

氏名・本籍	夜久 英信（京都府）
学位の種類	博士（理工学）
報告番号	甲第85号
学位授与の日付	平成26年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
論文題目	Development of Cancer Therapeutics and Diagnostics Targeting Telomere and Telomerase (テロメア及びテロメラーゼを標的としたがん 治療法及びがん診断法の開発)
審査委員	(主査) 教授 杉本 直己 (副査) 教授 村嶋 貴之 (副査) 准教授 三好 大輔

論文内容の要旨

テロメラーゼによるテロメア DNA 伸長反応（テロメラーゼ反応）は細胞のがん化を導く。そこで本研究では、テロメラーゼ反応の阻害によるがん治療法及び、テロメラーゼ活性測定を介したがん診断法の開発を行った。

1. がん治療法の開発：テロメア DNA により形成される G-quadruplex 構造に結合するリガンドは、テロメラーゼ反応を阻害することが知られている。しかし従来の G-quadruplex リガンドの多くは、細胞内では染色体二本鎖 DNA とも非特異的に結合するため、競合的に G-quadruplex への結合が阻害される。さらに最近、細胞内の分子クラウディング（Molecular Crowding：MC）環境による水の活量低下も、G-quadruplex リガンドの結合を阻害することが報告された。そこでこれら阻害要因に対する G-quadruplex リガンドの官能基、中心金属、 π 平面の大きさの影響について系統的に解析した。その結果、アニオン性官能基を有するフタロシアニンは、二本鎖 DNA とは静電的に反発するため、G-quadruplex への特異性が高いことが見出された。さらにアニオン性フタロシアニンは G-quadruplex に結合する際に水分子を取り込まないため、水の活量低下による G-quadruplex への結合阻害が生じないことが示された。そのためアニオン性フタロシアニンは、大量の二本鎖 DNA 存在下及び MC 条件下においてもテロメラーゼ反応を効率よく阻害することが示された。以上の結果は、アニオン性フタロシアニンが細胞核内においても効率よくテロメア DNA の G-quadruplex に結合し、テロメラーゼ反応を阻害することを示唆している。

2. がん診断法の開発：従来のテロメラーゼ活性測定技術は、テロメラーゼ反応と Polymerase Chain Reaction（PCR）を組み合わせた手法である。そのため生体試料中の PCR 阻害分子によって擬陰性結果が生じることがあった。そこで本研究では、テロメラーゼ反応後の反応産物を磁性ビーズ上に固定化、洗浄することで、PCR 阻害

分子を取り除く手法を開発した。さらにその後に行う PCR の産物をサイクリングプローブ法によって高感度に検出する方法を開発した。その結果、これらの手法を組み合わせることによって PCR 阻害分子である胆汁酸、ビリルビン、ヘモグロビン存在下においても、阻害の影響を受けることなくがん細胞中のテロメラーゼ活性を測定できることが示された。また、検出感度 50 細胞という非常に高い感度でがん細胞を検出できることが示された。

審査結果の要旨

本研究では、がん細胞に特異的な反応であるテロメラーゼ反応に着目し、テロメラーゼ反応阻害を介したがん治療法と、テロメラーゼ活性測定を介したがん診断法の開発を行っている。

がん治療法の開発に関しては、テロメラーゼ阻害剤である G-quadruplex リガンドの多くは、細胞内では染色体二本鎖 DNA にも非特異的に結合するため、G-quadruplex への結合効率が低いという問題があった。また、細胞内では水の活量は小さく、この環境は G-quadruplex リガンドの結合能を抑制するという問題もあった。そこで本研究では、これら問題に対する G-quadruplex リガンドの官能基、中心金属、 π 平面の大きさについて系統的に解析している。その結果、アニオン性官能基が二本鎖 DNA との静電的反発に寄与し、G-quadruplex への特異性を高めることを見出し、さらにアニオン性リガンドによる G-quadruplex への結合では水分子が取り込まれないため、水の活量低下による結合抑制を受けないことを見出した。以上の結果は、G-quadruplex リガンドにおけるアニオン性官能基の重要性を初めて示したものであり、テロメラーゼ反応を阻害するリガンドの設計にも有用である。がん診断法の開発に関しては、従来技術の課題であった擬陰性結果の生じないテロメラーゼ活性測定技術を開発している。本技術は、磁性ビーズに固定した TS プライマーを用いてテロメラーゼ反応を行った後、反応産物を磁性ビーズ上で洗浄し、その後 Polymerase Chain Reaction (PCR)により増幅し、さらにこの増幅産物をサイクリングプローブ法によって高感度に検出するものである。本技術を用いることで、PCR 阻害分子の存在下においても、これらの影響を受けることなくがん細胞中のテロメラーゼ活性を測定することに成功している。

これらの成果は、国際的専門誌である、*Chemical Communications*、*Methods*、*Molecules* において発表された。また国際学会及び国内学会においても発表され、第 5 回バイオ関連化学シンポジウムではその成果が高く評価され講演賞を受賞している。さらに *Chemical Communications* 及び *Molecules* に総説を発表し、前者は Feature Article に選ばれている。

平成 26 年 1 月 29 日、本学の学位規程に従い公開講演会を行い、本論文に関する説明と質疑応答を行った。申請者の説明はきわめて明快であり、応答内容も十分満足できるものであった。

以上により下記審査委員は本論文提出者（夜久英信）が、博士課程の修了に必要な所定の単位を修得し、かつ、必要な研究指導を受け博士論文の審査及び最終試験に合格したので、博士（理工学）の学位を授与せられるに充分なる資格をもつものであると認める。