

# 博士論文

神経膠腫幹細胞に対するグアニン四重鎖リガンドの制がん作用機序  
(Anti-tumor mechanism of a G-quadruplex ligand on glioma stem cells)

長谷川 大記

## 目次

略語.....	1
序論.....	2
第1章 Telomestatin の DNA 損傷メカニズム.....	7
要約.....	7
1-1 GSC に対するテロメラーゼ阻害剤の影響.....	8
1-2 GSC に対する Telomestatin のテロメア障害作用.....	16
1-3 複製・転写に依存した Telomestatin 誘導性の DNA 損傷.....	26
考察.....	30
第2章 Telomestatin の複製ストレス応答経路への影響.....	33
要約.....	33
2-1 BG4 抗体の調製と G4 特異性の確認.....	35
2-2 GSC と NSGC における G4 構造の比較.....	42
2-3 Telomestatin による複製ストレスの誘導.....	47
2-4 Telomestatin による GSC 選択的な Chk1 のリン酸化.....	51
2-5 ATR キナーゼ阻害剤の GSC 選択性.....	54
考察.....	58
第3章 総括.....	62
参考文献.....	67
謝辞.....	76

## 略語

Aph, aphidicolin; ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATP, adenosine triphosphate; ATR, ataxia telangiectasia and rad3-related protein; ATRIP, ATR interacting protein; bFGF, basic fibroblast growth factor; BSA, bovine serum albumin; CD, circular dichroism; Chk1, checkpoint kinase 1; Chk2, checkpoint kinase 2; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMEM F-12, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12; DRB, 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; EGF, epidermal growth factor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FACS, fluorescence activated cell sorting; FBS, fetal bovine serum; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; G4, g-quadruplex; GBM, glioblastoma; GSC, glioma stem cells; HRP, horseradish peroxidase; IC50, half maximal inhibitory concentration; IgG, immunoglobulin G; IHC, immunohistochemistry; MDC1, mediator of DNA damage checkpoint protein 1; NP-40, Nonidet P-40; NSGC, non stem glioma cells; PBS, phosphate buffered saline; PLL, poly-L-lysine; PNA, peptide nucleic acid; POD, peroxidase; POT1, protection of telomeres 1; RAP1, repressor activator protein 1; RIPA, radioimmunoprecipitation assay; RPA, replication protein A; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, tris buffered saline; TERT, telomerase reverse transcriptase; TIN2, TRF1-interacting nuclear protein 2; TMS, telomestatin; TRF1, telomeric repeat binding factor 1; TRF2, telomeric repeat binding factor 2.

# 序論

がん化学療法の原点は第一次世界大戦にまで遡る。化学兵器であるマスタードガスから最初の抗がん剤ナイトロジェンマスタードが開発され、その後、1960年前後には、活発に分裂するがん細胞に取り込ませることでがん細胞の増殖を抑制するメトトレキサートやフルオロウラシルなどの代謝拮抗剤が用いられるようになった。1970年代にはシスプラチンをはじめとするプラチナ製剤の開発により、固形がんにも治療効果を示す薬剤が導入された。現在では、がん細胞の特定の分子を狙い撃ちする分子標的薬の開発が盛んに行われている。がん化学療法の進歩により、進行がんの患者の延命期間を延ばすだけでなく、急性白血病や悪性リンパ腫といったがんに対しては高い治癒率が得られるようになった。しかしながら、再発がんや固形がんに対する有効な抗がん剤が得られず、我が国では1981年以来、がんが死因のトップであり続けている。

神経膠芽腫（glioblastoma: GBM）は極めて予後が悪い悪性脳腫瘍である。神経膠芽腫に対しては、外科的手術と放射線療法、化学療法を合わせた治療が行われるが、平均生存期間は12から15か月程度であるのが現状である(1-3)。このように予後が悪い原因として、神経膠芽腫が高い浸潤性を備えている点が挙げられる。脳の機能を温存するためには浸潤した腫瘍を手術で全摘出するのが困難であり、放射線治療においても正常脳組織への障害を避けるために一定線量を超えた放射線照射を行うことは難しい。化学療法に関しては近年、アルキル化剤であるテモゾロミド（Temozolomide）が治療に用いられるようになり、僅かに治療成績が向上したものの、5年生存率は現在も10%程度となっており(2,3)、優れた治療薬の開発が急務となっている。

1990年代に「がん幹細胞」の存在が白血病で見つかった以来、革新的な研究が行

われている。がん幹細胞は、腫瘍内の不均一な細胞集団の中にごく一部存在し、自己複製能や多分化能、強い造腫瘍性、治療抵抗性を保持している。抗がん剤により腫瘍の体積を一時的に減らすことが出来ても、腫瘍内に一部存在するがん幹細胞を排除できなければ、その高い造腫瘍性によりがんが再発してしまうと考えられる。神経膠芽腫の不均一な細胞集団の中にもがん幹細胞 (glioma stem cells: GSC) が存在し、放射線療法や化学療法に対する治療抵抗性に寄与していると考えられている (4,5)。スフェア培養した神経膠芽腫細胞は CD133 や SOX2、Nestin といったがん幹細胞・神経幹細胞マーカーを発現し、造腫瘍性を保持している (6,7)。一方、この細胞は 10% ウシ胎児血清含有培地では接着性を示し、幹細胞性を消失した non stem glioma cells (NSGC) となる (8)。

所属する研究室ではこれまでに、天然由来化合物であるテロメスタチン (Telomestatin) が GSC に対し、同細胞が分化して生じた NSGC と比べてより強力な細胞増殖抑制効果および DNA 損傷誘発作用を示すことを明らかにしてきた (9,10, Fig. A)。Telomestatin は、グアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) と呼ばれる特殊な核酸高次構造を安定化する「G4 リガンド」として知られている。G4 はグアニン残基の豊富な塩基配列において形成される (11,12, Fig. B)。G4 を形成する配列の代表的な例として、染色体末端に存在するテロメアが挙げられる (13-15)。テロメアは TTAGGG の繰り返し配列からなるテロメア DNA とその結合タンパク質で構成され、染色体の末端を保護している。テロメアには 6 つの因子 (TRF1、TRF2、RAP1、TIN2、TPP1、POT1) からなるシェルタリンと呼ばれるタンパク質複合体が結合している。シェルタリンの中でも、TRF1 および TRF2 は DNA 結合ドメインである Myb ドメインを使って二本鎖テロメア DNA に直接結合し、POT1 は G-tail と呼ばれる一本鎖テロメア DNA に直接結合している。G-tail がテロメア DNA の二本鎖部分に侵入することで、投げ縄構造である T-ループが形成され、染色体末端を保護している。T-ループの形成には TRF2 が必要であり、シェルタリンは DNA 損傷やテロメア機能不全

を防ぐために重要な役割を担っている (16-20)。DNA 複製は DNA ポリメラーゼ複合体を介して行われるが、DNA の末端部分を完全には複製することができないため、DNA 鎖の両端のテロメア DNA は徐々に失われていく。これを末端複製問題と呼ぶ。ヒト正常体細胞では、末端複製問題のためにテロメアが徐々に短縮していき、これが限界に達すると細胞はもはや分裂することが出来なくなり、細胞老化が誘導される。しかしながら、がん細胞の多くは、テロメア合成酵素であるテロメラーゼが活性化している。テロメラーゼは、鋳型 RNA と触媒サブユニットタンパク質 (TERT) で構成され、この酵素の働きによりテロメアを維持することで細胞の不死化が支持されている。テロメアの先端部の G-tail では G4 が形成されることが知られており (13-15)、Telomestatin がこの領域の G4 を安定化することで、テロメラーゼが G-tail へアクセスできなくなり、テロメア伸長が抑制される (9, 21,22)。G4 を形成する配列は、テロメアの他に、多くのがん関連遺伝子のプロモーター領域などにも存在することが知られており (23-36)、がん治療における新たな分子標的として期待されている。がん関連遺伝子 c-Myb のプロモーター領域にも G4 形成配列が存在することが知られており (37)、所属する研究室では Telomestatin が c-Myb の発現を低下させることが、GSC に対する細胞増殖抑制効果を示す一つの理由であることを明らかとしてきたが (10)、この化合物が GSC 選択的に DNA 損傷を誘導する理由は未だ明らかにされていない。

本研究は、G4 リガンドである Telomestatin が GSC 選択性を示す仕組みを明らかにすることを目的とした。この仕組みを解明することが出来れば、神経膠芽腫の新規治療戦略の構築に貢献できるであろう。Telomestatin の標的である G4 はグアニン豊富な塩基配列が一本鎖になると形成されることが知られており、テロメアの本鎖領域だけではなく、複製や転写の際にも G4 が形成されることが予測される (38,39)。この点に着目し、本研究では Telomestatin の GSC 選択性について、テロメアへの作用とテロメア以外の領域での作用にそれぞれ焦点を当て検討した。

本論文は、Telomestatin の DNA 損傷メカニズム（第 1 章）、および Telomestatin の複製ストレス応答経路への影響（第 2 章）から得られた新しい知見を通じて、Telomestatin が GSC 選択性を示す仕組みを考察したものである。

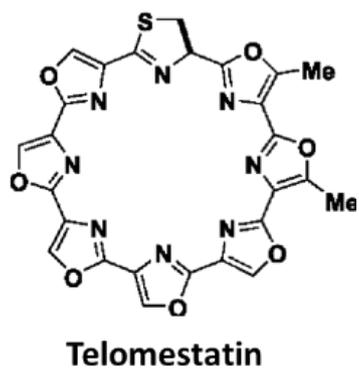


Figure A. Structure of Telomestatin.

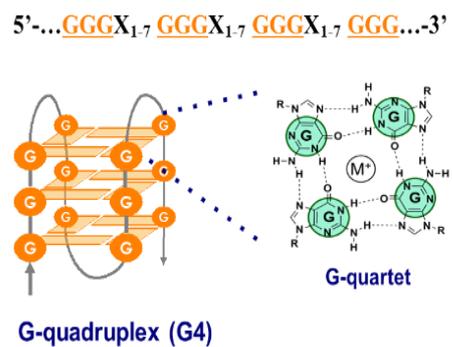


Figure B. Structure of G-quadruplex.

# 第 1 章

## Telomestatin の DNA 損傷メカニズム

### 【要約】

グアニン四重鎖リガンド Telomestatin は、テロメア G4 を安定化することでテロメラーゼ活性を阻害する (9)。この作用が Telomestatin の GSC 選択性に影響を与えている可能性を考えたが、TERT の触媒活性を阻害するテロメラーゼ阻害剤 BIBR1532 (40) は GSC 選択性を示さなかった。興味深いことに、Telomestatin はテロメア結合タンパク質である TRF2 の蛍光フォーカス (foci) を GSC 選択的に消失させることが明らかとなり、この活性が GSC におけるテロメア領域の DNA 損傷を誘導する原因である可能性が示された。また、免疫 FISH 法を用いた検討から、Telomestatin により誘導される DNA 損傷はテロメアだけではなく、約 7 割はテロメア以外の部位で生じることが認められた。複製阻害剤 (アフィディコリン) および転写阻害剤 (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole, DRB) を GSC に前処理すると、Telomestatin 誘導性の DNA 損傷が顕著に低下したことから、Telomestatin は GSC において TRF2 を標的としたテロメア障害だけではなく、複製や転写にも依存して DNA 損傷を誘導する可能性が示唆された。

## 1-1 GSC に対するテロメラーゼ阻害剤の影響

### 【目的】

Telomestatin はテロメラーゼ阻害活性を有することが知られている。この活性が GSC 選択性に影響を与えているのか検討する。

### 【材料・方法】

#### 細胞の培養

神経膠芽腫細胞 GBM146、GBM157 は、米国アラバマ大学の中野伊知郎先生からいただいた。これらの細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F-12) 培地 (Gibco, Grand Island, NY, USA) に、B27 (Gibco)、20 ng/mL bFGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)、50 ng/mL EGF (Peprotech)、100 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco)、GlutaMAX (Gibco)、5 µg/mL heparin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加えた浮遊細胞用培地により、37°C、5% CO<sub>2</sub>、95% air の条件下で、ベントキャップ付表面処理なし浮遊培養用フラスコ (Iwaki, Tokyo, Japan) を用いて培養した (10)。GBM146、GBM157 の GSC から NSGC への分化誘導には、DMEM F-12 に 10% fetal bovine serum (FBS, Mediatech Inc, Manassas, VA, USA) と 100 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco) を加えた培地を用い、GSC を組織培養用ディッシュ (Iwaki) で培養した。FBS は 55°C、30 分間の非働化処理をした後に使用した。特に示さない試薬類については、すべて特級以上、またはこれに準ずるものを使用した。

尚、本研究に用いている細胞は神経膠芽腫 (glioblastoma) 由来の細胞であるが、神経膠腫幹細胞 (glioma stem cells: GSC) という一般的な呼称を用いている。

### **Flow cytometry**

細胞を氷冷した PBS で 3 回洗淨した後、フィコエリスリン標識マウス抗ヒト CD133 抗体 (293C3; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を 30 分間反応させた。その後、細胞を 3 回洗淨して PBS に懸濁し、フィルターチューブ (FALCON, Corning, NY, USA) に通し、FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) で解析した (41)。

### **細胞溶解液の調製**

Western blotting 用細胞溶解液は以下のように調製した。細胞を PBS で 3 回洗淨し、phosphatase inhibitor cocktail と protease inhibitor cocktail (Nacalai, Kyoto, Japan) を加えた RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0、1.0% Nonidet P-40 (NP-40)、0.5% deoxycholic acid、150 mM NaCl、0.1% sodium dodecyl sulfate) で細胞を懸濁した。これを氷上で 10 分間静置し、ソニケーション処理を行った後、15,000 rpm、4°C、10 分間の遠心にかけた。この上清を細胞溶解液として回収した。タンパク量の定量は Bradford の方法に準じて PROTEIN ASSAY 試薬 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) を用いて行った。

### **Western blot analysis**

蛋白試料 10 µg に 5×SDS sample loading buffer (250 mM Tris-HCl, pH 6.5、

50% glycerol、10% sodium dodecyl sulfate、10% 2-mercaptoethanol、0.25% bromophenol blue) を加えた。これを 98°C で 10 分間加熱し、さらに 2 分間氷上で冷却した後、SDS-PAGE 用ゲル (Nacalai) を用いて、100 V で 10 分間、さらに 200 V で 50 分間電気泳動した。サイズマーカーには Rainbow marker (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いた。泳動終了後、あらかじめ transfer buffer (25 mM Tris-HCl、pH 8.3、190 mM glycine、20% methanol) に浸しておいたニトロセルロースメンブレン (Millipore, Darmstadt, Germany)、ろ紙、およびゲルを TRANS-BLOT (Bio Rad) にセットし、45 V、4°C で 30 分間、さらに 90 V、4°C で 90 分間トランスファーを行った。その後、washing buffer (0.1% Tween20/TBS) に溶解した 5% スキムミルク (Morinaga, Tokyo, Japan) で 30 分間ブロッキングし、メンブレンをウサギ抗 SOX2 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、ウサギ抗 Nestin 抗体 (Millipore)、マウス抗  $\beta$ -actin 抗体 (Sigma-Aldrich) のいずれかに 4°C で一晩浸した後、washing buffer で 5 分間 (4 回) 洗浄した。ついで、メンブレンを horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ抗体、HRP 標識抗マウス抗体 (GE Healthcare) のいずれかに室温で 1 時間浸し、washing buffer で 5 分間 (4 回) 洗浄した。特異的シグナルの検出は、ECL start Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) および Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) を用いて行った (42)。

