



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)	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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15648
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90973
Type	doctoral thesis
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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
実験方法	12 頁
実験結果	18 頁
考察	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

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。

1. 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。

1. 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
2. 辻 康介、菊地 英毅、高島 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

要旨

【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、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は非同源末端結合 (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 γ 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 β 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^{comet} 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 IC₅₀ 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

緒言

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 (mesenchymal-epithelial 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、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 ヶ月、全生存期間中央値は 10.3 ヶ月と報告される (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 ヶ月、全生存期間中央値 12.3 ヶ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 ヶ月、全生存期間中央値は 19.2 ヶ月と報告された (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 사용되는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ヶ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 $C_{47}H_{51}NO_{14}$

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 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 (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 (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 (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。Bcl-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 は多くの因子に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 NHEJ 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 (H4K20me_{2/3}) 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%CO₂ 下の 37°C 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)、NHEJ 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 ヶ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。一晚培養後、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 μ L 添加し、その 4 時間後に Solubilization Solution/Stop Mix (プロメガ社) 75 μ L を添加し、Varioskan Flash (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、米国マサチューセッツ州ウォルサム) を用いて吸光度を測定した。また、各薬剤の 50% 阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration: IC₅₀) を GraphPad Prism 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 (サーモフィッシュャー・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はNuPAGE MES SDS Running Buffer (サーモフィッシュャー・サイエンティフィック社) を使用した。泳動後、NuPAGE Transfer Buffer (サーモフィッシュャー・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。転写後にボンソ S で染色しタンパクのローディングが均一であることを確認した。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を行った。再度 TBST で 5 分×3 回洗浄した後、一次抗体を添加した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 γ 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^{comet} 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ス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 (9×10^5 個)、H1299 (7×10^5 個)、H1975 (9×10^5 個)、H520 (18×10^5 個)、A549-PR (9×10^5 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°C 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: pH3) 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 FACSVerser 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 (7×10^5 個)、H1299 (5×10^5 個)、H1975 (7×10^5 個)、H520 (14×10^5 個)、A549-PR (7×10^5 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 FACSVerser 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 μ 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 μ g、CutSmart Buffer (ニュー・イングランド・バイオラボ社) 5 μ g、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 および 293T を 6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり細胞 1.5×10^5 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 μ g を Lipofectamine2000 (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) 7 μ 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 (6×10^5 個)、293T-EJ5 (15×10^5 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 μ g を Lipofectamine2000 (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) 15 μ g 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 μ mol/L または JQ1 0.2 μ mol/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 μ L で再懸濁した。測定は BD FACSVerser 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 (5×10^4 個)、H1299 (4×10^4 個)、H1975 (5×10^4 個)、H520 (10×10^4 個)、A549-PR (5×10^4 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%CO₂ 下の 37°C 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 (5×10^4 個) をチャンバースライド II (IWAKI、東京都) で一晚培養し、翌日にパクリタキセル、A-196 を添加した。24 時間後に 4°C の PBS で 2 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド 500 μ L を用いて 4°C で 20 分間固定した。その後、4°C の PBS で 3 回洗浄し、0.5% Triton X-100 (シグマ・アルドリッチ社) 500 μ L を 4°C で 10 分間反応させた。再び 4°C の PBS で 2 回洗浄し、Blocking One Histo (ナカライテスク社、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 チューブリン抗体 (1:100、#2128、セル・シグナリング・テクノロジー社) を 4°C で一晚反応させた。翌日、4°C の PBS で 3 回洗浄し、蛍光二次抗体である Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (1:500、A-11008、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) を室温で 90 分間反応させた。その後、4°C の PBS で 2 回洗浄し、4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む ProLong™ Glass Mountant with NucBlue™ (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) で核の染色と包埋を行った。カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡 BZ-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 $\times$ 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 $\times$ 30 秒間遠心した。RNA Wash Buffer 400 μ L をカラムに加え、室温で 15000g $\times$ 30 秒間遠心した。DNase I 5 μ L、DN Digestion Buffer 75 μ L をカラムに加え、室温で 15 分間静置した。Direct-zol RNA PreWash 400 μ L をカラムに加え、室温で 15000g $\times$ 30 秒間遠心し、この作業を 2 回繰り返した。RNA Wash Buffer 700 μ L をカラムに加え、室温で 15000g $\times$ 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 μ L をカラムに加え、室温で 15000g $\times$ 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 μ g になるように RT Enzyme Mix 1 μ L、RT Buffer Mix 11 μ L 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°C 60 分、95°C 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 μ L、マスターミックス 10 μ L、RNase フリー水 9.8 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、米国カリフォルニア州フォスターシティ) を用いて 50°C 2 分、続いて 95°C 10 分、最後に 95°C 15 秒、60°C 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 Δ Ct 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 $\Delta\Delta$ Ct 法で施行した。

