

食道がん細胞における  
抗がん薬感受性に対するオラパリブによる増強効果に関する研究

2019 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

【薬学】臨床薬学分野

宮本 恵輔



本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社より許可を得ている。

1. Keisuke Miyamoto, Tetsuya Minegaki, Mami Tanahashi, Ayaka Yamamoto, Yumi Moriyama, Akari Wada, Ayaka Matsumoto, Keisuke Ota, Mai Tanaka, Utako Masuda, Masayuki Tsujimoto, Kohshi Nishiguchi. Synergistic Effects of Olaparib and DNA-damaging Agents in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 1813-1820. [第1章, 第2章]

## 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程  
氏名 (英字名) : 宮本恵輔 (Keisuke Miyamoto)  
学位論文題目 : 食道がん細胞における抗がん薬感受性に対するオラパリブによる増強効果に関する研究

### 序章

本邦において、食道がん患者の5年生存率は他の消化器がんと比較して低く、また多くの食道がん患者において診断時に既のがんの浸潤・転移が認められている。そのため、食道がんの治療には、全身的な治療が可能であるがん化学療法を欠かすことができない。食道がん化学療法の一次療法として、主に5-フルオロウラシル (5-FU) 及びシスプラチン (CDDP) を用いたFP療法が実施されており、奏効率は60%と比較的高い。しかしながら、一次療法に対して不応性を示す患者が一定数存在すること、さらには二次療法以降に有効な薬剤に乏しいことが、食道がんの治療における問題点である。

オラパリブは、DNA 損傷応答を促進するポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) 1 を標的とした分子標的薬であり、乳がん感受性遺伝子1または2 (*BRCA1/2*) に変異を有する卵巣がん及び乳がんの治療に単剤での使用が認められている。食道がんの場合、*in vitro* では細胞増殖阻害作用が認められているものの、*BRCA1/2* に変異を有する患者の割合が数%とわずかであるため、PARP 阻害薬単剤処置による治療への応用に向けた検討はほとんどなされていない。一方、オラパリブは、*BRCA1/2* 変異を問わず卵巣がん患者の抗がん薬治療に追加されることで無増悪生存期間を有意に延長させることから、食道がんにおいても既存の抗がん薬との組み合わせにより治療効果を向上させる可能性が考えられる。しかしながら、食道がん細胞において、オラパリブが既存の抗がん薬による細胞増殖阻害作用に対してどのような影響を及ぼすのかは、未だ不明である。

そこで本研究では、食道がんの治療においてオラパリブと組み合わせるべき既存の抗がん薬に関する情報を得る目的で、食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響について基礎的検討を実施した。

### 第1章 食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響

食道がん細胞 KYSE70 (*BRCA1/2* 野生型) 及び KYSE140 細胞 (*BRCA1* 変異型) を用いて、抗がん薬の感受性に及ぼすオラパリブの影響を検討した。抗がん薬として、既存の代表的な抗がん薬である CDDP、イリノテカンの活性代謝物である SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセルを選択した。オラパリブは、2種類の食道がん細胞に対して、単剤の処置により細胞増殖阻害作用を示し、特に KYSE140 細胞において高い感受性が認められた。また、オラパリブは、使用した6種類の抗がん薬の細胞増殖阻害曲線をそれぞれ低濃度側へシフトさせ、特に CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの50%増殖阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) 値を大きく低下させた。さらに、これら4種の抗がん薬による細胞増殖阻害作用は、*BRCA1/2* 野生型の KYSE70 細胞においてオラパリブにより相乗的に増強されることが認められた。一方、*BRCA1* 変異を有する KYSE140 細胞においては、オラパリブによる CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する相乗的な感受性増強効果は認められなかった。次に、KYSE70 細胞において、抗がん薬によるコロニー形成阻害作用に及ぼすオラパリブの影響を検討した。オラパリブは、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドのそれぞれによ

るコロニー形成阻害作用をいずれも顕著に増強させた。さらに、これら抗がん薬によるコロニー形成阻害作用は、オラパリブによって相乗的に増強されることが示された。なお、オラパリブは、5-FU 及びドセタキセルのコロニー形成阻害作用を増強したものの、その作用は相加的であった。したがって、オラパリブは、食道がん細胞において DNA 損傷を誘導する抗がん薬である CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの感受性を増強し、その作用は *BRCA1* 変異型の KYSE140 細胞ではなく *BRCA1/2* 野生型の KYSE70 細胞において相乗的であることが明らかとなった。

