テロメアbiologyからみた発癌メカニズムの解明と癌治療法への応用

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 京, 哲
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4493

金沢大学十全医学会雑誌　第113巻　第3･4合併号　82－87 (2004)

【総　説】

第一回　金沢大学十全医学賞受賞論文

論　文　「テロメアbiologyからみた発癌メカニズムの解明と癌治療法への応用」

京　　哲（きょう　さとる）

はじめに

テロメア，テロメレース研究は1994年にテロメレース活性の測定法がScience誌に公表されてから急速に進展し，細胞老化および不死化の分子機構の解明に多大な貢献をもたらした．本研究はテロメアbiologyより癌化メカニズムを解析し，さらに得られた知見を癌の遺伝子治療にも応用することを目的とした．本稿では我々の最新のデータを交えながら研究成果を概説する．

1　癌化過程におけるテロメア動態とテロメレースの活性化

一般に正常体細胞は試験管内での培養において無限に増殖，分裂できるわけではなく，一定の分裂回数の後，増殖を停止する．染色体末端にはテロメアとよばれるTTAGGGの6塩基対の繰り返し配列が約10000～20000塩基対存在している．この繰り返し配列の長さは細胞分裂ごとに徐々に短縮することが知られている．一回の分裂で約50－200塩基対短縮すると言われる．テロメアが極端に短縮するとDNAダメージシグナルと同様の機構が働いて細胞が増殖を停止する（図1）．正常細胞はテロメア伸長機構を持たないため，分裂にともなうテロメア短縮により最終的には必ず増殖停止を迎える．これをテロメア依存性の細胞老化 (senescence) と呼ぶ．

テロメアの機能は十分には解明されていないが，染色体末端でcap構造として働き，染色体の安定化に寄与すると考えられている．テロメアの極端な短縮はテロメア機能不全をもたらし，染色体の不安定性が誘発される．その結果，染色体融合などの高度な染色体異常が起こり，多くの場合細胞に致死的なダメージとなる．しかしながら，稀にこのような染色体異常が癌化のinitiationとなることがある．多くの前癌病変でテロメア短縮に起因する染色体異常が報告されている．したがって，老化によるテロメアの短縮は，染色体異常を通じた癌化のinitiationとなり得る．

このようにして発生した癌化細胞においても，分裂ごとに訪れるテロメア短縮はさらなる染色体異常を誘発し，致死的なダメージが起こる危険性をはらんでいる．これらの癌化細胞が安定的に増殖を続けるにはテロメアが安定する必要がある．テロメア伸長酵素であるテロメレースが活性化されると，細胞はテロメア短縮に起因する致死的染色体異常から免れる．すなわちテロメレース活性を獲得することで安定的に増殖を続ける真の癌細胞へと進展すると考えられる．

多くの癌細胞はこのような発癌過程でテロメレースの活性化を受け，不死化能を獲得していると考えられる．実際，臨床検体を用いた解析で90％以上の癌でテロメレースが活性化されていることがわかっている．これらのことからテロメレースの活性化は癌化過程における重要なステップであることがわかる．

2　テロメレース活性化の分子機構

癌化過程で起こるテロメレースの活性化機構は現在に至るまで完全には解明されていない．テロメレースは複数のサブユニットからなる複合体だが，その構成成分が相次いでクローニングされた．テロメア繰り返し配列の鋳型配列を持つRNA component (hTR)，telomerase-associated protein (TP1) および触媒サブユニットhTERT (human telomerase reverse transcriptase) の3種が同定された．このなかでもhTERTが酵素活性を担う最重要分子であることがわかっている（図2）．HTERTのmRNA発現レベルとテロメレース活性とは細胞株でも臨床検体でも極めてよく相関するので[1)2)]，hTERTの転写レベルでの制御あるいはmRNAの安定性がテロメレース活性化のkey factorであると推定される．我々はhTERT promoterをクローニングし，転写活性化機構を解析した[3)]．このpromoterはGC-richでTATA-less promoterである．hTERT-promoterのluciferase reporter plasmidを作製し，luciferase assayを行ったところ，大部分の癌細胞で高い転写活性を示すものの，正常細胞での転写活性は極めて低レベルで，このプロモーターが癌特異的な転写活性を有することが明らかになった．我々はpromoterの転写開始部200bpのregionが転写活性化に重要なcore promoterであることを見いだした．この領域にはE-boxおよびGC-boxが存在し，各々に作用する転写因子としてc-Myc

