



Title	JARID1阻害薬が、非小細胞肺癌の薬剤耐性に及ぼす効果の検討
Author(s)	有賀, 伸
Description	配架番号 : 2571
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14168号
Issue Date	2020-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14168
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95749
Type	doctoral thesis
File Information	Shin_Ariga.pdf



学位論文

JARID1 阻害薬が、非小細胞肺癌の薬剤耐性に及ぼす

効果の検討

(The effect of JARID1 family inhibitor on drug resistance
against non-small lung cancer)

2020 年 6 月

北海道大学

有賀 伸

学位論文

JARID1 阻害薬が、非小細胞肺癌の薬剤耐性に及ぼす

効果の検討

(The effect of JARID1 family inhibitor on drug resistance
against non-small lung cancer)

2020 年 6 月

北海道大学

有賀 伸

【目次】

発表論文目録および学会発表目録	1
要旨	3
略語表	6
緒言	7
第1章 JARID1 ファミリー阻害薬が細胞株に及ぼす効果	9
緒言	9
材料・方法	11
結果	14
考察	26
第2章 JARID1 ファミリー阻害薬が EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性細胞の増殖に及ぼす効果	27
緒言	27
材料・方法	28
結果	31
考察	39
全体の結論	42
謝辞	43
利益相反	44
引用文献	45

【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。

“JARID1 family inhibitor recovers sensitivity of drug-resistant non-small cell lung cancer cells and prevents their expansion”

Shin Ariga, Ichiro Kinoshita, Junko Kikuchi, Yasuchi Shimizu, Hirotohi Dosaka-Akita
Cancer Research

本研究の一部は以下の学会で発表した

「JARID1 ファミリー阻害薬の非小細胞肺癌細胞株に対する効果」

有賀 伸、木下 一郎、菊地 順子、清水 康、秋田 弘俊

第 58 回日本肺癌学会学術集会

2017 年 10 月 14 日、15 日 パシフィコ横浜 神奈川

“JARID1 family inhibitor recovers sensitivity of drug-tolerant subpopulation in lung cancer cell lines”

Shin Ariga, Kinoshita Ichiro, Junko Kikuchi, Shimizu Yasushi, Hirotohi Dosaka-Akita
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018

2018 年 4 月 14 日～18 日 McCormick Place シカゴ

“JARID1 family inhibitor reduces generation of drug resistant EGFR mutation-positive lung cancer cell lines”

有賀 伸、木下 一郎、菊地 順子、清水 康、秋田 弘俊

第 77 回日本癌学会学術集会

2018 年 9 月 27 日～29 日 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪 大阪

“JARID1 family inhibitor reduces generation of drug-resistant EGFR mutation-positive lung cancer cells”

Shin Ariga, Kinoshita Ichiro, Junko Kikuchi, Shimizu Yasushi, Hirotohi Dosaka-Akita
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019

2019 年 3 月 30 日～4 月 3 日 Georgia World Congress Center アトランタ

「ヒストン脱メチル化酵素 JARID1 阻害薬による非小細胞肺癌細胞の EGFR-TKI 耐性化の抑制」

有賀 伸、木下 一郎、菊地 順子、清水 康、秋田 弘俊
第 60 回 日本肺癌学会学術集会
2019 年 12 月 6 日～8 日 大阪国際会議場 大阪

【要旨】

背景と目的

肺癌は日本において最も死亡数が多い癌であり常に新しい治療薬が望まれている。エピジェネティックな異常はがん細胞の遺伝子発現に変化をもたらし、抗がん薬に対する獲得耐性につながる可能性がある。また、抗がん薬に自然耐性であるがん細胞の存在も示唆されるが、そのようながん細胞にはがん幹細胞様細胞が含まれていると考えられる。エピジェネティクスは正常幹細胞の維持に重要な役割を担っているが、肺癌幹細胞様細胞においても同様かもしれない。

今回私はヒストン 3 の 4 番目のリジン(H3K4)のメチル化に注目した。H3K4 のトリメチル化(H3K4me3)は転写開始領域の周囲に存在している、遺伝子発現の活性化マーカーである。JARID1 ファミリーは、この H3K4me3 の脱メチル化酵素であり、特に JARID1a、JARID1b は肺癌を含む様々な癌腫との関連性が報告されている。しかし、JARID1 ファミリーの阻害薬の開発が難渋していたこともあり、JARID1 ファミリー阻害薬の肺癌細胞に対する効果の報告はほとんどなかった。

また近年、標的治療を行った場合その薬剤に感受性の高い癌細胞が、複雑な分泌シグナル(セクレトーム)を産生し、それが薬剤耐性細胞の細胞増殖を促進するという報告がなされた。さらに、そのセクレトームの分泌は FRA1 という転写因子の発現の低下によって引き起こされることも報告された。FRA1 の活性化はエピジェネティックに制御されているという報告があり、JARID1 ファミリーもその制御に関与しているかもしれない。

今回私は、最近開発された JARID1 ファミリー阻害薬が肺癌細胞株に与える影響について検討した。

材料と方法

細胞株は9つの肺癌細胞株と3つの正常肺上皮細胞株を用いた。薬剤はシスプラチン、パクリタキセル、ゲフィチニブ、オシメルチニブを使用した。また汎 JARID1 ファミリー阻害薬として PBIT (2-(4-(4-methylphenyl)-1, 2-benzisothiazol-3 (2H)-one)を用いた。細胞増殖は MTT アッセイとコロニー形成アッセイで評価した。セクレトームの解析は ELISA で、蛋白発現はウェスタンブロット法で、ヒストンのメチル化の評価はクロマチン免疫沈降法を用いて評価した。

結果

PBIT が非小細胞肺癌細胞株において用量依存性、時間依存性に H3K4me3 レベルを上昇させることを確認した。次に PBIT が非小細胞肺癌細胞株や正常肺上皮細胞株の増殖を抑制するか検討したところ、肺癌細胞株の IC50 は比較的高く、正常肺上皮細胞株との差はわずかだった。

PBIT 単独で抗腫瘍薬として用いるのは難しいと考え、PBIT が薬剤耐性細胞に与える効果について検討した。高濃度の抗がん薬に短期間曝露し生き残った細胞(persister細胞)を薬剤耐性細胞として使用した。抗がん薬はそれぞれの細胞株に高い感受性

を持つものを用いた(PC9、PC3、HCC827 はゲフィチニブ、H1975 はオシメルチニブ、H226 はシスプラチン、H460、A549、H1299 パクリタキセル)。Persister 細胞は曝露した抗がん薬に耐性であることを確認した。Persister 細胞は JARID1a、JARID1b のどちらか、または両方の発現が上昇していた。また H1975 の side population 細胞でも、JARID1a と OCT-4 の発現が上昇していた。

次に、PBIT が persister 細胞に与える影響について検討した。コロニー形成アッセイで評価したところ、persister 細胞がコロニーを形成できたのは、PC9、HCC827、H1975、H226 の 4 つだった。それぞれ抗がん薬群、PBIT 群、抗がん薬と PBIT の併用群で 3 週間薬剤曝露を行ったところ、4 つの細胞株とも併用群で最もコロニー形成を抑制することができた。またこの 4 つの persister 細胞は H3K4me3 の発現の減少と OCT-4 の発現亢進を認めたが、PBIT を曝露することでその変化を打ち消された。

PBIT が肺癌細胞株に与える別の機序として、転写因子 FRA1 の制御について検討した。EGFR-TKI 感受性細胞株(PC9、H1975)に EGFR-TKI 各々(ゲフィチニブ、オシメルチニブ)を曝露したものと、PBIT で前処置した(preP-)EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露した細胞の FRA1 の発現を検討したところ、前者は FRA1 の発現が低下していたが、後者はその発現低下が打ち消されていた。また FRA1 のプロモーター領域における H3K4me3 のレベルをクロマチン免疫沈降法で検討したところ、前者は H3K4me3 レベルが低下していたが、後者はその低下が打ち消されていた。

PBIT がセクレトームに変化をもたらすか検討するため、EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露した後の馴化培養液(conditioned medium; CM)と、preP-EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露した後の CM を回収し、それぞれの培養液が EGFR-TKI 耐性の肺癌細胞株(EGFR 遺伝子野生型の肺癌細胞株または persister 細胞)の増殖を変化させるかを検討したところ、前者は細胞増殖を促進させたが、後者は細胞増殖を促進させなかった。

IGF-1R 経路の活性化が EGFR-TKI 耐性に関与しているという報告が複数あるため、IGF-1 の濃度を測定したところ、細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM 中では濃度が上昇していたが、preP-細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM 中ではその上昇が軽減されていた。

PBIT が EGFR-TKI 耐性細胞の増殖を抑えるか検討するため、96 穴ウェルプレートを用いて少数の細胞からなる EGFR-TKI 感受性細胞グループを作り、EGFR-TKI±PBIT を 4 週間曝露したところ、PBIT 併用で耐性細胞出現数の減少を認めた。また PBIT 併用時の IGF-1R 経路の変化を検討したところ、その下流の活性化が PBIT 併用によって抑えられた。また、3D コロニー形成アッセイで PBIT 単剤を 4 週間曝露し、PBIT 単剤では(非足場依存性の)細胞増殖抑制効果を有さないことを確認した。

考察

今回私は、JARID1 ファミリー阻害薬 PBIT が、薬剤耐性、特に EGFR-TKI 耐性の非

小細胞肺癌に対して 2 つの機序で効果を及ぼすことを明らかにした。1 つ目は PBIT が癌幹細胞マーカーである OCT-4 を高発現している persister 細胞の薬剤感受性を回復させること、そして 2 つ目は PBIT が薬剤感受性細胞において FRA1 のプロモーター領域の活性化マーカー H3K4me3 の脱メチル化を阻害し、FRA1 の発現の低下を抑えること、そして EGFR-TKI で誘導される IGF-1 を含むセクレトームを抑え、耐性細胞の増殖を抑制することである。

固形癌においては、がん幹細胞様細胞を標的とした治療の開発は非常に難航している。その理由の一つががん幹細胞様細胞の可塑性である。今回私は、PBIT が persister 細胞における OCT-4 の発現上昇を抑え、また PBIT を抗腫瘍薬と併用することで persister 細胞の増殖を抑制することを示した。PBIT は肺癌のがん幹細胞様細胞の可塑性を克服できるかもしれない。

標的治療の耐性機序は大きく 2 つに分類される。標的遺伝子の変化に代表されるオン-ターゲットによる耐性機序と、バイパスシグナル経路の活性化に代表されるオフ-ターゲットによる耐性機序である。特に後者の克服は複雑である。今回私が検討した IGF-1R 経路の活性化による耐性化の場合、IGF-1R 経路の阻害薬の併用によっても克服できる可能性がある。しかしバイパス経路にはさまざまなものが報告されており、単独経路の抑制では不十分である可能性が高い。理想は全ての活性化したバイパス経路を抑えることであるが、それを個別に行うことは困難である。今回私は JARID1 阻害薬により抗がん薬感受性細胞において FRA1 がエピジェネティックに調整され、抗がん薬によるセクレトーム分泌が抑制されることを初めて報告した。この FRA1 発現低下の抑制と、それによるセクレトーム分泌の抑制はオフ-ターゲットの耐性化を克服できる可能性を秘めていると考えられる。

結論

JARID1 ファミリー阻害薬 PBIT は、薬剤耐性 persister 細胞の薬剤感受性を回復させる。また FRA1 のプロモーター領域の活性化マーカー H3K4me3 の脱メチル化を阻害し、薬剤感受性細胞において FRA1 の発現の低下を抑え、EGFR-TKI で誘導される IGF-1 を含むセクレトームを抑制することで、薬剤耐性細胞の増殖を抑制する。

【略語表】

ALK:	Anaplastic lymphoma kinase
BRAF:	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CI:	Combination index
CM:	Conditioned medium
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DZNeP:	3-Deazaneplanocin A hydrochloride
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EZH2:	enhancer of zeste 2
FBS:	Fetal Bovine Serum
FRA1:	Fos related antigen 1
GAS6:	Growth arrest specific gene 6 product
HGF:	Hepatocyte growth factor
H3K4me3:	tri-methylation of histone H3 lysine 4
H3K9me3:	tri-methylation of histone H3 lysine 9
H3K27me3:	tri-methylation of histone H3 lysine 27
IGF-1:	Insulin like growth factor 1
IGF-1R:	Insulin like growth factor 1 receptor
JARD1:	Jumonji AT rich interactive domain 1
KDM:	Lysine (K) specific demethylase
MET:	Mesenchymal epithelial transition
MP 細胞:	Main population 細胞
MTT:	Dimethyl thiozoyl-2',5' -diphenyl-2-H-tetrazolium bromide
OCT-4:	Octamer-binding transcription factor 4
PCR:	Polymerase chain reaction
PBS:	Phosphate-buffered saline
ROS1:	Ros proto-oncogene 1
SP 細胞:	Side population 細胞
TBS:	Tris Buffered Saline
TKI:	Tyrosine kinase inhibitor

【緒言】

肺癌は、日本において最も死亡数が多い癌であり、常に新しい治療薬が望まれている。近年の非小細胞肺癌の薬物療法の進歩は目覚ましく、従来の殺細胞性抗癌薬に加え、EGFR (Maemondo et al., 2010)、ALK (Peters et al., 2017)、ROS1 (Shaw et al., 2014)、BRAF (Planchard et al., 2016) などのドライバー遺伝子の異常を標的とした薬剤や、免疫チェックポイント阻害薬の登場 (Reck et al., 2016) により治療選択肢も増加している。しかし薬物療法のみによる腫瘍細胞の根絶は依然として困難である。例えば EGFR 遺伝子変異に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) の新薬であるオシメルチニブでも、無増悪生存期間は従来の EGFR-TKI を大きく上回ったものの腫瘍を根絶することはできず、投与された患者の半数以上が 20 か月以内に腫瘍が進行する (Soria et al., 2018)。EGFR-TKI の耐性化の機序は複数報告されているが全てを網羅出来てはおらず、またそれらの耐性化の克服方法も十分確立されていない。特にオフターゲットの耐性化機序としてさまざまなバイパス経路の活性化 (Liu et al., 2018) が報告されており、その経路の阻害薬を併用することで耐性化を克服する方法が試みられているが、まだ臨床応用できるほどの十分な効果は挙げられていない。これらは肺癌の薬物療法の開発において非常に重要な研究テーマである。

DNA のメチル化や、ヒストンのアセチル化、メチル化に代表されるエピジェネティックな変化は腫瘍の発生や進展、浸潤などに関与することが知られており (Ellis et al., 2009)、エピジェネティクスに関わる分子は、近年がん治療における新しい標的として注目されてきている。特に血液腫瘍においては既に複数の薬剤が臨床応用されており、例えばヒストン脱アセチル化酵素阻害薬は、多発骨髄腫 (San-Miguel et al., 2014) や皮膚 T 細胞リンパ腫 (Olsen et al., 2007) において本邦でも保険承認されている。しかし固形癌においては、現時点では臨床応用されているエピジェネティクスに関する分子を標的とした薬剤はない。

