

博士論文

消化器神経内分泌がんの細胞株を使用した前臨床モデルと
PARP 阻害剤、EZH2 阻害剤の有用性に関する検討

大本 晃弘

論文題目 消化器神経内分泌がんの細胞株を使用した前臨床モデルと PARP 阻害剤、EZH2 阻害剤の有用性に関する検討

所属 病因・病理学専攻，腫瘍病理学分野

指導教員名 中釜 斉 連携教授

申請者名 大本晃弘

要旨

消化器神経内分泌がん (NEC) の細胞株を使用して、PARP 阻害薬 (Veliparib)、EZH2 阻害薬 (Tazemetostat) の前臨床的検討を行った。Veliparib への感受性は PARP1 が高発現の脾原発株で高く、 γ -H2AX 発現上昇と共に S 期への cell cycle shift を認めた。本細胞株のマウスモデルにおいても Veliparib が有意な抗腫瘍効果を示した。Tazemetostat の感受性は食道原発株で良好であり、H3K27 トリメチルの脱メチル化と共にアポトーシスを誘導した。本研究は両薬剤が一部の消化器 NEC に有効な可能性を示唆し、各腫瘍による多様な薬剤の感受性、作用メカニズムを示した。

目次

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. 序文 | ・・・5 |
| 2. 方法 | |
| 1) 細胞株 | ・・・18 |
| 2) 使用薬剤 | ・・・20 |
| 3) Viability assay | ・・・20 |
| 4) ウェスタンブロットティング | ・・・21 |
| 5) リアルタイム定量 PCR | ・・・23 |
| 6) セルサイクルアッセイ | ・・・24 |
| 7) 蛍光染色 | ・・・25 |
| 8) マウスゼノグラフトモデル | ・・・25 |
| 9) マウス腫瘍の病理組織学的評価 | ・・・28 |
| 10) 統計解析 | ・・・29 |
| 3. 結果 | |
| 1) NEC 細胞株を移植したマウスゼノグラフトの病理組織学的特徴 | ・・・29 |
| 2) CDDP、ETP、CPT-11、SN-38 に対する薬物感受性と薬物相互作用 | ・・・32 |
| 3) NEC 細胞株における ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターならびに ERCC1 発現 | ・・・33 |
| 4) <i>In vivo</i> での EP 療法と IP 療法の抗腫瘍効果の比較 | ・・・35 |
| 5) 実験に使用した NEC 細胞株の遺伝子変異 | ・・・37 |
| 6) NEC 細胞株の Veliparib に対する薬剤感受性 | ・・・38 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| 7) NEC 細胞株、マウスゼノグラフトにおける PARP の発現 | ・・・ 39 |
| 8) Veliparib による DNA 修復機構への関与 | ・・・ 41 |
| 9) Veliparib によるセルサイクルの変化とセルサイクル制御因子の発現 | ・・・ 43 |
| 10) <i>In vivo</i> での Veliparib 単剤の抗腫瘍効果 | ・・・ 45 |
| 11) NEC 細胞株の Tazemetostat に対する薬剤感受性 | ・・・ 45 |
| 12) NEC 細胞株での EZH2、H3K27me3 の発現 | ・・・ 47 |
| 13) PARP 阻害薬感受性予測因子としての SLFN11 と Tazemetostat 投与に伴う SLFN11 発現レベルの変化 | ・・・ 50 |
| 14) Tazemetostat によるセルサイクルの変化とアポトーシス関連タンパクの発現 | ・・・ 51 |
| | |
| 4. 考察 | ・・・ 52 |
| | |
| 5. 引用文献 | ・・・ 64 |
| | |
| 6. 謝辞 | ・・・ 86 |

序文

神経内分泌腫瘍は神経内分泌細胞に由来する腫瘍であり、肺と消化器が二大原発臓器である。米国 SEER データベースによると、消化器系の原発部位別では小腸（人口 10 万人あたり 1.05 人）・直腸（人口 10 万人あたり 1.04 人）・膵（人口 10 万人あたり 0.48 人）の順に患者数が多いことが報告されている [1]。膵原発の神経内分泌腫瘍についてはその発症頻度は膵悪性腫瘍全体の 1-2%程度と低頻度であるが、画像診断の進歩に伴い早期診断される症例は近年増加傾向にある [1]。標準的な診断法は切除標本の病理組織学的診断であり、クロモグラニン A、シナプトフィジン、CD56 などの神経内分泌マーカーを診断の補助として使用する。大多数を占める低悪性度の神経内分泌腫瘍 (Neuroendocrine tumor: NET) においてはその進行は緩徐であり、外科的切除を中心として、ラジオ波焼灼術や肝動脈化学塞栓術を併用した集学的治療が症例により選択される [2-4]。全身療法としてはホルモン産生症状の抑制効果を有するソマトスタチンアナログや殺細胞性抗がん剤であるストレプトゾシン、分子標的薬であるエベロリムス、スニチニブが選択される [2]。エベロリムスは mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤、スニチニブはチロシンキナーゼ阻害剤であり、progression-free survival (PFS) の延長効果を証明した臨床試験の結果に基づいて前者は膵・消化管原発の、後者は膵原発の神経内分泌腫瘍に対して使用される [5-7]。

神経内分泌がん (Neuroendocrine carcinoma: NEC) は、神経内分泌腫瘍のうち病理学に定義された高悪性度のサブタイプである [8-9]。我が国の統計では膵 NEC、消化管 NEC の発症頻度はそれぞれ膵神経内分泌腫瘍、消化管神経内分泌腫瘍全体の約 8%、6%と報告されており、その希少性から臨床データは限られている [10]。急速な病勢

により多くの症例が診断時には遠隔転移を来しており外科手術の対象とはならず、全身療法が治療の主体となる [11]。実臨床では小細胞肺癌に対する治療に準じてシスプラチン (CDDP) をキードラックとした殺細胞性抗がん剤の併用療法が一般的に行われるが、診断後の median overall survival (OS) は 1.5 年未満と予後不良である [12-15]。また本疾患に関して生存期間延長効果を示した新規薬剤は存在せず、臨床開発に関しても十分に行われていないのが現状である。現在日本臨床腫瘍グループ (JCOG) において、CDDP/エトポシド (ETP) 併用療法 (EP 療法) と CDDP/イリノテカン (CPT-11) 併用療法 (IP 療法) を比較した世界初のランダム化第 III 相試験 (JCOG1213 試験、UMIN000014795) が行なわれており、その結果が待たれるところである。

2010 年に消化器原発の神経内分泌腫瘍に対する WHO 分類が改定され、10 high power field (HPF) あたりの核分裂数ならびに Ki-67 labeling index の二つの病理学的指標に基づき、neuroendocrine tumor grade 1 (NET G1)、neuroendocrine tumor grade 2 (NET G2) および neuroendocrine carcinoma (NEC) の 3 つのサブタイプに分類された (表 1) [8]。NEC は 10HPF あたりの核分裂像数 > 20 または Ki-67 labeling index > 20% を満たす病理学的に最もアグレッシブなサブタイプとされるが、従来からこのカテゴリーには低分化型の形態学的な小細胞がん・大細胞がん、高分化で形態学的に NET G1/NET G2 に類似した症例が混在することが分類上の問題点として指摘されていた。典型的には小細胞・大細胞がんでは、核細胞質比 (N/C 比) が高く核小体の明瞭な腫瘍細胞がびまん性に増生する。対照的に NET G1/NET G2 では、N/C 比が前者ほど高くなく核異型の弱い腫瘍細胞が索状に増生する。2017 年の WHO 分類の改定により、膵原発の神経内分泌腫瘍については新たに高分化型の neuroendocrine tumor grade 3 (NET G3) が定義され、小細胞がん・大細胞がんと病理学的に区分されることとなった (表 2) [9]。

表 1. 消化器神経内分泌腫瘍に対する WHO 2010 分類

| 分類 | 核分裂数 (10HPF) | Ki-67 index (%) |
|--------|--------------|-----------------|
| NET G1 | < 2 | ≤ 2 |
| NET G2 | 2-20 | 3-20 |
| NEC | > 20 | > 20 |

表 2. 膵神経内分泌腫瘍に対する WHO 2017 分類

| 分類 | 分化度 | 核分裂数 (10HPF) | Ki-67 index (%) |
|-----------------|-----------------------|--------------|-----------------|
| NET G1 | Well-differentiated | < 2 | < 3 |
| NET G2 | Well-differentiated | 2-20 | 3-20 |
| NET G3 | Well-differentiated | > 20 | > 20 |
| NEC G3 | Poorly differentiated | > 20 | > 20 |
| Small cell type | | | |
| Large cell type | | | |

消化器 NEC に対する網羅的ゲノム解析の報告はこれまでにない。Yachida らは 19 例の低分化型膵 NEC に対して病理学的な検討を行い、p53 と Rb の免疫組織化学染色による異常を各々95%、 74%の症例に認めることを報告した [16]。そのうち 7 例に

対するターゲットシーケンスでは *TP53* と *RBI* の不活性型変異を 57%、71%の症例に検出した。また、Hijioka らは 21 例の膵 NET G3 と 49 例の低分化型膵 NEC を病理学的に比較し、NET G3 では Ki-67 labeling index が低く (中央値 28.5%)、Rb の免疫染色によるタンパク欠失を一例にも認めなかったのに対し、NEC では Ki-67 labeling index が高く (中央値 80.0%)、Rb のタンパク欠失を 55%の症例に検出したことを報告した [17]。また *KRAS* 変異については NET G3 では一例も検出されなかったのに対して、NEC では 49%の症例で陽性であった。*TP53* と *RBI* の不活性型変異は小細胞肺がんを対象にした大規模な全ゲノム解析においては 100%、93%と高頻度に認めており、少数例の検討ながら *TP53* と *RBI* が主たる遺伝子変異であるという点において膵 NEC と小細胞肺がんの遺伝学的な類似性が示唆される [18]。肺癌の WHO 2015 分類において、小細胞がんは神経内分泌腫瘍の一亜型として新たに分類されることとなった [19]。消化器 NEC の遺伝学的背景が十分に明らかとなっていない現状のもとで、肺原発の小細胞型神経内分泌がんである小細胞肺がんに関する知見を参考にして本疾患に対する前臨床的研究を行うことは有効と考えられる。

Byers らは小細胞肺がんと非小細胞肺がんの分子遺伝学的特徴を比較し、poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) ならびに enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) が小細胞肺がんを高発現をしていることを明らかにした [20]。PARP1 は E2F transcription factor 1 (E2F1) の活性化因子であり、同時に E2F1 によって活性化される下流のターゲット分子である。同様に EZH2 は E2F1 のターゲット分子である [21] (図 1)。

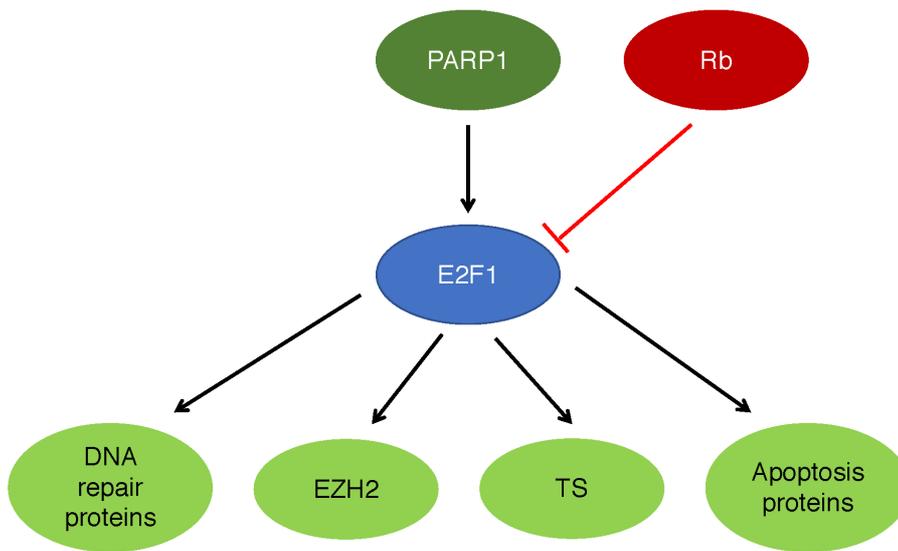


図 1. 小細胞肺がんで亢進している signaling pathway と PARP1、E2F1、EZH2 の関連 (文献 20 より改変)

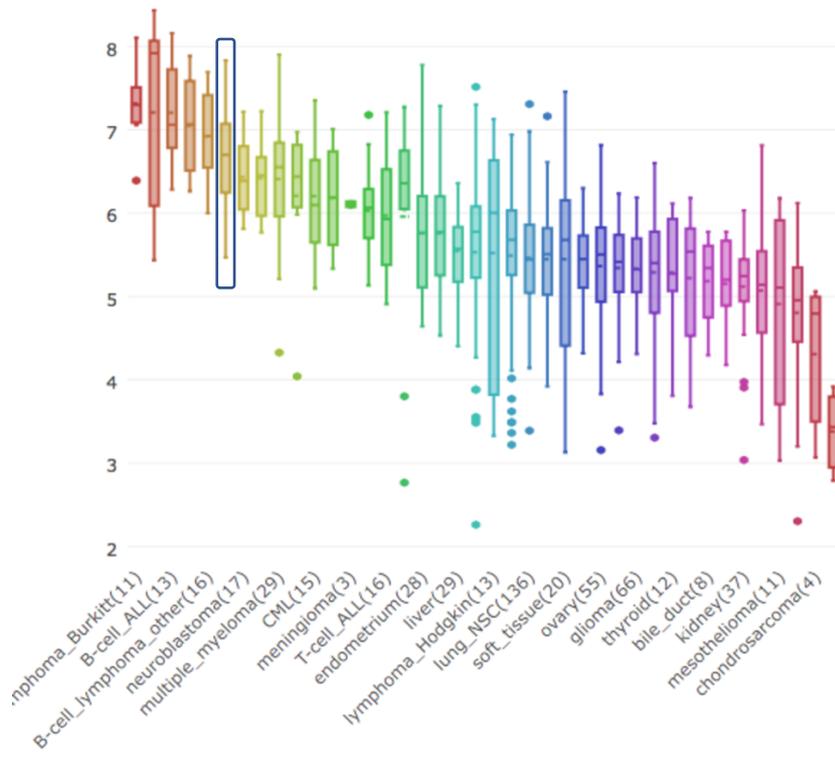
E2F1 の下流にある DNA 修復関連タンパクの中には PARP1 が含まれる。

Cancer Cell line Encyclopedia (CCLE) プロジェクトでデポジットされた小細胞肺がんの RNA-seq データに基づく PARP1・EZH2 mRNA 発現は、全 40 種のがん種の中で B 細胞性リンパ腫や急性リンパ性白血病に次ぎ固形腫瘍の中では最も高かった (図 2)。

(<https://portals.broadinstitute.org/ccle/page?gene=PARP1>)

(<https://portals.broadinstitute.org/ccle/page?gene=EZH2>)

(PARP1 mRNA)



(EZH2 mRNA)

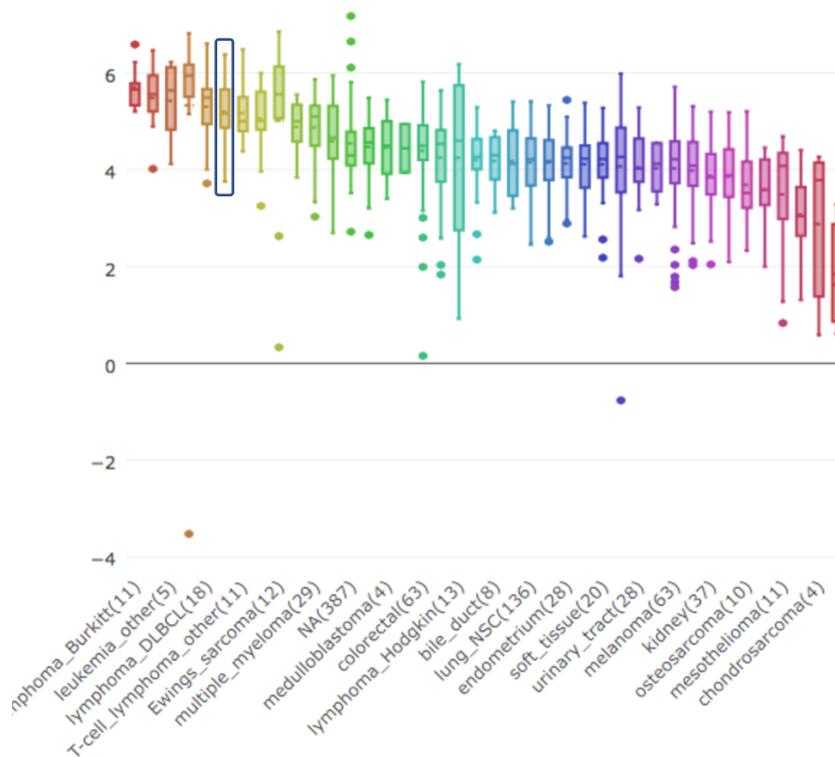


図 2. 40 がん種における PARP1、EZH2 の mRNA 発現レベル (RNAseq; CCLE データより)

PARP1 は total PARP activity の 90%以上の活性をもち、5-10%の活性を有する PARP2 と共に DNA 塩基除去修復に中心的な役割を果たしている [22-24]。PARP-1 は切断された DNA 一本鎖に結合し、NAD⁺を基質として種々のサイズの poly ADP-ribose (PAR) を産生する (PARylation) [25-27]。PARP 阻害薬は PARylation を抑制することで DNA 一本鎖切断が修復されずに蓄積し、複製フォークの崩壊を介して DNA 二本鎖切断を誘導する (図 3) [28]。また同時に損傷を受けた DNA で PARP を trapping して細胞毒性のある PARP-DNA 複合体を形成することによって、直接的な細胞毒性を示す [29]。

PARP 阻害薬に対する良好な感受性を予測する最も代表的なバイオマーカーは相同組み換え修復機構の欠損である [30]。2005 年に Farmer ら、Bryant らは各々 BRCA における不活性型の遺伝子変異を有するケースでは相同組み換えが正常に機能せず、PARP 阻害薬によって生じた DNA 二本鎖切断が修復されずに最終的に細胞死に至る合成致死の概念を明らかにした (図 3) [31-32]。BRCA 阻害、PARP 阻害単独での作用は限定的であるが、双方の作用が組み合わさることで細胞に致命的な影響をもたらす。Farmer らの *in vitro* の検討では、BRCA 変異を有する細胞株では変異のない細胞に比較し PARP 阻害薬の感受性は 1000 倍程度高かった [31]。相同組み換えが機能しない場合、DNA 二本鎖切断に対する代償的な修復機構としてエラーの多い非相同末端再結合、更には代替非相同末端再結合、一本鎖アニーリングが起こり、ゲノム不安定性につながるということが知られている [22]。また近年、相同組み換えならびに非相同末端再結合が抑制された条件下で、PARP1 阻害により代替非相同末端再結合が抑制され細

胞死を誘導する新たなメカニズムが提唱されている [33-34]。合成致死は正常細胞への影響が少なく腫瘍特異性が高く、がん抑制遺伝子の機能喪失型変異に対する有効なアプローチである。

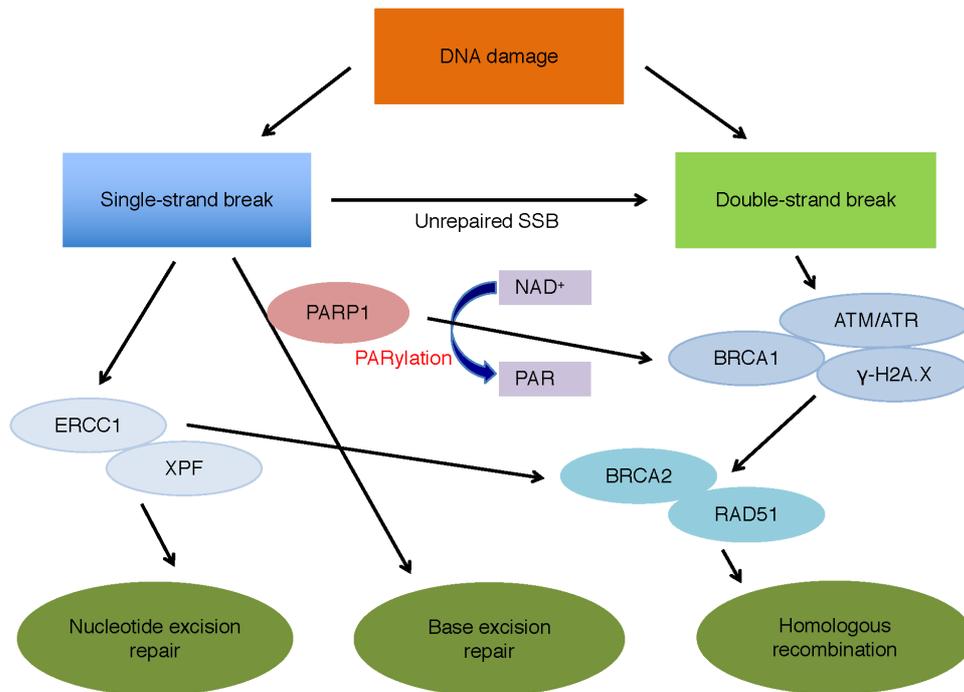


図 3. PARP 阻害薬の作用メカニズムと DNA 修復機構

PARP 阻害薬は PARylation を抑制することで PARP1 による塩基除去修復を阻害する。この結果、DNA 一本鎖切断が修復されずに蓄積し複製フォークの崩壊を介して DNA 二本鎖切断を誘導する。*BRCA* における不活性型の遺伝子変異を有するケースでは相同組み換え修復が正常に機能せず、DNA 二本鎖切断が修復されずに最終的に細胞死に至る。

現在は、*BRCA1/2* に限らず *ATM*、*ATR*、*CHEK1*、*CHEK2*、*RAD51*、*PALB2*、*PTEN*、*Fanconi anemia genes* といった他の相同組み換え修復に関連する遺伝子変異を有する腫瘍やプロモーターのメチル化による *BRCA1* の不活化あるいは *BRCA2* の転写を抑制する *EMSY* 遺伝子が増幅した腫瘍についても *BRCAness* と呼ばれ、合成致死のメカニ

