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
Author(s)	日高, 大輔
Description	配架番号：2557
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14091号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14091
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94593
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Hidaka.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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

北　海　道　大　学

日　高　大　輔

学位論文

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

北　海　道　大　学

日　高　大　輔

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・ 1 頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 頁

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12 頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46 頁

総括と結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・52 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・53 頁

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

著者：Daisuke Hidaka, Masahiro Onozawa, Miyashita Naohiro, Shota Yokoyama, Masao Nakagawa, Daigo Hashimoto, Takanori Teshima
論文タイトル：Transient telomerase inhibition sensitizes hematopoietic malignancy cells to a genotoxic insult via suppression of the telomerase-mediated DNA repair process
学術雑誌名：Scientific Reports

本研究の一部は以下の学会にて発表を行った。

発表者：Daisuke Hidaka, Masahiro Onozawa, Miyashita Naohiro, Masao Nakagawa, Daigo Hashimoto, Takanori Teshima
演題名：Imetelstat sensitizes hematopoietic malignancy cells to a genotoxic agent via suppression of the telomerase-mediated DNA repair process
学会名：第 61 回アメリカ血液学会
日時・場所：令和元年 12 月 8 日・アメリカ/フロリダ州/オーランド

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　　日高　大輔

学 位 論 文 題 名

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)

【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、human telomerase reverse transcriptase (hTERT) と鋳型 RNA から構成されている。hTERT は分化した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、単剤での臨床試験で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、より増殖力の高い急性白血病や悪性リンパ腫に対する効果は明らかではない。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。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。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。また CRISPR/Cas9 システムによる DNA 二重鎖切断部位にテロメア配列が挿入されうることを見出した。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。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。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。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。次に、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 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において観察された。さらに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】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。

【結論】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。

【略語表】
本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ALL	acute lymphoblastic leukemia
AML	acute myeloid leukemia
BSA	bovine serum albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CRISPR/Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins9
Ct	threshold cycle
DKC1	dyskeratosis congenita 1
E	etoposide
FISH	fluorescence in situ hybridization
FITC	fluorescein isothiocyanate
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
I	imetelstat
ITSs	internal telomere sequences
MFI	mean fluorescence intensity
NC	negative control
NHP2	nucleolar protein family A, member 2
NOP10	ribonucleoprotein 10
N.S.	not significant
NT	no treatment
R	radiation
RUNX1	runt-related transcription factor 1
RUNX1T1	RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
TBS	tris-buffered saline
TCAB1	telomerase Cajal body protein 1
TERC	telomerase RNA component
TRAP	telomerase repeat amplification protocol

【緒言】

テロメア配列は真核生物の染色体末端に存在する繰り返し配列で哺乳類では「TTAGGG」の 6 塩基の繰り返し配列となっている。ヒトではテロメアの長さは 10000～15000 塩基、マウスでは 20000～60000 塩基となっており生物種によって異なる。テロメアの発見は古く、1930 年初頭に Harmann Muller が染色体末端の構造を「テロメア」と名付けたことが始まりであるが、テロメアの具体的な機能については長く不明なままであった。その後 Blackburn らはテトラヒメナの染色体末端に「CCCCAA」の繰り返し配列が存在することを発表した(Blackburn and Gall, 1978)。そして Szostak らとともにテトラヒメナの染色体末端配列を酵母に移植する実験を行い、テロメアが染色体末端を保護していることやその保護機構が真核生物に共通している可能性を報告した(Szostak and Blackburn, 1982)。さらに Greider らは、テロメア配列を維持する酵素テロメラーゼをテトラヒメナから同定した(Greider and Blackburn, 1985, 1987)。その後ヒトの線維芽細胞のテロメア長と細胞の持つ分裂可能回数とに相関があることが明らかとなった(Harley et al., 1990)。テロメラーゼの基本機能は、テロメア構造の伸長作用であり、テロメラーゼは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（hTERT : human telomere reverse transcriptase）およびテロメア配列の鋳型となる RNA（TERC : Telomere RNA component）から構成されている(Cong et al., 2002)。またサブユニットとして telomerase Cajal body protein 1、dyskeratosis congenita 1、ribonucleoprotein 10 (NOP10)、nucleolar protein family A, member 2 (NHP2)といったリボ核タンパクを有しており hTERT の発現に関与していることがわかっている(Shay and Wright, 2019)。hTERT は分化した細胞ではその発現が失われているか非常に少ないが、胚細胞や悪性化した細胞においては高発現している(Kim et al., 1994; Shay and Bacchetti, 1997)。このため、テロメラーゼの阻害は悪性腫瘍の治療戦略として以前から注目されてきた(Lavelle et al., 2000)。

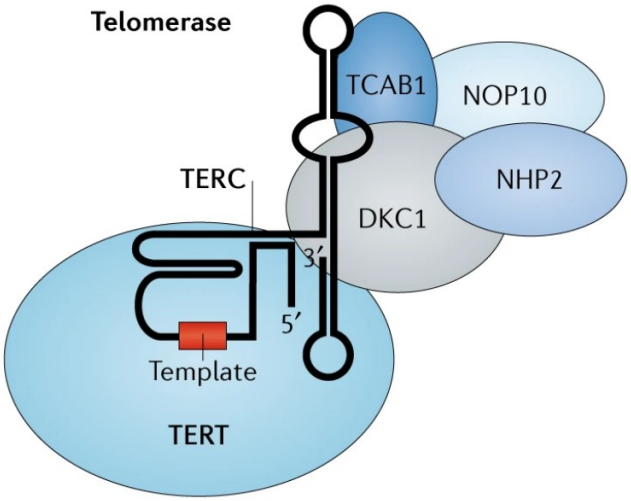


図 1. テロメラーゼの構造 Shay and Wright, 2019 より引用
TERT: telomerase reverse transcriptase
TERC: telomerase RNA component
TCAB1: telomerase Cajal body protein 1
DKC1: dyskeratosis congenita 1
NHP2: nucleolar protein family A, member 2
NOP10: ribonucleoprotein 10

イメテルスタットは Geron 社 (Menlo Park, CA)によって開発された、最初に臨床応用されたテロメラーゼ阻害薬である（図 2)。鋳型 RNA に相補的に結合し、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(Herbert et al., 2005; Schrank et al., 2018)。血液領域の疾患としては、本態性血小板血症に対する臨床試験において 89%の患者に血液学的奏功が認められた(Baerlocher et al., 2015)。また骨髄線維症に対する臨床試験では、21%の患者に奏功が認められた(Tefferi et al., 2015)。さらに少数例の報告ではあるが環状鉄芽球を伴う骨髄異形成症候群に有効であったとする報告がある(Tefferi et al., 2016)。一方で臨床的に悪性度の高い急性白血病や悪性リンパ腫における効果は

明らかではない。固形腫瘍の領域では、進行期非小細胞肺がんに対する維持療法として臨床試験が行われたが、予後改善の効果は認められなかった(Chiappori et al., 2015)。これまでの臨床試験はいずれもイメテルスタット単剤の効果を検証するものであった。

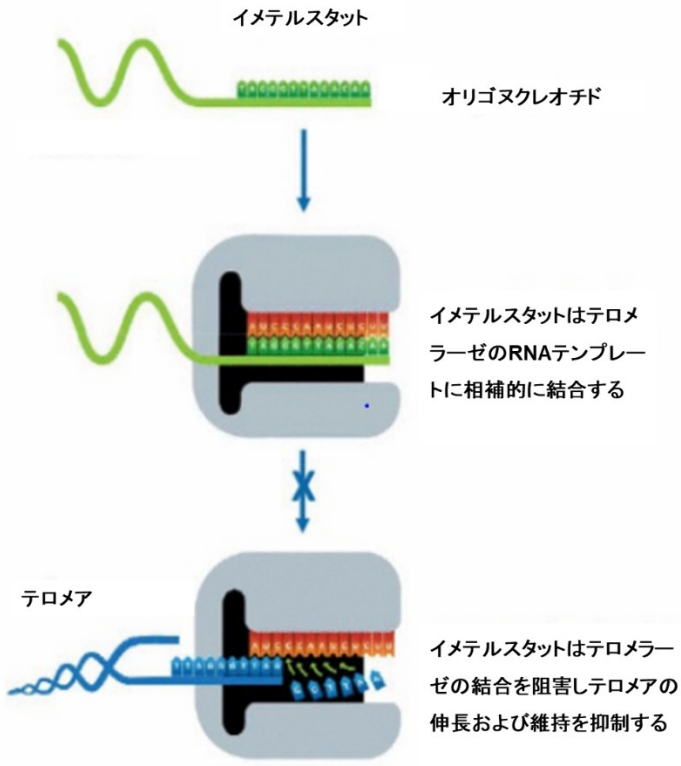


図 2. イメテルスタットの構造と作用機序
https://www.geron.com/r-d/imetelstat/　より引用、一部改変

イメテルスタット単剤の治療は、テロメア長の短縮を介して細胞増殖の抑制を期待するものであるが、テロメラーゼ阻害薬によるテロメア短縮がテロメラーゼ阻害薬耐性を引き起こすという耐性機序が報告されている(Seimiya et al., 2005)。テロメアにはテロメア反復配列結合タンパクと呼ばれる蛋白質複合体が結合しており(van Steensel and de Lange, 1997)、テロメラーゼのテロメアへの

アクセスを制限している。テロメラーゼ阻害薬によるテロメアの短縮が、染色体末端のテロメア反復配列結合タンパクの存在量を減らし、わずかに残存するテロメラーゼのテロメアへのアクセスを増強する（図 3)。またテロメラーゼ阻害によってテロメア長が短くなった結果、テロメラーゼ活性が上昇したとする報告が認められる(Shammas et al., 2008b)。したがってテロメラーゼ阻害薬によるテロメア短縮のみでの抗腫瘍効果は限定的であり、新たなアプローチが必要である。

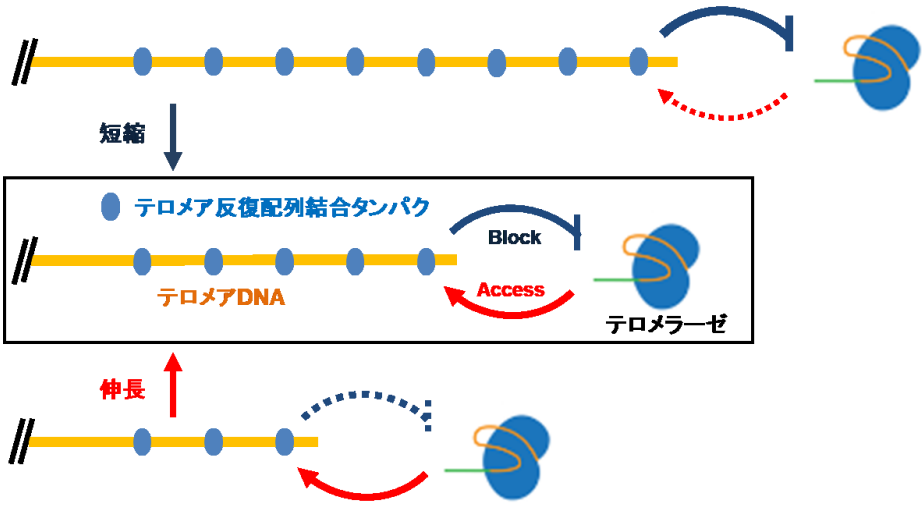
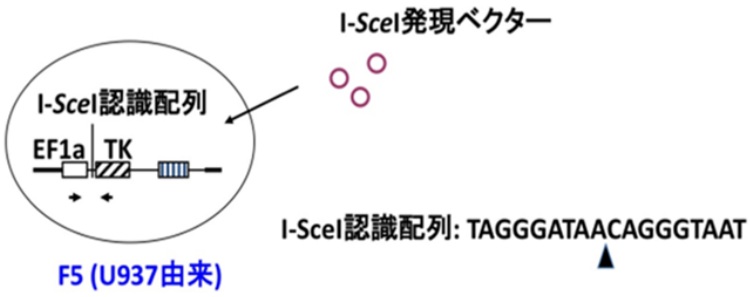


図 3. テロメラーゼによるテロメア伸長とテロメア反復配列結合タンパクの機能
テロメア上にはテロメア反復配列結合タンパクが存在し、テロメアへのテロメラーゼのアクセスを抑制している。

ヒト染色体には非末端部にも(TTAGGG)n の繰り返し配列からなるテロメア配列の挿入部があり、Interstitial telomeric sequences (ITSs)と呼ばれている。ITSs には 4 種類の分類があり、1) short ITSs、2) subtelomeric ITSs、3) fusion ITSs、4) heterocromatic ITSs に分類される(Bolzan, 2017)。これらのうち数～20 回の完全な TTAGGG の繰り返し配列からなる short ITSs は霊長類ゲノム間の比較で発見されており、進化の過程における DNA 損傷修復の痕跡ではないか

と推測されている(Nergadze et al., 2004)。しかし、TTAGGG の繰り返し配列の挿入は他のゲノム領域にあるテロメア配列からコピーされたものが挿入されている可能性もあり、これまでのところテロメラーゼが DNA 損傷部位を修復する直接的な証明はされていない。Onozawa らはヒト白血病細胞株を用い、実験的に制限酵素 I-*Sce*I により導入した DNA 二重鎖切断部位が、稀（2.9%）にテロメア配列の繰り返し配列で修復されることを報告した(Onozawa et al., 2014)。また、酵母のモデルで非常に低頻度ではあるが DNA 損傷部位にテロメアの繰り返し配列が挿入されることが報告されている(Ouenzar et al., 2017; Pennaneach et al., 2006)。



Length of insertion	CTAGGGATAA	insertion	ATAACAGGGTAAT
105 bp	CTAGGGATAA	CCTAA-(CCCTAA)x16-CCC	ATAACAGGGTAAT
212 bp	CTAGGG	(TTAGGG)x35-TT	AGGGTAAT
218 bp	CTAGGG	(TTAGGG)x36-TT	AGGGTAAT

赤文字:テロメア配列とのマイクロホモロジー

図 4. 制限酵素 I-*Sce*I による DNA 切断部位へのテロメア配列挿入
Onozawa et al., 2014 より引用、改変
制限酵素 I-*Sce*I 認識配列を有する細胞株に I-*Sce*I 発現ベクターを導入し、DNA 二重鎖切断がどのように修復されるかを検討した。下段の表に挿入されたテロメア配列が示されている。

この ITSs の存在はテロメラーゼが DNA 損傷修復に関与している可能性を示唆するものである。DNA 損傷は一本鎖切断と二本鎖（二重鎖）切断に大別され、一本鎖切断ではヌクレオチド除去修復、塩基除去修復、ミスマッチ修復機構等がはたらいている。二重鎖切断の代表的な修復機構は、相同組換えと非相同末

端結合であり(Scully et al., 2019)、その概要を図 5 に示す。相同組換えは DNA 複製によって生じた同じ配列をもつ姉妹染色分体を利用して正確な修復を行う。一方、非相同末端結合は、DNA の相同性とは関係なく、切断された末端を直接連結する。非相同末端結合は再連結に伴ってヌクレオチドの挿入や欠失が生じるため、相同組換えより修復の正確性は低い。我々は、テロメラーゼが ITSs の挿入による非相同末端結合に関わっている可能性があると考えている。

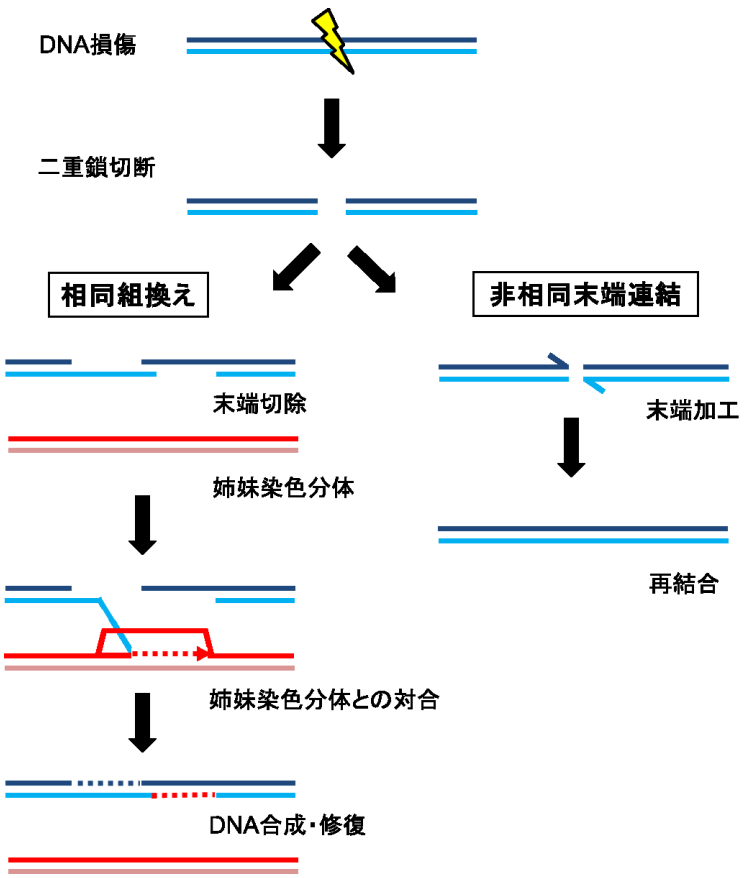


図 5. ヒトにおける DNA 二重鎖切断の修復機構
相同組換えと非相同末端連結の概要を示す

これまでにテロメラーゼ阻害と DNA 損傷を引き起こす抗がん剤や放射線の併用効果を検証した報告が複数されている。Bruedigam らはマウスやヒトの急性骨髄性白血病モデルにおいて、テロメラーゼ阻害が白血病幹細胞を減らし、

