HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	高島, 雄太
Description	配架番号：2464
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13450号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74762
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuta_Takashima_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　　氏名　高　島　雄　太

学 位 論 文 題 名

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)

【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 γH2AX 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 γH2AX 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 γH2AX 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 γH2AX 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。