

論文の内容の要旨

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

氏名 大本 晃弘

消化器原発神経内分泌がん (NEC) は希少がんかつ難治がんである。実地診療においては小細胞肺がんに準じてシスプラチン (CDDP) 併用療法が行われるが、予後不良であり臨床効果を示した新規薬剤も存在しない。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前臨床的研究を行うことは有効と考えられる。小細胞肺がんにおいては poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 1 ならびに enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) の高発現が明らかとなっており、これらの標的を阻害する薬剤の有効性が期待される。PARP 阻害薬は PARylation を抑制することで DNA 二本鎖切断を誘導すると共に、DNA 損傷部位で PARP-DNA 複合体を形成することによって細胞毒性を示す。奏効のバイオマーカーとしては、BRCA1/2、ATM をはじめとする相同組み換え修復機構に関連する遺伝子変異の存在が知られており、PARP 阻害作用と組み合わせることにより細胞に致死的な影響をもたらす (合成致死)。また、EZH2 阻害薬はヒストン H3 リシン 27 トリメチル (H3K27me3) を脱メチル化することによりエピジェネティックに抗腫瘍効果を示し、Y646 変異を始めとした EZH2 活性型変異を有する腫瘍での効果が報告されている。PARP 阻害薬は主として卵巣がん、乳がん、EZH2 阻害剤は B 細胞性リンパ腫に対する臨床開発が進行している。消化器原発 NEC における前臨床的検討はこれまで少数である。我々は膵原発株 (A99)、十二指腸原発株 (TCC-NECT-2)、食道原発株 (TYUC-1) の小細胞型消化器 NEC 細胞株を用いて、はじめに殺細胞性抗がん剤の感受性を前臨床的に評価し、この結果を基礎として PARP 阻害薬 (Veliparib)、EZH2 阻害薬 (Tazemetostat) 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。

3 種の NEC 細胞株に対する CDDP の薬剤感受性を viability assay で評価したところ、化学療法歴のない手術標本から樹立された TYUC-1 の感受性が最も高く、細胞株樹立前に CDDP をはじめとした多種にわたる化学療法歴のある A99 は不良であった (IC₅₀ A99: 3.74 µg/ml、TCC-NECT-2: 1.06 µg/ml、TYUC-1: 0.26 µg/ml)。抗がん剤の薬剤耐性との関連が指摘されている ATP binding cassette subfamily B member1 (ABCB1) の遺伝子発現をリアルタイム定量 PCR により評価したところ、A99 での発現が顕著であるのに対して、TYUC-1 では発現を認めなかった。ウェスタンブロッティングによる ABCB1 タンパクの比較を行ったところ、同様に A99 におけるシグナルが最も強く、TYUC-1 ではタンパクが欠損していた。3 種の細胞株を BALB/c ノードマウスに移植したゼノグラフトを作成し、腫瘍の病理組織学的評価を行った。いずれのゼノグラフトにおいても小型の N/C 比が高い均一な形態の腫瘍細胞が solid もしくは nested pattern を呈して増殖しており、クロモグラニン A 陽性、シナプトフィジン陽性、Ki-67 index 高値と併せて小細胞型 NEC に

合致する所見であった。

上記の知見に基づいて、PARP 阻害薬ならびに EZH2 阻害薬の前臨床的検討を行った。はじめに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と十二指腸細胞株をコントロールとして、NEC 細胞株における PARP1 遺伝子発現をリアルタイム定量 PCR により評価したところ、A99、TYUC-1 において有意な発現上昇を認めた ($P = 0.0008$; $P = 0.014$)。A99 での遺伝子発現が最も上昇しており、細胞株ならびに細胞株を移植したマウスゼノグラフトにおいて PARP1 タンパクは高発現であった。Veliparib に対する感受性は CDDP 低感受性株である A99 で最も高く (IC_{50} A99: 9.7 $\mu\text{g/ml}$ 、TCC-NECT-2: 15.2 $\mu\text{g/ml}$ 、TYUC-1: 26.1 $\mu\text{g/ml}$)、CDDP との併用効果を示した。Veliparib 投与による PARP1 ならびにポリ ADP-リボシル化により生成される poly(ADP-ribose) (PAR) のタンパク発現については、3 種の細胞株において PARP1 の発現が維持されるのに対して PAR は濃度依存的に抑制された。本薬剤の作用メカニズムを明らかにするため、DNA 二本鎖切断を反映する γ -H2AX を蛍光染色により評価したところ、A99 においては Veliparib 投与により染色陽性細胞比率が増加し、CDDP との併用による更なる陽性率の上昇が観察された。ウェスタンブロッティングにおいても Veliparib 投与により A99 の γ -H2AX シグナルが増強したが、他の 2 つの細胞株ではシグナルの増強は認めなかった。セルサイクルアッセイを行ったところ A99 では Veliparib 投与により S 期細胞比率の上昇を認め、S 期の進行に必要な細胞周期制御調節因子である Cyclin A ならびに CDK2 の遺伝子発現が上昇した。次に A99 を BALB/c ノードマウスの皮下に移植し、コントロール群、Veliparib 単独群の 2 群に分けて 21 日間の 1 コース投与を行った。実験終了時の治療開始時に対する相対腫瘍量 (平均値 \pm 標準誤差) はコントロール群: 11.1 ± 1.3 、Veliparib 群: 6.5 ± 1.4 であり、Veliparib 群で有意に腫瘍の増大が抑制された ($P = 0.045$)。毒性の点からは体重減少は明らかでなかった。

