

退任記念講演

細胞増殖のしくみ
—細胞周期, 癌遺伝子, 細胞老化—

井 出 利 憲

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
平成18年3月8日
(於：広島大学医学部第5講義室)

現在の所属機関：広島国際大学薬学部
現所属住所：737-0112 呉市広古新開5-1-1
現 E-mail address：tide@ps.hirokoku-u.ac.jp



井出 利憲 教授 略歴

1943年 東京都に生まれる

学歴：

- 1961年 東京大学理科Ⅱ類入学
- 1963年 東京大学薬学部進学
- 1965年 同大学卒業（薬学士）
- 1967年 東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了（薬学修士）
- 1970年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了（薬学博士）

職歴：

- 1970年 東京大学医科学研究所助手（ウイルス研究部）
- 1974年～1977年 アメリカ合衆国テンプル大学医学部留学
- 1977年 アメリカ合衆国テンプル大学医学部交換教授
- 1978年 広島大学医学部薬学科助教授
- 1985年 アメリカ合衆国テンプル大学医学部訪問教授
- 1988年 広島大学医学部薬学科教授
- 2000年～2002年 広島大学評議員
- 2002年 広島大学大学院医歯薬学総合研究科に改組，同教授
- 2002年～2003年 同研究科副研究科長
- 2003年～2005年 同研究科研究科長，広島大学評議員
- 2004年～2006年 広島大学出版会会長

2006年 東京大学客員教授（～2007年3月）

2006年3月 定年により広島大学を退職

所属学会：

日本生化学会（評議員）

日本癌学会（評議員）

日本薬学会（評議員）

日本細胞生物学会（評議員）

日本組織培養学会（評議員）

日本ウイルス学会

日本基礎老化学会

アメリカ癌学会

アメリカ微生物学会

はじめに

研究の歴史となると、昭和40年からの大学院や昭和45年からの助手時代の研究も含まれますが、ここでは助教授として広島大学へ赴任した昭和53年以降に限り、それも全部はお話しできませんので、その一部についてお話しすることにいたします。赴任する少し前の仕事を一つだけ紹介しておく、哺乳類細胞の DNA がスーパーコイル構造を持っている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した。

さて、本日の話はいくつかの項目に分けることができますが、ここでは全体を流れるテーマとして『細胞増殖のしくみ』と題してお話ししようと思います。概略的には、1) 細胞周期、2) 癌遺伝子、3) 細胞老化の3つに分けられます。主に細胞老化を中心にお話ししたいと思いますが、細胞周期と癌遺伝子の話もこれに直接関係するものであり、仕事としてはそれぞれ力を入れてきたものなので、前置きの少し紹介しておきたいと思います。なお、最終講義といえども講義であるということで、自分の仕事を中心に紹介いたしますが、若干その背景を含めたお話をいたします。

1 細胞周期

まず、細胞周期の仕事について簡単に紹介いたします。

1-1) 細胞増殖の調節

細胞増殖の調節を考えた場合に焦点になるのは、増殖と増殖停止の間の移行のメカニズムです（図1）。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 期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、その機構がどうなっているか、ということです。要するに、増殖調節というのは『細胞周期と G0 期の間の移行調節』のことである。

1-2) G0 期とは何か

G0 期というのは、細胞周期の中で、増殖する能力はあるけれども、環境条件によって増殖しない状態に保たれている、その状態を指します。体内にある大部分の体細胞は、増殖能力を持っているけれども、G0 期に留まっています。肝臓などの臓器を形成する細胞はもちろんのこと、生理的

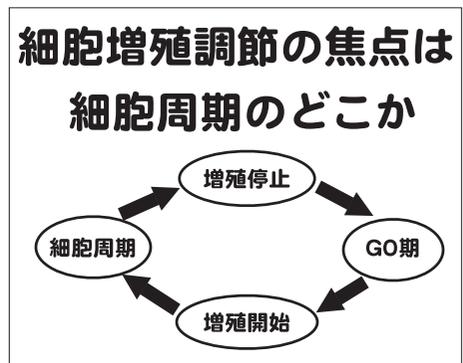


図 1

再生系といって、血球などのように細胞の置き換えがいつも起きている系でも、例えば骨髄の血球幹細胞には増殖していない細胞の方が多いと考えられています。培養系でも、完全に増殖を止めることはなかなか難しいけれども、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おくことで、比較的長い間増殖停止状態におくことができ、これはG0期と考えます。

これに対して、培養系における癌細胞は違います。癌細胞はG0期に留めておくことができず、増殖を続けるか、死ぬかのどちらかです。癌細胞とは要するにどういう細胞なのかを考える上でも、G0期の問題は中心的課題の一つと言えるわけです。

1-3) G1期とは何か

M期とS期の間のG1期の長さは、細胞によってしばしば大きな違いが見られますが、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であると考えられていました。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わかっており、当時はM期やS期と違って生化学的特徴がわかっておらず、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時代です。細胞周期内のG1期に一体何が起きているのかは分かっていなかったけれども、何か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期が開始するのだらうと考えられていました。ただ、根拠としてはきわめて間接的かつ断片的な証拠しかありませんでした。

1-4) G0期は細胞周期の中か外か

G0期というのは細胞が増殖停止している状態を指しますが、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ました。G2期と明らかに違うのは、DNA含量が2倍であり、増殖誘導するとやがてS期に入って、次いでM期へ進行するからです。ではありませんが、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、ふたつの考えがありました(図2)。

なお、図のなかにRポイント(restriction point)というのがS期の直前にありますが、これは、細胞周期の解析から、細胞がS期へ侵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す。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、そこで何が起きているかがかなりよく分かっております。後でまた出てきます。

1-5) 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留まっているのがG0期である、とするものです。G0期の細胞を増殖誘導したときには、残りのシーケンスをたどって進み、やがてS期へ入る、ということです。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期後半部分であって、細胞周期内のG1期を進行するプロセスとの間に特別な(質的な)違いはないであろう、と考えるわけです。

1-6) G0期は細胞周期の外である

これにたいして、G0期を細胞周期の外に描く考え方は、ひとつには、G1期の長さは細胞によって違うとは言うものの一般に10から20時間くらいであるのに対し、G0期というのは増殖誘導がかかるまでいくらでも(何年でも)そこにとどまっているという違いを、印象的に示すという意味があります。この場合、細胞周期というのは、あくまで増殖中の(細胞周期を回転している)細胞の有様を示しているわけです。

このように描く背景には、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期のプロセスとは構造的に違うのではないか、という期待があります。G0期から増殖誘導されてS期へ入るまでの時間は、必ず細胞周期内のG1期の時間より長くかかるので、それは、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特別なプロセスがあり、そのために時間がかかるからだ、と考えることが

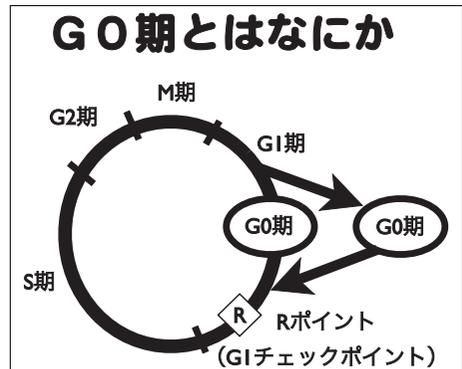


図2

できます。合流してからS期までのプロセスは共通であるとしても、です。ただ、細胞周期内にG0期を描く立場からは、G1期の進行に比べてG0期からS期までに時間がかかるのは、エンジン停止状態からフル運転までに時間を要するだけのことで、両プロセスに質的違いがあるのではない、と主張します。プロセスの中身がわかっていない段階では、どちらの立場でも何とでも言えるわけです。

1-7) どうすれば違いがわかるか

図としてどちらを採用するかはいつでもよいことのように思えますが、要するに、機構としてはどうなんだ、ということが問題なわけです。そこで、これをどうやったら調べられるかと考えました。

もし、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必要があるなら、その機能だけが変異した変異株をとれる可能性があります。とれただけで、G0期がG1期の外にあると考えるのが妥当と言えます。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わかると期待される。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とれないはずで、とれなかったときは、存在するはずがないのか、存在するけれどもとれなかっただけなのか、それは分からない。

1-8) G0期特異的温度感受性変異株を狙う

細かい話は省略せざるを得ないのですが、増殖に関わる必須の遺伝子が大きく変異した場合、変異株は増殖できなくなる可能性があります。増殖できない細胞がとれても実験に使えないので、ある条件では変異が現れるけれども、別の条件では変異が現れない、条件変異株を狙いました。具体的には、40度（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けれども、34度（許容温度）ではタンパク質が正常の高次構造、正常の機能を持つという、温度感受性変異株を狙いました。

狙いとする具体的な変異株はこういうものです。G0期に導入しておいた細胞は、増殖誘導したとき、34度なら細胞周期に入って増殖するが、40度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の細胞は、34度でも40度でもよく増殖を続ける。

実際の実験としては、ラットの繊維芽細胞である3Y1という細胞を使いました。よく増殖するだけでなく、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ます。まずG0期に導入した3Y1細胞を40度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。生き残った細胞を増やして、そ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とになります。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ました。

1-9) G0期特異的変異株細胞がとれた

苦労と努力の結果、目的とする性質をもった *tsJT60* と名付けた変異株細胞が一株とれました（図3）²⁾。白丸は34度、黒丸は40度です。図に示すように、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度では15時間くらい後にDNA合成を開始しますが、40度では全くDNA合成がおきません（図3A）。細胞数の変化（図3B）を見ますと、34度では血清を加えてから2日後には細胞数が2倍になりますが、40度では

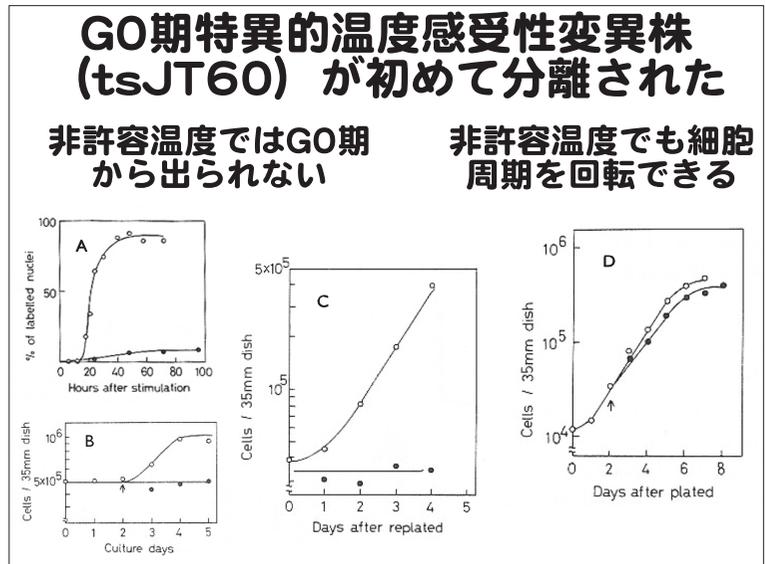


図 3

全く増えません。2倍になったところで止まってしまうのは、増える余地がなくなるからです。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度では増殖を開始して順調に増えますが、40度では全く増えられません(図3C)。これに対して、34度でよく増殖している細胞を40度にしても、ほとんど同じようによく増殖します(図3D)。何回も細胞周期を回転できる。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す。

さて、このような変異株細胞が得られたということは、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ます。つまりG0期を細胞周期の外に描くのが妥当である(図4)。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した。

1-10) この変異株はどのような性質であるか

実にたくさんのことを調べました^{3,11)}。40度でもG0期から脱出して細胞周期に入る方法はあるのだろうか。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)と一緒に与えると、G0期から脱出できます^{6,8)}。それぞれ単独ではいくら濃度を上げてみただけでした。これがなぜなのか、実は今でも分かりません。癌ウイルスであるSV40を感染させると、40度でもG0期から細胞周期に入りました⁵⁾。後で出てきますが、これについては今なら説明がつかえます。

その頃、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ました。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度でも34度と同じようにおきました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度でも進行しており、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ました^{3,4)}。しかし、40度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度でも超えられる。

現在ではこの辺りの細胞内反応について、サイクリンやCDK(サイクリン依存的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ますが、当時はほとんど分かかっていませんでした。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期にとどまれなくなった細胞であることを考えれば当然のことですが、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が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ました。

この辺りのことについて、1986年の生化学という雑誌に41ページにわたる総説『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刷りまで行きました¹³⁾。

1-11) 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)からとった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、哺乳類細胞でもぼつぼつ始まっていました。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、変異細胞をとった直後からこれを試みました。長い間、手を替え品を替えてしつこく努力しましたが、結論から言えば、不成功に終わりました。不成功と一言で終わってもよいのですが、少しこの辺りの背景、経緯を紹介したいと思います。

1-12) クローニングの問題点

問題点はいくつかあります。一つは、変異株の性質からくるものです。正常DNAを導入したとき、野生型に復帰した細胞を濃縮・単離するには、40度でもG0期から脱出する、という性質を使う他ありません。しかし、元の変異細胞自身が、40度でも100個に1個くらいはG0期から出て増殖するのです。図で見るように、細胞集団として見ると、ほとんどの細胞がG0期から出られないと言えますが、100個に1個くらいはどうしても漏れる。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と思われる。3Y1以外の細胞では、この値はもっと高くなります。DNA導入による野生復帰株は、せいぜい10のマイナス6乗程度しか得られないと考えられま

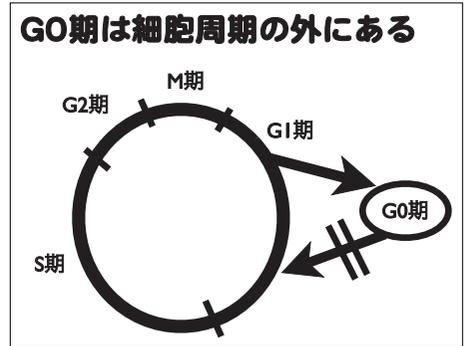


図 4

すから、これに比べてバックが高すぎます。

二つ目は、自然復帰変異株の頻度です。温度感受性変異株というのは、遺伝子のほんのちょっとした違い（おそらく1塩基置換）によって、つく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す。1塩基置換は、細胞を継代維持する間に、もう一度変異が起きて正常に復帰（自然復帰）する可能性が高い。一般には10のマイナス6乗程度は起きる可能性があるし、*tsJT60*ではもっと高いことが分かりました。

三番目は、DNAを導入する効率です。こういう方法で遺伝子をクローニングするには、遺伝子の導入効率の良い細胞を使います。遺伝子（cDNA）を導入したとき、効率の良い細胞では導入された細胞は数十%の頻度で得られます。ところが、*tsJT60*は異常に導入効率が悪く、10のマイナス6乗程度しかありませんでした。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、さらにそのマイナス6乗以下と考えられます。

実験を進めつつこれらが分かったわけですが、実に難しい話だったわけです。

1-13) 問題点への挑戦

それでも一つ目の問題については、意外な展開がありました。SV40という癌ウイルスが、この変異細胞を40度でもG0期から脱出させることは前に言いました。予想通り、SV40の癌遺伝子であるT抗原遺伝子で癌化（トランスフォーム）させた変異細胞は、G0期に留まらず両温度でよく増殖しました。さらに様々な癌遺伝子を導入してトランスフォーム細胞をとったところ^{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度ではすごい勢いで増殖しますが、40度では急速に死滅することが分かりました（図5）^{9,10)}。1日で大部分の細胞が死んで浮き上がってしまう。10の7乗くらいの細胞が生えていても、2日後にはほとんどシャーレに残っていない。シャーレ10枚使って正常細胞のDNAを導入すれば、復帰株（これは生き延びてシャーレに残る）が10の8乗に一つしかなくても回収することができるはずですが。

ただ、この性質が、*tsJT60*に起きている遺伝子の変異に由来するのか、変異遺伝子とは関係なく、たまたま*tsJT60*と言う細胞クローンの性質にすぎないのかは問題です。後者なら、この方法で変異遺伝子をクローニングすることはできません。しかしこの性質は、*tsJT60*の他にもう一つ得られた同じ性質を示す変異株をトランスフォームしたときにも見られたので、変異した遺伝子によると考えられました。

二番目の問題は工夫しようがありませんでしたが、三番目の問題については、DNA導入法を様々に工夫して、cDNAの導入なら10のマイナス3乗くらいにまで導入頻度を高めることができました¹¹⁾。導入する材料としてゲノムDNAを使うかcDNAを使うかは、それぞれ利害得失が考えられますが、その両方について実際にいろいろ試してみました。比較的最近に至るまで、新たな可能性を考えつくとそれを試してみました。

結局それでも残念ながら成功にはいたりませんでした。一言で言えば不成功、と言う他ありませんが、何事も大変なことであるという至極当たり前の一例として紹介した次第です。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ました¹⁴⁻²¹⁾が、それについては省略いたします。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が得られています²²⁻²⁹⁾が、省略いたします。

2 癌遺伝子

2-1) 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ました。今では、癌遺伝子と癌抑制遺伝子それぞれの働きがずいぶんよく分かってきておりますし、細胞周期の観点からだけでなく、癌細胞としての様々

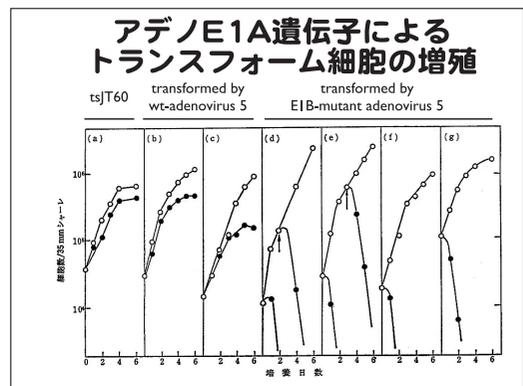


図 5

なふるまいにどう影響しているかが分かってきています。しかしここでは癌遺伝子に関する一般的なお話は省略いたします。

当時、SV40 という DNA 癌ウイルスのもつ T 抗原という癌遺伝子（タンパク質も同じ名前）は、使いやすいこともあって、広大へ赴任する前から使っていました。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ました。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、ただ単に強力な増殖因子として働くだけのように見えますが、普通なら到底 DNA 合成できないような条件、たとえば、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 合成を誘導します。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度で DNA 合成を誘導します^{5,7)} し、後から述べるように老化細胞にさえ DNA 合成を誘導します。

2-2) T 抗原は細胞を G0 期にとどまれなくする

要するに、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なわけです。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 期にとど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』ことにあります。

もちろん、これだけが癌細胞の特徴ではありませんが、例えば、癌細胞の持つもう一つの大きな性質である『転移』と言う現象に関しても、正常な細胞なら、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 期に留まらざるを言えないのが普通です。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。増殖できなければ、そう大きな問題にはなりません。環境からの増殖抑制シグナルにも関わらず、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わけです。

で、T 抗原はどのようにして細胞を G0 に留まれなくしているかに注目して、いろいろと仕事をしました³⁰⁻³³⁾。まあ、たいした成果とは言えないかも知れませんが、少し前の仕事を ProcNAS に出しました³²⁾ し、広大へ来てからの仕事が Nature に載りました³³⁾。もっとも、Nature の仕事は、実験解釈上大きな問題のあることが後に分かりました。

