

Title	非小細胞肺癌における非相同末端結合阻害によるパクリタキセル耐性克服に関する研究
Author(s)	过,康介
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15648号
Issue Date	2023-09-25
DOI	10.14943/doctoral.k15648
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90973
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:
File Information	TSUJI_Kosuke.pdf



## 学位論文

非小細胞肺癌における非相同末端結合阻害による パクリタキセル耐性克服に関する研究 (Studies on overcoming paclitaxel resistance by inhibition of non-homologous end joining in non-small cell lung cancer)

2023年9月

北海道大学

辻 康 介

## 学位論文

非小細胞肺癌における非相同末端結合阻害による パクリタキセル耐性克服に関する研究 (Studies on overcoming paclitaxel resistance by inhibition of non-homologous end joining in non-small cell lung cancer)

2023年9月

北海道大学

辻 康 介

発表	論	文	目	録	お	よ	び	学	会	発	表	目	録		•	•	•	•	•	•	•	1	頁
要旨	ł	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	2	頁
略語	·表		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	5	頁
緒言	Ī	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	7	頁
実験	方	法		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	12	頁
実験	結	果		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	18	頁
考察	ŧ	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	33	頁
総括	お	よ	び	結	論		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	36	頁
謝辞	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	37	頁
利益	相	反		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	38	頁
引用	文	献		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	39	頁

目

次

#### 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

 Kosuke Tsuji, Eiki Kikuchi, Yuta Takashima, Tetsuaki Shoji, Hirofumi Takahashi, Shotaro Ito, Daisuke Morinaga, Masahiro Kashima, Makie Maeda, Hidenori Kitai, Junko Kikuchi, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Konno Inhibition of non-homologous end joining mitigates paclitaxel resistance resulting from mitotic slippage in non-small cell lung cancer Cell Cycle

本研究の一部は以下の学会に発表した。

- Kosuke Tsuji, Eiki Kikuchi, Yuta Takashima, Tetsuaki Shoji, Hajime Asahina, Junko Kikuchi, Naofumi Shinagawa, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Konno Inhibition of DNA damage repair for mitotic slippage after paclitaxel treatment in non-small cell lung cancer 第81回日本癌学会学術総会、2022年9月29日、横浜
- 注 康介、菊地 英毅、髙島 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 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 第63回日本肺癌学会学術集会、2022年12月1日、福岡

1

【背景と目的】 肺癌は癌関連死亡原因の第一位であり、年々その死亡者数は増加 している。分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の開発により非小細胞肺癌患者 の予後は改善したものの、長期生存が得られる症例はいまだ限られており、今日でも 従来型の殺細胞性抗癌剤が頻用されている。パクリタキセルやドセタキセルは非小細 胞肺癌を含む多くの癌腫に対して使用される殺細胞性抗癌剤である。

パクリタキセルは代表的なタキサン系薬剤であり、細胞分裂の際に微小管の脱重 合を阻害することで細胞分裂を阻害して抗腫瘍効果を示す薬剤である。パクリタキセ ルが微小管を構成するβチュブリンに結合すると、M期で染色体は微小管と正しく接 着することができず、紡錘体形成チェックポイント(spindle assembly checkpoint: SAC)が活性化される。SAC が活性化されると、後期促進複合体/サイクロソームによ るサイクリン B1 の分解が阻害されることにより細胞周期の進行を阻害され、M期で の停止や異常な細胞分裂を起こす。また、DNA2 本鎖切断(double-strand break: DSB)やアポトーシスによる細胞死を引き起こすことで殺細胞性抗癌剤として作用す る。

Mitotic slippage とは細胞質分裂なしで早期に細胞分裂を終了させ、G1 期に移行 する現象であり、パクリタキセル耐性の機序の1つと考えられている。パクリタキセ ルにより M 期停止を起こした細胞は分裂期細胞死が誘導されるか、あるいはmitotic slippage が起こり、早期にG1 期に移行し、細胞死を回避しようとする。G1 期での DSB は非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ)のみによって修復され るので、mitotic slippage 後の DSB は NHEJ により修復されると考えられる。

そこで我々は、mitotic slippage によりパクリタキセル誘導性 DSB が G1 期に移行 した後で NHEJ 修復を阻害することにより、アポトーシスを増強できるという仮説を 立て、非小細胞肺癌細胞株に対するパクリタキセルの効果と mitotic slippage の関 連を評価し、NHEJ 阻害薬とパクリタキセルの併用効果を検討した。また、新たに作 成したパクリタキセル耐性細胞を使用してパクリタキセルまたはドセタキセルと NHEJ 阻害薬の併用効果を評価した。

【材料と方法】 4 種類の非小細胞肺癌株 A549、H1299、H1975、H520 を用いた。非 小細胞肺癌細胞株 A549 を培養する際に培地に低濃度のパクリタキセルを添加してパ クリタキセル耐性を誘導し、パクリタキセル耐性細胞 A549-PR を作成した。NHEJ 阻 害薬として A-196 および JQ1 を用いた。パクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用効果を MTT 法を用いて評価した。細胞周期の評価はプロピジウムイオダイド(propidium iodide: PI)と抗リン酸化ヒストン H3 を用いたフローサイトメトリー法で行った。 細胞分裂はタイムラプス顕微鏡を用いて観察した。DNA 損傷修復能の評価として 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。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および抗 cleaved PARP 抗体を用いたウエスタンブロット法で行 った。DSB の評価は抗γH2AX を用いたウエスタンブロット法で行った。分裂期細胞死 の誘導効果は抗βチュブリン抗体と4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) によ る蛍光免疫染色法を用いて評価した。SAC に関わるタンパク発現を抗 MAD2 抗体、抗 p31<sup>comet</sup> 抗体、抗 cyclin B1 抗体を用いたウエスタンブロット法で評価した。細胞周 期に関わる因子の mRNA 発現を定量的逆転写 PCR 法を用いて評価した。

【結果】 H1299 の IC<sub>50</sub>は他の細胞と比較して高く、パクリタキセル耐性であること が判明した。また、H1299 はパクリタキセル処理後の M 期停止の効果が小さく、M 期 の持続時間が短く、mitotic slippage が増加した。

NHEJ 阻害薬はH1299 においてパクリタキセルが誘導する細胞毒性、DSB、アポトーシスを有意に増強したが、他の細胞では併用効果は認めなかった。

H1299 に対するパクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用により、mitotic slippage 後の post-mitotic death はパクリタキセル単剤と比較して増加した。パクリタキセル 単剤で異常な細胞分裂を呈する細胞が観察されたが、パクリタキセルと NHEJ 阻害薬 の併用でその割合に有意な変化はみられなかった。以上の結果から、NHEJ 阻害は異 常な有糸分裂に影響することなく、mitotic slippage 後の細胞死を増加させたこと が示された。

新たに作成したパクリタキセル耐性誘導細胞株はパクリタキセル処理後にmitotic slippage が増加した。また、パクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用により、パクリタキセルが誘導する細胞毒性、DSB、アポトーシスを有意に増強した。以上の結果から、NHEJ 阻害薬によりパクリタキセルの感受性が回復したことが示された。

パクリタキセル耐性細胞はドセタキセルにも耐性であった。ドセタキセルはパク リタキセル耐性細胞において NHEJ 阻害薬との併用効果を示した。

【考察】 内因性耐性および獲得耐性の両者のパクリタキセル耐性非小細胞肺癌細胞株において、mitotic slippage がより頻回に起こっていることを確認した。また、NHEJ 阻害はmitotic slippage後のパクリタキセル誘導性 DSB の修復を阻害することによりパクリタキセルの誘導する細胞毒性を増強することを明らかにした。このことから我々が提案する治療戦略は、これまでの報告で試みられていたmitotic slippage 自体を抑制する方法と異なり、DNA 損傷修復を阻害することでmitotic slippage 後の細胞死を誘導することである。

さらに、パクリタキセルと同じタキサン系薬剤であり、前治療歴のある非小細胞肺 癌患者への標準的な化学療法薬であるドセタキセルと NHEJ 阻害薬の併用治療の有効 性を実証した。これらの結果から、ドセタキセルと NHEJ 阻害薬を併用することで、 mitotic slippage に起因するパクリタキセル耐性を克服する有効な戦略となる可能 性がある。

【結論】 NHEJ 阻害薬は H1299 および A549-PR に対して、パクリタキセルとの併用 により相乗的な抗腫瘍効果を認め、NHEJ 阻害は内因性あるいは獲得パクリタキセル 耐性を克服する手段となるかもしれない。この2剤の併用は非小細胞肺癌に対する新 たな治療戦略となりうる。

## 略語表

本文中および図	中で使用した略語は以下のとおりである。
ALK	anaplastic lymphoma kinase
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
Ct	threshold cycle
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dullbecco's Modified Eagle Medium
DSB	double-strand break
DsRed	Discosoma striata Red
DTX	docetaxel
EGFR	epidermal growth factor receptor
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
HR	homologous recombination
$IC_{50}$	half maximal inhibitory concentration
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LL	lower left
LR	lower right
MEM	Minimum Essential Media
MET	mesenchymal-epithelial transition factor
MTT	3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium
	bromide
NHEJ	non-homologous end joining
NTRK	neurotrophic tyrosine receptor kinase
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed cell death ligand 1
pHH3	phospho-histone H3
PI	propidium iodide
PMD	post-mitotic death
PTX	paclitaxel
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RET	rearranged during transfection
ROS1	v-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1

RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SAC	spindle assembly checkpoint
SSB	single-strand break
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
UL	upper left
UR	upper right

#### 1) 肺癌について

肺癌は世界で年に約200万人以上が罹患し、増加している(Bray et al, 2018; Parkin et al, 2005)。また世界で年間約160万人が死亡する癌関連死亡原因の第一 位である(Hirsch et al, 2017; Sung et al, 2021)。日本においても肺癌による死 亡は全悪性新生物死亡の原因として最多であり、男性では第一位、女性では乳癌に次 ぐ第二位であり、年々その死亡者数は増加している(Katanoda et al, 2021)。

肺癌は病理学的に非小細胞肺癌と小細胞肺癌の2つに大別され、非小細胞肺癌が 約85%を占める(Herbst et al, 2008)。非小細胞肺癌の治療は病変が局所にとどま る場合は治癒を目指した外科的切除あるいは放射線治療が選択されるが、30-50%を占 める進行期に対しては延命あるいは生活の質(QOL)の改善を目指した薬物療法が検 討される(Kennedy et al, 2018; Shi et al, 2019)。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変異が同定され、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)遺伝子 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)遺伝子転座に対する ALK 阻害薬、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)遺伝子転座に対する ROS1 阻害薬、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) 遺伝子変異に対する BRAF 阻害薬、神経 栄養因子受容体チロシンキナーゼ (neurotrophic tyrosine receptor kinase: NTRK) 遺伝子変異に対する NTRK 阻害薬、間葉上皮転換因子 (mesenchymalepithelial transition factor: MET)遺伝子変異に対する MET 阻害薬、トランスフ ェクション中再構成 (rearranged during transfection: RET) 遺伝子変異に対する RET 阻害薬、v-Ki-ras2 カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ(v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog: KRAS) 遺伝子変異に対する KRAS 阻 害薬が 2023 年時点で日本で使用可能となっており、これらの分子標的療法により長 期予後が期待されるようになった(Soria et al, 2018; Peters et al, 2017; Shaw et al, 2014; Planchard et al, 2016; Doebele et al, 2020; Paik et al, 2020; Drilon et al, 2020; Skoulidis et al, 2021)。しかし、これらの分子標的療法の対 象となるのは非小細胞肺癌の30%程度に留まり、分子標的療法の対象となり奏効が得 られても大半の症例では耐性を獲得して再増悪する(Arbour and Riely, 2019)。

さらに近年、腫瘍免疫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薬が開発されている。非小細胞肺癌において programmed cell death 1 (PD-1) や programmed cell death ligand 1 (PD-L1)、細胞傷害性 T リンパ球抗原4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; CTLA-4) に対する抗体療法の 有効性が報告されている (Reck et al, 2016; Herbst et al, 2020)。これらの免疫 チェックポイント阻害薬は単剤での治療だけではなく、殺細胞性抗癌剤との併用、殺 細胞性抗癌剤と血管新生阻害薬との併用、化学放射線療法後の維持療法としても使用 され、その有効性が報告されている (Mok et al, 2019; Socinski et al, 2018; Antonia et al, 2017)。しかし、腫瘍の蛋白質発現プロファイルから効果が期待でき ない症例、併存疾患のために使用できない症例、そして使用しても免疫関連有害事象 等により治療継続不能となる症例も多いのが現状である。

これらの分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の開発により非小細胞肺癌患 者の予後は改善したものの、長期生存が得られる症例はいまだ限られている。分子標 的薬や免疫チェックポイント阻害薬が使用不能あるいは抵抗性を示した症例では今日 でも従来型の殺細胞性抗癌剤が頻用される。パクリタキセルやドセタキセルは非小細 胞肺癌を含む多くの癌腫に対して使用される殺細胞性抗癌剤であり、細胞周期を標的 とする(Sandler et al, 2006; Garon et al, 2014)。

非小細胞肺癌に対する一次治療としてパクリタキセルが使用される場合、一般的 にプラチナ系薬剤であるカルボプラチンと併用され、無増悪生存期間中央値は4.5ヵ 月、全生存期間中央値は10.3ヵ月と報告される(Sandler et al, 2006)。また、カ ルボプラチンに加えて、血管新生阻害薬であるベバシズマブと併用することにより、 無増悪生存期間中央値6.2ヵ月、全生存期間中央値12.3ヵ月と有意な予後改善が報 告されている(Sandler et al, 2006)。カルボプラチンとベバシズマブに加えて、免 疫チェックポイント阻害薬であるアテゾリズマブとの併用では無増悪生存期間中央値 は8.3ヵ月、全生存期間中央値は19.2ヵ月と報告された(Socinski et al, 2018)。 パクリタキセルと同じタキサン系薬剤であるドセタキセルは、一次治療でシスプラチ ンなどのプラチナ系薬剤と併用されこともあるが、主に二次治療としての標準治療薬 である。二次治療で使用される場合は単剤あるいは血管新生阻害薬であるラムシルマ ブと併用される(Belani et al, 2002; Garon et al, 2014)。しかし、これらの治療 においても治療開始後数ヵ月で耐性となる場合が多い(Sandler et al, 2006; Garon et al, 2014)。

#### 2) パクリタキセルについて

パクリタキセルはタイヘイヨウイチイ(Taxus brevifolia)の樹皮から分離され た代表的なタキサン系薬剤であり、1967年に初めて報告された。1992年に米国食品 医薬品局により卵巣癌に対してその使用が承認され、その後非小細胞肺癌、乳癌など を含む様々な悪性腫瘍に承認され、広く治療に使用されている。分子式はC47H51N014 であり、細胞分裂の際に微小管の脱重合を阻害することで細胞分裂を阻害して抗腫瘍効果を示す薬剤である(Zhu and Chen, 2019)。

パクリタキセルが微小管を構成する $\beta$ チュブリンに結合すると、M 期で染色体は微 小管と正しく接着することができず、紡錘体形成チェックポイント (spindle assembly checkpoint: SAC) が活性化される (Henriques et al, 2021)。SAC が活性 化されると、後期促進複合体/サイクロソームによるサイクリン B1 の分解が阻害され ることにより細胞周期の進行を阻害され、M 期での停止 (mitotic arrest) や異常な 細胞分裂を起こす (Lara-Gonzalez et al, 2012)。また、DNA2 本鎖切断 (doublestrand break: DSB) やアポトーシスによる細胞死を引き起こすことで殺細胞性抗癌 剤として作用する (Weaver, 2014)。

#### 3) パクリタキセル耐性について

パクリタキセルに長期に曝露されると癌細胞は耐性を獲得する。パクリタキセル耐 性機序として主に以下の5点が考えられている。

1. 薬剤排泄促進

ATP binding cassette B1 などの薬剤排泄トランスポーターの過剰発現により、細胞外へのパクリタキセルの排出が強化されることでパクリタキセル耐性となる (Gottesman, 2002)。

2. 微小管の薬剤結合部位の遺伝子変異

パクリタキセルは微小管に結合することで作用を発揮するが、微小管の薬剤系結合 部位の遺伝子変異が生じるとパクリタキセルが結合できなくなり、パクリタキセル耐 性となる (Yin et al, 2012)。

3. アポトーシスシグナルへの感受性低下

パクリタキセルはM期停止や異常な細胞分裂を起こすことにより、その後のアポト ーシスによる細胞死を引き起こす。Bc1-2などのアポトーシス抑制性タンパクの過剰 発現などによりアポトーシスシグナルへの感受性が低下すると、細胞死が起こらない ためパクリタキセル耐性となる(Blagosklonny and Fojo, 1999)。

4. 微小管動態の変化

パクリタキセルは微小管の脱重合を阻害し、微小管を安定化させることでその効果 を発揮する。CD147の過剰発現などにより微小管が不安定化し、微小管動態が変化す ることによりパクリタキセル耐性となる(Nan et al, 2022)。

5. Mitotic slippage

パクリタキセルは微小管に作用して M 期停止や異常な細胞分裂を起こすことでその 後の細胞死を増強させるが、早期に細胞分裂を終了させて細胞周期から逸脱すること によりM期停止や異常な細胞分裂を回避するmitotic slippage という現象をおこし、パクリタキセルの作用を回避する (Han et al, 2021)。

#### 4) Mitotic slippage について

Mitotic slippage とは細胞質分裂なしで早期に細胞分裂を終了させ、G1 期に移行 する現象であり、パクリタキセル耐性の機序の1つと考えられている(Han et al, 2021)。パクリタキセルにより M 期停止を起こした細胞は分裂期細胞死が誘導される か、あるいはmitotic slippage が起こり、早期にG1 期に移行し、細胞死を回避しよ うとする。Slippage した細胞は細胞周期にリエントリーするかG1 期で細胞死に陥 る。細胞周期にリエントリーして細胞死を回避した細胞はしばしば不完全な細胞分裂 に伴う染色体の不安定性やDNA 損傷を伴う(Vitale et al, 2011)。

