

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07607

研究課題名(和文) エピジェネティクス機構によるDNA修復機構制御を標的とした新たな癌治療法の開発

研究課題名(英文) Targeting epigenetic regulators for impairment of DNA repair as a novel cancer therapy

研究代表者

菊地 英毅 (Kikuchi, Eiki)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：60463741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：4つの非小細胞肺癌細胞株すべてにおいてパクリタキセル(PTX)曝露によりM期が増加した(mitotic arrest)が、H1299はPTXに対する感受性が低く、mitotic arrestの比率が低く、mitotic slippageの出現割合も他の細胞に比較して有意に高かった。PTX耐性株であるH1299では非相同末端結合(NHEJ)阻害薬の併用によりPTXへの感受性が回復し、DNA2本鎖切断およびアポトーシスが有意に増加した。以上のことから、NHEJを阻害することによりmitotic slippageによるPTX耐性を克服することができると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パクリタキセル(PTX)は現在においても悪性腫瘍に対して幅広く用いられる抗悪性腫瘍薬であるが、使用開始から4-5ヶ月程度で耐性化がみられるため、耐性化の克服は喫緊の課題である。我々はパクリタキセル耐性の原因がmitotic slippageであることを示し、その克服として非相同末端結合(NHEJ)阻害薬が有用であることを示した。PTX耐性肺癌に対する有望な治療戦略となりうると考えられ、臨床応用できればPTXを用いる多くの癌患者の予後を延長することができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：All four non-small cell lung cancer cell lines exhibited an elevated M-phase (mitotic arrest) upon exposure to paclitaxel (PTX). H1299 cells demonstrated lower sensitivity to PTX, a reduced rate of mitotic arrest, and a significantly higher rate of mitotic slippage compared to the other cell lines. In the PTX-resistant H1299 cells, the simultaneous application of a non-homologous end joining (NHEJ) inhibitor reinstated the sensitivity to PTX and considerably amplified DNA double-strand breaks and apoptosis. These findings indicate that the inhibition of NHEJ may conquer PTX resistance induced by mitotic slippage.

研究分野：化学療法

キーワード：Mitotic slippage 細胞周期 非相同末端結合 非小細胞肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷修復は発がんの抑制に機能する一方、DNA 修復能が亢進しているがん細胞では抗癌剤や放射線による細胞死が誘導されにくくなることから、悪性度促進や治療抵抗性にかかわる。DNA2 本鎖切断 (DSB) は重篤な DNA 損傷であり、修復不能な場合はアポトーシスに陥る。DSB 修復を標的とした治療により DNA 傷害性薬剤の効果増強が期待できるが、これまで DSB 経路にかかわる分子を標的とした薬剤治療は必ずしも成功しているとは言いがたい。DSB の主な修復機構には相同組換え (HR) と非同末端結合 (NHEJ) の 2 つがあるが、HR と NHEJ の選択および促進にヒストン修飾が強く関与することが明らかになりつつある。我々は NHEJ を制御する遺伝子の発現が、ヒストン修飾を認識して RNA 転写を促進する BET (bromodomain and extraterminal) タンパクに依存しており、BET 阻害により NHEJ 活性が低下することを報告した。HR による DSB 修復は S/G2 期に限定されるが、NHEJ による DSB 修復は細胞周期を通して働くため、NHEJ の抑制による抗腫瘍効果は幅広い DNA 傷害剤との併用効果が期待できる。特に G1 期では HR が働かないため NHEJ が主な DSB 修復機構となる。そのため NHEJ 阻害はさまざまな薬剤、特に M 期で DNA を傷害する薬剤との併用効果が期待される有望な癌治療戦略であるが、このことを検討した報告はほとんどない。

## 2. 研究の目的

我々は、NHEJ を応用した新たな癌治療を確立することを目指す。核内因子 B (NF- $\kappa$ B) 阻害薬である dimethylaminoparthenolide (DMAPT) や BET 阻害薬等、エピジェネティック機構を利用した DSB 修復阻害と DNA 傷害性薬剤との併用により抗腫瘍効果を誘導する。このことを応用した新たな治療法を確立するため、各種 DNA 修復阻害薬や遺伝子ノックダウンを用いて NHEJ 阻害を最大化し、また併用するための DNA 傷害性薬剤を選択する。

## 3. 研究の方法

非小細胞肺癌株として H1299, A549, H1975, H520 の 4 つの細胞株を用いた。NHEJ 阻害薬として A-196 および JQ1 を用いた。NHEJ の評価として、GFP レポータープラスミドを組み込んだ H1299 細胞および 293T 細胞を用いた NHEJ レポーターアッセイを用いた。細胞死、細胞周期、細胞分裂、DSB の評価を MTT 法、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法、タイムラプス顕微鏡観察にて行った。

## 4. 研究成果

### (1) NHEJ 阻害活性を持つ薬剤の選定

まず DMAPT を用いて NHEJ に対する影響を検討したが、過去に報告されている程度に NHEJ を抑制しなかった。これは細胞株や実験環境の違いが原因として考えられた。過去の報告を参照に非小細胞肺癌細胞株に対する NHEJ 阻害活性を検討し、ヒストン H4K20 メチル化酵素 SUV4-20H1/H2 阻害剤である A-196 が、5-10 $\mu$ M 程度の濃度で NHEJ レポーターを遺伝子導入した H1299 細胞および 293T 細胞にて有意に NHEJ 活性を低下させることが判明した。しかし A-196 の 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は 15 $\mu$ M 以上であり、NHEJ 活性の低下のみでは細胞死を誘導しなかった。