2-3) T 抗原の働きに関する現在の理解

私たちの貢献はささやかなものですが、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ます。一つは、T 抗原にはヘリカーゼの活性があり、ウイルスの DNA 複製開始に関わる必須の因子であることが分かっています。二つ目は、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関わるだけでなく、様々な細胞遺伝子の発現抑制、発現促進に働くことが分かっています。

三つ目は、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ことです。癌抑制遺伝子というのは、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している、増殖のブレーキです。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。もうちょっと詳しい話は後から出てきますが、p53 や RB タンパク質は、先ほど出てきた R ポイント、現在では G1 チェックポイントという方がなじみ深いかもしれませんが、における重要な役割を果たしています。要するに、通常は G0 期から簡単に脱出できないように働いているタンパク質を、T 抗原が無効にしてしまう、それが細胞周期における T 抗原の重要な働きである。

2-4) 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りますが、事態はもう少し複雑です。話は終わっていない。温度感受性変異のある T 抗原遺伝子をもった 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。詳しく見ると、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 とも結合できないなど、T 抗原の働きが完全に失われているように見えます。ところが、なんと、この条件下でも細胞 DNA 合成は誘導されるのです³⁵⁻³⁸⁾。これは上記の T 抗原の機能だけからは説明困難で、細胞の持つ R ポイント機構を理解する上でも、新たな発見につながる可能性がある重要なことと思ひ、だいぶしつこく追いかけてきました。

実は、SV40 を感染したときにも、T 抗原遺伝子を導入したときにも、T 抗原のほかに small t 抗原というタンパク質が作られます。これが何かしている可能性があります。もう一つは、T 抗原が細胞内で結合しているタンパク質として p53 と RB が有名ですが、それだけではないらしい。他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。このあたりについて定年間際まで追いかけてきましたが、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ません。

3 ヒトの老化と細胞老化

次に細胞老化の話に入りますが、その前にイントロダクションとして老化について少しお話いたします。

3-1) 老化と寿命

老化のしくみを考えるに際して、ごく概略的に考えてみると、図6のようになるかと思えます。生まれてから成長期には様々な意味での体の活性、生理活性ともいうものは上り坂にある。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。注目する対象によって急速に低下するものもあれば、緩やかに下降するものあることは以前から云われていたことですが、全体として下降傾向を辿ることはさげられない。このカーブを押し下げるのは生体を障害する様々な要因、一言で言えばストレスです。これに対して、生体の持つ恒常性維持機構はこのカーブを押し上げ、あるいは維持しようとする。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いる。下降して機能維持が限界に達するところが老衰による死である。そういう概略的なことは良いとして、具体的に何が起きているかが問題です。

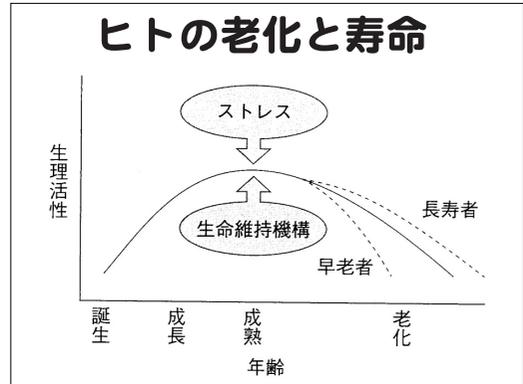


図 6

下降して機能維持が限界に達するところが老衰による死である。そういう概略的なことは良いとして、具体的に何が起きているかが問題です。

3-2) 老化の外因と内因

老化に関わる要因を、これもごく概略的に外因と内因とに分けて考えてみます。

外的要因としては、単純には損傷の蓄積です。DNA の損傷が歳とともに蓄積することは良く知られていますし、変性タンパク質や、過酸化脂質の蓄積もいわれていることです。これらの原因としては活性酸素が注目されています。もちろん、体外からの活性酸素もありますが、体内で発生する活性酸素が大きな寄与をしています。皮膚の老化には紫外線の影響が大きいなどとも言われている。云うまでもなく、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の蓄積が進行することは良く知られていることです。損傷の多くは修復されますが、修復は不完全で、損傷の蓄積は不可避と云えます。

内的要因としては、遺伝子が関わるものです。最近、長寿遺伝子として注目されているのは、非常に長寿の家系の方が持つ遺伝子レベルでの特徴です。多くの遺伝子にはヒトによってわずかの塩基配列の違い、たとえば SNP (single nucleotide polymorphism) があって、その結果、できるタンパク質の機能にわずかの違いを生じる。これが、たとえば成人病を発症させやすい体質とさせにくい体質の違いを生じる。こういった遺伝子レベルの違いの集積が、カーブを押し上げる恒常性維持機構の強弱にも影響するに違いありません。また、遺伝子の変異によっておきる遺伝的早老症の話の後で紹介しますが、多くはゲノム損傷の修復に関わる遺伝子であることを考えると、正常に働いていれば老化進行を妨げるように働いている、とも云えます。もう一つ、遺伝子とは云えないけれども DNA の老化への関わりとして、後でお話するテロメアがあります。

3-3) 生存曲線

図7は、18世紀のウイーンと20世紀のアメリカの生存率曲線です。要するにそれぞれの時代の先進国ということですが、平均寿命が著しく延びていることが見て取れますが、相似形の曲線が次第に右へ移動していく、

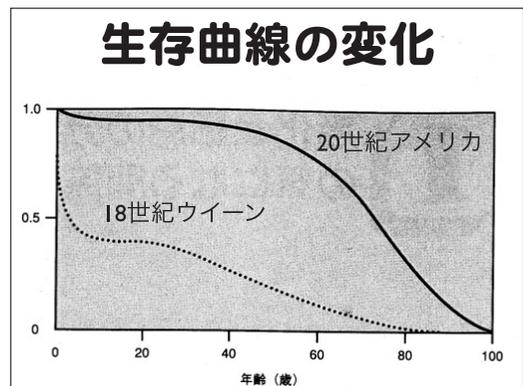


図 7

という変化ではないことが明らかです。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いなかった。その後も感染症で死ぬヒトもいて、平均寿命は短かった。この図では見にくいのですが、最大どこまで生きられるかという最大寿命は、昔も今もそんなに変わっていません。

日本は高齢化社会になったといわれますが、いわゆる百寿者が近年ものすごい勢いで増えていることは、よくご承知のことと思います。必ずしも入院しているような老人が増えている訳ではなく、元気な老人が増えている。

これらのことは以下のように整理出来ると思います。

- 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ていること、一見、老化の進行が遅くなっているように見えるのは、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歳と云われる)は伸びているわけではなく、生物学的寿命の限界は変化していない。

あるいは、平均寿命の伸びと、老化の進行と、最大寿命とは、相互に関係はあるもののある程度別に考えるべきことであろうと思います。日本人の寿命の延長は、医療環境が良くなった、衛生環境が良くなった、栄養事情が良くなった、などによって平均寿命(ゼロ歳児の平均余命)が著しく伸びて、その背景の上で、長寿になる可能性をも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、と考えられるように思います。

3-4) 老化と細胞再生能力

老化の過程で何が起きるのかについては膨大なデータの蓄積がありますが、なかでも、細胞再生能力が低下し、その結果、細胞数の減少、組織・臓器の萎縮が起きることは共通的な特徴です。もちろん、細胞数だけでなく、細胞機能の低下も見られることが多く、両者相まってシステムとしての劣化が進行する。

もちろん、老化を考える際には、良く云われるようにコラーゲンなど細胞間基質の劣化も考慮する必要はありますが、細胞間基質の代謝も細胞が果たしていることであり、細胞の老化はより重要であることは言うまでもないと思います。

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です。増殖能力を失った体細胞としては、終末分化した血球や表皮細胞などがありますが、これらの細胞は、幹細胞の分裂によって日常的に供給され続けています。ただ、神経細胞や骨格筋細胞などの終末分化細胞は、日常的に幹細胞から供給されることは一生を通じてほとんどないものと考えられます。従ってこれらの細胞は、細胞としての寿命がほとんど人の一生と同じほどに長いとはいえ、損傷蓄積による死は免れず、細胞が死ぬと補給して組織再生することが難しく、脳では毎日数万個の神経細胞が死んで失われると云われています。

これにたいして、大部分の体細胞は、普段は増殖停止状態に保たれて機能を果たしているわけですが、増殖能力をもっていて、必要に応じて多かれ少なかれ再生する能力を持っています。一つの典型例は肝細胞です。普段はほとんど増殖していないが、肝切除後には直ちに旺盛な増殖を開始して再生する。肝臓ほどではないにせよ、ほとんどすべての体細胞には再生能力がある。問題はこれらの細胞がどのように老化するかです。結論的には、すべての体細胞(これには体幹細胞も含まれます)には細胞分裂できる回数に限界があります。分裂可能回数は有限で、このために細胞は老化する。その辺りについてこれからお話しいたします。

4 細胞老化

4-1) 細胞老化とは

細胞老化とは何か。発端は1961年にさかのぼります。ヒト胎児から細胞をとってきて培養すると、細胞は一定の分裂回数の後に増殖停止することがヘイフリックによって報告されました³⁹⁾。これを細胞の『分裂寿命』といいます。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、異なる胎児を使っても、同じ臓器に由来する細胞は同じ分裂寿命を持つ。胎児ではなく、生まれた後のヒトからとった細胞は分裂寿命が短く、年齢が高いヒトからの細胞ほど分裂寿命が短い。このような結果から、分裂寿命というのは『細胞老化』であり、細胞老化はヒトの老化の原因になる、と考えられました。一つの細胞が年月とともに劣化する、という意味ではなく、分裂能力がなくなることを細胞老化と呼ぶわけです。

しかし、細胞が老化するのはなぜか、その機構については長い間不明でした。結局、1990年代になって、テロメア短縮が原因であることが分かるまで、激しい批判にさらされていました。それまでたくさんの研究者によって、現象としては再現性あるものと認識されてはいましたが、要するに、細胞培養の技術が不適切なためであって、細胞

胞本来の性質は無限増殖できるはずである、という批判に答えることができませんでした。要するに、細胞老化とは培養系の不備によるアーティファクトである。

4-2) 老化細胞とは

アーティファクトであるのか、細胞自身が持つ本質的な性質と見るべきなのかは分からなかったわけですが、とにかく一定の回数分裂の後に、不可逆的な増殖停止状態に陥ることは確かでした。癌細胞は G0 期にとどまれなくなった細胞であり、老化細胞は G0 期から脱出できなくなった細胞である。老化細胞がなぜ G0 期から脱出できないのかは、G0 期と細胞周期との移行に注目していた我々にとって、重要なテーマであると考えました。以下のようなことを考えながら進めてきました。

- 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ます。

4-3) 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りました。それぞれ詳しく説明したいところですが、このあたりは項目を挙げるだけにして先へ進みます。

- 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) どん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

このあたりの老化細胞の性質は、同じ頃に分離した G0 期特異的細胞周期変異株が非許容温度で示す性質と、大変よく似ているように見えます。従って、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言う期待を持ちました。

4-4) 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 抗原の実験についてちょっとコメントしておきます。T 抗原遺伝子の導入によって分裂寿命が延長するわけですが、ここで一つの疑問が生じました。T 抗原は細胞自身の老化に至る過程を遅延させる結果として分裂寿命を延長させているのか、それとも、細胞自身の持っている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として分裂寿命を延長するのか、という疑問です。当時としては、後者が正しいけ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ました。これを確認するために、前者なら正常細胞が老化する代数を超えたところで T 抗原を失活させても細胞はしばらく増殖を続けるだろう、後者なら正常細胞が老化する代数を超えたところで T 抗原を失活させると直ちに増殖を停止するだろうと考えて、実験をくみました。結果は 11) 12) に要約した通りですが、予想に反して、後者が正しいとする結果が得られたわけです。つまり、T 抗原があっても、細胞自身の老化に至る過程の進行は影響されることなく進

行っており、老化による増殖の限界を T 抗原が乗り越えさせる、と考えられます。後で紹介するように、具体的な機構が分かってみれば、細胞の老化はテロメアが 5 kbp まで短縮することで起こることであり、テロメア短縮の時点で稼働している増殖停止機構を T 抗原が阻害することで細胞は延命しますが、さらにテロメアが短縮することで、ついに死滅します。

4-5) 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ちょっと加えますと、老化した繊維芽細胞では、なぜか $\beta 2$ ミクログロブリンの発現が著しく上昇します⁴⁶⁾。インターフェロンで誘導される遺伝子も上昇し、インターフェロンの発現も上がります^{46,55)}。これは偶発的なことにすぎないのか、老化細胞では特定遺伝子のプロモータが活性化されることの一つの現れなのか、これらの遺伝子が発現することが老化細胞の機能として意味があるのかなどの疑問について、それなりに解析を進めたかったのですが展開できませんでした。その他にも、老化細胞に関わる仕事がありますが、省略します^{49,52,54)}。

5 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ました。これが、細胞の分裂寿命あるいは細胞老化の原因として、一躍脚光を浴びました。

5-1) テロメアとは何か

よく知られているように、真核生物のゲノム DNA は直鎖状です。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ます。多くの生物で 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、ヒトを含めた哺乳類では、共通して 5'-(TTAGGG)-3' という 6 塩基からなる繰り返しが数千回くりかえされ、ヒトの体細胞ではおよそ 10 kbp の長さを持っています。これをテロメア DNA と言います (図 8)。

不思議なことに、実験によく使われるマウスやラットのだけでなく、ウシ、ウマ、ブタなど、多くの哺乳類のテロメア DNA は 50 kbp と長いことが多い。調べてみて驚いたのですが、霊長類でも、ニホンザルをはじめ、ヒトに最も近い類人猿であるチンパンジーやゴリラなどでも 50 kbp 程度あって、ヒトに比べて著しく長いことが分かりました⁵³⁾。ヒトは哺乳類の中で特に短い。なぜこうなのか理由は分かりませんが、このことが、後で述べるようにヒトの老化にテロメアに関わるという結果を生んでいるらしい。

テロメア DNA の大部分は二本鎖で、反対側の鎖は言うまでもなく 3'-(AATCCC)-5' で、G を含みません。こういう特殊な塩基配列なので、通常の意味での遺伝子はここには存在しません。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、これを一本鎖オーバーハングと言いますが、G を含む鎖なので最近では G テイルと呼ばれます (図 8)。およそ 100 塩基くらいの長さで、テロメア DNA 全体から見れば短いものですが、すぐお話するように、これは非常に大事な役割を持っています。

5-2) なぜテロメアが必要か

真核生物の DNA はなぜテロメアという構造を持っているのだろうか。それは、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、そのように作られている、ということによると思います。どういうことか (図 9)。

原核生物の DNA は基本的に環状二本鎖 DNA です。これには末端がない。真核生物の DNA は直鎖状で、もちろん末端があります (図 9 A)。ただ、事実上末端はないに等しいといえます。なぜか。ヒトの体細胞一つは約 2 m

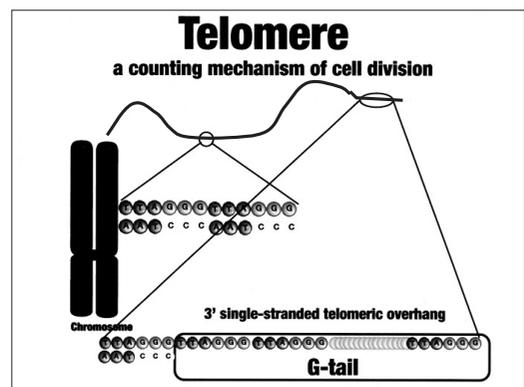


図 8

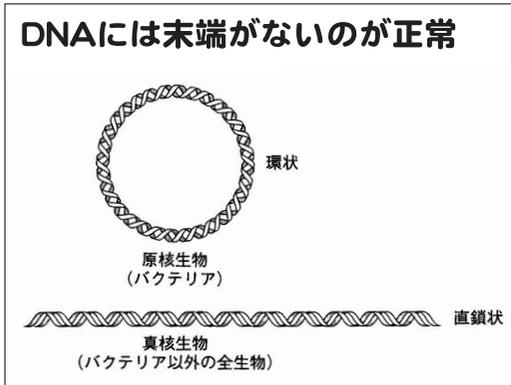


図9 A

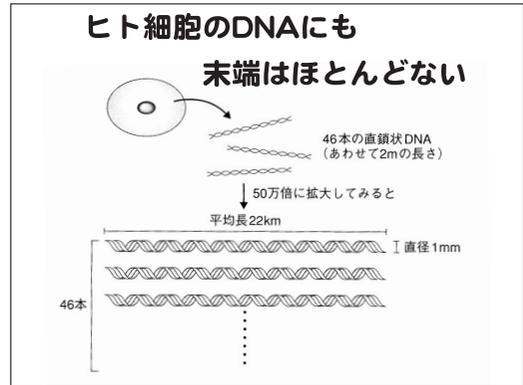


図9 B

の長さのDNAをもっています。これが46本に分かれています。直感的に分かりやすいようにDNAのサイズを50万倍に拡大してみますと、細胞一つは、直径1mmで長さが22kmもある細長いDNAを46本持っていることになります(図9B)。DNAというものはどこを見てもほとんど末端が見あたらないものである、という意味が分かります。

もし、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します。DNAの損傷は実は日常的に起きていますが、切断は死に直結する一大事ですから、細胞はいつでも損傷の有無をチェックし、損傷をなす修復酵素を用意して、切断があればすぐに修復しようとします。すなわち、末端があればできるだけ速やかに再結合させるように待ち構えている。

しかし、直鎖状DNAの本来の末端はつながっては困ります。一番単純には、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二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ます。これは多くの場合、細胞死につながります。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、少なくとも役割の一つです。

5-3) テロメアの構造

テロメアDNAはループを形成して、末端を隠していることがわかりました(図10A)。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します。元のテロメア二本鎖DNAの一本は外れて小さなループを作る。これをDループと言います。この結果、テロメアDNAは大きなループを形成しますが、これがtループ(telomere loop)です。

これで末端が隠されるわけですが、DNAだけでこれができるわけではありません。Dループを作るところに結合する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というタンパク質があります。これらはいずれもテロメアDNAの塩基配列を厳密に認識して結合するタンパク質で、塩基配列が一つでも変化すると、結