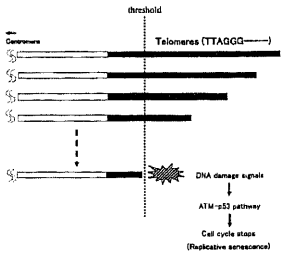

図1．テロメア短縮によるreplicative senescenceの誘導
細胞分裂ごとにテロメアは徐々に短縮し，限界長 (threshold) まで達するとDNA damage signalが誘導され細胞周期は停止する．この状態はsenescenceと呼ばれ，細胞老化を反映するものと考えられている．

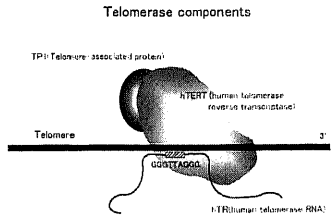

図2．テロメレースを構成するサブユニット
hTERTはテロメア伸長反応の触媒サブユニットである．hTRはテロメア相補的な9塩基の鋳型配列を有するRNA componentで，この鋳型配列がテロメレースのテロメア配列へのアクセスに重要である．TP1の機能は明らかになっていない．

およびSp1を明らかにした[4]．またMAP kinase cascadeの下流にあるEts familyがこのcore promoterに作用し，いわゆるMAPK pathwayによりhTERT転写レベルを活性化することを明らかにした[5]．また低酸素環境で誘導されるHIF1もE-boxに直接結合して転写活性化に働くことを証明した[6)7]．一般的に多くの固形癌は腫瘍の増殖により低酸素化にあると考えられ，HIF1がテロメレース活性化に寄与している可能性がある．これに対してMadはE-boxにてc-Mycと拮抗して転写抑制に働くこと，またMeninが何らかの未同定の転写因子を介して転写を抑制することもわかっている．さらにcore promoter上流にも多数の転写因子結合部を同定し，特にligandであるエストロゲンによって活性化されたestrogen receptorが直接結合して転写を活性化することを明らかにした[8]（図3）．このように非常に多岐の因子によってhTERT発現は制御されている．またepigeneticなregulationとしてcore promoterはhistone deacetylationにより転写抑制に働き，これが正常細胞でのサイレンシングに関与していること，また癌化過程ではSp1を通じてHDACがリクルートされることでサイレンシングが解除され，転写活性化が起こることも明らかにした[9]．癌化に伴いこれら多数の因子による複雑な相互作用で転写活性化が起こるものと推定される[10]．また多くの癌でrasの活性化や下流のMAPKの経路が活性化されており，これらがEtsを介してcore promoterの転写を活性化する経路は癌細胞において普遍的に起こっているシグナルである可能性が高い．

3 テロメレース導入による正常細胞の不死化

正常細胞は原則としてテロメレース活性を持たないが，テロメレースの構成成分であるhTRおよびTP1は恒常的に発現している．したがって正常細胞にhTERT遺伝子を導入してテロメレースを活性化すれば不死化に導くことが出来るかもしれない．そこで我々はこれまでに長期培養が不可能であるとされてきた子宮内膜腺上皮細胞を不死化させる実験系を立ち上げた．この細胞は培養が非常に困難で，primary cultureでは通常2週間で増殖停止となり，長期培養に成功した報告はこれまでなかった．また，上皮系細胞の場合，テロメア短縮による細胞老化よりも早期にp16/Rb経路の活性化が起こり，テロメア非依存性の増殖停止が起こることが知られている．これを阻止するためにRbを不活化するヒトパピローマウイルス（HPV）の癌遺伝子E7を導入し，同時にE7に対して協調的に働くE6を導入，さらにはhTERT遺伝子を導入することでその後に訪れるテロメア依存性細胞老化を回避して不死化を試みた．

子宮筋腫により手術を受けた閉経前の2名の患者より同意を得て子宮内膜組織を採取し，DNase Iおよびcollagenase type 3処理により内膜腺上皮細胞を内膜間質細胞と分離した．HPV16 E6およびHPV16 E7遺伝子とhTERT遺伝子はレトロウイルス発現ベクターにて各々単独，または互いの組み合わせにより内膜上皮細胞に導入した[11]．2患者の子宮内膜より計4種類の延命細胞を回収した．これらの細胞のE6, E7, hTERT遺伝子の発現はRT-PCR法にて確認した（図4）．これらの細胞は円形で，細胞間結合が強く，上皮細胞に典型的な形態を示す．安定的に培養が可能であり，遺伝子導入後約40回の分裂（population doubling (PD) 40）までは上記5種類の細胞はほぼ同様の増殖パターンを示した（図5）．ところがhTERTを導入していないEM-E6/E7は約40回の分裂後，増殖が停止し，細胞は扁平巨大化し，細胞老化を思わせる形態を示した．実際，老化細胞に特有のβ-gal染色陽性細胞が高率に出現してきた．一方，EM-E6/E7/hTERT-1, 2, 3では増殖も停止することなく，β-gal染色陽性細胞の出現も認めなかった．このことはhTERTを導入していないEM-E6/E7では約40回の分裂時点で細胞老化が誘導されるが，hTERT導入細胞ではこれを乗り越えていることがわかる．

