



| | |
|------------------|---|
| Title | シスプラチン耐性肺癌の治療標的としての免疫プロテアソーム解析 |
| Author(s) | 庄司, 哲明 |
| Citation | 北海道大学. 博士(医学) 甲第14072号 |
| Issue Date | 2020-03-25 |
| DOI | 10.14943/doctoral.k14072 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/78548 |
| Type | theses (doctoral) |
| Note | 配架番号 : 2537 |
| File Information | Tetsuaki_Shoji.pdf |



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

シスプラチン耐性肺癌の治療標的としての

免疫プロテアソーム解析

(Evaluating the immunoproteasome as a potential
therapeutic target in cisplatin-resistant small cell
and non-small cell lung cancer)

2020年3月

北 海 道 大 学

庄 司 哲 明

学 位 論 文

シスプラチン耐性肺癌の治療標的としての

免疫プロテアソーム解析

(Evaluating the immunoproteasome as a potential
therapeutic target in cisplatin-resistant small
and non-small cell lung cancer)

2020年3月

北 海 道 大 学

庄 司 哲 明

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 | 5 頁 |
| 緒言 | 7 頁 |
| 実験方法 | 15 頁 |
| 実験結果 | 22 頁 |
| 考察 | 35 頁 |
| 総括および結論 | 38 頁 |
| 謝辞 | 39 頁 |
| 利益相反 | 40 頁 |
| 引用文献 | 41 頁 |

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に投稿中である。

Cancer Chemotherapy and Pharmacology

本研究は以下の学会で発表した。

1. Tetsuaki Shoji, Eiki Kikuchi, Junko Kikuchi, Makie Maeda, Yuta Takashima, Megumi Furuta, Hirofumi Takahashi, Ichiro Kinoshita, Hirotooshi Dosaka-Akita, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Konno
Immunoproteasome as a potential therapeutic target in cisplatin-resistant small and non-small cell lung cancer
World Conference on Lung Cancer 2019, September 9th, 2019, Barcelona, Spain
2. Tetsuaki Shoji, Eiki Kikuchi, Junko Kikuchi, Yuta Takashima, Megumi Furuta, Ichiro Kinoshita, Hirotooshi Dosaka-Akita, Jun Sakakibara-Konishi
Analysis of immunoproteasome as a potential therapeutic target in cisplatin-resistant small and non-small cell lung cancer
The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 26th, 2019, Kyoto, Japan
3. 庄司 哲明、菊地 英毅、菊地 順子、前田 真希枝、高島 雄太、古田 恵
高橋 宏典、木下 一郎、秋田 弘俊、榊原 純、今野 哲
シスプラチン耐性肺癌の治療標的としての免疫プロテアソームの検討
第 60 回日本肺癌学会学術総会、2019 年 12 月 8 日、大阪、日本

要旨

【背景と目的】 肺癌は癌関連死亡原因の第一位を占め、今後も世界的に増加が予想される未だ予後不良な疾患であり、より効果的な治療法の開発が求められる。

今日、肺癌に対し分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤などの新たな治療薬が実用化されてきたが有効な症例は限られる。分子標的治療や免疫チェックポイント阻害治療の対象とならない場合の一次治療、分子標的治療や免疫チェックポイント阻害治療に抵抗性を示した場合の二次治療、あるいは分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬との併用療法として、殺細胞性抗癌剤は今日でも幅広く使用される。プラチナ製剤は殺細胞性抗癌剤のキードラッグとされるが、数ヶ月程度の使用で耐性が誘導される。したがってプラチナ製剤への耐性の克服は重要な課題である。

シスプラチンは代表的なプラチナ製剤であり、その作用機序はDNA傷害、酸化ストレス、小胞体ストレスを介したアポトーシス誘導などとされる。癌細胞がシスプラチン耐性をおこす機序として、細胞内への移行の低下、細胞外への排出の増加、核酸の修復機構の強化、細胞内でのシスプラチンの無毒化、の4つが主に考えられている。また、シスプラチン耐性癌細胞は好気呼吸が活性化しており細胞内活性酸素種量が上昇しているが、細胞内抗酸化物質を増加させることより活性酸素種による酸化ストレスから細胞を保護している。

ユビキチン・プロテアソーム系は真核細胞の代表的なタンパク質分解機構である。プロテアソームは多数のサブユニットからなる酵素複合体であり、ユビキチンにより標識されたタンパク質を分解する。構成型プロテアソームはプロテアーゼ活性を有する構成型サブユニット PSMB5/PSMB6/PSMB7 を持ち、細胞内のタンパク質の恒常性を維持している。インターフェロン γ などの炎症性サイトカインの刺激により構成型サブユニットが免疫プロテアソームサブユニット PSMB8/PSMB9/PSMB10 に変化した免疫プロテアソームが発現する。免疫プロテアソームは免疫反応を活性化し、ウイルス感染への応答や自己免疫性疾患の発症に関与する。一方で酸化ストレスや細胞増殖、代謝などによるストレスも免疫プロテアソームを誘導し、その際免疫プロテアソームは構成型プロテアソームと共に細胞内外からのストレスで誘導された細胞内の不要なタンパク質分解を行い恒常性維持に寄与する。

プロテアソーム阻害剤はプロテアソームのプロテアーゼ活性を阻害し、小胞体ストレス誘導や細胞周期停止を通じて抗腫瘍効果を発揮する。免疫プロテアソームサブユニットに選択性が高いカーフィルゾミブ (CFZ) や PR957 は免疫プロテアソーム阻害剤と呼ばれる。プロテアソーム阻害剤は多発性骨髄腫では既に臨床使用されているが、固形癌での臨床応用は進んでいない。肺癌に対する臨床試験では奏効割合は低いもの

の、プロテアソーム阻害剤が効果を示す症例が存在すること、プラチナ製剤への耐性獲得がプロテアソーム阻害剤への感受性に影響を与える可能性を示唆している。

そこで我々は、シスプラチン耐性肺癌細胞におけるプロテアソームサブユニット発現を評価し、CFZ および PR957 の有効性を検討した。また、免疫プロテアソーム阻害剤の有効性を予測する因子を探索した。

【材料と方法】 3種類の非小細胞肺癌細胞株（A549、H1299、H1975）および2種類の小細胞肺癌細胞株（SBC3、SBC5）を使用した。培養液に低濃度のシスプラチンを添加し3ヶ月間継代培養を続けシスプラチン耐性細胞を作成した。各細胞のシスプラチン、CFZ、PR957への感受性をMTT法を用いて評価した。細胞内活性酸素種量を2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetateを用いて評価した。プロテアソームサブユニットの発現を定量的逆転写PCR法、ウエスタンブロット法を用いて評価した。プロテアソームのキモトリプシン様プロテアーゼ活性を蛍光基質 Suc-LLVY-AMCを用いて評価した。CFZのアポトーシス誘導および細胞周期に対する効果をフローサイトメトリー法で評価した。CFZが分裂期細胞死（mitotic catastrophe）を誘導するかどうかを蛍光免疫染色法を用いて評価した。

【結果】 作成した5種類のシスプラチン耐性細胞は親細胞に対しシスプラチンの感受性が低下し、細胞内活性酸素種量が高く、また5種類中4種類で免疫プロテアソームサブユニット PSMB8、PSMB9の発現が亢進していた。

H1299およびSBC3ではシスプラチン耐性細胞は親細胞に比べ有意に免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進していたが、その他の細胞株ではシスプラチン耐性化により免疫プロテアソームへの感受性が低下する傾向にあった。免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進したH1299、SBC3ではシスプラチン耐性細胞は親細胞に対してキモトリプシン様活性が2.9ないし3.5倍に亢進していたが、その他の細胞株ではシスプラチン耐性細胞のキモトリプシン様活性の亢進は親細胞の約1.4程度の上昇にとどまった。

H1299およびSBC3のシスプラチン耐性細胞ではCFZ投与によりアポトーシスが誘導された。H1299およびSBC3では親細胞、シスプラチン耐性細胞ともに細胞周期のG2/M期の割合が上昇した。その他のシスプラチン耐性細胞ではCFZによるG2期およびM期の増加は親細胞と比較して減弱したか変化がみられなかった。またH1299のシスプラチン耐性株ではCFZ投与により分裂期細胞死が誘導された。

【考察】 肺癌細胞株5株中2株においてシスプラチン耐性獲得後に免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進することを示した。これはプロテアソーム阻害剤が効果を示す肺癌症例が少数ではあるものの存在すること、プロテアソーム阻害剤が効果を示す肺癌症例がプラチナ製剤耐性例にみられることを示す臨床試験の結果を支持する結果と考える。

シスプラチン耐性肺癌細胞に対する免疫プロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果は、G2/M 期の増加および細胞分裂死を介したアポトーシス誘導によると考えられた。免疫プロテアソーム阻害剤の感受性が亢進した細胞株ではキモトリプシン様活性が大きく上昇しており、シスプラチン耐性獲得後にキモトリプシン様活性が大きく亢進することが免疫プロテアソーム阻害剤の有効性を予測するマーカーとなりうると考えられた。

【結論】 非小細胞および小細胞肺癌において、シスプラチン耐性化に伴い免疫プロテアソームに対する感受性が亢進する細胞株が存在する。シスプラチン耐性獲得後にキモトリプシン様活性が大きく亢進している肺癌では免疫プロテアソーム阻害剤が効果を示す可能性があるため、症例を適切に選択できれば免疫プロテアソーム阻害剤はシスプラチン耐性肺癌に対する治療選択肢の一つとなりうる。

略語表

本文中および図表中で使用した略語は以下のとおりである。

| | |
|----------------|---|
| ALK | Anaplastic lymphoma kinase |
| APC | Anaphase-promoting complex |
| ATF | Activating transcription factor |
| ATP7B | Copper-transporting <i>P-type</i> ATPase |
| BRAF | V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 |
| BTZ | Bortezomib |
| CDK1 | Cyclin dependent kinase 1 |
| CFZ | Carfilzomib |
| CHOP | C/EBP homologous protein |
| CR | Cisplatin-resistant |
| CTR | Copper transporter protein |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DCFDA | 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| ERCC1 | Excision repair cross-complementation group 1 |
| ERO1- α | Endoplasmic reticulum-resident oxidase |
| FBS | Fatal bovine serum |
| HSP70 | 70 kDa heat-shock protein |
| IC50 | Half maximal inhibitory concentration |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IPI | Immunoproteasome inhibitor |
| IRE1 | Inositol-requiring enzyme 1 |
| LC3 | Microtubule-associated protein light chain 3 |
| MEM | Minimum essential media |
| MRP2 | Multidrug resistance-associated protein 2 |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| NER | Nucleotide excision repair |
| NTRK | Neurotrophic receptor tyrosine kinases |
| PARP | Poly (ADP-ribose) polymerase |
| PBS | Phosphate-buffered saline |

| | |
|---------------|---|
| PD-1 | Programmed cell death 1 |
| PD-L1 | Programmed cell death ligand 1 |
| PERK | Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase |
| PI | Propidium iodide |
| PR | Partial response |
| PSMA | Proteasome subunit α |
| PSMB | Proteasome subunit β |
| qRT-PCR | Quantitative reverse transcription PCR |
| ROS1 | V-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1 |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute medium |
| SD | Stable disease |
| Stat-1 | Signal transducer and activator of transcription-1 |
| TBST | Tris-buffered saline with Tween 20 |
| TNF- α | Tumor necrosis factor- α |
| XPF | Xeroderma pigmentosum complementation group F |

緒言

1) 肺癌について

肺癌は、癌関連死亡原因の第一位を占め、世界では毎年約 180 万人が罹患し、約 160 万人が死亡すると報告される。近年先進国の男性の罹患率は減少傾向であるものの、世界全体としては今後も増加が予想されている (Torre et al., 2015)。日本においては毎年約 11 万人が肺癌に罹患し、約 7 万 4000 人が肺癌にて死亡している。肺癌による死亡は全悪性新生物死亡の原因として最多であり、男性の第 1 位、女性の第 2 位である (国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」より、https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html, 2019 年 11 月 13 日アクセス)。近年、肺癌に対する治療は大きく進歩しているが未だ予後不良であり、より効果的な治療法の開発が求められる。

肺癌は病理学的に非小細胞肺癌と小細胞肺癌に大別され、約 85%を非小細胞肺癌が占める (Herbst et al., 2008)。近年、非小細胞肺癌に対する薬物療法は飛躍的な発展を遂げている。1990 年代以降、腫瘍細胞の増殖や生存に強く影響を与えるドライバー遺伝子が同定され、それを標的とした分子標的薬が開発された。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: *EGFR*) の変異に対する EGFR 阻害薬、未分化リンパ腫キナーゼ (anaplastic lymphoma kinase: *ALK*) 融合遺伝子に対する ALK 阻害薬の有効性が示され (Kwak et al., 2010; Maemondo et al., 2010)、さらに最近では V-ros トリ UR2 肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ 1 (V-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1: *ROS1*) 転座や V-raf マウス肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ B1 (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1: *BRAF*) 変異に対する分子標的薬の臨床的な有効性が証明された (Planchard et al., 2017; Shaw et al., 2014)。また、肺癌を含めた固形癌に対して神経栄養受容体チロシンキナーゼ (neurotrophic receptor tyrosine kinase: *NTRK*) 融合遺伝子を標的とした薬剤も臨床使用されている (Drilon et al., 2017)。これらの分子標的治療の対象となった症例の生存期間中央値は 2 年半を越えるとの報告もあり (Maemondo et al., 2010; Solomon et al., 2018)、今後も新たな分子標的薬の開発により予後の改善が期待される。しかし、これらの分子標的治療の対象となるのは非小細胞肺癌の 30%程度に留まり (Arbour and Riely, 2019)、また分子標的治療により奏効が得られても大半の症例では耐性を獲得して再増悪する。

さらに近年、腫瘍免疫についての研究の進歩から癌細胞による免疫抑制機構を標的とした免疫チェックポイント阻害剤の開発が進んでいる。非小細胞肺癌においては programmed cell death 1 (PD-1) や programmed cell death ligand 1 (PD-L1) に対する抗体療法の有効性が報告され (Borghaei et al., 2015; Brahmer et al., 2015; Mok

et al., 2019; Rittmeyer et al., 2017)、2015 年より日本および米国などで保険承認されている。抗 PD-1 抗体ペムブロリズマブによる治療の PD-L1 発現未治療非小細胞肺癌に対する効果は推定 5 年生存率 23.2%と報告され (Garon et al., 2019)、長期生存が実現されつつある。小細胞肺癌においても抗 PD-1 抗体の有効性が報告され (Antonia et al., 2016)、米国では 2018 年に保険承認されている。しかしこれらの免疫チェックポイント阻害剤の奏効割合は、初回治療として使用された場合は約 30% (Mok et al., 2019)、二次治療以降に使用された場合は 10-20% であり (Antonia et al., 2016; Borghaei et al., 2015; Brahmer et al., 2015; Rittmeyer et al., 2017)、治療の恩恵を受けられない患者も多い。また治療効果を予測するバイオマーカーの探索も不十分である。

