

肝切除後のテロメラーゼ活性

防衛医科大学校外科学第1講座, 同 微生物学講座*

乾 多久夫 初瀬 一夫 相原 司 大草 康
倉永 憲二 川原林伸昭 辻本 広紀 滝川 利通
四ノ宮成祥* 望月 英隆

テロメラーゼ活性は、いくつかの例外を除いて成人体細胞では検出されないといわれているが、肝再生過程において活性が亢進する可能性がある。今回、ラット70%肝切除後肝再生モデルで、12時間、24時間、36時間、48時間、72時間後、および1週、4週後の各時点での残肝のテロメラーゼ活性、細胞周期の比率(G_0/G_1 期, S期, G_2/M 期)および再生率と平均再生速度を測定した。テロメラーゼ活性検出はTRAP法を用い、内部標準を使って活性を定量化した。テロメラーゼ活性は肝切除12時間、24時間後で正常ラット肝と比較し有意に亢進したのち徐々に減衰し、1週後には正常レベルとなった。一方、S期細胞の占める比率は、24時間、36時間後でピークとなった。平均残肝再生速度とテロメラーゼ活性との間には有意な正の相関を認めた。これらから、肝切除がテロメラーゼの活性化を惹起すること、また、テロメラーゼ活性はDNA合成に先行して亢進していることが示された。

はじめに

テロメラーゼは、染色体末端に存在するテロメア配列(5' TTAGGG 3')を特異的に認識して延長反応を行い、細胞分裂に伴うテロメアDNAの短縮を補う逆転写酵素である¹⁾。大部分の癌細胞では強いテロメラーゼ活性が認められるものの、成熟体細胞ではいくつかの例外を除いて、ほとんど活性は認められない^{2,3)}。正常肝細胞は通常ほとんどが G_0 期で⁴⁾、細胞分裂は約2万個に1個といわれている⁵⁾。ところが、広範囲肝切除後では残存肝の再生、すなわち肝細胞の増殖は盛んであり、肝は短期間のうちにかなりの重量を回復することから、テロメラーゼ活性との関連が注目される。そこで今回、ラット肝切除後テロメラーゼ活性の経時変化と、再生率ならびに細胞周期との関連性について検討した。

方 法

1. 部分肝切除術

8週齢Donryu系雄性ラット48匹(体重 269 ± 31.1 g)にエーテル麻酔したのち、Higginsら⁶⁾の方法により、70%部分肝切除術を施行した。肝切除後12時間($n=7$)、24時間($n=7$)、36時間($n=7$)、48時間($n=7$)、72時間($n=7$)、および1週($n=7$)、4週($n=6$)の各時

点で残肝を摘出した。なお、正常ラット肝のテロメラーゼ活性測定のために、同種同週齢ラット3匹をエーテル麻酔下で開腹し、全肝を摘出した。

2. テロメラーゼ活性検出法

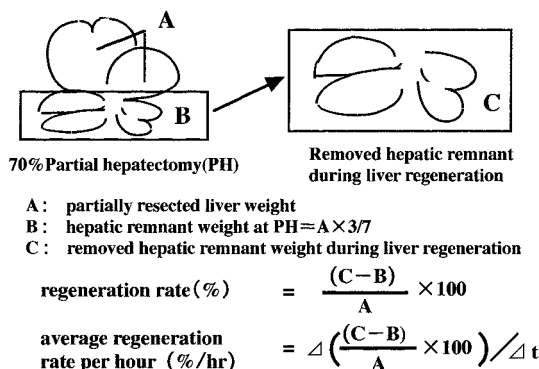
Modified telomeric repeat amplification protocol (Modified TRAP法)を用いて、以下のとおり残肝テロメラーゼ活性を相対評価した。