ズムにより奏効が期待される [35-37]。The Cancer Genomic Atlas (TCGA) プロジェクトによる卵巣がん 316 例の統合ゲノム解析によると、33%の症例に *BRCA1* もしくは *BRCA2* の遺伝子異常を検出し、相同組み換え修復に関連する遺伝子全体では約半数の症例に及んだ [38]。そのため、合成致死は実臨床に大きなインパクトを持つアプローチとすることができる。その他の PARP 阻害薬の奏効を予測するバイオマーカーとして、臨床的なプラチナ製剤への感受性 [39]、ゲノム不安定性に関する指標である Homologous Recombination Deficiency (HRD) スコア [40]、免疫染色による細胞質内 PARP1 の高発現 [41]、末梢血単核細胞中の高濃度 PAR もしくは細胞質内の PAR 高発現 [42-43] などが報告されている。

小細胞肺癌については近年、相同組み換え修復に関連する分子の一つである schlafen family member 11 (SLFN11) の発現が PARP 阻害薬の感受性に関連することが明らかにされている [44]。SLFN11 は DNA 傷害部位にリクルートされ、相同組み換え修復の起点となる replication protein A (RPA) ポリマーを取り除くことで RPA-1 本鎖 DNA の結合を阻害する。その結果、G1/S arrest により DNA 複製の阻害を起こすと共に、相同組み換え機構を抑制することで細胞死を誘導する [45]。

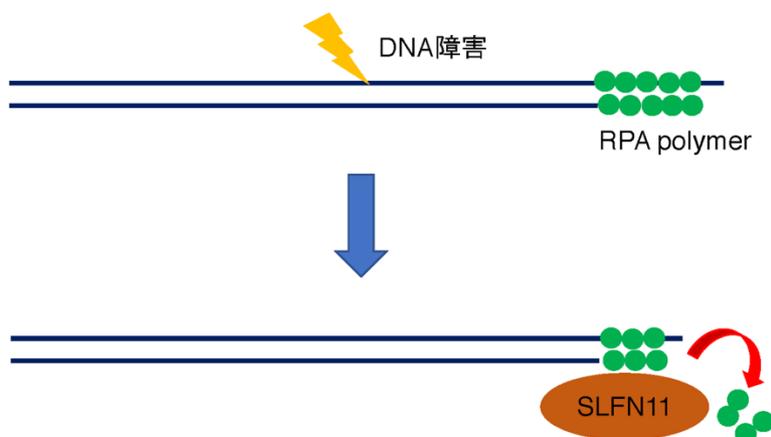


図 4. DNA 障害と SLFN11 の発現 (文献 45 より改変)

DNA 障害が起こると SLFN11 が障害を受けた部位にリクルートされる。相同組み換え修復機構の起点となる replication protein A (RPA) ポリマーと DNA との結合を阻害することで、以降の相同組み換え修復機構の進行を阻害する。

ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有する EZH2 は、embryonic ectoderm development (EED) や suppressor of zeste 12 (SUZ12) と共に polycomb repressive complex2 (PRC2) を構成するサブユニットの一つであり、ヒストン H3 リシン 27 の (H3K27) ジメチル化 (H3K27me2) ならびにトリメチル化 (H3K27me3) を介して、エピジェネティックな遺伝子の発現制御に関わる [46]。これまでの研究から EZH2 は腫瘍の増殖を促進し、予後不良なサブタイプとの関連が示唆されている [21,47]。EZH2 変異のプロファイルは各がん種により異なり、B 細胞性リンパ腫においては H3K27me3 の発現を亢進させる Y646、A682、A692 等の活性化型変異が報告される一方で、骨髄系腫瘍では不活性型変異が特徴的とされる [48-50]。本薬剤の奏効に関わるバイオマーカーとして EZH2 活性化型変異に加え、PRC2 に拮抗する ARID1A、SMARCA4、SMARCB1 等の SWI/SNF サブユニット、BAP1、KDM6A の不活性型変異が報告されている [48, 51-54]。44 のがんゲノム解析研究を対象にしたメタアナリシスによれば、SWI/SNF サブユニットをコードする遺伝子の不活性型変異を全がん種症例の約 20%で認めた [55]。がん種別では ARID1A の変異は卵巣明細胞がん、胃がん、膀胱がん、肝細胞がん、悪性黒色腫、SMARCA4 については卵巣明細胞がんの 10%以上の症例でそれぞれ検出された。SWI/SNF 関連タンパクと EZH2 はエピジェネティックに拮抗的な作用をしており、SWI/SNF 関連の不活性型変異のある症例では EZH2 への機能的依存が高まり、EZH2 阻害薬を投与すると合成致死を起こすと考えられている

る (図 4) [56-58]。Knutson らは Rhabdoid tumor の前臨床モデルにおいて、EZH2 阻害薬により *SMARCB1* 変異のある細胞株ではアポトーシスが誘導され、薬剤への感受性が亢進することを報告した [59]。

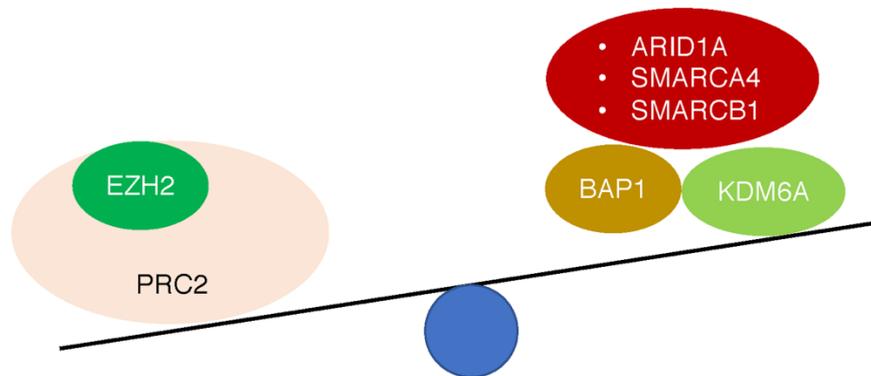


図 5. SWI/SNF 関連タンパクと EZH2 の機能的拮抗 (文献 56 より改変)

ARID1A、*SMARCA4*、*SMARCB1* 等の SWI/SNF サブユニットに不活性型変異が存在すると、PRC2 の安定を維持するために EZH2 への機能的依存が高まり、EZH2 を阻害することで合成致死に至る。

PARP 阻害薬と EZH2 阻害薬に関しては各々臨床開発が進行している。現在欧米では Olaparib、Rucaparib、Niraparib、Talazoparib の 4 種の PARP 阻害薬が実地診療で使用されており (卵巣がんに対して Olaparib、Rucaparib、Niraparib、乳がんに対して Olaparib、Talazoparib が使用される)、Veliparib の臨床試験も進行中である。我が国では 2018 年に Olaparib が「再発卵巣がんの維持療法」ならびに「既治療の *BRCA* 変異かつ *HER2* 陰性の手術不能・再発乳がん」に対して承認された。PARP 阻害薬については薬剤ごとに抗腫瘍効果ならびに毒性のプロファイルが異なることが明らかにされている。Veliparib は PARP1/PARP2 阻害活性をもつ薬剤であり、PARylation を引き起こす酵素触媒作用は強力な一方で、PARP-trapping activity は相対的に弱い。そのた

め単剤での抗腫瘍効果はマイルドである一方で、血液毒性・非血液毒性が共に軽度であることから殺細胞性薬剤との併用に適した薬剤と考えられる [60]。乳がん患者の根治切除を目指した術前化学療法における Veliparib の上乗せ効果を検証した第 III 相試験では、Veliparib/ Paclitaxel (PTX) / Carboplatin (CBDCA) 併用群の complete response rate は PTX/ CBDCA 併用群とは有意差はなかったものの、PTX 単独群よりも有意に高かった (53% vs. 31%, $P < 0.0001$) [61]。初発の小細胞肺癌に対しては Owonikoko らが Veliparib と EP 療法の併用第 1 相試験を行い、overall response rate (ORR) 71% と有望な結果を報告している [62]。また最近 Pietanza らは再発治療抵抗性の小細胞肺癌 104 例に対して、Temozolomide (TMZ) / Veliparib 併用レジメンと TMZ / プラセボを比較したランダム化第 2 相試験の結果を報告した [63]。この試験ではプライマリーエンドポイントとしての 4 ヶ月時点での PFS には有意差を認めなかったものの、TMZ / Veliparib レジメンを受けた症例に対するサブグループ解析においては、PFS、OS 共に免疫染色で SLFN11 陽性例が陰性例よりも有意に良好であった (median PFS: 5.7 months vs. 3.6 months, $P = 0.009$; median OS: 12.2 months vs. 7.5 months, $P = 0.014$)。一方、EZH2 阻害薬に対する臨床開発はこれまで単剤中心に行われてきており、最近報告された Italiano らによる Tazemetostat の第 1 相試験では、治療抵抗性・再発 B 細胞性リンパ腫、進行期固形腫瘍における ORR は各々 38%、5% であった [64]。Tazemetostat は EZH2 の選択的阻害剤であり、EZH1 に比較し約 35 倍高い EZH2 阻害活性を有する [59]。

低分化型消化器 NEC の病態の理解・新規治療開発の上で前臨床モデルの樹立が不可欠であるが、本疾患はもともと希少である上に、進行期での診断例が多いため手術標本を摘出する症例が少なく、細胞株樹立に関する研究は限られている。これまでに

大細胞型 NEC については胃食道接合部原発の NEC-DUE1 [65-66]、結腸直腸由来の NEC-DUE2 [65-66]、結腸由来の HROC57 [67]、小細胞型 NEC については肛門管原発の NEC-DUE3 [68] の報告がある (表 3)。

表 3. これまでに樹立が報告された消化器 NEC 細胞株

| 細胞株 | 原発臓器 | 組織型 | Ki-67 index (%) | 報告年 |
|---------------------------|--------|-----------------|-----------------|------|
| NEC-DUE1 ⁶⁵⁻⁶⁶ | 胃食道接合部 | Large cell type | 80% | 2014 |
| NEC-DUE2 ⁶⁵⁻⁶⁶ | 結腸直腸 | Large cell type | 80% | 2014 |
| HROC57 ⁶⁷ | 結腸 | Large cell type | > 80% | 2018 |
| NEC-DUE3 ⁶⁸ | 肛門管 | Small cell type | 90% | 2018 |

こうした現状を踏まえて、著者らははじめに膵臓由来の細胞株 (A99)、十二指腸由来の細胞株 (TCC-NECT-2)、食道由来の細胞株 (TYUC-1) の3種の小細胞型 NEC 細胞株を用いて、実地臨床で汎用され上述の JCOG1213 試験で比較をされている CDDP をはじめとした殺細胞性抗がん剤の抗腫瘍効果を *in vitro*、*in vivo* の両面から評価し、各細胞株の薬剤感受性の差をもたらすメカニズムについて考察を行った [69]。さらにこの結果をもとに将来的な臨床応用を視野に入れて、PARP 阻害薬 (Veliparib) ならびに EZH2 阻害薬 (Tazemetostat) の有効性に関して細胞株を用いた薬剤の抗腫瘍効果ならびに作用メカニズムに関する検討を行った。

方法

一連の研究は「網羅的ゲノム解析による消化器神経内分泌腫瘍の原因解明と新規診断・治療法の開発に関する研究」【課題管理番号：2015-114】の一環として行われた。国立がん研究センターの研究倫理審査委員会で承認され、ヘルシンキ宣言と動物福祉の原則にのっとり行われた。また動物実験のプロトコールは国立がん研究センター研究所の動物実験倫理委員会において承認された。

1. 細胞株

本研究においては3種の消化器原発小細胞型 NEC 細胞株を使用した。NEC の起源細胞は同定されていない。従って、原発臓器の正常細胞由来不死化細胞株である膵管細胞株 (hTERT-HPNE) (American type culture collection より購入、Cell number: CRL-4023™) と十二指腸細胞株 (HD) (国立がん研究センター研究所の清野 透 分野長らにより樹立) を遺伝子発現およびタンパク発現を比較するためのコントロール細胞株として使用した。A99 ならびに TCC-NECT-2 については、細胞株の入手にあたり Material Transfer Agreement を締結した。

(A99)

転移性膵原発 NEC 剖検症例の肝転移巣より樹立された接着細胞株である [70]。本症例は 60 歳代の白人女性で、初回治療として EP 療法を 6 コース施行後に増悪を認め、2 次治療として BCL-2 阻害薬を投与された。20% fetal bovine serum (FBS)、ペニシリン

100 U/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL を添加した DMEM で培養し、継代は 0.25% のトリプシンで 3-5 日毎に行った。培養にはポリ-L-リシンコーティングディッシュを使用した。

(TCC-NECT-2)

短期間の薬物治療（詳細不明）を受けた十二指腸原発 NEC 症例の腹水より樹立された浮遊細胞である [71]。10% FBS、ペニシリン 100 U/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL を添加した DMEM で培養し、継代は 3-5 日毎に行った。

(TYUC-1)

食道原発 NEC 症例の手術検体より樹立され、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) 細胞バンクより購入した浮遊細胞である (Cell number: JCRB 1512) [72]。本症例は 50 歳代の日本人女性で手術前に化学療法は施行されなかった。10% FBS、ペニシリン 100 U/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL を添加した DMEM/Ham's F12 メディウムで培養し、継代は 3-5 日毎に行った。

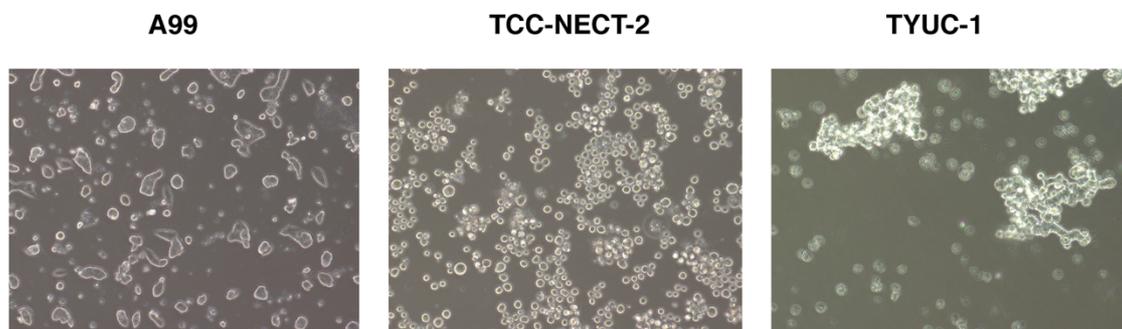


図 6. 消化器原発小細胞型 NEC 細胞株

2. 使用薬剤

CDDP (4291401A2069, Nichi-Iko)、CPT-11 (4240404A1040, Yakult)、ETP (055-08431, Wako)、SN-38 (7-ethyl-10-hydroxy-CPT) (C0154, LKT Laboratories)、Veliparib (A10026-100, AdooQ BioScience)、Tazemetostat (S7128, Selleck) を使用した。CDDP、CPT-11 は各々 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の原液を使用した。ETP については粉末をメタノール、SN-38、Veliparib、Tazemetostat については粉末をジメチルスルホキシドで各々溶解し、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶解液ストックを作成した。*In vitro* の実験では上記の液をメディアウムで希釈して細胞株に投与し、*in vivo* の実験では生理食塩水で所定の濃度に希釈してマウスに投与した。

3. Viability assay

CellTiter 96[®]AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega) を使用し評価を行った。1 ウェルあたり A99 では 3×10^3 個、TCC-NECT-2 と TYUC-1 では 1×10^4 個の細胞を 96 ウェルプレートに播き、CDDP、CPT-11、ETP、SN-38、Veliparib については 4 日間、Tazemetostat については 6 日間薬剤を投与した。各ウェルに 20 μL の CellTiter 96[®]AQueous One Solution Reagent (Promega) を加え 3 時間反応させた後に 490 nm の波長で viable cell を測定した。個々の薬剤の 50%増殖阻害濃度 (IC_{50}) は用量反応曲線により決定され、各薬剤につき 2 プレート以上のサンプルを使用して実験を行った。殺細胞性抗がん剤 (CDDP、CPT-11、ETP) に関しては Chou らにより提案された combination index (CI) を用いて薬物相互作用の評価を行い、 $\text{CI} < 1$ を相乗作用、 $\text{CI} =$

1 を相加作用、 $CI > 1$ を拮抗作用と判定した [73]。一方、分子標的薬の Veliparib については Owonikoko らにより提唱されたアルゴリズムに基づき、単剤の IC_{50} に比較し薬物併用時に IC_{50} が 50%以上低下する場合に増強作用があると判定した [74]。Tazemetostat の増殖抑制効果については Cell Proliferation Assay Kit に加え、自動セルカウンターを使用した。1 ウェルあたり 2.5×10^5 個の TCC-NECT-2 と TYUC-1 を 6 ウェルプレートに播き、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Tazemetostat を 7 日間投与した。投与 4 日後と 7 日後に Countess II Automated Cell counter を用いて viable cell をカウントした。

4. ウェスタンブロッティング

A99、TCC-NECT-2、TYUC-1 を 6 ウェルプレートに播き、CDDP、Veliparib を単剤もしくは併用で 24 時間投与した。Tazemetostat については実験に応じて単剤で 4 日、7 日、10 日間投与を行い、投与 4 日後、7 日後にそれぞれメEDIUMの交換を行った。薬物処置後のペレットを回収し、cell lysis buffer (Wako) を用いて細胞溶解液を抽出し上清を回収した。BCA protein assay を用いてタンパクを定量し、sodium dodecyl sulfate (SDS) containing buffer 添加後に 100°C で 5 分間加熱処理を行った。ポリアクリルアミドゲルの各ウェルに 15 μg もしくは 20 μg の均一量のタンパクをアプライし電気泳動を行い、polyvinylidene fluoride membrane (Bio-Rad) に転写を行った。転写されたメンブランをブロッキング後に 1 次抗体に浸して 4°C で一晩反応させた。2 次抗体で更に 1 時間反応させ、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) にメンブランを浸した後、ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare Japan) を使用して化学発光のシグナルを検出した。内在性コントロール遺伝子として GAPDH を

使用した。ウェスタンブロッティングで使用した1次抗体、2次抗体とその希釈倍率は以下の通りである。

(1次抗体)

マウス ABCB1 抗体 (sc-55510; Santa Cruz Biotechnology)、1:100

ラビット PARP1 抗体 (9542S; Cell Signaling Technology)、1:1000

ラビット poly(ADP-ribose)抗体 (4336-BPC-100; Trevigen)、1:1000

ラビット cleaved PARP1 抗体 (9541; Cell Signaling Technology)、1:1000

ラビット γ -H2AX 抗体 (9718; Cell Signaling Technology)、1:500

ラビット H2 A.X 抗体 (2595S; Cell Signaling Technology)、1:500

ラビット ERCC1 抗体 (ab129267; Abcam)、1:500

マウス SLFN11 抗体 (sc374339; Santa Cruz Biotechnology)、1:100

ラビット tri-methyl-Histone H3 (Lys27)抗体 (9733S; Cell Signaling Technology)、
1:500

ラビット Histone H3 抗体 (4499S; Cell Signaling Technology)、1:2000

マウス GAPDH 抗体 (sc32233; Santa Cruz Biotechnology)、1:1000

(2次抗体)

Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1031-05; SouthernBiotech)

Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (4051-05; SouthernBiotech)

5. リアルタイム定量PCR

A99、TCC-NECT-2、TYUC-1 を6ウェルプレートに播き、ペレットを回収した。Veliparib 10 µg/mL を単剤で24時間投与した。RNeasy® Mini Kit (Qiagen) を使用してプロトコールに従い total RNA を抽出した。1 µg の RNA を定量し SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて、cDNA に逆転写された。cDNA は MiniOpticon™ real-time polymerase chain reaction (PCR) detection system (Bio-Rad) により増幅され、SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad) により検出された。各々のターゲット遺伝子の発現は GAPDH を内在性コントロール遺伝子として標準化された。異なる2サンプルを使用して実験を行い、Cyclin A、CDK2 については異なる3サンプルを使用した。プライマー (Sigma-Aldrich Japan) の配列は以下の通りである。

ABCB1 forward: 5'-GAGAGATCCTCACCAAGCGG-3'

ABCB1 reverse: 5'-CGAGCCTGGTAGTCAATGCT-3'

ABCC1 forward: 5'-CTACCTCCTGTGGCTGAATCTG-3'

ABCC1 reverse: 5'-CATCAGCTTGATCCGATTGTCT-3'

ABCC2 forward: 5'-TAATGGTCCTAGACAACGGG-3'

ABCC2 reverse: 5'-GGGCCTTCTGCTAGAATTT-3'

ERCC1 forward: 5'-TTGTCCAGGTGGATGTGAAA-3'

ERCC1 reverse: 5'-GCTGGTTTCTGCTCATAGGC-3'

PARP1 forward: 5'-TCTTTGATGTGGAAAGTATGAAGAA-3'

PARP1 reverse: 5'-GGCATCTTCTGAAGGTCGAT-3'

PARP2 forward: 5'-GTGGAGAAGGATGGTGAGAAAG-3'

PARP2 reverse: 5'-CTCAAGATTCCCACCCAGTTAC-3'

SLFN11 forward: 5'-GGCCCAGACCAAGCCTTAAT-3'

SLFN11 reverse: 5'-CACTGAAAGCCAGGGCAAAC-3'

EZH2 forward: 5'-TTGTTGGCGGAAGCGTGTAATAATC-3'

EZH2 reverse: 5'-TCCCTAGTCCCGCGCAATGAGC-3'

Cyclin A forward: 5'-CTTGTAGGCACGGCTGCTAT-3'

Cyclin A reverse: 5'-CATGTTGTGGCGCTTTGAGG-3'

CDK2 forward: 5'-TTGGAGTCCCTGTCCGAACT-3'

CDK2 reverse: 5'-CGGGTCACCATTTCAGCAAAG-3'

GAPDH forward: 5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3'

GAPDH reverse: 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'

6. セルサイクルアッセイ

A99、TCC-NECT-2、TYUC-1 を 6 ウェルプレートに播き、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Veliparib を 24 時間投与した。TYUC-1 については、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Tazemetostat を 4 日間もしくは 7 日間投与し、投与 4 日後にメディアウムの交換を行っ