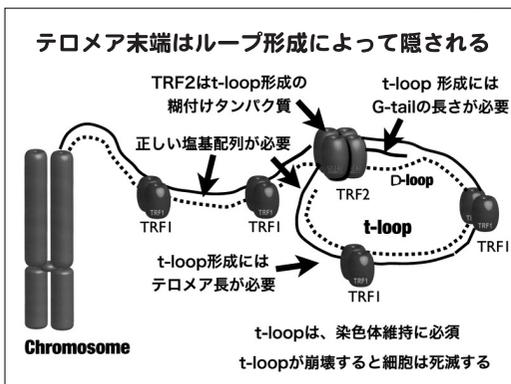


図10 A

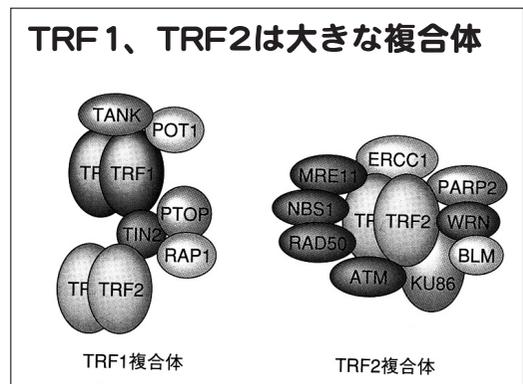


図10 B

合できないあるいは結合が弱くなります。これらは、多くのタンパク質と結合した複合体を作っているようです(図10B)。

実際にはこれに加えてさらに多くのタンパク質が結合していて、最終的には核膜のすぐ内側に存在する、ヘテロクロマチンの中に組み込まれていると考えられます。ちなみに、テロメア DNA 部分は通常の DNA 部分と違って、ヒストンと結合したヌクレオソーム構造をとっていません。

と言うことで、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)、などがわかりました。

6 テロメアは短縮する

6-1) テロメアは DNA 複製ごとに短縮する

テロメア DNA は複製のたびに短縮します。DNA 複製機構の性質として、末端部分に近いところの RNA プライマーは、DNA におきかえられません。そのため、複製終了時には娘鎖の 5' 最末端部分は短縮せざるを得ません。実際には、複製ごとにおよそ100塩基分程度短縮します(図11)。娘鎖の 3' 最末端側では、鋳型鎖との間で最後まで二本鎖ができそうですが、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ため、娘鎖の 3' 最末端側では鋳型鎖の方が100塩基分くらい分解されるものと考えられています。こうして、複製のたびに鋳型鎖も娘鎖も 5' 最末端が100塩基くらい短くなるわけです。

末端まで複製できないことは、複製機構が明らかになった1970年代から言われていたことで、末端複製問題と言いますが、実験的な証明は、テロメア DNA を測定する方法が工夫された1990年頃まで待たなければなりませんでした。

6-2) テロメア DNA は実際に短縮する

培養細胞で詳細に調べてみると、図12に示すように、はじめは 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します。1回の分裂でおよそ 100 bp くらい短縮する。重要なことは、およそ 5 kbp くらい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す。

5 kbp と言いましたが、これはあくまで平均値で、いくつかの問題を含んでいます。ひとつは、細胞ごとにテロメアの長さにはばらつきがあり、細胞一つをとっても染色体によって末端のテロメアの長さは異なっています。これはもっと後になって、蛍光標識したテロメアプローブをハイブリダイズして、テロメアごとの蛍光強度を測ることで確認されました。従って、テロメアサイズには大きな幅があり、5 kbp と言っても平均値でしかありません。染色体末端のテロメアの 하나가短縮の限界に達すると、細胞は増殖を停止する考えられていますが、厳密な証明は困難です。

もう一つは、テロメア長の測定法の問題です。通常、ゲノム DNA を制限酵素で切断し(テロメア配列は切断さ

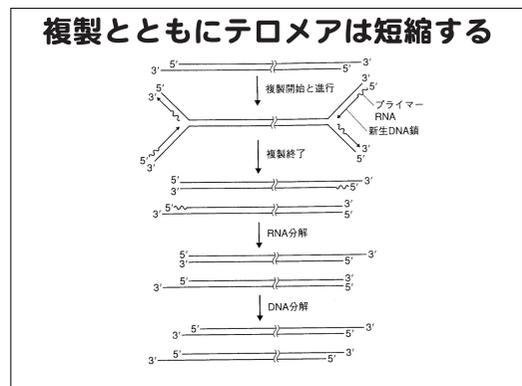


図11

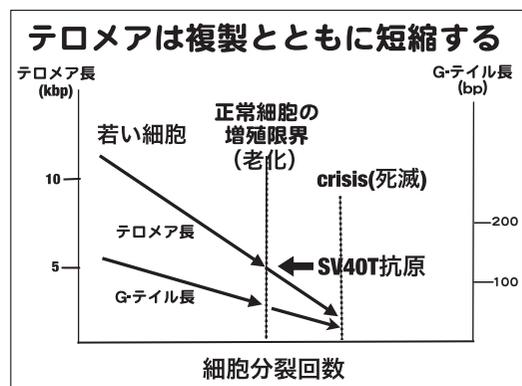


図12

れない)、電気泳動後にサザン解析します。ここで示されるテロメアサイズには、テロメア領域に加えて制限酵素で切れる部位までのテロメア以外の配列が含まれます。

そういう問題はありますが、繊維芽細胞だけでなく、血管内皮細胞等でも同様にテロメアが 5 kbp 程度になると増殖が止まります。これが、細胞老化です。

先ほどもちょっと言いましたが、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ます (延命)⁵⁵⁾。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 (図12)。これが crisis です。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おき、異常な核を持った細胞が急増します。

こうして見ると、テロメアが 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必然的に増殖できなくなるのではなく、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、と考えられます。増殖停止した老化細胞はすぐ死ぬのではなく、長期間生存することは前に述べた通りです。これについては後でもう一度述べます。後から紹介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⁾を出しました。

6-3) G テイルも短縮する

最近まで G テイルを測るうまい方法がなかったのですが、高感度で定量的に測れる方法を開発して2005年に Nature Methods に報告いたしました⁵⁸⁾。方法の詳細は略しますが、これで測ってみると、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 テイルも短縮することが分かりました (図12)。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してしまいます。

分裂寿命には、テロメア全体の短縮が問題なのか、G テイル短縮が問題なのか。当然と言えば当然ですが、どちらが変化しても分裂寿命に影響するらしいけれども、G テイルの重要性は明らかです。たとえば、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しますし、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思います。

6-4) 体内の細胞でもテロメアが短縮する

図13は我々のデータではありませんが、末梢血液中のリンパ球のテロメア長を調べたものです⁵⁹⁾。血球はサンプルの採取が容易なので、多くの報告例がありますが、概略似た結果が得られています。ここから3つのことが読み取れます。一つは、概略的には、年齢の高いヒトほどテロメアが短いということです。二つ目は、同じ年齢でも個人差が相当に大きいということです。三つ目は、5 kbp 以下の平均テロメア長を持つ例がないということです。60歳あたりから、平均テロメア長が 5 kbp 程度になるヒトが出てきます。単純に図を外挿すれば、高齢者では 5 kbp 以下の例があっても良いように見えますが、そうならないのは、リンパ球の場合でもテロメア長が 5 kbp あたりまで短縮すると増殖が悪くなり、それ以下にはならない、と理解できます。

リンパ球は様々な機能を持ったサブタイプがあり、ここで見ているのはあくまで平均値ではありますが、60歳を超えるあたりから、ヒトによってはある種のリンパ球の増殖が悪くなるとすれば、結果として感染に対して弱くなるのか、逆に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ります。実際、60歳くらいからそのような変化が顕著に現れてくる。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、というべきかもしれません。

図14は第一内科の先生方との共同研究による肝臓の場合です。まず、測定法を改良し⁶⁰⁾、それを使って測定しました⁶¹⁾。正常肝、と言っても異常があって切除された肝臓の正常部分ではありますが、個人差は大きいものの概略的には年齢とともにテロメアが短縮することが分かります。年間 100 bp くらい短縮する結果で、細胞分裂 1 回あ

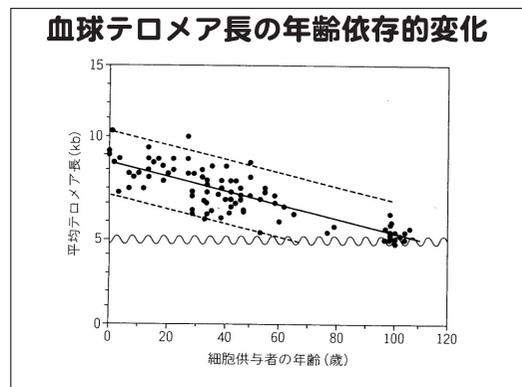


図13

たり 100 bp くらい短縮するとすれば、この結果からは肝細胞はおよそ年1回分裂する計算になり、教科書的な記述とよく合っています。ただ、最初の長さが長いので、高齢者になってもまだ5 kbp より遥かに長く、この観点からは、肝細胞は高齢者でも十分な再生能力がありそうです。

ただ、慢性肝炎あるいは肝硬変では、同じ年齢の健康者に比べて遥かにテロメアが短い。このような肝臓では局所的な細胞再生を繰り返していることを考えれば、至極妥当な結果です。中には 5kbp あたりまで短縮している例があり、このような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のではないかと思います。

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遥かに短縮している例があります。血管内皮細胞のテロメアが短縮して増殖限界に達すれば、内皮細胞の再生が悪くなる結果、損傷部位では基底膜が露出して血栓ができやすくなる等、病変部をさらに増悪させると考えられます。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のだそうです。血管内皮細胞のテロメア短縮の程度は、老化を考えるうえで注目に値します。

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います。ほとんどの組織で年齢とともにテロメアが短縮しますが、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ます。

6-5) 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、細胞の置き換えが必ずありますから、年齢とともにテロメアが短縮することは避けられませんが、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わけではありません。ただ、リンパ球のように、早いヒトでは60歳くらい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ります。組織によっては健康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ります。こういったことが、損傷修復の不全、再生の不良を引き起こし、組織の萎縮や機能低下、病変の増悪とあいまって、老化という総合的な症状の現れにつながる可能性があると思います。

図15に示したのは私たちのデータではありませんが、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2群に分け、以後15年間にわたる生存率の変化を見たものです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、有意に高いことがわかります。テロメアが短かった人たちは、心臓血管系や感染症でなくなる頻度が高かったということです。血球のテロメアが短かったことの結果なのか、他の体細胞のテロメアも同様に短かったことが問題なのか分かりませんが、ちょっと恐ろしい結果です。

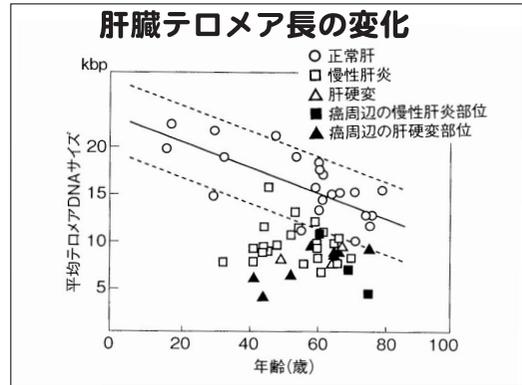


図14

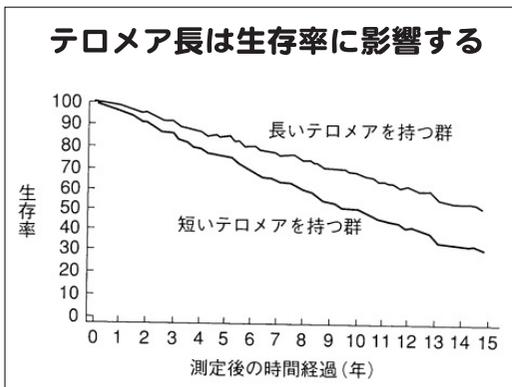


図15

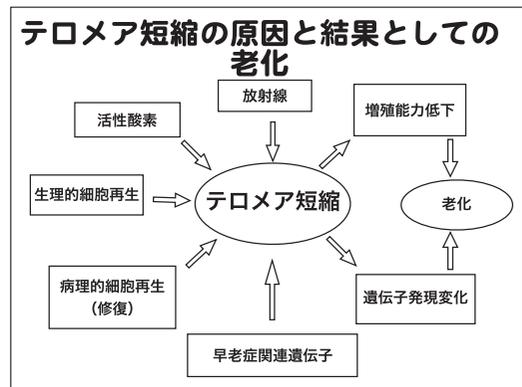


図16

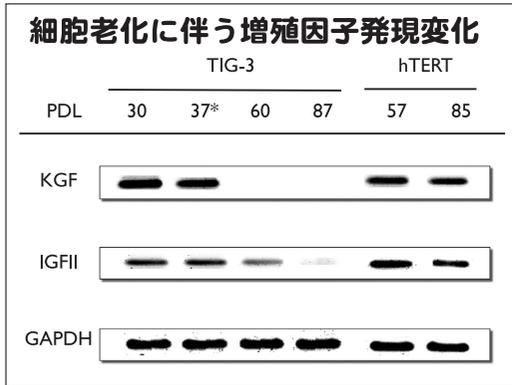


図17A

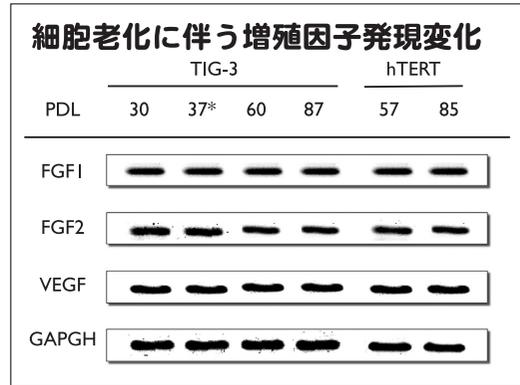


図17B

図16には、テロメア短縮が老化につながる可能性を考え、テロメア短縮に影響を与える因子をあけておきました。生理的な組織再生による細胞増殖だけでなく、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今までお話しした通りです。実はそれ以外にも、ここ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見られます。ゲノム損傷はある程度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ます。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見られます。これらについては後でまたお話しいたします。この図の右の方で、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てありますが、これを次にお話しします。

6-6) テロメア短縮による細胞機能変化

正常な細胞は、テロメアが限界まで短縮する（そこまで行けば細胞は死ぬ）前に、細胞老化を起こして増殖を停止する。ということは、細かい機構は別として、細胞はテロメアサイズをモニターしている可能性があります。テロメアサイズの短縮とともに、様々な遺伝子の発現が変化する可能性があります。

図17Aに示したのはヒト繊維芽細胞の例ですが、細胞の分裂回数が31回と若いとき（31代と言うことにします）には、KGF (keratinocyte growth factor) や IGF-II (insulin-like growth factor) と言った増殖因子の遺伝子がよく発現しています^{63,64}。しかし60代目では、細胞増殖能はまだ若い細胞とほとんど変わらないにも関わらず、遺伝子の発現がかなり低下しています。87代の老化細胞では、発現が見られません。37代の星印は、ここで細胞を飽和密度において、完全に増殖を停止させたものです。このときには発現は低下していませんので、老化細胞での発現低下が、増殖が止まった結果として起きているわけではないと考えられます。もちろん、増殖状態にも細胞老化にも影響されず、発現のかわらない増殖因子もあります（図17B）。

図の右の方は、この繊維芽細胞にテロメアを延長するテロメラ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す。テロメアが延長した細胞では、増殖因子の発現が高いままに保たれ、分裂を繰り返しても若い状態のまま保たれることが分かります⁶³。つまり、テロメアが短縮しなければ、これらの増殖因子の発現に関する限り、細胞機能は若い状態のままに保たれることが示されました。似たことは、血管内皮細胞の増殖因子遺伝子の発現でも見られました（未発表）。

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す。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他に、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。増殖因子の生産だけでなく、他の遺伝子の発現にも同様の変化をするものがあるかもしれません。

図18に示すのは、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の結果です（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ります。左から右へ向かって、0歳（若）から97歳（老）まで順に並べてあります。全体の中では一部に過ぎませんが、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ります。

これらのことは、細胞の老化、ヒトの老化に伴ってテロメア短縮がおきますが、それが遺伝子の発現を変化させ

うまく対応できて、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ます。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ます。これが細胞老化です。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します。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ます。もっ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は個体のためにならないと判断されたときは、細胞は積極的に自殺のための遺伝子を働かせてアポトーシスを起こす。

このように、細胞老化とは、広い意味での細胞ストレスに対する細胞応答の一つであると現在では理解されています。では具体的に、どのようなストレスがかかってきたときにどのような細胞内反応が起きるのか、これは現在研究が進行中であって、通常の細胞老化の場合を含めて一部を後で紹介いたします。その前に、活性酸素や遺伝的早老症との関係をちょっと紹介しておきます。

7-4) 活性酸素

図21Aは、ヒト繊維芽細胞に過酸化水素を $100 \mu\text{M}$ で処理し続けた場合の増殖曲線です。棒グラフは老化細胞に特有の $\beta\text{-gal}$ を発現した細胞の頻度です。細胞形態で見ても $\beta\text{-gal}$ の発現で見ても老化細胞です（未発表）。老化細胞で発現変化する他の遺伝子群についても調べましたが、老化細胞と同じ変化が得られています。通常の老化は80代を超えてから起きますから、ここに見られる42代での老化は早期老化です。過酸化水素を高濃度で処理すればすぐに死にますが、その場合は老化ではなくアポトーシスがおきます。

テロメアを測ってみますと、テロメア長の短縮はこの間にほとんど見られませんが、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ます（図21B）。これは、テロメア配列に変異が起きている可能性を示します（未発表）。活性酸素による塩基の変化としては、Gが三つ並んでいるとき、一番目のGが8-OHになる頻度が著しく高いことがわかっており、これを含むDNAが複製すると、CではなくAと対をつくるため、結果としてGからTへの塩基置換が高頻度におきます。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（これは当然です）にも関わらず、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りました（図21B）。つまり、過酸化水素によってテロメア配列に変異が起きている。

さきほど、テロメアループをつくる糊付けタンパク質 TRF2 の話をしましたが、塩基配列を厳密に認識して結合します。過酸化水素を処理した早期老化細胞では、TRF2 の存在量は変化しませんが、テロメアに結合している TRF2 タンパク質の量が著しく低下していることが分かりました（未発表）。活性酸素によってテロメア配列の塩

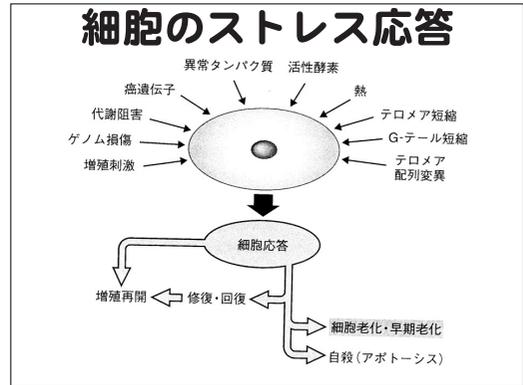


図20

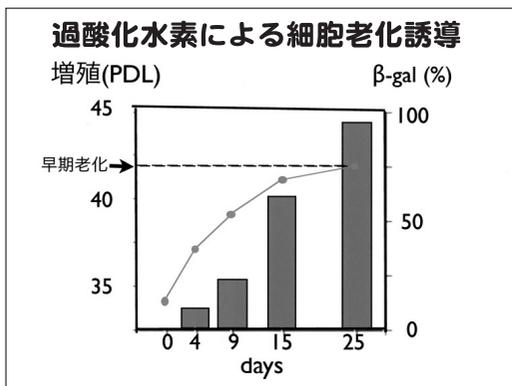


図21 A

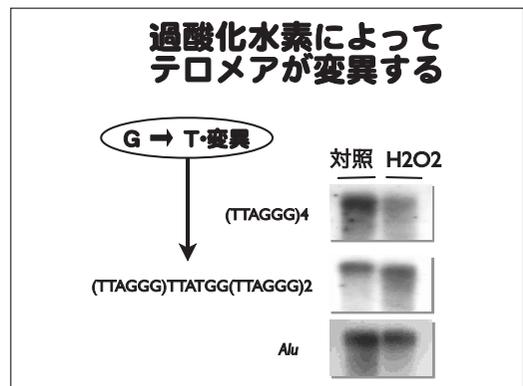


図21 B

基が変化する, DNA 複製によって変異が固定する, ループの糊付けタンパク質が結合できなくなる, テロメアはループを巻くことができず細胞は老化する, と言うことが起きていると考えられます。