ヒストンのメチル化を調整する分子は、新しい肺癌治療の標的候補と考えられている。以前我々は、遺伝子発現の抑制マーカーであるヒストン 3 の 27 番目のリジン (H3K27) のトリメチル化のメチル化酵素である Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) が非小細胞肺癌において過剰発現しており (Kikuchi et al., 2010)、これを阻害することで腫瘍の増殖を抑えることができることを報告している (Takashina et al., 2016)。

今回私はヒストン 3 の 4 番目のリジン (H3K4) のメチル化に注目した。H3K4 のトリメチル化 (H3K4me3) は転写開始領域の周囲に存在している、遺伝子発現の活性化マーカーである (Barski et al., 2007)。EZH2 の過剰発現は遺伝子発現を抑制する方向に働くと考えられるが、H3K4me3 の脱メチル化酵素も同様に遺伝子発現を抑制する方向に働くと考えられ、肺癌治療の標的分子の候補になると考えた。

Jumonji AT rich interactive domain 1 (JARID1) ファミリーは、この H3K4me3 の脱メチル化酵素であり、4 つのサブタイプ (JARID1a, JARID1b, JARID1c, JARID1d) が

報告されている(Allis et al., 2007)。特に JARID1a、JARID1b は肺癌を含む様々な癌腫との関連性が報告されている。JARID1a は、元々は retinoblastoma 蛋白のパートナ蛋白として同定された(Defeo-Jones et al., 1991)。ヒトの肺癌組織や薬剤耐性の肺癌細胞で過剰発現しており、マウスを用いた実験で JARID1a の発現を抑えた肺癌細胞は小さな腫瘍しか形成せず、転移も抑制されることが報告されている(Teng et al., 2013)。JARID1b は、HER2 抗体であるトラスツズマブ治療において著明に抑制される遺伝子の一つとして発見された(Lu et al., 1999)。JARID1b も肺癌組織で過剰発現しており、肺癌細胞株においても、siRNA で発現を抑えると癌細胞の増殖が抑制されることが報告されている(Hayami et al., 2010)。これらの報告から JARID1 ファミリーは新しい肺癌治療の標的となる可能性が示唆される。しかし、JARID1 ファミリーの阻害薬の開発が難渋していたこともあり、JARID1 ファミリー阻害薬の肺癌細胞に対する効果の報告はほとんどなかった。

今回私は、最近開発された JARID1 ファミリー阻害薬が肺癌細胞株に与える影響について検討した。第1章では、JARID1 ファミリー阻害薬の肺癌細胞株に対する増殖抑制効果について検討した。実験を進めていく中で、JARID1 ファミリー阻害薬単剤では肺癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果が不十分であると判断し、より効果的にこの薬剤を使用するため抗腫瘍薬耐性の肺癌細胞を作成し、それに対する効果を検討した。第2章では、JARID1 ファミリー阻害薬によりエピジェネティックに調整される転写因子を特定し、EGFR-TKI 耐性細胞の増殖に影響を与えることを突き止めた。それにより特定のバイパス経路の阻害薬を用いずにオフターゲットの耐性化を克服できる可能性が示唆された。この研究の成果により EGFR 遺伝子陽性肺癌の薬物治療の一助となることが期待される。

第 1 章

JARID1 ファミリー阻害薬が細胞株に及ぼす効果

【緒言】

近年、抗腫瘍薬の進歩は目覚ましいが、ほとんどの抗腫瘍薬は腫瘍の性質の変化などによってその効果を失ってしまう。非小細胞肺癌においては、EGFR 遺伝子の T790M 変異による第一世代、第二世代の EGFR-TKI の耐性化 (Yu et al., 2015) や、ALK 融合遺伝子の L1196M 変異や G1202R 変異などによる ALK 阻害剤の耐性化 (Gainor et al., 2016) など、特定の遺伝子変異が薬剤の結合部位等に変化を与え、薬剤耐性につながる事が報告されている。

エピジェネティックな異常は、正常細胞やがん細胞において自然発生で生じる遺伝子変化よりはるかに高い頻度で起こるといわれている (Easwaran et al., 2014; Vogelstein et al., 2013)。例えば、腫瘍あたりの遺伝子のプロモーター領域のメチル化の頻度は non-synonymous な遺伝子変異よりも多いという報告がある (Holohan et al., 2013)。これらのエピジェネティックな異常もがん細胞の遺伝子発現に変化をもたらし、抗腫瘍薬に対する獲得耐性につながる可能性があると考えられる。

また、抗腫瘍薬に自然耐性であるがん細胞の存在は抗がん薬治療の失敗につながると考えられるが、このような自然耐性のがん細胞にはがん幹細胞様細胞が含まれていると考えられる。がん幹細胞仮説はがんの不均一性を説明する際に用いられている仮説であり (Dick, 2008)、腫瘍細胞の根絶にはこのがん幹細胞を死滅させる必要があると考えられる。しかしがん幹細胞に特異的に発現する分子マーカーを標的とした抗腫瘍薬の開発は試みられてはいるが (Li et al., 2015)、現時点では固形腫瘍においては臨床応用できる薬剤は存在しない。開発が難航している理由の一つに、固形癌におけるがん幹細胞の可塑性の問題が挙げられる (Gupta et al., 2011)。がん幹細胞様細胞を同定し、それに特異的に効果を発揮する薬剤を用いても、分化した癌細胞が再度癌幹細胞様化してしまう可能性があり、直接がん幹細胞を標的とする薬の開発は困難である可能性がある。

しかしエピジェネティクスに関わる分子はがん幹細胞様細胞を対象とする治療の標的となりうるかもしれない。特に H3K4me3 は H3K27me3 とともに bivalent domain を形成し胚性幹細胞の維持に関与していることが知られているが (Bernstein et al., 2006)、がん幹細胞様細胞においても、その維持に重要な役割を担っている可能性があり、それらを調整する分子を標的とすることで、がん幹細胞様細胞の可塑性を制御できるかもしれない。例えば膠芽腫においては、H3K27me3 を調整するポリコム抑制複合体 2 によって幹細胞と分化細胞を移行しあい、それにより膠芽腫の抗腫瘍薬の感受性も変化することが報告されている (Liau et al., 2017)。また悪性黒色腫においては、JARID1b が高発現している細胞分裂が非常に遅い抗腫瘍薬耐性のサブポピュレーション

オンが存在しているが、JARID1b の発現には可逆性があることが報告されている (Roesch et al., 2010; Roesch et al., 2013)。

以上より、エピジェネティクスに関与する分子を標的とすることで癌細胞の薬剤耐性を克服できる可能性があり、JARID1 ファミリーがその候補となりうると考えた。まず、JARID1 ファミリー阻害薬の非小細胞肺癌細胞株や正常肺上皮細胞株に対する増殖抑制効果について検討した。次に薬剤自然耐性の細胞も含まれるような persister 細胞を作成し、それらの性質を確認した。最後にそれらに対する JARID1 ファミリー阻害薬の効果について検討した。

【材料・方法】

薬剤(第2章と共通)

PBIT、オシメルチニブ、パクリタキセルはフナコシから購入した。ゲフィチニブ、シスプラチンは富士フイルム和光純薬から購入した。

細胞株と培養(第2章と共通)

ヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H1299 (H1299)、NCI-H1975 (H1975)、HCC827、A549、H226、PC3 は American Type Culture Collection から購入した。LCD は JCRB 細胞バンク、PC9 は 免疫生物研究所から購入した。ヒト正常肺上皮細胞株 BEAS2B、NL20、16HBE は American Type Culture Collection から購入した。

PC3 以外の非小細胞肺癌細胞株は RPMI-1640 培地 (Thermo Fisher Scientific)、PC3 は MEM 培地 (Thermo Fisher Scientific) で培養した。BEAS2B は MEM 培地、NL20 は F-12K 培地 (Thermo Fisher Scientific)、16HBE は LHC-9 (Thermo Fisher Scientific) 培地で培養した。それぞれの培地に 10% (v/v) FBS と 0.03% (w/v) グルタミン、そして抗生剤 (NL20 は Antibiotic-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific)、それ以外は Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Thermo Fisher Scientific)) を添加し、37°C、5%CO₂、湿潤環境で培養した。

Persister 細胞の抽出、作製

PC9、PC3、HCC827 はゲフィチニブ 10 μ M、H1299、H460、LCD はパクリタキセル 1 μ M、H1975 はオシメルチニブ 5 μ M、H226 はシスプラチン 100 μ M を用いた。10cm ディッシュに細胞を撒き一晩インキュベートした後薬剤を添加した。3 日ごとにメディアウム交換を行い、9 日目にディッシュに接着していた細胞を persister 細胞として、即実験に用いた。

ウエスタンブロット(第2章と共通)

ディッシュに接着した細胞は冷却した PBS で 2 回 (persister 細胞は 4 回) 洗浄した後、RIPA バッファー (NaCl 150mM、トリトン X-100 1%、デオキシコール酸塩 1%、の SDS 0.1%、トリス (pH 7.4) 10mM)、ロイペプチン 100g/ml、アプロチニン 100g/ml 入れ、スクレーパーで剥離し、チューブに回収した。そして超音波で破碎したのち 12000rpm10 分で遠心し、上清を回収した。各々のサンプルのタンパク質濃度は、バイオ・ラッドプロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いて決定した。

各サンプルは 10%または 4-12%の SDS ゲルで展開し、ニトロセルロースメンブレン (Amersham Biosciences) に転写し、室温で 1h ブロッキング処理を行った。ブロッキングバッファは H3K4me3 抗体と OCT-4 抗体は BSA 5%含有のリン酸緩衝生理食塩水

(PBS)、それ以外の抗体は 5%スキムミルク含有のトリス緩衝生理食塩水 (TBS) を用いた。メンブレンはブロッキングバッファで希釈した抗体とともに 4°Cで一晩インキュベートした。メンブレンは計 2 回 (1 回 10 分) TBS または PBS で洗浄した後、1:250000 に希釈した抗ウサギ IgG 二次抗体で 1 時間インキュベートした。さらにメンブレンは計 6 回 (1 回 5 分~10 分) TBST または PBST で洗浄し、ECL prime western blotting detection reagent (GE ヘルスケア) で免疫複合体を検出した。

各抗体の購入先と抗体濃度は以下のとおり

Cell Signaling Technology

H3 D1H2 (#4499、1:2,000)、OCT-4 C30A3 (#2840、1:1,000)、ABCG2 (#4477、1:1,000)、pEGFR Y1068 (#3777、1:1,000)、pAKT S473 (#4060、1:1,000)、pERK 137F5 (#4695、1:1,000)、pMET T1234/1235 (#3129、1:1,000)、pS6 S240/S244 (#5364、1:1,000)、IRS1 D23G12 (#3407、1:1,000)

Abcam

H3K4me3 (ab8580、1:10,000)、JARID1a (ab70892、1:1,000)

Bethyl Laboratories

JARID1b (A301-813A、1:2000)

Santa Cruz Biotechnology

FRA1 (sc-605、1:500)

MTT アッセイ

各細胞株の半最大阻害濃度 (IC₅₀) 値を決定するために、96 ウェルプレートにウェルあたり 500~2000 の細胞を撒いた。翌日、培地に 2 倍希釈濃度の薬物を各ウェルに加えて、ウェルが 1 倍薬物濃度の培地 150ml を含むようにした。72 時間後、MTT (ジメチルチオゾリル-2',5'-ジフェニル-2-H-テトラゾリウムブロミド) アッセイ (CellTiter 96 non-radioactive cell proliferation assay, Promega) を使用して、マイクロプレートリーダーで吸光度を計測し細胞増殖を測定した。Graph-Pad Prism software を用い、「nonlinear regression analysis of log(inhibitor) versus normalized response with a variable slope」で IC₅₀ を推定した。

コンビネーションインデックス(CI)の解析

薬剤①を a 量と薬剤②を b 量同時に投与して、効果 E を測定した。また薬剤①、②単独で効果 E を得る A 量、B 量を求めた。CI は下記の式で計算される。

$$CI = a/A + b/B$$

CI の解析は Calcsyn ソフトウェア (Biosoft) を用いて行った。

2D コロニー形成アッセイ(persister 細胞)

Persister 細胞を 6 ウェルプレートにウェルあたり 5000～10000 播種し、0.1 μ M ゲフィチニブまたは 0.1 μ M オシメルチニブまたは 10 μ M CDDP を、5 μ M PBIT または DMSO とともに培養した。培地と薬物は週に 2 回交換した。3 週間後、形成されたコロニーを無水メチルアルコールで固定し、5%ギムザで染色した。

統計解析（第 2 章と共通）

グループ比較は、両側 Mann-Whitney U 検定で行い、 $P < 0.05$ を有意であるとした。棒グラフやドットプロットは平均値 $\pm$ SD で表記した。GraphPad Prism と EZR を使用してデータ解析を行った。

【結果】

汎 JARID 阻害薬 PBIT は H3K4me3 レベルを上昇させ、細胞増殖を抑制する

PBIT (2-(4-(4-methylphenyl)-1, 2-benzisothiazol-3 (2H)-one) は Sayegh らによって JARID1b 阻害薬として 15000 以上の化合物からスクリーニングされた (Sayegh et al., 2013)。PBIT は IC_{50} $3 \mu M$ で JARID1b を阻害するが、JARID1a も IC_{50} $6 \mu M$ で阻害することから、この化合物を汎 JARID1 ファミリー阻害薬として用いることにした。

まず、PBIT が非小細胞肺癌細胞株において H3K4me3 のレベルに影響を与えるか検討した。PBIT は用量依存性、時間依存性に H3K4me3 レベルを上昇させた (図1、図2)。

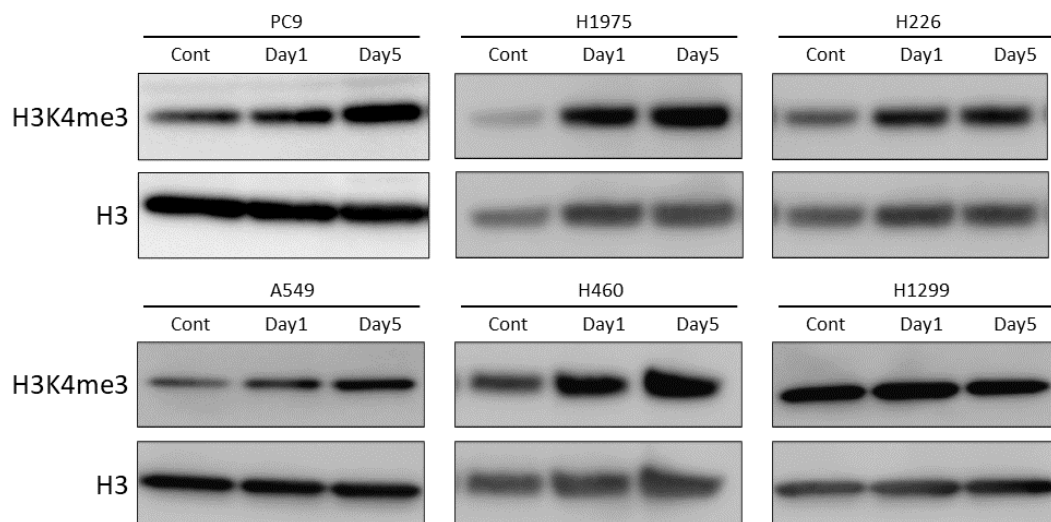


図1:PBIT の曝露時間ごとの H3K4me3 の蛋白レベル。PBIT 曝露後 1 日目、3 日目の各細胞株をウェスタンブロット法で評価した。PBIT の濃度は $1 \mu M$ 。