た。細胞ペレットを回収し洗浄後、100%メタノールを緩徐に加え-20°Cで一晩冷却し固定を行った。固定された細胞ペレットに RNaseA (Nippon Gene) を加え 37°Cで 30 分間反応させ、propidium iodide (Sigma-Aldrich) を加え 4°Cの暗室で更に 60 分間以上反応させた。EC800 flow cytometry (SONY) を使用して、1 サンプルあたり 20000 個の細胞を解析して sub-G1、G1、S、G2/M 期に属する細胞の割合を算出した。異なる 3 サンプルを使用して実験を行った。

7. 蛍光染色

A99 を 8 ウェルチャンバースライドに播き、CDDP 3 μ g/mL、Veliparib 10 μ g/mL を単剤もしくは併用で 24 時間投与した。4%のparaホルムアルデヒドに 10 分間浸して固定を行い、0.1 % Triton X (MP Biomedicals) を添加した PBS に 5 分間浸して透過処理を行った。200 倍希釈のラビット γ -H2 A.X 抗体に 4°Cで一晩反応させた。500 倍希釈の 2 次抗体 (Goat anti-rabbit IgG1, Alexa Fluor 546) で 1 時間反応させ、核を Hoechst 33342 (Invitrogen) で染色した。染色スライドを PermaFluor™ aqueous mounting medium (Thermo Fisher Scientific) で包埋し、BZ-X700 蛍光顕微鏡 (Keyence) で観察した。Nuclear foci 5 個以上もしくは核全体が染色されている細胞を陽性細胞と判定し、異なる 3 サンプルを使用して各サンプルあたり 200 個以上をカウントし γ -H2 A.X の染色陽性率を算出した。

8. マウスゼノグラフトモデル

5 週齢の BALB/c ノードマウスを Charles River Laboratories Japan より購入した。マウスに投与する薬剤 (CDDP、ETP、CPT-11、Veliparib) は、各々 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶解液をマウス体重 10g 当たり 0.1mL の換算で生理食塩水を用いて希釈し投与した。治療効果と毒性は治療開始後より 1 週間毎に測定される腫瘍量ならびに体重の変化により評価を行い、腫瘍量は長径 \times (短径)²/2 の式を使用して算出した。治療開始時の腫瘍量・体重に対する各測定日の腫瘍量・体重を相対腫瘍量・相対体重と定め、平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で表示した。

8.1. CDDP/ETP、CDDP/CPT-11 併用療法

A99、TCC-NECT-2 についてはマウス 1 匹あたり 2.5×10^6 個、TYUC-1 については 5×10^6 個の細胞を 200mL の phosphate buffered saline (PBS) に希釈して背部の皮下に移植し、腫瘍量が 130-250mm³ に到達した時点で薬物投与を開始した。

A99、TCC-NECT-2 を移植したマウスを各々 4 群に分け、日本臨床腫瘍グループ (JCOG) の CDDP/エトポシド (ETP) 併用療法 (EP 療法) と CDDP/イリノテカン (CPT-11) 併用療法 (IP 療法) を比較したランダム化第 III 相試験 (JCOG1213 試験, UMIN000014795) に使用されている薬剤投与量に準拠して、以下の投与スケジュールに従い 28 日間の 1 サイクルを施行した (図 7)。TYUC-1 は比較的低い細胞密度で緩やかに増殖する腫瘍であり、腫瘍の生着は他の細胞株に比較して不良であった。そのため各治療群に割り付けは行わず、28 日間無治療で観察し実験終了時に腫瘍を摘出した。

1. Control 群：無治療経過観察.

2. CDDP 単独投与群 : 4.4 mg/kg day 1 腹腔内投与.
3. CDDP/ETP 併用群 : 4.4 mg/kg day CDDP 1 + 5.5 mg/kg day ETP 1-3 腹腔内投与.
4. CDDP/CPT-11 併用群 : 3.3 mg/kg CDDP day 1 + 3.3 mg/kg CPT-11 day 1, 8, 15
腹腔内投与.

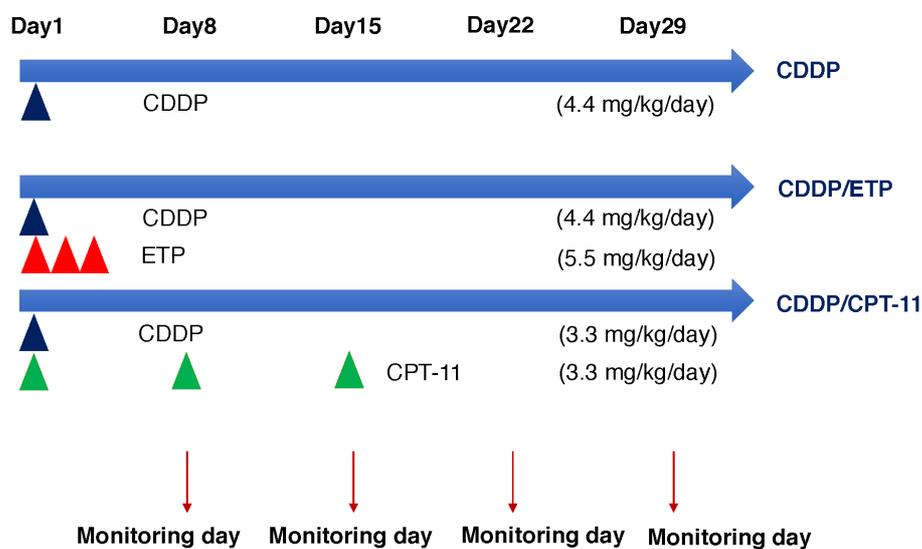


図 7. CDDP/ETP、CDDP/CPT-11 併用療法の *in vivo* 投与スケジュール

8.2. Veliparib 単独療法

マウス 1 匹あたり 1.5×10^6 個の A99 を PBS で希釈して背部の皮下に移植し、腫瘍量が 95-190 mm³ に到達した時点で薬物投与を開始した。マウスは 2 群に分けられ、以下の投与スケジュールに従い 21 日間の 1 サイクルを施行した (図 8)。Veliparib について

は、同薬剤を使用したマウス実験の既報告に基づき効果と毒性のバランスを考慮して投与量を設定した [75-76]。

1. Control 群：生理食塩水 day 3, 10, 17 腹腔内投与.
2. Veliparib 投与群：25 mg/kg day 1-5, 8-12, 15-19 経口投与.

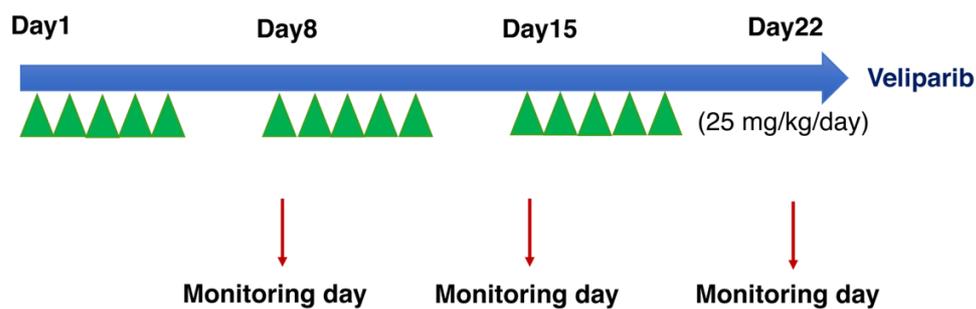


図 8. Veliparib 単剤の *in vivo* 投与スケジュール

9. マウス腫瘍の病理組織学的評価

マウス実験終了時に摘出された腫瘍をホルマリンで固定、パラフィン包埋し組織ブロックを作成した。ブロックは 4 μm の厚さでスライスされ、ヘマトキシリン・エオジン (HE 染色) ならびに免疫染色用の組織スライドを作成した。一連の染色は EnVision™ FLEX system manual protocol (DAKO) のマニュアルプロトコールに準じて行った。実験で使用した 1 次抗体とその希釈倍率は以下の通りである。

ラビット Ki-67 抗体 (Leica Biosystems)、1:5000

ラビット chromogranin A 抗体 (412751; Nichirei Biosciences)、1:1

ラビット synaptophysin 抗体 (Epitomics)、1:10000

ラビット PARP1 抗体 (9542S; Cell Signaling Technology)、1:50

ラビット ERCC1 抗体 (ab129267; Abcam)、1:50

Ki-67 labeling index は viable な腫瘍細胞が存在する領域の中で、Ki-67 index が最も高い範囲を選択し 2000 個以上の細胞をカウントして算出した。

10. 統計解析

全ての統計解析は、Prism version 7.0a software (GraphPad Software) を用いて行った。2 群間の統計学的有意差検定は unpaired *t*-test、3 群以上の群間比較は one-way ANOVA with post-hoc Tukey's multiple comparisons test により行い、両側検定で $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

結果

1. NEC 細胞株を移植したマウスゼノグラフトの病理組織学的特徴

A99 (図 9 A-D)、TCC-NECT-2 (図 10 A-D)、TYUC-1 (図 11 A-D)を移植したゼノグラフト試料より採取した腫瘍の病理組織像を示す。HE 染色においては小型の N/C 比の高い均一な形態の腫瘍細胞が solid もしくは nested pattern を呈して増殖していた (図 9 A、図 10 A、図 11 A)。Ki-67 index は A99: 74% (図 9 B)、TCC-NECT-2: 74% (図 10 B)、TYUC-1: 58% (図 11 B) であった。A99、TCC-NECT-2 ではクロモグラニン A とシナ

プトフィジンがびまん性に染色され (図 9 C-D、図 10 C-D)、TYUC-1 では限局性に染色された (図 11 C-D)。いずれも WHO 2017 分類における NEC G3 (Small cell type) に矛盾しない所見であり、細胞株が小細胞型 NEC であることがマウスゼノグラフトの病理組織学的評価により確認された。

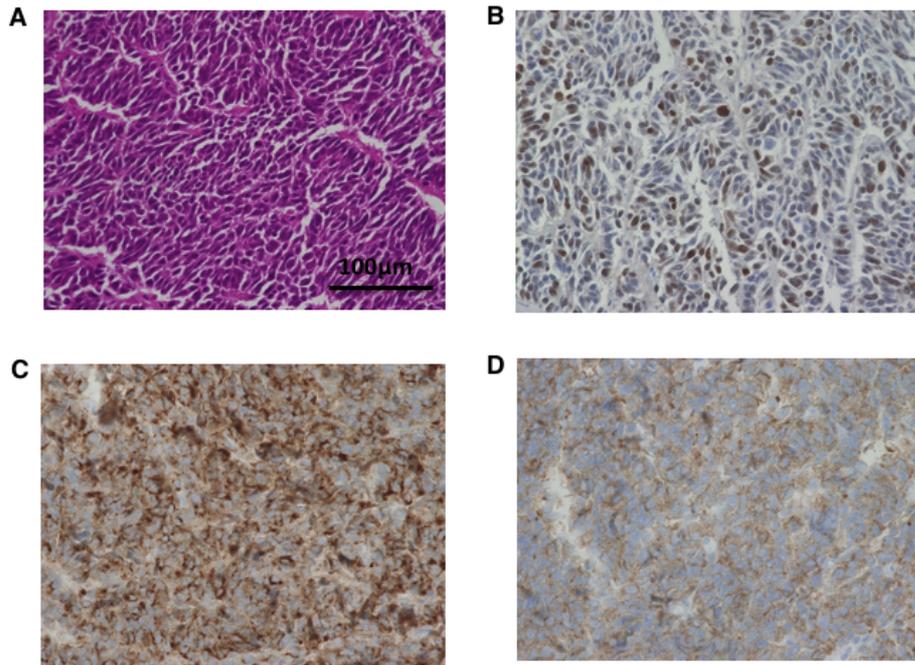


図 9. A99 ゼノグラフト組織の病理組織像：HE 染色 (図 A)、Ki-67 染色 (図 B)、クロモグラニン A 染色 (図 C)、シナプトフィジン染色 (図 D)の結果を示す。

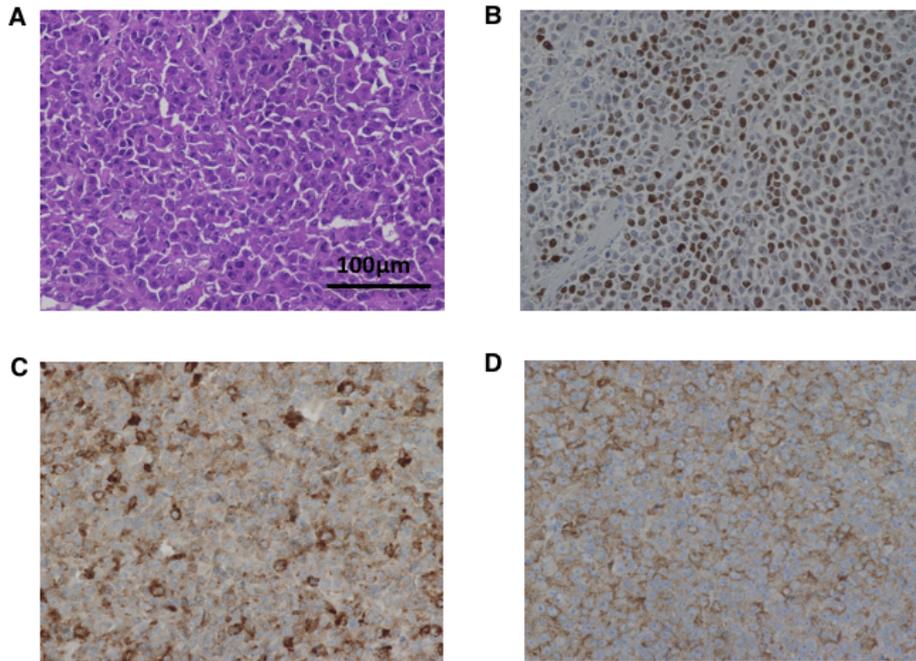


図 10. TCC-NECT-2 ゼノグラフトの病理組織像：HE 染色 (図 A)、Ki-67 染色 (図 B)、クロモグラニン A 染色 (図 C)、シナプトフィジン染色 (図 D)の結果を示す。

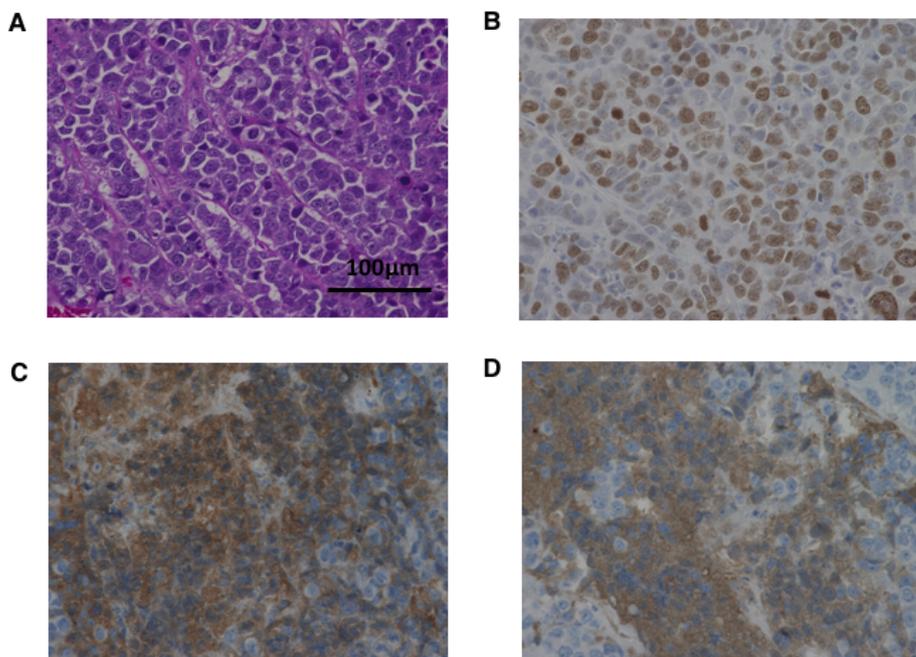


図 11. TYUC-1 ゼノグラフトの病理組織像：HE 染色 (図 A)、Ki-67 染色 (図 B)、クロモグラニン A 染色 (図 C)、シナプトフィジン染色 (図 D)の結果を示す。

2. CDDP、ETP、CPT-11、SN-38 に対する薬物感受性と薬物相互作用

NEC 細胞株の CDDP、ETP、CPT-11 に対する容量反応曲線を示す (図 12)。3 種の殺細胞性抗がん剤に対する IC₅₀ は樹立前に抗がん剤暴露を受けていない TYUC-1 で最も低く、濃厚な抗がん剤暴露歴のある A99 で高値であった。CPT-11 の活性代謝物である SN-38 についても同様の検討を行ったところ、CPT-11 と同様、TYUC-1 における感受性が良好であった。また、図 13 の isobologram で示されるように CDDP/ETP、CDDP/CPT-11 のいずれの併用も種々の濃度下で相乗効果を示し、CDDP/SN-38 についても相乗効果を認めた。

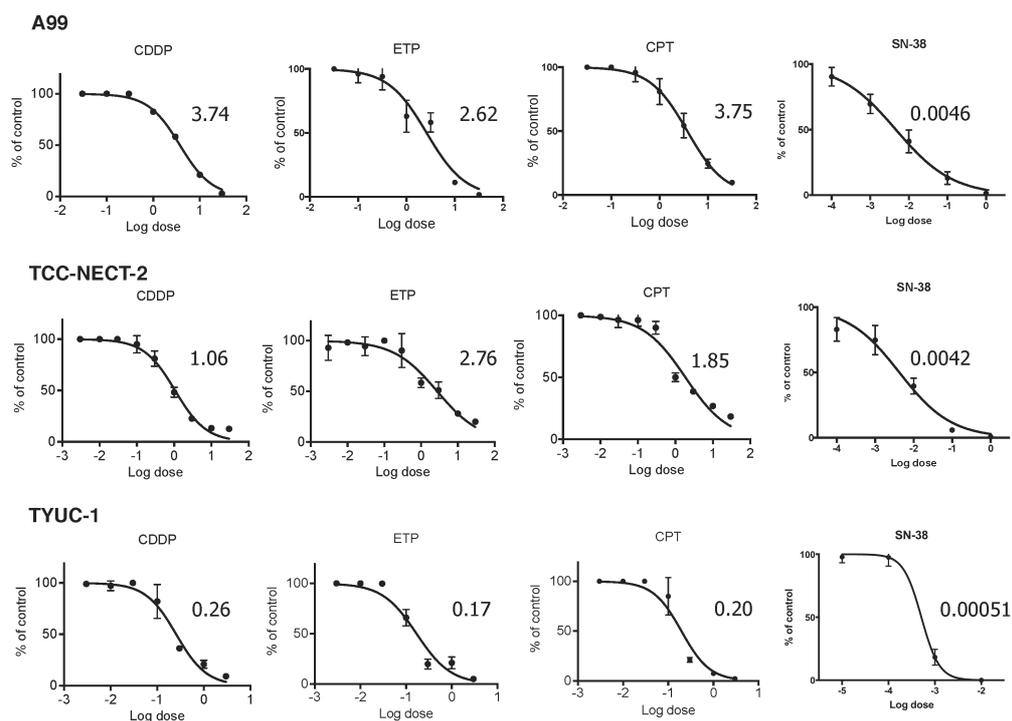


図 12. NEC 細胞株の容量反応曲線 : 1 ウェルあたり A99 では 3×10^3 個、TCC-NECT-2 と TYUC-1 では 1×10^4 個の細胞を 96 ウェルプレートに播き、CDDP、CPT-11、ETP、SN-38 を 4 日間投与した。各薬剤につき 2 プレート以上のサンプルを使用して実験を行った。IC₅₀ の単位は $\mu\text{g/mL}$ で、各プロットは平均値 \pm SD で表示した。

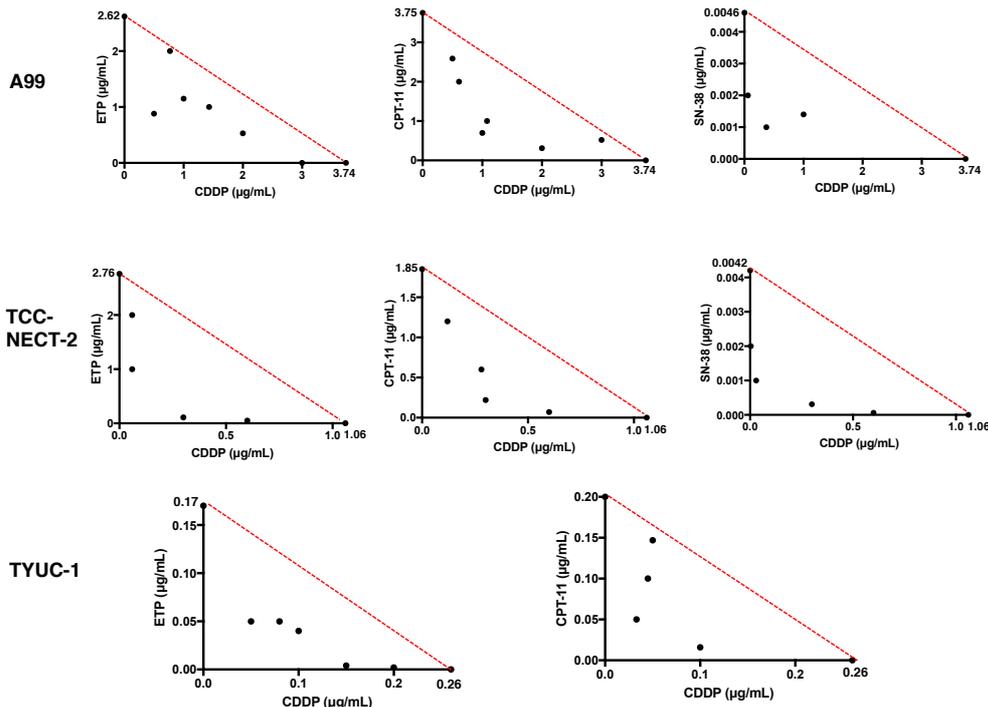
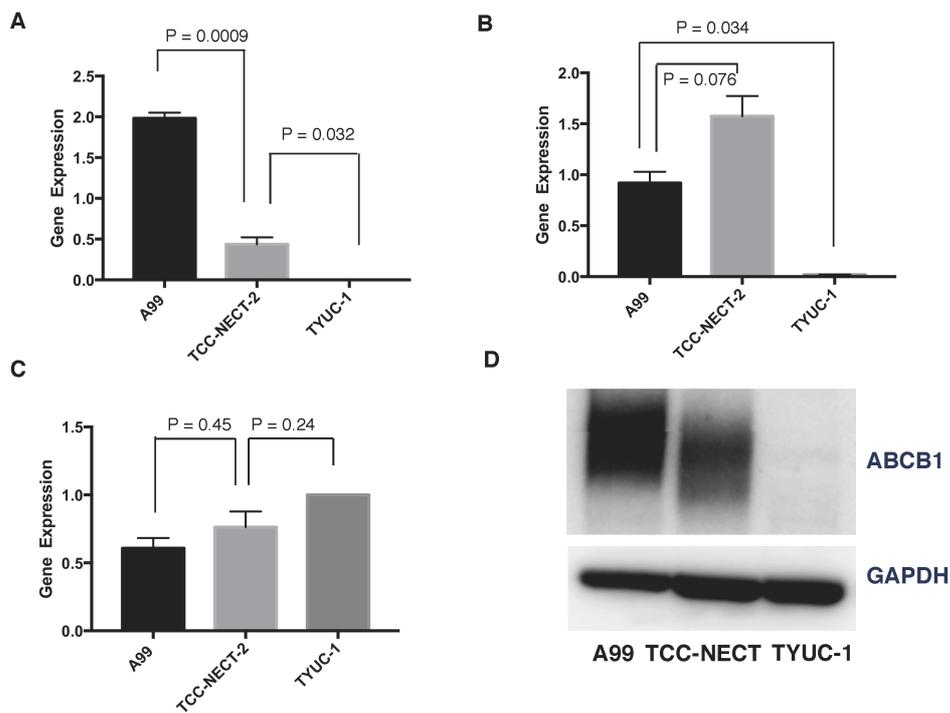