分子標的治療や免疫チェックポイント阻害治療の対象とならない場合の一次治療、分子標的治療や免疫チェックポイント阻害治療に抵抗性を示した場合の二次治療、あるいは分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬との併用療法として、殺細胞性抗癌剤は今日でも幅広く使用される。特に 1970 年代に登場したシスプラチン、あるいは 1980 年代に登場したカルボプラチンといったプラチナ製剤がキードラッグである。非小細胞肺癌に対しては、1990 年代に臨床導入されたドセタキセル、ゲムシタビン、ビンOREルビン、イリノテカンあるいはパクリタキセルといった「第 3 世代抗癌剤」とプラチナ製剤の併用化学療法の有効性が報告され、今日まで標準治療のひとつである。このプラチナ併用化学療法が初回治療として用いられた場合の奏効割合は 30% 程度、生存期間中央値は約 10-12 ヶ月程度、5 年生存率は数% 以下である (Ohe et al., 2007; Schiller et al., 2002)。小細胞肺癌に対しては 1980 年代以降に様々な臨床試験が行われ、シスプラチン・エトポシド併用化学療法が標準治療である (Pujol et al., 2000)。日本においてはシスプラチン・イリノテカン併用療法がシスプラチン・エトポシド併用療法よりも有意に予後を延長したと報告された (Noda et al., 2002)。このように今日も多く of 肺癌患者がプラチナ製剤を含む治療を受けているが、プラチナ製剤に対しても数ヶ月程度の使用で耐性が誘導される (Amable, 2016)。このためプラチナ製剤への耐性の克服は重要な課題である。

2) シスプラチンについて

シスプラチンは代表的なプラチナ製剤である。物質名はシスジアミンジクロロ白金 (II) であり白金錯体に分類される。中心金属が白金で配位子がアンミンと塩化物イオンである ($\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$)。薬理作用を発現するのはシス型だけでトランス型は細胞毒性を持たない (Amable, 2016)。

シスプラチンの抗腫瘍効果は DNA 傷害作用が中心であると考えられてきた。シスプラチンは copper transporter protein (CTR) 1 や CTR2 を通して細胞内に移行する。

細胞内は塩化物イオン濃度が低く、白金に配位していた塩化物イオンが遊離して水分子に置換され、その水分子から水素イオンが電離するため DNA への結合能を有する。DNA の 4 種の核酸塩基はいずれも金属イオンと配位結合する能力があるが、白金錯体はグアニン塩基の 7 位の N に優先的に結合する。さらに DNA に結合したシスプラチンの約 60% は隣り合ったグアニン塩基に一本鎖交叉結合する。このようにして DNA に重金属が結合することで DNA の複製が阻害される。DNA 傷害は Bcl-2 ファミリータンパクの内、アポトーシス促進性タンパクである Bax や Bak を介してミトコンドリアからのシトクローム C の放出を促し、カスパーゼ 9 活性化を起点としてカスパーゼカスケードを活性化し、アポトーシスを誘導する (Amable, 2016; Basu and Krishnamurthy, 2010)。

近年、DNA 傷害以外の作用機序も報告されている。その一つが活性酸素種を通じた細胞毒性である。シスプラチンは抗酸化物質であるグルタチオンと結合する他、抗酸化酵素であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼを阻害することで細胞内活性酸素種を増加させ、ミトコンドリア膜電位低下を介した代謝障害やアポトーシスを誘導する (Cocetta et al., 2019; Karasawa and Steyger, 2015)。

また、小胞体ストレスを通じた抗腫瘍効果も報告されている (Martins et al., 2011)。小胞体はタンパク質の折りたたみや修飾、カルシウム貯蔵を担う細胞小器官である。化学物質暴露、遺伝子変異、ウイルス感染などにより細胞内に生じた変性タンパクは小胞体に蓄積し、小胞体ストレス反応が誘導され、遺伝子の翻訳量を減少させることでのタンパク量の低下、分子シャペロンを増加することによる折りたたみ効率の向上、オートファジーの活性化による変性タンパク質の除去を行う。しかしこのような恒常性維持機能を超えた場合には細胞のアポトーシスが誘導される。シスプラチン投与によりユビキチン化タンパクの蓄積、C/EBP homologous protein (CHOP) などの小胞体ストレス関連タンパクの発現亢進、カスパーゼ 12 を起点としたアポトーシス誘導が報告されている (Xu et al., 2014)。また、シスプラチンの小胞体ストレスを通じたアポトーシス誘導は脱核した細胞でも観察されることから DNA 傷害とは独立した作用機序であると考えられている (Xu et al., 2014; Yu et al., 2008)。

3) シスプラチン耐性について

シスプラチンに長期に暴露されると癌細胞は耐性を獲得する。シスプラチン耐性機序として以下の 4 点が考えられている。

1. 細胞内への移行の低下

シスプラチンの細胞への移行を促す CTR1 の発現の低下が起こり細胞内へのシスプラチン移行が低下する (Zisowsky et al., 2007)。

2. 細胞外への排出の増加

Copper-transporting *P-type* ATPase (ATP7B) や multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) が高発現し、細胞外へのシスプラチンの排出を強化する (Komatsu et al., 2000; Taniguchi et al., 1996)。

3. 核酸の修復機構の強化

シスプラチンに傷害された DNA は主にヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair:NER) によって修復される。Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) と Xeroderma pigmentosum complementation group F (XPF) のヘテロダイマーが DNA の損傷部位を除去することが NER の律速段階と考えられているが、シスプラチン耐性癌細胞では ERCC1 と XPF が高発現すると報告される (Q et al., 2000)。

4. 細胞内でのシスプラチンの無毒化

シスプラチンはチオール基をもつ化合物と結合して DNA との結合能を失う。チオール基をもつ抗酸化物質のグルタチオンやメタロチオネインが増加することでシスプラチンの細胞毒性が低下する (Reedijk, 1999)。また、グルタチオンとの反応生成物は MRP2 を介して細胞内に排出される (Ishikawa and Ali-Osman, 1993)。

また、シスプラチン耐性癌細胞では代謝に変化がみられる。癌細胞は有酸素下でも解糖系による嫌氣的な ATP 産生が優位になっており、これはワールブルグ効果として知られる (Garber, 2006)。しかし、シスプラチン耐性癌細胞はミトコンドリアを利用した好気呼吸が活性化しており細胞内活性酸素種量が上昇している。活性酸素種による酸化ストレスから細胞を保護するのも抗酸化物質は役立っている (Wangpaichitr et al., 2012; Wangpaichitr et al., 2017)。シスプラチン耐性を獲得した癌細胞は耐性を獲得する前の細胞に比較し増殖速度が緩徐であるが、この変化に活性酸素種が関わっていることも報告されている (Fang et al., 2017; Wangpaichitr et al., 2017)。

これらの知見に基づいた治療法の研究が進んでいる。サラゾスルファピリジンはシスチントランスポーター xCT による細胞内へのシスチン輸送を抑制する。シスチンはグルタチオンの前駆物質であるため、サラゾスルファピリジン投与により細胞内のグルタチオンが低下し、シスプラチンの無毒化や反応生成物の細胞外への排出および活性酸素種の除去が低下する (Chen et al., 2009)。非小細胞肺癌においてサラゾスルファピリジンとシスプラチン・ペメトレキセド併用療法の I 相試験が行われ、奏効割合が 26.7%、無増悪生存期間の中央値が 11.7 ヶ月と報告され (Otsubo et al., 2017)、過去に報告されているシスプラチン・ペメトレキセド併用療法の無増悪生存期間の中央値 4.0-5.3 ヶ月よりも良好な結果であった (Barlesi et al., 2011; Paz-Ares et al., 2012; Scagliotti et al., 2008)。サラゾスルファピリジンがシスプラチン耐性機序を抑制し奏効期間を延長させた可能性がある。

4) ユビキチン・プロテアソーム系について

ユビキチン・プロテアソーム系は真核細胞における主要なタンパク質分解機構の一つである。細胞内において役割を終えたタンパク質や変性したタンパク質を分解し、細胞の恒常性維持に寄与している。オートファジー・リソソーム系が選択性の低いタンパク質分解機構であるのに対し、ユビキチン・プロテアソーム系では分解の標的となるタンパク質の選択性は厳密に制御されている。3種類のユビキチン活性化酵素 E1、E2、E3 が ATP 依存的にタンパク質にユビキチンを付加する。GTPase や細胞骨格タンパク質はモノユビキチン化されることで細胞内での局在が調節されるが、ポリユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームの一部である 19S 複合体に認識され分解の対象となる (Budenholzer et al., 2017)。

プロテアソームはプロテアーゼ活性を持った巨大な酵素複合体である。プロテアーゼ活性を持つ 20S プロテアソームの両端に調節ユニットである 19S 複合体が結合した 26S プロテアソームが標準的な状態である。20S プロテアソームはサブユニット proteasome subunit α (PSMA) 1~7 (α 1~7) の 7 分子から構成される α リングが 2 つと、サブユニット proteasome subunit β (PSMB) 1~7 (β 1~7) の 7 分子から構成される β リングが 2 つの計 4 つのリングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順に積み重なった構造をしている。インターフェロン γ (interferon- γ :IFN- γ)、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α :TNF- α) などの炎症性サイトカインによる刺激に反応してシグナル伝達兼転写活性化因子 (signal transducer and activator of transcription-1:STAT1) などの転写因子が活性化されると、免疫プロテアソームサブユニット PSMB8 (β 5i)、PSMB9 (β 1i)、PSMB10 (β 2i) が発現し、それぞれが PSMB5 (β 5)、PSMB6 (β 1)、PSMB7 (β 2) と置き換わったプロテアソームが発現する (Aki et al., 1994; Hallermalm et al., 2001)。PSMB5、PSMB6、PSMB7 はそれぞれキモトリプシン様、カスパーゼ様、トリプシン様のプロテアーゼ活性を持つ。また PSMB8、PSMB9 はキモトリプシン様、PSMB10 はトリプシン様活性を持つ。PSMB5、PSMB6、PSMB7 を含むプロテアソームは構成型プロテアソーム、PSMB8、PSMB9、PSMB10 を含むプロテアソームは免疫プロテアソームと呼ばれる。免疫プロテアソームが切断したポリペプチドは殆どの C 末端側が中性および塩基性となり、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex:MHC) クラス I 分子に親和性が高い。したがって免疫プロテアソームは炎症性サイトカインの刺激に反応して MHC クラス I を介した免疫系の活性化に寄与すると考えられ、サイトメガロウイルスやインフルエンザなど感染への応答、また関節リウマチや炎症性腸疾患などの自己免疫性疾患の発症にも関わっている (Angeles et al., 2012; Tanaka and Kasahara, 1998)。

一方で、熱刺激、高濃度グルコースなどの細胞外からのストレス、酸化ストレス、代謝や増殖などに関連した細胞内のストレスも免疫プロテアソーム発現を誘導する

(Callahan et al., 2006; Pickering et al., 2010; Rouette et al., 2016; Thomas et al., 2007; Zu et al., 2010)。その際免疫プロテアソームは構成型プロテアソームと共に細胞内外からのストレスで誘導された細胞内の不要なタンパク質分解を行い恒常性維持に寄与している(Nathan et al., 2013)。

5) 免疫プロテアソーム阻害剤について

プロテアソーム阻害剤および免疫プロテアソーム阻害剤はプロテアソームのタンパク質分解を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮する薬剤である(Gandolfi et al., 2017; Roeten et al., 2018)。ボルテゾミブ (Bortezomib:BTZ) は PSMB5、PSMB8 を中心に幅広くプロテアソームを阻害するプロテアソーム阻害剤である(Gandolfi et al., 2017)。カーフィルゾミブ (Carfilzomib:CFZ) は PSMB8 を強く阻害し、PSMB5 を部分的に阻害する(Parlati et al., 2009)。PR957 は PSMB8 を選択的に阻害する(Muchamuel et al., 2009)。CFZ や PR957 のような免疫プロテアソームに特異性の高いプロテアソーム阻害剤は免疫プロテアソーム阻害剤と呼ばれる。

プロテアソーム阻害剤の作用機序は主に小胞体ストレス誘導と細胞周期停止とされる(Gandolfi et al., 2017; Roeten et al., 2018)。70 kDa 熱ショックタンパク質(heat-shock protein 70:HSP70)の一種である BiP は小胞体ストレス反応に関係する各種の小胞体膜貫通型タンパク質に結合し、これらを不活化している。プロテアソーム活性が阻害されると、分解されずに小胞体に蓄積したタンパク質が BiP と結合する。その後 BiP が小胞体膜貫通型タンパク質から遊離し、小胞体ストレス反応が誘導される。小胞体ストレス反応は inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) 経路、double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK) 経路、activating transcription factor (ATF) 6 経路の 3 つに分類される。IRE1 経路では、BiP から遊離した IRE1 が二量体を形成して自己リン酸化することによって活性化され、Bcl-2 ファミリーの抗アポトーシスタンパク質の mRNA を分解する。PERK 経路では、BiP から遊離した PERK が二量体を形成しトランス自己リン酸化して活性化され、eIF2 α をリン酸化する。リン酸化 eIF2 α は転写因子として ATF4 を発現させる。ATF6 経路では、ATF6 が BiP から遊離するとゴルジ体に移動し site 1 プロテアーゼと site 2 プロテアーゼに切断され、DNA 結合能を有するようになる。ATF4 と ATF6 は共同して転写因子として働き CHOP を発現させる。CHOP は Bcl-2 ファミリーのアポトーシス促進性タンパク質の活性化と抗アポトーシスタンパク質の不活化を介してアポトーシスを誘導する(Nikesitch et al., 2018)。また、CHOP は endoplasmic reticulum-resident oxidase (ER α) を誘導して酸化ストレスにより細胞を障害する(Marciniak et al., 2004)。

プロテアソーム阻害剤および免疫プロテアソーム阻害剤による細胞周期停止の機序はまだ十分に解明されていないが、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1 として知ら

れる p21 の亢進による G2/M 期での細胞周期停止の機序が報告されている (Ling et al., 2003; Zhang et al., 2016)。M 期から G1 期への移行の障害は分裂期細胞死 (mitotic catastrophe) を誘導する (Gu et al., 2017; Strauss et al., 2007)。

BTZ および CFZ は多発性骨髄腫の治療に高い効果が証明され臨床使用されている。多発性骨髄腫細胞では γ グロブリン産生が亢進しているためプロテアソーム阻害により細胞内にタンパク質が蓄積しやすくプロテアソーム阻害剤および免疫プロテアソーム阻害剤の感受性が良好であると考えられている (Gandolfi et al., 2017)。再発多発性骨髄腫の患者において BTZ 療法はデキサメサゾン療法と比較し有意に無増悪生存期間を延長した (6.2 ヶ月 vs 3.5 ヶ月、 $p < 0.001$) (Richardson et al., 2005)。また再発・難治性多発性骨髄腫患者において、CFZ・デキサメサゾン併用療法は BTZ・デキサメサゾン療法と比較し有意に全生存期間を延長している (47.6 ヶ月 vs 40.0 ヶ月、 $p = 0.01$) (Dimopoulos et al., 2017)。しかし、固形癌においては、前臨床での効果が報告されているものの、臨床試験においては有効性が証明されていない (Roeten et al., 2018)。

