



Title	BET阻害がDNA修復機構に与える影響及びBET阻害薬を用いた新たな非小細胞肺癌治療の開発に関する検討
Author(s)	高島, 雄太
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13450号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13450
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91653
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2464
File Information	Yuta_Takashima.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

BET 阻害が DNA 修復機構に与える影響及び BET 阻害薬を用

いた新たな非小細胞肺癌治療の開発に関する検討

(The study of the impact of BET inhibition on DNA damage repair

and a new treatment strategy using BET inhibitors for

non-small cell lung cancer)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

高 島 雄 太

学 位 論 文

BET 阻害が DNA 修復機構に与える影響及び BET 阻害薬を用

いた新たな非小細胞肺癌治療の開発に関する検討

(The study of the impact of BET inhibition on DNA damage repair

and a new treatment strategy using BET inhibitors for

non-small cell lung cancer)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

高 島 雄 太

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	6 頁
実験方法	11 頁
実験結果	17 頁
考察	29 頁
総括および結論	32 頁
謝辞	33 頁
利益相反	34 頁
引用文献	35 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 Research

本研究は以下の学会で発表した。

1. Yuta Takashima, Eiki Kikuchi, Junko Kikuchi, Tetsuaki Shoji, Megumi Furuta, Hajime Kikuchi, Jun Sakakibara-Konishi, Ichiro Kinoshita, Hirotooshi Dosaka-Akita, Masaharu Nishimura
The BET bromodomain inhibitor JQ1 synergizes with WEE1 inhibitor AZD1775 by impairing non-homologous end joining and enhancing DNA damages in non-small cell lung cancer
AACR annual meeting 2018, 2018年4月15日, 米国シカゴ
2. Yuta Takashima, Eiki Kikuchi, Junko Kikuchi, Tetsuaki Shoji, Megumi Furuta, Ichiro Kinoshita, Hirotooshi Dosaka-Akita, Jun Sakakibara-Konishi
BET inhibitors synergize with WEE1 inhibitor by impairing non-homologous end joining and enhancing DNA damages in NSCLC
第77回日本癌学会学術総会, 2018年9月28日, 大阪
3. 高島 雄太、菊地 英毅、菊地 順子、庄司 哲明、古田 恵、品川 尚文、木下 一郎、秋田 弘俊、榊原 純
非小細胞肺癌に対する BET 阻害剤と WEE1 阻害剤 AZD1775 の併用効果及びその機序に関する研究
第59回日本肺癌学会学術総会, 2018年12月1日, 東京

要旨

【背景】 分子生物学の進歩により、がんの発症や増殖には遺伝子自体の異常に加え、DNA のメチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな異常が関与していることが明らかとなった。近年、エピジェネティクスを標的とした治療の開発が非小細胞肺癌を含めた様々な癌種に対して精力的に行われている。

ブロモドメインはヒストンのアセチル基を認識し、RNA ポリメラーゼを活性化することで、様々な遺伝子の転写を促進させるエピジェネティック調節因子の一つである。ブロモドメインの繰り返し配列および特異的末端配列を持つ BET (bromodomain and extraterminal domain) ファミリータンパクの阻害薬はアセチル化ヒストンと結合し、様々な遺伝子の転写を抑制して多くの癌腫に対して抗腫瘍効果を示すが、詳細な作用機序は不明である。近年、重篤な DNA 損傷である DNA2 本鎖切断 (double-strand break: DSB) の修復に BET タンパクが関与しており、BET 阻害薬が DNA 修復を障害して抗腫瘍効果を示すことが報告された。

WEE1 キナーゼは G2/M チェックポイントで重要な役割を担っており、細胞周期を G2 期に留まらせる働きをもつ。WEE1 阻害薬である AZD1775 は強制的に細胞周期を進めることで DSB を起こし、分裂期細胞死 (mitotic catastrophe) を誘導することで肺癌を含めた様々な固形癌に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。そこで我々は、BET 阻害薬は WEE1 阻害薬がもたらす DNA 損傷を増強することで抗腫瘍効果を高めることができ、この 2 剤併用療法は非小細胞肺癌に対する新たな治療方法となりうるのではないかと考え、非小細胞肺癌細胞を用いて併用効果の確認とその機序の解明を行った。

【材料と方法】 非小細胞肺癌細胞 A549、H1299、H1975 を使用した。BET 阻害薬として JQ1 と AZD5153 を、WEE1 阻害薬として AZD1775 を使用した。BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用効果は MTT 法を行い、併用係数 (combination index: CI) を算出して評価した。DSB の評価は抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタンブロット法で行なった。DSB 修復や細胞周期に関与する遺伝子の発現は定量的逆転写 PCR (quantitative reverse transcription PCR: qRT-PCR) 法とウエスタンブロット法で評価した。DNA 損傷修復能の評価として非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) 活性の定量を、NHEJ レポータープラスミド安定発現細胞とフローサイトメトリー法を用いて行った。細胞周期の評価はプロピジウムイオダイド (Propidium Iodide: PI) 染色を用いたフローサイトメトリー法と抗リン酸化ヒストン H3 (phospho-histone H3: pHH3) 抗体を用いたウエスタンブロット法で行ない、アポトーシスの評価はアネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法で行なった。また、A549 細胞を用いて異種移

植マウスモデルを作成し、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用効果を *in vivo* の系で検討した。

【結果】 使用した全ての非小細胞肺癌細胞において CI は 0.1 から 0.5 の間で推移し、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬は相乗的な抗腫瘍効果を示した。また、2 剤を併用することでアポトーシスが誘導された。

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

BET 阻害薬の投与により *SHLD1*、*SHLD3*、*XRCC4*、*SASS6*、*TP53BP1* といった NHEJ 機構関連遺伝子の発現が低下した。また、BET 阻害薬の投与や BRD4 のノックダウンによって NHEJ 修復活性が低下した。以上より BET 阻害は NHEJ 機構関連遺伝子の発現を抑制し、NHEJ 機構による DSB 修復能を低下させることが明らかとなった。

フローサイトメトリー法を用いた細胞周期の検討では、2 剤の併用により G2/M 期の増加がみられ、またウエスタンブロット法では pHH3 のタンパク発現亢進がみられたことから、M 期への移行が増加していることが明らかになった。G2/M チェックポイント機構関連遺伝子の発現を評価したところ、BET 阻害薬の投与でミエリン転写因子 1 (myelin transcription factor 1: MYT1) の発現が低下した。以上より BET 阻害薬は MYT1 の発現を低下させ、WEE1 阻害薬と併用することで G2/M チェックポイント機構を著明に抑制し、癌細胞の M 期への移行を増加させていることが示唆された。

A549 細胞を用いた異種移植マウスモデルに対して BET 阻害薬と WEE1 阻害薬を投与したところ、併用療法は単剤療法と比べて腫瘍増殖を有意に抑制した。また、*in vitro* の結果と同様に併用群の腫瘍では γ H2AX と pHH3 の発現が増加し、*MYT1* およびいくつかの NHEJ 機構関連遺伝子の発現が低下した。

【考察】 相乗効果の機序として (i) BET 阻害薬がもたらす NHEJ 機構関連遺伝子抑制による DSB 修復能の低下、(ii) BET 阻害薬がもたらす MYT1 抑制による G2/M チェックポイントの脆弱化、の 2 つが示唆された。

BET 阻害薬が DSB 修復を抑制することはすでに報告されているが、その機序は様々である。今回我々は BET 阻害によって NHEJ 機構関連遺伝子の発現が低下することを示した。DSB 修復の主要な機構として NHEJ と相同組換え (homologous recombination: HR) があるが、HR は S 期から G2 期でのみ選択されるのに対し、NHEJ は細胞周期を通して利用可能である。WEE1 阻害薬を投与すると G2/M チェックポイント機構が抑制されるため、DSB 修復が不十分な細胞の M 期への移行が増加することになる。M 期にある細胞に生じた DSB は M 期ではほとんど修復が起こらず、G1 期に移行した後に NHEJ によって修復されると報告されており、このため BET 阻害による NHEJ 抑制が WEE1 阻害薬による M 期細胞の DNA 損傷と相乗効果を示すと考える。

さらに我々は、BET 阻害薬を投与することで MYT1 の発現が低下し、WEE1 阻害薬との併用で細胞の M 期への移行を増加させていることを示した。MYT1 の発現が低い細胞は WEE1 阻害薬に感受性が高い傾向があり、MYT1 が WEE1 阻害薬の効果予測因子となりうることが報告されている。この研究は BET タンパクが MYT1 の発現を制御していることを示した初めてのものである。

BET 阻害薬も WEE1 阻害薬も現在多くの臨床試験が行われており、固形癌に対して臨床応用が期待されている薬剤である。この 2 剤の相乗効果とその機序を示した本研究は非小細胞肺癌における新たな治療開発の一助となる可能性がある。

【結論】 BET 阻害薬と WEE1 阻害薬は非小細胞肺癌に対して相乗的な抗腫瘍効果を示した。この 2 剤の併用は非小細胞肺癌におけ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
BET	Bromodomain and extraterminal domain
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA	Breast cancer susceptibility gene
CDK	Cyclin dependent kinase
CI	Combination index
CtIP	C-terminal binding protein interacting protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DSB	Double-strand break
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Fa	Fraction affected
FBS	Fatal bovine serum
GFP	Green fluorescent protein
HR	Homologous recombination
MYT1	Myelin transcription factor 1
NHEJ	Non-homologous end joining
NT	Non target
PBS	Posphate-buffered saline
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
pHH3	Phospho histone H3
PI	Propidium Iodide
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
PTST	PBS with Tween 20
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription PCR
ROS1	V-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
siRNA	Small interfering RNA
SSB	Single-strand break
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20

緒言

1) 肺癌について

肺癌の死亡者数は全世界で年間 120 万人に達し、悪性新生物に関連した死亡数の第 1 位を占める。また罹患率は増加傾向である (Siegel et al., 2018)。日本においても肺癌は 1998 年以降癌死亡原因の第 1 位であり、2016 年の全癌死亡に対する肺癌死の割合は男性で 24%、女性で 14%を占め、男性の第 1 位、女性の第 2 位である。

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、80%以上が非小細胞肺癌である (Herbst et al., 2008)。進行非小細胞肺癌の治療としては、1970 年代に登場したプラチナ製剤と 1990 年代に臨床導入されたドセタキセル、ゲムシタビン、ビノレルビン、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」のいずれか 1 種類を併用するプラチナ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が、奏効率は 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%以下であり、効果は限定的である (Ohe et al., 2007; Schiller et al., 2002)。

1990 年後半頃よりがん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常によりがんの悪性形質を説明し、臨床応用していこうとする研究が活発となり、がん細胞の増殖や生存に強く影響しているドライバー遺伝子のがん治療の標的とする分子標的治療が注目されるようになった。肺癌領域においては上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: *EGFR*) に変異をもつ非小細胞肺癌に対する *EGFR* 阻害薬や未分化リンパ腫キナーゼ (Anaplastic Lymphoma Kinase: *ALK*) 転座をもつ非小細胞肺癌に対する *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*) 転座をもつ非小細胞肺癌や *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*) に変異をもつ非小細胞肺癌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)。これら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 年半を優に越えており (Maemondo et al., 2010)、新たな分子標的薬の登場により予後の改善は現在も続いている。しかし、これらの分子標的治療の対象となる非小細胞肺癌は 30%程度であり (Kwak et al., 2010; Paez et al., 2004; Planchard et al., 2017; Shaw et al., 2014)、分子標的治療の対象となっても獲得耐性による再増悪の問題があるため、その効果は十分ではない。

近年、腫瘍免疫のメカニズムが徐々に解明され、腫瘍を取り巻く免疫抑制機構を標的とした治療の開発が肺癌においても急速に進められている。非小細胞肺癌に対しては Programmed cell death 1 (PD-1) 抗体や Programmed cell Death ligand 1 (PD-L1)

抗体の有効性が報告され (Borghaei et al., 2015; Brahmer et al., 2015; Rittmeyer et al., 2017)、一般臨床でも使用可能となった結果、5年生存率が10%程度期待できるようになった (Gettinger et al., 2018)。しかし、奏効率は30%程度で、治療効果を予測するバイオマーカーの探索もまだ不十分な状況であり、課題も少なくない。そのため、進行非小細胞肺癌に対する治療効果や生存率をさらに改善するためには新たな治療戦略の確立が重要であると考えられる。

2) エピジェネティクスについて

エピジェネティクスとはDNAの塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の発現を制御する機構である。一卵性双生児はDNAの塩基配列が同じであるにも関わらず、身体的特徴や性格、病気の発症の有無などに差が見られる。クローン動物では塩基配列が同一であるにも関わらず、元の動物の毛色や模様のパターンが受け継がれないことが知られている。これらは遺伝子配列が同一であるにもかかわらず、その遺伝子発現がエピジェネティクスにより調節された結果と考えられる。また、生物は発生や分化の各段階において必要な遺伝子を発現させ、不必要な遺伝子の発現を止めることにより同じDNA情報をもつ細胞が心臓や肺、脳神経などの異なる組織や臓器に分化するが、これもエピジェネティクスによる遺伝子発現調節によってもたらされたものである。さらに、エピジェネティックな遺伝子調節には可逆性があり、環境や生活習慣といった外部からの刺激や老化などの影響を受けて変化し、遺伝子発現の状態が変化する。このことが代謝、免疫疾患など多くの病気の発症に深く関係していることが知られ、がんにおいてもこの機構ががん遺伝子の発現、あるいはがん抑制遺伝子の発現低下に強く関与していることが明らかとなった。その代表的なものに、DNAメチル化とヒストン修飾があげられる。