## 第2章 *BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる DNA 損傷応答を介した抗がん薬感受性の増強機序の解明

*BRCA1/2* 野生型である KYSE70 細胞において、オラパリブによる抗がん薬感受性増強効果に関する機序を明らかにする目的で、PARP1 が関連する DNA 損傷応答に着目した検討を実施した。*BRCA1/2* 野生型である KYSE70 細胞において、PARP1 活性化の指標となるタンパク質のポリ ADP リボース化 (PAR) が、抗がん薬 (CDDP、SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセル) 処置の有無に関わらず認められた。また、オラパリブは、いずれの条件下においても PAR をほぼ完全に抑制した。次に、KYSE70 細胞において、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドは、DNA 損傷が生じていることを示す指標となる核内リン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX) の集積を誘導した。また、オラパリブは、これら 4 種類の抗がん薬が誘導する核内 $\gamma$ H2AX の集積量を有意に増大させた。しかしながら、5-FU 及びドセタキセルの場合には、オラパリブの共存による核内 $\gamma$ H2AX の集積量の増大は認められず、それはオラパリブ単独処置時とほぼ同等であった。これらの結果は、KYSE70 細胞における CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性の相乗的増強効果が、オラパリブによる PARP1 活性の阻害に基づいた DNA 損傷の増大に起因していることを示唆している。一方、オラパリブは、*BRCA1/2* 変異型のがん細胞において DNA 修復エラー頻度が高い古典的非相同末端結合を亢進させることで細胞における染色体異常を蓄積し、細胞毒性を誘導することが知られている。そこで、*BRCA1/2* 野生型である KYSE70 細胞におけるオラパリブによる抗がん薬に対する感受性の相乗的増強効果への古典的非相同末端結合の関与について確認することとした。古典的非相同末端結合の主要な因子である DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) に対する阻害薬である NU7441 は、KYSE70 細胞におけるオラパリブと抗がん薬による細胞増殖阻害作用を減弱させなかった。この結果は、*BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる抗がん薬感受性の相乗的増強効果に古典的非相同末端結合が寄与しない可能性を示している。

したがって、*BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞において、オラパリブは PARP1 活性を阻害することで CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対して相乗的増強効果を誘導し、その機序は DNA 損傷の増大に起因する可能性を明らかとした。

### 総括

本研究では、*BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞において、オラパリブが CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性を DNA 損傷の増大に起因して相乗的に増強する可能性を明らかにした。本知見は、食道がん細胞において、オラパリブが感受性を増強させる抗がん薬の特徴を明確にするものであり、オラパリブなどの PARP 阻害薬を用いた食道がん化学療法構築のための基礎的な知見になると考えられる。

## 目次

序論.....	1
第1章 食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響.....	6
第1節 緒言.....	6
第2節 実験方法.....	8
第3節 結果.....	13
第4節 考察.....	26
第5節 小括.....	29
第2章 <i>BRCAl/2</i> 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる DNA 損傷応答を介した 抗がん薬感受性の増強機序の解明.....	30
第1節 緒言.....	30
第2節 実験方法.....	31
第3節 結果.....	36
第4節 考察.....	43
第5節 小括.....	45
総括.....	46
謝辞.....	47
引用文献.....	48

## 略語一覧

5-FU	5-フルオロウラシル (5- fluorouracil)
53BP1	p53 結合タンパク質 1 (p53-binding protein 1)
AKT	RAC- $\alpha$ セリン/スレオニンプロテインキナーゼ (RAC- $\alpha$ serine/threonine-specific protein kinase )
BRCA	乳がん感受性遺伝子 (breast cancer susceptibility gene)
BCRP	乳がん耐性タンパク質 (breast cancer resistance protein)
CDDP	シスプラチン (cisplatin)
CI	Combination Index
D-MEM	ダルベッコ改変イーグル培地 (dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)
DNA-PK	DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-dependent protein kinase)
EGFR	ヒト上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor)
EXP	期待値 (expected value)
FBS	ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum)
FDA	アメリカ食品医薬品局 (food and drug administration)
IC <sub>50</sub>	50%細胞増殖阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration)
mTOR	ラパマイシン標的タンパク質 (mammalian target of rapamycin)
PAR	ポリ ADP リボース化 (Poly ADP-ribosylation)
PARP	ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (poly (ADP-ribose) polymerase)
PBS	リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline)
P-gp	P 糖タンパク質 (P-glycoprotein)
R.S.	相対感度 (relative sensitivity)
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate)
S.E.	標準誤差 (standard error)
SN-38	7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン (7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin)
VEGF	血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor)
$\gamma$ H2AX	リン酸化ヒストン H2AX (phosphorylated histone H2AX)



