

博士論文

膵臓がんに対する新規併用化学療法の基礎的検討

令和2年度

森元能仁

# 目 次

序論	4
第 I 章 GEM と S-1 併用療法の作用機序解析	
1. 緒言	7
2. 実験材料と方法	9
2-1. 細胞株	9
2-2. 抗がん剤	9
2-3. 抗体	9
2-4. MTT assay	10
2-5. 細胞周期解析	10
2-6. Western blotting	11
2-7. 統計解析	12
3. 結果	13
3-1. S-1 と GEM による併用効果の解析	13
3-2. S-1 と GEM の併用が細胞周期に与える影響	14
3-3. Cyclin の発現量の解析	16
3-4. p21 と p27 の発現量の解析	18
3-5. Chk1 のリン酸化の解析	19
4. 考察	22
5. 小括	25
第 II 章 Chk1 阻害剤 prexasertib を用いた新規治療法の検討	
1. 緒言	26
2. 実験材料と方法	27
2-1. 細胞株	27
2-2. 抗がん剤	27
2-3. 抗体	27

2-4. MTT assay	28
2-5. 細胞死の解析	28
2-6. Western blotting	29
2-7. cytochrome <i>c</i> の解析	30
2-8. Small interfering RNA を用いたトランスフェクション	30
2-9. 統計解析	30
3. 結果	31
3-1. prexasertib の GEM、S-1 との併用効果の解析	31
3-2. prexasertib、GEM、S-1 による細胞死の解析	34
3-3. prexasertib + GEM + S-1 による細胞増殖抑制効果の詳細な機序の 解析	36
3-4. Chk1 特異的 Small interfering RNA 処理が GEM + S-1 によるアポ トーシスの誘導へ与える影響	38
4. 考察	40
5. 小括	44
第Ⅲ章 Bcl-2 ファミリーをターゲットとした治療法の検討	
1. 緒言	45
2. 実験材料と方法	47
2-1. 細胞株	47
2-2. 抗がん剤	47
2-3. 抗体	47
2-4. MTT assay	48
2-5. 細胞死の解析	48
2-6. Western blotting	49
2-7. cytochrome <i>c</i> の解析	49
2-8. Small interfering RNA を用いたトランスフェクション	50
2-9. 統計解析	50

3.結果	51
3-1. venetoclax と navitoclax を用いた各種抗がん剤（GEM、S-1、prexasertib）との併用効果の解析	51
3-2. prexasertib と navitoclax による細胞死の解析	53
3-3. prexasertib と navitoclax の併用による細胞増殖抑制効果の詳細な機序の解析	55
3-4. Bcl-2 と Bcl-xL 特異的 siRNA 処理が prexasertib によるアポトーシスの誘導へ与える影響	57
3-5. 膵臓がん細胞株における内因性の Bcl-2、Bcl-xL、Chk1 の発現量の解析	59
4.考察	61
5.小括	64
総括	65
謝辞	71
参考文献	72

## 序 論

本邦における膵臓がんの患者数は年々増加しており、部位別がん死亡数は第4位である<sup>1)</sup>。膵臓がん患者の初発症状として腹痛、腹部膨満感、黄疸、体重減少等があるが、特異的な症状に乏しい<sup>2)</sup>。一方無症状で発見される場合もあり、早期診断は困難である。切除手術が唯一治癒を期待できる治療であるにも関わらず、切除可能性は20%以下である<sup>2)</sup>。その少ない切除例においても術後早期に再発することが多い。また5年生存率は9%と極めて低く、予後不良である<sup>3)</sup>。外科的治療に加え、放射線療法や化学療法による集学的治療が行われるが、その多くが治療抵抗性を示す。現在膵臓がんに対する新薬開発や臨床試験が世界各地で行われ、生存期間が少しずつ延長してきているが、その成績は十分ではない。そのため、膵臓がんの予後改善のために有効な化学療法の開発が重要な課題である。

1997年に gemcitabine (GEM) と fluorouracil (5-FU) の無作為化比較試験により、GEM が生存期間、症状緩和効果において有意に優れていると報告され<sup>4)</sup>、以降 GEM が進行膵臓がんに対する標準療法として広く使用されている。しかし、単剤療法での治療成績は十分とはいえないのが現状であり、薬剤耐性が生じて治療効果が失われる症例も少なくはない。そこで世界中で様々な GEM との併用療法が試みられてきたが、本邦では経口フッ化ピリミジン系抗がん剤である S-1 を中心に開発が行われてきた。S-1 は 5-FU のプロドラッグである tegafur (FT) と 2 種類の modulator である 5-chloro-2,4-dihydropyridine (CDHP) と oteracil potassium (Oxo) を 1:0.4:1 の比で含む合剤である<sup>5)</sup>。FT は肝臓で次第に 5-FU に変換され、速やかに dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) により分解される。CDHP は 5-FU の分解酵素である DPD を強力に阻害することで 5-FU の血中濃度が維持され、その結果抗腫瘍効果が増強される<sup>6)</sup>。Oxo は消化管組織に分布して pyrimidine phosphoribosyltransferase を選択的に阻害し、5-FU のリン酸化を抑制することで重篤な消化器毒性を軽減させる<sup>7)</sup>。S-1 の抗腫瘍効果は既に

単剤ないしは併用療法で胃がんや大腸がん、非小細胞肺癌等の様々な固形がんが証明されている<sup>8-12)</sup>。

膵臓がんに対して GEM 単剤療法と S-1 単剤療法、GEM + S-1 併用療法の 3 つの治療を比較した第Ⅲ相無作為化比較試験 (GEST) が行われ、S-1 単剤療法の GEM 単剤療法に対する非劣性が証明された<sup>13)</sup>。GEM + S-1 療法は GEM 単剤療法に対して主要評価項目である生存期間 (OS) を有意に延長させることはできなかったが、副次的評価項目の無増悪生存期間 (PFS) を有意に延長させた。これらの試験結果から、本邦では S-1 が GEM と並んで膵臓がんに対するキードラッグとして使用されるようになり、GEM + S-1 療法は現在、膵臓がんに対する薬物治療の 1 つの選択肢として使用されている。

しかし GEM + S-1 療法における基礎レベルの知見は少なく、さらなるエビデンスの集積が待望されている。またその併用効果について分子レベルにおける基礎研究はほとんど行われていないのが現状である。これまでに著者らはヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 を用いて GEM と S-1 の併用療法に対する基礎的検討を行い、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay により併用療法の相乗効果を明らかにした。更にフローサイトメトリー (FACS) を用いた細胞周期への影響を解析した結果、併用群において各単剤群と比較し、最も S 期に細胞が蓄積することを見出した<sup>14)</sup>。

そこで本研究では本邦における膵臓がんに対する標準的薬物療法である GEM + S-1 療法の基礎的検討を行い、その分子メカニズムを明らかにすると共に、更に効果的なターゲットを模索し、新規薬物治療法を開発することを目的とした。

第Ⅰ章では、ヒト膵臓がん細胞株 SUIT-2 に対して MIA PaCa-2 同様に GEM と S-1 の併用効果を検討し、細胞周期を解析した。またその細胞周期遅延の分子メカニズムを MIA PaCa-2 と SUIT-2 を用いて検討した。

第Ⅱ章では、第Ⅰ章で明らかとなった S 期細胞の蓄積を引き起こすチェッ

クポイントキナーゼ 1 (Chk1) の阻害剤 prexasertib を用いて、GEM、S-1 それぞれの単剤および GEM + S-1 併用療法と組み合わせたの細胞増殖抑制効果を MTT assay にて検討した。またその併用療法との組み合わせによる細胞死と細胞増殖抑制効果の分子メカニズムについて検討した。

第Ⅲ章では、2種の Bcl-2 阻害剤 (venetoclax、navitoclax) を用いて各種抗がん剤 (GEM、S-1、prexasertib) とそれぞれを組み合わせてより有効な治療法を検討した。また small interfering RNA (siRNA) を用いて細胞増殖抑制効果の詳細な分子メカニズムについて検討した。

以下、これらの検討から得られた知見について詳述する。

# 第 I 章 GEM と S-1 併用療法の作用機序解析

## 1. 緒 言

1997 年に膵臓がんに対してそれまでの標準的治療法であった 5-FU 単剤療法と GEM 単剤療法を比較する第 III 相試験が行われ、GEM 単剤が 5-FU 単剤を上回る延命効果と症状緩和効果が報告された。以降は GEM 単剤が切除不能膵臓がんに対する第一選択肢として用いられてきた<sup>4)</sup>。しかしその成績は十分ではなく、以降 GEM を対照群として多くのランダム化比較試験 (RCT) が行われ、新規薬剤の単剤療法もしくは GEM との併用療法が比較検討されてきた。

本邦では、S-1 が 2006 年 8 月に膵臓がんへの保険適応が認められた。以降は GEM と S-1 の併用療法の第 II 相試験が複数行われてきた。そして GEM 単剤療法と S-1 単剤療法と GEM + S-1 療法の 3 つの治療を比較した第 III 相無作為化比較試験 (GEST) が行われ、S-1 単剤療法の GEM 単剤療法に対する非劣性は証明されたものの、GEM 単剤に対する GEM + S-1 療法の優越性は証明できなかった<sup>13)</sup>。しかし GEM + S-1 療法は、GEM 単剤に対して副次的評価項目の無増悪生存期間 (PFS) を有意に延長させた。これらの結果より、本邦において現在 GEM + S-1 療法は膵臓がんに対する薬物治療の 1 つの選択肢として使用されている。

GEM + S-1 療法の臨床開発が進んだものの、一方で根拠となる基礎レベルの知見は少なく、さらなるエビデンスの集積が待望されている。これまでに著者らはヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 を用いて GEM + S-1 療法に対する基礎的検討を行い、MTT assay により併用療法の相乗効果を明らかにした。更にフローサイトメトリー (FACS) を用いて細胞周期への影響を解析したところ、併用群において各単剤群と比較し、最も S 期細胞の蓄積が観察された<sup>12)</sup>。また細胞死に与える影響を検討するため、FACS による Sub-G1 解析法、TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法を用いてアポトーシスを検討したが、GEM 群と GEM + S-1 群のアポトーシス誘導に有意な差は無

いことを確認した<sup>14)</sup>。

そこで本章では第一に、他の膵臓がん細胞株においても同様に GEM と S-1 による相乗効果が認められるかどうか検討するため、膵臓がん細胞株 SUIT-2 を用いて MTT assay を行い、GEM と S-1 の併用効果を検討した。また FACS にて細胞周期への影響を解析した。そして MIA PaCa-2 と SUIT-2 を用いて細胞周期の進行に関わる Chk1 やがん抑制遺伝子、Cyclin 等の蛋白の発現を Western blotting にて検出し、S 期細胞蓄積についての詳細な作用機序を分子レベルで明らかにした。

## 2. 実験材料と方法

### 2-1. 細胞株

ヒト膵臓がん細胞株 SUIT-2 (JCRB、大阪、日本) とヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 (ATCC、MD、USA) を用いた。SUIT-2 は 10% FBS (fetal bovine serum) (Invitrogen. Co., CA、USA) 添加 RPMI1640 (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) にて培養した。MIA-PaCa-2 は 10% FBS および 2.5% HBS (horse bovine serum) (Invitrogen) 添加 D-MEM (和光純薬工業株式会社) にて培養した。

### 2-2. 抗がん剤

S-1 および GEM (日本イーライリリー株式会社、神戸、日本) を使用した。S-1 は 5-FU (協和発酵工業株式会社、東京、日本) と CDHP (大鵬薬品工業株式会社、東京、日本) を S-1 の臨床試験の血中濃度を参考にして 1:2 で混合したものを使用した<sup>15)</sup>。

### 2-3. 抗体

抗ヒト Cyclin D1 抗体 (ウサギ monoclonal Antibody (mAb)、H-295、1:1000 dilution)、抗ヒト Cyclin E 抗体 (ウサギ polyclonal Antibody (pAb)、C-19、1:1000 dilution)、抗ヒト Cyclin A 抗体 (ウサギ pAb、H-432、1:1000 dilution)、抗ヒト p27 抗体 (ウサギ pAb、C-19、1:1000 dilution)、抗ヒト Chk1 抗体 (ウサギ pAb、FL-476、1:1000 dilution)、抗ヒト GAPDH 抗体 (ウサギ pAb、FL-335、1:1000 dilution) は Santa Cruz Biotechnology (CA、USA) より購入し、抗ヒト p21 抗体 (ウサギ mAb、12D1、1:1000 dilution) と抗ヒト Phospho-Chk1(Ser345) 抗体 (ウサギ mAb、1:1000 dilution) は Cell Signaling Technology (MA、USA) より購入し、使用した。二次抗体として抗ウサギ IgG-HRP を Cell Signaling Technology より購入し、使用した。

#### 2-4. MTT assay

96 well plate に SUIT-2 を  $1 \times 10^3$  cells / 100  $\mu$ L とした細胞懸濁液を 100  $\mu$ L / well ずつ播種し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、S-1 濃度 (5-FUとして) が 0.1 ~ 10  $\mu$ g / mL、GEM 濃度が 0.00025 ~ 0.005  $\mu$ g / mL となるように調製した培地を 100  $\mu$ L / well ずつ添加した。併用する際は各薬剤で調製した培地を 100  $\mu$ L / well ずつ添加した。72 時間の培養後、上清を除去し Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、MTT 試薬 (0.4% MTT : 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide、SIGMA、MO、USA) 10  $\mu$ L / well および 0.1 M コハク酸ナトリウム六水和物 (関東化学、東京、日本) 10  $\mu$ L / well を添加し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間反応させた。生成した formazan を Dimethyl Sulfoxide (関東化学) 150  $\mu$ L にて溶解し、測定波長 540 nm、補正波長 630 nm における吸光度をプレートリーダー (Elx800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., VT, USA) にて測定した。

細胞増殖抑制効果の判定は、細胞のみの well の OD 値をブランク (a)、細胞 + MTT 試薬の well の OD 値を対照群 (b)、細胞 + 抗がん剤 + MTT 試薬の well の OD 値を試験群 (c) とした時、以下の式により Inhibition Index (I.I.) (%) を算出し、50%以上を有効と判定した。

$$\text{I.I. (\%)} = (\text{b}-\text{c}) / (\text{b}-\text{a}) \times 100$$

さらに、I.I.値が 50%になる濃度を算出し IC<sub>50</sub> 値 (50%抑制濃度) ( $\mu$ g / mL) とした。S-1 と GEM による併用効果の判定は classical isobologram<sup>16)</sup> を用いた。

#### 2-5. 細胞周期解析

SUIT-2 ( $7.0 \times 10^4$  cells) を 60 mm culture dish に播種し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し、予備実験を行った際に S 期細胞蓄積を顕著に認めた濃度の S-1 が 0.3  $\mu$ g / mL (MTT assay の IC<sub>50</sub> 値の約半量)、GEM が 0.0006  $\mu$ g / mL (MTT assay の IC<sub>50</sub> 値の約半量) と

なるように調製した培地を添加した。指定時間 (12、24、48、72 時間) の経過後、Trypsin-EDTA (Invitrogen) を用いて細胞を回収し、1000×g で遠心分離し、PBS で 2 回洗浄した後、0.1% TritonX-100 / PBS にて細胞を裸核させた。RNaseType I-A (SIGMA) を終濃度が 0.5 mg / mL となるように添加し、37 °C で 15 分間反応させ RNA を分解した後、Propidium Iodide (PI) を最終濃度が 50 μL / mL となるように添加して 10 分間染色し、ナイロンメッシュ (#300) にて細胞の凝集塊を除去後直ちに FACS calibur (Becton Dickinson、CA、USA) を用いて測定した。取得した細胞データの解析は CELLQuest ver.3.1 (Becton Dickinson) で行い、細胞周期の分布は ModFit LT ver.3.0 (Becton Dickinson) で解析した。

## 2-6. Western blotting

MIA PaCa-2 ( $6.0 \times 10^5$  cells) または SUIT-2 ( $3.0 \times 10^5$  cells) を 100 mm culture dish に播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去した。各抗がん剤の濃度においては細胞周期解析の結果から、S 期細胞蓄積を認めた濃度を設定し<sup>14)</sup>、MIA PaCa-2 においては S-1 が 0.4 μg / mL (MTT assay の IC<sub>50</sub> 値)、GEM が 0.002 μg / mL (MTT assay の IC<sub>50</sub> 値の 1/4) となるように調製し、SUIT-2 においては S-1 が 0.3 μg / mL (MTT assay の IC<sub>50</sub> 値の約半量)、GEM が 0.0006 μg / mL (MTT assay の IC<sub>50</sub> 値の約半量) となるように調製した培地を添加した。指定時間 (24、48、72 時間) の経過後、上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した後、Lysis buffer [25 mM Tris HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、Complete protease inhibitor cocktail (Roche、Mannheim、Germany)、PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche)] でタンパク質を可溶化し、cell scraper (IWAKI、東京、日本) で細胞を回収した。氷上で 20 分間静置後、15,000×g で 15 分間遠心分離し、上清を -80 °C で保存した。タンパク質濃度は BCA Protein Assay Reagent (Pierce、IL、USA) を用いて測定した。回収したサンプルは 2×loading buffer [0.1M Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、12% β -mercaptoethanol、20% glycerol、0.2%

bromophenol blue] で希釈し、100℃で 15 分間加熱した。各群の等量のタンパク質を 12% SDS-PAGE にて分離し、PVDF 膜 (MILLIPORE、MA、USA) に転写した。ブロッケーアス (雪印乳業、東京、日本) にて 1 時間ブロッキング後、各一次抗体を 1 時間、さらに二次抗体を 1 時間反応させた。最終的に ECL detection kit (GE Healthcare、Amersham、UK) にて化学発光を行い、Hyperfilm TM ECL (GE Healthcare) に露光させた。検出されたバンドの強度は Image J (NIH、MD、USA) にて定量解析を行った。

## 2-7. 統計解析

MTT assay、細胞周期解析による測定値は平均値±標準偏差で表示した。Image J による解析結果は平均値±標準誤差で表示した。細胞周期解析、Image J による解析結果による平均値の比較には分散分析 (ANOVA) を用いた後、ポストホックテストとして Fisher's PLSD 法を用いた。5%未満を有意差ありと判断し、統計解析ソフトは STAT VIEW for Windows ver.5 (HULINKS Inc.、東京、日本) を用いた。

### 3. 結 果

#### 3-1. S-1 と GEM による併用効果の解析

SUIT-2 に対して S-1 と GEM についてそれぞれ MTT assay を行い、IC<sub>50</sub> 値を算出した。それぞれの結果は 0.69 ± 0.13 µg/mL、0.0011 ± 0.0003 µg/mL であった。S-1 と GEM の併用実験では、単剤の I.I.値が 50 % を下回り、有効でなかった濃度 (GEM 0.00025 ~ 0.0006 µg/mL、S-1 0.1 ~ 0.3 µg/mL) において、両薬剤を併用することにより I.I.値が 50 % 以上となる有効な組み合わせが多く認められた (Table 1)。

Table 1. Effect of combination therapy of S-1 and GEM against SUIT-2.

S-1 (µg/ml)	GEM (µg/ml)					
	0	0.00025	0.0005	0.0006	0.0007	0.001
0	–	2.7	21.9	42.0	52.7	72.8
0.1	11.2	19.7	41.1	52.7	58.6	75.0
0.15	27.9	30.9	52.1	61.5	68.2	77.9
0.2	37.5	39.8	54.9	64.3	69.4	77.7
0.3	49.6	54.6	65.6	70.7	73.8	80.4
0.5	62.6	64.7	71.4	75.6	77.2	82.3

Data are shown as the mean inhibition index (%) from four separate experiments. Numbers on a grey background are greater than or equal to 50.

更に S-1 と GEM による併用効果を classical isobologram<sup>16)</sup> を作製し解析すると、併用時の data point は全て、それぞれの単剤での IC<sub>50</sub> 値を結んだ直線より左下に位置し相乗効果が確認された (Figure 1)。

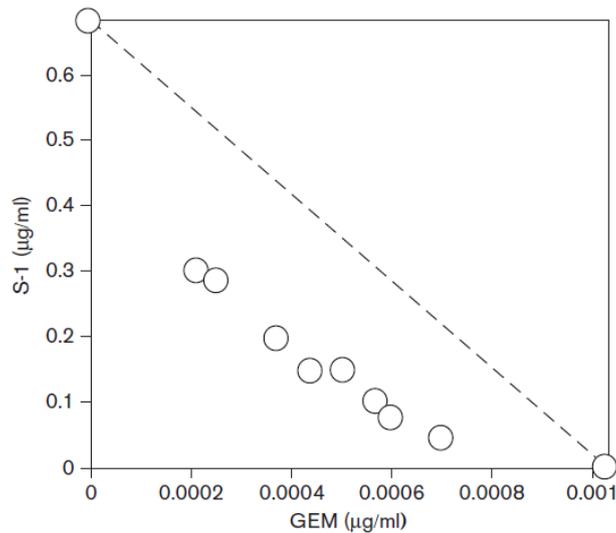


Figure 1. Classical isobologram showing treatment of SUIT-2 cells with a combination of S-1 and GEM. The  $IC_{50}$  values for S-1 and GEM were connected with a dotted line to distinguish the area of synergism and the area of antagonistic effect. Plots on the dotted line indicate an additive effect. S-1 plus GEM shows a synergistic effect.

### 3-2. S-1 と GEM の併用が細胞周期に与える影響

S-1 と GEM の併用が SUIT-2 の細胞周期に与える影響について検討するため、S-1 単剤、GEM 単剤と両薬剤を併用し、細胞周期に現れる変化を解析した。未処理 (control) 群においては 12 時間目で G1 期、S 期、G2/M 期の割合がそれぞれ  $35.8 \pm 0.4$ 、 $55.1 \pm 1.3$ 、 $9.1 \pm 0.9\%$ であったが、培養時間が長くなるに伴い G1 期が増加して S 期と G2/M 期は共に減少し、72 時間目ではそれぞれ  $70.5 \pm 1.1$ 、 $25.1 \pm 1.3$ 、 $4.4 \pm 0.7\%$ となった。S-1 群では 24 時間目まで細胞周期の分布が control 群とほぼ変わらなかったが、48 時間目以降 S 期細胞の増加が認められ、48 時間目には  $58.5 \pm 0.6\%$ 、72 時間目には  $67.6 \pm 0.9\%$ と S 期細胞の増加が持続した。GEM 群においては 12 時間目から S 期細胞の顕著な増加が認められ、12 時間目、24 時間目にはそれぞれ  $78.3 \pm 0.1$ 、 $77.1 \pm 0.4\%$ となったが、48 時間目以降は減少を認めた。一方、S-1 と GEM の併用群においては S 期細胞の割合が 12 時間目、24 時間目でそれぞれ  $78.8 \pm 0.1\%$ 、 $80.9 \pm 0.2\%$ となり、GEM 群と同様に S 期細胞の顕著な増加を認めた。また 48 時間目以降 72 時間目まででは、S 期細胞がそれぞれ  $69.6 \pm 1.2$ 、 $68.1 \pm 0.9\%$ となり、S-1 群と同様に S 期細胞の高い割合が持続しており、併用群では両薬剤の特徴が表れる結果となった。尚、48 時間目における

S 期細胞の割合は併用群と各々の単剤群との間に有意な差を認めた ( $p < 0.0001$ ) (Figure 2)。S-1 と GEM は共に DNA の合成を阻害するピリミジン系代謝拮抗薬であるが、併用の結果は S 期細胞が増加していた。両薬剤を併用することにより細胞周期が S 期で遅延していることが示唆された。

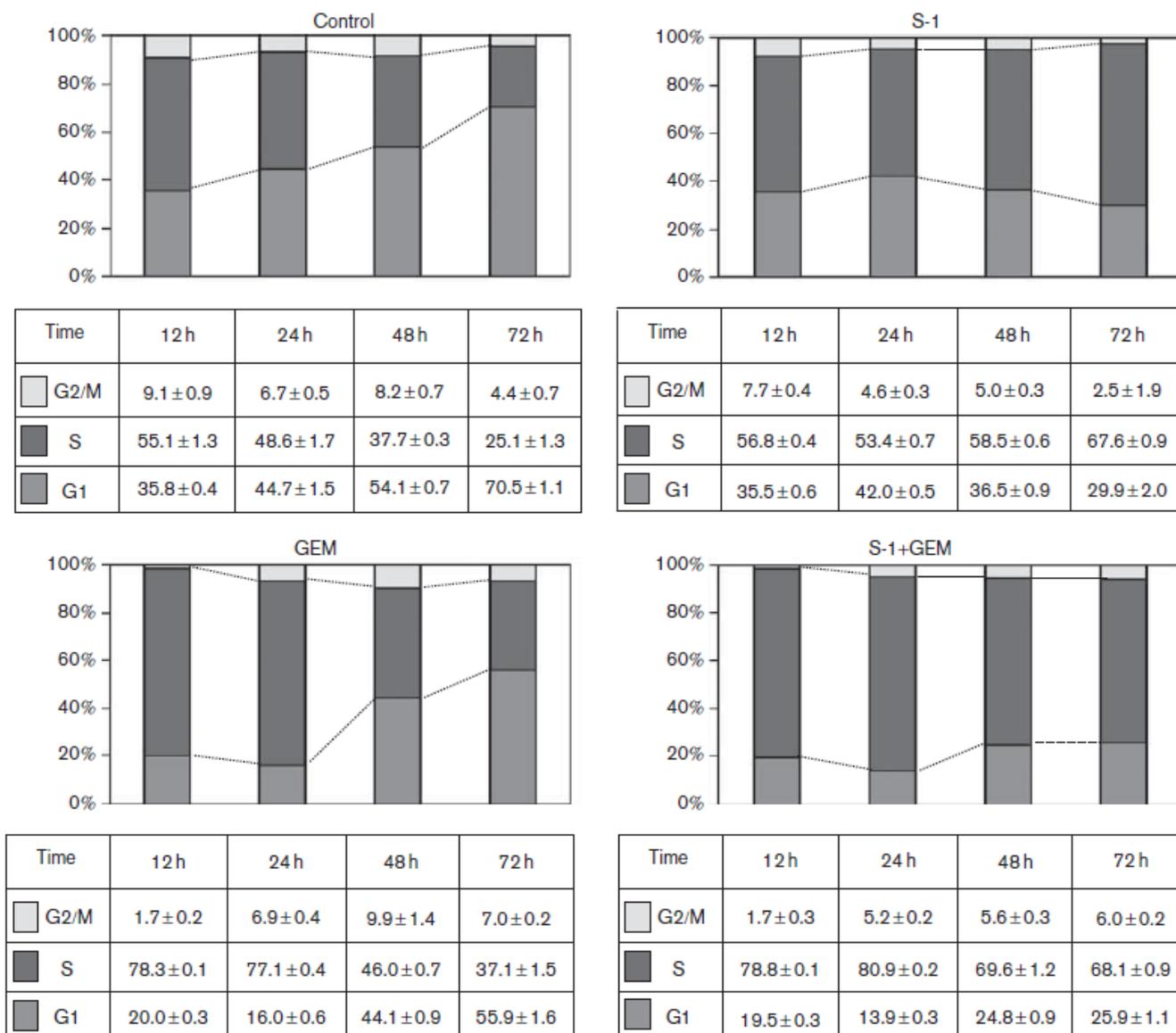


Figure 2. Changes at each phase of the cell cycle induced in SUIT-2 cells by S-1, GEM, or a combination of both drugs. Data (mean ± SD) are from three separate experiments (n=3).