まず、各時点で摘出した残肝をhomogenize処理したのち、1×CHAPS溶解液で蛋白を抽出し濃度を0.5 mg/mlに調整した。Oncor社のTRAPEze™テロメラーゼ活性検出キットを使用し、23℃で10分間のテロメラーゼ伸長反応ののちポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)により伸長したテロメア配列の増幅を行った(94℃30秒, 55℃30秒, 72℃90秒/33サイクル)。TSプライマーはジゴキシゲニンで標識したものをを用いた。15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後(polyacrylamide gel electrophoresis: 以下、PAGEと略記)、ナイロン膜へ転写し、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニンCSPDによる化学発光で活性を検出した。

画像解析用ソフトウエアNIH imageを用い、テロメラーゼにより生じた50bpより始まり6bpずつ増加するladderと、36bpに存在するinternal standard(内部標準)との強度比を用いて活性を数値化し相対評価した。

<1999年9月22日受理> 別刷請求先: 乾 多久夫
〒359 8513 所沢市並木3-2 防衛医科大学校外科学
第1講座

Fig. 1 Regeneration rate (%), and average regeneration rate per hour (%/hr) of the hepatic remnant.



3. 細胞周期の測定

摘出した残肝より細胞を分離し, propidium iodide で核 DNA を蛍光染色したのち (Becton-Dickinson 社, Cycle Test™), FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson 社) で DNA 量を計測し, 描出されたヒストグラムの形状から G_0/G_1 期, S 期, G_2/M 期のおおのの比率を算出した。

4. 残肝再生率と平均残肝再生速度の測定

肝切除後再生により増加した肝重量(肝再生量)は, 肝切除後各時点における残肝重量(C)から初回肝切除時の予想残肝重量(B: Higgins ら⁶⁾の方法による切除肝重量 A は, 全肝重量の約70%であり, B は切除肝重量の約 7 分の 3 の割合であると予想される)を差し引

いた分(C-B)であり, これを初回肝切除時の切除肝重量(A)で割った値を残肝再生率(%)とした($(C-B)/A$)。また, 各時点における残肝再生率の平均値の変化率(%/hr)を平均残肝再生速度とした(Fig. 1)。

なお, 統計学的解析では, 各時点間におけるテロメラーゼ活性の平均値の差異に対して, Student's t test を用い, $p < 0.05$ をもって統計学的に有意であるとした。

結 果

1. 肝切除後テロメラーゼ活性の推移

肝切除後のテロメラーゼ活性(電気泳動でみられる ladder)の時間経過を Fig. 2 に示す。12 時間後および 24 時間後では ladder が鮮明に濃く観察されたが, 36 時間後以降は ladder が薄くなった。

NIH image を用いて数値化したテロメラーゼ活性の経時的変化を Fig. 3 に示す。正常ラット肝のテロメラーゼ活性の平均値は 1.07 (arbitrary unit: 以下 AU と略記)であった。肝切除後 12 時間, 24 時間, 36 時間, 48 時間, 72 時間, および 1 週, 4 週での平均テロメラーゼ活性はそれぞれ 3.80 AU, 3.37 AU, 1.52 AU, 1.40 AU, 1.47 AU, 1.02 AU, 1.01 AU であった。12 時間後および 24 時間後の活性は正常ラット肝と比較して有意に高値を示した($p < 0.001$)。36 時間後以降は漸減し, 1 週, 4 週後では正常ラット肝の活性レベルにまで低下した。

2. 細胞周期とテロメラーゼ活性

テロメラーゼ活性と細胞周期の関係を経時的に検討したところ, 12 時間後および 24 時間後におけるテロメラーゼ活性が, 正常ラット肝のテロメラーゼ活性と比

Fig. 2 Typical patterns of telomerase activity after partial hepatectomy. TRAP products were visualized by PAGE analysis