肺癌における I 相もしくは II 相試験でもプロテアソーム阻害剤は奏効割合が低く有効性を証明するには至っていないが、少数ながら著効する症例が報告されている。CFZ の I/II 相試験において、すでに 6 次治療まで受けている小細胞肺癌患者 1 例が CFZ により 2 年以上にわたり部分奏効 (partial response: PR) が維持された。また、非小細胞肺癌患者 1 例において 10 ヶ月以上にわたり安定 (stable disease: SD) が維持された (Papadopoulos et al., 2013)。BTZ の小細胞肺癌を対象とした II 相試験においては、プラチナ併用化学療法に感受性を示した 28 例には効果がみられた症例はいなかったが、プラチナ併用化学療法抵抗性の 28 例では 1 例で PR がみられた (Lara et al., 2006)。また、*KRAS* G12D 変異をもつ非小細胞肺癌患者 16 例に対する II 相試験において、カルボプラチン併用化学療法既治療の 1 例で著明な腫瘍縮小がみられた。 (Drilon et al., 2019)。これらの症例はプロテアソーム阻害剤が効果を示す肺癌症例が少数ではあるものの存在すること、プラチナ製剤への耐性獲得がプロテアソーム阻害剤への感受性に影響を与える可能性を示唆している。

6) 本研究の仮説

シスプラチン耐性を獲得した肺癌細胞は、度重なるシスプラチン暴露による外的なストレスおよび好気性代謝亢進による酸化ストレスという内的なストレスにより免疫プロテアソームが活性化しており、免疫プロテアソームに恒常性維持を依存している。したがってシスプラチン耐性肺癌において免疫プロテアソームの阻害は有効な治療法となりうる。

7) 本研究の目的

シスプラチン耐性肺癌細胞におけるプロテアソームサブユニット発現を評価し、免疫プロテアソーム阻害剤の有効性を検討する。また、免疫プロテアソーム阻害剤の有効性を予測する因子を探索する。

実験方法

細胞株と薬剤

細胞株は以下の3種類の非小細胞肺癌細胞株と2種類の小細胞肺癌細胞株を用いた。非小細胞肺癌細胞株は American Type Culture Collection (米国バージニア州マナサス) から、小細胞肺癌細胞株は Japanese Collection of Research Bioresources 細胞バンク (東京都) からそれぞれ購入した。

A549、H1299、H1975：非小細胞肺癌細胞株

SBC3、SBC5：小細胞肺癌細胞株

細胞の培養には、非小細胞肺癌細胞株はローズウェルパーク記念研究所培地 (Roswell Park Memorial Institute medium: RPMI)、小細胞肺癌細胞株は最小必須培地 (minimum essential media: MEM) を使用した。いずれの培地にも 10%の牛胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS) を添加し、5%CO₂ 下の 37°C 湿潤環境で培養した。

シスプラチンは日本化薬 (東京都)、免疫プロテアソーム阻害剤 CFZ、PR957 はアドックバイオサイエンス社 (米国カリフォルニア州アーバイン) から購入した。

シスプラチン耐性肺癌細胞株の樹立

非小細胞肺癌および小細胞肺癌を培養する際に培地に低濃度のシスプラチンを添加してシスプラチン耐性を誘導し、シスプラチン耐性細胞を作成した。シスプラチン濃度は 0.15 μmol/L から開始し、2.0 μmol/L まで漸増した。その後、2.0 μmol/L で3ヶ月間以上培養して得られた細胞をシスプラチン耐性細胞として使用した。

得られたシスプラチン耐性細胞は、親細胞の名称の後に ddpR を付して命名した。シスプラチン耐性非小細胞肺癌細胞 A549ddpR、H1299ddpR、H1975ddpR はそれぞれ親細胞 A549、H1299、H1975 から作成した。シスプラチン耐性小細胞肺癌細胞 SBC3ddpR、SBC5ddpR はそれぞれ親細胞 SBC3、SBC5 から作成した。

薬剤の抗腫瘍効果の測定

薬剤の抗腫瘍効果を評価するために MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法を用いて細胞増殖抑制効果を測定した。96 ウェルプレートに細胞を散布した。1 ウェルあたりの散布細胞数は A549:1000 個、H1299:1000 個、H1975:1500 個、SBC3:3000 個、SBC5:3000 個、A549ddpR:2000 個、H1299ddpR:2000 個、H1975:2500 個、SBC3ddpR:5000 個、SBC5ddpR:5000 個とした。一晚培養後、濃度勾配をつけてシスプラチン、CFZ、PR957 を添加し、72 時間培養した。MTT 溶液 (プロメガ社、米国ウィスコンシン州マディソン) を各ウェルに 10 μL 添加し、その4時間後に Solubilization Solution/Stop Mix (プロメガ社) 75 μL を添加し、Varioskan

Flash (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、米国マサチューセッツ州ウォルサム) を用いて吸光度を測定した。また、各薬剤の 50%阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration : IC50) を GraphPad Prism v7.0 (グラフパッド・ソフトウェア社、米国カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて算出した。

細胞増殖速度の測定

肺癌細胞の増殖速度を MTT 法を用いて測定した。96 ウェルプレートに細胞を散布した。1 ウェルあたりの散布細胞数は A549、A549ddpR : 1000 個、H1299、H1299ddpR : 1000 個、H1975、H1975ddpR : 1000 個、SBC3、SBC3ddpR : 3000 個、SBC5、SBC5ddpR : 3000 個とした。0、24、48、72、96 時間培養した。それぞれに MTT 溶液 (プロメガ社) を各ウェルに 10 μ L 添加し、その 4 時間後に Solubilization Solution/Stop Mix (プロメガ社) 90 μ L を添加し、Varioskan Flash (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) を用いて吸光度を測定した。

活性酸素種量の測定

細胞の産生する活性酸素種量を 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) を用いて測定した。DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit (アブカム社、英国ケンブリッジシャー州ケンブリッジ) を用いた。黒色透明底 96 ウェルプレートに細胞を 1 ウェルあたり 10000 個散布し一晩培養した。翌日、メディウムを吸引し付属のバッファーで洗浄した後、各ウェルに 30 μ mol/L の DCFDA を 100 μ L 加えて染色した。暗所、37°C で 45 分間培養した。DCFDA を吸引し 1 ウェルあたり 100 μ L のバッファーを添加した。その後、直ちに Varioskan Flash (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) を用いて蛍光を測定した。

定量的逆転写 PCR (quantitative reverse transcription PCR: qRT-PCR) 法

以下の処理はすべて RNase フリーの器具を使用して行った。

1. RNA 抽出

RNeasy Mini Kit (キアゲン社、ドイツ・ヒルデン) を用いて施行した。細胞培養を行なった 10 cm ディッシュに TRIZOL (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) を 1 mL 加え、細胞溶解後に回収した。回収液にクロロホルム 0.2 mL を加え 15 秒間激しく混和し、室温で 3 分間静置した後、4°C で 12000 g \times 15 分間遠心し、3 相に分離した無色の上部水相のみを新しいチューブに移した。移した水相にイソプロピルアルコールを 0.5 mL 加え、室温で 10 分間静置した後、4°C で 12000 g \times 10 分間遠心し、上清を除去してペレットのみを残した。ペレットを 75%エタノールで洗浄後に 10 分間真空乾燥を行い、RNase フリー水 100 μ L を加え再溶解し、別のチューブに移した。移した

溶液に Buffer RLT 350 μL と 100%エタノール 250 μL を加え混和した後、専用のスピ
ンカラムに注入し、8000 g \times 15 秒間遠心を行なった。遠心後廃液は破棄し、Buffer RW1
でスピンカラム・メンブレンを洗浄し、RNase-Free DNase Set (キアゲン社) を用い
て DNase 処理を行なった。再度、Buffer RW1 及び Buffer RPE でスピンカラム・メン
ブレンを洗浄した後、RNase フリー水を添加し、8000 g \times 1 分間遠心を行い、コレクシ
ョンチューブ内に RNA 抽出を行った。

2. 逆転写

High Capacity RNA-to-cDNA Kit (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社)
を用いて行なった。RNA 濃度を NanoDrop ND-1000 (サーモフィッシャー・サイエンテ
ィフィック社) を用いて測定し、総 RNA 量が 1 μg になるように RT Enzyme Mix 1 μL 、
RT Buffer Mix 10 μL 及び RNase フリー水で調整し、逆転写を行った。反応時間は 25 $^{\circ}\text{C}$
10 分、48 $^{\circ}\text{C}$ 30 分、95 $^{\circ}\text{C}$ 10 分で行なった。

3. 定量的 PCR

SYBR Green PCR Master Mix (キアゲン社) を用いて行った。プライマーは表 1 に
記載した配列のものを用いた。上記工程で逆転写したサンプル 0.2 μL 、フォワードプ
ライマー 10 $\mu\text{mol/L}$ 、リバースプライマー 10 $\mu\text{mol/L}$ 、マスターミックス 10 μL 、RNase
フリー水 9.6 μL を各ウェル内で調整し、StepOnePlus Real-Time PCR System (アプ
ライドバイオシステムズ社、米国カルフォルニア州フォスターシティ) を用いて 95 $^{\circ}\text{C}$
5 分、続いて 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒、60 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒 40 サイクル、最後に 70 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒の反応時間で行
なった。Threshold cycle (Ct) 値は StepOnePlus Real-Time PCR System に内蔵され
たプログラムにより自動的に測定された。ACTB を内因性コントロールとし、各サンプ
ルにおける各遺伝子の相対的な発現量を ΔCt 法で算出し、対照群と各薬剤投与群の遺
伝子発現量の比較は $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法にて行った。

表 1. qRT-PCR 法に用いたプライマー

| 標的遺伝子 | フォワードプライマー | リバースプライマー |
|--------------|------------------------|------------------------|
| <i>ACTB</i> | CCGCGAGAAGATGACCCAGAT | GGATAGCACAGCCTGGATAGCA |
| <i>PSMB5</i> | TCCAGGGAGTCTCAGTGATGG | CTCCATGGCGGAAGCTTGAAGG |
| <i>PSMB6</i> | AATTCAGTCCAATGCTCTCG | TACCCCTGACTCTGCAATGG |
| <i>PSMB8</i> | GCTGGGATAAGAAGGGTCCTGG | CCCCTACCCGTGGAGAACA |
| <i>PSMB9</i> | CGCTTACCACAGACGCTAT | CCACACCGGCAGCTGTAATA |

ウエスタンブロット法

各種タンパク質の発現はウエスタンブロット法を用いて評価した。ウエスタンブロット法は NuPAGE プロトコールに従い施行した。サンプルの蛋白濃度よりロード量を算出し、メルカプトエタノール、NuPAGE LDS sample buffer（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社）と混合しゲルにそれぞれ注入し、泳動した。この際泳動バッファーは NuPAGE MES SDS Running Buffer（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社）を使用した。泳動後、NuPAGE Transfer Buffer（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社）を用いて 60 分間かけてメンブレンに転写した。Tween20 含有トリス緩衝生理食塩水（Tris-buffered saline with Tween 20 : TBST）で 5 分×3 回の洗浄施行後、5%スキムミルクまたは 5%BSA を用いてブロッキングを行った。再度 TBST で 5 分×3 回洗浄した後、1 次抗体を添加したブロッキング液を用いて 4°C 下で一晩振とうした。

翌日に TBST で 5 分×6 回の洗浄施行後、2 次抗体を 60 分添加した。再度 TBST で 15 分×6 回洗浄して撮影を行った。感光液は ECL TM Prime Western Blotting Detection Reagent（GE ヘルスケア社、米国イリノイ州シカゴ）を用いた。1 次抗体に関しては表 2 に記載したものをを用いた。

タンパク発現量のコントロールおよび相対定量のための標準化にはアクチンを用いた。

表 2. ウェスタンブロット法に用いた 1 次抗体

| 抗体名 | 販売元 | 商品番号 | 希釈倍率 |
|---------------------|-------------------|-----------|---------|
| 抗アクチン | シグマ・アルドリッチ | A2066 | 1:1500 |
| 抗 PSMA6 | アブカム | ab3325 | 1:1000 |
| 抗 PSMB5 | アブカム | ab3330 | 1:1000 |
| 抗 PSMB8 | アブカム | ab3329 | 1:1000 |
| 抗 PSMB9 | アブカム | ab3328 | 1:2000 |
| 抗 cleaved caspase-3 | セル・シグナリング・テクノロジー | #9961 | 1:1000 |
| 抗 PARP | セル・シグナリング・テクノロジー | #9532 | 1:1000 |
| 抗サイクリン A | サンタクルーズ・バイオテクノロジー | sc-271682 | 1:100 |
| 抗サイクリン B1 | サンタクルーズ・バイオテクノロジー | sc-166210 | 1:100 |
| 抗サイクリン D | アブカム | ab134175 | 1:10000 |
| 抗リン酸化 CDK1 | アブカム | ab47594 | 1:1000 |
| 抗 p21 | アブカム | ab109199 | 1:1000 |
| 抗リン酸化ヒストン H3 | セル・シグナリング・テクノロジー | #3377 | 1:1000 |
| 抗 CHOP | セル・シグナリング・テクノロジー | #2895 | 1:1000 |
| 抗リン酸化 eIF2 α | セル・シグナリング・テクノロジー | #9721 | 1:1000 |
| 抗リン酸化 IRE1 | アブカム | ab48187 | 1:1000 |
| 抗 LC3 | セル・シグナリング・テクノロジー | #12741 | 1:1000 |

初出の略語： cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)、microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)、poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)
 (サンタクルーズ・バイオテクノロジー社、米国テキサス州ダラス)

20S プロテアソームキモトリプシン様活性の測定

肺癌細胞の 20S プロテアソームのキモトリプシン様プロテアーゼ活性を 20S Proteasome Assay Kit (ケイマンケミカルカンパニー社、米国ミシガン州アナーバー) を用いて測定した。96 ウェルプレートに肺癌細胞を散布した。細胞数は 1 ウェルあたり 30000 個とした。96 ウェルプレートを 500 g \times 5 分間遠心し、培養メEDIUMを除去した。アッセイバッファー (5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 添加トリス緩衝生理食塩水) 200 μ L で洗浄した後、500 g \times 5 分間遠心して上澄み液を吸引した。溶解バッファー 10 μ L とアッセイバッファー 90 μ L を加え、30 分間振とうしながら反応させた。96 ウェルプレートを 1000 g \times 10 分間遠心して細胞膜や核などを沈殿させ、プロテアソームを含む上澄み液 90 μ L を採取した。採取した上澄み液を黒色 96 ウェルプレートに移し、キモトリプシン様活性の基質となる Suc-LLVY-AMC

