HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	短期間のテロメラーゼ阻害はDNA損傷修復の抑制を介し造血器悪性腫瘍の抗がん剤に対する感受性を増強する［全文の要約］
Author(s)	日高, 大輔
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2557 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14091号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78053
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Hidaka_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 （要約）

短期間のテロメラーゼ阻害はDNA損傷修復の抑制を介し造血器悪性腫瘍の抗がん剤に対する感受性を増強する

(Short-term telomerase inhibition sensitizes hematopoietic malignant cells to a genotoxic agent via suppression of the telomerase-mediated DNA repair process)

2020年３月

日高　大輔

学 位 論 文 （要約）

短期間のテロメラーゼ阻害はDNA損傷修復の抑制を介し造血器悪性腫瘍の抗がん剤に対する感受性を増強する

(Short-term telomerase inhibition sensitizes hematopoietic malignant cells to a genotoxic agent via suppression of the telomerase-mediated DNA repair process)

2020年３月

日高　大輔

【背景と目的】

テロメラーゼはテロメア長の維持を主たる機能とする酵素で、細胞の分裂限界回避に必須とされている。ヒトのテロメラーゼは主に逆転写酵素である human telomerase reverse transcriptase (hTERT) と鋳型 RNA から構成されている。hTERT は分化した正常細胞ではその発現が失われているか非常に少ないが、悪性腫瘍や胚細胞においては高発現している。このためテロメラーゼ阻害薬は悪性腫瘍に対する効果を期待され開発されてきた。イメテルスタットは臨床応用された世界初のテロメラーゼ阻害薬であり、テロメラーゼのテロメア伸長作用を競合的に阻害する薬剤である。血液疾患領域では、単剤での臨床試験において本態性血小板血症や原発性骨髄線維症での臨床効果が報告されている。一方で、増殖力の高い急性白血病や悪性リンパ腫に対する臨床的効果は証明されていない。我々は制限酵素により切断された DNA にテロメア配列の挿入が認められたとする報告をもとに、テロメラーゼが DNA 損傷修復に関与しているとの仮説を立てた。この仮説に基づくと、イメテルスタットは抗がん剤や放射線照射による DNA 損傷を増強し、より高い細胞増殖抑制効果をもたらす可能性がある。ヒト造血器悪性腫瘍細胞株を用いて、テロメラーゼの DNA 損傷修復機能を解明し、イメテルスタットと抗がん剤の相乗効果を明らかにする目的で実験を行った。

【材料と方法】

テロメラーゼによる DNA 損傷修復の痕跡を見出すために、ヒトゲノムデータベースを用いてテロメア配列挿入多型を探索した。テロメラーゼによる DNA 損傷修復の再現のため、clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins9 (CRISPR/Cas9) により、ゲノムの特定領域を切断し、ゲノム DNA を回収し、その領域の PCR 産物をディープシークエンスにて解析した。ヒト造血器悪性腫瘍細胞株と健常人末梢血単核球、急性白血病の臨床検体を用い、*hTERT* の mRNA、タンパクの発現とテロメラーゼ活性を検討した。また急性骨髄性白血病患者の *hTERT* の mRNA 発現レベルと予後の相関について検討した。イメテルスタットの効果をみるために、主に U937 細胞を用いて、テロメラーゼ活性、生細胞数や生細胞率、テロメア長の変化を観察した。抗がん剤との併用実験では、エトポシドを用いて、「無治療」、「エトポシド単独」、「イメテルスタット単独」、「両者の併用」の 4 群で増殖曲線を作成した。また陰性コントロールとして、イメテルスタットと化学構造は同様だが、鋳型となる塩基配列がランダムなコントロールオリゴを用いた。さらに 4-ヒドロペルオキシ-シクロフォスファミド、シタラビン、メソトレキセート、ビンクリスチン、ドキソルビシンの各抗がん剤とイメテルスタットの相乗効果を検討した。放射線照射とイメテルスタットの併用実験では DNA 損傷マーカーの γH2AX の発現をウェスタンブロット法で検討した。テロメラーゼと γH2AX の細胞内での局在を観察する目的で、健常人の末梢血単核球に放射線照射を行い、hTERT タンパクの発現やテロメラーゼ活性の経時的変化を検討すると共に、hTERT と γH2AX を蛍光免疫染色で共染色した。