DNAを構成する4つの塩基の組み合わせの中でシトシン (C) の次にグアニン (G) が続くCG配列のシトシンにメチル基 (-CH₃) が付加され、5メチルシトシンとなることをDNAのメチル化という。DNA配列の中でCG配列が密に存在する領域 (CpGアイランド) があり、哺乳類の遺伝子の多くがプロモーターの内部または近傍にCpGアイランドを含む (Fatemi et al., 2005)。プロモーター領域のCpGアイランドに過剰なメチル化が生じると遺伝子の転写は休止する。この機構によりがん抑制遺伝子が不活性化し、がんの発生や増殖に関わる (Ushijima, 2005)。

染色体はゲノムDNAをヒストン8量体に巻きつけて1つの細胞あたり2メートルもの長さのDNA鎖をコンパクトに折りたたんで保管している。このDNAが巻きつくヒストンタンパク質にはH2A、H2B、H3、およびH4の4種類があり、それぞれが球状のドメインとヒストンテイルから構成されている。この4種類のヒストンが2つずつあわさって8量体を構成し、この8量体にDNAが巻き付いた構造単位はヌクレオソームと

呼ばれるが、ヒストンテイルはヌクレオソームの表面から外に出ており様々な化学修飾を受ける。このヒストンテイルの修飾（ヒストン修飾）が遺伝子発現の調節に関わっている。ヒストンアセチル基転移酵素によってヒストンテイルにアセチル基が付加されるとヒストンの正電荷が減少し、ヒストンと DNA の間の電気的な相互作用が減少するため凝集したヌクレオソーム構造が緩み、RNA ポリメラーゼがプロモーター領域に結合しやすくなり、遺伝子の発現が亢進する。逆にヒストン脱アセチル化酵素によってアセチル基が除去されるとヒストンと DNA の結合が強固になり、遺伝子の発現は抑制される (Wolffe and Pruss, 1996)。また、ヒストンのアセチル化は標的とする遺伝子上への転写因子の誘導にも関わる (Turner, 1998)。がん細胞では、ヒストンの脱アセチル化あるいはメチル化によってがん抑制遺伝子の発現が負に制御され、がんの発生や増殖を誘導する (Greer and Shi, 2012; Ropero and Esteller, 2007)。

近年エピジェネティクスを化学的に制御することでがん治療に応用しようとする試みが盛んに行われ、DNA メチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素、ヒストン脱メチル化酵素、ヒストンメチル化酵素、あるいはプロモドメインを標的とした薬剤の研究や臨床試験が行われている。非小細胞肺癌に対しては Rosalyn らが DNA メチル化阻害薬アザシチジンとヒストン脱アセチル化阻害薬エンチノスタットを併用した第 I/II 相臨床試験の結果を報告し、エピジェネティック治療が非小細胞肺癌に対して有効な治療戦略となる可能性を初めて示した (Juergens et al., 2011)。

3) プロモドメイン含有タンパクである BET について

プロモドメインはヒストンのアセチル基を認識し、プロモーター領域に転写伸長因子 positive transcription elongation factor b (P-TEFb) を動員して RNA ポリメラーゼを活性化することで、様々な遺伝子の転写を促進させるエピジェネティック調節因子である (Dey et al., 2003; Shi and Vakoc, 2014; Yang et al., 2005)。プロモドメインの繰り返し配列および特異的末端配列を持つ BET (bromodomain and extraterminal domain) ファミリータンパクには BRD2、BRD3、BRD4、BRDT がある。BET タンパクが阻害されると転写が抑制され、がんにおいては BET 阻害により腫瘍促進遺伝子の発現が選択的に抑制され、抗腫瘍効果が得られることがこれまで示されている。(Shi and Vakoc, 2014)。Filippakopoulos らはプロモドメイン阻害薬である JQ1 がアセチル化ヒストンに競合的に結合し、BRD4-NUT 融合遺伝子をもつ正中癌細胞 (NUT midline carcinoma: NMC) に対して抗腫瘍効果を示すことを 2010 年に初めて報告した (Filippakopoulos et al., 2010)。現在までに BET 阻害薬が NMC 以外にも血液腫瘍や肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、膀胱癌などに対して抗腫瘍効果を示すことが報告されており (Cheng et al., 2013; Lockwood et al., 2012; Mertz et al., 2011; Shimamura et al., 2013; Wyce et al., 2013; Zhu et al., 2017)、BET 阻害薬に関する複数の

臨床試験が現在進行中である。BET 阻害薬の抗腫瘍効果は *c-MYC* 癌遺伝子の転写抑制と関連することがこれまで多く報告されているが (Delmore et al., 2011; Mertz et al., 2011)、*c-MYC* 癌遺伝子には非依存的であるとする報告もあり (Lenhart et al., 2015; Lockwood et al., 2012)、その作用機序はいまだ不明な点が多い。最近の報告では、BET タンパクは重篤な DNA 損傷である DNA2 本鎖切断(double-strand break: DSB) の修復において重要な役割を担っており、BET 阻害薬は DSB の修復機構である相同組換え(homologous recombination: HR)と非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ) を抑制することが示されている (Li et al., 2018; Stanlie et al., 2014; Sun et al., 2018; Yang et al., 2017)。

4) DNA 損傷修復機構について

DNA は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、一つの細胞で 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。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。一方で、DNA 鎖が 2 本とも切断されている DSB は相補 DNA 鎖を用いた修復ができないため、多くの因子が関与した複雑な機構を用いて時間をかけて修復される。

DSB の主な修復機構に HR と NHEJ の 2 つがある。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コピーすることで修復を行なう。このため変異を伴わない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 期でのみ利用可能である。一方、NHEJ は切断された DNA 末端同士をそのまま結合することで修復を行なう。細胞周期を通じて行うことができるが、結合部分における塩基の欠失や挿入、空間的に近接するほかの配列との結合などの誤りが起こる危険性がある (van Gent and Kanaar, 2016)。DSB 修復の際にどちらの機構を選択するかはまず細胞周期で決まるが、詳細な選択機序については不明である。

5) WEE1 について

一つの細胞が二つの娘細胞を生み出す一連の過程を細胞周期と言い、DNA 合成準備期 (G1 期)、DNA 合成期 (S 期)、分裂準備期 (G2 期)、分裂期 (M 期)、および分裂を停止した休止期 (G0 期) に分かれる。細胞には正しく細胞周期が進行しているかを監視するチェックポイント機構が備わっており、異常や不具合があった際は細胞周期の進行が G1/S 移行期、S 期、G2/M 移行期などで停止する。ほとんど全ての悪性腫瘍は細胞周期の異常活性やチェックポイント機構の部分的な破綻が起こっており、G0 期には入らず細胞が無制限に異常増殖を続けている。

DNAに損傷が生じるとチェックポイント機構が活性化し、細胞周期を停止させ、DNA修復を行う。がん細胞のDNA修復は、*p53*遺伝子の変異欠損などでG1/Sチェックポイントが不活化しており、G2/Mチェックポイントへの依存度が相対的に高くなっていることが多いため、G2/Mチェックポイントががん治療の標的として注目されている。

WEE1はG2/Mチェックポイントで重要な役割を担うセリン/スレオニンキナーゼであり、ミエリン転写因子1 (myelin transcription factor 1: MYT1) と共同してサイクリン依存性キナーゼ1 (cyclin-dependent kinase 1: CDK1) をリン酸化することで細胞をG2期に留まらせる働きをもつ (O'Connell et al., 1997)。G2/Mチェックポイントが阻害されると、十分なDNA修復ができていない細胞がM期へと移行することになり、異常なDNA複製や未成熟な細胞分裂が生じ、アポトーシスにおちいる (Matheson et al., 2016)。また、細胞周期が早まることでDNA複製も亢進し、ヌクレオチドの枯渇による複製フォークの失速や停止が生じ、S期においてDSBが生じる (Beck et al., 2010)。前臨床研究では、WEE1阻害薬AZD1775は肺癌細胞を含めたさまざまな癌細胞に対してDSBを起こしてアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示した (Murrow et al., 2010)。また、固形癌に対するAZD1775単剤投与の第I相臨床試験では乳癌感受性遺伝子 (breast cancer susceptibility gene: *BRCA*) に変異を有する症例での奏効が報告された (Do et al., 2015)。*BRCA*はDNA修復に関わる因子であることから、DNA修復機構の破綻がAZD1775の効果に影響を及ぼす可能性が考えられた。

6) 本研究の仮説

BET阻害薬はDNA修復機構に関与する遺伝子の転写を抑制し、DNA修復を妨げる。このことによりBET阻害薬はDNA損傷をもたらすWEE1阻害薬の効果を増強し、抗腫瘍効果を高めることができる。この2剤併用療法についての報告はまだないが、非小細胞肺癌に対する新たな治療方法となりうる。

7) 本研究の目的

BET阻害薬 (JQ1 または AZD5153) と WEE1 阻害薬 AZD1775 の併用効果を非小細胞肺癌細胞を用いて検証し、その機序を解明する。

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ヒト胎児腎細胞株である 293T を用いた。これらはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（米国バージニア州 マナサス）から購入した。

A549: 肺腺癌細胞株で野生型の *p53* 遺伝子を持っている。

H1299: 非小細胞肺癌細胞株で *p53* 遺伝子が欠失している。

H1975: 肺腺癌細胞株で変異型の *p53* 遺伝子を持っている。

上記の細胞株は 5% CO₂ 下の 37°C 湿潤環境で 10% の牛胎仔血清 (fatal bovine serum: FBS) を含んだローズウェルパーク記念研究所培地 (Roswell Park Memorial Institute medium: RPMI) で培養した。

293T は 5% CO₂ 下の 37°C 湿潤環境で 10% の熱不活性化 FBS を含めたダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM) で培養した。

in vitro の検討では A549、H1299、H1975、293T を使用し、*in vivo* の検討には A549 を用いた。WEE1 阻害薬 AZD1775 はアクティブ・バイオケミカルズ社（中国香港）から購入した。BET 阻害薬である JQ1 と AZD5153 はケイマンケミカル社（米国ミシガン州 アナーバー）から購入した。

MTT 法と併用係数 (combination index: CI) の算出

96 ウェルプレートに A549 (1 ウェルあたり細胞 1000 個)、H1299 (1 ウェルあたり細胞 1000 個)、H1975 (1 ウェルあたり細胞 2000 個) を散布し各々一晩培養後、濃度勾配をつけて AZD1775 および BET 阻害薬を添加し、72 時間培養した。Dye Solution (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 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、さらにその 1 時間後に Varioskan Flash (サーモフィッシュャー・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) を用いて測定した。2 剤併用時の相互作用については Chou と Talalay による median-effect plot を用いて併用係数 (combination index: CI) を算出し、CI が 0.90 以下で相乗作用、CI が 0.90 から 1.10 で相加作用、CI が 1.10 以上で拮抗作用とした (Chou, 2010)。解析には Compusyn 1.0 software (コンボシン社、米国ニュージャージー州パラマス) を用いた。

ウエスタンブロット法

各種タンパク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。サンプルの蛋白濃度よりロード量を計算し、

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 1 に記載したものをを用いた。

表 1. 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 γ H2AX	セル・シグナリング・テクノロジー	#9718	1:1000
抗 XRCC4	アブカム	ab139092	1:1000
抗 DNA リガーゼ IV	セル・シグナリング・テクノロジー	#14649	1:1000
抗 Artemis	セル・シグナリング・テクノロジー	#13381	1:1000
抗 53BP1	セル・シグナリング・テクノロジー	#4908	1:1000
抗 BRD4	セル・シグナリング・テクノロジー	#13440	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 MYT1	セル・シグナリング・テクノロジー	#4282	1:1000

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 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 1ml 加え、細胞溶解後に回収した。回収液にクロロホルム 0.2ml 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 12000g×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 0.5ml 加え、室温で 10 分間静置した後、4°C で 12000g×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 μ l と 100%エタノール 250 μ l を加え混和した後、専用のスピнкаラムに注入し、8000g \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нка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нкаラム・メンブレンを洗浄した後、RNase フリー水を添加し、8000g \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 μ g になるように RT Enzyme Mix 1 μ l、RT Buffer Mix 10 μ l 及び RNase フリー水で調整し、逆転写を行った。反応時間は 25 $^{\circ}$ C 10 分、48 $^{\circ}$ C 30 分、95 $^{\circ}$ 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 2 に記載した配列のものを用いた。上記行程で逆転写したサンプル 0.2 μ l、フォワードプライマー 10 μ mol/L、リバースプライマー 10 μ mol/L、マスターミックス 10 μ l、RNase フリー水 9.6 μ l 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 $^{\circ}$ C 5 分、続いて 95 $^{\circ}$ C 20 秒、60 $^{\circ}$ C 20 秒 40 サイクル、最後に 70 $^{\circ}$ 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。HPRT1 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 Δ Ct 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 $\Delta \Delta$ Ct 法にて行った。