統計解析

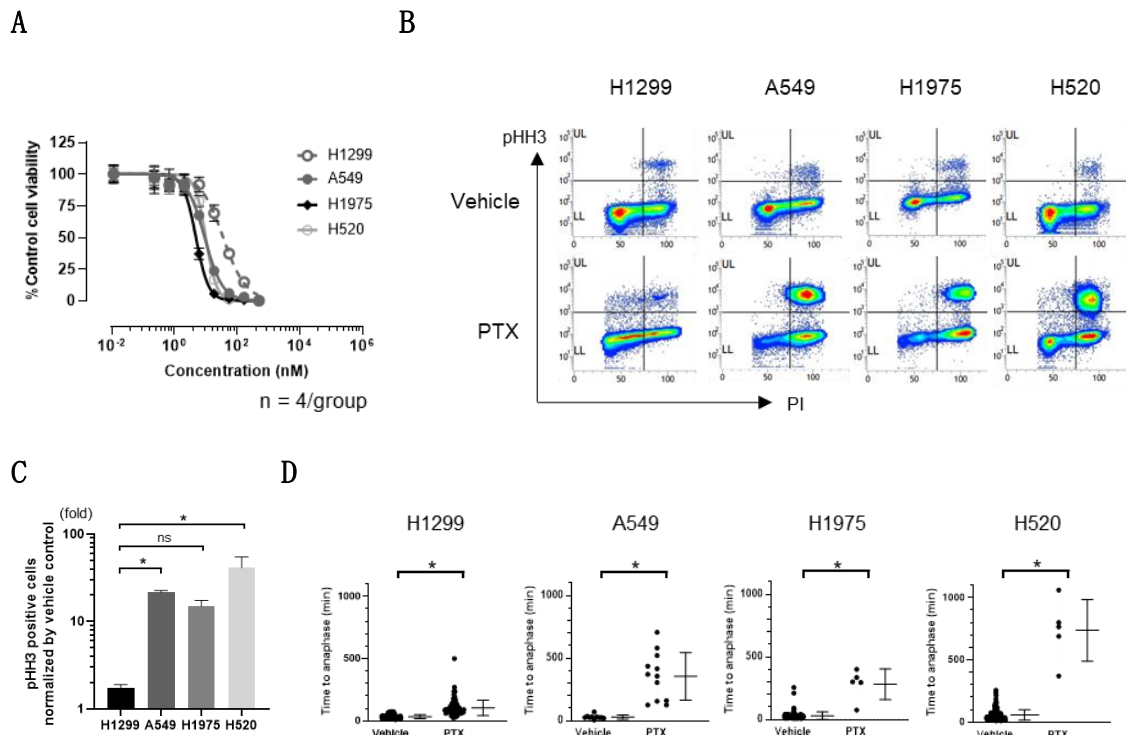
全ての検討は独立した状態で 3 回以上行った。連続変数の 2 群間の比較にはウェルチの *t* 検定、4 群間の比較にはダネットの多重比較検定をそれぞれ用いた。カテゴリ変数の 2 群間の比較にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。統計学的有意差は *p* 値が 0.05 未満の時と定義した。ソフトウェアは GraphPad Prism v8.4.3 (グラフパッド・ソフトウェア社) を使用した。