### 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験は、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Fitchburg, WI, USA) を用いて、ATP を定量することで生存細胞数を測定した。細胞を 96 well plate (Iwaki) に  $10^3$  個/well 播き込み 24 時間培養した後に、Telomestatin (産業技術総合研究所の新家一男先生より供与)、BIBR1532 (Selleck Chem,

Houston, TX, USA) のいずれかで処理した。37°Cで6日間培養した後、室温にて30分間静置した96 well plateにCellTiter-Glo 試薬 (Promega) を添加し、シェーカーで10分間攪拌して細胞を溶解させた。その後10分間静置し、ピペッティングした細胞溶解液を白色の96 well plate (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に移し、発光シグナルをプレートリーダーで測定した。

## 【結果】

### GSCの分化誘導に伴う未分化マーカーの発現変化

まず、Flow cytometry を行い GSC の分化に伴う CD133 の発現変化を検討した (Fig. 1-1)。その結果、GSC で発現している CD133 は、血清刺激に伴い低下することが観察された。さらに、Western blot analysis を行い、SOX2 や Nestin といった未分化マーカーの発現を検討した結果、GSC で発現しているこれらの未分化マーカーは血清刺激により低下することが確認できた (Fig. 1-2)。

### GSC に対する Telomestatin の細胞増殖抑制効果

先に述べた、GSC と分化誘導して生じた NSGC について、Telomestatin の細胞増殖抑制効果を検討した (Fig. 1-3)。その結果、Telomestatin の 50% 阻害濃度 (Half maximal inhibitory concentration: IC<sub>50</sub>) は GBM146、GBM157 の GSC においてはそれぞれ 0.23 μmol/L、0.24 μmol/L であったのに対し、NSGC では二種類の細胞共に 1.0 μmol/L 以上であった。すなわち、Telomestatin は二種類の細胞において、4 倍以上の GSC 選択的な細胞増殖抑制効果を示すことが確認できた。

## GSC に対するテロメラーゼ阻害剤の細胞増殖抑制効果

続いては、GSC と NSGC に対するテロメラーゼ阻害活性の影響を検討するために、テロメラーゼ阻害剤 (BIBR1532) を用いた細胞増殖抑制試験を行った (Fig. 1-4)。その結果、IC<sub>50</sub> 値を比較すると GBM146 の GSC では 57.8  $\mu\text{mol/L}$ 、NSGC では 71.9  $\mu\text{mol/L}$  (NSGC/GSC 比は 1.24 倍) であり、GBM157 の GSC では 60.0  $\mu\text{mol/L}$ 、NSGC では 71.5  $\mu\text{mol/L}$  (NSGC/GSC 比は 1.19 倍) であった。これらの結果から、BIBR1532 は Telomestatin で観察されたような GSC 選択的な細胞増殖抑制効果を示さないことが明らかとなった。

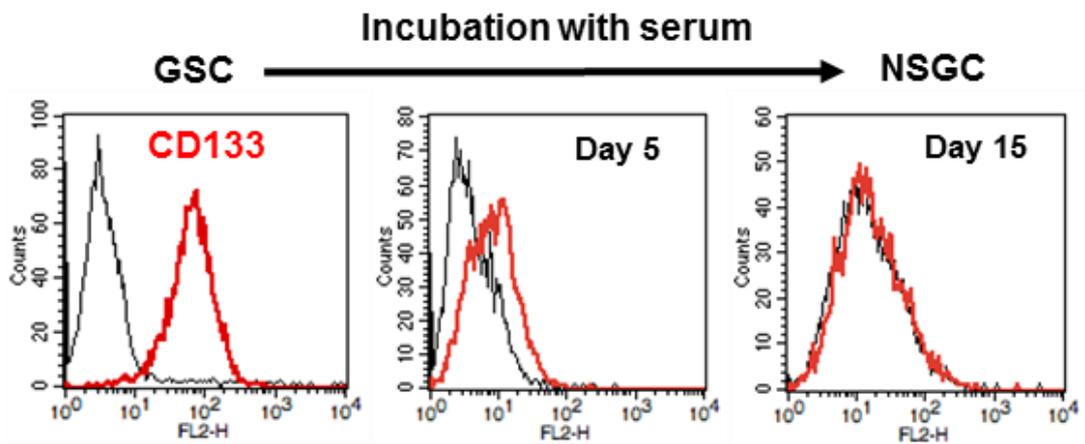


Figure 1-1. Measurement of CD133 levels in GBM146 cells by flow cytometry. Black histogram indicates normal immunoglobulin as negative control.

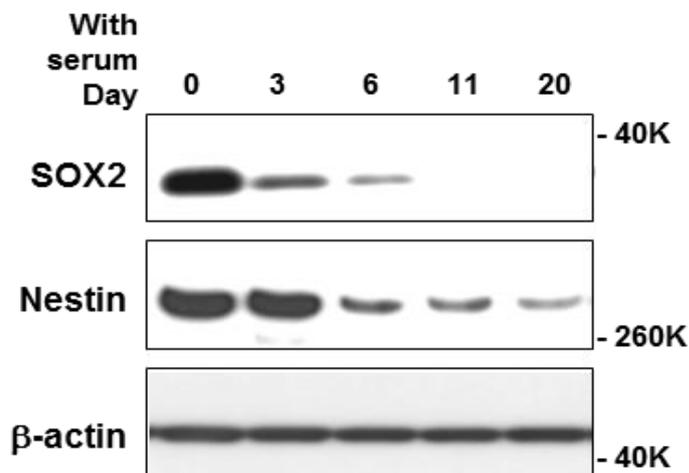
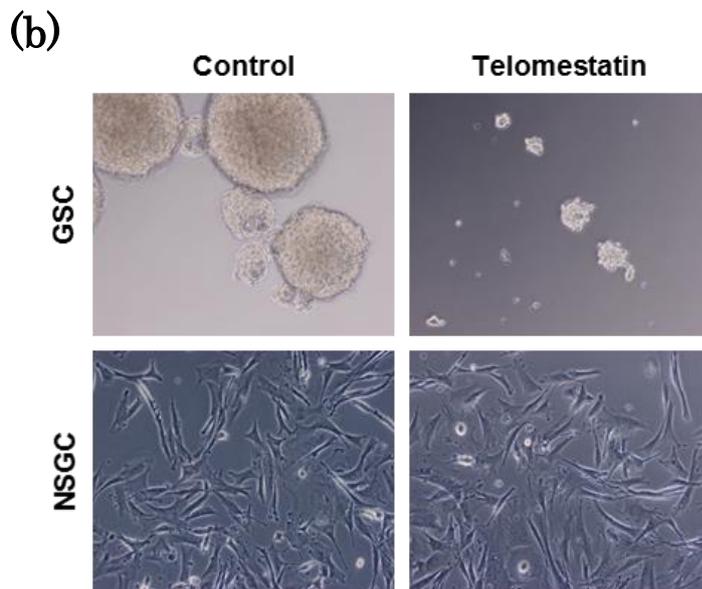
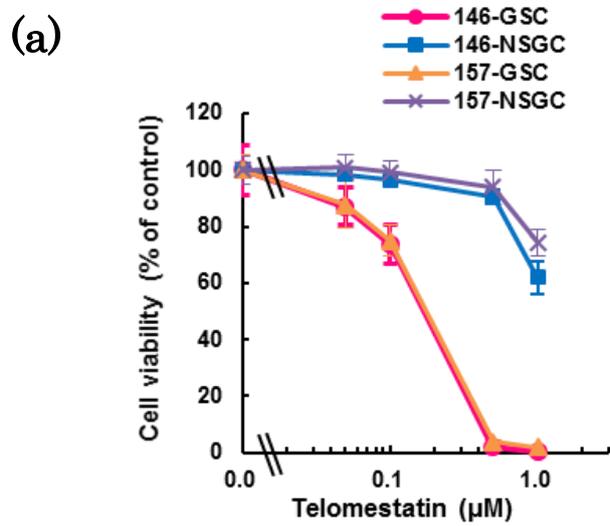


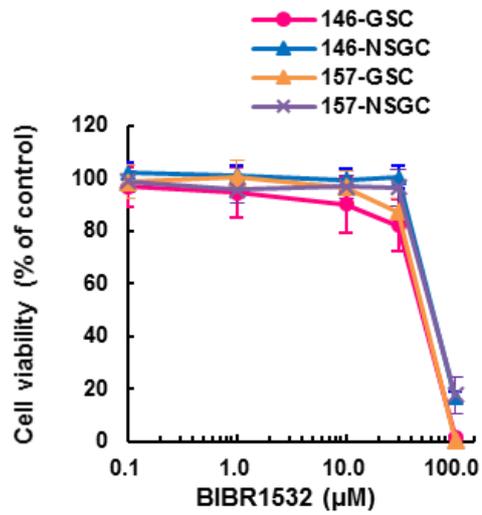
Figure 1-2. Western blot analysis of GBM146 cell lysates with indicated antibodies.



**Figure 1-3. Effect of Telomestatin on growth of GSCs and NSGCs.**

(a) GBM146 and GBM157 cells were treated with Telomestatin for 144 h. *Error bar*, standard deviation.

(b) Morphological changes in GBM146 cells following treatment with 1 µM Telomestatin for 72 h.



**Figure 1-4. Effect of telomerase inhibitor BIBR1532 on growth of GSCs and NSGCs.** GBM146 and GBM157 cells were treated with indicated concentrations of BIBR1532 for 144 h.

## 1-2 GSC に対する Telomestatin のテロメア障害作用

### 【目的】

テロメア DNA のグアニンリッチな 1 本鎖領域は G4 構造を形成するため、Telomestatin のターゲットとなり得る。そこで、Telomestatin がテロメア領域に DNA 損傷を誘導しているのかを明らかにする。

### 【材料・方法】

#### 細胞の播き込み

免疫蛍光染色に用いる細胞の播き込みは以下のように行った。TrypLE Express (Gibco) 処理して単離した細胞を 10% fetal bovine serum (Mediatech Inc) 含有培地 (第 1 章 1-1) に懸濁し、1 枚/well ずつ Poly-L-Lysine (PLL) コートカバーガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan) を入れた 12 well plate (Iwaki) に、 $10^5$  個/well の細胞を播き込んだ。37°C で 2 時間培養した後、浮遊細胞用培地 (第 1 章 1-1) で 2 回洗浄した。ついで 1 mL/well の浮遊細胞用培地で 37°C、24 時間培養した後、浮遊細胞用培地で希釈した薬剤を処理した。

#### 細胞の固定

薬剤処理した細胞を PBS で 1 回洗浄した後、2% paraformaldehyde/PBS を 10 分間処理し細胞を固定した。その後、PBS で 10 分間 (3 回) 洗浄し、0.5% NP-40/PBS

を 10 分間処理し膜透過処理をした。さらに PBS で 10 分間 (3 回) 洗浄し、0.02% アジ化ナトリウム/PBS を加え 4°C に保存した。

### 免疫蛍光染色

細胞を固定したカバーガラスをパラフィルムに移し、1% bovine serum albumin (BSA, Roche, Mannheim, Germany) /PBS で 30 分間ブロッキングを行った。その後、ウサギ抗 53BP1 抗体 (Cell Signaling Technology)、マウス抗 TRF2 抗体 (Novus, Littleton, CO, USA) のいずれかを 120 分間反応させ、これを 1% BSA/PBS で 5 分間 (4 回) 洗浄した。ついで Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) のいずれかを 60 分間反応させた後、1% BSA/PBS で 5 分間 (4 回) 洗浄した。その後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector, Burlingame, CA, USA) で核を対比染色し、シグナルを観察した。

### 免疫 FISH 法

先に述べたように細胞を固定したカバーガラスをパラフィルムに移し、PBS で 2 分間 (1 回) 洗浄した。そこに 70%エタノール (Nacalai) を 5 分間、95%エタノールを 5 分間、100%エタノールを 5 分間処理し、その後、アスピレーターで取り除きカバーガラスを 10 分間乾燥させた。ついで、70% formamide (Nacalai)、0.5% blocking reagent (Roche)、10 mM Tris-HCl pH 7.2、300 ng/mL Cy3 標識 peptide nucleic acid (PNA) プローブ(CCCTAA)<sub>3</sub> (テロメア DNA を検出するプローブ) を含む hybridizing solution で処理し、80°C で 5 分間加熱したのち、室温で 120 分間静置した。その後、washing solution (70% formamide、10 mM Tris-HCl pH 7.2) で 15 分間 (2 回)、1% BSA/PBS で 5 分間 (3 回) 洗浄した後、1% BSA/PBS で 30 分間ブロ

ッキングを行った。そこにウサギ抗 53BP1 抗体 (Cell Signaling Technology) を 120 分間反応させ、1% BSA/PBS で 5 分間 (4 回) 洗浄した。さらに、Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を 60 分間反応させ、1% BSA/PBS で 5 分間 (4 回) 洗浄した後 DAPI で核を対比染色した (10)。

## 【結果】

### Telomestatin による GSC 選択的な DNA 損傷

まず、DNA 損傷マーカーである 53BP1 の抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。53BP1 は DNA 損傷応答に関わるタンパク質である。DNA 二本鎖切断あるいは複製ストレスが生じると、その領域にチェックポイントプロテインキナーゼである ataxia telangiectasia mutated (ATM) あるいは ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) がリクルートされ、H2AX のセリン 139 がリン酸化 ( $\gamma$ H2AX) される。 $\gamma$ H2AX にアダプタータンパク質である MDC1、さらに E3 ユビキチンリガーゼである RNF8 がリクルートされることで、H2AX はユビキチン化される。ユビキチン化された H2AX に 53BP1 がリクルートされ、最終的に DNA 修復反応が生じる (Fig. 1-5)。免疫蛍光染色を行い、GSC あるいは NSGC に対する Telomestatin の 53BP1 foci 誘導作用を検討した結果、Telomestatin は GSC 選択的に 53BP1 foci を誘導することが確認できた (Fig. 1-6)。

### Telomestatin によるテロメア領域 DNA 損傷

続いては、Telomestatin が GSC においてテロメア領域に DNA 損傷を誘導しているのかを明らかにするために、免疫 FISH 法を用いてテロメアと DNA 損傷マーカー

53BP1 との共局在性を検討した (Fig. 1-7)。その結果、テロメア領域 DNA 損傷の割合は、非選択的なアルキル化剤である Temozolomide では 11.5%であったのに対し、Telomestatin では 31.4%であり、テロメアで生じる頻度が有意に高いことが確認された。しかし、Telomestatin によるテロメア DNA 損傷は、全損傷部位の 3 割程度であり、残りの約 7 割はテロメア以外で生じていることも明らかとなった。

