50 kbpと長く、類人猿であるチンパンジーやゴリラなどでも同様である。⁵³⁾ ヒトのテロメアが特に短いことが、老化にテロメアが係わるという結果を生む。テロメアDNAの大部分は二本鎖で、反対側の鎖3'-(AATCCC)n-5'はGを含まない。通常の意味での遺伝子はここには存在しない。一番端の部分では、3'末端の一本鎖がオーバーハングしていることが特徴で、Gを含む鎖なので最近ではGテイルと呼ぶ(Fig. 4)。およそ100塩基位の長さで、非常に大事な役割を持っている。

6-2. なぜテロメアが必要か 真核生物のDNAがテロメア構造を持つのは、DNAは本来末端を持たないものとして細胞が認識していることに関係する。DNAに末端があったとき、細胞はゲノムDNAが切断されたものと判断する。DNAの損傷は実は日常的に起きているが、切断は死に直結する一大事なので、細胞はいつでも損傷の有無をチェックし、損傷を直す修復酵素を用意していて、切断があればすぐに修復しようとする。しかし、直鎖状DNAの本来の末端はつながっては困る。もしDNAがテロメア末端同士でつながると、細胞分裂のときに動原体を2つ持った染色体が形成され、染色体の正常な分離が妨げられ、その結果、異常な染色体を生じ、細胞死につながるからである。そのため、直鎖状DNAの末端は覆い隠される必要がある。これがテロメアの役割の1つである。

6-3. テロメアの構造 テロメアDNAはループを形成して末端を隠している(Fig. 5)。繰り返し配列を使ってGテイルが内部のテロメアDNAと部分二本鎖を形成する。この結果、テロメアDNAは大きなループを形成し、これをtループ(telomere loop)と言う。ここにはTRF2という糊付けタンパク質や、テロメア配列に結合するTRF1と言うタンパク質がある(Fig. 5)。いずれもテロメアDNAの塩基配列を厳密に認識して結合し、塩基配列が1つでも変化すると結合できない。実際に

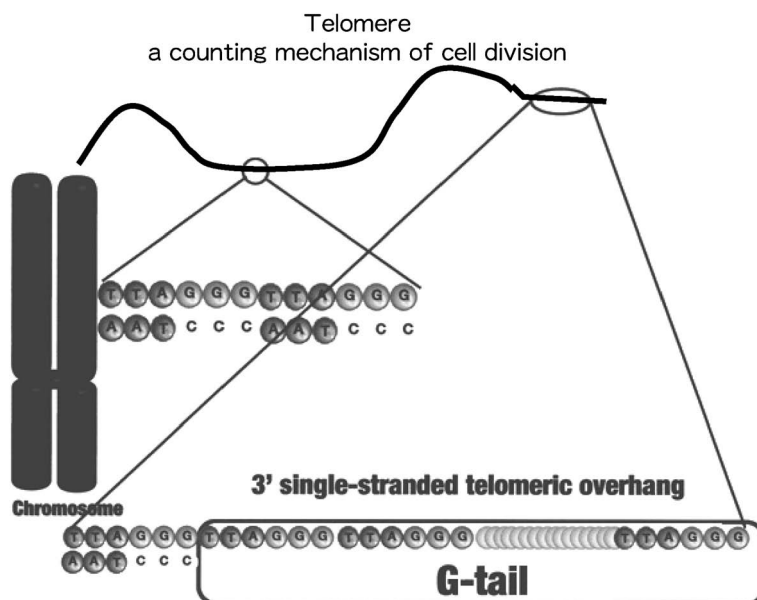


Fig. 4. Structure of Telomere DNA

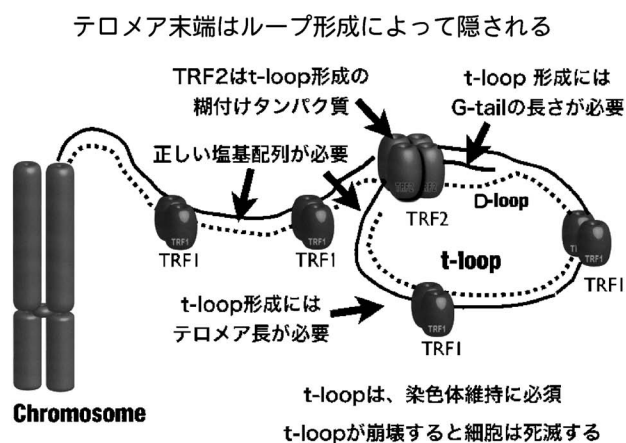


Fig. 5. Telomere Ends of Linear DNA are Hidden by t-loop Formation

は多くのタンパク質と会合した大きな複合体を作っている。このようなテロメア複合体は、核膜のすぐ内側に存在するヘテロクロマチンとして存在すると考えられる。

テロメアループを形成するには、1) ある程度の長さのテロメア長が必要であること（短縮あるいは消失するとループ形成できない）、2) G テイルが必要であること（短縮あるいは消失するとループ形成できない）、3) 正確な塩基配列が維持されること（変異すると TRF1 や TRF2 が結合できずループ形成できない）、4) テロメア結合タンパク質が必要であること（変異するとループ形成やテロメア長に異

常が生じる）、などが分かった。

7. テロメアは短縮する

7-1. テロメアは DNA 複製毎に短縮する テロメア DNA は複製のたびに短縮する (Fig. 6). 末端部分の娘鎖にある RNA プライマーは、DNA に置き換えられないため、複製終了時には娘鎖の 5' 最末端部分は 100 塩基分程度短縮する。娘鎖の 3' 最末端側では鋳型鎖との間で完全な二本鎖ができそうであるが、実際には両末端側に G テイルが存在することが分かっているので、娘鎖の 3' 最末端側では鋳型鎖が 100 塩基分位分解されるものと考えられている。こうして、複製のたびに鋳型鎖も娘鎖も 5' 最末端が 100 塩基位短くなる。実験的に証明されたのは、テロメア DNA を測定する方法が工夫された 1990 年以後のことである。

7-2. テロメア DNA は実際に短縮する 始めは 10 kbp 以上あったヒト胎児繊維芽細胞のテロメアは、分裂回数が進むにつれて短縮する (Fig. 7). 重要なことは、およそ 5 kbp 位まで短縮すると細胞は老化して、増殖を停止することで、これが分裂寿命の限界である。繊維芽細胞だけでなく、血管内皮細胞等でも同様である。ただ、5 kbp は平均値に過ぎず、細胞毎に染色体毎にテロメアの長さは異なるため、現実のテロメアサイズには大きな幅がある。染色体末端のテロメアの 1 つが短縮の限界に達すると、細胞は増殖を停止すると考えられるが、厳密な

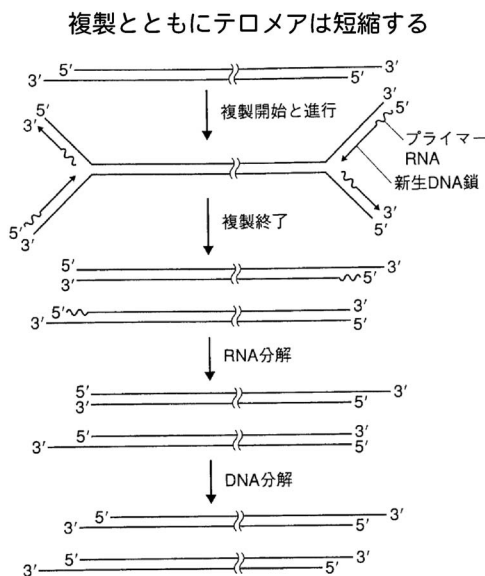


Fig. 6. Telomere Ends are not Replicated (End Replication Problem)

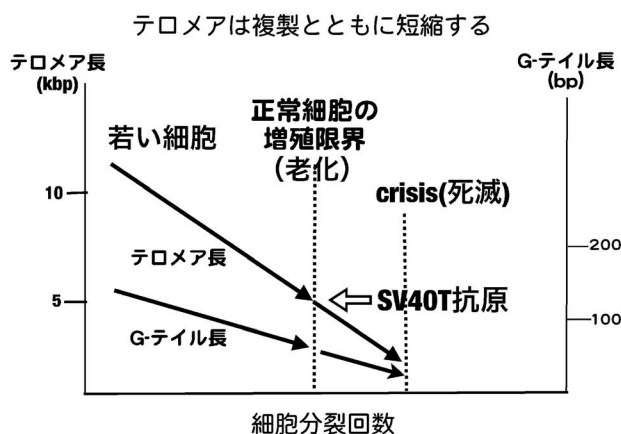


Fig. 7. Telomere and G-tail Shorten in Cultured Cells with Proliferation

証明は困難である。前述のように T 抗原という癌遺伝子は、老化細胞にも DNA 合成を誘導し、T 抗原によるトランスフォーム細胞は老化を超えてさらに分裂を続ける（延命）³⁵⁾。しかし延命中にもテロメア短縮は進行し、ついに死滅する（Fig. 7）。これが crisis である。このとき、テロメアがほとんど消失するために染色体末端同士の融合が頻繁に起き、異常な核を持った細胞が急増する。

テロメアが約 5 kbp 付近まで短縮したところで増殖を止める（細胞老化）のは、テロメア短縮のために受動的に増殖できなくなると言うより、テロメアがさらに消失して細胞死に至るのを防ぐための、正

常細胞が持っている積極的な予防的措置である、と考えられている。後述するところも含めて、この辺りをまとめて蛋白質核酸酵素誌⁵⁶⁾に総説を、また、『ヒト細胞の老化と不死化』と言う本⁵⁷⁾を出した。

7-3. G テイルも短縮する 最近まで G テイルを測るよい方法がなかったが、高感度で定量的に測れる方法を開発して 2005 年に Nature Methods に報告した。⁵⁸⁾ 細胞分裂の進行とともにテロメアが短縮するだけでなく、G テイルも短縮する（Fig. 7）。T 抗原を導入した細胞の延命中にもさらに短縮し、ついにほとんど消失する。分裂寿命にはテロメア全体の短縮と G テイル短縮の両方が影響するが、G テイルの重要性は明らかで、テロメア全体がかなり長くても G テイルが短縮すれば細胞は老化するし、G テイルが十分に長ければテロメアがかなり短縮しても老化細胞にならない。この測定方法を使って、今後、老化との関連で様々なヒト疾患との関係を調べることができると期待される。

7-4. 体内の細胞でもテロメアが短縮する

Figure 8 はわれわれのデータではないが、末梢血液中のリンパ球のテロメア長を調べたものである。⁵⁹⁾ 概略的には、年齢の高いヒトほどテロメアが短い、同じ年齢でも個人差が相当に大きい、5 kbp 以下の平均テロメア長を持つ例がない、などのことが分かる。60 歳辺りから平均テロメア長が 5 kbp 程度になるヒトが出てくるが、高齢者でも 5 kbp 以下の例がみられないのは、リンパ球の場合でもテロメア長が 5 kbp 辺りまで短縮すると増殖が悪くなるためと理解できる。リンパ球の増殖が悪くなれば、結果として感染に対して弱くなる、自己免疫による慢性疾患が増える、と言ったことにつながる可能性があるが、実際、60 歳位からそのような変化が顕著に現れる。もちろん、百歳でも十分に長いテロメアを持つヒトもいる。と言うより、こういうヒトが百歳まで生きられる、というべきであろう。

Figure 9 は第一内科の先生方との共同研究による肝臓の場合である。高感度で定量的な測定法を改良し、⁶⁰⁾ それを使って測定した。⁶¹⁾ 正常肝ではテロメアが 1 年に 100 bp 位短縮することが分かる。肝細胞はおよそ年 1 回分裂するという教科書的な記述とよく合っている。ただ、高齢者になってもまだ 5 kbp より長く、肝細胞は高齢者でも十分な再生能力があると考えられる。慢性肝炎あるいは肝硬変で

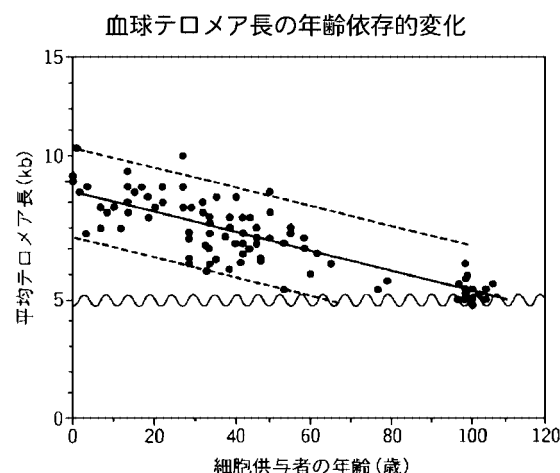


Fig. 8. Telomeres in Human Periphery Lymphocytes Shorten with Age

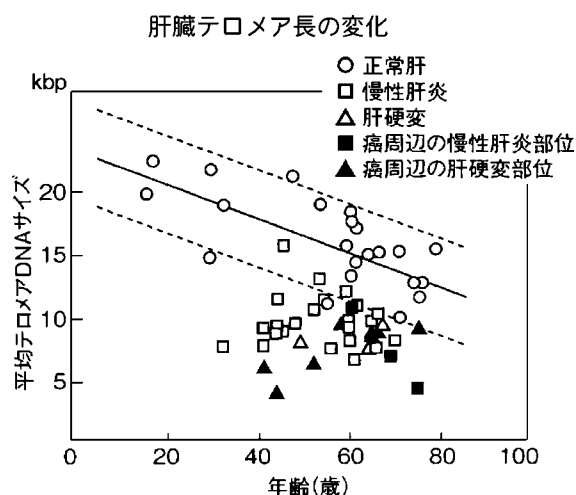


Fig. 9. Changes in Telomere Size in Human Liver Tissues

は、同じ年齢の健常者に比べてテロメアが短い。局所的な細胞再生を繰り返していることを考えれば妥当な結果で、5 kbp 辺りまで短縮している患者さんでは再生能力が非常に低下している可能性がある。

