

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17173

研究課題名（和文）BET阻害によるDNA損傷修復阻害効果を用いた新たな肺癌治療の開発

研究課題名（英文）Development of a New Lung Cancer Therapy Using Inhibition of DNA Damage Repair by BET Inhibition

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：PTX耐性非小細胞肺癌細胞株H1299やPTX感受性非小細胞肺癌細胞株A549を用いて作成したPTX耐性株（A549-PR）にPTXを投与したところ、mitotic slippageが亢進しており、耐性機序としてmitotic slippageの関与が考えられた。これらの細胞株に対してPTXとNHEJ阻害効果のある薬剤を併用したところDNA2本鎖切断がより多く生じ、相乗的な抗腫瘍効果を認めた。NHEJ機構抑制はde novoのPTX耐性あるいはPTX獲得耐性を克服する手段となるかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌に対して使用されているPTXの耐性機序であるmitotic slippageによる細胞死の回避に対してDNA修復機構であるNHEJ機構の抑制が有効であることを示した初めての研究である。さらなる検討が必要だが、今後の肺癌治療の発展の一助となる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：H1299 cells were paclitaxel (PTX) resistance and exhibited an increased frequency of mitotic slippage upon PTX treatment. The newly generated PTX-resistant cells (A549-PR) were even more prone to mitotic slippage following PTX treatment. NHEJ inhibitors significantly augmented the PTX-induced DNA double-strand breaks and cytotoxicity in H1299 cells and A549-PR cells. NHEJ inhibition may overcome intrinsic or acquired PTX resistance resulting from mitotic slippage by synergistically increasing the cytotoxic effects of antimetabolic drugs in NSCLC.

研究分野：肺がん

キーワード：肺がん パクリタキセル DNA修復 非同末端結合 細胞周期

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

BET (bromodomain and extraterminal domain) はヒストンのアセチル基を認識し、転写伸長因子をプロモーター領域に動員することで RNA ポリメラーゼを活性化しており、様々な遺伝子の転写を促進させることができるエピジェネティック調節因子である。がんにおいては BET を阻害することで腫瘍促進遺伝子の発現が選択的に抑制され、抗腫瘍効果が得られることがこれまでに示されている。現在までに BET 阻害剤が肺癌を含めた多くの癌腫に対して有効であることが報告されており、BET 阻害剤に関する複数の臨床試験が現在進行中である。BET 阻害剤の抗腫瘍効果は *c-MYC* 癌遺伝子の転写抑制と関連することがこれまで多く報告されているが、*c-MYC* 癌遺伝子には非依存的であるとする報告もあり (Lenhart *et al. Mol Cancer Ther* 2015; Lockwood *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 2012)、詳細な作用機序はいまだ不明である。近年、BET 阻害が非常に重篤な DNA 損傷である DNA2 本鎖切断 (double-strand break: DSB) の修復を障害することで抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、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 を傷害する薬剤の効果を BET 阻害剤が増強するとする研究であり、その標的とする DSB 修復機構は相同組換え (homologous recombination: HR) である。HR は DNA 修復にあたり姉妹染色分体を必要とするため、その働きは細胞周期の S/G2 期に限定される。もう一つの DSB 修復機構である非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) 機構は 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。BET が NHEJ 機構にも関与していることは報告されている (Stanlie *et al. Mol Cell* 2014; Li *et al. Cell Rep* 2018) が、その機序やそれを利用した抗腫瘍治療戦略について検討しているものは少ない。我々は BET 阻害が NHEJ 機構を抑制することで WEE1 阻害剤による DSB を増強することを、NHEJ レポーターを導入した肺癌細胞株を用いて明らかにした (Takashima *et al. Int J Cancer* 2019)。NHEJ 阻害を抗癌治療に応用できれば、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。

### 2. 研究の目的

本研究は BET 阻害などによる DSB 修復抑制 (特に NHEJ 機構抑制) を利用した肺癌に対する新たな治療戦略の開発を目的としている。

### 3. 研究の方法

事前に作成していた NHEJ レポーターを導入した肺癌細胞株と HR レポーターを導入した肺癌細胞株を用いて、さまざまな抗腫瘍薬による DNA 傷害に対して BET 阻害剤が NHEJ および HR にどう影響するかを評価した結果、非小細胞肺癌細胞株に対するパクリタキセル (PTX) の効果とその耐性機序のひとつとして知られている mitotic slippage の関連に着目することにした。

