

## 研 究

## 担癌マウスのテロメラーゼ活性に及ぼすシスプラチンの影響

小林 礼樹

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：関山 三郎 教授)

(受付：2001年1月4日)

(受理：2001年1月10日)

**Abstract :** Telomerase is an enzyme that adds TERT proteins and telomere repeat sequences to the end of chromosomes that make up RNA sub-units. This enzyme participates in the proliferation of cell division. Not found in normal tissues, high activity is shown in malignant tumors and tissues related to generative cells. This study analyzed the influence exerted on telomerase activity (TA) by anticancer agents and examined the utility of TA as an index of anti-tumor effects. It also examined c-myc involved in the TA mechanism, bcl-2 involved in apoptosis inhibition and the emission of each mRNA. In our a results, TA was not detected in normal mouse skin tissue, but high activity was observed in the mice's carcinoma tissue within the squamous cells. Also, on observing significant rises in the enhancement of tumors by TA, it appears to be deeply involved in the growth of cancer. With the administration of cisplatin, TA falls off significantly and the growth of tumors is inhibited. This shows that TA may be useful as an index for the anti-cancer effects of cisplatin. Myc proteins are involved in the transcription factor of tert genes. In this research the reduction in emissions of c-myc mRNA through the administration of cisplatin is shown in the involvement of TA of Myc proteins. Also, our results suggest that tumors may tend to reduce when restrained by apoptosis through reductions in bcl-2 mRNA emissions.

**Key words :** telomere, telomerase, cisplatin, bcl-2, c-myc

## 緒 言

テロメアは染色体末端の構成成分でヒトを含む脊椎動物ではTTAGGGの6塩基の反復配列からなり<sup>1)</sup>, 染色体末端の変性や融合による遺伝情報の欠失を防ぎ, 遺伝子を保護してい

る<sup>2)</sup>。テロメアDNAは, 通常のDNA合成酵素によって完全に複製されないために, 正常の体細胞では細胞分裂のたびに徐々にテロメアが短縮する<sup>3-4)</sup>。テロメアがある一定の長さ以下になると, 細胞は分裂可能の限界に達し, 染色体の構造を維持できなくなり, 細胞は死滅する<sup>5)</sup>。

Influence of Cisplatin Exerted on the Telomerase Activity of Mice with Cancer

Reiju KOBAYASHI

(Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, 020-8505 Japan)

(Chief : Prof. Saburo. SEKIYAMA)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 26 : 23-32, 2001

一方、癌細胞では細胞分裂のたびに染色体は短縮しようとするが、修復機構であるテロメラーゼが存在し<sup>6)</sup>、これを阻止する。テロメラーゼは正常体細胞において、生殖細胞系を除き殆ど発現されない酵素である。テロメラーゼは、テロメアの反復配列に相補的な鋳型 RNA を含む、一種の逆転写酵素であり、テロメア反復配列を合成付加し、癌細胞の分裂を無限にし、不死化を可能にしている。テロメラーゼ活性 (TA) は、頭頸部領域を含め様々な悪性腫瘍組織で高率に検出されている<sup>7~8)</sup>。近年、種々の抗癌薬が *in vitro* における癌細胞の TA を低下させるという報告<sup>9~10)</sup>があるが、担癌状態の TA に及ぼす影響に関しては不明な点が多い。

そこで本研究では、口腔領域の悪性腫瘍の選択薬として多用されるシスプラチンを用い、担癌マウスにおけるシスプラチンの抗腫瘍効果の指標として TA の有用性について検討した。また、TA に関与するとされる *c-myc*、アポトーシス抑制に関与する *bcl-2*、各 mRNA の発現について検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

岩手医科大学歯学部口腔外科学第2講座にて兄妹交配により、近交系として維持している WHT/Ht マウスの雌、8~12週齢 (体重24~33g) を1群あたり5匹とし、水と固形試料 (オリエンタル酵母工業) は自由に摂取させた。

### 2. 腫瘍と移植

近交系 WHT/Ht マウスに自然発生し、胸部皮下に継代移植している扁平上皮癌細胞を使用した。この腫瘍は、Tumorigenic dose rate 50 (TD<sub>50</sub>) 値が14.4と極めて低免疫原性である<sup>11)</sup>。同種マウス腫瘍を無菌的に採取し、滅菌した少量の phosphate buffer saline (PBS) を加え剪刀にて細切りし、100 $\mu$ m nylon mesh で濾過した。これに PBS を加え細胞を洗浄し、回収した細胞浮遊液を800rpm で3回遠心洗浄し、PBS に再浮遊させて使用した。生細胞数の算定は0.9% ニグロシン染色で行い、細胞の viability は各

ロットとも90%以上であった。浮遊液は、血球計算板上で生細胞数を算定した後 PBS で  $1 \times 10^6$  個に調製し、1.0ml注射器 (Terumo) を用いて、0.1mlをマウス胸部皮下に移植した。