血管内皮細胞でも年齢とともにテロメアが短縮し、特に動脈硬化等の病変部では正常部位よりはるかに短縮している。血管内皮細胞の再生が悪くなれば、損傷部位では基底膜が露出して血栓ができ易くなる等、病変部をさらに増悪させると考えられる。血管の老化は、循環の悪化を通して全身の老化に影響を与える重要な原因としてよく知られていることで、『ヒトは血管から老いる』という言葉もある。血管内皮細胞のテロメア短縮の程度は、老化を考え

る上で注目に値する。

体内のほとんどの組織・細胞で、年齢に伴うテロメア長変化が測定されており、ほとんどの組織で年齢とともにテロメアが短縮するが、増殖しない神経、筋肉では短縮しないことが報告されている。

7-5. ヒトの老化との関係 体細胞のほとんどは増殖能力を持っていて、細胞の置き換えがかならずあるので、年齢とともにテロメアが短縮することは避けられないが、高齢者でも体内のすべての細胞がテロメア短縮の限界に達する訳ではない。ただ、リンパ球のように、早いヒトでは60歳位から平均テロメア長としては増殖限界に達し、免疫系の機能に影響を与える可能性がある。組織によっては健常部位のテロメアは長くても、損傷と修復を繰り返す部位では増殖限界までテロメアが短縮する可能性がある。こういったことが、再生の不良、損傷修復の不全を引き起こし、組織の萎縮や機能低下、病変の増悪と相まって、老化という総合的な症状につながると考えられる。

Figure 10 に示したのはわれわれのデータではないが、60歳以上のヒトから血球を採取し、テロメア長を測定して長短の二群に分け、以後15年間に渡る生存率の変化をみた。⁶²⁾ これで見ると、テロメアの長かったヒトのその後の生存率が、有意に高いことが分かる。テロメアが短かったヒトたちは、心臓血管系や感染症でなくなる頻度が高かった。

Figure 11 には、テロメア短縮に影響を与える因子を挙げた。生理的な組織再生による細胞増殖に加えて、損傷修復による細胞増殖がテロメア短縮の原因になっていることは紹介した。それ以外にも、Fig. 11 に示したように放射線や活性酸素等によるゲノム障害によって、テロメアの異常な短縮がみられる。ゲノム損傷は日常的に起きていることであり、特に活性酸素は老化の主たる外因と考えられる。遺伝的変異による遺伝的早老症でも、テロメア短縮や異常な代謝がみられる。つまり、テロメア短縮には内因と外因の両方が係わる。

7-6. テロメア短縮による細胞機能変化 この Fig. 11 の右の方で、テロメア短縮による遺伝子発現の変化が老化に影響するように描いた。Figure 12 はヒト繊維芽細胞の例で、細胞の分裂回数が31回と若いとき(31代とすることにする)には、KGF (keratinocyte growth factor) や IGF-II (in-

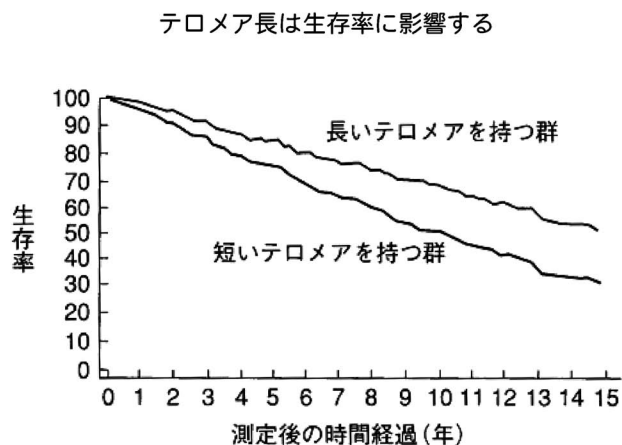


Fig. 10. Human Survival Depends upon Telomere Length

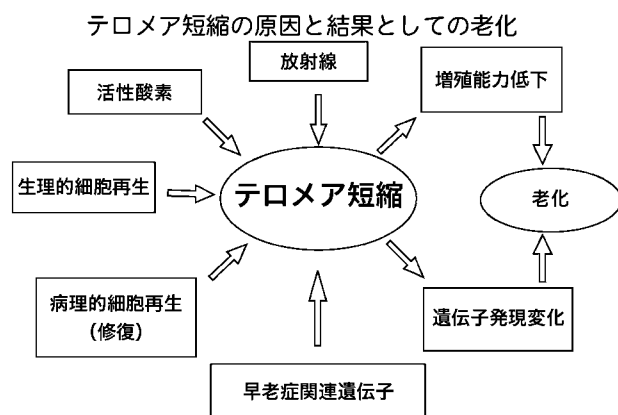


Fig. 11. Causes of Telomere Shortening

sulin-like growth factor) などの増殖因子遺伝子がよく発現している.^{63,64)} しかし 60 代目では、細胞増殖能は若い細胞と変わらないにも関わらず、遺伝子発現が低下している。87 代の老化細胞では、全く発現がみられない。37 代の星印は、細胞を飽和密度において完全に増殖停止させたもので、このときには発現は低下していないので、老化細胞での発現低下は単純に増殖が止まった結果ではない。もちろん、増殖状態にも細胞老化にも影響されず、発現の変わらない増殖因子もある。Figure 12 の右側は、この繊維芽細胞にテロメアを延長するテロメララーゼという酵素の遺伝子 (hTERT) を導入して、テロメアが延長した細胞である。テロメアが延長した細胞では、分裂を繰り返しても増殖因子の発現が若い状態のまま保たれる。⁶³⁾ 似たことは、血管内皮細胞の増殖因子遺伝子の発現でもみられた (未発

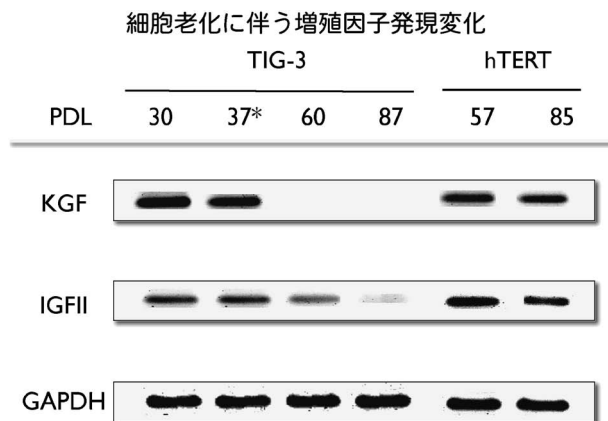


Fig. 12. Changes in Expression Level of Growth Factors according to Cellular Senescence of Human Fibroblasts

KGF (keratinocytes growth factor), IGFII (insulin-like growth factor II), and GAPDH (glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase) as a control of expression level. PDL (population doubling level). *: Cells growth-arrested at saturation density at 37 PDL.

表)。増殖因子の生産は、産生細胞自身だけでなく周囲の細胞の増殖にも大いに影響を与えることは当然で、老化とともに細胞の増殖能力が低下するのは、テロメア短縮による直接効果のほかに、増殖因子の生産能力が低下することが関係しているのかもしれない。

Figure 13 は、様々な年齢のヒトから採取された繊維芽細胞を使って、細胞の全タンパク質を調べたプロテオーム解析である (未発表)。タンパク質のスポットの濃さを規格化して、それぞれのサンプル間で比較した結果が棒グラフで表示してある。左から右へ向かって、0 歳 (若) から 97 歳 (老) まで順に並べてある。全体の中では一部に過ぎないが、かなり多くのタンパク質スポットが年齢に従って発現が上昇する、あるいは低下する傾向を示すことが分かる。これらのことは、細胞の老化に伴ってテロメア短縮が起き、それが遺伝子の発現を変化させることを示し、それが個体の老化に係わることを示唆している (Fig. 11)。

8. 早期老化

8-1. 早期増殖停止という現象 繊維芽細胞や血管内非細胞など、一部の細胞を除いてヒト体細胞の大部分は、培養系で長い間増殖を続けることができない。培養系ではほとんど全く増殖しない細胞から、数回から 20 回程度は分裂できる細胞など様々であるが、テロメア短縮以前に増殖停止してしまう。培養系の不備による増殖停止ということで、し

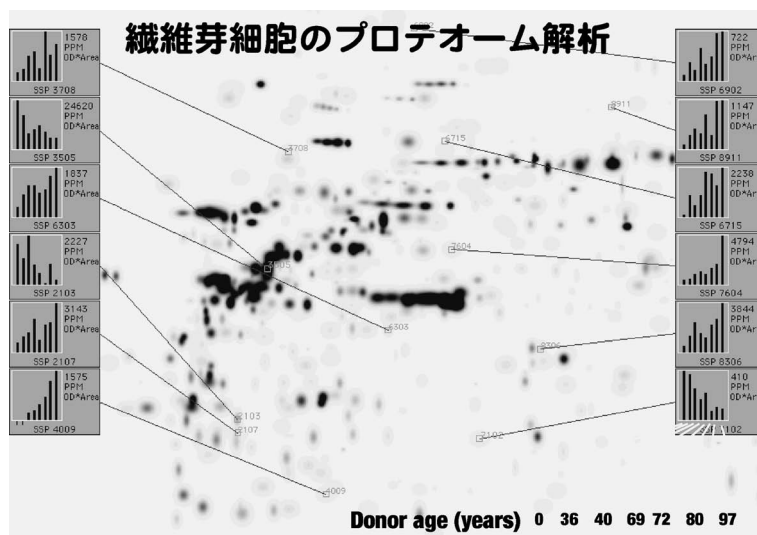


Fig. 13. Proteome Analysis of Human Fibroblasts from Patients of Different Ages

られてカルチャーショックと呼ばれる。ほかにも、ヌクレオチドアナログの取り込み、活性酸素への曝露やDNA損傷剤によるゲノム損傷、ある種の代謝阻害剤による増殖停止、あるいは異常タンパク質の蓄積や小胞体ストレスなどによっても、テロメア短縮に係わりなく増殖が停止する。

8-2. これは細胞老化なのか 以上に述べた増殖停止の例が細胞老化との関連で注目されたのは、増殖停止した細胞の表現型が、テロメア短縮による増殖停止と区別がつかないことからであった。扁平で大きな特有の細胞形態を示すこと、特徴的な遺伝子発現の変化があること、老化細胞の特徴と考えられていたSA (senescence associated) β -galの発現が共通してみられる。テロメアが短縮していないことを除けば、いわゆる老化細胞との区別がつかない。テロメア短縮以前の細胞老化ということで、これを早期老化とも言う。他方、増殖停止のすべてが老化細胞様の表現型を示す訳ではない。生体内の細胞の多くは増殖停止しているが、老化細胞ではない。培養系でも、増殖因子の欠乏、飽和密度、細胞の分化など、いわゆる生理的条件下での増殖停止は老化細胞の表現型を示さない。したがって、老化細胞の表現型を示して増殖停止するのは、特別な意味があるに違いない。

8-3. 早期老化とはどういうことか 現在、細胞への様々な不都合な事態に対する細胞の応答反応の1つが細胞老化である、と理解される。Figure

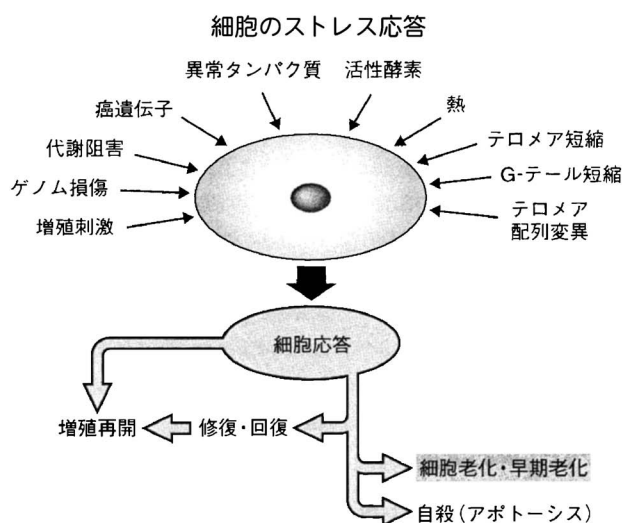


Fig. 14. Response of Cells against Wide Variety of Stress

14に示すような様々な不都合な事態（ストレスと総称する）に対して細胞はまず一時的に増殖を停止し、ストレスへの対応反応を細胞内で引き起こす。

例えばDNA損傷というストレスに対して修復酵素が十分に働いて損傷が修復されれば、細胞は再び増殖を開始できる。しかし、十分に損傷を修復しきれない、しかし細胞を殺すほどのことではないと判断されれば、細胞を生かしたまま増殖を永久に停止させる。これが細胞老化である。テロメア短縮という損傷（ストレス）は修復することができないので細胞老化を引き起こす。しかし、細胞老化を起こすのはテロメア短縮に限らないことが理解できる。も