図 13. CDDP/ETP、CDDP/CPT-11 併用に伴う isobologram : Combination index (CI) に基づき、 $CI < 1$ を相乗作用、 $CI = 1$ を相加作用、 $CI > 1$ を拮抗作用と判定した。

3. NEC 細胞株における ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターならびに ERCC1 発現

各細胞株における薬物感受性の違いをもたらすメカニズムを明らかにするため、これまでに抗がん剤の薬剤耐性との関連が指摘されている ABC トランスポーター、ならびにヌクレオチド除去修復の中心的な因子であり、プラチナ製剤に対する耐性との関連が指摘される ERCC1 の発現を細胞株間で比較した [77]。代表的な 3 種のトランスポーターである ATP binding cassette subfamily B member1 (ABCB1): P-glycoprotein、ATP binding cassette subfamily C member2 (ABCC2): multidrug resistance-associated protein2 (MRP2)、ATP binding cassette subfamily C member1 (ABCC1): multidrug resistance-associated protein1 (MRP1) の遺伝子発現をリアルタイム定量 PCR 法により評価した (図 14 A-C)。ABCB1 は A99 での発現が顕著であるのに対して、TYUC-1 では発現が

見られなかった (図 14 A)。ABCC2 については TCC-NECT-2 での発現が高い一方で、TYUC-1 では同じく消失していた (図 14 B)。ABCC1 の発現については 3 種の細胞株間で発現に有意差は認めなかった (図 14 C)。ABCB1 に関してウェスタンブロッティングによるタンパクレベルでの比較も行ったところ、遺伝子発現と同様 A99 におけるシグナルが最も強い一方で、TYUC-1 ではタンパクは欠損していた (図 14 D)。また ERCC1 については TYUC-1 で遺伝子発現が上昇していたが (図 14 E)、細胞株のウェスタンブロッティングとゼノグラフト組織を用いた免疫染色では、ERCC1 タンパク発現は A99 でのみ欠損していた (図 14 F-G)。



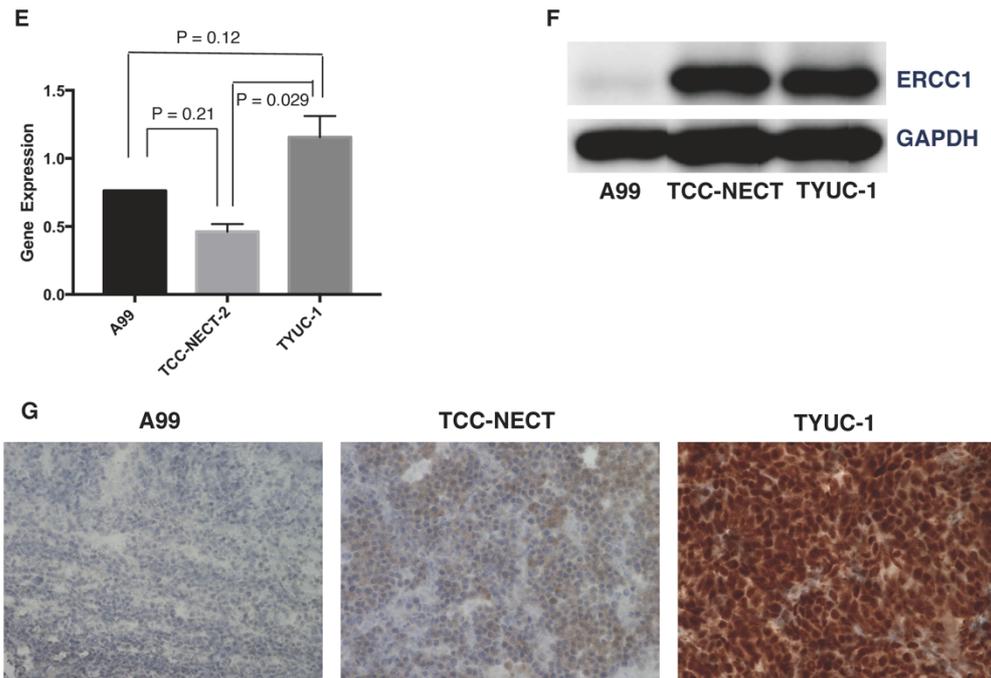


図 14. NEC 細胞株における ABC トランスポーターならびに ERCC1 の発現 : ABCB1 (図 A)、ABCC2 (図 B)、ABCC1 (図 C)、ERCC1 (図 E) の遺伝子発現は GAPDH をコントロール遺伝子として標準化し、相対値 (平均値±SEM) として表示した。ABCB1 タンパク発現 (マウス ABCB1 抗体、1:100; マウス GAPDH 抗体、1:1000) (図 D)。ERCC1 タンパク発現 (ラビット ERCC1 抗体、1:500) (図 F)。各細胞株を移植したマウスゼノグラフト組織における免疫染色による ERCC1 発現 (ラビット ERCC1 抗体、1:50) (図 G)。

4. *In vivo* での EP 療法と IP 療法の抗腫瘍効果の比較

(A99)

コントロール群として 3 匹、CDDP 群、EP 群、IP 群に 5 匹ずつを割り付けた。治療開始時の腫瘍量は平均値±SEM でコントロール群: $196 \pm 26 \text{ mm}^3$ 、CDDP 群: $180 \pm 18 \text{ mm}^3$ 、EP 群: $191 \pm 16 \text{ mm}^3$ 、IP 群: $183 \pm 17 \text{ mm}^3$ であった。治療開始 29 日目の相対腫瘍量は平均値±SEM でコントロール群: 21.55 ± 1.77 、CDDP 群: 17.67 ± 2.90 、EP 群: 18.23 ± 1.31 、IP 群: 18.41 ± 2.30 であり、各治療群のコントロール群との統計学的有意差は

いずれも認めなかった (図 15 A)。毒性の観点からは治療群における明らかな体重減少は認めなかった。

(TCC-NECT-2)

コントロール群、CDDP 群に 4 匹、EP 群、IP 群に 5 匹ずつが割り付けられた。治療開始時の腫瘍量はコントロール群: $169 \pm 14 \text{ mm}^3$ 、CDDP 群: $163 \pm 15 \text{ mm}^3$ 、EP 群: $155 \pm 11 \text{ mm}^3$ 、IP 群: $159 \pm 9 \text{ mm}^3$ であった。治療開始 29 日目の相対腫瘍量はコントロール群: 13.52 ± 1.21 、CDDP 群: 8.21 ± 1.01 、EP 群: 9.70 ± 1.49 、IP 群: 6.46 ± 0.85 であり、CDDP 群、IP 群でコントロール群に比較し有意に腫瘍の増大が抑制された ($P = 0.04$; $P = 0.005$) (図 15 B)。治療群における明らかな体重減少は認めなかった。

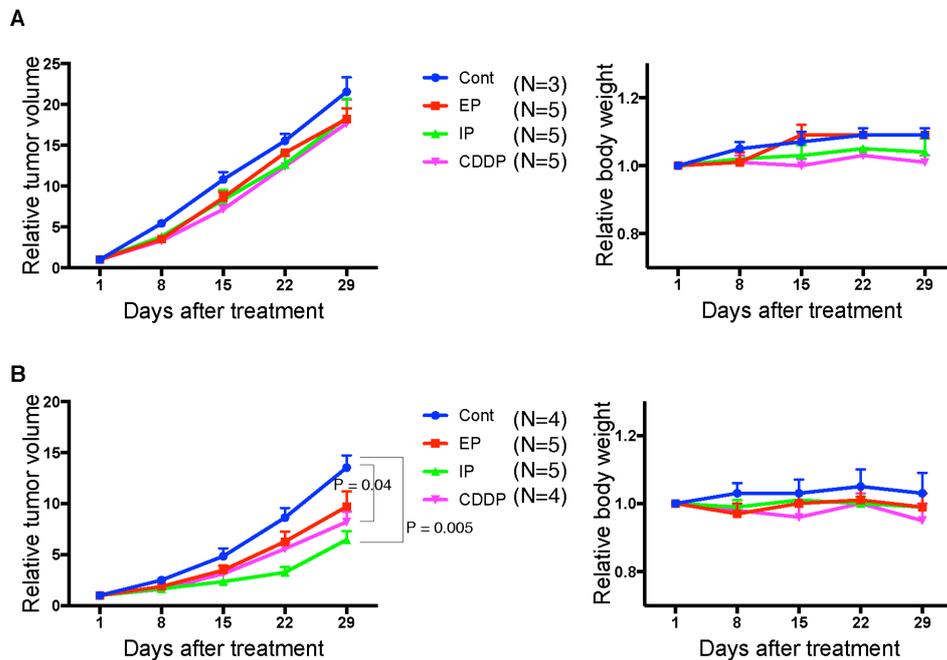


図 15. *In vivo* モデルにおける各治療群の相対腫瘍量と相対体重の推移 : A99、TCC-NECT-2 についてはマウス 1 匹あたり 2.5×10^6 個、TYUC-1 については 5×10^6 個の細胞を背部の皮下に移植し、腫瘍量が $130\text{-}250\text{mm}^3$ に到達した時点で薬物投与を開始し

た。A99 (図 A)、TCC-NECT-2 (図 B) を移植したマウスを各々4群に分けて、図6に示した投与スケジュールに従い28日間の1サイクルを施行した。各プロットは平均値±SEMで表示し、4群間の統計学的比較は one-way ANOVA with post-hoc Tukey's multiple comparisons test により行った。

5. 実験に使用した NEC 細胞株の遺伝子変異

(A99) 本細胞株を樹立した元の腫瘍組織、ならびに対応する正常組織の凍結検体を用いて全ゲノムシーケンス解析を行った。既報告において膵 NEC に特徴的とされる変異については、*KRAS* のミスセンス変異 (c.34 C>G, p.Gly12Arg; c.35 C>A, p.Gly12Val)、*TP53* のミスセンス変異 (c.379 A > T, p.Ser127Thr)、*RBI* のスプライシング変異 (Splicing 1216-2A>G) がそれぞれ検出された。相同組み換え修復に関連する *BRCA1*、*BRCA2*、*ATM*、*ATR*、*CHEK1*、*CHEK2*、*RAD51*、*PALB2* の変異は検出されず、また *EZH2* 阻害薬の奏効に関わるとされる *EZH2* の活性型変異ならびに、*SWI/SNF* 関連分子である *ARID1A*、*SMARC4A*、*SMARCB1*、*BAP1*、*KDM6A* の不活性型変異は検出されなかった。

(TCC-NECT-2)

NCC オンコパネル (v4) を使用して、114 のがん関連遺伝子に関して本細胞株の解析を行った。*BRAF V600E* 変異、*TP53* のスプライシング変異 (Splicing 783-1G>A)、*c-myc* の52倍の増幅が検出された。本細胞株では *KRAS*、*RBI* の遺伝子変異は検出されなかった。また相同組み換え修復に関連する *BRCA1*、*BRCA2*、*ATM*、*CHEK2*、*RAD51C*、

PALB2 の変異ならびに *EZH2* 阻害薬の奏効に関与する *EZH2*、*ARID1A*、*SMARC4A*、*SMARCB1*、*BAP1*、*KDM6A* の遺伝子変異は検出されなかった。

(TYUC-1)

TYUC-1 細胞株ならびに、細胞株を樹立した症例の正常組織を用いて *EZH2* 遺伝子に関するサンガーシーケンス解析を行った。*EZH2* 阻害薬の感受性に関係し、*EZH2* 遺伝子変異の hot spot である Y646 を含む以下の配列のプライマーを作成し、ターゲット領域を PCR 法により増幅しシーケンス反応を行った。

EZH2 forward: 5'-ACGTTGACTGAAGCTGTGTGC-3'

EZH2 reverse: 5'-TTTCCAATCAAACCCACAGAC-3'

本細胞株では *EZH2* Y646 の変異は検出されなかった。

6. NEC 細胞株の Veliparib に対する薬剤感受性

Veliparib 単剤の IC₅₀ は A99: 9.7 µg/mL、TCC-NECT-2: 15.2 µg/mL、TYUC-1: 26.1 µg/mL であった (図 16)。また CDDP 単剤ならびに Veliparib 1 µg/mL、10 µg/mL 併用下での CDDP の IC₅₀ を 3 つの細胞株で比較した。IC₅₀ は A99 においては順に単剤: 2.07 µg/mL、Veliparib 1 µg/mL 併用: 0.45 µg/mL (IC₅₀ 減少率: 78%)、CDDP/Veliparib 10 µg/mL 併用: 0.36 µg/mL (IC₅₀ 減少率: 83%)、TCC-NECT-2 においては 1.00 µg/mL、1.02 µg/mL (IC₅₀ 減少率: -2%)、0.42 µg/mL (IC₅₀ 減少率: 58%)、TYUC-1 においては 0.17 µg/mL、0.19 µg/mL (IC₅₀ 減少率: -12%)、0.02 µg/mL (IC₅₀ 減少率: 88%) であった。A99 では Veliparib

単剤の感受性が最も高く、Veliparib 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との併用下においても CDDP の増強作用を認めた。TCC-NECT-2、TYUC-1 においては Veliparib 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との併用では CDDP の増強作用を認めたが、Veliparib 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では増強作用を認めなかった。

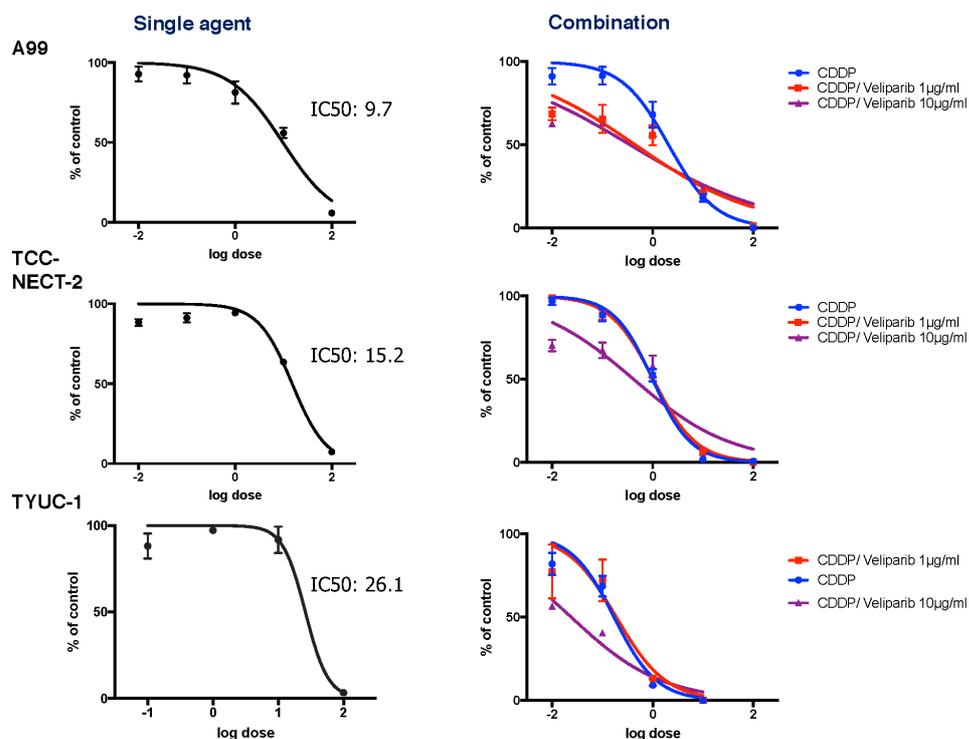


図 16. NEC 細胞株の Veliparib 単剤（左図）もしくは Veliparib 併用下での CDDP の容量反応曲線（右図）：1 ウェルあたり A99 では 3×10^3 個、TCC-NECT-2 と TYUC-1 では 1×10^4 個の細胞を 96 ウェルプレートに播き、Veliparib、CDDP/Veliparib を 4 日間投与した。各薬剤につき 2 プレート以上のサンプルを使用して実験を行った。IC₅₀ の単位は $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、各プロットは平均値 \pm SEM で表示した。

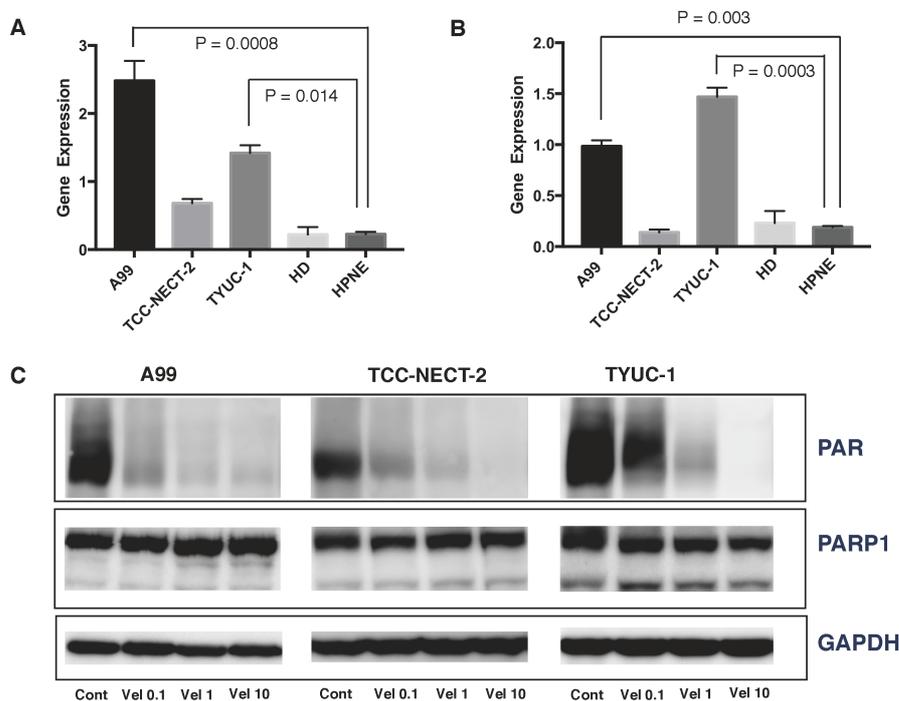
7. NEC 細胞株、マウスゼノグラフトにおける PARP の発現

次に消化器 NEC に対する新規治療標的としての PARP の有効性に関する検討を行った。始めに PARP1、PARP2 ならびに PARP1/PARP2 による PARylation によって生成される PAR の発現を評価した。GAPDH をコントロール遺伝子とした時の各細胞株の PARP1 遺伝子発現レベル（平均値 \pm SEM）は、A99: 2.48 ± 0.29 、TCC-NECT: 0.68 ± 0.06 、

TYUC-1: 1.42 ± 0.12 、HD: 0.22 ± 0.11 、hTERT-HPNE: 0.23 ± 0.04 であり、A99、TYUC-1 では hTERT-HPNE よりも有意に発現が上昇していた ($P = 0.0008$; 0.014) (図 17 A)。

PARP2 の遺伝子発現については、A99: 0.98 ± 0.06 、TCC-NECT: 0.14 ± 0.03 、TYUC-1: 1.47 ± 0.09 、HD: 0.23 ± 0.12 、hTERT-HPNE: 0.19 ± 0.01 であり、PARP1 と同様に A99 ならびに TYUC-1 の発現量が有意に上昇していた ($P = 0.003$; $P = 0.0003$) (図 17 B)。

ウェスタンブロッティングでは 3 種の NEC 細胞株において PAR の発現を認め、Veliparib の投与により発現は濃度依存的に抑制された (図 17 C)。PARP1 については 10 $\mu\text{g/mL}$ の Veliparib 投与においても発現が維持された。3 種の NEC 細胞株を移植したゼノグラフトの免疫染色においても PARP1 は陽性であり、特に A99、TYUC-1 由来の腫瘍において染色強度が高かった (図 17 D)。