表 2. 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>HPRT1</i>	TTGCTTTCCTTGGTCAGGCA	ATCCAACACTTCGTGGGGTC
<i>XRCC5</i>	CCAGCTTTGAGGAAGCGAGT	GGCTCGGATGCAGTCTATGC
<i>XRCC6</i>	TGGACCTGACATTGCCCAAG	TCTGGTGGGTAAACAAGCTCC
<i>PRKDC</i>	ATCCGCTACACAGTTTCTGCC	TGATGCTGTACATAAGGCCCG
<i>LIG4</i>	TCGACGCCACACCGTTTATT	TGCTCCATGAAACCGAAGCT
<i>XRCC4</i>	ATGACTGCTGACCGAGATCCA	TTACAGCAGCTGAAGCCAACC
<i>DCLRE1C</i>	CCTCTGTCCTGTGAACGCAT	GTACTIONTTGGGAAGACCGGCA

<i>NHEJ1</i>	GAAGCATCAAGGCGCTGGAG	GGGCTGAGGAGACCAGTTGT
<i>PAXX</i>	AAAGCCCGTTTTGGCCTGA	TGAAAGCGTCAGGGATGCTC
<i>SASS6</i>	CCTGAATGTGGTTGATGGTAGACTG	TTCTGGAATGCAAATGCAGAGGA
<i>TP53BP1</i>	TGGGAGTTCTCTCAGGCAAA	TCCTGCCCTACAGGTTTTAC
<i>REV7</i>	GATAAAGAGCACCGCCAGT	ACAGCGAGTCTGAGCTGATG
<i>SHLD1</i>	TGTGGATCCAGACACCAGTAA	AGAGTGAGTTGCAGAGCCT
<i>SHLD2</i>	GCTGCTTGCCATTTACTATGAAGA	GAGGAAGGAACCTATCACTCTGTTGA
<i>SHLD3</i>	GGGAAGGTTACAGACCAGCC	TCCATAGTCCTTTCACTGCTGC
<i>CDK1</i>	TTCAGAGCTTTGGGCACTCC	TCGAGAGCAAATCCAAGCCA
<i>WEE1</i>	ACCACAAGTGCTTTCCCAAGA	CAGTGCCATTGCTGAAGGTC
<i>CDC25</i>	AGAAGCCCATCGTCCCTTTG	GAGACCTGTCCTCTTCACGC
<i>CHK1</i>	GTCAGTTACTTGGCACCCCA	TTCTTTTGACCAACCGCTGC
<i>CHK2</i>	AGAAGAAGCCTTAAGACACCCG	CGACTAGTAGAAGGCTGGGC
<i>MYT1</i>	TCTCGCCAATATCCGCCTTC	GGTGCTCACATAGGCATCGA

BRD4 ノックダウン細胞の作成

6 ウェルプレートに A549 を 1 ウェルあたり 1.5×10^5 個散布し、一晚培養した。翌日、Opti-MEM (インビトロジェン社、米国カルフォルニア州カールスバッド) を溶媒として、ON-TARGET plus BRD4 siRNA SMART pool (ダーマコン社、米国コロラド州ラファイエット) 50pmol を Lipofectamine RNAiMAX (インビトロジェン社) 5 μ l と混合した後に細胞へ添加し、低分子干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA) の導入を行なった。48 時間後に蛋白を回収し、ウエスタンブロット法を用いて BRD4 の蛋白発現を確認した。陰性コントロールには ON-TARGET plus Non-targeting Control pool (ダーマコン社) を用いて対照群とした。

細胞周期の解析

A549 (1.0×10^5 個)、H1299 (1.0×10^5 個)、H1975 (1.0×10^5 個) を 10cm ディッシュで一晩培養した。翌日に細胞周期を同期させるためにノコダゾールを 100ng/ml になるように添加した。添加 16 時間後にリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS) で 2 回洗浄し、JQ1 及び AZD1775 を加えた培養液で培養した。24 時間後にトリプシンで処理し、PBS で 2 回洗浄した後に -20°C 下で 70%エタノールを用いて 2 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 PI/RNase Staining Buffer (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) 500 μ l で再懸濁し、DNA を標識した。測定は BD FACSVerser flow cytometer (ベクトン・ディッキンソン社) を使用した。

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 (1.0×10^5 個)、H1299 (1.0×10^5 個)、H1975 (1.0×10^5 個) を 10cm ディッシュで一晩培養し、翌日に JQ1 及び AZD1775 を添加した。添加 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 $500 \mu\text{l}$ で再懸濁した。その後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 FACSVerser flow cytometer (ベクトン・ディッキンソン社) を使用した。

NHEJ 修復活性の解析

1. NHEJ 修復レポーター試験の概要

NHEJ レポータープラスミドである pimEJ5GFP (#44026; アドジーン社、米国マサチューセッツ州ケンブリッジ) と ISceI-GR-RFP (#17654; アドジーン社) を用いて行なった。pimEJ5GFP に含まれている緑色蛍光タンパク (Green fluorescent protein: 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化されている。ISceI-GR-RFP 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 機構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 の導入効率を表す造礁サンゴ由来赤色蛍光タンパク (DsRed) の発現量をもとに GFP の発現を相対定量することで NHEJ 修復活性を評価した。

2. pimEJ5GFP 安定発現細胞株 (H1299-EJ5) の作成

pimEJ5GFP $1 \mu\text{g}$ 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) $1 \mu\text{l}$ 、CutSmart Buffer (ニュー・イングランド・バイオラボ社) $5 \mu\text{l}$ 、水を混和し、 37°C 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 を 6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり細胞 1.5×10^5 個散布し一晩培養した後、Opti-MEM を溶媒として、線状化した pimEJ5FP $3 \mu\text{g}$ を Lipofectamine 2000 (インビトロジェン社) $7 \mu\text{l}$ 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) を樹立した。

3. NHEJ 修復レポーター試験

H1299-EJ5 細胞を 10cm ディッシュに 6×10^5 個散布し一晩培養した。Opti-MEM を溶媒として、ISceI-GR-RFP プラスミド $2 \mu\text{g}$ を Lipofectamine 2000 $15 \mu\text{l}$ 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、JQ1 $0.2 \mu\text{mol/L}$ または AZD5153

0.2 μ mol/L を添加した。ISceI-GR-RFP プラスミドの導入 48 時間後に BD FACSVerser flow cytometer (ベクトン・ディッキンソン社) を用いて GFP 及び DsRed 発現の測定を行った。

異種移植マウスモデル

動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に基づき施行した。5 週齢の雌のヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) を異種移植モデルに使用し、A549 細胞 2×10^6 個を 200 μ l の PBS で希釈し、マウスの左背部に皮下注射で移植した。移植 7 日後に点状に腫瘍が形成しているのを確認し、無作為に対照群、JQ1 単独投与群 (50mg/kg、腹腔投与)、AZD1775 単独投与群 (20mg/kg、経口投与)、2 剤併用群の 4 群に割り付けし、治療を開始した (各群 4 匹)。JQ1 は 5%ジメチルスルホキシドと 0.5%メチルセルロースを、AZD1775 は 10% 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンを用いて 200 μ l に調整し、週 5 回、3 週間にかけて投与した。また、腫瘍径と体重を週 2 回測定し、腫瘍体積 (Tumor Volume: TV) の計算式は $TV = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times 1/2$ を用いた。治療終了日にマウスを安楽死させ、その後速やかに腫瘍組織から RNA と蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法および qRT-PCR 法を用いて検討を行った。

マウス皮下腫瘍の免疫組織染色法

摘出した腫瘍をパラフィン包埋し、切片作製を行った。キシレンとエタノールで脱パラフィン化を行った後、オートクレープで抗原賦活を施行した。抗原賦活後、メタノールと過酸化水素を用いた内因性ペルオキシダーゼ除去と他種血清を用いた非特異的ブロッキングを行った後、1 次抗体を添加し 4°C 下で一晩静置した。1 次抗体には抗 γ H2AX (#9718; 希釈倍率 1:480、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) 及び抗リン酸化ヒストン H3 (#9701; 希釈倍率 1:200、セル・シグナリング・テクノロジー社) を用いた。翌日、PBS with Tween 20 (PBST) で洗浄後、2 次抗体を添加して室温で 30 分静置し、再度 PBST で洗浄して、ヒストファイン DAB 基質キット (ニチレイバイオサイエンス社、東京) を用いて発色させた。超純水で洗浄し、ヘマトキシリン核染色を施行した後、再度超純水で洗浄を行った。透徹を施行した後、封入剤 (マリノール) を用いてスライドガラスに封入した。評価に関してはスライド 1 枚あたり無作為に 400 倍視野で 5 視野選び、陽性細胞率をそれぞれ計算した。

統計解析

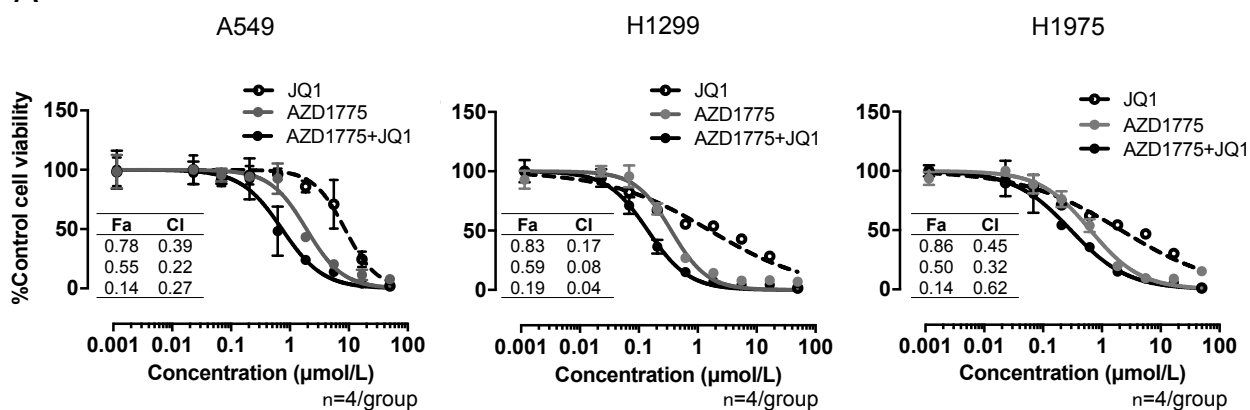
全ての検討は独立した状態で 3 回以上行った。2 群間の比較にはウェルチの t 検定を用い、統計学的有意差は P 値が 0.05 未満の時と定義した。

実験結果

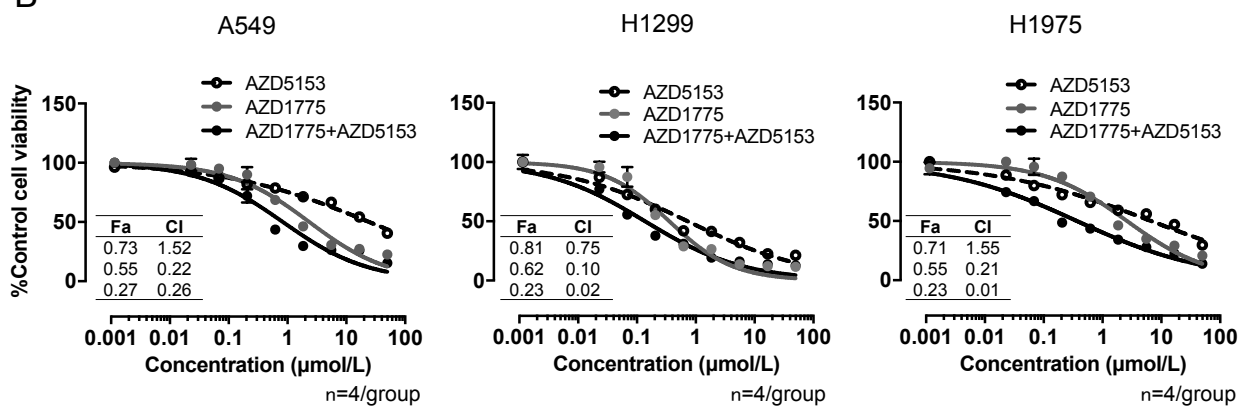
1) 非小細胞肺癌細胞における BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用効果に関する検討

はじめに、3つの非小細胞肺癌細胞（A549、H1299、H1975）を用いて BET 阻害薬である JQ1 あるいは AZD5153 と WEE1 阻害薬 AZD1775 の併用効果について検討した。MTT 法を行い各薬剤の抗腫瘍効果を評価し、その結果をもとに CI を算出したところ、3つの細胞全てにおいて CI は 0.1 から 0.5 の間で推移し、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬は相乗的な抗腫瘍効果があることが示された（図 1A、1B）。また、この相乗効果の有無には細胞の持つ *p53* 遺伝子の状態との関連はみられなかった。さらに、非腫瘍細胞である 293T では 2 剤の相乗効果は確認されなかった（図 1C）。