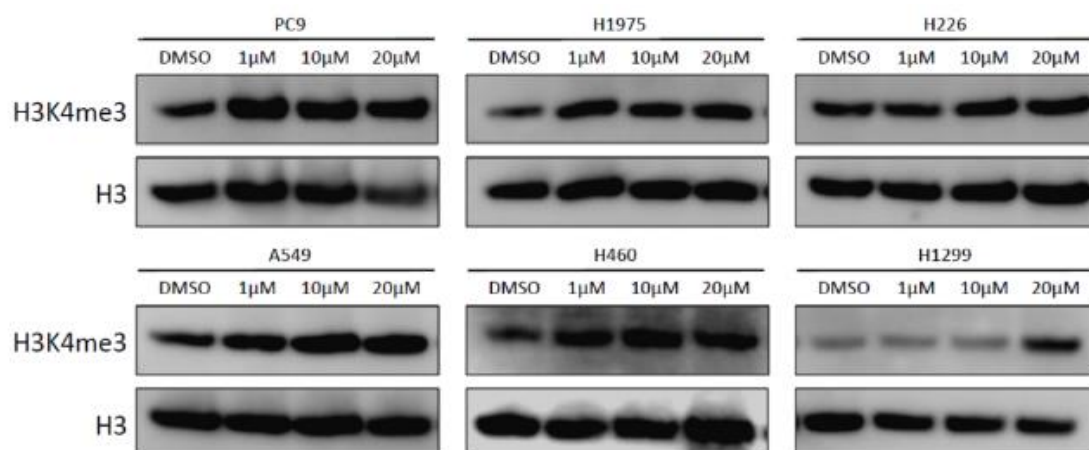


図2: PBIT の濃度ごとの H3K4me3 の蛋白レベル。PBIT 1 μ M、10 μ M、20 μ M に曝露した各細胞株をウエスタンブロット法で評価した。曝露時間は 7 日間。

次に、PBIT が非小細胞肺癌細胞株や正常肺上皮細胞株の増殖を抑制するか検討した。検討したすべての非小細胞肺癌細胞株は PBIT によって用量依存性に増殖が抑制された(図 3)。しかし IC_{50} は比較的高く、正常肺上皮細胞株の IC_{50} との差はわずかであり(図 3)、単独で抗腫瘍薬として用いるのは難しいと考えた。

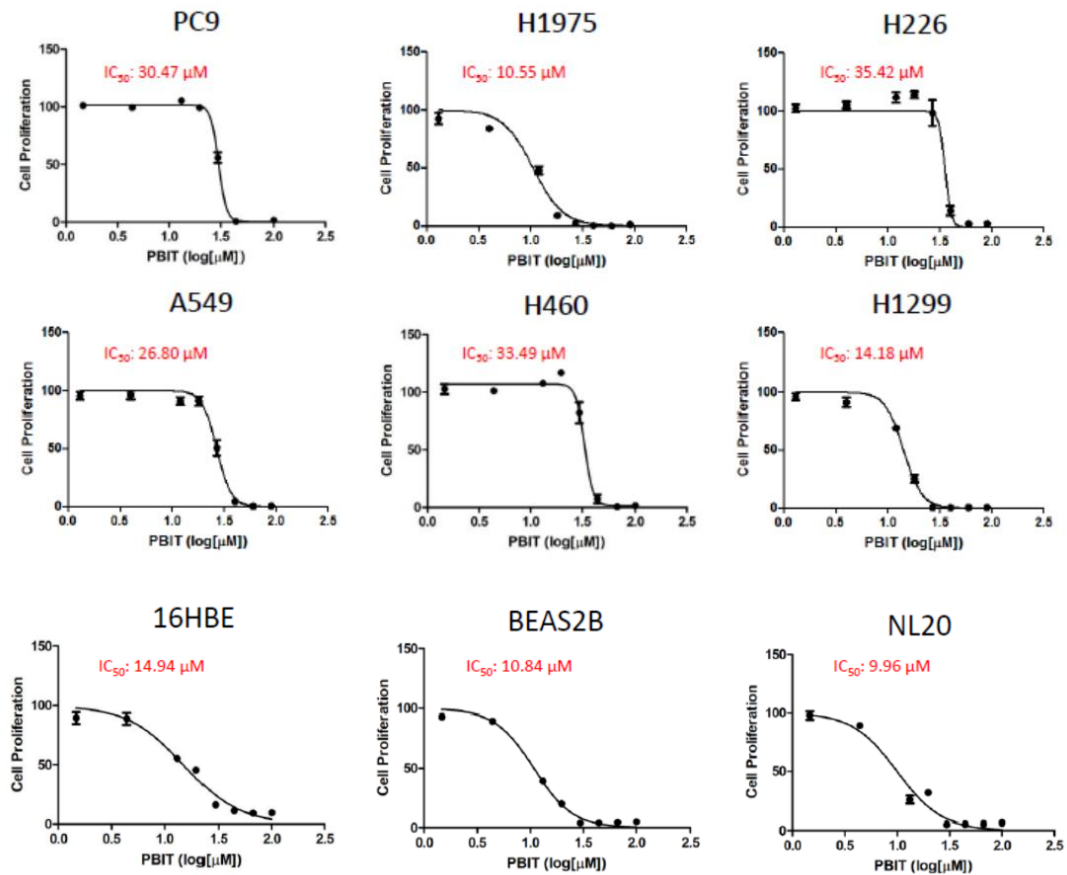


図 3: 肺癌細胞株(上 2 段)と正常肺上皮細胞株(下 1 段)における PBIT の用量反応曲線。さまざまな濃度の PBIT で 72 時間曝露した後の細胞生存割合を MTT アッセイで評価しグラフにした。それぞれのプロットは平均値±SD(n=4)を示している。曲線の上の数字は IC₅₀。

また、他の抗癌薬との併用も試してみたが、相乗効果といえるほどの細胞増殖抑制効果は認めなかった(図 4、図 5)。さらに、H3K27me3 のメチルトランスフェラーゼである EZH2 の阻害薬 DZNeP との併用も検討したが、これも、明らかな相乗効果は認めなかった(図 6)。

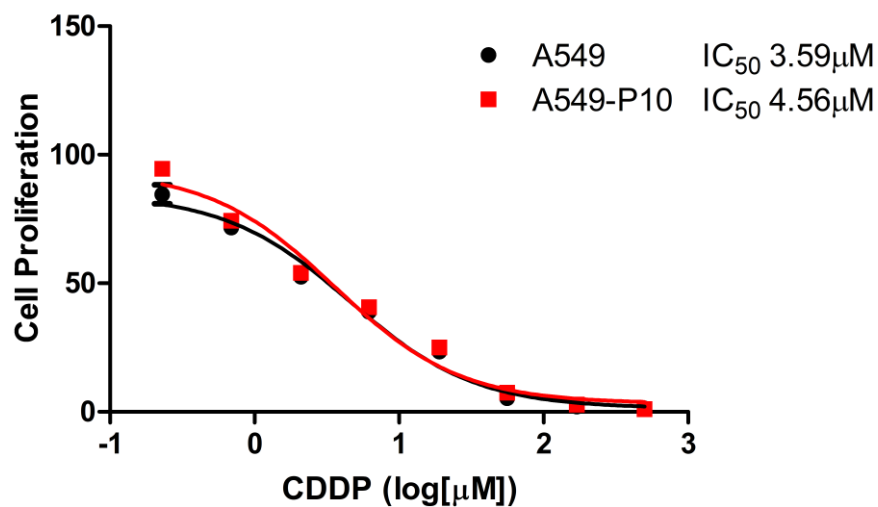


図 4: A549 のシスプラチン単剤と PBIT 10 μ M 併用時 (A549-P10) のそれぞれの用量反応曲線。それぞれのプロットは平均値 $\pm$ SD (n=4) を示している。各細胞株の右の数字はそれぞれの IC₅₀。

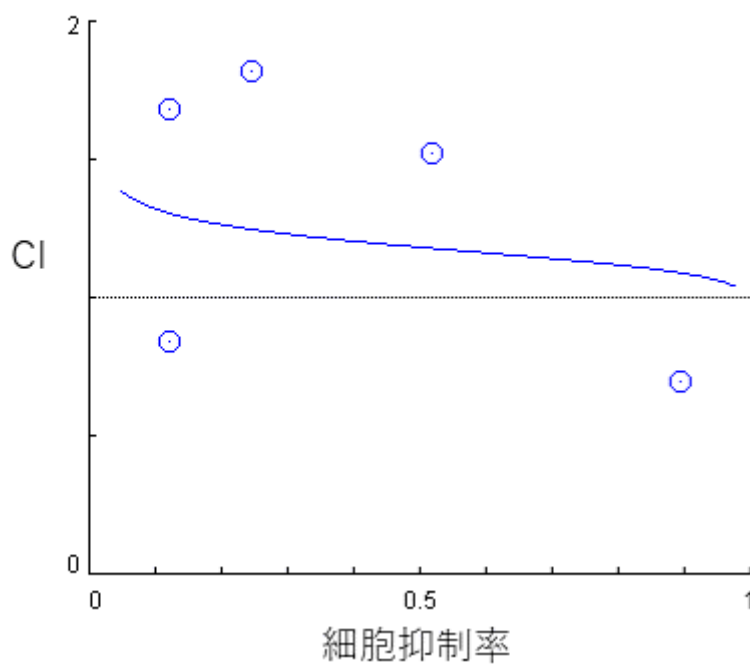


図 5: A549 の PBIT とシスプラチンのコンビネーションインデックス (CI) のグラフ。PBIT (2.5 μ M-40 μ M) と DZNep (2.5 μ M-40 μ M) の濃度比を 1:1 で固定した。細胞抑制率は MTT アッセイで評価した。CI が 0.8 未満で相乗効果あり、1.2 以上は拮抗的と判断される。

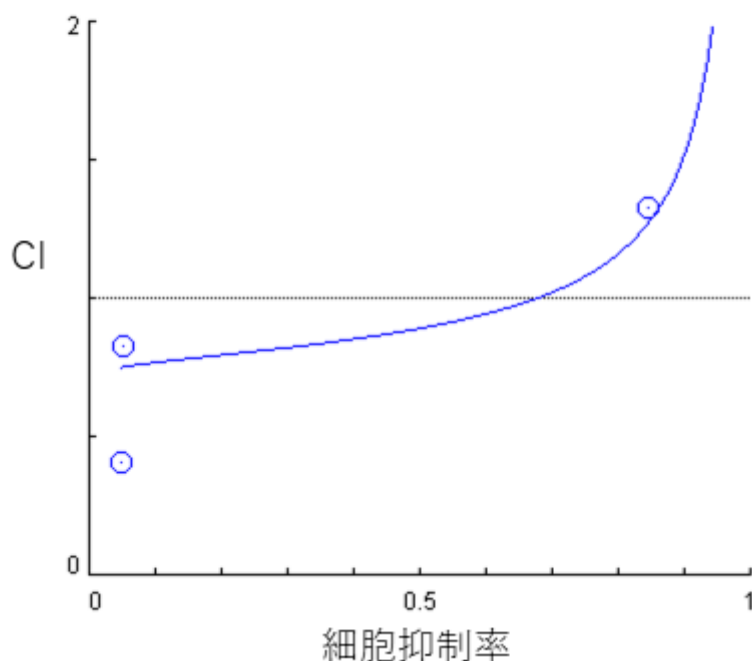


図 6: H226 の PBIT と DZNep のコンビネーションインデックス (CI) のグラフ。PBIT ($2.5 \mu\text{M}$ – $80 \mu\text{M}$) と DZNep ($0.025 \mu\text{M}$ – $0.8 \mu\text{M}$) の濃度比を 100:1 で固定した。細胞抑制率は MTT アッセイで評価した。CI が 0.8 未満で相乗効果あり、1.2 以上は拮抗的と判断される。

薬再耐性細胞株、persister 細胞の作製

薬剤耐性細胞株の作製方法はいくつかあるが、今回私は、高濃度の抗癌薬に曝露し生き残った細胞 (persister 細胞) を使用する方法を選択した。曝露時間を比較的短くすることで、癌幹細胞様細胞を含む抗癌薬に自然耐性の細胞を抽出することができると考えた。抗癌薬はそれぞれの細胞株に高い感受性を持つものを用いた (PC9、PC3、HCC827 はゲフィチニブ、H1975 はオシメルチニブ、H226 はシスプラチン、H460、A549、H1299 パクリタキセル)。Persister 細胞は元の細胞の 1% 以下であり (図 7)、抽出に用いた抗癌薬に耐性であることを確認した (図 8)。尚、ゲフィチニブの耐性機序として EGFR T790M の 2 次変異の頻度が最も高いことが知られており、これらに対して第三世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤オシメルチニブが有効であることも知られている。ゲフィチニブで抽出した persister 細胞は T790M 陽性の細胞が含まれている可能性が考えられたが、これらの細胞はオシメルチニブにも耐性を示しており (図 9)、大部分は T790M 陽性の細胞で構成されているわけではないと考えられた。