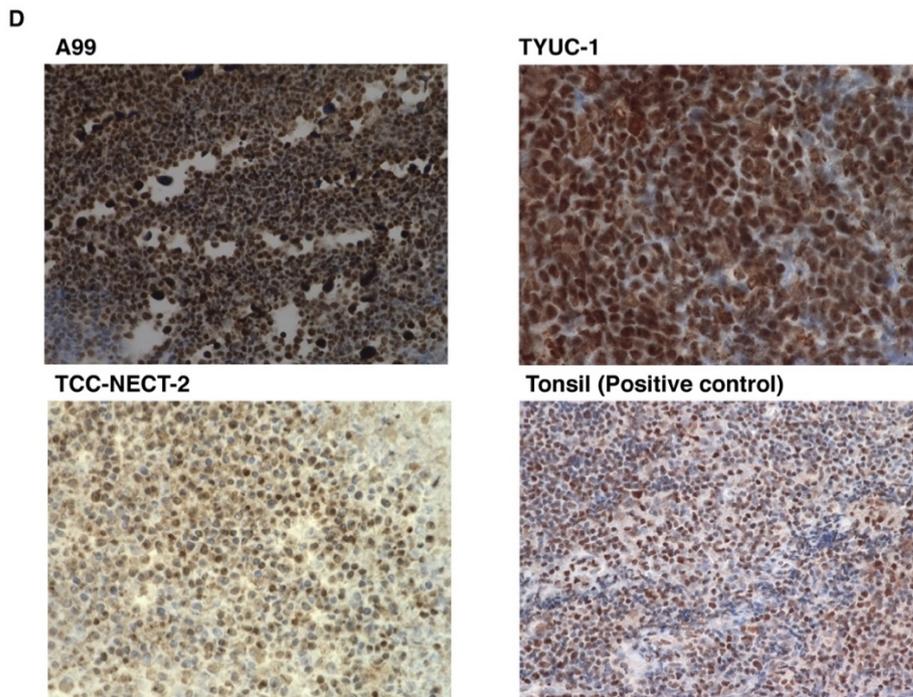


図 17. NEC における PARP/PAR 発現と PARP 阻害薬投与による発現の変化: PARP1 (図 A)、PARP2 (図 B) の遺伝子発現は GAPDH をコントロール遺伝子として標準化し、異なる 2 サンプルを使用して相対値 (平均値 \pm SEM) として表示した。NEC 細胞株における PARP1 ならびに PARylation による生成産物である PAR のタンパク発現を示す(図 C)。Veliparib (Vel) は 0.1 μ g/mL、1 μ g/mL、10 μ g/mL で 24 時間投与を行った。3 種の NEC 細胞株を移植したマウスゼノグラフト組織の免疫染色における PARP1 の発現を示す (図 D)。PARP1 の陽性コントロールであるヒト扁桃組織で条件検討を行い、抗体の希釈倍率を決定した。

8. Veliparib による DNA 修復機構への関与

Veliparib の DNA 修復機構に関与するメカニズムを明らかにするため、DNA 二本鎖切断の指標としての γ -H2AX の発現を評価した。A99 における γ -H2AX の蛍光染色においては、染色陽性比率 (平均値 \pm SEM) がコントロール群: 6.3 \pm 1.8%、CDDP 群: 63.7 \pm 1.2%、Veliparib 群: 47.3 \pm 6.7%、CDDP/Veliparib 群: 77.3 \pm 4.1%であり、コントロール群に比較し各治療群の陽性比率は有意に高かった ($P < 0.0001$; $P = 0.0005$; $P < 0.0001$) (図 18 A)。また CDDP/Veliparib 群の陽性比率は Veliparib 群よりも高値であっ

た ($P=0.0036$)。ウェスタンブロッティングにおいてもコントロール群に比較し、各治療群のサンプルにおける γ -H2AX のシグナルは増強していた (図 18 B)。その一方で、TCC-NECT-2、TYUC-1 においては A99 とは異なり Veliparib 投与による γ -H2AX の発現上昇は認めなかった (図 18 C)。

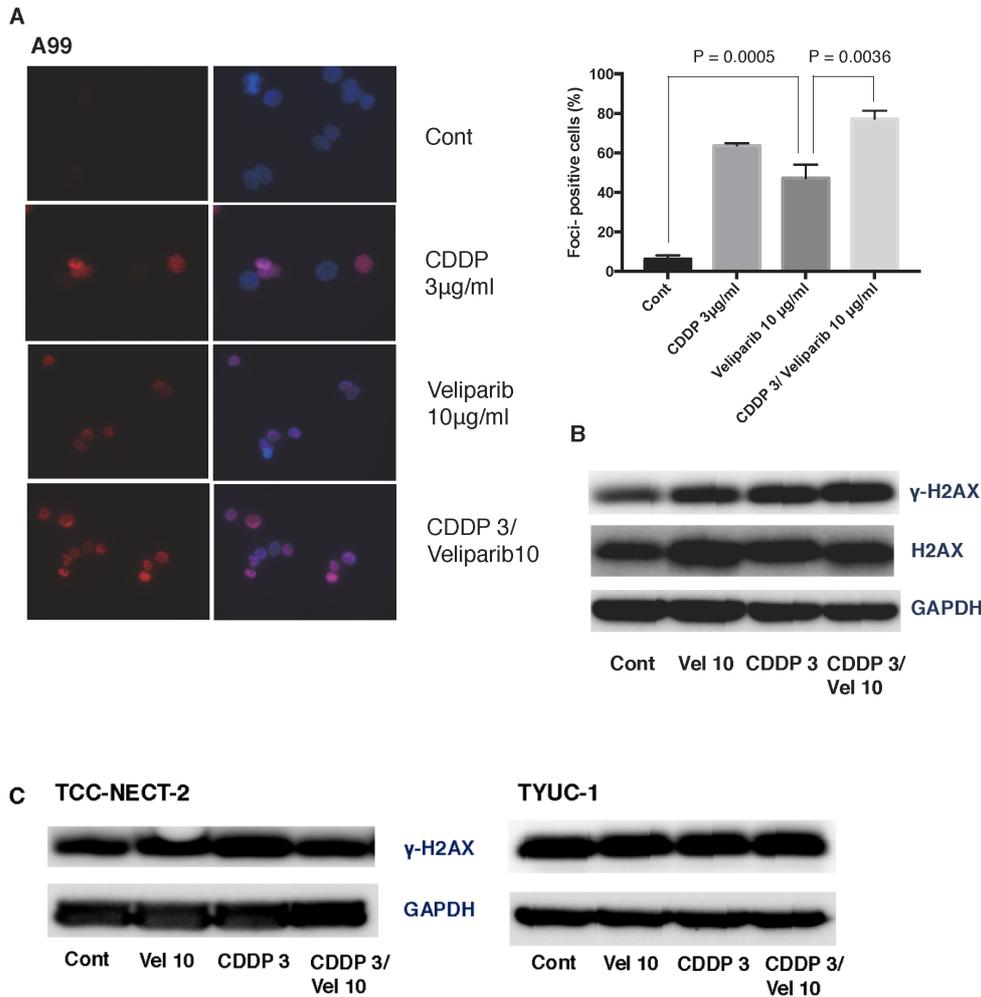


図 18. 蛍光染色による γ -H2AX の発現(図 A) : CDDP は 3 μ g/mL、Veliparib (Vel) は 10 μ g/mL で 24 時間投与を行った。Nuclear foci 5 個以上もしくは核全体が染色されている細胞を陽性細胞と判定し、異なる 3 サンプルを使用して各サンプルあたり 200 個以上をカウントした。ウェスタンブロッティングによる A99 における γ -H2AX の発現 (図 B)と TCC-NECT-2、TYUC-1 における γ -H2AX の発現を示す(図 C)。

9. Veliparib によるセルサイクルの変化とセルサイクル制御因子の発現

A99 においては Veliparib 投与後、S 期への cell cycle shift が明瞭に観察された (図 19 A)。S 期の細胞比率 (平均値±SEM) はコントロール群: $27.4 \pm 3.1\%$ に対して Veliparib 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群: $45.9 \pm 1.1\%$ 、Veliparib 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群: $46.0 \pm 3.6\%$ であり、有意に S 期の割合が上昇した ($P = 0.007$; $P = 0.007$)。TCC-NECT-2 では Veliparib 投与による cell cycle shift は認めなかった (図 19 B)。TYUC-1 においては緩徐な cell cycle shift を認め、G2/M 期の細胞比率は Veliparib 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群でコントロール群に比較し高値であった ($23.9\% \pm 0.5\%$ vs. $17.8\% \pm 1.2\%$, $P = 0.0025$) (図 19 C)。

次に最も鋭敏な cell cycle shift を示した A99 について S 期への進行に必要で DNA 二本鎖の切断修復に関与する Cyclin A、Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) の遺伝子発現を定量 PCR により評価した [78]。Veliparib 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を投与したサンプルでは、Cyclin A、CDK2 の発現がコントロール群に比較し平均で 1.5 倍、2.7 倍上昇しており、CDK2 については統計学的に有意な上昇であった ($P = 0.0244$) (図 19 D-E)。

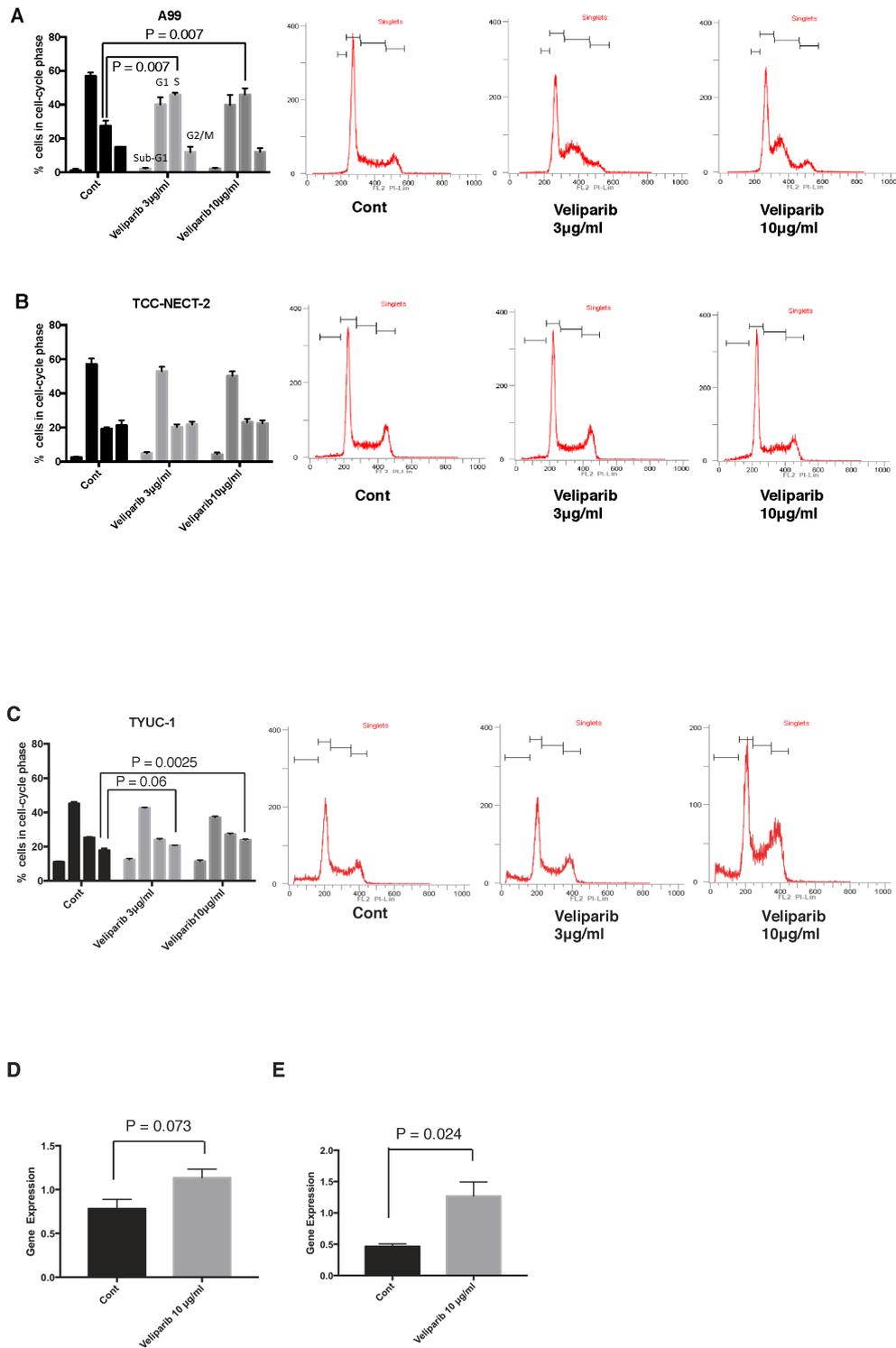


図 19. Veliparib 投与後の細胞周期の変化 (図 A-C) とセルサイクル調節因子の発現 (図 D-E) : A99 (図 A)、TCC-NECT-2 (図 B)、TYUC-1 (図 C) の 3 種の細胞株に対して 3 µg/mL または 10 µg/mL の Veliparib を 24 時間投与し、1 サンプルあたり 20000 個の細胞を解析し sub-G1、G1、S、G2/M 期の割合を算出した。異なる 3 サンプルを使用して実験を行い、平均値±SEM で表記した。グラフ上 S-phase への shift が観察された

A99 について S 期の制御に関する Cyclin A (図 D)、CDK2 (図 E) の遺伝子発現をリアルタイム定量 PCR により評価した。異なる 3 サンプルを使用して実験を行い、平均値±SEM で表記した。

10. In vivo での Veliparib 単剤の抗腫瘍効果

コントロール群: 5 匹、Veliparib 群: 5 匹が割り付けられた。治療開始時の腫瘍量は平均値±SEM でコントロール群: $156 \pm 10 \text{ mm}^3$ 、Veliparib 群: $122 \pm 16 \text{ mm}^3$ であり、2 群の治療開始時の腫瘍量に統計学的有意差は認めなかった ($P=0.11$, unpaired *t*-test)。治療開始 22 日目の相対腫瘍量は平均値±SEM でコントロール群: 11.1 ± 1.3 、Veliparib 群: 6.5 ± 1.4 であり、Veliparib 単剤群で有意に腫瘍の増大が抑制された ($P=0.045$) (図 20)。毒性の観点からは治療群における明らかな体重減少は認めなかった。

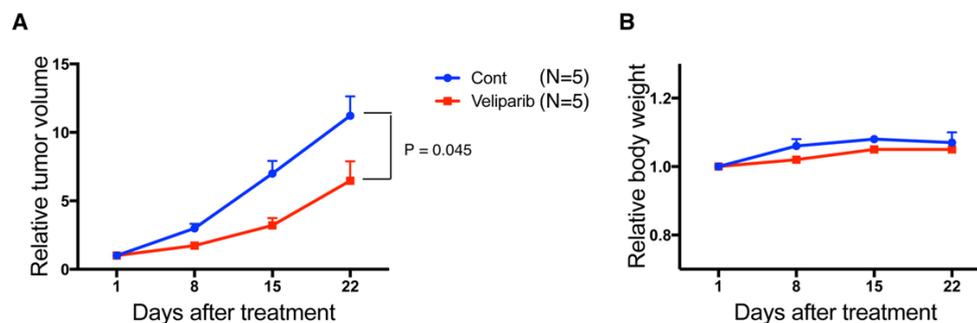
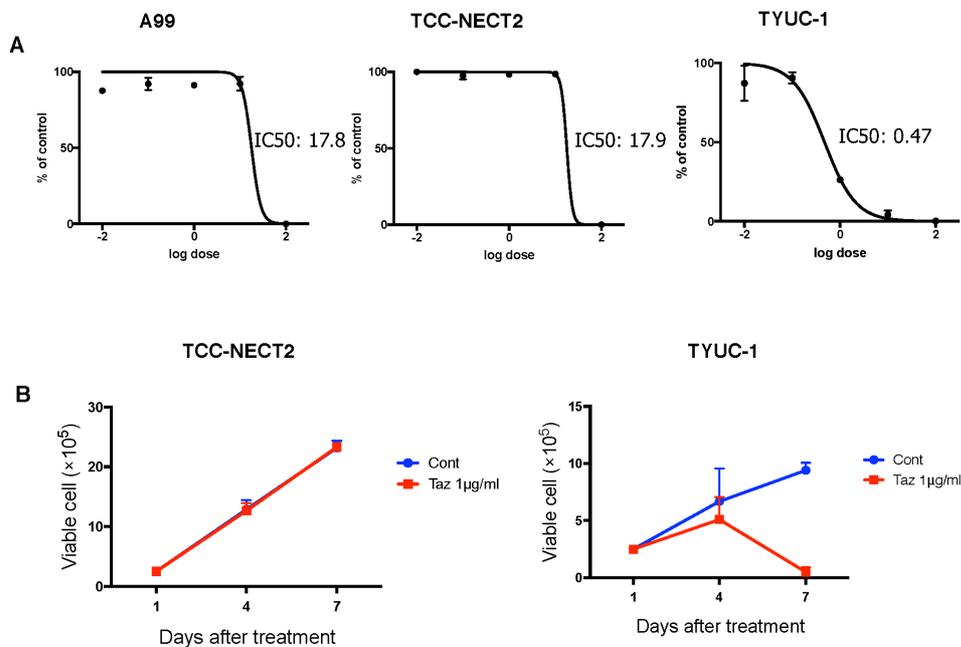


図 20. *In vivo* モデルにおける各治療レジメン群の相対腫瘍量 (図 A) と相対体重 (図 B) の推移: マウス 1 匹あたり 1.5×10^6 個の A99 細胞を移植し、腫瘍量が $95\text{-}190\text{mm}^3$ で薬物投与を開始した。Control、Veliparib の 2 群に分け、図 6 に示した投与スケジュールに従い、21 日間 1 サイクルを施行した。Control 群については生理食塩水の腹腔内投与を行った。各プロットは平均値±SEM で表示し、2 群間の統計学的比較は、unpaired *t*-test により行った。

11. NEC 細胞株の Tazemetostat に対する薬剤感受性

Tazemetostat 単剤の IC₅₀ は A99: 17.8 μg/mL、TCC-NECT-2: 17.9 μg/mL、TYUC-1: 0.47 μg/mL と TYUC-1 において薬剤感受性が顕著に高かった (図 21 A)。また Tazemetostat 1 μg/mL を 7 日間投与した TCC-NECT-2、TYUC-1 の生細胞数をセルカウンターにより計測しコントロール群と比較したところ、TCC-NECT-2 に関しては有意な細胞増殖抑制効果を示さなかった (図 21 B)。TYUC-1 については、コントロール群で (9.41 ± 0.67) × 10⁵ cells と薬剤投与開始時の 4 倍程度までの細胞増加を示すのに対して、Tazemetostat 群においては (0.49 ± 0.42) × 10⁵ cells と細胞数は大きく減少した (*P* = 0.0045)。図 21 C に TYUC-1 に対して 0.3 μg/mL、1 μg/mL の Tazemetostat を 7 日間投与した時の光学顕微鏡画像を示す。コントロールサンプルでは細胞増殖に伴って目立った細胞集塊が観察されたが、Tazemetostat 投与サンプルでは濃度依存的に細胞集塊は消失した。



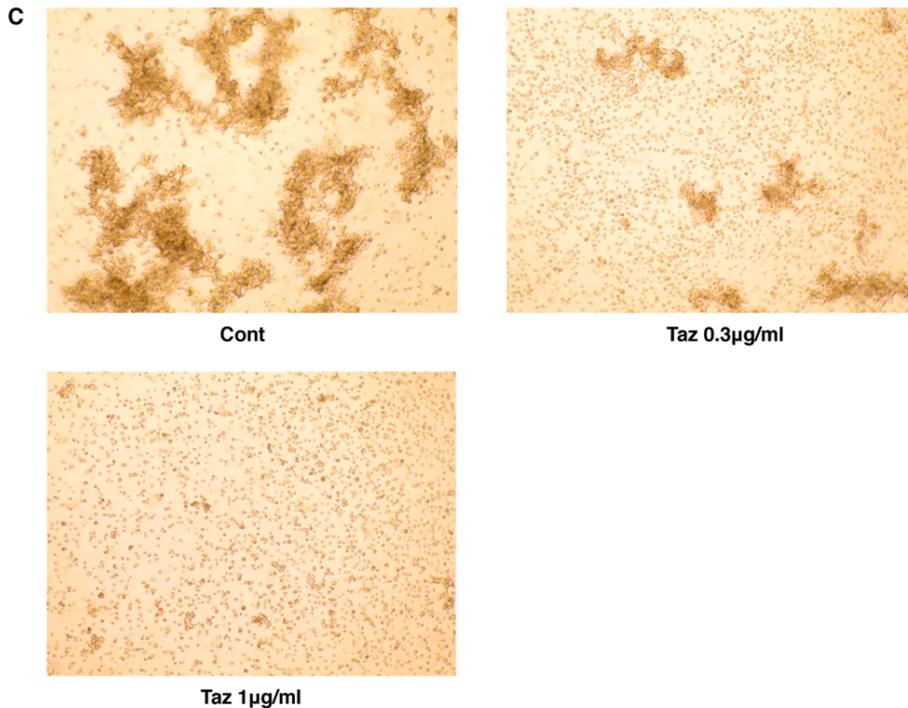


図 21. NEC 細胞株の薬剤感受性とセルサイクルの変化：Tazemetostat に対する容量反応曲線を示す (図 A)。1 ウェルあたり A99 では 3×10^3 個、TCC-NECT-2 と TYUC-1 では 1×10^4 個の細胞を 96 ウェルプレートに播き、Tazemetostat を 6 日間投与した。各薬剤につき 2 プレート以上のサンプルを使用して実験を行った。IC₅₀ の単位は µg/mL で、各プロットは平均値 ± SEM で表示した。TCC-NECT-2 と TYUC-1 における Tazemetostat 投与後の viable cell の推移を示す (図 B)。1 ウェルあたり 2.5×10^5 個の TCC-NECT-2 と TYUC-1 を 6 ウェルプレートに播き、1 µg/mL の Tazemetostat を 7 日間投与した。投与 4 日後と 7 日後に自動セルカウンターを用いて viable cell をカウントした。異なる 3 サンプルを使用して平均値 ± SD として表示した。TYUC-1 に対して 0.3 µg/mL、1 µg/mL の Tazemetostat を 7 日間投与した時の光学顕微鏡画像を示す (図 C)。