## 序論

がんとは、細胞増殖を抑制するがん抑制遺伝子の欠失並びに過剰な増殖能を促進する遺伝子変異及び染色体領域の増幅により、細胞分裂の抑制機能が破綻し細胞が無秩序な増殖能を獲得した状態を示す。細胞における遺伝子異常は、一般的な生活環境において生じる紫外線暴露、炎症及び酸化ストレスなどによる DNA 損傷が誘発される。がん細胞は、その損傷を修復する際に誘発される DNA 修復エラーにより遺伝子異常が蓄積し、多段階的に無秩序な増殖能を獲得すると考えられている<sup>1-2)</sup>。このように細胞の DNA 修復機構は、非常に低い頻度ではあるものの、正常な遺伝子において塩基の挿入や欠失、または染色体領域の欠失や増幅を引き起こし、遺伝子異常を蓄積する。そのため、平均寿命が延長した現代社会では、長寿に伴い遺伝子異常が蓄積する可能性が高くなるため、がんを罹患するリスクが増大する<sup>3)</sup>。以上のような背景をもとにがんは、脳血管疾患及び心血管疾患に次いで全人類の主要な死因となっている<sup>4)</sup>。2012 年には、全世界でがんによる年間 1400 万人が罹患している<sup>5)</sup>。さらには、今後とも世界の平均寿命が延びることが予想されるため、2030 年には全世界で 2160 万人ががんによる死因となると予想されている<sup>6)</sup>。本邦において、既に 1981 年から死亡原因の第 1 位は、がんである。そして日本人の生涯のうち 2 人に 1 人が罹患し、3 人に 1 人ががんにより死亡するとされている<sup>7)</sup>。すなわちがんは、本邦において誰にでも起こりうるありふれた病気と考えられる。

近年におけるがんの治療成績は、飛躍的に向上しており、がん患者全体の 5 年生存率は 1963 年と 2008 年を比較すると、男性で 29.5%から 58.8%、女性で 50.5%から 66.0%と大幅に改善している<sup>8)</sup>。これは、主にコンピュータ断層撮影や核磁気共鳴画像法を用いたがんの早期発見技術の向上や、5-フルオロウラシル (5-FU)、シスプラチン (CDDP) などを始めとする各種抗がん薬に加え、分子標的治療薬の登場など治療薬の開発によるところが大きい<sup>8)</sup>。本邦におけるがん患者の生存率は (Figure I)<sup>9)</sup>、1993-1996 年診断例から 2006-2008 年診断例において、全