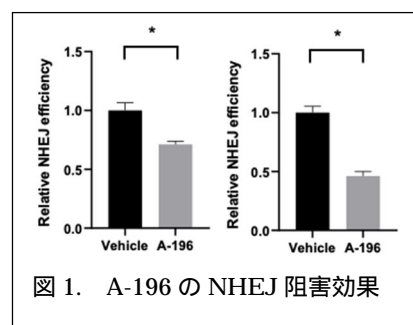


図 1. A-196 の NHEJ 阻害効果

### (2) タキサン系薬剤は NHEJ 阻害薬と併用効果を示す

この NHEJ 活性低下を応用したがん治療法開発のため、各種殺細胞性抗癌剤との併用実験を行い、併用効果を評価した。NHEJ の機構を考え、M から G1 期にかけて DNA2 本鎖切断が誘導されるタキサン系薬剤との併用効果があるだろうと予想し、これらを用いた検討を行った。その結果、パクリタキセル (PTX) およびドセタキセル (DOC) は H1299 細胞において

Cell line	PTX	PTX+A-196	p value
H1299	37.4 ± 2.9	18.2 ± 1.7	<0.01
A549	8.1 ± 0.8	6.8 ± 1.3	0.31
H1975	3.6 ± 1.0	3.9 ± 0.6	0.69
H520	8.9 ± 0.9	8.1 ± 0.8	0.39

表 1. 2.5 $\mu$ M の A-196 添加によるパクリタキセル (PTX) の IC<sub>50</sub> 濃度 (nM) の変化

NHEJ 阻害薬との相乗効果を示した（表 1）。しかし、A549 細胞、H1975 細胞、H520 細胞では併用効果を示さなかった。また S 期での DNA 切断を引き起こすペメトレキセドは全ての細胞において併用効果を示さず、NHEJ 阻害薬の想定される機序による併用効果に矛盾がないと考えられた。NHEJ 阻害薬として JQ-1 を用いた検討においても、H1299 細胞は PTX あるいは DOC との併用効果を示した。

（ 3 ） NHEJ 阻害薬とタキサン系薬剤が併用効果を示す腫瘍の同定

H1299 細胞において NHEJ 阻害薬とタキサン系薬剤との併用効果が得られ、その他の細胞で併用効果が得られない理由を検索した。

まず PTX の効果を検討したところ、H1299 細胞を含めた 4 つの細胞株全てで PTX 曝露により M 期の増加がみられた（mitotic arrest）が、H1299 は PTX に対する感受性が低く、mitotic arrest の比率が低かった。H1299 は NHEJ 阻害薬と PTX の併用による殺細胞性効果の機序についての検討では、DSB の増加およびアポトーシスの誘導がその機序であることが判明した。

PTX の感受性が低く、mitotic arrest が誘導されにくい細胞で NHEJ 阻害薬の効果が高いことから、PTX 耐性機序の一つである mitotic slippage について着目した。Mitotic slippage は正常な細胞質分裂を伴わずに早期に M 期から G1 期に移行することで細胞死を回避する現象である（図 2）。4 つの細胞株を PTX に曝露し、mitotic slippage の頻度を測定したところ、H1299 では mitotic slippage の出現割合が他の細胞株に比較して有意に高かった（表 2）。

PTX 耐性細胞株 H1299 は mitotic slippage が多くみられ、また NHEJ 阻害薬の併用により PTX への感受性が回復し、DSB およびアポトーシスが有意に増加した。H1299 では mitotic slippage により PTX による DSB が修復されないまま G1 期に移行し、NHEJ 抑制によりアポトーシスが増加した可能性がある。以上のことから、NHEJ を阻害することにより mitotic slippage による PTX 耐性を克服できる可能性があると考えられた。

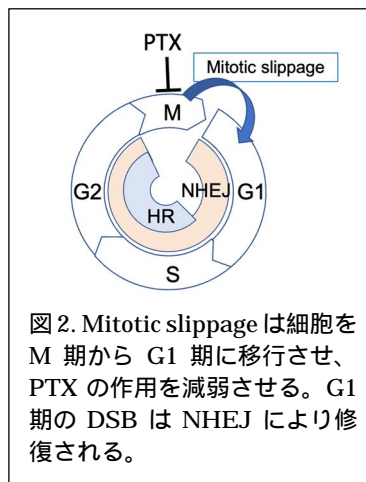


図 2. Mitotic slippage は細胞を M 期から G1 期に移行させ、PTX の作用を減弱させる。G1 期の DSB は NHEJ により修復される。

Cell line	Treatment	Slippage/Total calls	p value
H1299	Vehicle	2/140	0.01
	PTX	10/124	
A549	Vehicle	0/113	>0.99
	PTX	0/158	
H1975	Vehicle	2/179	0.68
	PTX	3/176	
H520	Vehicle	1/252	>0.99
	PTX	1/265	

表 2. 各種細胞株における PTX 曝露後の mitotic slippage を示す細胞の割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻 康介、菊地 英毅、高島 雄太、森永 大亮、伊藤 祥太郎、高橋 宏典、朝比奈 肇、菊地 順子、品川 尚文、榊原 純、今野 哲
2. 発表標題 非小細胞肺癌のmitotic slippageに対するDNA修復阻害の有用性についての基礎的検討
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Tsuji, Eiki Kikuchi, Yuta Takashima, Hajime Asahina, Junko Kikuchi, Naofumi Shinagawa, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Konno
2. 発表標題 Inhibition of DNA damage repair for mitotic slippage in non-small cell lung cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	菊地 順子  (Kikuchi Junko)  (40739637)	北海道大学・大学病院・特任助教    (10101)	

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
---------	---------