図22は, ヒトの骨芽細胞を培養したのですが, 通常の培養条件では18代くらいで増殖が止まります。早期老化です。通常, 細胞は空気を気相として培養するので, 酸素濃度は約20%です。体内の細胞が接している酸素濃度はずっと低い。気相の酸素濃度を3%に下げて培養したとき, 40代くらいまで分裂を継続することが分かります。酸素を3%にした上に, 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伸びます(未発表)。そろそろ, テロメア短縮のための老化が起きます。過酸化水素のような激しいものを使わなくても, 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ります。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伸びるわけではなく, なかには低酸素状態では死んでしまうものもあります。

7-5) 活性酸素と老化

シヨ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ります。これらの成虫の体細胞は分裂しないので, 活性酸素による損傷を減らせば細胞の寿命(分裂寿命ではなく)が延びることはありそうな話です。

他方, 酵母, 線虫, シヨ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, という遺伝子があります。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時のシグナル伝達経路の遺伝子群です。これらの遺伝子群の変異体は長寿になる。まあ, 長寿だけでなく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ようですが。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ました, 霊長類のサルでも実験が進行中で, サルは寿命が長いのでまだ実験が完了していませんが, 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ことです。

で, このような条件でなぜ寿命が延びるかは十分にわかっていませんが, 活性酸素と遺伝子とカロリー制限の三題漸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, 寿命が延びることです。そうではなく, 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のではないかという報告もあります。

いずれにせよ, カロリー制限は哺乳類で寿命の延長に成功した唯一の方法です。ヒトへの応用を考えた場合, 小さい頃からずっと食事を制限して細々と100歳まで生きたいか, やりたいことをやって60か70歳まで生きれば本望と考えるかは, 各人の人生観の問題でしょう。

7-6) 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ます。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関わるものと思われます。Werner 症候群, Bloom 症候群, Rothmund-Thomson 症候群の原因遺伝子は DNA ヘリカーゼです。Ataxia-telangiectasis 症候群の原因遺伝子(ATM)は, ゲノム損傷修復に関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です。Nijmegen 症候群, Cockaine 症候群, Xeroderma pigmentosum の原因遺伝子は, いずれもゲノム損傷の修復酵素群の遺伝子です。テロメアのところでも簡単に紹介した(図10B)ように, これらの遺伝子の産物は, テロメアあたりに局在しているものが少なくありません。

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あります。ウエルナー症候群のヘリカーゼ(WRN 遺伝子)はテロメ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事が分かっています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

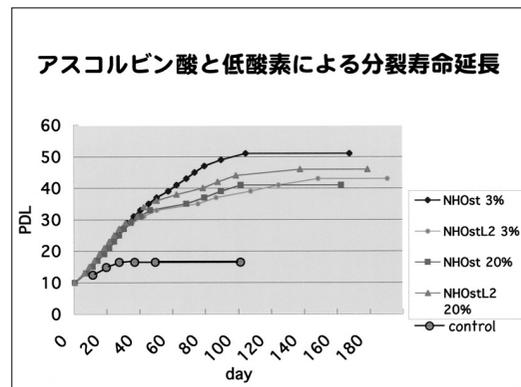


図22

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ません⁶⁸⁾。その他、リンパ球の不死化についての結果がありますが省略します⁶⁹⁻⁷⁵⁾。

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ます(図23)。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おり、一部は確かめました⁷⁶⁾。また、テロメア部分は前にも言ったように活性酸素による G 塩基の変異が起きやすいこと、テロメア部分はヘテロクロマチンを形成していて損傷修復が遅いことは、細胞レベルで早期老化が起きる可能性があります。

WRN 遺伝子あるいは ATM 遺伝子の変異は、マウスでは早老症を表しません。マウスのテロメアは 50 kbp と非常に長いことは前に述べましたが、テロメアを短縮してやると、WRN 変異も ATM 変異も早老症が現れます。ヒトのテロメアは元々マウスに比べると著しく短く、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思われま

7-7) プロジェリアの場合

Hutchinson-Gilford progeria 症候群の原因遺伝子は、核骨格タンパク質であるラミン A、あるいはラミンを部分分解して機能タンパク質にする変換酵素の遺伝子 Zepste24 である事が分かっています。プロジェリア症候群は非常に急速に老化症状が進行し、多くは20歳前後で動脈硬化などのために死亡すると云われています。アシュリーさんという患者さんのことがテレビで何度も放映され、本も出版されているので、ご存知の方も多いでしょう。患者さんの細胞では、テロメア短縮が著しいことが以前から報告されています。ラミン A は核骨格として核膜のすぐ内側にたくさんありますが、ここはテロメア DNA が局在するところでもあり、この異常がテロメア短縮に関係しているのかもしれない。それだけでなく、ラミン A の異常あるいは

Zepste24 の異常は、ラミン A タンパク質の異常な蓄積をもたらし、これが細胞ストレスとして早期老化を引き起こします(図24)。マウスでもこれらの遺伝子を変異させると早老マウスになりますが、ラミン A の蓄積を減少させたり、ストレスに対する細胞応答に中心的な役割を果たしている p53 をノックアウトすると、症状が軽減されます。細胞ストレスによる早期老化を抑えることによって、症状が軽減されるというわけです。

このように遺伝的早老症では、テロメア短縮による細胞老化と、それ以外のストレスによる早期老化の両方が関わる可能性が高いと考えられます。

7-8) p53 の役割

いま、p53 をノックアウトしておく、早期老化の症状が軽減されると紹介しました。老化の症状を表す過程で、p53 が関わっている。あとで出てきますが、p53 は、DNA の異常が起きたとき、修復や細胞老化、細胞死などを起こさせて対応する際に、中心的な役割を果たす重要な遺伝子です。で、こういう論文もあります。p53 をノックアウトしたマウスをつくと、遺伝子の異常を持った細胞が増えるために癌が多発して、寿命が短くなる。逆に、p53 の機能が高まるような変異マウスを作ると、癌はできにくくなるけれども老化が促進して、寿命はやはり短くなる。細胞老化だけでなく、個体の老化にも p53 が深く関わっていることが分かります。

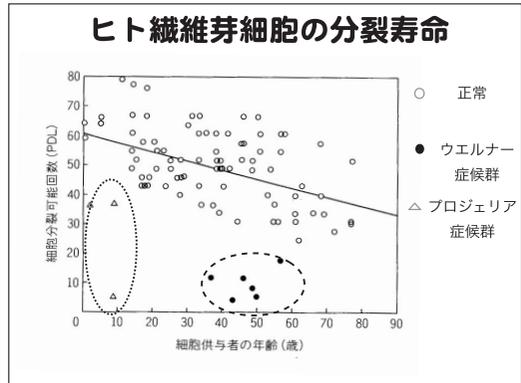


図23

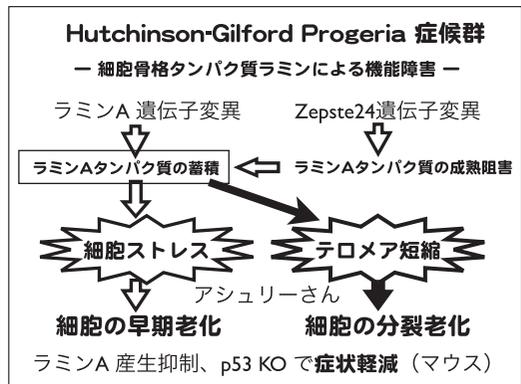


図24

8 増殖停止のプロセス

さて、テロメア短縮を含めて、細胞への様々なストレスが与えられたとき、細胞内では何がおきているのだろうか。先ほどの図20で、細胞応答、一時的増殖停止とだけ書いてあったことの中身です。

8-1) 増殖誘導によって起きる細胞内プロセス

まず、細胞が増殖するとき、どのような細胞内反応が起きているのか。図25は、非常に単純化したものではありませんが、細胞に増殖刺激が与えられた後、DNA合成開始に至る細胞内で起きるシグナル伝達系について示したものです。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一つである RB をリン酸化する。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すが、RB がリン酸化されることによって E2F が活性になり、DNA 合成に必要な酵素などが作られ、やがて S 期へ進行する。

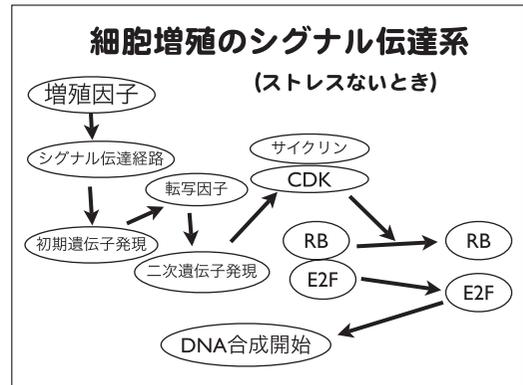


図25

8-2) 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。図26は、ストレスが来たとき、細胞内ではストレスの種類によって様々なシグナル伝達経路が働くことが分かりつつありますが、重要な反応の一つは、癌抑制遺伝子として有名な p53 の活性化がおきます。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 タンパク質がたくさん作られるようにもなります。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しますが、その中でも重要なのは、p21 遺伝子の活性化です。その結果、p21 タンパク質がたくさん作られると、これはサイクリンと CDK の複合体に結合して働きを阻害します。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ます。

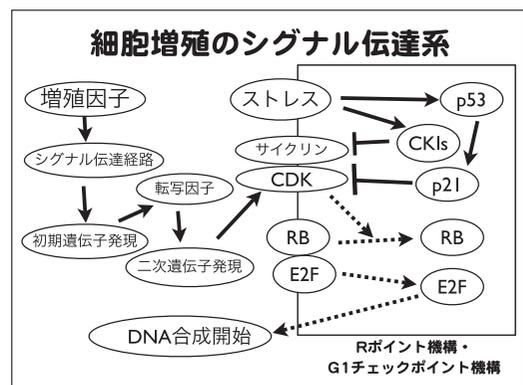


図26

図26にはこの他に、p53 を介さずに CKI (cyclin-dependent kinase inhibitor) がつくられてサイクリンと CDK の複合体を阻害する経路も書いてあります。CKI は複数の遺伝子を含むファミリーで、実は p21 もこのファミリーの一員です。正常な細胞が飽和密度に達した時、あるいは正常細胞を浮遊状態においた時、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きますが、これらの場合には老化細胞の表現型が現れるわけではありません。

8-3) G1 期チェックポイント機構

このような増殖停止機構が、先ほど細胞周期のところでお話した R ポイントの機構であり、最近では G1 チェックポイントと呼ばれる機構です。チェックポイントというのは、細胞周期が回転する際に、ある時点から先へ進行してよいかどうかを細胞がチェックしているところです。不都合があると、細胞周期をそこから先へ進ませない。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ことが分かっています。G1 チェックポイントも大変重要なもので、DNA に損傷があったとき、そのまま S 期へ進行すると細胞死や変異の固定が起きるので、損傷を修復するまで S 期への進行を抑える役割を持つものとして見つかったものです。

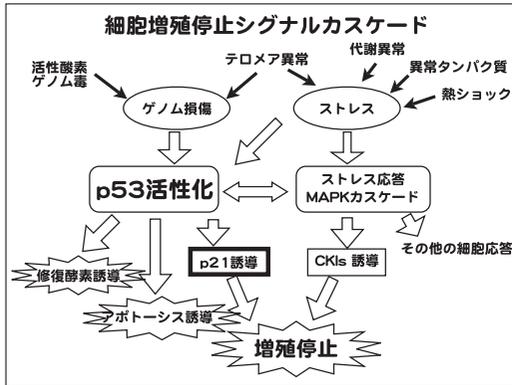


図27

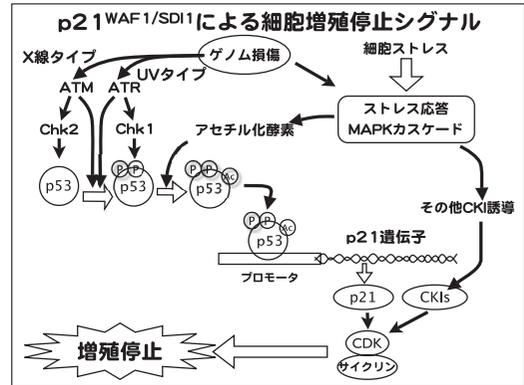


図28

ただ、G1 期チェックポイントとして細胞が S 期へ進んでよいかどうかをチェックするには、DNA 損傷の有無だけが重要なわけではありません。例えば、細胞のサイズの重要性について古くから言われていました。一定のサイズになるまでチェックポイントを通できない。最近になって、このあたりの分子レベルの機構についても解析が進められています。

DNA 損傷に限らず様々なストレス（不都合）があるわけで、図27も誠におおざっぱですが、p53 の経路以外には、ストレス応答 MAP キナーゼが働く経路が有名です。これらの経路には相互のクロストークもあるらしい。ストレスと言う表現は少し違和感があり、むしろ細胞にとっての何らかの不都合な事態とでも言う他はないのですが、実にたくさんを含んでいます。

ストレスの種類によって引き起こされる細胞内反応は、ストレスを受容する上流部分にはそれぞれの特異性があるが当然ですし、下流では共通の増殖の一時停止という反応を起こすとしても、ストレスへの対応反応はストレスの種類によって様々な違いがあるが当然です。シグナル伝達経路には共通部分と特異的な部分があるに違いありません。

DNA 損傷に対しては主に p53 の経路が働いており（図28）、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、損傷が大きすぎた時には 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します。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）とも言われますが、ストレスとしてはゲノムの損傷だけに働いているわけではありません。

ちょっと追加ですが、まに、SV40 のがん遺伝子である T 抗原は、細胞を G0 期に留まれなくする、老化細胞にも DNA 合成を誘導することを紹介しました。T 抗原は、図30に示すように p53 タンパク質にも RB タンパク質にも結合することによって、働きを失わせます。つまり、G1 チェックポイントを働かなくさせることがわかりました（図29）。T 抗原で癌化した細胞は、ゲノムの守護者たる p53 の働きを失っているわけで、良く増殖するけれども、ゲノムの変化と染色体の変化をどんどん起こしつつ増殖するという、古くからの観察ともあっています。

8-4) 細胞老化による増殖停止

長々と前置きをいたしました。繊維芽細胞を材料として細胞老化を見ていると、老化するにつれて p21 の発現が急に増加し、やがて増殖停止します⁵¹⁾。p21 の最初の発見は、老化細胞には、自分自身の DNA 合成を抑えるだけでなく、若い細胞と融合した時に若い細胞の核の DNA 合成も抑制する因子が含まれていることから、老化細胞に蓄積している DNA 合成誘導を抑制する因子の遺伝子としてクローニングされたものです。他方、ゲノムに損

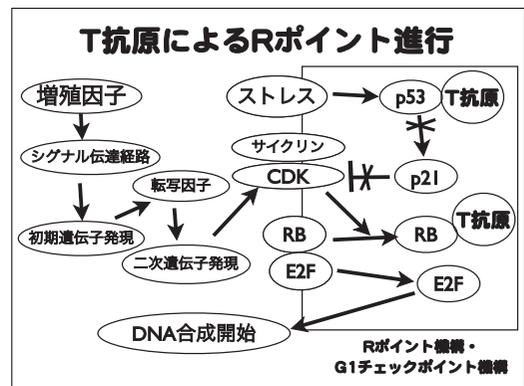


図29

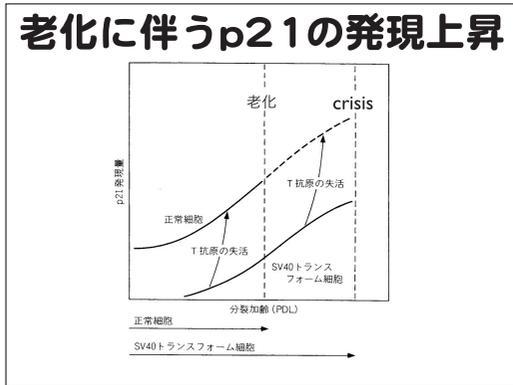


図30

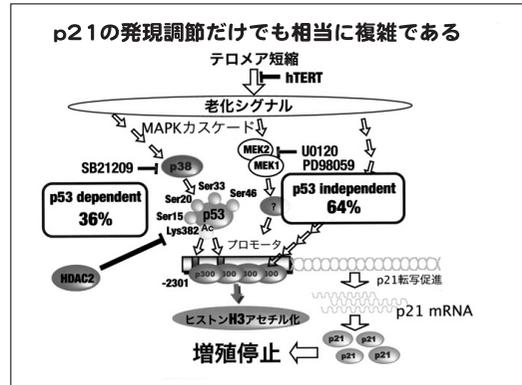


図31

傷を与えた時、p21の発現が大きく上昇することが、別の研究者によって明らかにされました。

通常、p21の発現はp53によって促進されることが明らかですが、細胞老化の場合にはどうもそれだけではないらしい。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⁵¹⁾。T抗原によって発現量は著しく低下するのですが、それでも継代とともに次第に上昇するのです(図30)。

むしろ、p53を介するp21の上昇は3分の1程度でしかなく、3分の2はp53の関与なしにp21の上昇があることがわかりました(図31)。実際、p53をノックアウトしても老化に伴うp21の上昇が見られます(未発表)。p21遺伝子のプロモータ活性を調べるために、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し、導入細胞が老化するにつれて、確かにレポータ遺伝子の発現が急上昇しますが、プロモータ領域からp53タンパク質の結合部位を除去したプロモータを使っても、細胞老化とともにレポータ遺伝子の発現は急上昇します(未発表)。ただ、ゲノムに損傷を与えた時には、まともなプロモータではレポータ遺伝子の発現があがりますが、p53結合部位を除去した変異プロモータでは全く発現があがりません。

ゲノム損傷の場合にも細胞老化の場合にもp21は上昇するが、上昇するしくみ、上昇に至るシグナル伝達には両者に大きな違いがあることがわかりますし、細胞老化にp53が重要であると言っても、それだけではないことが明らかになりつつあります。

8-5) 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、先ほどもあげたMAPキナーゼカスケードです。というのは、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、なんと老化細胞が増殖を継続するようになります(未発表)。いつまでも増殖を継続するわけにはいきませんが。