### 3-3. Cyclin の発現量の解析

以前報告した細胞周期解析の結果では<sup>14)</sup>、ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 において S-1 と GEM の併用添加後 72 時間目に S 期細胞が増加することを明らかにしている。今回、SUIT-2 における細胞周期解析の実験では、併用添加後 48 時間目に S 期細胞が増加していた。そこで、MIA PaCa-2 と SUIT-2 において薬剤併用による S 期細胞増加の詳細な機序を解明するため、細胞周期進行に関わる種々のタンパク質 (Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、p21、p27、Chk1) の発現量の変化を Western blotting にて検出した。初めに薬剤併用による S 期細胞増加の更に詳細な機序を解明するため、Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A の発現量の変化を検出した。細胞周期解析の結果を考慮し、MIA PaCa-2 においては、薬剤添加後 72 時間目に、SUIT-2 においては添加後 48 時間目のサンプルを用いて実験を行った。MIA PaCa-2 における Cyclin D1 の発現は S-1 群、GEM 群、併用群でそれぞれ未処理の control 群の約 0.7 倍、0.7 倍、0.3 倍に低下し、併用群でのみ control 群に比べ有意に減少した ( $p < 0.01$ ) (Figure 3)。同様に Cyclin E の発現も併用群でのみ、control 群の約 0.8 倍となり各々の単剤群と比較し有意に減少した ( $p < 0.05$ )。Cyclin A の発現は S-1 群、GEM 群、併用群でそれぞれ control 群の約 1.4 倍、1.7 倍、2.7 倍に上昇した。併用群では各々の単剤群と比較し有意な発現の増加を認めた ( $p < 0.05$ )。SUIT-2 においては Cyclin D1 の発現が S-1 群と併用群でのみ減少し、それぞれ control 群の約 0.7 倍、0.6 倍となった (Figure 4)。併用群と各々の単剤群との間に有意な減少が認められた ( $p < 0.05$ )。Cyclin E の発現は S-1 群、GEM 群、併用群においてそれぞれ control 群の約 1.2 倍、1.3 倍、1.5 倍に増加し、有意な差は認められなかったものの、併用群が各々の単剤群を上回る傾向が観察された。Cyclin A の発現は S-1 群と併用群においてのみ増加し、それぞれ control 群の約 1.5 倍、1.7 倍となり、有意な差は認められなかったものの、併用群の発現が各々の単剤群を上回る傾向が観察された。

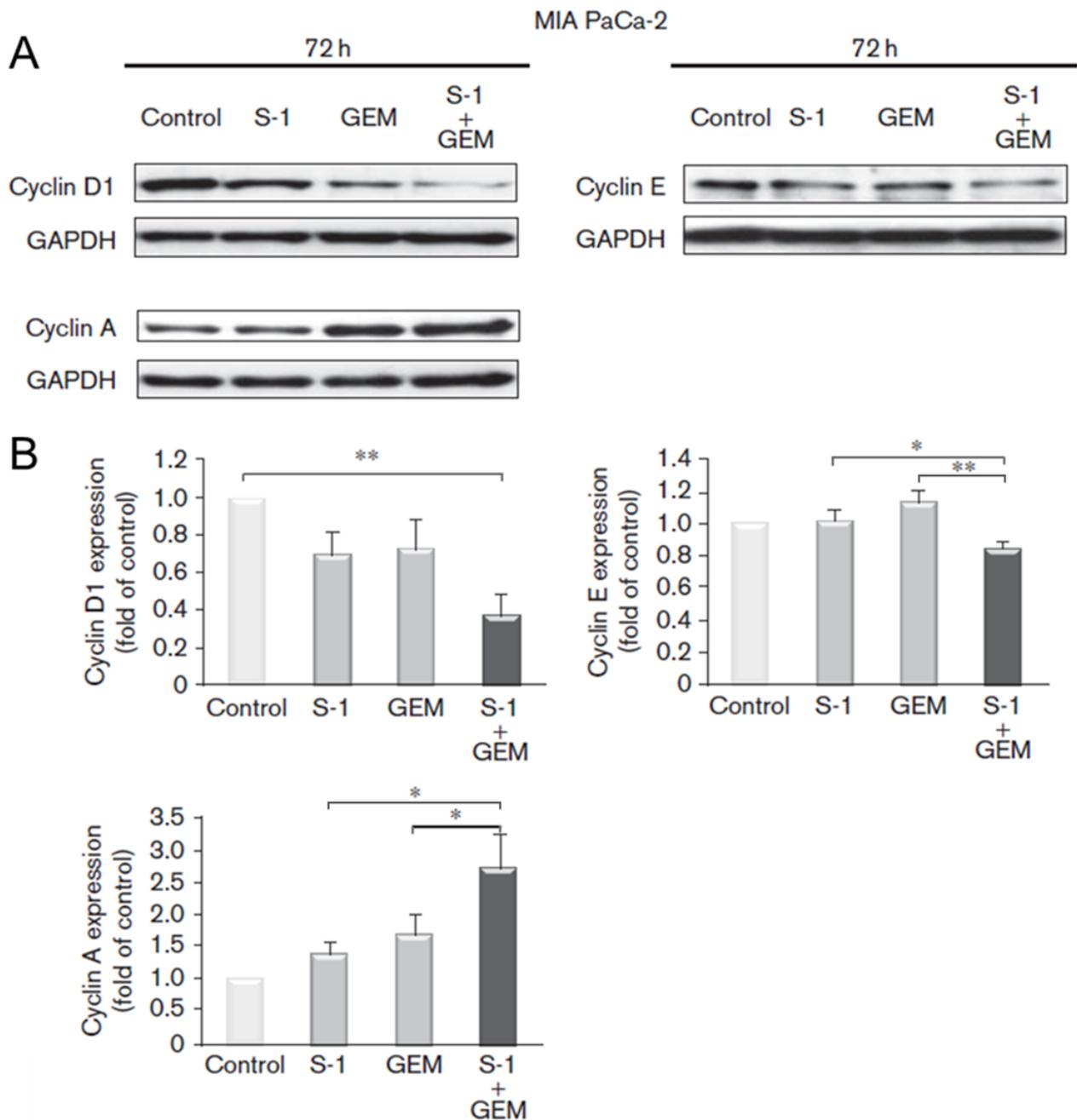


Figure 3. Effect of S-1, GEM and a combination of both drugs on cyclin D1, cyclin E and cyclin A levels in MIA PaCa-2 cells ((A) and (B)). MIA PaCa-2 cells were treated for 72 h without (control) or with S-1, GEM or a combination of both. The relative band intensities of cyclin D1, cyclin E and cyclin A were quantified using densitometric analysis and normalized to that of GAPDH. (B). Values are expressed as the mean  $\pm$  SE of three independent experiments (n=3). \**p* less than 0.05, \*\**p* less than 0.01 by Fisher's PLSD.

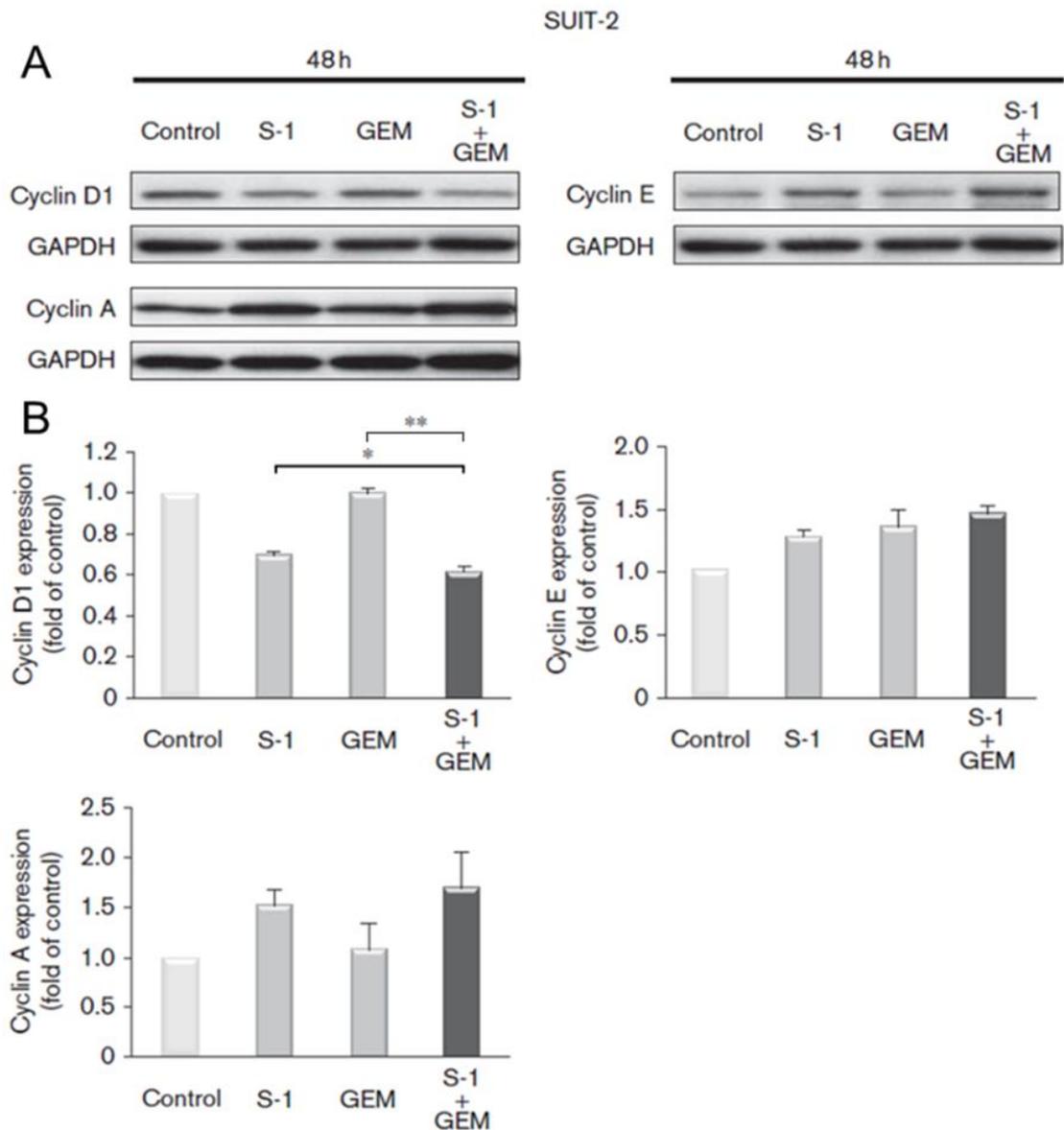


Figure 4. Effect of S-1, GEM and a combination of both drugs on cyclin D1, cyclin E and cyclin A levels in SUIT-2 cells ((A) and (B)). SUIT-2 cells were treated for 48 h without (control) or with S-1, GEM or a combination of both. The relative band intensities of cyclin D1, cyclin E and cyclin A were quantified using densitometric analysis and normalized to that of GAPDH. (B). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. of three independent experiments (n=3). \**p* less than 0.05, \*\**p* less than 0.01 by Fisher's PLSD.

### 3-4. p21 と p27 の発現量の解析

次に細胞周期を G1 期に停止させる p21 と p27 の発現量の変化を検出した。同様に細胞周期解析の結果を考慮し、MIA PaCa-2 においては、薬剤添加後 72 時間目に、SUIT-2 においては添加後 48 時間目に実験を行った。MIA PaCa-2 における p21 の発現は未処理の control 群に比べ S-1 群、GEM 群、併用群でそれぞれ control 群の約 0.7 倍、0.8 倍、0.4 倍に低下した。併用群でのみ

control 群との間に有意な発現の減少を認めた ( $p < 0.05$ ) (Figure. 5 (A) and 5 (B))。また p27 の発現は control 群に比べ S-1 群、GEM 群、併用群でそれぞれ control 群の約 0.7 倍、0.5 倍、0.3 倍に低下した。併用群と各々の単剤群の間に有意な差が認められ、併用群における p27 の発現が最も減少していた ( $p < 0.05$ )。SUIT-2 においては、p21 の発現が S-1 群と併用群で減少し、共に control 群の約 0.4 倍となった (Figure 5 (C) and 5 (D))。また GEM 群に比べて併用群の p21 の発現は有意に減少していた ( $p < 0.005$ )。p27 の発現においても S-1 群と併用群でのみ減少し、それぞれ control 群の約 0.8 倍、0.7 倍となった。p21 の発現と同様に GEM 群に比べ併用群の p27 の発現が有意に減少していた ( $p < 0.005$ )。

### 3-5. Chk1 のリン酸化の解析

DNA 損傷によりリン酸化され、細胞周期を停止させることで知られているチェックポイントキナーゼ-1 (Chk1) の発現を検討した。細胞周期解析の結果を考慮し、S 期遅延が生じる前に Chk1 の活性化が起きると予測し、MIA PaCa-2 においては薬剤添加後 48、72 時間目に、SUIT-2 においては薬剤添加後 24、48 時間目の結果を示した。MIA PaCa-2 では Chk1 (Ser345) のリン酸化レベルが S-1 群と併用群で増加し、薬剤添加 48 時間目では S-1 群と併用群で共に未処理の control 群の約 1.4 倍に増加した (Figure 6 (A) and 6 (B))。併用群は GEM 群に比べ、有意に Chk1 (Ser345) のリン酸化が増加していた ( $p < 0.005$ )。72 時間目では S-1 群と併用群でそれぞれ control 群の約 2.0 倍、2.5 倍に増加し、併用群における Chk1(Ser345) のリン酸化は各々の単剤群と比べ、有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。尚、Chk1 の総タンパク質量に変化は認められなかった。SUIT-2 においては Chk1 (Ser345) のリン酸化レベルの増加が 24 時間目と 48 時間目に観察され、このうち 24 時間目では S-1 群、GEM 群、併用群でそれぞれ control 群の約 3.0 倍、2.2 倍、3.9 倍に増加した (Figure. 6 (C) and 6 (D))。GEM 群に比べ併用群では有意に Chk1(Ser345) のリン酸化が増加した ( $p < 0.005$ )。48 時間目では S-1 群と併用群でのみ Chk1(Ser345) の

リン酸化が増加し、それぞれ control 群の約 5.5 倍、6.9 倍となった。S-1 群と併用群間では有意差は認められなかったものの、GEM 群に比べ併用群では有意な増加が認められた ( $p < 0.005$ )。尚、Chk1 の総タンパク質量に変化は認められなかった。

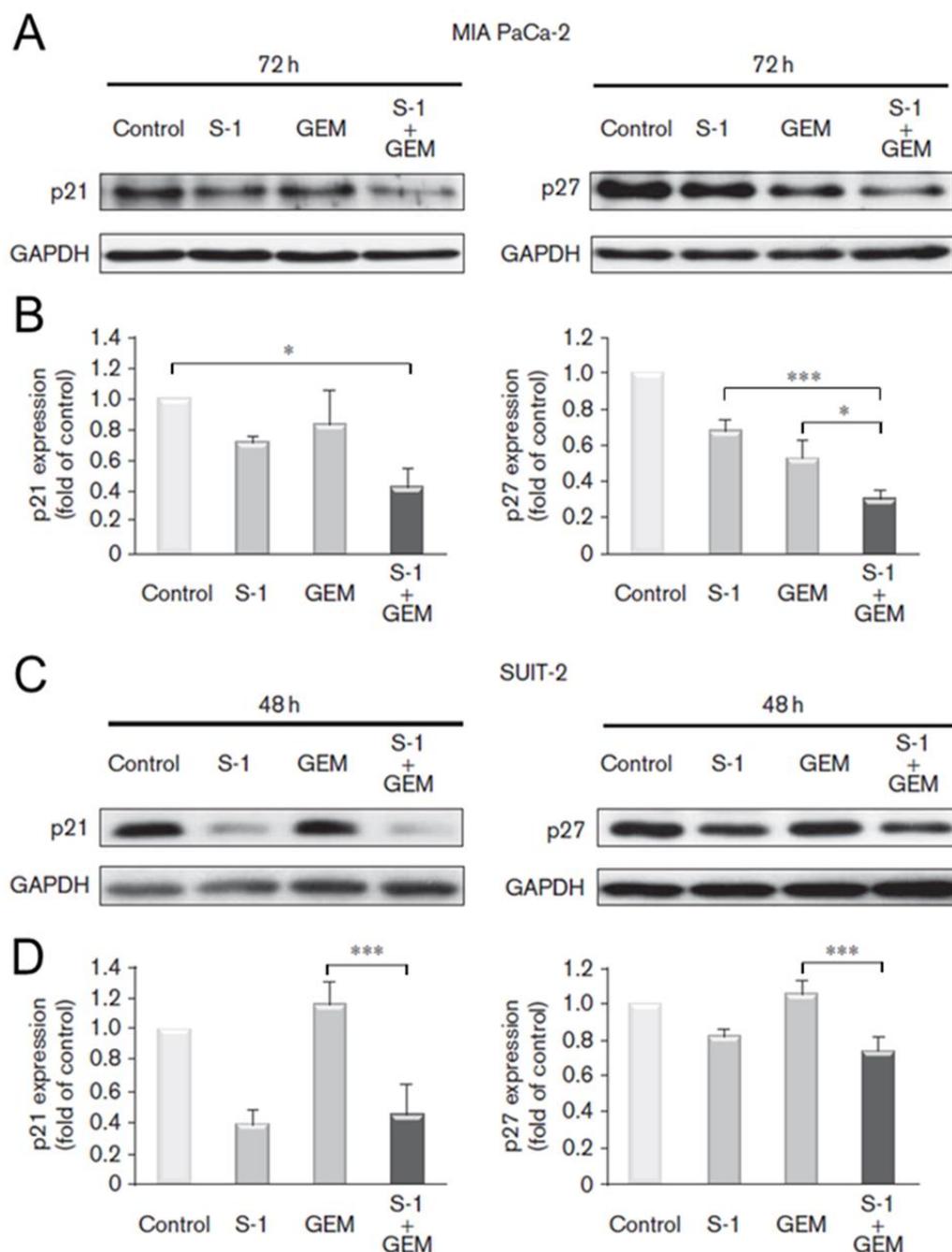


Figure 5. Effect of S-1, GEM and a combination of both drugs on p21 and p27 expression in MIA PaCa-2 ((A) and (B)) and SUI-2 ((C) and (D)) cells. MIA PaCa-2 and SUI-2 cells were treated for 72 h and 48 h, respectively, with S-1, GEM or a combination of both drugs. Control cells received no treatment. The relative band intensities for p21 and p27 were quantified using densitometric analysis and normalized to that of GAPDH ((B) and (D)). Values are expressed as the mean  $\pm$  SE of three independent experiments ( $n=3$ ). \* $p$  less than 0.05, \*\*\* $p$  less than 0.005 by Fisher's PLSD.

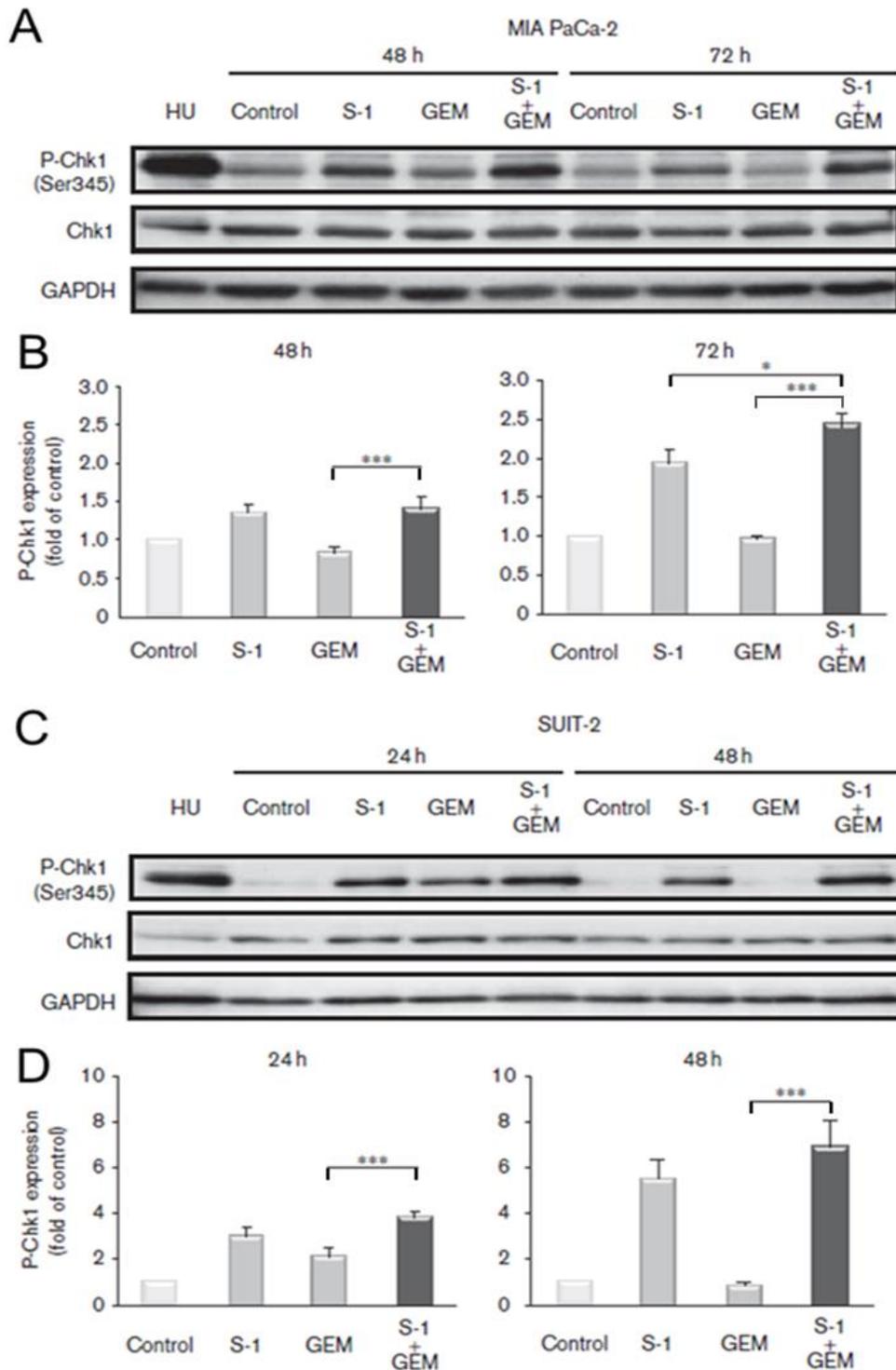


Figure 6. Effect of S-1, GEM and a combination of both drugs on Chk1 expression in MIA PaCa-2 ((A) and (B)) and SUIT-2 ((C) and (D)) cells. MIA PaCa-2 and SUIT-2 cells were treated for the indicated times without (control) or with S-1, GEM or a combination of both drugs. The relative band intensities for phosphorylated Chk1 (P-Chk1) were quantified using densitometric analysis and normalized to that of GAPDH ((B) and (D)). Values are expressed as the mean  $\pm$  SE of three independent experiments (n=3). HU (hydroxy urea) was used as a positive control for P-Chk1. \**p* less than 0.05, \*\*\**p* less than 0.005 by Fisher's PLSD.