### **Telomestatin による GSC 選択的な TRF2 foci の減少**

先に述べたように、テロメラーゼ阻害剤は GSC 選択性を示さないことから、Telomestatin はテロメラーゼ阻害活性とは異なるメカニズムで GSC におけるテロメア障害を誘導する可能性が考えられる。所属する研究室ではこれまでに、HeLa や SiHa といった子宮頸がん由来の細胞株あるいは MCF-7 といった乳がん由来細胞株では、Telomestatin がテロメア結合タンパク質である TRF2 をテロメアから遊離することで、細胞死が誘導されることを明らかにしてきた (43)。また、この時 TRF2 と同じテロメア結合タンパク質である TRF1 には影響を与えないことも確認されている (43)。そこで、続いては Telomestatin の TRF2 への影響を検討した結果、Telomestatin は GSC 選択的に TRF2 foci を減少させることが明らかとなった (Fig. 1-8)。この現象は 5  $\mu\text{mol/L}$  の Telomestatin を 24 時間処理した場合で顕著に認められたが、4 時間処理した場合でも弱いながら観察された。

### **Temozolomide による NSGC に対する DNA 損傷**

DNA 損傷マーカーである 53BP1 を用いた免疫蛍光染色を行い、GSC あるいは NSGC に対する Temozolomide の DNA 損傷誘発作用を検討した (Fig. 1-9)。その結果、Temozolomide は GSC と NSGC 共に 53BP1 foci を誘導することが明らかとな

った。

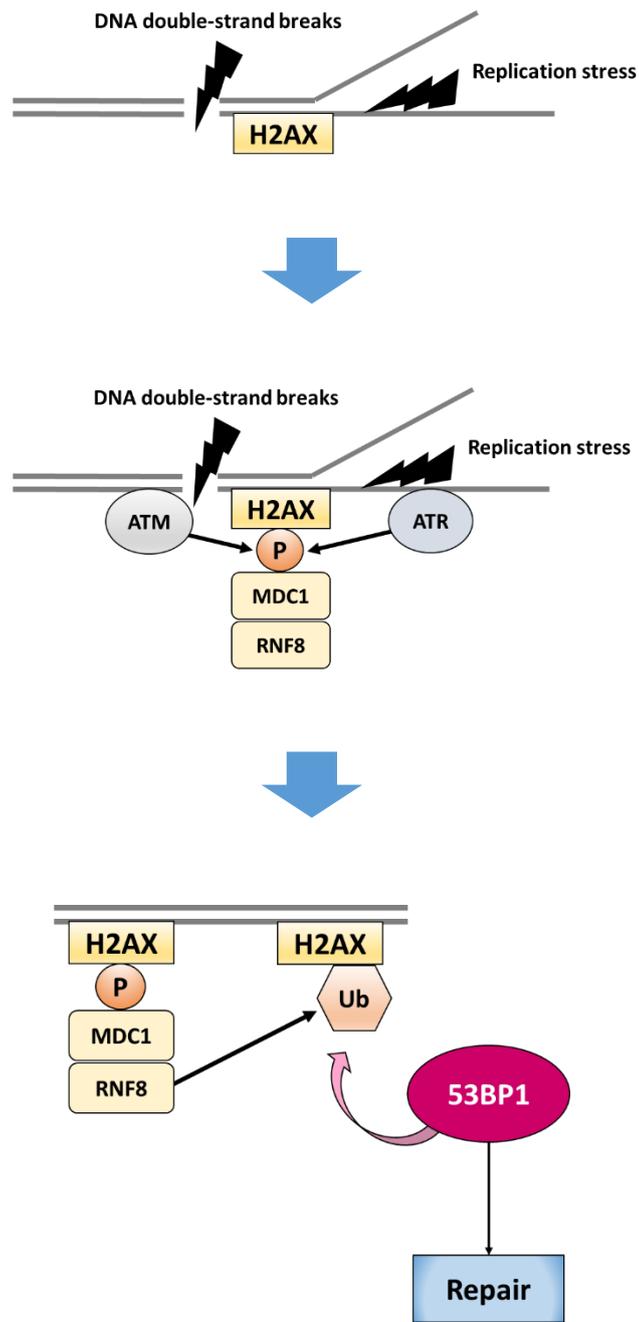
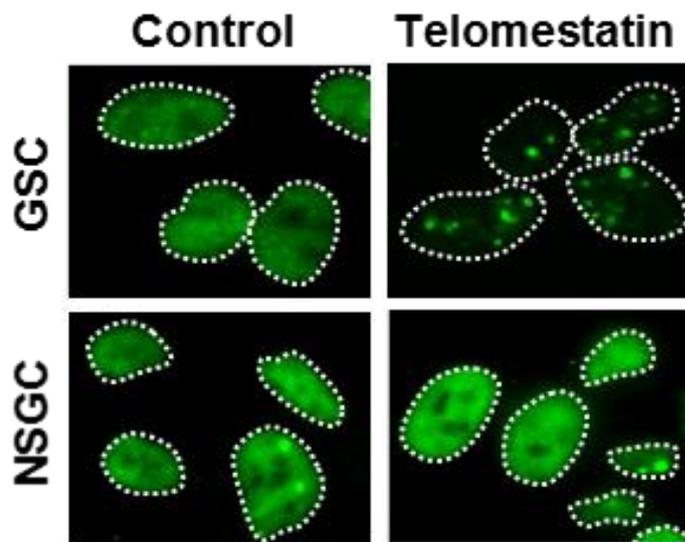
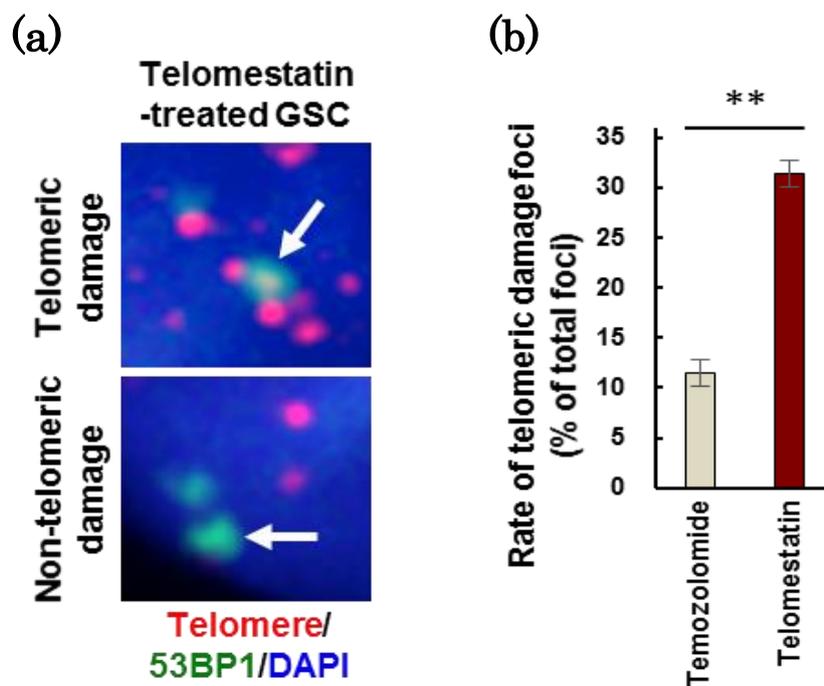


Figure 1-5. DNA damage response by double-strand breaks or replication stress.

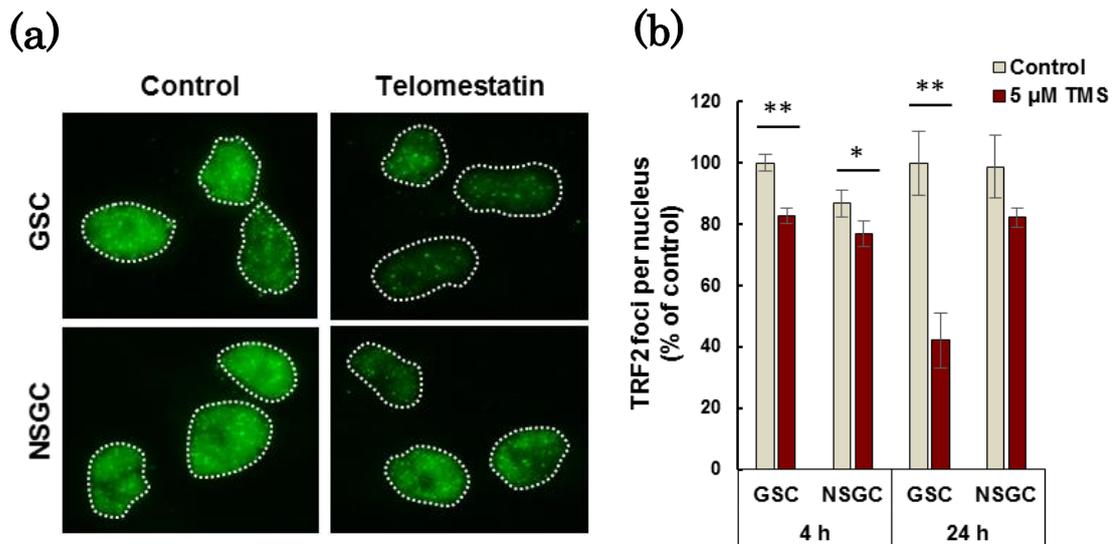


**Figure 1-6.** DNA damage foci induced by Telomestatin in GSCs. GBM146 cells were treated with 5  $\mu$ M Telomestatin in serum-free medium for 24 h and subjected to immunofluorescence staining with anti-53BP1 antibody.



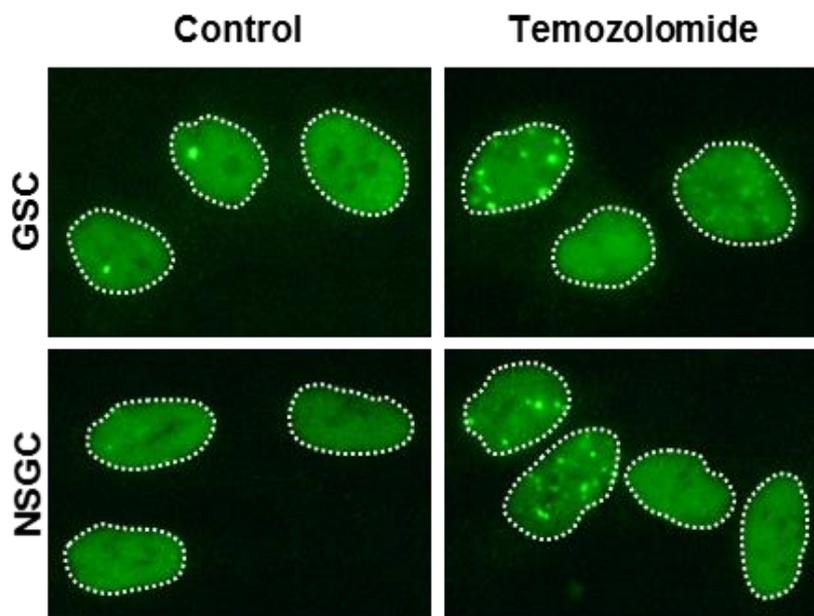
**Figure 1-7. iFISH assay.** (a) GSCs were treated with 1  $\mu\text{M}$  Telomestatin in serum-free medium for 96 h. Representative images of telomeric and non-telomeric DNA damage foci are shown (*arrows* in upper and lower panels, respectively). *Red*, telomere; *green*, 53BP1; *blue*, DAPI staining for nuclear DNA.

(b) The rate of telomeric 53BP1 damage foci in Telomestatin- or Temozolomide-treated GSCs. GSCs were treated with 1  $\mu\text{M}$  Telomestatin or 10  $\mu\text{M}$  Temozolomide in serum-free medium for 96 h (these drug concentrations inhibited the cell growth to equivalent extents). The rate of telomeric 53BP1 foci among all 53BP1 foci was calculated. Statistical evaluations were performed using the Welch *t*-test. \*\*,  $P < 0.01$ .



**Figure 1-8. TRF2 immunofluorescence staining.** (a) GBM146 cells were treated with 5  $\mu$ M Telomestatin in serum-free medium for 24 h. Representative photos are shown.

(b) GBM146 cells were treated with 5  $\mu$ M Telomestatin in serum-free medium for 4 or 24 h. The numbers of TRF2 foci per nucleus were counted and normalized against those in GSC/control cells. Statistical evaluations were performed using the Welch *t*-test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .



**Figure 1-9. Temozolomide-induced DNA damage response in both GSCs and NSGCs.** GBM146 cells were treated with 10  $\mu$ M Temozolomide for 96 h.

### 1-3 複製・転写に依存した Telomestatin 誘導性の DNA 損傷

#### 【目的】

G4 の形成には DNA 二重らせんの解消が必要であり、テロメア DNA の一本鎖領域だけでなく複製や転写の際にも G4 が形成されると予想される。そこで、Telomestatin の DNA 損傷誘発作用が複製や転写に依存しているのかを検討する。

#### 【材料・方法】

##### 細胞の固定と免疫蛍光染色

S 期の細胞を染色するために、Click-iT EdU Imaging Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いた 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 染色を行った。細胞を固定する前に、10  $\mu\text{mol/L}$  の EdU 濃度になるように、10  $\text{mmol/L}$  の EdU stock solution (Thermo Fisher Scientific) を培地に加え 37°C で 10 分間培養し、EdU を S 期の細胞に取り込ませラベルした。その後の細胞の固定は、第 1 章 1-2 で述べたように行った。固定した細胞を、3% BSA/PBS で 2 分間 (3 回) 洗浄し、Click-iT EdU reaction cocktail (Thermo Fisher Scientific) を 30 分間反応させた。その後、Rinse Buffer (Thermo Fisher Scientific) で 10 分間洗浄し、さらに 3% BSA/PBS で 15 分間洗浄した。その後の免疫蛍光染色は第 1 章 1-2 に準じて行った。細胞周期の分類には、IN Cell Analyzer 6000/Workstation (GE Healthcare) を使用し、EdU の強度、あるいは DAPI の強度と面積を測定することで細胞周期を G1 期、S 期、G2/M 期に区分した。EdU で染色された細胞を S 期とし、EdU で染色されなかった細胞は、DAPI の