### 3. 薬剤

シスプラチン (CDDP, 日本化薬) は生理食塩水で調整後腹腔内投与とし、移植した腫瘍の直径が10mmに達した時点から投与を開始した。

### 4. 実験プロトコール

1) TA と腫瘍体積を以下のように比較検討した。

①  $1 \times 10^6$  個の腫瘍細胞を移植後、自然経過における経日的変化。

② 腫瘍直径が10mmになった時点で CDDP を0.1, 1, 10, 25mg/kgの各濃度で腹腔内に投与した6日目の腫瘍。

③ 10mg/kg投与において、10mg/kg単回投与群、3.33mg/kgずつ3回連日投与群、同じく3回隔日投与群の各投与方法による腫瘍。

④ 10mg/kg単回投与群における経日的変化。

対照群は、生理食塩水を同じく投与した。腫瘍体積の測定は、腫瘍の長径および短径をノギスにて計測し、(長径)  $\times$  (短径)<sup>2</sup>  $\times$  0.5の式から求めた。また同時に体重の測定を行った。

2) *c-myc* および *bcl-2* の mRNA の発現を10mg/kg単回投与群から RNA を抽出し、RT-PCR法で経日的 (2, 4, 6日目) に検討した。

### 5. TA の測定

TA は、腫瘍細胞より抽出した蛋白を用いて、TRAP assay (telomeric repeat amplification protocol: TRAP)<sup>12)</sup>にて測定した。尚、TRAP assay には TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit (INTERGEN, Co NY, USA) を使用した。

#### ① 蛋白の抽出

抽出した腫瘍組織は、滅菌した極少量の PBS を加え剪刀で細切りし、100 $\mu$ m nylon mesh で濾過洗浄後、 $1 \times 10^6$  個に調整した。調整した細胞を Kit 付属の  $1 \times$  CHAPS 溶解液 (0.5% CHAPS, 10mM Tris-HCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1

mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.1 mM Benzamidine, 10% Glycerol) 200  $\mu$ l と RNase inhibitor 1  $\mu$ l (100U/ml, GIBCO BRL) で懸濁し, 氷上で30分インキュベートした。その後4°Cで12,000 g, 20分間遠心し, 上清を蛋白抽出液とした。抽出液の蛋白濃度は Bradford 法に基づき, Protein assay dye (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用し測定した。

### ②TRAP assay

各試料を0.025  $\mu$ g/ $\mu$ l になるよう RNase-free の脱イオン水で調整した。各試料と各試料の加熱処理液および Kit 添付の Positive control 細胞, TSR 8 (Control template), Negative Control (1  $\times$  CHAPS 溶解液) それぞれ 2  $\mu$ l に, ビオチン標識 TS primer を含む 5  $\times$  TRAP reaction mixture 5  $\mu$ l と Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l, PERKIN ELMER) 0.2  $\mu$ l を加え, RNase-free の脱イオン水にて全量 25  $\mu$ l とし, テロメラーゼによる TS primer へのテロメア反復配列の付加・伸長反応 (30°C30分) を促進させた。次に付加・伸長されたテロメア配列を鋳型とし, TS primer およびテロメア配列を認識する RP primer による特異的な polymerase chain reaction (PCR) (94°C30秒, 57°C30秒, 72°C10分: 33cycle) を行った。

PCR 生成物を12.5%ポリアクリルアミドゲルにて400v1.5時間電気泳動を行い (PAGE), 10,000 倍希釈の SYBR<sup>TM</sup>Green (FMC BioProducts Rockland, ME, USA) にて染色し, Polaroid film にて撮影した。

### ③ELISA

ストレプトアビジンをコートしたマイクロプレートに, ビオチンとジニトロフェニルを標識した②の同一 PCR 生成物 5  $\mu$ l を加えインキュベート (37°C1時間) し, ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗 DNP 抗体を反応させインキュベート (室温30分) 後, TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethyl-benzidine) 基質で発色させマイクロプレートリーダー (THERMO max, Molecular Devices) にて吸光度 (OD<sub>450-650</sub>) を

測定し半定量的に検討した。TRAP assay の判定はコントロールが次の条件を満たした上で行った。1) Negative Control の OD 値0.2以下, 2) TSR 8 (Control template) の OD 値0.8以上, 3) 各試料の加熱処理液の OD 値0.25以下。

### 6. RT-PCR

1  $\times$  10<sup>6</sup> 個の腫瘍細胞から Rneasy Minikit (QIAGEN USA) を用い total RAN を抽出した。逆転写酵素反応は, 約 2  $\mu$ g の RNA から, 0.1 M Oligo(dt) primer {pd(T)<sub>12-18</sub>}, 5  $\times$  First strand buffer (GIBCO BRL), 10mM dNTPs, M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l, GIBCO BRL), RNASEOUT<sup>TM</sup> Ribonuclease inhibitor (40U/ $\mu$ l, GIBCO BRL) を含む反応液で cDNA を合成した。反応条件は37°C90分, 95°C5分: 1 cycle で行った。