A



B



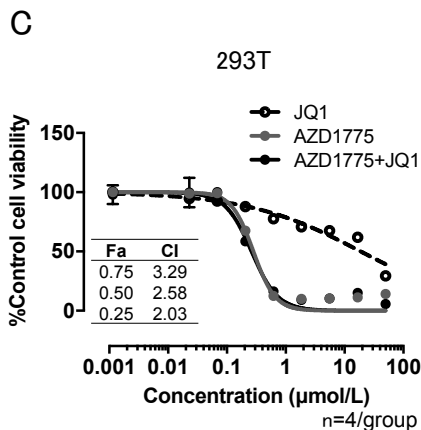


図1. 非小細胞肺癌細胞および非腫瘍細胞に対する BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の細胞増殖抑制効果と 2 剤の併用効果

A: 3 種類の非小細胞肺癌細胞に対する JQ1 と AZD1775 の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。

B: 3 種類の非小細胞肺癌細胞に対する AZD5153 と AZD1775 の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。

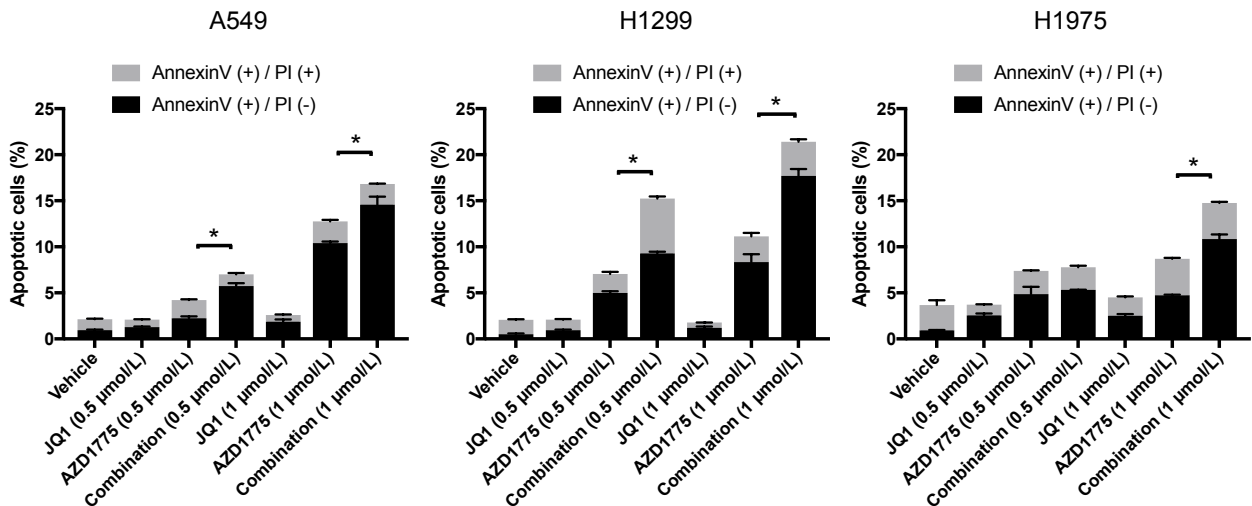
C: 非腫瘍細胞 293T に対する JQ1 と AZD1775 の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。

CI, Combination index; Fa, Fraction affected.

2) BET 阻害薬と WEE1 阻害薬がアポトーシスに与える影響に関する検討

次に、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 BET 阻害薬と WEE1 阻害薬がアポトーシスに与える影響を検討した。JQ1 単独投与ではアポトーシスの誘導はほとんど確認できなかったが、AZD1775 と併用することで AZD1775 単独投与に比べて有意にアポトーシス細胞が増加した (図 2)。以上の結果から、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用は非小細胞肺癌細胞においてアポトーシスを誘導し、相乗的に細胞増殖を抑制することが示された。



n=3/group *p < 0.05, Welch t-test.

図 2. JQ1 と AZD1775 がアポトーシスに与える影響

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。グラフは平均値と標準偏差値を示す。

3) BET 阻害薬が DSB に与える影響に関する検討

次に、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬が起こす DSB を評価するために抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタンブロット法を行った。 γ H2AX の発現は BET 阻害薬単独投与では乏しかったが、AZD1775 と併用することで AZD1775 単独投与よりも増強した (図 3A、3B)。

BET 阻害薬が WEE1 阻害薬によって生じた DSB にどのような影響を与えるのかを検討するために、AZD1775 単独投与 24 時間後に JQ1 を添加した培養液に交換し、ウエスタンブロット法を用いて γ H2AX 発現の経時的変化を評価した (図 4A)。JQ1 を添加していない対照群では培養液交換 4 時間後に γ H2AX 発現はピークに達し、それ以降は徐々に低下した。一方で、JQ1 を添加した群では培養液交換 4 時間後以降も γ H2AX 発現は遷延し、8 時間後のサンプルでは対照群と比較して有意に亢進した (図 4B、4C)。以上の結果から、BET 阻害薬が WEE1 阻害薬によって起こった DSB の修復を遅延させていることが示唆された。

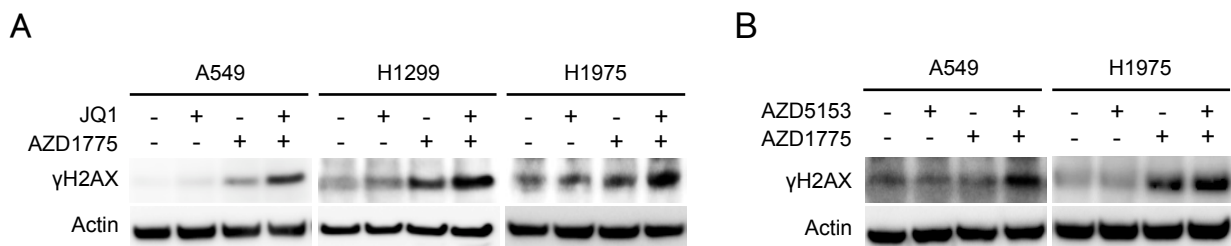


図 3. BET 阻害薬と AZD1775 が DSB に与える影響

A: JQ1 と AZD1775 を 24 時間投与し、抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタンブロット法で

タンパク発現量を評価した。

B: AZD5153 と AZD1775 を 24 時間投与し、抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタンブロット法でタンパク発現量を評価した。

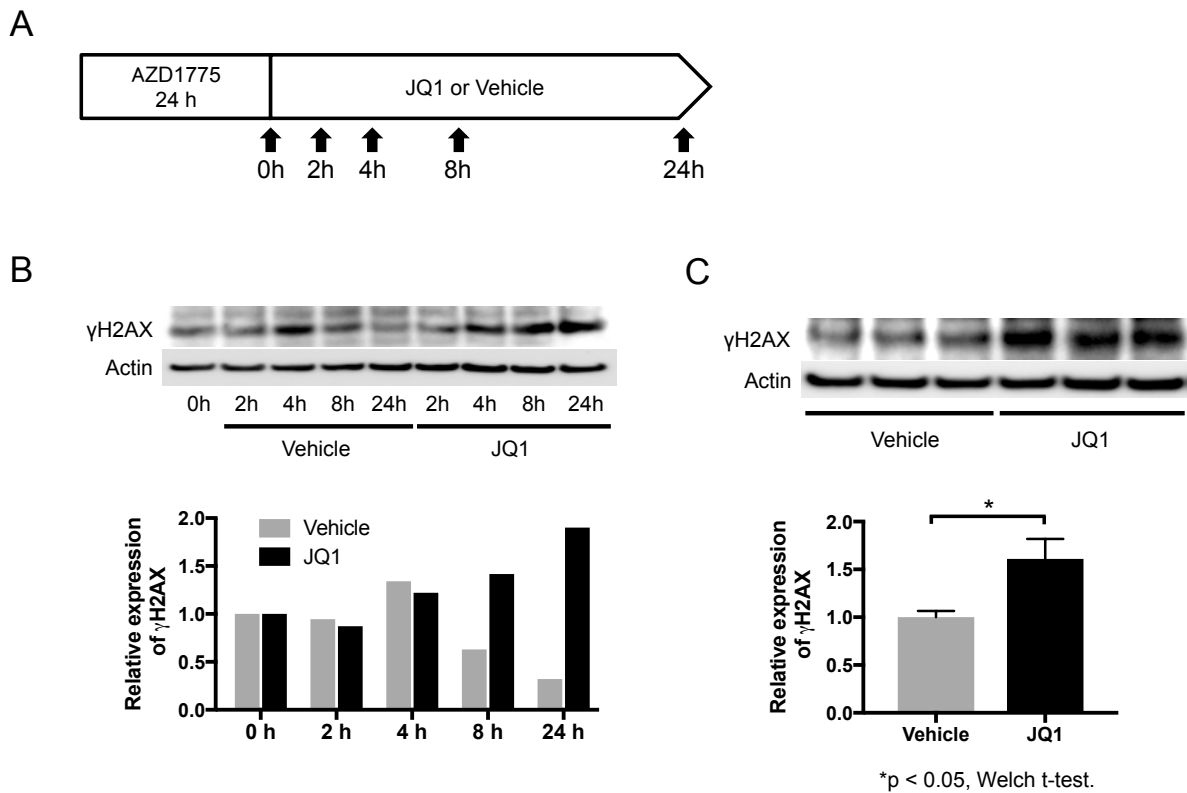


図 4. AZD1775 が起こした DSB に JQ1 が与える影響

A: DSB を生じさせるために AZD1775 $1.0 \mu\text{mol/L}$ を添加した培養液で A549 細胞を培養し、24 時間後に JQ1 $1.0 \mu\text{mol/L}$ が添加されている培養液に交換した。その後、経時的に細胞を回収してタンパク抽出を行い、ウエスタンブロット法に使用した。

B: ウエスタンブロット法を用いて γ H2AX タンパクの発現量を経時的に評価した。 γ H2AX のタンパク量を Actin のタンパク量を用いて相対定量し、0 時間での対照群の値を 1 とした。

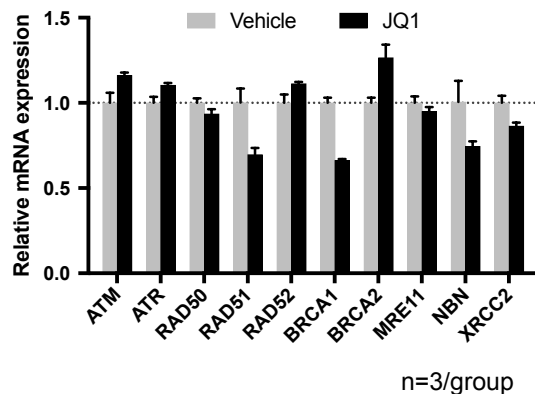
C: ウエスタンブロット法を用いて AZD1775 投与終了 8 時間後の γ H2AX タンパクの発現量を評価した。 γ H2AX のタンパク量を Actin のタンパク量を用いて相対定量し、対照群の平均値を 1 とした。グラフは平均値と標準偏差値を示す。

4) BET 阻害薬が DSB 修復機構関連遺伝子の発現に与える影響に関する検討

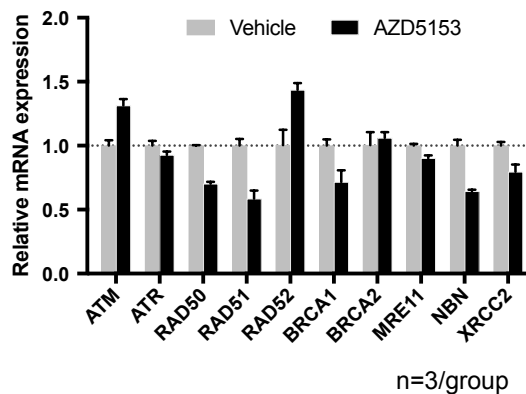
BET タンパクが DSB 修復機構関連遺伝子の転写を調節していると考え、qRT-PCR 法を用いて BET 阻害薬投与時の DSB 修復機構関連遺伝子の RNA 量を相対定量した。HR 機構関連遺伝子の RNA 量は大きくは変化しなかった (図 5A、5B)。一方で、*SHLD1*、*SHLD3*、*XRCCA*、*SASS6*、*TP53BP1* といった NHEJ 機構関連遺伝子の RNA 量は大きく低下した (図

5C、5D、5E、5F、5G、5H)。また、ウエスタンブロット法を用いて NHEJ 機構関連遺伝子のタンパク発現量を評価したところ、RNA 量と同様に BET 阻害薬投与によりタンパク発現量は低下した (図 5I、5J)。