パクリタキセル耐性とmitotic slippage に関していくつか前臨床研究が施行され ている。膀胱癌細胞では、アポトーシス抑制性タンパクであるMcl-1の過剰発現によ るパクリタキセル耐性がある場合に、BH3 模倣薬であるオバトクラックスとパクリタ キセルの併用効果を認め、mitotic slippage を減少させた(Jimenez-Guerrero et al, 2018)。卵巣癌細胞では、Mcl-1阻害薬であるA1210477 と後期促進複合体/サイ クロソーム阻害薬である pro-Tosyl-L-Arginine Methyl Ester との併用により、パク リタキセル耐性であるサイクリンE1 増幅卵巣癌細胞でのパクリタキセルの効果を高 め、mitotic slippage を減少させた(Raab et al, 2020)。これらの研究は主にアポ トーシスシグナルへの感受性の増強やmitotic slippage 自体の抑制を試みることで パクリタキセル耐性を克服しようとしている。Mitotic slippage によりパクリタキ セル耐性となった場合でも、mitotic slippage 後の細胞死を増強させることでパク リタキセル耐性を克服できる可能性があるが、このことを検証した報告はほとんどな い。

#### 5) DNA 損傷修復阻害について

DNA 紫外線や複製エラーなどにより絶えず損傷を受けており、1 つの細胞で1 日あ たり数万から数十万箇所の損傷が生じている(Lindahl and Barnes, 2000)。DNA 損 傷は1本鎖切断(single-strand break: SSB)と DSB に分けられる(Li et al, 2019)。SSB は損傷を受けていない相補 DNA 鎖を鋳型にして数分以内に修復されるた め、重篤な影響には至らないことが多いが、DNA 鎖が2本とも切断させている DSB は 多くの因子が関わる複雑な機構で修復が行われ、修復不能な場合はゲノム不安定性や 細胞死に陥る重篤な損傷である(Li et al, 2019)。

DNA 修復阻害により抗癌剤などの DNA 傷害性薬剤の効果を増強させることができる。DSB の主要な修復機構には非相同末端結合(non-homologous end joining:

NHEJ) と相同組換え (homologous recombination: HR) の2つがある (Brandsma and Gent, 2012; Li et al, 2019)。HR は損傷部位と同じ遺伝子情報を持つ娘染色体を鋳型として修復を行うため正確な修復が可能であるが、娘染色体が存在する細胞周期の S 期から G2 期に限定される。一方、NHEJ は切断された DNA 末端同士をそのまま結合して修復を行うため修復エラーが起こりやすいが、細胞周期を通じて行うことができる (Brandsma and Gent, 2012)。

BRCA 変異乳癌やHR 遺伝子変異前立腺癌に対する PRAP 阻害薬などHR 阻害を利用した治療法は広く臨床応用されている一方、NHEJ を標的とした治療の開発は遅れている(Robson et al, 2017; de Bono et al, 2020)。

#### 6) NHEJ 阻害薬

現時点で臨床応用されている NELJ 阻害薬は存在しない。いくつかの薬剤が前臨床 研究で使用されている。

A-196 は NHEJ を特異的に阻害する薬剤であり、その機序はヒストン H4K20 メチル 化酵素 SUV-20H1/H2 の阻害による H4K20 モノメチル化修飾のジメチル化/トリメチル 化(H4K20me2/3)阻害である (Bromberg et al, 2017)。JQ1 は bromodomain and extra terminal domain 阻害薬であるが、NHEJ に関連する遺伝子の発現を抑制することによ り、NHEJ を抑制すると報告されている (Takashima et al, 2020; Stanlie et al, 2014)。

#### 7) 本研究の仮説

G1 期でのDSB はNHEJ のみによって修復されるので、mitotic slippage 後のDSB はNHEJ により修復されると考えられる。このことから、mitotic slippage によりパク リタキセル誘導性DSB がG1 期に移行した後でNHEJ 修復を阻害することにより、アポ トーシスを増強できる。この2剤併用療法についての報告はこれまでないが、非小細 胞肺癌に対する新たな治療方法となりうる。

#### 8) 本研究の目的

NHEJ 阻害を応用した非小細胞肺癌に対する新たな治療法を開発するため、非小細胞肺癌細胞株に対するパクリタキセルの効果とmitotic slippageの関連を評価し、 NHEJ 阻害薬とパクリタキセルの併用効果を検討する。また、新たに作成したパクリ タキセル耐性細胞を使用してパクリタキセルまたはドセタキセルと NHEJ 阻害薬の併 用効果を評価する。

#### 実験方法

#### 細胞株と薬剤

細胞株は4種類の非小細胞肺癌株A549、H1299、H1975、H520とヒト胎児腎細胞株 293Tを用いた。非小細胞肺癌株はAmerican Type Culture Collection (米国バージ ニア州マナサス)から購入し、293T は理化学研究所バイオリソース研究センター

(つくば市)から購入した。細胞の培養には、非小細胞肺癌株はローズウェルパーク 記念研究所培地(Roswell Park Memorial Institute medium: RPMI)、293T はダルベ ッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM)を使用した。 RPMIには10%の牛胎仔血清(Fetal bovine serum: FBS)、DMEMには10%の非動化FBS を添加し、5%C02下の37℃湿潤環境で培養した。

パクリタキセルはSelleck Chemicals (米国テキサス州ヒューストン)、NEJ 阻害 薬 A-196 および JQ1 は Cayman Chemical Company (米国ミシガン州アナーバー)から 購入した。

#### パクリタキセル耐性非小細胞肺癌株の樹立

非小細胞肺癌細胞株 A549 を培養する際に培地に低濃度のパクリタキセルを添加し てパクリタキセル耐性を誘導し、パクリタキセル耐性細胞を作成した。パクリタキセ ル濃度は 0.67 nmol/L から開始し、3.7 nmol/L まで漸増した。その後、3.7 nmol/L で1ヵ月以上培養して得られた細胞をパクリタキセル耐性細胞として使用した。

得られたパクリタキセル耐性細胞は、親細胞の名称の後に PR を付して命名した。 パクリタキセル耐性非小細胞肺癌細胞 A549-PR は親細胞 A549 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、1 ウェルあたりの散布細胞数は A549: 2000 個、H1299: 2000 個、H1975: 2000 個、H520: 6000 個、A549-PR: 2000 個とした。一晩培養後、濃 度勾配をつけてパクリタキセル、A-196、JQ1 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:  $IC_{50}$ ) を GraphPad Prism v8.4.3 (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。

#### ウエスタンブロット法

各種タンパクの発現はウエスタンブロット法を用いて検討した。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。サンプルのタンパク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。転写後にポンソS で染色しタンパクのローディングが均一であるかを確認した。確認後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液を用いて4℃下で一晩振盪した。

翌日に TBST で 5 分×6 回の洗浄施行後、二次抗体を 60 分添加した。再度 TBST で 5 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。

一次抗体は抗アクチン抗体(1:1500、#A2066、シグマ・アルドリッチ社、米国ミ ズーリ州セントルイス)、抗 cleaved PARP 抗体(1:1000、#5625、セル・シグナリン グ・テクノロジー社、米国マサチューセッツ州ダンバース)、抗 y H2AX 抗体

(1:1000、#2577、セル・シグナリング・テクノロジー社)、抗 MAD2 抗体 (1:1000、 #4636、セル・シグナリング・テクノロジー社)、抗 p31<sup>comet</sup> 抗体 (1:1000、 ab150363、アブカム社、英国ケンブリッジシャー州ケンブリッジ)、抗 cyclin B1 抗 体 (1:1000、#4138、セル・シグナリング・テクノロジー社)をそれぞれ使用した。 バンド強度は National Institutes of Health ImageJ Ver1.52 software (アメリカ 国立衛生研究所、米国メリーランド州ベセスダ)を用いた定量的デンシトメトリー分 析で示し、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同じブ ロットのアクチンを用いた。

#### 細胞周期の解析

パクリタキセル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 (9×10<sup>5</sup> 個)、H1299 (7×10<sup>5</sup> 個)、H1975 (9×10<sup>5</sup> 個)、H520 (18×10<sup>5</sup> 個)、A549-PR (9×10<sup>5</sup> 個)を10 cm ディッシュで培養し、24 時間後にパクリタキセ ルを投与した。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℃下で70%エタノールを用いて4時間固定処理を行っ 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 (phospho-histone H3: pHH3)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 フローサイトメーター (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 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

MEBCYTO Apoptosis Kit (Annexin V-FITC kit) (医学生物学研究所、名古屋市)を 用いて行った。A549 (7×10<sup>5</sup>個)、H1299 (5×10<sup>5</sup>個)、H1975 (7×10<sup>5</sup>個)、H520 (14 ×10<sup>5</sup>個)、A549-PR (7×10<sup>5</sup>個)を10 cm ディッシュで培養し、24 時間後にパクリタ キセル、A-196、JQ1を投与した。72 時間後にトリプシンで処理し、PBS で2回洗浄 した後に Binding Buffer 85 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)の二重染色を行い、暗所 で15分間静置した後に測定を行った。測定は BD FACSVerse フローサイトメーター (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。