白血病進行や抗がん剤後の再発を遅らせることを報告した(Bruedigam et al., 2014)。また、Wu らは食道がんの細胞株においてイメテルスタットが放射線照射の増感剤になると報告した(Wu et al., 2012; Wu et al., 2017)。過去には肝細胞がんや乳がんにおいて抗がん剤の効果を高めるとする報告もされている(Djojosubroto et al., 2005; Goldblatt et al., 2009)。イメテルスタットは抗がん剤だけではなくチロシンキナーゼ阻害薬のイマチニブ(Tauchi et al., 2002)や乳がん治療薬のトラスツズマブ(Koziel and Herbert, 2015)、骨肉腫に対するヒートショックタンパク 90 阻害薬(Hu et al., 2015)の効果を高めるとする報告が認められる。しかしながら、抗がん剤も含め他の薬剤との相乗効果に関して、テロメラーゼ阻害そのものに意味があるのか、テロメア長の短縮に意味があるのかは十分に明らかにされていない。長期的なテロメラーゼ阻害によるテロメア長短縮が、ユーイング肉腫や乳がんのシスプラチン感受性を高めたとする報告はあるが(Uziel et al., 2010)、短期的なテロメラーゼの阻害効果については明らかでない。

造血器悪性腫瘍は癌腫のなかでも比較的抗がん剤や放射線に感受性が高く、この領域の疾患でイメテルスタットとの相乗効果を検証することは臨床的意義が大きい。例えば、急性骨髄性白血病は「Total cell kill」という考え方で治療されるが、これは抗がん剤治療を繰り返し行い、白血病細胞を根絶し治癒を目指す治療戦略である。急性骨髄性白血病において標準的な治療を受けた 60 歳以下の 5 年無再発生存率は 35～40%とされているが(Dohner et al., 2015)、これは同種造血幹細胞移植も含めた治療成績である。また染色体や遺伝子異常による層別化で予後不良とされる群は、5 年生存率が 15%と満足のいく治療成績ではない(Dohner et al., 2017)。さらに標準治療が難しい 70 歳以上に限った検討で生存期間の中央値が 6～7 か月とされている(Heiblig et al., 2017; Oran and Weisdorf, 2012)。イメテルスタットの併用は抗がん剤の治療強度を上げ、寛解率や生存率を向上させる可能性がある。さらに治療強度を維持しつつ抗がん剤の投与量を減らすことができれば、感染症などの致命的な合併症を減少させることができる。その結果、これまで治療強度を上げることが難しかった高齢患者の治療成績を向上させる可能性がある。

以上の背景をふまえて我々は、テロメラーゼの DNA 損傷修復機構を明らかにすること、そして造血器悪性腫瘍においてイメテルスタットの抗がん剤や放射線との相乗効果を明らかにすることを主たる目的としてこの研究を行った。

【方法】

1. 倫理・コンプライアンス

ヒト白血病検体を用いた検討においては、ヘルシンキ宣言に則り、臨床試験「急性白血病における遺伝子変異と治療反応性・白血病発症機序の解明」（自015-0334）において同意のもとで採取された検体を使用した。北海道大学病院の自主臨床研究審査委員会の承認を得た。

2. 細胞培養

リンパ組織球性リンパ腫の細胞株である U937、急性前骨髄急性白血病の細胞株である HL60、急性 T リンパ性白血病の細胞株である CCRF-CEM とその派生株 1301 は American Type Culture Collection (Manassas, VA)より購入した。1301 は CCRF-CEM の派生株でテロメア配列が異常に長いことが知られている。フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病の細胞株である PALL2 は Japanese Collection of Research Bioresources (Osaka, Japan)より購入した。多発性骨髄腫の細胞株である IM9 と RPMI8221 は北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野のムハンマド バグダーディ講師に提供いただいた。成人 T 細胞白血病リンパ腫の細胞株である ST1、SU9T01 は北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室 中川雅夫助教に提供いただいた。これらの造血器悪性腫瘍細胞株は 10%ウシ胎児血清（CORNING, Corning, NY）と 1%ペニシリン・ストレプトマイシン（nacalai tesque, Kyoto, Japan）を添加したロズウェルパーク記念研究所培地 1640（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を用い、37℃、5%CO_2 下で培養した。トランスフェクションに用いた Human embryonic kidney 293 T (293T) 細胞は 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を用い、37℃、5%CO_2 下で培養した。

3. 患者および健常人検体

2017 年 5 月までに「急性白血病における遺伝子変異と治療反応性・白血病発症機序の解明」に登録された症例のうち、初発の正常核型急性骨髄性白血病および急性リンパ性白血病を解析対象とした。このうち骨髄検体から作成された相補的 DNA が保存されていた症例に限定し、*hTERT* mRNA 発現の検討を行った。健常人の末梢血および骨髄検体は、北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室の教室員から口頭同意を得て採取した。採取後の検体からゲノム DNA や相補的 DNA を作成し、匿名化した状態で保存した。

4. ヒトゲノム上におけるテロメア配列挿入

公開されているゲノム変異データベース (www.completegenomics.com/sequence-data/download-data/)を分析し、多型としてのテロメア配列挿入の候補を 1 番染色体と X あるいは Y 染色体上に見出した。1 番染色体の候補は 4940 塩基の欠失と CCCTAA の繰り返しがメインとなる 58 塩基の挿入が認められる多型である。この多型があるゲノム DNA でテロメア配列挿入部位を増幅する PCR プライマーを設計した（フォワード 5'-GCATGTCAGGACTGAATGTCC-3'、リバース 5'-TACTCACTGAGTCATCCCAGG-3'）。また、この多型がないアリルを増幅可能な PCR フォワードプライマーを設計した（5'-GCTTCATAAAGGACAAGTCCC-3'）。X 染色体上の候補は 729 塩基の欠失と TTAGGG の繰り返しがメインとなる 22 塩基の挿入が認められる多型で、この多型を増幅する PCR プライマーを設計した（フォワード 5'-ACATGGACACATGTGGAGTG -3'、リバース 5'-ACAACCTCCTACCTCAGTCC -3'）。日本人 10 人のゲノム DNA を QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands)を用いて作成しこれをテンプレートとし、上記のプライマーを用いて 95℃で変性、60℃でアニーリング、72℃で伸長反応のサイクルを 35 サイクル行い増幅させた産物をアガロースゲル電気泳動で解析した。Thermus aquaticus DNA ポリメラーゼとして EmeraldAmp (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)を使用した。また陽性コントロールとして *β-globin* の PCR を同時に施行した（フォワード：5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3'、リバース：5'-GGAAAATAGACCAATAGGCAG-3'）。

X 染色体上の多型については配列確認のためにサンガーシークエンスを行った。PCR 産物を、ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (Applied Biosystems, Waltham, MA)にて精製した。精製産物を鋳型とし、1 μM に希釈したフォワードプライマーをシークエンスプライマーとして、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いてシークエンス反応を行った。シークエンス反応産物をカラムに通して精製し(Illustra Sephadex G-50 Fine DNA Grade, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England)、SpeedVac 遠心濃縮システム (UT-80/CVE-100D, EYELA, Tokyo, Japan)にて乾燥、20 μl の Hi-Di ホルムアミド (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に溶解し、ブロックインキュベーターにて 95℃で 5 分処理したのち氷冷した。そのサンプルを用い、シークエンサー (3130/3100-Avant Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用い、サンガーシークエンスにてその塩基配列を同定した。

5. トランスフェクションおよびディープシークエンス

ヒト細胞株の DNA の特定領域に clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas9) システムで DNA 二重鎖切断を施し、どのように修復されるかディープシークエンスを用いて検討した（図 6)。標的領域は急性骨髄性白血病と関連する *runt-related transcription factor 1 (RUNX1)* および *RUNX1T1 (RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1)* 遺伝子内の転座高頻度領域であり、Cas9 蛋白の mRNA とその特定領域を認識するガイド RNA を含むオーダーメイドのベクターを作成した(Invitrogen, Carlsbad, CA)。

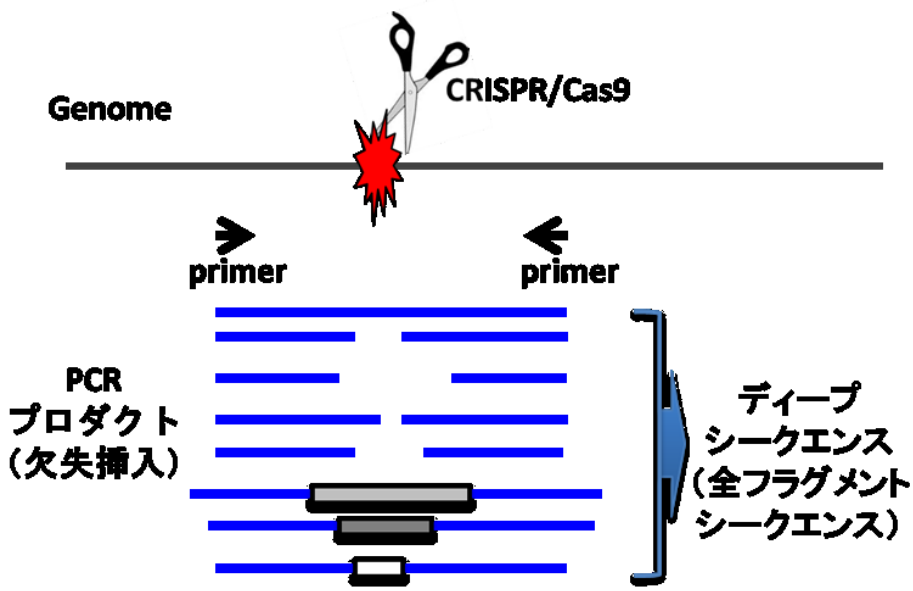


図 6. CRISPR/Cas9 システムを用いた DNA 二重鎖切断とディープシークエンスによる欠失挿入修復の網羅的解析

293T 細胞を用いたリポフェクションの概要を示す。トランスフェクション前日に、0.6 x 10^6 個の 293T 細胞を 6 well plate に撒いた。トランスフェクションの 1 時間前に培地を、ダルベッコ変法イーグル培地から Opti- minimal essential medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に変更し、*RUNX1*、

RUNX1T1 を標的として CRISPR ベクター、green fluorescence protein（トランスフェクション効率を観察するため）発現ベクターをそれぞれ 2 μg ずつ、Lipofectamine2000（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）を用いてトランスフェクションした。4 時間後に培地に 10%ウシ胎児血清を加え、インキュベートを継続した。トランスフェクション 24 時間後にトリプシン/Ethylenediaminetetraacetic acid で 293T 細胞を剥がし、新しい 6 well plate に 3 分の 1 ずつ播種した。さらにトランスフェクション 72 時間後に新しい 6 well plate に撒き直した。トランスフェクション 120 時間後に細胞を剥がし全量回収し、QIAamp DNA Mini Kit でゲノムを作成した。

トランスフェクション後のゲノム DNA をテンプレートとして、二重鎖切断が起こっている想定される領域を PCR で増幅した。プライマーはディープシークエンス用にタグがついたものを使用し、*RUNX1* 領域はフォワード：5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-GACCCTTTTCTTTCTATGGC-3'、リバース：5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-GCCCTGTTTTTCAATATCCC-3'、*RUNX1T1* 領域はフォワード：5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-TAAGATAGAGAGTGGGAGGG-3'、リバース：5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-TTACAACCTGACCTCCCTGC-3'を用いた。98℃で変性、60℃でアニーリング、72℃で伸長反応のサイクルを 35 サイクル行った。Thermus aquaticus DNA ポリメラーゼとして EmeraldAmp を使用した。PCR 産物の多様性を確保するために PCR は 5 つのチューブに分注して反応させてそれらを混合した。増幅された PCR 産物を、2%のアガロースゲルに泳動し目的のバンドをゲルカットし、QIAquick gel purification kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands) を用いて精製した。PCR 産物のディープシークエンスは大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター　ゲノム解析室に委託した。得られた塩基配列は、Human BLAT Search (http://mgc.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat) を用い塩基挿入の有無などを検討した。

6. Real-time quantitative-PCR (RQ-PCR)

細胞株や患者検体の *hTERT* mRNA 発現を検討することを目的に行った。細胞株の RNA 精製には、Trizol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用い、健常人および患者検体の RNA 精製には、QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands) を用いた。作成した RNA 1μg をテンプレートとして、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて逆転写反応を行い、相補的 DNA

を作成した。相補的 DNA 1 µl をテンプレート、Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Waltham, MA) を蛍光色素標識のポリメラーゼとして用い PCR 反応を行った。95℃で変性、60℃でアニーリング、72℃で伸長反応のサイクルを 45 サイクル行い、CFX96 Real-Time System (BIO RAD, Hercules, CA) で記録した。*hTERT* のプライマーは、フォワード：5'-AGGGTGAAGGCACTGTTCAG-3'、リバース：5'-CGTACATGCGACAGTTCGTG-3'を用いた。内部コントロールとして *β-actin* を同時に反応させ、そのプライマーはフォワード：5'-AGGCCGGCTTCGCGGGCGAC-3'、リバース：5'-CTCGGGAGCCACACGCAGCTC-3'を用いた。*hTERT* と *β-actin* の threshold cycle（Ct）値をそれぞれ計算し、その差（ΔCt 値）を求めた。さらに U937 細胞の ΔCt 値を標準検体とし、標準検体との差（ΔΔCt 値）を求め、U937 細胞由来の RNA 1µg の発現を 1000 としたときの相対値を計算した。

7. Telomerase repeat amplification protocol (TRAP)

このアッセイはテロメラーゼ活性を測定する方法として Kim らによって提唱され今日も使用されている(Fajkus, 2006; Kim et al., 1994)。テロメラーゼを含む細胞ライセートをテンプレートにして、テロメラーゼを基質とするプライマーを伸長させ、リバースプライマーをアニーリングし PCR 反応を行い、テロメア配列がどの程度伸長するかを蛍光色素の強さを読むことで評価し、相対的なテロメラーゼ活性を測定することができる（図 7）。我々は TRAPeze XL Telomerase Detection Kit (Millipore, Bedford, MA)を用いて活性を測定した。U937、HL60、PALL2、CCRF-CEM、IM9、RPMI8226、ST1、SU9T01 の 8 つの細胞株と健常人の末梢血から Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare, Chicago, IL) を用いて採取した peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) をペレットにして、細胞 1 x 10^6 個あたり 200µl の 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) buffer を加えて 30 分氷上に静置したのち 14000 rpm で 20 分遠心し、上清 160 µl をライセートとして回収した。そのライセートをテンプレートに 94℃で変性、59℃でアニーリング、72℃で伸長反応の条件で 36 サイクルの PCR 反応を行った。蛍光強度は CFX96 Real-Time System (BIO RAD, Hercules, CA) で記録した。イメテルスタットのテロメラーゼ活性へ与える影響を検討する実験では、種々の濃度でイメテルスタットを細胞に添加し 48 時間培養した細胞を用いた。この際細胞数のカウントを行い検体間で統一した。TRAP に用いたライセートは-80℃で保存し、のちに U937 のライセートでウェスタンブロットを施行し hTERT タンパクの発現量の変化を検討した。