強度と面積が低い細胞を G1 期、高い細胞を G2/M 期と分類し、それぞれの細胞周期の DNA 損傷を定量化した。

## 【結果】

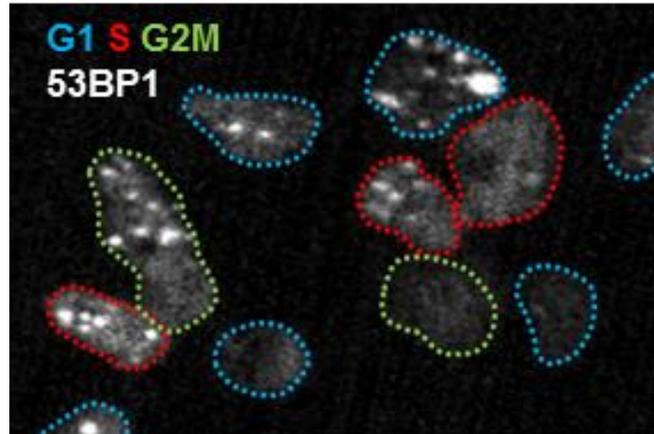
### Telomestatin 誘導性 DNA 損傷の細胞周期特異性の検討

まず、GSC に Telomestatin を処理した際に誘導される DNA 損傷が細胞周期に依存しているのかを検討するため免疫蛍光染色を行った (Fig. 1-10)。その結果、Telomestatin は G1 期、S 期、G2/M 期の細胞それぞれに 53BP1 foci を形成することが明らかとなり、細胞周期特異性は認められなかった。

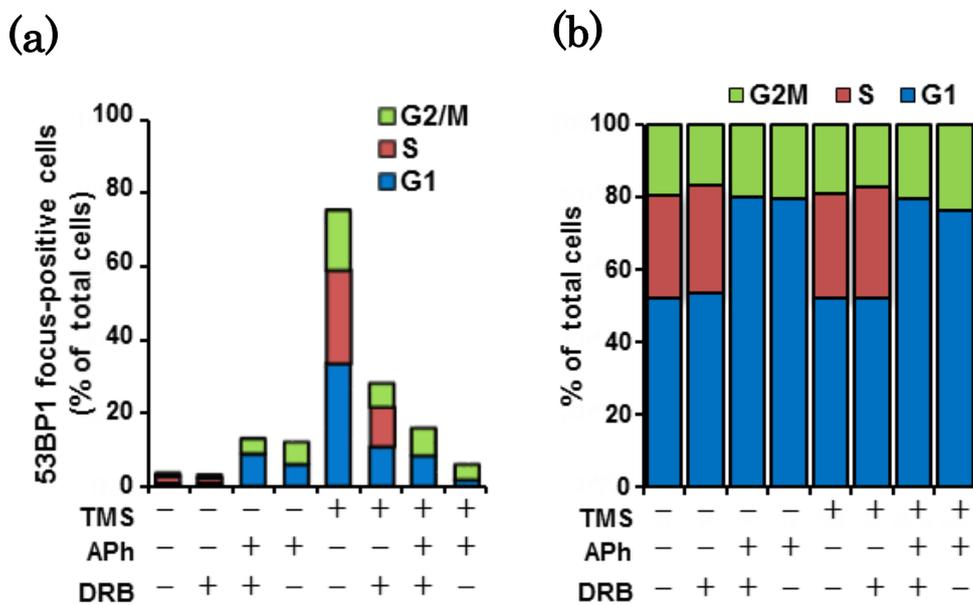
### 複製・転写阻害による Telomestatin 誘導性 DNA 損傷の減弱

続いては、Telomestatin の DNA 損傷誘発作用が複製や転写に依存しているのかを明らかにするため、複製阻害剤(アフィディコリン)あるいは転写阻害剤(5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole, DRB) を処理した GSC の免疫蛍光染色を行った (Fig. 1-11)。その結果、DRB あるいはアフィディコリンの前処理により Telomestatin 誘導性の DNA 損傷が顕著に低下することが確認された。この時、DRB は細胞周期の分布に影響を与えなかったが、アフィディコリンは EdU-positive である S 期の細胞を完全に消失させた。

## Telomestatin-treated GSC



**Figure 1-10. Cell cycle analysis of DNA damage foci in Telomestatin-treated GSCs.** Cells were treated with 5  $\mu$ M Telomestatin for 4 h and subjected to anti-53BP1 immunofluorescence staining. Cells in S phase were detected by EdU labeling. Colored dotted lines indicate the nuclei boundaries and the cell-cycle phase. A representative image depicting Telomestatin-induced DNA damage in G1-, S-, and G2/M-phase cells is shown. *Blue*, G1; *red*, S; *green*, G2/M.



**Figure 1-11. Effects of replication/transcription inhibition on Telomestatin-induced DNA damage foci in GSCs.** (a) Cells were pretreated with 0.5  $\mu$ M Aphidicolin (APh, an inhibitor of DNA replication) for 2 h and/or 50  $\mu$ M 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB, an inhibitor of transcription) for 1 h before treatment with 5  $\mu$ M Telomestatin for 4 h. Cells were classified as focus-positive or -negative according to the numbers of punctate nuclear 53BP1 foci ( $n > 2$ ). (b) Cell cycle distribution as in a.

## 【考察】

テロメア DNA のグアニンリッチな 1 本鎖領域は G4 構造を形成することが知られている (13,14)。G4 リガンド Telomestatin は、この領域の G4 を安定化することでテロメラーゼの反応を阻害する (9,21,22)。この活性が Telomestatin の GSC 選択性に影響を与えている可能性を考えたが、G4 安定化作用を持たないテロメラーゼ阻害剤 (BIBR1532) は GSC 選択性を示さなかった (Fig. 1-4)。すなわち、テロメア短縮によるキャップ構造の崩壊は Telomestatin の GSC 選択性を決定づける要因ではないと考えられる。しかしながら、Telomestatin は GSC 選択的にテロメア結合タンパク質である TRF2 の foci を減少させることが明らかとなった (Fig. 1-8)。GSC に対する Telomestatin の TRF2 foci 減少作用は、Telomestatin を 24 時間処理した際に顕著に認められたが、4 時間処理した場合でも弱いながら観察された。テロメアを DNA 損傷から保護している TRF2 がテロメアから遊離することによって引き起こされるテロメアの障害は、テロメラーゼ阻害により生じるキャップ構造の崩壊と比較して、すみやかに引き起こされることが予想される。ある種のがん細胞では、Telomestatin が TRF2 をすみやかにテロメアから遊離することで、細胞死が誘導されることが知られている (43)。Telomestatin がなぜ GSC 選択的にテロメアから TRF2 を遊離するのかという詳細な機序は未だ不明ではあるが、Telomestatin のこのような作用により、GSC においてすみやかなテロメア領域 DNA 損傷が誘導されることが予想される。Telomestatin が GSC 選択的に DNA 損傷を誘導する一方で、アルキル化剤である Temozolomide は GSC だけではなく NSGC に対しても DNA 損傷を誘導した (Fig. 1-9)。すなわち、NSGC では DNA 損傷応答の機能障害が生じているために Telomestatin 誘導性の DNA 損傷に対して耐性を示すという可能性は低いと考えられる。

免疫 FISH 法を用いた検討から、Telomestatin によるテロメア領域 DNA 損傷は、全損傷部位の約 3 割であり、残りの約 7 割はテロメア以外で生じていることが明らかとなった (Fig. 1-7)。G4 の形成には DNA 二重らせんの解消が必要であり、テロメア DNA の一本鎖領域だけでなく複製や転写の際にも G4 が形成されると予想される (23,38,39)。事実、複製阻害剤 (アフィディコリン) および転写阻害剤 (DRB) を GSC に前処理すると、Telomestatin 誘導性の DNA 損傷が顕著に低下した (Fig. 1-11)。DRB を前処理した場合には Telomestatin 誘導性の DNA 損傷が一部抑制されたのに対して、アフィディコリンを前処理すると Telomestatin 誘導性の DNA 損傷がほぼ完全に抑制された。この時、S 期だけではなく、G1 期や G2/M 期の DNA 損傷も抑制されたことから、アフィディコリンは複製を阻害するだけではなく S 期以外の細胞にも何らかの影響を与えていることが予想される。これらの結果から、Telomestatin は GSC において、複製および転写に依存して DNA 損傷を誘導する可能性が示唆された。EdU 陽性細胞の割合は、GSC では 14.0%であったのに対して、NSGC では 6.3%であった。すなわち、NSGC では EdU 陽性細胞が少ないことが、Telomestatin による DNA 損傷が引き起こされにくい理由のひとつであると考えられる。

Telomestatin による細胞増殖抑制試験では、Telomestatin を 144 時間と長時間処理したのに対して、免疫蛍光染色で DNA 損傷や TRF2 foci を観察する場合は、高濃度の Telomestatin を 24 時間程度の短時間処理して検討した。このような条件で免疫蛍光染色を行った理由は、GSC の分化による影響を最小限に抑えるためである。免疫蛍光染色では、浮遊細胞である GSC に一時的に血清刺激を与えて細胞をカバースリップに接着させ、その後薬剤処理を行う。そのため、薬剤を細胞増殖抑制試験と同じように長期間処理すると GSC の分化が懸念される。そこで、高濃度短時間という薬剤処理条件で免疫蛍光染色を行った。このような条件でも Telomestatin による GSC 選択的な DNA 損傷は観察され、誘導された DNA 損傷はテロメアだけではなく複製

および転写にも依存していることが明らかとなった。本章では GSC における Telomestatin の DNA 損傷メカニズムを検討してきたが、それでは何故 Telomestatin が GSC 選択的に DNA 損傷を誘導するのかという問題を解明すべく、次なる検討を行った。

## 第 2 章

### Telomestatin の複製ストレス応答経路への影響

#### 【要約】

前章では GSC における Telomestatin の DNA 損傷メカニズムを検討してきたが、何故この化合物が GSC 選択的に DNA 損傷を誘導するのかという問題を解明すべく次なる検討を行った。そもそも Telomestatin の標的である G4 の数が GSC と NSGC で異なるのではないのかと考え、まずは G4 の可視化を試みた。近年、G4 構造特異的抗体である BG4 抗体が開発されたことで、細胞内 G4 の可視化が可能となった(44)。そこで、BG4 抗体のプラスミド (英国・Shankar Balasubramanian 博士より供与) から大腸菌を用いて抗体を調製し、免疫蛍光染色を行った結果、Telomestatin のターゲットである G4 は GSC と NSGC で同程度に存在することが明らかとなった。Replication protein A (RPA) は一本鎖 DNA 結合タンパク質である。複製ストレスが生じ RPA にコートされた一本鎖 DNA が蓄積すると、チェックポイントプロテインキナーゼである ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) が活性化され、RPA2 のリン酸化が引き起こされる (45)。そこで、Telomestatin が複製ストレスを誘導しているのかを明らかにするために RPA2 のリン酸化状態を検討した結果、Telomestatin 処理した GSC と NSGC 共に RPA2 のリン酸化が認められた。しかしながら、この時の Telomestatin 誘導性 DNA 損傷は GSC でのみ生じたため、複製ストレス応答経路に Telomestatin の GSC 選択性を説明しうる分子作用点があると考えた。複製ストレスが生じると、ATR の活性化に伴い、細胞周期の進行を抑制する Chk1 のリン酸化 (活性化) が生じる (46)。Telomestatin を処理した際の Chk1

のリン酸化状態を検討した結果、GSCではNSGCと比較して強力なChk1のリン酸化が誘導されることが見出された。DNA損傷応答の上流に位置するH2AXのセリン139のリン酸化 ( $\gamma$ H2AX) もChk1と同様にATRキナーゼに依存しており、ATRキナーゼによってリン酸化されることでDNA損傷応答が引き起こされる(47)。以上の結果から、TelomestatinがGSC選択的にATR-Chk1経路を活性化することで、GSC選択的な細胞増殖抑制効果およびDNA損傷応答が引き起こされることが示唆された。

## 2-1 BG4 抗体の調製と G4 特異性の確認

### 【目的】

抗 G4 抗体 (BG4 抗体) のプラスミド (英国・Shankar Balasubramanian 博士より供与) から調製した抗体の G4 特異性を検討する。

### 【材料・方法】

#### G4 構造の形成

ELISA に用いる G4 構造を形成するために、3 種類のビオチン化 DNA を使用した。KIT2 (G4 motif) 5'-CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGG-3'; hTELO (G4 motif) 5'-GG(TTAGGG)<sub>4</sub>TTAG-3'; control DNA (Non-G4) 5'-GGCATAGTGCGTGGGCG-3'。これらのビオチン化 DNA を 100 mM KCl あるいは 100 mM NaCl に希釈し、95°C で 10 分間加熱した後、-1°C/30 秒のペースで徐々に冷やし、G4 の立体構造を形成させた (48)。G4 構造の形成を確認するために、circular dichroism (CD) スペクトル法を行った。CD スペクトルの測定には J-820 分光光度計 (Jasco, Tokyo, Japan) を用い (2 nm bandwidth、100 nm/min scan speed、0.1 nm step resolution)、窒素環境下 200~320 nm の範囲で G4 構造特異的な CD スペクトルを測定した (48)。

#### ELISA

先に述べたようにアニーリングして G4 を形成させたビオチン化 DNA を、

binding/wash buffer (0.05% Tween20 /0.1% BSA/TBS) で3回洗浄した 96 well アビジンプレート (Sumitomo Bakelite) に添加し、1時間反応させた。binding/wash buffer で5回洗浄した後、調製した BG4 抗体を1時間反応させ、binding/wash buffer で5回洗浄した。さらに、anti-FLAG-HRP (Abcam, Cambridge, UK) を1時間反応させ、binding/wash buffer で5回洗浄した後、peroxidase (POD) substrate solution (Roche) を10分間処理した後、stop solution (1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) で反応を停止させ、プレートリーダーで測定した。

### 細胞の固定

免疫蛍光染色に用いる細胞の播き込みは、第1章 1-2 の方法に準じて行った。細胞の固定は以下のように行った。化合物を処理した細胞を PBS で1回洗浄した後、-20°Cに冷却した 100%メタノール (Nacalai) を処理し、-20°Cで10分間静置した。次いで、アスピレーターでメタノールを取り除き、室温で5分間乾燥させた。その後、PBS で10分間 (3回) 洗浄し、0.02% アジ化ナトリウム/PBS を加え 4°Cに保存した。

### 免疫蛍光染色

細胞を固定したカバーガラスをパラフィルムに移し、PBS で1回洗浄した後、120 ユニット/カバーガラスの Turbo DNase I (Thermo Fisher Scientific)、1% BSA/PBS のいずれかを 37°Cで60分間処理した。ついで 1% BSA/PBS で30分間ブロッキングを行い、調製した BG4 抗体を120分間反応させ、これを 1% BSA/PBS で5分間 (4回) 洗浄した。ついでウサギ抗 FLAG 抗体 (Cell Signaling Technology) あるいはマウス抗 TRF2 抗体 (Novus) を60分間反応させ、これを 1% BSA/PBS で5分間 (4

回) 洗浄した。さらに、Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) のいずれかを 30 分間反応させた後、1% BSA/PBS で 5 分間 (4 回) 洗浄した。その後、DAPI で核を対比染色し、シグナルを観察した。