PARP1 と同様に EZH2 の遺伝子発現を評価したところ、TYUC-1 における発現が有意に亢進しており、A99 についても上昇傾向であった ($P = 0.037$; $P = 0.071$)。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く、A99 では EZH2 遺伝子発現を認めるにも関わらず H3K27me3 は欠損していた。TCC-NECT-2、TYUC-1 共に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の Tazemetostat 投与により H3K27me3 のシグナルは消失した。Viability assay においては、TYUC-1 は他の細胞株に比較し Tazemetostat に対する 40 倍程度の感受性を有していた (IC_{50} A99: 17.8 $\mu\text{g/ml}$ 、TCC-NECT-2: 17.9 $\mu\text{g/ml}$ 、TYUC-1: 0.47 $\mu\text{g/ml}$)。TYUC-1 を使用しセルサイクルアッセイを行うと、sub-G1 期の細胞比率が薬剤の投与期間・濃度依存的に上昇し、cleaved PARP1 シグナルの増強を認めた。

薬剤感受性との関連を明らかにするため、A99 を樹立した腫瘍組織と対照の正常組織を用いた全ゲノムシーケンス、TCC-NECT-2 細胞株を用いた 114 のがん関連遺伝子に関するターゲットシーケンスを行った。TYUC-1 については細胞株と対照の正常組織を用いて、EZH2 遺伝子変異に関するサンガーシーケンスを行った。PARP 阻害薬の奏効に関わる相同組み替え修復関連の遺伝子変異ならびに EZH2 阻害薬の奏効に関わる EZH2 の変異は A99、TCC-NECT-2 で検出されず、TYUC-1 においても hot spot である EZH2 Y646 変異は認めなかった。

本研究においては、消化器 NEC 細胞株のうち A99 と TYUC-1 において PARP1、EZH2 の高発

現を認めた。消化器 NEC に対する同様の検討はこれまでにないが、メルケル細胞がん、卵巣小細胞がんにおける PARP1、EZH2 高発現の報告がある。*In vitro* での Veliparib 単剤の薬剤感受性ならびに CDDP との併用による抗腫瘍効果の増強は PARP1 発現レベルが最も高い A99 で顕著であり、*in vivo* モデルにおいても Veliparib 投与により腫瘍増大が有意に抑制された。明らかな毒性はなく、CDDP 治療後再発・不応症例に対して PARP 阻害薬が有効な可能性を示唆した。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。本研究において A99 では γ -H2AX 陽性細胞と S 期細胞の蓄積が同時期に認められ、S 期の進行に関与する Cyclin A、CDK2 の発現上昇を認めた。TCC-NECT-2、TYUC-1 において Tazemetostat は H3K27me3 の脱メチル化を引き起こしたが、アポトーシスを伴う細胞増殖抑制効果は TYUC-1 でのみ認められた。この結果から EZH2 阻害薬の抗腫瘍効果はエピジェネティックな機序のみではなく、腫瘍の遺伝子変異を含めた複合的な要因により決定されることが示唆される。NEC 細胞株のゲノム解析において両薬剤の奏効に関わる明らかな遺伝子変異は検出されなかったが、網羅的な解析により本薬剤の感受性に関わるバイオマーカーが同定されることが期待される。

我々は小細胞型消化器 NEC 細胞株を用いた前臨床的検討を行い、PARP 阻害薬、EZH2 阻害薬が一部の消化器 NEC に有効な可能性を示した。同時に各 NEC により薬剤の感受性や作用メカニズムが異なることを明らかにした。