12. NEC 細胞株での EZH2、H3K27me3 の発現

次に EZH2 の治療標的としての有効性に関する検討を行った。GAPDH をコントロール遺伝子とした時の各細胞株の EZH2 の遺伝子発現 (平均値 ± SEM) は、A99: 1.47 ± 0.48 、TCC-NECT: 0.41 ± 0.09 、TYUC-1: 1.73 ± 0.32 、HD: 0.12 ± 0.05 、hTERT-HPNE: 0.11 ± 0.04 であり、hTERT-HPNE に対して TYUC-1 の発現が有意に上昇していた ($P =$

0.037) (図 22 A)。TYUC-1 では H3K27me3 のタンパク発現は EZH2 の遺伝子発現レベルに応じて高かった (図 22 B)。一方、A99 では EZH2 の遺伝子発現レベルにも関わらず H3K27me3 のタンパクは欠損していた。TCC-NECT-2 では Tazemetostat 0.01 µg/mL の投与により H3K27me3 のシグナルは減弱し、0.1 µg/mL ではシグナルが消失した (図 22 C)。TYUC-1 においては 0.01 µg/mL Tazemetostat を 7 日間持続投与することで H3K27me3 のシグナルは一旦消失したが、10 日間の投与では再上昇を示した。Tazemetostat 0.1 µg/mL 投与では TCC-NECT-2 と同様にシグナルは消失した。TYUC-1 は H3K27me3 の活性がもともと亢進しているために、脱メチル化に TCC-NECT-2 よりも高い薬剤濃度を要するものと考えられる。加えて、TYUC-1 については低濃度 (0.01 µg/mL) の Tazemetostat 投与では投与 7 日目以降に H3K27me3 の二次的な活性化カスケードが機能する可能性が示唆される。

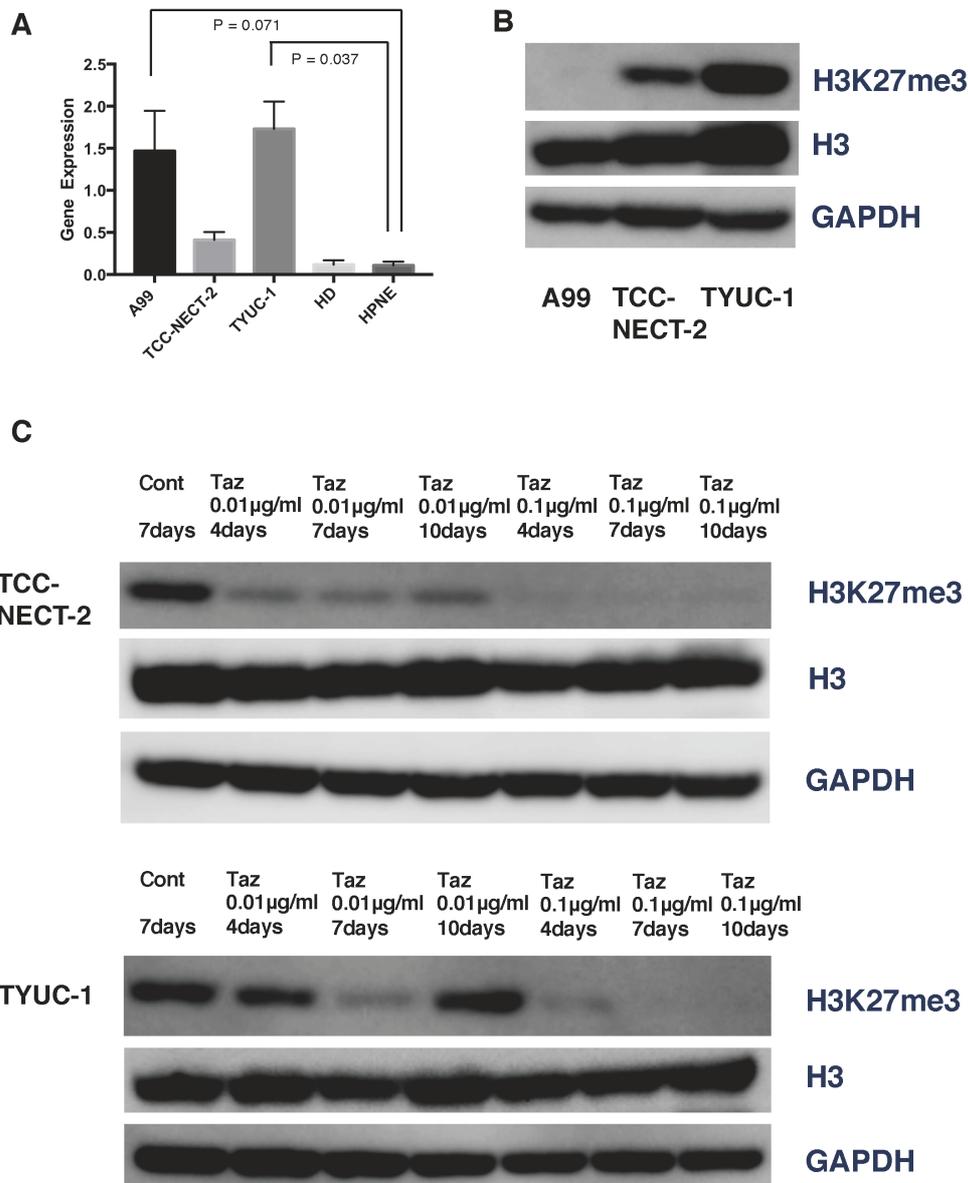


図 22. NEC 細胞株での EZH2、H3K27me3 の発現: NEC 細胞株における EZH2 の遺伝子発現を示す (図 A)。GAPDH をコントロール遺伝子として標準化し、異なる 2 サンプルを使用して相対値 (平均値±SEM) として表示した。H3K27me3、H3 のタンパク発現 (図 B)。Tazemetostat を TCC-NECT-2、TYUC-1 に対して 0.01 µg/mL、0.1 µg/mL の濃度で 4 日間、7 日間、10 日間投与し、H3K27me3 発現の変化をウェスタンブロッティングで検出した (図 C)。

13. PARP 阻害薬感受性予測因子としての SLFN11 と Tazemetostat 投与に伴う SLFN11 発現レベルの変化

A99、TCC-NECT-2、TYUC-1 における SLFN11 の遺伝子発現レベルは hTERT-HPNE に比較して平均で 1/72、1/464、1/201 であり、3 種の NEC 細胞株で著明に低値であった ($P < 0.0001$) (図 23 A)。ウェスタンブロッティングにおいても 3 種の NEC 細胞株では SLFN11 タンパクは欠損していた (図 23 B)。TCC-NECT-2、TYUC-1 に対して Tazemetostat 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 7 日間、10 日間投与を行ったが、SLFN11 遺伝子発現レベルの有意な上昇は認めなかった (図 23 C)。なお、A99 については図 22 B のように H3K27 のトリメチル化がなく、Tazemetostat の脱メチル化作用による SLFN11 の発現上昇が理論的に期待できないことから本検討には不適と判断した。

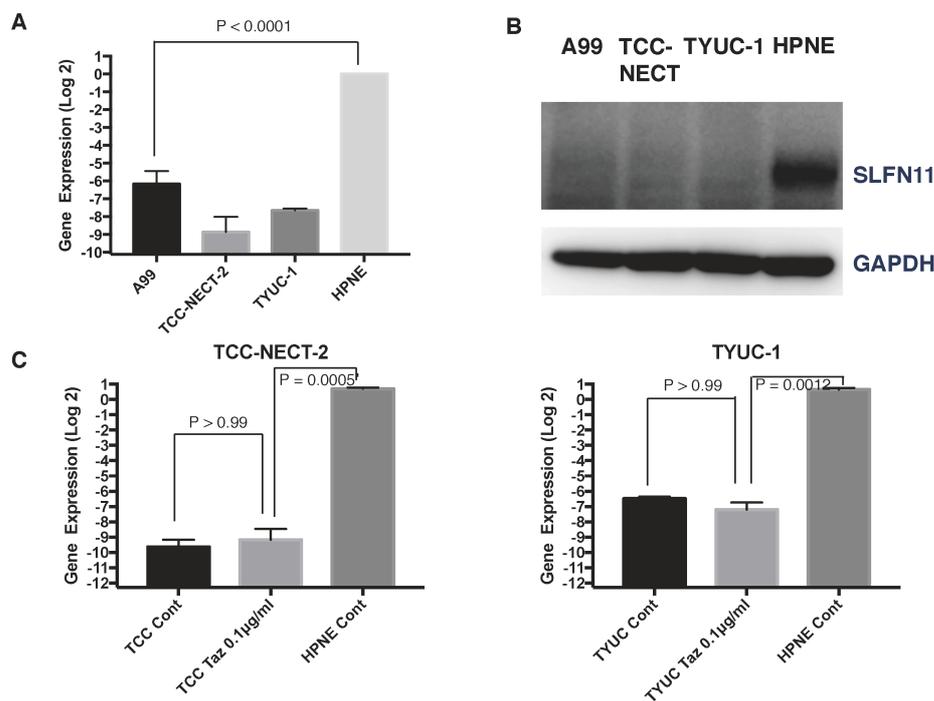


図 23. NEC 細胞株における SLFN11 の発現：A99、TCC-NECT-2、TYUC-1 における SLFN11 の遺伝子発現を示す(図 A)。GAPDH をコントロール遺伝子として標準化し、異なる 2 サンプルを使用して相対値 (平均値 \pm SEM) として表示した (縦軸は log2 表示)。各細胞株における SLFN11 のタンパク発現を示す (図 B)。Tazemetostat (Taz) を

TCC-NECT-2、TYUC-1 に対して 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 7 日間投与し、SLFN11 の遺伝子発現に関して薬剤投与を行っていないコントロールサンプルと比較した (図 C)。

14. Tazemetostat によるセルサイクルの変化とアポトーシス関連タンパクの発現

本薬剤に良好な感受性を示す TYUC-1 を使用してセルサイクルアッセイを行ったところ、アポトーシスを反映した sub-G1 期の細胞比率 (平均値 \pm SEM) は 4 日間の投与でコントロール群: $8.7 \pm 0.2\%$ に対して Tazemetostat 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群: $14.0 \pm 0.6\%$ 、Tazemetostat 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群: $18.9 \pm 1.2\%$ と濃度依存的に増加した ($P = 0.0058$; $P = 0.0002$) (図 24 A)。7 日間の投与ではコントロール群: $11.7 \pm 0.5\%$ に対して Tazemetostat 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群: $28.7 \pm 0.7\%$ 、Tazemetostat 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群: $41.1 \pm 0.3\%$ と sub-G1 期の細胞比率は濃度依存的に顕著な上昇を示した ($P = 0.0001$; $P = 0.0001$) (図 24 B)。アポトーシスの更なる検証のため、PARP1、cleaved PARP1 の発現をウェスタンブロッティングにより評価した。PARP1 のシグナルは Tazemetostat の濃度依存的に減弱し 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与下でシグナルが消失した。cleaved PARP については Tazemetostat 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与によりシグナルの増強を認めた (図 24 C)。

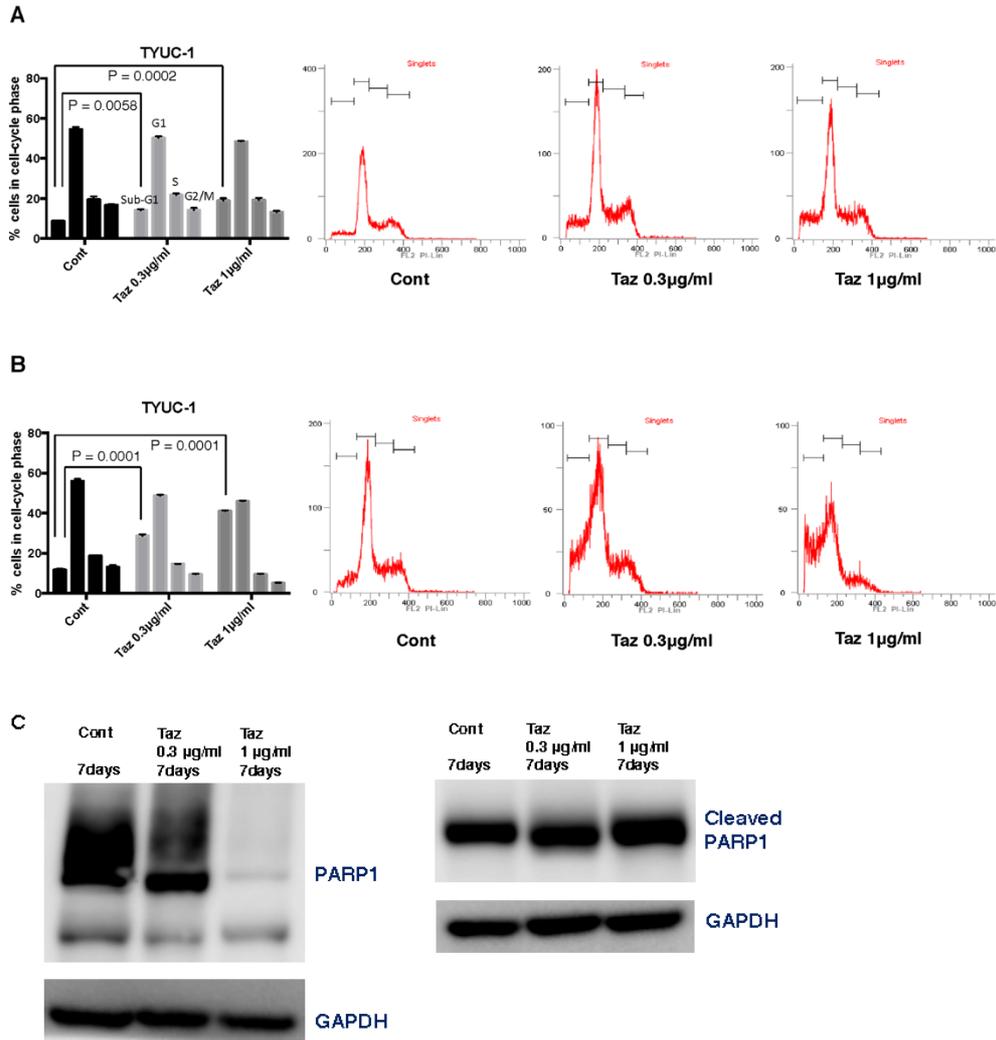


図 24. NEC 細胞株のセルサイクルの変化とアポトーシス関連タンパクの発現：0.3 µg/mL または 1 µg/mL の TYUC-1 に Tazemetostat を 4 日間投与し、細胞周期の変化を観察した(図 A)。sub-G1、G1、S、G2/M 期に属する細胞の割合を各々測定し、コントロールと比較した。異なる 3 サンプルを使用して実験を行い、平均値±SEM で表記した。さらに 0.3 µg/mL または 1 µg/mL の Tazemetostat に 7 日間投与後の TYUC-1 における細胞周期の変化を示す (図 B)。Tazemetostat 0.3 µg/mL、1 µg/ml に 7 日間投与後の TYUC-1 における PARP1、cleaved PARP1 のタンパク発現を提示する(図 C)。

考察

著者らははじめに 3 種の小細胞型消化器 NEC 細胞株を用いて、CDDP レジメンの感受性に関する *in vitro*、*in vivo* の前臨床的モデルを報告した [69]。本疾患については

patient-derived xenograft (PDX) モデルや遺伝子改変モデルの報告は知るかぎりなく、マウスゼノグラフトモデルにおいて小細胞型 NEC と病理組織学的に確認された細胞株を使用した一連の検討は、希少がんかつ難治がんである同疾患に対する創薬やドラッグリポジショニング等の臨床開発を行う上で重要な基盤的データを提供するものとする。著者らは細胞株間の異なる薬剤感受性をもたらす一因として ABC トランスポーター (ABCB1、ABCC2) の発現レベルが有意に異なる点を明らかにした。次に上記のモデルを基盤として、消化器 NEC に対する PARP 阻害剤、EZH2 阻害剤の有用性に関する検証を行った。消化器原発 NEC に対する分子標的薬剤の前臨床モデルは少数である。2018 年に Yanagihara ら、Dizdar らが各々 *BRAF V600E* 変異陽性 NEC 細胞株を移植したマウスゼノグラフトモデルを用いて BRAF 阻害剤 (Dabrafenib) の有意な腫瘍増大抑制効果を報告した [66, 71]。その他の分子標的薬剤に関する報告はこれまでにない。

3 種の細胞株の中では多種にわたる化学療法歴のある A99 で殺細胞性抗がん剤 (CDDP、ETP、CPT-11) への感受性が最も低く、対照的に化学療法歴のない手術標本から樹立された TYUC-1 で最も良好であった。既報では小細胞肺癌細胞株を使用した *in vitro* の薬剤感受性試験において CDDP、ETP、CPT-11、SN-38 の IC_{50} は各々 0.09 ~ 1.14 $\mu\text{g/ml}$ 、0.16 ~ 2.18 $\mu\text{g/ml}$ 、0.12 ~ 0.89 $\mu\text{g/ml}$ 、0.3 ~ 16.0 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{g/ml}$ であった [79-81]。消化器 NEC 細胞株に関しては HROC57 における CDDP、ETP の IC_{50} が各々 0.63 $\mu\text{g/ml}$ 、1.1 $\mu\text{g/ml}$ 、NEC-DUE3 における CDDP の IC_{50} が 0.31 $\mu\text{g/ml}$ 、NEC-DUE2 における ETP の IC_{50} が 0.35 $\mu\text{g/ml}$ と報告されている [65, 67-68]。HROC57 ならびに NEC-DUE3 はいずれも手術標本より樹立された細胞株であり、樹立前の抗がん剤暴露はない。NEC-DUE2 は胃切除術後の肝転移より樹立された細胞株であり、術前 EP 療法の

治療歴があった。これらの消化器 NEC 細胞株と比較すると TYUC-1 は概ね同等の感受性を有しており、一方で A99 の感受性は不良であった。CPT-11 は生体においてはカルボキシエステラーゼにより SN-38 に代謝され、抗腫瘍効果を示す [82]。Jansen らは大腸がん細胞株を用いて CPT-11 と SN-38 の IC₅₀ を比較し、SN-38 では感受性が 245-865 倍上昇することを報告した [83]。本研究においては、3 種の細胞株で SN-38 の感受性は CPT-11 と比較し 390-815 倍上昇していた。*In vitro* では細胞内の内因性カルボキシエステラーゼや細胞培養液 (FBS) 中のカルボキシエステラーゼの存在により、一定量が SN-38 に代謝され細胞増殖抑制効果につながる可能性が指摘されている [83]。本研究では 3 種の細胞株において、CDDP/ETP、CDDP/CPT-11 がともに薬物の相乗効果を示した。SN-38 についても CDDP との相乗効果を示した。これまでに Kano、Fukuda らが各々急性リンパ芽球性白血病細胞株や小細胞肺癌細胞株に対して isobologram を用いた評価を行い、CPT-11、SN-38 の双方が CDDP と相乗効果を示すことを報告している [84-85]。

ABC トランスポーターに関して ABCB1 の発現レベルは A99 で最も高く、TYUC-1 における ABCB1 ならびに ABCC2 の発現は消失していた。ABC トランスポーターはがん細胞における薬剤の取り込みを減少させるとともに薬剤排出を増加させる機能を有し、細胞内の薬剤濃度を低下させる [86]。各トランスポーターの臨床的意義についてはがん種や抗がん剤の種類により多様であり、これまでの研究から ABCB1 は乳がん、急性白血病、小細胞肺癌 [87-89]、ABCC2 は食道扁平上皮がん、肝細胞がんに関して臨床的効果を予測することが報告されている [90-92]。卵巣がんの全ゲノム・シーケンス解析においては ABCB1 の過剰発現が、抗がん剤治療後の耐性獲得症例で特徴的に観察された [93]。消化器 NEC に関する報告はなく詳細は明らかでないが、

筆者らのデータは、ABC トランスポーターの中でとりわけ ABCB1、ABCC2 の発現が同疾患の薬剤耐性に関連する可能性を示唆した。また ERCC1 の臨床的な意義については非小細胞肺癌において最も検証されてきており、前向き試験により ERCC1 陰性症例で術後化学療法の効果が高いことなどが報告されている [94]。一方で小細胞肺癌に関してはデータが少なくその意義は明らかでない [95]。著者らの実験では ERCC1 の遺伝子発現を 3 種の細胞株で認めるものの、タンパク発現については A99 でのみ欠損していた。このような ERCC1 の遺伝子発現とタンパク発現の乖離はしばしば観察される。Friboulet らは入手可能な ERCC1 抗体を用いた免疫染色では ERCC1 の機能的なアイソフォームを適切に検出できないことを報告しており、ERCC1 の発現については遺伝子発現の方がより標準化された指標と考えられる [96]。

In vivo では A99 のゼノグラフトでは EP 療法・IP 療法ともに十分な抗腫瘍効果は認めず、TCC-NECT-2 のゼノグラフトでは IP 療法で腫瘍の増大が有意に抑制された。*In vitro*、*in vivo* の結果の乖離については、マウスモデルでは薬物の血中濃度が十分に上昇せず相互作用が得られなかった可能性や、薬物の投与方法が *in vitro*、*in vivo* で異なる (*In vitro* の viability assay では 96 時間持続投与に対して、マウスでは間欠腹腔内投与) 可能性が考慮される。とりわけ A99 は殺細胞性抗がん剤に対する潜在的耐性株であることから、*in vivo* モデルでは薬物の血中濃度を上げる必要があった可能性がある。しかしながら本実験の予備検討において EP 群で平均 10%以上の体重減少が出現したため、治療毒性の観点から薬剤投与量を 2/3 倍量に減量せざるを得なかった。小細胞肺癌に対しては Kondo ら、Kudoh らが各々 EP 療法、IP 療法の抗腫瘍効果を報告している [97-98]。両治療はともに消化器 NEC に対する代表的なプラチナ併用療法であるが、治療成績に関する報告は後方視的研究に留まる。Sorbye らは 305 例の進行

期消化器 NEC 症例を解析し、両治療を受けた患者の OS には有意差がないことを報告した [13]。一方 Yamaguchi らは 258 例の進行期症例を解析し、ORR と OS が IP 療法群で優れていることを示しているが、IP 療法が主として消化管原発の NEC に、EP 療法が肝胆膵領域の NEC に使用されていた [12]。消化管原発の NEC は肝胆膵原発に比較し、元来予後が不良である点も指摘されており、原発臓器の相違が化学療法後の臨床経過に影響している可能性が否定出来ない。現在行われている前向き JCOG1213 試験が両治療の位置付けを明確にすることが期待されている [99]。