## 【結果】

### CD スペクトル法による G4 形成の確認

ELISA を行うにあたって、まずは、G4 形成配列をもつ DNA が G4 の立体構造を形成できているのかを CD スペクトル法で確認した。G4 構造は、G4 形成配列をもつ DNA を一価カチオン存在下、アニーリングすることで形成できることが知られている。また、G4 構造は G4 を形成する 4 本の DNA スtrand の方向から、全てが同じ方向を向いた Parallel propeller G4、2 本が逆平行である Anti-parallel propeller G4、1 本が逆平行である Mixed parallel and anti-parallel propeller G4 の 3 種類に分類され、これらの構造は CD スペクトル法により確認することができる。CD スペクトル法の結果から、KIT2 を KCl に希釈しアニーリングすることで Parallel propeller G4 を形成し、また hTELO + NaCl では Anti-parallel propeller G4、hTELO + KCl では Mixed parallel and anti-parallel propeller G4 を形成することが確認できた (Fig. 2-1)。G4 形成配列を持たないオリゴ (Non-G4) の場合は一価カチオン存在下でアニーリングをしても、G4 特異的なスペクトルは観察されなかった。

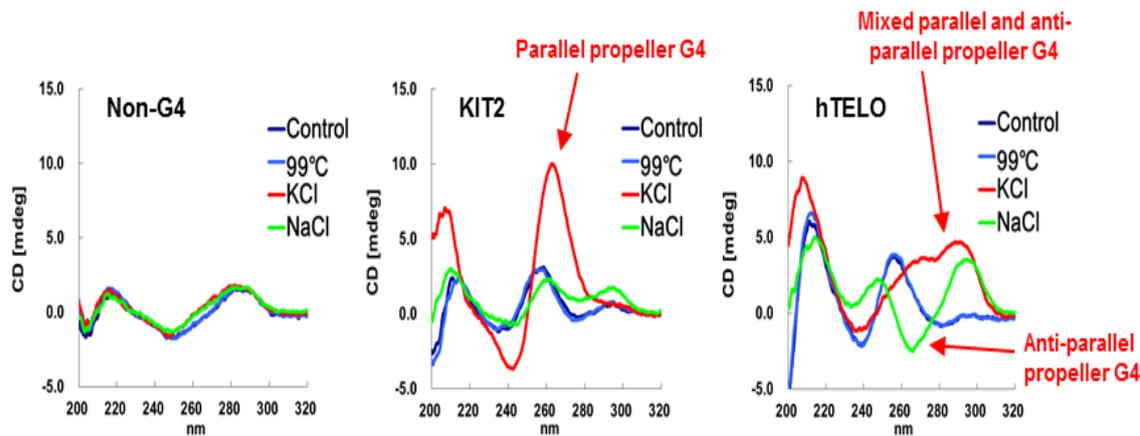
### ELISA 法による BG4 抗体の G4 特異性の検証

先に述べた、3 種類の異なる配向性をもった G4 DNA と G4 を形成しないコントロ

ール DNA (Non-G4) を用いて ELISA を行い、調製した BG4 抗体の G4 特異性を検討した (Fig. 2-2)。その結果、BG4 抗体はコントロール DNA と比較して、配向性の異なる 3 種類の G4 DNA に対して同等に高い親和性を示した。

### **BG4 抗体を用いた細胞内 G4 の可視化**

ELISA 法により BG4 抗体が試験管レベルで G4 選択性を示すことが確認できたため、続いては免疫蛍光染色を行い細胞内での G4 の可視化を試みた (Fig. 2-3)。まず、固定した GSC に BG4 抗体、ウサギ抗 FLAG 抗体、Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体と反応させることで、核内に多数の foci が確認できた。さらに、DNase I を前処理した後に免疫蛍光染色を行うことで、核内の foci が消失することが確認できた。続いては、BG4 foci とテロメアの共局在性を検討した。免疫 FISH 法 (第 1 章 1-2) によるテロメアと BG4 の二重染色を試みたが、変性操作で G4 の立体構造が崩れるのが原因なのか、この方法では BG4 foci の検出ができなかった。そこで、TRF2 抗体と BG4 抗体の二重染色を行った (Fig. 2-4)。BG4 抗体で免疫蛍光染色を行う場合は細胞をメタノール固定する必要があるため、この条件では TRF2 のシグナルは減弱したものの、全ての BG4 foci のうち約 2 割が TRF2 と一致することが確認できた。



**Figure 2-1. G4 formed in guanine-rich oligos.**

Circular dichroism spectra of control (Non-G4), KIT2, and telomeric (hTELO) oligos. *Control*, oligos were not dissolved in KCl or NaCl and not annealed. *99°C*, oligos were heat-denatured at 99°C without KCl or NaCl and rapidly cooled down. *KCl* and *NaCl*, oligos were annealed in KCl and NaCl, respectively, by heating to 95°C for 10 min, then cooled slowly to room temperature.

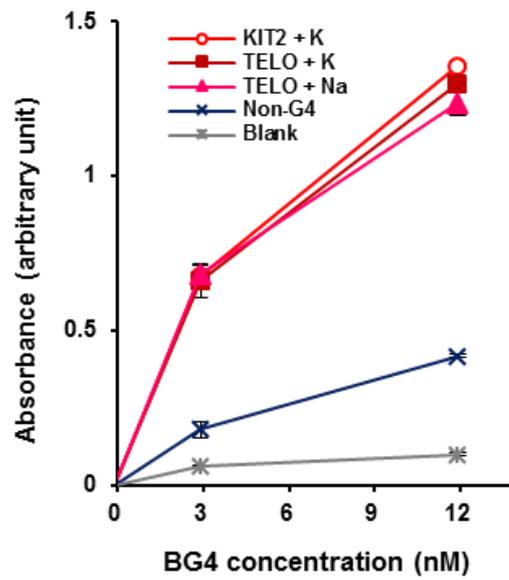


Figure 2-2. ELISA verification of the affinity of the anti-G4 antibody BG4 for G4-forming oligos in Fig. 2-1.

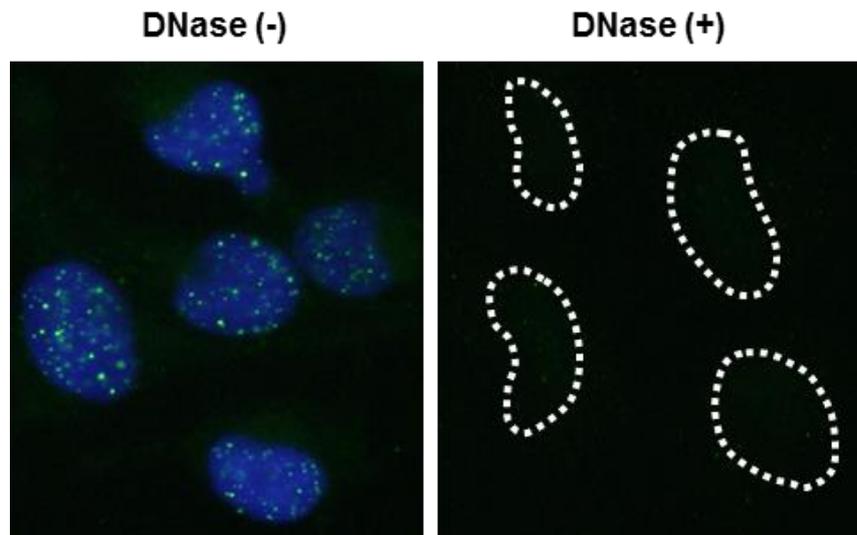
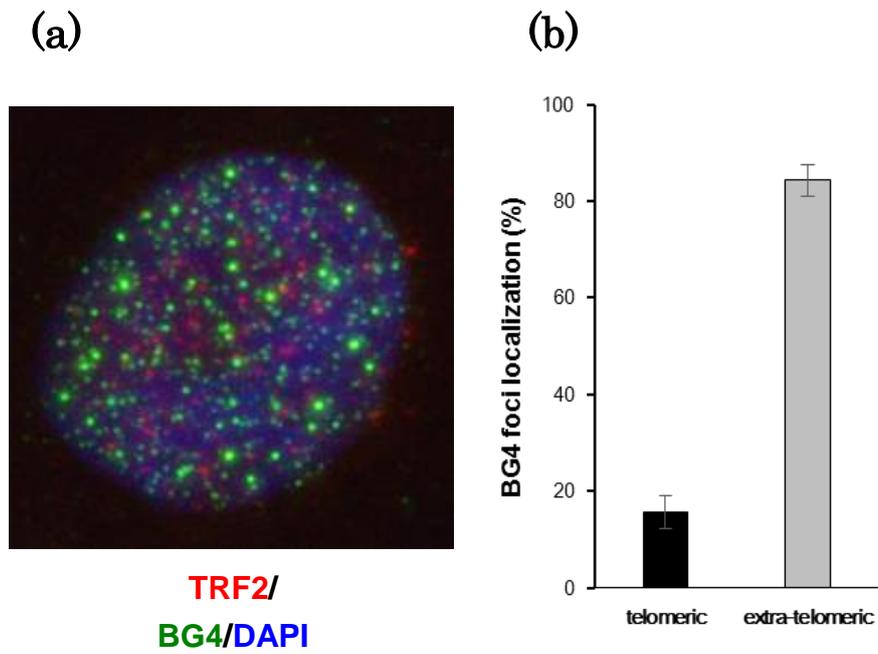


Figure 2-3. Immunofluorescence staining of GSCs with BG4. *Blue*, DAPI staining of nuclear DNA. *Dotted lines* indicate nuclear boundaries. *Right panel* indicates disappearance of nuclear BG4 foci after DNase I treatment.



**Figure 2-4. Immunofluorescence staining of GSCs with BG4 and TRF2 antibody.** (a) Representative photos are shown. *Red*, TRF2; *green*, BG4; *blue*, DAPI staining for nuclear DNA. (b) The rate of telomeric BG4 foci among all BG4 foci was calculated.

## 2-2 GSC と NSGC における G4 構造の比較

### 【目的】

調製した抗 G4 抗体 (BG4 抗体) を用いて、Telomestatin のターゲットである G4 の数が GSC と NSGC との間で異なるのかを検討する。

### 【材料・方法】

#### 免疫蛍光染色

細胞の播き込みと固定は、第 2 章 2-1 で述べた通りに行った。免疫蛍光染色は第 2 章 2-1 のブロッキング操作以降の方法に準じて行った。BG4 foci のカウント、蛍光強度、蛍光面積の測定には IN Cell Analyzer 6000/Workstation (GE Healthcare) を使用した。

#### ELISA

ELISA は第 2 章 2-1 の方法に準じて行った。但し、アビジンプレートにビオチン化 DNA を結合させた後、0.1  $\mu\text{M}$  Telomestatin を 4°C で一晩処理し、次いで BG4 抗体を反応させた。

## 【結果】

### BG4 抗体を用いた GSC と NSGC の免疫蛍光染色

調製した BG4 抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、GSC と NSGC における G4 構造の数に違いがあるのか検討した (Fig. 2-5)。その結果、G4 の数は GSC と NSGC で同程度に存在することが明らかとなった。また、GBM146 の GSC と NSGC における 1 つの細胞当たりの BG4 foci の蛍光強度 (Mean intensity of BG4 foci) および蛍光面積 (Mean area of BG4 foci) についても検討したが、同程度であることが確認された (Fig. 2-6)。

### Telomestatin を処理した GSC を用いた BG4 抗体の免疫蛍光染色

G4 を Telomestatin が安定化することで、BG4 foci が増加することが予想される。そこで、Telomestatin を処理した GSC を BG4 抗体で免疫蛍光染色したが、Telomestatin による BG4 foci の変化は観察されなかった (Fig. 2-7)。Telomestatin が G4 を安定化することで BG4 抗体の G4 への親和性を低下させる可能性を考え、続いては ELISA でその点を検討した (Fig. 2-8)。その結果、コントロール DNA (Non-G4) と比較して、TELO + K、TELO + Na といった G4 DNA (Fig. 2-1) の場合には、Telomestatin を処理すると BG4 抗体の DNA への親和性が低下することが明らかとなった。

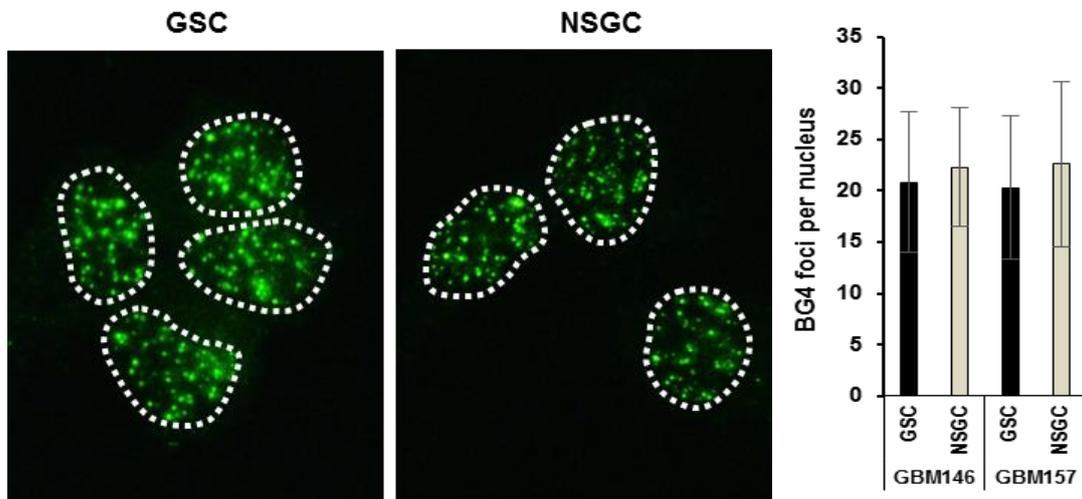


Figure 2-5. BG4 foci in GSCs and NSGCs. Representative photos (*left*) and quantification of BG4 foci numbers per nucleus (*right*) are shown.

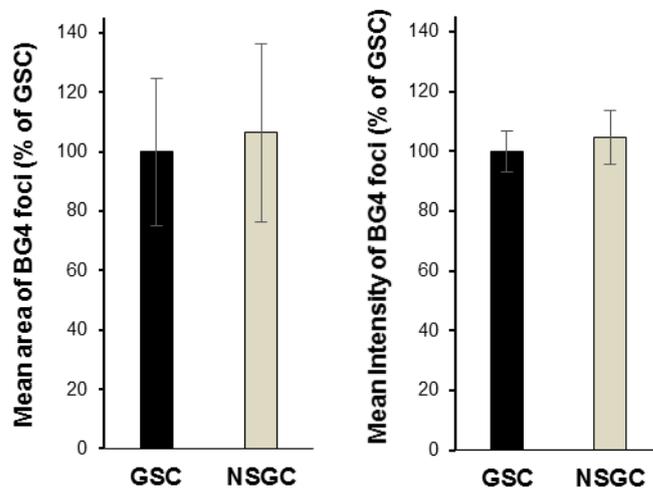
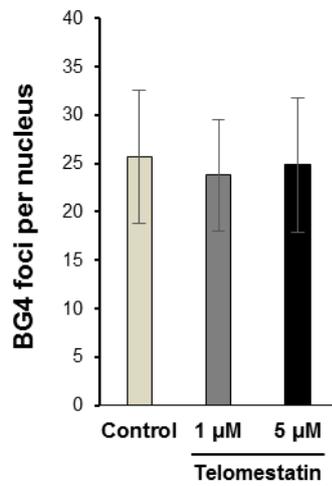


Figure 2-6. Mean intensity and mean area of BG4 foci in GSCs and NSGCs.