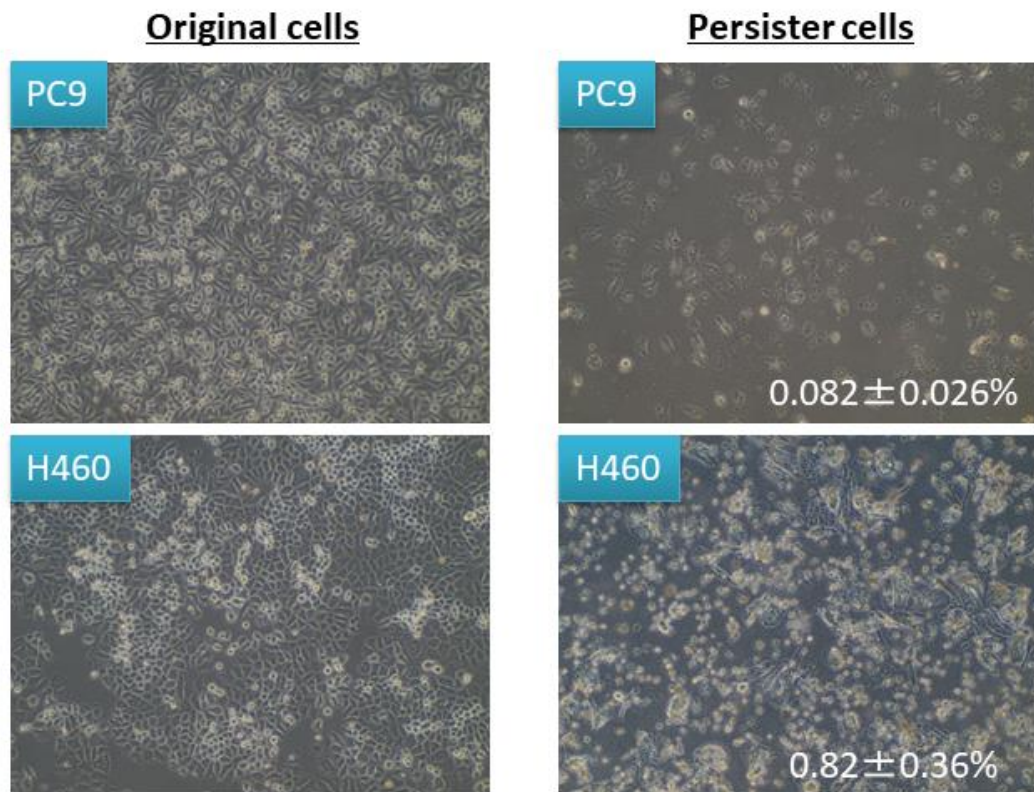
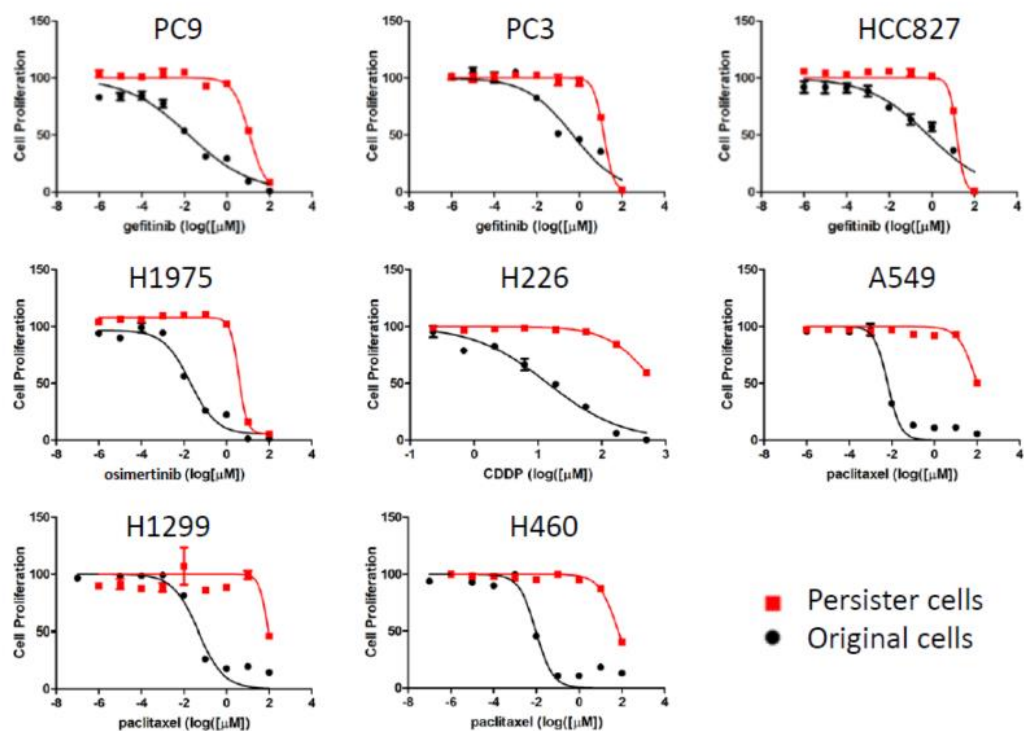


図 7: PC9 と H460 の元の細胞と persister 細胞の代表的な顕微鏡画像 (20×)。Persister 細胞の右下の数字は元の細胞から persister 細胞として生き残った割合。



Cell line (drug)	Original IC ₅₀	DTPs IC ₅₀
PC9 (gefitinib)	0.01622μM	11.44μM
PC3 (gefitinib)	0.4928μM	14.12μM
HCC827 (gefitinib)	0.6766μM	14.64μM
H1975 (osimertinib)	0.01970μM	3.735μM
H226 (CDDP)	14.28μM	696.0μM
A549 (paclitaxel)	0.006334μM	102.7μM
H1299 (paclitaxel)	0.004766μM	93.66μM
H460 (paclitaxel)	0.009557μM	68.10μM

図 8:元の細胞株と、persister 細胞の用量反応曲線。さまざまな濃度の、persister 細胞の作製に用いた薬剤を 72 時間曝露した後の細胞生存割合を MTT アッセイで評価しグラフにした。それぞれのプロットは平均値±SD(n=4)を示している。下の表は各細胞株の IC₅₀ のまとめ。

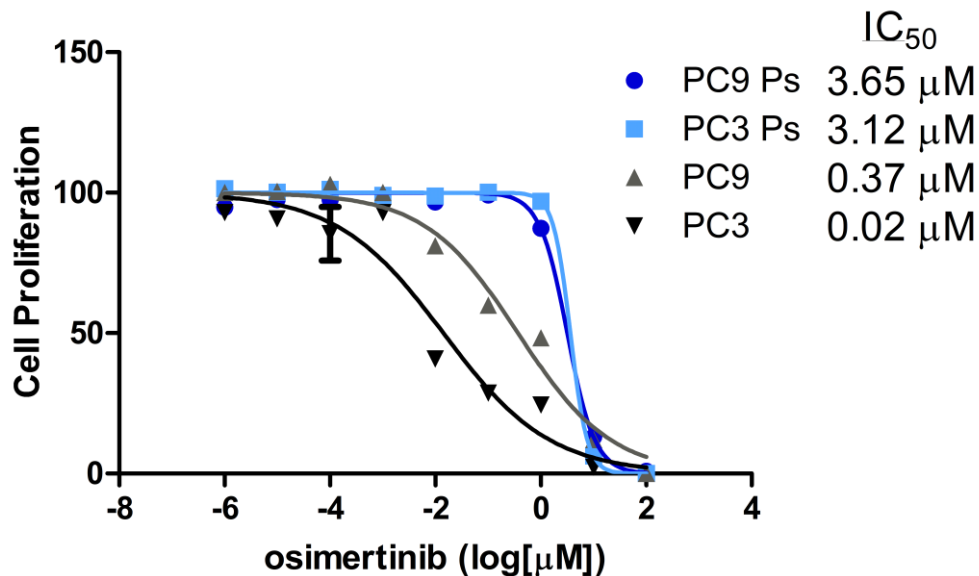


図 9: ゲフィチニブで作製した persister 細胞とその元の細胞における、オシメルチニブの用量反応曲線。さまざまな濃度のオシメルチニブを 72 時間曝露した後の細胞生存割合を MTT アッセイで評価しグラフにした。それぞれのプロットは平均値±SD(n=4)を示している。各細胞株の右の数字はそれぞれの IC₅₀。

PBIT は薬剤耐性 persister 細胞の薬剤感受性を回復させる

Persister 細胞は JARID1a、JARID1b のどちらか、または両方の発現が上昇していた (図 10)。また癌幹細胞様細胞が含まれると想定される H1975 の side population 細胞でも、JARID1a と OCT-4 の発現が上昇していた (図 11)。これらの結果から、JARID1 ファミリーの発現の上昇は persister 細胞を特徴付けるものであり、またこれらの細胞には癌幹細胞様細胞の性質がある可能性が示唆された。

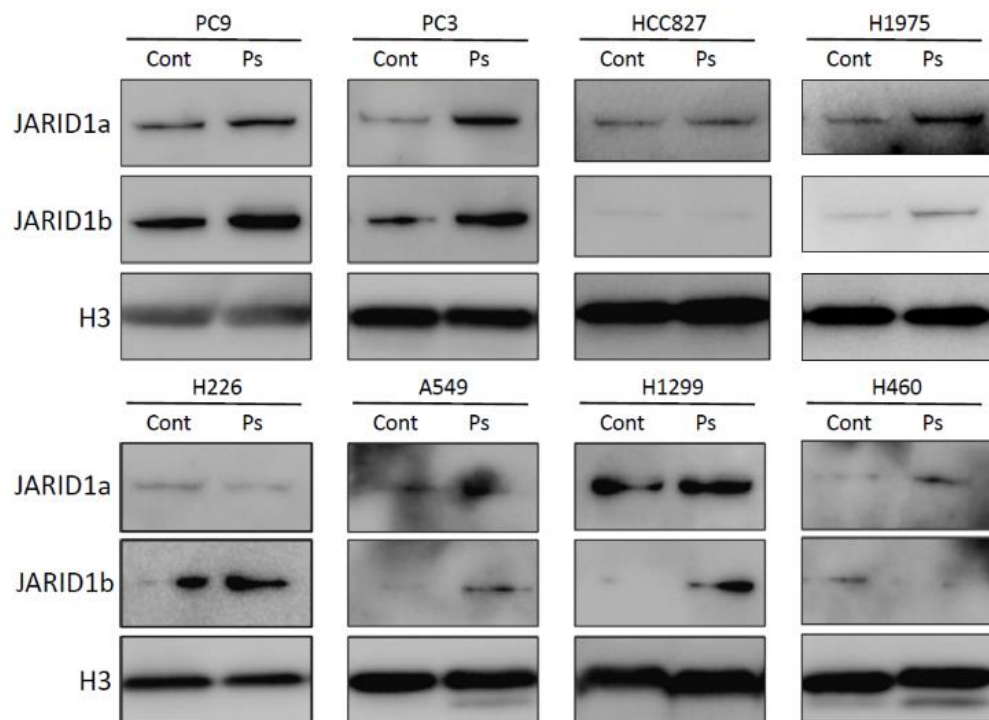


図 10: Persister 細胞(Ps)と、その元の細胞(Cont)の JARID1a、JARID1b の蛋白発現をウエスタンブロットで評価した。

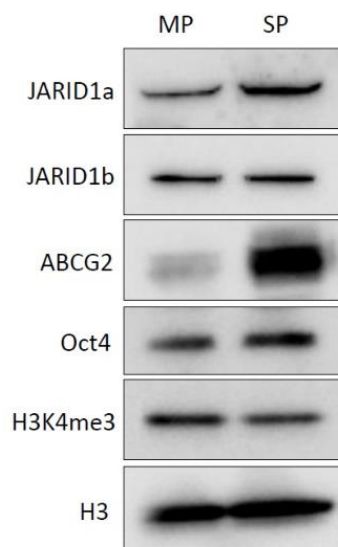


図 11: H1975 から抽出した side population 細胞(SP)と main population 細胞(MP)の各蛋白の発現をウエスタンブロットで評価した。

次に、PBIT が persister 細胞に与える影響について検討した。細胞増殖の抑制効果を見るため、まず 96 穴のウェルプレートに細胞をまき、PBIT を 72 時間曝露し、MTT アッセイで細胞の生存を評価する方法を用いた。しかし、persister 細胞は細胞増殖が遅く、72 時間では細胞増殖にほとんど変化が見られなかった。そこで薬を長時間曝露するため、6 穴のウェルプレートを用い、コロニー形成アッセイで評価する方法を行った。検討した細胞株のうち、persister 細胞がコロニーを形成できたのは、PC9、HCC827、H1975、H226 の 4 つだった。それぞれ抗癌薬群、PBIT 群、抗癌薬と PBIT の併用群で 3 週間薬剤曝露を行ったところ、4 つの細胞株とも併用群で最もコロニー形成を抑制することができた(図 12)。またこの 4 つの persister 細胞は H3K4me3 の発現の減少と OCT-4 の発現亢進を認めたが、PBIT を曝露することでその変化を打ち消すことがわかった(図 13)。

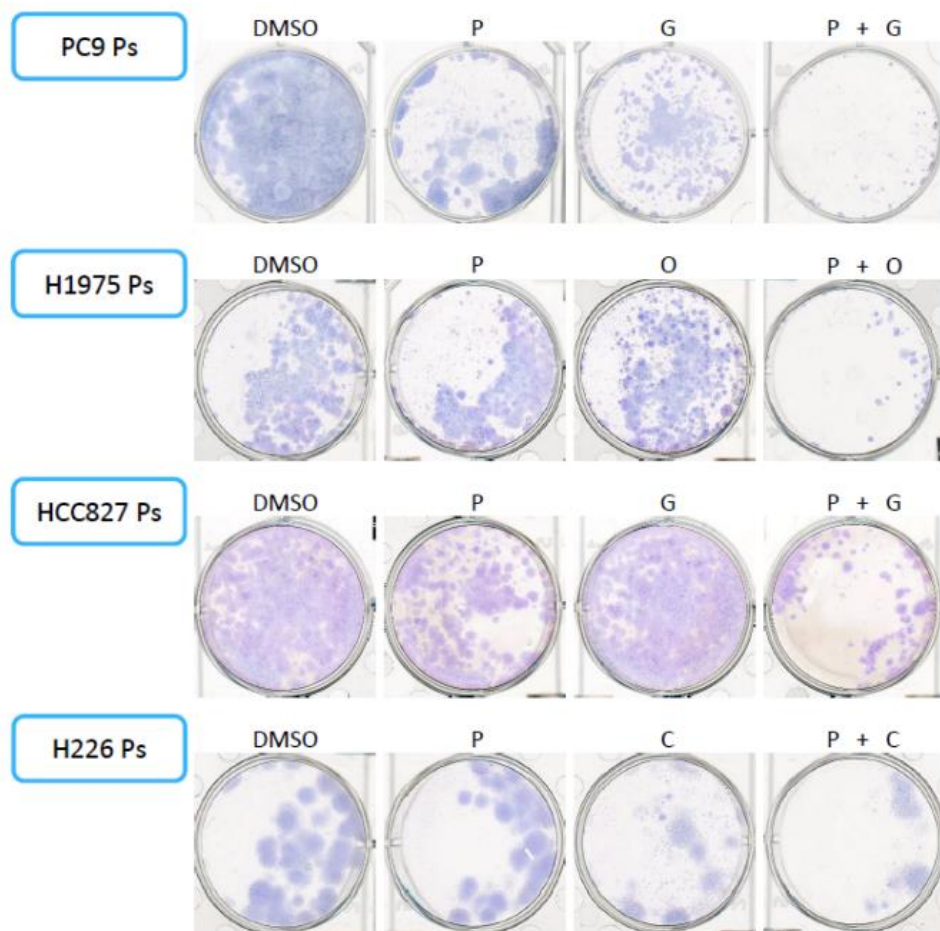


図 12:PC9 Ps、H1975 Ps、HCC827 Ps、H226 Ps をゲフィチニブ 0.1 μ M (G)、オシメルチニブ 0.1 μ M (O), シスプラチン 5 μ M (C)、PBIT 5 μ M (P)とその併用にそれぞれ 3 週間曝露した。代表的なコロニー形成画像を示す。