これらの細胞が正常内膜上皮細胞の形質をどの程度保持しているかを確認するために以下の実験を行った．まずマトリゲル上で3次元培養し，腺構造をとり得るかどうかを確認した．細胞は網の目状に増殖し，一部を採取してパラフィン包埋切片を作成し，断面を観察すると，環状に並んだ細胞が内腔を形成し，腺管様の構造を形成することが確認された（図6）．

さらにこれらの細胞のステロイドホルモンの反応性を確認したところ，エストロゲンおよびプロゲステロンに対する反応性を有していた（図6）．またこれらの細胞の癌化形質についても解析したが，軟寒天培地でのコロニー形成能やヌードマウスでの造腫瘍能はなく，癌化形質を持たないことが証明された．（図7）．

今回樹立した不死化内膜上皮細胞は，HPV癌遺伝子E6, E7とhTERTの導入によって樹立されたが，幸いにもこれらの遺伝子操作によって染色体異常は引き起こさないか，あるいはnon-clonalな軽微な異常にとどまった（data not shown）（詳細は文献11を参照）．上皮細胞の不死化に広く用いられてきたのはSV40-LT遺伝子である．しかしながらこれらは高度の染色体異常を誘発し，その結果本来の細胞の形質を失ってしまっている．この点，我々の導入系は染色体異常を誘発しにくい非常にgentleな方法で，正常細胞の性質を維持した不死化細胞の樹立には理想的な方法であると考えられる．

これらの細胞は様々な分野において利用価値がある．特にreproductionの分野で幅広い応用が考えられる．受精卵が子宮内膜に着床する際，まず卵と内膜上皮のあいだに接着が起こる

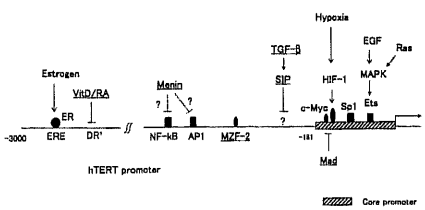

図3．hTERT promoterに作用する転写因子群
転写開始部上流の約200bpはcore promoterとして転写活性化に最も重要な流域である．この領域にはc-Myc, Sp1, Etsが結合し，転写活性化に働く．抑制に働く因子は下線で示した．

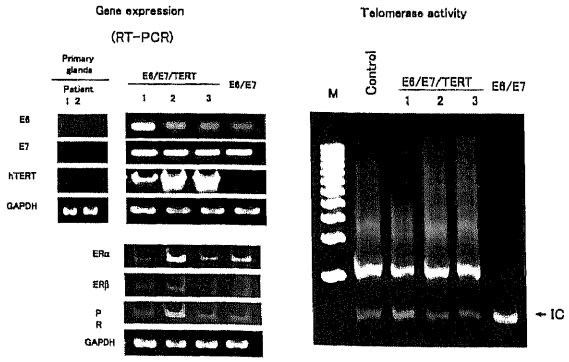

図4．遺伝子導入により延命した子宮内膜腺上皮細胞の遺伝子発現とテロメレース活性（文献11より）

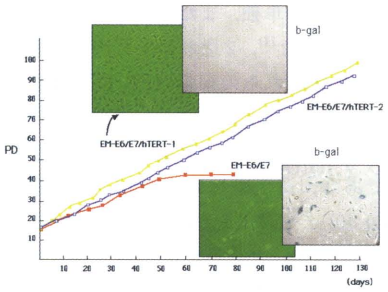

図5．遺伝子導入により延命した子宮内膜腺上皮細胞の増殖様式
hTERT導入クローン（EM-E6/E7/hTERT-1およびEM-E6/E7/hTERT-2）は際限なく増殖を続けているがhTERT非導入クローン（EM-E6/E7）はPD40で増殖停止となり，細胞形態も扁平巨大化しsenescence-associated beta-galも染まってくる．(文献11より)