もう一つのことは、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わかりました(未発表)(図31)。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す。ただ、老化細胞では、ヒストンアセチル化酵素の方も良く結合しているという一見矛盾する結果が得られています。今のところそれ以上のことは分かりませんが、老化細胞のp21のプロモータ領域ではヒストンのアセチル化と脱アセチル化とが激しく起きているのかもしれない。

だいたい、細胞老化に関わるシグナル伝達経路は、ほとんど分かっていないと言わざるを得ません。ある程度分かっているように線でつなげているけれども、線の中身がほとんど分かっていないし、他に線がある

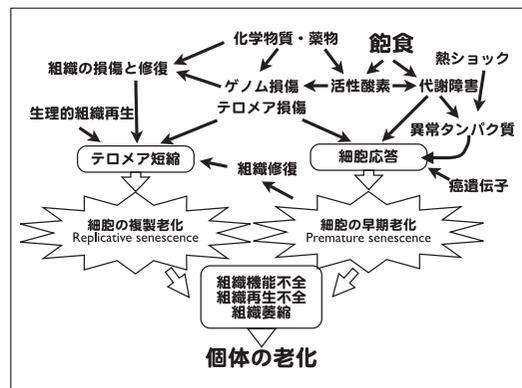


図32

かどうかも不明です(図32)。テロメア短縮を検知するタンパク質は何か、から始まって、それを p21 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ありません。シグナル伝達の下流に関しても、増殖抑制の他、唯一のマーカーと言える老化特異的な β -gal 上昇に至るシグナル伝達経路も全く分かっていないのです。すべてこれからという他はありません。分かっていないことが多いどころか、ほとんど何も分かっていないというべきでしょう。

9 テロメラーゼ

テロメア短縮によって、細胞には分裂寿命があるという話をしてきました。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。実際にはそんなことはありません。それは、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からです。

9-1) 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) との複合体です(図33)。hTERT 遺伝子のクローニングは困難なものでしたが、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ました⁷⁷⁾。このふたつのサブユニットによる複合体が、試験管内ではテロメラーゼ活性を示しますから、酵素反応に最低必須の部分はこのこれで良いと考えられます。ただ、細胞からテロメラーゼを分画

すると、非常に大きなタンパク質複合体として回収されます(未発表)。このことは、RNA ポリメラーゼのコアだけで RNA 合成反応はできますが、クロマチン構造を持っている核内の鋳型を使って正しく RNA 合成を開始するには、たくさんのタンパク質からなる転写開始複合体の形成が必要であると同様ののだらうと思います。

9-2) テロメラーゼの反応

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(図34)。ただ、6塩基の延長ごとに酵素が外れるかどうかは問題で、はずれずに鋳型あるいは延長した DNA が尺取り

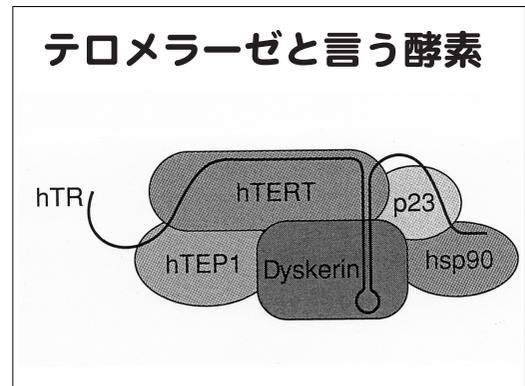


図33

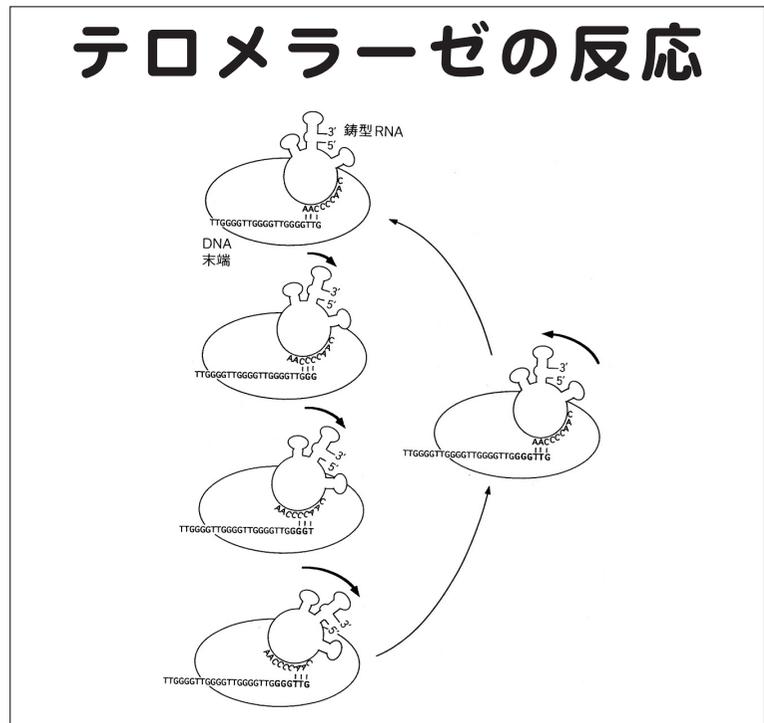


図34

虫のように移動するという考え方もある。試験管内反応としてはかなりの長さ延長しますが、細胞内ではテロメア結合タンパク質も関わって、ほぼ一定の長さが延長するのだらうと思われます。

テロメラーゼは、鋳型 RNA を鋳型として、適当なプライマーの 3' 末端にテロメア DNA を延長する、一種の逆転写酵素です。適当なプライマーというのはいい加減な表現ですが、プライマーとして通常はテロメア配列を使うけれども、プライマーに要求される塩基配列は厳密なものではないと言いたかったのです。絨毛虫類では増幅された DNA の末端にテロメアを新生しますし、馬の回虫では発生途中で DNA の一部が失われますがこのときにも末端にテロメアが新生する。ヒトの癌細胞ではしばしば染色体異常が起きますが、このときにも、切れた DNA の末端にテロメアが新生すると言われます。いずれも、テロメア配列ではない DNA にテロメア配列を付加するわけです。

テロメア構造は、3' 最末端が G テイルとして一本鎖でオーバーハングしているわけですが、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す。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ます。

9-3) 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ります。DNA 複製ごとにテロメアが短縮することは複製機構の性質として避けられないけれども、短縮したテロメアを延長することによって、テロメア長はほぼ一定に保たれる。テロメラーゼが十分に働くことでテロメアが保たれれば、テロメア短縮による分裂寿命はないはずですが。分裂寿命が見られるケースはありますが、それは別の原因によるものです。なお、原生動物の絨毛虫類では、大核を形成する過程で非常にたくさんの DNA 断片ができ、それぞれにテロメアを新生するために非常に多くのテロメラーゼ酵素を持っているので、テロメラーゼの研究は絨毛虫類でまず進みました。

真核多細胞生物ではどうか。言うまでもないことですが、多細胞生物では生殖細胞と体細胞の分化があり、子孫への効果を考えると、生殖系列の細胞群にテロメラーゼ活性があるのは当然のことです。むしろ、体細胞にテロメラーゼ活性があるかどうかに関心をもたれました。

植物の細胞には、調べられた限り大抵テロメラーゼ活性があります。植物の体細胞は基本的に分裂寿命のない不死化細胞であると考えてよいと思います。ニンジンといった一つの体細胞から、ニンジンという植物体を形成できる。何もニンジンに限らず成功した植物はたくさんあります。株分けや、挿し木など、栄養生殖で何百年の間ひき続き植物体を増やせるケースが多いのも、体細胞が不死化細胞であることが背景にあるのだと思います。

動物の場合でも、実は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。しばしば魚類では一生を通じて成長を続けるものがありますが、体細胞が不死化細胞であることと関係があるかどうか興味あるところです。哺乳類まで来ても、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ります。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見られます⁵³⁾。

こうして見ると、生物界全体としてはテロメラーゼがあるのが標準で、細胞としては分裂寿命がない（不死化細胞である）のが当たり前と言えます。ただ、体細胞から個体が再生できるかといった問題には、他の条件が関わっているのは当然のことです。

9-4) ヒトの場合

生物界全体の中では哺乳類はかなり特殊ですが、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す（図35）。生殖系列の細胞には強いテロメラーゼ活性があります。発生過程を見ると、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り、基本的に不死化細胞と考えられます。ごく初期の胚細胞から得られる ES 細胞（胚性幹細胞）は不死化細胞です。発生が進んで体細胞が分化していくと、組織によって時期の違いはあります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ります。

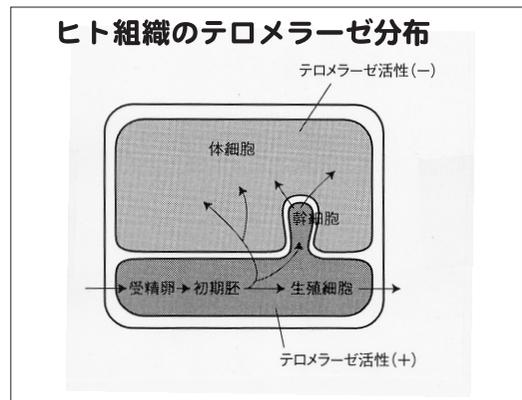


図35

す。誕生後の体細胞にはテロメラーゼ活性がありません。

ただ、血球や表皮、消化管上皮などの幹細胞には、成人でも弱いテロメラーゼ活性があります⁷⁸⁾。リンパ球も同様です。このため、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と考えられます。ただ、これらの細胞群はいずれも年齢とともにテロメアが短縮し、有限分裂寿命と考えられます。血球幹細胞移植のレシピエントでは、血球のテロメア長はドナーに比べて短いと言います。従って、幹細胞を含めてすべてのヒト体細胞は有限分裂寿命である、と理解されます。神経や筋肉、肝細胞、表皮など様々な細胞に分化できる多能性幹細胞が骨髄に存在することが分かってきて、テロメラーゼ活性があることが分かっていますが、これについてはテロメア短縮などの解析は不十分です。

9-5) 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、不思議なことに鋳型 RNA は発現しているのが普通です。テロメラーゼの発現は、触媒サブユニットの発現量 (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りますが、マイナーなものと思われます。すなわち、hTERT の転写調節が主たる調節です。

発現調節には、発生過程を通じて調節される分化形質のように、ある時期以降は金輪際発現しない、と言うタイプの調節があります。アルブミン遺伝子は肝細胞でしか発現せず、他の体細胞では一生を通じて金輪際発現しない。テロメラーゼも、細胞分化とともに体細胞での再発現は減多なことでは起きないように抑制されます。後で言うように癌細胞の多くは強く発現していますが、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ます⁷⁹⁾。つまり、発現しない、という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⁾。一番単純な解釈は、正常体細胞にはリプレッサ様のタンパク質が発現している、と言うものです。この遺伝子をクローニングする競争には我々も挑戦していましたが、2004年について取れたと言う報告がありました。しかし、誰も追試ができず、消滅した模様です。

分化に関わる遺伝子の発現抑制は、多くの場合、DNA のメチル化に始まるクロマチン構造の変化、ヘテロクロマチン化に関わります。テロメラーゼ遺伝子の場合も、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ます (未発表)。面白いのは、テロメラーゼ遺伝子の発現調節領域をレポータ遺伝子につないだものを癌細胞に導入すると、レポータ遺伝子は強く発現しますが、正常体細胞に導入した時は、導入遺伝子が宿主 DNA に組み込まれる前には発現が見られますが、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ことです。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しています (未発表)。

9-6) ヒト細胞は減多なことでは不死化しない

ヒトの体細胞は、培養系で不死化することは非常に難しいことが分かっています。T 抗原を導入して細胞老化の限界を超えて増殖を続けさせるとともに、p53 の失活による高頻度の変異を期待して培養を続けると、非常にまれに不死化細胞が得られる場合があります (図36)。ただ、非常にまれな現象でしかありません。繊維芽細胞に限らず、他のヒト体細胞についても同様で、不死化はまれな事象です。テロメラーゼはなかなか再発現しない。

唯一の例外として、B リンパ球は容易に不死化すると言われていました。B リンパ球はそのままではほとんど増殖しませんが、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ました。EB ウイルスは癌ウイルスの一種です。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%程度にすぎないことが分かりました (図37)^{60,68-70)}。長いものは160代まで増殖して分裂寿命を迎えます。多くの研究者が、50代くらいまで増殖すればもう不死化したと結論していたのでしよう。学会の常識に反する結論であったため、リンパ球の飼いが悪いのではないかなど様々な

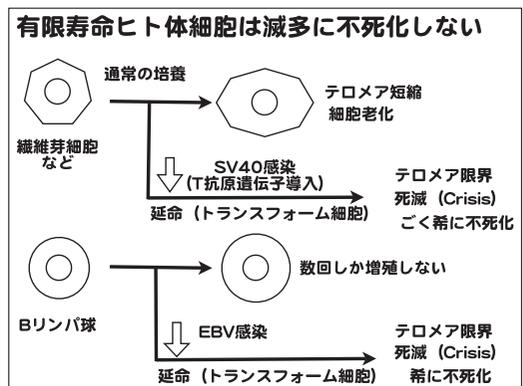


図36

批判がありました。同じ患者さんのリンパ球はだいたい同じ代数で寿命を迎えるなどの再現性もあり、むしろ不死化には患者さんの遺伝的な背景が関係する可能性が伺われました。鎌倉にあるエイジーン研究所の杉本さんとの仕事です。不死化しにくいのはリンパ球も例外ではなかったのです。なお、リンパ球には元々弱いテロメラーゼ活性がありますが、培養中に低下し、テロメアも短縮します。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ます。

なおこの実験は、ウエルナー患者さんの細胞の特徴を解析する中で行われたものですが、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例もありませんでした⁶⁸⁾。これとは別に、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の結果が得られています。いずれも、不死化には遺伝的な背景が関わることを示していますが、詳細は不明です。テロメラーゼ発現して不死化するにはどのような遺伝子が関わるか、ほとんど分かっていないのが現状です。

ヒトが生まれた時、体細胞が比較的短いテロメアを持っていて、しかも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老化に深く関わる原因です。他方、後で述べるように、癌が成長するためにはテロメラーゼ発現が不可欠であることを考えると、テロメラーゼの再発現がきわめて低頻度に抑えられていることは、ヒトにおける癌の発生を極めて低く抑えている原因の一つと言えます。

9-7) 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ります。酵素活性の上下は、この場合でも hTERT の転写調節で行われます。血球幹細胞の系列では、おおよとの細胞は普段それほど増殖しておらず、活性は低い。少し下流（子孫）の細胞で、一番増殖活性が高いところではテロメラーゼ活性が高い。分化が進んで増殖が低下すると、活性が低下する。リンパ球でも静止状態では活性が低いが、増殖刺激を受けると活性があがります。また、細胞周期の中でも、S 期には活性が高く、他の期では活性が低い⁸¹⁾。このような活性の上下に関わる転写調節は、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、良く知られた Myc という転写因子は上皮系の細胞では hTERT の転写を上昇させます。

ちょっと意外にも思えますが、テロメアを維持するにはどのくらいのテロメラーゼ活性が必要なのか、どのくらいあれば十分なのかよくわかっていません。活性が強いほどテロメアが延長するのかも、よくわかっていません。正常細胞にもごく微量のテロメラーゼ活性があって、それが G テイルの短縮を遅くしているという報告もありますが、詳細は省略します。

10 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なかなか難しいことですが、適当なプロモータに接続した hTERT 遺伝子 (cDNA) を導入したら、テロメラーゼを発現して不死化細胞になるだろうか。

10-1) 多くの細胞は不死化する

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ました。我々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ります。図38にはアストロサイト⁸²⁾、図39には肝実質細胞（未発表）の例を示しました。いずれの細胞も通常は20回くらいしか分裂できませんが、hTERT を導入するといくらかでも増殖するようになります。

10-2) 不死化した細胞は正常の表現型を示す

不死化した細胞は、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、本来の分化機能が全部とは言えないまでも良く維持されます。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

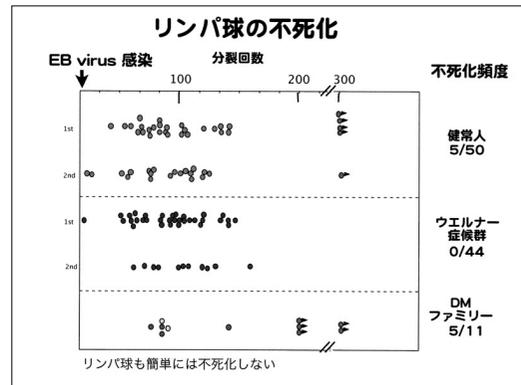


図37

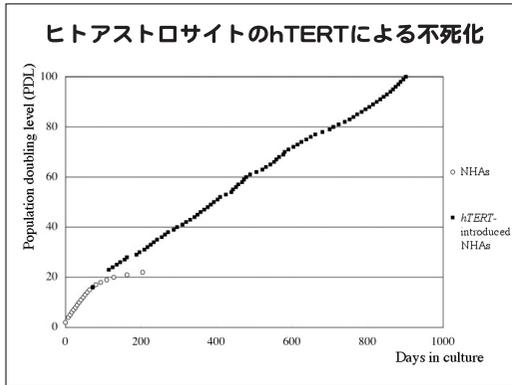


図38

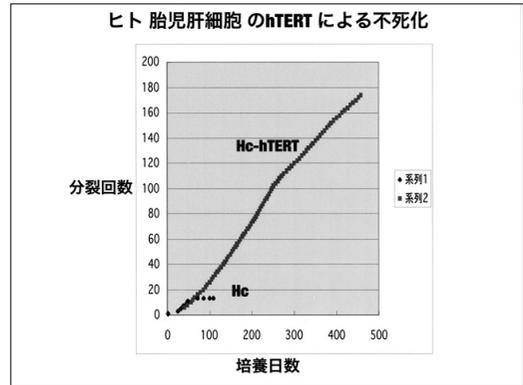


図39

現など、多くの機能が維持されています（未発表）。多くの遺伝子の発現を見ても、正常細胞とほとんど同じです。染色体の構成も正常です。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のですが、不思議なことに hTERT を導入した細胞では、それが維持されることが多い。また、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に述べた通りです。

言うまでもなく、癌細胞的な表現型は見られません。たとえば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見られません。

10-3) 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わけではありません。上皮系細胞のなかには hTERT 導入だけでは不死化しないものがあると言われています。我々の実験でも、骨芽細胞は hTERT の導入で不死化できないだけでなく、分裂寿命の延長も見られませんでした（未発表）。

上皮系細胞の多くや骨芽細胞でも、一つの特徴は培養系での増殖が非常に早く停止する、すなわちカルチャーショックを受けることです。これは、テロメア短縮ではない、ストレスによる増殖停止ですから、これを乗り越えるには、テロメアの延長ではだめなことは当然です。実際これらの細胞では、まず T 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させ、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します。