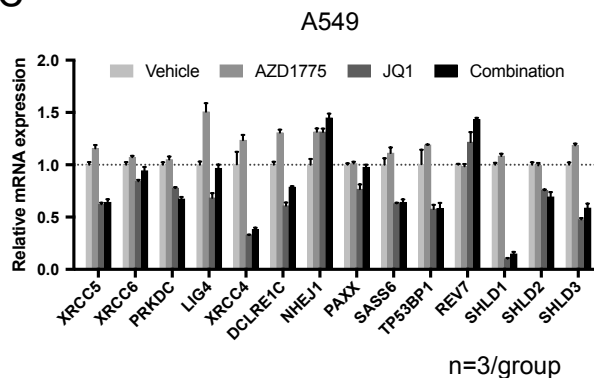
A



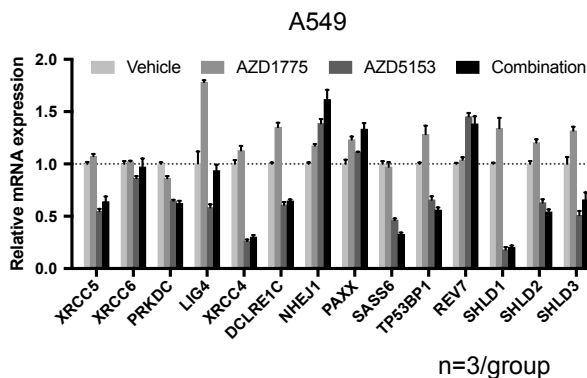
B



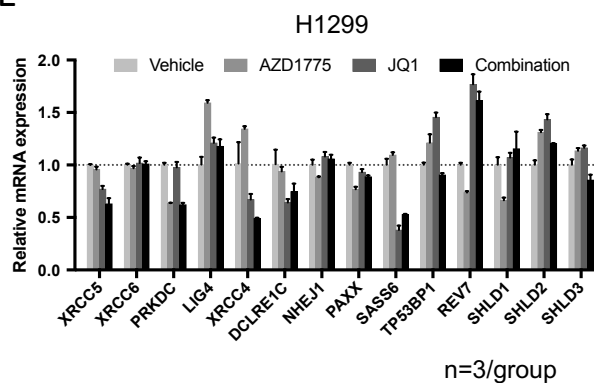
C



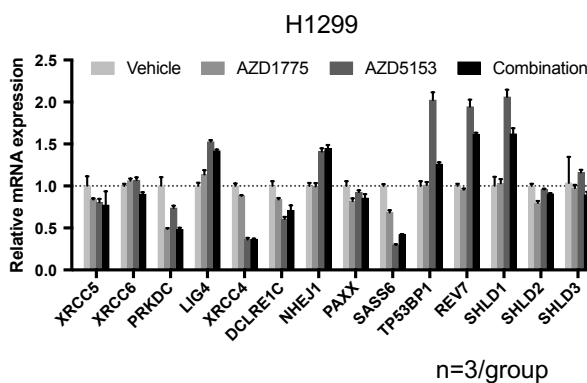
D



E



F



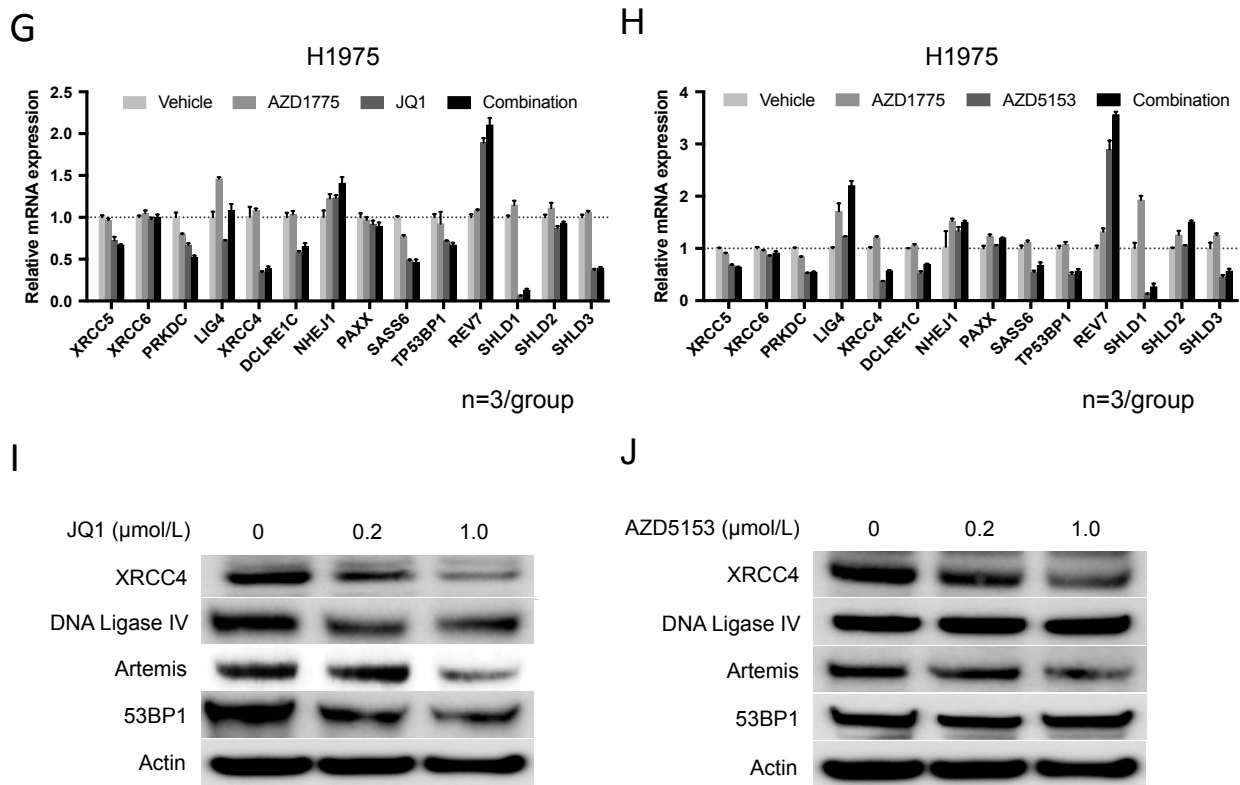


図 5. BET 阻害薬が DSB 修復機構関連遺伝子の発現に与える影響

A, B : A549 細胞に JQ1 1.0 μmol/L (A)、AZD5153 1.0 μmol/L (B) を 24 時間投与し、qRT-PCR 法を用いて HR 機構関連遺伝子の RNA 量を測定した。

C, D : A549 細胞に JQ1 1.0 μmol/L (C)、AZD5153 1.0 μmol/L (D) を 24 時間投与し、qRT-PCR 法を用いて NHEJ 機構関連遺伝子の RNA 量を測定した。

E, F : H1299 細胞に JQ1 1.0 μmol/L (E)、AZD5153 1.0 μmol/L (F) を 24 時間投与し、qRT-PCR 法を用いて NHEJ 機構関連遺伝子の RNA 量を測定した。

G, H : H1975 細胞に JQ1 1.0 μmol/L (G)、AZD5153 1.0 μmol/L (H) を 24 時間投与し、qRT-PCR 法を用いて NHEJ 機構関連遺伝子の RNA 量を測定した。

I, J : A549 細胞に JQ1 (I)、AZD5153 (J) を 24 時間投与し、ウエスタンブロット法を用いて NHEJ 機構関連遺伝子のタンパク発現量を評価した。

全てのグラフは平均値と標準偏差値を示す。

5) BET 阻害が NHEJ 修復活性に与える影響に関する検討

次に、BET タンパクを阻害することで NHEJ 修復活性が低下するかどうかを検討した。H1299 細胞に 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) を作成し、それを用いて NHEJ 修復レポーター試験を行った。JQ1 あるいは AZD5153 の投与により GFP 陽性細胞比率は対照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 6A、6B)。また、代表的な BET タンパクである BRD4 を siRNA を用いてノックダウンしたところ、やはり GFP 陽性細胞比

率は対照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 6C、6D)。以上の結果から、BET 阻害により NHEJ 機構関連遺伝子の転写が抑制され、NHEJ 機構による DSB 修復能が低下することが示された。

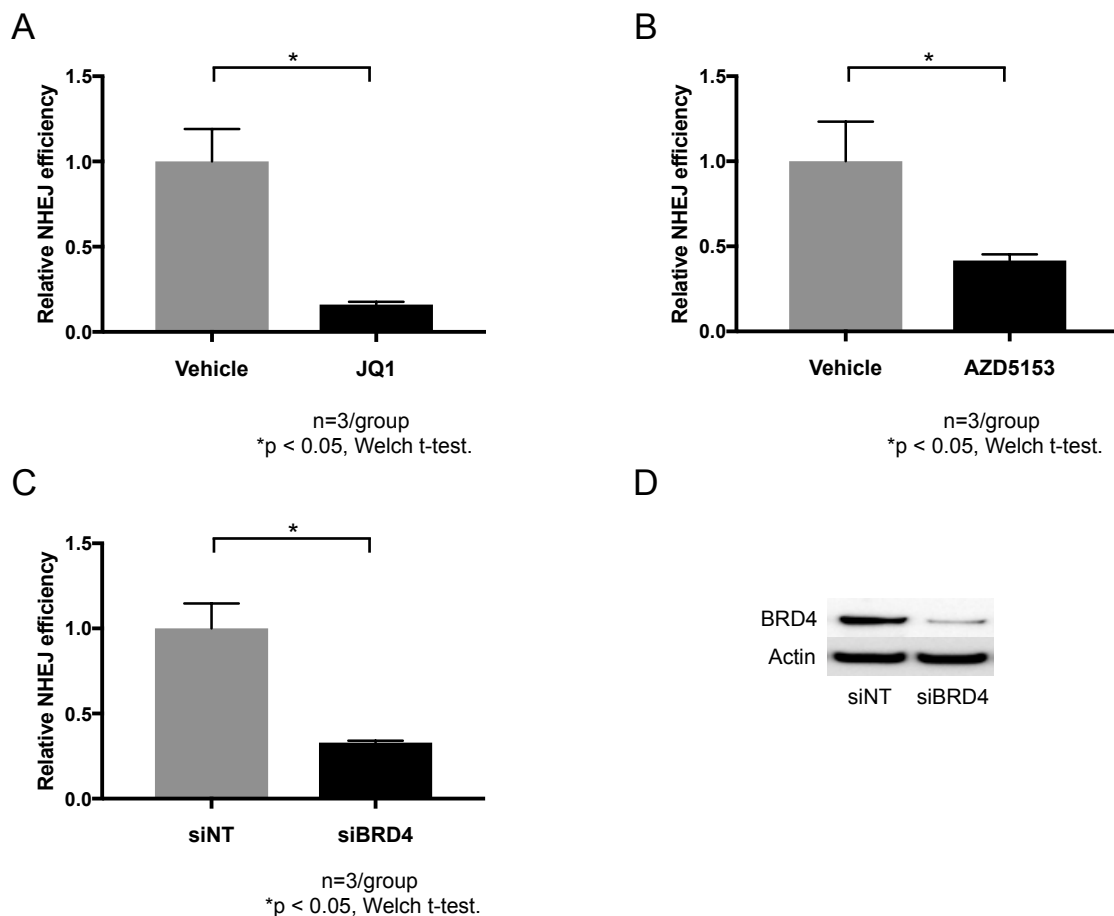


図 6. BET 阻害が NHEJ 修復活性に与える影響

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 細胞を用いて NHEJ 機構による DSB 修復能の評価を行なった。

A : JQ1 0.2 μ mol/L 投与後の NHEJ 機構による DSB 修復能を評価した。

B : AZD5153 0.2 μ mol/L 投与後の NHEJ 機構による DSB 修復能を評価した。

C : BRD4 を siRNA によってノックダウンした後の NHEJ 機構による DSB 修復能を評価した。

D : BRD4-siRNA 導入 48 時間後に抗 BRD4 抗体を用いたウエスタンブロット法で BRD4 タンパクの発現量を評価した。NT, Non target.