## 4. 考 察

本章の検討から、MIA PaCa-2 と SUIT-2 の 2 種のヒト膵臓がん細胞株において S-1 と GEM による併用効果の作用機序として、DNA 損傷により活性化した Chk1 が、S 期細胞蓄積を引き起こしていることを明らかにした。

DNA 損傷チェックポイントとは染色体 DNA に損傷が生じるなどの異常が検知されると細胞周期の特定の位置で細胞周期の進行を停止し、その間に異常な DNA の修復を効率的に行う機構である<sup>17)</sup>。そのチェックポイント機構に参与しているリン酸転移酵素である Chk1 は DNA が損傷を受けた時に活性化され、Cdc25 を阻害することにより細胞周期を停止させる<sup>15)</sup>。S-1 と GEM を併用することにより MIA PaCa-2 においては処理後 72 時間目で単剤群に比べ、有意に Chk1 が活性化した。SUIT-2 においては処理後 48 時間後に有意差は無かったものの、単剤群に比べ最も Chk1 を活性化させた。それぞれの細胞株で薬剤を併用することにより単剤群以上に Chk1 が活性化するタイミングと S 期細胞蓄積が起こるタイミングが一致していることや、5-FU により Chk1 活性化を介した S 期細胞蓄積が起きると報告がされていることから<sup>18)</sup>、今回観察された S 期細胞の蓄積は Chk1 の活性化が引き起こしていることが示唆された。DNA 損傷チェックポイント機構には ATM/Chk2/p53 経路と ATR/Chk1/Cdc25 経路が存在する<sup>19)</sup>。MIA PaCa-2 と SUIT-2 細胞では TP53 遺伝子に変異があり<sup>20)</sup>、ATM/Chk2/p53 の経路が欠損していることが考えられ、ATR/Chk1/Cdc25 経路に依存していることが予測できる。

さらに S 期細胞蓄積の詳細な機序を解析するため、CDK インヒビターの p21 と p27 の発現の変化を検出した。CDK インヒビターは様々な抗がん剤により誘導されることが報告されている<sup>21)</sup>。しかし、S-1、GEM そして両薬剤の併用で処理させることにより両細胞株で p21、p27 の発現が共に減少する傾向が観察され、MIA PaCa-2 においては併用群で単剤群と比較しその発現は有意に減少した。p21、p27 は主にユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが知られており、その分解はユビキチンリガーゼとして機能する Skp2

(S phase kinase associated protein 2) に依存し、S期で亢進することが報告されている<sup>22,23)</sup>。併用により最もS期細胞が蓄積したため、その分解が亢進したと推察された。

周期的な発現を示すことで知られている Cyclin についても解析した。Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A はそれぞれ G1 期、G1 期後期から S 期初期にかけて、S 期から G2 期にかけて発現が上昇する<sup>24)</sup>。Cyclin A の発現が増加したことについては S-1 と GEM を併用することにより S 期細胞が蓄積したためと推察された。併用群で最も Cyclin A の発現が増加したことについては、S-1 と GEM による併用効果が更なる Cyclin A の発現増加へとつながったことが考えられる。SUIT-2 において Cyclin D1 と Cyclin A の発現が MIA PaCa-2 と同様、S-1 と GEM を併用することによりそれぞれ減少、増加を示したが、Cyclin E の発現については MIA PaCa-2 の実験結果とは逆に増加を示した。この結果より SUIT-2 においては S 期初期で蓄積していると推察された。本検討結果の S 期蓄積が Cyclin の周期的発現のタイミングとほぼ一致していることから、抗がん剤処理による S 期蓄積の結果として Cyclin の発現量の変動したと推察された。

創薬のプロセスにおいて、がん細胞株を用いて行われた非臨床研究の結果から有望と考えられる治療法は最終的にヒトを対象とした臨床試験へ進んでいく。大腸がんや乳がんを対象とした調査研究で、がん細胞株は患者のがん細胞に認める遺伝子異常を再現させていることが報告されており、膵臓がん細胞株でも同じことが当てはまると考えられている<sup>25)</sup>。膵臓がん細胞株によって表現型や遺伝子型は様々であり、抗がん剤の感受性も異なる<sup>26)</sup>。本検討で使用した S-1 の活性体である 5-FU と GEM の感受性についても、その耐性機構や代謝に関わる遺伝子の発現量によって変わることが報告されている<sup>26)</sup>。MIA PaCa-2 では GEM に適度な感受性を示すが、5-FU は他の細胞株と比較して耐性を示す。SUIT-2 は GEM の感受性が高い細胞株であることがわかっている<sup>26)</sup>。本検討においても GEM は MIA PaCa-2 と比較して SUIT-2 で感受性が高く、細胞周期へ影響を与える時間は GEM が S-1 と比較して早かった。ま

た S-1 は細胞周期へ与える影響が 72 時間後まで継続した。これは、S-1 の活性体である 5-FU の代謝拮抗薬である CDHP の影響により効果が持続したことが考えられる。がん細胞株によって GEM や S-1 の感受性が変わってくることから、感受性に影響を与えるバイオマーカーの同定と個別化治療への応用が望まれる。

S-1 と GEM 両薬剤の併用により、DNA の合成が強力に阻害され、アポトーシスの誘導へと至ったと考えられたが、著者らの以前の研究結果では、併用することによるアポトーシスの増加は認められなかった<sup>14)</sup>。そこで併用効果の機序を検討した結果、両薬剤により DNA の損傷による Chk1 の活性化が引き起こされ、S 期で DNA 修復による細胞周期が遅滞していることが示唆された。近年 Chk1 の研究が世界的に進められ、この Chk1 を阻害することで抗がん剤の効果が増強するという知見があり、Chk1 は抗がん剤の領域において注目を集めている分子の一つである。実際に Chk1 の発現を RNA 干渉により低下させたところ、5-FU の効果が劇的に増強し、更にアポトーシスの増加につながったという報告がある<sup>18)</sup>。同じく GEM に関しても Chk1 を阻害することで GEM の感受性が上がったという報告もあり<sup>27)</sup>、S-1 と GEM の併用療法も Chk1 の阻害によりその効果が増強する可能性があるとして示唆され、今後検討を行っていく必要があると考えられる。

本章における検討により S-1 と GEM による併用療法の有用性を基礎レベルで示すことができ、併用効果の分子的機序の一端を明らかにすることができた。これらの結果が併用療法のエビデンスの一つとして確立し、今後より有効な治療法の開発へとつながることが期待される。

## 5. 小 括

本章で S-1 と GEM の併用療法が SUIT-2 に対し、MTT assay で相乗効果を示すことを明らかとした。更に細胞周期への影響を FACS で解析したところ、S-1 と GEM はそれぞれ異なるタイミングで S 期での細胞周期遅延を誘導しており、併用群においては各単剤群と比較してより長い時間帯で S 期遅延を認めた。S 期遅延の詳細なメカニズムを解析すべく、細胞周期に関わる様々な分子を Western blotting にて検出した結果、Chk1 のリン酸化が増加していることを明らかとした。Chk1 は DNA 損傷が起きると DNA 修復を行うために、細胞周期を S 期で遅延させる。Chk1 の活性化は抗がん剤の耐性機序として知られており、この耐性機序克服が既存の抗がん剤の効果増大に期待できると考えられる。

## 第Ⅱ章 Chk1 阻害剤 prexasertib を用いた新規治療法の検討

### 1. 緒 言

著者は膵臓がんに対する GEM + S-1 併用療法の基礎的検討を行い、併用療法は各々の単剤療法より細胞周期の S 期遅延が起きていることを明らかとした。第 I 章でその併用効果の詳細なメカニズムを検討した結果、Chk1 のリン酸化が増加していることを示した。Chk1 は DNA 損傷が起きると DNA 修復を行うために、細胞周期を S 期で遅延させる<sup>17)</sup>。それゆえ、DNA 損傷を起こす抗がん剤と Chk1 阻害剤を併用させると、DNA チェックポイントが不活性化され、DNA 修復ができなくなり、ついには細胞死を強く誘導させることが期待できる。これまでもいくつかの Chk1 阻害剤が単剤あるいは抗がん剤との併用で臨床試験が行われている<sup>28-30)</sup>。prexasertib (LY2606368) は Chk1 と checkpoint kinase 2 (Chk2) の阻害剤であり、Chk2 よりも Chk1 を強力に阻害することで、DNA 二重鎖を破壊し、アポトーシスを誘導する<sup>31)</sup>。prexasertib は現在世界的に臨床試験が進行しており、卵巣がんや扁平上皮がんに対して単剤で効果を示していることから<sup>32,33)</sup>、Chk1 阻害剤の中でも期待されている薬剤の一つである。

本章ではまず Chk1 阻害剤である prexasertib と GEM、S-1、GEM + S-1 の併用効果を検討した。更に prexasertib と GEM、S-1、GEM + S-1 の併用による細胞死の解析とその分子メカニズムの解析を行った。また prexasertib が Chk1 を阻害して GEM + S-1 の併用効果を高めているかどうか検討するため、特異的 siRNA を用いて Chk1 をノックダウンし、Chk1 のノックダウンが GEM と S-1 の効果に与える影響について検討した。

## 2. 実験材料と方法

### 2-1. 細胞株

ヒト膵臓がん細胞株 SUIT-2 を用いた。10% FBS 添加 RPMI1640 (富士フイルム和光純薬工業株式会社、大阪、日本) にて培養した。

### 2-2. 抗がん剤

GEM、5-FU および CDHP は東京化成工業 (東京、日本) から購入した。prexasertib はセレックバイオテック (東京、日本) から購入した。S-1 は 5-FU と CDHP を臨床試験の血中濃度比を参考にして 1:2 で混合したものを使用した<sup>13)</sup>。

### 2-3. 抗体

抗ヒト phosphorylated-Chk1 抗体(Ser296) (ウサギ mAb、product #90178、1:1000 dilution)、抗ヒト phosphorylated-Chk1 抗体(Ser317) (ウサギ mAb、product #12302、1:1000 dilution)、抗ヒト phosphorylated-Chk1 抗体(Ser345) (ウサギ mAb、product #2348、1:1000 dilution)、抗ヒト Chk1 抗体(マウス mAb、product #2360、1:1000 dilution)、抗ヒト  $\gamma$ H2AX 抗体(Ser139) (ウサギ mAb、product #9718、1:1000 dilution)、抗ヒト H2AX 抗体(ウサギ mAb、product #2595、1:1000 dilution)、抗ヒト caspase 9 抗体(マウス mAb、product #9508、1:1000 dilution)、抗ヒト caspase 3 抗体(ウサギ mAb、product #9665、1:1000 dilution)、抗ヒト cleaved Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体(Asp214) (ウサギ mAb、product #5625、1:1000 dilution)、抗ヒト Mcl-1 抗体(ウサギ mAb、product #94296、1:1000 dilution)、抗ヒト Bcl-2 抗体(ウサギ mAb、product #2870、1:1000 dilution)、抗ヒト Bcl-xL 抗体(ウサギ mAb、product #2764、1:1000 dilution)、抗ヒト Bax 抗体(ウサギ mAb、product #2772、1:1000 dilution)は Cell Signaling Technology から購入した。抗ヒト  $\beta$ -actin 抗体(ウサギ mAb、Merck KGaA、1:5000 dilution)は Sigma-Aldrich から購入した。抗ヒト cytochrome *c* 抗体(マ

ウス mAb、cat. no. 556433、1:1000 dilution) は BD Biosciences (NJ、USA) から購入した。二次抗体としてウサギ抗マウス IgG-HRP もしくはヤギ抗ウサギ IgG-HRP を Dako (Denmark A/S、Glostrup、Denmark) より購入し、使用した。

#### 2-4. MTT assay

96 well plate に SUIT-2 を  $1 \times 10^3$  cells / 100  $\mu$ L とした細胞懸濁液を 100  $\mu$ L / well ずつ播種し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し GEM、S-1、prexasertib をそれぞれの濃度となるように調製した培地を 100  $\mu$ L / well ずつ添加した。72 時間の培養後、0.5% MTT 20  $\mu$ L / well を添加し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間反応させた。生成した formazan を Dimethyl Sulfoxide 100  $\mu$ L にて溶解し、測定波長 620 nm における吸光度をプレートリーダーにて測定した。IC<sub>50</sub> 値を算出し、classical isobologram にて GEM と prexasertib、S-1 と prexasertib の併用効果をそれぞれ判定した。また CalcuSyn (Biosoft、Cambridge、UK) を用いて combination index (CI) を算出した。CI < 1 は相乗効果あり、CI = 1 は相加効果、そして CI > 1 は拮抗作用と判定できる。全ての実験は少なくとも 3 回以上行った。

#### 2-5. 細胞死の解析

SUIT-2 ( $6.0 \times 10^4$  cells) を 60 mm culture dish に播種し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し、GEM が 0.3 ng / mL、S-1 が 0.2  $\mu$ g / mL、prexasertib が 5 nM となるように調製した培地で培養した。各抗がん剤の濃度は予備実験の結果、併用することでアポトーシスが顕著に増加する濃度に設定した。72 時間後に Cell Death Detection ELISA kit (Roche Diagnostics、Basel、Switzerland; cat. no. 1544675) を用いて添付文書のプロトコルに沿って細胞質に遊離するヒストン結合断片(モノオリゴヌクレオソームとオリゴヌクレオソーム) を測定した。抗ヒストン抗体を 96 well plate に室温 1 時間でコーティングし、細胞可溶化物を 90 分間反応させた。ペルオキシダーゼ標識抗 DNA 抗体を加えて 90 分間インキュベーションし、

基質溶液を加えて測定波長 405 nm における吸光度をプレートリーダーにて測定した。さらに同様の細胞培養環境におけるアポトーシス細胞について 1.2 mM の Hoechst 33342 で核を染色し、蛍光顕微鏡で核の形態学的変化を撮影した。

## 2-6. Western blotting

SUIT-2 ( $3.0 \times 10^5$  cells) を 100 mm culture dish に播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し、GEM が 0.3 ng / mL、S-1 が 0.2 µg / mL、prexasertib は 2-5.の結果よりアポトーシスが顕著に起きた 10 nM となるように調製した培地を添加した。アポトーシスが実際に起きる前のタンパク質の発現量の変化を検出するため、指定時間 (24、48、72 時間) の経過後、上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した後、Cell lysis buffer M (富士フィルム和光純薬工業株式会社) に Complete protease inhibitor cocktail と PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail を加えた溶液でタンパク質を可溶化し、cell scraper で細胞を回収した。氷上で 20 分間静置後、15,000×g で 15 分間遠心分離し、上清を -80 °C で保存した。タンパク質の濃度を測定し、30 µg のタンパク質を SDS-PAGE Sample Loading Buffer (タカラバイオ、滋賀、日本) で希釈し、7.5-12% SDS-PAGE にて分離し、PVDF 膜に転写した。1% Difco Skim Milk (BD Biosciences) にて 1 時間ブロッキング後、各一次抗体を 4°C、12 時間反応させ、さらに二次抗体を 1 時間反応させた。最終的に SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) にて化学発光を行い、ImageQuant LAS 4000 (富士フィルム株式会社、東京、日本) で検出を行った。検出されたバンドの強度は Image J にて定量解析を行った。

## 2-7. cytochrome *c* の解析

SUIT-2 ( $3.0 \times 10^5$  cells) を 100 mm culture dish に播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し、GEM が 0.3 ng / mL、S-1 が 0.2 µg / mL、prexasertib が 10 nM となるように調製した培地に換えた。指定時間 (24、48、72 時間) の経過後、上清を除去し、PBS で洗浄した後、0.05%トリプシンで回収し、0.01% ジギトニン溶液(東京化成工業)で懸濁した。氷上で 5 分放置した後、14,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を -80 °C で保存した。上清は cytochrome *c* 特異的抗体を用いて Western blotting にて解析した。

## 2-8. Small interfering RNA を用いたトランスフェクション

Chk1 に対する Silencer® Select Validated siRNA と Silencer® Select Negative Control siRNA は Thermo Fisher Scientific から購入した。SUIT-2 ( $1.0 \times 10^5$ ) を 60 mm culture dish に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。細胞を siRNA (終濃度 25 nM) と DharmaFECT transfection reagent (GE Healthcare Japan、東京、日本) で添付のプロトコルに基づき処理した。37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養後、上清を抗がん剤 (GEM 0.8 ng/mL、S-1 0.5 µg/mL) を添加した RPMI-1640 で置き換えた。抗がん剤の処理時間と濃度は予備実験の結果、アポトーシスが顕著に増加した条件で行った。

## 2-9. 統計解析

MTT assay、ELISA、Western blotting による測定値は平均値±標準偏差で表示した。Image J による解析結果は平均値±標準偏差で表示した。各群の平均値の比較には分散分析 (ANOVA) を用いた後、ポストホックテストとして Fisher's PLSD 法を用いた。p 値が 5 %未満を有意差ありと判断し、統計解析ソフトは BellCurve エクセル統計 (社会情報サービス、東京、日本) を用いた。

### 3. 結 果

#### 3-1. prexasertib の GEM、S-1 との併用効果の解析

Figure 7 に SUIT-2 に対して prexasertib と GEM もしくは S-1 を併用し MTT assay を行った結果を示した。まず prexasertib、GEM、S-1 の IC<sub>50</sub> を算出した結果は、それぞれ 30.8 ± 6.0 nM、0.642 ± 0.048 ng/mL、0.506 ± 0.219 μg/mL であった。prexasertib と GEM もしくは S-1 を様々な濃度で組み合わせた結果、高い併用効果を認めた (Figure 7 (A) and 7 (B))。算出した IC<sub>50</sub> を用いた classical isobologram による判定結果として prexasertib + GEM と prexasertib + S-1 の併用効果は相乗効果であった (Figure 7 (C) and 7 (D))。特に prexasertib + GEM の組み合わせが prexasertib + S-1 よりも高い相乗効果を示していた。combination index (CI) を算出した結果、prexasertib + GEM 及び prexasertib + S-1 の併用は多くの濃度の組み合わせで CI < 1 を示しており、相乗効果を認めた (Table 2)。更に prexasertib + GEM + S-1 の 3 剤併用療法について検討を行ったところ、2 剤 (prexasertib + GEM もしくは prexasertib + S-1) よりも有意に高い細胞増殖抑制効果を示していた ( $p < 0.05$ ) (Figure 8)。

Table 2. Combination indexes (CI) calculated for the combination of prexasertib + GEM or prexasertib + S-1.

	Prexasertib (nM)		
	10	20	30
GEM (ng/ml)			
0.1	0.488 <sup>a</sup>	0.564 <sup>a</sup>	0.679 <sup>a</sup>
0.3	0.456 <sup>a</sup>	0.584 <sup>a</sup>	0.723 <sup>a</sup>
0.5	0.495 <sup>a</sup>	0.653 <sup>a</sup>	0.793 <sup>a</sup>
S-1 (μg/ml)			
0.1	3.016	0.807 <sup>a</sup>	0.749 <sup>a</sup>
0.2	1.007	0.702 <sup>a</sup>	0.753 <sup>a</sup>
0.3	0.820 <sup>a</sup>	0.661 <sup>a</sup>	0.716 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Indicates synergy.

CI < 1 indicates synergy.

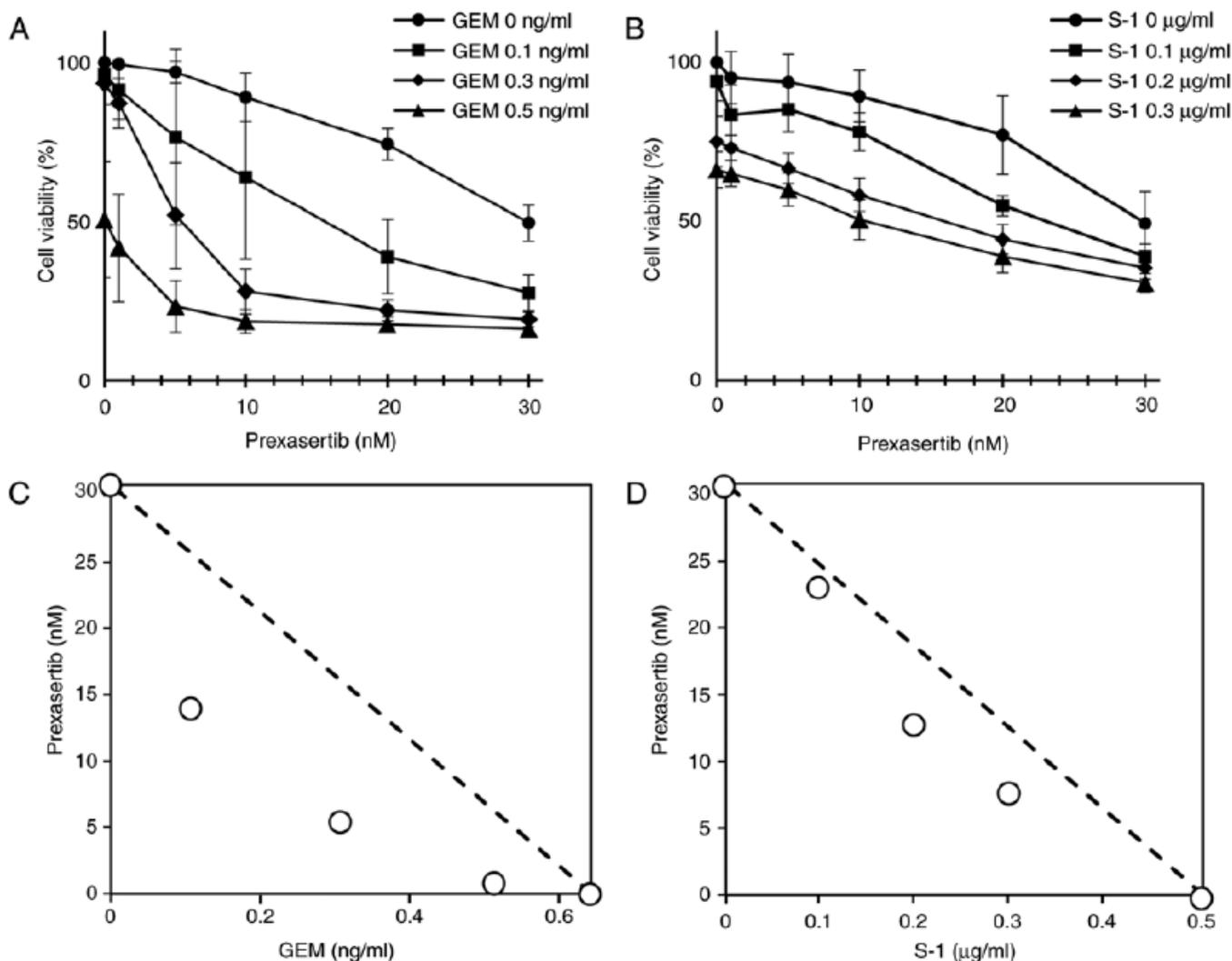


Figure 7. Prexasertib enhanced the cytostatic effect of (A) GEM and (B) S-1. SUIT-2 cells were treated with a combination of prexasertib (0, 1, 5, 10, 20, or 30 nM) and GEM (0, 0.1, 0.3, or 0.5 ng/ml), or S-1 (0, 0.1, 0.2, or 0.3 μg/ml) for 72 h. Values shown are the mean ± standard deviation (SD) from at least 3 independent experiments. A classical isobologram shows the combined effect of (C) prexasertib + GEM and (D) prexasertib + S-1 in SUIT-2 cells. The  $IC_{50}$  values for prexasertib (30.8 nM) and GEM (0.642 ng/ml), as well as those for prexasertib and S-1 (0.506 μg/ml), are connected with a dotted line to distinguish the area of synergism (under the line) and the area of antagonism (above the line). Plots on the dotted line indicate an additive effect. Both prexasertib + GEM and prexasertib + S-1 showed a synergistic effect.