10 μL とアッセイバッファー10 μL を加え、遮光し 37°C で 1 時間培養した。その後、Varioskan Flash (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) を用いて蛍光を測定した。

CFZ 投与濃度の設定

CFZ が細胞周期、分裂期細胞死、アポトーシス、小胞体ストレス反応に与える影響を評価する際の CFZ の投与濃度は親細胞とシスプラチン耐性細胞の IC50 の内、より高い濃度とした。A549 と A549ddpR には 100 $\mu\text{mol/L}$ 、H1299 と H1299ddpR には 30 $\mu\text{mol/L}$ 、SBC3 と SBC3ddpR には 40 $\mu\text{mol/L}$ 、SBC5 と SBC5ddpR には 6 $\mu\text{mol/L}$ とした。

細胞周期の解析

CFZ が細胞周期に与える影響を、フローサイトメトリー法を用いて評価した。A549 (1.0 $\times 10^5$ 個)、A549ddpR (2.0 $\times 10^5$ 個)、H1299 (1.0 $\times 10^5$ 個)、H1299ddpR (2.0 $\times 10^5$ 個)、SBC3 (2.0 $\times 10^5$ 個)、SBC3ddpR (3.0 $\times 10^5$ 個)、SBC5 (1.0 $\times 10^5$ 個)、SBC5ddpR (2.0 $\times 10^5$ 個) を 10 cm ディッシュで培養した。24 時間後に CFZ を投与した。24 時間後にトリプシンで処理し、Phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄した後に -20°C 下で 70% エタノールを用いて 4 時間固定処理を行なった。遠心し、上清を破棄した後に残ったペレットを PBS で 2 回、Stain Buffer (FBS) (ベクトン・ディッキンソン社、米国ニュージャージー州フランクリンレイクス) で 1 回洗浄し、Alexa Fluor® 647 Rat anti-Histone H3 (pS28) 20 μL でリン酸化ヒストン H3 を標識した。20 分後に PI/RNase Staining Buffer (ベクトン・ディッキンソン社) 500 μL で再懸濁し、DNA を標識した。測定は BD FACSVerse flow cytometer (ベクトン・ディッキンソン社) を使用した。核相が 2 倍体である細胞を G1 期もしくは S 期と定義した。また、核相が 4 倍体かつリン酸化ヒストン H3 が陰性である細胞を G2 期、核相が 4 倍体かつリン酸化ヒストン H3 が陽性である細胞を M 期と定義した。

アポトーシスの解析

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (メルクミリポア社、米国マサチューセッツ州バーリントン) を用いて行なった。A549 (1.0 $\times 10^5$ 個)、A549ddpR (2.0 $\times 10^5$ 個)、H1299 (1.0 $\times 10^5$ 個)、H1299ddpR (2.0 $\times 10^5$ 個)、SBC3 (2.0 $\times 10^5$ 個)、SBC3ddpR (3.0 $\times 10^5$ 個)、SBC5 (1.0 $\times 10^5$ 個)、SBC5ddpR (2.0 $\times 10^5$ 個) を 10 cm ディッシュで一晩培養し、翌日に CFZ を添加した。CFZ 暴露時間は 24 時間、48 時間、72 時間とした。その後、トリプシンで処理し、PBS で 2 回洗浄した後に Binding Buffer 500 μL で再懸濁した。キットに含まれている試薬でアネキシン V とプロピジウムイオダイド (Propidium iodide: PI) の 2 重染色を行ない、暗所で 15 分間静置した後に測定を行

なった。測定はBD FACSVerse flow cytometer (ベクトン・ディッキンソン社) を使用した。アネキシン V 陽性かつPI 陰性の細胞を早期アポトーシス細胞と定義し、アネキシン V 陽性かつPI 陽性の細胞を後期アポトーシス細胞と定義した (Vermes et al., 2000)。

分裂期細胞死の解析

免疫蛍光染色法を用いて CFZ による分裂期細胞死の誘導効果を評価した。A549ddpR (5.0×10^4 個)、H1299ddpR (5.0×10^4 個) をチャンバースライド II (IWAKI、東京都) で一晩培養し、翌日に CFZ を添加した。24 時間後に 4°C の PBS で二回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド 500 μ L を用いて 4°C で 20 分間固定した。その後、4°C の PBS で三回洗浄し、0.5% Triton X-100 (シグマ・アルドリッチ社) 500 μ L を 4 °C で 10 分間反応させた。再び 4°C の PBS で 2 回洗浄し、Blocking One Histo (ナカライテスク社、日本京都市) で 5 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体である抗 γ チューブリン抗体 (1:100、#2128、シグマ・アルドリッチ社) を 4°C で一晩反応させた。翌日、4°C の PBS で三回洗浄し、蛍光二次抗体である Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (1:500、A-11008、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) を室温で 90 分間反応させた。その後、4°C の PBS で二回洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む ProLong™ Glass Antifade Mountant with NucBlue™ (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) で核の染色と包埋を行った。カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡 BZ-2000 (キーエンス社、大阪市) で観察した。

統計解析

全ての検討は独立した状態で 3 回以上行った。2 群間の比較にはウェルチの t 検定を用い、統計学的有意差は p 値が 0.05 未満の時と定義した。

実験結果

1) シスプラチン耐性肺癌細胞および親細胞のシスプラチン感受性の検討

はじめに、3種類の非小細胞肺癌細胞株（A549、H1299、H1975）と2種類の小細胞肺癌細胞株（SBC3、SBC5）、及びそれらから作成した5種類のシスプラチン耐性細胞株（A549ddpR、H1299ddpR、H1975ddpR、SBC3ddpR、SBC5ddpR）のシスプラチン感受性を検討した。MTT法を用いて細胞増殖抑制効果を測定し（図1）、IC50を算出した（表3）。作成したシスプラチン耐性細胞はいずれも親細胞に対して有意にIC50が大きく、シスプラチン耐性を獲得したと考えられた。

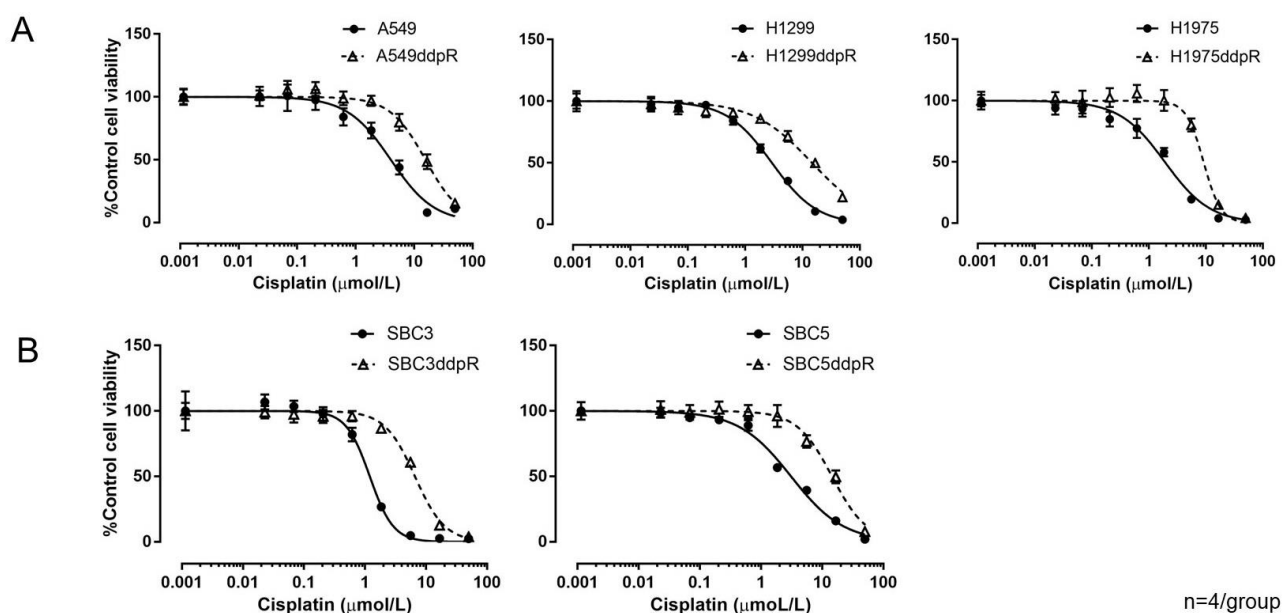


図1. シスプラチン耐性肺癌細胞および親細胞に対するシスプラチンの細胞増殖抑制効果

A: 非小細胞肺癌細胞に対するシスプラチンの細胞増殖抑制効果をMTT法を用いて評価した。

B: 小細胞肺癌細胞に対するシスプラチンの細胞増殖抑制効果をMTT法を用いて評価した。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。

表 3. シスプラチン耐性肺癌細胞および親細胞に対するシスプラチンの IC50

| | IC50 values of cisplatin ($\mu\text{mol/L}$) | | |
|-------|--|----------------|----------|
| | Parent | CR variant | <i>p</i> |
| A549 | 3.8 \pm 0.2 | 14.1 \pm 2.1 | <0.05 |
| H1299 | 3.6 \pm 2.2 | 8.8 \pm 2.2 | <0.05 |
| H1975 | 3.1 \pm 0.1 | 9.3 \pm 0.4 | <0.01 |
| SBC3 | 1.3 \pm 0.4 | 7.0 \pm 0.4 | <0.01 |
| SBC5 | 2.7 \pm 0.8 | 15.0 \pm 2.0 | <0.01 |

シスプラチンの細胞増殖抑制効果を MTT 法で測定し、IC50 を算出した。実験は独立して 3 回行い、2 群間の比較にはウェルチの *t* 検定を用いた。数値は平均値と標準偏差を示す。CR: cisplatin-resistant。

2) シスプラチン耐性細胞における細胞増殖速度および細胞内活性酸素種量の測定

作成したシスプラチン耐性細胞の特徴を明らかにするため、細胞増殖速度および細胞内活性酸素種量を測定した。細胞増殖速度の測定には MTT 法を用いた。全ての細胞株においてシスプラチン耐性細胞の方が親細胞よりも有意に増殖速度が遅かった (図 2)。細胞内活性酸素種の測定には DCFDA 法を用いた。いずれの細胞株でもシスプラチン耐性細胞の方が親細胞よりも有意に細胞内活性酸素種量が高かった (図 3)。いずれも既報と一致する結果であった。

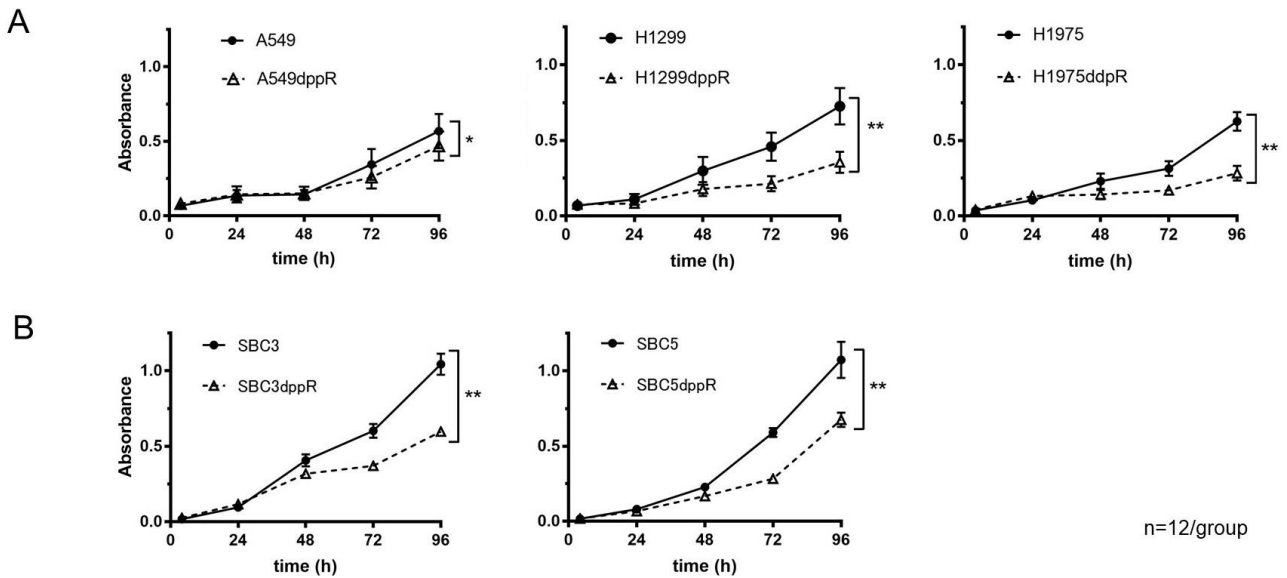


図 2. シスプラチン耐性肺癌細胞および親細胞の細胞増殖曲線

A：非小細胞肺癌細胞の細胞増殖速度を MTT 法を用いて評価した。

B：小細胞肺癌細胞の細胞増殖速度を MTT 法を用いて評価した。

数値は平均値と標準偏差値を示す。2 群間の比較にはウェルチの t 検定を用いた。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

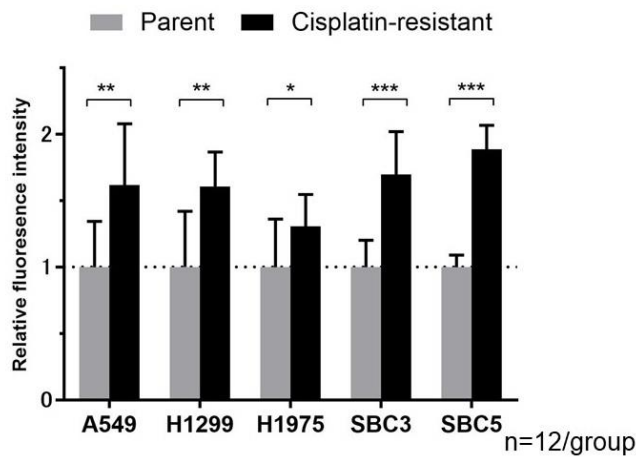


図 3. シスプラチン耐性肺癌細胞における細胞内活性酸素種量の親細胞との比較

親細胞に対するシスプラチン耐性細胞の細胞内活性酸素種量を DCFDA を用いて評価した。グラフは平均値と標準偏差値を示す。2 群間の比較にはウェルチの t 検定を用いた。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

3) シスプラチン耐性細胞におけるプロテアソームサブユニット発現についての検討

シスプラチン耐性肺癌細胞におけるプロテアソームの意義を調べるため、まずシスプラチン耐性細胞における 20S プロテアソームサブユニットの発現を評価した。

qRT-PCR 法を用いた mRNA 発現量定量の結果、SBC3ddpR では有意な変化が見られなかったが、A549ddpR、H1299ddpR、H1975ddpR、SBC5ddpR の 4 種類のシスプラチン耐性細胞株では免疫プロテアソームサブユニット *PSMB8*、*PSMB9* の発現はそれぞれの親細胞の 2.7 倍から 5.8 倍と高発現していた (図 4)。一方、構成型プロテアソームサブユニット *PSMB5*、*PSMB6* の発現は親細胞株と比較して変化がみられないか、高々 2.2 倍程度までの発現にとどまった。