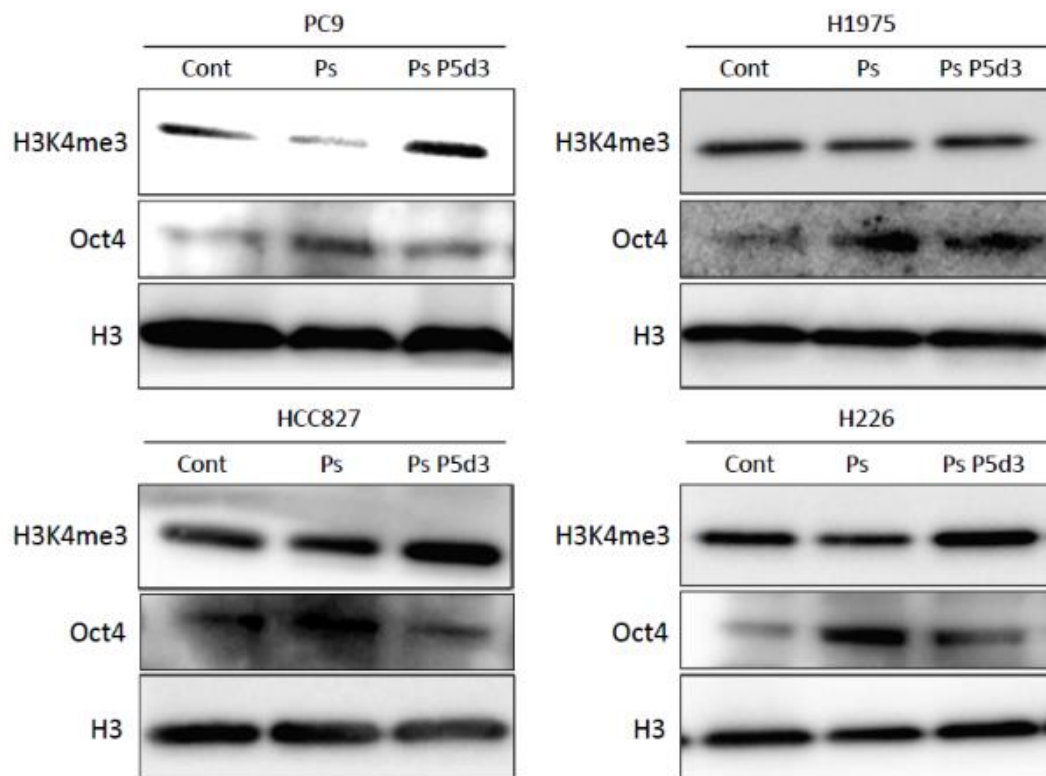


図 13:PC9 Ps、H1975 Ps、HCC827 Ps、H226 Ps を PBIT 5 μ M に 3 日間曝露した (P5d3)。それぞれの細胞株の H3K4me3 と Oct-4 の蛋白発現をウエスタンブロット法で評価した。

【考察】

今回私は persister 細胞ががん幹細胞マーカーの一つである OCT-4 (Chen et al., 2008) の発現が上昇していること、そして JARID1a、JARID1b のいずれか、または両方の発現が上昇していることを示した。JARID1a は SP 細胞でも発現が上昇しており、JARID1a/b による H3K4me3 の調整は肺癌のがん幹細胞様細胞に重要な役割を担っている可能性がある。過去に PC9 の persister 細胞が JARID1a やがん幹細胞マーカーの一つとされる CD133 の発現が上昇しているとした報告があり (Sharma et al., 2010)、それと一貫した結果であったが、JARID1a、JARID1b 両方を同時に評価した肺癌の報告はほとんどみられない。本研究で JARID1a、JARID1b 共に肺癌の薬剤耐性細胞と関連性があることが示唆される。しかしこの両者の違いについては検討しておらず、今後の課題である。

がん幹細胞様細胞が薬剤の耐性に重要な役割を担っているという報告は数多くある (Holohan et al., 2013)。しかし、特に固形癌においては、がん幹細胞様細胞を標的とした治療の開発は非常に難航している。その理由の一つががん幹細胞様細胞の可塑性である。今回私は、PBIT が persister 細胞における OCT-4 の発現上昇を抑え、また PBIT を抗腫瘍薬と併用することで persister 細胞の増殖を抑制することを示した。しかし正常上皮細胞の細胞増殖に大きな影響を与えない濃度の PBIT 単剤では persister 細胞の増殖を十分に抑制することはできなかった。これは PBIT が直接細胞増殖を抑制しているのではなく、PBIT が persister 細胞を、より抗腫瘍薬に感受性のある非がん幹細胞様の状態に変化させている可能性が示唆される。PBIT は肺癌のがん幹細胞様細胞の可塑性を克服できるかもしれない。

今回、多くの細胞株から persister 細胞を作成したが、コロニーを形成できた細胞株は 4 つだけであり、そのうち EGFR 遺伝子陰性細胞株は H226 のみだった。殺細胞性抗癌剤を用いて作成した persister 細胞の多くは、癌細胞への障害が大きくコロニーを形成することができなかったと推測される。EGFR 遺伝子変異陰性の肺癌細胞に対しても、PBIT による肺癌幹細胞様細胞の可塑性の阻害を示すためには、persister 細胞ではなく、フローサイトメトリーでがん幹細胞マーカー陽性細胞を抽出して行う方法が考えられる。しかし、肺癌の幹細胞マーカー候補は複数報告されているが (Wu et al., 2012)、確立したものはない。また、がん幹細胞様細胞の維持には周りの腫瘍環境も影響していると考えられるが、in vitro の実験系ではその検討ができておらず、今後の課題である。

第二章

JARID1 ファミリー阻害薬が EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性細胞の増殖に及ぼす効果

【緒言】

抗腫瘍薬による治療過程において、抗腫瘍薬に耐性の少数のサブポピュレーションが増殖し、腫瘍の大部分を占めることがある (Yoda et al., 2018)。第 1 章において、JARID1 阻害薬 PBIT が薬剤耐性肺癌細胞の薬剤感受性を回復できる可能性が示された。次に、抗腫瘍薬による治療には、初期のサブポピュレーションとしての薬剤耐性細胞の増殖を抑制することも重要であると考え、これを制御する方法を考えた。

2015 年に、BRAF 遺伝子変異陽性悪性黒色腫に対する BRAF 阻害薬ベムラフェニブや、ALK 遺伝子転座陽性肺癌に対する ALK 阻害薬クリゾチニブなどの標的治療を行った場合、その薬剤に感受性の高い癌細胞が、複雑な分泌シグナル (セクレトーム) を産生し、それが薬剤耐性細胞の細胞増殖を促進するという報告がなされた。さらに、そのセクレトームの分泌は FRA1 という転写因子の発現の低下によって引き起こされることも報告された (Obenauf et al., 2015)。そこで EGFR-TKI においても同様の現象があり、このセクレトームを制御することで EGFR-TKI 耐性細胞の増殖を抑えることができると考えた。また、悪性黒色腫をベムラフェニブに曝露した際に誘導されるセクレトームには HGF や IGF-1、GAS6 など多彩な細胞増殖因子が含まれており、これらの経路の活性化は EGFR-TKI 耐性化機序の一つとしても報告されている (Cortot et al., 2013; Taniguchi et al., 2019; Yano et al., 2008)。このセクレトームを治療初期から制御することで、EGFR-TKI 耐性化の克服にもつながると考えた。

転写因子 FRA1 は抑制マーカーである H3K9me3 の脱メチル化酵素である KDM4A によって、活性化されるとの報告がある (Ding et al., 2013)。そこで、JARID1 ファミリーにより活性化マーカー H3K4me3 が脱メチル化されることで FRA1 の発現がエピジェネティックに抑制されるという仮説を立てた。そして JARID1 ファミリー阻害薬を用いることでセクレトームの分泌を抑えることができると考えた。

セクレトームは、in vitro の実験系では培養液中に分泌されと考えられ、まず馴化培養液を用いた実験系を組み立てた。次に FRA1 の発現が JARID1 阻害薬により変化し、それがエピジェネティックに引き起こされているかを検討した。そして馴化培養液から耐性細胞の増殖を促進させている増殖因子の一つとして IGF-1 を突き止め、さらに JARID1 阻害薬が薬剤耐性細胞の増殖を抑えるかを検討し、それに IGF-1R 経路が関わっているかどうかを検討した。

【材料・方法】

クロマチン免疫沈降法

ChIP assay kit (Cell Signaling #9004)を用いて行った。1 サンプルあたり 4×10^6 の細胞を用いた。

クロスリンク

15cm ディッシュに培養液 20ml と細胞を入れ、ホルムアルデヒド 540ml を加え 10 分間振盪し、その後グリシン 2ml を加えさらに 5 分間振盪させた。それをコニカルチューブに取り、1500rpm で 5 分間遠心し上清を除去し、ペレットを氷冷した PBS で 2 回洗した。

クロマチン断片化

上記サブプルを緩衝液+ジチオトレイトール+プロテアーゼ阻害剤の混合液に再懸濁し、氷上で 10 分間転倒混合した。3000rpm で 5 分間遠心し上清を除去した後、氷冷した緩衝液+ジチオトレイトールの混合液 1ml に再懸濁した。遠心し上清を除去後、冷した緩衝液+ジチオトレイトールの混合液 100 μ l に再懸濁した。ミクロコッカスヌクレアーゼを 0.5 μ を加え数回転倒混合し、37℃で 3 分ごとに転倒混合しながら 20 分間インキュベートし DNA を断片化した。EDTA を加え断片化を終了させた後、13000rpm で 1 分間遠心し上清を除去した。できたペレットを緩衝液+プロテアーゼ阻害剤の混合液に再懸濁し氷上で 10 分間インキュベートした。サンプルを 1.5ml チューブにまとめ、超音波処理(20 秒ソニケードし 30 秒氷上でインキュベートを3回繰り返す)で核膜を破碎した。10000rpm で 10 分間遠心し上清を除去した。これを使用するときまで-80 度で冷凍保存した。

クロマチン免疫沈降

緩衝液+プロテアーゼ阻害剤混合液 500 μ l に溶解した上記 1 サンプル分を加え、希釈した。そのうち 2 μ l をインプットサンプルとして別途保存した。H3K3me3 抗体を 1 サンプルあたり 1 μ l 加え、ローテーターを使い 4℃で一晩インキュベートした。キットに付属しているアガロースビーズを加え、ローテーターを使い 4℃で 2 時間インキュベートした。6000rpm で 1 分間遠心し、アガロースビーズを沈殿させ、上清を除去した。ビーズの洗浄用として low salt wash(緩衝液)、high salt wash(緩衝液+NaCl)を用意し、ビーズに low salt wash を加えローテーターを使い 4℃で 5 分間インキュベートを 3 回繰り返して洗浄し、最後にビーズに high salt wash を加えローテーターを使い 4℃で 5 分間インキュベートして洗浄した。6000rpm で遠心し上清を除去した。

クロマチン溶出、脱クロスリンク

各サンプルに付属の ChIP 溶出緩衝液を加え、サーモミキサーを用い 1200rpm でボルテックスしながら 65℃で 30 分間インキュベートしクロマチンを溶出した。6000rpm で 1 分間遠心し、クロマチンが溶解している上清を別のチューブに移し替えた。各サンプルに NaCl とプロテアーゼ K を加え、65℃で 2 時間インキュベートして脱クロスリンクし

た。

DNA 精製

サンプルに付属の DNA バインディングバッファーを加え、スピncラムを用い 14000rpm で 30 秒遠心し、付属の DNA 溶解バッファーを加え 14000rpm で 30 秒遠心し DNA を溶出した。

リアルタイム PCR

・プライマー

FRA1 AP1 site

5' -CTTAAAACAAGGCCAGTGGAAAGACC-3' (forward)

5' -TGCCCATACATG GTGTAACCTTCC-3' (reverse)

・プログラム

初期変性 95°C 3 分間

変性 95°C 15 秒間

アニーリング 60°C 60 秒間

計 40 サイクル

・マスターミックス(1 サンプル)

SYBR green 10 μ l

10 μ M プライマー 2 μ l

RNase free water 7 μ l

IP 効率は以下で計算

$$\text{Percent input} = 2\% \times 2^{C[T]_{2\% \text{ input sample}} - C[T]_{\text{IP sample}}}$$

C[T] = Threshold Cycle

馴化培地の作製

10% (v/v) FBS の通常の培地に 2×10^6 の PC9、preP-PC9、H1975、preP-H1975 を 10cm ディッシュに撒いた。コントロールとして 1×10^6 の PC9 と H1975 を同様にディッシュに撒いた。一晩インキュベートして細胞を接着させた後、培地を除去し低血清培地 (2% (v/v) FBS) に PC9、preP-PC はゲフィチニブ 0.1 μ M、H1975、preP-H1975 はオシメルチニブ 0.1 μ M を加え、インキュベートした。コントロールとして DMSO を用いた。72 時間後、培地を回収し 1000rpm で遠心し上清を回収し、0.22 μ m フィルターでろ過した後実験に用いた。

セクレトームの IGF-1、HGF の測定

ヒト IGF-1 特異的または HGF 特異的 ELISA (Quantikine ELISA Kit) を R&D Systems から購入し、同社のプロトコールに従って測定した。各ウェルにキットに付属している測定用バッファー50 μ l と前述のとおり作成した馴化培地を 200 μ l 加え、室温で 2 時間インキュベートした。その後洗浄バッファーで 3 回洗浄を行い、ウェルを逆さにしてペーパータオルに叩きつけ、十分水分を除去した。次に IGF-1 conjugate または HGF conjugate を添加し、室温で 2 時間インキュベートした。その後上記と同様に洗浄バッファーで洗浄し、十分水分を除去してから基質溶液を添加し 20 分インキュベートした。最後に各ウェルに反応停止液を加え、プレートリーダーで測定を行った。

3D コロニー形成アッセイ

最初に下層として寒天 0.48g に PBS 6ml を加え、電子レンジで 1~2 分加熱し、50°C の培地 54ml を加え、0.8%の寒天を作った。次に 0.8%の寒天 26ml に 37°Cの培地 26ml を加え、0.4%寒天を作った。6 ウェルプレートの各ウェルに 0.8%の寒天 2ml をいれ、1 時間インキュベートし下層を固まるのを待った。次に各ウェルに撒きたい細胞数の 3 倍の細胞と目標濃度の 1.5 倍の濃度になるように薬剤を 12ml の 0.4%寒天に懸濁し、各ウェルに 4ml ずつゆっくり滴下した。プレートを 1 時間冷蔵保存し、寒天が固くなったことを確認してから、37°Cで 4 週間インキュベートした。コロニーを p-iodonitrotetrazolium violet (Sigma-Aldrich) で染色し、NIH ImageJ バージョン 1.51p ソフトウェア (NIH, USA) を使用してカウントした。