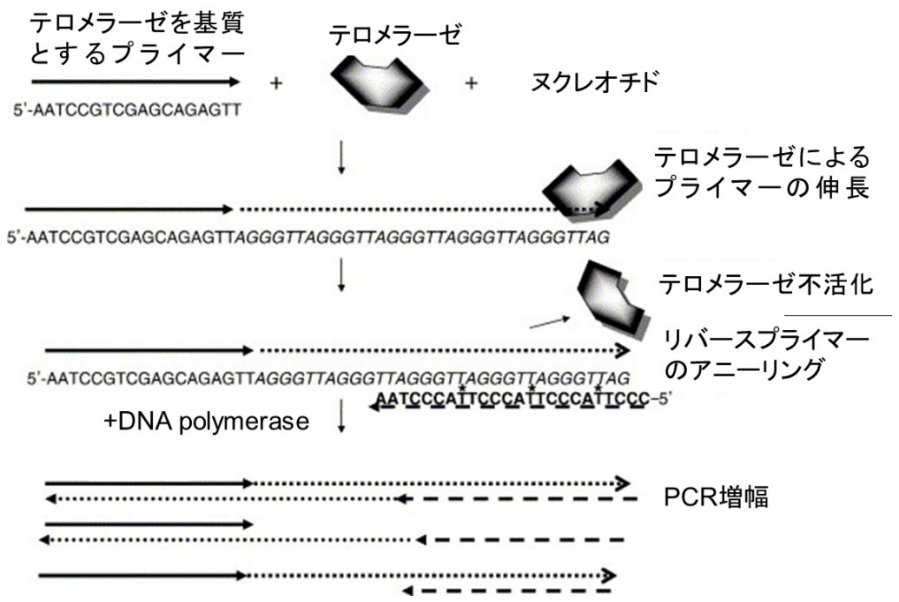


図 7. TRAP アッセイの概要(Fajkus, 2006)　一部改変

8. Flow-FISH (fluorescence in situ hybridization) によるテロメア長測定

この手法はテロメア配列に蛍光プローブをハイブリダイズし、その蛍光強度をフローサイトメーターで測定する定量的なテロメア長測定法である(Hultdin et al., 1998)。実験には Telomere peptide nucleic acid FISH kit (Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark) を用いた。テロメア長が例外的に長い 1301 細胞をコントロールの細胞として、1301 細胞との比をフローサイトメトリーを用いて測定した。6 well plate に細胞を播種し、イメテルスタット 1 μM を加えて培養した。2 から 3 日毎に継代およびイメテルスタットの追加を行い、4、7、14、21、28、35 日目にテロメア長を測定した。細胞のテロメア配列にハイブリダイズするプローブ (fluorescein isothiocyanate : FITC 標識) を加え一晩 4℃で静置した。翌日細胞を洗浄後にフローサイトメーター (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) で FITC の mean fluorescence intensity (MFI) を測定し、プローブを加えていない細胞の MFI との差を計算した(ΔMFI)。コントロールの 1301 細胞と測定サンプル細胞の ΔMFI の比を求め、相対的なテロメア長を算出した。

9. イメテルスタットおよび抗がん剤

テロメラーゼ阻害薬のイメテルスタットとコントロールオリゴはヤンセンファーマ(Raritan, NJ) より研究成果有体物移転契約にて無償で提供された。イメテルスタットとコントロールオリゴは滅菌精製水で溶解し、25mM をストック溶液として-20℃で保存した。コントロールオリゴはイメテルスタットと化学構造は同様だが、塩基配列がランダムなためテロメラーゼの RNA テンプレートに結合できない。エトポシド (Wako, Osaka, Japan)、ドキソルビシン (Wako, Osaka, Japan)、ビンクリスチン (Wako, Osaka, Japan)、メソトレキセート (Wako, Osaka, Japan)、シタラビン (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) は dimethyl sulfoxide にて溶解し-20℃で保存した。4-ヒドロペルオキシ-シクロフォスファミド (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) はクロロホルムにて溶解し-80℃で保存した。

10. 細胞増殖の検討

U937、HL60、PALL2、CCRF-CEM、IM9 の 5 つの細胞株を用いてイメテルスタット単剤およびイメテルスタットと抗がん剤の併用効果を検討した。Day 0 に細胞を 1 x 10^6/ml の濃度で 6 well plate に播き、薬剤を各濃度で添加した。薬剤を入れないコントロールの well には各薬剤の溶媒である dimethyl sulfoxide、クロロホルムを添加した。37℃、5% CO_2 インキュベーターで 4 日間増殖を観察した。Day 1 から 4 までの毎日、細胞数を改良ノイバウエル計算盤を用いてカウントした。死細胞はメチレンブルー染色 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により選別し、死細胞割合を記録した。同様に Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いた細胞増殖アッセイを行った。このキットは生細胞にとりこまれた薬剤が代謝を受けて、色素を産生しメディウムが着色される。蛍光強度をよみとることで生細胞数を客観的に多数の well で評価することができる。96 well plate (U-bottom)に 1 x 10^6/ml の濃度で細胞を播き、薬剤を各濃度で添加した。コントロールとして細胞が入っていないメディウムのみの well を作成した。Day 4 に Cell counting Kit-8 を 10 μl ずつ添加し、37℃でインキュベートした。メディウムの変色を目視で確認しながら 2～3 時間後に、GloMax Navigator Microplate Luminometer (Promega, Tokyo, Japan) を用いて吸光度を測定した。細胞が入った well の吸光度と細胞が入っていないコントロールの well の吸光度の差を計算し、薬剤を入れていない well の吸光度を 1 として標準化した値を求めた。

11. 蛍光免疫染色

細胞内での hTERT および γH2AX の局在を検討するために蛍光免疫染色を行った。γH2AX の発現を誘導する目的で、2 グレイの放射線を細胞に照射した（未照射のコントロールも作成した）。8 時間後に細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline: PBS）で 1 回洗浄したのち、固定を目的に 2%パラホルムアルデヒドを加え室温で 20 分静置した。その後、1 ml の PBS で 3 回洗浄を行い、500 µl の PBS で細胞を懸濁した。そのうちの 100 µl を 800rpm、5 分でサイトスピン（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）にてスライドガラス（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）にふきつけて乾燥させた。あらかじめ-20℃に冷やした 70%エタノールにスライドガラスを浸し、4℃で一晩インキュベートした。翌日、エタノールを PBS で洗浄したのち、5% bovine serum albumin (BSA)、0.1% Triton-X、0.05% Tween20 を含む PBS に 5%の Hoechst 33342 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を混合したものを作成し、室温で 30 分インキュベートした。PBS で 1 回洗浄ののち、1% BSA、0.1% Triton-X、0.05% Tween20 を含む PBS に 1 次抗体として抗 hTERT 抗体 (C12, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)を 1:50 の比、抗 γH2AX 抗体 (ab2893, Abcam, Cambridge, UK) を 1:250 の比で混合し、スライドガラス上に添加し室温で 2 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄したのち、1% BSA、0.1% Triton-X、0.05% Tween20 を含む PBS に 2 次抗体として Alexa Fluor 594 rabbit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)および Alexa Fluor 488 mouse (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を 1:400 の比で混合し、スライドガラス上に添加し室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄したのち、残存した RNA を分解する目的で RNase (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands)を 0.5 mg/ml の濃度で PBS に混合し、スライドガラス上に添加し 37℃で 20 分インキュベートした。PBS で洗浄後、mounting medium (Sakura Finetek, Torrance, CA)を適量のせカバーガラス（Matsunami Glass, Osaka, Japan）で封入し観察を行った。観察は Keyence BZ-X800 オールインワン蛍光顕微鏡（Keyence, Osaka, Japan）を使用し、100 倍油浸対物レンズ（開口数 1.45）で観察した。サンプルは遮光のボックスに入れて 4℃で保管した。

12. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットに用いる細胞は SDS 溶解バッファー（1.7% SDS、60 mM Tris-HCl, pH6.8、0.85% 2-mercaptoethanol、タンパク質分解酵素阻害薬）を加え、1ml シリンジ（SS-01T2613S, TERUMO, Tokyo, Japan）にてシアリングを行ったのち 98℃で 5 分ボイル、その後 4℃、14000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収しライセートとした。それぞれ 6×sample buffer（0.375 M Tris-HCl, pH6.8、30% 2-mercaptoethanol、12% SDS、30% sucrose、0.03%

bromophenol blue）を加え、98℃で 5 分間熱変性を加えたのち、10%もしくは 12%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分画を行った。SDS-PAGE は 60 V より開始し、120 V、180 V と徐々に電圧を上げて行った。セミドライ式ブロッター（TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL; BIO-RAD, Hercules, CA）にて 15 V、45 分間電圧をかけ、ニトロセルロースメンブレン（GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England）に転写した。転写した膜は、適量の Ponceau 3R（Wako, Osaka, Japan）で染色し、タンパクの転写を確認した後に逆浸透水で洗浄を行った。分子量マーカー（Precision Plus Protein Dual Color Standards; BIO-RAD, Hercules, CA）をボールペンにてマーキングし、膜の不要部分をカットした上で、Blocking buffer として 5% skim milk を含む 0.1% Tween- tris-buffered saline（TBS）または 5% BSA を含む 0.1% Tween-TBS を使用し、室温にて 1 時間もしくは 3 時間、ベリーダンサー・シェーカー（IBI Scientific, Peosta, IA）で緩徐に振盪しながらインキュベートした。Blocking 後、0.1% Tween-TBS で 1 度洗浄し、膜を Hybri-bag (COSMO BIO, Tokyo, Japan）に入れ、Blocking buffer で希釈した一次抗体と 4℃で一晩反応させた。その際、旋回培養器（ROTARY CULTURE RCC-100, IWAKI, Chiba, Japan）を用いた。反応後の膜を、0.1% Tween-TBS で 3 回 10 分間洗浄し、Blocking buffer を含む 0.1% Tween-TBS で希釈した二次抗体と 4℃で 2 時間反応させた。その後、再度 0.1% Tween-TBS で 3 回 10 分間洗浄した。ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England)で化学発光を行い、LAS4000mini (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England）で検出した。

一次抗体（クローン名、希釈比率、Blocking buffer）として、抗β-actin 抗体 (AC-15, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO、1:400、5% skim milk を含む 0.1% Tween-TBS)、抗 hTERT 抗体（C12, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX、1:100、5% skim milk を含む 0.1% Tween-TBS)、抗 γH2AX 抗体（05-636, Merck Millipore, Burlington, MA, 1:500、5% BSA を含む 0.1% Tween-TBS)を用いた。二次抗体は Horse Radish Peroxidase 標識ウサギ抗マウス抗体（Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England）、Horse Radish Peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ抗体（Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England）を用い、それぞれ 1:3000 の比率で希釈を行った。

13. 統計解析

2 群の値の比較には、Mann-Whiteny U 検定、2 群の相関は Pearson の相関係数を求めて統計学的に解析し、P 値 < 0.05 を有意とした。これらの統計学的解析は EZR(Kanda, 2013)を用いて行った。

【結果】

1. 多型としてみられるテロメア配列挿入

まず公開されているゲノム変異データベース(www.completegenomics.com/sequence-data/download-data/)を分析し、多型としてのテロメア配列挿入を 2 か所発見した。図 8A に示す 1 番染色体上の多型は、様々な国籍や人種の 52 人のゲノムのうち 2 人に認められいずれもアジア人であった。日本人成人 10 人で検討したところ、この 1 番染色体上の多型は 10 人のうち 3 人の片アリルに認められた（図 8B）。

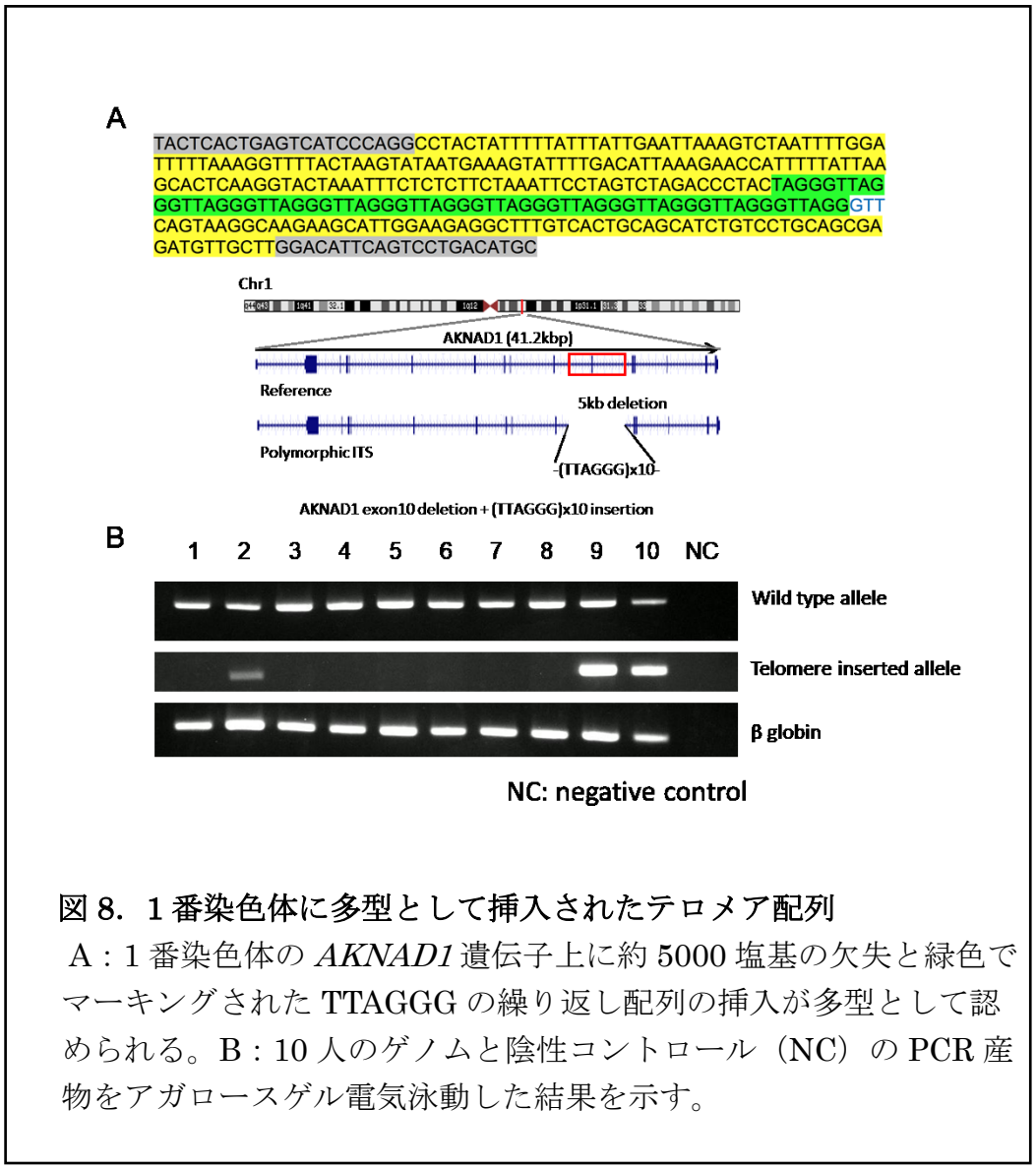


図 8. 1 番染色体に多型として挿入されたテロメア配列

A：1 番染色体の *AKNAD1* 遺伝子上に約 5000 塩基の欠失と緑色でマーキングされた TTAGGG の繰り返し配列の挿入が多型として認められる。B：10 人のゲノムと陰性コントロール（NC）の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果を示す。

図 9A に示す X 染色体上の多型はデータベースの 52 人にうち 31 人に認められた。日本人成人 10 人で検討したところ全てに認められ、このうち 3 人はホモ多型、7 人はヘテロ多型であった（図 9B)。さらに検体 2 においてサンガーシークエンスを行い TTAGGG の繰り返しを含む 22 塩基の挿入配列が同定された（図 9C)。多型テロメア配列の挿入は、個体の生殖細胞で起こったゲノム損傷修復の傷跡と考えられる。生殖細胞および幹細胞は例外的にテロメラーゼを発現しており、テロメラーゼが進化の過程で DNA 損傷修復プロセスに直接関与していることを示唆する所見と考えられる。これまで霊長類ゲノムの比較でヒト特有のテロメア配列挿入は認められていたが、ヒトゲノムの遺伝多型としてのテロメア配列挿入はこれまで報告されていない。

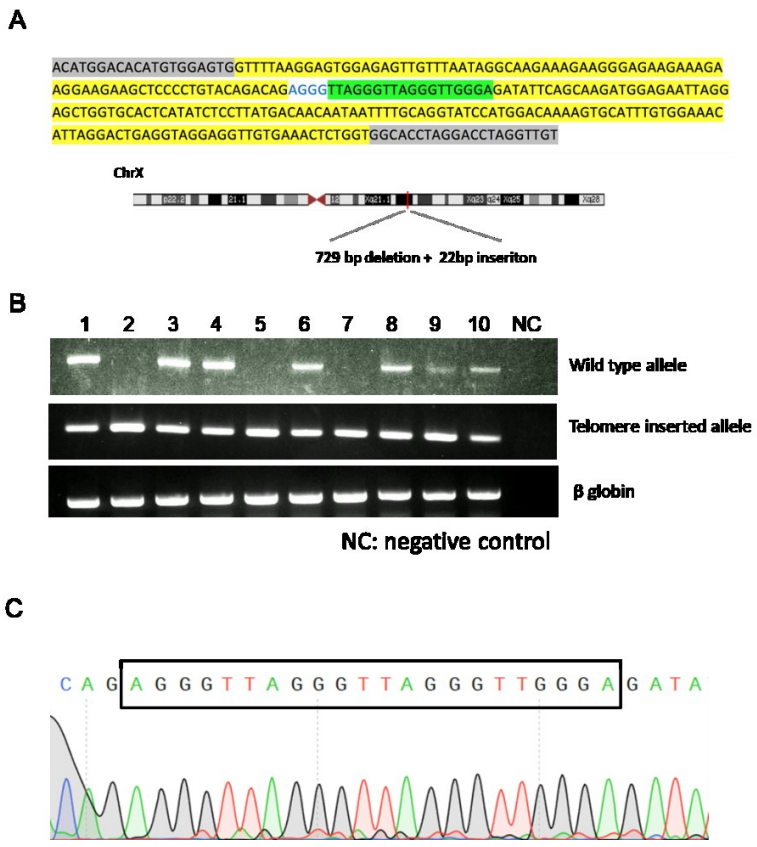


図 9. X 染色体上に多型として挿入されたテロメア配列

A：X 染色体上に緑色でマーキングされた TTAGGG の繰り返し配列の挿入が多型として認められる。B: 10 人のゲノムと陰性コントロール（NC）の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果を示す。C：検体 2 のサンガーシークエンスの結果を示す。