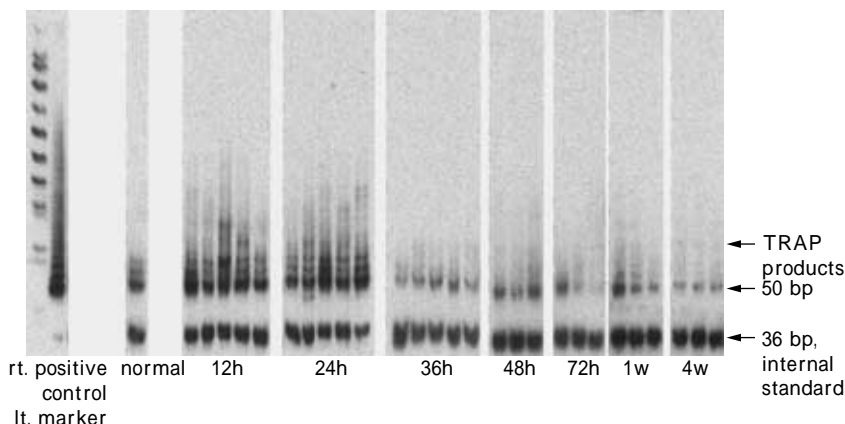
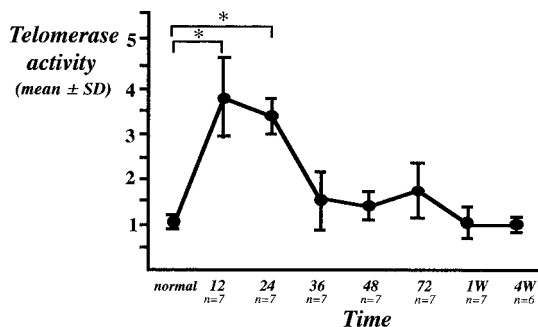


Fig. 3 Time course of the telomerase activity after partial hepatectomy. The activity strongly increased at 12 and 24 hrs and gradually decreased to normal level at 1 wk after partial hepatectomy. * $p < 0.001$



較し有意に高かったのに対して、各時点での DNA 合成期,すなわち,S 期細胞の占める比率は24時間後および36時間後で高い結果となった (Fig. 4)。

3. 残肝再生率と平均残肝再生速度

肝切除後各時点での残肝再生率の平均値は,5.68%,23.9%,39.4%,48.8%,58.4%,88.3%,119.6%であった (Fig. 5左)。平均残肝再生速度は残肝再生率の平均値を結んだ直線の傾きで表され,おのおの0.47%/hr,1.52%/hr,1.29%/hr,0.78%/hr,0.40%/hr,0.31%/hr,0.06%/hrであった (Fig. 5右)。

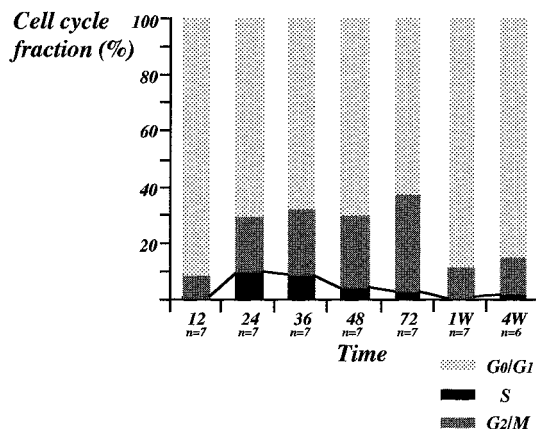
4. テロメラーゼ活性と平均残肝再生速度

肝切除後各時点におけるテロメラーゼ活性と平均残肝再生速度との関係を Fig. 6に示す。両者の間には有意な正の相関を認めた ($r=0.858$, $p<0.001$)。

考 察

テロメラーゼは1985年に Greider ら⁷⁾によって,原生動物である繊毛虫類テトラヒメナにおいてはじめて同定されて以来,1997年には中山ら⁸⁾によりその構成要素が同定されるなど,近年の分子生物学的手法の発展によりその研究は大きく進展した。また,1994年 Kim ら²⁾により,簡便なテロメラーゼ活性検出法である TRAP 法が登場し,癌とテロメラーゼとの高い相関性が報告されるようになった。さらには,前癌組織にも強い活性を認める場合があり⁹⁾,将来,癌治療の指針や癌予知因子としての可能性も期待されている。一方,正常体細胞においては幹細胞を含む組織,たとえば骨髓細胞,皮膚,毛のう,消化管粘膜上皮などや末梢血リンパ球には微弱ながらテロメラーゼ活性がみられる¹⁰⁾。しかし,増殖刺激を受けて細胞分裂を行うその

Fig. 4 Ratio of cell cycle among G₀/G₁, S, and G₂/M phase. The increase in the ratio of S phase is observed at 24 and 36 hrs after partial hepatectomy.