合成された cDNA は各 primer および 10  $\times$  PCR buffer (15mM MgCl<sub>2</sub>, PERKIN ELMER), 2 mM dNTPs, Ampli Taq Gold<sup>TM</sup> (5 U/ $\mu$ l, PERKIN ELMER) を用いて PCR (94°C1分, 60°C2分, 72°C2分: 34cycle) を施行した。各 primer の塩基配列を以下に示す。

c-myc,

5'-CAGCAGAGCGAGCTGCAGCC-3' (sense)

5'-CTGTCTTTGCGCGCAGCCTG-3' (antisense)

bcl-2,

5'-CAGCTGCACCTGACGCCCTTC-3' (sense)

5'-CCCAGCCTCCGTTATCTGG-3' (antisense)

$\beta$ -actin (内部コントロール),

5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' (sense)

5'-CAGCGGAACCGCTCATGCAATGG-3' (antisense)

増幅された PCR 産物を3%アガロースゲルにて電気泳動後エチジウムブロマイドで染色し Polaroid film にて撮影した。各バンドの輝度をデンストグラフ (ATTO JAPAN) 測定し, 得られた積算値を用いて内部コントロールとの比を算出し, mRNA 発現量を検討した。

### 7. 統計学的検討

統計学的処理は Fisher's PLSD で行い, p < 0.05 を有意差とした。

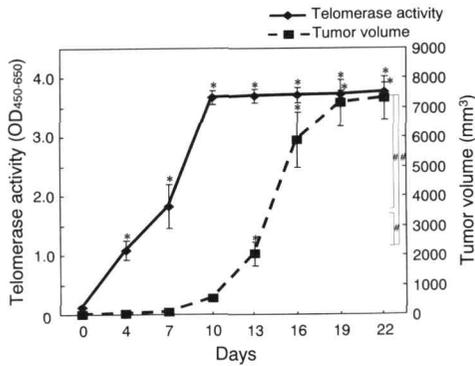


Fig. 1. Relationship between telomerase activity and tumor volume during the natural progression after tumor cell transplantation. 0th represents normal skin. Significance was determined by Fisher's PLSD ( $p < 0.05$ ). Bars, SD.

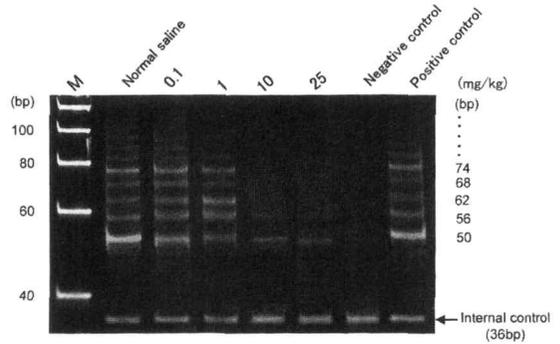


Fig. 2. Relationship between CDDP dosage and telomerase activity. A decline in activity was observed with the weakening in the ladder band signal following an increase in dosage. M : 20bp marker.

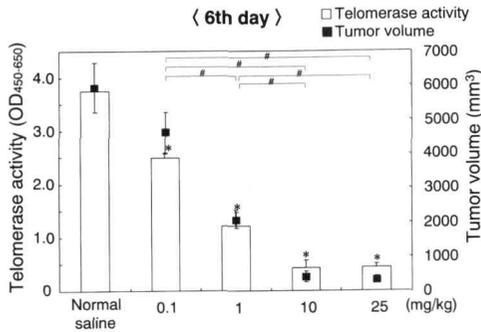


Fig. 3. Relationship between CDDP dosage and telomerase activity as well as tumor volume. As in Fig. 2, PCR formations were determined by ELISA. Significance was determined by Fisher's PLSD ( $p < 0.05$ ). Bars, SD.  
\* : significant difference from normal saline ( $p < 0.05$ )

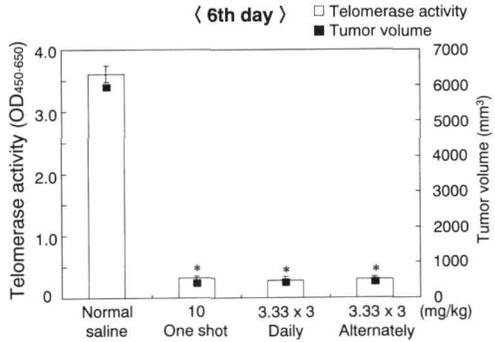


Fig. 4. Relationship between method for administering CDDP and telomerase activity as well as tumor volume. Significance was determined by Fisher's PLSD ( $p < 0.05$ ). Bars, SD.