非小細胞肺癌細胞株である A549 細胞、H1299 細胞、H1975 細胞、H520 細胞を用いた。薬剤の抗腫瘍効果の評価や 2 剤の相互作用については MTT 法で評価した。細胞周期の評価をプロピジウムイオダイド (PI) と抗リン酸化ヒストン H3 (pHH3) 抗体を用いたフローサイトメトリー法で行った。アポトーシスの評価はアネキシン V と PI を用いたフローサイトメトリー法および、抗 cleaved PARP 抗体を用いたウェスタンブロット法で行った。DSB の評価は抗  $\gamma$ H2AX 抗体を用いたウェスタンブロット法で行った。細胞分裂の評価はタイムラプス顕微鏡を用いた肉眼観察で行った。

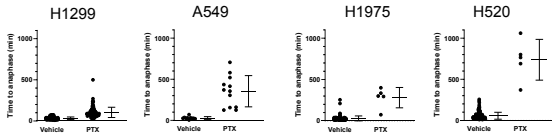
#### 4. 研究成果

H1299 は de novo の PTX 耐性であった。H1299 では PTX による mitotic arrest の効果が小さく、M 期停止の時間が短く、mitotic slippage がより多く起こっていた。BET 阻害剤である JQ1 や NHEJ 機構阻害剤である A-196 は H1299 において PTX と相乗的な併用効果を示したが、その他の細胞では併用効果は認めなかった。JQ1、A-196 は PTX との併用により H1299 に対して DSB およびアポトーシスを誘導し、post mitotic death を増加させ、細胞死までの時間を短縮した。

PTX 感受性非小細胞肺癌株である A549 を培養する際に培地に、低濃度の PTX を添加して PTX 耐性細胞 (A549-PR) を作成した。A549-PR では PTX により mitotic slippage が増加し、A-196 は PTX と相乗的な併用効果を示した。A549-PR に対して A-196 と PTX の併用は DSB およびアポトーシスを誘導した。

NHEJ 阻害は H1299 および A549-PR に対して、PTX との併用により相乗的な抗腫瘍効果を認められた。NHEJ 阻害は de novo の PTX 耐性あるいは PTX 獲得耐性を克服する手段となるかもしれない。

##### H1299 showed shorter mitotic arrest after PTX treatment



<Time from mitotic entry to anaphase>

Cell line	Vehicle (min)	PTX (min)
H1299	33.1 ± 16.2	105.0 ± 62.1
A549	29.1 ± 15.6	354.1 ± 181.9
H1975	28.5 ± 31.4	281.0 ± 109.6
H520	56.3 ± 41.9	737.0 ± 221.8

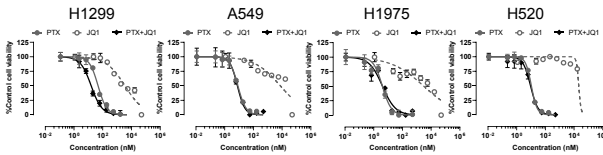
Mean, SD, n=3, \* p<0.05 (Dunnett's multiple comparisons test)

##### H1299 showed more frequent mitotic slippage after PTX treatment

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	

(Fisher's exact test)

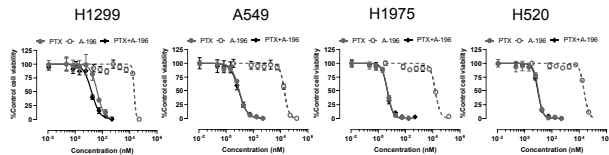
##### JQ1 significantly enhanced the PTX-induced cytotoxicity in H1299



<IC<sub>50</sub> of PTX ± 2 μM of JQ1 (nM)>

Cell line	PTX	PTX+JQ1	p value
H1299	47.7 ± 1.1	14.4 ± 0.9	<0.0001
A549	8.5 ± 0.7	7.1 ± 1.0	0.19
H1975	4.3 ± 0.4	6.6 ± 1.8	0.22
H520	11.0 ± 1.0	9.5 ± 0.2	0.17