#### NHEJ 修復活性の解析

1. NHEJ 修復レポーター試験の概要

NHEJ 修復活性の定量を 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。Green fluorescent protein (GFP) を発現したレポーター プラスミドである pimEJ5GFP を遺伝子導入した H1299 (H1299-EJ5) と 293T (293T-EJ5) を使用した。pimEJ5GFP は Jeremy Stark 教授から寄贈された (#44026、アドジ ーン社、米国マサチューセッツ州ケンブリッジ) (Bennardo et al, 2008) (Gupta et al, 2018)。GFP 遺伝子は制限酵素 I-SceI の切断領域の挿入によって不活性化さ れている。造礁サンゴ由来赤色蛍光タンパク (Discosoma striata Red: DsRed) を発 現したプラスミドである ISceI-GR-RFP (#17654、アドジーン社) の導入によって I-SceI が発現誘導されると、染色体が切断され DSB が生じ、DSB が NHEJ によって修復 されると GFP 遺伝子が発現することとなる。ISceI-GR-RFP の導入効率を表す DsRed の発現量をもとに GFP の発現を相対評価することで NHEJ 修復活性を評価した。 2. pimEJ5GFP 安定発現細胞株(H1299-EJ5、293T-EJ5)の作成

pimEJ5GFP 1 μg に制限酵素 XhoI (#R0146、ニュー・イングランド・バイオラボ 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ) 1 μg、CutSmart Buffer (ニュー・イ ングランド・バイオラボ社) 5 μg、水を混和し、37℃下で15分間静置することで pimEJ5GFP プラスミドを線状化した。H1299 および293T を 6 ウェルプレートに1 ウェ ルあたり細胞 1.5×10<sup>5</sup> 個散布し一晩培養した後、opti-Minimum Essential Media

(MEM) (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社)を溶媒として、線状化した pimEJ5GFP 3 µg を Lipofectamine2000 (サーモフィッシャー・サイエンティフィック 社) 7 µl と混合し、細胞へ添加した。添加 5 時間後に培養液を交換し、翌日よりピ ューロマイシンを添加して選択培養を行った。2 週間の選択培養後に発育していた単 一細胞塊を回収し、新しいディッシュで培養を続けることで pimEJ5GFP 安定発現細胞 株 (H1299-EJ5、293T-EJ5)を樹立した。

3. NHEJ 修復レポーター試験

H1299-EJ5 (6×10<sup>5</sup>個)、293T-EJ5 (15×10<sup>5</sup>個)を10 cm ディッシュに散布し一晩 培養した。OptiMEM (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社)を溶媒とし て、ISceI-GR-RFP プラスミド 2 µg を Lipofectamine2000 (サーモフィッシャー・サ イエンティフィック社) 15 µg と混合し細胞へ添加した。添加4時間後に PBS で 2 回洗浄し、RPMI (H1299-EJ5)または DMEM (293T-EJ5)と A-196 10 µmol/L または JQ1 0.2 µmol/L を添加した。I-SceI-GR-RFP プラスミドの導入 48 時間後にトリプシンで 処理し、PBS で 2 回洗浄した後に PBS 500 µL で再懸濁した。測定は BD FACSVerse フ ローサイトメーター (ベクトン・ディッキンソン社)を使用し、GFP および DsRed 発 現を測定した。DsRed 陽性細胞に対する GFP 陽性細胞の比を NHEJ 効率と定義した。

#### 細胞分裂の観察

タイムラプス顕微鏡を用いて観察した。A549(5×10<sup>4</sup>個)、H1299(4×10<sup>4</sup>個)、 H1975(5×10<sup>4</sup>個)、H520(10×10<sup>4</sup>個)、A549-PR(5×10<sup>4</sup>個)を35 mm ディッシュで 培養し、24時間後にチミジン(シグマ・アルドリッチ社)を投与して細胞周期を同 期させた。24時間後にPBS で2回洗浄した後にRPMIとパクリタキセル、A-196、JQ1 を投与した。顕微鏡 BZ-9000(キーエンス社、大阪市)で観察を開始し、5%C0<sub>2</sub>下の 37℃湿潤環境で5分間隔で24時間撮影した。最低100細胞の細胞運命を観察した。M 期開始は細胞が丸くなったタイミング、通常の細胞分裂でのM期の終了はM期の中期 になり細胞がくびれて2つに分裂したタイミングと定義し、その間の時間を測定し た。細胞死は細胞収縮、膜ブレブ化、運動停止と定義した。細胞死はM期での細胞死 とmitotic slippage後に細胞死が起こる post-mitotic death (PMD) に分類した。 Mitotic slippage は細胞質分裂なしで M 期を終了することと定義した。

#### 分裂期細胞死の解析

免疫蛍光染色法を用いてパクリタキセルおよび A-196 による分裂期細胞死の誘導効 果を評価した。H1299(5×10<sup>4</sup>個)をチャンバースライド II(IWAKI、東京都)で一 晩培養し、翌日にパクリタキセル、A-196 を添加した。24 時間後に 4℃の PBS で 2回 洗浄し、4%パラホルムアルデヒド 500 µL を用いて 4℃で 20 分間固定した。その後、 4℃の PBS で 3 回洗浄し、0.5%Triton X-100(シグマ・アルドリッチ社)500 µL を 4℃で 10 分間反応させた。再び 4℃の PBS で 2 回洗浄し、Bloking One Histo(ナカ ライテスク社、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 βチュブリン抗体(1:100、#2128、セル・シグナリング・テクノロジー社)を 4℃で 一晩反応させた。翌日、4℃の PBS で 3 回洗浄し、蛍光二次抗体である Alexa Fluor<sup>™</sup> 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℃の PBS で 2 回洗浄し、4', 6diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含む ProLong<sup>™</sup> Glass Mountant with NucBlue<sup>™</sup> (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-9000(キーエンス社)で観察した。

# 定量的逆転写 PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: 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

Direct-zol RNA Miniprep(ザイモリサーチ社、米国カリフォルニア州アーバイ ン)を用いて施行した。細胞培養を行った 10cm 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。室温で 15000g×30 秒間遠心し、無色の上清部分のみを新しいチューブに移した。上清と同 量の 100%エタノールを加え混和した後、キット内のカラム付きコレクションチュー ブに移し、室温で 15000g×30 秒間遠心した。RNA Wash Buffer 400 µL をカラムに加 え、室温で 15000g×30 秒間遠心した。DNase I 5 µL、DN Digestion Buffer 75 µL をカラムに加え、室温で 15 分間静置した。Direct-zol RNA PreWash 400 µL をカラ ムに加え、室温で 15000g×30 秒間遠心し、この作業を2 回繰り返した。RNA Wash Buffer 700 µL をカラムに加え、室温で 15000g×2 分間遠心した。カラムを新しいチ ューブに移し、DNase/RNase-Free Water 50 µL をカラムに加え、室温で 15000g×30 秒間遠心し、コレクションチューブ内に RNA 抽出を施行した。

#### 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)を用いて施行した。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 DNA 量が1 µg になるように RT Enzyme Mix 1 µL、RT Buffer Mix 11 µL 及び RNase フリー水で調整し、逆転写を施行した。反応 時間は 37℃ 60 分、95℃ 5 分で施行した。

#### 3. 定量的 PCR

TaqMan Array Human Cyclins & Cell Cycle Regulations (サーモフィッシャー・ サイエンティフィック社)、TaqMan Universal PCR Master Mix (キアゲン社、ドイツ ヒルデン)を用いて施行した。プライマーはTaqMan Array Human Cyclins & Cell Cycle Regulations に事前に各ウェルに入れられている 44 遺伝子(ATM、ATR、 CCNA1、CCNA2、CCNB1、CCNB2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CCNE2、CCNH、CDC2、 CDC25A, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN2D, E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, GSK3B, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6、HDAC7、HDAC9、PPP2CA、RAF1、RB1、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TP53)のものを 用いた。上記工程で逆転写したサンプル 0.2 µL、マスターミックス 10 µL、RNase フリー水 9.8 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、米国カリフォルニア州フォスターシティ)を用いて 50℃2分、続いて95℃10分、最後に95℃15秒、60℃60秒40サイクルの反応時 間で施行した。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。18S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ACt 法で算出し、コントロール群と各 薬剤投与群の遺伝子発現量の比較はAACt 法で施行した。

#### 統計解析

全ての検討は独立した状態で3回以上行った。連続変数の2群間の比較にはウェル チの t 検定、4 群間の比較にはダネットの多重比較検定をそれぞれ用いた。カテゴリ 変数の2 群間の比較にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。統計学的有意差はp 値が0.05 未満の時と定義した。ソフトウェアは GraphPad Prism v8.4.3 (グラフパ ッド・ソフトウェア社)を使用した。