ところが骨芽細胞の場合は、ちょっと特殊です。カルチャーショックは要するに何らかの培養条件の不都合であるわけですが、骨芽細胞の場合、通常は18代くらいで増殖停止します。酸素濃度を下げてアスコルビン酸を添加するという条件によって、50代を超えて増殖を継続します（図22）。それに加えて、通常の培地で使われている牛胎児血清の代わりにヒト血清を用いると、60代くらいまで増殖を継続できます。しかし、どのような条件で培養しても、hTERT 導入によっては延命も不死化も起こすことはできませんでした（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りました（未発表）。どちらも CKI の仲間であり、サイクリン・CDK 複合体の働きを阻害して、G1 チェックポイントを先に進ませないわけですから、増殖できなくなる。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するようになります（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わけで、一筋縄では行かないことがよくわかります。

10-4) 不死化細胞の利用

培養細胞は様々な目的で使われますが、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、比較的機能を維持しますが、いろいろな問題があります（図40）。初代培養細胞は多くの場合、異なった細胞腫の混ざりです。注目する細胞だけを純化しようとすると、どんな方法によるにせよ、しばらく培養して増殖させる必要がありますが、一般に増殖能力が乏しい（カルチャーショックで止まる）ので、困難です。しかも培養中に分化機能を失います。何度もヒトから採取するのは大変ですし、別のヒトからと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。初代培養を使わざるを得ない研究者が大いに苦労するところです。

全部とは言えないまでも、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はずで（図40）。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す。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ります。

10-5) テロメラーゼはテロメア延長だけが機能か

テロメラーゼがテロメアを延長するのは分かりますが、hTERT を導入した細胞の振る舞いを見てみると、どうもそれだけとはちょっと思えないところがあります。

培養に移した細胞はしばしば速やかに分化機能を消失しますが、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）。分化機能消失は短期間に起きるので、テロメア短縮のためとは思えませんが、それが防がれる。これがテロメア延長のためとは思えない。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、蓄積しますが、hTERT で不死化した繊維芽細胞では染色体異常が蓄積しない（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ります。

非常に概略的な言い方ですが、細胞にとって、正常性を維持する好都合な変化が起きているように見えます。

10-6) 幹細胞への影響

血球の再生のための骨髄移植は以前から行われていますが、この場合レシピエントの血球のテロメア長は、ドナーの血球に比べて短いと言われます。ヒトの骨髄には、様々な細胞に分化できる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ました。血管の再生には臨床でかなり使われはじめており、心筋や神経の再生にも試験的に使われはじめています。問題の一つは、多能性幹細胞はたくさんとれないことで、あまり少数の細胞では移植しても効果がないことです。培養で増殖させてそれを移植できれば良いのですが、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ようです。

実験的には、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良くなり、分化する性質も維持されると言います。幹細胞には元々弱いテロメラーゼ活性が見られるわけですが、遺伝子導入後には高い活性を発現します。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ように思われます。

10-7) 不思議なことは他にもある

先ほどから、さりげなく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と書いてきました。これらの細胞は、通常なら20代になる前にカルチャーショックで増殖停止します。もちろん、この段階ではテロメア短縮はほとんど見られません。この場合、T 抗原を導入して、なおかつ hTERT を導入すれば不死化することは理解しやすい。しかし、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のは、説明できません（図41）。とにかく hTERT にはそういう性質がある、という他はない。

もっと驚くべき報告が2005年の Nature に出ました（図42）⁸³⁾。皮膚の毛嚢細胞は、周期的に活性化します。いわゆる毛の周期です。毛嚢には幹細胞があって、幹細胞にはテロメラーゼが発現していますが、周期に応じて増殖活性が上下するのと同時に、テロメラーゼ活

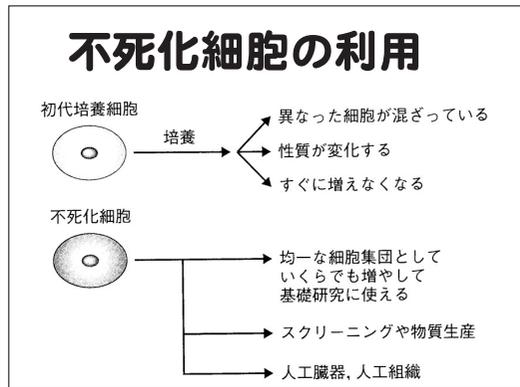


図40

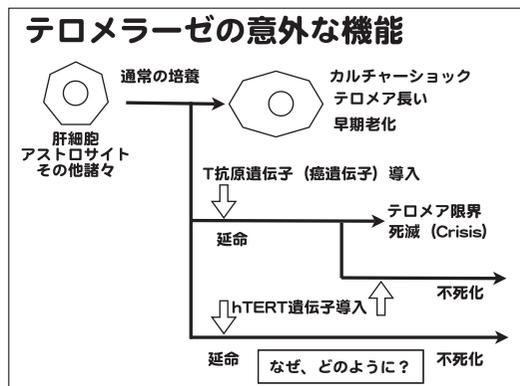


図41

性も上下します。TERT 遺伝子を導入したマウスを作って、毛嚢細胞で恒常的に発現させてやると、毛がふさふさしたマウスができる。マウスの毛を刈ってみると、TERT を導入したマウスでは毛の再生が著しくはやい。ここまでなら、そんなこともあるかと思いますが、驚くのはこの先です。TERT 遺伝子の逆転写酵素として働く部分にわずかに1塩基の変異を入れると、テロメア延長機能が失われます。この変異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、というのです。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機能によるものではなかった。この報告が正しければ、テロメラーゼには、テロメア延長以外の機能があることは明らかです。

10-8) ヒトへの応用は可能か

さて、通常の体細胞にせよ、あるいは幹細胞にせよ、hTERT を導入した不死化細胞は、再生医療や移植医療、もっと言えば、抗老化医療にも使えそうに思えますが、可能なのだろうか。

動物実験のレベルでは、不死化した β 細胞を糖尿病ラットに移植するとか、急性・慢性肝炎患ラットに不死化肝細胞を移植して救命するとか、骨や軟骨への移植治療に使うとか、様々な応用が試みられています。ただ、hTERT の導入によって不死化した細胞は、正常な表現型をかなり維持しているとは言え、明らかに正常ではないはずです。少なくとも、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はずで、その部分ではゲノムが変化しているはずで、これが悪い影響を与えない保証はありません。もう一つは、テロメラーゼの発現は、後で述べるように細胞が癌化する際に、必須の一步であることです。

ですから、たとえば体外組織として人工肝臓をつくってミリポアフィルターのような膜を介して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のようなものに封じて移植する等は可能でしょう（図40）が、不死化細胞を直接に体内へ移植することは、よほどの緊急時、患者さんの生死に直接関わる場合を除いては避けるべきではないかと思えます。

10-9) 内因性 hTERT の発現誘導

テロメラーゼを発現している細胞も発現していない細胞も、遺伝子としては持っているはずで、この遺伝子を自在に発現させる薬があると、必要なときだけ発現させて細胞を若返らせることができるのではないかと思います。特定の遺伝子の発現だけを調節するのは難しいことでは、見つければ面白い。自分自身の細胞を活発に再生する再生医療だけでなく、もっと言えば、抗老化医療にも使えるかもしれない（図43）。先ほどの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、かどうかは分かりませんが、お話ししたら可能性はある。

hTERT の転写調節領域にレポーター遺伝子をつないだものを癌細胞に導入すると、レポーター遺伝子が蛍光タンパク質（GFP 等）だったときは100%がピカピカ光る。正常細胞に導入すると全く光らない。正常細胞をもとにしてこういう検定細胞を作っておいて、これが光るようになる薬を探せば良い。逆に、光る癌細胞が光らなくなる薬があれば、テロメラーゼ発現を抑制する薬になる可能性もあります。これはもう実際にスクリーニングを開始しています。

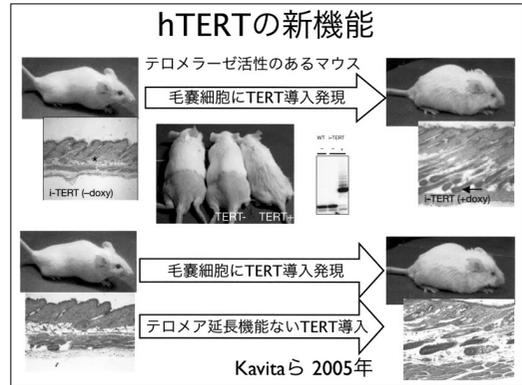


図42

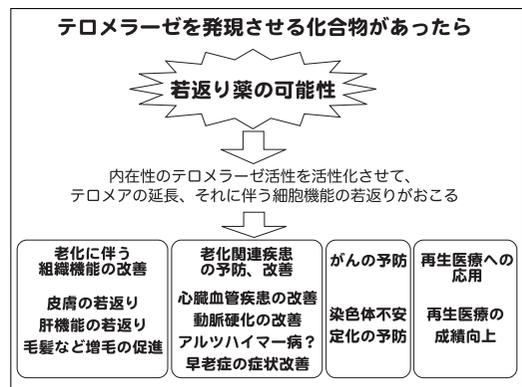


図43

10-10) 不老長寿・不老不死は可能か

細胞レベルでは不死化に成功しているという、ではヒトも不老不死になりますか、としばしば素人から聞かれます。私は、細胞の老化を抑制し、若返らせることができれば、個体としての老化を部分的には抑制することができるかとも思います。血管の老化を抑制できれば、脳の老化進行も少しは遅延させられるかもしれない。しかし、脳の老化は一方的な変化であって、阻止することはできないでしょう。寿命の限界を延長することはあまり期待できないと思っていますが、寿命の限界まで体を健康に維持できれば、それで十分なことと思います。図7に示したように、生存率を示す曲線は直角型（寿命の限界近くで急に低下する）に近づいておりますが、生存率だけではなく、QOLの観点から、いわゆるPPK（ピンピンコロリ）型に近づけることへの寄与ができればと思います。

ただ、不死は可能とは思えないし、それで良いと思います。不死が実現したら、人口の急増を抑えるには新たな誕生を抑制する他はありません。いつまでも同じヒトが生き続ける社会など、バラ色ではなく灰色の世界だと私は思います。年寄りには適当に消滅するのが生物界の必然、と最近ますます強く思っている次第です。

11 癌とテロメラーゼ

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した。多くの癌遺伝子が、正常細胞で働いている増殖に関わる遺伝子に由来し、正常では増殖因子が来たときしか活性化しないタンパク質が、遺伝子の変異によっていつも活性化状態のタンパク質を作れば、細胞は増殖因子がなくても増殖を続けてしまう。これが癌遺伝子による癌の自立的増殖の要因でした。その後、増殖だけでなく、癌細胞の社会性の喪失や転移に関わる性質も、遺伝子の変異によることが分かってきています。遺伝子の働きが失われることによって癌が生じやすくなる、がん抑制遺伝子もたくさん分かってきました。これらはすべて、癌細胞が、癌らしい表現型を表すことに働らくものです。

11-1) 細胞の癌化と不死化

培養系で発癌実験をしたとき、マウスの細胞は容易に癌化するのに、ヒトの細胞はきわめて癌化しにくいことで有名でした。ヒト体細胞を癌細胞らしい細胞に変化させることはそれほど難しいことではないけれども、結局死に絶えてしまうので、動物に移植しても癌を作りません。これでは癌化したとは言えない。いかにも癌細胞らしい表現系を与える癌遺伝子の変化だけでなく、不死化しない限り、癌組織を形成できる癌細胞にはなれないことが分かりました。癌細胞らしい表現型と不死化とは全く独立の事象で、それが両方も起きることが癌化には必須である（図44）。マウスの細胞は容易に不死化するけれども、ヒトの細胞は容易に不死化しないので、癌化が難しい。

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を測定し、また、テロメラーゼ遺伝子産物の発現を調べました⁸⁴⁻¹⁰⁵。この頃、年に20回以上も臨床系の学会や研究会での講演を頼まれました。非常に概略的ですが、図45に結果を要約してあります。これで見ても分かるように、大部分の癌組織でテロメラーゼ活性が陽性であることが分かりました。

11-2) 肝癌におけるテロメラーゼ活性

従来の方はよく改良されたものではありませんが、さらに高感度で定量的で、短時間に簡便に測定できる

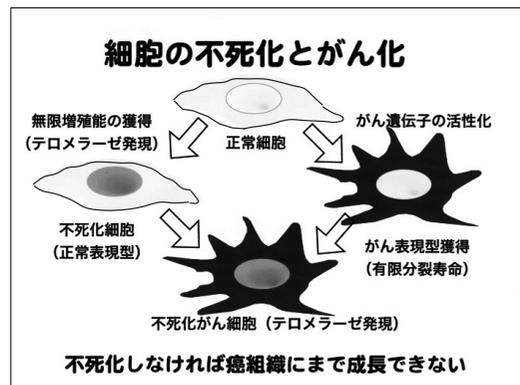


図44

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

図45

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が図46です。癌細胞が1万個に1個あっても測定できる程度の感度がありますが、正常な肝では活性が全く検出できません。慢性肝疾患では弱い活性が検出される例が半分以上あります。これはおそらく、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ます。非癌部では1,000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ります。ここでは縦軸を対数尺で表していますが、普通のスケールにすると非癌部との大きな違いが分かります。高分化型はほとんどが1 cm 以下で、いわゆる癌マーカーの発現も10から30%でしか検出されないことを考えると、テロメラーゼ陽性率はかなり高いものです。

もっと注目されることは、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す。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と思いますが、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ろうと思います。

11-3) 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ます。癌細胞への道を辿り始めた細胞は、変異によって増殖が有利になる一方で、多くの細胞が代謝のアンバランスやチェックポイント機構によって自滅し、免疫機構等によって死滅させられるものと考えられます。少数の生き残りが変異を重ねて、増殖しつつさらに多くが死滅し、と言うプロセスを繰り返し、これを乗り越えた細胞だけが臨床的に検出できる癌組織にまで成長するためには、どこかの時点で不死化しなければなりません。非常に初期の癌でもテロメラーゼ活性が陽性なのはそれを示している、と考えられるようになりました。初期の癌で検出できることが分かったことは臨床応用としても重要ですが、癌の発生機序を考える上でも大きな貢献でした。

なお、悪性化の進行とともにテロメラーゼ活性が上昇しますが、細胞1個あ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りませんでした。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りました¹⁰⁰⁾。なお、正常な肝細胞はほとんど染まりませんが、グリソン鞘に近い部分に少数の染色される細胞があることが分かりました。肝実質細胞の幹細胞があるとすればこの辺りにあるとの考えもあり、興味深いことと思いました。

11-4) その他の癌組織

実にたくさんの癌組織について測定いたしましたが、初期癌の診断法として強い関心のあった胃癌や大腸癌では肝臓ほどうまく行きませんでした。一つの問題は、組織の抽出液には、テロメラーゼ活性測定を妨害する強い阻害因子があるためです。この主体はRNaseで、テロメラーゼの鋳型RNAを分解することがわかり、RNase阻害剤の添加で解決しました⁹³⁾。

一番大きな問題は、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す。常在的にリンパ球が存在することも問題かもしれない。肝臓のように、正常組織では検出限界以下、ということがない。大部分の例で、同じ患者さんの正常部位に比べて癌部位では活性が高いのはありますが、全体としては癌組織との間の活性変化が連続的で、癌と非癌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ませんでした。

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見られました⁹⁶⁾。ただ、テロメラーゼタンパク質を免疫染色すると、かなり上部の細胞にも検出でき、タンパク質はあっても活性がなくなるものと思われました。

転移のために血中を流れる可能性のある少数の癌細胞を検出できないか、尿から膀胱がんの細胞を検出できない

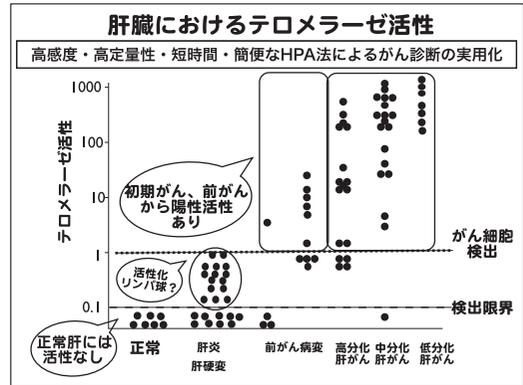


図46

かなど、多くの試みもしましたが、安定な結果は得られませんでした。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ました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良い方法と言えますが、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す。

11-5) 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が陰性です。これらの癌細胞は不死化していないのだろうか。不死化していると考えられます。培養系でもテロメラーゼ活性のない不死化細胞がありますが、テロメア配列検出プローブで染まる大きささまざまなスポットが、染色体外に見えることが分かりました¹⁰⁸⁾。はじめの頃、変なゴミシグナルがあるなあと感じておりましたが、ここには、直鎖状の短いテロメア DNA がたくさんあり、多くのタンパク質と一緒に大きな集合体を形成していることが分かりました¹⁰⁹⁾。テロメラーゼはなくても、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され維持されると考えられ、ALT (alternative lengthening of telomere repeats) と呼ばれます。

テロメラーゼ陰性の癌組織でも培養細胞でも同様ですが、このような細胞についてサザン法でテロメア長を調べると、テロメア長は一見非常に長く (20 kbp 以上) 見えるのが特徴です。ところが、染色体末端のテロメアをテロメアプローブを使って in situ 染色してみると、シグナルは非常に弱い、つまりテロメアは短いと考えられます¹⁰⁸⁾。これはどういうことか。染色体末端のテロメアが長いのではなく、サザン法で一見長く見えるのは、DNA を精製する過程で、染色体 DNA のテロメア末端と、たくさんの染色体外テロメア配列との間で部分的二本鎖を形成することによって、絡まった状態で大きな DNA として電気泳動されるためと分かりました^{65,110)}。解きほぐせば本来のサイズが見える。

11-6) 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す。テロメア・テロメラーゼとは別に、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、アポトーシス抵抗性を獲得していて、簡単には死なないと言う変化もあります。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一つ⁶⁵⁾ 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りました¹¹¹⁾。新たな制癌剤のターゲットは、他にも様々にあり得るはずだと思います。

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ます。このため、新たなターゲットが模索されていました。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、この違いを利用して制癌剤が開発できないかと考えるのは当然のことです。当初、多くの製薬企業がテロメラーゼ阻害剤の開発に飛びつきましたが、現在ではごく一部を除いて撤退しています。ただ、一部ではフェイズ II まで行っている