細胞長期生存アッセイ

PC9 または H1975 を 96 ウェルプレートにウェルあたり 100 播種し、各ウェル 150 μ l の培地にゲフィチニブ 0.1 μ M、オシメルチニブ 0.1 μ M、PBIT 1 μ M の濃度になるように調整した。培地と薬物のは週に一度、半量を交換した。4 週間後、MTT アッセイを使用して細胞増殖を測定した。

※細胞株と培養、ウェスタンブロット、統計解析は第1章と同様に行った。

【結果】

PBIT は FRA1 の発現をエピジェネティックに制御することで、セクレトームの産生を抑える

細胞は標的治療である EGFR チロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）が有効である EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌細胞株を選択した。まず既報の、標的治療で薬剤耐性細胞を増殖させるセクレトームが分泌するかどうかを追試するため、肺癌細胞株に EGFR-TKI を曝露した後その馴化培養液（conditioned medium; CM）を回収し、その培養液が EGFR-TKI 無効の EGFR 遺伝子野生型の肺癌細胞株の増殖を変化させるかを検討した（図 14）。既報通り、通常の培養液と比較して CM の方が（培養液中に EGFR-TKI が含まれているにも関わらず）EGFR 遺伝子野生型の肺癌細胞株の増殖を促進させた（図 15）。次に PBIT がこのセクレトームを抑制するか検討するため、PBIT 併用で EGFR-TKI を曝露することを考えたが、CM の薬剤は除去できないため、培養液中の PBIT が細胞増殖に負の影響を与える可能性があり、PBIT で前処置した（preP-）細胞株を用いることにした。すると興味深いことに、preP-細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM は EGFR 遺伝子野生型の肺癌細胞株の増殖を促進させなかった。さらに EGFR 遺伝子野生型の肺癌細胞株のかわりに persister 細胞を用いても同様の結果だった。

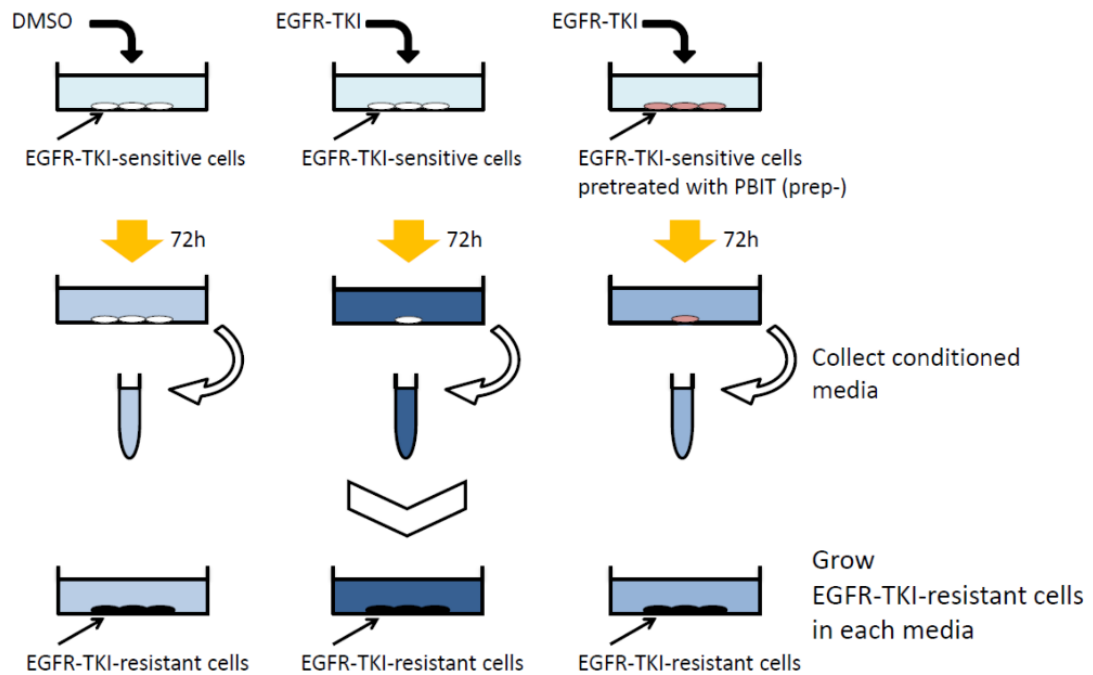


図 14: 実験のシェーマ。EGFR-TKI 感受性細胞と、PBIT $1 \mu\text{M}$ で 72 時間前処置した (preP-)EGFR-TKI 感受性細胞を EGFR-TKI に曝露した。DMSO はコントロールとして用いた。72 時間後にそのコンディショニングメディウムを回収し、それぞれのメディウム中での EGFR-TKI 耐性細胞の細胞増殖を評価した。

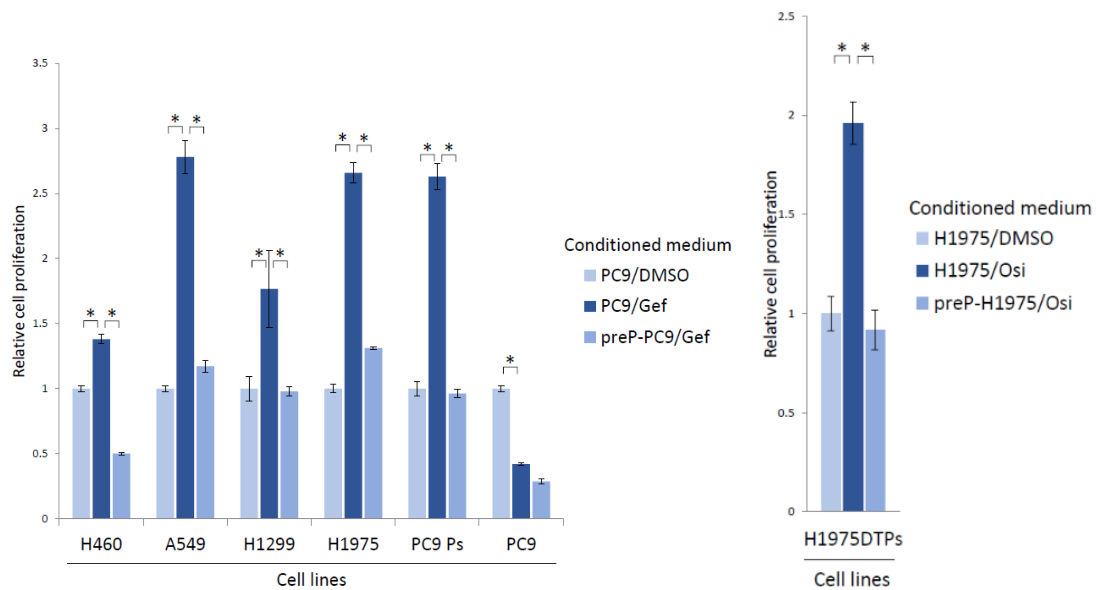


図 15: (左)コンディショニングメディウムをゲフィチニブ $0.1 \mu\text{M}$ に曝露した PC9 (PC9/Gef) と、ゲフィチニブ $0.1 \mu\text{M}$ に曝露した preP-PC9 (preP-PC9/Gef)から回収した。ゲフィチニブ耐性細胞として、EGFR 野生型肺癌細胞株と PC9 Ps を用いた。それぞれの細胞の各コンディショニングメディウム中での 72 時間後の細胞増殖を評価した。(右)コンディショニングメディウムをオシメルチニブ $0.1 \mu\text{M}$ に曝露した H1975 (H1975/Osi) と、オシメルチニブ $0.1 \mu\text{M}$ に曝露した preP-H1975 (preP-H1975/Osi) から回収した。オシメルチニブ耐性細胞として H1975 Ps を用い、上記と同様に細胞増殖を評価した。グラフは平均 $\pm$ SD (n=4)で表記。* $P < 0.05$ (マン・ホイットニーの U 検定)

次に PBIT が FRA1 に与える影響について検討した。上記と同じ条件で、細胞株に EGFR-TKI を曝露したものと、preP-細胞株に EGFR-TKI を曝露したものの FRA1 の発現を検討したところ、前者は FRA1 の発現が低下していたが、後者はその発現低下が打ち消されていた (図 16)。尚、PBIT 単独投与をした細胞では FRA1 の発現に変化は見られなかった。また FRA1 のプロモーター領域における、活性化マーカーである H3K4me3 のレベルをクロマチン免疫沈降アッセイで検討したところ、前者は H3K4me3 レベルが低下していたが、後者はその低下が打ち消されていた (図 17)。

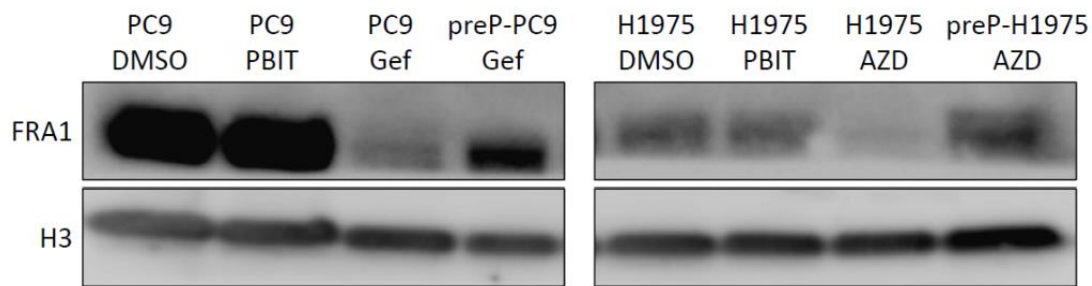


図 16: PC9 はゲフィチニブ $0.1 \mu\text{M}$ 、PBIT $1 \mu\text{M}$ 、H1975 はオシメルチニブ $0.1 \mu\text{M}$ 、PBIT $1 \mu\text{M}$ に 72 時間曝露した。PreP は、PBIT $1 \mu\text{M}$ 72 時間で前処置した細胞。FRA1 の蛋白発現をウエスタンブロット法で評価した。

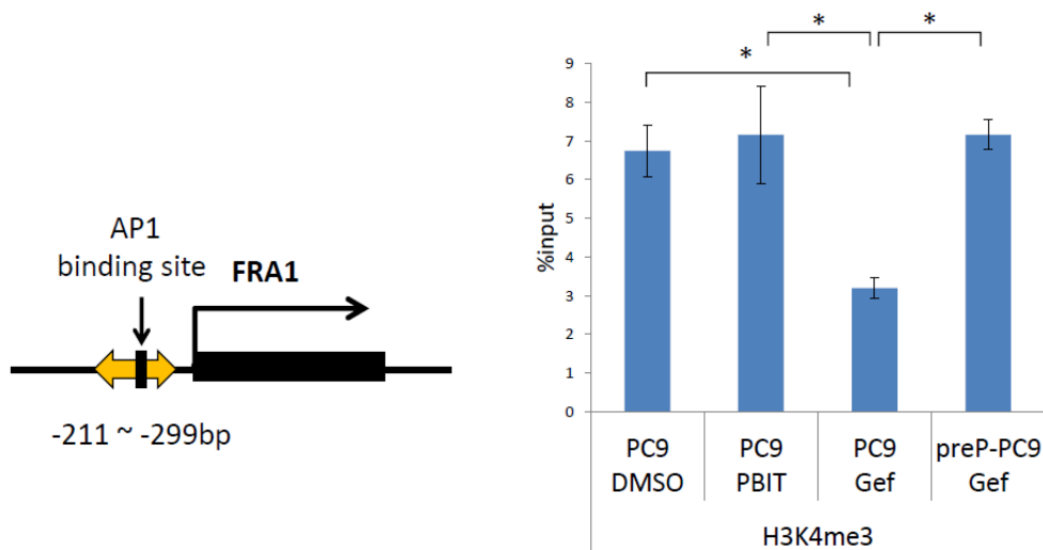


図 17: FRA1 のプロモーター領域における H3K4me3 のクロマチン免疫沈降法。共沈した DNA はリアルタイム PCR で分析した。グラフは平均 $\pm$ SD (n=3) で表記。*P < 0.05 (マン・ホイットニーの U 検定)

HGF による MET 経路の活性化は EGFR-TKI の耐性機序として確立されている。この HGF がセクレトームの主要素の一つと考え、上記の CM 中の HGF の濃度を測定した。しかしこの実験系では、どの CM でも HGF を検出することはできなかった (data not shown)。次に、既報で BRAF 遺伝子変異陽性悪性黒色腫を BRAF 阻害薬に曝露した際のセクレトームの主要素の一つが IGF-1 であることが報告されていることに着目した。

この IGF-1R 経路の活性化も EGFR-TKI 耐性に関与しているという報告が複数あるため、IGF-1 の濃度を測定したところ、細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM 中では濃度が上昇していたが、preP-細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM 中ではその上昇が軽減されていた (図 18)。

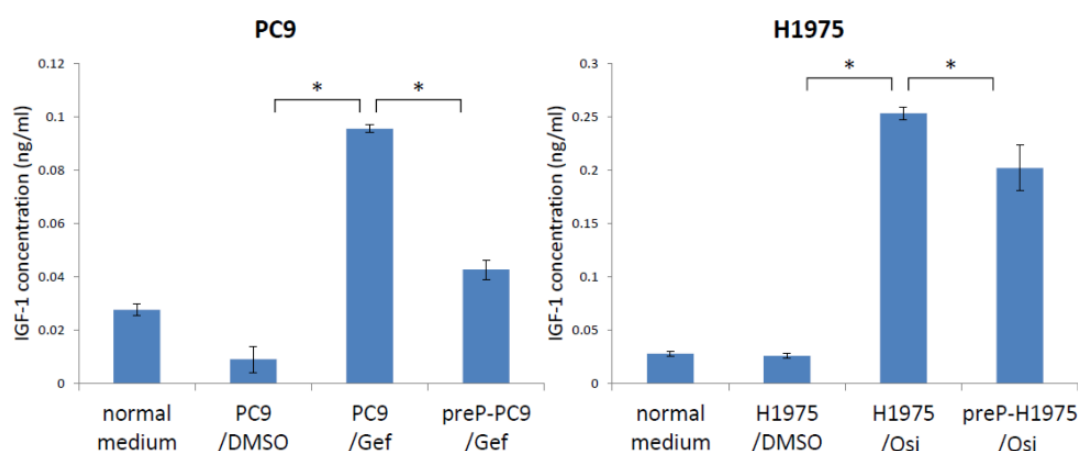


図 18: 各コンディションメディウム中の IGF-1 の濃度を ELISA で評価した。グラフは平均 ± SD (n=3) で表記。*P<0.05 (マン・ホイットニーの U 検定)

