

論文審査の結果の要旨

氏名 吉武 和敏

本論文は3章からなり、第1章は *in vitro* におけるヒトテロメアを特異的に切断するエンドヌクレアーゼの創出について、第2章は細胞内におけるテロメア切断、短縮による細胞の応答について解析が行われており、第3章ではがん細胞特異的にテロメアを切断し、細胞の増殖を阻害する研究について述べられている。

第1章では、ヒトテロメア配列 (TTAGGG)_n と似たテロメア配列である、カイコテロメア配列 (TTAGG)_n を特異的に切断するエンドヌクレアーゼ TRAS1EN を出発点として、研究を進めている。まず、ヒトテロメアへの切断活性を向上させるために、ヒトテロメアに結合する TRF1 と TRAS1EN のキメラタンパク質を作成しているが、この発想は独創性があり評価出来る。そして、活性を向上させるのに必要な TRF1 のドメインを検討するため、複数のキメラタンパク質を作成し、各キメラタンパク質の活性、及び特異性を適切に比較している。さらに、キメラタンパク質となった際の TRAS1EN 及び、TRF1 それぞれのドメインの特異性が保存されていることを、注意深く検証している。第1章は、第2章において、ヒト細胞内でテロメアを切断するために、ヒトテロメアを特異的に切断する酵素を創出することが目的であり、その役割は十分に果たしていると思われる。

第2章は *in vitro* でのキメラタンパク質の切断活性の結果を受け、実際にヒト細胞内でテロメアを切断しうるかについての検証から行われている。まず第1章で作成したキメラタンパク質を、アデノウィルスベクターを用いてヒトがん細胞で発現させたのち、細胞からゲノム DNA を抽出し、テロメアの長さを解析した。その結果、TRAS1EN のキメラタンパク質は細胞内でも、テロメアを切断することが示された。これまでに、細胞内でテロメアを急速に短縮させる手法はなく、本論文はそれを可能にしたという点で評価出来る。さらに、TRAS1EN のキメラタンパク質を発現させた細胞に関して、その増殖速度を、テロメアを切断しないコントロールの細胞と比較した結果、わずか2週間でがん細胞の増殖を阻害することを示した。また、そのような細胞の増殖の阻害は、アポトーシスによる細胞死ではなく、細胞老化によるものであることが、senescence associated βガラクトシダーゼ染色によって示された。さらにテロメアの短縮に対する細胞の応答を調べるため、キメラタンパク質を発現させた細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを行い、p53 と p16 の発現量の経時変化を解析した。これにより、テロメア短縮時には、DNA 修復系の役割も知られている p53 が活性化されていることが示され、またこれまでに詳細が不明であった p16 に関しては、活性化される必要がないことを明らかにした。このようなテロメアを急速に短縮させることによって、細胞の増殖を速やかに阻害することが可能になった点、及びテロメア短縮時には p16 が活性化さ

れる必要がないことを明らかにした点で評価できる。

第3章はテロメアを切断する **TRAS1EN** のキメラタンパク質の発現をがん細胞に限定することで、正常細胞には影響を与えずに、がん細胞のみの増殖を阻害することを目標として研究を行っている。キメラタンパク質の発現をがん細胞に限定するために、がん細胞で活性の高いテロメラーゼのプロモーター、**hTERT** プロモーターを用い、がん細胞での特異性を確保できるか検討している。まず、**Dual-Luciferase** アッセイを行い、**hTERT** プロモーターが、本論文で使用するがん細胞で特異的に機能するか、慎重に確認している。そして、**hTERT** プロモーターに依存して、がん細胞で特異的に増殖するアデノウイルスベクター**CRAd** にキメラタンパク質を組み込むことで、がん細胞の増殖を制御することを試みた。結果としては、これまで臨床試験にも使用されたことのある **p53** タンパク質よりも、**TRAS1EN** のキメラタンパク質を発現させた場合の方が、がん細胞の増殖をより強く阻害することを明らかにした。がん細胞に対する特異性を確保するという点では、**CRAd** ウィルスベクターの特異性が、想定したほどには高くないことに起因して、正常細胞に対しても細胞の増殖を阻害してしまっていた。しかし、既存のテロメラーゼ阻害剤などの、テロメアに着目した細胞の増殖阻害を行う物質と比較すると、**TRAS1EN** のキメラタンパク質はテロメラーゼの発現の有無に関わらず、広範ながん細胞に応用可能であり、さらに 1~2 週間の短い期間で細胞の増殖を阻害するという利点を明らかにした。このようにテロメアを切断することで、短期間のうちにがん細胞の増殖を阻害することができるという知見は、今後テロメアに関するがんの遺伝子治療に関する研究において極めて重要な知見であり、本論文中で最も評価できる点である。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。