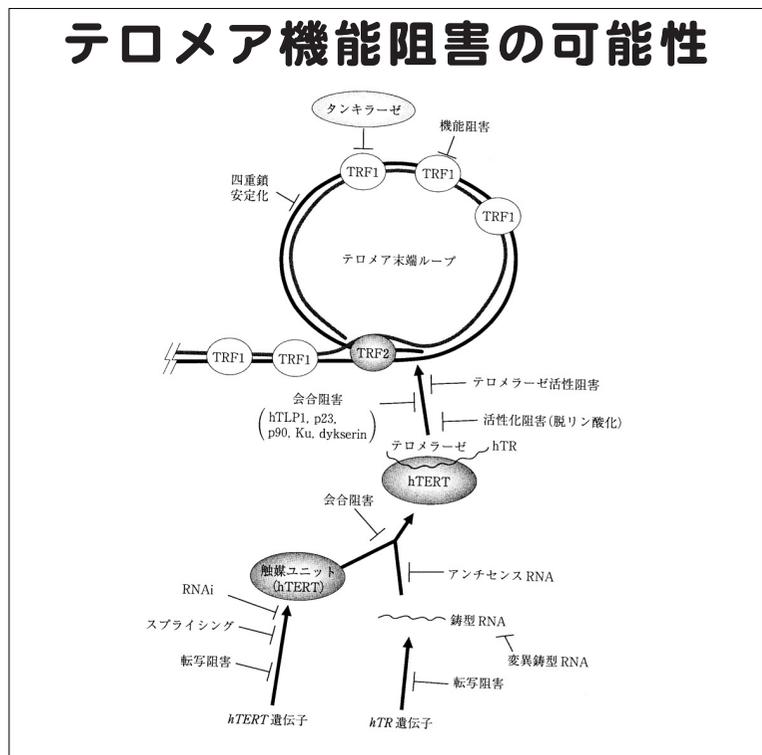


図47

ものもあると聞き及びます。

有効で選択的な阻害剤がなかなか見つからないことも問題のひとつですが、テロメラーゼをよく阻害したとしても、積極的にテロメアを短縮するのではない以上、癌細胞が増殖を続けて自然にテロメアが短縮するのを待たなければならないことが大きな問題です。その間に癌は大きくなってしまいます。実際、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は癌細胞は増殖を続けます（未発表）。これではあまり役に立たない。

テロメア機能を失わせるターゲットには様々な可能性があります（図47）が、テロメラーゼを持っている細胞だけがテロメア機能を失う方法として、変異を持った鋳型 RNA を大量に発現させるという方法があります。これだと、塩基配列の変化したテロメア末端 DNA が作られ、もちろん、G テイルの配列も変化しますから、うまくループが形成できず、増殖は停止するあるいは死ぬ。テロメラーゼを持たない細胞には影響がないはずですが。テトラヒメナでこのような報告がありますが、哺乳類ではうまく行かないようです。

11-7) 新しい制癌剤

テロメア配列というのは G 塩基が並んでいて、この特徴からなんと四重鎖を形成できると言われています。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ります（図48）。これは東大分生研の新家先生が発見したものです。

培養系でこれを癌細胞に与えると1週間以内に死滅しますが、正常細胞では同じ濃度でほとんど影響がありません（図49）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ます。もう少し詳しく調べてみると、テロメア全体のサイズには短縮が見られませんが、G テイルが著しく短縮しています（図50）。実際に短縮させるのか、4 重鎖形成によって機能的な G テイルを消失させているのかはわかりませんが、テロメアループの糊付けタンパク質であった TRF2 は、テロメアからほとんど全部はずれてしまいます（図51）。テロメア配列へ

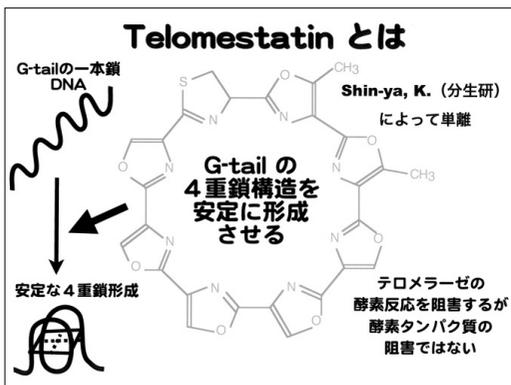


図48

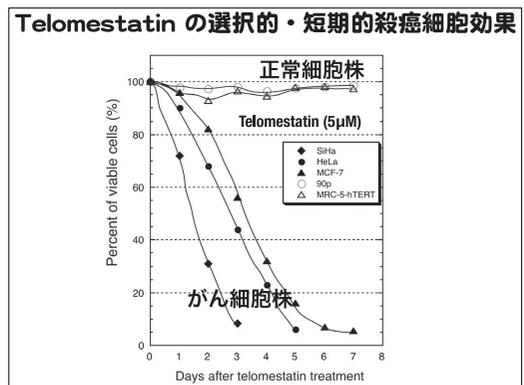


図49

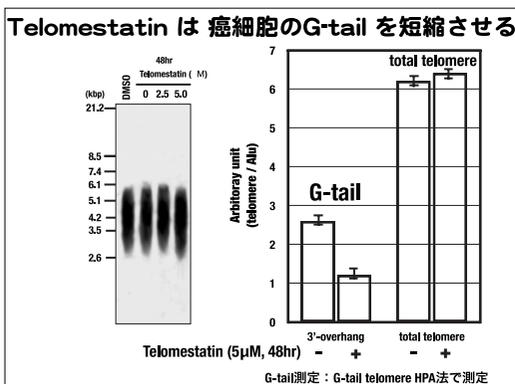


図50

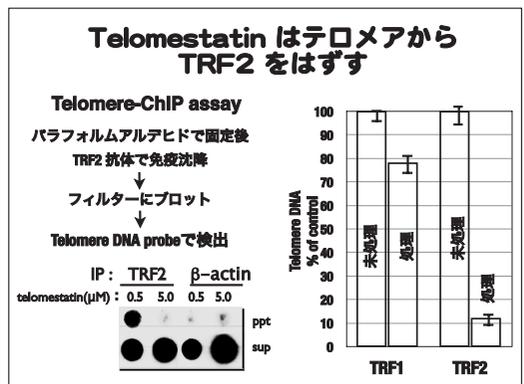


図51

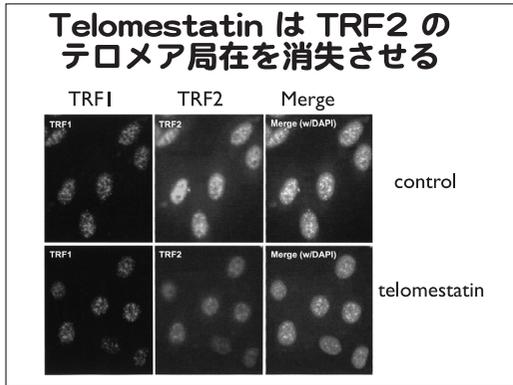


図52

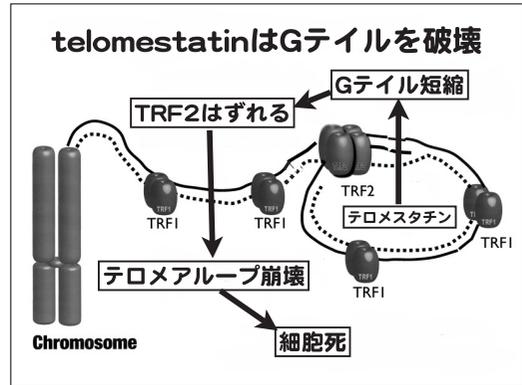


図53

の TRF1 タンパク質の結合はほんの少し低下するだけです。蛍光染色で見ても、テロメア部分に TRF1 は局在していますが、TRF2 はほとんど見えなくなります (図52)。テロメスタチンを処理した癌細胞からテロメラーゼを抽出して活性を測っても、全然阻害されていません。と言うことで、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ます (図53)。

ただ問題なのは、どうして癌細胞は死ぬが正常細胞は死なないか、現在のところ説明つかないことです。いままでの説明にはテロメラーゼの有無が登場していません。実は、正常細胞に hTERT 遺伝子を導入して不死化した細胞も死なないのです。従って、正常細胞と癌細胞の間の選択性は、テロメラーゼのあるなしと言う単純なことではないことだけは確かです。ではどうということか。これはこれからの研究に待つ他ありませんが、私は、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ます。テロメラーゼが働きやすいクロマチン構造になっているのではないかと思うのです。単純すぎる想像ですが、クロマチンが少し裸になっていて、テロメラーゼも接近しやすいし、テロメスタチンも接近しやすいとか。hTERT を導入して、大量のテロメラーゼ酵素を無理やり働かせている正常細胞では、この部分のクロマチン構造は正常のままである。だから、癌細胞と違ってテロメスタチンが届きにくい。テロメスタチンが酵素にではなく、DNA に結合して効くことを考えれば、不適切な考えではないと思います。実際に制癌剤として使うまでには、多くの障壁を乗り越える必要がありますが、テロメラーゼの活性阻害ではなく、新たなそして有効な制癌ターゲットが見つかったという点で、大きな進歩ではないかと考えております。

終わりに

細胞周期の仕事から始まって細胞老化まで、ほぼ一貫して『細胞増殖のしくみ』の周辺をうろろろしておりました (図54)。仕事と言うものはいつもそうですが、これで終わりと言うことはなく、進むにつれて、ますます分からないことが見えてくるのは当然です。実際、多くのテーマが進行中であることは、今までお話しした中にも垣間見えると思います。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います。

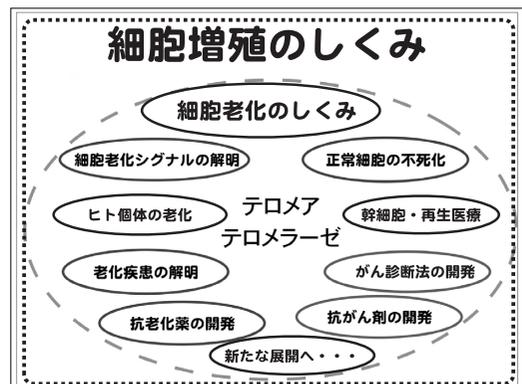


図54

謝辞

広島大学の28年間のうち、はじめの10年間は石橋教授の助教授としてのびのび仕事させていただきました。ただ、その時期にもその後で教授になってからも、一緒の仕事をする教員のポストがないという変則的な状況が大変長く続きました。しかも赴任した次の年から、200から400人もの利用者を抱えた医歯薬学の 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中でしかできませんでした。ようやく助手席がいただけただ頃からは、学部や研究科の管理職的仕事に忙殺されるようになりました。そんなわけで、研究には不十分なところ不本意なところがあるのは当然ですが、それでも、多くの先輩や研究仲間・同僚をはじめ、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ように思います。関係各位に心からお礼を申し上げる次第です。また、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もとに実験手引書¹¹³⁾や教科書¹¹⁴⁻¹¹⁸⁾、その他¹¹⁹⁾を書きましたが、いずれも非常に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いでした。

本稿と同趣旨の原稿を、日本薬学会の薬学雑誌「薬学雑誌」からも依頼されております。趣旨からして内容的にほとんど同一にならざるを得ませんが、両雑誌の読者はほとんどオーバーラップしておらず、お許ししたいと思います。

引用文献

- 1) **Ide, T., Nakane, M., Anzai, K., and Andoh, T.** 1975. Supercoiled DNA folded by non-histone protein in cultured mammalian cells. *Nature*, **258**: 445-447.
- 2) **Ide, T., Ninomiya, J., and Ishibashi, S.** 1984. Isolation of G0-specific ts mutant from a Fischer rat cell line, 3Y1. *Exp. Cell Res.*, **150**: 60-67.
- 3) **Ninomiya-Tsuji, J., Goto, Y., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1986. Defect in prereplicative phase of G0-specific ts mutant, tsJT60. *Exp. Cell Res.*, **165**: 191-198.
- 4) **Ide, T., Ninomiya-Tsuji, J., Ferrari, S., Philiponis, V., and Baserga, R.** 1986. Expression of growth-regulated genes in tsJT60 cells, a temperature-sensitive mutant of the cell cycle. *Biochemistry*, **25**: 7041-7046.
- 5) **Ninomiya-Tsuji, J., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1987. Entrance of SV40-transformed cells into G0 phase as revealed by a study using the G0-specific ts mutant tsJT60. *Cancer Res.*, **47**: 6028-6032.
- 6) **Ninomiya-Tsuji, J., Nakahara, Y., Ito, C., Akiyama, T., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1987. Bypass of the ts block of tsJT60, a G0-specific ts mutant from rat fibroblasts, by fetal bovine serum and epidermal growth factor. *Cell Struct. Funct.*, **12**: 421-432.
- 7) **Ninomiya-Tsuji, J., Goto, Y., Ishibashi, S., Shiroki, K., and Ide, T.** 1987. Induction of DNA synthesis in G0-specific ts mutant, tsJT60, following infection with SV40 and adenoviruses. *Exp. Cell Res.*, **171**: 509-512.
- 8) **Ninomiya-Tsuji, J., Nakahara, Y., Ito, C., Akiyama, T., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1987. Epidermal growth factor has a unique effect in combination with fetal bovine serum to bypass the ts-block of G0-specific ts mutant tsJT60. *Exp. Cell Res.*, **171**: 86-93.
- 9) **Tai, Y. Y., Goto, Y., Ninomiya-Tsuji, J., Kameoka, Y., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1988. A cell cycle G0-ts mutant, tsJT60, becomes lethal at the nonpermissive temperature after transformation with adenovirus 12E1B 19K mutant. *Exp. Cell Res.*, **179**: 50-57.
- 10) **Tai, Y. Y., Ninomiya-Tsuji, J., Furuoku, K., Ogawa, N., Ishibashi, S., Shiroki, K., Segawa, K., Tsuchida, N., Shibuya, M., and Ide, T.** 1990. Nonlethal Go-ts mutant tsJT60 becomes lethal at the nonpermissive temperature after transformation: A hint for new cancer chemotherapeutics. *Cell Struct. Funct.*, **15**: 385-391.
- 11) **Hatakeyama, Y., Tsuyama, N., Sasaki, T., and Ide, T.** 1995. Improved transfection efficiency of 3Y1 and its derivative cells. *Tissue Cult. Res. Comm.*, **14**: 141-145.

- 12) **井出利憲** 1985. 動物細胞の細胞周期—G0期の周辺, 生化学 **57**: 255-295.
- 13) **井出利憲** 1989. 細胞増殖のしくみ, 共立出版株式会社 pp.1-148.
- 14) **Tanonaka, K., Ninomiya-Tsuji, J., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1986. Isolation of ts mutant cells which arrest in G1/G0 phase at the non-permissive temperature in the presence of appropriate growth factors from a Fischer rat cell line, 3Y1. *Exp. Cell Res.*, **165**: 337-344.
- 15) **Takasuka, T., Ninomiya-Tsuji, J., Sakayama, M., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1990. A temperature-sensitive cell-cycle mutant of mammalian cells, tsJT16, is defective in a function operating soon after growth stimulation. *Cell Struct. Funct.*, **15**: 39-45.
- 16) **Takasuka, T., Sakayama, M., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1990. tsJT16, a cell-cycle ts mutant defective in a function operating soon after growth stimulation, fails to induce a primarily activated labile nuclear protein. *Cell Struct. Funct.*, **15**: 47-52.
- 17) **Miyake, E., Takasuka, T., Sakayama, M., and Ide, T.** 1991. A cell cycle ts mutant, tsJT16, is defective in p70 synthesis through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *Cell Struct. Funct.*, **16**: 315-321.
- 18) **Takasuka, T., Sakayama, M., Miyake, E., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1991. A nuclear labile protein, p70, is expressed exclusively during G0-S transition but not in G1 phase of a cell cycle ts mutant, tsJT16. *Cell Struct. Funct.*, **16**: 81-85.
- 19) **Sasaki, T., Kameoka, Y., Kamase, S., and Ide, T.** 1994. Isolation of a mammalian cell cycle ts mutant, tsJT663, defective in preparation for passing restriction point. *Exp. Cell Res.*, **214**: 209-214.
- 20) **Ueohzono, T., Tanida-Miyake, E., Kato, N., and Ide, T.** 1994. tsJT16, a cell cycle ts mutant of rat fibroblasts defective in early G0/G1 transition, fails to induce G1 cyclin and cdk2 genes after serum stimulation at the nonpermissive temperature. *Cell Struct. Funct.*, **19**: 341-348.
- 21) **Kashima, N., Ueohzono, T., Fornace, A. J., and Ide, T.** 1995. Induction of gadd153 gene in G0-specific ts mutant cells at nonpermissive temperature. *Exp. Cell Res.*, **217**: 324-328.
- 22) **Ohta, T., Takasuka, T., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1985. Cytochalasin D inhibits the progression from the G0 to S phase at the mid-prereplicative stage in GC-7 cells stimulated with serum. *Cell Struct. Funct.*, **10**: 37-46.
- 23) **Takasuka, T., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1987. Blockage of prereplicative progression by cytochalasin D in serum-stimulated GC-7 cells. *Cell Struct. Funct.*, **12**: 559-565.
- 24) **Miura, M., Ninomiya-Tsuji, J., Tsuji, Y., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1987. Colchicine activates cell cycle-dependent genes in growth-arrested rat 3Y1 cells. *Exp. Cell Res.*, **173**: 294-298.
- 25) **Takasuka, T., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1987. GC-7 cells are growth arrested by cytochalasin D at two different points in the cell cycle. *Exp. Cell Res.*, **171**: 287-293.
- 26) **Tsuji, K., Ueno, A., and Ide, T.** 1991. Dual effect of protein kinase C on the induction of DNA synthesis by colcemid in G0-arrested human diploid fibroblasts. *Cell Struct. Funct.*, **16**: 73-80.
- 27) **Tsuji, K., Ueno, A., and Ide, T.** 1992. Inhibitory effect of taxol, a microtubule stabilizing agent, on induction of DNA synthesis is dependent upon cell lines and growth factors. *Cell Struct. Funct.*, **17**: 139-144.
- 28) **Fukami, J., Tsuji, K., Ueno, A., and Ide, T.** 1995. Transforming growth factor- β 1 has both promoting and inhibiting effects on induction of DNA synthesis in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **216**: 107-112.
- 29) **Takasuka, T., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1987. Expression of cell-cycle-dependent genes in serum stimulated cells whose entry into S phase is blocked by cytochalasin D. *Biochim. Biophys. Acta*, **909**: 161-164.
- 30) **Ide, T., Anzai, K., and Andoh, T.** 1976. Enhancement of SV40 transformation by treatment of C3H2K cells with UV light and caffeine. II. The effects of multiplicity of infection, cell phase, and time with caffeine. *Virology*, **72**: 480-485.
- 31) **Whelly, S., Ide, T., and Baserga, R.** 1978. Stimulation of RNA synthesis in isolated nucleoli by preparations of simian virus 40 T antigen. *Virology*, **88**: 82-91.
- 32) **Ide, T., Whelly, S., and Baserga, R.** 1977. Stimulation of RNA synthesis in isolated nuclei by partially purified preparations of simian virus 40 T-antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 3189-3192.

