



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	辻, 康介
Description	配架番号 : 2808
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15648号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/90960">https://hdl.handle.net/2115/90960</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	TSUJI_Kosuke_abstract.pdf, 論文内容の要旨



## 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 辻 康介

### 学 位 論 文 題 名

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)

**【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 $\beta$ チュー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  $\gamma$ H2AX 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  $\beta$  チューブリン抗体と 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。