次に新規治療の観点から PARP1、EZH2 の発現を評価し、特に A99 と TYUC-1 の 2 種の細胞株においてこれらの遺伝子発現が上昇していることを明らかにした。A99 についてはゲノム解析で *RBI* のスプライシング変異を検出しており、免疫染色での Rb タンパク欠損が報告されている [70]。一方で TCC-NECT-2 に関してはゲノム解析で *RBI* 変異を認めなかった。Rb は E2F1 の抑制因子であることから、*RBI* の不活性型変異は E2F1 の活性化を介して、PARP1、EZH2 の発現を亢進している機序が推測される [20-21]。肺以外の組織学的小細胞がんに対する検討は限られている。Ferrarotto らは小細胞がんに類似したメルケル細胞がん 19 例に免疫染色を行い、74%の症例で PARP1 の染色が強陽性であり、4 種のメルケル細胞がん細胞株のうち PARP1 が最も高発現の細胞株で、PARP 阻害薬 Olaparib への感受性が最良であることを報告した [100]。EZH2 に関してもメルケル細胞がんにおいて正常皮膚に比較し遺伝子発現が増強しているとの Veija らによる報告がある [101]。また Wang らは卵巣小細胞がん (Hypercalcemic type) の 80%の症例において免疫組織化学的に EZH2 が高発現しており、他の卵巣がん細胞株に比較し EZH2 阻害薬に対する良好な感受性を示すことを報告した [102]。

In vitro における Veliparib 単剤の薬剤感受性は PARP1 が高発現している CDDP 耐性の A99 で最も良好であり、CDDP との併用による作用の増強も顕著であった。また A99 を移植したゼノグラフトにおいて、Veliparib 単剤投与により良好な腫瘍増大抑制効果を示した。毒性の点からは明らかな体重減少は観察されなかった。この結果は実臨床でしばしば問題となるプラチナ治療後再発・プラチナ不応症例に対して PARP 阻害薬が有効である可能性を示唆しており、全身状態が急激に悪化することの多い NEC 患者に対して忍容性の高い治療選択肢と考えられる。これまでに Veliparib の抗腫瘍効果を *in vivo* モデルで評価した研究が複数存在する。Donawho らによる BRCA を欠損している乳がん細胞株、Hopkins らによる BRCA 変異のない卵巣がん細胞株のゼノグラフトにおいては Veliparib 単剤での抗腫瘍効果は明らかでなかった [75, 103]。一方、Clark らは BRCA2 欠損のチャイニーズハムスター卵巣細胞株と BRCA2 を補充した誘導株のゼノグラフトを比較し、誘導株においても Veliparib 単剤が一定の抗腫瘍効果を示し、プラチナ製剤のカルボプラチンとの併用で作用が増強した [76]。各研究により使用した細胞株、治療開始時の腫瘍量、薬剤投与スケジュールが異なるため、結果を直接比較することは出来ない。とはいえ、今回の検討で明らかとなった CDDP 低感受性の消化器 NEC に対する Veliparib の抗腫瘍効果は、*in vivo* コントロール群での急激な腫瘍増大を踏まえると注目すべきものであり、今後は CDDP 等の殺細胞性抗がん剤との至適な併用条件についても *in vivo* モデルで検証すべきものとする。

Michels らは CDDP 抵抗性の非小細胞肺癌株を用いた研究において、樹立された抵抗株の多くで野生株に比較し PAR の発現は上昇し、PARP 阻害薬への感受性が亢進することを示した [42]。また Makvandi らは遺伝子編集技術を用いて PARP1 の発現をノックアウトした卵巣がん細胞株では、*in vitro* で 5 種の異なる PARP 阻害薬にそ

れぞれ抵抗性を示すことを報告した [104]。前臨床モデルだけでなく臨床試験のセッティングにおいても、Somlo らによる *BRCA1/BRCA2* 変異を有する乳がん患者を対象にした試験で、Veliparib の臨床効果が末梢血中の PAR レベルと関連することが明らかにされている [43]。小細胞肺がんや消化器 NEC に関する報告はこれまでにないが、PAR/PARP1 の高発現が A99 の良好な感受性に関連している可能性が示唆される。なお、本細胞株では相同組み替え修復に関連する *BRCA1/BRCA2* をはじめとした主要な遺伝子変異は検出されなかったが、これらの遺伝子変異を有さない症例においても Veliparib の臨床効果は報告されており、そのメカニズムの解明を引き続き行っている。

A99 に対する Veliparib 投与は γ -H2AX の発現を上昇させ、S 期への cell cycle shift を生じた。これに対して他の 2 種の細胞株では γ -H2AX 発現上昇は明らかでなく、cell cycle shift も A99 に比較し緩やかであった。DNA 一本鎖切断は PARP の阻害により塩基除去修復が起こらない状況下では未修復のまま蓄積し、S 期で行われる DNA 複製を通して複製フォークで DNA 二本鎖切断を生じる。実際、本研究において γ -H2AX 陽性細胞と S 期細胞の蓄積が同時期に認められた。さらにこの背景で S 期の進行に関与する Cyclin A、CDK2 の発現上昇を認めた。PARP 阻害薬のセルサイクルへの関与についての Jelinic らの研究によると、Olaparib では骨肉腫細胞株で G2 phase arrest を起こし、非小細胞肺がん細胞株では cell cycle shift を認めなかった [105]。その一方で Veliparib は両細胞株で cell cycle shift を起こさなかった。Chuang らはまた 3 種のトリプルネガティブ乳がん細胞株に 4 種の異なる PARP 阻害薬の投与を行い、Rucaparib、Olaparib では γ -H2AX の発現上昇と G2/M phase arrest を起こし、Veliparib ではそうした変化を認めなかった [106]。セルサイクルに及ぼす影響は細胞株や薬剤濃度、薬剤

への曝露時間により多様であると考えられ、A99 では S 期への cell cycle shift があつた。

SLFN11 に関しては、著者らの検討では 3 種の NEC 細胞株全てで発現は極めて低いレベルにあつた。また TCC-NECT-2、TYUC-1 の両細胞株において 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Tazemetostat の投与により H3K27me3 の脱メチル化が生じた一方で、同じ条件で投与を行った後も SLFN11 の発現上昇には至らなかった。抗がん剤の反復投与に伴い EZH2 の発現が誘導されると SLFN11 発現がエピジェネティックに抑制され、相同組み換えの活性化により治療耐性へとつながるメカニズムが提唱されている [107]。Gardner らは抗がん剤の反復投与により SLFN11 発現が低下した治療抵抗性の小細胞肺癌細胞株を樹立し、EZH2 阻害薬を投与することにより SLFN11 が再活性化することを示した [108]。今回の検討では Gardner らの報告とは異なり、3 種の細胞株において SLFN11 の発現上昇は観察されなかった。消化器 NEC では H3K27 において SLFN11 のタンパク発現制御がなされていない可能性が示され、細胞株のメチル化解析等によりこのメカニズムを更に明らかにする必要がある。また SLFN11 が元々低い腫瘍においては、発現が二次的に抑制されたものとは異なり、EZH2 阻害薬による活性化が誘導されない可能性も指摘されている [109]。こうした SLFN11 陰性症例に対して、Murai らの報告した ATR 阻害薬との併用は PARP 阻害薬への感受性を高める上で検討すべき治療戦略であるかもしれない [110]。

A99 と TCC-NECT-2 は Tazemetostat に不応であり、一方で TYUC-1 は良好な感受性を示した。TYUC-1、TCC-NECT-2 の両細胞株において低濃度の Tazemetostat 投与で H3K27me3 の脱メチル化が生じている点を考慮すると、本薬剤の細胞増殖抑制効果は

エピジェネティックな作用でのみ決定されるのではなく、遺伝子変異を含めた複合的要因によるものと考えられる。TYUC-1 では Tazemetostat 投与により PARP 阻害剤では検出されなかったアポトーシスの活性化を認め、両薬剤の消化器 NEC に対する作用メカニズムの違いを明確化している。EZH2 の A682G 変異や Y646N 変異を有する B 細胞性リンパ腫細胞株 (KARPAS-422, Y646N; SU-DHL-6, Y646N; Pfeiffer, A682G) においては、sub-G1 期の細胞増加とカスパーゼの発現上昇を伴うアポトーシスの誘導がこれまでに報告されている [48, 53, 111]。EZH2 の阻害によりアポトーシスを引き起こす機序は未だ明らかでないが、pro-apoptotic タンパクである Bim の活性化などがこれまでに提唱されている [112-113]。

本研究においては TYUC-1 における EZH2 遺伝子に関するサンガーシーケンス解析を行い、hot spot である Y646 の変異は認めなかった。これまでの大規模なゲノム解析において、germinal center B-cell (GCB) type のびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の 22%、濾胞性リンパ腫の 7-12% に EZH2 の heterozygous Y646 変異が検出されている [114-115]。本変異は機能的に H3K27 のトリメチル化を促進することが明らかにされている [116]。EZH2 阻害薬に高感受性の B 細胞性リンパ腫細胞株の多くは Y646 変異を有しており (WSU-DLCL2, Y646F; KARPAS-422, Y646N; SU-DHL-10, Y646F; SU-DHL-6, Y646N)、治療適応を考慮する上でも有用な指標と考えられる [48, 54]。

一連の実験結果に基づき消化器 NEC に対する治療選択肢を以下のように提示したい。PARP1/PARP2 が高発現している症例では、殺細胞性抗がん剤使用後の再発に対して PARP 阻害薬の選択が考慮される。再発時に認めるような ABC トランスポータ

一の発現が上昇している症例に対しても、PARP 阻害薬は耐性を有することなく使用可能と考えられる。

本研究で使用した NEC 細胞株は原発臓器が各々異なり、この点が PARP 阻害薬、EZH2 阻害薬に対する感受性、作用メカニズムの差異につながっている可能性を考慮すべきである。消化器 NEC については、原発臓器により遺伝学的プロファイルが多様な可能性が指摘されている (表 4)。Klempner らによる結腸直腸 NEC 108 例の解析では、9%の症例に *BRAF* 変異を検出した [117]。また Jesinghaus らは結腸直腸原発の腺がん成分と神経内分泌がん成分が混在した腫瘍である mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC) 19 例のゲノム解析を行い、大腸がんで特徴的な *BRAF*、*TP53*、*APC*、*KRAS* 変異を検出した [118]。このうち 3 例で腺がん成分と神経内分泌がん成分に分けた解析が行われ、*BRAF*、*TP53*、*APC* 変異が双方に共通して認められた。

表 4. 原発臓器による消化器 NEC 遺伝子変異の多様性

| Gene | Yachida et al. ¹⁶ (N = 7) | Klempner et al. ¹¹⁷ (N = 109) | Jesinghaus et al. ¹¹⁸ (N = 19) |
|-------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Organ | Pancreas | Colorectal | Colorectal (MANEC) |
| <i>TP53</i> | 57% (4/7) | NA | 47% (9/19) |
| <i>RBI</i> | 71% (5/7) | NA | 5% (1/19) |
| <i>APC</i> | NA | NA | 16% (3/19) |
| <i>BRAF</i> | NA | 9% (10/109) | 37% (7/19) |
| <i>KRAS</i> | 29% (2/7) | 32% (35/109) | 21% (4/19) |

MANEC, mixed adenoneuroendocrine carcinoma; NA, not available.

BRAF 変異は結腸由来の NEC-DUE2、HROC57、ならびに十二指腸由来の TCC-NECT-2 の二つの細胞株においても検出されているが、膵 NEC ではこうした変異は知られておらず膵原発の A99 においても同変異は検出されていない。臨床的にも消化管原発と肝胆膵原発の NEC で異なる予後を示したデータが存在する [12]。今回の一連の実験結果は消化器 NEC が生物学的に多様性に富んだ腫瘍であることを示唆している。そのため単一の分子標的薬剤の使用で大部分の症例の奏効を期待することは困難と予想され、原発臓器も考慮した各腫瘍個別の *biology* に着目した治療戦略が必要である。がん関連遺伝子をターゲットにしたクリニカルシーケンスにおいては、1 割程度の症例がゲノム情報に合致する新規薬剤の治療を受けて 30%の奏効率を得たとの報告があり、個別化医療の観点から有用なアプローチと考える [119]。

本研究に関して以下のような言及すべき *limitation* が挙げられる。始めに実験に使用した NEC 細胞株が 3 種類と限られており、PARP 阻害薬ならびに EZH2 阻害薬の有用性に関して本研究より確定的な結果を導くことは出来ない。本疾患は希少がんであり細胞株も極めて限られることから、セルバンクから複数の細胞株を入手することは困難であった。加えて、将来的な臨床応用を目指す上では臨床検体を用いて薬剤の感受性に関わるバイオマーカーを明らかにしていく必要があるものと考えられる。第二に本研究で使用した PARP 阻害薬ならびに EZH2 阻害薬は Veliparib と Tazemetostat の各 1 種類ずつであり、薬剤ごとの効果や副作用の特徴を明らかにすることが将来的に必要と考えられる。第三に分子標的薬による検討は標的遺伝子の発現抑制の点で特異的ではなく、ゲノム編集技術ならびに RNAi 技術を使用した実験を併用して行う必要

がある。最後に Tazemetostat は食道原発の TYUC-1 に対して *in vitro* で高い感受性を示したが、緩やかに増殖する細胞株でありヌードマウスへの腫瘍の生着についても他の 2 株に比べ不良であったことから、*in vivo* での Tazemetostat の効果の検討が困難であった。

著者らは小細胞型消化器 NEC の前臨床モデルをもとに PARP、EZH2 阻害薬の有用性に関する検討を行い、本薬剤が一部の消化器 NEC に有効な可能性が示唆された。同時に、本細胞株を用いた実験結果からは、同じ消化器 NEC でも各々のがんにより薬剤の感受性や作用メカニズムが大きく異なり、腫瘍の分子遺伝学的特徴に基づいて複数の分子標的薬剤を効率的に使い分ける治療戦略が鍵となるように考える。

引用文献

1. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States. *JAMA Oncol* 2017; 3: 1335-1342.
2. Ito T, Igarashi H, Jensen RT. Therapy of metastatic pancreatic neuroendocrine tumors (pNETs): recent insights and advances. *J Gastroenterol* 2012; 47: 941-60.
3. Hill JS, McPhee JT, McDade TP, Zhou Z, Sullivan ME, Whalen GF, Tseng JF. Pancreatic neuroendocrine tumors: the impact of surgical resection on survival. *Cancer* 2009; 115: 741-51.
4. O'Toole D, Ruszniewski P. Chemoembolization and other ablative therapies for liver metastases of gastrointestinal endocrine tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 585-94.
5. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011; 364: 514-23.
6. Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, Tomasek J, Raderer M, Lahner H, Voi M, Pacaud LB, Rouyrre N, Sachs C, Valle JW, Fave GD, Van Cutsem E, Tesselaar M, Shimada Y, Oh DY, Strosberg J, Kulke MH, Pavel ME; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial (RADIANT-4) Study Group. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2016; 387: 968-977.

7. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Hörsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzzniewski P. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011; 364: 501-13.
8. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Digestive System. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2010.
9. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2017.
10. Ito T, Igarashi H, Nakamura K, Sasano H, Okusaka T, Takano K, Komoto I, Tanaka M, Imamura M, Jensen RT, Takayanagi R, Shimatsu A. Epidemiological trends of pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors in Japan: a nationwide survey analysis. *J Gastroenterol* 2015; 50: 58-64.
11. Haugvik SP, Janson ET, Österlund P, Langer SW, Falk RS, Labori KJ, Vestermark LW, Grønbaek H, Gladhaug IP, Sorbye H. Surgical treatment as a principle for patients with high-grade pancreatic neuroendocrine carcinoma: A Nordic multicenter comparative study. *Ann Surg Oncol* 2016; 23: 1721-8.
12. Yamaguchi T, Machida N, Morizane C, Kasuga A, Takahashi H, Sudo K, Nishina T, Tobimatsu K, Ishido K, Furuse J, Boku N, Okusaka T. Multicenter retrospective analysis of systemic chemotherapy for advanced neuroendocrine carcinoma of the digestive system. *Cancer Sci* 2014; 105: 1176-81.

13. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, Dueland S, Hofslie E, Guren MG, Ohrling K, Birkemeyer E, Thiis-Evensen E, Biagini M, Gronbaek H, Soveri LM, Olsen IH, Federspiel B, Assmus J, Janson ET, Knigge U. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol* 2013; 24: 152-60.
14. Basturk O, Tang L, Hruban RH, Adsay V, Yang Z, Krasinskas AM, Vakiani E, La Rosa S, Jang KT, Frankel WL, Liu X, Zhang L, Giordano TJ, Bellizzi AM, Chen JH, Shi C, Allen P, Reidy DL, Wolfgang CL, Saka B, Rezaee N, Deshpande V, Klimstra DS. Poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the pancreas: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *Am J Surg Pathol* 2014; 38: 437-47.
15. Walter T, Tougeron D, Baudin E, Le Malicot K, Lecomte T, Malka D, Hentic O, Manfredi S, Bonnet I, Guimbaud R, Coriat R, Lepère C, Desauw C, Thiot-Bidault A, Dahan L, Roquin G, Aparicio T, Legoux JL, Lombard-Bohas C, Scoazec JY, Lepage C, Cadiot G; CEPD investigators. Poorly differentiated gastro-entero-pancreatic neuroendocrine carcinomas: Are they really heterogeneous? Insights from the FFCD-GTE national cohort. *Eur J Cancer* 2017; 79:158-165.
16. Yachida S, Vakiani E, White CM, Zhong Y, Saunders T, Morgan R, de Wilde RF, Maitra A, Hicks J, Demarzo AM, Shi C, Sharma R, Laheru D, Edil BH, Wolfgang CL, Schulick RD, Hruban RH, Tang LH, Klimstra DS, Iacobuzio-Donahue CA. Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 173-84.

17. Hijioka S, Hosoda W, Matsuo K, Ueno M, Furukawa M, Yoshitomi H, Kobayashi N, Ikeda M, Ito T, Nakamori S, Ishii H, Kodama Y, Morizane C, Okusaka T, Yanagimoto H, Notohara K, Taguchi H, Kitano M, Yane K, Maguchi H, Tsuchiya Y, Komoto I, Tanaka H, Tsuji A, Hashigo S, Kawaguchi Y, Mine T, Kanno A, Murohisa G, Miyabe K, Takagi T, Matayoshi N, Yoshida T, Hara K, Imamura M, Furuse J, Yatabe Y, Mizuno N. Rb loss and *KRAS* mutation are predictors of the response to platinum-based chemotherapy in pancreatic neuroendocrine neoplasm with Grade 3: A Japanese multicenter pancreatic NEN-G3 study. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 4625-4632.

18. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernández-Cuesta L, Bosco G, Müller C, Dahmen I, Jahchan NS, Park KS, Yang D, Karnezis AN, Vaka D, Torres A, Wang MS, Korbel JO, Menon R, Chun SM, Kim D, Wilkerson M, Hayes N, Engelmann D, Pützer B, Bos M, Michels S, Vlastic I, Seidel D, Pinther B, Schaub P, Becker C, Altmüller J, Yokota J, Kohno T, Iwakawa R, Tsuta K, Noguchi M, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Petersen I, Chen Y, Soltermann A, Tischler V, Choi CM, Kim YH, Massion PP, Zou Y, Jovanovic D, Kotic M, Wright GM, Russell PA, Solomon B, Koch I, Lindner M, Muscarella LA, la Torre A, Field JK, Jakopovic M, Knezevic J, Castañós-Vélez E, Roz L, Pastorino U, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Thunnissen E, Köhler J, Schuler M, Botling J, Sandelin M, Sanchez-Cespedes M, Salvesen HB, Achter V, Lang U, Bogus M, Schneider PM, Zander T, Ansén S, Hallek M, Wolf J, Vingron M, Yatabe Y, Travis WD, Nürnberg P, Reinhardt C, Perner S, Heukamp L, Büttner R, Haas SA, Brambilla E, Peifer M, Sage J, Thomas RK. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015; 524: 47-53.

19. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2015.
20. Byers LA, Wang J, Nilsson MB, Fujimoto J, Saintigny P, Yordy J, Giri U, Peyton M, Fan YH, Diao L, Masrourpour F, Shen L, Liu W, Duchemann B, Tumula P, Bhardwaj V, Welsh J, Weber S, Glisson BS, Kalhor N, Wistuba II, Girard L, Lippman SM, Mills GB, Coombes KR, Weinstein JN, Minna JD, Heymach JV. Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer Discov* 2012; 2: 798-811.
21. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003; 22: 5323-35.
22. Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, Yap TA. Targeting DNA repair in cancer: Beyond PARP inhibitors. *Cancer Discov* 2017; 7: 20-37.
23. Amé JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Höger T, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 1999; 274: 17860-8.
24. McLornan DP, List A, Mufti GJ. Applying synthetic lethality for the selective targeting of cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 1725-35.
25. Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly (ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3785-90.

26. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 517-28.
27. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 2012; 481: 287-94.
28. Plummer ER, Calvert H. Targeting poly (ADP-ribose) polymerase: a two-armed strategy for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6252-6.
29. Ratnam K, Low JA. Current development of clinical inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1383-8.
30. Lim D, Ngeow J. Evaluation of the methods to identify patients who may benefit from PARP inhibitor use. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23: R267-85.
31. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434: 917-21.
32. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; 434: 913-7.
33. Robert I, Dantzer F, Reina-San-Martin B. Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2009; 206: 1047-56.