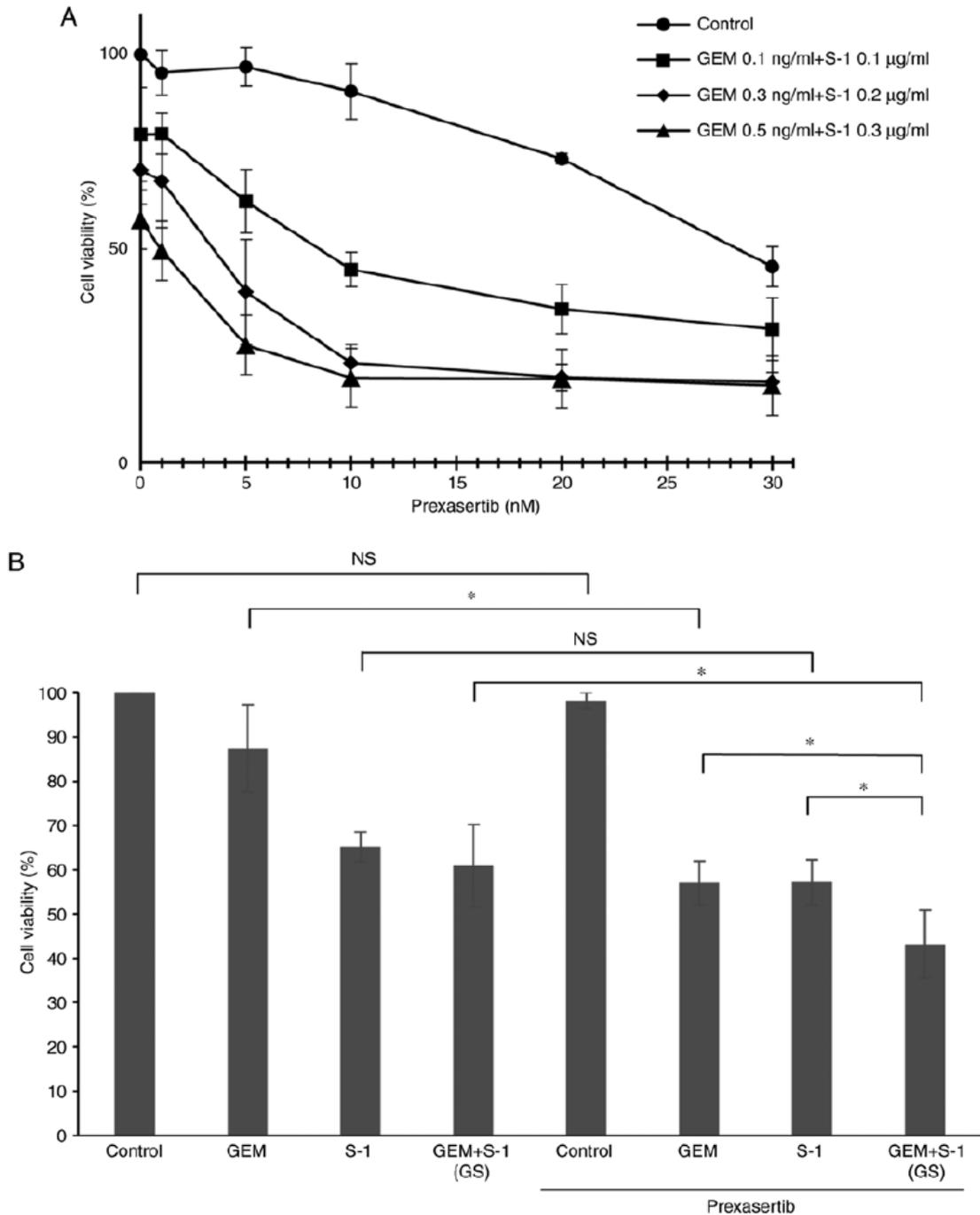


Figure 8. Prexasertib + GEM + S-1 inhibit cell proliferation. (A) SUI-2 cells were treated with prexasertib (0, 1, 5, 10, 20, or 30 nM) and GEM + S-1 (GEM 0.1 ng/ml + S-1 0.1 µg/ml, GEM 0.3 ng/ml + S-1 0.2 µg/ml, or GEM 0.5 ng/ml + S-1 0.3 µg/ml) for 72 h. (B) SUI-2 cells were treated with prexasertib (5 nM) and/or GEM 0.3 ng/ml and/or S-1 0.2 µg/ml for 72 h. Values shown are the mean  $\pm$  SD from 3 independent experiments. \* $p < 0.05$  indicates a significant difference. NS, not significant.

### 3-2. prexasertib、GEM、S-1 による細胞死の解析

prexasertib と GEM + S-1 を併用し SUIT-2 におけるアポトーシス誘導を Cell Death Detection ELISA kit (Roche) を用いて調べた。このキットは DNA とヒストンに対するマウスモノクローナル抗体が含まれており、細胞可溶化物の細胞質中のモノ及びオリゴヌクレオソームを検出する実験キットである。その結果、prexasertib (5 nM) + GEM + S-1 は有意にアポトーシスを誘導した ( $p < 0.05$ ) (Figure 9 (A))。更に prexasertib を 10 nM に増やして検討を行ったところ、prexasertib (10 nM) + GEM + S-1 は prexasertib (5 nM) + GEM + S-1 のアポトーシスを約 2 倍増加させた。Figure 9 (B) に SUIT-2 にそれぞれの抗がん剤で 72 時間処理した後の細胞の形態学的変化を示す。結果として prexasertib + GEM + S-1 では核の断片化が prexasertib 単剤や GEM + S-1 よりも多く認めた。

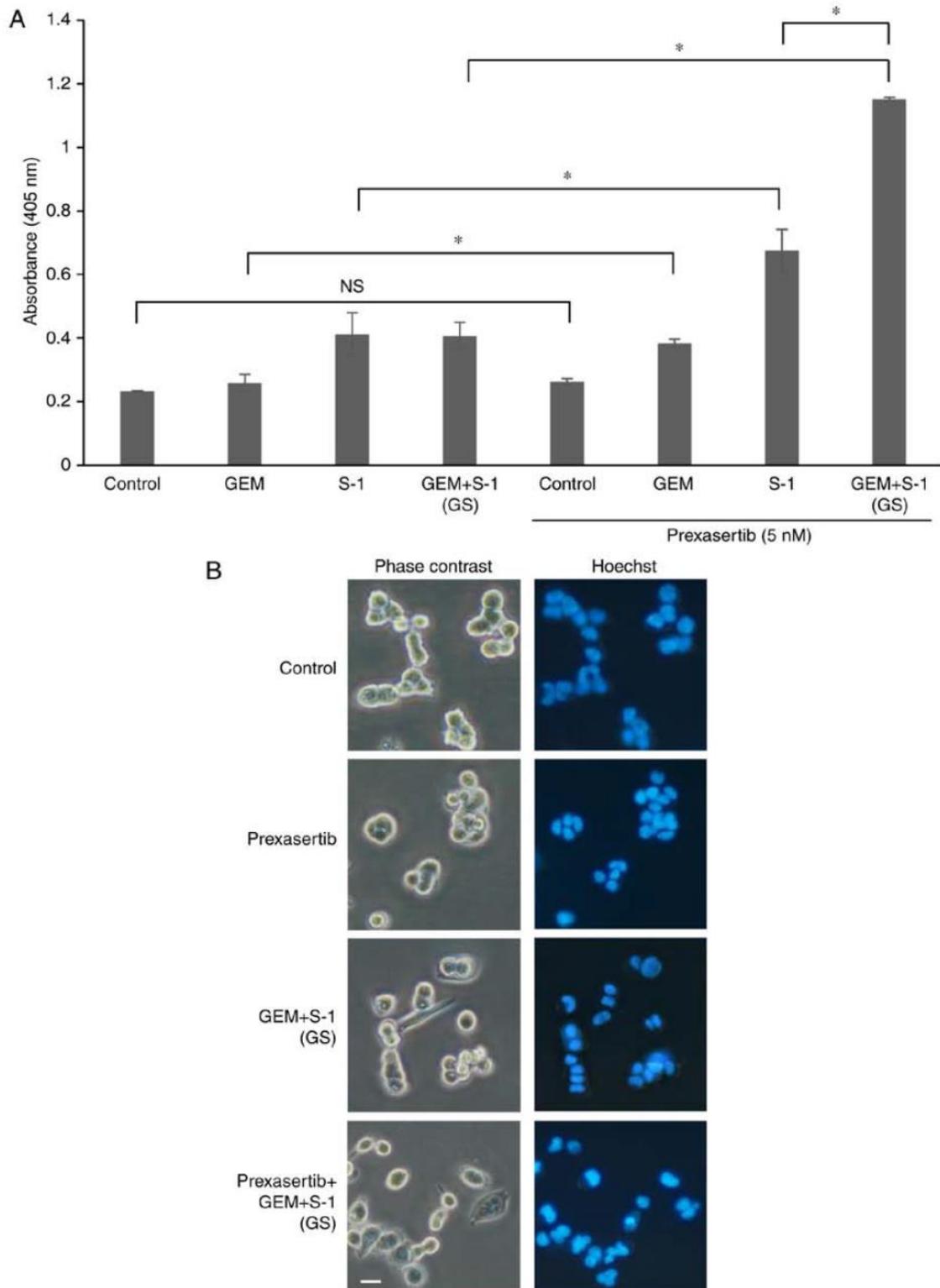


Figure 9. Prexasertib + GEM + S-1 increased apoptotic cell death. (A) SUI-2 cells were treated with prexasertib 5 nM and/or GEM 0.3 ng/ml and/or S-1 0.2  $\mu$ g/ml for 72 h. Values shown are the mean  $\pm$  SD. \* $p$  < 0.05 indicates a significant difference. NS, not significant. (B) Analysis of morphological changes induced by prexasertib (5 nM) + GEM (0.3 ng/ml) + S-1 (0.2  $\mu$ g/ml) 72 h after treatment of cell with indicated drugs. After staining the cells with Hoechst 33342, morphological changes were analyzed under a fluorescence microscope or assessed by phase contrast microscopy. The scale bar indicates 10  $\mu$ m.

### 3-3. prexasertib + GEM + S-1 による細胞増殖抑制効果の詳細な機序の解析

アポトーシスの詳細なシグナル変化を検出するため、Western blotting を行った。prexasertib の濃度は 3-2.の結果から、より効率的にアポトーシスを誘導することができる 10 nM で併用した。まず DNA 損傷が起きた時に活性化する細胞周期チェックポイントキナーゼである Chk1 のリン酸化(pS296、pS317、pS345)を検出した(Figure 10 (A))。その結果、prexasertib は 24 時間後からいずれの処理時間においても Chk1-S296 の自己リン酸化を抑制していた。また、prexasertib + GEM + S-1 は DNA 損傷が起きると最初にリン酸化される部位である S317 と S345 のリン酸化を増加させた。DNA ダメージマーカーである  $\gamma$ H2AX は同様に prexasertib + GEM + S-1 処理によりリン酸化が増加していた。なお、H2AX の総蛋白量は  $\gamma$ H2AX の発現量と相関していなかった。次に prexasertib + GEM + S-1 のアポトーシスのメカニズムについて解析した。その結果、cleaved caspase 3 と cleaved PARP は 48 時間後に増加していた(Figure 10 (B))。また prexasertib + GEM + S-1 が Bcl-2 family に与える影響について検討した。その結果、cleaved Mcl-1 は 48 時間後に prexasertib + GEM + S-1 処理で増加していた。Bcl-2 は 24 時間後から大きく減少しており、72 時間後まで続いていた(Figure 10 (C))。次にミトコンドリアからの cytochrome *c* の放出について検討した。その結果、prexasertib + GEM + S-1 処理を行ったところ、48 時間後に cytochrome *c* の放出が起きていた(Figure 10 (D))。抗がん剤処理後 72 時間での Bcl-2 の発現量を定量した結果、prexasertib + GEM + S-1 処理で有意に減少していた ( $p < 0.05$ ) (Figure 10 (E))。

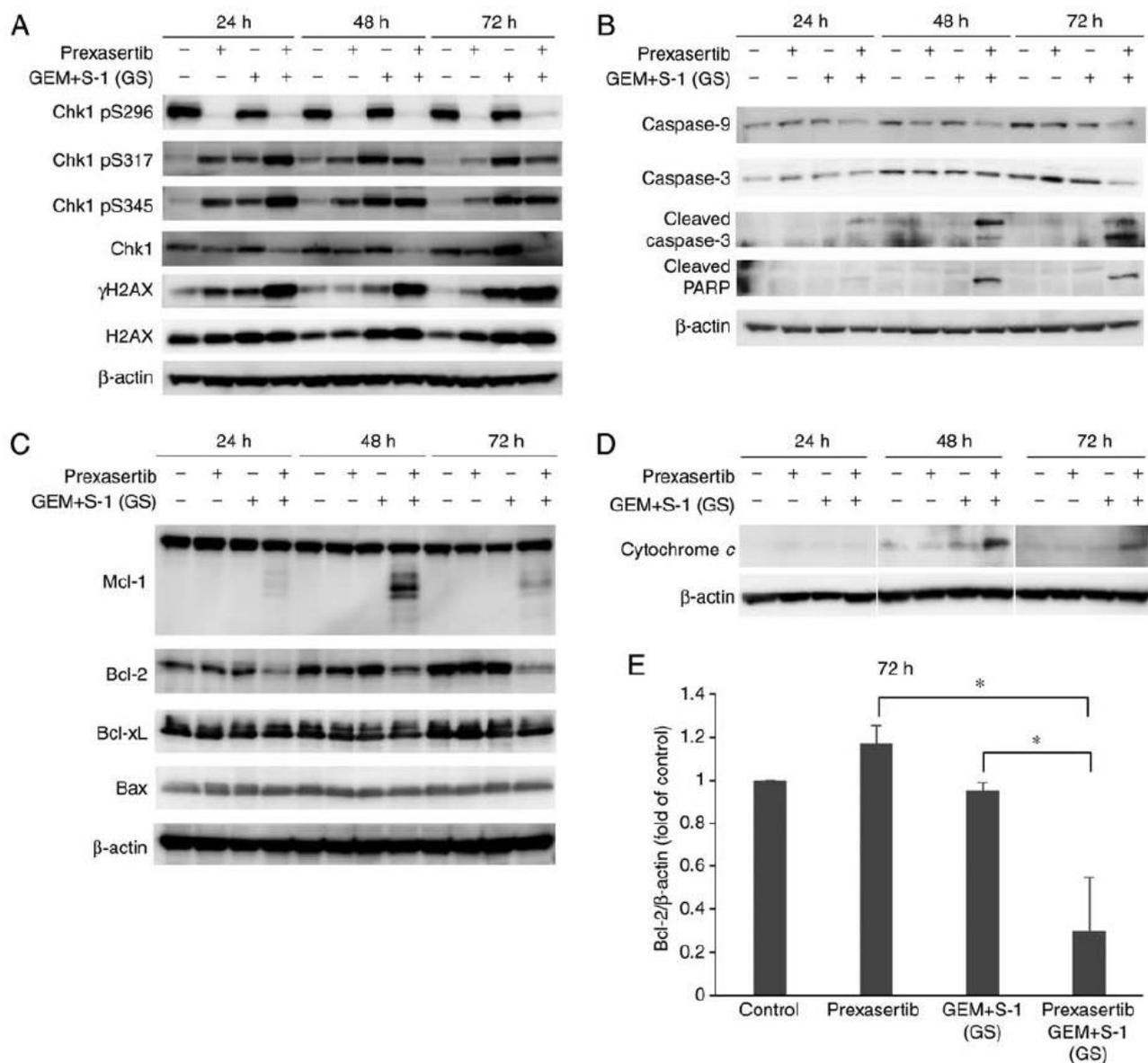


Figure 10. (A) Effect of prexasertib, GEM + S-1 and prexasertib + GEM + S-1 on Chk1 (pS296, pS317, pS345), Chk1,  $\gamma$ H2AX, and H2AX levels in SUIT-2 cells. (B and C) Western blot analysis revealed the levels of caspase 9, caspase 3, and PARP and Bcl-2 family. (D) Release of cytochrome c from mitochondria was detected. SUIT-2 cells were treated for 24, 48, and 72 h without (control) or with prexasertib, GEM + S-1, or prexasertib + GEM + S-1. (E) Level of expression of Bcl-2 72 h after cells were treated with indicated drugs was normalized to that of  $\beta$ -actin (Bcl-2/ $\beta$ -actin) and reported as the fold change compared with the control value. The relative band intensities of Bcl-2 and  $\beta$ -actin were quantified using densitometric analysis. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$  indicates a significant difference.

### 3-4. Chk1 特異的 siRNA 処理が GEM + S-1 によるアポトーシスの誘導へ与える影響

prexasertib が Chk1 を阻害して GEM + S-1 の併用効果を高めているかどうか検討することは重要である。そこで、siRNA を用いて Chk1 をノックダウンし、Chk1 のノックダウンが GEM + S-1 の効果に与える影響について検討した。トランスフェクション後に Chk1 の発現量について Western blotting で検出した (Figure 11 (A))。その結果、Chk1 特異的 siRNA (Chk1-si) 処理群は non-silencing siRNA (Control-si) 処理群や vehicle (トランスフェクション試薬のみ) 群に比較して Chk1 の発現を大きく抑制していた。また、Control-si + GEM + S-1 処理群と比較して Chk1-si + GEM + S-1 処理群は 24 時間後で有意にアポトーシスが增加していた ( $p < 0.05$ ) (Figure 11 (B))。そして Chk1-si + GEM + S-1 処理群のみアポトーシスの形態学的変化の特徴である核の断片化を多く認めた (Figure 11 (C))。Chk1-si + GEM + S-1 によるアポトーシスの詳細なメカニズムを検討した結果、Bcl-2 の発現量が大きく減少していた (Figure 11 (D))。それ以外の siRNA を用いた結果も、prexasertib + GEM + S-1 によるアポトーシスのメカニズムの解析結果とほとんど同じであった (Figure 10 (B) and 10 (C))。Bcl-2 の発現量を定量した結果でも Chk1-si + GEM + S-1 群で有意に低下していた ( $p < 0.05$ ) (Figure 11 (E))。

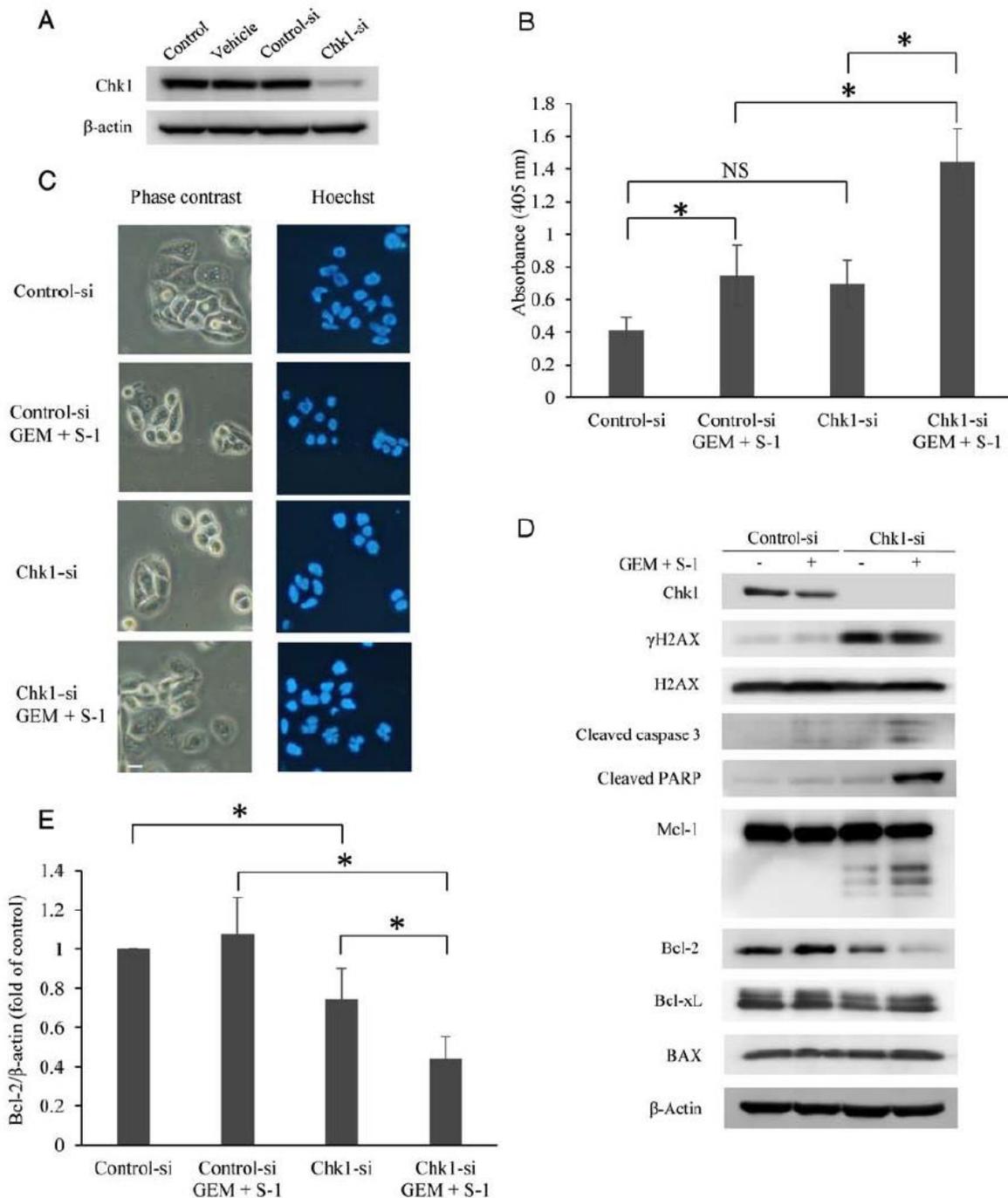


Figure 11. Effects of Chk1-specific siRNA on combination treatment with GEM + S-1. (A) SUI-2 cells were transfected with vehicle, non-silencing siRNA (Control-si) and Chk1-specific siRNA (Chk1-si). After transfection, the levels of expression of Chk1 and  $\beta$ -actin were analyzed by western blotting. (B) SUI-2 cells were treated with GEM + S-1 for 24 h after transfection of Control-si or Chk1-si. The extent of apoptosis was quantified by Cell Death ELISA. Values shown are the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant difference. (C) After staining of the cells with Hoechst 33342, morphological changes were analyzed under a fluorescence microscope, or assessed by phase contrast microscopy. The scale bar indicates 10  $\mu$ m. (D) Western blot analysis shows changes in the expression of apoptosis-related factors in SUI-2 cells treated with GEM + S-1 24 h after transfection of Control-si or Chk1-si. (E) Level of expression of Bcl-2 were normalized to that of  $\beta$ -actin (Bcl-2/ $\beta$ -actin) and reported as the fold change compared with the control value. The relative band intensities of Bcl-2 and  $\beta$ -actin were quantified using densitometric analysis. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$  indicates a significant difference. NS, not significant.