他の正常体細胞では,テロメラーゼ活性は全く検出されない¹¹⁾。

ところで,肝切除後肝再生過程における肝細胞増殖様式は成熟した肝細胞が増加する simple duplication で,先に述べた幹細胞の分裂,分化ではないことが特徴である¹²⁾。しかしながら,肝細胞としての機能を持ちつつ,旺盛な増殖能力をもつ小型肝細胞を,古典的な幹細胞の定義上の committed stem cell に相当する臨床的幹細胞とする意見もある⁴⁾。このように肝切除後の肝細胞は幹細胞のごとく旺盛な増殖能力をもつ一方,時期がくると増殖が制御されるわけで,テロメラーゼとの関連性に興味もたれる。

そこで本研究は,肝切除後の肝再生過程におけるテロメラーゼ活性の経時的変化を検討することによって,肝切除後の肝細胞増殖制御におけるテロメラーゼの関与を明らかにすることを目的とした。今回の検討では,肝切除12時間および24時間後の肝再生時のテロメラーゼ活性は,正常ラット肝のテロメラーゼ活性と比較し有意に高く,肝再生終了に先行しテロメラーゼ活性も正常ラット肝の活性レベルに復した。これらより,肝切除刺激にともない,テロメラーゼ活性が一時的に上昇したのち,漸減することが明らかとなった。Tsujiuchi ら¹³⁾は,6週齢のラットを用いて部分肝切除(3分の2切除)を施行し,その後のテロメラーゼ活性を経時的に測定した結果,肝切除6時間後から36時間後までテロメラーゼ活性は上昇し,72時間後には肝切除直後の残存肝の活性レベルにまで減少したと報告して

Fig. 5 Regeneration rate (left) and average regeneration rate per hour (right) of the hepatic remnant after partial hepatectomy.

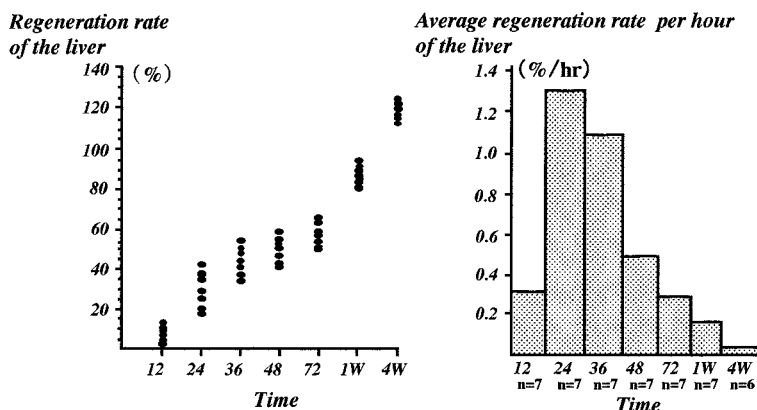
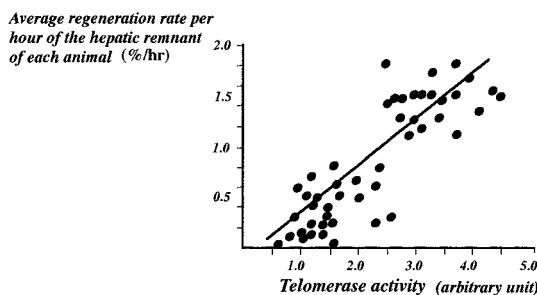


Fig. 6 Relationship between telomerase activity and average regeneration rate per hour of the hepatic remnant of each animal after partial hepatectomy ; a positive linear correlation was observed ($r=0.858$, $p<0.001$).