**Figure 2-7. Immunofluorescence staining of Telomestatin-treated GSCs with BG4.** Cells were treated with 1 or 5  $\mu\text{M}$  Telomestatin in serum-free medium for 24 h.

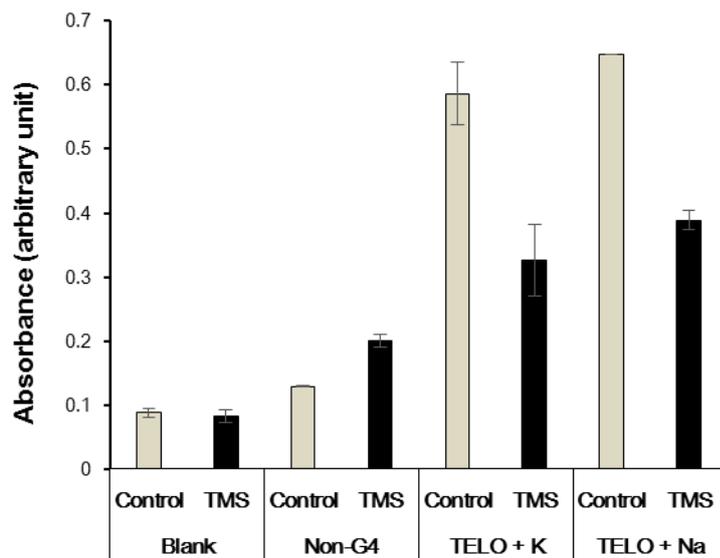


Figure 2-8. ELISA verification of the affinity of the BG4 antibody for 0.1  $\mu$ M Telomestatin treated G4-forming oligos.

## 2-3 Telomestatin による複製ストレスの誘導

### 【目的】

Replication protein A (RPA) は一本鎖 DNA 結合タンパク質で、複製ストレスが生じると RPA2 のリン酸化が引き起こされる。RPA2 のリン酸化抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、Telomestatin が GSC や NSGC において複製ストレスを引き起こすか検討する。

### 【材料・方法】

#### 免疫蛍光染色

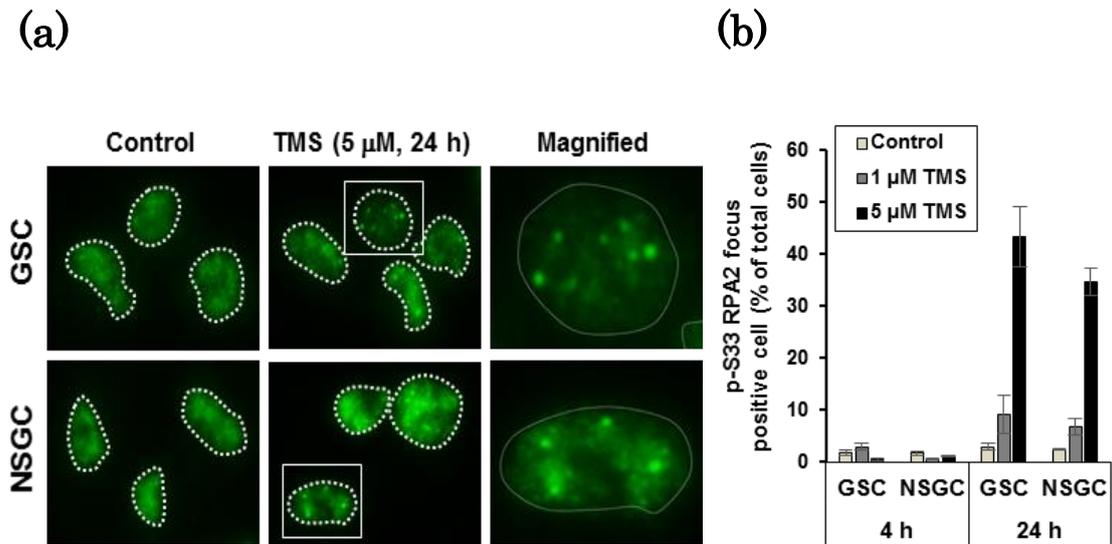
細胞の播き込みおよび固定は、第 1 章 1-2 で述べた通り行った。但し、一次抗体にはウサギ抗 Ser33-リン酸化-RPA2 抗体 (Novus)あるいはウサギ抗 53BP1 抗体 (Cell Signaling Technology) を使用し、二次抗体には Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、蛍光シグナルを観察した。

### 【結果】

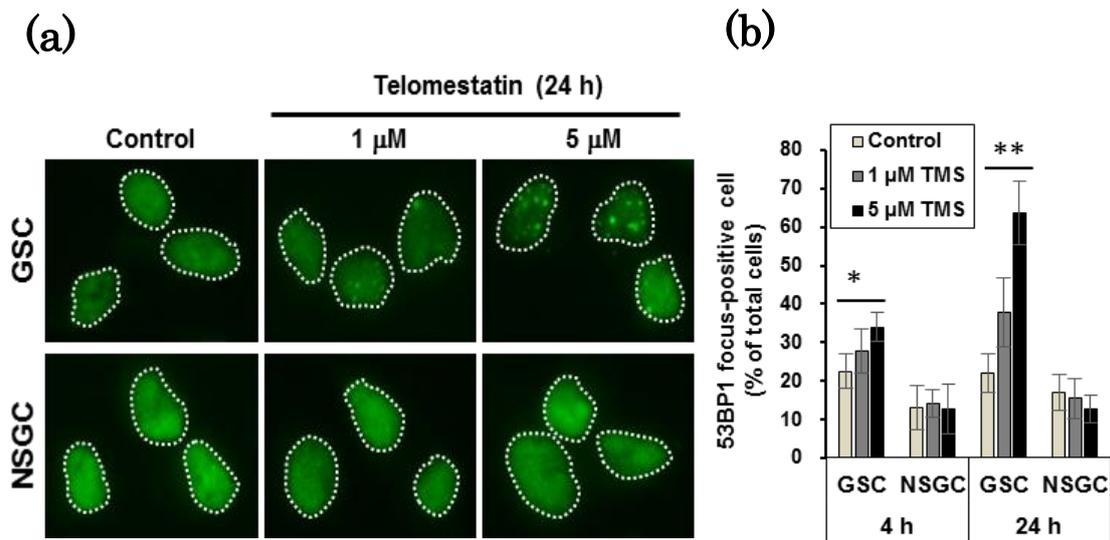
まずは、RPA2 のリン酸化抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、Telomestatin が GSC や NSGC において複製ストレスを引き起こすか検討した (Fig. 2-9)。その結果、GSC と NSGC 共に Telomestatin により RPA2 のリン酸化が引き起こされることを見出

した。Telomestatin を 24 時間処理した場合では RPA2 のリン酸化が濃度依存的に認められたが、4 時間処理した場合には観察されなかった。

続いて、同じ薬剤処理条件での DNA 損傷の誘導を 53BP1 抗体の免疫蛍光染色で検討した結果、Telomestatin 誘導性の DNA 損傷は GSC のみで認められた (Fig. 2-10)。Telomestatin を 24 時間処理した場合には GSC 選択的な DNA 損傷が顕著に観察されたが、4 時間処理した場合でも弱いながら DNA 損傷が誘導された。



**Figure 2-9. Immunofluorescence staining of Telomestatin-treated GSCs and NSGCs with anti-p-RPA2-Ser33 antibody.** GBM146 cells were treated with 1 or 5 μM Telomestatin in serum-free medium for 4 or 24 h. (a) Representative photos are shown. (b) Cells were classified as focus-positive or -negative according to numbers of punctate nuclear foci of p-RPA2-Ser33 staining ( $n > 3$ ). *Error bar*, standard deviation.



**Figure 2-10. Immunofluorescence of Telomestatin-induced 53BP1 foci in GSCs and NSGCs.** GBM146 cells were treated as in Fig. 2-9. (a) Representative photos are shown. (b) Cells were classified according to the numbers of punctate nuclear 53BP1 foci ( $n > 4$ ). Statistical evaluations were performed using the Welch *t*-test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

## 2-4 Telomestatin による GSC 選択的な Chk1 のリン酸化

### 【目的】

複製ストレスが生じると、ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) の活性化に伴い、細胞周期の進行を抑制する Chk1 のリン酸化（活性化）が生じる。また、Chk1 と同様に細胞周期を制御する Chk2 は、DNA 損傷により活性化される ataxia telangiectasia mutated (ATM) によってリン酸化（活性化）される。続いては、Western blot analysis を行い Telomestatin の Chk1、Chk2 への影響を検討する。

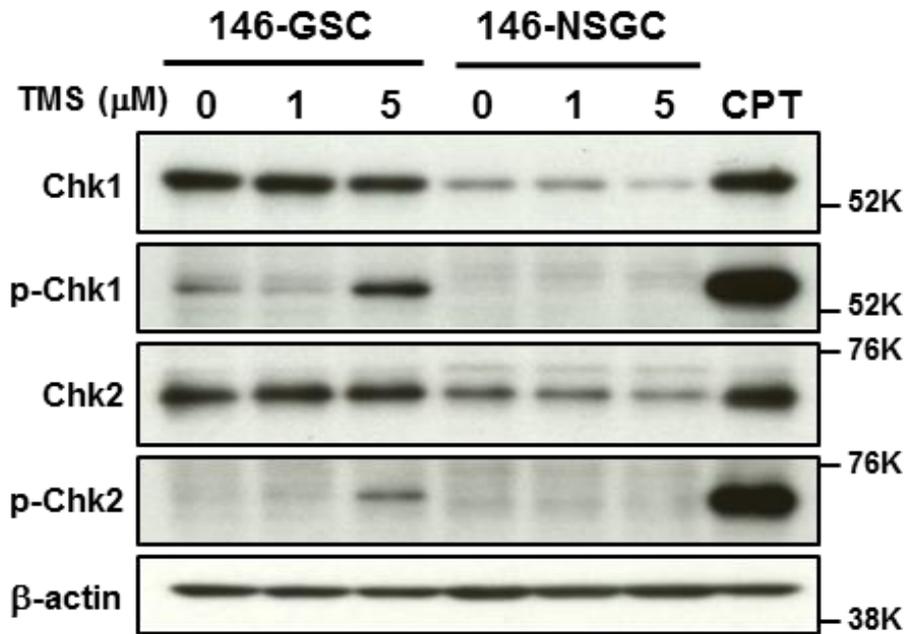
### 【材料・方法】

#### Western blot analysis

細胞溶解液の調製および Western blot analysis は、第 1 章 1-1 に示した通りに行った。但し、一次抗体としてマウス抗 Chk1 抗体 (Cell Signaling Technology)、ウサギ抗 Ser317-リン酸化-Chk1 抗体 (Cell Signaling Technology)、マウス抗 Chk2 抗体 (Millopore)、ウサギ抗 Thr68-リン酸化-Chk2 抗体 (Cell Signaling Technology)、マウス抗  $\beta$ -actin 抗体 (Sigma-Aldrich) のいずれかを 4°C で一晩反応させ、二次抗体には HRP 標識抗ウサギ抗体、HRP 標識抗マウス抗体 (GE Healthcare) のいずれかを用いて、シグナルを検出した。

## 【結果】

Chk1 と Chk1 のリン酸化抗体を用いた Western blot analysis を行い、Telomestatin の複製ストレス応答経路に対する影響を検討した (Fig. 2-11)。その結果、まず Telomestatin を処理していない状態での Chk1 のタンパク質発現量は、GSCの方が NSGC と比較して高いことが確認された。さらに、Telomestatin を処理すると GSC 選択的に Chk1 のリン酸化が引き起こされることが明らかとなった。また、Chk1 と同様に細胞周期を制御する Chk2 についてもタンパク質発現量は GSC の方が高く、Telomestatin を処理することで、弱いながらも GSC 選択的なリン酸化が認められた。



**Figure 2-11. Western blot analysis.** GBM146 cells were treated with 1 or 5  $\mu\text{M}$  Telomestatin for 24 h. Cell lysates were prepared and subjected to western blot analysis. CPT, GSCs were treated with 2  $\mu\text{M}$  Camptothecin for 1 h as positive control of p-Chk1 and p-Chk2.

## 2-5 ATR キナーゼ阻害剤の GSC 選択性

### 【目的】

Telomestatin が GSC 選択的に Chk1 のリン酸化を引き起こしたことから、複製ストレス応答経路である ATR-Chk1 経路が Telomestatin の GSC 選択性を説明しうる作用点である可能性が示唆される。この経路が GSC の生存に重要な役割を果たし、治療標的となり得ると考えられるため、続いてはこの経路を阻害した場合の細胞への影響を検討する。

### 【材料・方法】

#### 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験は第 1 章 1-1 の方法に準じて行った。薬剤は ATR キナーゼ阻害剤 VE-821 (Selleck Chem) あるいは ATM キナーゼ阻害剤 KU-55933 (Selleck Chem) のいずれかを使用し、37°C で 6 日間培養した後に生存細胞数を測定した。