2. CRISPR/Cas9 システムによる DNA 二重鎖切断がテロメア配列挿入により修復しうる

次に CRISPR/Cas9 システムで人工的に DNA 二重鎖切断を生じさせ、どのように修復されるかをディープシークエンスで検討した。*RUNX1* および *RUNX1T1* 領域に二重鎖切断を生じさせ PCR で増幅した産物をディープシークエンスで解析する実験を 3 回行った。3 回の実験いずれにおいてもテロメア配列様の挿入が少数認められた。1 回目は *RUNX1T1* 領域に 6 塩基以上の挿入が 2291 リード認められ、そのうち 1 リード（0.04%）に、TTAGGG 様の繰り返し配列の挿入が認められた（表 1）。2 回目は *RUNX1* 領域に 6 塩基以上の挿入が 3275 リード認められ、そのうちの 6 リード（0.18%）に(TTAGGG)x3 TTCT の挿入が認められた。3 回目は *RUNX1* 領域に 6 塩基以上の挿入が 310 リード認められ、そのうち 1 リード（0.32%）に AGAG 欠失＋CTAACCCTAACCC 挿入が認められた。テロメア配列挿入は全挿入イベントの 0.04%～0.32%であった。図 11 に挿入配列の詳細を示す。テロメア配列の挿入で CRISPR/Cas9 システムによる DNA 損傷が修復しうることを発見した。

表 1. CRISPR/Cas9 により切断された DNA はテロメア配列挿入により修復しうる

3 回の実験における CRISPR の切断部位、総リード数、6 塩基以上が挿入されたリードの数、テロメア配列が挿入されたリードの数を記載した。

Experiment	1	2	3
CRISPR 部位	*RUNX1T1*	*RUNX*	*RUNX1*
総リード数	100425	1131412	122751
6塩基以上が挿入されたリード数	2291	3275	310
テロメア配列が挿入されたリード数	1	6	1

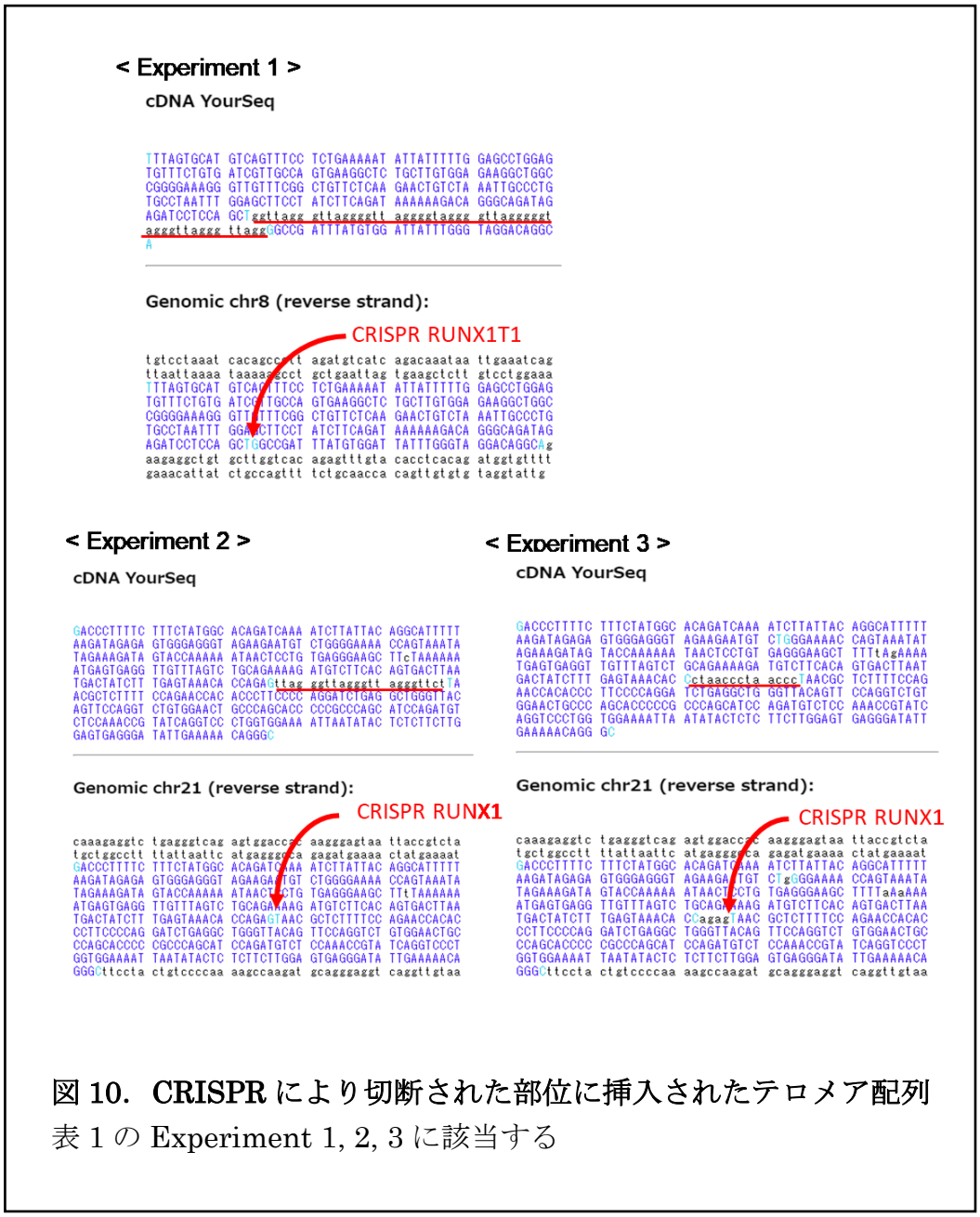


図 10. CRISPR により切断された部位に挿入されたテロメア配列
表 1 の Experiment 1, 2, 3 に該当する

3. 細胞株と健常人由来末梢血単核球における *hTERT* mRNA 発現量、タンパク発現量、活性についての検討

腫瘍細胞で発現しているとされる hTERT が mRNA、タンパク、そしてテロメラーゼ活性と各段階において実際に造血器悪性腫瘍で発現しているかを確認した。まずは、*hTERT* mRNA の RQ-PCR の系を確立するために、いくつかの

プライマーで相補的DNAをテンプレートとしてPCR反応を行った。その結果、エクソン 5 にフォワード、エクソン 7 にリバースプライマーを設定した場合、図 11A のように非特異的バンドが認められず、サイバーグリーンによる RQ-PCR に適していると判断した。図 11B で示す *hTERT* mRNA の発現レベルであるが、悪性リンパ腫の U937 を基準とした場合、腫瘍細胞は 1～2 log の範囲内で発現していることがわかった。急性前骨髄性白血病の細胞株 HL60 では発現が相対的に低いが、分化傾向を示す腫瘍であるためと推測される。一方、健常人由来の PBMCs においては発現が認められなかった。

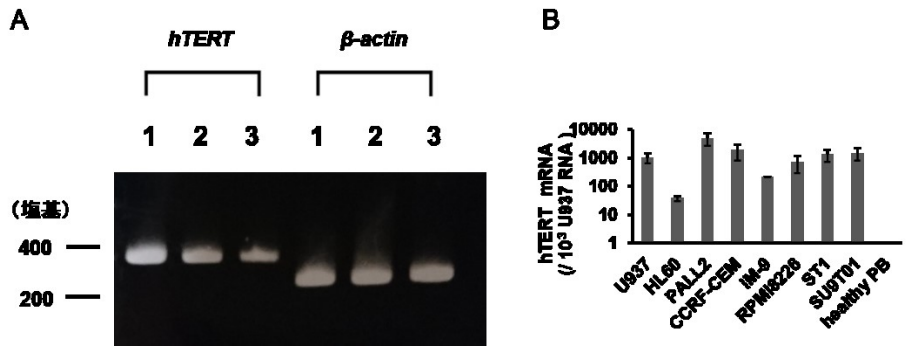


図 11.　*hTERT* mRNA RQ-PCR

A：3 例の白血病臨床検体を用いて、*hTERT* と *β-actin* の PCR を行い、その産物をアガロース電気泳動した。

B：8 つの細胞株と健常人 PBMCs の *hTERT* mRNA の発現量を示す。U937 RNA 1 μg の発現量を 1000 として標準化し、3 回測定の平均値±標準偏差の数値をグラフ化した。

次に hTERT タンパクの発現をウェスタンブロットで検討した（図 12)。内部コントロールの β-actin のバンドで補正した結果、HL60 はやや発現が低いものの腫瘍の種類に関わらず発現していることがわかった。一方で健常人の PBMCs には発現が認められなかった。

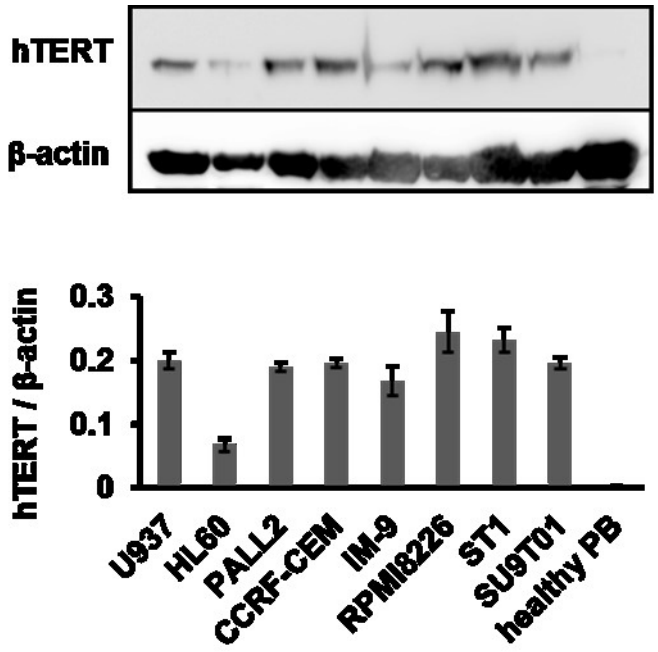


図 12. hTERT タンパクウェスタンブロット
8 つの細胞株と PBMCs の hTERT タンパクおよび β-actin の発現を比較した。下段は hTERT と β-actin のバンドの濃さを解析ソフト (Image Quant TL, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England) で算出し、内部コントロールで標準化した値をグラフにしている。

次に TRAP アッセイを用いてテロメラーゼ活性を測定した（図 13)。最も活性の低い HL60 を 1 とした場合、測定した範囲で最高値は成人 T 細胞白血病リンパ腫の細胞株である ST1 であった (2.87)。テロメラーゼは造血器悪性腫瘍で広く活性を有している一方で､健常人の PBMCs では活性は認められなかった。mRNA、タンパク、活性ともに PBMCs では認められず、成熟した細胞で発現が失われているとする既報と一致した結果であった。

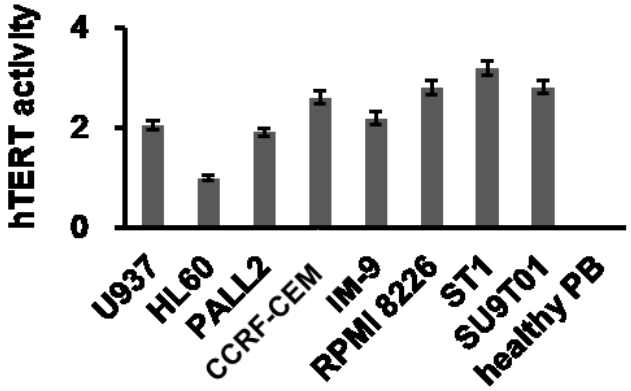


図 13. テロメラーゼ活性

8 つの細胞株と健常人 PBMCs のテロメラーゼ活性を示す。細胞株のうち活性が最も低い HL60 の値を 1 として標準化し、3 回測定の平均値±標準偏差の数値をグラフ化した。

最後に mRNA、タンパク、活性に相関があるかを検討した。mRNA とタンパクの組み合わせ（図 14A）では、Pearson の相関係数 r=0.902 と強い相関を認めた。タンパクと活性の組み合わせ（図 14B）および mRNA と活性の組み合わせ（図 14C）でも同様に r=0.953 および r=0.839 と強い相関を認めた。このことから 3 者には強い相関があると言え、タンパクレベルの検討が難しい臨床検体等では、mRNA の発現を調べることでテロメラーゼ活性の評価が代用できる可能性がある。

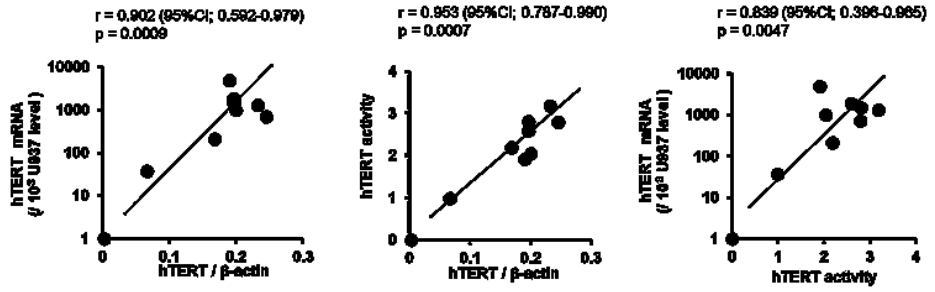


図 14. 細胞株と健常人 PBMCs における *hTERT* mRNA、hTERT タンパク、テロメラーゼ活性の相関

A : *hTERT* mRNA と hTERT タンパクの相関

B : テロメラーゼ活性と hTERT タンパクの相関

C : *hTERT* mRNA とテロメラーゼ活性の相関

黒丸は細胞株あるいは健常人 PBMCs の検体一つを示す。

直線は相関直線を、上記数値は Pearson の相関係数と P 値を示す。

テロメラーゼの活性は腫瘍の増殖や抗がん剤耐性に関与していることが予想されるため、臨床検体での検討を考慮した。しかし、タンパクは検体採取後すぐに処理する必要があり実臨床での検討に向かないと考え、活性と相関が認められた *hTERT* mRNA の発現を検討した。その結果、患者由来の骨髄検体の全てで発現を確認し、そ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（図 15、P=0.008)。この理由として、幼弱な骨髄系の細胞よりリンパ系の細胞でテロメラーゼ活性が高いとする報告がある(Morrison et al., 1996)。様々な種類の急性白血病のテロメラーゼ活性を検討した報告では、有意差はないものの急性骨髄性白血病よりも急性リンパ性白血病のテロメラーゼ活性が高い傾向にあった(Ohyashiki et al., 1997)。既報はいずれも活性の比較であるが、*hTERT* mRNA とテロメラーゼ活性は相関しており同様の傾向を示すものと予想される。一方、1 人ではあるが健常人の骨髄液における発現を検討したところ、急性骨髄性白血病患者と同等の発現を認めた。骨髄液には未分化

な造血細胞が含まれておりこれを反映したものと考えられる。*hTERT* mRNA の発現だけでは腫瘍の有無は判別できず、治療効果判定や微小残存病変の評価に用いることはできない。健常人 3 人の PBMCs を用いた検討では、*hTERT* mRNA の発現は認められず、タンパク発現やテロメラーゼ活性を認めないという上述の結果と一致した。

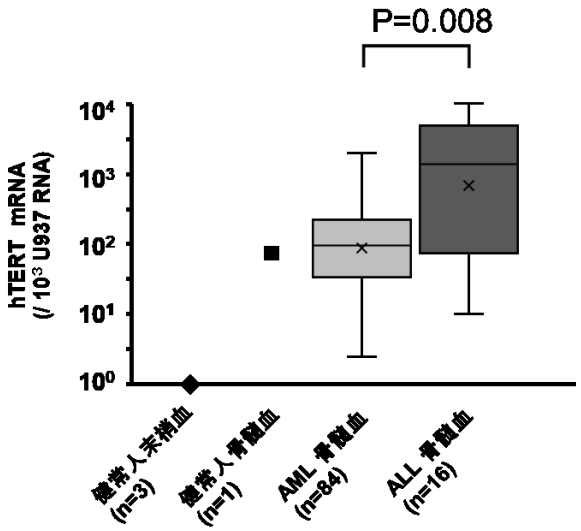


図 15. 急性白血病における *hTERT* mRNA 発現

左から健常人の末梢血検体（n=3)、健常人の骨髄検体（n=1)、急性骨髄性白血病（AML）の骨髄検体（n=84)、急性リンパ性白血病（ALL）の骨髄検体（n=16）の発現量を示す。急性白血病の群は箱ひげ図で示しており、バツ印（×）は中央値、横線は平均値を示す。