つと損傷が大きくて修復しきれない、あるいはそのような細胞を生かしておくことが個体に不都合であれば、細胞はアポトーシスを起こして死ぬ。

様々なストレスに応答する細胞内反応については現在研究が進行中であって、細胞老化の場合についてはあとで紹介するが、活性酸素や遺伝的早老症との関係を紹介しておく。

8-4. 活性酸素 Figure 15(A)は、ヒト繊維芽細胞に過酸化水素を処理し続けた場合の増殖曲線で、棒グラフは老化細胞に特有の β -gal を発現した細胞の頻度である。細胞形態でも β -gal の発現でも老化細胞になる (未発表)。遺伝子発現変化についても老化細胞と同じ変化が得られている。通常の老化は 80 代を超えてから起きるから、42 代での老化は早期老化である。高濃度の過酸化水素を処理すれば、アポトーシスによって死ぬ。テロメア長の短縮はこの間にほとんどみられないが、テロメアを検出するテロメアプローブとの結合量が非常に低下している (Fig. 15(B))。これは、テロメア配列に変異が起きている可能性を示す (未発表)。活性酸素は 3 つ並んでいる G の 1 番目を高頻度に T へ塩基置換する。テロメアプローブとして、TTATGG を検出する配列を使うと、対照細胞 DNA のシグナルは非常に弱いにも係わらず、過酸化水素処理した細胞 DNA のシグナルが強いことが分かった (Fig. 15(B))。過酸化水素を処理した早期老化細胞では、テロメアループの糊付けタンパク質 TRF2 の存在量は変化しないが、テロメアに結合している量が著しく低下していることが分かった (未発表)。活性酸素によってテロメア配列の塩基が変化し、TRF2 が結合できなくなり、テロメアはループを巻けず細胞は老化すると理解される。

活性酸素を下げたらどうなるか。ヒトの骨芽細胞を培養したとき、通常は 18 代位で早期老化し増殖が止まる (Fig. 16)。気相 (空気) の酸素濃度は約 20% である。気相の酸素濃度を 3% に下げて培養したとき、40 代位まで分裂を継続する。さらに、活性酸素を消去するアスコルビン酸を添加すると、50 代以上にまで分裂寿命が延びる (未発表)。普通の酸素が細胞内で活性酸素を作って毒性を発揮していることが分かる。ただ、早期老化を起こす細胞の多くは、低酸素にするだけで分裂寿命が延びる訳ではない。

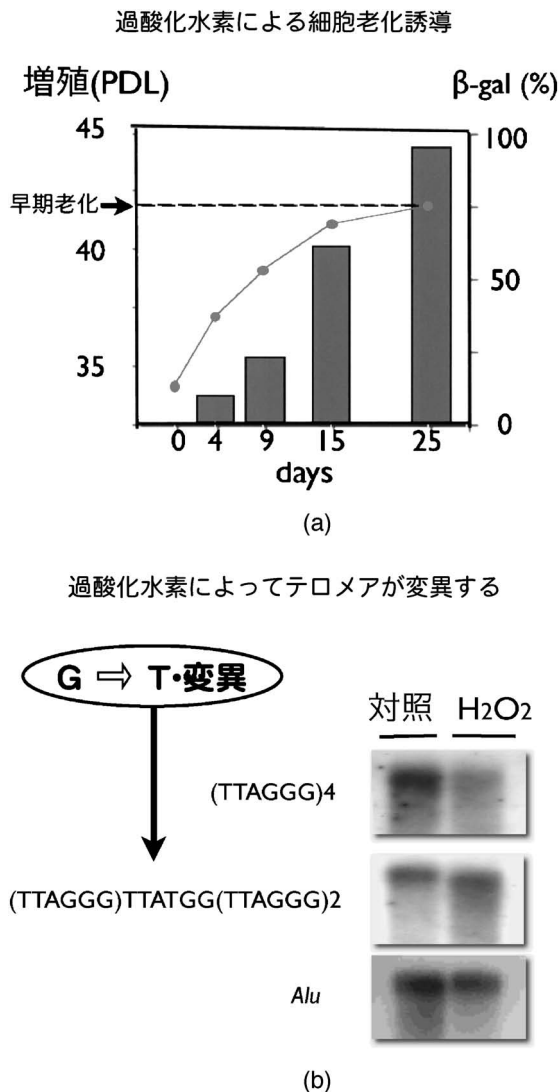


Fig. 15. Cellular Senescence by Exposure to Hydrogen Peroxide

A) Growth-arrest and senescence-associated β -gal (SA- β -gal) expression by hydrogen peroxide exposure. B) Telomere mutation by hydrogen peroxide exposure revealed by Southern hybridization using probes with wild type and mutant base sequences.

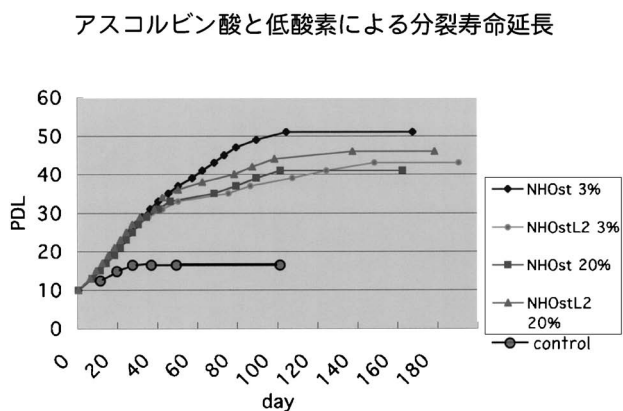


Fig. 16. Extension of Proliferative Lifespan of Human Osteoblasts by Low Oxygen Pressure and Addition of Ascorbic Acid

8-5. 活性酸素と老化 ショウジョウバエや線虫に、活性酸素を消去する働きを持った遺伝子を導入しておくと、寿命が延びるという報告がある。他方、酵母、線虫、ショウジョウバエだけでなく、マウスでも、変異が起きて遺伝子産物の機能が低下すると長寿になる、という遺伝子がある。これは、どの生物にも保存されている共通性の高い遺伝子で、哺乳類では IGF-1 (insulin-like growth factor) やインシュリンが働くときのシグナル伝達経路の遺伝子群である。これらの遺伝子群の変異体は、個体の大きさが小さく活発ではないといった問題はあるが、長寿になる。また一方では、カロリー制限が寿命を延ばす、という研究はマウスでかなり古くから知られていた、霊長類のサルでも実験が進行中で、途中経過としては通常のサルが既に老化した症状を示しているのに対して、カロリー制限したサルはまだ若々しく保たれているという。寿命が延びる機構は十分に分かっていないが、活性酸素と遺伝子とカロリー制限の三題噺から共通に考えられることは、過剰なエネルギー消費を抑えると活性酸素の産生が抑制され、寿命が延びるという関係がみえる。ただ、糖の過剰な代謝が、活性酸素とは別に細胞に早期老化を引き起こす機構がある可能性もある。

8-6. 遺伝的早老症 ヒトの遺伝的早老症には、広義のものまで含めるとたくさんの例が知られている。これらの早老症は、細胞レベルでは細胞老化と早期老化のいずれかあるいは両方に係わるものと思われる。Werner 症候群、Bloom 症候群、Rothmund-Thomson 症候群の原因遺伝子は DNA ヘリカーゼで、Ataxia-telangiectasis 症候群の原因遺伝子 (ATM) は、ゲノム損傷修復に係わるシグナル伝達系で働くタンパク質キナーゼの遺伝子、Nijmegen 症候群、Cockayne 症候群、Xeroderma pigmentosum の原因遺伝子は、いずれもゲノム損傷の修復に係わる遺伝子群である。遺伝子の産物はテロメア辺りに局在しているものも多い。

早老症患者さんの細胞は、細胞の分裂寿命が短いことが報告されている (Fig. 17)。これらの患者さんの細胞では、テロメア短縮が早いこともたびたび報告されている。⁷⁶⁾ テロメアは短い塩基配列の繰り返しのため、ほかの DNA のテロメア配列同士の間で二本鎖を形成して絡まる可能性が高い。ウエルナー症候群のヘリカーゼ (WRN 遺伝子) はテロメ

ヒト繊維芽細胞の分裂寿命

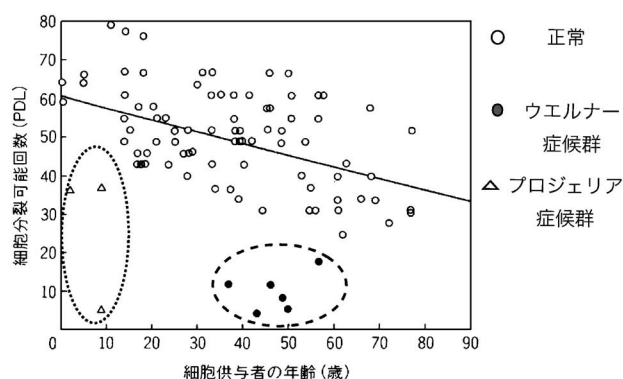


Fig. 17. Shortening of Proliferative Lifespan of Human Fibroblasts with Donor Age and in Patients with Premature-senescence Syndrome

ア部位に局在しており、試験管内ではテロメアの絡み合いを解きほぐす。⁶⁵⁾ 患者さんのリンパ球は培養中にテロメア長が異常な変動を示し、^{66,67)} 健常者のリンパ球が EB ウイルスの感染によって一部が不死化するのに対して、患者さんのリンパ球は全く不死化しない。⁶⁸⁾ その他、リンパ球の不死化についての結果があるが省略する。⁶⁹⁻⁷⁵⁾ WRN 遺伝子あるいは ATM 遺伝子の変異はテロメアの長いマウスでは早老症を現さないが、テロメアを短縮させると WRN 変異も ATM 変異も早老症が現れる。ヒトのテロメアは元々短いため、これらの遺伝子の変異による早老症が現れやすいものと考えられる。Hutchinson-Gilford progeria (プロジェリア) 症候群の原因遺伝子は核骨格タンパク質ラミン A であるが、この場合、テロメアの異常短縮とともに、異常なラミンタンパク質の蓄積による細胞ストレスが早期老化を引き起こす。

9. 増殖停止のプロセス

9-1. 増殖誘導によって起きる細胞内プロセス

Figure 18 は非常に単純化したものであるが、細胞に増殖刺激が与えられたのち、DNA 合成開始に至る細胞内で起きるシグナル伝達経路である。増殖因子によって初期シグナル伝達系が働き、初期遺伝子が活性化され、初期遺伝子によって作られた転写因子が二次遺伝子を活性化し、やがてサイクリンと CDK (サイクリン依存性キナーゼ) タンパク質が合成・蓄積し、この複合体が活性化されると、癌抑制遺伝子タンパク質の 1 つである RB をリン酸化す

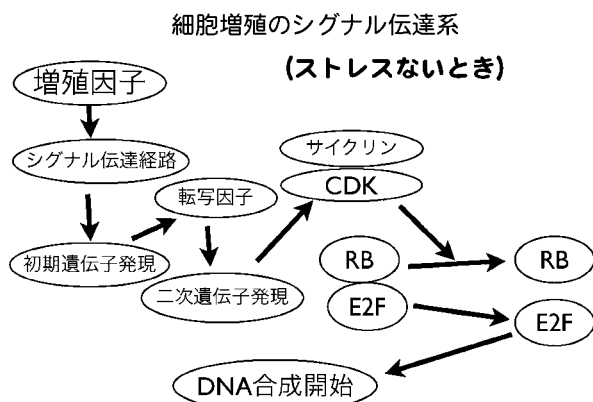


Fig. 18. Intracellular Signal Transduction Process Leading to the Induction of DNA Synthesis

る。E2F は DNA 合成に必要な酵素の遺伝子を活性化する転写因子であるが、RB がリン酸化されることによって E2F が活性になり、DNA 合成に必要な酵素遺伝子が活性化され、やがて S 期へ進行する。T 抗原は、p53 タンパク質にも RB タンパク質にも結合して働きを失わせ、G1 チェックポイントを働かなくさせる。

9-2. ストレスがあったとき ストレスがあったらどうなるのか。ストレスがきたとき、重要な反応の 1 つは癌抑制遺伝子として有名な p53 の活性化である (Fig. 19)。タンパク質としての活性化だけでなく、この遺伝子が活性化されて p53 タンパク質が増える場合もある。p53 タンパク質は、転写因子としてたくさんの遺伝子を活性化あるいは逆に抑制するが、その中でも重要なのは、p21 遺伝子の活性化である。その結果、p21 タンパク質がたくさん作られてサイクリンと CDK の複合体に結合し、その働きを阻害する。その結果、これ以降の反応が進行せず、S 期への進行は阻止される。

p53 を介さない経路もあり、例えばストレス応答 MAP キナーゼが知られている。p53 を介さずに CKI (cyclin-dependent kinase inhibitor) が作られてサイクリンと CDK の複合体を阻害する (Fig. 19)。CKI は複数の遺伝子を含むファミリーで、p21 もこのファミリーの一員である。正常細胞が飽和密度に達したとき、あるいは正常細胞を浮遊状態においたとき、p53 を介さずに p16 や p27 などの CKI の仲間が誘導されて増殖停止を導くが、これらの場合には老化細胞の表現型が現れる訳ではない。複数の経路にはストレスの種類によって共通部分と特異的な