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。



E

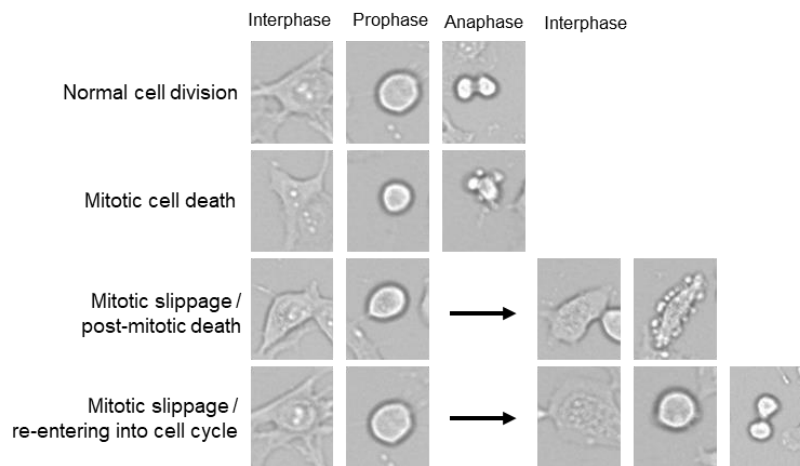


図 1. 非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルの効果

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.

表 1. 非小細胞肺癌細胞に対するパクリタキセルの IC₅₀

Cell line	PTX (nmol/L)
H1299	37.4 ± 2.9
A549	8.1 ± 0.8
H1975	3.6 ± 1.0
H520	8.9 ± 0.9

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 ± 16.2	105.0 ± 62.1
A549	29.1 ± 15.6	354.1 ± 181.9
H1975	28.5 ± 31.4	281.0 ± 109.6
H520	56.3 ± 41.9	737.0 ± 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
H1299	Vehicle	2/140	0.01
	PTX	10/124	
A549	Vehicle	0/113	> 0.99
	PTX	0/158	
H1975	Vehicle	2/179	0.68
	PTX	3/176	
H520	Vehicle	1/252	> 0.99
	PTX	1/265	

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。

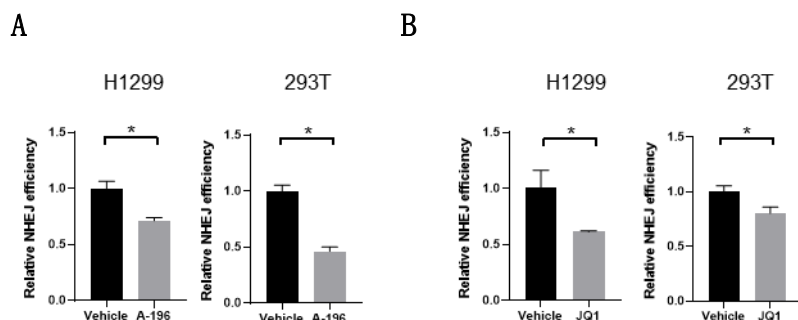
PTX, paclitaxel.

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

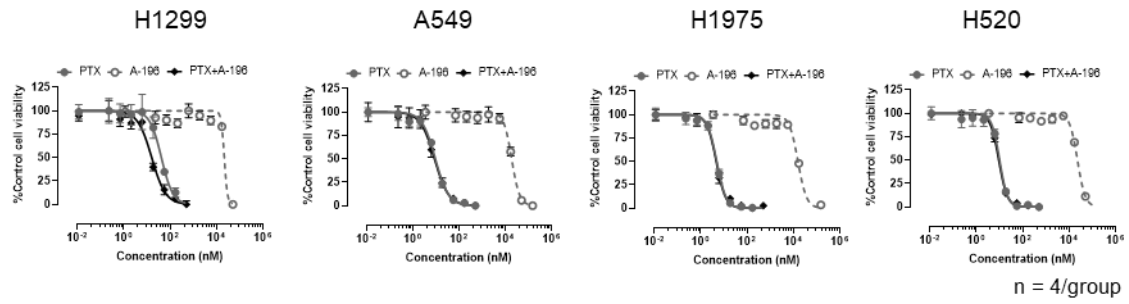
最初に、NHEJ 阻害薬が NHEJ 修復活性に与える影響について検討した。非小細胞肺癌細胞である H1299 と非腫瘍細胞である 293T に NHEJ レポータープラスミドである pimEJ5GFP を遺伝子導入して安定遺伝子発現細胞株 (H1299-EJ5 および 293T-EJ5) を作成し、それらを用いて NHEJ 修復レポーター試験を行った。NHEJ 阻害薬である A-196 あるいは JQ1 の投与により GFP 陽性細胞比率はコントロール群と比較して有意に低下し、NHEJ 修復活性が低下したと考えられた (図 2A、2B)。