#### 実験結果

#### 1) 非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルの効果に関する検討

はじめに、4 種類の非小細胞肺癌細胞株(H1299、A549、H1975、H520)を用いてパ クリタキセルの効果を評価した。MTT 法を用いて細胞増殖抑制効果を測定し(図 **1A)**、 $IC_{50}$ を算出した(表1)。H1299の $IC_{50}$ は他の細胞と比較して高く、パクリタキ セル耐性であることが判明した。

次に、パクリタキセルの細胞周期への効果を評価した。フローサイトメトリー法を 用いて M 期の細胞の割合を測定した (図 1B、1C)。H1299 では他の細胞株と比較して PTX による mitotic arrest の効果が小さかった。続いて、M 期の持続期間をタイムラ プス顕微鏡を用いて測定した(図1D、表2)。H1299のパクリタキセル処理時のM期 の持続期間は約100分であり、それは他の細胞株と比較して有意に短く、mitotic arrest に対するパクリタキセルの効果が減弱していることを示唆していた。さら に、mitotic slippage をした細胞をタイムラプス顕微鏡を用いて測定した(図 1E、 表3)。H1299 ではパクリタキセル処理後にmitotic slippage が有意に多くなってい た。以上の結果から、H1299 はパクリタキセル耐性であり、パクリタキセル処理によ り mitotic slippage が誘導されることが示された。



В



#### 図1. 非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルの効果

A: 4 種類の非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルの細胞増殖抑制効果を MTT 法 を用いて評価した。

B-C:4種類の非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルの細胞周期への効果をpHH3 抗体とPI染色を用いたフローサイトメトリー法を用いて評価した。フローサイトメ トリー法の代表的な画像を示す(B)。グラフはコントロールを1とした時のパクリタ キセル処理時のM期の細胞の割合を示す(C)。

D: 4 種類の非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルの細胞周期への効果をタイム ラプス顕微鏡を用いて評価した。M 期開始から M 期中期までの細胞分裂の時間を測定 した。各点は1つの細胞を示す。

E: タイムラプス顕微鏡を用いて細胞分裂を評価した。通常の細胞分裂、M 期での細胞死、mitotic slippage と PMD、mitotic slippage と次の細胞周期へのリエントリーの代表的な画像を示す。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。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、4 群間の比較にはダネットの多重比較検定をそれぞれ用いた。\*p < 0.05、ns p  $\geq$  0.05。

LL, lower left; LR, lower right; pHH3, phospho histone H3; PI, propidium iodide; PTX, paclitaxel; UL, upper left; UR, upper right.

Cell line	PTX (nmo1/L)
H1299	$37.4 \pm 2.9$
A549	$8.1 \pm 0.8$
H1975	$3.6 \pm 1.0$
H520	$8.9 \pm 0.9$

表1. 非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルの IC50

実験は独立して3回行い、数値は平均値と標準偏差値を示す。

PTX, paclitaxel.

表2. M期開始からM期中期までの時間

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

実験は独立して3回行い、数値は平均値と標準偏差値を示す。

PTX, paclitaxel.

表3.	Mitotic	slippage	を	した細胞数

Cell line	Treatment	Slippage/Total cells	p-value
U1200	Vehicle	2/140	0.01
H1299	PTX	10/124	0.01
4540	Vehicle	0/113	$\mathbf{X} 0 0 0$
A549	PTX	0/158	/ 0.99
H1975	Vehicle	2/179	0.69
	PTX	3/176	0.68
H520	Vehicle	1/252	$\mathbf{X} 0 0 0$
	PTX	1/265	/ 0.99

実験は独立して3回行い、2群間の比較にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。 PTX, paclitaxel.

#### 2) H1299 に対するパクリタキセルと NIEJ 阻害薬の併用効果に関する検討

最初に、NHEJ 阻害薬が NHEJ 修復活性に与える影響について検討した。非小細胞肺 癌細胞である H1299 と非腫瘍細胞である 293T に NHEJ レポータープラスミドである pimEJ5GFP を遺伝子導入して安定遺伝子発現細胞株(H1299-EJ5 および 293T-EJ5)を 作成し、それらを用いて NHEJ 修復レポーター試験を行った。NHEJ 阻害薬である A-196 あるいは JQ1 の投与により GFP 陽性細胞比率はコントロール群と比較して有意に 低下し、NHEJ 修復活性が低下したと考えられた(図 2A、2B)。

次に、4種類の非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルとA-196 あるいはJQ1の 併用効果について検討した。MTT 法を行い各薬剤の細胞増殖抑制効果を測定し(図 2C、2D)、IC<sub>50</sub>を算出した(表 4-6)。H1299 でのみ、パクリタキセルとA-196 あるい はJQ-1の併用効果を認め、IC<sub>50</sub>が有意に低下した。

さらに、H1299 に対するパクリタキセルと A-196 あるいは JQ1 の併用がアポトーシ スおよび DSB に与える影響について検討した。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を行いアポトーシスの誘導を測定した(図 2E、2F)。A-196 あるいは JQ1 単独ではアポトーシスをほとんど誘導せず、パクリタキセル単剤で ややアポトーシスを誘導したが、パクリタキセルと A-196 あるいは JQ1 の併用では有 意にアポトーシス細胞が増加した。抗 cleaved PARP 抗体および抗 γ H2AX 抗体を用い たウエスタンブロット法を用いてアポトーシスおよび DSB の誘導を測定した(図 2G、2H)。パクリタキセルと A-196 あるいは JQ1 の併用ではアポトーシスおよび DSB を強く誘導した。以上の結果から、NHEJ 阻害薬は H1299 においてパクリタキセル誘 導性細胞毒性、DSB、アポトーシスを有意に増強したことが示された。





D

С



Ε



F



G



Н

PTX JQ1	-	- +	+ -	+ +
cPARP			100	-
γΗ2ΑΧ	-	-	-	-
Actin	1	-	-	-

#### 図 2. H1299 に対するパクリタキセルと NEEJ 阻害薬の併用効果

A-B: NHEJ レポータープラスミド pimEJ5GFP を遺伝子導入して作成した H1299-EJ5 および 293T-EJ5 を用いて NHEJ 機構による DSB 修復能の評価を行った。グラフは A-196 10  $\mu$  mol/L (A) あるいは JQ1 0.2  $\mu$ mol/L 投与後の NHEJ 機構による DSB 修復能を示す。

C-D: 4 種類の非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルと A-196 2.5 µmol/L (C) あるいは JQ1 2 µmol/L (D) の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。

E-F: H1299 に対するパクリタキセルと A-196 5 µmol/L (E) あるいは JQ1 2 µmol/L (F) によるアポトーシスの誘導をアネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法で測定した。フローサイトメトリー法の代表的な画像を示す(左図)。

グラフはアポトーシス細胞の割合の定量化を示す(右図)。

G-H: H1299 に対するパクリタキセルと A-196 5 μmol/L (G) あるいは JQ1 2 μmol/L (H) によるアポトーシスおよび DSB の誘導を抗 cleaved PARP 抗体および抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタンブロット法で測定した。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。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。\*p < 0.05。

LL, lower left; LR, lower right; PI, propidium iodide; PTX, paclitaxel; UL, upper left; UR, upper right.

Cell line	A-196 (µmo1/L)	JQ1 (µmol/L)
H1299	$21.9 \pm 0.7$	$3.6 \pm 0.1$
A549	$16.8 \pm 3.5$	$12.3 \pm 6.7$
H1975	$18.4 \pm 2.1$	2.7 $\pm$ 0.4
H520	24.7 $\pm$ 3.5	$21.2 \pm 0.1$

表4. 非小細胞肺癌細胞に対する A-196 および JQ1 の IC<sub>50</sub>

実験は独立して3回行い、数値は平均値と標準偏差値を示す。

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

表 5. 非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセル±A-196 2.5 µmol/L の IC<sub>50</sub>

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。

PTX, paclitaxel.

表 6. 非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセル±JQ1 2 µmol/L の IC<sub>50</sub>

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

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。

PTX, paclitaxel.

#### 3) パクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用による細胞死の評価に関する検討

H1299 に対するパクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用による細胞死の詳細な評価の ため、mitotic slippage 後の PMD について検討した。タイムラプス顕微鏡を用いて パクリタキセルと A-196 あるいは JQ1 との併用での PMD を測定した(図 3A、表 7)。 パクリタキセル単剤と比較して、A-196 あるいは JQ1 と併用した時に PMD が増加し た。さらに、mitotic slippage から PMD までの時間は、パクリタキセル単剤と比較 してパクリタキセルと A-196 あるいは JQ1 の併用後に短縮した。

さらなる細胞死の詳細な評価のため、異常な細胞分裂について検討した。パクリタ キセルと A-196 の併用時の細胞分裂について蛍光免疫染色法および蛍光顕微鏡を用い て観察した(図 3B-D)。パクリタキセルの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細胞分裂が観察された。パクリタキセル単剤で micronuclei、fragmented nuclei、multi-lobular nucleiのような異常な細胞分裂 を呈する細胞が観察されたが、パクリタキセルと A-196の併用でその割合に有意な変化はみられなかった。以上の結果から、NHEJ 阻害は異常な有糸分裂に影響することなく、mitotic slippage 後の細胞死を増加させたことが示された。



図 3. H1299 に対するパクリタキセルと NIEJ 阻害薬の併用による細胞死の評価

A: H1299 に対するパクリタキセルと A-196 あるいは JQ1 の細胞死への効果をタイム ラプス顕微鏡を用いて評価した。Mitotic slippage から PMD までの時間を測定し た。各点は1つの細胞を示す。

B: H1299 に対するパクリタキセルの異常な細胞分裂への効果を蛍光免疫染色法と蛍 光顕微鏡を用いて評価した。染色体および微小管をそれぞれ DAPI および抗βチュブ リン抗体を用いて染色して蛍光顕微鏡で観察した。

C-D: H1299 に対するパクリタキセルと A-196 の異常な細胞分裂への効果を蛍光免疫 染色法と蛍光顕微鏡を用いて評価した。染色体を DAPI を用いて染色して蛍光顕微鏡 で観察した。代表的な異常な細胞分裂の画像を示す(C)。スケールバーは 10 µm であ る。グラフは異常な細胞分裂の割合の定量化を示す(D)。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。実験は独立して3回行い、2 群間の比較にはウ エルチの t 検定、4 群間の比較にはダネットの多重比較検定をそれぞれ用いた。\*p < 0.05、ns p  $\geq$  0.05。

DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole; PTX, paclitaxel.