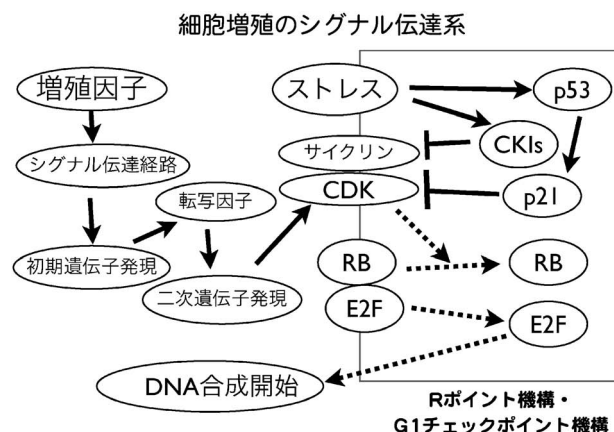


Fig. 19. Interruption by Cell Stress of Signal Transduction Process Leading to Proliferation

部分があり、相互のクロストークもある。

9-3. G1 期チェックポイント機構 このような増殖停止機構が、細胞周期のところで述べた R ポイントの機構でもあり、最近では G1 チェックポイントと呼ばれる。チェックポイントでは、細胞周期のある時点から先へ進行してよいかどうかチェックされ、不都合があると細胞周期をそこから先へ進ませない。G1 チェックポイント以外に、S 期内、G2 期内、M 期内には、それぞれ重要なチェックポイントがある。DNA 損傷に対しては主に p53 の経路が働いており (Fig. 20)、p21 を発現させて増殖を停止させるほか、DNA の損傷を修復する酵素の遺伝子群を活性化して修復を促進する働きや、損傷が大き過ぎたときには p53 タンパク質に別の修飾が起きて活性化され、アポトーシスを起こすための遺伝子が活性化されたりする。このように p53 は重要な働きをしていて、ゲノムの守護者 (guardian of genome) とも言われるが、ストレスとしてはゲノムの損傷だけに働いている訳ではない。

9-4. 細胞老化による増殖停止 繊維芽細胞では、老化するにつれて p21 の発現が急に増加し、やがて増殖停止する。⁵¹⁾ 通常、p21 の発現は p53 によって促進されることが多いが、細胞老化の場合にはそれだけではない。老化細胞で上昇するだけでなく、T 抗原遺伝子を導入して延命している細胞でも、継代とともに上昇する。T 抗原によって p53 タンパク質が不活性化される結果、p21 発現量は著しく低下するが、継代とともに次第に上昇する (Fig. 21)。⁵¹⁾ p53 を介する p21 の上昇は 3 分の 1 程度で

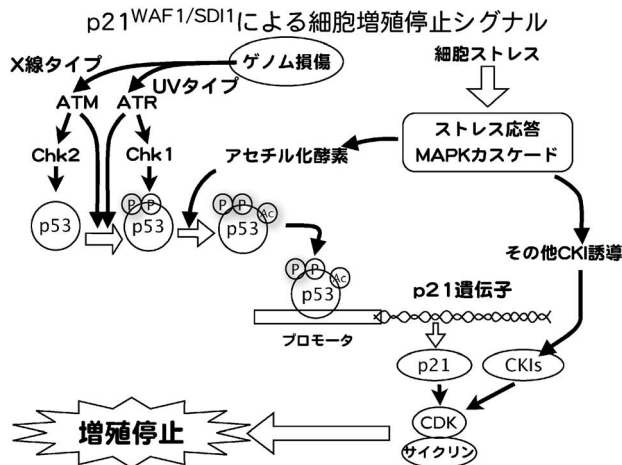


Fig. 20. Signal Transduction Process via p21 towards Growth-arrest

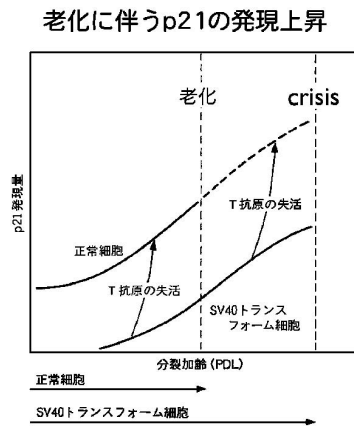


Fig. 21. Induction of p21 with Cellular Senescence

しかなく、3分の2は p53 の関与なしに p21 の上昇があることが分かった (Fig. 22). 実際、p53 をノックアウトした細胞でも、老化に伴う p21 の上昇が見られる (未発表). p21 遺伝子のプロモータ配列をレポータ遺伝子につないで細胞に導入しておくと、導入細胞が老化するにつれてレポータ遺伝子の発現が急上昇するが、プロモータ領域から p53 タンパク質の結合部位を除去してもレポータ遺伝子の発現は上昇する (未発表). これに対して、ゲノム損傷の際には、p53 変異細胞や、p53 結合部位を除去した変異プロモータでは、p21 は全く発現が上らない。

9.5. 細胞老化における p21 発現へのシグナル伝達経路 現在のところ、p53 経路以外の候補は、先ほども上げた MAP キナーゼカスケードである。

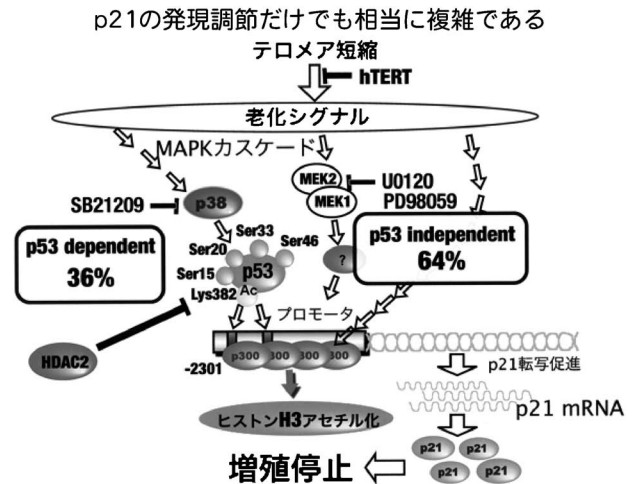


Fig. 22. Mechanism in p21 Expression with Cellular Senescence

ストレス応答 MAP キナーゼカスケードの阻害剤を老化細胞に処理すると、p21 の発現が抑制されるだけでなく、老化細胞が増殖を継続するようになる (未発表). 老化細胞の p21 遺伝子のプロモータ領域には、若い細胞に比べて HDAC (histone deacetylase) がたくさん結合していることが分かった (未発表) (Fig. 20). ヒストンを脱アセチル化することでクロマチン構造を緩め、転写を促進すると考えればこれは妥当なことである。

細胞老化に係わるシグナル伝達経路はほとんど未知である. p21 の発現調節にしばって話を進めたが、p21 タンパク質の分解も非常に大きな調節を受けていて、存在量の調節には合成も分解も重要である. テロメア短縮を検知するタンパク質は何から始まって、それを p21 量の調節にまで伝えるシグナル伝達経路のすべてが未知というほかはない。

10. テロメラーゼ

テロメア短縮によって、細胞は分裂寿命が決められていることが分かった. すべての細胞に分裂寿命があるなら、よほど長いテロメアを持っていたとしても子孫ほどテロメアが短くなりやがて生物は絶えてしまう. ほとんどの真核生物の細胞は、テロメアを延長する酵素テロメラーゼを持っている。

10.1. テロメラーゼとは テロメラーゼは、触媒作用を持つ酵素タンパク質サブユニット (hTERT : human telomerase reverse transcriptase) と、テロメア配列の鋳型となる RNA サブユニット (hTR : human telomerase RNA component) との複

合体である (Fig. 23). hTERT 遺伝子のクローニングは困難なものであったが, 当時東京工業大学 (現京大) におられた石川先生のグループが成功され, 共同研究の成果として *Nature Genetics* に報告することができた.⁷⁷⁾ この2つのサブユニットによる複合体だけでテロメラーゼ活性を示すので, 酵素反応には必要十分と考えられる. ただ, ほかにも会合しているタンパク質が知られ, 細胞からテロメラーゼを分画すると非常に大きな複合体として回収される (未発表) ので, 核内で反応する際には多くのタンパク質からなる複合体の形成が必要であると考えられる.

10-2. テロメラーゼの反応 テロメラーゼは, 鋳型 RNA を鋳型として, プライマーとなる DNA の 3'末端にテロメア DNA を延長する, 一種の逆転写酵素である. プライマーの塩基配列はテロメアでなくてもよい. 酵素反応としては 6 塩基を延長すると一休みしてまた 6 塩基を延長する. ただ, 6 塩基の延長毎に酵素が外れるかどうかには問題で, はずれずに鋳型あるいは延長した DNA が尺取り虫のように移動するという考え方もある. テロメラーゼが延長するのは, オーバーハングしている G テイルをさらに延長することで, これによって一本鎖が十分延長すれば, 逆側の鎖はこれを鋳型にして通常の DNA 合成が進行して, 二本鎖が合成されると考えられている.

10-3. テロメラーゼの分布 真核単細胞生物には例外なくテロメラーゼがある. テロメラーゼが十分に働くことでテロメアが保たれ, テロメア短縮による分裂寿命はない. 真核多細胞生物では, 生殖

系列の細胞群にはすべてテロメラーゼ活性がある. 植物の体細胞には, 調べられた限り大抵テロメラーゼ活性があり, 基本的に分裂寿命のない不死化細胞である. 株分けや, 挿し木など, 栄養生殖で何百年も植物体を増やせるケースが多いのは, 体細胞が不死化細胞であることが背景にある. 動物の場合でも, 体細胞がテロメラーゼ活性を持っているケースが多い. いわゆる下等動物だけでなく, 脊椎動物の魚類でもテロメラーゼ活性を持つものが多い. 哺乳類でも, 例えばマウスの繊維芽細胞には強いテロメラーゼ活性がある. 霊長類のチンパンジーでさえ, かなりの体細胞組織に活性がみられる.⁵³⁾ このように, 生物界全体としてはテロメラーゼがあるのが標準である.

10-4. ヒトの場合 生物界全体の中では哺乳類はかなり特殊であるが, 中でもヒトでは体細胞のほとんどにテロメラーゼ活性がないことが顕著である (Fig. 24). 生殖系列の細胞には強いテロメラーゼ活性があり, 発生過程では受精卵から始まって発生初期にはすべての細胞に強い活性がある不死化細胞と考えられる. ES 細胞 (胚性幹細胞) も不死化細胞である. 発生が進んで体細胞が分化すると, 組織によって時期の違いはあるがテロメラーゼ活性が消失し, それ以後は有限分裂寿命になる. 誕生後の体細胞にはほぼテロメラーゼ活性がない. ただ, 血球や表皮, 消化管上皮などの幹細胞やリンパ球に

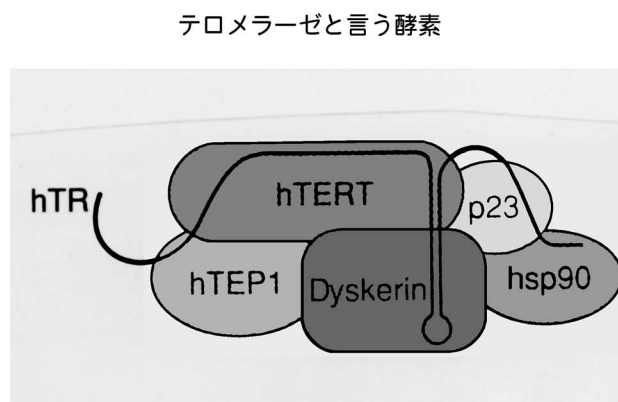


Fig. 23. Telomerase

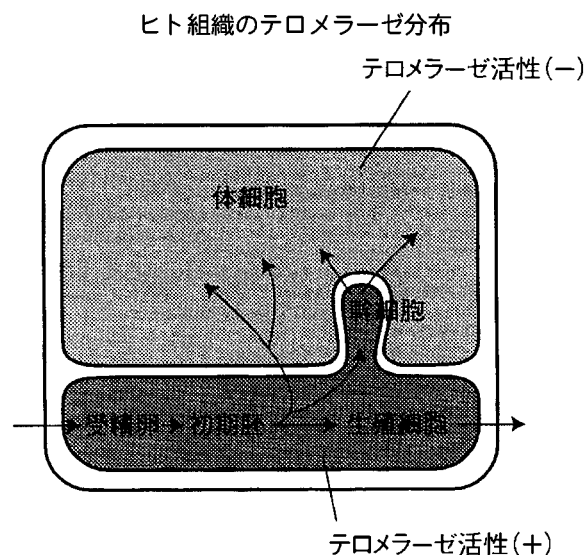


Fig. 24. Distribution of Telomerase in Various Human Tissues and Cells

は、成人でも弱いテロメラーゼ活性があり、⁷⁸⁾ 分裂ごとのテロメア短縮を減弱し一生を通じて多くの細胞を供給できる。ただテロメラーゼ活性は弱く、これらの細胞群も年齢とともにテロメアが短縮する。したがって、体幹細胞を含めてヒト体細胞は有限分裂寿命である。