## 結 果

### 1. 自然経過における TA と腫瘍体積

経日経過の TA と腫瘍体積の関係を縦軸に吸光度と腫瘍体積、横軸に経日経過のグラフで示した。腫瘍細胞移植後 7 日目までは、平均腫瘍体積 (mean ± SD) の増大は  $67.4 \pm 14.6 \text{ mm}^3$  と極く軽度であったが、TA は移植後 4 日目には OD 値が  $1.08 \pm 0.16$  と有意の上昇を示し、以後 10 日目体積がまだ  $558.2 \pm 126.5 \text{ mm}^3$  のときにほぼ最高値  $3.66 \pm 0.11$  の OD 値に達した。それ以後腫瘍体積は 13 日目で  $2,043.8 \pm 410.4 \text{ mm}^3$  と有意に

増大し、16 日目で  $5,910.0 \pm 929.6 \text{ mm}^3$  と腫瘍体積は急激な増大を示した (Fig. 1)。

### 2. CDDP 投与量と TA および腫瘍体積

CDDP 各投与量投与後 6 日目の PAGE では、生理食塩水投与群および Positive Control と比較して、CDDP 投与群は、0.1, 1, 10, 25, mg/kg の順で投与量の増加に従いラダーバンドのシグナルが弱くなり TA の低下が示された (Fig. 2)。

同じ PCR 生成物を ELISA で測定した結果を、縦軸に吸光度と腫瘍体積、横軸に CDDP 投与量で示した。TA は、生理食塩水投与群が

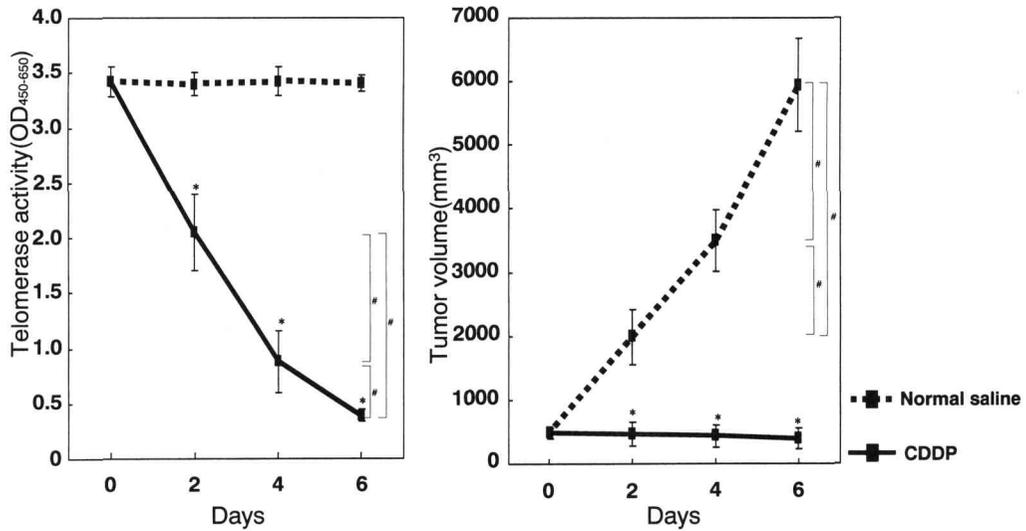


Fig. 6. Relationship between telomerase activity and tumor volume after administering CDDP 10 mg/kg doses. As in Fig. 5, PCR formations were determined by ELISA (left figure). Relationship tumor volume (right figure).

Significance was determined by Fisher's PLSD (# $p < 0.05$ ). Bars, SD.

\* : significant difference from normal saline ( $p < 0.05$ )

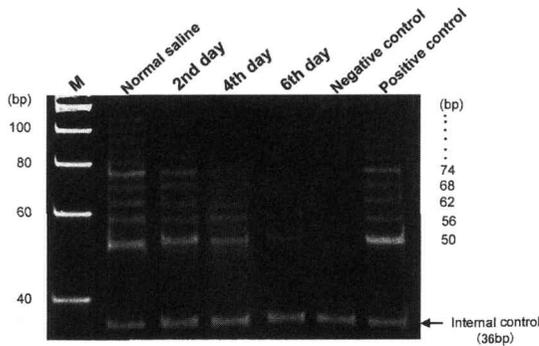


Fig. 5. Telomerase activity after CDDP 10 mg/kg. It was recognized that ladder band signals weakened and telomerase activity declined day dependently. M: 20bp marker.