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_{50} 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 JQ1 の併用効果を認め、 IC_{50} が有意に低下した。

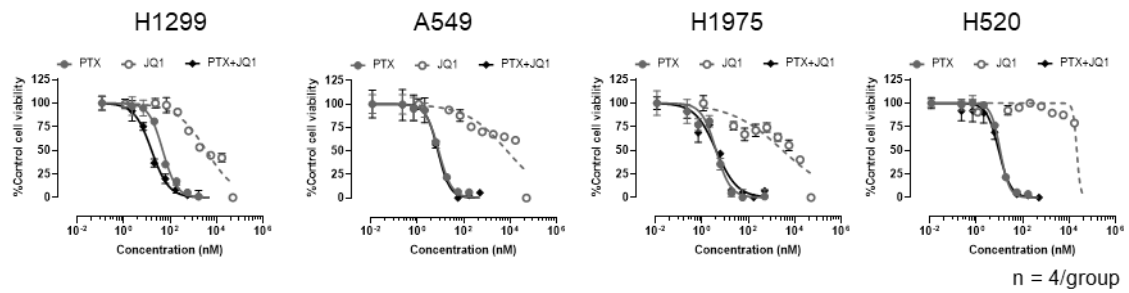
さらに、H1299 に対するパクリタキセルと A-196 あるいは JQ1 の併用がアポトーシスおよび DSB に与える影響について検討した。アネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法を行いアポトーシスの誘導を測定した (図 2E、2F)。A-196 あるいは JQ1 単独ではアポトーシスをほとんど誘導せず、パクリタキセル単剤でややアポトーシスを誘導したが、パクリタキセルと A-196 あるいは JQ1 の併用では有意にアポトーシス細胞が増加した。抗 cleaved PARP 抗体および抗 γ H2AX 抗体を用いたウエスタンブロット法を用いてアポトーシスおよび DSB 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。