次にウエスタンブロット法を用いてタンパク質の発現量を評価した。*PSMB8* は全てのシスプラチン耐性細胞株において、*PSMB9* は SBC5ddpR 以外のシスプラチン耐性細胞株において、それぞれ親細胞に比較して有意に高発現していた (図 5)。構成型プロテアソームサブユニット *PSMB5* および α サブユニット *PSMA6* の発現には明らかな変化が見られなかった。

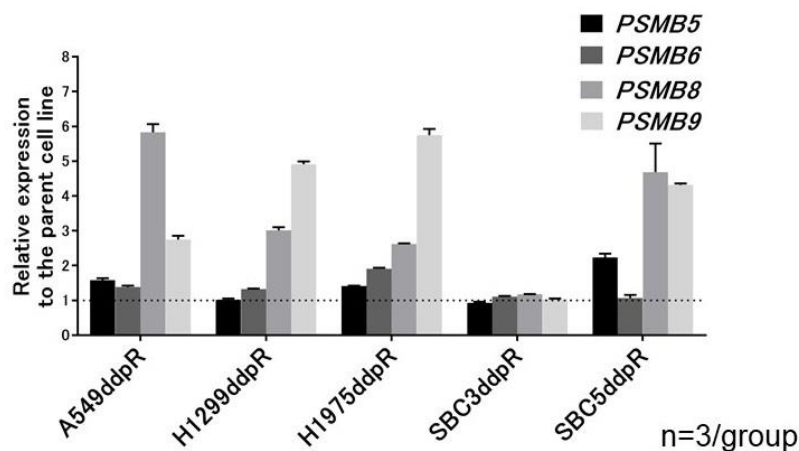


図 4. シスプラチン耐性肺癌細胞における構成型および免疫プロテアソームサブユニット mRNA 量の親細胞との比較

シスプラチン耐性肺癌細胞における 20S プロテアソームサブユニットの mRNA 量を定量的逆転写 PCR 法を用いて評価した。グラフはそれぞれの親細胞を 1 とした相対定量値の平均値と標準偏差値を示す。

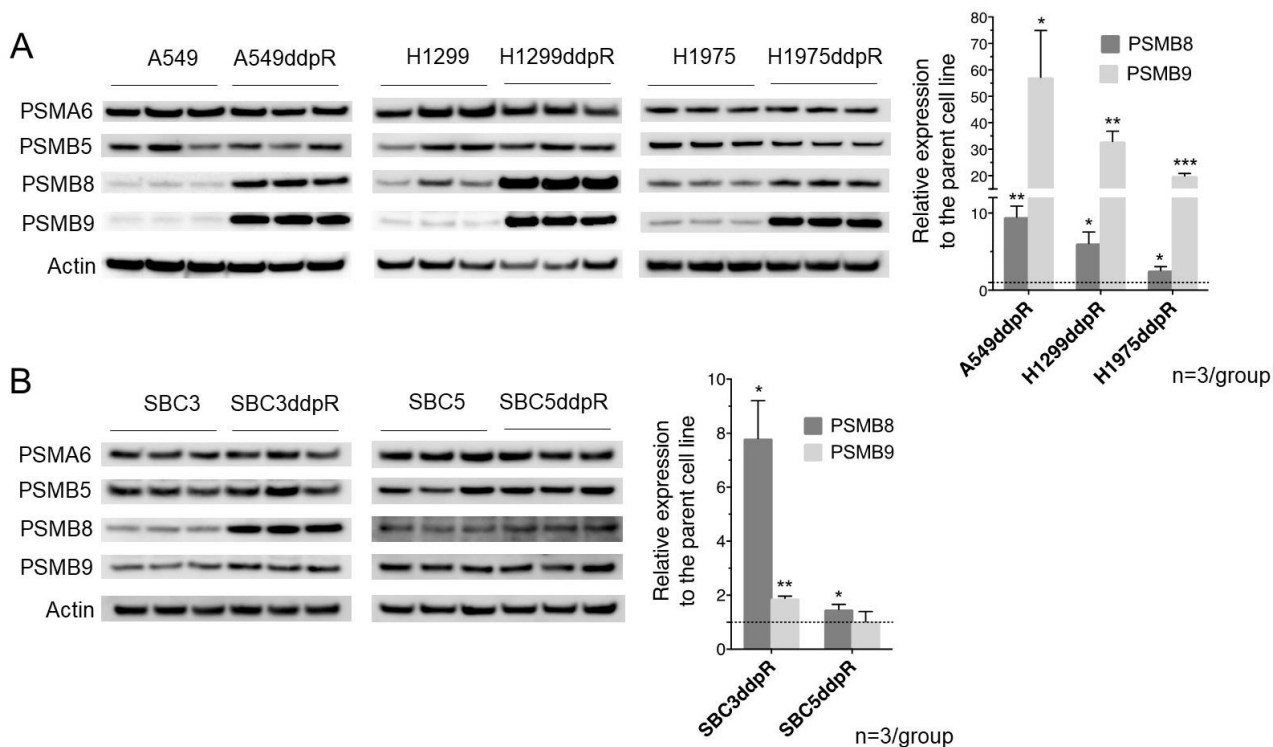


図 5. シスプラチン耐性肺癌細胞および親細胞における 20S プロテアソームサブユニットタンパク発現

A: 非小細胞肺癌細胞の 20S プロテアソームサブユニットのタンパク発現をウエスタンブロット法を用いて評価した。

B: 小細胞肺癌細胞の 20S プロテアソームサブユニットのタンパク発現をウエスタンブロット法を用いて評価した。

アクチンで標準化し相対定量した。グラフは平均値と標準偏差値を示す。2 群間の比較にはウェルチの t 検定を用いた。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

4) シスプラチン耐性細胞の免疫プロテアソーム阻害剤感受性の検討

シスプラチン耐性肺癌細胞株において免疫プロテアソームが高率に発現していることが明らかとなったが、細胞の生存あるいは増殖が免疫プロテアソームに依存しているかどうかを検討するため、免疫プロテアソーム阻害剤である CFZ と PR957 の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価し (図 6、7)、IC50 を算出した (表 4)。非小細胞肺癌株 H1299 および小細胞肺癌株 SBC3 では、CFZ および PR957 の IC50 はシスプラチン耐性細胞において親細胞よりも有意に小さかった。その他の 3 つの細胞株では、シスプラチン耐性細胞の方が免疫プロテアソーム阻害剤の IC50 が大きい傾向があった。

シスプラチン耐性化に伴い免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進した H1299ddpR および SBC3ddpR を immunoproteasome inhibitor (IPI) responder、それ

以外のシスプラチン耐性細胞 A549ddpR、H1975ddpR、SBC5ddpR を IPI non-responder と定義し、以降の検討をすすめた。

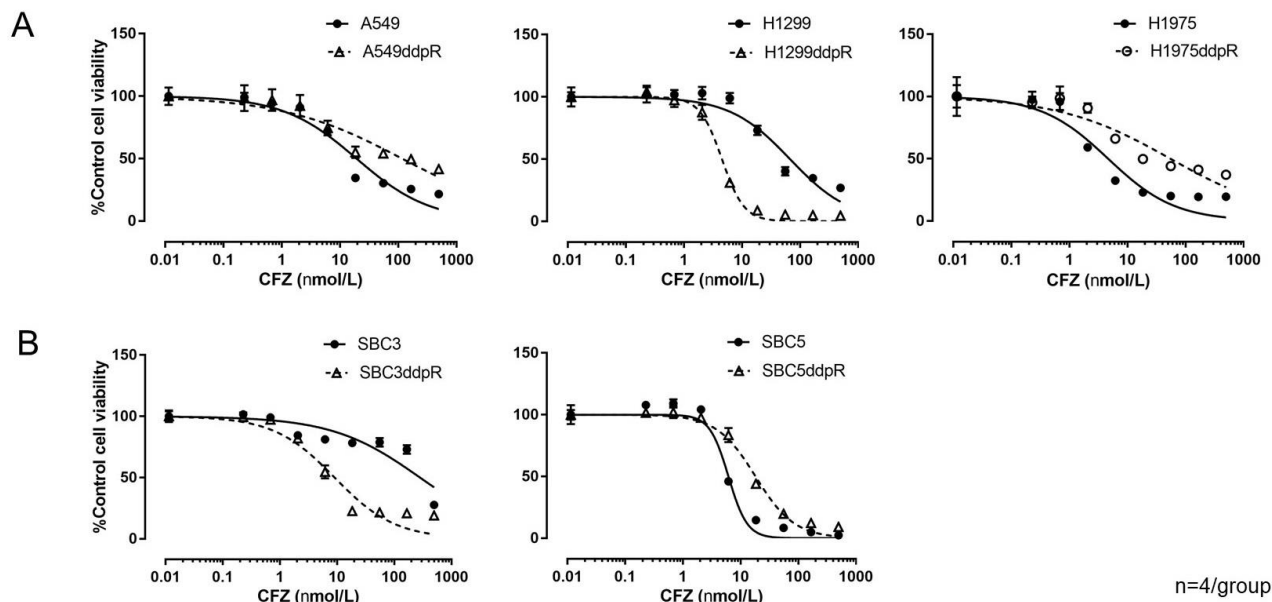


図 6. シスプラチン耐性肺癌細胞および親細胞に対する CFZ の細胞増殖抑制効果

A : 非小細胞肺癌細胞に対する CFZ の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。

B : 小細胞肺癌細胞に対する CFZ の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。

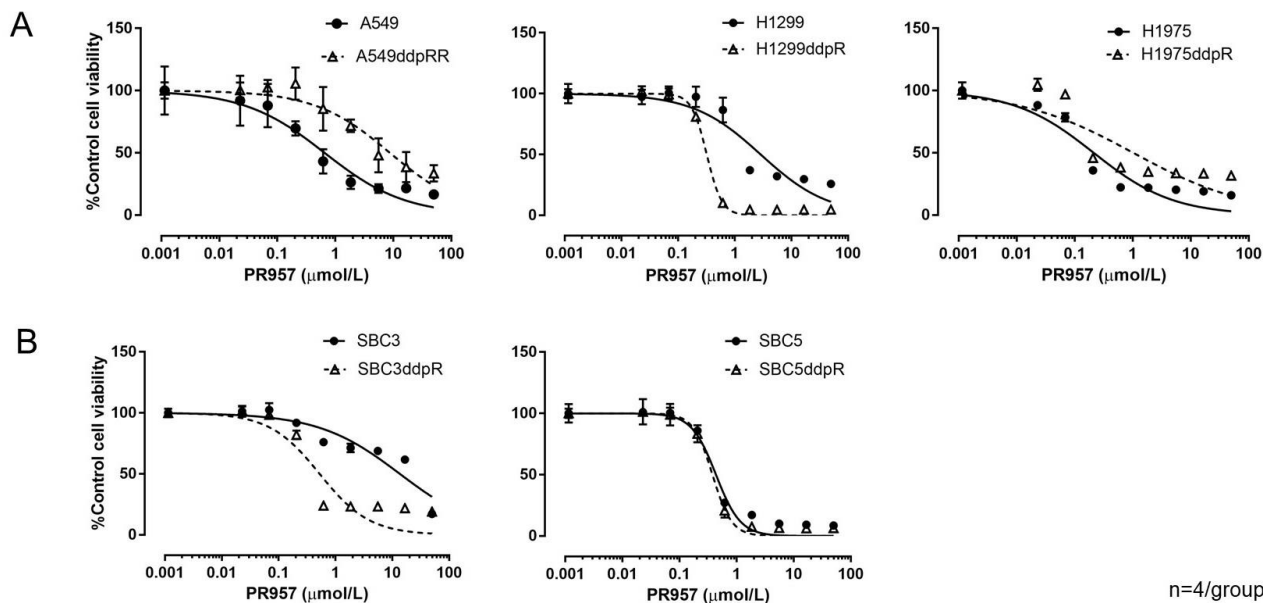


図 7. シスプラチン耐性肺癌細胞および親細胞に対する PR957 の細胞増殖抑制効果
 A : 非小細胞肺癌細胞に対する PR957 の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。
 B : 小細胞肺癌細胞に対する PR957 の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。
 グラフは平均値と標準偏差値を示す。

表 4. シスプラチン耐性肺癌細胞および親細胞に対する免疫プロテアソーム阻害剤の IC50

| | IC50 values of carfilzomib (nmol/L) | | | IC50 values of PR957 (μmol/L) | | |
|-------|--|------------|----------|----------------------------------|------------|----------|
| | Parent | CR variant | <i>p</i> | Parent | CR variant | <i>p</i> |
| A549 | 12.9±5.9 | 97.5±42.0 | <0.05 | 0.91±0.11 | 7.03±4.22 | 0.13 |
| H1299 | 28.9±1.6 | 3.2±1.2 | <0.01 | 1.48±0.17 | 0.26±0.07 | <0.01 |
| H1975 | 2.4±1.9 | 33.8±20.4 | 0.12 | 0.14±0.06 | 0.84±0.44 | 0.11 |
| SBC3 | 42.8±2.0 | 16.3±6.1 | <0.05 | 12.7±6.1 | 0.80±0.28 | <0.05 |
| SBC5 | 3.9±0.5 | 5.7±0.8 | 0.08 | 0.40±0.04 | 0.41±0.08 | 0.88 |

CFZ および PR957 の細胞増殖抑制効果を MTT 法で測定し、IC50 を算出した。実験は独立して 3 回行い、2 群間の比較にはウェルチの t 検定を用いた。数値は平均値と標準偏差値を示す。

5) IPI responder と IPI non-responder における免疫プロテアソームサブユニット発現およびプロテアーゼ活性の比較

IPI responder と IPI non-responder の違いを決定する因子を探るため、免疫プロテアソームサブユニットの発現亢進と免疫プロテアソーム阻害剤への感受性変化の関係を検討した。

上述の qRT-PCR 法による mRNA 発現の評価結果をもとに検討した (図 4)。IPI responder においては、H1299ddpR では *PSMB8* が 3.0 倍、*PSMB9* が 4.9 倍に亢進していた。SBC3ddpR では *PSMB8* が 1.2 倍に亢進し、*PSMB9* は 1.0 倍と変化に乏しかった。IPI non-responder においては、A549ddpR では *PSMB8* が 5.8 倍、*PSMB9* が 2.7 倍に亢進していた。H1975ddpR では *PSMB8* が 2.6 倍、*PSMB9* が 5.7 倍に亢進していた。SBC5ddpR では *PSMB8* が 4.7 倍に、*PSMB9* が 4.3 倍に亢進していた。したがって、シスプラチン耐性細胞における免疫プロテアソームサブユニットの mRNA 発現亢進について、IPI responder あるいは IPI non-responder で一定の傾向は見られなかった。