OD 値  $3.75 \pm 0.08$ , 0.1mg/kg投与群が OD 値  $2.48 \pm 0.07$ , 1 mg/kg投与群が OD 値  $1.21 \pm 0.29$ , 10 mg/kg投与群が OD 値  $0.42 \pm 0.13$ , 25mg/kg投与群が OD 値  $0.43 \pm 0.06$ となり, TA は投与量の増加に従い有意に低下を示した。

腫瘍体積は, 生理食塩水投与群が  $5, 939.0 \pm 727.3\text{mm}^3$ , 0.1mg/kg投与群が  $4, 619.8 \pm 598.3\text{mm}^3$ , 1 mg/kg投与群が  $2, 055.8 \pm 231.5\text{mm}^3$ , 10mg/kg投与群が  $404.5 \pm 161.9\text{mm}^3$ , 25 mg/kg投与群は

$320.4 \pm 109.3\text{mm}^3$ と減少傾向を示した。10mg/kg投与群と25mg/kg投与群の2群間において, TAの低下および腫瘍体積の減少は, 有意差を認めなかった (Fig. 3)。

### 3. CDDP 投与方法と TA および腫瘍体積

25mg/kg投与群では体重減少による副作用が強くみられたため10mg/kgにて投与方法について検討した。10mg/kg単回投与群, 3.33mg/kgずつ3回連日投与群および3.33mg/kgずつ3回隔日投与群の3群間において, TAの低下および腫瘍体積の減少は, いずれも有意差を認めなかった (Fig. 4)。

### 4. CDDP 10mg/kg投与と TA および腫瘍体積

投与方法の違いによる TA および腫瘍体積の変動に差を認めなかったため, CDDP 10mg/kg単回投与にて経日的な TA を PAGE にて検討した。生理食塩水投与群および Positive control と比較して, 2, 4, 6日の順でラダーバンドのシグナルは弱くなり経日的な TA の低下が認められた (Fig. 5)。

同じ PCR 生成物を ELISA で測定した。TA は生理食塩水投与群と比較して CDDP 投与群において 2 日目が OD 値  $2.04 \pm 0.34$ , 4 日目が

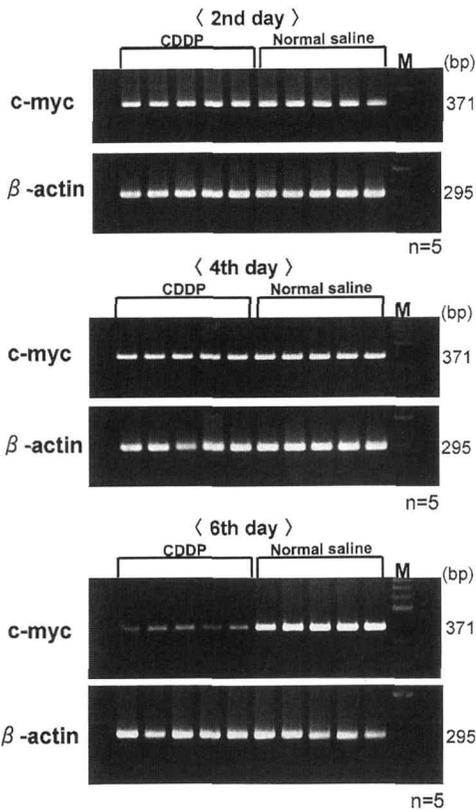


Fig. 7. Day dependent detections of c-myc mRNA after administering CDDP 10 mg/kg doses. M : 100bp marker.

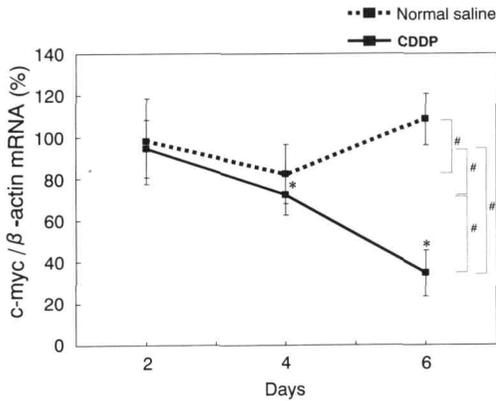


Fig. 8. Amount of c-myc mRNA detections after the administration of CDDP 10 mg/kg doses. Significance was determined by Fisher's PLSD (# $p < 0.05$ ). Bars, SD. \* : significant difference from normal saline ( $p < 0.05$ )

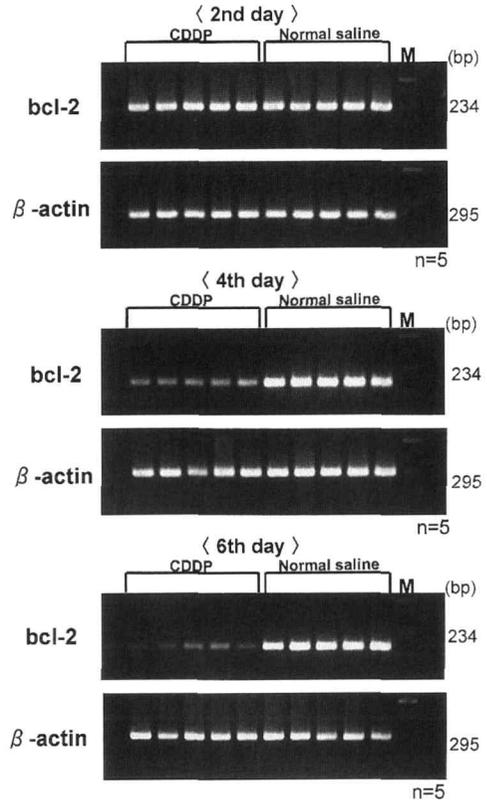


Fig. 9. Day dependent detections of bcl-2 mRNA after the administration of CDDP 10 mg/kg doses. M : 100bp marker.

