

京都大学	博士 (医学)	氏名	三嶋 眞紗子
論文題目	TERT upregulation promotes cell proliferation via degradation of p21 and increases carcinogenic potential (TERT の高発現は p21 の分解を介して細胞増殖を促進し発癌ポテンシャルを上昇させる)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】 肝細胞癌では、テロメラーゼ逆転写酵素 (<i>TERT</i>) 遺伝子に関連する異常が最も高頻度に認められることが報告されている。これらの異常はいずれも TERT 高発現を引き起こし、肝発癌に関わると考えられている。TERT はテロメアの維持に必須であるが、TERT 高発現が肝発癌において果たす意義は明らかでない。本研究では、肝特異的 Tert 過剰発現モデルマウスを作成・解析することにより、肝発癌過程における TERT 高発現の意義を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】 アルブミンプロモーター下に <i>Cre</i> が挿入されたマウス (<i>Alb-Cre</i>) と、<i>Cre</i> recombinase 作用下で Tert を発現するマウス (<i>Tert</i>Tg) を交配し、肝特異的に Tert を過剰発現するマウス (<i>Alb-Cre;Tert</i>Tg) を作成した。① チオアセトアミド (TAA) の自由引水により慢性肝炎刺激を 24-30 週間加え、表現型を解析した。② <i>Alb-Cre;Tert</i>Tg の肝組織のトランスクリプトーム解析を行い、TERT 過剰発現により変動する分子経路を解析した。③ ②で得られた結果から、候補となる発癌関連分子経路を同定し、肝癌細胞株を用いて機能解析実験を行った。④ ヒト肝癌臨床検体を用いて Tert 発現と連関する遺伝子発現の解析を行った。</p> <p>【結果】 ① <i>Alb-Cre;Tert</i>Tg の肝組織は、コントロール群 (<i>Tert</i>Tg) と同程度の慢性肝炎像を呈し、肝腫瘍の発生率に有意差を認めなかった。② 背景肝組織におけるトランスクリプトーム解析にて、<i>Alb-Cre;Tert</i>Tg では TNF-NFκB シグナル、細胞周期、アポトーシスに関連する遺伝子群の発現が上昇していた。この結果から、アポトーシスの中心的な役割を果たす p53 の非機能下における Tert 高発現の意義を検討するために、<i>Alb-Cre;Tert</i>Tg に <i>Trp53</i> を欠損させたマウス (<i>Alb-Cre;Trp53^{f/f};Tert</i>Tg) を作成した。これらのマウスに TAA を 24-30 週間自由引水させたところ、<i>Alb-Cre;Trp53^{f/f};Tert</i>Tg には他のマウスと比較し、高頻度に肝腫瘍が発生した。この結果より p53 非機能下における Tert 高発現は肝発癌を誘発することが示唆された。③ TNF-NFκB シグナル、細胞周期関連経路について肝癌細胞株を用いて機能解析を行った。免疫沈降法とルシフェラーゼアッセイにより、TERT が NFκB p65 と直接結合し NFκB プロモーター活性を増強することが明らかになった。また、フローサイトメトリーの結果から TERT を knockdown すると S 期の細胞数の割合が減少することがわかった。免疫沈降法により TERT は細胞周期を負に制御する p21 とサイクリン A2 またはサイクリン E と複合体を形成することが明らかになった。TERT のノックダウンによりユビキチン化 p21 の発現が低下することから、TERT がユビキチン化を介して p21 の発現を抑制し細胞周期の亢進させることが示唆された。④ TCGA データベースを用いて TERT の高発現例と低発現例を比較すると、TERT 高発現群において細胞周期が亢進していることが分かった。また、ヒト肝細胞癌サンプルを用いた TERT と p21 の免疫染色により、両者の発現レベルが逆相関することが明らかとなった。</p> <p>【結論】 TERT の過剰発現は、NFκB プロモーター活性の上昇や p21 のユビキチン化を介した細胞周期亢進を引き起こし、肝発癌のポテンシャルを上昇させる可能性が示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究では肝発癌過程における TERT の役割を解明することを目的とした。肝特異的 Tert 過剰発現マウス (*Alb-Cre;Tert*Tg) の肝腫瘍発生率は慢性肝炎刺激下でも上昇しない一方、背景肝組織のトランスクリプトーム解析では炎症・細胞周期・アポトーシス関連遺伝子群の発現に変動が認められた。実際、Tert 過剰発現 + *Trp53* 欠失マウス (*Alb-Cre;Trp53^{f/f};Tert*Tg) は他のマウスと比較し、高率に肝腫瘍の発生が認められた。肝癌細胞株を用いた機能解析により、TERT が p65 と結合し NF κ B プロモーター活性を増強させることが明らかとなった。また、TERT のノックダウンにより各種 Cyclin の発現低下を伴って細胞増殖活性が低下することや、TERT が p21/CyclinA/CyclinE と結合すること、TERT のノックダウンによりユビキチン化 p21 の発現が低下することから、TERT が p21 のユビキチン化を介して細胞周期を亢進させる可能性が示唆された。ヒト肝癌検体を用いた TERT と p21 の免疫染色にて、両者の発現は逆相関にあることが分かった。TCGA データベースの解析では、TERT 高発現群で細胞周期関連分子の発現亢進が認められた。以上より、TERT の過剰発現は、NF κ B プロモーター活性の上昇や p21 のユビキチン化を介した細胞周期の亢進を生じ、肝発癌に寄与する可能性が示唆された。

以上の研究は肝細胞癌における TERT が有する役割の解明に貢献し肝細胞癌発生機序の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、令和 6 年 11 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。