#### 4. 考 察

本検討により、膵臓がん細胞株 SUIT-2 に対して prexasertib と GEM、S-1 それぞれの併用は相乗的細胞増殖抑制効果があることが明らかとなった。また prexasertib + GEM + S-1 の 3 剤併用が最も高い細胞増殖抑制効果があり、これは Bcl-2 の発現抑制を伴ったアポトーシスを誘導していた。

DNA チェックポイントは DNA 損傷があると活性化され、細胞周期が遅延し DNA の修復が行われる。DNA チェックポイントは ATM/Chk2/p53 経路と ATR/Chk1/Cdc25A 経路の二つの主要な経路でコントロールされている<sup>17)</sup>。多くのがん種では ATM/Chk2/p53 経路が欠損しており、Chk1 阻害剤にてアポトーシスを選択的に誘導できることが期待される<sup>17)</sup>。実際に TP53 遺伝子が膵臓がんの多くの患者で変異が起きていることがわかっている<sup>1)</sup>。prexasertib は *in vitro* と *in vivo* において様々な検討が行われており、PARP 阻害薬のオラパリブとの併用療法で卵巣高異型度漿液性腺がんに対して<sup>34)</sup>、急性リンパ芽球性白血病<sup>35)</sup> やセツキシマブと放射線の併用療法で頭頸部がんに対し<sup>36)</sup>、そして神経芽細胞腫<sup>37)</sup> に対して効果的な細胞増殖抑制効果を示している。著者は GEM と S-1 がそれぞれ Chk1-Ser345 のリン酸化を誘導することを既に示している。それゆえ、GEM と S-1 に効果的な Chk1 阻害剤を組み合わせることで、効果を高めることが期待できる。結果として GEM、S-1 それぞれの薬剤は prexasertib と相乗効果を示していた。

prexasertib は ATP 競合型タンパク質キナーゼ阻害剤であり、Chk1 を強く阻害し (IC<sub>50</sub> CHK1 enzyme: <1 nM)、Chk2 も阻害する (IC<sub>50</sub> CHK2 enzyme: 8 nM)<sup>31)</sup>。本検討で使用していた濃度 (5 nM) では Chk2 も阻害している可能性があり、アポトーシス誘導へ影響することも考えられる。Chk2 の検討は行っていないが、前述の通り SUIT-2 や膵臓がんの多くが ATR/Chk1/Cdc25A 経路に依存していることが考えられるため、Chk2 の影響は少ないと予測できる。

DNA の損傷が起きると ATR が活性化され、Chk1 の S317 と S345 のリン酸化を修飾し Chk1 が活性化する<sup>17)</sup>。その後自身の S296 を自己リン酸化し、

14-3-3 タンパク質と結合の後に Cdc25A を阻害して不活化させる。結果として CDK が阻害され細胞周期が停止する。Chk1-Cdc25A の経路に Chk1-S296 の自己リン酸化は必須の役割を担っている。prexasertib + GEM + S-1 は DNA 損傷が起きるとまずリン酸化される部位である Chk1-S317 と Chk1-S345 を増加させたが、prexasertib は Chk1-S296 の自己リン酸化を抑制した。他の報告でも同様の結果が得られている<sup>34)</sup>。また本検討では control 群で Chk1-S296 の自己リン酸化が生じていることが観察された。同様の現象が他の報告でも認めており、自発的な DNA 損傷が本培養条件で起きていることが予測された<sup>38)</sup>。

既に GEM と Chk1 阻害剤の併用が有効であったという報告があり<sup>39,40)</sup>、Chk1 の経路は 5-FU の耐性メカニズムとして報告されている<sup>41)</sup>。本検討で初めて Chk1 阻害剤と経口フッ化ピリミジン系薬剤である S-1 との併用でアポトーシス誘導による有効性を示した。さらに、prexasertib + GEM + S-1 が prexasertib + GEM もしくは prexasertib + S-1 よりも高い効果があることを示したが、これは GEM もしくは S-1 単剤よりも GEM + S-1 のほうが Chk1 を多くリン酸化させることが要因として考えられる。

また、これまで Chk1 阻害剤と抗がん剤の併用によるアポトーシスのメカニズムを検討した報告はほとんどないことから、本検討において近年創薬のターゲットとなっている Bcl-2 ファミリーについて検討した。その結果、Western blotting では prexasertib + GEM + S-1 が Bcl-2 の発現量を大きく抑制していた。Bcl-2 はミトコンドリアに局在しており、cytochrome c の放出を抑制することでアポトーシスを負に制御している<sup>42)</sup>。選択的 Bcl-2 阻害剤の venetoclax (ABT-199) は第Ⅲ相臨床試験で慢性リンパ性白血病に対して rituximab との併用で既に強い抗腫瘍効果を示されている<sup>43)</sup>。また血液系がんだけでなく、膵臓がん細胞株にも Bcl-2 が発現しており、アポトーシスの抑制に関わっていることが報告されている<sup>44)</sup>。加えて結腸がん細胞株では Bcl-2 の発現量に応じて抗がん剤の感受性が異なることが報告されている<sup>45)</sup>。このことから、今後複数の細胞株を用いて Bcl-2 の発現量の違いによる効果

の差を検討していく必要がある。Bcl-2 タンパク質の発現量は様々なサイトカインや NF- $\kappa$ B、p53、c-myc 等の転写因子により調節されていることが報告されている<sup>46)</sup>。またリン酸化やユビキチン化によりその活性が調節されている。本検討では抗がん剤処理の結果、Bcl-2 の発現量が低下したメカニズムを検討できておらず、今後詳細に検討していく必要がある。また 3 剤併用はそれぞれの低い濃度を組み合わせて効率的にアポトーシスを誘導することができたが、prexasertib + GEM と prexasertib + S-1 の 2 剤併用療法については詳細に検討できていないので今後検討していく必要がある。

さらに今回、prexasertib + GEM + S-1 が cleaved Mcl-1 を増加させることを示した。Mcl-1 は Bcl-2 family の一つであり、抗アポトーシス作用を有している。非小細胞肺癌細胞で抗がん剤処理により caspase 3 が Mcl-1 を切断し、抗アポトーシス作用が部分的に損なわれることが報告されている<sup>47)</sup>。近年 Mcl-1 をターゲットとした創薬も進行しているが、抗がん剤によりアポトーシスが誘導された際の Mcl-1 のアポトーシス抑制メカニズムは未だわかっていない。

Chk1 は外来性の DNA 傷害が無い状態でも一定レベルの活性を保持している<sup>17)</sup>。通常の細胞周期進行においても重要な役割を担っており、CHEK1 ノックアウトマウスは胎生早期に致死する<sup>48)</sup>。正常細胞でも Chk1 を阻害してしまうと少なからず細胞増殖において影響が出てしまう。実際に臨床試験の結果、副作用として好中球減少や血小板減少、貧血が起きることが報告されている<sup>32,33)</sup>。併用する抗がん剤との適切な副作用管理が必要とされる。

現在の進行期膵臓がんに対する世界的な標準レジメンは FOLFIRINOX と GEM + nab-paclitaxel (nab-PTX) である<sup>49,50)</sup>。しかし FOLFIRINOX は頻繁に Grade 3 の副作用が起こることが知られており、一方 GEM + nab-PTX は高頻度に末梢神経障害や好中球減少が起きることが報告されている。このように現在の標準レジメンは膵臓がんに対してある程度の効果を示しているが、その高い毒性から全身状態が良好な患者にしか投与できない。本邦では GEM + S-1 療法が周術期の化学療法もしくは高齢者を対象とした化学療法として使

われている<sup>51,52)</sup>。さらに、胆管がんに対しても GEM + S-1 は世界的に標準レジメンとなっている GEM + cisplatin に対して非劣性が証明されている<sup>53)</sup>。GEM + cisplatin は嘔吐や急性腎障害の様な重篤な副作用を起こすことで知られており、患者の状態を考慮したうえで、GEM + cisplatin もしくは GEM + S-1 を選択することができる。そこで、膵臓がんに加えて、胆管がんに対しても prexasertib + GEM + S-1 の効果を検討していく必要がある。

prexasertib を含むいくつかの Chk1 阻害剤は開発が進行しており、臨床試験の結果が報告されている<sup>29,30,54,55)</sup>。しかしその結果は十分とは言えず、臨床現場で使用できる Chk1 阻害剤はまだ存在していない。その中でも prexasertib は現在臨床試験が進んでおり、卵巣がんや扁平上皮がんに対して単剤で効果を示している<sup>32,33)</sup>が、Grade 4 の好中球減少症が報告されている。それゆえ、既存の抗がん剤と組み合わせることでそれぞれの用量を下げることで副作用を減らすことが期待される。

prexasertib + GEM + S-1 は膵臓がん細胞に対して Bcl-2 のタンパク質の発現量を低下させてアポトーシスを誘導することで高い細胞増殖抑制効果を示した。prexasertib は膵臓がんに対して標準的薬剤である GEM や S-1 の効果を高める有用な薬剤となりうると考えられる。

## 5. 小 括

本章ではまず Chk1 阻害剤の prexasertib と GEM、S-1 をそれぞれ組み合わせて膵臓がん細胞株 SUI-2 に対し MTT assay を行った結果、細胞増殖抑制に対して相乗効果を示すことを明らかにした。また prexasertib + GEM + S-1 の 3 剤併用療法が単剤療法もしくは 2 剤併用療法より効果的であることを示した。細胞死について Cell Death Detection ELISA kit を用いて検討を行ったところ、3 剤併用療法は効率的にアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。そのアポトーシスの詳細なメカニズムを Western blotting で解析したところ、抗アポトーシス分子の Bcl-2 のタンパク質の発現量が減少していた。次に Chk1 特異的 siRNA で Chk1 mRNA をノックダウンし、GEM + S-1 処理を行ったところ、顕著にアポトーシスが誘導された。Western blotting で同様にアポトーシスの詳細なメカニズムを解析したところ、抗アポトーシス分子の Bcl-2 のタンパク質の発現量が減少していた。Bcl-2 はアポトーシスを制御しており、抗がん剤治療開発における魅力的なターゲットとなっている。Bcl-2 が膵臓がん細胞株のアポトーシス誘導において重要な分子となっている可能性があり、さらに効果的な治療法を検討すべく、Bcl-2 阻害剤を使用した検討が必要と考えられる。

### 第Ⅲ章 Bcl-2 ファミリーをターゲットとした治療法の検討

#### 1. 緒 言

第Ⅱ章で Chk 1 阻害剤の prexasertib が GEM と S-1 の細胞増殖抑制効果を高めることを示した。さらに prexasertib + GEM + S-1 の併用療法は膵臓がん細胞に対して高い細胞増殖抑制効果があり、抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 の発現を低下させアポトーシスを誘導していることを明らかにした。

Bcl-2 ファミリーはアポトーシスを負に制御しており、抗がん剤治療開発における魅力的なターゲットとなっている<sup>56)</sup>。Bcl-2 ファミリータンパク質は複数の BH ドメインからなるマルチドメインタンパク質であり、そのドメインの機能と構造から 3 つのサブグループに分けられる (Figure 12)<sup>56,57)</sup>。Bcl-2 の BH3 ドメインにアポトーシス促進に働く BH3-only タンパク質が結合することで抗アポトーシス作用を抑制している。そこで Bcl-2 を阻害する薬剤として BH3 模倣薬が開発された。BH3 模倣薬は Bcl-2 ファミリータンパク質の BH3 ドメインに結合し、抗アポトーシス作用を抑制する。また Bcl-2 ファミリータンパク質への結合を競合阻害された BH3-only タンパク質がアポトーシス促進タンパク質である BAX を活性化させることでアポトーシスを強く誘導する (Figure 13)<sup>56)</sup>。BH3 模倣薬の中で選択的 Bcl-2 阻害剤 venetoclax (ABT-199) が開発されており、慢性リンパ性白血病に対する臨床試験が行われ、既に FDA に認可されている<sup>43, 58,59)</sup>。また、非選択的 Bcl-2 阻害剤である navitoclax (ABT-263) は Bcl-2 だけではなく、Bcl-2 ファミリー分子で抗アポトーシス作用を有する Bcl-xL も阻害する<sup>60)</sup>。Navitoclax は現在、骨髄線維症や慢性リンパ性白血病、小細胞肺癌等の固形がんに対して単剤療法もしくは併用療法で臨床試験が現在進行している<sup>61)</sup>。

第Ⅱ章で得られた結果から、本章では Bcl-2 に注目し、選択的 Bcl-2 阻害剤の venetoclax と非選択 Bcl-2 阻害剤の navitoclax を用いて、これまでに膵臓がん細胞に対して使用してきた GEM、S-1、prexasertib と併用して、よ

り効果的な治療法を検討した。

本章ではまず膵臓がん細胞株 SUIT-2 に対して GEM, S-1, prexasertib と venetoclax もしくは navitoclax の併用効果を検討した。SUIT-2 に対して特に高い細胞増殖抑制効果を示した組み合わせについて、さらに膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 と BxPC-3 を追加して同様に併用効果を検討した。またその併用効果の詳細なメカニズムの検討を行った。そして個々の細胞株における薬剤の感受性の違いについて、内因性の Chk1 や Bcl-2、Bcl-xL の発現量と関連があるかどうかを検討した。

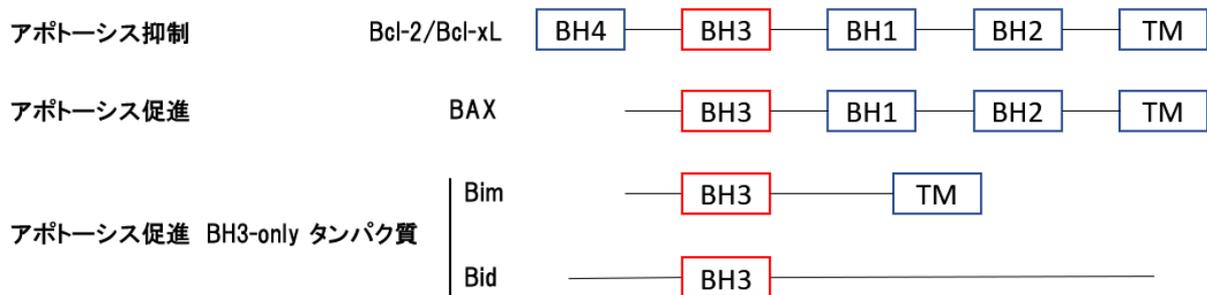


Figure 12. Bcl-2 ファミリータンパク質の構造 (TM は膜貫通部位を示す)

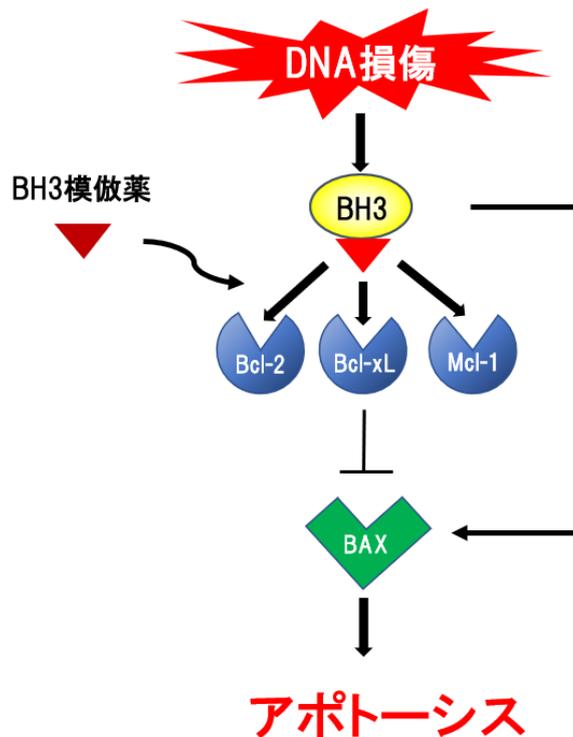


Figure 13. BH3 模倣薬の作用機序

## 2. 実験材料と方法

### 2-1. 細胞株

ヒト膵臓がん細胞株 SUIT-2、MIA PaCa-2、BxPC-3 (ATCC) を用いた。またヒト白血病細胞株 HL-60 (JCRB) を用いた。SUIT-2、BxPC-3、HL-60 は 10% FBS 添加 RPMI1640 にて培養した。MIA PaCa-2 は 10% FBS 添加 E-MEM (富士フィルム和光純薬工業株式会社) にて培養した。

### 2-2. 抗がん剤

venetoclax と navitoclax は MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ) から購入した。GEM、5-FU、CDHP および prexasertib を使用した。S-1 は 5-FU と CDHP を臨床試験の血中濃度を参考にして 1:2 で混合したものを使用した<sup>13)</sup>。

### 2-3. 抗体

抗ヒト caspase 3 抗体(ウサギ mAb、product #9665、1:1000 dilution)、抗ヒト cleaved PARP 抗体(Asp214) (ウサギ mAb、product #5625、1:1000 dilution)、抗ヒト Mcl-1 抗体(ウサギ mAb、product #94296、1:1000 dilution)、抗ヒト Bcl-2 抗体(ウサギ mAb、product #2870、1:1000 dilution)、抗ヒト Bcl-xL 抗体(ウサギ mAb、product #2764、1:1000 dilution)、抗ヒト Bax 抗体(ウサギ mAb、product #2772、1:1000 dilution)、抗ヒト phosphorylated-Chk1 抗体 (Ser296) (ウサギ mAb、product #90178、1:1000 dilution)、抗ヒト phosphorylated-Chk1 抗体 (Ser317) (ウサギ mAb、product #12302、1:1000 dilution)、抗ヒト phosphorylated-Chk1 抗体 (Ser345) (ウサギ mAb、product #2348、1:1000 dilution)、抗ヒト Chk1 抗体(マウス mAb、product #2360、1:1000 dilution)、抗ヒト  $\gamma$ H2AX 抗体 (Ser139) (ウサギ mAb、product #9718、1:1000 dilution)、抗ヒト  $\beta$ -actin 抗体(ウサギ mAb、Merck KGaA、1:5000 dilution)、抗ヒト cytochrome c 抗体(マウス mAb、cat. no. 556433、1:1000 dilution) を使

用した。二次抗体としてウサギ抗マウス IgG-HRP もしくはヤギ抗ウサギ IgG-HRP を使用した。

#### 2-4. MTT assay

96 well plate に SUIT-2 は  $1 \times 10^3$  cells / 100  $\mu$ L、MIA PaCa-2 と BxPC-3 は  $2 \times 10^3$  cells / 100  $\mu$ L とした細胞懸濁液を 100  $\mu$ L / well ずつ播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し venetoclax、navitoclax、S-1、GEM、prexasertib をそれぞれの濃度となるように調製した培地を 100  $\mu$ L / well ずつ添加した。各抗がん剤の濃度は併用効果を認めた濃度で設定した。72 時間の培養後、0.5% MTT 20  $\mu$ L / well を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間反応させた。生成した formazan を Dimethyl Sulfoxide 100  $\mu$ L にて溶解し、測定波長 620 nm における吸光度をプレートリーダーにて測定した。IC<sub>50</sub> 値を CalcuSyn を用いて算出した。venetoclax、navitoclax とそれぞれの抗がん剤(prexasertib、GEM、S-1) の併用効果を CalcuSyn を用いて combination index (CI) を算出して判定した。また CI < 1 は相乗効果あり、CI = 1 は相加効果、そして CI > 1 は拮抗作用と判定できる。全ての実験は少なくとも 3 回以上行った。

#### 2-5. 細胞死の解析

SUIT-2 もしくは BxPC-3 ( $1.0 \times 10^5$ ) を 60 mm culture dish に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し、prexasertib と navitoclax を予備実験の結果からアポトーシスを顕著に認めた濃度となるようにそれぞれ調製した培地を添加した。アポトーシスを顕著に認めた 24 時間後に Cell Death Detection ELISA kit を用いて添付文書のプロトコルに沿って細胞質に遊離するヒストン結合断片(モノオリゴヌクレオソームとオリゴヌクレオソーム) を測定した。抗ヒストン抗体を 96 well plate に室温 1 時間でコーティングし、細胞可溶化物を 90 分間反応させた。ペルオキシダーゼ標識抗 DNA 抗体を加えて 90 分間インキュベーションし、基質溶液

を加えて測定波長 405 nm における吸光度をプレートリーダーにて測定した。さらに同様の細胞培養環境におけるアポトーシス細胞について 1.2 mM の Hoechst 33342 で核を染色し、蛍光顕微鏡で核の形態学的変化を撮影した。

## 2-6. Western blotting

SUIT-2 ( $3.0 \times 10^5$ ) を 100 mm culture dish に播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し、2-5.の各抗がん剤の濃度と同様の prexasertib が 10 nM、navitoclax が 3 μM となるように調製した培地を添加した。指定時間 (24、48、72 時間) の経過後、上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した後、Cell lysis buffer M に Complete protease inhibitor cocktail と PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail を加えた溶液でタンパク質を可溶化し、cell scraper で細胞を回収した (HL-60 は浮遊細胞のため本工程を除く)。氷上で 20 分間静置後、15,000×g で 15 分間遠心分離し、上清を -80 °C で保存した。タンパク質の濃度を測定し、30 μg のタンパク質を SDS-PAGE Sample Loading Buffer で希釈し、7.5-12% SDS-PAGE にて分離し、PVDF 膜に転写した。1% Difco Skim Milk にて 1 時間ブロッキング後、各一次抗体を 4°C、約 12 時間反応させ、さらに二次抗体を 1 時間反応させた。最終的に SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate にて化学発光を行い、ImageQuant LAS 4000 で検出を行った。検出されたバンドの強度は Image J にて定量解析を行った。

## 2-7. cytochrome *c* の解析

SUIT-2 ( $3.0 \times 10^5$ ) を 100 mm culture dish に播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。事前培養後、上清を除去し、prexasertib が 10 nM、navitoclax が 3 μM となるように調製した培地を添加した。2-6.の結果からアポトーシスマーカーである cleaved caspase 3 や cleaved PARP が変動するまでの時間 (24、48 時間) の経過後、上清を除去し PBS で洗浄した後、0.05% トリプシンで回収し、0.01% ジギトニン溶液で懸濁した。氷上で 5 分放置した後、

14,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を -80℃ で保存した。上清は cytochrome c 特異的抗体を用いて Western blotting にて解析した。

#### 2-8. Small interfering RNA を用いたトランスフェクション

Bcl-2 と Bcl-xL に対する Silencer® Select Validated siRNA (small interfering RNA: siRNA) と Silencer® Select Negative Control siRNA は Thermo Fisher Scientific から購入した。SUIT-2 ( $1.0 \times 10^5$ ) を 60 mm culture dish に播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間事前培養した。細胞を siRNA (終濃度 5 nM) と DharmaFECT transfection reagent で添付のプロトコルに基づき処理した。37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養後、上清に予備実験の結果からアポトーシスを顕著に認めた prexasertib (10 or 30 nM) を添加した RPMI-1640 で置き換えた。Western blotting にてそれぞれのタンパク質の発現量を定量した。細胞死は Cell Death Detection ELISA kit と Hoechst 33342 染色を用いて行った。

#### 2-9. 統計解析

MTT assay、ELISA、Hoechst 染色による画像解析、Western blotting による測定値は平均値 ± 標準偏差で表示した。venetoclax と navitoclax の IC<sub>50</sub> 値は unpaired t-test を用いて比較した。Image J による解析結果は平均値 ± 標準偏差で表示した。各群の平均値の比較には分散分析 (ANOVA) を行った後、Fisher's PLSD 法を用いた。p 値が 5% 未満を有意差ありと判断し、統計解析ソフトは BellCurve エクセル統計を用いた。

### 3. 結 果

#### 3-1. venetoclax と navitoclax を用いた各種抗がん剤 (GEM、S-1、prexasertib) との併用効果の解析

SUIT-2 に対して venetoclax もしくは navitoclax とそれぞれの抗がん剤 (GEM、S-1、prexasertib) を組み合わせて MTT assay を行った結果、venetoclax とそれぞれの抗がん剤は多くの濃度の組み合わせで拮抗作用 (CI > 1) を示した (Table 3)。しかし navitoclax と prexasertib は多くの濃度の組み合わせで高い相乗効果を示していた (CI < 1) (Table 4)。

Table 3 Combination indexes calculated for venetoclax + GEM, venetoclax + S-1, and venetoclax + prexasertib

	Venetoclax ( $\mu\text{M}$ )		
	1	2	3
GEM (ng/mL)			
0.1	-	2.016	2.226
0.3	0.828*	1.069	1.123
0.5	1.052	1.178	1.294
S-1 ( $\mu\text{g/mL}$ )			
0.1	2.682	1.979	1.549
0.2	1.128	1.072	1.145
0.3	0.778*	0.992*	1.041
Prexasertib (nM)			
10	1.249	1.345	1.376
20	0.882*	0.970*	1.026
30	0.970*	1.047	1.077

\*Indicates synergy

Table 4 Combination indexes for navitoclax + GEM, navitoclax + S-1, and navitoclax + prexasertib

	Navitoclax ( $\mu\text{M}$ )		
	1	2	3
GEM (ng/mL)			
0.1	0.736*	0.871*	1.022
0.3	1.063	0.793*	0.974*
0.5	0.653*	0.808*	0.911*
S-1 ( $\mu\text{g/mL}$ )			
0.1	1.473	1.967	1.619
0.2	1.385	1.546	1.933
0.3	1.140	1.400	1.629
Prexasertib (nM)			
10	0.719*	0.890*	0.962*
20	0.529*	0.574*	0.698*
30	0.451*	0.559*	0.727*