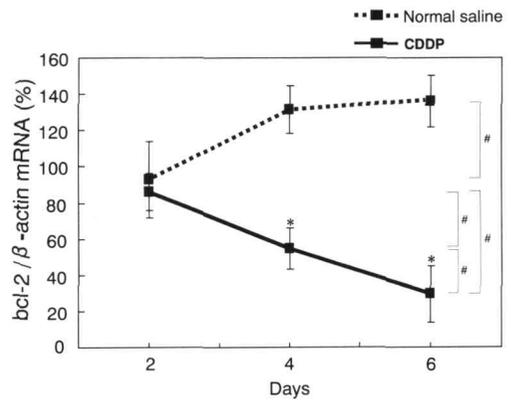


Fig. 10. Amount of bcl-2 mRNA detections after the administration of CDDP 10 mg/kg doses. Significance was determined by Fisher's PLSD (# $p < 0.05$ ). Bars, SD. \* : significant difference from normal saline ( $p < 0.05$ )

OD 値 $0.88 \pm 0.27$ 、6日目がOD 値 $0.39 \pm 0.06$ と経日的に有意に低下した (Fig. 6 左図)。腫瘍体積では生理食塩水投与群と比べ増大はみられず、わずかに減少傾向を示した (Fig. 6 右図)。

#### 5. CDDP 10mg/kg投与後の c-myc, bcl-2, 各 mRNA の発現

c-myc mRNA の発現は、投与後2日目では、生理食塩水投与群に比べてCDDP投与群での変化は見られなかったが、4日目では、CDDP投与群での発現量が減少傾向を示していた。6日目では、CDDP投与群における発現量の明らかな減少がみられた (Fig. 7)。

デントグラフで半定量した結果は、CDDP投与群4日目が $72.3 \pm 9.8\%$ 、6日目が $34.6 \pm 11.0\%$ と経日的に有意に発現量が減少した (Fig. 8)。

bcl-2 mRNA 発現は、2日目では、特に変化はみられなかったが、4日目では、生理食塩水投与群と比較して、CDDP投与群での発現が減少した。6日目では、さらに減少傾向を示した (Fig. 9)。

デントグラフで半定量した結果は、生理食塩水投与群が4日目 $131.5 \pm 13.2\%$ 、6日目 $136.1 \pm 14.3\%$ と発現量が有意に上昇した。CDDP投与群は4日目 $54.4 \pm 11.3\%$ 、6日目 $29.4 \pm 15.7\%$ と発現量が有意に減少した (Fig. 10)。

## 考 察

### 1. テロメア

正常体細胞が分裂可能回数限界をもつことは、Hayflickら<sup>12)</sup>によって報告され、細胞が分裂する際にはS期において染色体が複製される必要があるが、このときDNA合成酵素は染色体末端のテロメアDNAを完全に合成することはできない。そのためテロメアDNAの反復配列は、細胞分裂のたびに短小化することがわかっている (end replication problem)<sup>3~4)</sup>。テロメアのない染色体は染色体末端において融合や組み換えを起こしやすいことが知られており、その重要な機能は、遺伝情報の保護と染色体の安定化であると考えられている。

### 2. TRAP assay

TAの存在が1985年にGreiderら<sup>13)</sup>によって、原生動物であるテトラヒメナにおいて初めて実証され、その後、Morin<sup>6)</sup>がヒト (Hela細胞) TAを初めて検出した。1994年Kimら<sup>7)</sup>によって開発されたTRAP assay (telomeric repeat amplification protocol: TRAP) は高感度で能率的なPCRを用いた検出法で、少数の癌細胞や臨床検体で容易にTAが測定できるようになり、TAの研究を大きく発展させた。本研究に使用したKitはTRAP assayをもとに改良されたもので、PCRの遺伝子増幅技術とELISAの定量的技術を応用したものである。

1995年以降、TRAP assayによってあらゆる癌でTAが測定されるようになり、現在までに調べられた約3,000検体の臨床癌組織のうち約85%にTAが検出され、検出率0%の悪性腫瘍はない<sup>14)</sup>。頭頸部扁平上皮癌においても90%以上にTAが検出されている<sup>15)</sup>。本研究においてもTAは正常マウス皮膚組織では検出されず、マウス扁平上皮癌組織において高い活性がみられた。さらに、早期からTAの上昇がみられた。