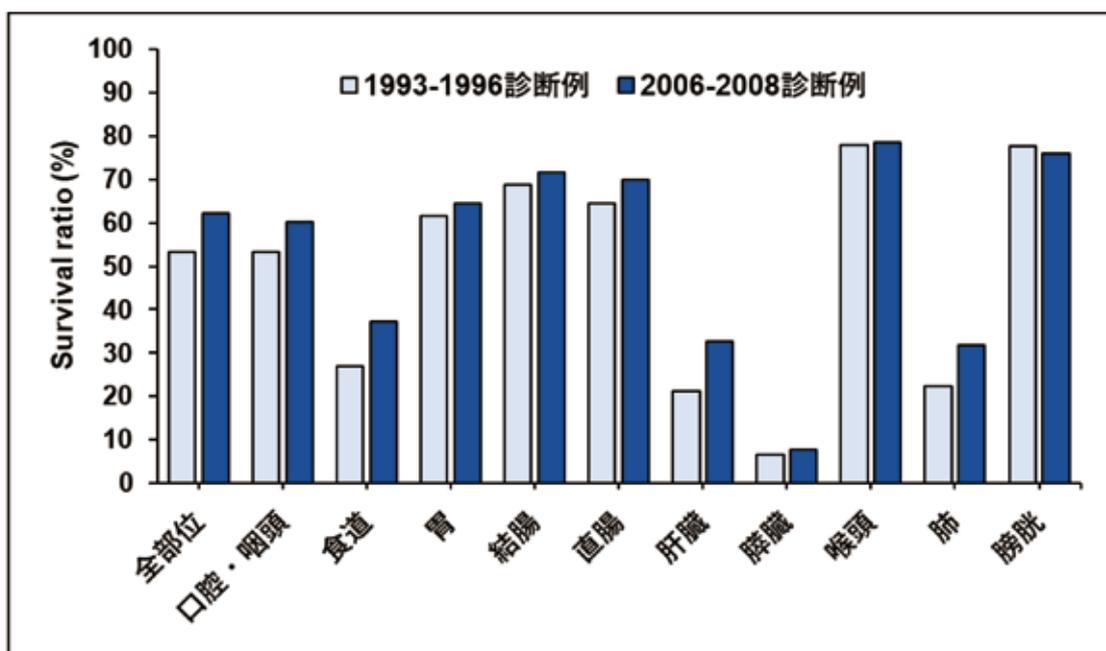


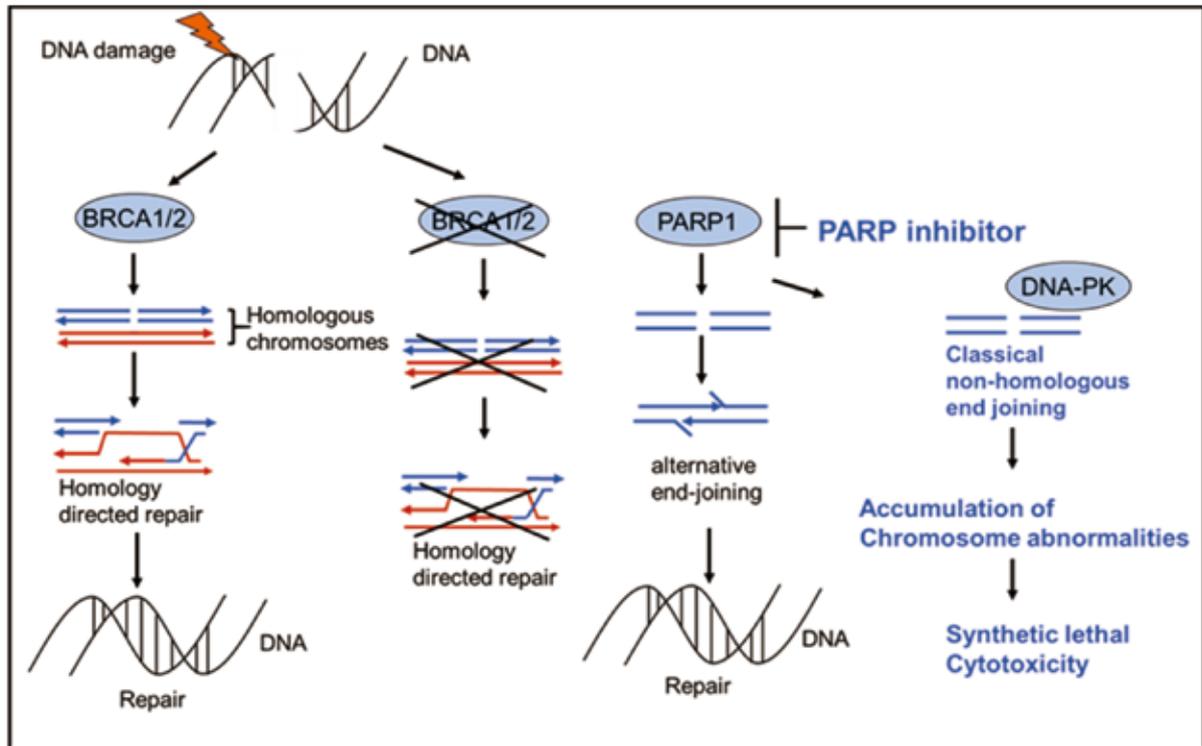
Figure I. Improving cancer survival in Japan<sup>9)</sup>.

部位と比較して低い数値を示すがん種が存在している。具体的には、全部位において 53.2% から 62.1%と生存率が改善したことと比較して、食道では 26.9%から 37.2%、肝臓では 21.2% から 32.6%、すい臓では 6.5%から 7.7%及び肺癌 22.5%から 31.9%と低値を示すがんが見受けられる。このようにがん全体の生存率が高まる一方で、生存率は改善しているものの、他のがんと比較して生存率が低いがん種（食道がん、肝臓がん、すい臓がん及び肺癌）も存在している。食道がんは、本邦においてその罹患率が第 10 位と、患者数は他のがん種と比較して決して多いとは言えない。しかしながら、食道がん患者の 5 年生存率は 36%であり、全がんで 60%以上であることを考慮すれば、食道がんは長期生存が困難ながんの一つと言える<sup>10)</sup>。その要因として、食道がんは初期症状に乏しく早期発見が難しいこと、食道にはリンパ節が数多く存在するため、他の臓器へ転移し易いことなどが考えられる。実際に、食道がん患者の半数以上は、診断時に原発巣から多臓器へと浸潤・転移している<sup>11)</sup>。がん患者の死亡原因の 7 割は、がんの浸潤・転移により生じる臓器機能の障害に起因している<sup>12)</sup>。さらにながんの浸潤・転移は、局所的な治療である外科的切除や放射線治療を適用が困難である場合が多い。すなわち、食道がん患者における生命予後の改善には全身的な治療が重要であり、そのため抗がん薬によるがん化学療法が不可欠な治療となっている。

