

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23876

研究課題名（和文）BET阻害による非相同末端結合機構抑制効果を用いた新しい肺癌治療の開発

研究課題名（英文）The study of the impact of BET inhibition on NHEJ DNA damage repair and a new treatment strategy using BET inhibitors for lung cancer

研究代表者

高島 雄太（Takashima, Yuta）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90848764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：BET阻害剤とWEE1阻害剤の併用は非小細胞肺癌細胞株において相乗的な抗腫瘍効果をもたらした。BET阻害によって複数のNHEJ機構関連遺伝子の発現が抑制され、NHEJ機構活性が低下した。BET阻害はG2/Mチェックポイント関連遺伝子であるMYT1の発現を抑制しており、BET阻害剤とWEE1阻害剤を併用することでDNA修復が不十分な細胞が大量にM期へのエントリーすることとなり、最終的には分裂期細胞死が誘導されていた。本研究はBET阻害剤とWEE1阻害剤の併用効果を示した初めての報告である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の報告はBET阻害によるHR機構抑制を対象としたものがほとんどだが、本研究ではもう一つのDNA 2本鎖切断修復機構であるNHEJ機構を対象とした。BET阻害によるNHEJ阻害を抗癌治療に応用できれば、幅広いDNA傷害性薬剤の作用を増強することが期待でき、新たな抗癌治療の開発につながる。非小細胞肺癌細胞を用いてBET阻害によるNHEJ機構抑制能を明らかにし、機序も検討した本研究は今後の非小細胞肺癌の治療開発の一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We show that combined inhibition of BET and WEE1 synergistically suppresses NSCLC growth. BET inhibition considerably repressed NHEJ pathway-related genes and diminished NHEJ pathway-mediated DNA double-strand break repair. Furthermore, BET inhibition repressed MYT1 expression and promoted mitotic entry when combined with WEE1 inhibition. This is the first report to show that BET inhibition synergizes with WEE1 inhibitor via two distinct mechanisms, impairing NHEJ DNA damage repair and synergistic forced mitotic entry.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 DNA修復 非相同末端結合 BET

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、BET 阻害剤が DNA2 本鎖切断 (DSB) の修復を阻害することで DNA 傷害活性をもつ様々な薬剤の効果を増強することが報告されている。しかし、これらの先行研究のほとんどは細胞周期における S 期細胞の DNA を傷害する薬剤と BET 阻害剤との併用についての検討であり、その標的としている DSB 修復機構は相同組換え (HR) である。BET 阻害剤はもう一つの DSB 修復機構である非相同末端結合機構 (NHEJ) も抑制しうることが報告されているが、BET 阻害による NHEJ 阻害能が抗癌治療に応用できるかどうかについての検討はほとんどされていない。NHEJ は HR と異なり、S/G2 期に限定されずすべての細胞周期内で機能するため、NHEJ 阻害を抗癌治療に応用することができれば、S 期特異的な DNA 傷害活性を示す薬剤のみならず幅広い DNA 傷害性薬剤の作用を増強することが期待でき、新たな抗癌治療の開発につながる。

WEE1 キナーゼは G2/M チェックポイントで重要な役割を担っており、細胞周期を G2 期に留まらせる働きをもつ。WEE1 阻害剤は強制的に細胞周期を進めることで DSB を起こし、分裂期細胞死 (mitotic catastrophe) を誘導することで肺癌を含めた様々な固形癌に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。我々は、BET 阻害剤と WEE1 阻害剤を併用することで、BET 阻害による NHEJ 抑制が WEE1 阻害剤がもたらす DNA 損傷を増強し、抗腫瘍効果が高まるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、新たな肺癌治療法を産み出すべく、BET 阻害による NHEJ 機構抑制を利用した治療方法の有用性とその機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

非小細胞肺癌細胞株である A549、H1299、H1975、H460、H520 を使用した。BET 阻害剤として JQ1 と AZD5153 を、WEE1 阻害剤である AZD1775 を使用した。BET 阻害剤と WEE1 阻害剤の併用効果は MTT 法を行い、併用係数 (combination index: CI) を算出して評価した。DSB の評価は抗

H2AX 抗体を用いたウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法で行なった。DSB 修復や細胞周期に關与する遺伝子の発現は定量的逆転写 PCR (quantitative reverse transcription PCR: qRT-PCR) 法とウエスタンブロット法で評価した。DNA 損傷修復能の評価として非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) 活性の定量を、NHEJ レポータープラスミド安定発現細胞とフローサイトメトリー法を用いて行った。細胞周期の評価はプロピジウムイオダイド (Propidium Iodide: PI) 染色を用いたフローサイトメトリー法と抗リン酸化ヒストン H3 (phospho-histone H3: pHH3) 抗体を用いたウエスタンブロット法で行ない、アポトーシスの評価はアネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法で行なった。また、A549 細胞を用いて異種移植マウスモデルを作成し、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用効果を *in vivo* の系で検討した。また、蛍光免疫染色法を用いて分裂期細胞死を定量した。