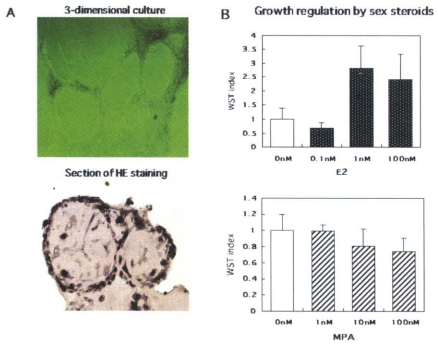

図6．不死化子宮内膜腺上皮細胞の形態的，機能的特性
A マトリゲル状での3次元培養とその断面のHE section
マトリゲル状では網目状構造を形成して増殖し，その断面は腺腔様構造を呈する．
B エストロゲンおよびプロゲステロンによる増殖変化 (WST-1 assayによる検討)
エストロゲン（エストラディオール: E2）添加により増殖刺激がかかり，プロゲステロン（MPA）添加により増殖抑制がかかる．(文献11より)

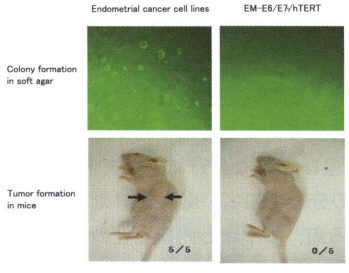

図7．不死化子宮内膜腺上皮細胞の腫瘍性性格の検討
不死化子宮内膜腺上皮細胞は軟寒天培地でコロニーを形成せず，ヌードマウスにも腫瘍を形成しない．
コントロールとして子宮内膜癌細胞株（IshikawaおよびHEC1）細胞を用いた．(文献11より)

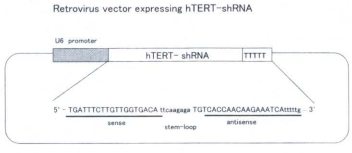

図8．hTERTに対するshRNAを発現するレトロウイルスベクター
hTERTに対して抑制効果を持つ19baseのhTERT遺伝子配列をstem-loopを介してshRNAとして発現するように設計されている．(文献12より)

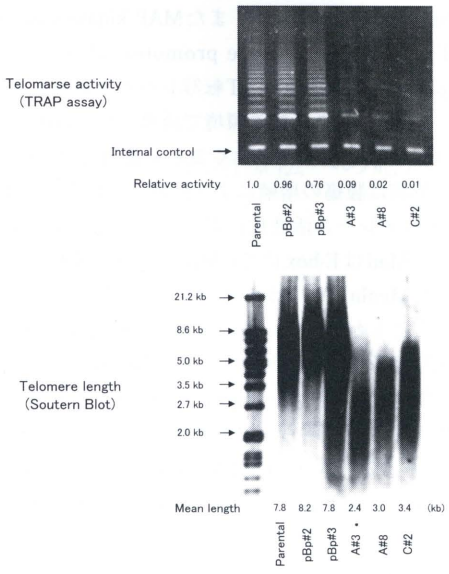

図9．hTERT-shRNA発現クローンのテロメレース活性抑制効果
A#3, A#8, C#2はHeLaのhTERT-shRNA導入クローン，pBp#2and#3は無関係のshRNAを導入したクローン．hTERT-shRNA導入クローンのテロメレース活性は著明に減弱し，同時にテロメア長も短縮している．(文献12より)

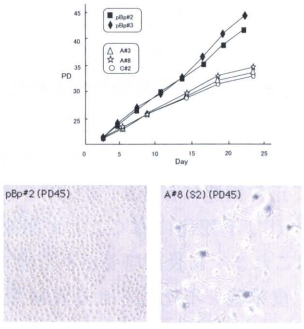

図10．hTERT-shRNA導入クローンの細胞増殖抑制効果
hTERT-shRNA導入クローンでは遺伝子導入直後より増殖は遅く，PD45前後でsenescenceに陥る．PD45で細胞形態は扁平，巨大化し，senescence-associated beta-gal staining陽性で明らかにsenescenceが誘導されていることがわかる．(文献12より)

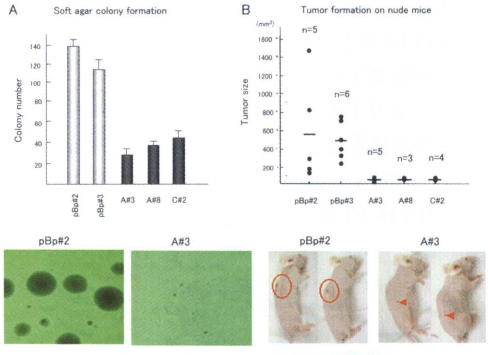

図11．hTERT-shRNA導入クローンの腫瘍性性格の解析
A 軟寒天培地でのコロニー形成能はhTERT-shRNA導入クローンで明らかに低下している．
B ヌードマウスでの腫瘍形成はhTERT-shRNA導入クローンで著明に低下している．これらはいずれも継代数10～20のsenescenceに陥る前の細胞を用いているため，細胞老化による増殖停止を反映しているわけではなく，hTERT抑制がより直接的に造腫瘍能を阻害する可能性を示唆する．(文献12より)