34. Faraoni I, Graziani G. Role of BRCA mutations in cancer treatment with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Cancers* 2018; 10. pii: E487.
35. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* 2016; 16: 110-20.
36. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 564-9.
37. Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M, Fuks F, Bye J, Chin SF, Milner J, Brown LA, Hsu F, Gilks B, Nielsen T, Schulzer M, Chia S, Ragaz J, Cahn A, Linger L, Ozdag H, Cattaneo E, Jordanova ES, Schuuring E, Yu DS, Venkitaraman A, Ponder B, Doherty A, Aparicio S, Bentley D, Theillet C, Ponting CP, Caldas C, Kouzarides T. EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell* 2003; 115: 523-35.
38. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474: 609-15.
39. Wiggans AJ, Cass GK, Bryant A, Lawrie TA, Morrison J. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 5: CD007929.
40. Telli ML, Timms KM, Reid J, Hennessy B, Mills GB, Jensen KC, Szallasi Z, Barry WT, Winer EP, Tung NM, Isakoff SJ, Ryan PD, Greene-Colozzi A, Gutin A, Sangale Z, Iliev D, Neff C, Abkevich V, Jones JT, Lanchbury JS, Hartman AR, Garber JE, Ford JM, Silver DP, Richardson AL. Homologous recombination deficiency (HRD) score predicts response to

platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 3764-73.

41. von Minckwitz G, Müller BM, Loibl S, Budczies J, Hanusch C, Darb-Esfahani S, Hilfrich J, Weiss E, Huober J, Blohmer JU, du Bois A, Zahm DM, Khandan F, Hoffmann G, Gerber B, Eidtmann H, Fend F, Dietel M, Mehta K, Denkert C. Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2150-7.

42. Michels J, Vitale I, Galluzzi L, Adam J, Olaussen KA, Kepp O, Senovilla L, Talhaoui I, Guegan J, Enot DP, Talbot M, Robin A, Girard P, Oréar C, Lissa D, Sukkurwala AQ, Garcia P, Behnam-Motlagh P, Kohno K, Wu GS, Brenner C, Dessen P, Saparbaev M, Soria JC, Castedo M, Kroemer G. Cisplatin resistance associated with PARP hyperactivation. *Cancer Res* 2013; 73: 2271-80.

43. Somlo G, Frankel PH, Arun BK, Ma CX, Garcia AA, Cigler T, Cream LV, Harvey HA, Sparano JA, Nanda R, Chew HK, Moynihan TJ, Vahdat LT, Goetz MP, Beumer JH, Hurria A, Mortimer J, Piekarz R, Sand S, Herzog J, Van Tongeren LR, Ferry-Galow KV, Chen AP, Ruel C, Newman EM, Gandara DR, Weitzel JN. Efficacy of the PARP inhibitor veliparib with carboplatin or as a single agent in patients with germline *BRCA1*- or *BRCA2*-associated metastatic breast cancer: California cancer consortium trial NCT01149083. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 4066-4076.

44. Lok BH, Gardner EE, Schneeberger VE, Ni A, Desmeules P, Rekhtman N, de Stanchina E, Teicher BA, Riaz N, Powell SN, Poirier JT, Rudin CM. PARP inhibitor activity correlates

with SLFN11 expression and demonstrates synergy with temozolomide in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 523-535.

45. Mu Y, Lou J, Srivastava M, Zhao B, Feng XH, Liu T, Chen J, Huang J. SLFN11 inhibits checkpoint maintenance and homologous recombination repair. *EMBO Rep* 2016; 17: 94-109.

46. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011; 469: 343-9.

47. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 2006; 24: 268-73.

48. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A 3rd, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 2012; 492: 108-12.

49. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, Smitheman KN, Ott HM, Pappalardi MB, Allen KE, Chen SB, Della Pietra A 3rd, Dul E, Hughes AM, Gilbert SA, Thrall SH, Tummino PJ, Kruger RG, Brandt M, Schwartz B, Creasy CL. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 2989-94.

50. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boultonwood J, Grand FH, Cross NC. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010; 42: 722-6.
51. Bitler BG, Aird KM, Garipov A, Li H, Amatangelo M, Kossenkov AV, Schultz DC, Liu Q, Shih IeM, Conejo-Garcia JR, Speicher DW, Zhang R. Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat Med* 2015; 21: 231-8.
52. Januario T, Ye X, Bainer R, Alicke B, Smith T, Haley B, Modrusan Z, Gould S, Yauch RL. PRC2-mediated repression of SMARCA2 predicts EZH2 inhibitor activity in SWI/SNF mutant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: 12249-12254.
53. Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, Zeng J, Li M, Fan H, Lin Y, Gu J, Ardayfio O, Zhang JH, Yan X, Fang J, Mi Y, Zhang M, Zhou T, Feng G, Chen Z, Li G, Yang T, Zhao K, Liu X, Yu Z, Lu CX, Atadja P, Li E. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 21360-5.
54. Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang KC, Xiao Y, Kadowaki T, Uesugi M, Kuznetsov G, Kumar N, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Waters NJ, Smith JJ, Porter-Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Uenaka T, Pollock RM, Kuntz KW, Yokoi A, Keilhack H. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 842-54.

55. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, Elias L, Ho L, Ranish J, Crabtree GR. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet* 2013; 45: 592-601.
56. Yamagishi M, Uchamaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2017; 29: 375-381.
57. Wilson BG, Wang X, Shen X, McKenna ES, Lemieux ME, Cho YJ, Koellhoffer EC, Pomeroy SL, Orkin SH, Roberts CW. Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell* 2010; 18: 316-28.
58. Kim KH, Kim W, Howard TP, Vazquez F, Tsherniak A, Wu JN, Wang W, Haswell JR, Walensky LD, Hahn WC, Orkin SH, Roberts CW. SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med* 2015; 21:1491-6.
59. Knutson SK, Warholic NM, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Porter Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM, Kuntz KW, Keilhack H. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 7922-7.
60. Ohmoto A, Yachida S. Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 5195-5208.
61. Loibl S, O'Shaughnessy J, Untch M, Sikov WM, Rugo HS, McKee MD, Huober J, Golshan M, von Minckwitz G, Maag D, Sullivan D, Wolmark N, McIntyre K, Ponce Lorenzo JJ, Metzger Filho O, Rastogi P, Symmans WF, Liu X, Geyer CE Jr. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy

in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018; 19: 497-509.

62. Owonikoko TK, Dahlberg SE, Khan SA, Gerber DE, Dowell J, Moss RA, Belani CP, Hann CL, Aggarwal C, Ramalingam SS. A phase 1 safety study of veliparib combined with cisplatin and etoposide in extensive stage small cell lung cancer: A trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E2511). *Lung Cancer* 2015; 89: 66-70.

63. Pietanza MC, Waqar SN, Krug LM, Dowlati A, Hann CL, Chiappori A, Owonikoko TK, Woo KM, Cardnell RJ, Fujimoto J, Long L, Diao L, Wang J, Bensman Y, Hurtado B, de Groot P, Sulman EP, Wistuba II, Chen A, Fleisher M, Heymach JV, Kris MG, Rudin CM, Byers LA. Randomized, Double-Blind, Phase II study of temozolomide in combination with either veliparib or placebo in patients with relapsed-sensitive or refractory small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2018; 36: 2386-2394.

64. Italiano A, Soria JC, Toulmonde M, Michot JM, Lucchesi C, Varga A, Coindre JM, Blakemore SJ, Clawson A, Suttle B, McDonald AA, Woodruff M, Ribich S, Hedrick E, Keilhack H, Thomson B, Owa T, Copeland RA, Ho PTC, Ribrag V. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol* 2018; 19: 649-659.

65. Krieg A, Mersch S, Boeck I, Dizdar L, Weihe E, Hilal Z, Krausch M, Möhlendick B, Topp SA, Piekorz RP, Huckenbeck W, Stoecklein NH, Anlauf M, Knoefel WT. New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. *PLoS One* 2014; 9: e88713.

66. Dizdar L, Werner TA, Drusenheimer JC, Möhlendick B, Raba K, Boeck I, Anlauf M, Schott M, Göring W, Esposito I, Stoecklein NH, Knoefel WT, Krieg A. BRAFV600E_mutation: A promising target in colorectal neuroendocrine carcinoma. *Int J Cancer* 2019; 144: 1379-1390.
67. Gock M, Mullins CS, Harnack C, Prall F, Ramer R, Göder A, Krämer OH, Klar E, Linnebacher M. Establishment, functional and genetic characterization of a colon derived large cell neuroendocrine carcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 3749-3759.
68. Dizdar L, Drusenheimer J, Werner TA, Möhlendick B, Schütte SC, Esposito I, Filler TJ, Knoefel WT, Krieg A. Establishment and characterization of a novel cell line derived from a small cell neuroendocrine carcinoma of the anal canal. *Neuroendocrinology* 2018; 107: 246-256.
69. Ohmoto A, Suzuki M, Takai E, Rokutan H, Fujiwara Y, Morizane C, Yanagihara K, Shibata T, Yachida S. Establishment of preclinical chemotherapy models for gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9: 21086-21099.
70. Yachida S, Zhong Y, Patrascu R, Davis MB, Morsberger LA, Griffin CA, Hruban RH, Laheru D, Iacobuzio-Donahue CA. Establishment and characterization of a new cell line, A99, from a primary small cell carcinoma of the pancreas. *Pancreas* 2011; 40: 905-10.
71. Yanagihara K, Kubo T, Mihara K, Kuwata T, Ochiai A, Seyama T, Yokozaki H. Establishment of a novel cell line from a rare human duodenal poorly differentiated neuroendocrine carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9: 36503-36514.
72. Shimada Y, Okumura T, Takei Y, Watanabe K, Hirasawa A, Yamane A, Nishiyama M, Nagata T, Tsukada K, Shimizu K. Establishment of an esophageal small cell carcinoma cell line (TYUC-1). *AACR 106th Annual Meeting Proceedings* 2015; 75: Abstract 5126.

73. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 22: 27-55.
74. Owonikoko TK, Zhang G, Deng X, Rossi MR, Switchenko JM, Doho GH, Chen Z, Kim S, Strychor S, Christner SM, Beumer J, Li C, Yue P, Chen A, Sica GL, Ramalingam SS, Kowalski J, Khuri FR, Sun SY. Poly (ADP) ribose polymerase enzyme inhibitor, veliparib, potentiates chemotherapy and radiation in vitro and in vivo in small cell lung cancer. *Cancer Med* 2014; 3: 1579-94.
75. Donawho CK, Luo Y, Luo Y, Penning TD, Bauch JL, Bouska JJ, Bontcheva-Diaz VD, Cox BF, DeWeese TL, Dillehay LE, Ferguson DC, Ghoreishi-Haack NS, Grimm DR, Guan R, Han EK, Holley-Shanks RR, Hristov B, Idler KB, Jarvis K, Johnson EF, Kleinberg LR, Klinghofer V, Lasko LM, Liu X, Marsh KC, McGonigal TP, Meulbroek JA, Olson AM, Palma JP, Rodriguez LE, Shi Y, Stavropoulos JA, Tsurutani AC, Zhu GD, Rosenberg SH, Giranda VL, Frost DJ. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2728-37.
76. Clark CC, Weitzel JN, O'Connor TR. Enhancement of synthetic lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and carboplatin in vitro and in vivo using BRCA1 and BRCA2 isogenic models. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 1948-58.
77. Gossage L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 565-77.
78. Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9408-21.

79. Carmichael J, Mitchell JB, DeGraff WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE, Glatstein E, Minna JD. Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer* 1988; 57: 540-7.
80. van Ark-Otte J, Kedde MA, van der Vijgh WJ, Dingemans AM, Jansen WJ, Pinedo HM, Boven E, Giaccone G. Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. *Br J Cancer* 1998; 77: 2171-6.
81. Takigawa N, Takeyema M, Shibayama T, Tada A, Kawata N, Aoe K, Tabata M, Kiura K, Ueoka H, Takahashi K. Rational combinations of amrubicin with cisplatin or irinotecan for small-cell lung cancer cells. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, Volume 46, 2005, abstract 4947.
82. Humerickhouse R, Lohrbach K, Li L, Bosron WF, Dolan ME. Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res* 2000; 60: 1189-92.
83. Jansen WJ, Zwart B, Hulscher ST, Giaccone G, Pinedo HM, Boven E. CPT-11 in human colon-cancer cell lines and xenografts: characterization of cellular sensitivity determinants. *Int J Cancer* 1997; 70: 335-40.
84. Kano Y, Suzuki K, Akutsu M, Suda K, Inoue Y, Yoshida M, Sakamoto S, Miura Y. Effects of CPT-11 in combination with other anti-cancer agents in culture. *Int J Cancer* 1992; 50: 604-10.
85. Fukuda M, Nishio K, Kanzawa F, Ogasawara H, Ishida T, Arioka H, Bojanowski K, Oka M, Saijo N. Synergism between cisplatin and topoisomerase I inhibitors, NB-506 and SN-38, in human small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1996; 56: 789-93.

86. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett* 2016; 370:153-64.
87. Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 917-31.
88. Triller N, Korosec P, Kern I, Kosnik M, Debeljak A. Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease. *Lung Cancer* 2006; 54: 235-40.
89. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdens L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1999; 94: 1086-99.
90. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012; 31: 1869-83.
91. Yamasaki M, Makino T, Masuzawa T, Kurokawa Y, Miyata H, Takiguchi S, Nakajima K, Fujiwara Y, Matsuura N, Mori M, Doki Y. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2011; 104: 707-13.
92. Korita PV, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, Takamura M, Yano M, Sanpei A, Aoyagi Y, Hatakeyama K, Ajioka Y. Multidrug resistance-associated protein 2 determines

the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2010; 23: 965-72.

93. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, Nones K, Cowin P, Alsop K, Bailey PJ, Kassahn KS, Newell F, Quinn MC, Kazakoff S, Quek K, Wilhelm-Benartzi C, Curry E, Leong HS; Australian Ovarian Cancer Study Group, Hamilton A, Mileskin L, Au-Yeung G, Kennedy C, Hung J, Chiew YE, Harnett P, Friedlander M, Quinn M, Pyman J, Cordner S, O'Brien P, Leditschke J, Young G, Strachan K, Waring P, Azar W, Mitchell C, Traficante N, Hendley J, Thorne H, Shackleton M, Miller DK, Arnau GM, Tothill RW, Holloway TP, Semple T, Harliwong I, Nourse C, Nourbakhsh E, Manning S, Idrisoglu S, Bruxner TJ, Christ AN, Poudel B, Holmes O, Anderson M, Leonard C, Lonie A, Hall N, Wood S, Taylor DF, Xu Q, Fink JL, Waddell N, Drapkin R, Stronach E, Gabra H, Brown R, Jewell A, Nagaraj SH, Markham E, Wilson PJ, Ellul J, McNally O, Doyle MA, Vedururu R, Stewart C, Lengyel E, Pearson JV, Waddell N, deFazio A, Grimmond SM, Bowtell DD. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 2015; 521: 489-94.

94. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC; IALT Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-91.

95. Knez L, Sodja E, Kern I, Košnik M, Cufer T. Predictive value of multidrug resistance proteins, topoisomerases II and ERCC1 in small cell lung cancer: a systematic review. *Lung Cancer* 2011; 72: 271-9.

96. Friboulet L, Olausson KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, Kratzke R, Douillard JY, Seymour L, Pirker R, Filipits M, André F, Solary E, Ponsonnailles F, Robin A, Stoclin A, Dorvault N, Commo F, Adam J, Vanhecke E, Saulnier P, Thomale J, Le Chevalier T, Dunant A, Rousseau V, Le Teuff G, Brambilla E, Soria JC. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 1101-10.
97. Kondo H, Kanzawa F, Nishio K, Saito S, Saijo N. In vitro and in vivo effects of cisplatin and etoposide in combination on small cell lung cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 1050-6.
98. Kudoh S, Takada M, Masuda N, Nakagawa K, Itoh K, Kusunoki Y, Negoro S, Matsui K, Takifuji N, Morino H. Enhanced antitumor efficacy of a combination of CPT-11, a new derivative of camptothecin, and cisplatin against human lung tumor xenografts. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 203-7.
99. Morizane C, Machida N, Honma Y, Okusaka T, Boku N, Kato K, Mizusawa J, Katayama H, Hiraoka N, Taniguchi H, Ikeda M, Shibuya Y, Hosokawa A, Nobumasa Mizuno, Takeshi Sano, Masahiro Tsuda, Osamu Yokosuka, Yuko Kitagawa, Mitsuru Sasako, Junji Furuse. Randomized phase III study of etoposide plus cisplatin versus irinotecan plus cisplatin in advanced neuroendocrine carcinoma of the digestive system: A Japan Clinical Oncology Group study (JCOG1213). *J Clin Oncol* 2015; 33: suppl; abstr TPS4143.
100. Ferrarotto R, Cardnell R, Su S, Diao L, Eterovic AK, Prieto V, Morrisson WH, Wang J, Kies MS, Glisson BS, Byers LA, Bell D. Poly ADP-ribose polymerase-1 as a potential therapeutic target in Merkel cell carcinoma. *Head Neck* 2018. doi: 10.1002/hed.25146.

101. Veija T, Koljonen V, Bohling T, Kero M, Knuutila S, Sarhadi VK. Aberrant expression of ALK and EZH2 in Merkel cell carcinoma. *BMC Cancer* 2017; 17: 236.
102. Wang Y, Chen SY, Karnezis AN, Colborne S, Santos ND, Lang JD, Hendricks WP, Orlando KA, Yap D, Kommoss F, Bally MB, Morin GB, Trent JM, Weissman BE, Huntsman DG. The histone methyltransferase EZH2 is a therapeutic target in small cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type. *J Pathol* 2017; 242: 371-383.
103. Hopkins TA, Shi Y, Rodriguez LE, Solomon LR, Donawho CK, DiGiammarino EL, Panchal SC, Wilsbacher JL, Gao W, Olson AM, Stolarik DF, Osterling DJ, Johnson EF, Maag D. Mechanistic dissection of PARP1 trapping and the impact on in vivo tolerability and efficacy of PARP inhibitors. *Mol Cancer Res* 2015; 13: 1465-77.
104. Makvandi M, Pantel A, Schwartz L, Schubert E, Xu K, Hsieh CJ, Hou C, Kim H, Weng CC, Winters H, Doot R, Farwell MD, Pryma DA, Greenberg RA, Mankoff DA, Simpkins F, Mach RH, Lin LL. A PET imaging agent for evaluating PARP-1 expression in ovarian cancer. *J Clin Invest* 2018; 128: 2116-2126.
105. Jelinic P, Levine DA. New insights into PARP inhibitors' effect on cell cycle and homology-directed DNA damage repair. *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 1645-54.
106. Chuang HC, Kapuriya N, Kulp SK, Chen CS, Shapiro CL. Differential anti-proliferative activities of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 649-59.
107. Sabari JK, Lok BH, Laird JH, Poirier JT, Rudin CM. Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14: 549-561.

108. Gardner EE, Lok BH, Schneeberger VE, Desmeules P, Miles LA, Arnold PK, Ni A, Khodos I, de Stanchina E, Nguyen T, Sage J, Campbell JE, Ribich S, Rekhtman N, Dowlati A, Massion PP, Rudin CM, Poirier JT. Chemosensitive relapse in small cell lung cancer proceeds through an EZH2-SLFN11 axis. *Cancer Cell* 2017; 31: 286-299.
109. Berns K, Berns A. Awakening of "Schlafen11" to tackle chemotherapy resistance in SCLC. *Cancer Cell* 2017; 31: 169-171.
110. Murai J, Feng Y, Yu GK, Ru Y, Tang SW, Shen Y, Pommier Y. Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition. *Oncotarget* 2016; 7: 76534-76550.
111. Bradley WD, Arora S, Busby J, Balasubramanian S, Gehling VS, Nasveschuk CG, Vaswani RG, Yuan CC, Hatton C, Zhao F, Williamson KE, Iyer P, Méndez J, Campbell R, Cantone N, Garapaty-Rao S, Audia JE, Cook AS, Dakin LA, Albrecht BK, Harmange JC, Daniels DL, Cummings RT, Bryant BM, Normant E, Trojer P. EZH2 inhibitor efficacy in non-Hodgkin's lymphoma does not require suppression of H3K27 monomethylation. *Chem Biol* 2014; 21: 1463-75.
112. Huang JP, Ling K. EZH2 and histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in triple negative breast cancer cells by differentially increasing H3 Lys²⁷ acetylation in the *BIM* gene promoter and enhancers. *Oncol Lett* 2017; 14: 5735-5742.
113. Wu ZL, Zheng SS, Li ZM, Qiao YY, Aau MY, Yu Q. Polycomb protein EZH2 regulates E2F1-dependent apoptosis through epigenetically modulating Bim expression. *Cell Death Differ* 2010; 17: 801-810.

114. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett R, Tam A, Varhol R, Smailus D, Moksa M, Zhao Y, Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S, Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010; 42: 181-5.
115. Bödör C, O'Riain C, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, Tayyib H, Calaminici M, Clear A, Iqbal S, Quentmeier H, Drexler HG, Montoto S, Lister AT, Gribben JG, Matolcsy A, Fitzgibbon J. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* 2011; 25: 726-9.
116. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, Marquez VE, Marra MA, Gascoyne RD, Humphries RK, Arrowsmith CH, Morin GB, Aparicio SA. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 2011; 117: 2451-9.
117. Klempner SJ, Gershenhorn B, Tran P, Lee TK, Erlander MG, Gowen K, Schrock AB, Morosini D, Ross JS, Miller VA, Stephens PJ, Ou SH, Ali SM. BRAFV600E mutations in high-grade colorectal neuroendocrine tumors may predict responsiveness to BRAF-MEK combination therapy. *Cancer Discov* 2016; 6: 594-600.
118. Jesinghaus M, Konukiewitz B, Keller G, Kloor M, Steiger K, Reiche M, Penzel R, Endris V, Arsenic R, Hermann G, Stenzinger A, Weichert W, Pfarr N, Klöppel G. Colorectal mixed adenoneuroendocrine carcinomas and neuroendocrine carcinomas are genetically closely related to colorectal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2017; 30: 610-619.

119. Tanabe Y, Ichikawa H, Kohno T, Yoshida H, Kubo T, Kato M, Iwasa S, Ochiai A, Yamamoto N, Fujiwara Y, Tamura K. Comprehensive screening of target molecules by next-generation sequencing in patients with malignant solid tumors: guiding entry into phase I clinical trials. *Mol Cancer* 2016; 15: 73.

謝辞

本研究の実施にあたりご指導を賜りました指導教員の中釜斉教授、共同研究者の鈴木雅美先生、高井英里奈先生、六反啓文先生、藤原優子先生、森実千種先生、柳原五吉先生、柴田龍弘先生、谷内田真一先生、ならびに国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野・大阪大学がんゲノム情報学分野の諸先生に深く御礼を申し上げます。