PBIT は EGFR-TKI 耐性細胞の増殖を抑制する

PBIT が EGFR-TKI 耐性細胞の増殖を抑えるか検討するため、細胞に薬剤を長期曝露したのちの耐性細胞の生存を評価する方法を考えた。耐性細胞はさまざまなクローンが出現すると想定されるため、96 穴ウェルプレートを用いて多くの細胞グループを作り、それぞれで耐性細胞を評価する方針とした (図 19)。また細胞数が多い場合は (フルコンフルエントになってしまい) 長期間の薬剤曝露ができず、また細胞数が少ない場合はセクレトーム分泌に影響を及ぼすと考えられることから、persister 細胞が 1% 以下なのも加味し 1 穴あたりの細胞数を 100 とした。また培養液の交換は、頻回だとセクレトームを除去してしまうため、週 1 回で行う方針とした。4 週後に MTT アッセイで細胞の生存を評価したところ、PBIT 併用群で耐性細胞の減少を認めた。

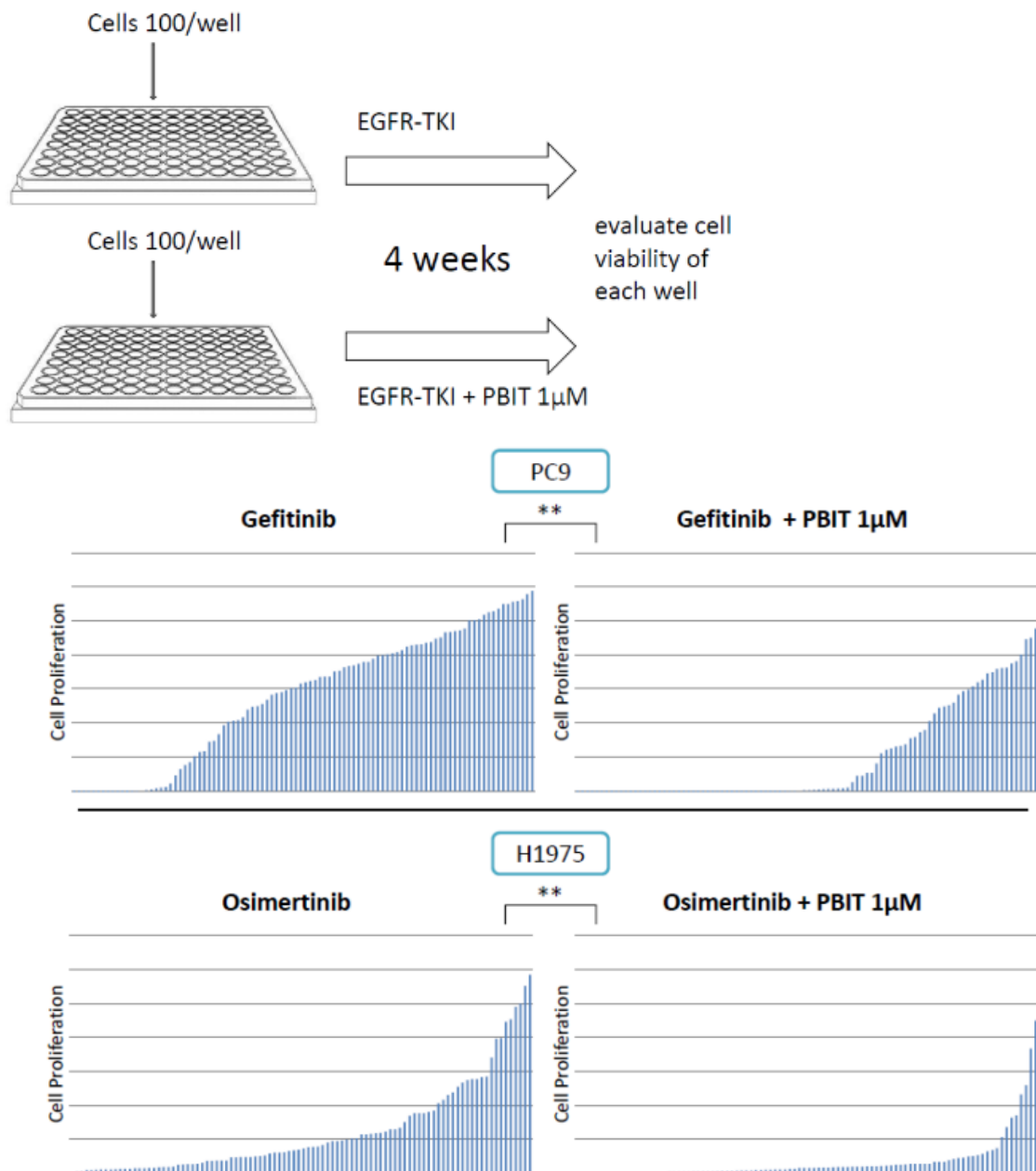


図 19: (上)実験のシェーマ。EGFR-TKI 単剤または PBIT との併用に 4 週間曝露した後、各ウェルの細胞増殖を MTT アッセイで評価した。(下)PC9 はゲフィチニブ 1 μ M 単剤または PBIT 1 μ M 併用に曝露し、H1975 はオシメルチニブ 1 μ M 単剤または PBIT 1 μ M 併用に曝露した。各バーは 1 つのウェルの細胞増殖を示している。
**P<0.01 (マン・ホイットニーの U 検定)

PBIT 併用時の IGF-1R 経路の変化を検討したところ、その下流の活性化が PBIT 併用時は抑えられていることが分かった (図 20)。尚、MET の経路に変化は認めず、これは前述のセクレトームで HGF が測定できなかったことと一致した結果だった。尚、PBIT 単剤では細胞増殖抑制効果を有さないことを確認する必要があるが、同じ方法では早期にフルコンフルエントになり 4 週間の薬剤曝露ができなかったため、3D コロニー形成アッセイで評価を行った。4 週間の薬剤曝露ではコロニー数は変化せず、(非足場依存性の)細胞増殖には影響を与えないことを確認した (図 21)。

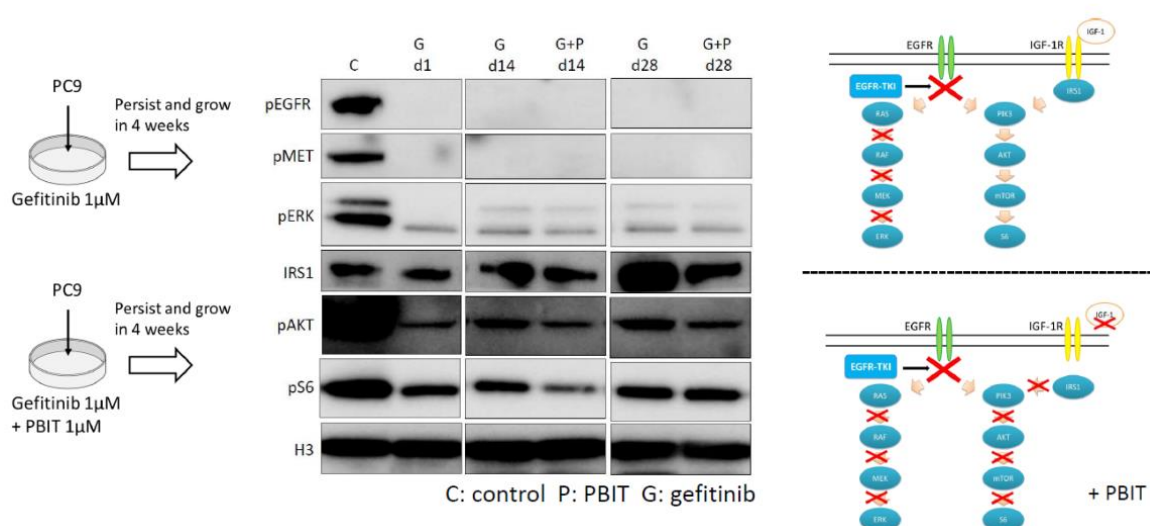


図 20: (左)実験のシェーマ。PC9 をゲフィチニブ 1 μ M 単剤(G)または PBIT 1 μ M 併用(G+P)に 4 週間曝露した。(中央)細胞は 0 日目(コントロール C)、1 日目、14 日目、28 日目にそれぞれ回収し、各蛋白発現をウェスタンブロット法で評価した。(右) EGFR-TKI を投与した時の PBIT 併用の有無での IGF-1R 経路の変化。

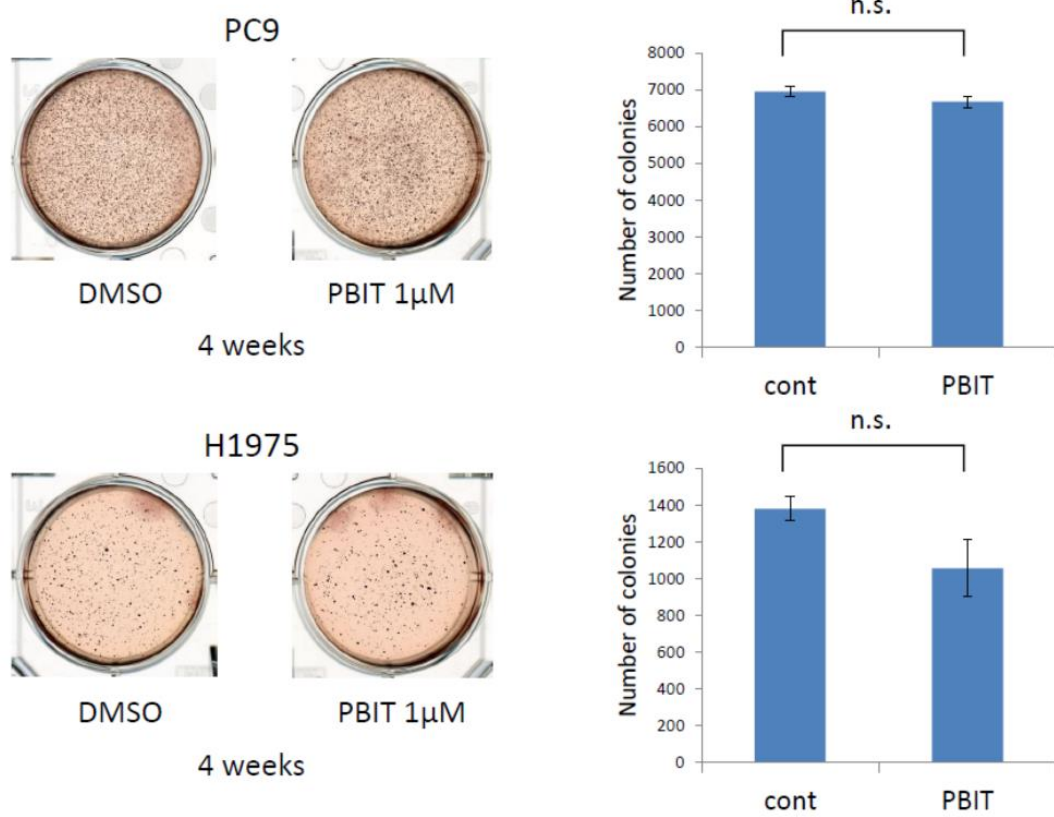


図 21: PBIT 1 μ M の長期曝露による細胞増殖への影響。軟寒天コロニー形成アッセイを用い、4 週間後のコロニー形成数を計測した。グラフは平均 $\pm$ SD (n=3)。

【考察】

今回私は、JARID1 ファミリー阻害薬 PBIT が、薬剤耐性、特に EGFR-TKI 耐性の非小細胞肺癌に対して 2 つの機序で抗腫瘍効果を発揮することを突き止めた (図 22)。1 つ目は第 1 章で記述した、PBIT が OCT-4 を高発現している persister 細胞の薬剤感受性を回復させること、そして 2 つ目は本章の、PBIT が FRA1 のプロモーター領域の活性化マーカー H3K4me3 の脱メチル化を抑えることで、FRA1 の発現の低下を抑えること、そして EGFR-TKI で誘導される IGF-1 を含むセクレトームを抑え、耐性細胞の増殖を抑制する機序である。

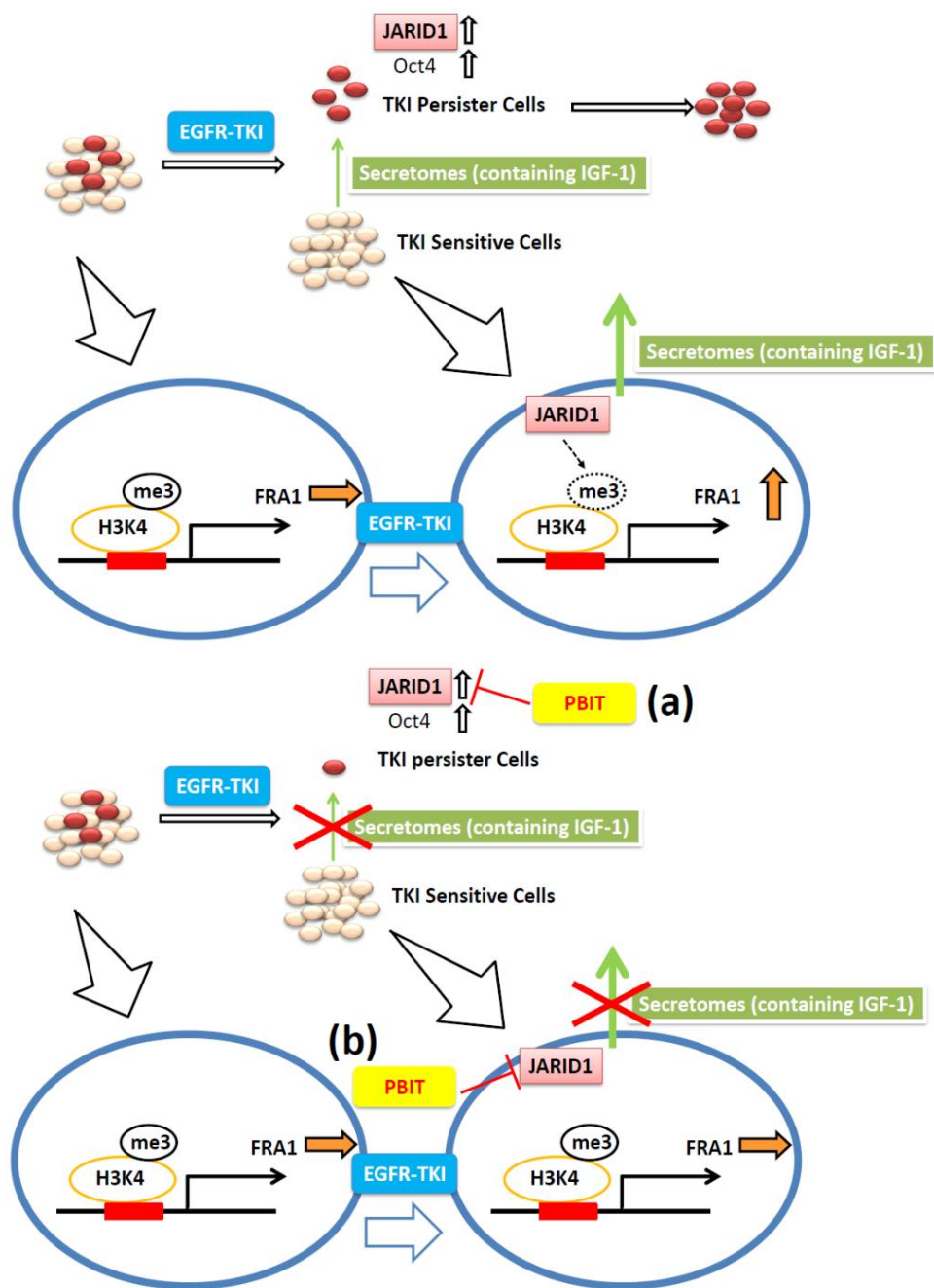


図 22: PBIT が肺癌細胞株に及ぼす効果のまとめ。上図は PBIT 非併用時、下図は PBIT 併用時の EGFR-TKI 感受性細胞に EGFR-TKI 曝露した時のシエーマ。PBIT には(a) JARID1 の発現が上昇している薬剤耐性 persister 細胞を抑制することと、(b)EGFR-TKI 曝露で誘導される、薬剤耐性細胞の増殖を促進させるセクレトームを、FRA1 の発現をエピジェネティックに制御することで抑えるという 2 つの効果を持っていると考えられる。