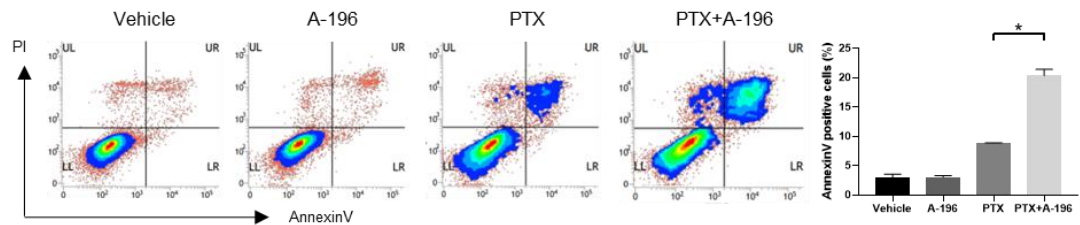
C



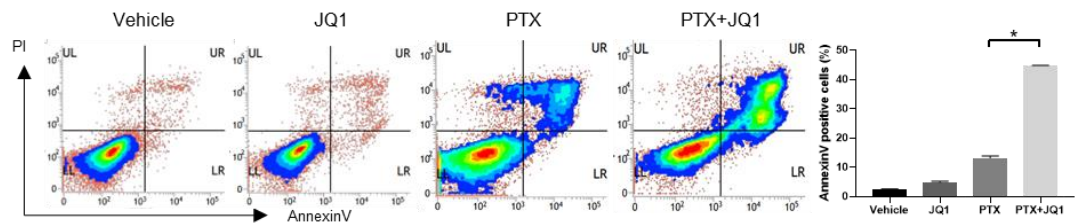
D



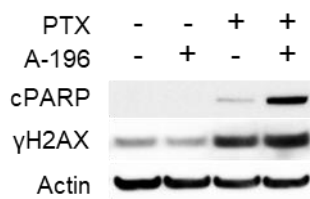
E



F



G



H

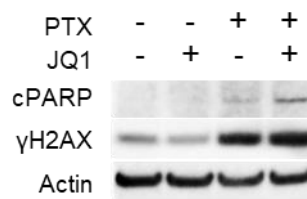


図 2. H1299 に対するパクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用効果

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 $\mu\text{mol/L}$ (A) あるいは JQ1 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ (C) あるいは JQ1 2 $\mu\text{mol/L}$ (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 $\mu\text{mol/L}$ (E) あるいは JQ1 2 $\mu\text{mol/L}$ (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 $\mu\text{mol/L}$ (G) あるいは JQ1 2 $\mu\text{mol/L}$ (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 γH2AX 抗体を用いたウェ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.

表 4. 非小細胞肺癌細胞に対する A-196 および JQ1 の IC_{50}

Cell line	A-196 ($\mu\text{mol/L}$)	JQ1 ($\mu\text{mol/L}$)
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

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。

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 $\mu\text{mol/L}$ の IC_{50}

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

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 $\mu\text{mol/L}$ の IC_{50}

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。

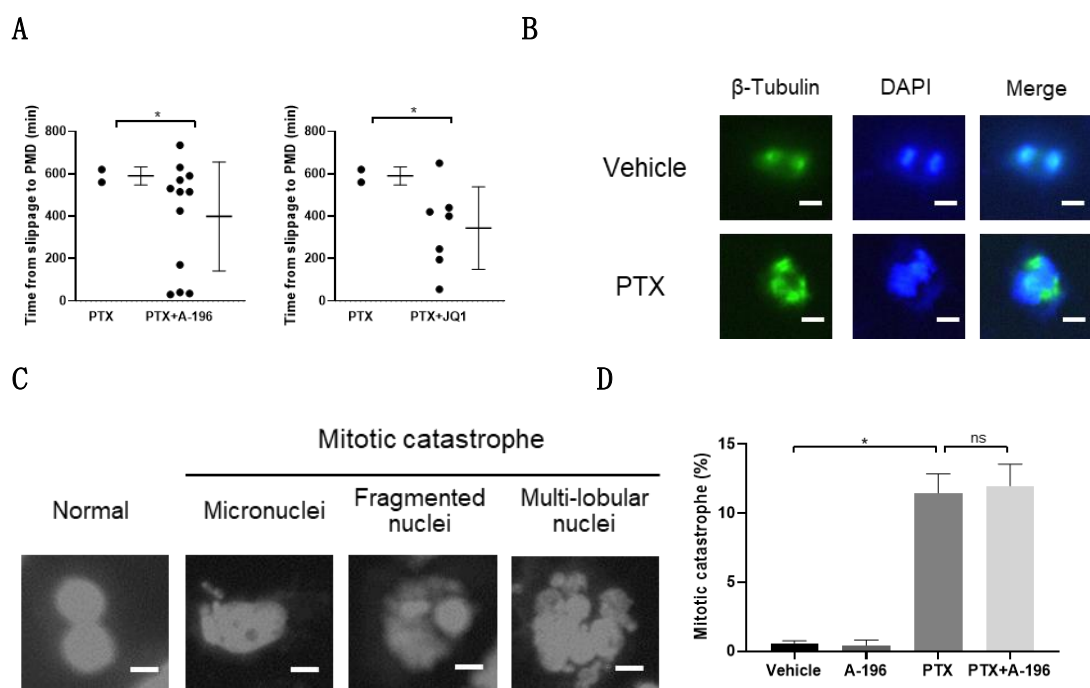


図 3. H1299 に対するパクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用による細胞死の評価

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 μ m 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 $p \geq 0.05$ 。

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

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

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

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.