現在、食道がん化学療法は、一次療法として 5-FU 及び CDDP を用いた FP 療法が用いられており、その奏効率は 60%と高い治療成績を示している<sup>13)</sup>。また、FP 療法にドセタキセルを加えた DCF 療法の臨床開発が進められており、高い治療効果を有する治療法として確立されつつある<sup>14)</sup>。また、これらががん化学療法は、術前がん化学療法として外科的切除と組み合わせることで、食道がん患者の生存期間を延長することも知られており<sup>14-15)</sup>、食道がん治療において標準的に用いられている。しかしながら、一定数の患者が、これらががん化学療法に対し治療抵抗性を示し、さらに治療の過程で薬剤に抵抗性を獲得し治療の継続が困難となる患者も存在する。一般的に、このような治療抵抗性を示す患者に対しては、二次療法として薬剤の変更が試みられる。しかしながら食道がん化学療法において、生存率のより低い膵がん、肺癌、肝臓がんなどと比較して、分子標的薬の臨床開発も進んでいないなど、二次療法に用いられる有効な治療薬が不足している<sup>16)</sup>。近年、免疫チェックポイント阻害薬であるニボルマブ及びペムブロリズマブが進行性食道がんにおいて、既存の二次療法と比較して、全生存期間を延長するなど<sup>17-18)</sup>、新たな治療薬の拡充を目指した臨床試験が進められている。しかしながら、依然として二次療法以降に食道がんで使用できる薬剤の選択肢は少ないため、生存率の向上のためには、有効性を示す新たな治療薬の拡充が今後とも必要である。

ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) 阻害薬の一つであるオラパリブは、乳がん感受性遺伝子 (*BRCA*) 1/2 に変異を有する卵巣がん及び乳がんに対する治療薬として承認された新規分子標的薬である<sup>19-20)</sup>。*BRCA*1/2 は、DNA 二本鎖損傷修復反応の一つである相同組み換え修復を促進するがん抑制遺伝子であり<sup>21)</sup>、その遺伝子変異はオラパリブの感受性を増強する。その詳細な機序を Figure II<sup>22-24)</sup>に示す。通常 *BRCA*1/2 野生型のがん細胞において DNA 二本鎖損傷が誘導されると、*BRCA*1/2 を介した相同性のある染色体を用いた相同組み換え修復が促進され DNA 損傷が修復され細胞は生存する。その一方で、*BRCA*1/2 変異型のがん細胞

においては、相同組み換え修復機能が低下しているため、DNA 損傷が細胞に誘発されると PARP1 依存性の代替的な非相同末端結合が促進される。また、PARP1 タンパク質の発現量及び活性は、野生型のがん細胞と比較して *BRCA1/2* 変異型の細胞において増大している<sup>25, 26)</sup>。すなわち、*BRCA1/2* 変異型の細胞において PARP1 依存的な修復機構が亢進していると考えられる。またオラパリブは、*BRCA1/2* 変異型のがん細胞において PARP1 依存性の DNA 損傷修復経路を阻害することで、代替的に DNA 修復エラー頻度の高い古典的非相同末端結合を促



**Figure II. Synthetic lethal of PARP inhibitor in BRCA mutation cancer cells<sup>22-24)</sup>.**

Abbreviations: PARP, Poly (ADP-ribose) polymerase; BRCA, Breast cancer susceptibility gene; DNA-PK, DNA-dependent protein kinase.