いる。また, Golubovskaya ら¹⁴⁾は, 7週齢のラットを用いて, 70%部分肝切除を施行したところ, 肝切直後の残存肝の活性レベルと比較して, 12時間後のテロメラーゼ活性は1.5倍, 24時間後には2倍に上昇したと報告している。一方, Yamaguchi ら¹⁵⁾は, 7週齢のラットを用いて, 70%部分肝切除を施行したところ, テロメラーゼ活性は12時間後および24時間後で減少し, 48時間後に肝切除前のテロメラーゼ活性のレベルに回復したのち, 72時間後まで上昇したと報告している。このように, 肝切除後のテロメラーゼ活性の変化については, 相反する報告がみられる。このような相違がみられるのは, 動物数の多寡およびテロメラーゼ活性の定量化, 数値化の違いに由来するものと考えられる。いずれにしても, 肝切除後肝再生に伴い, テロメラーゼ活性

の変動がみられることは明らかである。

では, この肝切除後肝再生に伴うテロメラーゼ活性の変動は, 細胞増殖周期といかに関連しているのだろうか。今回の検討から, テロメラーゼ活性のピークは切除後12, 24時間後であったのに対し, 再生肝細胞のDNA合成期, すなわち, S期の占める比率のピークは24, 36時間後であった。すなわち, テロメラーゼ活性はDNA合成に先行して亢進し, DNA合成が十分となると正常域にもどるものと考えられた。Buchkovich ら¹⁶⁾もヒト末梢血リンパ球細胞ではあるが, S期とテロメラーゼ活性に正の相関を認めている。ただ彼らは, DNA合成阻害剤でS期への移行を抑制した時に, テロメラーゼ活性はなんら影響を受けなかったことから, G_0/G_1 期における何らかの機序がテロメラーゼ活性の誘導に重要であるとしている。近年, 肝切除後の G_0/G_1 期の initiation として $TNF-\alpha$, $IL-6$ などのサイトカインの重要性が指摘されているが^{17, 18)}, これらのサイトカインが先行してテロメラーゼ活性を誘導している可能性も考えられる。

細胞周期とテロメラーゼ活性の関係からも, 肝細胞増殖とテロメラーゼ活性の上昇は, 直接関連性があるとはいえない。しかしながら, Fig. 6に示すようにテロメラーゼ活性と平均残肝再生速度との間に正の相関を認めたことから, 急速な肝再生をもたらすなんらかの伝達機構が, テロメラーゼ活性上昇をもたらす, 肝細胞増殖を抑制し再生速度を減少させるなんらかの伝達機構が, テロメラーゼ活性を抑制しているものと考えられる。

さて, 本実験の問題点は, いくつかの正常体細胞組

織においてもテロメラーゼ活性が認められる齧歯類を用いた実験であること¹⁹⁾, 類洞内皮細胞を分離していないこと, 残肝内浸潤リンパ球のテロメラーゼ活性をみている可能性を否定しきれないこと²⁰⁾, などである。したがって, 実験種を変えること, 肝細胞を分離して変動をみることなど, 慎重に評価検討せねばならない面もある。ただ, 肝切除後の細胞増殖ならびにその制御にともない, テロメラーゼ活性の up-regulation ならびに down-regulation が認められたことから, 肝切除後肝再生過程においてテロメラーゼが肝再生に関与している可能性は高く, その on/off シグナルの解明も含め, 今後の検討課題と考える。