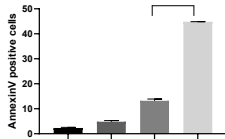
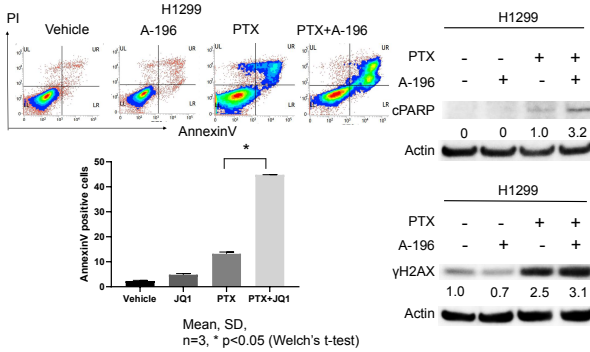
##### A-196 significantly enhanced the PTX-induced cytotoxicity in H1299



<IC<sub>50</sub> of PTX ± 2.5 μM of A-196 (nM)>

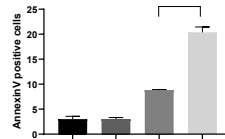
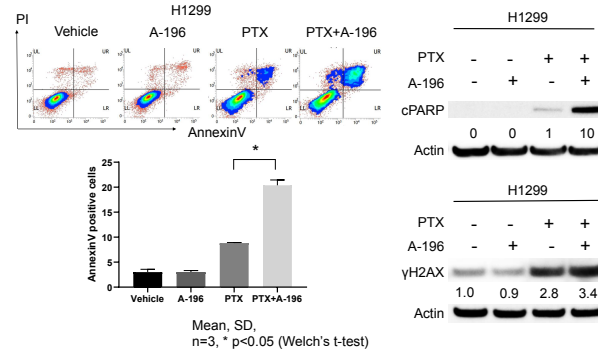
Cell line	PTX	PTX+A-196	p value
H1299	37.4 ± 2.9	18.2 ± 1.7	<0.01
A549	8.1 ± 0.8	6.8 ± 1.3	0.31
H1975	3.6 ± 1.0	3.9 ± 0.6	0.69
H520	8.9 ± 0.9	8.1 ± 0.8	0.39

##### JQ1 significantly enhanced the PTX-induced apoptosis and DSB in H1299



Mean, SD, n=3, \* p<0.05 (Welch's t-test)

##### A-196 significantly enhanced the PTX-induced apoptosis and DSB in H1299



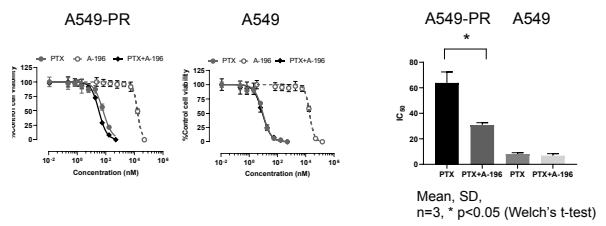
Mean, SD, n=3, \* p<0.05 (Welch's t-test)

**A549-PR showed more frequent mitotic slippage after PTX treatment**

Cell line	Treatment	Slippage/Total calls	p value
A549-PR	Vehicle	0/158	<b>0.03</b>
	PTX	<b>6/170</b>	
A549	Vehicle	0/113	>0.99
	PTX	0/158	

(Fisher's exact test)

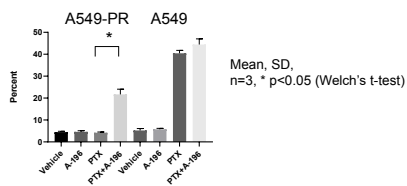
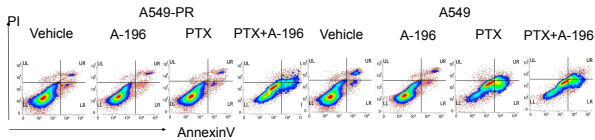
**A-196 significantly enhanced the PTX-induced cytotoxicity in A549-PR**



< IC<sub>50</sub> of PTX ± 2.5 μM of A-196 (nM) >

Cell line	PTX	PTX+A-196	p value
A549-PR	63.8 ± 7.0	<b>30.8 ± 1.5</b>	<b>0.02</b>
A549	8.1 ± 0.8	6.8 ± 1.3	0.31

**A-196 significantly enhanced the PTX-induced apoptosis and DSB in A549-PR**



	A549-PR				A549			
	PTX -	PTX +	A-196 -	A-196 +	PTX -	PTX +	A-196 -	A-196 +
γH2AX	1.0	0.9	3.7	9.6	2.5	2.9	10.5	11.8
cPARP	0	0	0	1	0	0	0.5	3.8
Actin	[Western blot bands]							

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 1件）

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

1. 発表者名 辻 康介、菊地 英毅、高島 雄太、庄司 哲明、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

〔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
---------	---------