\*Indicates synergy

次に、SUIT-2 に加えて MIA PaCa-2 と BxPC-3 に対して venetoclax と navitoclax の細胞増殖抑制効果について検討した。その結果、これらの細胞株全てにおいて venetoclax より navitoclax が高い感受性を示し、 $\text{IC}_{50}$  値は有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (Figure 14 (A)–(C))。prexasertib の  $\text{IC}_{50}$  値は SUIT-2、MIA PaCa-2、BxPC-3 でそれぞれ  $20.1 \pm 2.2$  nM、 $1113.3 \pm 385.6$  nM、 $12.8 \text{ nM} \pm 9.5$  nM だった。SUIT-2 と BxPC-3 において navitoclax と prexasertib の併用はそれぞれ単剤の細胞増殖抑制効果よりも有意に高く ( $p < 0.05$ )、venetoclax との併用では全ての細胞株において併用効果を認めなかった (Figure 14 (D)–(I))。

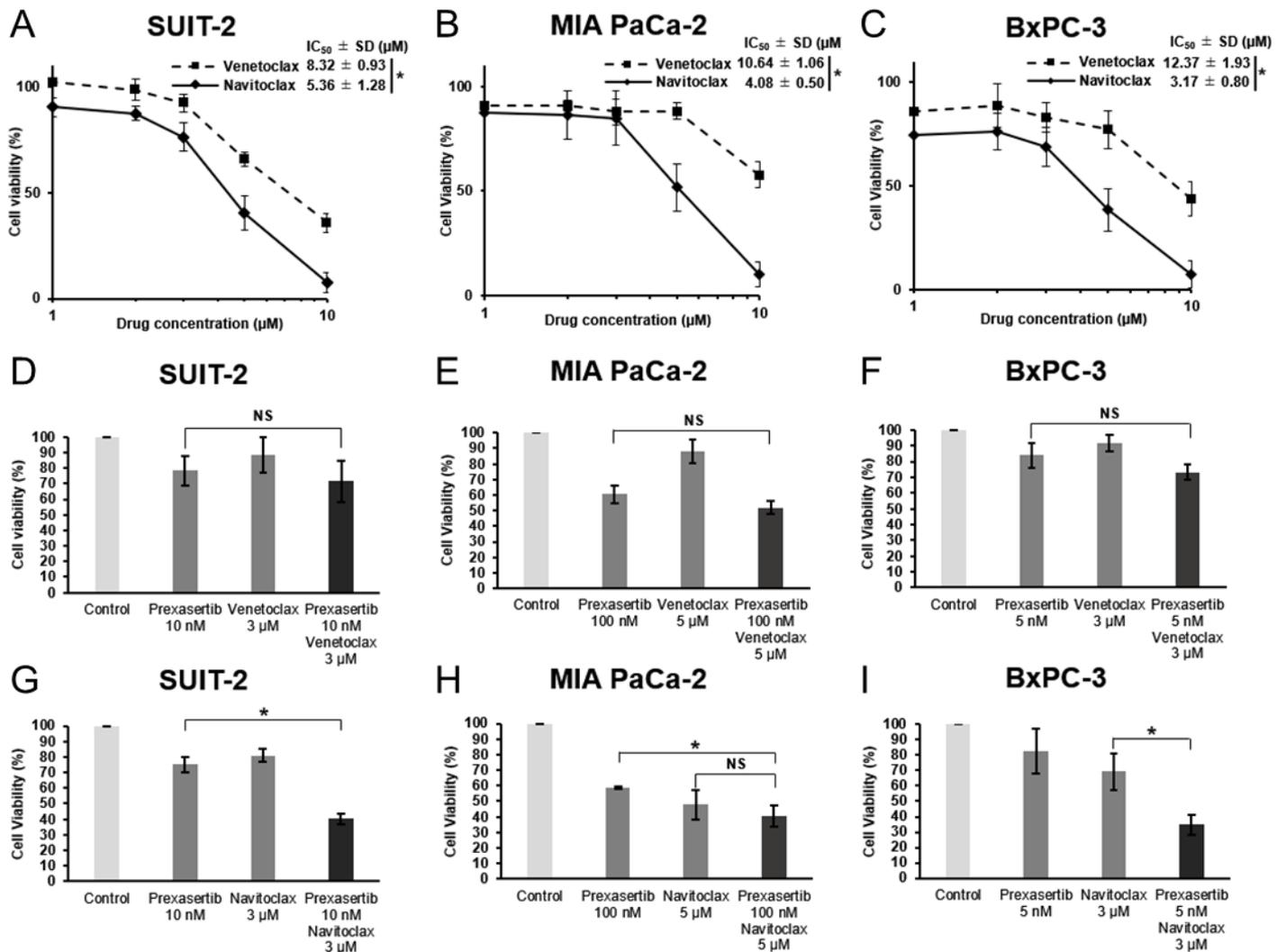


Figure 14. Effects of venetoclax or navitoclax on SUIT-2, MIA PaCa-2, and BxPC-3. (A–C) Viability of cells treated with various concentrations of venetoclax or navitoclax for 72 h. Cell viability was measured by MTT assay. The  $IC_{50}$  values were determined at concentrations that showed 50% inhibition of cell growth. Effect of prexasertib combined with (D–F) venetoclax or (G–I) navitoclax. Cell growth was measured by MTT assay. Values shown are the mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments. \* $p < 0.05$  indicates a significant difference. NS: not significant.

### 3-2. prexasertib と navitoclax による細胞死の解析

Cell Death Detection ELISA kit (Roche) を用いて SUIT-2 と BxPC-3 に対する prexasertib と navitoclax の併用処理によるアポトーシスを検討した。Cell Death Detection ELISA kit を用いたアポトーシス定量的結果、prexasertib と navitoclax の併用はそれぞれの単剤処理と比較して有意にアポトーシスを増加した( $p < 0.05$ ) (Figure 15 (A), (B))。

SUIT-2 にそれぞれの薬剤処理を行い、24 時間後の核の形態変化をみた結

果を Figure 15 (C)(D)に示す。未処理群では核に形態変化は認めなかったが、prexasertib と navitoclax 処理群では核の凝縮や断片化であるアポトーシスに特徴的な変化を認めた。

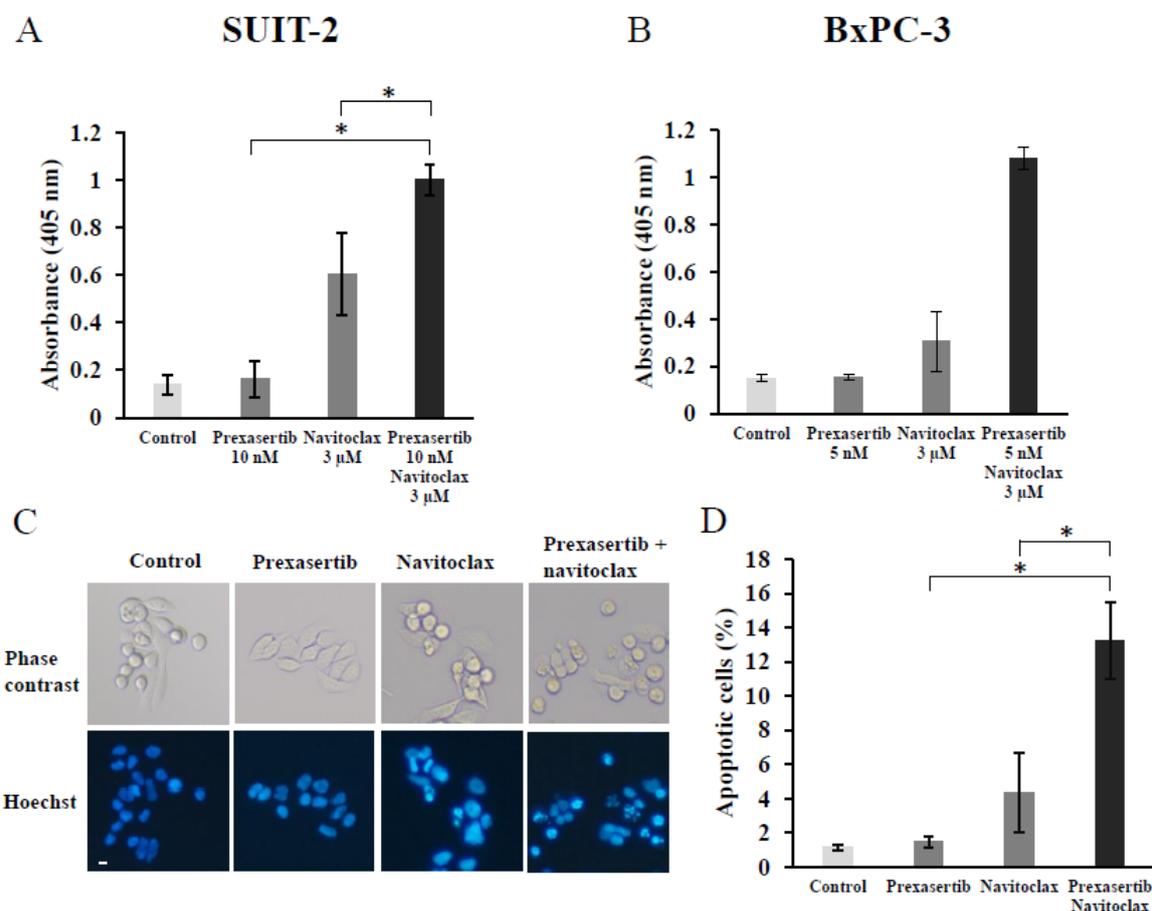


Figure 15. Effect of the combination of prexasertib and navitoclax on apoptotic cell death. (A), (B) SUI2 cells and BxPC-3 cells were treated with prexasertib and/or navitoclax for 24 h. (C), (D) Analysis of morphological changes induced by prexasertib and navitoclax at 24 h in SUI2 cells. The cells were stained with Hoechst 33342 and the morphological changes were analyzed under a fluorescence microscope or assessed by phase contrast microscopy and quantitative analysis of apoptotic cells as percentage of total cells. The scale bar represents 10 μm. Values shown are the mean ± SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant difference.

### 3-3. prexasertib と navitoclax の併用による細胞増殖抑制効果の詳細な機序の解析

prexasertib と navitoclax との併用処理によるアポトーシスの詳細なシグナル変化を検出するため、Western blotting を行った。アポトーシスマーカーである cleaved caspase 3 と cleaved PARP を検出した結果を Figure 16 (A) に示した。prexasertib と navitoclax との併用処理 48 時間後に cleaved caspase 3 と cleaved PARP の発現が増加していた。続いてアポトーシスを制御している Bcl-2 ファミリーについて検討した (Figure 16 (B))。その結果、抗アポトーシス分子である Mcl-1 は navitoclax 処理で増加していた。Bcl-2 の発現は未処理群と比較して navitoclax 処理にて 48 時間後に低下していた。同じく抗アポトーシス分子である Bcl-xL とアポトーシス促進分子の Bax の発現は変化が無かった。ミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の放出を検討した結果、24 時間後と 48 時間後に放出が増加していた (Figure 16 (C))。次に prexasertib と navitoclax との併用が Chk1 シグナルに与える影響について検討した (Figure 16 (D))。その結果、薬剤処理後 24 時間以降で prexasertib は Chk1 の活性化に最も重要なプロセスである Chk1-S296 の自己リン酸化を抑制していた。また、prexasertib と navitoclax 併用処理は DNA 損傷が起きると最初にリン酸化される部位である S317 と S345 のリン酸化を 24 時間後に増加させた。DNA ダメージマーカーである  $\gamma$ H2AX は navitoclax 処理群と併用群でリン酸化が増加していた。

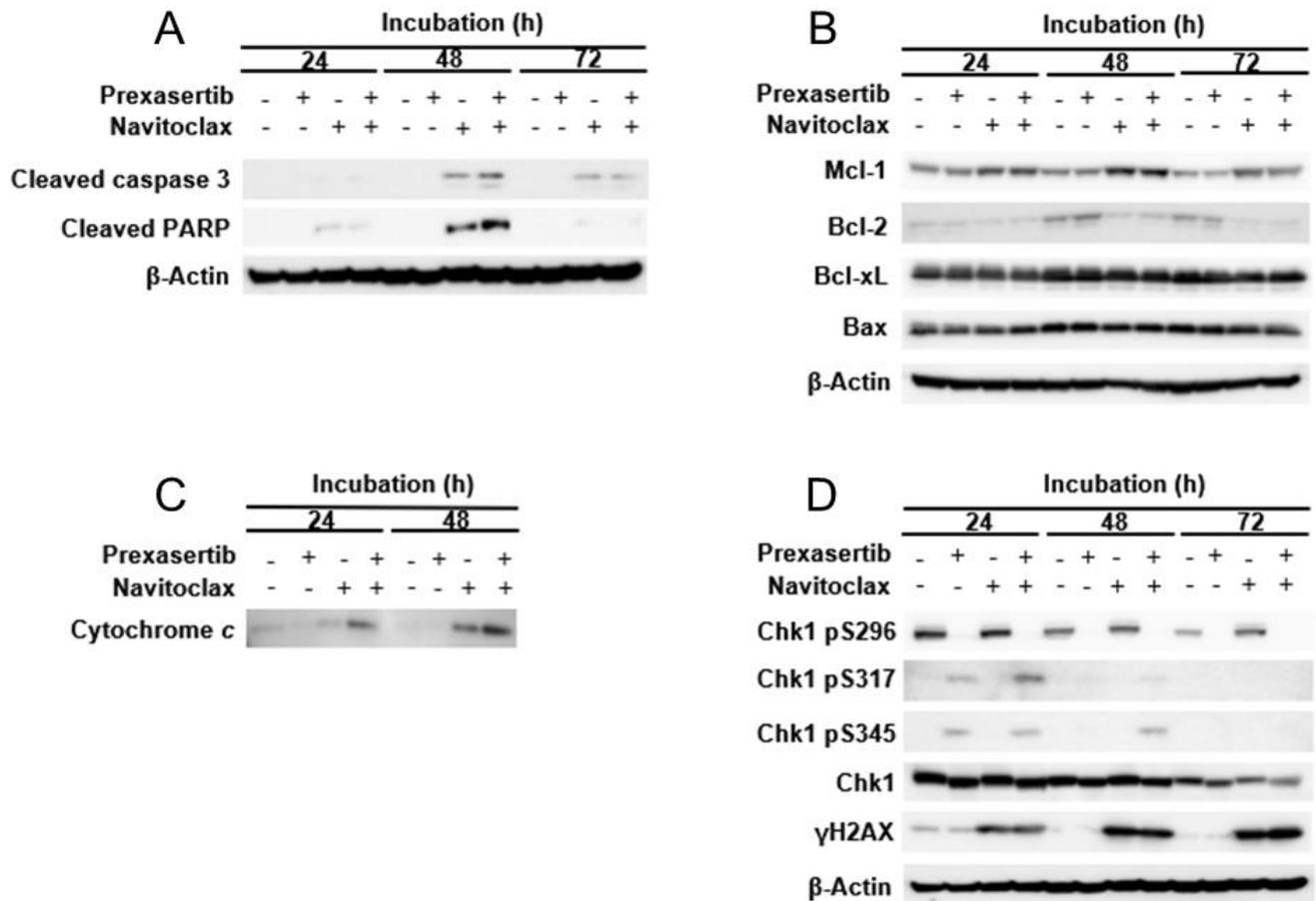


Figure 16. Effect of prexasertib, navitoclax, and prexasertib + navitoclax on apoptosis and Chk1 in SUIT-2 cells. (A) Western blot analysis of the levels of cleaved caspase 3 and cleaved PARP. (B) Effect of prexasertib, navitoclax, and prexasertib and navitoclax on the Bcl-2 family. (C) Release of cytochrome c from mitochondria. SUIT-2 cells were treated for 24 and 48 h with prexasertib, navitoclax, or prexasertib and navitoclax. (D) Western blot analysis of the levels of Chk1 (pS296, pS317, pS345), Chk1, and  $\gamma$ H2AX in SUIT-2 cells.

### 3-4. Bcl-2 と Bcl-xL 特異的 siRNA 処理が prexasertib によるアポトーシスの誘導へ与える影響

次に prexasertib と navitoclax による相乗効果のメカニズムを検討した。navitoclax の細胞増殖抑制効果は Bcl-2 もしくは Bcl-xL に依存しているため<sup>51)</sup>、Bcl-2 と Bcl-xL mRNA をそれぞれ選択的 siRNA にてノックダウンさせ、prexasertib の細胞増殖抑制効果への影響を解析した (Figure 17 (A)、(B))。その結果、期待された結果とは異なり Bcl-2 のノックダウンと prexasertib 処理でアポトーシスの誘導は起こらなかった (Figure 17(C))。しかし Bcl-xL のノックダウンはアポトーシスを著しく誘導し、prexasertib との併用で prexasertib の用量依存的にアポトーシスが増加した (Figure 17 (D))。

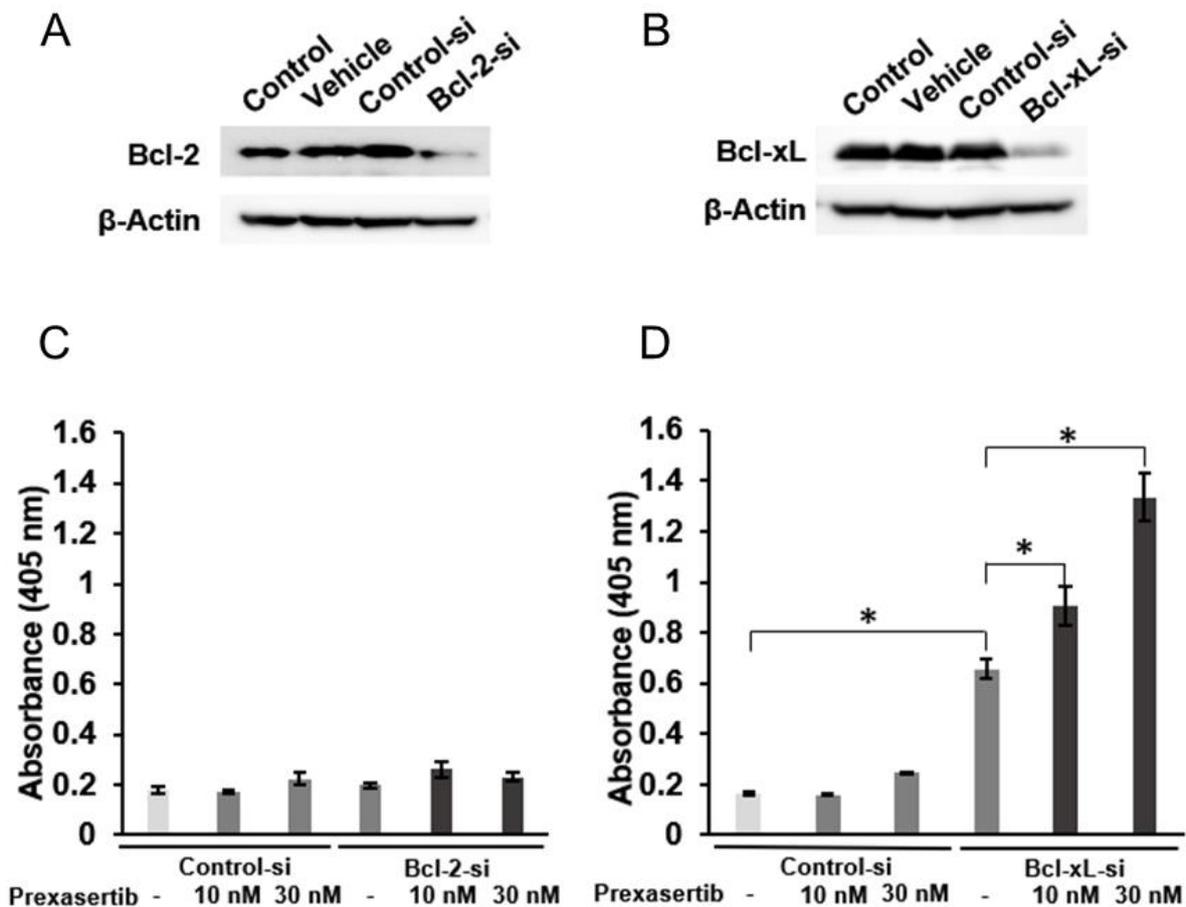


Figure 17. Effect of prexasertib on apoptosis induction when Bcl-2/Bcl-xL is knocked down in SUIT-2 cells. Western blot analysis of the levels of expression of Bcl-2 or Bcl-xL and  $\beta$ -actin in SUIT-2 cells transfected with vehicle, non-silencing siRNA, and (A) Bcl-2 or (B) Bcl-xL specific siRNA. Apoptosis quantified by Cell Death ELISA in SUIT-2 cells treated with prexasertib for 24 h after transfection of non-silencing siRNA or c Bcl-2 or d Bcl-xL specific siRNA. Values shown are the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant difference.

Figure 18 (A) に Bcl-xL をノックダウンし、prexasertib (30 nM) で 24 時間処理した時の核の形態変化を示した。未処理群では核に形態変化が無かったのに対して Bcl-xL のノックダウン処理と prexasertib の併用処理群では核の凝縮と断片化を多く認めた (Figure 18 (B))。Figure 18 (C) は prexasertib 処理と Bcl-xL ノックダウンによるアポトーシスの詳細なメカニズムを検出した結果である。特異的 siRNA を用いた Bcl-xL ノックダウンと prexasertib の併用処理は navitoclax と prexasertib 併用処理とほぼ同様の結果だった。cleaved caspase 3 と cleaved PARP は prexasertib と Bcl-xL ノックダウン処理により発現量が増加していた。cleaved Mcl-1 は prexasertib + GEM+ S-1 併用処理の結果 (第 II 章の結果) と同様に増加していた。Bcl-2 の発現は Bcl-xL ノックダウンと prexasertib 処理群で最も減少していた。Prexasertib は Chk1-S296 のリン酸化を抑制していた。γH2AX はまた Bcl-xL ノックダウンと prexasertib 処理群でリン酸化が増加していた。

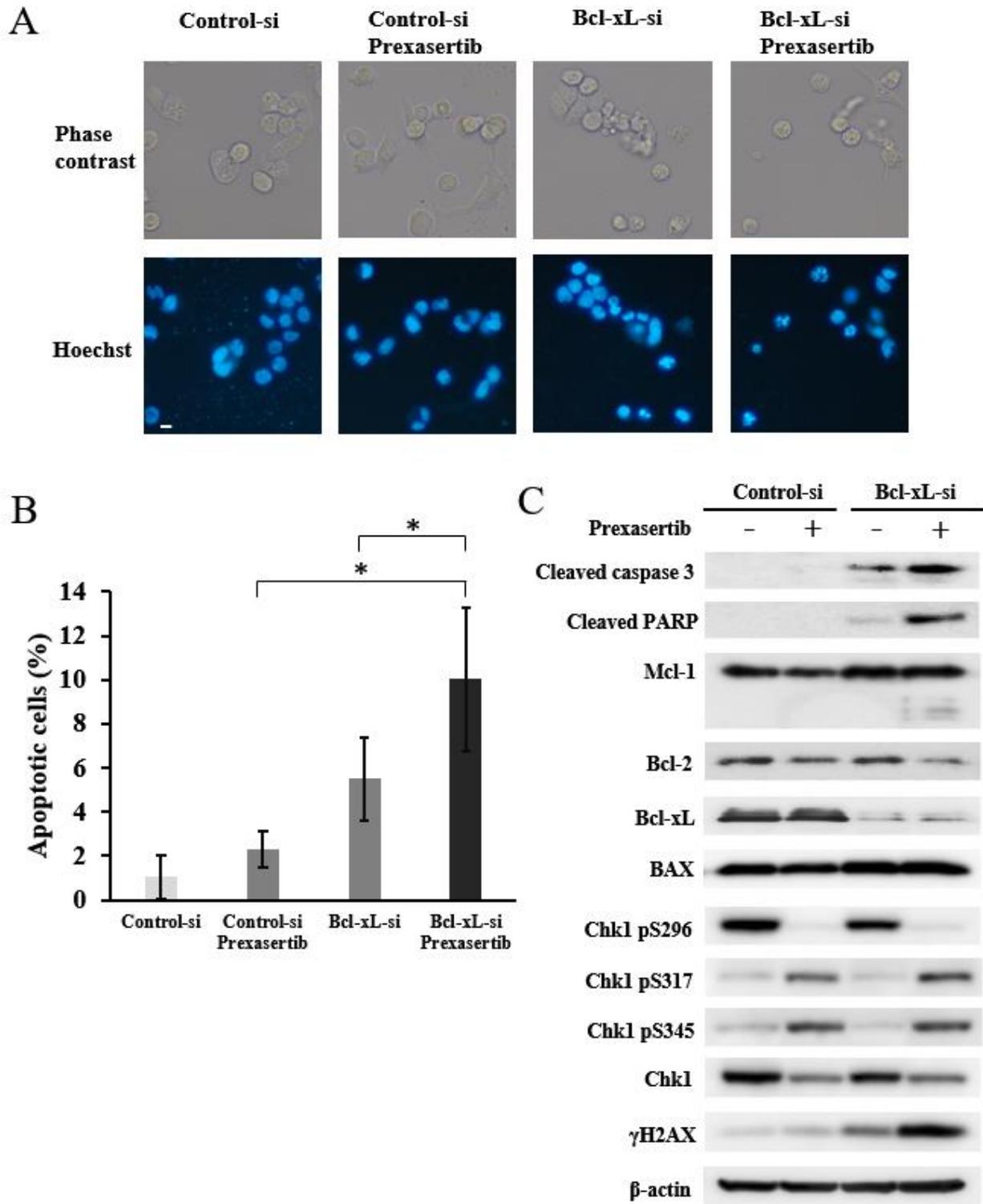


Figure 18. Apoptosis induction by Bcl-xL knockdown using specific siRNA and prexasertib treatment in SUIT-2 cells. (A), (B) Morphological change analyzed by fluorescence microscopy or phase contrast microscopy in cells stained with Hoechst 33342 and quantitative analysis of apoptotic cells as percentage of total cells. The scale bar represents 10  $\mu$ m. Values shown are the mean  $\pm$  SD. \* $p$  < 0.05 indicates a significant difference. (C) Western blot analysis of changes in the expression of apoptosis-related factors and Chk1 in cells treated with prexasertib 24 h after transfection with non-silencing siRNA or Bcl-xL-specific siRNA.