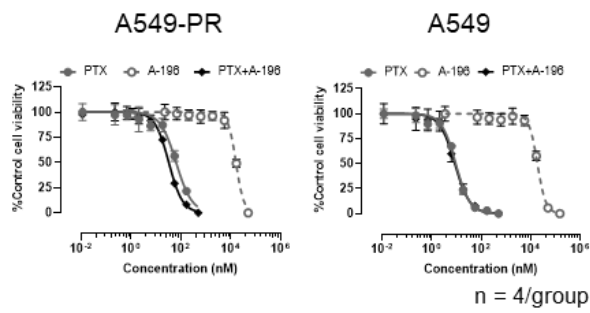
4) 新たに作成したパクリタキセル耐性細胞に対するパクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用効果に関する検討

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)。

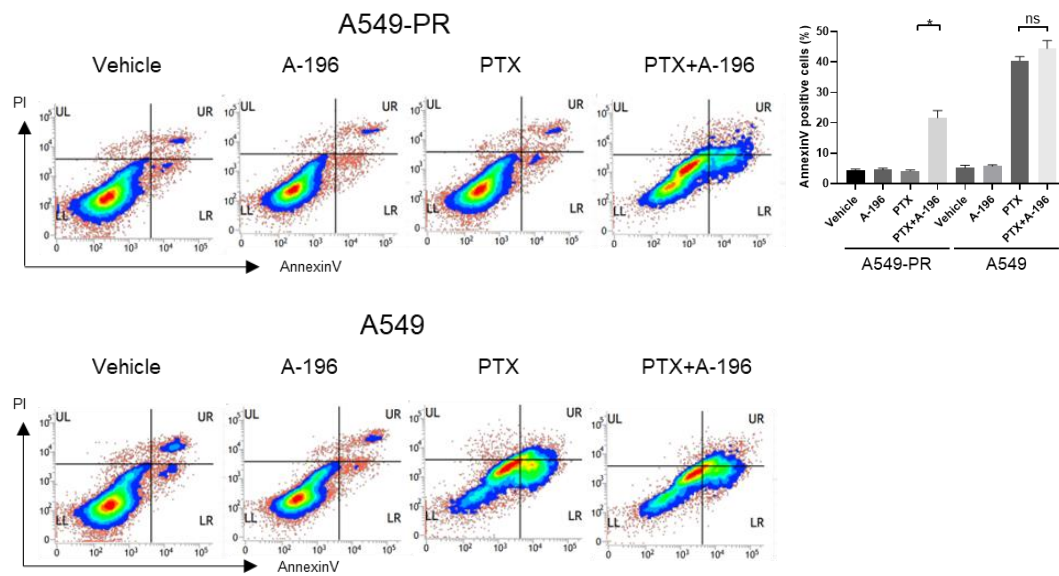
最初に、mitotic slippage をした細胞をタイムラプス顕微鏡を用いて測定し、A549-PR ではパクリタキセル処理後に mitotic slippage が有意に増加することを確認した (表 9)。次に、MTT 法にて各細胞株に対するパクリタキセルの IC_{50} を算出したところ、A549-PR において A-196 併用によりパクリタキセルの IC_{50} が有意に低下した (図 4A、表 10)。さらに、アネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリ法では A549-PR においてパクリタキセル単剤と比較して、パクリタキセルと A-196 の併用により有意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^{comet}、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。