Treatment	PMD/slippage	p-value*
PTX	2/24	_
PTX+A-196	12/34	0.028
PTX+JQ1	7/16	0.018

表 7. Mitotic slippage をした細胞のうち PMD により細胞死となった割合

実験は独立して3回行い、2群間の比較にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。 \* P値は PTX 単剤と比較した時の対応する処理での値を示す。

PMD, post-mitotic death; PTX, paclitaxel.

### 4) 新たに作成したパクリタキセル耐性細胞に対するパクリタキセルと NHEJ 阻害薬 の併用効果に関する検討

新たに作成したパクリタキセル耐性細胞を用いて、NHEJ 阻害薬がパクリタキセル 耐性に及ぼす影響について検討した。A549 を培養する際に培地に低濃度のパクリタ キセルを添加してパクリタキセル耐性を誘導し、パクリタキセル耐性細胞 A549-PR を 作成した(表 8)。

最初に、mitotic slippage をした細胞をタイムラプス顕微鏡を用いて測定し、 A549-PR ではパクリタキセル処理後にmitotic slippage が有意に増加することを確 認した(表9)。次に、MTT 法にて各細胞株に対するパクリタキセルの IC<sub>50</sub>を算出した ところ、A549-PR において A-196 併用によりパクリタキセルの IC<sub>50</sub>が有意に低下した

(図4A、表10)。さらに、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 リー法ではA549-PRにおいてパクリタキセル単剤と比較して、パクリタキセルとA-196の併用により有意にアポトーシス細胞が増加した(図4B)。また、抗 cleaved PARP 抗体および抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタンブロット法では、A549-PR におい てパクリタキセル単剤と比較して、パクリタキセルとA-196の併用によりアポトーシ スおよび DSB の誘導が増強された(図4C)。以上の結果から、新たに作成したパクリ タキセル耐性誘導細胞株 A549-PR はパクリタキセル処理により mitotic slippage が 生じるようになったこと、NHEJ 阻害薬の併用によりパクリタキセルに対する感受性 が回復することが示された。

次に、我々はmitotic slippage が誘導される分子的機序を検討するため、A549-PR と A549 の違いをウエスタンブロット法と qRT-PCR 法で評価した (図 4D、4E)。し かし、CDK4、CDK6、MAD2、p31<sup>comet</sup>、cyclin B1 など、細胞周期や SAC に関連する因子 のタンパクや mRNA の発現は、これらの細胞株間で差が認められなかった。



В







С



D



#### 図 4. A549-PR に対するパクリタキセルと NELJ 阻害薬の併用効果

A: A549-PR および A549 に対するパクリタキセルと A-196 2.5 µmol/L の細胞増殖抑 制効果を MTT 法を用いて評価した。

B: A549-PR および A549 に対するパクリタキセルと A-196 5 µmol/L によるアポトーシスの誘導をアネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法で測定した。フローサイトメトリー法の代表的な画像を示す(左図)。グラフはアポトーシス細胞の割合の定量化を示す(右図)。

C: A549-PR および A549 に対するパクリタキセルと A-196 5 µmol/L によるアポトー シスおよび DSB の誘導を抗 cleaved PARP 抗体および抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタ ンブロット法で測定した。

D: A549-PR および A549 の SAC に関わるタンパク発現を抗 MAD2 抗体、抗 p31<sup>comet</sup> 抗 体、抗 cyclin B1 抗体を用いたウエスタンブロット法で測定した。

E: A549-PR および A549 における細胞周期に関わる因子の mRNA 発現を qRT-PCR 法を 用いて評価した。グラフは A549 を 1 とした A549-PR の相対定量値の平均値と標準偏 差値を示す。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。実験は独立して3回行い、2 群間の比較にはウ エルチの t検定を用いた。\*p < 0.05、ns p  $\geq$  0.05。

LL, lower left; LR, lower right; PI, propidium iodide; PTX, paclitaxel; UL, upper left; UR, upper right.

表 8. A549-PR および A549 に対するパクリタキセルの IC50

Cell line	PTX (nmol/L)
A549-PR	$63.8 \pm 7.0$
A549	$8.1 \pm 0.8$

実験は独立して3回行い、数値は平均値と標準偏差値を示す。

PTX, paclitaxel.

表 9. Mitotic slippage をした細胞数

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

実験は独立して3回行い、2 群間の比較にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。 PTX, paclitaxel.

表 10.A549-PR および A549 に対するパ	クリタキセル±A-196 2.	$5 \ \mu mol/L \mathcal{O} IC_{50}$
-----------------------------	-----------------	-------------------------------------

Cell line	PTX	PTX + A-196	p-value
A549-PR	$63.8 \pm 7.0$	$30.8 \pm 1.5$	0.02
A549	$8.1 \pm 0.8$	$6.8 \pm 1.3$	0.31

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。

PTX, paclitaxel.

# 5) パクリタキセル耐性細胞に対するドセタキセルとNHEJ阻害薬の併用効果に関する検討

これらの知見の臨床応用を考えると、初回治療でパクリタキセル治療を行い耐性化 した症例に対し、ドセタキセルによる二次治療を行う際にNHEJ阻害薬を併用するこ とが効果的である可能性がある。ドセタキセルはパクリタキセルと同じタキサン系の 薬剤であり、ドセタキセル療法は前治療歴のある非小細胞肺癌患者への標準治療であ る(Garon et al, 2014)。最初に、MTT法を行い各細胞株に対するドセタキセルの IC<sub>50</sub>を算出したところ、パクリタキセル耐性細胞はドセタキセルにも耐性であった。 パクリタキセル耐性誘導株 A549-PR は A-196 の投与によりドセタキセルの感受性が回 復した(図 5A、5B、表 11、12)。さらに、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によりアポトーシス細胞を測定したところ、A549-PR ではドセ タキセル単剤と比較して、ドセタキセルと A-196 の併用で有意にアポトーシス細胞が 増加した(図 5C)。また、抗 cleaved PARP 抗体および抗 γ H2AX 抗体を用いたウエス タンブロット法により、A549-PR においてドセタキセル単剤と比較して、ドセタキセ ルと A-196 の併用によりアポトーシスおよび DSB の誘導が増強された(図 5D)。以上 の結果から、NHEJ の阻害によりパクリタキセル耐性細胞に対するドセタキセル療法 の抗腫瘍効果を増強されることが示された。









#### 図 5. パクリタキセル耐性細胞に対するドセタキセルと NHEJ 阻害薬の併用効果

A: 5 種類の非小細胞肺癌細胞に対するドセタキセルの細胞増殖抑制効果を MTT 法を 用いて評価した。

B: A549-PR および A549 に対するドセタキセルと A-196 2.5 µmol/L の細胞増殖抑制 効果を MTT 法を用いて評価した。

C: A549-PR および A549 に対するドセタキセルと A-196 5 µmol/L によるアポトーシ スの誘導をアネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法で測定し た。フローサイトメトリー法の代表的な画像を示す(左図)。グラフはアポトーシス 細胞の割合の定量化を示す(右図)。

D: A549-PR および A549 に対するドセタキセルと A-196 5 μmol/L によるアポトーシ スおよび DSB の誘導を抗 cleaved PARP 抗体および抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタン ブロット法で測定した。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。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。\*p < 0.05、ns p  $\ge$  0.05。

DTX, docetaxel; LL, lower left; LR, lower right; PI, propidium iodide; UL, upper left; UR, upper right.

D

Cell line	PTX (nmo1/L)
H1299	$11.1 \pm 0.6$
A549	$3.3 \pm 0.8$
H1975	$1.6 \pm 0.2$
H520	$3.5 \pm 0.3$
A549-PR	$15.7 \pm 3.1$

表11. 非小細胞肺癌細胞に対するドセタキセルの IC50

実験は独立して3回行い、数値は平均値と標準偏差値を示す。

DTX, docetaxel.