3-5. 膵臓がん細胞株における内因性の Bcl-2、Bcl-xL、Chk1 の発現量の解析  
 venetoclax、navitoclax、prexasertib のそれぞれの細胞株に対する効果の差  
 が内因性の Bcl-2、Bcl-xL、Chk1 の発現量の差と関連があるかどうかを検討  
 した (Figure 19)。HL-60 は臨床上で venetoclax の効果が認められている白  
 血病の細胞株であり<sup>37)</sup>、他のがん種の細胞株よりも Bcl-2 の発現量が高いと  
 予想されるため、Bcl-2 のポジティブコントロールとして使用した。結果と  
 して、全ての膵臓がん細胞株の Bcl-2 の発現量は HL-60 と比較して有意に  
 低かった ( $p < 0.05$ )。しかし Bcl-xL の発現量は全ての膵臓がん細胞株で  
 HL-60 と比較して有意に高かった ( $p < 0.05$ )。また、MIA PaCa-2 は Chk1 の  
 発現量が他の細胞株と比較して有意に低かった ( $p < 0.05$ )。

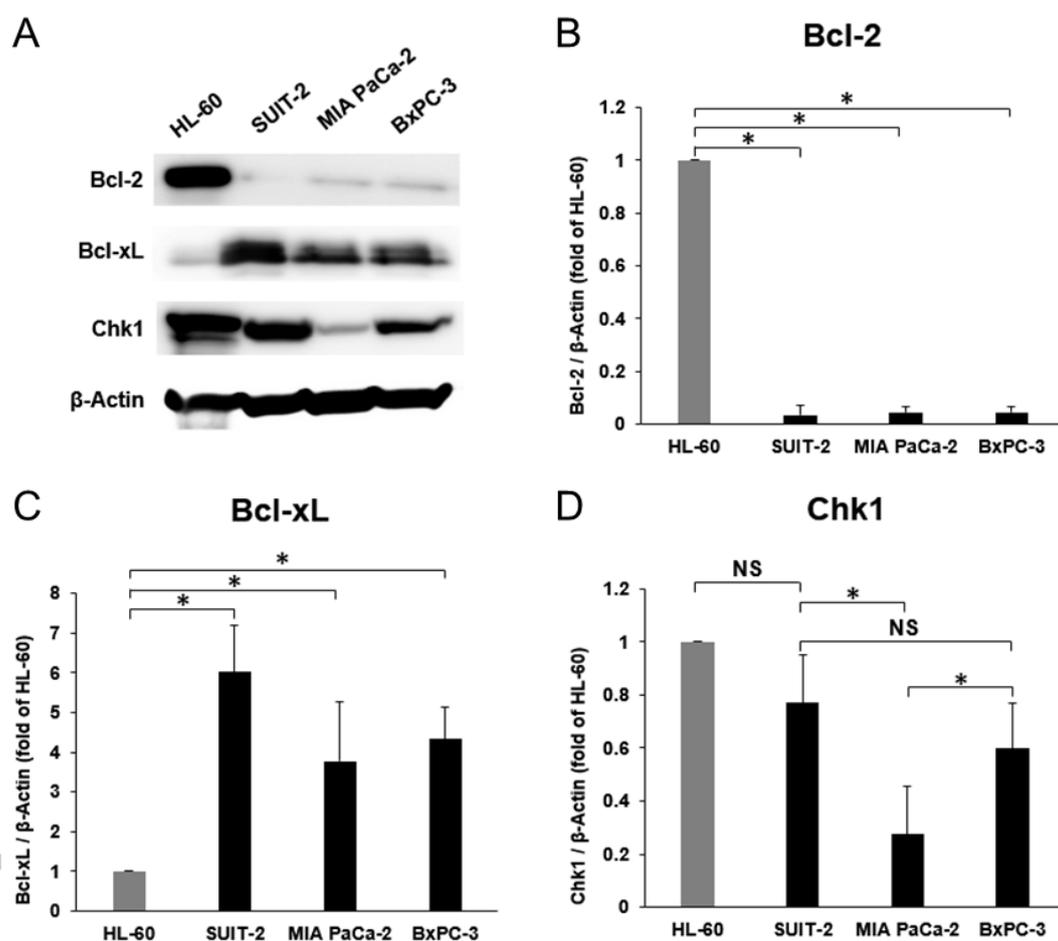


Figure 19. Endogenous expression of Bcl-2, Bcl-xL, and Chk1 proteins. (A) Western blot analysis of the levels of Bcl-2, Bcl-xL, and Chk1 protein expression in HL-60, SUIT-2, MIA PaCa-2, and BxPC-3 cells. The relative band intensities of (B) Bcl-2, (C) Bcl-xL, (D) Chk1, and  $\beta$ -actin were quantified using densitometric analysis. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Values shown are the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant difference.

#### 4. 考 察

本検討では、prexasertib と navitoclax の併用は膵臓がん細胞株に対して相乗的細胞増殖抑制効果があることを示した。更にその相乗的細胞増殖抑制効果が Bcl-2 ではなく Bcl-xL の阻害によるアポトーシス誘導であることを示した。

第 II 章で、Chk1 阻害剤の prexasertib と GEM + S-1 の 3 剤併用処理が膵臓がん細胞に対して Bcl-2 の発現量を下げてアポトーシスを誘導することを明らかにした。そこで代表的な Bcl-2 ファミリーの Bcl-2 をターゲットとして Bcl-2 阻害剤である venetoclax もしくは navitoclax を用いて既存の抗がん剤と組み合わせてより効果的な治療法を模索した。3 つの膵臓がん細胞株を用いた検討の結果、選択的 Bcl-2 阻害剤の venetoclax よりも非選択的 Bcl-2 阻害剤の navitoclax の方が高い感受性を示した。venetoclax は既に *in vitro* や臨床上においても、Bcl-2 の発現量が高いほど効果的であることが報告されている<sup>62, 63)</sup>。一方で、内因性の Bcl-2 の発現量がしばしば膵臓がん細胞株では低く、Bcl-xL と Mcl-1 は高頻度に発現していることが報告されている<sup>64)</sup>。さらに、膵臓がん組織での Bcl-xL の発現は Bcl-2 よりも高いことが報告されている<sup>65)</sup>。3 つの膵臓がん細胞株と白血病細胞株 (HL-60) を用いた今回の検討でも、膵臓がん細胞株では HL-60 と比較して Bcl-2 の発現量が低く、Bcl-xL の発現量は逆に高かった。navitoclax は非選択的 Bcl-2 阻害剤であり、Bcl-2 だけではなく、Bcl-xL を阻害することから<sup>60)</sup>、上述のように navitoclax は膵臓がん細胞株に対して venetoclax よりも効果的であったと考える。本検討では HL-60 と 3 つの膵臓がん細胞株における venetoclax の細胞増殖抑制効果を直接的に比較できていないが、他の検討では HL-60 に対する IC<sub>50</sub> 値は 0.2 μM と報告されており<sup>66)</sup>、本検討の膵臓がん細胞株における IC<sub>50</sub> 値よりも低く、感受性が高いことがわかる。

DNA チェックポイントは DNA 損傷により活性化され、細胞周期を遅延させることで DNA を修復する。Chk1 阻害剤はがん細胞に対して選択的に有糸

分裂細胞死を誘導することを期待できる<sup>19)</sup>。実際に prexasertib は *in vitro* と *in vivo* において様々な検討が行われており、PARP 阻害薬の olaparib との併用療法で卵巣高異型度漿液性腺がんに対して<sup>34)</sup>、急性リンパ芽球性白血病<sup>35)</sup> や cetuximab と放射線の併用療法で頭頸部がんに対し<sup>36)</sup>、また神経芽細胞腫<sup>37)</sup> に対して効果的な細胞増殖抑制効果を示している。さらに、現在複数の臨床試験が行われており、臨床開発が進行しているが<sup>67)</sup>、現在臨床現場で使用できる Chk1 阻害剤は未だ存在しないのが現状である。今回の結果では、prexasertib と navitoclax の併用処理は DNA 損傷が起きると Chk1 の最初にリン酸化される部位である S317 と S345 のリン酸化を増加させ、prexasertib は Chk1-Cdc25A の経路に必須の Chk1-S296 の自己リン酸化を抑制することを示した。

本章の検討は navitoclax が Chk1 阻害剤の細胞増殖抑制効果を高めることを示した初めての報告となった。更に特異的 siRNA を用いた検討ではその機序は Bcl-2 阻害ではなく、Bcl-xL 阻害によることを示した。そしてその機序として cytochrome c がミトコンドリアから細胞質へ放出され、カスパーゼ経路が働きアポトーシスが増加したことを明らかにした。このように、Chk1 と Bcl-xL の同時阻害は膵臓がんや他の固形がんに対して新たな治療戦略となりうることが考えられる。venetoclax と Chk1 阻害剤である rabusertib (LY2603618) の併用処理は急性骨髄性白血病に対して効率的にアポトーシスを誘導したことが報告されている<sup>68)</sup>。Bcl-2 をターゲットとした治療薬の効果は Bcl-2 の発現量に関連するが、今後 Chk1 の阻害と膵臓がん細胞株で高頻度に発現している Mcl-1 を含めた Bcl-2 ファミリーをターゲットとした新規治療法を検討していく必要がある。

navitoclax は Bcl-xL 阻害による血小板減少症という臨床問題となる副作用が報告されている<sup>69, 70)</sup>。prexasertib は骨髄抑制の副作用が報告されており<sup>28)</sup>、navitoclax と prexasertib を併用する場合は開始用量の設定に注意が必要であり、投与後は血球数を注意深く観察する必要がある。しかしながら、この二つの薬剤の併用療法は相乗的效果があることが今回示されたため、そ

れぞれの用量を減らせる可能性がある。

venetoclax は Bcl-2 の発現量が高い場合に効果が期待できることが報告されていることから、navitoclax と prexasertib にも効果予測バイオマーカーを同定することが必要である。ゲフィチニブが EGFR 遺伝子に特異的な変異がある場合に効果的であることがわかっているように<sup>71)</sup>、今後がん化学療法は個別化され、より個々の患者に効果が期待できる薬剤を選択して投与することが求められている。Chk1 阻害剤 や Bcl-xL 阻害剤も効果予測バイオマーカーが同定され、効果の期待できる場合に選択的に使用されることが重要である。本検討の結果では、Chk1 阻害剤と Bcl-xL 阻害剤の併用が Bcl-xL と Chk1 の発現量が高い SUIT-2 と BxPC-3 で効果が高いことを示された一方で、Chk1 の発現量が低い MIA PaCa-2 では Chk1 阻害剤と Bcl-xL 阻害剤の併用効果が低いことが示された。これらの知見は個別化医療という点で有用な情報となることが期待できる。実際に Chk1 の発現量が有意に低かった MIA PaCa-2 での MTT assay における prexasertib の IC<sub>50</sub> 値 (1113.3 nM) は SUIT-2 の IC<sub>50</sub> 値 (20.1 nM) や BxPC-3 の IC<sub>50</sub> 値 (12.8 nM) に比較し顕著に高かった。Bcl-2 の発現量については 3 つの細胞株で差は無く、その結果通り venetoclax の感受性も変わらなかった。また 3 つの細胞株の中で Bcl-xL の発現量が最も高かった SUIT-2 において、navitoclax の感受性が 2 つの細胞株と比較し高い結果は得られなかった。

prexasertib と navitoclax の併用療法は Bcl-xL を阻害することでアポトーシスを誘導し、膵臓がん細胞株に対して強い細胞増殖抑制効果を示した。Chk1 と Bcl-xL の同時阻害は膵臓がんに対して新たな治療法となりうる。

## 5. 小 括

本章ではまず選択的 Bcl-2 阻害剤の venetoclax と非選択的 Bcl-2 阻害剤の navitoclax を用いて、これまでに使用してきた GEM、S-1、prexasertib をそれぞれ組み合わせ、膵臓がん細胞株 SUIT-2 に対し MTT assay を行った。その結果、prexasertib と navitoclax の併用は相乗効果を示していた。そこで他の膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 と BxPC-3 を加えて検討を行った結果、全ての細胞株において venetoclax よりも navitoclax の方が高い感受性を示し、BxPC-3 においても prexasertib と navitoclax は高い併用効果を認めた。細胞死について Cell Death Detection ELISA kit を用いて検討した結果、prexasertib と navitoclax はアポトーシスを顕著に誘導していることが明らかとなった。prexasertib と navitoclax の併用効果が Bcl-2 の阻害に依存しているかどうかを確認するために Bcl-2 を特異的 siRNA にてノックダウンし、prexasertib を処理した結果、期待とは異なりアポトーシスは増加しなかった。一方、Bcl-xL を特異的 siRNA にてノックダウンし、prexasertib を処理した結果、アポトーシス誘導が顕著に増加した。venetoclax は既に白血病に対して臨床上で効果を認めており、その白血病の細胞株 HL-60 を用いて、venetoclax、navitoclax、prexasertib が内因性の Bcl-2、Bcl-xL、Chk1 の発現量に依存しているかどうかを Western blotting で検討した。全ての膵臓がん細胞株の Bcl-2 の発現量は HL-60 と比較して極めて低かった。しかし Bcl-xL の発現量は全ての膵臓がん細胞株で HL-60 と比較して高い結果となった。MIA PaCa-2 は Chk1 の発現量が他の細胞株と比較して有意に低く、prexasertib と navitoclax の併用効果が低いこととの関連が考えられた。これらの情報は効果予測バイオマーカーとして利用できる可能性がある。Chk1 と Bcl-xL の同時阻害は膵臓がんに対して新たな治療法となりうる。

## 総 括

膵臓がんは様々ながん種と比較して生存率が低く、切除例においても再発が多いため、化学療法が治療における重要な役割を果たしている。本邦において GEM や S-1 を中心とした薬物治療が頻用されているが、その治療成績は十分とはいえない。これまでに著者は、GEM と S-1 併用療法の基礎的検討を行い、MIA PaCa-2 に対して MTT assay で相乗効果を示すことを明らかにしていた。また FACS を用いて細胞周期への影響を解析したところ、併用群において各単剤群と比較し、最も S 期細胞の蓄積が観察されていた。

第 I 章では他の膵臓がん細胞株でも同じ傾向が見られるかどうかを検討するため、膵臓がん細胞株 SUIT-2 を用いて MIA PaCa-2 と同様の検討を行った。SUIT-2 は日本人の膵臓がん患者から樹立された細胞株で、世界的に広く使用されている細胞株である。MIA PaCa-2 と比較して GEM に感受性が高いことがわかっている。まず MTT assay で GEM と S-1 の併用効果を検討した結果、相乗効果を認めた。続いて FACS を用いて細胞周期への影響を解析したところ、併用群において各単剤群と比較し、S 期細胞の蓄積が観察され、MIA PaCa-2 と同様の傾向を認めた。そこで S 期細胞蓄積の詳細なメカニズムを解析するために、細胞周期の進行に関わる Chk1 や p21、p27、Cyclin 等のタンパク質の発現を Western blotting にて検出した。結果として GEM と S-1 を併用することにより DNA 損傷チェックポイントキナーゼの Chk1-S345 がリン酸化されていることを明らかにした。DNA 損傷チェックポイントとは染色体 DNA に損傷が生じるなどの異常が検知されると細胞周期が特定の位置で周期の進行を停止し、その間に DNA の修復を効率的に行う機構である。DNA の損傷が起きると ATR が活性化され、Chk1 の S317 と S345 をリン酸化し、その結果 Chk1 キナーゼが活性化される。その後自身の S296 を自己リン酸化し、14-3-3 タンパク質と結合の後に Cdc25A を不活化させる。結果として CDK が阻害され細胞周期が停止する。両薬剤により DNA の合成が強力に阻害されることで Chk1 の活性化が引き起こされ、S 期で細胞周期

が遅滞していることが示唆された。DNA 損傷チェックポイントは抗がん剤の耐性機序として知られており、近年 Chk1 の研究が世界的に進められている。この Chk1 を阻害することで抗がん剤の効果が増強するという知見があり、Chk1 は抗がん剤の領域において注目を集めている分子の一つである。また 2 つの細胞株で GEM や S-1 の感受性や細胞周期に影響を与える時間が異なっていた。GEM や S-1 の活性体である 5-FU の感受性は、その耐性機構や代謝に関わる遺伝子の発現量によって変わることがわかっている。今後効果予測バイオマーカーとして確立され、臨床応用されることが望まれる。第 I 章で GEM と S-1 併用の耐性機序として Chk1 が活性化していることを明らかにした。

第 II 章では Chk1 阻害剤である prexasertib (LY2606368) を用いて GEM、S-1、GEM と S-1 の併用効果を検討し、その併用効果の詳細なメカニズムを検討した。膵臓がん細胞株 SUIT-2 を用いて MTT assay を行った結果、prexasertib と GEM、S-1 それぞれの併用は相乗効果を認めた。また prexasertib + GEM + S-1 の 3 剤併用が最も高い細胞増殖抑制効果を認めた。細胞死について解析した結果、3 剤併用によってアポトーシスをより強く誘導していた。そのアポトーシスの詳細なメカニズムについて Western blotting で検討した結果、Bcl-2 の発現量が大きく低下していた。また prexasertib は Chk1-Cdc25A の経路阻害に必須の役割を担っている Chk1-S296 の自己リン酸化を抑制していた。Chk1 特異的 siRNA を用いて Chk1 をノックダウンし、GEM + S-1 の効果に与える影響について検討した結果、やはり Bcl-2 の発現量が大きく低下し、アポトーシス誘導が増加していた。Figure 20 に GEM + S-1 による細胞周期 S 期遅延 (A) と prexasertib + GEM + S-1 によるアポトーシスの誘導 (B) の作用機序を示した。prexasertib は膵臓がんに対して標準的薬剤である GEM や S-1 の効果を高める有用な薬剤となりうる可能性を示した。

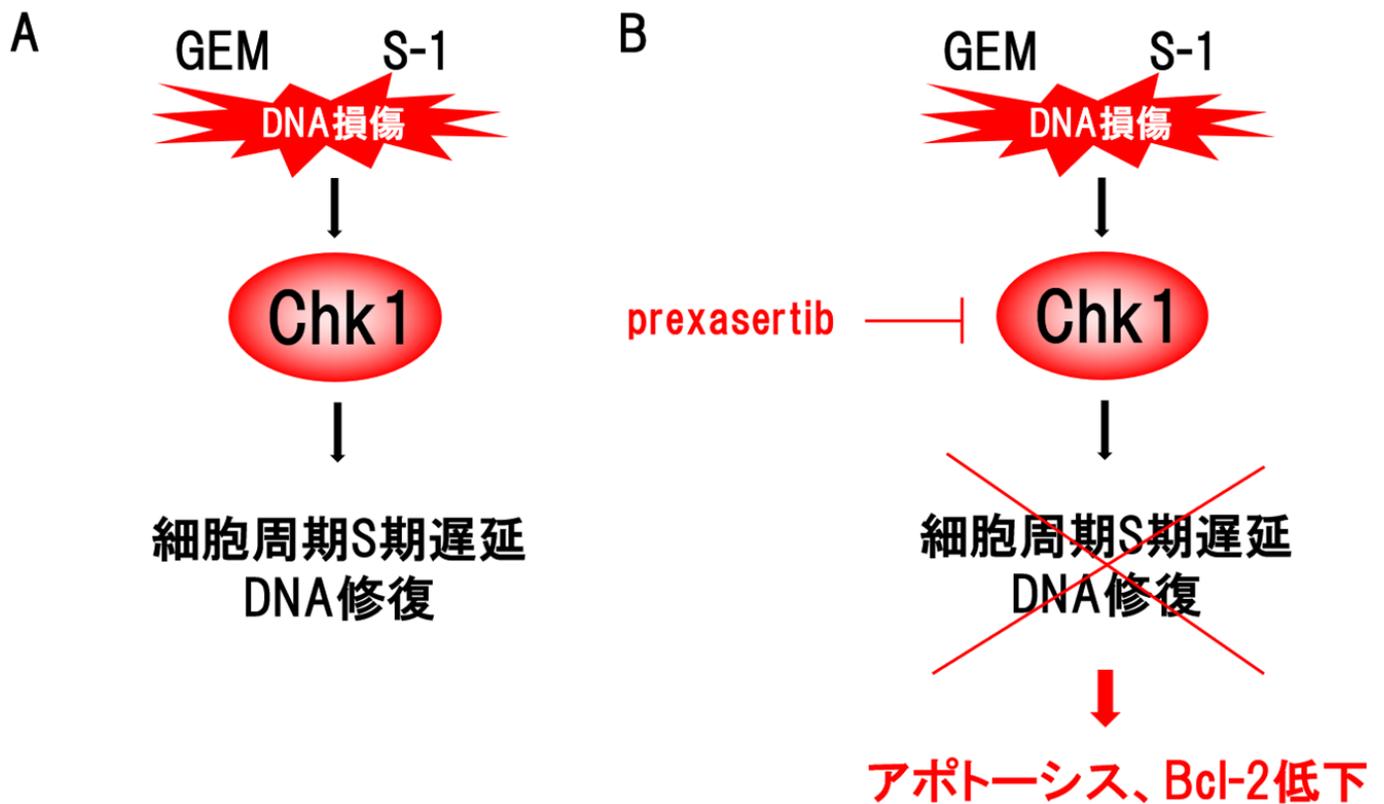


Figure 20. GEM + S-1 による細胞周期 S 期遅延 (A) と prexasertib + GEM + S-1 によるアポトーシスの誘導 (B) の機序

第Ⅲ章では近年創薬のターゲットとなっている Bcl-2 について注目し、さらに効果的な治療法を模索した。選択的 Bcl-2 阻害剤の venetoclax (ABT-199) と非選択的 Bcl-2 阻害剤の navitoclax (ABT-263) を用いて GEM、S-1、prexasertib とそれぞれを組み合わせる検討を行った。ヒト膵臓がん細胞株 SUIT-2 で検討した結果、prexasertib と navitoclax は相乗効果を示していた。別のヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 と BxPC-3 についても検討を行った結果、BxPC-3 でも SUIT-2 と同様の傾向を認めたが MIA PaCa-2 では高い併用効果を認めなかった。細胞死を検討した結果、prexasertib と navitoclax の併用はアポトーシスをより強く誘導していた。navitoclax の細胞増殖抑制効果は Bcl-2 もしくは Bcl-xL に依存しているため、Bcl-2 と Bcl-xL 遺伝子をそれぞれ siRNA にてノックダウンし、prexasertib の細胞増殖抑制効果への影響を解析した。期待された結果とは異なり、Bcl-2 のノックダウンと

prexasertib 処理でアポトーシスの誘導は増加しなかった。しかし Bcl-xL のノックダウンと prexasertib 処理では prexasertib の用量依存的にアポトーシスが増加していた。prexasertib と navitoclax の相乗効果の機序は prexasertib の Chk1 阻害による DNA 修復阻害と navitoclax による Bcl-xL 阻害によるアポトーシスの誘導と示唆された (Figure 21)。更に venetoclax、navitoclax、prexasertib のそれぞれの細胞株に対する効果の差が内因性の Bcl-2、Bcl-xL、Chk1 の発現量の差と関連があるかどうかを検討した。他のがん種の細胞株と膵臓がん細胞株の Bcl-2 ファミリーの内因性発現量を比較するために Bcl-2 が多く発現していると予測でき、venetoclax の効果が臨床でも証明されている白血病の細胞株 HL-60 も加えて検討を行った。それぞれの細胞株の Bcl-2 を Western blotting で検出した結果、全ての膵臓がん細胞株の Bcl-2 の発現量は HL-60 と比較して極めて低かった。しかし Bcl-xL の発現量は全ての膵臓がん細胞株で HL-60 と比較して高かった。また、MIA PaCa-2 は Chk1 の発現量が他の細胞株と比較して有意に低かったことから、これが prexasertib の効果が低いことと関連していることが考えられた。これらの結果は効果予測バイオマーカーとして臨床で有用な情報となりうる。近年がん化学療法は個別化され、個々の患者により効果が期待できる薬剤を選択して投与することが求められている。Chk1 阻害剤 や Bcl-xL 阻害剤においても、腫瘍組織での Chk1 や Bcl-xL のタンパク質発現量が効果予測バイオマーカーとして臨床現場において免疫染色で測定され、患者を選択できるようになることが期待される。将来的にこれらの効果予測バイオマーカーの簡易的測定キット開発やリキッドバイオプシーの開発も望まれる。