AML：acute myeloid leukemia

ALL：acute lymphoblastic leukemia

最後に *hTERT* mRNA の発現レベルと予後との関連を検討した。図 16 の急性骨髄性白血病のうち予後が判明した 60 人を対象に、初発時の *hTERT* mRNA

発現レベルが 100 以上を高い群（high）、100 未満を低い群（low）に分けて全生存率をカプランマイヤー法で検討した。2 年の生存率は high 群で 64.4%、low 群で 46.7%であり発現の高低で予後に差は認められなかった（P=0.136、図 16）。既報においても急性白血病において hTERT mRNA やテロメラーゼ活性と予後との関連を指摘した大規模な研究は認められない。テロメア長については、骨髄異形成症候群ではテロメア長が短いと予後が悪いが、急性骨髄性白血病では予後と関連しないという報告もあり(Williams et al., 2017)、疾患毎に予後的インパクトは異なる可能性がある。

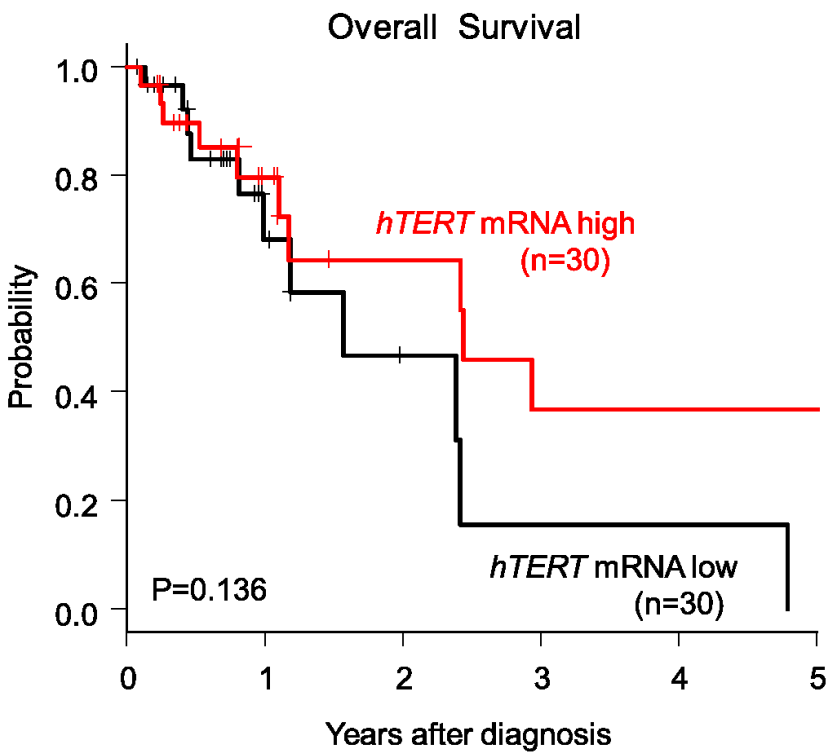


図 16. 急性骨髄性白血病において初発時の *hTERT* mRNA 発現レベルは予後と関連しない

カプランマイヤー法により全生存率を記載した。赤線が *hTERT* mRNA high、黒線が *hTERT* mRNA low 群の生存曲線を示す。
hTERT: human telomerase reverse transcriptase

4. イメテルスタットの効果

まずはイメテルスタットのテロメラーゼ活性に対する効果を確認した。図 17 に示すように、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。一方、コントロールのオリゴを投与してもテロメラーゼ活性に変化は認められなかった。でも HL60 や CCRF-CEM では 1 μM で活性は半分程度に抑えられているが、そのほかの細胞株では 6~7 割程度と細胞株によって効果の度合いは異なっていることがわかる。

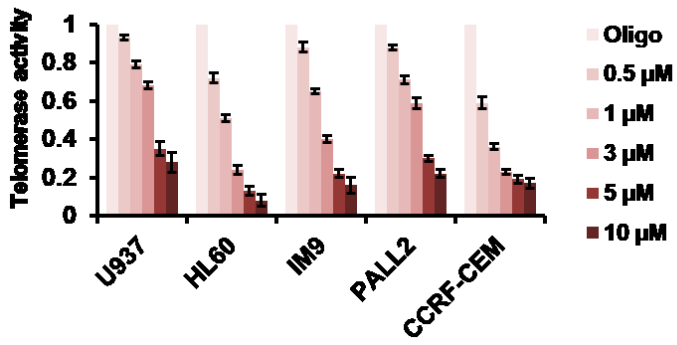


図 17. イメテルスタットは濃度依存性にテロメラーゼ活性を抑制する
左から U937、HL60、IM9、PALL2、CCRF-CEM を各濃度イメテルスタットで処理したときのテロメラーゼ活性を示す。コントロールのオリゴを加えたときの活性を 1 とした相対値で表示している。3 回測定の平均値±標準偏差の数値をグラフ化した。

次にイメテルスタットが hTERT タンパクの発現を変化させる検討するためにウェスタンブロットを行った（図 18）。U937 細胞において TRAP アッセイを検討したライセートを用いて hTERT と β-actin の発現をみたところ、イメテルスタットの濃度とは関係なくタンパク量は一定であった。競合的阻害によりテロメラーゼ活性は抑制されたものの、タンパク合成抑制あるいは亢進などのフィードバックは働かないことが示唆された。

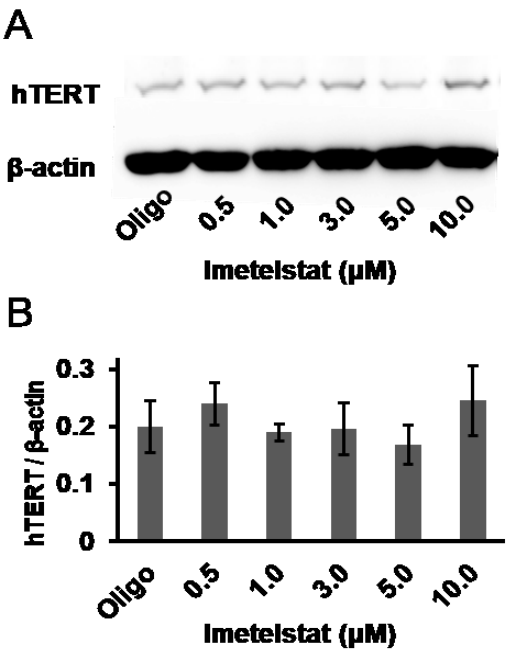


図 18. イメテルスタットは hTERT タンパクの発現量を変化させない
A：hTERT と β-actin のウェスタンブロット画像
B：内部コントロール（β-actin）で標準化した hTERT のバンドの濃さを 3 回計測の平均値±標準偏差の数値でグラフ化した。

次に細胞増殖に与える影響を 5 つの細胞株で検討した。イメテルスタットの濃度をふって細胞に投与したところ、3～5 μM 以上投与すると 4 日目の時点で細胞増殖が抑制された（図 19A)。その一方で死細胞は認められず生細胞率はほとんど 100%で推移した(図 19B)。イメテルスタットは細胞周期に影響を与え、G2 期の細胞を増やすとする報告があり(Thompson et al., 2018)、増殖速度にブレーキがかかったと推測された。高濃度では細胞増殖抑制効果を示すものの、単剤では殺細胞性がないことになり、悪性腫瘍において単剤治療が十分な効果を発揮しない一因となっている可能性がある。一方で U937 細胞に各濃度のイメテルスタットを加えて 24 時間後に γH2AX の発現を観察すると、5 μM を加えた細胞でわずかに発現が認められ、10 μM を加えた細胞では明らかな発現が認められた(図 19C)。この DNA 損傷は、イメテルスタットそのものによる DNA 損傷というよりは、細胞株に恒常的に起きている内因性の DNA 損傷の修復がイ

メテルスタットにより抑制された可能性がある。これまでの検討から、テロメラーゼ活性を抑制しつつ細胞増殖に影響を与えないイメテルスタットの濃度を 1 μM と決定し、これ以降の検討は 1 μM に濃度を固定して実験を行った。

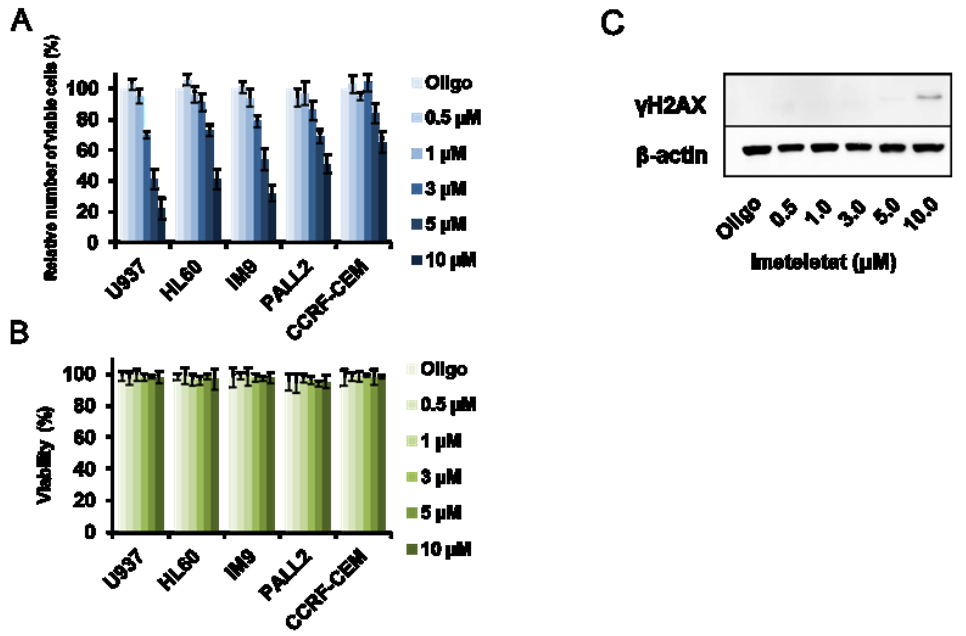


図 19. イメテルスタットは濃度依存性に細胞増殖を抑制するが細胞死を誘導しない

A：左から U937、HL60、IM9、PALL2、CCRF-CEM に各濃度のイメテルスタットを投与したときの day 4 の生細胞数を示す。コントロールのオリゴを投与したときの細胞数を 100 として標準化し、3 回計測の平均値±標準偏差を棒グラフ化した。

B：左から U937、HL60、IM9、PALL2、CCRF-CEM に各濃度イメテルスタットを投与したときの day 4 の生細胞割合を示す。3 回計測の平均値±標準偏差を棒グラフ化した。

C：U937 細胞に各濃度のイメテルスタットを投与し 24 時間後の γH2AX と β-actin の発現をウェスタンブロットを用いて観察した。

次にテロメア長の変化を 4 つの細胞株で検討した（図 20）。短期的に細胞増殖に影響を与えない濃度のイメテルスタット（1 μM）を加え継続的に培養していくと、どの細胞株においても経時的にテロメア長の短縮が認められた。一方コントロールのオリゴでは有意な変化はみられなかった。35 日後でテロメア長は約 8 割となったが、細胞増殖はコントロールと著変なく、テロメア長短縮のみで増殖に影響を与えるためには、さらに長期的に投与する必要があると推測された。既報においてもテロメア長の変化には数週間の投与が必要であり、テロメア長短縮による細胞増殖抑制効果は短期間では得られない可能性がある。

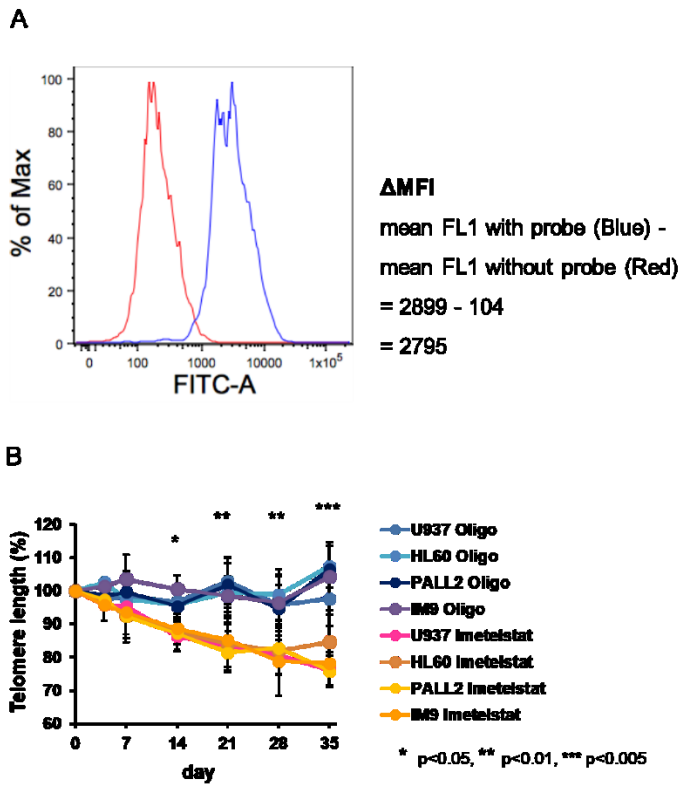


図 20. イメテルスタット投与によるテロメア長の変化

A：1301 細胞の Flow-FISH の元データ。縦軸に最大%、横軸に FITC の蛍光強度をとり、個々のデータをヒストグラムで示した。青がテロメアにハイブリダイズするプローブあり、赤がプローブなしのデータで、右側には MFI の差（ΔMFI）の値を記した。

B：Day 0 のテロメア長を 100 とした時の相対的なテロメア長を day 4, 7, 14, 21, 28, 35 に測定した。寒色系はコントロールのオリゴを加えた群、暖色系はイメテルスタットを加えた群で、3 回測定の平均値±標準偏差を折れ線グラフで示した。

5. イメテルスタットは抗がん剤のエトポシドの効果を増強する

イメテルスタット単剤では細胞死をもたらさなかったので、イメテルスタットの細胞増殖抑制効果は生理的な DNA 損傷修復が抑制されたためである可能性があり、次の検討では少量の抗がん剤を併用し相乗効果を検証した。イメテルスタットと抗がん剤の相乗効果を検討するために、抗がん剤としてエトポシドを選択した。エトポシドの作用機序は DNA の直接切断とトポイソメラーゼ阻害を介した DNA 再結合阻害である。このため、イメテルスタットの DNA 損傷修復抑制効果と最も相乗効果が期待できる抗がん剤と考えられた。またエトポシドは急性白血病や悪性リンパ腫に対して一般的に使用されている。まずは予備実験として各細胞株のエトポシドに対する感受性を調べるためにエトポシド単剤で濃度をふって増殖に対する影響を検討した（表 2)。

表 2. 各細胞株に対するエトポシドの細胞増殖抑制効果

4 日目の無治療（薬剤濃度 0）の生細胞数を 100 と標準化し、各濃度の薬剤を加えたときの 4 日目の生細胞数をパーセントで表記した。

エトポシド濃度（nM）	0	0.5	1	5	10	50	100	500	1000
U937	100	104.5	98.4	99.4	83.2	73.9	54.9	26.2	4.5
HL60	100	99.8	98.7	76.2	58.6	53.6	24.8	11.9	2.2
IM-9	100	97.8	102.9	94.4	87.2	65.8	48.5	22.7	7.1
PALL2	100	101.2	98.9	90.7	87.9	73.8	60.8	28.9	10.9
CCRF-CEM	100	103.6	97.8	95.5	90.4	86.8	57.6	28.3	9.7

そのうえで day 4 の時点で無治療と比較して生細胞数が約 50%となるようなエトポシドの濃度が U937、IM-9、PALL2、CCRF-CEM で 100 nM (0.1 μM)、HL60 で 50 nM (0.05 μM) であり、この濃度でイメテルスタットとの併用効果を検討した。図 21 に 5 つの細胞株における増殖曲線を示す。イメテルスタットは前述のとおり増殖に影響を与えない低濃度（1 μM）で使用しており、無治療とほぼ同等である。エトポシド単剤と比較して、イメテルスタットとエトポシ

ドを併用すると有意に細胞増殖を抑制することがわかった。これはどの細胞株においても認められた。また 96 ウェルプレートを用いた生細胞アッセイで 4 日目の生細胞数を測定したところ、エトポシド単剤と比較してイメテルスタット併用において生細胞数は有意に少なく（図 22)、増殖曲線の結果と一致した。