が，これまで内膜上皮細胞の培養が不可能であったため，試験管内でこれらの現象を解析することが不可能であった．我々の樹立した細胞を用いれば着床における受精卵の接着，さらには浸潤などの解析が可能になる．また我々の細胞は内膜の再生に応用できる可能性がある．特に内膜間質細胞は培養が容易で，長期にわたり増殖可能であるため，我々の細胞と共培養を行うことで内膜再生を実現できる可能性がある．

4 テロメレース阻害による癌治療への応用

癌細胞のテロメレース活性を阻害することで癌細胞に老化を誘導する試みが行われている．我々はhTERT遺伝子発現をshRNAにより特異的に抑制し，遺伝子治療への応用を試みた[12]．hTERT遺伝子発現を特異的に抑制するshRNAを作製するため，コンピューター解析により多数の候補配列をtransientの発現系で確認し，最も抑制効果の高い配列を選択した．この配列をヘアピンループの状態で発現するレトロウイルスを構築し (図8)，HeLa細胞に導入後，薬剤セレクションによりhTERT-shRNAを発現するpermanent cloneを得た．これらのクローンはcontrolクローンに比し，テロメレース活性が著明に低下していた (図9)．テロメア長は親株およびcontrolクローンが平均8kbを示すのに対し，約2－3kbと短縮していた．In vitroの細胞増殖はshRNA導入クローンが明らかに低下し，PD40～45で増殖が停止した (図10)．一方，shRNA導入クローンではsoft agarでのコロニー形成能およびヌードマウスでの造腫瘍能とも明らかに低下していた (図11)．この造腫瘍能の低下は細胞が増殖停止をきたすPD45よりもはるかに若いPD10－20の若い細胞ですでに認められたことから，細胞老化の結果として起こるものではなく，hTERT抑制がより直接的に造腫瘍能を阻害する可能性を示唆するものである．

さらに我々はshRNAを発現するクローンの放射線および抗癌剤感受性を検討したところ，放射線およびDNA-strand brakeを引き起こす抗癌剤に対する感受性が増していることを見いだした (図12)．興味深いことにDNA-strand brake作用のないPaclitaxelとCisplatinでは感受性の増加は見られなかった．放射線もDNA-strand brake作用を有することを考えると，hTERT抑制によりDNA-strand brakeを来す治療の感受性が増強するものと思われる．これらの結果は，hTERTがテロメア伸長以外にもDNA修復にも寄与することを示唆する非常に興味深いものであるが，詳細な分子機構は未だ明らかになっていない．またこれらの成績はテロメレース阻害剤の作用機序として癌細胞老化誘導以外にも，放射線およびある種の抗癌剤への感受性増強が期待できること示唆しており，米国で臨床試験が開始されているテロメレース阻害剤の既存の治療法との併用効果を理論的に証明するものとして注目に値する．

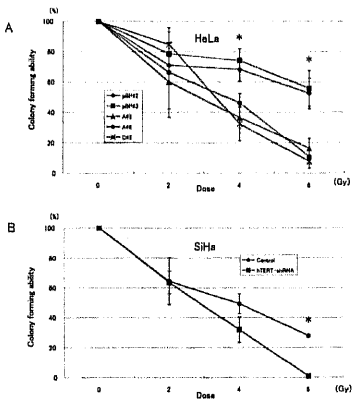

図12．hTERT-shRNA導入クローンの放射線感受性の増強
HeLaおよびSiHa細胞で，hTERT-shRNA導入クローンおよび無関係のshRNAを発現するcontrolクローンに放射線を種々のdoseで照射し，7－10日目のコロニー形成能を検討した．各クローンごとに，放射線を照射しない細胞を100％とした場合のコロニー形成能の相対値で放射線感受性を評価した．HeLaでは4Gyおよび6Gyで，SiHaでは6GyでhTERT-shRNA導入クローンの感受性増強が確認された．
*P < 0.05 (文献12より)

5 テロメレースプロモーターを用いた癌特異的ウイルス療法

テロメレースの癌特異的発現は先に述べたようにhTERT promoterの癌細胞特異性によるものと考えられる．一方，hTERT promoterは正常細胞では原則として転写活性を持たない．我々はhTERT promoterのこのような特性を利用して新たな癌遺伝子治療ベクターを開発した．一例としてhTERT promoterの下流にapoptosis誘導遺伝子であるBax, Caspace-8などを組み込んだベクターを構築し，癌細胞特異的にapoptosisを誘導しながら正常細胞への毒性を最小限にとどめることに成功している[13]．