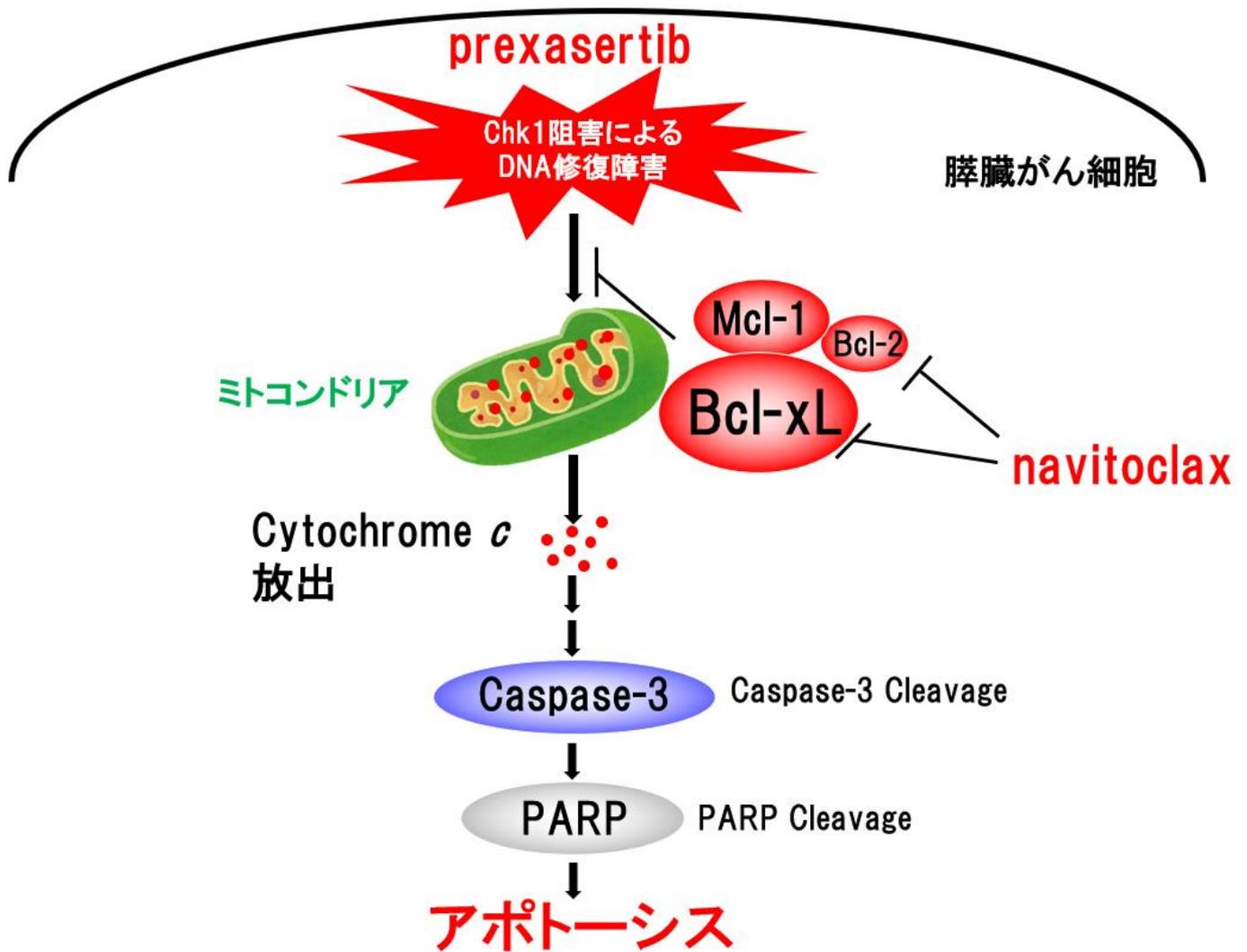


Figure 21. prexasertib と navitoclax による相乗効果の機序

次世代シーケンサーを用いたがん遺伝子異常スクリーニングプロジェクト (SCRUM-Japan) による報告では日本の膵臓がん患者に *KRAS*、*TP53* が高頻度で変異している<sup>72)</sup>。変異 RAS は DNA 複製ストレスを過剰に引き起こし、ATR/Chk1/Cdc25A 経路の DNA 損傷チェックポイント機構を活性化させ、DNA 損傷を軽減させることが報告されている<sup>73)</sup>。そこで Chk1 阻害剤と DNA に損傷を与える抗がん剤等を併用することで、変異 *KRAS* が過剰に活性化を引き起こす DNA 損傷修復機構を阻害し、有効な治療法となることが期待される。また膵臓がんは *TP53* が変異していることが多いため、ATM/Chk2/p53 経路が欠損しており、Chk1 阻害剤がアポトーシスをがん細胞で選択的かつ効率的に

誘導できることが期待される。さらに、膵臓がんに対して Chk1 阻害剤と効果的な併用療法の開発が期待される。

本検討により膵臓がんに対する標準的薬物治療法である GEM と S-1 の併用療法の耐性機序として Chk1 の活性化が明らかとなり、Chk1 をターゲットとした阻害剤を併用する効果的な併用療法を示した。さらに、その併用療法の詳細なメカニズムを検討し、Bcl-2 ファミリーに着目した結果、Chk1 と Bcl-xL を同時に阻害する新たな治療法の可能性を示した。

## 謝 辞

本論文の主査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 薬物治療学研究室 水谷顕洋教授に謹んで深謝の意を表します。本論文の副査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 生化学研究室 伊東進教授および昭和薬科大学 薬理学研究室 渡邊泰男教授に謹んで深謝の意を表します。

本研究の遂行および本論文の作成に懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 臨床薬学教育研究センター 応用薬物治療部門 増田豊教授に深甚なる謝意を表すとともに、深く御礼申し上げます。

研究を進めていく上で、実験技術に関して多くの助言を頂きました臨床薬学教育研究センター 地域医療部門 高田公彦准教授に深く感謝致します。

本研究に際し、建設的な御指導、御助言、御校閲を頂きました昭和薬科大学 臨床薬学教育研究センター 応用薬物治療部門 濱本知之教授、実践薬学部門 渡部一宏教授、応用薬物治療部門 高木彰紀助教に深く感謝致します。

また、本研究の計画と遂行に多大なるご助言を頂き、公私に渡り支えて下さいました北里研究所病院研究部 竹内修先生に深く感謝申し上げます。

最後に、日頃よりご指導頂き、研究活動に理解を示し支えてくれた昭和薬科大学 臨床薬学教育研究センター 実践薬学部門 廣原正宜教授、廣澤伊織講師、神林弾助教、山本健助教に心より感謝致します。

## 参考文献

- 1) Okusaka T, Furuse J. Recent advances in chemotherapy for pancreatic cancer: evidence from Japan and recommendations in guidelines. *Journal of Gastroenterology*, **55**, 369-382, 2020.
- 2) Sharma C, Eltawil KM, Renfrew PD, Walsh MJ, Molinari M. Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990-2010, *World Journal of Gastroenterology*, **17**, 867-897, 2011.
- 3) Ohmoto A, Yachida S, Morizane C. Genomic Features and Clinical Management of Patients with Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 561, 2019.
- 4) Burris HA, Moore MJ, Anderson J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer : A randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, **15**, 2403-2413, 1997.
- 5) Shirasaka T, Shimamoto Y, Ohshimo H, Yamaguchi M, Kato T, Yonekura K, Fukushima M. Development of a novel form of an oral 5-fluorouracil derivative (S-1) directed to the potentiation of the tumor selective cytotoxicity of 5-fluorouracil by two biochemical modulators. *Anti-cancer Drugs*, **7**, 548-557, 1996.
- 6) Tatsumi K, Fukushima M, Shirasaka T, Fujii S. Inhibitory effects of pyrimidine, barbituric acid and pyridine derivatives on 5-fluorouracil degradation in rat liver extracts. *Japanese Journal of Cancer Research*, **78**, 748-755, 1987.
- 7) Shirasaka T, Shimamoto Y, Fukushima M. Inhibition by oxonic acid of gastrointestinal toxicity of 5-fluorouracil without loss of its antitumor activity in rats. *Cancer Research*, **53**, 4004-4009, 1993.
- 8) Sasako M, Sakuramoto S, Katai H, Kinoshita T, Furukawa H, Yamaguchi T,

- Nashimoto A, Fujii M, Nakajima T, Ohashi Y. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 4387-4393, 2011.
- 9) Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M, Miyashita K, Nishizaki T, Kobayashi O, Takiyama W, Toh Y, Nagaie T, Takagi S, Yamamura Y, Yanaoka K, Orita H, Takeuchi M. S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncology*, **9**, 215-221, 2008.
- 10) Ohtsu A, Baba H, Sakata Y, Mitachi Y, Horikoshi N, Sugimachi K, Taguchi T: Phase II study of S-1, a novel oral fluoropyrimidine derivative, in patients with metastatic colorectal carcinoma. S-1 Cooperative Colorectal Carcinoma Study Group. *British Journal of Cancer*, **83**, 141-145, 2000.
- 11) Okamoto I, Yoshioka H, Morita S, Ando M, Takeda K, Seto T, Yamamoto N, Saka H, Asami K, Hirashima T, Kudoh S, Satouchi M, Ikeda N, Iwamoto Y, Sawa T, Miyazaki M, Tamura K, Kurata T, Fukuoka M, Nakagawa K. Phase III trial comparing oral S-1 plus carboplatin with paclitaxel plus carboplatin in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a west Japan oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 5240-5246, 2010.
- 12) Kubota K, Sakai H, Katakami N, Nishio M, Inoue A, Okamoto H, Isobe H, Kunitoh H, Takiguchi Y, Kobayashi K, et al. A randomized phase III trial of oral S-1 plus cisplatin versus docetaxel plus cisplatin in Japanese patients with advanced non-small-cell lung cancer: TCOG0701 CATS trial. *Annals Oncology*, **26**, 1401-1408, 2015.
- 13) Ueno H, Ioka T, Ikeda M, Ohkawa S, Yanagimoto H, Boku N, Fukutomi A, Sugimori K, Baba H, Yamao K, et al. Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally

- advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. *Journal of Clinical Oncology*, **31**, 1640-1648, 2013.
- 14) Yoshizawa J, Takizawa A, Takeuchi O, Hiraku O, Sasaki K, Morimoto Y, Atsuda K, Inoue G, Suzuki Y, Asanuma F, et al. Experimental study of combination therapy with S-1 against pancreatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **64**, 1211-1219, 2009.
  - 15) Hirata K, Horikoshi N, Aiba K, Okazaki M, Denno R, Sasaki K, Nakano Y, Ishizuka H, Yamada Y, Uno S, et al: Pharmacokinetic study of S-1, a novel oral fluorouracil antitumor drug. *Clinical Cancer Research*, **5**, 2000-2005, 1999.
  - 16) Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **298**, 865-872, 2001.
  - 17) Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, **432**, 316-323, 2004
  - 18) Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Rosenberg SH, Zhang H. A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation. *Oncogene*, **24**, 1403-1411, 2005.
  - 19) Goto H, Izawa I, Li P, Inagaki M. Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Science*, **103**, 1195-1200, 2012.
  - 20) Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Klöppel G, Kalthoff H, et al. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. *Virchows Arch*, **439**, 798-802, 2001.
  - 21) Magné N, Fischel JL, Tiffon C, Formento P, Dubreuil A, Renée N, Formento JL, Francoual M, Ciccolini J, Etienne MC, Milano G. Molecular mechanisms underlying the interaction between ZD1839 ('Iressa') and cisplatin/5-fluorouracil. *British Journal of Cancer*, **89**, 585-592, 2003.
  - 22) Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A.

- Role of the SCF<sup>Skp2</sup> ubiquitin ligase in the degradation of p21<sup>Cip1</sup> in S phase. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 25752-25757, 2003.
- 23) Auld CA, Fernandes KM, Morrison RF. Skp2-mediated p27(Kip1) degradation during S/G2 phase progression of adipocyte hyperplasia. *Journal of Cellular Physiology*, **211**, 101-111, 2007.
- 24) Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Ardelt B, Traganos F. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry*, **25**, 1-13, 1996.
- 25) Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, **39**, 425-435, 2010.
- 26) Kurata N, Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Mahawithitwong P, Sakai H, Onimaru M, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M. Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by quantifying the expression levels of genes associated with the metabolism of gemcitabine and 5-fluorouracil. *International Journal of Oncology*, **39**, 473-482, 2011.
- 27) Parsels LA, Morgan MA, Tanska DM, Parsels JD, Palmer BD, Booth RJ, Denny WA, Canman CE, Kraker AJ, Lawrence TS, et al. Gemcitabine sensitization by checkpoint kinase 1 inhibition correlates with inhibition of a Rad51 DNA damage response in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Therapy*, **8**, 45-54, 2009.
- 28) Dent P, Tang Y, Yacoub A, Dai Y, Fisher PB and Grant S: CHK1 inhibitors in combination chemotherapy: thinking beyond the cell cycle. *Molecular Intervention*, **11**, 133-140, 2011.
- 29) Webster JA, Tibes R, Morris L, Blackford AL, Litzow M, Patnaik M, Rosner GL, Gojo I, Kinders R, Wang L, et al. Randomized phase II trial of cytosine arabinoside with and without the CHK1 inhibitor MK-8776 in relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, **61**, 108-116, 2017.
- 30) Sausville E, Lorusso P, Carducci M, Carter J, Quinn MF, Malburg L, Azad N,

- Cosgrove D, Knight R, Barker P, et al. Phase I dose-escalation study of AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with gemcitabine in US patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **73**, 539-549, 2014.
- 31) King C, Diaz HB, McNeely S, Barnard D, Dempsey J, Blosser W, Beckmann R, Barda D Marshall MS. LY2606368 causes replication catastrophe and antitumor effects through CHK1-dependent mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics*, **14**, 2004-2013, 2015.
- 32) Lee JM, Nair J, Zimmer A, Lipkowitz S, Annunziata CM, Merino MJ, Swisher EM, Harrell MI, Trepel JB, Lee MJ, et al. Prexasertib, a cell cycle checkpoint kinase 1 and 2 inhibitor, in BRCA wild-type recurrent high-grade serous ovarian cancer: a first-in-class proof-of-concept phase 2 study. *Lancet Oncology*, **19**, 207-215, 2018.
- 33) Hong DS, Moore K, Patel M, Grant SC, Burris HA 3rd, William WN Jr, Jones S, Meric-Bernstam F, Infante J, Golden L, et al. Evaluation of prexasertib, a checkpoint kinase 1 inhibitor, in a phase Ib study of patients with squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **24**, 3263-3272, 2018.
- 34) Brill E, Yokoyama T, Nair J, Yu M, Ahn YR, Lee JM. Prexasertib, a cell cycle checkpoint kinases 1 and 2 inhibitor, increases in vitro toxicity of PARP inhibition by preventing Rad51 foci formation in BRCA wild type high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*, **8**, 111026-111040, 2017.
- 35) Ghelli Luserna Di Rorà A, Iacobucci I, Imbrogno E, Papayannidis C, Derenzini E, Ferrari A, Guadagnuolo V, Robustelli V, Parisi S, Sartor C, et al. Prexasertib, a Chk1/Chk2 inhibitor, increases the effectiveness of conventional therapy in B-/T- cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*, **7**, 53377-53391, 2016.
- 36) Zeng L, Beggs RR, Cooper TS, Weaver AN, Yang ES. Combining Chk1/2 inhibition with Cetuximab and radiation enhances in vitro and in vivo

- cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, **16**, 591-600, 2017.
- 37) Lowery CD, VanWye AB, Dowless M, Blosser W, Falcon BL, Stewart J, Stephens J, Beckmann RP, Bence Lin A, Stancato LF. The checkpoint kinase 1 inhibitor prexasertib induces regression of preclinical models of human neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, **23**, 4354-4363, 2017.
- 38) Okita N, Minato S, Ohmi E, Tanuma S, Higami Y. DNA damage induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. *FEBS Letters*, **586**, 3974-3979, 2012.
- 39) Barnard D, Diaz HB, Burke T, Donoho G, Beckmann R, Jones B, Barda D, King C, Marshall M. LY2603618, a selective CHK1 inhibitor, enhances the anti-tumor effect of gemcitabine in xenograft tumor models. *Investigation New Drugs*, **34**, 49-60, 2016.
- 40) Montano R, Thompson R, Chung I, Hou H, Khan N, Eastman A. Sensitization of human cancer cells to gemcitabine by the Chk1 inhibitor MK-8776: cell cycle perturbation and impact of administration schedule in vitro and in vivo. *BMC Cancer*, **21**, 604, 2013.
- 41) Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, Tuul M, Sakasai R, Yoshinaga K, Saeki H, Morita M, Kakeji Y, Gillespie DA, et al. ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. *DNA Repair (Amst)*, **11**, 247-258, 2012.
- 42) Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132, 1997.
- 43) Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, Owen C, Gerecitano J, Robak T, De la Serna J, et al. Venetoclax-Rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **378**, 1107-1120, 2018.

- 44) Dong J, Zhao YP, Zhou L, Zhang TP, Chen G. Bcl-2 upregulation induced by miR-21 via a direct interaction is associated with apoptosis and chemoresistance in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Archives of Medical Research*, **42**, 8-14, 2011.
- 45) Hakata S, Terashima J, Shimoyama Y, Okada K, Fujioka S, Ito E, Habano W, Ozawa S. Differential sensitization of two human colon cancer cell lines to the antitumor effects of irinotecan combined with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncology Letters*, **15**, 4641-4648, 2018.
- 46) Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, **89**, 289-317, 2015.
- 47) Wang T, Yang Z, Zhang Y, Zhang X, Wang L, Zhang S, Jia L. Caspase cleavage of Mcl-1 impairs its anti-apoptotic activity and proteasomal degradation in non-small lung cancer cells. *Apoptosis*, **23**, 54-64, 2018.
- 48) Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M, Nakayama K. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1<sup>-/-</sup> mice. *Genes and Development*, **14**, 1439-1447, 2000.
- 49) Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*, **364**, 1817-1825, 2011.
- 50) Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, **369**, 1691-1703, 2013.
- 51) Motoi F, Ishida K, Fujishima F, Ottomo S, Oikawa M, Okada T, Shimamura H, Takemura S, Ono F, Akada M, et al. Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and S-1 for resectable and borderline pancreatic ductal

- adenocarcinoma: results from a prospective multi-institutional phase 2 trial. *Annals of Surgical Oncology*, **20**, 3794-3801, 2013.
- 52) Ishii H, Yamashita N, Ueno M, Ohkawa S, Saito AM, Sekimoto M. A randomised controlled trial of gemcitabine hydrochloride plus S-1 combination therapy versus gemcitabine hydrochloride therapy alone in pancreatic cancer patients aged  $\geq 75$  years: a study protocol for an open-label randomised feasibility study. *BMJ Open Gastroenterology* **5**, e000187, 2018.
- 53) Mizusawa J, Morizane C, Okusaka T, Katayama H, Ishii H, Fukuda H, Furuse J. Hepatobiliary and Pancreatic Oncology Group of the Japan Clinical Oncology Group. Randomized Phase III study of gemcitabine plus S-1 versus gemcitabine plus cisplatin in advanced biliary tract cancer: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG1113, FUGA-BT). *Journal of Clinical Oncology*, **46**, 385-388, 2016.
- 54) Scagliotti G, Kang JH, Smith D, Rosenberg R, Park K, Kim SW, Su WC, Boyd TE, Richards DA, Novello S, et al. Phase II evaluation of LY2603618, a first-generation CHK1 inhibitor, in combination with pemetrexed in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Investigation New Drugs*, **34**, 625-635, 2016.
- 55) Laquente B, Lopez-Martin J, Richards D, Illerhaus G, Chang DZ, Kim G, Stella P, Richel D, Szczylik C, Cascinu S, et al. A phase II study to evaluate LY2603618 in combination with gemcitabine in pancreatic cancer patients. *BMC Cancer*, **17**, 137, 2017.
- 56) Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **26**, 1324-1337, 2007.
- 57) Doerflinger M, Glab JA, Puthalakath H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *FEBS Journal*, **282**, 1006-1016, 2015.
- 58) Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, DaytonBD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, et al. ABT-199, a potent

- andselective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, **19**, 202–208, 2013.
- 59) Cramer P, von Tresckow J, Bahlo J, Robrecht S, Langerbeins P, Al-Sawaf O, Engelke A, Fink AM, Fischer K, Tausch E, et al. Bendamustine followed by obinutuzumab and venetoclax in chronic lymphocytic leukaemia (CLL2-BAG): primary endpoint analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncology*, **19**, 1215–1228, 2018.
- 60) Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Research*, **68**, 3421–3428, 2008.
- 61) Suvarna V, Singh V, Murahari M. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, **862**, 172655, 2019.
- 62) Ko TK, Chuah CT, Huang JW, Ng KP, Ong ST. The BCL2 inhibitor ABT-199 significantly enhances imatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia progenitors. *Oncotarget*, **5**, 9033–9038, 2014.
- 63) Moreau P, Chanan-Khan A, Roberts AW, Agarwal AB, Facon T, Kumar S, Touzeau C, Punnoose EA, Cordero J, Munasinghe W, et al. Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood*, **130**, 2392–2400, 2017.
- 64) Takahashi H, Chen MC, Pham H, Matsuo Y, Ishiguro H, Reber HA, Takeyama H, Hines OJ, Eibl G. Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1833**, 2980–2987, 2013.
- 65) Miyamoto Y, Hosotani R, Wada M, Lee JU, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Kato M, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 expression in pancreatic cancers. *Oncology*, **56**, 73–82, 1999.

- 66) Song T, Zhang M, Liu T, Xue Z, Fan Y, Zhang Z. Identification of JNK1 as a predicting biomarker for ABT-199 and paclitaxel combination treatment. *Biochemical Pharmacology*, **155**, 102-109, 2018.
- 67) Angius G, Tomao S, Stati V, Vici P, Bianco V, Tomao F. Prexasertib, a checkpoint kinase inhibitor: from preclinical data to clinical development. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **85**, 9–20, 2019.
- 68) Zhao J, Niu X, Li X, Edwards J, Wang G, Wang Y, Taub JW, Lin H, Ge Y. Inhibition of CHK1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, **7**, 34785–34799, 2016.
- 69) Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, Hua M, Qiao J, White MJ, Josefsson EC, Alwis I, Ono A, Willcox A, et al. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood*, **118**, 1663–1674, 2011.
- 70) Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, LaCasce AS, Gerecitano JF, Leonard JP, Tulpule A, Dunleavy K, Xiong H, Chiu YL, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncology*, **11**, 1149–1159, 2010.
- 71) Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong SS, Sriuranpong V, Chao TY, Nakagawa K, Chu DT, Saijo N, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 2866-2874, 2011.
- 72) Nakamura Y, Taniguchi H, Ikeda M, Bando H, Kato K, Morizane C, Esaki T, Komatsu Y, Kawamoto Y, Takahashi N, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA sequencing in advanced gastrointestinal cancer: SCRUM-Japan

GI-SCREEN and GOZILA studies *Nature Medicine*, **5**, doi:  
10.1038/s41591-020-1063-5.

- 73) Grabocka E, Commisso C, Bar-Sagi D. Molecular pathways: targeting the dependence of mutant RAS cancers on the DNA damage response. *Clinical Cancer Research*, **21**, 1243-1247, 2015.