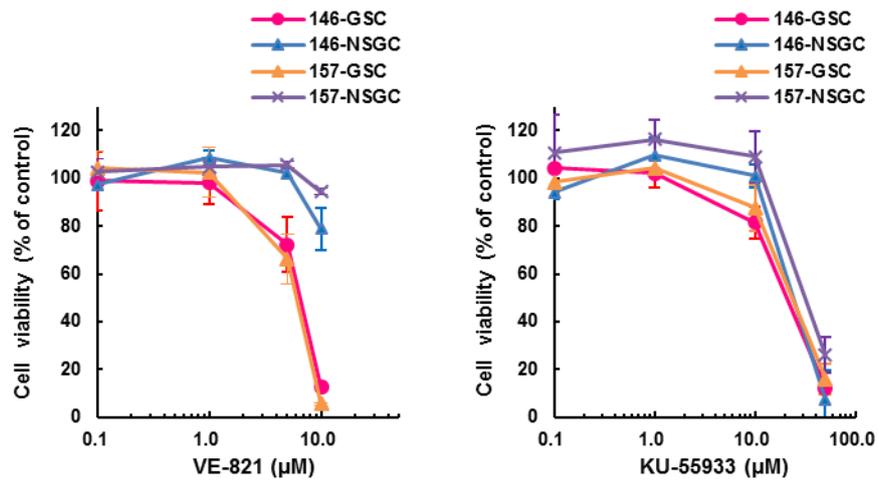
#### 免疫蛍光染色

細胞の播き込み、固定および免疫蛍光染色は、第 1 章 1-2 で述べた通り行った。

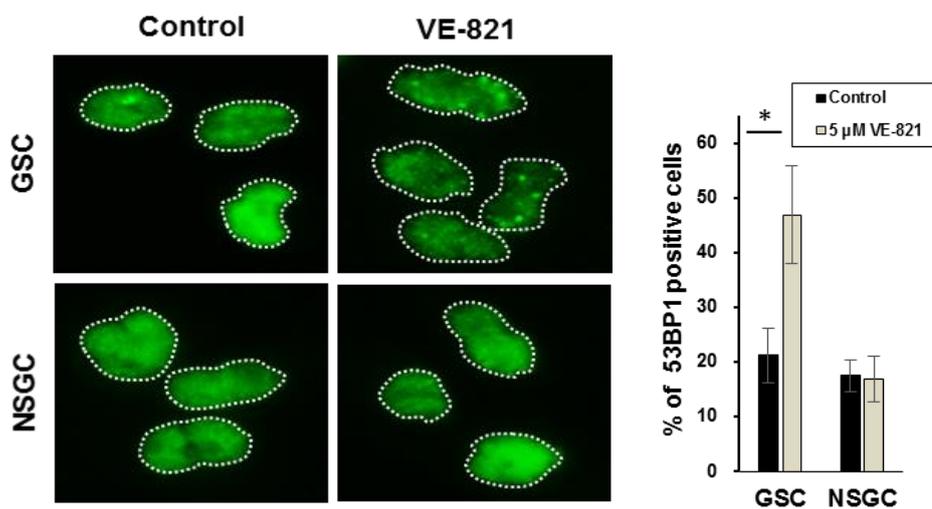
## 【結果】

まず、ATR キナーゼ阻害剤 (VE-821) あるいは ATM キナーゼ阻害剤 (KU-55933) に対する GSC あるいは NSGC の感受性を、細胞増殖抑制試験により比較検討した (Fig. 2-12)。その結果、VE-821 の IC<sub>50</sub> 値は、GBM146、GBM157 の GSC においてはそれぞれ 6.87  $\mu\text{mol/L}$ 、6.33  $\mu\text{mol/L}$  であったのに対し、NSGC では二種類の細胞共に 10  $\mu\text{mol/L}$  以上であった。VE-821 の析出が懸念されるため 10  $\mu\text{mol/L}$  を超えた濃度での検討は困難であったが、これらの結果から、VE-821 は二種類の細胞において、GSC 選択的な細胞増殖抑制効果を示す傾向が観察された。これに対して KU-55933 の IC<sub>50</sub> 値は、GBM146 においては GSC で 28.11  $\mu\text{mol/L}$ 、NSGC では 31.66  $\mu\text{mol/L}$  (NSGC/GSC 比は 1.13 倍)、GBM157 については GSC で 31.05  $\mu\text{mol/L}$ 、NSGC では 38.38  $\mu\text{mol/L}$  (NSGC/GSC 比は 1.24 倍) と僅かながらに GSC 選択性を示したが、VE-821 ほどの GSC 選択的な細胞増殖抑制効果は確認できなかった。

次に、VE-821 の DNA 損傷誘導作用を明らかにするために、53BP1 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った (Fig. 2-13)。その結果、VE-821 は GSC 選択的に DNA 損傷を誘発することが確認でき、細胞増殖抑制試験と一致した結果が得られた。



**Figure 2-12. Effect of an ATR inhibitor VE-821 or ATM inhibitor KU-55933 on growth of GSCs and NSGCs.** GBM146 and GBM157 cells were treated with VE-821 or KU-55933 for 144 h. *Error bar*, standard deviation.



**Figure 2-13. Immunofluorescence of VE-821-induced DNA damage foci in GSCs and NSGCs.** GBM146 cells were treated with 5  $\mu$ M VE-821 in serum-free medium for 24 h. Representative photos (*left*) and quantitation of 53BP1 focus-positive cells (*right*) are shown. Cells with more than four punctate nuclear 53BP1 foci were classified as the focus-positive cells. *Error bar*, standard deviation. Statistical evaluations were performed using the Welch *t*-test. \*,  $P < 0.05$ .

## 【考察】

第 1 章では GSC における Telomestatin の DNA 損傷メカニズムを検討してきたが、Telomestatin が GSC 選択的に DNA 損傷を誘導する理由として、ターゲットである G4 の数が GSC と NSGC の間で異なる可能性を考えた。そこで、まずは細胞内 G4 の可視化を試みた。これまでは、G4 構造を細胞内で観察することは困難であり、多くが試験管レベルでの検討であった。しかし、2013 年に G4 特異的抗体 (BG4 抗体) が開発されたことで、細胞内 G4 の可視化が可能となった (44)。BG4 抗体のプラスミドから抗体を調製し、調製した抗体の G4 特異性を ELISA で検証した結果、BG4 抗体は 3 種類の異なる配向性の G4 構造 (Parallel propeller G4、Anti-parallel propeller G4、Mixed parallel and anti-parallel propeller G4) に対して同等に高い親和性を示すことが確認できた (Fig. 2-2)。また、BG4 抗体を用いた免疫蛍光染色を行うと核内に多数の foci が確認でき、DNase I を前処理した後に免疫蛍光染色を行うことでこれらの foci が消失した (Fig. 2-3)。ELISA と免疫蛍光染色の結果から、調製した BG4 抗体は細胞内でも DNA を認識し、DNA の中でも特に G4 DNA を認識する可能性が示された。次に、BG4 抗体を用いた免疫蛍光染色を行い GSC と NSGC における G4 の数を比較したところ、G4 の数に大きな違いは無かった (Fig. 2-5)。ゲノム中には多数の G4 形成配列が存在することが知られており、BG4 抗体はいくつかの G4 の集合体を蛍光シグナルとして可視化していることが予想される。一つの細胞内にも蛍光の強度やサイズが異なる foci が存在しているため、GSC と NSGC における BG4 foci の蛍光強度あるいは面積についても検討したが、両者の間で大きな違いは観察されなかった (Fig. 2-6)。従って、Telomestatin のターゲットである G4 は、GSC と NSGC で同程度に存在する可能性が示唆された。GSC と NSGC との間で G4 の数には大きな違いが無いにも関わらず、何故 Telomestatin が GSC 選択性を示すの

かという疑問を解決すべく更なる検討を行った。

先に述べたように、Telomestatin はテロメアだけではなく、複製にも依存して DNA 損傷を誘導することが明らかとなった (第 1 章)。さらに、Telomestatin は GSC と NSGC において複製ストレスを誘導したことから (Fig. 2-9)、複製時に形成される G4 を Telomestatin が安定化することで、複製の進行が妨げられ、複製ストレスが引き起こされる可能性が示唆される。GSC と NSGC で同程度に複製ストレスが誘導されたのは、Telomestatin の標的である G4 が GSC と NSGC で同程度に存在しているからであると推測することができる。複製ストレスが生じると、ATR の活性化に伴い、細胞周期の進行を抑制する Chk1 のリン酸化 (活性化) が生じる (46)。本検討から、Telomestatin は Chk1 のリン酸化を GSC 選択的に誘導することが見出された (Fig. 2-11)。GSC における Chk1 のリン酸化は、Telomestatin を 5  $\mu$ M 処理した場合では亢進した一方で、1  $\mu$ M 処理すると僅かに減少した (Fig. 2-11)。G4 リガンドの一つである Pyridostatin は、低濃度と高濃度で誘導する DNA 損傷の頻度は変わらないが、高濃度の方がテロメア領域 DNA 損傷を高い頻度で誘導するという報告がある (23)。Telomestatin を 1  $\mu$ M 処理することで Chk1 のリン酸化が抑制される原因は不明であるが、Pyridostatin と同様に Telomestatin も、濃度により作用点が異なる可能性が考えられる。DNA 損傷が生じると ATM キナーゼの活性化に伴い、細胞周期の進行を抑制する Chk2 のリン酸化 (活性化) が生じる。本検討から、Telomestatin を 5  $\mu$ M 処理することで Chk2 のリン酸化が GSC 選択的に認められたことから (Fig. 2-11)、GSC 選択的に Chk1 のリン酸化を引き起こす条件では、DNA 損傷も誘導されることが確認できた。GSC では、ATR や Chk1 といった DNA 損傷応答に関わるタンパク質の発現が高いことが知られている (49)。本検討からも、Chk1 のタンパク質発現量は GSC の方が NSGC と比較して高いことが確認された (Fig. 2-11)。したがって、GSC においては複製ストレスが生じた際に、ATR キナーゼの活性化や Chk1 のリン酸化が引き起こされやすい状態にあると予測される。DNA 損傷応答の上流に

位置する H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ H2AX) も Chk1 と同様に ATR キナーゼに依存しており、ATR キナーゼによってリン酸化されることで DNA 損傷応答が引き起こされる (47)。以上より、Telomestatin が GSC 選択的に ATR-Chk1 経路を活性化することで、Chk1 のリン酸化による GSC 選択的な細胞増殖抑制効果、あるいは H2AX のリン酸化による GSC 選択的な DNA 損傷応答が引き起こされる可能性が示唆された。

GSC で発現が高い ATR や Chk1 といったタンパク質の活性化は、細胞周期の停止による DNA 修復を促し、放射線等の治療抵抗性に寄与していると考えられている (49)。しかしながら、強力な ATR-Chk1 経路の活性化は、持続的な細胞周期の停止を引き起こし、細胞死を誘導することが予想される。実際、ATR-Chk1 経路の活性化による細胞周期の停止を引き起こすことで細胞死を誘導する化合物も知られており (50)、G4 リガンドである NSC746364 も肺癌細胞株において、このような仕組みで細胞死を誘導すると考えられている (51)。このように、ATR-Chk1 経路は細胞の生存に重要な役割を担っており、特に GSC ではこの経路が重要な役割を果たしていることが予測される。本検討から、ATM キナーゼ阻害剤 (KU-55933) と比較して、ATR キナーゼ阻害剤 (VE-821) は GSC 選択的な細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった (Fig. 2-12)。ATR-Chk1 経路を活性化すると考えられる Telomestatin だけではなく、ATR キナーゼの阻害剤も GSC 選択性を示したことから、GSC は ATR-Chk1 経路の不均衡状態に対する脆弱性が高い可能性が示唆される。GSC においては、薬剤未処理の状態でも弱いながらも Chk1 のリン酸化が確認された (Fig. 2-11)。すなわち、薬剤を処理していない状態でもこの経路が細胞の維持に寄与していることが予想され、この経路を過剰に活性化するだけでなく、阻害することでも細胞に致命的な毒性を与えることが考えられる。以上より、この経路は GSC に対する新たな治療標的となり得る可能性が示唆される。

Telomestatin を 24 時間処理した場合では、RPA2 のリン酸化と 53BP1 foci の形成が共に顕著に確認されたため (Fig. 2-9、Fig.2-10)、この条件での DNA 損傷は主に

複製ストレスの誘導に起因していることが推測される。しかしながら、**Telomestatin** を 4 時間処理した場合では、**RPA2** のリン酸化は生じていないにも関わらず、弱いながらも DNA 損傷が誘導された (Fig. 2-10)。すなわち、この条件では複製ストレスの誘導とは異なる仕組みで DNA 損傷が誘導されていることが予測される。先に述べたように、**Telomestatin** 誘導性の DNA 損傷は複製だけではなく、テロメアや転写にも依存していることが明らかとなっている (第 1 章)。**TRF2** がテロメアから遊離することにより生じるテロメアの障害は、テロメラーゼ阻害によるテロメア短小化と比較してすみやかに生じることが予想され、この作用は **Telomestatin** の GSC に対する即効的な効果として期待される。このように、**Telomestatin** はテロメアや複製、転写など幅広い標的を持つことで、短期間で誘導される細胞周期への依存が低い DNA 損傷や、薬剤処理時間に依存して誘導される複製ストレスに起因した DNA 損傷を引き起こす可能性が示唆された。

## 第3章 総括

神経膠芽腫は予後不良の悪性脳腫瘍である。手術による全摘出が困難な為、手術と併せて、放射線療法や化学療法を行っている。しかしながら、このような治療を行っても神経膠芽腫患者の平均生存期間は1年程度であり、優れた治療戦略の開発が急務となっている(1-3)。神経膠芽腫の不均一な細胞集団の中にはがん幹細胞 (glioma stem cells: GSC) が存在し、治療抵抗性に寄与していると考えられている(4,5)。所属する研究室ではこれまでに、天然由来化合物であるテロメスタチン (Telomestatin) が GSC に対し、同細胞が分化して生じた non stem glioma cells (NSGC) と比べてより強力な細胞増殖抑制効果および DNA 損傷誘発作用を示すことを明らかにしてきたが(10)、なぜこの化合物が GSC 選択性を示すのかは未だ明らかにされていない。

このような背景から本論文第1章では、Telomestatin により誘導される GSC 選択的な DNA 損傷のメカニズムを検討した。Telomestatin はテロメラーゼ阻害活性を有することで知られている(9)。この活性が Telomestatin の GSC 選択性に影響を与えている可能性を考えたが、G4 安定化能を持たないテロメラーゼ阻害剤 (BIBR1532) は GSC 選択性を示さなかった。すなわち、テロメア短縮によるキャップ構造の崩壊は Telomestatin の GSC 選択性を決定づける要因ではないと考えられる。しかしながら、Telomestatin がテロメア結合タンパク質である TRF2 foci を GSC 選択的に消失させることが明らかになり、この活性が GSC におけるテロメア領域 DNA 損傷を誘導する原因である可能性が示唆された。また、免疫 FISH 法を用いた検討から、Telomestatin によるテロメア DNA 損傷は、全損傷部位の約3割であり、残りの約7割はテロメア以外の領域で生じることが明らかとなった。G4 の形成には DNA 二重らせんの解消が必要であり、テロメア DNA の一本鎖領域だけでなく複製や転写の際にも G4 が形成されると予想される。事実、複製阻害剤 (アフィディコリン) および

転写阻害剤 (DRB) を GSC に前処理することで、Telomestatin 誘導性の DNA 損傷が顕著に低下した。以上の結果から、G4 リガンド Telomestatin は GSC において、TRF2 をテロメアから遊離することでテロメア障害を引き起こすだけでなく、複製や転写にも依存して DNA 損傷を誘導する可能性が示唆された。

第 2 章では、まず Telomestatin のターゲットである G4 の可視化を試みた。抗 G4 抗体 (BG4 抗体) のプラスミドから抗体を調製し、調製した抗体の G4 特異性を検証した。ELISA の結果から、調製した BG4 抗体は G4 を形成させた DNA に対して高い親和性を示すことが確認でき、さらに DNase I を前処理した後に免疫蛍光染色を行うことで核内の foci が消失することが確認できた。これら ELISA と免疫蛍光染色の結果から、調製した BG4 抗体は細胞内でも DNA を認識し、DNA の中でも特に G4 DNA を認識している可能性が示された。調製した BG4 抗体を用いた免疫蛍光染色から、Telomestatin のターゲットである G4 は GSC と NSGC で同程度に存在することが明らかとなった。これまでの G4 に関する研究は主に試験管レベルで行われてきたが、2013 年に BG4 抗体が開発されたことで、細胞内での G4 の可視化が可能となった (44)。BG4 抗体は核内では DNA による G4 を認識するのに対し、細胞質側では RNA に由来する G4 を可視化できるという報告もあり (52)、G4 リガンドのターゲットを可視化できる有用なツールとなり得る。また、BG4 抗体による免疫組織染色 (IHC) も行われており、胃がんや肝がんの腫瘍組織では、正常組織と比較して BG4 抗体による染色が強いという報告もある (53)。腫瘍組織と正常組織の G4 の数に何故違いがあるのかは不明であるが、一つの可能性として、G4 の形成や解消に関わるタンパク質の関与が予想される。近年、G4 を解消する働きをもつヘリカーゼの存在が注目されており、その中の一つ PIF1 ヘリカーゼは細胞内において、蛍光標識した G4 リガンド Pyridostatin と共局在することが明らかとなっている (23)。ヘリカーゼとは逆に G4 を形成するタンパク質の存在も知られており、このような G4 ダイナミクスに影響を与えるタンパク質の存在が、細胞内の G4 の数や G4 リガンドの感受