- 33) **Baserga, R., Ide, T., and Whelly, S.** 1978. Stimulation of ribosomal RNA synthesis in isolated nuclei and nucleoli by partially purified preparations of SV40 T-antigen. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, **XLII**: 685-691.
- 34) **Ide, T., Ohta, T., Shinohara, Y., and Ishibashi, S.** 1979. Persisting DNA synthesis in SV40-transformed cells in the presence of cycloheximide. *Nature*, **278**: 264-265.
- 35) **Tsuji, Y., Ide, T., and Ishibashi, S.** 1983. Correlation between the presence of T-antigen and the reinitiation of host DNA synthesis in senescent human diploid fibroblasts after SV40 infection. *Exp. Cell Res.*, **144**: 165-169.
- 36) **Ide, T., Tsuji, Y., Ishibashi, S., and Mitsui, Y.** 1983. Reinitiation of host DNA synthesis in senescent human diploid cells by infection with simian virus 40. *Exp. Cell Res.*, **143**: 343-349.
- 37) **Ide, T., Tsuji, Y., Nakashima, T., and Ishibashi, S.** 1984. Progress of aging in human diploid cells transformed with a tsA mutant of simian virus 40. *Exp. Cell Res.*, **150**: 321-328.
- 38) **Tsuyama, N., Miura, M., Kitahira, M., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1991. SV40 T-antigen is required for maintenance of immortal growth in SV40-transformed human fibroblasts. *Cell Struct. Funct.*, **16**: 55-62.
- 39) **Hayflick, L., and Moorehead, P. S.** 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, **25**: 585-621.
- 40) **Tsuji, Y., Ide, T., Ishibashi, S., and Nishikawa, K.** 1984. Loss of responsiveness in senescent human TIG-1 cells to the DNA synthesis-inducing effect of various growth factors. *Mech. Ageing Dev.*, **27**: 219-232.
- 41) **Ide, T., Tsuji, Y., and Ishibashi, S.** 1984. Induction of host DNA synthesis in senescent human diploid fibroblasts by infection with human cytomegalovirus. *Mech. Ageing Dev.*, **25**: 227-235.
- 42) **Kihara, F., Tsuji, Y., Miura, M., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1986. Events blocked in prereplicative phase in senescent human diploid cells, TIG-1, following serum stimulation. *Mech. Ageing Dev.*, **37**: 103-117.
- 43) **Kihara, F., Ninomiya-Tsuji, J., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1986. Failure in S6 protein phosphorylation by serum stimulation of senescent human diploid fibroblasts, TIG-1. *Mech. Ageing Dev.*, **37**: 27-40.
- 44) **Tsuji, Y., Ishibashi, S., and Ide, T.** 1986. Induction of heat shock proteins in young and senescent human diploid fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.*, **36**: 155-160.
- 45) **Hara, E., Yamaguchi, T., Tahara, H., Tsuyama, N., Tsurui, H., Ide, T., and Oda, K.** 1993. DNA-DNA subtractive cDNA cloning using oligo (dT) 30-latex and PCR: Identification of cellular genes which are overexpressed in senescent human diploid fibroblasts. *Anal. Biochem.*, **214**: 58-64.
- 46) **Tahara, H., Hara, E., Tsuyama, N., Oda, K., and Ide, T.** 1994. Preparation of a subtractive cDNA library enriched in cDNAs which expressed at a high level in cultured senescent human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**: 1108-1112.
- 47) **Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H., and Oda, K.** 1994. Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **269**: 2139-2145.
- 48) **Wadhwa, R., Mitsui, Y., Ide, T., and Kaul, S. C.** 1995. On the anti-proliferative aspects of mortalin. *Int. J. Oncol.*, **7**: 69-74.
- 49) **Fujii, M., Ide, T., Wadwa, R., Tahara, H., Kaul, S. C., Mitsui, Y., Ogata, T., Oishi, M., and Ayusawa, D.** 1995. Inhibitors of cGMP-dependent protein kinase block senescence induced by inactivation of T antigen in SV40-transformed immortal human fibroblasts. *Oncogene*, **11**: 627-634.
- 50) **Fukami, J., Anno, K., Ueda, K., Takahashi, T., Takahashi, T., and Ide, T.** 1995. Enhanced expression of cyclin D1 in senescent human fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.*, **81**: 139-157.
- 51) **Tahara, H., Sato, E., Noda, A., and Ide, T.** 1995. Increase in expression level of p21^{sd1} /cip1 /waf1 with increasing division age in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Oncogene*, **10**: 835-840.
- 52) **Ito, Y., Ide, T., and Mitsui, Y.** 1998. Expressional changes in alternative splicing affecting genes during cell passage of human diploid fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.*, **105**: 105-114.
- 53) **Kakuo, S., Asaoka, K., and Ide, T.** 1999. Human is a unique species among primates in terms of telomere

- length. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**: 308-314.
- 54) **Li, H.-C., Tahara, H., Tsuyama, N., and Ide, T.** 1998. A hVt11 homologue: its expression depends on population doubling levels in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**:70-74.
- 55) **Tahara, H., Kamada, K., Sato, E., Tsuyama, N., Kim, J. K., Hara, E., Oda, K., and Ide, T.** 1995. Increase in expression levels of interferon-inducible genes in senescent human diploid fibroblasts and in SV40-transformed human fibroblasts with extended lifespan. *Oncogene* **11**: 1125-1132.
- 56) **井出利憲, 田原栄俊,** ヒトの老化・癌とテロメラーゼ, 1997, 蛋白質核酸酵素, **42**: 1351-1374.
- 57) **井出利憲,** 細胞の老化と不死化, 1994, 羊土社 pp.1-180.
- 58) **Tahara, H., Kusunoki, M., Yamanaka, Y., Matsumura, S., and Ide, T.** 2005. Gt-Telomere HPA: simple measurement of human single-stranded telomeric overhangs. *Nature Methods*, **2**: 1-3.
- 59) **Vaziri, H., Schachter, F., Uchida, I., Wei, L., Zhu, X., Effros, R., Cohen, D., and Harley, C. B.** 1993. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am. J. Human Genet.*, **52**: 661-667.
- 60) **Nakamura, Y., Hirose, M., Matsuo, H., Tsuyama, N., Kamisango, K., and Ide, T.** 1999. Simple, rapid, sensitive and quantitative detection of telomere repeats in cell lysate by hybridization protection assay (HPA). *Clin. Chem.*, **45**: 1718-1724.
- 61) **Aikata, H., Takaishi, H., Kawakami, Y., Takahashi, S., Kitamoto, M., Nakanishi, T., Nakamura, Y., Shimamoto, F., Kajiyama, G., and Ide, T.** 2000. Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation. *Exp. Cell Res.*, **256**: 578-582.
- 62) **Cawthon, R. M., Smith, K. R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., and Kerber, R. A.** 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*, **361**: 393-395.
- 63) **Kanzaki, Y., Onoue, F., Ishikawa, F., and Ide, T.** 2002. Telomerase rescues the expression levels of keratinocyte growth factor and insulin-like growth factor-II in senescent human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **279**:321-329.
- 64) **Kanzaki, Y., Onoue, F., Sakurai, H., and Ide, T.** 2003 Telomerase upregulates expression levels of interleukin (IL)-1a, IL-b, IL-6, IL-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in normal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**:150-154.
- 65) **Ohsugi, I., Tokutake, Y., Suzuki, N., Ide, T., Sugimoto, M., and Furuichi, Y.** 2000. Telomere repeat DNA form a large non-covalent complex with unique cohesive properties dissociated by Werner syndrome DNA helicase in the presence of replication protein A. *Nuc. Acid Res.*, **28**: 3642-3648.
- 66) **Kataoka, H., Tahara, H., Watanabe, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., Furuichi, Y. and Sugimoto, M.** 1997. immortalization of immunologically committed Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines accompanied by a strong telomerase activity. *Differentiation*, **62**: 203-211.
- 67) **Tahara, H., Tokutake, Y., Maeda, S., Kataoka, H., Watanabe, T., Satoh, M., Matsumoto, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., Furuichi, Y., and Sugimoto, M.** 1997. Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene*, **15**: 1911-1920.
- 68) **Sugimoto, M., Tahara, H., Okubo, M., Kobayashi, T., Goto, M., Ide, T., and Furuichi, Y.** 2004. WRN gene and other genetic factors affecting immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Genet. Cytogenet.* **152**: 95-100.
- 69) **Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y.** 1999. Incorrect use of "immortalization" for B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **73**: 9690-9691.
- 70) **Sugimoto, M., Ide, T., Goto, M., and Furuichi, Y.** 1999. Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mech. Ageing Dev.*, **107**: 51-60.
- 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., and Sugimoto, M.** 2000. Differential regulation of human RecQ family helicases in cell transformation and cell cycle. *Oncogene*, **19**: 4764-4772.
- 72) **Okubo, M., Tsurukubo, Y., Higaki, T., Kawabe, T., Goto, M., Murase, T., Ide, T., Furuichi, Y., and Sugimoto, M.** 2001. Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **129**: 30-34.
- 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., and Sugimoto, M.** 2003. In vitro establishment of tumorigenic human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *DNA and Cell Biology*, **22**:727-735.
- 74) **Sato, M., Yasuda, T., Higaki, T., Goto, M., Tanuma, S., Ide, T., Furuichi Y., and Sugimoto, M.** 2003. Innate apoptosis of human B lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus: modulation by cellular immortalization and senescence. *Cell Struct. Funct.*, **28**: 61-70.
- 75) **Sugimoto, M., Tahara, H., Ide, T., and Furuichi, F.** 2004. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res.*, **64**: 3361-3364.
- 76) **Nakamura, A., Matsuura, S., Tauchi, H., Hanada, R., Ohashi, H., Hasegawa, T., Honda, K., Masuno, M., Imaizumi, K., Sugita, K., Ide, T., and Komatsu, K.** 1999. Four novel mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Japanese patients. *J. Hum. Genet.*, **44**: 48-51.
- 77) **Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Tahara, E., Ide, T. and Ishikawa, F.** 1998. Telomerase activation by the catalytic component gene TRT in human primary fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nature Genet.*, **18**: 65-68.
- 78) **Yasumoto, S., Kunimura, C., Kikuchi, K., Tahara, H., Ohji, H., Yamamoto, H., Ide, T., and Utakoji, T.** 1996. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene*, **13**: 433-439.
- 79) **Ishii, Y., Tsuyama, N., Maeda, S., Tahara, H., and Ide, T.** 1999. Telomerase activity in hybrids between telomerase-negative and telomerase-positive immortal human cells is repressed in the different complementation groups but not in the same complementation group of immortality. *Mech. Ageing Dev.*, **110**: 175-193.
- 80) **Ohmura, H., Tahara, H., Suzuki, M., Ide, T., Shimizu, M., Yoshida, M. A., Tahara, E., Shay, J. W., Barrett, J. C., and Oshimura, M.** 1995. Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by human chromosome 3. *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**: 899-904.
- 81) **Shimada, Y., Nakano, M., Kanda, N., Murakami-Murohushi, K., Kim, J. K., Ide, T., and Murohushi, H.** 1997. Cell cycle-dependent activation of telomerase in naturally synchronized culture of a true slime mold, *Physarum polycephalum*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **232**: 492-496.
- 82) **Yoshida, K., Yoshizato, A., Kakuo, S., Tahara, H., and Ide, T.** 2004. Establishment of lifespan-extended human astrocytes with normal phenotypes by introduction of telomerase gene. *Tissue Cult. Res. Commun.*, **23**: 59-69.
- 83) **Sarin, K. Y., Cheung, P., Gilison, D., Lee, E., Tennen, R. I., Wang, E., Artandi, M. K., Oro, A. E., and Artandi, S. E.** 2005. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature*, **436**: 1048-1052.
- 84) **Tahara, H., Kuniyasu, H., Yokozaki, H., Yasui, W., Shay, J. W., Ide, T., and Tahara, E.** 1995. Telomerase activity in precancerous and cancerous lesions of gastric and colorectal tissues. *Clinical Cancer Res.*, **1**: 1245-1251.
- 85) **Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J. W., Tahara, E., Kajiyama, G., and Ide, T.** 1995. Telomerase activity in human liver tissues: Comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.*, **55**: 2734-2736.
- 86) **Sugino, T., Yoshida, K., Bolodeoku, J., Tahara, H., Buley, I., Menek, S., Wells, C., Goodison, S., Ide, T.,**

- Suzuki, T., Tahara, E., and Tarin, D.** 1996. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: Diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int. J. Cancer*, **69**: 301-306.
- 87) **Ide, T., Tahara, H., Nakashio, R., Kitamoto, M., Nakanishi, T., and Kajiyama, G.** 1996. Telomerase in hepatocellular carcinogenesis. *Human Cell*, **9**: 283-286.
- 88) **Nakashio, R., Kitamoto, M., Tahara, H., Nakanishi, T., Ide, T., and Kajiyama, G.** 1997. Significance of telomerase activity in the diagnosis of small differentiated hepatocellular carcinomas. *Int. J. Cancer*, **74**: 141-147.
- 89) **Murakami, J., Nagai, N., Ohama, K., Tahara, H., and Ide, T.** 1997. Telomerase activity in ovarian tumors. *Cancer*, **80**: 1085-1092.
- 90) **Nakashio, R., Kitamoto, R., Nakanishi, T., Tahara, H., Ide, T., Asahara, T., and Kajiyama, G.** 1997. Alteration of telomeric repeat length in hepatocellular carcinoma is independent of telomerase activity. *Int. J. Oncol.*, **11**: 139-143.
- 91) **Yasui, W., Tahara, H., Tahara, E., Fujimoto, J., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Ide, T., and Tahara, E.** 1998. Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* **89**: 1187-1194.
- 92) **Hiyama, T., Yokozaki, H., Kitadai, Y., Tahara, E., Tahara, H., Ide, T., Haruma, K., Yasui, W., Kajiyama, G., and Tahara, E.** 1998. In situ mRNA hybridization technique for analysis of human telomerase RNA in gastric precancerous and cancerous lesions. *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**: 1099-1103.
- 93) **Nakamura, Y., Tahara, E., Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., and Ide, T.** 1999. Quantitative re-evaluation of telomerase activity in cancerous and noncancerous gastrointestinal tissues. *Mol. Carcinog.* **26**: 312-320.
- 94) **Harada, K., Kurisu, K., Arita, K., Sadamoto, T., Tahara, H., Tahara, E., Ide, T., and Uozumi, T.** 1999. Telomerase activity in central nervous system malignant lymphoma. *Cancer*, **86**: 1050-1055.
- 95) **Yasui, W., Tahara, E., Tahara, H., Fujimoto, J., Naka, K., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Ide, T., and Tahara, E.** 1999. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**: 589-595.
- 96) **Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., Fujimoto, J., Ito, K., Tamai, K., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Tahara, E., and Ide, T.** 1999. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene*, **18**: 1561-1567.
- 97) **Kitamoto, M. and Ide, T.** 1999. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer*, **85**: 245-246.
- 98) **Harada, K., Kurisu, K., Sadatomo, T., Tahara, H., Tahara, E., Ide, T., and Tahara, E.** 2000. Growth inhibition of human glioma cells by transfection-induced P21 and its effects on telomerase activity. *J. Neurooncol.* **47**: 39-46.
- 99) **Harada, K., Kurisu, K., Tahara, H., Tahara, E., Ide, T., and Tahara, E.** 2000. Telomerase activity in primary and secondary glioblastomas multiforme as a novel molecular tumor marker. *J. Neurosurg.* **93**: 618-25.
- 100) **Kawakami, Y., Kitamoto, M., Nakanishi, T., Yasui, W., Tahara, E., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Tahara, H., Ide, T., and Kajiyama, G.** 2000. Immuno-histochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in human liver tissues. *Oncogene*, **19**: 3888-3893.
- 101) **Takaishi, H., Kitamoto, M., Takahashi, S., Aikata, H., Kawakami, Y., Nakashio, R., Nakanishi, T., Nakamura, Y., Shimamoto, F., Asahara, K., Kajiyama, G., and Ide, T.** 2000. Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity by sensitive quantitation using hybridization protection assay. *Cancer*, **88**: 312-317.
- 102) **Takahashi, S., Kitamoto, M., Takaishi, H., Aikata, H., Kawakami, Y., Nakanishi, T., Shimamoto, F., Tahara, E., Tahara, H., Ide, T., and Kajiyama, G.** 2000. Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas. *Eur. J. Cancer.* **36**:496-502.
- 103) **Yano, Y., Yoshida, K., Osaki, A., Toge, T., Tahara, H., Ide, T., and Yasui, W.** 2002. Expression and distribution of human telomerase catalytic component, hTERT, in human breast tissues. *Anticancer Research*, **22**: 4101-4108.

- 104) **Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ishikawa, N., Sato, N., Nagai, E., Takaishi, H., Ide, T., and Tanaka, M.** 2004. A highly-sensitive and quantitative telomerase activity assay with pancreatic juice is useful for diagnosis of pancreatic cancer without problems due to PCR inhibitors: Analysis of 100 samples of pancreatic juice from consecutive patients. *Cancer*, **101**: 2309-2317.
- 105) **Kitamoto, M., Takaishi, H., Takahashi, S., Aikata, H., Nakanishi, T., Chayama, K., Tahara, H., and Ide, T.** 2004. Telomeres and telomerase in hepatocellular carcinoma. *Recent Res. Devel. Cancer*, **6**: 191-210.
- 106) **Hirose, M., Abe-Hashimoto, J., Ogura, K., Tahara, H., Ide, T., and Yoshimura, T.** 1997. A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay (HPA) connected with telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **123**: 337-344.
- 107) **Hirose, M., Abe-Hashimoto, J., Tahara, H., Ide, T. and Yoshimura, T.** 1998. A new method to detect and measure telomerase activity by transcription-mediated amplification (TMA) and hybridization protection assay (HPA). *Clinical Chem.* **44**: 2446-2452.
- 108) **Tokutake, K., Takehisa, M., Watanabe, T., Maeda, S., Tahara, H., Sakamoto, S., Niida, H., Sugimoto, M., Ide, T. and Furuichi, Y.** 1998. Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**: 765-772.
- 109) **Tachibana, N. and Ide, T.** 2003. Characterization of extrachromosomal telomere repeat DNA-protein complexes in telomerase-negative immortal cells. *Tissue Cult. Res. Commun.*, **22**: 89-100.
- 110) **Higaki, T., Watanabe, T., Tamatomi, I., Tahara, H., Sugimoto, M., Furuichi, Y., and Ide, T.** 2004. Terminal telomere repeats are actually short in telomerase-negative immortal human cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**: 1932-1938.
- 111) **Tahara, E., Jr., Tahara, H., Kanno, M., Naka, K., Takeda, Y., Ishihara, H., Yasui, W. barrett, J. C., Ide, T., and Tahara, E.** 2005. G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell *Cancer Immunol. Immunoth.*, **54**: 729-740.
- 112) **Tahara, H., Shin-ya, K., Seimiya, H., Yamada, H., Matsumura, S., Tsuruo, T., and Ide, T.** 2006. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3'telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene*, **25**: 1955-1966.
- 113) **井出利憲**, 培養細胞入門ノート (現7刷り), 羊土社, pp.1-163 (1999).
- 114) **井出利憲**, 分子生物学講義中継 part 1 (現9刷り), 羊土社, pp.1-259 (2002).
- 115) **井出利憲**, 分子生物学講義中継 part 2 (現5刷り), 羊土社, pp.1-161 (2003).
- 116) **井出利憲**, 分子生物学講義中継 part 3 (現4刷り), 羊土社, pp.1-209 (2004).
- 117) **井出利憲**, 分子生物学講義中継 part 0 上 (現3刷り), 羊土社, pp.1-233 (2005).
- 118) **井出利憲**, 分子生物学講義中継 part 0 下 (現2刷り), 羊土社, pp.234-489 (2006).
- 119) **井出利憲**, 細胞の老化, サイエンス社, pp.1-179 (2006).