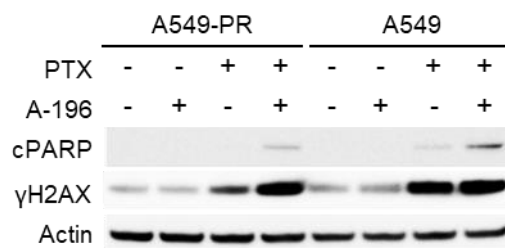
A



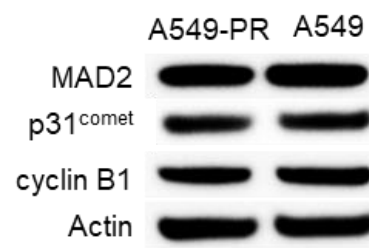
B



C



D



E

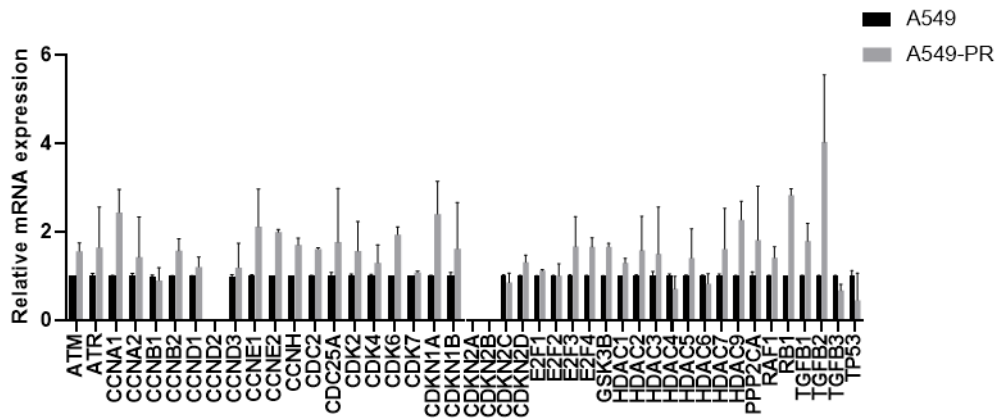


図 4. A549-PR に対するパクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用効果

A: A549-PR および A549 に対するパクリタキセルと A-196 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 γH2AX 抗体を用いたウェ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^{comet} 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群間の比較にはウェルチの 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 ± 7.0
A549	8.1 ± 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 μmol/L の IC₅₀

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

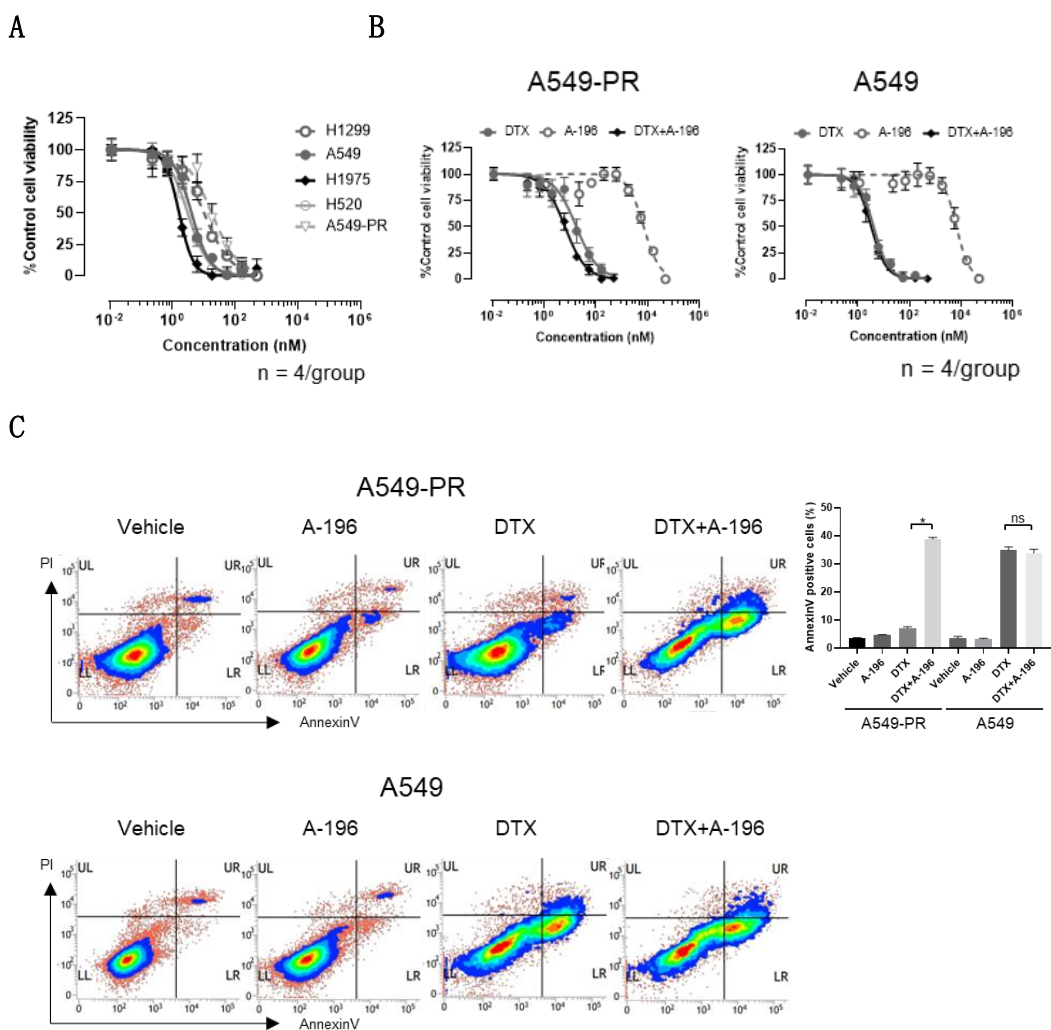
実験は独立して 3 回行い、2 群間の比較にはウェルチの *t* 検定を用いた。数値は平均値と標準偏差値を示す。