進させ、細胞に染色体異常を蓄積し、synthetic lethal cytotoxicity すなわち合成致死性の細胞毒性を誘導する。オラパリブは、乳がんや卵巣がんだけでなく、臨床試験第III相 POLO 試験<sup>27)</sup> 及び PROfound 試験<sup>28)</sup> において、*BRCA1/2* 変異を有するすい臓がん及び前立腺がん患者における無増悪生存期間をそれぞれ延長することが報告されている。さらに、他の PARP 阻害薬 (ベリパリブ、タラゾパリブ、ルカパリブ及びニラパリブ) も *BRCA1/2* 変異を有する卵巣がんや *BRCA1/2* 変異かつ HER2 陰性の乳がんに対して臨床開発が進められ、アメリカ食品医薬品局 (FDA) に承認されている (Table I)。その一方で、PARP 阻害薬は、*BRCA1/2* 変異に限らず、他の相同組み換え修復機能低下に繋がる遺伝子異常 (*HDRness*) を有するがん細胞において高い感受性を示すことが知られている<sup>29)</sup>。オラパリブは、*HDRness* を有する前立腺がんにおいても、腫瘍縮小などの臨床効果を示す<sup>30)</sup>。そのため、PARP 阻害薬は、*BRCA1/2* 変異以外の遺伝子変異を有する患者に対して、その適応の範囲を広げられる可能性が高い。したがって、オラパリブを含む PARP 阻害薬の単独使用は、現在の *BRCA1/2* 変異に留まらず、臨床において対象となる患者が増大し、今後はさらに重要な治療薬として用いられていくと考えられる。

PARP 阻害薬は、*BRCA1/2* に遺伝子変異を有するがんに対する単独使用に加え、*BRCA1/2* 野

**Table I. PARP inhibitors used in clinical application.**

PARP inhibitors	Rute	Gene types	Approval (FDA)	ref
Olaparib	Oral	• <i>BRCA1/2</i> mut	• Ovarian	19)
		• <i>BRCA1/2</i> mut HER2 negative	• Breast • Fallopian Tube • Peritoneal	20)
Veliparib	Oral		• none	
Talazoparib	Oral	• <i>BRCA1/2</i> mut HER2 negative	• Breast	31)
Rucaparib	Oral	• <i>BRCA1/2</i> mut	• Ovarian	32)
Niraparib	Oral	• Homologous recombination defect	• Ovarian • Fallopian Tube • Peritoneal	33)

Abbreviations: mut, mutation; FDA, Food and Drug Administration; HER2: human epidermal growth factor receptor 2

生型のがんに対して既存のがん化学療法と組み合わせた臨床試験が多く実施されている<sup>34)</sup>。具体的な PARP 阻害薬との組み合わせは、白金製剤、テモゾロミド、FOLFOX (5-FU/フォリン酸/オキサリプラチン) または FOLFIRI 療法 (5-FU/フォリン酸/イリノテカン)、トポテカンであり、種々のがんの治療成績向上を目指した研究が行われている。特に、オラパリブは多くの抗がん薬並びに分子標的薬と組み合わせた臨床試験が進められている (Table II)<sup>35)</sup>。具体的にオラパリブは、乳がんや食道がんにおける放射線照射、頭頸部がんにおけるセツキシマブ (ヒト上皮成長因子受容体: epidermal growth factor receptor (EGFR) 阻害薬) 及び放射線照射、すい臓がんにおけるイリノテカン、CDDP 及びメトトレキサート、卵巣がんにおけるカルボプラチン及びパクリタキセル、前立腺がんにおけるアビラテロン、乳がんにおけるセジラニブ (血管内皮増殖因子: vascular endothelial growth factor (VEGF) 阻害薬)、卵巣がんにおけるラパマイシン標的タンパク質 (mammalian target of rapamycin: mTOR) 阻害薬または RAC- $\alpha$ セリン/スレオニンプロテインキナーゼ (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase: AKT) 阻害薬と組み合わせた臨床試験が行われている。それら臨床試験の中で、PARP 阻害薬であるオラパリブやベリパリブを卵巣がん患者においてカルボプラチン及びパクリタキセルを組み合わせた TC 療法に加えることで、*BRCA1/2* 変異の有無に関わらず無増悪生存期間を延長させることが報告されている<sup>36-37)</sup>。またオラパリブは、卵巣がん患者において VEGF 阻害薬であるセジラニブとの併用<sup>38)</sup>、前立腺がんにおいてアビラテロンとの併用療法<sup>39)</sup>により患者の生存期間を延長させることが報告されている。すなわち、オラパリブは、相同組み換え修復の機能が低下した腫瘍に対する単独の使用だけでなく、相同組み換え修復の機能が正常ながんに対する抗がん薬と組み合わせる治療薬として用いられていくと考えられる。加えて、食道がん患者の 2 割が *HDRness* となる遺伝子変異を有していることも考慮すると<sup>40-41)</sup>、食道がんの治療に対する PARP 阻害薬の利用は今後有望となる可能性が考えられる。さらには、PARP 阻害薬は既存のがん化学療法と組み合わせることで治療成績を向上させる薬剤であることから、*HDRnes* を有していない食道がんにおいても他の治療薬と組み合わせた有効性の高い治療法を確立できると考えらる。