10-5. テロメラーゼの発現調節 ヒトでは、テロメラーゼを発現していない体細胞でも、鋳型 RNA は発現しているのが普通で、テロメラーゼの発現は触媒サブユニット (hTERT) の発現量 (mRNA 量) で決まる。⁷⁷⁾ 転写後調節や、タンパク質レベルでの修飾などによる活性調節についての報告もあるがマイナーである。発現調節の 1 つは、分化形質のように、ある時期以降は金輪際発現しないタイプの調節である。発生とともに体細胞で抑制されるテロメラーゼの再発現は、滅多なことでは起きない。後述するように、癌細胞の多くは強く発現しているが、癌細胞と正常細胞とを細胞融合すると、融合細胞ではテロメラーゼの発現が抑制される。⁷⁹⁾ 発現しない表現型が優性である。しかも、特定の正常ヒト染色体を導入すると、癌細胞のテロメラーゼ発現が抑制されて、テロメアが短縮する。⁸⁰⁾ 発現していない体細胞では発現調節領域と遺伝子領域のメチル化が高いことが分かっている (未発表)。テロメラーゼ遺伝子のプロモータ領域をレポータ遺伝子につないで癌細胞に導入すると強く発現するが、正

常体細胞に導入したときは、導入遺伝子が宿主 DNA に組み込まれる前には発現がみられるものの、宿主 DNA に組み込まれたあとはレポータの発現が強く抑制される。組み込まれた後ではクロマチン構造による調節が働くことを示唆する (未発表)。

10-6. ヒト細胞は滅多なことでは不死化しない
ヒトの体細胞を培養系で不死化することは、非常に難しいまれな事象である。テロメラーゼがなかなか再発現しないからである。唯一の例外として、B リンパ球に癌ウイルスの一種である EB (Epstein-Barr) ウイルスを感染させると 100% 不死化すると信じられてきた。しかし、50 例のヒトからリンパ球を頂戴して EB ウイルスを感染させて培養し続けたところ、大部分は長短様々な分裂寿命を持っていて、不死化するのは 10% 程度に過ぎないことが分かった (Fig. 25)。^{60,68-70)} エイジーン研究所の杉本さんとの仕事である。リンパ球には元々弱いテロメラーゼ活性があるが、培養中に低下しテロメアも短縮する。しかし、不死化したリンパ球には、例外なく強いテロメラーゼ活性がありテロメア長は保たれる。ウエルナー患者さんの場合には、44 例の中で不死化したものは 1 例もなかった。⁶⁸⁾ 他の遺伝的な特徴を持つ患者さんの例では、11 例中 5 例が不死化するという高頻度で、不死化には遺伝的な背景が係わることを示しているが、詳細は不明である。

ヒトが生まれたとき、体細胞のテロメアが比較的

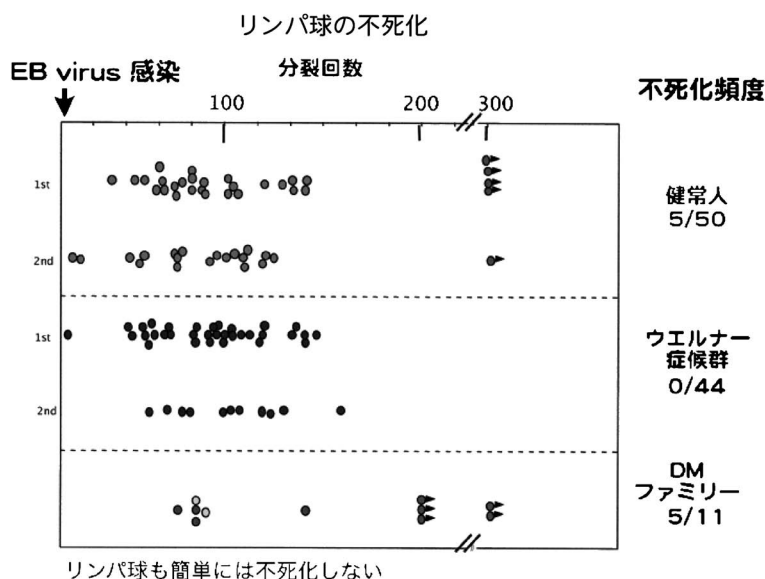


Fig. 25. Immortalization of Human B Lymphocytes after Infection with EB Virus

短く、テロメラーゼの発現がなく、一生の間に増殖限界近くまで短縮する可能性があることが、他の生物と違ってテロメア短縮が個体の老化に深く係わる原因である。他方、テロメラーゼの再発現が強く抑制されていることが、ヒトにおける癌の発生を極めて低く抑えている原因の1つである。

10-7. テロメラーゼ発現の量的調節 テロメラーゼが発現している細胞でも、増殖状況によって活性の上下がある。酵素活性の上下は、この場合でも hTERT の転写調節で行われる。また、細胞周期の中でも、S 期には活性が高く、ほかの期では活性が低い。⁸¹⁾ このような活性の上下に係わる転写調節は、クロマチン構造の変化ではなく、転写因子によって行われるようで、よく知られた Myc という転写因子は上皮系の細胞では hTERT の転写を上昇させる。テロメアを維持するテロメラーゼ活性の必要十分量は分かっていない。正常細胞にもごく微量のテロメラーゼ活性があって G テイルの短縮を遅くしているとの報告もあるが、詳細は省略する。

11. 細胞の不死化

ヒトの正常体細胞にテロメラーゼを発現させることは難しいが、適当なプロモータに接続した hTERT 遺伝子 (cDNA) を導入すれば、テロメラーゼを発現して不死化細胞になる。

11-1. 多くのヒト体細胞は不死化する ヒト体細胞に hTERT 遺伝子 (cDNA) を導入することで多くの細胞が不死化した。われわれが試みたものだけでも、胎児や成人の繊維芽細胞、血管内皮細胞

だけでなく、平滑筋細胞、肝実質細胞、肝間葉系細胞、アストロサイト、乳腺上皮細胞など多くの例がある。Figure 26 にはアストロサイト、⁸²⁾ Fig. 27 には肝実質細胞 (未発表) の例を示した。いずれの細胞も通常は 20 回位しか分裂できないが、hTERT を導入することで不死化する。

11-2. 不死化した細胞は正常表現型を示す 不死化細胞は、形態、増殖速度、増殖因子依存性などが若い正常細胞と同様であるだけでなく、本来の分化機能がよく維持される。肝実質細胞では、アルブミンの産生や薬物代謝酵素 CYP の発現など、多くの機能が維持されている (未発表)。多くの遺伝子の発現をみても、正常細胞とほとんど同じである。染色体の構成も正常である。一般に、分化した細胞を培養系に移すと、本来持っていた分化機能を比較的速やかに消失することが多いが、hTERT を導入した細胞では維持されることが多い。テロメア短縮によって老化しつつある細胞でも、hTERT 導入によって若返ることは前述した。癌細胞的な表現型は示さず、細胞増殖の接触阻止能、足場依存的増殖は保たれ、動物に移植しても造腫瘍性はみられない。

11-3. 不死化しない細胞もある ただ、あらゆる体細胞が不死化する訳ではない。上皮系細胞の中には hTERT 導入だけでは不死化しないものがある。われわれの実験でも、骨芽細胞は hTERT の導入で不死化できないだけでなく、分裂寿命の延長もみられなかった (未発表)。上皮系細胞の多くや骨芽細胞もカルチャーショックを受けるが、まず T

ヒトアストロサイトのhTERTによる不死化

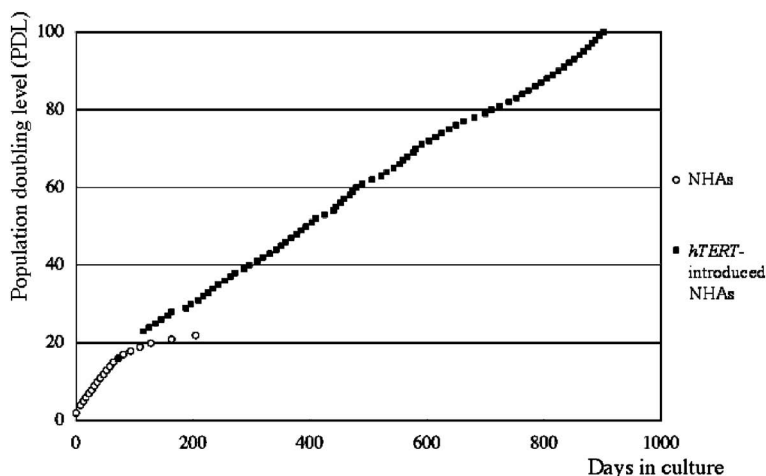


Fig. 26. Immortalization of Human Astrocytes after Transfection with hTERT

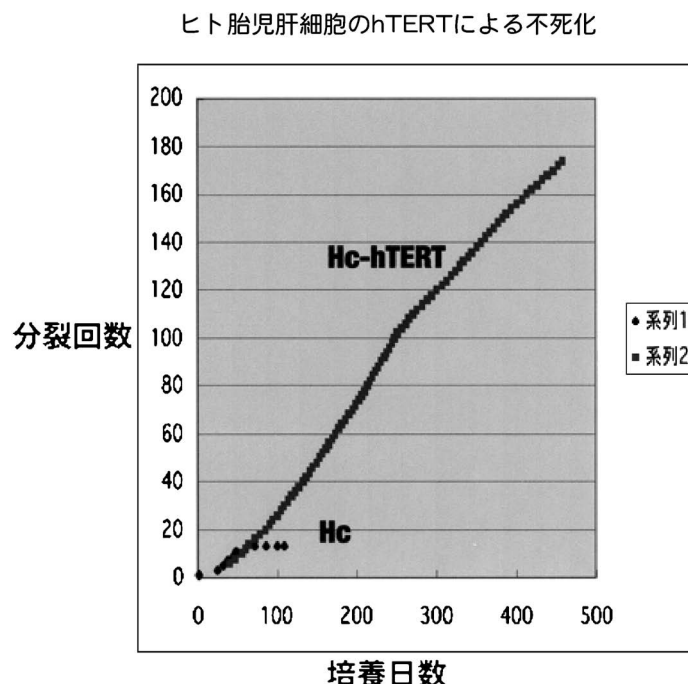


Fig. 27. Immortalization of Human Fetal Hepatocytes after Transfection with hTERT

抗原を導入してカルチャーショックによる増殖停止を乗り越え、なおかつ hTERT の導入によってテロメア短縮を阻止するという二重の処置によって例外なく不死化する。しかし骨芽細胞の場合はちょっと特殊である。培養条件の工夫によってカルチャーショックを回避し、60 代位まで増殖を継続するようにしても hTERT 導入によって不死化できなかった (未発表)。これらの細胞系では、増殖停止に際して p21 ではなく p16 の発現が著しく上昇することが分かった (未発表)。骨芽細胞の場合、Bmi1 遺伝子の導入によって p16 の働きを抑えると、hTERT の導入によって増殖を継続できるようになる (未発表)。増殖停止のしくみも、それを乗り越えさせるしくみも、細胞によってずいぶん違う訳で、一筋縄では行かないことが分かる。

11-4. 不死化細胞の利用 培養細胞は様々な目的で使われるが、体内にあったときの機能を維持することがなかなか難しい。組織から切り出して培養に移したばかりの初代培養細胞は異なった細胞腫の混ざりで、注目する細胞だけを純化させることも一般に増殖能力が乏しい (カルチャーショック) ので、困難である。しかも培養中に分化機能を失う。何度もヒトから採取するのは大変であるし、別のヒトから取った細胞では個人差があって、同じ性質を

示すとは限らないため、初代培養を使う研究者は苦労している。ある程度の正常な分化機能を維持した、均質でいくらかでも増殖する細胞集団として、不死化細胞が使える。正常細胞の機能解析にはもちろん有用だし、遺伝性疾患の解析にも有用で、毒性試験や有用物質の生産、ヒト感染ウイルスのワクチン生産等にも利用できる可能性がある。

11-5. ヒトへの応用は可能か 通常の体細胞にせよ、幹細胞にせよ、hTERT を導入した不死化細胞は、再生医療や移植医療や抗老化医療にも使えるだろうか。動物実験レベルでは、不死化した β 細胞の糖尿病ラットへの移植、急性・慢性肝疾患ラットへの不死化肝細胞移植による救命、骨や軟骨への移植治療など、様々な応用が試みられている。ただ、hTERT の導入によって不死化した細胞は、正常な表現型を維持しているとは言え、導入した遺伝子が宿主細胞のゲノム DNA に組み込まれている部分ではゲノムが変化している。これが悪い影響を与えない保証はない。もう 1 つは、テロメラーゼの発現は、後述するように細胞が癌化する際の必須の一步であることへの危惧である。したがって、ミリポアフィルターのような膜を介した人工肝臓に患者さんの血液を還流するとか、 β 細胞やホルモン産生細胞をミリポアチャンバーに封じて移植するなどは可