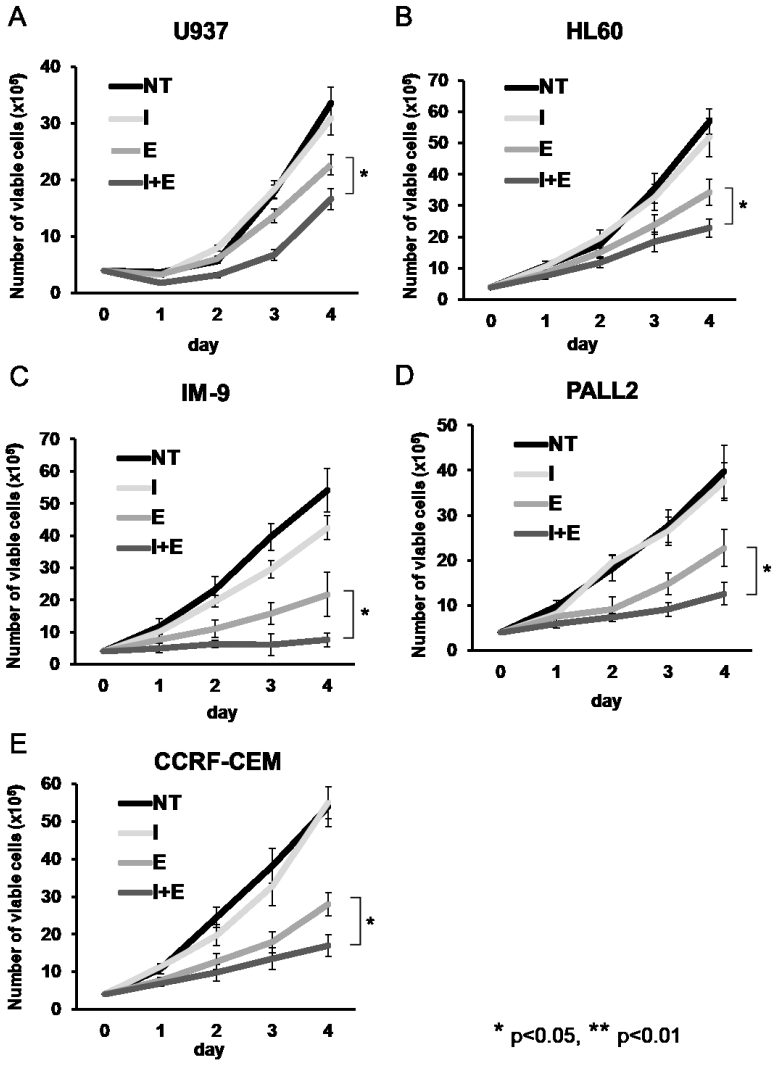


図 21. イメテルスタットはエトポシドの効果を増強する

4 日間の生細胞数の変化を折れ線グラフにして、増殖曲線を作成した。データは 3 回計測の平均値±標準偏差で示している。A～E は 5 つの細胞株 U937、HL60、IM-9、PALL2、CCRF-CEM を用いたときの増殖曲線である。

NT: no treatment, I: imetelstat, E: etoposide

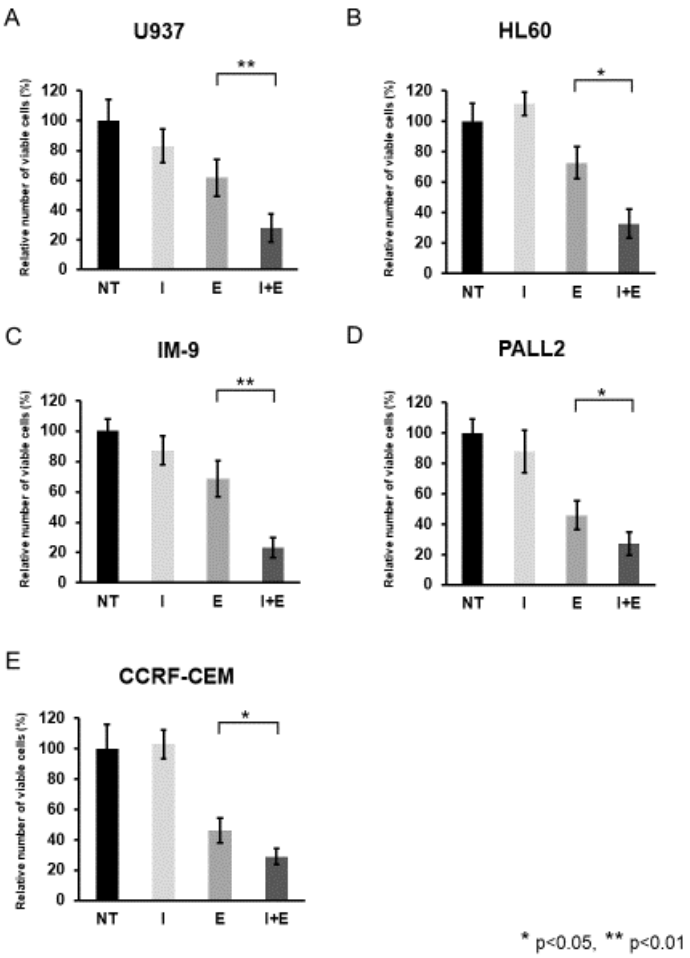


図 22. 生細胞アッセイによるイメテルスタットとエトポシドの相乗効果の検討

4 日目の生細胞数を生細胞アッセイ（Cell counting kit-8）により評価し、no treatment の生細胞数を 100 として標準化した。データは 3 回計測の平均値±標準偏差で示している。A～E は 5 つの細胞株 U937、HL60、IM-9、PALL2、CCRF-CEM を用いたときの実験結果である。

NT: no treatment, I: imetelstat, E: etoposide

次に U937 細胞を用いた実験における生細胞率を day 1 から day 4 までで比較した（図 23)。生細胞率は無治療のものとイメテルスタット単独のものではほぼ 100%で推移した。エトポシド単独で治療すると day 1, 2 と生細胞率が 70%程度に低下するがその後は生き残った細胞が増殖し生細胞率は上昇した。イメテルスタットを併用するとエトポシド単独よりも生細胞率が低下した。day 1 では生細胞率に有意差が認められたが、その後エトポシド単独とイメテルスタット併用の差は小さくなり有意差はなくなった。イメテルスタットは投与初期段階におけるエトポシドの殺細胞効果を高め、その差が day 4 における生細胞数の差となって現れたと考えられる。

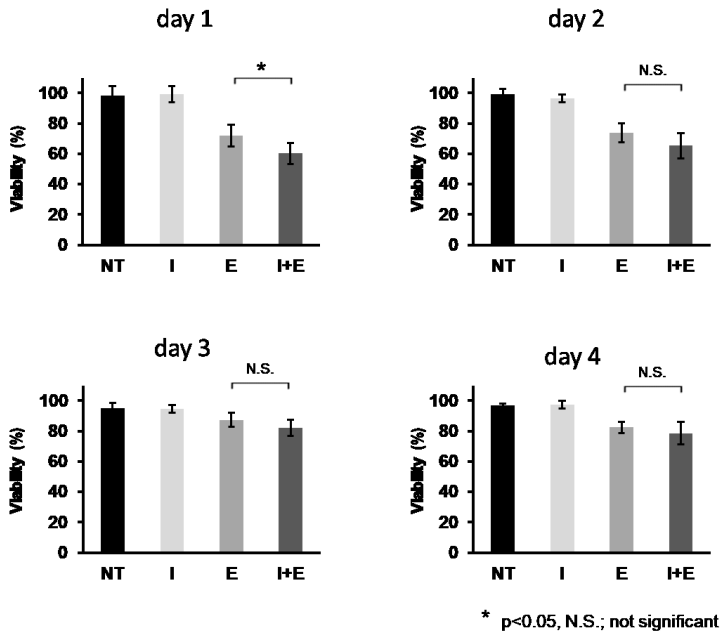


図 23. U937 細胞におけるエトポシドとイメテルスタット併用による生細胞率の経時的変化

トリパンブルー染色により評価した生細胞率を棒グラフ化した。
データは 3 回測定の平均値±標準偏差で示す。
NT: no treatment, I: imetelstat, E: etoposide

次にエトポシド以外の抗がん剤とイメテルスタットの併用について U937 細

胞を用いて検討した。造血器悪性腫瘍の治療で広く用いられる 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 5 剤について検討した。まず各薬剤の増殖に与える影響を濃度を振って単剤で検討した（表 3）。

表 3. 抗がん剤の各濃度における U937 細胞の増殖抑制効果

4 日目の無治療（薬剤濃度 0）の生細胞数を 100 と標準化し、各濃度の薬剤を加えたときの 4 日目の生細胞数をパーセントで表記した。

薬剤濃度（nM）	0	0.5	1	5	10	50	100	500	1000
4-ヒドロペルオキシ-シクロフォスファミド	100	104.5	98.4	95.4	93.2	83.9	74.9	56.2	24.5
シタラビン	100	99.8	98.7	76.2	58.6	23.6	4.8	0	0
メソトレキセート	100	97.8	82.9	74.4	47.2	15.8	8.5	0	0
ビンクリスチン	100	58.2	38.9	10.7	7.9	0	0	0	0
ドキソルビシン	100	103.6	87.8	75.5	50.4	16.8	6.9	0	0

4 日目の生細胞数が無治療と比較して約 50%になる濃度を併用実験に用いることと決定し、4-ヒドロペルオキシ-シクロフォスファミドは 500 nM、シタラビン、メソトレキセート、ドキソルビシンは 10 nM、ビンクリスチンは 0.5 nM とした。この濃度と 1 μM のイメテルスタットを併用で加えて 4 日目の生細胞数を比較した（図 24）。その結果、エトポシドと同様に 4-ヒドロペルオキシ-シクロフォスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシンにおいて 4 日目の生細胞数はイメテルスタット併用において有意に少なかった。一方でシタラビン、メソトレキセートとの併用においては有意な細胞増殖抑制効果は認められなかった。この抗がん剤による違いの要因について十分に検討できていないが、シタラビン、メソトレキセートの作用機序が DNA 代謝拮抗作用であり、DNA を直接障害しないことに由来している可能性は考えられる。また細胞株や実験系によっては異なる結果となる可能性もあり検討の余地が残る。

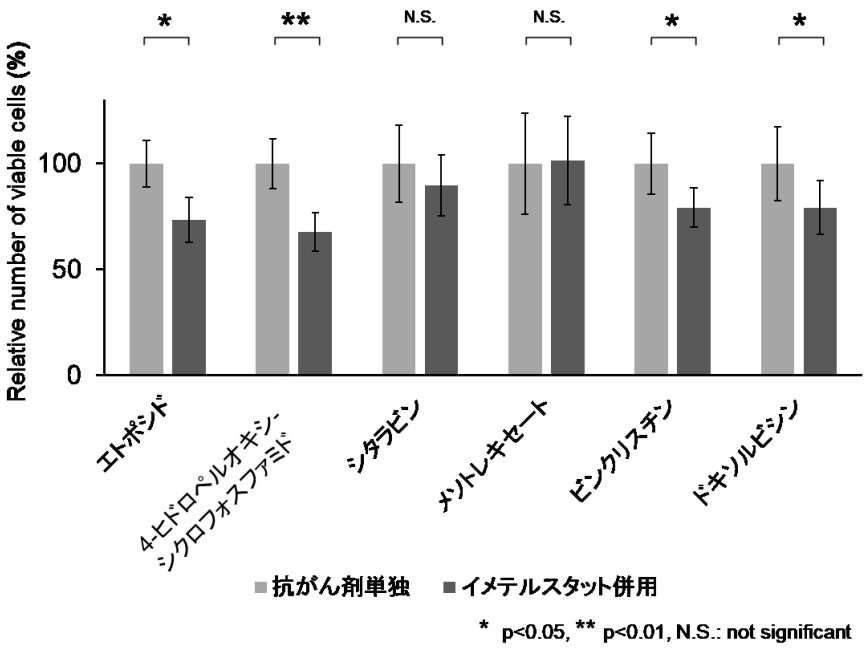


図 24. イメテルスタット併用効果の抗がん剤による比較

U937 細胞における各抗がん剤単独とイメテルスタット併用の生細胞数の比較を示す。データは 4 日目の生細胞数を 3 回計測の平均値±標準偏差で示しており、抗がん剤単独投与の生細胞数を 100 として標準化した。

6. イメテルスタットは放射線照射で誘導される γH2AX の発現を増強する

テロメラーゼ阻害による DNA 損傷修復抑制効果を検証するために、DNA 損傷時に生じるリン酸化されたヒストン（γH2AX）の発現を、イメテルスタット併用の有無で検討した。この実験における DNA 損傷は放射線照射 2 グレイを用いて導入したが、放射線照射の場合もエトポシドと同様にイメテルスタットとの相乗効果が認められた（図 25A）。なおエトポシドより効果発現が早いため、投与 2 日目の時点でイメテルスタット併用の有無で細胞増殖に有意な差が生じていた。5 つの細胞株で放射線照射 4 時間後の γH2AX の発現を比較したところ、全ての細胞株で放射線単独よりイメテルスタット併用において γH2AX の発現が強かった（図 25B～F）。イメテルスタット単独では γH2AX はほとんど発現しないか、無治療と同程度の発現レベルであった。この結果から、イメテルス

タットは放射線照射で誘導されるγH2AX の発現を増強することが示された。4時間という早期の段階で差がついており、テロメア短縮とは別の機序が働いていることが予想される。

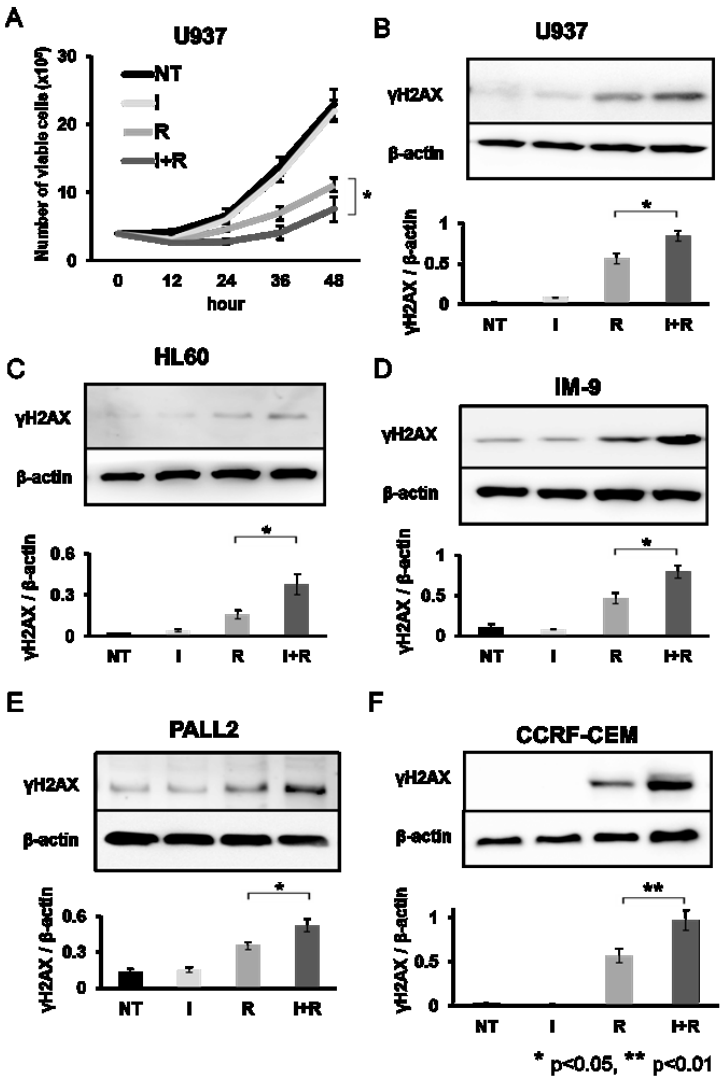


図 25. 放射線照射 4 時間後のγH2AX 発現の強さ

A は U937 細胞の生細胞数を 12 時間毎に記録しグラフ化した。データは 3 回計測の平均値±標準偏差で示している。B～F は U937、HL60、IM-9、PALL2、CCRF-CEM におけるγH2AX と β-actin の発現をウェスタンブロットで検討した結果を示す。下段は β-actin で標準化したγH2AX のバンドの濃さを平均値±標準偏差の数値でグラフ化した。
NT: no treatment, I: imetelstat, R: radiation

次に放射線照射後の γH2AX 発現の経時的な変化をイメテルスタットの有無で検討するために、U937 細胞を用いて、2 グレイの放射線照射前、照射後 0.5 時間、4 時間、8 時間の γH2AX の発現を比較した。その結果、イメテルスタットを投与した細胞における γH2AX の発現は 0.5 時間後では同等かやや低いが、4 時間後、8 時間後においては γH2AX 発現が亢進していた（図 26)。イメテルスタットを投与していない細胞では DNA 損傷修復が進み、8 時間後には γH2AX の発現が低下した一方、イメテルスタットを投与した細胞では DNA 損傷修復が抑制され γH2AX 発現の低下が認められなかった。イメテルスタットが放射線照射による DNA 損傷を長期間持続させた可能性を示唆する。