【結果】

公開データの検索からヒトゲノム多型として、1 番染色体と X 染色体上にテロメア配列挿入多型を発見した。日本人 10 人における頻度は 1 番染色体の多型は 3 人、X 染色体の多

型は全員に認められ、3 人はホモ多型、7 人はヘテロ多型であった。また 293 細胞において、CRISPR/Cas9 システムによる人工的な DNA 二重鎖切断が、テロメア配列挿入によって修復されうることを見出した。挿入頻度としては少数であるが、テロメラーゼの DNA 損傷修復への関与が示唆された。hTERT はヒト造血器悪性腫瘍細胞株に広く発現しており、mRNA、タンパクの発現量、テロメラーゼ活性の強さに相関を認めた。一方で健常者の末梢血単核球において hTERT の発現、テロメラーゼ活性は認められなかった。患者検体において *hTERT* mRNA の発現は急性骨髄性白血病と比較して急性リンパ性白血病で有意に高かった。最後に *hTERT* mRNA の発現レベルと全生存率との関連をカプランマイヤー法で検討したが、発現の高低で 2 群に差は認められなかった。

次にイメテルスタットの効果を細胞株を用いて検討した。5 つの細胞株においてイメテルスタットは濃度依存性にテロメラーゼ活性を抑制した。また高濃度のイメテルスタット投与により細胞増殖は抑制されたが、殺細胞効果は認められなかった。4 つの細胞株においてイメテルスタットを継続的に投与すると、3 週目以降に有意なテロメア長短縮を認めたが、短期間（4 日目）ではテロメア長の有意な短縮は観察されなかった。単剤で細胞増殖に影響を与えない濃度のイメテルスタットを加え、抗がん剤との相乗効果を 5 つの細胞株で検討した。その結果、イメテルスタットはエトポシドの細胞増殖抑制効果を増強した。この相乗効果は U937 細胞において、4-ヒドロペルオキ-シクロフォスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシンの各抗がん剤および放射線照射との併用で観察された。さらに 5 つの細胞株においてイメテルスタットは放射線照射により誘導された γH2AX の発現を有意に増強させた。健常人の末梢血単核球を用いた検討で、放射線照射により hTERT の発現およびテロメラーゼ活性の経時的な上昇を認めた。また蛍光免疫染色を行うと、発現した hTERT と放射線照射で誘導された γH2AX の共局在が観察された。

【考察と結論】

ゲノム上に認められたテロメア配列挿入多型は、その多型の創始者となる個体の胚細胞で生じた DNA 損傷修復の過程にテロメラーゼが関与したこと示唆する。また CRISPR/Cas9 による二重鎖切断部位にテロメア配列が挿入された現象は、テロメラーゼによる DNA 損傷部位へのテロメア配列挿入が、DNA 損傷修復に寄与していることを示している。さらに健常人の末梢血単核球を用いた蛍光免疫染色の検討で、放射線照射による DNA 損傷により hTERT タンパクが発現し、その損傷部位に局在している現象が確認された。このテロメラーゼの DNA 損傷修復機能を標的とした治療戦略が、テロメラーゼ阻害薬と抗がん剤・放射線照射の併用である。造血器悪性腫瘍細胞株を用いた実験でイメテルスタットが抗がん剤や放射線照射による DNA 損傷を増強し、殺細胞効果を高めることが明らかとなった。この相乗効果はイメテルスタットによるテロメア長短縮という従来想定された抗腫瘍機序とは異なり、テロメア長には影響を与えない短期的投与で観察されるものである。単剤で用いられてきたイメテルスタットの新たな用法であり、既存の抗がん剤や放射線照射の治療効果を高める方法として期待される。ただし本検討は細胞株を用いたものであり、動物実験により相乗効果の確認を行うとともに、正常組織への影響、副作用の検証が求められる。

造血器悪性腫瘍細胞株において、イメテルスタットは抗がん剤や放射線照射による DNA 損傷を増強させ、その殺細胞効果を高めることが明らかとなった。テロメラーゼの DNA 損傷修復機能に着目した新しい治療戦略は、造血器悪性腫瘍のみならず幅広い癌腫に応用可能と考えられる。