性に影響を与えている可能性が考えられる。BG4 抗体による検討から、Telomestatin の標的である G4 は GSC と NSGC で同程度に存在していることが明らかとなったが、複製時に形成されるこのような G4 を Telomestatin が安定化することで、複製の進行が妨げられ、複製ストレスが引き起こされると予想した。複製ストレスを表す RPA2 のリン酸化抗体を用いた免疫蛍光染色を行った結果、Telomestatin を処理した GSC と NSGC では、共に複製ストレスが誘導されることが明らかとなった。しかしながら、この時の Telomestatin 誘導性 DNA 損傷は GSC でのみ生じており、複製ストレス応答経路に Telomestatin の GSC 選択性を説明しうる分子作用点があると考えた。複製ストレスが生じると、ATR の活性化に伴い、細胞周期の進行を抑制する Chk1 のリン酸化（活性化）が引き起こされる (46)。興味深いことに、Telomestatin は Chk1 のリン酸化を GSC 選択的に誘導することが見出された。GSC では ATR や Chk1 といった DNA 損傷応答に関わるタンパク質の発現が高いことが報告されており (49)、本検討からも GSC では Chk1 のタンパク質発現が高いことが確認された。以上の結果から、GSC においては複製ストレスが生じた際に、ATR-Chk1 経路の活性化が引き起こされやすい状態にあると予想される。DNA 損傷応答の上流に位置する H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ H2AX) も Chk1 と同様に ATR キナーゼに依存しており、ATR キナーゼによってリン酸化されることで DNA 損傷応答が引き起こされる (47)。すなわち、Telomestatin が GSC 選択的に ATR-Chk1 経路を活性化することで、Chk1 のリン酸化による GSC 選択的な細胞増殖抑制効果、あるいは H2AX のリン酸化による GSC 選択的な DNA 損傷応答が引き起こされると予想される (Fig. 3)。また、Telomestatin だけではなく ATR キナーゼ阻害剤 (VE-821) も GSC 選択性を示したことから、GSC では ATR-Chk1 経路が生存のために重要な役割を果たしており、この経路の不均衡状態に対する脆弱性が高いことが推測される。以上より、この経路は GSC における新たな治療標的となる可能性が示唆された。

以上のように本研究では、Telomestatin はテロメアだけではなく、複製や転写に依

存して DNA 損傷を誘導することを明らかにした。特に、TRF2 を標的としたテロメア障害や、複製ストレスの誘導に伴う ATR-Chk1 経路の活性化を GSC 選択的に引き起こすことで、GSC 選択的な細胞増殖抑制効果および DNA 損傷誘発作用を示す可能性が示唆された。このような新しい知見は、GSC を標的とした新規治療戦略の構築のために、重要な情報を提供し得るものと考えられる。

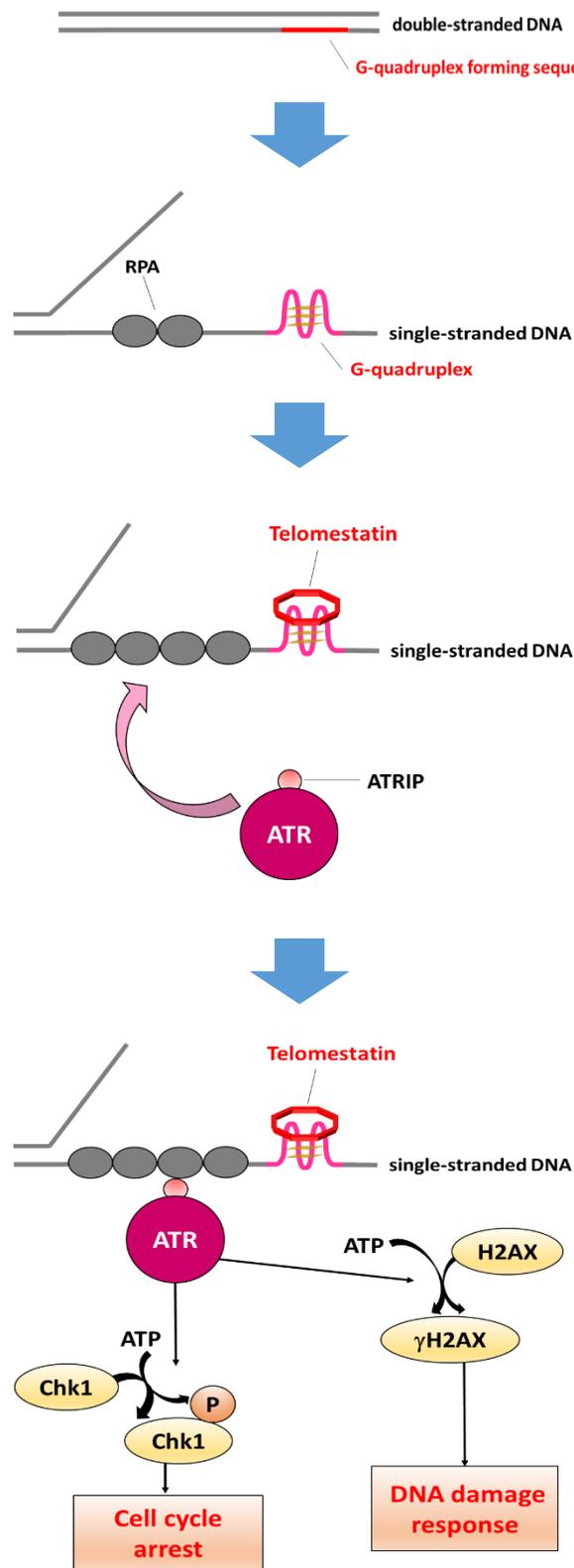


Figure 3. Telomestatin impairs GSC growth through potent activation of the replication stress response pathway.

## 参考文献

- 1 Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; 359: 492-507.
- 2 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-996.
- 3 Stupp R, Hegi ME, Mason WP et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 459-66.
- 4 Cheng L, Bao S, Rich JN. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 654-665.
- 5 Chen J, Li Y, Yu TS et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012; 488: 522-526.
- 6 Galli R, Binda E, Orfanelli U et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64: 7011-21.

- 7 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.
- 8 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 5821-5828.
- 9 Shin-ya K, Wierzba K, Matsuo K et al. Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J Am Chem Soc* 2001; 123: 1262-3.
- 10 Miyazaki T, Pan Y, Joshi K et al. Telomestatin impairs glioma stem cell survival and growth through the disruption of telomeric G-quadruplex and inhibition of the proto-oncogene, c-Myb. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1268-80.
- 11 Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; 48: 2013-2018.
- 12 Sen D, Gilbert W. Formation of parallel four-stranded complexes by guaninerich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 1988; 334: 364-366.
- 13 Parkinson GN, Lee MP, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 2002; 417: 876-880.
- 14 Yu HQ, Miyoshi D, Sugimoto N. Characterization of structure and stability of long telomeric DNA G-quadruplexes. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 15461-15468.

- 15 KimMY, Vankayalapati H, Shin-Ya K, Wierzba K, Hurley LH. Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular G-quadruplex. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 2098-99.
- 16 de Lange T. Shelterin : the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development* 2005; 19: 2100-2110.
- 17 Hockemeyer D, Sfeir AJ, Shay JW, Wright WE, de Lange T. POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J* 2005; 24: 2667-78.
- 18 Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; 42: 301-34.
- 19 de Lange T. How shelterin solves the telomere end-protection problem. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2010; 75: 167-177.
- 20 Sfeir A, de Lange T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* 2012; 336: 593-597.
- 21 Gomez D, Paterski R, Lemarteleur T, Shin-Ya K, Mergny JL, Riou JF. Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang. *J Biol Chem* 2004; 279: 41487-94.

- 22 Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G et al. Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene* 2006; 25: 5719-5725.
- 23 Rodriguez R, Miller KM, Forment JV. Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 301-310.
- 24 Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou JF. Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 802-8.
- 25 Wei D, Todd AK, Zloh M, GunaratnamM, Parkinson GN, Neidle S. Crystal structure of a promoter sequence in the B-raf gene reveals an intertwined dimer quadruplex. *J Am Chem Soc* 2013; 135: 19319-19329.
- 26 Dai J, Chen D, Jones RA, Hurley LH, Yang D. NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 5133-5144.
- 27 Cogo S, Paramasivam M, Membrino A, Yokoyama KK, Xodo LE. The KRAS promoter responds to Myc-associated zinc finger and poly(ADP-ribose) polymerase 1 proteins, which recognize a critical quadruplex-forming GA-element. *J Biol Chem* 2010; 285: 22003-22016.

- 28 Rankin S, Reszka AP, Huppert J et al. Putative DNA quadruplex formation within the human c-kit oncogene. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 10584-10589.
- 29 Guo K, Pourpak A, Beetz-Rogers K, Gokhale V, Sun D, Hurley LH. Formation of pseudosymmetrical G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter region of the RET oncogene. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 10220-8.
- 30 Qin Y, Fortin JS, Tye D, Gleason-Guzman M, Brooks TA, Hurley LH. Molecular cloning of the human platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR-beta) promoter and drug targeting of the G-quadruplex-forming region to repress PDGFR-beta expression. *Biochemistry* 2010; 49: 4208-19.
- 31 De Armond R, Wood S, Sun D, Hurley LH, Ebbinghaus SW. Evidence for the presence of a guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter. *Biochemistry* 2005; 44: 16341-50.
- 32 Fernando H, Reszka AP, Huppert J. A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human c-kit oncogene. *Biochemistry* 2006; 45: 7854-7860.
- 33 Phan AT, Kuryavyi V, Burge S, Neidle S, Patel DJ. Structure of an unprecedented G-quadruplex scaffold in the human c-kit promoter. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 4386-4392.

- 34 Hsu ST, Varnai P, Bugaut A, Reszka AP, Neidle S, Balasubramanian S. A G-rich sequence within the c-kit oncogene promoter forms a parallel G-quadruplex having asymmetric G-tetrad dynamics. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 13399-13409.
- 35 Kuryavyi V, Phan AT, Patel DJ. Solution structures of all parallel-stranded monomeric and dimeric G-quadruplex scaffolds of the human c-kit2 promoter. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 6757-6773.
- 36 Todd AK, Haider SM, Parkinson GN, Neidle S. Sequence occurrence and structural uniqueness of a G-quadruplex in the human c-kit promoter. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 5799-5808.
- 37 Palumbo SL, Memmott RM, Uribe DJ, Krotova-Khan Y, Hurley LH, Ebbinghaus SW. A novel G-quadruplex-forming GGA repeat region in the c-myc promoter is a critical regulator of promoter activity. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 1755-69.
- 38 Maizels N, Gray LT. The G4 genome. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003468.
- 39 Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 770-80.
- 40 Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J* 2001; 20: 6958-68.

- 41 Mashima T, Soma-Nagae T, Migita T et al. TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. *Cancer Res* 2014; 74: 4888-97.
- 42 Hirashima K, Migita T, Sato S, Muramatsu Y, Ishikawa Y, Seimiya H. Telomere length influences cancer cell differentiation in vivo. *Mol Cell Biol* 2013; 33: 2988-2995.
- 43 Tahara H, Shin-Ya K, Seimiya H, Yamada H, Tsuruo T, Ide T. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene* 2006; 25: 1955-66.
- 44 Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat Chem* 2013; 5: 182-6.
- 45 Vassin VM, Anantha RW, Sokolova E, Kanner S, Borowiec JA. Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *J Cell Sci* 2009; 122: 4070-80.
- 46 Shechter D, Costanzo V, Gautier J. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 901-8.

- 47 Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*. 2001; 276: 47759-62.
- 48 Hirashima K, Seimiya H. Telomeric repeat-containing RNA/G-quadruplex-forming sequences cause genome-wide alteration of gene expression in human cancer cells in vivo. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: 2022-32.
- 49 Ahmed SU, Carruthers R, Gilmour L, Yildirim S, Watts C, Chalmers AJ. Selective Inhibition of Parallel DNA Damage Response Pathways Optimizes Radiosensitization of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Res* 2015; 75: 4416-28.
- 50 Zhao Y, Wu Z, Zhang Y, Zhu L. HY-1 induces G(2)/M cell cycle arrest in human colon cancer cells through the ATR-Chk1-Cdc25C and Weel pathways. *Cancer Sci* 2013; 104: 1062-6.
- 51 Chung YL, Pan CH, Liou WH et al. NSC746364, a G-quadruplex-stabilizing agent, suppresses cell growth of A549 human lung cancer cells through activation of the ATR/Chk1-dependent pathway. *J Pharmacol Sci* 2014; 124: 7-17.
- 52 Biffi G, Di Antonio M, Tannahill D, Balasubramanian S. Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nat Chem* 2014; 6: 75-80.

- 53 Biffi G, Tannahill D, Miller J, Howat WJ, Balasubramanian S. Elevated levels of G-quadruplex formation in human stomach and liver cancer tissues. *PLoS One* 2014; 9: e102711.

## 謝辞

本研究は東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻がん分子標的治療学分野（公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子生物治療研究部）において、清宮啓之部長の御指導、御鞭撻のもとに行わせていただきました。心より御礼申し上げます。

同研究部の岡部幸子先生、岡本啓治先生、馬島哲夫先生には、本研究を進める上で終始貴重な御指導、御助言をいただきました。同級生である大内梨江さんには神経膠芽腫細胞を用いた実験を中心に有意義な御助言、御協力をいただきました。中村貴大君にはグアニン四重鎖に関する興味深い情報を提供していただきました。共に過ごしました同研究部の皆様にも実に様々な御協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

**Telomestatin** を提供していただきました産業技術総合研究所の新家一男先生、神経膠芽腫細胞を提供していただきました米国アラバマ大学の中野伊知郎先生、**BG4** 抗体のプラスミドを提供していただきました英国ケンブリッジ大学の **Shankar Balasubramanian** 先生に厚く御礼申し上げます。

審査過程において貴重な御指導、御助言をいただきました東京大学の松田浩一先生、佐藤均先生、古川洋一先生、伊庭英夫先生に厚く御礼申し上げます。公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター所長の藤田直也先生、同・ゲノム研究部の富田章弘先生、同・分子薬理部の且慎吾先生には貴重な御指導をいただきました。厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり貴重な御指導、ご助言をいただきました公益財団法人がん研究会がん化学療法センター前所長の吉田光昭先生に心より御礼申し上げます。