### 3. 抗癌薬とTA

近年、多くの細胞毒性物質が培養細胞におけるTAの低下を引き起こすことが報告されている。Zhuら<sup>9)</sup>はdoxorubicin, 5-fluorouracil, methotrexateなどを投与したSW480結腸癌細胞でTAの著しい低下を報告し、これは細胞増殖阻害が原因であろうと示唆した。Faraoniら<sup>10)</sup>は, doxorubicin, temozolomid, CDDPを投与したT細胞白血病jurkat細胞, 組織球U937細胞および乳腺癌MCF-7細胞におけるTAの低下を報告し、TAの低下が細胞増殖抑制に関連することを示した。本研究においても、CDDP投与により腫瘍増大が抑制されTAは有意に低下した。CDDPの抗癌作用は、塩素が活性化されて2つの反応基をつくり、2本鎖DNAの間に結合しクロスリンクを作ることによるといわれている。この架橋形成はグアニンのN-7位に起こり

やすく、一方の鎖のグアニンと他方の鎖グアニンが白金によって結合し、DNA二重らせん構造の変性をきたし、DNA合成を阻害するとされる<sup>16)</sup>。このようなCDDPの作用機序により細胞増殖が阻害され、TAの低下につながったと考えられる。

#### 4. テロメラーゼの構造と機能

テロメラーゼは合成すべきテロメア反復配列の鋳型となるRNA成分TERC<sup>17)</sup>と触媒サブユニットTERT<sup>18)</sup>および付属タンパク質TEP1<sup>19)</sup>からなる。細胞の癌化にともないTERT発現が誘導されてテロメラーゼが活性化するとされる<sup>20)</sup>。また、テロメラーゼの制御に関与する蛋白TRF1およびTRF2が2本鎖テロメアDNAに結合している<sup>14)</sup>。

#### 5. MycおよびBcl-2

Mycは細胞増殖に関与しており、Myc蛋白の強制発現により正常細胞においてTERTの発現とTAの出現を認めたとするものや<sup>21)</sup>、逆にMycをanti-sense oligonucleotideにより抑制することで癌細胞のTAが減弱したともいわれている<sup>23)</sup>。Mycはtert遺伝子のプロモーター領域のE-boxに結合し転写を活性化し、これがテロメラーゼ活性の上昇に関与していると考えられている<sup>24)</sup>。本研究においてもCDDP投与後のc-myc mRNAの発現の減弱は、Myc蛋白のTAへの関与を示すものであった。

Bcl-2はアポトーシスを抑制する機能を持ち、ほぼすべての刺激で誘導されるアポトーシスを抑制できることからアポトーシス共通経路を遮断しているものと考えられている<sup>25)</sup>。Bcl-2の生化学的機能は、ミトコンドリアからアポトーシス誘導因子チトクロームCの放出を抑制することでアポトーシス抑制に関与しているとされている<sup>26)</sup>。本研究ではCDDP投与後、経口的にbcl-2の発現減弱がみられたが、当教室長内<sup>27)</sup>のBcl-2蛋白を免疫組織化学的に検索した報告を裏付ける結果となり、CDDP投与における腫瘍抑制とbcl-2の関連がさらに明確になった。

今回得られた結果から、TAが化学療法の効果を反映することが明らかとなった。また、Myc蛋白とTAの関連が確認できた。

近年、種々のテロメラーゼ阻害薬が研究されており<sup>28~29)</sup>、新たな抗癌戦略としての役割が期待されている。

## 結 論

担癌マウスのTAに及ぼすCDDPの影響について解析し、抗腫瘍効果の指標としてTAの有用性について検討した。また、TAの機序に関与するとされるc-myc、アポトーシス抑制に関与するbcl-2、各mRNAの発現について検討したところ、以下の結論を得た。

1. TAは正常マウス皮膚組織では検出されず、本マウス扁平上皮癌組織において高い活性がみられた。
2. TAは腫瘍細胞移植後早期から出現し、腫瘍の増大にともなって有意な上昇がみられたことから、癌の増殖に深く関与していると考えられた。
3. CDDP投与によりTAは有意に低下し、腫瘍増大が抑制されたことから、TAはCDDPの抗腫瘍効果の指標として有用であると考えられた。
4. CDDP投与によるc-myc mRNAの発現の減弱は、Myc蛋白のTAへの関与を示すものと思われた。
5. bcl-2 mRNAの発現減弱によりアポトーシス抑制が抑えられ腫瘍が縮小傾向を示した可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な指導、校閲を賜りました恩師関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。貴重な器材の使用をご快諾頂きご懇切な助言を賜りました本学細菌学講座佐藤成大教授に衷心より謝意を捧げます。また、ご親切な指導と鞭撻を頂きました当講座杉山芳樹助教授に深く感謝致します。さらに、本研究の遂行にあたり終始懇切丁寧な実験手技のご指導