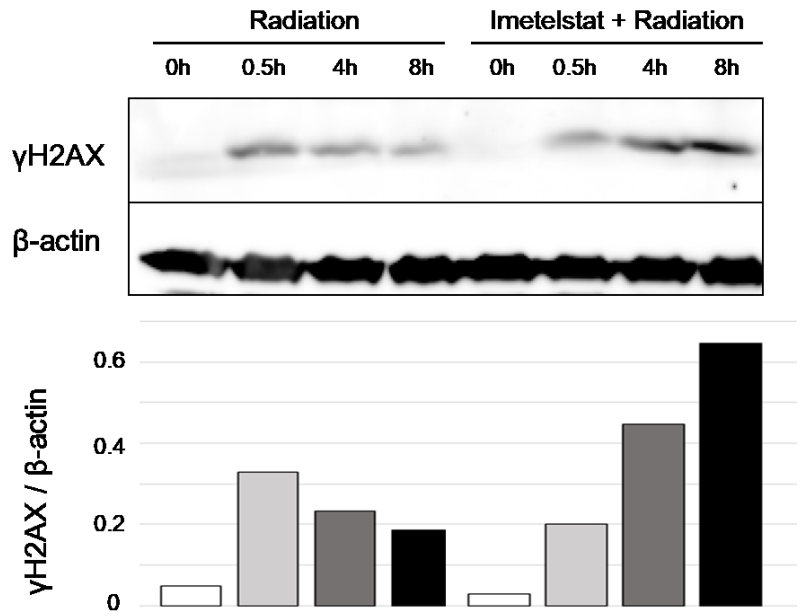


図 26. 放射線照射後の γH2AX 発現の経時的変化
放射線照射後の γH2AX と β-actin の発現をウェスタンブロットで検討した。左 4 列は放射線照射のみ、右 4 列はイメテルスタットを併用した細胞における結果で、0、0.5h、4h、8h は放射線照射からの経過時間を示す。下段は β-actin で標準化した γH2AX のバンドの濃さを数値化しグラフ化した。

7. 正常の末梢血単核球において放射線照射は hTERT タンパク発現およびテロメラーゼ活性を誘導し、その hTERT は γH2AX と核内で共局在する

テロメラーゼが DNA 損傷修復に関わっているとすれば、DNA 損傷部位にテロメラーゼが物理的に近接しているのではないかと予想された。このことを検証するために、γH2AX と hTERT の細胞内での発現を蛍光免疫染色により評価する方針とした。まずは恒常的に hTERT が発現しており、実験手技上も扱いやすい U937 細胞を用いて検討した。U937 細胞を放射線照射の有無で分けて、hTERT や γH2AX を蛍光免疫染色した（図 27）。その結果、放射線照射により γH2AX の発現は亢進したが、hTERT の局在や発現の強さに明らかな変化は認められなかった。細胞株ではもともと恒常的に hTERT が発現しているため、DNA 損傷が加わったときの変化が捉えにくかった可能性がある。

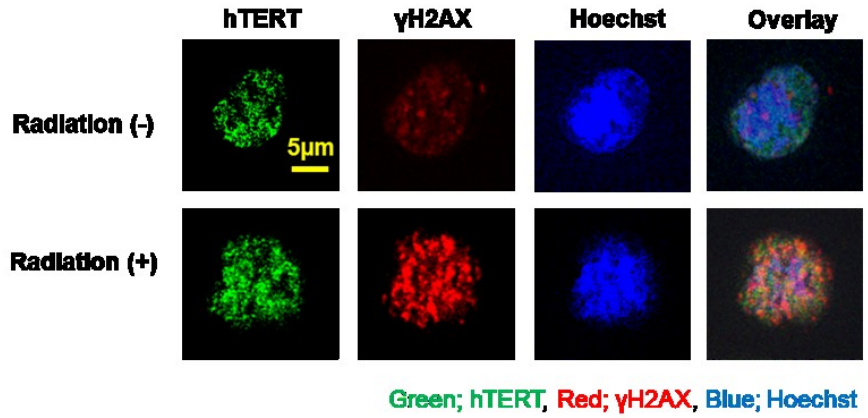


図 27. U937 細胞を用いた hTERT と γH2AX の蛍光免疫染色
蛍光免疫染色で hTERT を緑、γH2AX を赤、核を青に染色した。
Overlay は重ね合わせ画像を示す。図中のスケールバーは 5 μm を示す
hTERT: human telomerase reverse transcriptase

ここで、線維芽細胞において hTERT がテロメア以外のクロマチン構造に作用することで DNA 傷害応答に重要な役割を果たすとする報告(Masutomi et al., 2005)を参考に、恒常的にテロメラーゼ発現を認めない細胞を用いて検討した。健常人の PBMCs をサンプルとして実験を進めた。まずは放射線照射によりテロメラーゼの活性およびタンパク発現が検出可能となるかを経時的に検討した。

まずテロメラーゼ活性は、2 時間後からわずかに上昇し 6 時間以降で有意に上昇し、12 時間後には 3.5 倍となった（図 28A)。上昇するとはいえ細胞株との比較では、健常人 PBMCs のテロメラーゼ活性は相対的にみるとほぼ 0（活性なし）となるため、かなり低いレベルでの変動である。ただ時間経過とともに上昇しており、この所見は有意と判断した。

次に hTERT、γH2AX および内部コントロールの β-actin 発現をウェスタンブロットで評価した（図 28B)。細胞数は開始時から著変ないため、β-actin の発現はほぼ同等であった。γH2AX は放射線照射による DNA 二重鎖切断を反映して、2～4 時間をピークに発現し、12 時間後に発現低下が認められた。hTERT の発現は照射前から 6 時間までは認められなかったが、8 時間後から検出されそれに伴って γH2AX の発現は減少した。

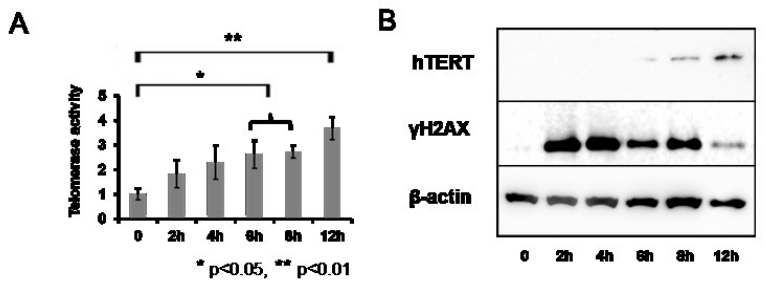


図 28. 放射線照射によるテロメラーゼ活性および hTERT 発現の変化
A：放射線照射前（0）における活性を 1 として標準化し、3 回計測の平均値±標準偏差を棒グラフに示した。
B：hTERT、γH2AX、β-actin タンパクのウェスタンブロット画像を示す。
hTERT: human telomerase reverse transcriptase

次に hTERT と γH2AX の局在をこれらが同時に発現していると予想された放射線照射 8 時間後の PBMCs で検討した。図 29 に蛍光免疫染色の結果を示す。放射線照射なしのコントロールにおいては、hTERT および γH2AX ともに染色されず、放射線照射ありの細胞においては、核内に両者の発現が認められた。さらに一部、hTERT の赤と γH2AX の緑が重なって黄に染色されている部分があり、両者の局在が一致している所見が得られた。

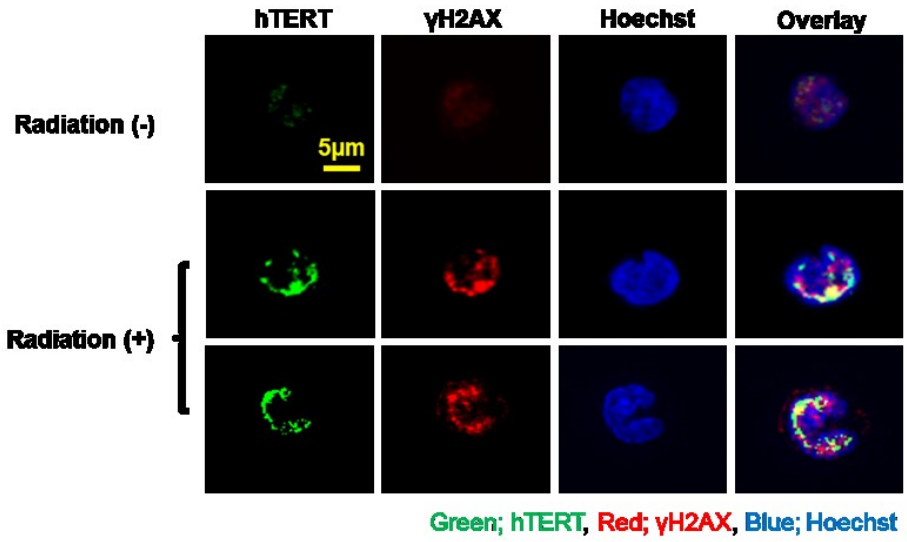


図 29. hTERT は γH2AX と核内で共局在する

蛍光免疫染色で hTERT を緑、γH2AX を赤、核を青に染色した。
Overlay は重ね合わせ画像を示す。図中のスケールバーは 5 μm を示す。
hTERT: human telomerase reverse transcriptase

【考察】

テロメラーゼは、テロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）とテロメラーゼ RNA の主に 2 つのコンポーネントで構成される酵素である。テロメラーゼ RNA はヒト細胞で普遍的に発現しているが、hTERT 発現は幹細胞/前駆細胞、活性化リンパ球および増殖能の高い細胞に限定されており、テロメラーゼ活性の制御は hTERT の発現で調整されている。造血器悪性腫瘍を含む多くのヒトの癌は、正常な細胞と比較して高いテロメラーゼ活性と短いテロメア長をもつという特徴を有する(Aalbers et al., 2013; Allegra et al., 2017; Bernard et al., 2009; Drummond et al., 2005; Gessner et al., 2010)。また、高いテロメラーゼ活性は造血器悪性腫瘍における病勢進行、予後不良、化学療法抵抗性に関連しているとする報告がある(Jones et al., 2012)。ヒトの悪性腫瘍の 90%以上が hTERT を発現している(Kyo et al., 2008)。その一方で生殖細胞、幹細胞、および増殖の必要性が高い一部の細胞を除き、分化した体細胞には検出可能なテロメラーゼ活性は認められない(Ropio et al., 2016)。したがって、テロメラーゼ阻害により腫瘍細胞の増殖を抑制し治療効果を得るという戦略は合理的であると考えられていた。

実際にイメテルスタットによるテロメラーゼ阻害は、テロメア長の短縮と細胞老化およびアポトーシスを引き起こす(Jafri et al., 2016)。また乳がんや転移性肺がんのモデルにおいて単剤で腫瘍を縮小させたとの報告もあるが (Hochreiter et al., 2006; Jackson et al., 2007)、この効果は短期的に得られたものではなく効果が認められるまで数週間を要した。多発性骨髄腫の細胞株を用いた研究ではイメテルスタットで治療するとテロメラーゼ活性が抑制され、テロメア長が短縮し、生細胞数が 3〜5 週間かけて初期値の 5%未満に減少したことが示された(Shammas et al., 2008a)。しかしながら、テロメア長の減少とともにテロメラーゼへのアクセスをブロックするテロメア結合タンパク質が減少し、ある一定のところでテロメア長は安定化する現象が報告されている (Burchett et al., 2014)。テロメア長の大幅な短縮には複数回の細胞分裂を待たなければならず、テロメラーゼ阻害薬単独でのがん治療が限界を示す一つの理由と考えられる(Shay, 2016)。また一部の腫瘍においては、テロメラーゼ非依存性にテロメア長を維持する alternative of lengthening telomere という機構が働いており(Dilley et al., 2016)、テロメラーゼ阻害によるテロメア長短縮は期待できない。我々の検討で、高濃度のイメテルスタットでは細胞増殖抑制効果が短期間で得られたが、低濃度では単剤で増殖に影響を与えなかった。高濃度で短期間に細胞増殖が抑制された理由としては、細胞周期を遅らせて DNA 損傷を引き起こすイメテルスタットの作用が報告されている(Celeghin et al., 2016; Thompson et al., 2018)。しかしイメテルスタットの高濃度投与は用量制限毒性

である骨髄抑制の副作用を引き起こすことが小児を対象としたフェーズ 1 研究で報告されている(Thompson et al., 2013)。

短期間に殺細胞効果を効率的に得るために我々はテロメラーゼの DNA 損傷修復への関与に着目し、抗がん剤や放射線治療との併用効果を検討した。他のグループからも DNA 損傷を引き起こす治療とイメテルスタットの併用効果を示す報告がされているが(Uziel et al., 2010; Wu et al., 2017)、その機序については不明な点が多かった。DNA 損傷修復を抑える治療は、既存の治療と比較して、イメテルスタット、抗がん剤、放射線の投与量を抑えつつ相乗的に高い効果が得られるというメリットをもつ。

この併用療法の問題点としてはテロメラーゼが発現していない分化した細胞への毒性が強まるのではないかという点である。分化した正常細胞にはテロメラーゼが発現していないため、イメテルスタット併用により抗がん剤の副作用が増強する可能性は少ないと考えられる。しかし我々の検討において、健常人の PBMCs でわずかではあるがテロメラーゼの発現が DNA 損傷により誘導された。したがって、DNA 損傷時は分化した細胞でもテロメラーゼ阻害の影響を受け副作用が強く出ることが懸念される。正常のヒト線維芽細胞でテロメラーゼがテロメア構造の維持に重要であると過去に報告されている(Masutomi et al., 2003)。さらに幹細胞にはテロメラーゼが恒常的に発現しており、抗がん剤による DNA 損傷をより強く受ける可能性がある。さらに hTERT には分化を促進する機能があると報告されているため(Choi et al., 2008; Sarin et al., 2005)、分化障害といったこれまでに報告されていないような副作用も懸念される。一方で、ラットの間葉系幹細胞に短期間イメテルスタットを投与しても、自己複製および分化を妨げないと報告されている(Tokcaer-Keskin et al., 2010)。さらに骨髄増殖性疾患の病的な造血幹細胞と正常な造血幹細胞に対するイメテルスタットの感受性の違いを検討し、病的な幹細胞のほうがより増殖能に影響を受けるとの報告がある(Mosoyan et al., 2017; Wang et al., 2018)。一方、急性骨髄性白血病の幹細胞や乳がんの幹細胞に対するイメテルスタットの効果が報告されている(Bruedigam et al., 2014; Joseph et al., 2010)。正常な幹細胞への影響が限定的であれば、テロメラーゼ阻害により抗がん剤や放射線照射への感受性が乏しいがん幹細胞への治療効果を高めることができる可能性がある。

我々が今回検証したテロメラーゼ阻害薬の相乗効果について図 30 にシェーマを示す。がん細胞に抗がん剤や放射線照射による DNA 損傷が加わったときにテロメラーゼが損傷部位にアクセスし、テロメア配列挿入による DNA 修復機構が機能する。ここにテロメラーゼ阻害薬が加わると DNA 修復が阻害される。その結果、がん細胞はアポトーシスを起こす。この機序を利用した治療は多くの癌腫に適応可能でありさらなる研究が必要である。

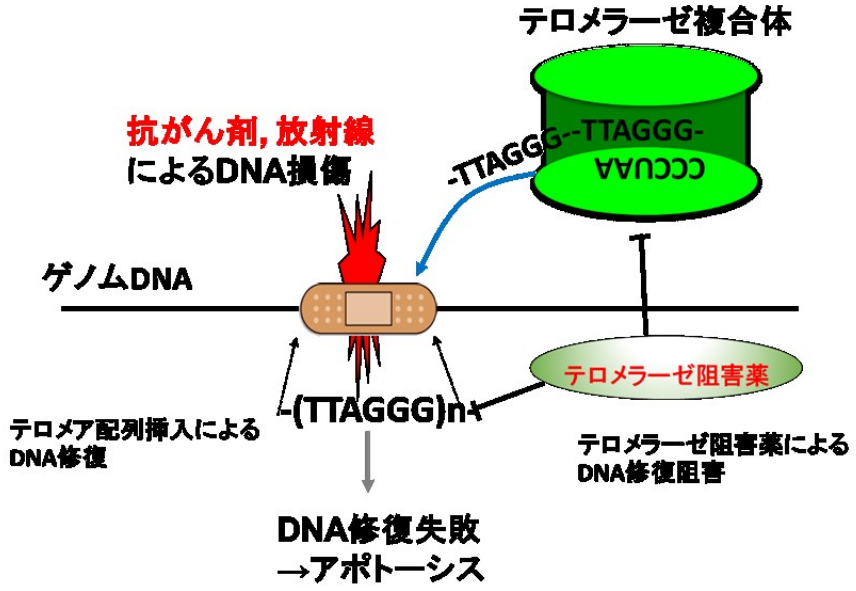


図 30. テロメラーゼ阻害薬と抗がん剤、放射線照射の併用効果

【総括と結論】

新知見

・テロメラーゼによる DNA 損傷修復作用
・ヒトゲノムにおけるテロメア配列挿入多型の発見
・イメテルスタットが抗がん剤や放射線照射の細胞増殖抑制効果を増強する

意義

・テロメラーゼの DNA 損傷修復機能に着目することにより、テロメラーゼ阻害薬と抗がん剤や放射線照射との併用という新たな治療戦略の開発につながる。
・イメテルスタットは造血器悪性腫瘍に対する抗がん剤治療の治療成績を向上させる可能性がある。
・イメテルスタットによる DNA 損傷修復機能の抑制は、造血器悪性腫瘍だけでなく、固形腫瘍の治療にも応用できる可能性がある治療戦略である。

今後の課題

本研究は細胞株での検討にとどまっており、動物モデルなどの個体へ投与した際の効果は確認できていない。イメテルスタット単剤での動物実験や臨床試験は既に行われており、それらを参考に疾患罹患マウスモデル等でさらなる検討を行う必要がある。また正常細胞、幹細胞に与える影響は副作用の観点から懸念されるため、検討が必要である。

今後の研究展開

テロメラーゼ阻害薬を用いたがん治療は単剤の連日投与では効果が限定的なことが知られている。我々の研究のように抗がん剤や放射線治療と組み合わせて治療効果を高めることが期待される。また、特定の遺伝子変異に有効な分子標的薬や抗体薬などとイメテルスタットの併用による治療効果を検討する必要がある。最適な併用薬を見出すために、テロメラーゼの機能をさらに詳細に解明する必要がある。我々はその一端を担うべく具体的な計画として以下の実験を考えている。

① ヒトの造血器悪性腫瘍細胞をマウスに移植しイメテルスタットと抗がん剤の相乗効果について検証する。

② 固形腫瘍の細胞株でイメテルスタットと抗がん剤/放射線照射の相乗効果について検証する。

③ DNA 損傷とは異なる機序をもつ造血器悪性腫瘍に対する薬剤とイメテルスタットの併用効果を検討する。具体的には急性骨髄性白血病に使用される fms-related tyrosine kinase 3 阻害薬のミドスタウリンやギルテルチニブ、B-cell lymphoma 2 阻害薬のベネトクラックス、DNA メチル化阻害薬のアザシチジ、主に多発性骨髄腫に用いられるプロテアソーム阻害薬や免疫調整薬との併用効果を検証する。

④ 将来的には、造血器悪性腫瘍患者に対するイメテルスタットと抗がん剤の併用療法の効果を検証する臨床試験を計画する。

【謝辞】
稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室 豊嶋崇徳教授に深く感謝いたします。また、直接の御指導を賜りました北海道大学病院臨床研修センター 小野澤真弘講師に心より感謝申し上げます。最後に様々な面においてご協力いただいた教室員の皆様に心よりお礼申し上げます。

【利益相反】

開示すべき利益相反状態はない。

【引用文献】

Aalbers, A.M., Calado, R.T., Young, N.S., Zwaan, C.M., Wu, C., Kajigaya, S., Coenen, E.A., Baruchel, A., Geleijns, K., de Haas, V., et al. (2013). Telomere length and telomerase complex mutations in pediatric acute myeloid leukemia. Leukemia. *27*, 1786-1789.