グラフは平均値と標準偏差値を示している。

6) BET 阻害薬と WEE1 阻害薬が細胞周期に与える影響に関する検討

次に、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用が細胞周期にもたらす影響を PI 染色を用いたフローサイトメトリー法で検討した。過去の報告では JQ1 投与により G1 期の割合が

増加するとされ (Lockwood et al., 2012; Muralidharan et al., 2017; Wu et al., 2016)、今回の検討でも A549 細胞において G1 期の割合が増加したが、AZD1775 単独投与で増加した G2/M 期の割合は JQ1 と AZD1775 の併用によりさらに増加した (図 7)。また、M 期の指標となるリン酸化ヒストン H3 (phospho-histone H3: pHH3) 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ところ、2 剤併用群では対照群や単独薬剤投与群と比べて著明に増強した (図 8A、8B)。このことから、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用により G2/M 期、とりわけ M 期の割合が増加することが明らかとなった。

これらの結果の機序として、BET タンパクが G2/M チェックポイント機構関連遺伝子の発現を調節している可能性を考え、G2/M チェックポイント機構関連遺伝子の RNA 量を qRT-PCR 法を用いて相対定量したところ、BET 阻害薬投与によって *MYT1* の RNA 量が低下することが明らかとなった (図 9A、9B、9C)。さらに *MYT1* のタンパク発現量も BET 阻害薬投与により低下することをウエスタンブロット法で確認した (図 9D、9E)。以上より、BET 阻害薬は *MYT1* の発現を低下させ、WEE1 阻害薬と併用することで G2/M チェックポイント機構を著明に抑制し、M 期への移行を増加させていることが示唆された。

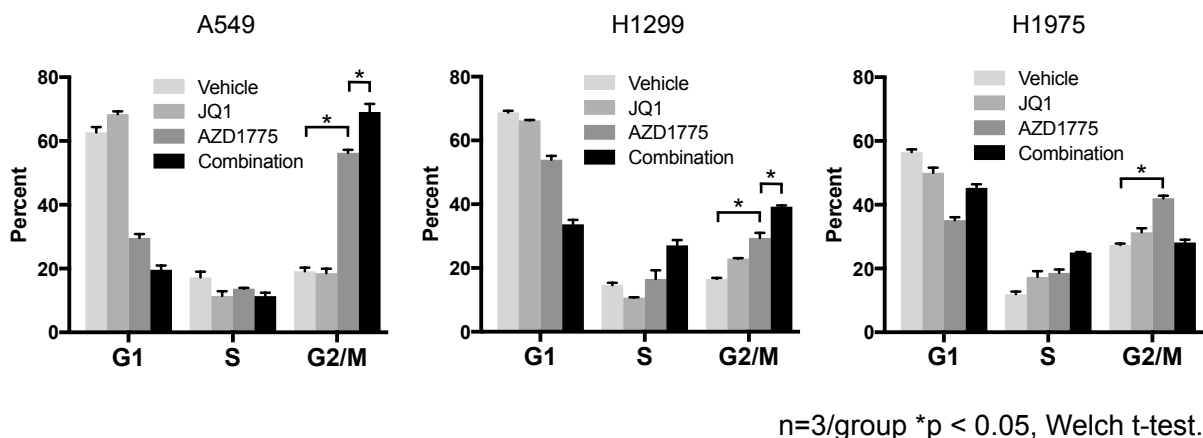


図 7. JQ1 と AZD1775 が細胞周期に与える影響

PI 染色を用いたフローサイトメトリー法で測定した。グラフは平均値と標準偏差値を示している。

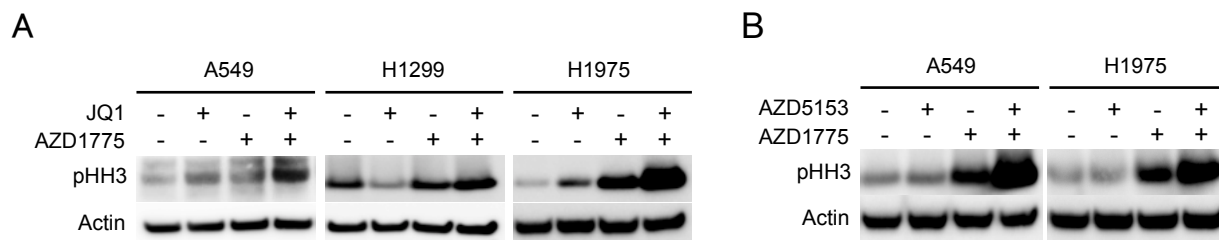


図 8. BET 阻害薬と AZD1775 がヒストン H3 のリン酸化 (pHH3) に与える影響

A: JQ1 と AZD1775 を 24 時間投与し、抗 pHH3 抗体を用いたウエスタンブロット法でタ

ンパク発現量を評価した。

B: AZD5153 と AZD1775 を 24 時間投与し、抗 pHH3 抗体を用いたウエスタンブロット法でタンパク発現量を評価した。

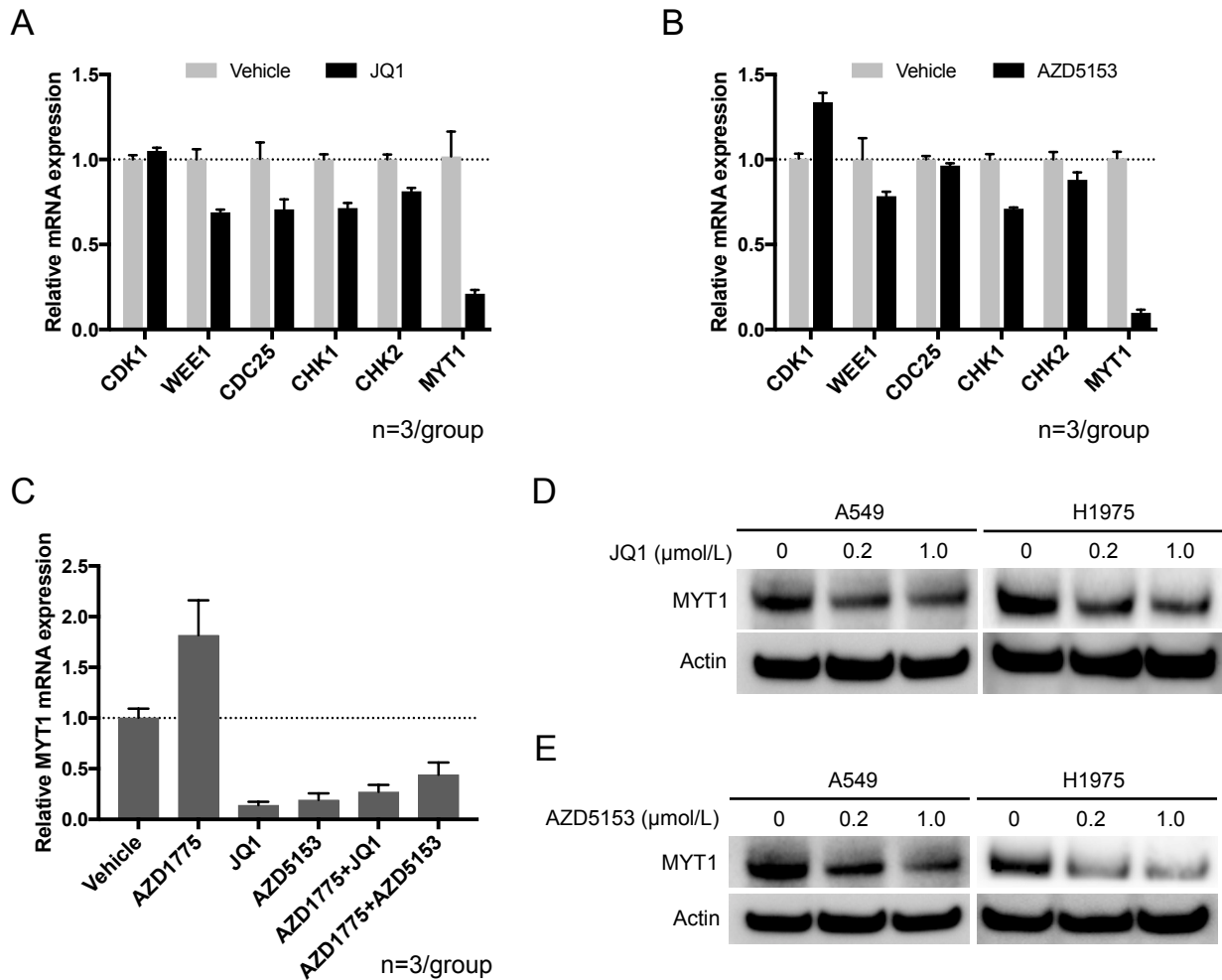


図 9. BET 阻害薬が G2/M チェックポイント機構に与える影響

A, B: A549 細胞に JQ1 1.0 μ mol/L (A)、AZD5153 1.0 μ mol/L (B) を 24 時間投与し、qRT-PCR 法を用いて G2/M チェックポイント機構関連遺伝子の RNA 量を測定した。

C: H1975 細胞に AZD1775 1.0 μ mol/L、JQ1 1.0 μ mol/L、AZD5153 1.0 μ mol/L を 24 時間投与し、qRT-PCR 法を用いて *MYT1* の RNA 量を測定した。

D, E: JQ1 (D)、AZD5153 (E) を 24 時間投与し、抗 MYT1 抗体を用いたウエスタンブロット法でタンパク発現量を評価した。

グラフは平均値と標準偏差値を示す。

7) 異種移植マウスモデルにおける BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用をもたらす抗腫瘍効果に関する検討

A549 細胞を用いて異種移植マウスモデルを作成し、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用

療法がもたらす抗腫瘍効果について検討した。対照群、JQ1 単独群、AZD1775 単独群、2 剤併用群の 4 群に分け、週 5 回、3 週間にかけて薬剤投与を行ったところ、2 剤併用群はその他の群と比較して有意に腫瘍増殖を抑制した (図 10)。また、本実験の治療では全ての群において有意な体重減少やその他明らかな有害事象は認めなかった。

次に、薬剤投与最終日にマウスを安楽死させ、速やかに腫瘍を切除し、腫瘍組織を用いた免疫組織染色法、ウエスタンブロット法、および qRT-PCR 法を行なった。*in vitro* の結果と同様に、併用群の腫瘍で γ H2AX と pHH3 の発現が亢進することが免疫組織染色法およびウエスタンブロット法で明らかとなった (図 11A、11B、11C、11D)。また、ウエスタンブロット法では MYT1 のタンパク発現量が *in vitro* の結果と同様に JQ1 の投与により低下した (図 11D)。qRT-PCR 法を行なったところ、*in vitro* の結果と同様に JQ1 の投与により *MYT1* およびいくつかの NHEJ 機構関連遺伝子の RNA 量が低下した (図 11E)。

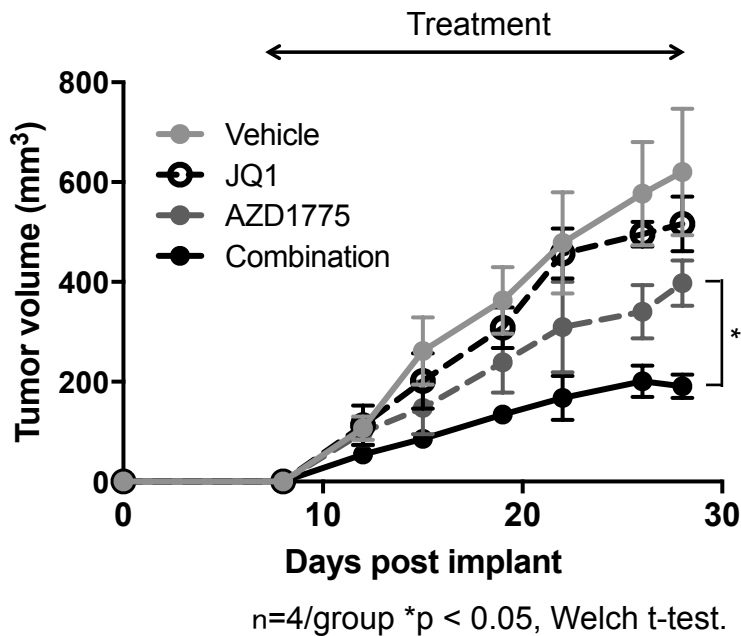


図 10. JQ1 と AZD1775 の併用療法が異種移植マウスモデルにもたらす抗腫瘍効果
無作為に対照群、JQ1 単独投与群 (50mg/kg、腹腔投与)、AZD1775 単独投与群 (20mg/kg、経口投与)、2 剤併用群に割り付けし、週 5 回 3 週間にわたり薬剤を投与した。週 2 回腫瘍径を測定し、腫瘍体積を計算した。グラフは平均値と標準偏差値を示す。