さらに我々はアデノウイルスを癌の遺伝子治療に応用している[14]．従来，アデノウイルスは遺伝子治療のベクターとして用いられてきた．ベクターが複製すると毒性の問題が生ずるので，複製に必須のE1遺伝子を欠損させた変異型アデノウイルスが用いられてきた．我々は発想を転換し，アデノウイルスをベクターではなく複製可能なウイルスとして活用し，ウイルスの毒性により癌細胞を死滅させることを試みた．この際，いかに正常細胞への毒性を少なくするかがポイントとなる．そこでウイ

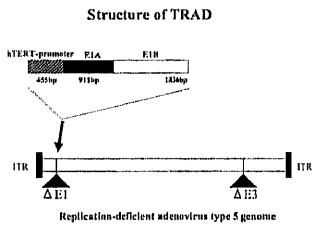

図13．Tumor-specific replication Adenovirus (TRAD) の遺伝子構造
E1遺伝子を欠失させた非増殖型のアデノウイルス5型ゲノムに，hTERT-promoter下流にE1AおよびE1B遺伝子を含む断片を挿入して作製した．(文献14より)

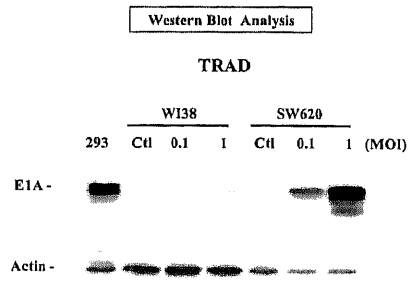

図14．癌細胞と正常細胞におけるTRADのE1A遺伝子発現
癌細胞 (SW620) および正常細胞 (WI38) にTRADを感染させ，60時間後にWestern blotでE1A蛋白発現を検討した．癌細胞においてのみ著明なE1A蛋白の発現が認められる．陽性コントロールとして293細胞を用いた．(文献14より)

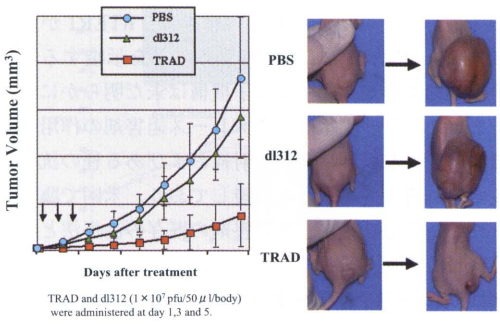

図15．TRADによる造腫瘍抑制効果
肺癌細胞株H1299をヌードマウスに接種し腫瘍を形成させ，直後よりTRAD, dl312 (非増殖型のアデノウイルス) およびPBSを3日間局所注入し，腫瘍のサイズをモニターした．TRAD注射により著明な造腫瘍抑制効果が認められた．dl312では効果が認められない．(文献14より)

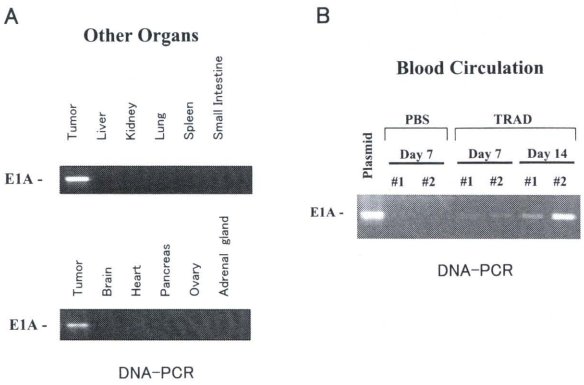

図16．TRAD局所注射後の生体内分布
(A) ヌードマウス側背の腫瘍にTRADを局所注射後，各臓器を取り出してE1A DNAの存在をPCRで確認した．腫瘍以外の臓器にはE1A DNAは検出されなかった．(B) 一方，TRAD注射後7日および14日目に血液を採取し，血液中のE1A DNAの検出を試みたところ，7日目にE1A DNAが検出され，14日目にはコピー数の増加を認めた．したがってTRADは注入部腫瘍細胞より血液中に拡散，漏出していることがわかる．(文献14より)