表 12. A549-PR および A549 に対するドセタキセル±A-196 2.5 µmol/Lの IC50

Cell line	DTX	DTX + A-196	p-value
A549-PR	$15.7 \pm 3.1$	$6.9 \pm 1.0$	0.047
A549	$3.3 \pm 0.8$	$2.8 \pm 0.4$	0.45

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。

DTX, docetaxel.

#### 考察

我々は、内因性耐性および獲得耐性の両者のパクリタキセル耐性非小細胞肺癌細胞 株において、mitotic slippage がより頻回に起こっていることを確認した。また、 NHEJ 阻害はmitotic slippage 後のパクリタキセル誘導性 DSB の修復を阻害すること によりパクリタキセルの誘導する細胞毒性が増強されることを明らかにした。

H1299 は内因性パクリタキセル耐性であり、A549-PR は獲得パクリタキセル耐性で あるが、これらの細胞株はいずれもパクリタキセルによる M 期停止効果が減弱してお り、mitotic slippage の頻度が高いことが示された。我々はタイムラプス顕微鏡を 用いて mitotic slippage とパクリタキセル耐性の相関を直接示すことができた。

細胞分裂の過程に関する様々な分子を標的とした低分子化合物や低分子干渉 RNA を 用いて、mitotic slippage を抑制する試みがいくつか報告されているが、臨床的に は成功していないのが現状である。Henriques らは非小細胞肺癌細胞を用いて、SAC 関連タンパクである p31<sup>comet</sup>に対する低分子干渉 RNA と、抗アポトーシス Bc1-2 ファ ミリータンパク阻害薬であるナビトクラックスを併用することにより、mitotic slippage を抑制してアポトーシスを増強させ、M 期での細胞死を増加させたことを示 した (Henriques et al, 2021)。Pena-Blanco らは HeLa 細胞、非小細胞肺癌細胞、 骨肉腫細胞を用いて、ミトコンドリア分裂タンパクである Drp1 に対する低分子干渉 RNA により mitotic slippage を抑制し、M 期での細胞死を増加させたことを示した (Pena-Blanco et al, 2020)。

このことから我々が提案する治療戦略は、これまでの報告で試みられていた mitotic slippage 自体を抑制する方法と異なり、DNA 損傷修復を阻害することで mitotic slippage 後の細胞死を誘導することである。DNA 損傷修復の方法として細胞 が NHEJ と HR のどちらを選択するかは、主に細胞周期の段階に依存する(van Gent and Kanaar, 2016)。HR は S 期から G2 期でのみ選択されるのに対し、NHEJ は M 期を 除いた全細胞周期を通じて活性があるが、M 期で DNA 損傷修復はほとんど行われな い。M 期の DNA 損傷は、M 期終了後の次の G1 期で NHEJ により主に修復される (Heijink et al, 2013)。また、mitotic slippage をした細胞は DNA 損傷を持ったま ま G1 期に進行する(Hyun et al, 2012)。したがって、我々はmitotic slippage を 起こした細胞に対して NHEJ を阻害することにより効率よく細胞死を誘導できるので はないかと仮説を立て、証明した。パクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用により mitotic slippage から PMD までの時間が短縮され、mitotic slippage 直後の G1 期に細胞死が 起こっていることを示唆する結果である。ただし今回の研究ではタイムラプス顕微鏡 による観察は24時間であり、PMDを経験した細胞が少数にとどまったこと、24時間 以降の細胞の運命を観察できていないことは本研究の限界である。

A-196 はヒストンH4 のリシン 20 のジメチル化およびトリメチル化を触媒すること により、NHEJ を介した DSB 修復を促進する SUV420H1 および SUV420H2 を強力かつ選 択的に阻害する化学プローブである (Bromberg et al, 2017)。A-196 は 53BP1 を阻 害し、HR に影響を与えることなく、NHEJ を介した DSB 修復を低下させる。JQ1 は bromodomain and extra terminal domain 阻害薬であり、NHEJ に関連する遺伝子発現 を抑制し、NHEJ 活性を低下させる (Takashima et al, 2020; Stanlie et al, 2014)。これらに加え、いくつかの NHEJ 阻害薬が開発されている。M3814 や AZD7648 などの DNA-PK 阻害薬、SCR7 などの DNA リガーゼ IV 阻害薬は NHEJ を介するタンパク を標的とし、結果として NHEJ を阻害する (van Bussel et al, 2021; Fok et al, 2019; Srivastava et al, 2012)。M3814 は第1 相試験が実施され、第1a/1b 相試験 が現在進行中である (van Bussel et al, 2021)。しかし、現時点で臨床的に利用可 能な NHEJ 阻害薬は存在しないため、NHEJ 阻害薬の探索は極めて重要である。

我々はパクリタキセルとNHEJ 阻害薬を併用することで、mitotic slippage に起因 するパクリタキセル耐性の治療に有効となる可能性を示した。さらに、パクリタキセ ルと同じタキサン系薬剤であり、前治療歴のある非小細胞肺癌患者への標準的な化学 療法薬であるドセタキセルとNHEJ 阻害薬の併用治療の有効性を実証した(Garon et al, 2014)。これらの結果から、ドセタキセルとNHEJ 阻害薬を併用することで、 mitotic slippage に起因するパクリタキセル耐性を克服する有効な戦略となる可能 性がある。本研究は in vitro での検討であり、今後 in vivo での実験が必要であ る。

Mitotic slippage は SAC の影響を受けることが報告されている(Sinha et al, 2019)。SAC は細胞周期の機能不全時に有糸分裂の進行を停止させ、染色体の制御さ れた分離の前に適切な染色体の整列を保証する有糸分裂監視機構である(van Gent and Kanaar, 2016)。有糸分裂の終了には正常な細胞分裂と mitotic slippage があ り、サイクリン B1 が後期促進複合体/サイクロソームとその標的サブユニットである CDC20 によって分解される時に起こる。SAC の活性化により長期の mitotic arrest と それに続く M 期での細胞死が起こるが、SAC のサイレンシングにより正常な細胞分裂 または mitotic slippage が起こる(Zeng et al, 2019)。SAC 活性は MAD2 や p31<sup>comet</sup> などの SAC タンパクにより調整されている(Lok et al, 2020)。そこで、我々は A549-PR と A549 の違いをウエスタンブロット法や qRT-PCR 法で評価し、mitotic slippage の分子機序を検討した。しかし、CDK4、CDK6、MAD2、p31<sup>comet</sup>、cyclin B1 な ど、細胞周期や SAC に関連するタンパクや mRNA の発現は、これらの細胞株間で差が 認められなかった。今後、mitotic slippage とパクリタキセル耐性の機序的な関連 性を評価するため、他の因子も調査する必要がある。

#### 総括及び結論

本研究で得られた新知見として、

- H1299 はパクリタキセル耐性であり、パクリタキセル処理後にmitotic slippage が増加した
- NHEJ 阻害薬はH1299 においてパクリタキセルが誘導する細胞毒性、DSB、アポト ーシスを有意に増強した
- NHEJ 阻害は異常な有糸分裂に影響することなく、mitotic slippage 後の細胞死 を増加させた
- 新たに作成したパクリタキセル耐性誘導細胞株はパクリタキセル処理後に mitotic slippage が増加し、NHEJ 阻害薬によりパクリタキセルの感受性が回復 した
- ドセタキセルはパクリタキセル耐性細胞において NHEJ 阻害薬との併用効果を示した

が得られた。パクリタキセル耐性細胞では、M期において誘導されたDSBがmitotic slippage によりG1期に移行し、さらにG1期でのDSB修復をNHEJ阻害薬により抑制 することによりアポトーシスを増強できた可能性が示唆された(図6)。NHEJ阻害薬 はH1299およびA549-PRに対して、パクリタキセルとの併用により相乗的な抗腫瘍効 果を認め、NHEJ阻害は内因性あるいは獲得パクリタキセル耐性を克服する手段とな るかもしれない。今回の新知見の意義はパクリタキセルとNHEJ阻害薬の併用療法が 非小細胞肺癌に対する新たな治療戦略となる可能性を示したことである。



### 図 6. Mitotic slippage によるパクリタキセル耐性と、パクリタキセルと NHEJ 阻害 薬の併用の作用機序を示した概略図

DSB; double-strand break, NHEJ; non-homologous end joining; PTX, paclitaxel.