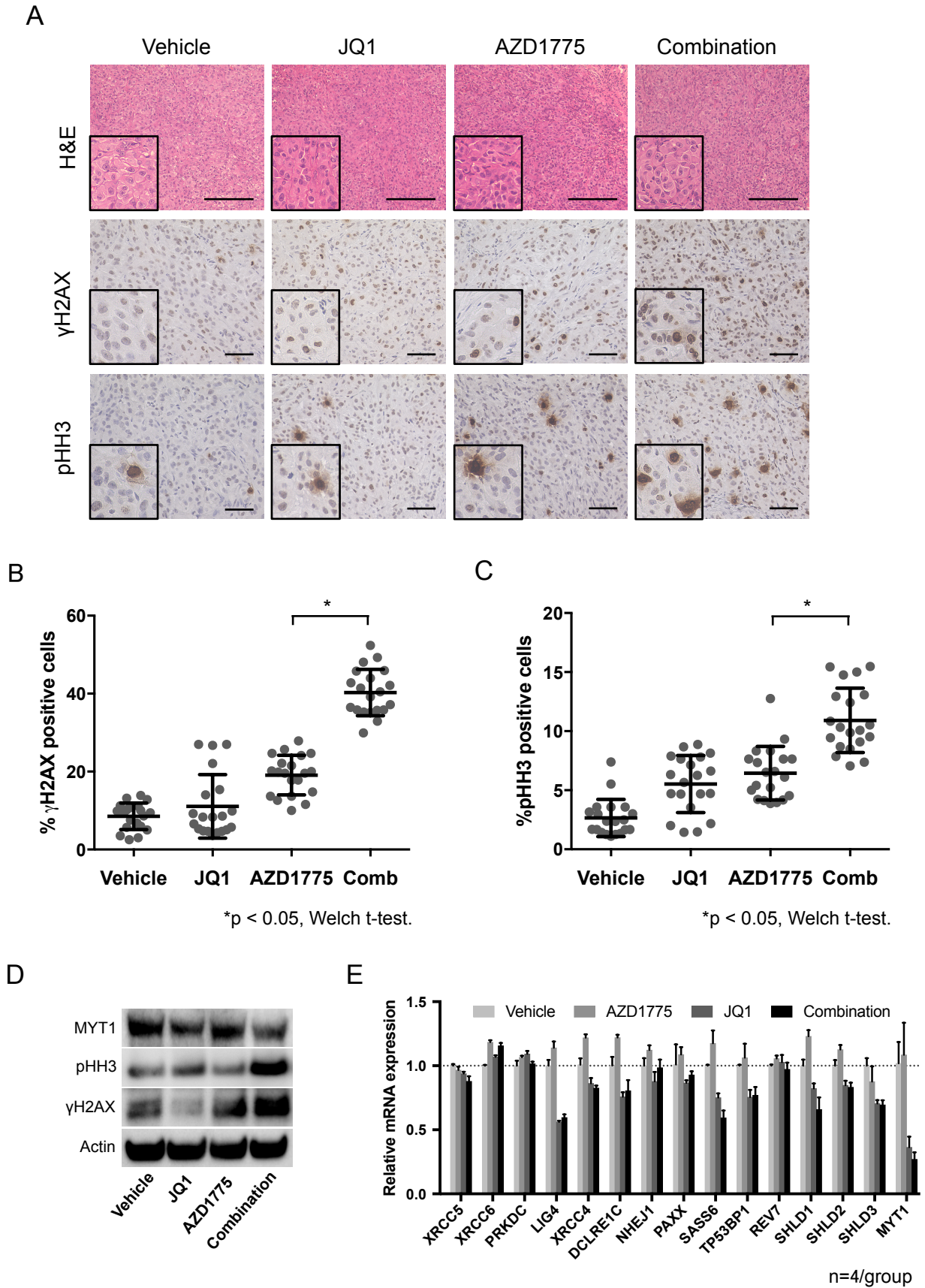


図 11. JQ1 と AZD1775 の併用療法が異種移植マウスモデルにもたらす影響

A: マウスより摘出した腫瘍組織を抗 γ H2AX 抗体と抗 pHH3 抗体を用いた免疫組織染色

法で評価した。図中のスケールは 50 μ m を示す。

B, C: マウス移植腫瘍切片スライド 1 枚あたり無作為に 400 倍視野で 5 視野を選び、 γ H2AX 発現陽性細胞率 (B) あるいは pHH3 発現陽性細胞率 (C) を計算した。図中の水平線は平均値と標準偏差値を示す。

D: マウスより摘出した腫瘍組織からタンパクを抽出し、抗 γ H2AX 抗体と抗 pHH3 抗体を用いたウエスタンブロット法でタンパク発現量を評価した。

E: マウスより摘出した腫瘍組織から RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて NHEJ 機構関連遺伝子と *MYT1* の RNA 量を測定した。グラフは平均値と標準偏差値を示す。

考察

今回我々は、BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用が非小細胞肺癌に対して相乗的な抗腫瘍効果をもたらすことを *in vitro* 及び *in vivo* の系で確認した。また、BET 阻害が NHEJ 機構による DNA 修復を抑制すること、そして細胞周期において M 期を増加させることを明らかにした。

BET 阻害薬が DSB 修復を抑制することで放射線療法や化学療法の効果を増強させることはこれまでも報告されているが、BET 阻害薬が DSB 修復を抑制する機序は様々である。Li らは BRD4 が NHEJ 機構関連遺伝子の発現を調節する一方、BRD4 が直接 NHEJ 機構関連タンパクに作用することを報告した (Li et al., 2018)。Wang らは、NHEJ 機構関連因子である DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) は DSB 発生部位のアセチル化ヒストンを認識するが、JQ1 はアセチル化ヒストンに競合的に結合することで DNA-PKcs を抑制し、NHEJ 機構抑制を介して DSB 修復能を低下させることを明らかにした (Wang et al., 2015)。また、Sun らは BRD4 を阻害すると C-terminal binding protein interacting protein (CtIP) の発現が低下し、DSB 末端の削り込み (DSB end resection) が抑制され、HR 機構による DNA 修復能が低下することを報告した (Sun et al., 2018)。今回我々は、BET 阻害によって NHEJ 機構関連遺伝子の発現が低下することを *in vitro* 及び *in vivo* の系で確認した。抑制される遺伝子は使用した細胞の種類によって多少異なるものの、*SHLD1*、*SHLD3*、*XRCCA*、*SASS6*、*TP53BP1* といった NHEJ 機構にかかわる因子の RNA 量低下がみられた。BET 阻害薬はヒストンのアセチル化によって発現が異常亢進している遺伝子を選択的に抑制するため (Shi and Vakoc, 2014)、細胞によって標的となる遺伝子が異なりうるものの、一般的に肺癌細胞を含めた多くのがん細胞では DNA 修復機構関連因子の異常活性がみられ DNA 修復能は亢進していることから (Hosoya and Miyagawa, 2014)、この BET 阻害薬による DNA 修復機構の抑制効果は多くの癌種でみられる可能性があると考ええる。

DSB 修復の際に HR 機構と NHEJ 機構のどちらを選択するかはまず細胞周期で決まる。HR は S 期から G2 期でのみ選択されるのに対し、NHEJ は細胞周期を通して可能である (van Gent and Kanaar, 2016)。また、M 期にある細胞に生じた DSB は、M 期ではほとんど修復が起こらず、G1 期に移行した後に NHEJ によって修復されるとの報告がある (Heijink et al., 2013)。WEE1 を阻害すると G2/M チェックポイントが脆弱化し、DSB が十分修復されていない細胞が M 期へ移行することになるため、これらの DSB は G1 期に NHEJ によって修復されると考えられる。このことが BET 阻害による NHEJ 抑制が WEE1 阻害薬と相乗効果を示す機序の一つであると考ええる。2018 年に HR 機構と NHEJ 機構の選択に関わる重要な調節因子として Shieldin 複合体が同定された (Ghezraoui et al. Nature 2018; Gupta et al. Cell 2018; Noordermeer et al. Nature 2018)。

Shieldin 複合体は TP53BP1 の下流因子として DSB 末端の削り込みを阻害することで HR 機構を抑制し、NHEJ 機構を活性化する重要な NHEJ 機構調節因子である。また SHLD1 は Shieldin 複合体の構成成分である。我々の結果では A549 細胞と H1975 細胞において *SHLD1* の RNA 量は 90%程度抑制されており、この SHLD1 の強い発現抑制が NHEJ 機構の抑制に大きく影響している可能性が考えられた。

G2/M チェックポイント機構を抑制する AZD1775 は、*p53* 遺伝子の欠失や変異によって G1/S チェックポイント機構が脆弱化している細胞で、より高い抗腫瘍効果を示すことが報告されている (Bridges et al., 2011; Hirai et al., 2009; Rajeshkumar et al., 2011)。一方で、*p53* 遺伝子の状態は AZD1775 の効果に影響を与えなかったとする報告もあり (Guertin et al., 2013; Van Linden et al., 2013)、定まった見解はない。今回行った併用療法は *p53* 遺伝子の状態が異なっても一様に相乗効果を示し、非腫瘍細胞である 293T では相乗効果は認められなかったことから、この併用療法は様々な癌種に対して有効である可能性がある。

我々はさらに、WEE1 阻害薬と BET 阻害薬の併用が M 期の指標である pHH3 の発現を亢進させること、そして BET 阻害が MYT1 の発現を低下させることも明らかにした。WEE1 と MYT1 は G2/M チェックポイント機構において共同して細胞周期を停止させるゲートキーパーとして機能している。Guertin らは AZD1775 に感受性の高い細胞は MYT1 の発現が低い傾向があり、MYT1 をノックダウンすると AZD1775 に対する感受性が高くなることを報告した (Guertin et al., 2013)。今回の検討は BET タンパクが MYT1 の発現を制御しており、BET 阻害が MYT1 発現を低下させることを明らかにした初めての報告である。

現在、BET 阻害薬は臨床応用に向けて様々な試験が行われている。非小細胞肺癌を含めた進行期固形癌に対する第 Ib 相臨床試験において、選択的 BET 阻害薬であるピラブレシブの単剤投与は、忍容性に問題はないものの抗腫瘍効果は限定的であった (Lewin et al., 2018)。さらなる検討が必要ではあるが、固形癌に対しては BET 阻害薬単剤では効果は不十分な可能性があり、他の薬剤との併用療法が検討されている。前立腺癌では BET 阻害薬と抗アンドロゲン薬の併用療法に関する臨床試験が進行中である。非小細胞肺癌に関しては、前臨床実験で BET 阻害による腫瘍細胞及び腫瘍浸潤免疫細胞上の PD-L1 発現の低下や細胞障害性 T 細胞の誘導が示され (Zhu et al., 2016)、Adeegbe らによって抗 PD-1 抗体と BET 阻害薬の相乗的な抗腫瘍効果が報告されており (Adeegbe et al., 2018)、BET 阻害薬と PD-1/PD-L1 抗体の併用療法が新たな治療戦略となりえるかもしれない。WEE1 阻害薬 AZD1775 は第 I 相臨床試験として進行期固形癌に対する単剤療法及び既存の殺細胞性抗癌剤との併用療法が行われ、両試験とも忍容性に問題はなかった (Do et al., 2015; Leijen et al., 2016)。また、単剤療法では 25 症例中 2 例で部分奏効 (PR) が確認された (Do et al., 2015)。現在単剤

療法、併用療法ともに第 II 相臨床試験が進行中である。BET 阻害薬も WEE1 阻害薬も今後の臨床応用が期待されている薬剤であり、その 2 剤の相乗効果とその機序を示した本研究は今後の非小細胞肺癌の治療開発の一助となる可能性がある。

総括及び結論

本研究では新知見として

- BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用療法は非小細胞肺癌細胞においてアポトーシスを誘導し、相乗的に腫瘍増殖を抑制した。
- 併用療法は強い DSB を起こし、BET 阻害薬は WEE1 阻害薬が起こした DSB の修復を遅延させた。
- BET 阻害薬は NHEJ 機構関連遺伝子の発現を低下させ、NHEJ 機構による DSB 修復能を低下させた。
- BET 阻害薬は MYT1 の発現を低下させ、WEE1 阻害薬と共同して M 期への移行を増加させた。
- A549 細胞を用いた異種移植マウスモデルにおいてもこの併用療法は相乗的に腫瘍増殖を抑制した。

が得られ、相乗効果の機序として (i) BET 阻害薬がもたらす NHEJ 機構関連遺伝子の発現抑制による DSB 修復能の低下、(ii) BET 阻害薬がもたらす MYT1 の発現抑制による G2/M チェックポイント機構の脆弱化、の 2 つが示唆された (図 12)。今回の新知見の意義は BET 阻害薬と WEE1 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。