能であろうが、不死化細胞を直接に体内へ移植することは、患者さんの生死に直接係わる緊急時を除いては避けるべきではないかと思われる。

11-6. 内因性 hTERT の発現誘導 テロメラーゼ遺伝子を自在に発現させる薬があれば、必要なときだけ発現させて細胞を若返らせる可能性がある。自分自身の細胞を活発に再生する再生医療や抗老化医療にも使えるかもしれない (Fig. 28)。後述する毛嚢の例をヒントにして、頭に塗れば毛髪の再生にも効く可能性がある。hTERT のプロモータ領域にレポータ遺伝子をつないで癌細胞に導入すると発現するが、正常細胞に導入すると全く発現しない。正常細胞を元に検定細胞を作って、発現を誘導する薬を探せばよい。逆に、癌細胞で発現しなくなる薬は、テロメラーゼ発現を抑制する薬になる。実際にスクリーニングを開始している。

11-7. テロメラーゼはテロメア延長だけが機能か テロメラーゼはテロメアを延長するが、hTERT を導入した細胞の振る舞いは、それだけと言えないところがある。肝実質細胞やアストロサイトが hTERT 導入によって不死化することを紹介したが、これらの細胞は、通常なら 20 代前にカルチャーショックで増殖停止し、テロメア短縮はほとんどみられない。この場合、hTERT を導入するだけでカルチャーショックを免れて増殖を継続することは、テロメア延長では説明できない。培養に移した細胞はしばしば速やかに分化機能を消失するが、hTERT を導入した細胞では分化機能が維持されることが多い (未発表)。ウエルナー患者さんの細胞

では高頻度に染色体異常が起き、蓄積するが、hTERT で不死化した繊維芽細胞では染色体異常がほとんど蓄積しない (未発表)。hTERT 導入で不死化した繊維芽細胞は、そうでない細胞に比べて癌化に抵抗するという報告もある。細胞が正常性を維持する好都合な変化が起きているようにみえる。

11-8. 幹細胞への影響 ヒトの骨髄には多能性幹細胞があることが分かって、これを再生医療に応用することが臨床的にも行われるようになってきた。血管の再生には臨床で使われており、心筋や神経の再生にも試験的に使われ始めている。問題の 1 つは、多能性幹細胞はたくさん取れないことで、少数の細胞では移植しても効果がないことである。培養で増殖させてそれを移植できればよいが、培養系でなかなか増殖しないのと、増殖しても移植後の分化能が低下するなどの問題がある。このような幹細胞に hTERT を導入すると、培養系での増殖能がよくなり、分化する性質も維持されると言われる。とは言え、テロメラーゼによる幹細胞の挙動の変化が、テロメア延長によって現れるという説明は難しい。

11-9. 不思議なことは他にもある 2005 年の Nature に出た報告⁸³⁾によれば、TERT 遺伝子を導入したマウスの毛嚢細胞でテロメラーゼを恒常的に発現させると、毛がふさふさしたマウスができる。驚くべきことに、テロメア延長機能を失わせた変異 TERT 遺伝子を導入したときにも、正常遺伝子を導入したときと同じ効果が現れるという。この報告が正しければ、毛をふさふささせる働きはテロメラーゼ遺伝子のテロメア延長以外の機能によるものである。

12. 癌とテロメラーゼ

12-1. 細胞の癌化と不死化 細胞が癌化するとき、発癌物質、放射線、癌ウイルスと原因が何であれ、結局は遺伝子が変わることが分かったことは大きな進歩であった。これらの癌遺伝子は、増殖の異常を含めて癌細胞が癌らしい表現型を表すことに働く。培養系の発癌実験で、マウスの細胞は容易に癌化するのに、ヒトの細胞は極めて癌化し難いことは顕著であった。ヒト細胞に癌細胞らしい表現型を与えることは容易であっても、癌細胞らしい表現型と不死化とは全く独立の事象で、それが両方とも起きることが癌化には必須なのである (Fig. 29)。

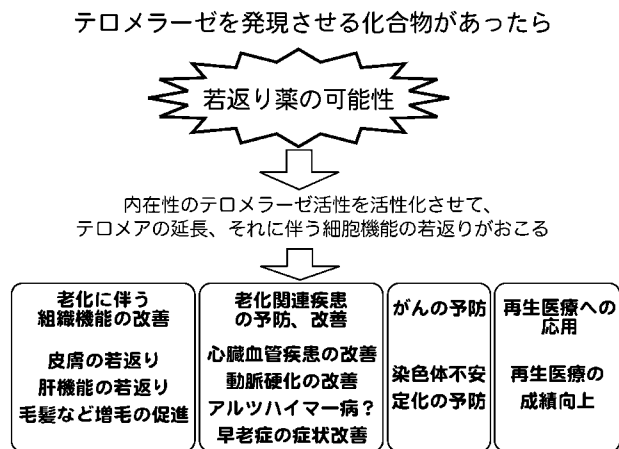


Fig. 28. Search for Compounds that may Induce Endogenous Telomerase Gene

テロメラーゼ活性が比較的容易に測定できるようになった 1995 年頃から、多くの臨床の先生方と一緒に癌組織でのテロメラーゼ活性やテロメラーゼ遺伝子産物の発現を調べた⁸⁴⁻¹⁰⁵⁾ところ、大部分の癌組織でテロメラーゼ活性陽性であった (Fig. 30)。

12-2. 肝癌におけるテロメラーゼ活性 高感度で定量的で、短時間に簡便に測定できる方法を開発し、^{106,107)} これを使って第一内科の先生方と肝臓について測定した結果を Fig. 31 に示す。正常な肝臓では活性が全く検出できない。慢性肝疾患では弱い活性が検出される例が半分以上あるが、炎症部位に浸潤しているリンパ球による弱い活性を検出しているものと思われる。非癌部では 1000 個に 1 個以下の値なので、これ以上の活性を癌細胞の存在によるものと仮定し、肝癌についてみると、高分化型、中分化型、低分化型と、悪くなるに従って陽性率も活性の強さも上昇することが分かる。高分化型は、ほとんどが 1 cm 以下で特徴的な癌マーカーの発現も 10 から 30% しか検出されないレベルであることを考えると、テロメラーゼ陽性率は高いと評価できる。さらに注目されることは、いわゆる前癌病変とされるノジュールでもかなりの頻度で活性が陽性に出ることである。これらについては、直ちに処置するか経過観察するかは臨床医の判断であるが、いずれにせよ他の診断マーカーに比較して、非常に早期から情報が得られることは大きな進歩である。

12-3. 不死化した細胞だけが癌になれる 体内で癌として検出できるまでには、多くの場合、癌細胞への最初の変異が生じてから 20 年、30 年という年月を経ていると考えられている。少数の癌細胞が増殖しつつ死滅しつつ変異を重ねて臨床的に検出できる癌組織にまで成長するためには、不死化しなければならない。非常に初期の癌でもテロメラーゼ活性陽性なのはそれを示している。初期の癌で検出できることは臨床応用として重要であるが、癌の発生機序を考える上でも大きな貢献であった。悪性化の進行とともにテロメラーゼ活性が上昇する場合が多いが、細胞 1 個当たりの活性が上がるためか、陽性細胞の頻度が上がるためなのかは簡単には分からなかった。当時、東京工業大学におられた石川先生がお作りになったテロメラーゼの抗体を使って免疫染色したところ、主に陽性細胞の頻度が上がるためであることが分かった。¹⁰⁰⁾ なお、正常な肝細胞は

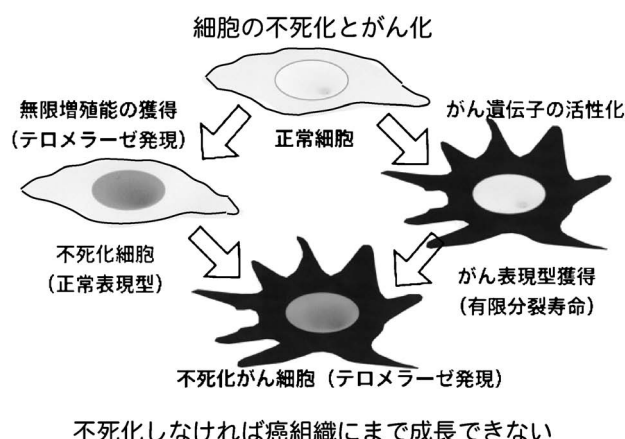


Fig. 29. Tumor Cell Phenotype and Immortalized Phenotype

ヒト癌組織におけるテロメラーゼ活性

癌組織	テロメラーゼ陽性率
肝臓	85%
大腸	92%
胃	85%
肺	80%
脳	85%
食道	95%

がん診断法として利用できる可能性

Fig. 30. Telomerase Activity in Various Human Tumor Tissues

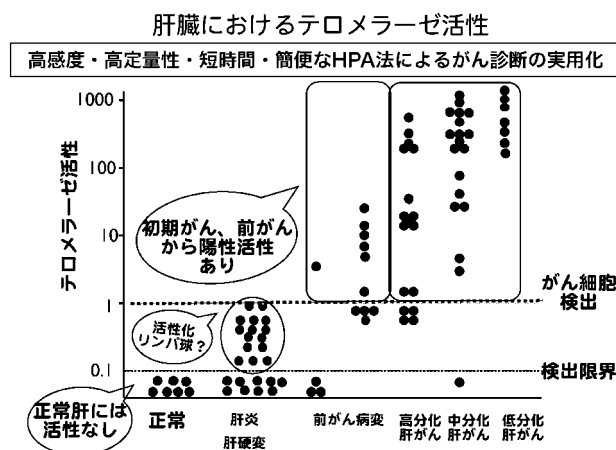


Fig. 31. Telomerase Activity in Human Liver

ほとんど染まらなかったが、グリソン鞘に近い部分に少数の染色される細胞があった。肝幹細胞の可能性として興味深い。

12-4. その他の癌組織 実にたくさんの癌組織について測定したが、強い関心のあった胃癌や大腸癌では、肝臓はどうも行かなかった。1つの問題はテロメラーゼ活性測定を妨害する強い阻害因子の存在で、テロメラーゼの鋳型 RNA を分解することが分かり、RNase 阻害剤の添加で解決した。⁹³⁾ 癌診断法としての問題は、正常な組織に幹細胞があって、弱いながらもテロメラーゼ活性があることである。大部分の例で正常部位に比べて癌部位の活性が高いのではあるが、癌組織ととの活性変化が連続的で、癌と非癌ととの間のテロメラーゼ活性に明確な線を引くことができなかった。なお、正常な大腸組織で陰窩の部分だけを単離して上部と下部に分けると、幹細胞のある下部にかなり強い活性がみられた。⁹⁶⁾ ただ、テロメラーゼタンパク質を免疫染色するとかかなり上部の細胞にも検出でき、上部にはタンパク質はあっても活性がなくなるものと思われた。

転移のために血中を流れる少数の癌細胞を検出できないか、尿から膀胱癌の細胞を検出できないかなど、多くの試みもしたが、安定な結果は得られなかった。十二指腸にカテーテルを入れて、膵臓癌の細胞を採取して測定することは、比較的安定に成功した。¹⁰⁴⁾ いずれにせよ、組織によっては非常に早期から検出できるよい方法と言えるものの、細胞を採取しない限り測定できないことは大きな制約である。

12-5. テロメラーゼ陰性の癌細胞 表から分かるように、一部の癌組織はテロメラーゼ陰性である。これらの癌細胞も実は不死化していると考えられる。培養系でもテロメラーゼ活性のない不死化細胞があるが、テロメア配列検出プローブで染まる大小様々なスポットが、染色体外にみえることが分かった。¹⁰⁸⁾ ここには、直鎖状のテロメア DNA 断片が多くのタンパク質とともに集合体を形成し、単離できる。¹⁰⁹⁾ この短い染色体外テロメア DNA との間で頻繁に組み替えを起こすことで、染色体末端のテロメアが延長・維持されると考えられ、ALT (alternative lengthening of telomere repeats) と呼ぶ。テロメラーゼ陰性細胞のテロメア長をサザン法で調べると非常に長く (20 kbp 以上) みえるが、染色体末端のテロメアを *in situ* 染色するとシグナルは非常に弱く、¹⁰⁸⁾ 明らかに矛盾する。サザン法で長くみえるのは、DNA 精製の過程で、染色体 DNA のテロメア末端と染色体外テロメア配列との間で部分

的二本鎖を形成し、絡まった大きな DNA として電気泳動されるためと分かった。^{65,110)}

12-6. テロメラーゼと制癌剤 正常細胞が癌細胞になるまでには様々な変化が必要である。正常細胞なら当然アポトーシスを起こすような場合でも、癌細胞はアポトーシス抵抗性を獲得していて、簡単には死なない。老化細胞で発現上昇することを見つけた、インターフェロンで誘導される遺伝子の1つ⁵⁹⁾が、アポトーシスへの抵抗性を与え癌細胞で発現が高いことが分かった。¹¹¹⁾ 新たな制癌剤のターゲットは、ほかにも様々にあり得るであろう。多くの従来型の制癌剤が増殖阻害剤であり、増殖の旺盛な正常細胞も殺すために強い副作用があり、新たなターゲットが模索されている。癌組織の大部分にはテロメラーゼ活性があり、正常体細胞の大部分にはないことから、当初、多くの製薬企業がテロメラーゼ阻害剤の開発に参入したが、現在ではフェーズ II まで行ったごく一部を除いて撤退している。テロメラーゼを阻害しても、癌細胞が増殖を続けてテロメアが短縮するのを待たなければならないことが当初から大きな問題であった。siRNA などによってテロメラーゼを抑制しても、テロメア短縮の限界まで増殖を続けてから死ぬ (未発表)。これでは役に立たない。