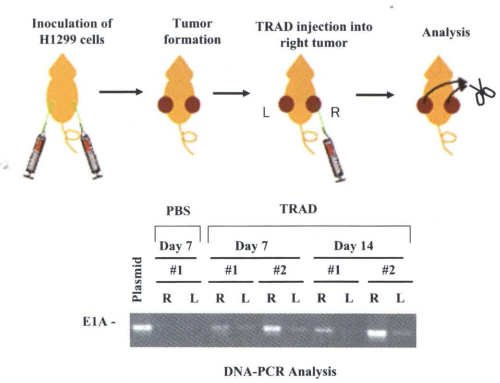

図17．TRAD局所注射後の遠隔腫瘍への拡散効果
ヌードマウス左右両側背に肺癌細胞H1299を接種して腫瘍を形成させ，右側背の腫瘍にのみTRADを局所注射後，両側の腫瘍を取り出してE1A DNAの検出を試みた．右側背の腫瘍にE1A DNAを認めるが，左側の腫瘍にも弱いながらE1A DNAを検出することが出来た．TRADが拡散によって対側腫瘍にまで波及していることがわかる．(文献14より)

ルスのE1AおよびE1B上流にhTERT promoterを組み込み，これらがテロメレース陽性の癌細胞のみで発現するようにした(図13)．このウイルスをTumor-specific Replication Adenovirus (TRAP) と命名した．TRADを癌細胞および正常細胞に感染させて，E1A蛋白の発現をみると，癌細胞でのみ高発現がみられた (図14)．in vitroでのTRAD複製効率を感染後のtiterでみると，癌細胞において1000～10000倍の複製効率を確認した．さらにin vivoでの造腫瘍抑制効果を検討した．ヌードマウスに腫瘍を移植してTRADおよびコントロールとして自律複製能を欠いたベクター型のアデノウイルスを局所注入したところ，TRAD注入群で著明な造腫瘍抑制効果を認めた (図15)．さらに注入TRADの動態を確認するために，全身臓器でのTRAD拡散をE1A DNAのPCRで確認した．注入腫瘍では高濃度E1A DNAを確認したが，他の正常臓器ではまったく検出されなかった(図16)．一方，マウスの血液中のE1A DNAを同様にPCR法で確認したところ，注入7日目よりE1A DNAが検出され，14日目にはE1A DNAコピー数の増加を認めた．したがって，TRADは腫瘍注入部より血液中に拡散あるいは漏出したことが

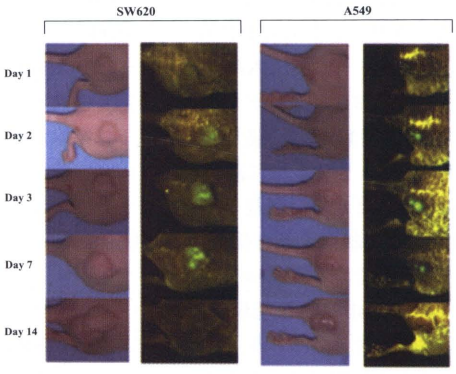

図18．TRAD-GFPによるin vivoでの癌細胞の可視化
TRADにGFP遺伝子を組み込んだものをヌードマウス腫瘍(SW620およびA549) に局注し，GFP発光をモニターした．注射後3～7日をピークとして腫瘍部にGFP発光が確認され，その後は徐々に減弱した．(文献15より)

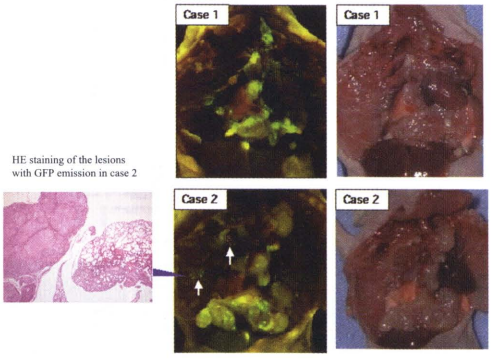

図19．TRAD-GFPによるin vivoでの播種性癌細胞の可視化
肺癌細胞A549をマウス胸腔に注射して約2週間で胸腔播種病変を形成させ，胸腔内にTRAD-GFPを注入した．5日後に開胸しGFP発光を確認した．播種病変に一致してGFP発光が検出された．肉眼的に病変が明らかでない部分にも弱いGFP発光を認めた (Case 2: 矢印)．この部分を採取して病理組織学的に検討したところ，顕微鏡的播種病変が確認された．(文献15より)

わかる．血流に乗って拡散したTRADは遠隔転移巣に抗腫瘍効果をもたらすのか？この点を明らかにするために，マウス側背の左右両側に腫瘍を形成後，片側の腫瘍にTRADを局注し，対側腫瘍への波及効果を検討した．興味あることに対側腫瘍にもE1A DNAおよびE1A蛋白の発現が認められ，TRADの存在が確認された (図17)．対側腫瘍の抗腫瘍効果に関しては現時点では著明な縮小までには至っておらず，遠隔腫瘍巣により高濃度のTRADを移行させる工夫が必要であると考えている．