4. 研究成果

使用した全ての非小細胞肺癌細胞株に対して BET 阻害剤と WEE1 阻害剤を併用してみたところ、CI は広く 1 以下で推移し、相乗的な抗腫瘍効果を示した (図 1)。また、2 剤を併用することでアポトーシスが誘導された。

2 剤の併用は H2AX のタンパク発現を増加した。また、WEE1 阻害剤によって生じた H2AX のタンパク発現は BET 阻害剤を追加投与することで遷延した (図 2)。以上より BET 阻害剤は DSB の修復遅延を起こすことが明らかとなった。

図1

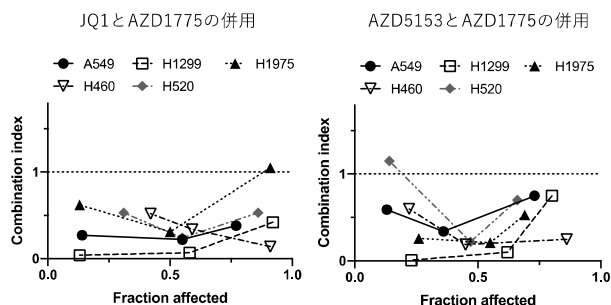
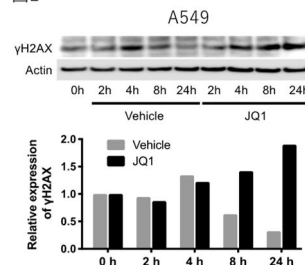


図2



BET 阻害薬の投与により *SHLD1*、*SHLD3*、*XRCC4*、*SASS6*、*TP53BP1* といった NHEJ 機構関連遺伝子の発現が低下した (図 3)。また、BET 阻害薬の投与や BRD4 のノックダウンによって NHEJ 修

復活性が低下した（図4）。以上より BET 阻害は NHEJ 機構関連遺伝子の発現を抑制し、NHEJ 機構による DSB 修復能を低下させることが明らかとなった。

図3

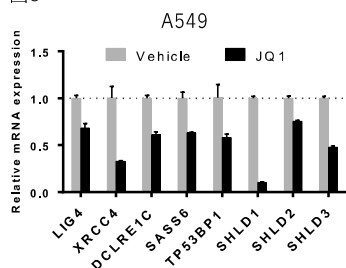
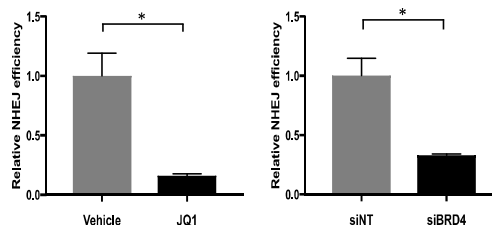


図4

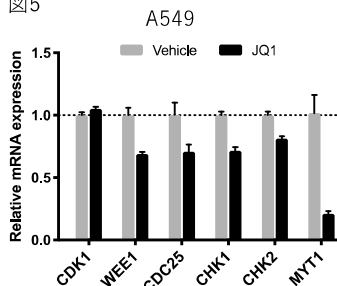


H1299を用いて作成したNHEJレポータープラスミド安定発現細胞を用いたNHEJ活性の評価

フローサイトメトリー法を用いた細胞周期の検討では、2剤の併用により G2/M 期の増加がみられ、またウエスタンブロット法では M 期の指標である pHH3 のタンパク発現亢進がみられたことから、M 期への移行が増加していることが明らかになった。G2/M チェックポイント機構関連遺伝子の発現を評価したところ、BET 阻害薬の投与でミエリン転写因子 1 (myelin transcription factor 1: MYT1) の発現が低下した（図5）。以上より BET 阻害薬は MYT1 の発現を低下させ、WEE1 阻害薬と併用することで G2/M チェックポイント機構を著明に抑制し、癌細胞の M 期への移行を増加させていることが示唆された。蛍光免疫染色法を用いて分裂期細胞死を定量してみたところ、BET 阻害剤と WEE1 阻害剤の併用で異常な細胞分裂が増えており、分裂期細胞死が誘導されていることが示唆された。

A549 細胞株を用いた異種移植マウスモデルの実験でも上記細胞実験と矛盾しない結果が得られた。

図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashima Yuta, Kikuchi Eiki, Kikuchi Junko, Suzuki Motofumi, Kikuchi Hajime, Maeda Makie, Shoji Tetsuaki, Furuta Megumi, Kinoshita Ichiro, Dosaka Akita Hirotooshi, Sakakibara Konishi Jun, Konno Satoshi	4. 巻 146
2. 論文標題 Bromodomain and extraterminal domain inhibition synergizes with WEE1 inhibitor AZD1775 effect by impairing nonhomologous end joining and enhancing DNA damage in nonsmall cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1114 ~ 1124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.32515	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------