**Table II. Active clinical trials of olaparib combination therapy in non-*BRCA* mutation cancers<sup>35)</sup>.**

Therapy	Cancer types	Phase	NCT no./trial name
Radiation	Breast	I	NCT02229656
Radiation	Esophagus	I	NCT01460888
Radiation + cetuximab (EGFR inhibitor)	Head and neck	I	NCT02229656
Irinotecan+ CDDP+ methotrexate	Pancreas	I	NCT01296763
AZD2014 (mTOR inhibitor)	Ovarian	I/II	NCT02208375
AZD5363 (AKT inhibitor)	Ovarian	I/II	NCT02208375
Carboplatin + paclitaxel	Ovarian	II	NCT01081951
Abiraterone	Prostate	II	NCT01972217
Cediranib (VEGF inhibitor)	Breast	III	NCT02446600

Abbreviations: NCT no./ trial, U.S. national clinical trial; EGFR, epidermal growth factor receptor; VEGF; vascular endothelial growth factor receptor; mTOR, mammalian target of rapamycin; AKT: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase

そこで本研究では、食道がんにおけるオラパリブの単独及び既存の抗がん薬と組み合わせた際の有効性に関する情報を得る目的で、*BRCA1/2* 野生型及び変異型の食道がん細胞を用いて、単独処置及び抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響について基礎的検討を試みた。本研究では、第1章において食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響を、第2章では *BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる DNA 損傷応答を介した抗がん薬感受性増強効果について検討した。以下、得られた結果を論述する。

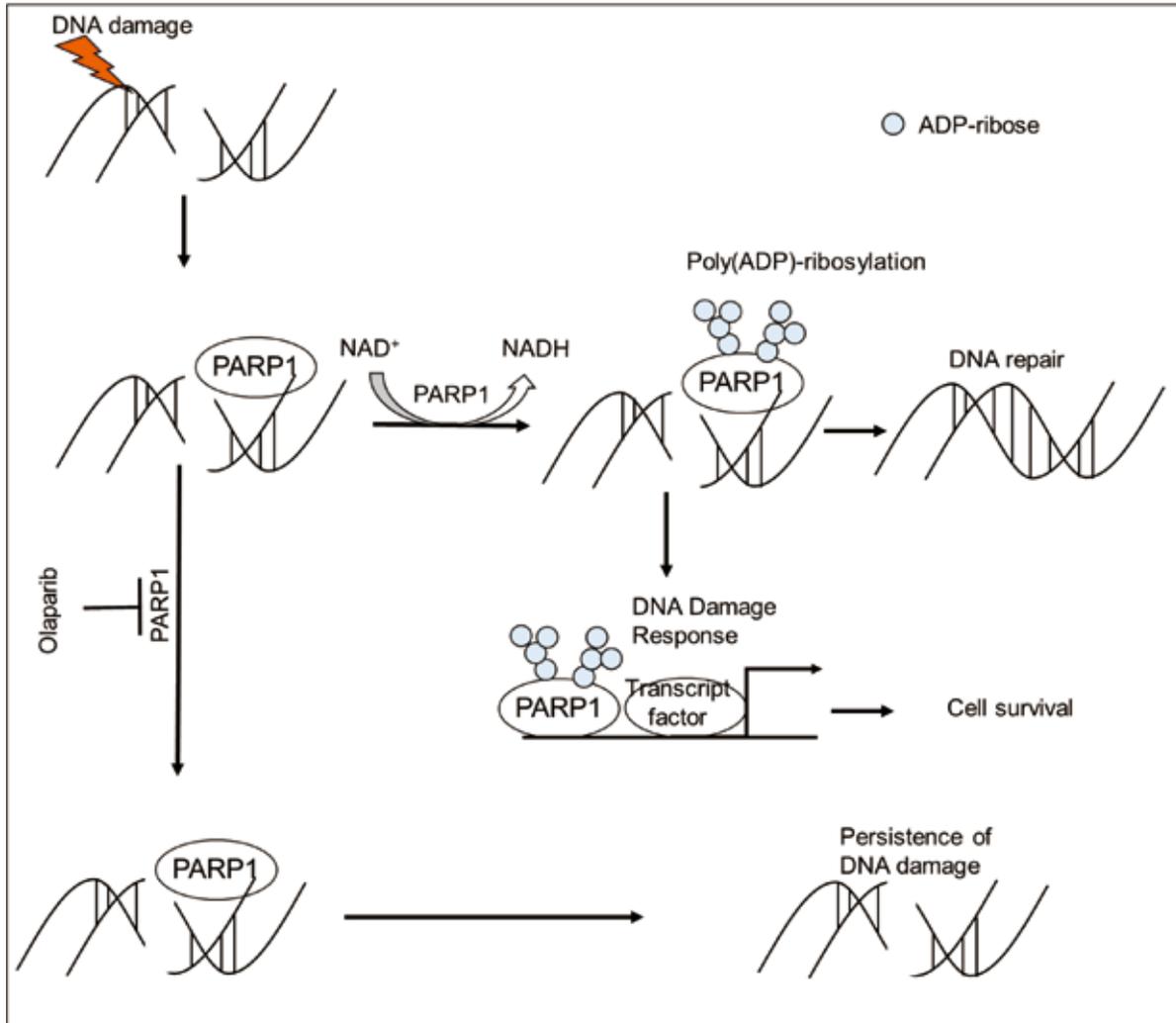
## 第1章 食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響