ウエスタンブロット法によるタンパク発現の結果をもとに検討した (図 5)。IPI responder においては、H1299ddpR では *PSMB8* が 6.1 倍、*PSMB9* が 33.0 倍に亢進していた。SBC3ddpR では *PSMB8* が 7.8 倍、*PSMB9* が 1.9 倍に亢進していた。IPI non-responder においては、A549ddpR では *PSMB8* が 9.5 倍、*PSMB9* が 57.3 倍に亢進していた。H1975ddpR では *PSMB8* が 2.6 倍、*PSMB9* が 20.0 倍に亢進していた。SBC5ddpR では *PSMB8* が 1.5 倍に亢進し、*PSMB9* は 1.0 倍と変化に乏しかった。したがって、シスプラチン耐性細胞における免疫プロテアソームサブユニットのタンパク発現亢進について、IPI responder あるいは IPI non-responder で一定の傾向は見られなかった。

次に、20S プロテアソームのプロテアーゼ活性を検討した。シスプラチン耐性細胞で発現亢進がみられた *PSMB8* および *PSMB9* が有するキモトリプシン様活性を、分解されることで蛍光を発する Suc-LLVY-AMC を基質として用い、蛍光強度を測定した。いずれの細胞株においてもシスプラチン耐性細胞では親細胞に対してキモトリプシン様活性が亢進する傾向があった。また、IPI non-responder での亢進が約 1.4 倍であるのに対し、IPI responder における亢進は 2.9 ないし 3.5 倍と大きかった (図 8)。

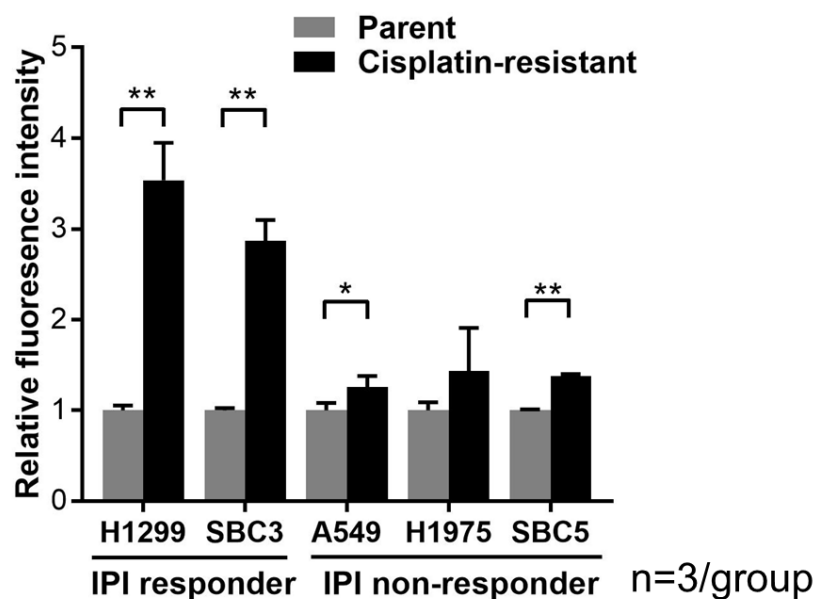


図 8. シスプラチン耐性肺癌細胞におけるキモトリプシン様プロテアーゼ活性の親細胞との比較

蛍光基質 Suc-LLVY-AMC を用いてキモトリプシン様プロテアーゼ活性を測定した。グラフは平均値と標準偏差値を示す。2 群間の比較にはウェルチの t 検定を用いた。
* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

6) CFZ のアポトーシス誘導に与える影響の検討

IPI responder に対する免疫プロテアソーム阻害剤の増殖抑制効果の機序を検討するため、免疫プロテアソーム阻害剤がアポトーシスを誘導するかどうかを評価した。非小細胞肺癌細胞株 A549、A549ddpR、H1299、H1299ddpR および小細胞肺癌細胞株 SBC3、SBC3ddpR、SBC5、SBC5ddpR に CFZ を投与し、フローサイトメトリー法を用いてアポトーシス細胞の割合を評価した。IPI responder では IPI non-responder に比べて高率にアポトーシスが誘導された (図 9A)。次にウェスタンブロット法を用いて IPI responder における CFZ 投与後のアポトーシス関連タンパクの発現を評価した。シスプラチン耐性細胞において cleaved caspase-3 と cleaved poly(ADP-ribose) polymerase が強く誘導された (図 9B)。したがって、免疫プロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果にアポトーシスが関与しており、IPI responder では免疫プロテアソーム阻害剤がアポトーシスを強く誘導することが示された。

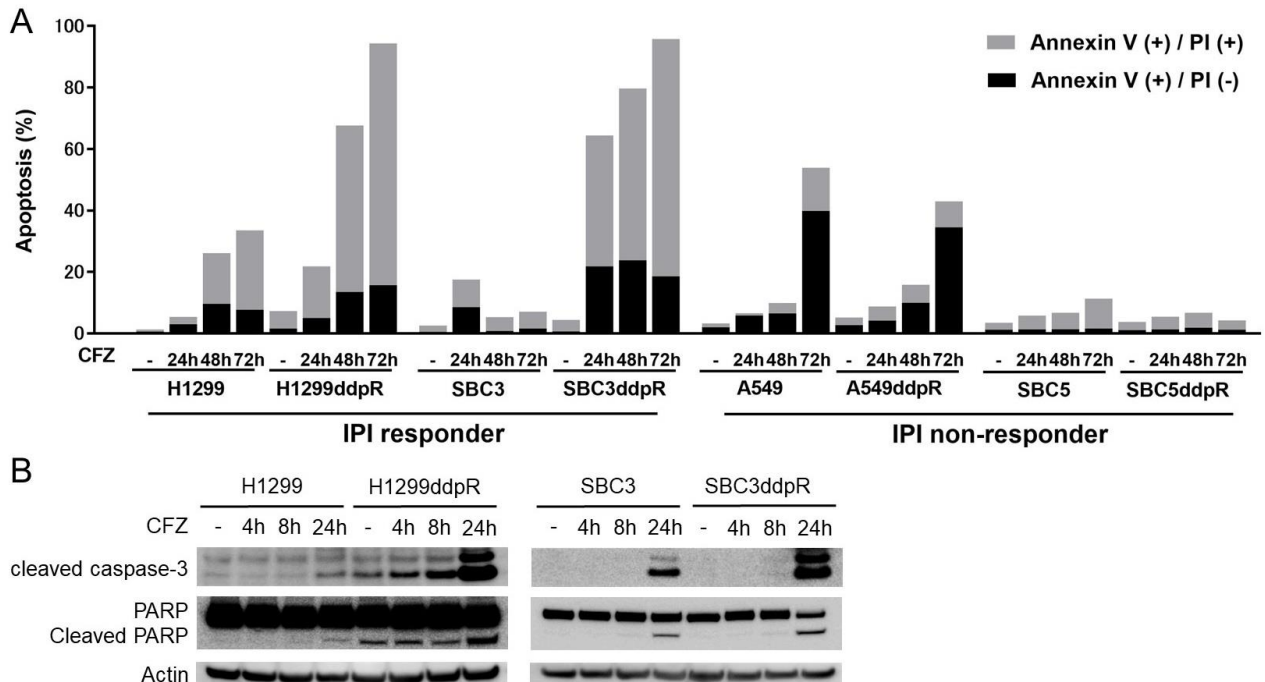


図 9. 肺癌細胞における CFZ のアポトーシス誘導の検討

A: CFZ 投与後のアポトーシス細胞の割合をアネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法で評価した。

B: IPI responder における CFZ 投与後のアポトーシス関連タンパクの発現をウエスタンブロット法を用いて評価した。

7) CFZ が細胞周期に与える影響の検討

IPI responder に対する免疫プロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果に細胞周期停止が関与しているかどうかを検討した。非小細胞肺癌株 A549、A549ddpR、H1299、H1299ddpR および小細胞肺癌株 SBC3、SBC3ddpR、SBC5、SBC5ddpR に CFZ を投与し、フローサイトメトリー法を用いて細胞周期を評価した。IPI responder では親細胞、シスプラチン耐性細胞ともに CFZ により G2 期および M 期の細胞の割合が増加した (図 10)。一方、IPI non-responder では CFZ による G2 期および M 期の増加は親細胞と比較して減弱したか変化がみられなかった。A549 では親細胞で CFZ により G2 期および M 期の細胞の割合が増加したが、シスプラチン耐性細胞ではその効果は減弱した。SBC5 では、親細胞、シスプラチン耐性細胞ともに CFZ は細胞周期に殆ど影響を与えなかった。

また、免疫プロテアソーム阻害剤が分裂期細胞死を誘導するかどうかを検討した。A549ddpR と H1299ddpR に CFZ を投与し、蛍光免疫染色法および蛍光顕微鏡を用いて観察した。H1299ddpR では CFZ 投与により micronuclei、fragmented nuclei、multilobular nuclei を呈する細胞が観察された (図 11A)。H1299ddpR ではこれらの核形態を呈する

細胞の割合が有意に増加したが、A549ddpR では変化しなかった (図 11B)。また、H1299ddpR においては CFZ 投与により中心体の多極化および非赤道面への染色体の集合という異常な分裂期像が観察された (図 11C)。以上より免疫プロテアソーム阻害剤の IPI responder に対する抗腫瘍効果は G2/M 期誘導とその後の分裂期細胞死と関連していると考えられた。

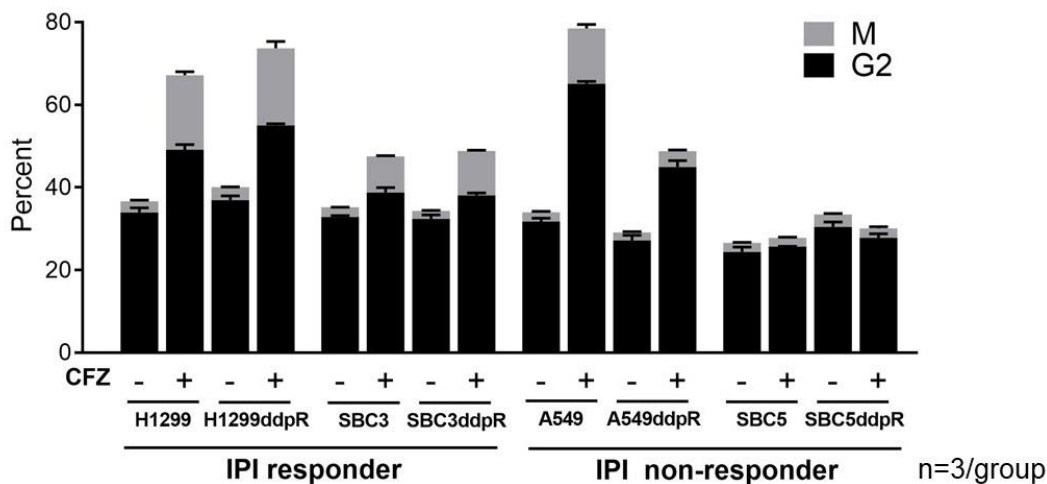


図 10. 肺癌細胞における CFZ の細胞周期への影響の検討

CFZ が肺癌細胞の細胞周期に与える影響を、PI 染色および抗リン酸化ヒストン H3 抗体を用いたフローサイトメトリー法で評価した。グラフは平均値と標準偏差値を示す。

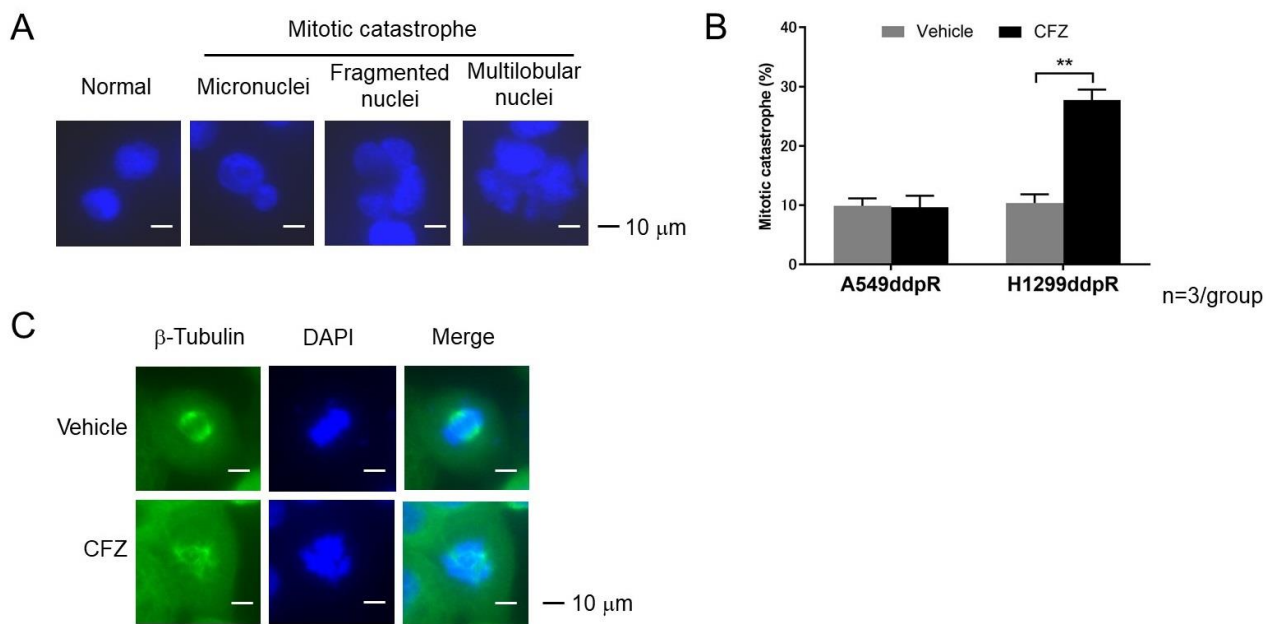


図 11. CFZ の分裂期細胞死誘導の検討

A : H1299ddpR に CFZ を投与し、DAPI を用いて核を染色して蛍光顕微鏡で観察した。分裂期細胞死の特徴を有する細胞が観察された。

B : A549ddpR および H1299ddpR に CFZ を投与し、分裂期細胞死の特徴を有する細胞の割合を蛍光顕微鏡を用いて評価した。グラフは平均値と標準偏差値を示す。2 群間の比較にはウェルチの t 検定を用いた。** $p < 0.01$ 。

C : H1299ddpR に CFZ を投与し、染色体および星状体をそれぞれ DAPI、抗 β チューブリン抗体を用いて染色して蛍光顕微鏡で観察した。異常な分裂期像が観察された。