Allegra, A., Innao, V., Penna, G., Gerace, D., Allegra, A.G., and Musolino, C. (2017). Telomerase and telomere biology in hematological diseases: A new therapeutic target. Leuk. Res. *56*, 60-74.

Baerlocher, G.M., Oppliger Leibundgut, E., Ottmann, O.G., Spitzer, G., Odenike, O., McDevitt, M.A., Roth, A., Daskalakis, M., Burington, B., Stuart, M., et al. (2015). Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. N. Engl. J. Med. *373*, 920-928.

Bernard, L., Belisle, C., Mollica, L., Provost, S., Roy, D.C., Gilliland, D.G., Levine, R.L., and Busque, L. (2009). Telomere length is severely and similarly reduced in JAK2V617F-positive and -negative myeloproliferative neoplasms. Leukemia. *23*, 287-291.

Blackburn, E.H., and Gall, J.G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. J. Mol. Biol. *120*, 33-53.

Bolzan, A.D. (2017). Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. Mutat. Res. *773*, 51-65.

Bruedigam, C., Bagger, F.O., Heidel, F.H., Paine Kuhn, C., Guignes, S., Song, A., Austin, R., Vu, T., Lee, E., Riyat, S., et al. (2014). Telomerase inhibition effectively targets mouse and human AML stem cells and delays relapse following chemotherapy. Cell Stem Cell. *15*, 775-790.

Burchett, K.M., Yan, Y., and Ouellette, M.M. (2014). Telomerase inhibitor Imetelstat (GRN163L) limits the lifespan of human pancreatic cancer cells. PLoS One. *9*, e85155.

Celeghin, A., Giunco, S., Freguja, R., Zangrossi, M., Nalio, S., Dolcetti, R., and De Rossi, A. (2016). Short-term inhibition of TERT induces telomere

length-independent cell cycle arrest and apoptotic response in EBV-immortalized and transformed B cells. Cell Death Dis. *7*, e2562.

Chiappori, A.A., Kolevska, T., Spigel, D.R., Hager, S., Rarick, M., Gadgeel, S., Blais, N., Von Pawel, J., Hart, L., Reck, M., et al. (2015). A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer. Ann. Oncol. *26*, 354-362.

Choi, J., Southworth, L.K., Sarin, K.Y., Venteicher, A.S., Ma, W., Chang, W., Cheung, P., Jun, S., Artandi, M.K., Shah, N., et al. (2008). TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. PLoS Genet. *4*, e10.

Cong, Y.S., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). Human telomerase and its regulation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *66*, 407-425.

Dilley, R.L., Verma, P., Cho, N.W., Winters, H.D., Wondisford, A.R., and Greenberg, R.A. (2016). Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. Nature. *539*, 54-58.

Djojosubroto, M.W., Chin, A.C., Go, N., Schaetzlein, S., Manns, M.P., Gryaznov, S., Harley, C.B., and Rudolph, K.L. (2005). Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. Hepatology. *42*, 1127-1136.

Dohner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., et al. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. *129*, 424-447.

Dohner, H., Weisdorf, D.J., and Bloomfield, C.D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. N. Engl. J. Med. *373*, 1136-1152.

Drummond, M.W., Hoare, S.F., Monaghan, A., Graham, S.M., Alcorn, M.J., Keith, W.N., and Holyoake, T.L. (2005). Dysregulated expression of the major telomerase components in leukaemic stem cells. Leukemia. *19*, 381-389.

Fajkus, J. (2006). Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. Clin. Chim. Acta. *371*, 25-31.

Gessner, A., Thomas, M., Castro, P.G., Buchler, L., Scholz, A., Brummendorf, T.H., Soria, N.M., Vormoor, J., Greil, J., and Heidenreich, O. (2010). Leukemic fusion genes MLL/AF4 and AML1/MTG8 support leukemic self-renewal by controlling expression of the telomerase subunit TERT. Leukemia. *24*, 1751-1759.

Goldblatt, E.M., Gentry, E.R., Fox, M.J., Gryaznov, S.M., Shen, C., and Herbert, B.S. (2009). The telomerase template antagonist GRN163L alters MDA-MB-231 breast cancer cell morphology, inhibits growth, and augments the effects of paclitaxel. Mol. Cancer Ther. *8*, 2027-2035.

Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell. *43*, 405-413.

Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1987). The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. Cell. *51*, 887-898.

Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature. *345*, 458-460.

Heiblig, M., Elhamri, M., Le Jeune, C., Laude, M.C., Deloire, A., Wattel, E., Salles, G., and Thomas, X. (2017). Acute myeloid leukemia in the elderly (age 70 yr or older): long-term survivors. Eur. J. Haematol. *98*, 134-141.

Herbert, B.S., Gellert, G.C., Hochreiter, A., Pongracz, K., Wright, W.E., Zielinska, D., Chin, A.C., Harley, C.B., Shay, J.W., and Gryaznov, S.M. (2005). Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. Oncogene. *24*, 5262-5268.

Hochreiter, A.E., Xiao, H., Goldblatt, E.M., Gryaznov, S.M., Miller, K.D., Badve, S., Sledge, G.W., and Herbert, B.S. (2006). Telomerase template antagonist GRN163L disrupts telomere maintenance, tumor growth, and metastasis of breast cancer. Clin. Cancer Res. *12*, 3184-3192.

Hu, Y., Bobb, D., He, J., Hill, D.A., and Dome, J.S. (2015). The HSP90 inhibitor alvespimycin enhances the potency of telomerase inhibition by

imetelstat in human osteosarcoma. Cancer Biol. Ther. *16*, 949-957.

Hultdin, M., Gronlund, E., Norrback, K., Eriksson-Lindstrom, E., Just, T., and Roos, G. (1998). Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. Nucleic Acids Res. *26*, 3651-3656.

Jackson, S.R., Zhu, C.H., Paulson, V., Watkins, L., Dikmen, Z.G., Gryaznov, S.M., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2007). Antiadhesive effects of GRN163L--an oligonucleotide N3'->P5' thio-phosphoramidate targeting telomerase. Cancer Res. *67*, 1121-1129.

Jafri, M.A., Ansari, S.A., Alqahtani, M.H., and Shay, J.W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. Genome Med. *8*, 69.

Jones, C.H., Pepper, C., and Baird, D.M. (2012). Telomere dysfunction and its role in haematological cancer. Br. J. Haematol. *156*, 573-587.

Joseph, I., Tressler, R., Bassett, E., Harley, C., Buseman, C.M., Pattamatta, P., Wright, W.E., Shay, J.W., and Go, N.F. (2010). The telomerase inhibitor imetelstat depletes cancer stem cells in breast and pancreatic cancer cell lines. Cancer Res. *70*, 9494-9504.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant. *48*, 452-458.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science. *266*, 2011-2015.

Koziel, J.E., and Herbert, B.S. (2015). The telomerase inhibitor imetelstat alone, and in combination with trastuzumab, decreases the cancer stem cell population and self-renewal of HER2+ breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat. *149*, 607-618.

Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T., and Inoue, M. (2008). Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. Cancer Sci. *99*, 1528-1538.

Lavelle, F., Riou, J.F., Laoui, A., and Mailliet, P. (2000). Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? Crit. Rev. Oncol. Hematol. *34*, 111-126.

Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J.M., Currier, J.L., Tothova, Z., Manola, J.B., Ganesan, S., Lansdorp, P.M., Collins, K., and Hahn, W.C. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. *102*, 8222-8227.

Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. Cell. *114*, 241-253.

Morrison, S.J., Prowse, K.R., Ho, P., and Weissman, I.L. (1996). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. Immunity. *5*, 207-216.

Mosoyan, G., Kraus, T., Ye, F., Eng, K., Crispino, J.D., Hoffman, R., and Iancu-Rubin, C. (2017). Imetelstat, a telomerase inhibitor, differentially affects normal and malignant megakaryopoiesis. Leukemia. *31*, 2458-2467.

Nergadze, S.G., Rocchi, M., Azzalin, C.M., Mondello, C., and Giulotto, E. (2004). Insertion of telomeric repeats at intrachromosomal break sites during primate evolution. Genome Res. *14*, 1704-1710.

Ohyashiki, J.H., Ohyashiki, K., Iwama, H., Hayashi, S., Toyama, K., and Shay, J.W. (1997). Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. Clin. Cancer Res. *3*, 619-625.

Onozawa, M., Zhang, Z., Kim, Y.J., Goldberg, L., Varga, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Aplan, P.D. (2014). Repair of DNA double-strand breaks by templated nucleotide sequence insertions derived from distant regions of the genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. *111*, 7729-7734.

Oran, B., and Weisdorf, D.J. (2012). Survival for older patients with acute myeloid leukemia: a population-based study. Haematologica. *97*, 1916-1924.

Ouenzar, F., Lalonde, M., Laprade, H., Morin, G., Gallardo, F.,

Tremblay-Belzile, S., and Chartrand, P. (2017). Cell cycle-dependent spatial segregation of telomerase from sites of DNA damage. J. Cell Biol. *216*, 2355-2371.

Pennaneach, V., Putnam, C.D., and Kolodner, R.D. (2006). Chromosome healing by de novo telomere addition in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Microbiol. *59*, 1357-1368.

Ropio, J., Merlio, J.P., Soares, P., and Chevret, E. (2016). Telomerase Activation in Hematological Malignancies. Genes (Basel). *7*.

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.

Schrank, Z., Khan, N., Osude, C., Singh, S., Miller, R.J., Merrick, C., Mabel, A., Kuckovic, A., and Puri, N. (2018). Oligonucleotides Targeting Telomeres and Telomerase in Cancer. Molecules. *23*.

Scully, R., Panday, A., Elango, R., and Willis, N.A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *20*, 698-714.

Seimiya, H., Muramatsu, Y., Ohishi, T., and Tsuruo, T. (2005). Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. Cancer Cell. *7*, 25-37.

Shammas, M.A., Koley, H., Bertheau, R.C., Neri, P., Fulciniti, M., Tassone, P., Blotta, S., Protopopov, A., Mitsiades, C., Batchu, R.B., et al. (2008). Telomerase inhibitor GRN163L inhibits myeloma cell growth in vitro and in vivo. Leukemia. *22*, 1410-1418.

Shammas, M.A., Qazi, A., Batchu, R.B., Bertheau, R.C., Wong, J.Y., Rao, M.Y., Prasad, M., Chanda, D., Ponnazhagan, S., Anderson, K.C., et al. (2008). Telomere maintenance in laser capture microdissection-purified Barrett's adenocarcinoma cells and effect of telomerase inhibition in vivo. Clin. Cancer Res. *14*, 4971-4980.

Shay, J.W. (2016). Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer.

Cancer Discov. *6*, 584-593.

Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. Eur. J. Cancer. *33*, 787-791.

Shay, J.W., and Wright, W.E. (2019). Telomeres and telomerase: three decades of progress. Nat. Rev. Genet. *20*, 299-309.

Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. Cell. *29*, 245-255.

Tauchi, T., Nakajima, A., Sashida, G., Shimamoto, T., Ohyashiki, J.H., Abe, K., Yamamoto, K., and Ohyashiki, K. (2002). Inhibition of human telomerase enhances the effect of the tyrosine kinase inhibitor, imatinib, in BCR-ABL-positive leukemia cells. Clin. Cancer Res. *8*, 3341-3347.

Tefferi, A., Al-Kali, A., Begna, K.H., Patnaik, M.M., Lasho, T.L., Rizo, A., Wan, Y., and Hanson, C.A. (2016). Imetelstat therapy in refractory anemia with ring sideroblasts with or without thrombocytosis. Blood Cancer J. *6*, e405.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Begna, K.H., Patnaik, M.M., Zblewski, D.L., Finke, C.M., Laborde, R.R., Wassie, E., Schimek, L., Hanson, C.A., et al. (2015). A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. N. Engl. J. Med. *373*, 908-919.

Thompson, C.A.H., Gu, A., Yang, S.Y., Mathew, V., Fleisig, H.B., and Wong, J.M.Y. (2018). Transient Telomerase Inhibition with Imetelstat Impacts DNA Damage Signals and Cell-Cycle Kinetics. Mol. Cancer Res. *16*, 1215-1225.

Thompson, P.A., Drissi, R., Muscal, J.A., Panditharatna, E., Fouladi, M., Ingle, A.M., Ahern, C.H., Reid, J.M., Lin, T., Weigel, B.J., et al. (2013). A phase I trial of imetelstat in children with refractory or recurrent solid tumors: a Children's Oncology Group Phase I Consortium Study (ADVL1112). Clin. Cancer Res. *19*, 6578-6584.

Tokcaer-Keskin, Z., Dikmen, Z.G., Ayaloglu-Butun, F., Gultekin, S., Gryaznov, S.M., and Akcali, K.C. (2010). The effect of telomerase template antagonist GRN163L on bone-marrow-derived rat mesenchymal stem cells is reversible

and associated with altered expression of cyclin d1, cdk4 and cdk6. Stem Cell Rev. Rep. *6*, 224-233.

Uziel, O., Beery, E., Dronichev, V., Samocha, K., Gryaznov, S., Weiss, L., Slavin, S., Kushnir, M., Nordenberg, Y., Rabinowitz, C., et al. (2010). Telomere shortening sensitizes cancer cells to selected cytotoxic agents: in vitro and in vivo studies and putative mechanisms. PLoS One. *5*, e9132.

van Steensel, B., and de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. Nature. *385*, 740-743.

Wang, X., Hu, C.S., Petersen, B., Qiu, J., Ye, F., Houldsworth, J., Eng, K., Huang, F., and Hoffman, R. (2018). Imetelstat, a telomerase inhibitor, is capable of depleting myelofibrosis stem and progenitor cells. Blood Adv. *2*, 2378-2388.

Williams, J., Heppel, N.H., Britt-Compton, B., Grimstead, J.W., Jones, R.E., Tauro, S., Bowen, D.T., Knapper, S., Groves, M., Hills, R.K., et al. (2017). Telomere length is an independent prognostic marker in MDS but not in de novo AML. Br. J. Haematol. *178*, 240-249.

Wu, X., Smavadati, S., Nordfjall, K., Karlsson, K., Qvarnstrom, F., Simonsson, M., Bergqvist, M., Gryaznov, S., Ekman, S., and Paulsson-Karlsson, Y. (2012). Telomerase antagonist imetelstat inhibits esophageal cancer cell growth and increases radiation-induced DNA breaks. Biochim. Biophys. Acta. *1823*, 2130-2135.

Wu, X., Zhang, J., Yang, S., Kuang, Z., Tan, G., Yang, G., Wei, Q., and Guo, Z. (2017). Telomerase antagonist imetelstat increases radiation sensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. Oncotarget. *8*, 13600-13619.