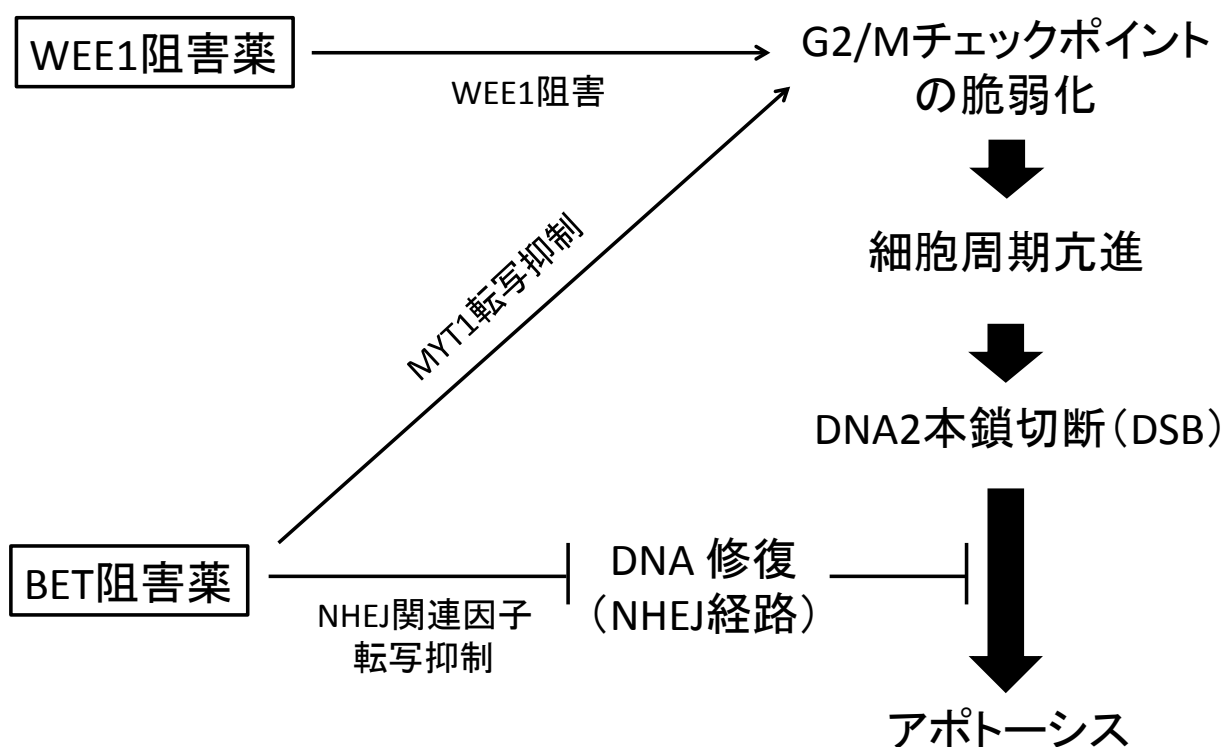


図 12. BET 阻害薬と WEE1 阻害薬の相乗効果の機序

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医学院呼吸器内科学教室元教授 西村正治先生に深謝致します。ならびに、適切な助言と直接の御指導を賜りました菊地英毅助教、菊地順子助教、品川尚文講師、榊原純講師、また北海道大学大学院医学研究院医学院腫瘍内科学教室 木下一郎准教授、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

- Adeegbe, D.O., Liu, S., Hattersley, M.M., Bowden, M., Zhou, C.W., Li, S., Vlahos, R., Grondine, M., Dolgalev, I., Ivanova, E.V., *et al.* (2018). BET Bromodomain Inhibition Cooperates with PD-1 Blockade to Facilitate Antitumor Response in Kras-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer immunology research* *6*, 1234-1245.
- Beck, H., Nahse, V., Larsen, M.S., Groth, P., Clancy, T., Lees, M., Jorgensen, M., Helleday, T., Syljuasen, R.G., and Sorensen, C.S. (2010). Regulators of cyclin-dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. *J Cell Biol* *188*, 629-638.
- 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.
- Bridges, K.A., Hirai, H., Buser, C.A., Brooks, C., Liu, H., Buchholz, T.A., Molkenline, J.M., Mason, K.A., and Meyn, R.E. (2011). MK-1775, a novel Wee1 kinase inhibitor, radiosensitizes p53-defective human tumor cells. *Clin Cancer Res* *17*, 5638-5648.
- Cheng, Z., Gong, Y., Ma, Y., Lu, K., Lu, X., Pierce, L.A., Thompson, R.C., Muller, S., Knapp, S., and Wang, J. (2013). Inhibition of BET bromodomain targets genetically diverse glioblastoma. *Clin Cancer Res* *19*, 1748-1759.
- Chou, T.C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* *70*, 440-446.
- Delmore, J.E., Issa, G.C., Lemieux, M.E., Rahl, P.B., Shi, J., Jacobs, H.M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R.M., Qi, J., *et al.* (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* *146*, 904-917.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8758-8763.
- Do, K., Wilsker, D., Ji, J., Zlott, J., Freshwater, T., Kinders, R.J., Collins,

J., Chen, A.P., Doroshow, J.H., and Kummar, S. (2015). Phase I Study of Single-Agent AZD1775 (MK-1775), a Wee1 Kinase Inhibitor, in Patients With Refractory Solid Tumors. *J Clin Oncol* *33*, 3409–3415.

Fatemi, M., Pao, M.M., Jeong, S., Gal-Yam, E.N., Egger, G., Weisenberger, D.J., and Jones, P.A. (2005). Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res* *33*, e176.

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T.T., Felletar, I., *et al.* (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* *468*, 1067–1073.

Gettinger, S., Horn, L., Jackman, D., Spigel, D., Antonia, S., Hellmann, M., Powderly, J., Heist, R., Sequist, L.V., Smith, D.C., *et al.* (2018). Five-Year Follow-Up of Nivolumab in Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From the CA209-003 Study. *J Clin Oncol* *36*, 1675–1684.

Greer, E.L., and Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature reviews Genetics* *13*, 343–357.

Guertin, A.D., Li, J., Liu, Y., Hurd, M.S., Schuller, A.G., Long, B., Hirsch, H.A., Feldman, I., Benita, Y., Toniatti, C., *et al.* (2013). Preclinical evaluation of the WEE1 inhibitor MK-1775 as single-agent anticancer therapy. *Mol Cancer Ther* *12*, 1442–1452.

Heijink, A.M., Krajewska, M., and van Vugt, M.A. (2013). The DNA damage response during mitosis. *Mutat Res* *750*, 45–55.

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

Hirai, H., Iwasawa, Y., Okada, M., Arai, T., Nishibata, T., Kobayashi, M., Kimura, T., Kaneko, N., Ohtani, J., Yamanaka, K., *et al.* (2009). Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Mol Cancer Ther* *8*, 2992–3000.

Juergens, R.A., Wrangle, J., Vendetti, F.P., Murphy, S.C., Zhao, M., Coleman, B., Sebree, R., Rodgers, K., Hooker, C.M., Franco, N., *et al.* (2011). Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* *1*, 598–607.

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.

Leijen, S., van Geel, R.M., Pavlick, A.C., Tibes, R., Rosen, L., Razak, A.R., Lam, R., Demuth, T., Rose, S., Lee, M.A., *et al.* (2016). Phase I Study Evaluating WEE1 Inhibitor AZD1775 As Monotherapy and in Combination With Gemcitabine, Cisplatin, or Carboplatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* *34*, 4371–4380.

Lenhart, R., Kirov, S., Desilva, H., Cao, J., Lei, M., Johnston, K., Peterson, R., Schweizer, L., Purandare, A., Ross-Macdonald, P., *et al.* (2015). Sensitivity of Small Cell Lung Cancer to BET Inhibition Is Mediated by Regulation of ASCL1 Gene Expression. *Mol Cancer Ther* *14*, 2167–2174.

Lewin, J., Soria, J.C., Stathis, A., Delord, J.P., Peters, S., Awada, A., Aftimos, P.G., Bekradda, M., Rezai, K., Zeng, Z., *et al.* (2018). Phase Ib Trial With Birabresib, a Small-Molecule Inhibitor of Bromodomain and Extraterminal Proteins, in Patients With Selected Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol*, Jco2018782292.

Li, X., Baek, G., Ramanand, S.G., Sharp, A., Gao, Y., Yuan, W., Welti, J., Rodrigues, D.N., Dolling, D., Figueiredo, I., *et al.* (2018). BRD4 Promotes DNA Repair and Mediates the Formation of TMPRSS2-ERG Gene Rearrangements in Prostate Cancer. *Cell reports* *22*, 796–808.

Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *65*, 127–133.

Lockwood, W.W., Zejnullahu, K., Bradner, J.E., and Varmus, H. (2012). Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 19408–19413.

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.

Matheson, C.J., Backos, D.S., and Reigan, P. (2016). Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci* *37*, 872–881.

Mertz, J.A., Conery, A.R., Bryant, B.M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D.A., Bergeron, L., and Sims, R.J., 3rd (2011). Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 16669–16674.

Muralidharan, S.V., Einarsdottir, B.O., Bhadury, J., Lindberg, M.F., Wu, J., Campeau, E., Bagge, R.O., Stierner, U., Ny, L., Nilsson, L.M., *et al.* (2017). BET bromodomain inhibitors synergize with ATR inhibitors in melanoma in melanoma. *Cell Death Dis* *8*, e2982.

Murrow, L.M., Garimella, S.V., Jones, T.L., Caplen, N.J., and Lipkowitz, S. (2010). Identification of WEE1 as a potential molecular target in cancer cells by RNAi screening of the human tyrosine kinome. *Breast Cancer Res Treat* *122*, 347-357.

O'Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M., and Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J* *16*, 545-554.

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.

Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* *304*, 1497-1500.

Planchard, D., Smit, E.F., Groen, H.J.M., Mazieres, J., Besse, B., Helland, A., Giannone, V., D'Amelio, A.M., Jr., Zhang, P., Mookerjee, B., *et al.* (2017). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* *18*, 1307-1316.

Rajeshkumar, N.V., De Oliveira, E., Ottenhof, N., Watters, J., Brooks, D., Demuth, T., Shumway, S.D., Mizuarai, S., Hirai, H., Maitra, A., *et al.* (2011). MK-1775, a potent Wee1 inhibitor, synergizes with gemcitabine to achieve tumor regressions, selectively in p53-deficient pancreatic cancer xenografts. *Clin Cancer Res* *17*, 2799-2806.

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.

Ropero, S., and Esteller, M. (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* *1*, 19-25.

Schiller, J.H., Harrington, D., Belani, C.P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., and Johnson, D.H. (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.

Shi, J., and Vakoc, C. R. (2014). The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition. *Mol Cell* *54*, 728-736.

Shimamura, T., Chen, Z., Soucheray, M., Carretero, J., Kikuchi, E., Tchaicha, J. H., Gao, Y., Cheng, K. A., Cohoon, T. J., Qi, J., *et al.* (2013). Efficacy of BET bromodomain inhibition in Kras-mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* *19*, 6183-6192.

Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* *68*, 7-30.

Stanlie, A., Yousif, A. S., Akiyama, H., Honjo, T., and Begum, N. A. (2014). Chromatin reader Brd4 functions in Ig class switching as a repair complex adaptor of nonhomologous end-joining. *Mol Cell* *55*, 97-110.

Sun, C., Yin, J., Fang, Y., Chen, J., Jeong, K. J., Chen, X., Vellano, C. P., Ju, Z., Zhao, W., Zhang, D., *et al.* (2018). BRD4 Inhibition Is Synthetic Lethal with PARP Inhibitors through the Induction of Homologous Recombination Deficiency. *Cancer Cell* *33*, 401-416. e408.

Turner, B. M. (1998). Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell Mol Life Sci* *54*, 21-31.

Ushijima, T. (2005). Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* *5*, 223-231.

van Gent, D. C., and Kanaar, R. (2016). Exploiting DNA repair defects for novel cancer therapies. *Mol Biol Cell* *27*, 2145-2148.

Van Linden, A. A., Baturin, D., Ford, J. B., Fosmire, S. P., Gardner, L., Korch, C., Reigan, P., and Porter, C. C. (2013). Inhibition of Wee1 sensitizes cancer cells to antimetabolite chemotherapeutics in vitro and in vivo, independent of p53 functionality. *Mol Cancer Ther* *12*, 2675-2684.

Wang, L., Xie, L., Ramachandran, S., Lee, Y., Yan, Z., Zhou, L., Krajewski, K., Liu, F., Zhu, C., Chen, D. J., *et al.* (2015). Non-canonical Bromodomain within DNA-PKcs Promotes DNA Damage Response and Radioresistance through Recognizing an IR-Induced Acetyl-Lysine on H2AX. *Chem Biol* *22*, 849-861.

Wolffe, A. P., and Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* *84*, 817-819.

Wu, X., Liu, D., Tao, D., Xiang, W., Xiao, X., Wang, M., Wang, L., Luo, G., Li, Y., Zeng, F., *et al.* (2016). BRD4 Regulates EZH2 Transcription through Upregulation of C-MYC and Represents a Novel Therapeutic Target in Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther* *15*, 1029–1042.

Wyce, A., Degenhardt, Y., Bai, Y., Le, B., Korenchuk, S., Crouthame, M.C., McHugh, C.F., Vessella, R., Creasy, C.L., Tummino, P.J., *et al.* (2013). Inhibition of BET bromodomain proteins as a therapeutic approach in prostate cancer. *Oncotarget* *4*, 2419–2429.

Yang, L., Zhang, Y., Shan, W., Hu, Z., Yuan, J., Pi, J., Wang, Y., Fan, L., Tang, Z., Li, C., *et al.* (2017). Repression of BET activity sensitizes homologous recombination-proficient cancers to PARP inhibition. *Sci Transl Med* *9*.

Yang, Z., Yik, J.H., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K., and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* *19*, 535–545.

Zhu, H., Bengsch, F., Svoronos, N., Rutkowski, M.R., Bitler, B.G., Allegrezza, M.J., Yokoyama, Y., Kossenkov, A.V., Bradner, J.E., Conejo-Garcia, J.R., *et al.* (2016). BET Bromodomain Inhibition Promotes Anti-tumor Immunity by Suppressing PD-L1 Expression. *Cell reports* *16*, 2829–2837.

Zhu, X., Enomoto, K., Zhao, L., Zhu, Y.J., Willingham, M.C., Meltzer, P., Qi, J., and Cheng, S.Y. (2017). Bromodomain and Extraterminal Protein Inhibitor JQ1 Suppresses Thyroid Tumor Growth in a Mouse Model. *Clin Cancer Res* *23*, 430–440.