8) CFZ の抗腫瘍効果の分子的機序の検討

CFZ が細胞周期関連タンパク質および小胞ストレス関連タンパク質の発現に与える影響をウエスタンブロット法を用いて検討した。CFZ 投与により p21 発現が亢進する傾向がみられた (図 12)。また、CFZ 投与により小胞体ストレス関連タンパク質である CHOP、リン酸化 eIF2 α 、リン酸化 IRE1 の発現が亢進する傾向がみられた (図 13)。しかし、これらの発現亢進の程度と CFZ の感受性との相関はみられなかった。

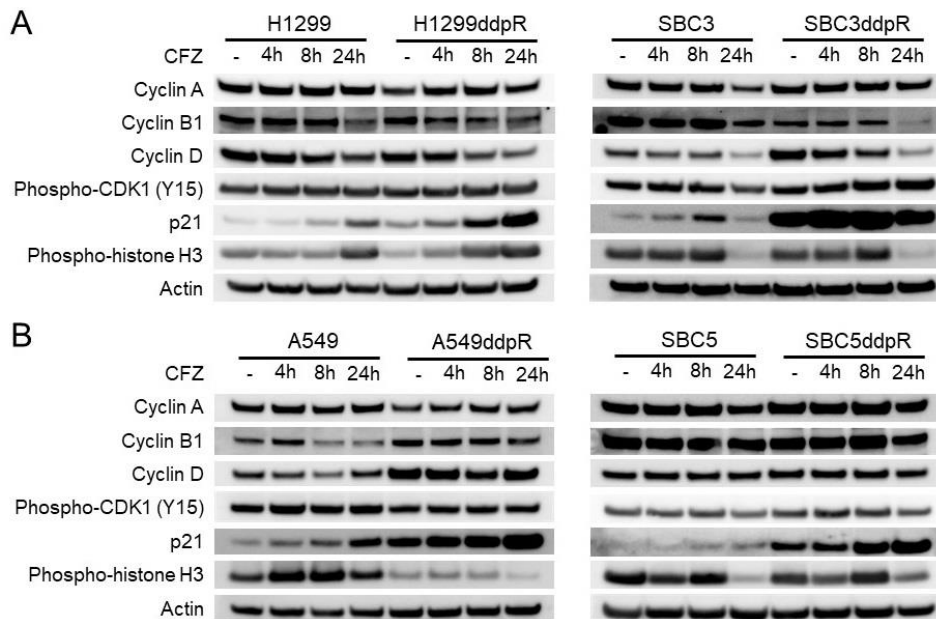


図 12. CFZ が細胞周期調節タンパク質の発現に与える影響の検討

A : CFZ が IPI responder の細胞周期調節タンパク質発現に与える影響をウエスタンブロット法を用いて評価した。

B : CFZ が IPI non-responder の細胞周期調節タンパク質発現に与える影響をウエスタンブロット法を用いて評価した。

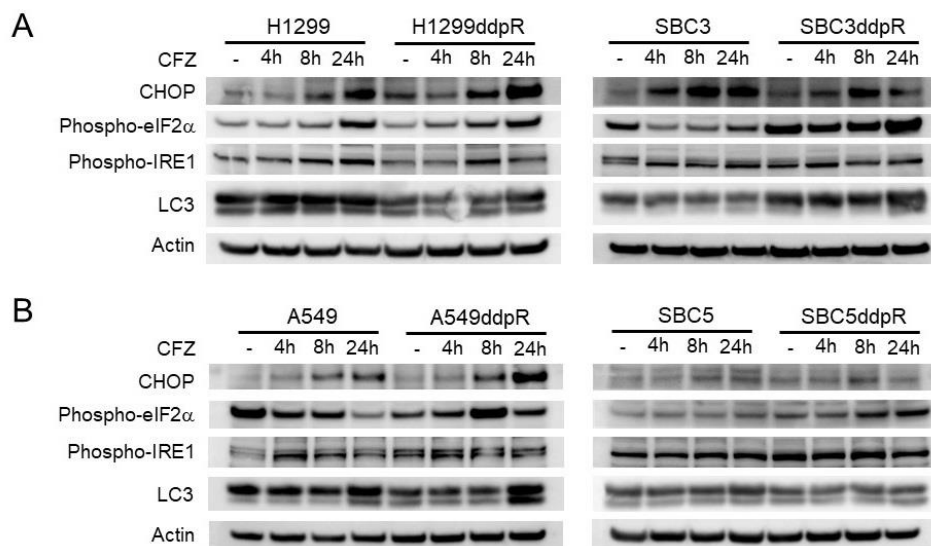


図 13. CFZ が小胞体ストレス関連タンパク質の発現に与える影響の検討

A : CFZ が IPI responder の小胞体ストレス関連タンパク質発現に与える影響をウエスタンブロット法を用いて評価した。

B : CFZ が IPI non-responder の小胞体ストレス関連タンパク質発現に与える影響をウエスタンブロット法を用いて評価した。

考察

我々は、シスプラチン耐性が誘導された肺癌細胞では親細胞よりも免疫プロテアソームサブユニットが高率に発現すること、そしてプロテアソーム活性が強く亢進したシスプラチン耐性肺癌細胞では免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進することを示した。これはプロテアソーム阻害剤が効果を示す肺癌症例が少数ではあるものの存在すること、プロテアソーム阻害剤が効果を示す肺癌症例がプラチナ製剤耐性例にみられることを示す臨床試験の結果を支持する結果であると考え(Arnold et al., 2017; Drilon et al., 2019; Lara et al., 2006; Papadopoulos et al., 2013)。また、シスプラチン耐性化後のキモトリプシン様プロテアーゼ活性亢進が免疫プロテアソーム阻害剤の感受性亢進を予測するマーカーとなりうる可能性を示した。症例を適切に選択できれば免疫プロテアソーム阻害剤はシスプラチン耐性肺癌に対する治療選択肢の一つとなりうると思われる。

免疫プロテアソームは IFN- γ 、TNF- α といった炎症性サイトカインの他、酸化ストレスや高グルコース、代謝や増殖などに関連した細胞内外のストレス反応やミトコンドリア活性の変化によって発現が促進される。我々の作成したシスプラチン耐性肺癌細胞は既報と同様に親細胞と比較して細胞内活性酸素種量が有意に上昇していた(Wangpaichitr et al., 2012; Wangpaichitr et al., 2017)、このことによる酸化ストレスが免疫プロテアソームサブユニットの発現を誘導した一因となっている可能性がある。シスプラチン耐性細胞では糖代謝やアミノ酸代謝も変化していると報告されており(Garber, 2006; Sullivan et al., 2014)、これらが複合的に免疫プロテアソームの発現に影響しているのかもしれない。我々が用いたシスプラチン耐性細胞は *in vitro* で作成したものであるが、*in vivo* で作成したシスプラチン耐性細胞あるいはプラチナ製剤を含む化学療法をうけた患者から採取された癌細胞においても免疫プロテアソームサブユニットが高発現しているかどうかは今後の検討課題である。

免疫プロテアソームの発現亢進がプロテアソーム阻害剤および免疫プロテアソーム阻害剤の効果予測因子となりうるものがこれまで報告されている。BTZ を含む化学療法をうけた白血病患者から採取された腫瘍細胞における PSMB9/PSMB6 発現比は、完全寛解を達成した患者群で有意に高かった(Niewerth et al., 2016)。小児白血病患者から採取された腫瘍細胞において PSMB8/PSMB5 比、PSMB9/PSMB6 比、PSMB10/PSMB7 比が高い細胞は BTZ、CFZ、PR957 の感受性が高い傾向があった(Niewerth et al., 2013)。また、血液腫瘍細胞および固形癌細胞を 96 時間 IFN- γ に暴露すると免疫プロテアソームの mRNA 発現が亢進し、プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進することが報告されている(Busse et al., 2008)。さらに血液腫瘍細胞において 24 時間の IFN- γ 暴露が PSMB8、PSMB9 の高発現と BTZ、PR957 に対する感受性の亢進をもたらし、PSMB8、PSMB9

のノックダウンにより感受性亢進は阻害されることが報告されている (Niewerth et al., 2014)。我々の検討では、シスプラチン耐性化に伴い免疫プロテアソーム阻害剤の感受性が亢進した細胞では 20S プロテアソームのキモトリプシン様プロテアーゼ活性が大きく亢進していたが、一方免疫プロテアソームサブユニット PSMB8 あるいは PSMB9 の遺伝子発現またはタンパク発現とは一定の関係を認めなかった。今後細胞株の数を増やし、キモトリプシン様活性亢進のカットオフ値の検討が必要である。

既報では小胞体ストレスがプロテアソーム阻害剤および免疫プロテアソーム阻害剤のアポトーシス誘導に関与していると報告される (Gandolfi et al., 2017; Roeten et al., 2018)。我々の検討でも免疫プロテアソーム阻害剤により CHOP を中心とした小胞体ストレス関連タンパク質の発現が誘導されたが、IPI responder および IPI non-responder でその発現に明らかな差異を見出せなかった。

細胞内の代表的なタンパク質分解機構にはユビキチン・プロテアソーム系の他にオートファジー・リソソーム系がある。ユビキチン・プロテアソーム系が厳密に選択性を制御されているのに対して、オートファジー・リソソーム系は大量のタンパク質を非選択的に分解する。この二者は互いに代償し合って細胞内のタンパク質の恒常性を維持している (Ji and Kwon, 2017; Zaffagnini and Martens, 2016)。我々の検討ではオートファジーの総量を反映する LC3 発現量と免疫プロテアソーム阻害剤の感受性との明らかな相関はみられなかった。

CFZ は IPI responder に対して G2 期および M 期を増加させ、また分裂期細胞死を有意に増加させた。一方で IPI non-responder においてはこれらの効果は低かった。つまり IPI responder に対する免疫プロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果は、G2/M 期の増加および細胞分裂死を介したアポトーシス誘導によるものである可能性が考えられた。その機序を解明するために G2/M 期移行に関わる細胞周期調節因子が免疫プロテアソーム阻害剤により影響をうけている可能性を考えて検討を行った。既報ではプロテアソーム阻害剤および免疫プロテアソーム阻害剤の G2/M 期停止には p21 が関与すると報告されている (Ling et al., 2003; Zhang et al., 2016)。p21 は G1/S チェックポイントにおいて S 期移行の強力な抑制因子であるが (Sherr and Roberts, 1999)、G2/M チェックポイントにおける p21 の役割は十分には解明されていない。我々の検討でも CFZ 投与により p21 の発現亢進がみられたが、CFZ の感受性との相関はみられなかった。また、S 期の後期においてサイクリン A は CDK1 と複合体を形成し、G2 期にはサイクリン B が CDK1 と複合体を形成し、紡錘体の形成やクロマチン凝集を促進し M 期への進行を実行する。役割を負えたサイクリン A、サイクリン B は anaphase-promoting complex (APC/C) によりユビキチン化され、プロテアソームによって分解されることで M 期から G1 期に移行する (Zhou et al., 2016)。そこで CFZ 投与によりサイクリン A、サイクリン B の分解が抑制され、M 期が遷延する原因となっていることを予想したが、サ

イクリン A に明らかな変化はみられなかった。またサイクリン B の減少が一部の細胞ではみられたものの CFZ の感受性とは相関しなかった。以上 G2/M 期移行に関わる細胞周期調節因子が免疫プロテアソーム阻害剤の効果と関与していると考えられるものの、因子の同定に至ることはできなかった。

総括および結論

本研究では以下の新知見が得られた。

- 肺癌細胞はシスプラチン耐性化に伴い、免疫プロテアソームサブユニット PSMB8、PSMB9 が高率に発現し、またキモトリプシン様プロテアーゼ活性が亢進すること。
- 一部のシスプラチン耐性肺癌細胞は親細胞と比較して免疫プロテアソーム阻害剤 CFZ、PR957 への感受性が亢進すること。
- 免疫プロテアソーム阻害剤 CFZ、PR957 への感受性が亢進したシスプラチン耐性肺癌細胞株はキモトリプシン様活性の亢進が大きいこと。
- シスプラチン耐性肺癌細胞に対する免疫プロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果は、G2/M 期の増加および細胞分裂死を介したアポトーシス誘導であること。

今回の新知見の意義は、シスプラチン耐性獲得後にキモトリプシン様活性が大きく亢進した肺癌では免疫プロテアソーム阻害剤が効果を示す可能性があるため、症例を適切に選択できれば免疫プロテアソーム阻害剤はシスプラチン耐性肺癌に対する治療選択肢の一つとなりうる可能性を示したことである。

臨床応用を目指す上で以下の点が今後の研究課題である。

- *In vivo* で作成したシスプラチン耐性細胞あるいはプラチナ製剤を含む化学療法に抵抗性の患者から採取された癌細胞においても免疫プロテアソームサブユニット PSMB8、PSMB9 の高発現、キモトリプシン様活性の亢進、免疫プロテアソーム阻害剤の感受性亢進が起こるかどうかの検討。
- 細胞株を増やしシスプラチン耐性化後の免疫プロテアソーム阻害剤の感受性亢進を予測するためのキモトリプシン様活性亢進のカットオフ値の検討。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室 教授 今野哲先生に深謝致します。また、直接の御指導を賜りました菊地英毅助教に深謝致します。また、適切な助言を賜りました菊地順子特任助教、品川尚文講師、榊原純講師、北海道大学病院がん遺伝子診断部 木下一郎教授、北海道大学大学院医学研究院腫瘍内科学教室 秋田弘俊教授に感謝の意を表します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1994). Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem.* *115*, 257-269.
- Amable, L. (2016). Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol. Res.* *106*, 27-36.
- Angeles, A., Fung, G., and Luo, H. (2012). Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front. Biosci.* *17*, 1904-1916.
- Antonia, S. J., López-Martín, J. A., Bendell, J., Ott, P. A., Taylor, M., Eder, J. P., Jäger, D., Pietanza, M. C., Le, D. T., de Braud, F., *et al.* (2016). Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol.* *17*, 883-895.
- Arbour, K. C., and Riely, G. J. (2019). Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA* *322*, 764-774.
- Arnold, S. M., Chansky, K., Leggas, M., Thompson, M. A., Villano, J. L., Hamm, J., Sanborn, R. E., Weiss, G. J., Chatta, G., and Baggstrom, M. Q. (2017). Phase 1b trial of proteasome inhibitor carfilzomib with irinotecan in lung cancer and other irinotecan-sensitive malignancies that have progressed on prior therapy (Onyx IST reference number: CAR-IST-553). *Invest. New Drugs* *35*, 608-615.
- Barlesi, F., Gervais, R., Lena, H., Hureaux, J., Berard, H., Paillot, D., Bota, S., Monnet, I., Chajara, A., and Robinet, G. (2011). Pemetrexed and cisplatin as first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) with asymptomatic inoperable brain metastases: a multicenter phase II trial (GFPC 07-01). *Ann. Oncol.* *22*, 2466-2470.
- Basu, A., and Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids* *2010*.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Ready, N. E., Chow, L. Q., Vokes, E. E., Felip, E., Holgado, E., *et al.* (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1627-1639.
- Brahmer, J., Reckamp, K. L., Baas, P., Crino, L., Eberhardt, W. E., Poddubskaya, E., Antonia, S., Pluzanski, A., Vokes, E. E., Holgado, E., *et al.* (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl.*

J. Med. 373, 123–135.

Budenholzer, L., Cheng, C.L., Li, Y., and Hochstrasser, M. (2017). Proteasome Structure and Assembly. J. Mol. Biol. 429, 3500–3524.