#### 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 今野哲教授に深謝致します。また、直接の御指導を賜りました菊地英毅客員研究員に 深謝致します。また、適切な助言を賜りました北井秀典助教、菊地順子客員研究員、 榊原純講師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

- Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, Yokoi T, Chiappori A, Lee KH, de Wit M, et al (2017) Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 377, 1919-1929.
- Arbour KC and Riely GJ (2019) Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. JAMA 322, 764-774.
- Belani CP and Group TAXS (2002) Docetaxel in combination with platinums (cisplatin or carboplatin) in advanced and metastatic non-small cell lung cancer. Semin Oncol 29, 4-9.
- Bennardo N, Cheng A, Huang N and Stark JM (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. PLoS Genet 4, e1000110.
- Blagosklonny MV and Fojo T (1999) Molecular effects of paclitaxel: Myths and reality (a critical review). International Journal of Cancer 83, 151-156.
- Brandsma I and Gent DC (2012) Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. Genome Integr 3, 9.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 68, 394-424.
- Bromberg KD, Mitchell TR, Upadhyay AK, Jakob CG, Jhala MA, Comess KM, Lasko LM, Li C, Tuzon CT, Dai Y, et al (2017) The SUV4-20 inhibitor A-196 verifies a role for epigenetics in genomic integrity. Nat Chem Biol 13, 317-324.
- de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, Chi KN, Sartor O, Agarwal N, Olmos D, et al (2020) Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. N Engl J Med 382, 2091-2102.
- Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, Blakely CM, Seto T, Cho BC, Tosi D, et al (2020) Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. Lancet Oncol 21, 271-282.
- Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, Loong HHF, Johnson M, Gainor J, McCoach CE,

Gautschi O, Besse B, Cho BC, et al (2020) Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 383, 813-824.

- Fok JHL, Ramos-Montoya A, Vazquez-Chantada M, Wijnhoven PWG, Follia V, James N, Farrington PM, Karmokar A, Willis SE, Cairns J, et al (2019) AZD7648 is a potent and selective DNA-PK inhibitor that enhances radiation, chemotherapy and olaparib activity. Nat Commun 10, 5065.
- Garon EB, Ciuleanu TE, Arrieta O, Prabhash K, Syrigos KN, Goksel T, Park K, Gorbunova V, Kowalyszyn RD, Pikiel J, et al (2014) Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. Lancet 384, 665-673.
- Gottesman M (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. Annu Rev Med 53, 615-627.
- Gupta R, Somyajit K, Narita T, Maskey E, Stanlie A, Kremer M, Typas D, Lammers M, Mailand N, Nussenzweig A, et al (2018) DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity. Cell 173, 972-988 e923.
- Han TL, Sha H, Ji J, Li YT, Wu DS, Lin H, Hu B and Jiang ZX (2021) Depletion of Survivin suppresses docetaxel-induced apoptosis in HeLa cells by facilitating mitotic slippage. Sci Rep 11, 2283.
- Heijink AM, Krajewska M and van Vugt MA (2013) The DNA damage response during mitosis. Mutat Res 750, 45-55.
- Henriques AC, Silva PMA, Sarmento B and Bousbaa H (2021) Antagonizing the spindle assembly checkpoint silencing enhances paclitaxel and Navitoclax-mediated apoptosis with distinct mechanistic. Sci Rep 11, 4139.
- Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, Morise M, Felip E, Andric Z, Geater S, et al (2020) Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. New England Journal of Medicine 383, 1328-1339.
- Herbst RS, Heymach JV and Lippman SM (2008) Lung cancer. N Engl J Med 359, 1367-1380.
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L and Paz-

Ares L (2017) Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. The Lancet 389, 299-311.

- Hyun SY, Rosen EM and Jang YJ (2012) Novel DNA damage checkpoint in mitosis: Mitotic DNA damage induces re-replication without cell division in various cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 423, 593-599.
- Jimenez-Guerrero R, Gasca J, Flores ML, Perez-Valderrama B, Tejera-Parrado C, Medina R, Tortolero M, Romero F, Japon MA and Saez C (2018) Obatoclax and Paclitaxel Synergistically Induce Apoptosis and Overcome Paclitaxel Resistance in Urothelial Cancer Cells. Cancers (Basel) 10.
- Katanoda K, Hori M, Saito E, Shibata A, Ito Y, Minami T, Ikeda S, Suzuki T and Matsuda T (2021) Updated Trends in Cancer in Japan: Incidence in 1985-2015 and Mortality in 1958-2018-A Sign of Decrease in Cancer Incidence. J Epidemiol 31, 426-450.
- Kennedy MPT, Cheyne L, Darby M, Plant P, Milton R, Robson JM, Gill A, Malhotra P, Ashford-Turner V, Rodger K, et al (2018) Lung cancer stage-shift following a symptom awareness campaign. Thorax 73, 1128-1136.
- Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG and Taylor SS (2012) The spindle assembly checkpoint. Curr Biol 22, R966-980.
- Li J, Sun H, Huang Y, Wang Y, Liu Y and Chen X (2019) Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 51, 879-889.
- Lindahl T and Barnes DE (2000) Repair of endogenous DNA damage. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 65, 127-133.
- Lok TM, Wang Y, Xu WK, Xie S, Ma HT and Poon RYC (2020) Mitotic slippage is determined by p31(comet) and the weakening of the spindle-assembly checkpoint. Oncogene 39, 2819-2834.
- Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, Castro G, Jr., Srimuninnimit V, Laktionov KK, Bondarenko I, et al (2019) Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. Lancet 393, 1819-1830.
- Nan G, Zhao SH, Wang T, Chao D, Tian RF, Wang WJ, Fu X, Lin P, Guo T, Wang

B, et al (2022) CD147 supports paclitaxel resistance via interacting with RanBP1. Oncogene 41, 983-996.

- Paik PK, Felip E, Veillon R, Sakai H, Cortot AB, Garassino MC, Mazieres J, Viteri S, Senellart H, Van Meerbeeck J, et al (2020) Tepotinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations. N Engl J Med 383, 931-943.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55, 74-108.
- Pena-Blanco A, Haschka MD, Jenner A, Zuleger T, Proikas-Cezanne T, Villunger A and Garcia-Saez AJ (2020) Drp1 modulates mitochondrial stress responses to mitotic arrest. Cell Death Differ 27, 2620-2634.
- Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW, Ou SI, Perol M, Dziadziuszko R, Rosell R, et al (2017) Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 377, 829-838.
- Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet PJ, Quoix E, Baik CS, Barlesi F, Kim TM, Mazieres J, Novello S, et al (2016) Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. Lancet Oncol 17, 984-993.
- Raab M, Kobayashi NF, Becker S, Kurunci-Csacsko E, Kramer A, Strebhardt K and Sanhaji M (2020) Boosting the apoptotic response of high-grade serous ovarian cancers with CCNE1 amplification to paclitaxel in vitro by targeting APC/C and the pro-survival protein MCL-1. Int J Cancer 146, 1086-1098.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, et al (2016) Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 375, 1823-1833.
- Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A, et al (2017) Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. N Engl J Med 377, 523-533.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R and Johnson DH (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with

bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 355, 2542-2550.

- Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, et al (2014) Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 371, 1963-1971.
- Shi JF, Wang L, Wu N, Li JL, Hui ZG, Liu SM, Yang BY, Gao SG, Ren JS, Huang HY, et al (2019) Clinical characteristics and medical service utilization of lung cancer in China, 2005-2014: Overall design and results from a multicenter retrospective epidemiologic survey. Lung Cancer 128, 91-100.
- Sinha D, Duijf PHG and Khanna KK (2019) Mitotic slippage: an old tale with a new twist. Cell Cycle 18, 7-15.
- Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, Italiano A, Schuler M, Borghaei H, Barlesi F, et al (2021) Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. N Engl J Med 384, 2371-2381.
- Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, Rodriguez-Abreu D, Moro-Sibilot D, Thomas CA, Barlesi F, et al (2018) Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. N Engl J Med 378, 2288-2301.
- Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N, Kurata T, et al (2018) Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 378, 113-125.
- Srivastava M, Nambiar M, Sharma S, Karki SS, Goldsmith G, Hegde M, Kumar S, Pandey M, Singh RK, Ray P, et al (2012) An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. Cell 151, 1474-1487.
- Stanlie A, Yousif AS, Akiyama H, Honjo T and Begum NA (2014) Chromatin reader Brd4 functions in Ig class switching as a repair complex adaptor of nonhomologous end-joining. Mol Cell 55, 97-110.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A and Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 71, 209-249.

- Takashima Y, Kikuchi E, Kikuchi J, Suzuki M, Kikuchi H, Maeda M, Shoji T, Furuta M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, et al (2020) 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. Int J Cancer 146, 1114-1124.
- van Bussel MTJ, Awada A, de Jonge MJA, Mau-Sorensen M, Nielsen D, Schoffski P, Verheul HMW, Sarholz B, Berghoff K, El Bawab S, et al (2021) A first-in-man phase 1 study of the DNA-dependent protein kinase inhibitor peposertib (formerly M3814) in patients with advanced solid tumours. Br J Cancer 124, 728-735.
- van Gent DC and Kanaar R (2016) Exploiting DNA repair defects for novel cancer therapies. Mol Biol Cell 27, 2145-2148.
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M and Kroemer G (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. Nat Rev Mol Cell Biol 12, 385-392.
- Weaver BA (2014) How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Mol Biol Cell 25, 2677-2681.
- Yin S, Zeng C, Hari M and Cabral F (2012) Random mutagenesis of beta-tubulin defines a set of dispersed mutations that confer paclitaxel resistance. Pharm Res 29, 2994-3006.
- Zeng X, Xu WK, Lok TM, Ma HT and Poon RYC (2019) Imbalance of the spindleassembly checkpoint promotes spindle poison-mediated cytotoxicity with distinct kinetics. Cell Death Dis 10, 314.
- Zhu L and Chen L (2019) Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. Cell Mol Biol Lett 24, 40.