

Mechanism of regulation of telomerase expression, and experimental study on cancer gene therapy using its promoter

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-11-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 並木, 幹夫, Namiki, Mikio メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00048967

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



テロメラーゼ発現制御機構解明とそのプロモーター
を利用した癌遺伝子治療の実験的研究

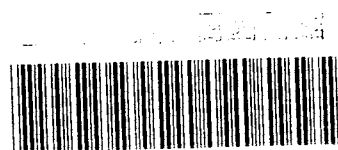
(12470330)

平成13年度科学研究費助成金（基盤研究B）研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 並木 幹夫

(金沢大学大学院医学系研究科教授)



8011-05264-0

テロメラーゼ発現制御機構解明とそのプロモーター
を利用した癌遺伝子治療の実験的研究

(12470330)

平成13年度科学研究費助成金（基盤研究B）研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 並木 幹夫

(金沢大学大学院医学系研究科教授)

著 者 寄 贈

はしがき

ヒト染色体末端に存在するテロメアとその維持機構であるテロメラーゼは、細胞の不死化に関わる最も重要な因子で、ヒト癌の発生・進展に深く関与していると考えられている。実際に様々なヒト癌組織でテロメラーゼ活性の上昇が認められており、癌細胞のみを標的とする治療法を確立する上で、テロメラーゼの有用性が認識されている。

本研究は、テロメラーゼの構成蛋白の一つであるhuman telomerase catalytic subunit (hTERT) のプロモーター領域の詳細な解析を行い、hTERTプロモーターを用いた癌遺伝子治療の確立を目指したものである。本プロモーターは申請者らがクローニングしたものであり、世界に先駆け独創的な研究を行うとともに、本研究の成果が、癌遺伝子治療の新たなブレークスルーになるものと期待される。

研究組織

研究代表者：並木 幹夫（金沢大学・大学院医学系研究科・教授）

研究分担者：越田 潔（金沢大学・大学院医学系研究科・助教授）

研究分担者：高 栄哲（金沢大学・医学部附属病院・講師）

研究分担者：京 哲（金沢大学・大学院医学系研究科・講師）

研究経費

	直接経費	間接経費	計
平成12年度：	8,100千円	0円	8,100円
平成13年度：	2,500千円	0円	2,500円
計	10,600千円	0円	10,600円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Kitagawa Y, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Namiki M, Inoue M
Demethylating reagent 5-azacytidine inhibits telomerase activity in human prostate cancer cells through transcriptional repression of hTERT
Clin Cancer Res 6: 2868-2875, 2000.
2. Koh E, Kanaya J, Namiki M
Adrenal steroids in human prostate cancer cell lines
Arch Androl 46: 117-125, 2001.
3. Takakura M, Kyo S, Sowa Y, Wang Z, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, Inoue M
Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells: induction of hTERT expression through Sp1 binding site
Nucleic Acids Res 29: 3006-3011, 2001.
4. Kyo S, Kondo S
Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene
Cancer Res 61: 5796-5802, 2001.
5. Yang H, Kyo S, Takakura M, Sun L
Autocrine transforming growth factor beta suppresses activity and hTERT transcription in human cancer cells
Cell Growth Differentiation 12: 119-127, 2001.

(1) 口頭発表

1. 並木幹夫

シンポジウム 「前立腺疾患に対するホルモン治療」

日蘭修交400周年記念シンポジウム, 2000年10月, 大阪

2. 並木幹夫

特別講演 「前立腺疾患と医療連携」

兵庫県排尿障害学術講演会, 2000年11月, 神戸

3. 京 哲

「テロメラーゼ活性化機構の解析と癌の遺伝子治療への応用」

群馬 Clinical Oncology Research 2001, 2001年11月, 群馬

研究成果

1. 研究目的

癌は全身性疾患であり，転移性癌に対する治療法の確立が急務である．転移性癌に対する遺伝子治療法として，現在までに免疫遺伝子治療や抗体を利用した標的遺伝子治療などが行われているが，いまだ臨床的に有効な方法は見出しがたいのが現状である．

今回癌に特異的に発現するテロメラーゼの構成蛋白の一つであるhTERTに着目し，そのプロモーター領域を利用した癌遺伝子治療の基礎的検討を行った．従来の研究にて，hTERTはあらゆる癌腫で高発現していることが判明し，泌尿器科領域だけでなく，あらゆる癌腫で目的とする遺伝子を発現する系を確立することを目的とした．

2. 研究方法および結果

1) hTERTプロモーター領域のマッピングと活性領域の制御機構の解明

プロモーター領域のdeletion mutantを10種類作製し，各種細胞株におけるプロモーター活性をLuciferase assay法を用いて解析した．その結果，転写開始点から378bp上流までの領域は，コントロールとして用いたSV40プロモーターの約80%の活性を示した．次にこの活性領域の脱メチル化を行い，抑制されていたp16やE-cadherinの発現がメチレーションの関与を受けていることを確認した．さらにPCR-based methylation assayにて，脱メチル化による発現であることを証明した．

2) CD遺伝子を用いた自殺遺伝子治療の基礎検討とプロモーター活性増強の試み

自殺遺伝子治療に用いられるCD遺伝子を378bpプロモーター下流につなぎ、各種ヒト癌細胞株を用いてin vitro実験を行った。遺伝子導入にはFuGENE6法を用いた。至適濃度の5FCを投与した結果、コントロールとして用いた正常上皮細胞や線維芽細胞では殺細胞効果は認められなかったが、癌細胞株では泌尿器癌だけでなく婦人科癌においても高い殺細胞効果が認められた。さらなる活性増強を目的に、現在この378bpプロモーターをタンDEMリピートし、同様の手法で検討中である。

3) in vivo治療実験

in vivoでの治療実験を行うため、378bpプロモーター+ CDをアデノウィルスベクターに組み入れた。予備実験として、ex vivoでアデノウィルスによりCD遺伝子を導入した前立腺癌細胞を、SCIDマウスに同所移植後5FCを腹腔内投与した。その結果明かな腫瘍縮小効果が認められた。

3. 結論および今後の研究の展開

今後このアデノウィルスベクターをマウス尾静脈から投与し、*in vivo*での治療実験を行う予定であるが、前述の実験結果から明らかなように、hTERTプロモーターは幅広い癌腫で活性を示すと考えられる。しかしながらアデノウィルスを用いた癌遺伝子治療をより効果的に行うためには、肝臓でのアデノウィルスのトラップを克服する必要がある。従って、単に局所での抗腫瘍効果を比較するのではなく、ウィルスの全身分布についての検討や、投与量、さらに副作用の有無などについても詳細に検討する必要がある。また、タンDEMリピートなどの手法を用い、さらにプロモーター活性を高める工夫を行いつつ、より安全で高い抗腫瘍効果を各種癌種で得られるよう研究を進める必要となるであろう。