を賜りました本学細菌学講座高橋清実講師に心から感謝の意を表します。また、デンストグラフを使用する際、ご協力を頂きました本学口腔病理学講座畠山節子講師に感謝申し上げます。最後に、様々な面にて御協力御援助を頂きました本学細菌学講座および口腔外科学第二講座医局員各位に深く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、1999年10月13日、第45回日本口腔外科学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Moyzis, R. K., Buckingharn, J. M., Cram, S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., Wu, J. R.: A highly conserved repetitive DNA sequenc, (TTAGGG) n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 6622-6626, 1988.
- 2) Muller, H. J.: The remaking of chromosomes. *Collecting net* 13 : 181-198, 1938.
- 3) Shampay, J., Szostak, J.W., Blackburn, E. H.: DNA sequence of telomerase maintained in yeast. *Nature* 310 : 154-157, 1984.
- 4) De lung, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., Varmus, H. E.: Structure and variability of human chromosome end. *Mol. Cell Biol.* 10 : 518-526, 1990.
- 5) Shay, J. W., Wright, W. E., Werbin, H.: Defining the molecular mechanisms human cell immortalization. *Biochem. Biophys. Acta* 1072 : 1-7, 1991.
- 6) Morin, G. B.: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleomrotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59 : 521-529, 1989.
- 7) Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Weight, W. E., Weinrich, S. L., Shay, J. W.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 226 : 2011-2015, 1994.
- 8) Mohammad, A., Vasef, Jeffrey, S. R., Michael, B. C.: Telomerase activity in human solid tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 112 : 68-75, 1999.
- 9) Zhu, X., Kumar, R., Mandal, M., Sharma, N., Dhingra, U., Sokoloski, J. A., Hsiao, R., Narayanan, R.: Cell cycle dependantmodulation of telomerase activity in tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 6091-6095, 1996.
- 10) Faraoni, L., Turriziani, M., Masci, G., De Vecchis, L., Shay, J. W., Bonmassar, E., Graziani, G.: Decline in telomerase activity as a measure of tumor cell killing by antineoplastic agents in vitro. *Clin. Cancer Res.* 3 : 579-585, 1997.
- 11) Hewitt, H. B., and Sakamoto, K.: The comparative survival of clonogenic cells of a murine epithelioma after irradiation in mice breathing air, oxygen and carbon dioxide, or hyperbaric oxygen. *Brit. J. Radiol.* 44 : 457-463, 1971.
- 12) Hayflick, L. and Moorehead, P. S.: The serial cultivation of human diploid cell strain. *Exp. Cell Res.* 25 : 585-621, 1961.
- 13) Greider, C. W., Blackburn, E. H.: Indentification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43 : 405-413, 1985.
- 14) Shay, J. W., Bacchetti, S.: A Survey of telomerase activity in human Cancer. *J. Cancer.* 33 : 787-791, 1997.
- 15) Mao, L., El, N. A., Fan, Y. H., Lee, J. S., Lippman, S. M.: Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res.* 56 : 5600-5604, 1996.
- 16) Zwelling, L. A. and Kohn, K. W.: Mechanism of action of cis-dichlorodiammine platinum(II). *Cancer Treat. Rep.* 63 : 1439-1444, 1979.
- 17) Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avillon, A. A.: The RNA component of human telomerase. *Science* 269 : 1236-1241, 1995.
- 18) Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H.: Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277 : 955-959, 1997.
- 19) Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R.: A mammalian telomerase associated protein. *Science* 275 : 973-977, 1997.
- 20) Nakayama, J., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Tahara, E., Ide, T., Ishikawa, F.: Telomerase activation by the catalytic component gene TRT in human primary fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nature genetics* 18 : 65-68, 1998.
- 21) Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., de Lange, T.: Human telomeres contain two distinct Mybrelated protein, TRF 1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17 : 231-235, 1997.
- 22) Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S.: Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 12 : 1769-1774, 1998.
- 23) Fujimoto, K. and Takahashi, M., Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against c-myc mRNA. *Biochem Biophys Res. Commun* 241 : 775-781, 1997.
- 24) 高倉正博, 京哲, 金谷太郎, 井上正樹: テロメラーゼに関する最新情報(その2), 産婦人科治療, 79 : 573-581, 1999.
- 25) Tsujimoto, Y.: Stress-resistance conferred by

- high level of bcl-2  $\alpha$  protein in human Blymphoblastoid cell. *Oncogene* 4 : 1331-1336, 1989.
- 26) Liu, X.: Induction of apoptotic program in cell free extracts, Requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 86 : 147-157, 1996.
- 27) 長内宏夫：マウス扁平上皮癌におけるシスプラチン誘導性アポトーシスの基礎的研究, 岩医大歯誌, 23 : 27-37, 1998.
- 28) Gomez, D. E., Tejera, A. M., Plivero, O. A.: Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 : 107-110, 1998.
- 29) Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., de Lang, T.: Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282 : 1484-1487, 1998.