12-7. 新しい制癌剤 テロメア配列には G 塩基が並んでいて、DNA は四重鎖を形成できる。鎖の間に入り込むことによって、四重鎖形成を安定化するテロメスタチンという抗生物質がある。東大分生研の新家先生の発見である。培養系で癌細胞に与えると1週間以内に死滅するが、正常細胞では同じ濃度でほとんど影響がない (Fig. 32)。¹¹²⁾ テロメスタチンを与えられた癌細胞では強いアポトーシスが起きている。テロメア全体のサイズには短縮がみられないが、G テイルが著しく短縮している (Fig. 33)。テロメアループの糊付けタンパク質であった TRF2 は、テロメアから外れる (Fig. 34)。テロメア配列への TRF1 タンパク質の結合は少し低下するだけである。蛍光染色でみても、テロメア部分に TRF1 は局在しているが、TRF2 はほとんどみえなくなる。テロメスタチンはテロメアの G テイルを短縮させ、糊付けタンパク質 TRF2 が結合できなくなり、テロメアループが崩壊し、その結果、癌細胞が死ぬ、というプロセスが考えられる (Fig. 35)。

Telomestatin の選択的・短期的殺癌細胞効果

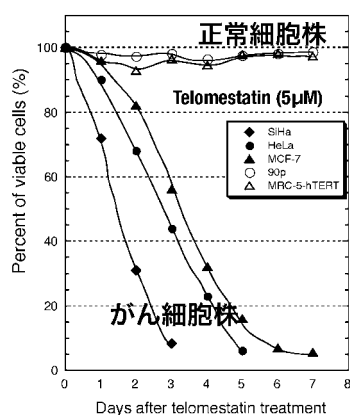


Fig. 32. Telomestatin Kills Tumor Cells Immediately, Selectively, and Effectively

Telomestatinは癌細胞のG-tailを短縮させる

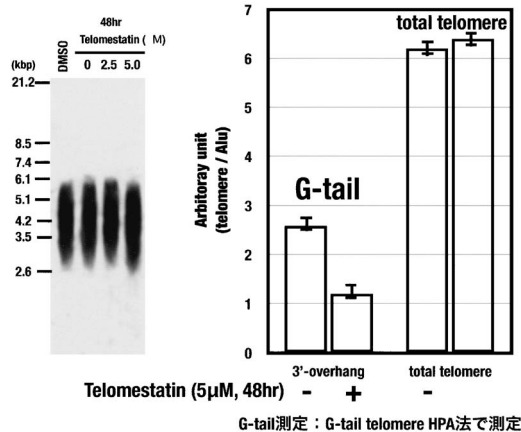


Fig. 33. Telomestatin Shortens Telomere G-tail

Telomestatin はテロメアから TRF2 をはずす

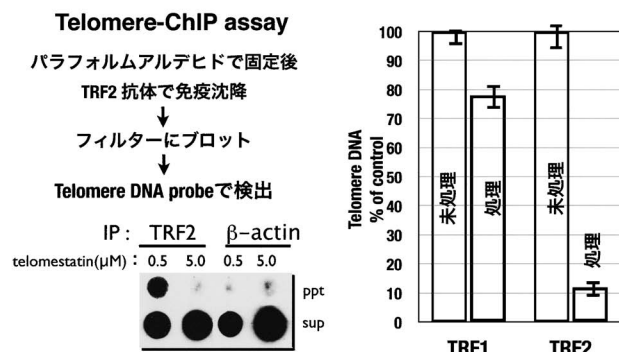


Fig. 34. Telomestatin Removes TRF2 from Telomere DNA

telomestatinはGテイルを破壊

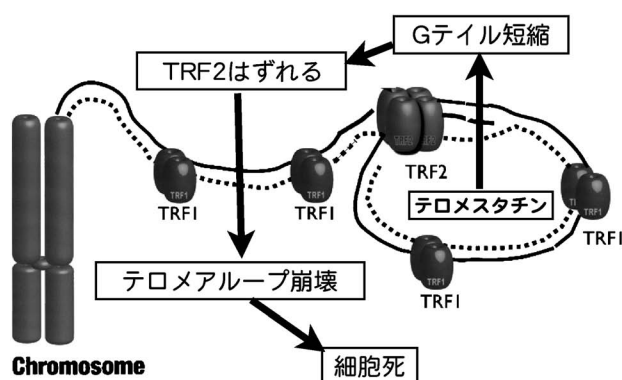


Fig. 35. Telomestatin Destroys Telomere t-loop and Kills Tumor Cells

ただ、癌細胞と正常細胞に対する選択毒性の機序は現在のところ説明がつかない。正常細胞にhTERT遺伝子を導入して不死化した細胞もテロメスタチンで死なないので、テロメラーゼの有無と言う単純なことではない。テロメラーゼが働くようになった癌細胞では、テロメア部分のクロマチン構造が正常細胞とは異なっているのではないかと想像している。テロメラーゼの活性阻害ではない新たな有効な制癌ターゲットを示したという点で、大きな進歩と考えている。

13. おわりに

細胞周期の仕事から細胞老化まで、ほぼ一貫して『細胞増殖のしくみ』の周辺にいた。仕事はいつもそうであるように、これで終わりと言うことはなく、進むにつれて益々分からないことがみえてくる。実際、多くのテーマが進行中であることは、今まで紹介した中にも垣間みえる。とは言え、一応これで一区切りと言うことで、更なる展開は次の世代に任せようと思っている。

謝辞

広島大学の28年間のうち、始めの10年間は石橋教授の助教授としてのびのび仕事をさせていただいた。ただ、その時期にもそのあとで教授になってからも、一緒に仕事をする教員のポストがないという状況が長く続いた。赴任した次の年から定年まで、200から400人もの利用者を抱えた劣悪な医歯薬学RI共同施設を切り盛りしなければならず、研究は著しく制約された。助手席がいただけただ頃からは、学部や研究科の管理職の仕事に忙殺され

るようになった。そんな訳で、研究面で不本意なところはあがあるが、多くの先輩や研究仲間・同僚を始め、研究室の教職員、学生のご援助と献身とに恵まれ、全体として振り返ればそれなりに面白く仕事を展開できたと思っている。関係各位に心からお礼を申し上げる。学生や院生の教育についても力を入れ、この間の経験や講義録を元に実験手引書¹¹³⁾や教科書¹¹⁴⁻¹¹⁸⁾その他¹¹⁹⁾を書いたが、いずれも非常な好評を持って世に迎えられたことは、予想外ではなかったとは言え望外の幸せであった。

本稿と同趣旨の原稿を、『広島大学医学雑誌』からも依頼されている。趣旨からして内容的にほとんど同一にならざるを得ないが、両雑誌の読者はほとんどオーバーラップしておらず、お許しいただきたい。

REFERENCES

- 1) Ide T., Nakane M., Anzai K., Andoh T., *Nature* (London), **258**, 445-447 (1975).
- 2) Ide T., Ninomiya J., Ishibashi S., *Exp. Cell Res.*, **150**, 60-67 (1984).
- 3) Ninomiya-Tsuji J., Goto Y., Ishibashi S., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **165**, 191-198 (1986).
- 4) Ide T., Ninomiya-Tsuji J., Ferrari S., Philiponis V., Baserga R., *Biochemistry*, **25**, 7041-7046 (1986).
- 5) Ninomiya-Tsuji J., Ishibashi S., Ide T., *Cancer Res.*, **47**, 6028-6032 (1987).
- 6) Ninomiya-Tsuji J., Nakahara Y., Ito C., Akiyama T., Ishibashi S., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **12**, 421-432 (1987).
- 7) Ninomiya-Tsuji J., Goto Y., Ishibashi S., Shiroki K., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **171**, 509-512 (1987).
- 8) Ninomiya-Tsuji J., Nakahara Y., Ito C., Akiyama T., Ishibashi S., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **171**, 86-93 (1987).
- 9) Tai Y. Y., Goto Y., Ninomiya-Tsuji J., Kameoka Y., Ishibashi S., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **179**, 50-57 (1988).
- 10) Tai Y. Y., Ninomiya-Tsuji J., Furuoku K., Ogawa N., Ishibashi S., Shiroki K., Segawa K., Tsuchida N., Shibuya M., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **15**, 385-391 (1990).
- 11) Hatakeyama Y., Tsuyama N., Sasaki T., Ide T., *Tissue Cult. Res. Comm.*, **14**, 141-145 (1995).
- 12) Ide T., *Seikagaku*, **57**, 255-295 (1985).
- 13) Ide T., "Saibou-zoushoku no Shikumi," Kyouritsu Shuppan, Tokyo, 1989, pp. 1-148.
- 14) Tanonaka K., Ninomiya-Tsuji J., Ishibashi S., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **165**, 337-344 (1986).
- 15) Takasuka T., Ninomiya-Tsuji J., Sakayama M., Ishibashi S., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **15**, 39-45 (1990).
- 16) Takasuka T., Sakayama M., Ishibashi S., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **15**, 47-52 (1990).
- 17) Miyake E., Takasuka T., Sakayama M., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **16**, 315-321 (1991).
- 18) Takasuka T., Sakayama M., Miyake E., Ishibashi S., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **16**, 81-85 (1991).
- 19) Sasaki T., Kameoka Y., Kamase S., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **214**, 209-214 (1994).
- 20) Ueohzono T., Tanida-Miyake E., Kato N., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **19**, 341-348 (1994).
- 21) Kashima N., Ueohzono T., Fornace A. J., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **217**, 324-328 (1995).
- 22) Ohta T., Takasuka T., Ishibashi S., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **10**, 37-46 (1985).
- 23) Takasuka T., Ishibashi S., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **12**, 559-565 (1987).
- 24) Miura M., Ninomiya-Tsuji J., Tsuji Y., Ishibashi S., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **173**, 294-298 (1987).
- 25) Takasuka T., Ishibashi S., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **171**, 287-293 (1987).
- 26) Tsuji K., Ueno A., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **16**, 73-80 (1991).
- 27) Tsuji K., Ueno A., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **17**, 139-144 (1992).
- 28) Fukami J., Tsuji K., Ueno A., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **216**, 107-112 (1995).
- 29) Takasuka T., Ishibashi S., Ide T., *Biochim. Biophys. Acta*, **909**, 161-164 (1987).
- 30) Ide T., Anzai K., Andoh T., *Virology*, **72**, 480-485 (1976).
- 31) Whelley S., Ide T., Baserga R., *Virology*, **88**, 82-91 (1978).
- 32) Ide T., Whelley S., Baserga R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3189-3192 (1977).
- 33) Baserga R., Ide T., Whelley S., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **XLII**, 685-691