6 癌特異的増殖ウイルスを用いた微少転移巣の可視化

TRADが癌細胞特異的に複製増殖することを利用して，微少癌転移巣のイメージングを試みた[15]．TRADにGFP遺伝子を組み込み，マウス腫瘍内に注入すると2日目より発光が確認され，7日目で最大の発光強度を示した (図18)．さらにマウスの胸腔内播種モデルを作製し，播種巣形成後にGFP-TRADを胸腔内注入しキセノンファイバー光源下にCCDカメラで観察したところ，播種巣全般に発光が確認された (図19)．さらに興味あることに肉眼的には播種と認識できない部分にも発光点を認めたため，この部分を採取し，病理組織学的に検討したところ，微少播種巣を確認できた．したがって，GFP-TRADの導入により，治療効果ばかりではなく，occult転移巣を検出できる可能性が示唆された．

まとめ

以上のように，テロメア，テロメレース研究は発癌メカニズムの解明のみならず，癌の遺伝子治療や遺伝子診断など幅広い応用が可能である．特にテロメレース阻害剤とTRADによるウイルス療法は米国で臨床試験が行われつつあり，translational researchとして極めて有望である．

謝　　辞

第一回の十全医学賞受賞に当たり，賞の創設および審査に携わっていただいた諸先生に厚く御礼申し上げます．本研究を物心両面から全面的にサポートしていただき，時には厳しいsuggestionと的確な方向性を示して下さった産婦人科主任教授の井上正樹先生には心より深謝致します．またこれらの仕事は国立がんセンター研究所ウイルス部門の清野透博士，Dana-Farber Cancer Instituteの増富健吉博士，岡山大学遺伝子・細胞治療センター助教授の藤原俊義博士との共同研究により行われたもので，この場を借りて厚く御礼申し上げます．最後にこれらの研究は金沢大学産婦人科第6研究室のメンバーにより成し遂げられたもので，彼らに心より感謝申し上げます．

文　　献

1） Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, and Inoue M. Expression of telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. Cancer Res, 58: 1558-1561, 1998.

2） Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Namiki M, Inoue M. Expression of of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. Clin. Cancer Res. 4: 1603-1608, 1998.

3） Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Takeda J, Yutsudo M, Hirano H, Inoue M. Cloning of human telomerase reverse transcriptase gene promoter and identification of proximal core promoter essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. Cancer Res. 59: 551-557, 1999

4） Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, Ariga H, and Inoue M. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. Nucleic Acids Res. 28: 669-677, 2000.

5） Maida M, Kyo S, Kanaya T, Wang Z, Takakura M, yatabe N, Tanaka M, Nakamura M, Hisamoto K, Ohmichi M, Gotoh N and Inoue M. Direct activation of telomerase by EGF through Ets -mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. Oncogene 21:4071-4079, 2002.

6） Yatabe N, Kyo S, Maida Y, Nishi H, Nakamura M, Kanaya T, Tanaka M, Isaka K, Ogawa S and Inoue M. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. Oncogene 23: 3708-3715, 2004.

7） Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW and Isaka K. Hypoxia-inducible factor mediates upregulation of telomerase (hTERT). Mol.Cell.Biol., 24; 6076-6083, 2004.

8） Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Wang Zhuo, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. Estrogen activates telomerase. Cancer Res. 59: 5917-5921, 2000.

9） Takakura M, Kyo S, Sowa Y, Wang Z, Yatabe N, Maida Y, anaka M, InoueM, Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells: induction of hTERT expression through Sp1 binding sites. Nucleic Acids Res, 29: 3006-3011, 2001.

10) Kyo S and Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy? Oncogene 21: 688-697, 2002.

11) Kyo S, Nakamura M, et al. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. Am. J. Pathol. 2003, 163: 2259-2269.

12) Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, Hashimoto M, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Hahn WC, Inoue M. Efficient inhibition of hTERT expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy. Hum. Gene Ther. in press.

13) Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA, Fang B. Tumor-specific transgene expression from hTERT promoter: Targeting pharmaceutical effects of the Bax gene to cancer. Cancer Res. 60: 5359-5364, 2000.

14) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N and Fujiwara T. Telomerase-specific replication selective virotherapy for human cancer. Clin. Cancer. Res. 10: 285-292. 2004.

15) Umeoka T, Kawashima T, Kagawa S, Teraishi F, Taki M, Nishizaki M, Kyo S, Nagai K, Urata Y, Tanaka N and Fujiwara T. Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. Cancer Res. 64: 6259-6256, 2004.