概して、標的治療の耐性機序は大きく 2 つに分類される。標的遺伝子の変化に代表されるオン-ターゲットによる耐性機序と、バイパスシグナル経路の活性化に代表されるオフ-ターゲットによる耐性機序である。EGFR-TKI の耐性化の場合、前者は第一世代、第二世代 EGFR-TKI の耐性機序である T790M 変異 (Kobayashi et al., 2005)、第三世代 EGFR-TKI の耐性機序である C797S (Yu et al., 2015) など EGFR 遺伝子の 2 次変異があげられる。これらを克服するには、変異遺伝子も標的にできる EGFR-TKI そのものの開発が必要である。

それに対して、オフ-ターゲットの耐性機序の克服は複雑である。最も開発が進んでいるのは、HGF の下流である MET 経路の活性化に対する MET 阻害薬である (Sequist et al., 2020)。しかし、セクレトームが様々なバイパス経路を活性化させると考えると、仮に MET 経路が活性化した肺癌でも、MET 阻害薬のみではその耐性化の克服が不十分である可能性がある。

今回私が検討した IGF-1R 経路の活性化による耐性化の場合も、IGF-1R 経路の阻害薬を併用することでも克服できるかもしれない。しかし活性化するバイパス経路にはさまざまなものが報告されており、それらが複合され耐性化すると考えると、単独経路の活性化の抑制では不十分である可能性がある。理想は全ての活性化したバイパス経路を抑えることであるが、それを個別に行うことは困難である。PBIT を用いることで、網羅的にバイパス経路を抑制させることができるかもしれない。今回の実験系では IGF-1R 以外の活性化される経路を特定できなかった。網羅的なバイパス経路の検討と、それが PBIT で抑制されるかどうかは今後の課題である。また、MET 経路の活性化の場合、MET 遺伝子の増幅が耐性機序として報告されているが (Yano et al., 2008)、HGF による恒常的な MET 経路の活性化が MET 遺伝子の増幅につながるかは現時点では不明である。今回の実験系では HGF の上昇や MET 経路の活性化は確認できなかった。細胞株の種類や EGFR-TKI の種類などによる違いもあるのかもしれない。

今回私は JARID1 阻害薬により FRA1 がエピジェネティックに調整されることを初めて報告した。この FRA1 発現低下の抑制と、それによるセクレトーム分泌の抑制はオフ-ターゲットの耐性化を克服できる可能性を秘めていると考えられる。

【全体の結論】

第1章

- ・JARID1 ファミリー阻害薬 PBIT は単剤でも非小細胞肺癌細胞株の細胞増殖抑制効果を有するが IC_{50} は比較的高く、正常の肺上皮細胞と大きな違いがない。
- ・高濃度、短期間の抗癌薬を曝露することで抽出される薬剤耐性 persister 細胞は、JARID1a または/かつ JARID1b の発現が上昇しており、かつ癌幹細胞マーカーである OCT-4 の発現も上昇している。
- ・JARID1 ファミリー阻害薬 PBIT は persister 細胞の薬剤感受性を回復させることができる。

第2章

- ・PBIT は転写因子 FRA1 の発現をエピジェネティックに制御することで、EGFR-TKI 感受性細胞に EGFR-TKI を曝露した時に生じる FRA1 の発現低下を緩和させることができる。
- ・PBIT を用いることで、FRA1 発現の低下によって誘導されるセクレトームを抑制し、EGFR-TKI 耐性細胞の増殖を抑制することができる。
- ・セクレトームの1つに IGF-1 があり、PBIT 併用することで EGFR-TKI 長期曝露後の IGF-1 経路の活性化を抑制することができる。

本研究により、エピジェネティクスに関わる分子であるJARID1ファミリーを標的とした薬剤を用いることで、2つの機序で肺癌の耐性化を克服できる可能性が示された。特に、EGFR-TKIの耐性機序のうち、現時点で克服に難渋しているオフターゲットによる耐性を克服できる可能性があると考えられる。固形癌においてはエピジェネティクスに関わる分子を標的とした治療はまだ研究段階であるが、本研究がその発展に寄与すると考えられる。しかし、*in vitro*の実験データであり、また特定できたバイパス経路もIGF-1経路のみである。今後の課題は、セクレトームの網羅的な検討や、標的治療によるJARID1ファミリーの発現の上昇の機序、FRA1発現低下によるセクレトーム分泌の機序の解明などが挙げられる。

分子標的薬は多癌腫において有効性が証明されているが、同時にその耐性化の克服も課題となっている。JARID1ファミリーを標的とした薬剤を用いることで肺癌以外の癌腫でも薬剤耐性化が克服できるのかは今後の研究テーマである。さらに薬剤がより有効となるバイオマーカーを検討し、最終的には癌腫横断的な治療開発に繋げていきたい。

【謝辞】

本研究を進めるに当たり、指導教官の秋田弘俊教授、木下一郎教授からは多大な助言を賜りました。厚く感謝を申し上げます。また、日常診療業務中に試薬の準備やサンプル作成等、多大なサポートをして下さった実験助手の澤田さん、樋渡さん、小宮さん、実験に協力して下さいった医学研究院腫瘍内科学教室/北海道大学病院腫瘍内科の教室員の皆様にも厚く御礼を申し上げ、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】

- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhata, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633–636.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326.
- Chen, Y.C., Hsu, H.S., Chen, Y.W., Tsai, T.H., How, C.K., Wang, C.Y., Hung, S.C., Chang, Y.L., Tsai, M.L., Lee, Y.Y., *et al.* (2008). Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* 3, e2637.
- Cortot, A.B., Repellin, C.E., Shimamura, T., Capelletti, M., Zejnullahu, K., Ercan, D., Christensen, J.G., Wong, K.K., Gray, N.S., and Janne, P.A. (2013). Resistance to irreversible EGF receptor tyrosine kinase inhibitors through a multistep mechanism involving the IGF1R pathway. *Cancer Res.* 73, 834–843.
- Defeo-Jones, D., Huang, P.S., Jones, R.E., Haskell, K.M., Vuocolo, G.A., Hanobik, M.G., Huber, H.E., and Oliff, A. (1991). Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 352, 251–254.
- Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793–4807.
- Ding, X., Pan, H., Li, J., Zhong, Q., Chen, X., Dry, S.M., and Wang, C.Y. (2013). Epigenetic activation of AP1 promotes squamous cell carcinoma metastasis. *Sci. Signal* 6, ra28.21–13, S20–15.
- Easwaran, H., Tsai, H.C., and Baylin, S.B. (2014). Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol. Cell* 54, 716–727.
- Ellis, L., Atadja, P.W., and Johnstone, R.W. (2009). Epigenetics in cancer: targeting

chromatin modifications. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 1409–1420.

Gainor, J.F., Dardaei, L., Yoda, S., Friboulet, L., Leshchiner, I., Katayama, R., Dagogo-Jack, I., Gadgeel, S., Schultz, K., Singh, M., *et al.* (2016). Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov.* *6*, 1118–1133.

Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Shapira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C., and Lander, E.S. (2011). Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* *146*, 633–644.

Hayami, S., Yoshimatsu, M., Veerakumarasivam, A., Unoki, M., Iwai, Y., Tsunoda, T., Field, H.I., Kelly, J.D., Neal, D.E., Yamaue, H., *et al.* (2010). Overexpression of the JmJc histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway. *Mol. Cancer* *9*, 59.

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 714–726.

Kikuchi, J., Kinoshita, I., Shimizu, Y., Kikuchi, E., Konishi, J., Oizumi, S., Kaga, K., Matsuno, Y., Nishimura, M., and Dosaka-Akita, H. (2010). Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. *Cancer* *116*, 3015–3024.

Kobayashi, S., Boggon, T.J., Dayaram, T., Janne, P.A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B.E., Eck, M.J., Tenen, D.G., and Halmos, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* *352*, 786–792.

Li, Y., Rogoff, H.A., Keates, S., Gao, Y., Murikipudi, S., Mikule, K., Leggett, D., Li, W., Pardee, A.B., and Li, C.J. (2015). Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *112*, 1839–1844.

Liau, B.B., Sievers, C., Donohue, L.K., Gillespie, S.M., Flavahan, W.A., Miller, T.E., Venteicher, A.S., Hebert, C.H., Carey, C.D., Rodig, S.J., *et al.* (2017). Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance.

Cell Stem Cell 20, 233–246 e237.

Liu, Q., Yu, S., Zhao, W., Qin, S., Chu, Q., and Wu, K. (2018). EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol. Cancer* 17, 53.

Lu, P.J., Sundquist, K., Baeckstrom, D., Poulsom, R., Hanby, A., Meier-Ewert, S., Jones, T., Mitchell, M., Pitha-Rowe, P., Freemont, P., *et al.* (1999). A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *J. Biol. Chem.* 274, 15633–15645.

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.

Obenauf, A.C., Zou, Y., Ji, A.L., Vanharanta, S., Shu, W., Shi, H., Kong, X., Bosenberg, M.C., Wiesner, T., Rosen, N., *et al.* (2015). Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 520, 368–372.

Olsen, E.A., Kim, Y.H., Kuzel, T.M., Pacheco, T.R., Foss, F.M., Parker, S., Frankel, S.R., Chen, C., Ricker, J.L., Arduino, J.M., *et al.* (2007). Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 25, 3109–3115.

Peters, S., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Gadgeel, S., Ahn, J.S., Kim, D.W., Ou, S.I., 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, H.J.M., Souquet, P.J., Quoix, E., Baik, C.S., Barlesi, F., Kim, T.M., 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.

Reck, M., Rodriguez-Abreu, D., Robinson, A.G., Hui, R., Csoszi, T., Fulop, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., *et al.* (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 375, 1823–1833.

Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T., and Herlyn, M. (2010). A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* *141*, 583–594.

Roesch, A., Vultur, A., Bogeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D., Korb, C., Laschke, M.W., Gimotty, P.A., Philipp, S.E., *et al.* (2013). Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* *23*, 811–825.

San-Miguel, J.F., Hungria, V.T., Yoon, S.S., Beksac, M., Dimopoulos, M.A., Elghandour, A., Jedrzejczak, W.W., Gunther, A., Nakorn, T.N., Siritanaratkul, N., *et al.* (2014). Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *15*, 1195–1206.

Sayegh, J., Cao, J., Zou, M.R., Morales, A., Blair, L.P., Norcia, M., Hoyer, D., Tackett, A.J., Merkel, J.S., and Yan, Q. (2013). Identification of small molecule inhibitors of Jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen. *J. Biol. Chem.* *288*, 9408–9417.

Sequist, L.V., Han, J.Y., Ahn, M.J., Cho, B.C., Yu, H., Kim, S.W., Yang, J.C., Lee, J.S., Su, W.C., Kowalski, D., *et al.* (2020). Osimertinib plus savolitinib in patients with EGFR mutation-positive, MET-amplified, non-small-cell lung cancer after progression on EGFR tyrosine kinase inhibitors: interim results from a multicentre, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol.* *21*, 373–386.

Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., *et al.* (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* *141*, 69–80.

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.

Soria, J.C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K.H., 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.

Takashina, T., Kinoshita, I., Kikuchi, J., Shimizu, Y., Sakakibara-Konishi, J., Oizumi, S., Nishimura, M., and Dosaka-Akita, H. (2016). Combined inhibition of EZH2 and histone deacetylases as a potential epigenetic therapy for non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* *107*, 955–962.

Taniguchi, H., Yamada, T., Wang, R., Tanimura, K., Adachi, Y., Nishiyama, A., Tanimoto, A., Takeuchi, S., Araujo, L.H., Boroni, M., *et al.* (2019). AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. *Nat. Commun.* *10*, 259.

Teng, Y.C., Lee, C.F., Li, Y.S., Chen, Y.R., Hsiao, P.W., Chan, M.Y., Lin, F.M., Huang, H.D., Chen, Y.T., Jeng, Y.M., *et al.* (2013). Histone demethylase RBP2 promotes lung tumorigenesis and cancer metastasis. *Cancer Res.* *73*, 4711–4721.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Sci.* *339*, 1546–1558.

Wu, X., Chen, H., and Wang, X. (2012). Can lung cancer stem cells be targeted for therapies? *Cancer Treat. Rev.* *38*, 580–588.

Yano, S., Wang, W., Li, Q., Matsumoto, K., Sakurama, H., Nakamura, T., Ogino, H., Kakiuchi, S., Hanibuchi, M., Nishioka, Y., *et al.* (2008). Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* *68*, 9479–9487.

Yoda, S., Lin, J.J., Lawrence, M.S., Burke, B.J., Friboulet, L., Langenbucher, A., Dardaei, L., Prutisto-Chang, K., Dagogo-Jack, I., Timofeevski, S., *et al.* (2018). Sequential ALK Inhibitors Can Select for Lorlatinib-Resistant Compound ALK Mutations in ALK-Positive Lung Cancer. *Cancer Discov.* *8*, 714–729.

Yu, H.A., Tian, S.K., Drilon, A.E., Borsu, L., Riely, G.J., Arcila, M.E., and Ladanyi, M. (2015). Acquired Resistance of EGFR-Mutant Lung Cancer to a T790M-Specific EGFR Inhibitor: Emergence of a Third Mutation (C797S) in the EGFR Tyrosine Kinase Domain. *JAMA Oncol.* *1*, 982-984.