- (1978).
- 34) Ide T., Ohta T., Shinohara Y., Ishibashi S., *Nature*, **278**, 264–265 (1979).
 - 35) Tsuji Y., Ide T., Ishibashi S., *Exp. Cell Res.*, **144**, 165–169 (1983).
 - 36) Ide T., Tsuji Y., Ishibashi S., Mitsui Y., *Exp. Cell Res.*, **143**, 343–349 (1983).
 - 37) Ide T., Tsuji Y., Nakashima T., Ishibashi S., *Exp. Cell Res.*, **150**, 321–328 (1984).
 - 38) Tsuyama N., Miura M., Kitahira M., Ishibashi S., Ide T., *Cell Struct. Funct.*, **16**, 55–62 (1991).
 - 39) Hayflick L., Moorehead P. S., *Exp. Cell Res.*, **25**, 585–621 (1961).
 - 40) Tsuji Y., Ide T., Ishibashi S., Nishikawa K., *Mech. Ageing Dev.*, **27**, 219–232 (1984).
 - 41) Ide T., Tsuji Y., Ishibashi S., *Mech. Ageing Dev.*, **25**, 227–235 (1984).
 - 42) Kihara F., Tsuji Y., Miura M., Ishibashi S., Ide T., *Mech. Ageing Dev.*, **37**, 103–117 (1986).
 - 43) Kihara F., Ninomiya-Tsuji J., Ishibashi S., Ide T., *Mech. Ageing Dev.*, **37**, 27–40 (1986).
 - 44) Tsuji Y., Ishibashi S., Ide T., *Mech. Ageing Dev.*, **36**, 155–160 (1986).
 - 45) Hara E., Yamaguchi T., Tahara H., Tsuyama N., Tsurui H., Ide T., Oda K., *Anal. Biochem.*, **214**, 58–64 (1993).
 - 46) Tahara H., Hara E., Tsuyama N., Oda K., Ide T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 1108–1112 (1994).
 - 47) Hara E., Yamaguchi T., Nojima H., Ide T., Campisi J., Okayama H., Oda K., *J. Biol. Chem.*, **269**, 2139–2145 (1994).
 - 48) Wadhwa R., Mitsui Y., Ide T., Kaul S. C., *Int. J. Oncol.*, **7**, 69–74 (1995).
 - 49) Fujii M., Ide T., Wadhwa R., Tahara H., Kaul S. C., Mitsui Y., Ogata T., Oishi M., Ayusawa D., *Oncogene*, **11**, 627–634 (1995).
 - 50) Fukami J., Anno K., Ueda K., Takahashi T., Takahashi T., Ide T., *Mech. Ageing Dev.*, **81**, 139–157 (1995).
 - 51) Tahara H., Sato E., Noda A., Ide T., *Oncogene*, **10**, 835–840 (1995).
 - 52) Ito Y., Ide T., Mitsui Y., *Mech. Ageing Dev.*, **105**, 105–114 (1998).
 - 53) Kakuo S., Asaoka K., Ide T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 308–314 (1999).
 - 54) Li H.-C., Tahara H., Tsuyama N., Ide T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 70–74 (1998).
 - 55) Tahara H., Kamada K., Sato E., Tsuyama N., Kim J. K., Hara E., Oda K., Ide T., *Oncogene*, **11**, 1125–1132 (1995).
 - 56) Ide T., Tahara H., *Tanpakushitsu Kakusan Kousho*, **42**, 1351–1374 (1997).
 - 57) Ide T., “Saibou no Rouka to Hushika,” Yodosha, Tokyo, 1994, pp. 1–180.
 - 58) Tahara H., Kusunoki M., Yamanaka Y., Matsumura S., Ide T., *Nat. Methods*, **2**, 1–3 (2005).
 - 59) Vaziri H., Schachter F., Uchida I., Wei L., Zhu X., Effros R., Cohen D., Harley C. B., *Am. J. Hum. Genet.*, **52**, 661–667 (1993).
 - 60) Nakamura Y., Hirose M., Matsuo H., Tsuyama N., Kamisango K., Ide T., *Clin. Chem.*, **45**, 1718–1724 (1999).
 - 61) Aikata H., Takaishi H., Kawakami Y., Takahashi S., Kitamoto M., Nakanishi T., Nakamura Y., Shimamoto F., Kajiya G., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **256**, 578–582 (2000).
 - 62) Cawthon R. M., Smith K. R., O’Brien E., Sivatchenko A., Kerber R. A., *Lancet*, **361**, 393–395 (2003).
 - 63) Kanzaki Y., Onoue F., Ishikawa F., Ide T., *Exp. Cell Res.*, **279**, 321–329 (2002).
 - 64) Kanzaki Y., Onoue F., Sakurai H., Ide T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 150–154 (2003).
 - 65) Ohsugi I., Tokutake Y., Suzuki N., Ide T., Sugimoto M., Furuichi Y., *Nucleic. Acids Res.*, **28**, 3642–3648 (2000).
 - 66) Kataoka H., Tahara H., Watanabe T., Sugawara M., Ide T., Goto M., Furuichi Y., Sugimoto M., *Differentiation*, **62**, 203–211 (1997).
 - 67) Tahara H., Tokutake Y., Maeda S., Kataoka H., Watanabe T., Satoh M., Matsumoto T., Sugawara M., Ide T., Goto M., Furuichi Y., Sugimoto M., *Oncogene*, **15**, 1911–1920 (1997).
 - 68) Sugimoto M., Tahara H., Okubo M., Kobayashi T., Goto M., Ide T., Furuichi Y., *Cancer Genet. Cytogenet.*, **152**, 95–100 (2004).
 - 69) Sugimoto M., Ide T., Goto M., Furuichi Y., *J. Virol.*, **73**, 9690–9691 (1999).

- 70) Sugimoto M., Ide T., Goto M., Furuichi Y., *Mech. Ageing Dev.*, **107**, 51–60 (1999).
- 71) Kawabe T., Tsuyama N., Kitao S., Nishikawa K., Shimamoto A., Shiratori M., Matsumoto T., Anno K., Sato T., Mitsui Y., Seki M., Enomoto T., Goto M., Ellis N. A., Ide T., Furuichi Y., Sugimoto M., *Oncogene*, **19**, 4764–4772 (2000).
- 72) Okubo M., Tsurukubo Y., Higaki T., Kawabe T., Goto M., Murase T., Ide T., Furuichi Y., Sugimoto M., *Cancer Genet. Cytogenet.*, **129**, 30–34 (2001).
- 73) Takahashi T., Kawabe T., Okazaki Y., Itoh C., Noda K., Tajima M., Sato M., Goto M., Mitsui Y., Tahara H., Ide T., Furuichi Y., Sugimoto M., *DNA Cell Biol.*, **22**, 727–735 (2003).
- 74) Sato M., Yasuda T., Higaki T., Goto M., Tanuma S., Ide T., Furuichi Y., Sugimoto M., *Cell Struct. Funct.*, **28**, 61–70 (2003).
- 75) Sugimoto M., Tahara H., Ide T., Furuichi F., *Cancer Res.*, **64**, 3361–3364 (2004).
- 76) Nakamura A., Matsuura S., Tauchi H., Hanada R., Ohashi H., Hasegawa T., Honda K., Masuno M., Imaizumi K., Sugita K., Ide T., Komatsu K., *J. Hum. Genet.*, **44**, 48–51 (1999).
- 77) Nakayama J., Tahara H., Tahara E., Saito M., Ito K., Nakamura H., Nakanishi T., Tahara E., Ide T., Ishikawa F., *Nat. Genet.*, **18**, 65–68 (1998).
- 78) Yasumoto S., Kunimura C., Kikuchi K., Tahara H., Ohji H., Yamamoto H., Ide T., Utakoji T., *Oncogene*, **13**, 433–439 (1996).
- 79) Ishii Y., Tsuyama N., Maeda S., Tahara H., Ide T., *Mech. Ageing Dev.*, **110**, 175–193 (1999).
- 80) Ohmura H., Tahara H., Suzuki M., Ide T., Shimizu M., Yoshida M. A., Tahara E., Shay J. W., Barrett J. C., Oshimura M., *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 899–904 (1995).
- 81) Shimada Y., Nakano M., Kanda N., Murakami-Murohushi K., Kim J. K., Ide T., Murohushi H., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **232**, 492–496 (1997).
- 82) Yoshida K., Yoshizato A., Kakuo S., Tahara H., Ide T., *Tissue Cult. Res. Commun.*, **23**, 59–69 (2004).
- 83) Sarin K. Y., Cheung P., Gilison D., Lee E., Tennen R. I., Wang E., Artandi M. K., Oro A. E., Artandi S. E., *Nature*, **436**, 1048–1052 (2005).
- 84) Tahara H., Kuniyasu H., Yokozaki H., Yasui W., Shay J. W., Ide T., Tahara E., *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1245–1251 (1995).
- 85) Tahara H., Nakanishi T., Kitamoto M., Nakashio R., Shay J. W., Tahara E., Kajiyama G., Ide T., *Cancer Res.*, **55**, 2734–2736 (1995).
- 86) Sugino T., Yoshida K., Bolodeoku J., Tahara H., Buley I., Menek S., Wells C., Goodison S., Ide T., Suzuki T., Tahara E., Tarin D., *Int. J. Cancer*, **69**, 301–306 (1996).
- 87) Ide T., Tahara H., Nakashio R., Kitamoto M., Nakanishi T., Kajiyama G., *Hum. Cell*, **9**, 283–286 (1996).
- 88) Nakashio R., Kitamoto M., Tahara H., Nakanishi T., Ide T., Kajiyama G., *Int. J. Cancer*, **74**, 141–147 (1997).
- 89) Murakami J., Nagai N., Ohama K., Tahara H., Ide T., *Cancer*, **80**, 1085–1092 (1997).
- 90) Nakashio R., Kitamoto R., Nakanishi T., Tahara H., Ide T., Asahara T., Kajiyama G., *Int. J. Oncol.*, **11**, 139–143 (1997).
- 91) Yasui W., Tahara H., Tahara E., Fujimoto J., Nakayama J.-I., Ishikawa F., Ide T., Tahara E., *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1187–1194 (1998).
- 92) Hiyama T., Yokozaki H., Kitadai Y., Tahara E., Tahara H., Ide T., Haruma K., Yasui W., Kajiyama G., Tahara E., *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1099–1103 (1998).
- 93) Nakamura Y., Tahara E., Tahara H., Yasui W., Tahara E., Ide T., *Mol. Carcinog.*, **26**, 312–320 (1999).
- 94) Harada K., Kurisu K., Arita K., Sadamoto T., Tahara H., Tahara E., Ide T., Uozumi T., *Cancer*, **86**, 1050–1055 (1999).
- 95) Yasui W., Tahara E., Tahara H., Fujimoto J., Naka K., Nakayama J.-I., Ishikawa F., Ide T., Tahara E., *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 589–595 (1999).
- 96) Tahara H., Yasui W., Tahara E., Fujimoto J., Ito K., Tamai K., Nakayama J.-I., Ishikawa F., Tahara E., Ide T., *Oncogene*, **18**, 1561–1567 (1999).
- 97) Kitamoto M., Ide T., *Cancer*, **85**, 245–246 (1999).

- 98) Harada K., Kurisu K., Sadatomo T., Tahara H., Tahara E., Ide T., Tahara E., *J. Neurooncol.*, **47**, 39–46 (2000).
- 99) Harada K., Kurisu K., Tahara H., Tahara E., Ide T., Tahara E., *J. Neurosurg.*, **93**, 618–625 (2000).
- 100) Kawakami Y., Kitamoto M., Nakanishi T., Yasui W., Tahara E., Nakayama J.-I., Ishikawa F., Tahara H., Ide T., Kajiyama G., *Oncogene*, **19**, 3888–3893 (2000).
- 101) Takaishi H., Kitamoto M., Takahashi S., Aikata H., Kawakami Y., Nakashio R., Nakanishi T., Nakamura Y., Shimamoto F., Asahara K., Kajiyama G., Ide T., *Cancer*, **88**, 312–317 (2000).
- 102) Takahashi S., Kitamoto M., Takaishi H., Aikata H., Kawakami Y., Nakanishi T., Shimamoto F., Tahara E., Tahara H., Ide T., Kajiyama G., *Eur. J. Cancer.*, **36**, 496–502 (2000).
- 103) Yano Y., Yoshida K., Osaki A., Toge T., Tahara H., Ide T., Yasui W., *Anticancer Res.*, **22**, 4101–4108 (2002).
- 104) Ohuchida K., Mizumoto K., Ishikawa N., Sato N., Nagai E., Takaishi H., Ide T., Tanaka M., *Cancer*, **101**, 2309–2317 (2004).
- 105) Kitamoto M., Takaishi H., Takahashi S., Aikata H., Nakanishi T., Chayama K., Tahara H., Ide T., *Res. Devel. Cancer*, **6**, 191–210 (2004).
- 106) Hirose M., Abe-Hashimoto J., Ogura K., Tahara H., Ide T., Yoshimura T., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **123**, 337–344 (1997).
- 107) Hirose M., Abe-Hashimoto J., Tahara H., Ide T., Yoshimura T., *Clin. Chem.*, **44**, 2446–2452 (1998).
- 108) Tokutake K., Takehisa M., Watanabe T., Maeda S., Tahara H., Sakamoto S., Niida H., Sugimoto M., Ide T., Furuichi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 765–772 (1998).
- 109) Tachibana N., Ide T., *Tissue Cult. Res. Commun.*, **22**, 89–100 (2003).
- 110) Higaki T., Watanabe T., Tamatomi I., Tahara H., Sugimoto M., Furuichi Y., Ide T., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1932–1938 (2004).
- 111) Tahara Jr. E., Tahara H., Kanno M., Naka K., Takeda Y., Ishihara H., Yasui W., Barrett J. C., Ide T., Tahara E., *Cancer Immunol. Immunother.*, **54**, 729–740 (2005).
- 112) Tahara H., Shin-ya K., Seimiya H., Yamada H., Matsumura S., Tsuruo T., Ide T., *Oncogene*, **25**, 1955–1966 (2006).
- 113) Ide T., “Baiyousaibou Nyuumonn Note,” Yodosha, Tokyo, 1999, pp. 1–163.
- 114) Ide T., “Bunnshiseibutsugaku Kougichuukei: Part 1,” Yodosha, Tokyo, 2002, pp. 1–259.
- 115) Ide T., “Bunnshiseibutsugaku Kougichuukei: Part 2,” Yodosha, Tokyo, 2003, pp. 1–161.
- 116) Ide T., “Bunnshiseibutsugaku Kougichuukei: Part 3,” Yodosha, Tokyo, 2003, pp. 1–209.
- 117) Ide T., “Bunnshiseibutsugaku Kougichuukei: Part 0–1,” Yodosha, Tokyo, 2005, pp. 1–233.
- 118) Ide T., “Bunnshiseibutsugaku Kougichuukei: Part 0–2,” Yodosha, Tokyo, 2006, pp. 234–489.
- 119) Ide T., “Saibou no Rouka,” Scienc Co., Tokyo, 2006, pp. 1–179.