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

IC₅₀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。



D

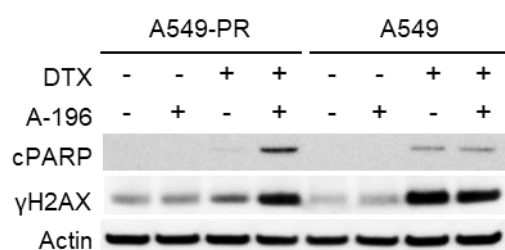


図5. パクリタキセル耐性細胞に対するドセタキセルと NHEJ 阻害薬の併用効果

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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 γH2AX 抗体を用いたウェ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 $p \geq 0.05$ 。

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

表 11. 非小細胞肺癌細胞に対するドセタキセルの IC_{50}

Cell line	PTX (nmol/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

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 μ mol/L の IC_{50}

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^{comet} に対する低分子干渉 RNA と、抗アポトーシス Bcl-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 から 10 時間以内程度に PMD が多くみられた。このことは 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^{comet}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^{comet}、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。

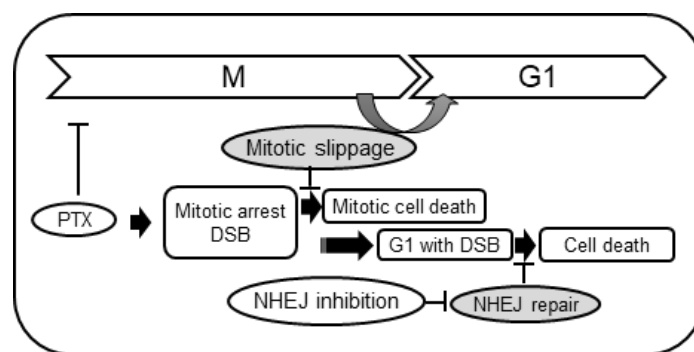


図 6. Mitotic slippage によるパクリタキセル耐性と、パクリタキセルと NHEJ 阻害薬の併用の作用機序を示した概略図

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 platinum (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 HHH, 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, Prabhaskar 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, Sarmiento 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-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 393, 1819–1830.
- 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, Czoszi 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, Lilienbaum 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 spindle-assembly 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.