文 献

- 1) 田原栄俊, 井出利憲: テロメラーゼの発現調節と分裂寿命. 実験医 13: 1505 1510, 1995
- 2) Kim NW, Mieczyslaw A, Piatyszek A et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266: 2011 2015, 1994
- 3) Smith JR, Pereira-Smith OM, Roy M et al: Implications for in vivo aging and tumor suppression. Science 273: 63 67, 1996
- 4) 古川 恵: 肝再生の開始機構と IL 6. Mol Med 34: 566 571, 1997
- 5) 三高俊広: 肝臓の多発性幹細胞. Mol Med 34: 554 565, 1997
- 6) Higgins GF, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch Pathol 12: 186 202, 1931
- 7) Greider CW, Blackburn EH: Identification of a specific telomerase activity in Tetrahymena extracts. Cell 43: 405 413, 1985
- 8) 中山潤一, 石川冬木: 哺乳類テロメラーゼ. 実験医 15: 1823 1828, 1997
- 9) Tahara H, Kuniyasu H, Yasui W et al: Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions Clin. Cancer Res 1: 1245 1251, 1995
- 10) 井出利憲: テロメアとテロメラーゼ: 細胞の不死化機構. 消外 20: 1185 1196, 1997
- 11) 石川冬木: テロメアの分子生物学. 実験医 15: 1800 1805, 1997
- 12) Bucher NRL: Growth of cells in hormonally defined media. Edited by Sato GH. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferations. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, p 15 26
- 13) Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Kido A et al: Induction of telomerase activity during regeneration after partial hepatectomy in the rat. Cancer Lett 122: 115 120, 1998
- 14) Golubovskaya VM, Presnell SC, Hooth MJ et al: Expression of telomerase in normal and malignant rat hepatic epithelia. Oncogene 15: 1233 1240, 1997
- 15) Yamaguchi Y, Nozawa K, Savoysky E et al: Change in telomerase activity of rat organs during growth and aging. Exp Cell Res 242: 120 127, 1998
- 16) Buchkovich KJ, Greider CW: Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. Mol Biol Cell 7: 1443 1454, 1996
- 17) Diehl AM, Rai RM: Regulation of signal transduction during liver regeneration. FASEBJ 10: 215 227, 1996
- 18) Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA et al: Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin 6 deficient mice. Science 274: 1379 1383, 1996
- 19) Prowse KR, Greider CW: Developmental and tissue-specific Regulation of mouse telomerase and telomere length. Proc Natl Acad Sci USA 92: 4818 4822, 1995
- 20) 井出利憲, 田原栄俊: テロメラーゼ. 癌と治療 23: 247 256, 1996

Telomerase Activity after Partial Hepatectomy

Takuo Inui, Kazuo Hatsuse, Tsukasa Aihara, Yasushi Okusa,
Noritsugu Kuranaga, Nobuaki Kawarabayashi, Hironori Tsujimoto, Toshimichi Takigawa,
Nariyoshi Shinomiya* and Hidetaka Mochizuki
First Department of Surgery and Department of Microbiology*, National Defense Medical College

Telomerase activity is undetectable in adult human tissues, but in proliferating hepatocytes it can be present during liver regeneration. In this study we investigated the activation of telomerase in the rat hepatic remnant, the ratio of the cell cycle (G_0/G_1 phase, S phase, G_2/M phase) the regeneration rate and the average regeneration rate per hour of the hepatic remnant at 12, 24, 36, 48, 72 hrs, 1 wk, and 4 wks after 70% partial hepatectomy in rats. Telomerase activity was assayed by the telomeric repeat amplification protocol which we modified (modified TRAP) and quantitated by using an internal standard. Telomerase activity was strongly detected at 12 and 24 hrs ($p<0.001$) and then decreased gradually to the normal level at 1 wk after hepatectomy, whereas the peak of the proportion of the S phase was at 24 and 36 hrs after the operation. The average regeneration rate per hour of the hepatic remnant correlated significantly with the telomerase activity ($r=0.858$, $p<0.001$) In conclusion, these findings may suggest that hepatectomy mediate the activation of telomerase and indicate that the activity is strongly increased before DNA synthesis.

Key words : telomerase activity, liver regeneration, partial hepatectomy, cell cycle, regeneration rate (per hour)

[Jpn J Gastroenterol Surg 33 : 12 17, 2000]

Reprint requests : Takuo Inui First Department of Surgery, National Defense Medical College
3 2 Namiki, Tokorozawa, 359 8513 JAPAN