Busse, A., Kraus, M., Na, I.K., Rietz, A., Scheibenbogen, C., Driessen, C., Blau, I.W., Thiel, E., and Keilholz, U. (2008). Sensitivity of tumor cells to proteasome inhibitors is associated with expression levels and composition of proteasome subunits. Cancer 112, 659–670.

Callahan, M.K., Wohlfert, E.A., Menoret, A., and Srivastava, P.K. (2006). Heat shock up-regulates lmp2 and lmp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes. J. Immunol. 177, 8393–8399.

Chen, R.S., Song, Y.M., Zhou, Z.Y., Tong, T., Li, Y., Fu, M., Guo, X.L., Dong, L.J., He, X., Qiao, H.X., *et al.* (2009). Disruption of xCT inhibits cancer cell metastasis via the caveolin-1/beta-catenin pathway. Oncogene 28, 599–609.

Cocetta, V., Ragazzi, E., and Montopoli, M. (2019). Mitochondrial Involvement in Cisplatin Resistance. Int. J. Mol. Sci. 20.

Dimopoulos, M.A., Goldschmidt, H., Niesvizky, R., Joshua, D., Chng, W.-J., Oriol, A., Orłowski, R.Z., Ludwig, H., Facon, T., Hajek, R., *et al.* (2017). Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 18, 1327–1337.

Drilon, A., Schoenfeld, A.J., Arbour, K.C., Litvak, A., Ni, A., Montecalvo, J., Yu, H.A., Panora, E., Ahn, L., Kennedy, M., *et al.* (2019). Exceptional responders with invasive mucinous adenocarcinomas: a phase 2 trial of bortezomib in patients with KRAS G12D-mutant lung cancers. Cold Spring Harb Mol Case Studies 5.

Drilon, A., Siena, S., Ou, S.I., Patel, M., Ahn, M.J., Lee, J., Bauer, T.M., Farago, A.F., Wheler, J.J., Liu, S.V., *et al.* (2017). Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). Cancer Discov. 7, 400–409.

Fang, C., Chen, Y.X., Wu, N.Y., Yin, J.Y., Li, X.P., Huang, H.S., Zhang, W., Zhou, H.H., and Liu, Z.Q. (2017). MiR-488 inhibits proliferation and cisplatin sensibility in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells by activating the eIF3a-mediated NER signaling pathway. Sci. Rep. 7, 40384.

Gandolfi, S., Laubach, J.P., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K.C., and Richardson, P.G. (2017). The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. Cancer Metastasis Rev. 36, 561–584.

Garber, K. (2006). Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* *312*, 1158-1159.

Garon, E. B., Hellmann, M. D., Rizvi, N. A., Carcereny, E., Leighl, N. B., Ahn, M. J., Eder, J. P., Balmanoukian, A. S., Aggarwal, C., Horn, L., *et al.* (2019). Five-Year Overall Survival for Patients With Advanced NonSmall-Cell Lung Cancer Treated With Pembrolizumab: Results From the Phase I KEYNOTE-001 Study. *J. Clin. Oncol.* *37*, 2518-2527.

Gu, J. J., Kaufman, G. P., Mavis, C., Czuczman, M. S., and Hernandez-Ilizaliturri, F. J. (2017). Mitotic catastrophe and cell cycle arrest are alternative cell death pathways executed by bortezomib in rituximab resistant B-cell lymphoma cells. *Oncotarget* *8*, 12741-12753.

Hallermalm, K., Seki, K., Wei, C., Castelli, C., Rivoltini, L., Kiessling, R., and Levitskaya, J. (2001). Tumor necrosis factor- α induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. *Blood* *98*, 1108-1115.

Herbst, R., Heymach, J., and Lippman, S. (2008). Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1367-1380.

Ishikawa, T., and Ali-Osman, F. (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J. Biol. Chem.* *268*, 20116-20125.

Ji, C.H., and Kwon, Y.T. (2017). Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Mol. Cells* *40*, 441-449.

Karasawa, T., and Steyger, P. S. (2015). An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicol. Lett.* *237*, 219-227.

Komatsu, M., Sumizawa, T., Mutoh, M., Chen, Z. S., Terada, K., Furukawa, T., Yang, X. L., Gao, H., Miura, N., Sugiyama, T., *et al.* (2000). Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* *60*, 1312-1316.

Kwak, E. L., Bang, Y. J., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Solomon, B., Maki, R. G., Ou, S. H., Dezube, B. J., Janne, P. A., Costa, D. B., *et al.* (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1693-1703.

Lara, P. J., Chansky, K., Davies, A., Franklin, W., Gumerlock, P., Guaglianone, P., Atkins, J., Farneth, N., Mack, P., Crowley, J., *et al.* (2006). Bortezomib (PS-341) in relapsed or refractory extensive stage small cell lung cancer: a

Southwest Oncology Group phase II trial (S0327). *J. Thorac. Oncol.* *1*, 996–1001.

Ling, Y.H., Liebes, L., Jiang, J.D., Holland, J.F., Elliott, P.J., Adams, J., Muggia, F.M., and Perez-Soler, R. (2003). Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* *9*, 1145–1154.

Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., Harada, M., Yoshizawa, H., Kinoshita, I., *et al.* (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* *362*, 2380–2388.

Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* *18*, 3066–3077.

Martins, I., Kepp, O., Schlemmer, F., Adjemian, S., Tailler, M., Shen, S., Michaud, M., Menger, L., Gdoura, A., Tajeddine, N., *et al.* (2011). Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* *30*, 1147–1158.

Mok, T.S.K., Wu, Y.-L., Kudaba, I., Kowalski, D.M., Cho, B.C., Turna, H.Z., Castro, G., Srimuninnimit, V., Laktionov, K.K., Bondarenko, I., *et al.* (2019). Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* *393*, 1819–1830.

Muchamuel, T., Basler, M., Aujay, M.A., Suzuki, E., Kalim, K.W., Lauer, C., Sylvain, C., Ring, E.R., Shields, J., Jiang, J., *et al.* (2009). A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.* *15*, 781–787.

Nathan, J.A., Spinnenhirn, V., Schmidtke, G., Basler, M., Groettrup, M., and Goldberg, A.L. (2013). Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. *Cell* *152*, 1184–1194.

Niewerth, D., Franke, N.E., Jansen, G., Assaraf, Y.G., van Meerloo, J., Kirk, C.J., Degenhardt, J., Anderl, J., Schimmer, A.D., Zweegman, S., *et al.* (2013). Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. *Haematologica* *98*, 1896–1904.

Niewerth, D., Kaspers, G., Assaraf, Y., van Meerloo, J., Kirk, C., Anderl, J.,

Blank, J., van de Ven, P., Zweegman, S., Jansen, G., *et al.* (2014). Interferon- γ -induced upregulation of immunoproteasome subunit assembly overcomes bortezomib resistance in human hematological cell lines. *J. Hematol. Oncol.* *7*.

Niewerth, D., Kaspers, G. J., Jansen, G., van Meerloo, J., Zweegman, S., Jenkins, G., Whitlock, J.A., Hunger, S.P., Lu, X., Alonzo, T.A., *et al.* (2016). Proteasome subunit expression analysis and chemosensitivity in relapsed paediatric acute leukaemia patients receiving bortezomib-containing chemotherapy. *J. Hematol. Oncol.* *9*, 82.

Nikesitch, N., Lee, J.M., Ling, S., and Roberts, T.L. (2018). Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance. *Clin Transl Immunology* *7*, e1007.

Noda, K., Nishiwaki, Y., Kawahara, M., Negoro, S., Sugiura, T., Yokoyama, A., Fukuoka, M., Mori, K., Watanabe, K., Tamura, T., *et al.* (2002). Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *346*, 85-91.

Ohe, Y., Ohashi, Y., Kubota, K., Tamura, T., Nakagawa, K., Negoro, S., Nishiwaki, Y., Saijo, N., Ariyoshi, Y., and Fukuoka, M. (2007). Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. *Ann. Oncol.* *18*, 317-323.

Otsubo, K., Nosaki, K., Imamura, C.K., Ogata, H., Fujita, A., Sakata, S., Hirai, F., Toyokawa, G., Iwama, E., Harada, T., *et al.* (2017). Phase I study of salazosulfapyridine in combination with cisplatin and pemetrexed for advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* *108*, 1843-1849.

Papadopoulos, K.P., Burris, H.A., 3rd, Gordon, M., Lee, P., Sausville, E.A., Rosen, P.J., Patnaik, A., Cutler, R.E., Jr., Wang, Z., Lee, S., *et al.* (2013). A phase I/II study of carfilzomib 2-10-min infusion in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *72*, 861-868.

Parlati, F., Lee, S.J., Aujay, M., Suzuki, E., Levitsky, K., Lorens, J.B., Micklem, D.R., Ruurs, P., Sylvain, C., Lu, Y., *et al.* (2009). Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood* *114*, 3439-3447.

Paz-Ares, L., de Marinis, F., Dediu, M., Thomas, M., Pujol, J.-L., Bidoli, P., Molinier, O., Sahoo, T.P., Laack, E., Reck, M., *et al.* (2012). Maintenance therapy

with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* *13*, 247-255.

Pickering, A.M., Koop, A.L., Teoh, C.Y., Ermak, G., Grune, T., and Davies, K.J. (2010). The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 α beta proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* *432*, 585-594.

Planchard, D., Smit, E.F., Groen, H.J.M., Mazieres, J., Besse, B., Helland, Å., Giannone, V., D'Amelio, A.M., Zhang, P., Mookerjee, B., *et al.* (2017). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* *18*, 1307-1316.

Pujol, J.L., Carestia, L., and Daures, J.P. (2000). Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent. *Br. J. Cancer* *83*, 8-15.

Q, L., Yu, J., Mu, C., Yunbam, M., Slavsky, D., Cross, C., Bostick-Bruton, F., and Reed, E. (2000). Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* *20*, 645-652.

Reedijk, J. (1999). Why does Cisplatin reach Guanine-n7 with competing s-donor ligands available in the cell? *Chem. Rev.* *99*, 2499-2510.

Richardson, P., Sonneveld, P., Schuster, M., Irwin, D., Stadtmauer, E., Facon, T., Harousseau, J., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., *et al.* (2005). Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 2487-2498.

Rittmeyer, A., Barlesi, F., Waterkamp, D., Park, K., Ciardiello, F., von Pawel, J., Gadgeel, S.M., Hida, T., Kowalski, D.M., Dols, M.C., *et al.* (2017).

Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* *389*, 255-265.

Roeten, M.S.F., Cloos, J., and Jansen, G. (2018). Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *81*, 227-243.

Rouette, A., Trofimov, A., Haberl, D., Boucher, G., Lavallee, V.P., D'Angelo, G., Hebert, J., Sauvageau, G., Lemieux, S., and Perreault, C. (2016). Expression of immunoproteasome genes is regulated by cell-intrinsic and -extrinsic factors in human cancers. *Sci. Rep.* *6*, 34019.

Scagliotti, G.V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., *et al.* (2008). Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* *26*, 3543-3551.

Schiller, J.H., Harrington, D., Belani, C.P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., Johnson, D.H., and Eastern Cooperative Oncology, G. (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *346*, 92-98.

Shaw, A.T., Ou, S.H., Bang, Y.J., Camidge, D.R., Solomon, B.J., Salgia, R., Riely, G.J., Varella-Garcia, M., Shapiro, G.I., Costa, D.B., *et al.* (2014). Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *371*, 1963-1971.

Sherr, C., and Roberts, J. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* *13*, 1501-1512.

Solomon, B.J., Kim, D.W., Wu, Y.L., Nakagawa, K., Mekhail, T., Felip, E., Cappuzzo, F., Paolini, J., Usari, T., Tang, Y., *et al.* (2018). Final Overall Survival Analysis From a Study Comparing First-Line Crizotinib Versus Chemotherapy in ALK-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* *36*, 2251-2258.

Strauss, S.J., Higginbottom, K., Juliger, S., Maharaj, L., Allen, P., Schenkein, D., Lister, T.A., and Joel, S.P. (2007). The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Res.* *67*, 2783-2790.

Sullivan, E.J., Kurtoglu, M., Brenneman, R., Liu, H., and Lampidis, T.J. (2014). Targeting cisplatin-resistant human tumor cells with metabolic inhibitors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *73*, 417-427.

Tanaka, K., and Kasahara, M. (1998). The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* *163*, 161-176.

Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., Kagotani, K., Okumura, K., Akiyama, S., and Kuwano, M. (1996). A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in

cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* *56*, 4124-4129.

Thomas, S., Kotamraju, S., Zielonka, J., Harder, D.R., and Kalyanaraman, B. (2007). Hydrogen peroxide induces nitric oxide and proteasome activity in endothelial cells: a bell-shaped signaling response. *Free Radic. Biol. Med.* *42*, 1049-1061.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* *65*, 87-108.

Vermes, I., Haanen, C., and Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* *243*, 167-190.

Wangpaichitr, M., Sullivan, E.J., Theodoropoulos, G., Wu, C., You, M., Feun, L.G., Lampidis, T.J., Kuo, M.T., and Savaraj, N. (2012). The relationship of thioredoxin-1 and cisplatin resistance: its impact on ROS and oxidative metabolism in lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 604-615.

Wangpaichitr, M., Wu, C., Li, Y.Y., Nguyen, D.J.M., Kandemir, H., Shah, S., Chen, S., Feun, L.G., Prince, J.S., Kuo, M.T., *et al.* (2017). Exploiting ROS and metabolic differences to kill cisplatin resistant lung cancer. *Oncotarget* *8*, 49275-49292.

Xu, Y., Wang, C., and Li, Z. (2014). A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress. *Mol Clin Oncol* *2*, 3-7.

Yu, F., Megyesi, J., and Price, P.M. (2008). Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *295*, F44-52.

Zaffagnini, G., and Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *J. Mol. Biol.* *428*, 1714-1724.

Zhang, L., Boufraquech, M., Lake, R., and Kebebew, E. (2016). Carfilzomib potentiates CUDC-101-induced apoptosis in anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget* *7*, 16517-16528.

Zhou, Z., He, M., Shah, A.A., and Wan, Y. (2016). Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics. *Cell Div.* *11*, 9.

Zisowsky, J., Koegel, S., Leyers, S., Devarakonda, K., Kassack, M.U., Osmak, M., and Jaehde, U. (2007). Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* *73*, 298-307.

Zu, L., Bedja, D., Fox-Talbot, K., Gabrielson, K.L., Van Kaer, L., Becker, L.C., and Cai, Z.P. (2010). Evidence for a role of immunoproteasomes in regulating

cardiac muscle mass in diabetic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 5-15.