### 第1節 緒言

PARP1 は (Figure 1-1)、主に  $\text{NAD}^+$  を  $\text{NADH}$  に変換することにより、ADP リボースを PARP1 自身や他の標的タンパク質に修飾しポリ ADP リボース化 (Poly ADP-ribosylation: PAR) する。その後、PAR 修飾された PARP1 は、DNA 損傷応答である DNA 修復機構の促進や DNA 損傷に応答した遺伝子発現を促進し細胞生存に寄与する<sup>42)</sup>。そのため、PARP 阻害薬であるオラパリブは、PARP1 の酵素活性を阻害することで、これら DNA 損傷応答を抑制し、細胞増殖阻害作用を誘導する。これら機序によりオラパリブは、臨床においても既存のがん化学療法や分子標的薬など様々な薬剤の治療成績を向上させる可能性がある。現在、食道がんにおけるオラパリブの基礎的な知見の集積は限られるものの、*in vitro* において単独処置により細胞増殖阻害作用<sup>43)</sup> や放射線照射の感受性を相乗的に増強することが報告されている<sup>44)</sup>。すなわち、食道がんにおいてもオラパリブをはじめとする PARP 阻害薬は、有効な治療薬となる可能性が想定される。

がん化学療法は、全身的な治療効果が期待できるものの、その一方で、骨髄抑制などしばしば治療継続が困難な副作用が生じる場合が存在する。がん化学療法は、複数の治療薬を組み込み合わせることで、がんに対して単独で薬剤を使用する以上の治療成績を得ることができる<sup>45)</sup>。すなわち、がんに対して抗がん薬を組み合わせその作用が高まる組み合わせを明らかにすることは、がん化学療法を構築するうえで重要な基礎的な知見となり、治療効果を維持したまま、薬剤の投与量を下げ、副作用の減弱を目指す治療法を確立するための基礎的な知見ともなり得る。しかしながら、食道がんにおいてオラパリブと抗がん薬と共に用いた基礎的な知見は殆ど存在していない。

そこで本章では、食道がん細胞におけるオラパリブの基礎的な知見を集積するため、*BRCA1/2* 遺伝子変異の有無が異なる食道がん細胞を用いて、オラパリブにより感受性が特に増強する抗がん薬を *in vitro* にて探索した。



**Figure 1-1. Mechanism action of olaparib<sup>42</sup>.**

PARP: poly (ADP-ribose) polymerase: NAD<sup>+</sup>:nicotinamide-adenine dinucleotide oxidized form

NADH: nicotinamide-adenine dinucleotide reduced form

## 第2節 実験方法

### 1. 試薬

CDDP 及びドキシソルビシンは、富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。ドセタキセル、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン (SN-38) 及びテモゾロミドは、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。5-FU は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、オラパリブは、LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) から購入した。本研究では食道がん化学療法に用いられる抗がん薬として 5-FU、CDDP 及びドセタキセルを選択した。さらに、固形がんに対するがん化学療法に汎用される抗がん薬としてドキシソルビシン、SN-38 及びテモゾロミドを用い、代表的な PARP 阻害薬としてオラパリブを選択した。各抗がん薬の作用機序を Table 1-1 に示す。CDDP は、DNA 架橋形成薬としてグアニン及びアデニンへの結合作用<sup>46)</sup>、ドキシソルビシン及び SN-38 は、それぞれトポイソメラーゼII及びI阻害薬として、トポイソメラーゼI及びIIによる DNA 再結合の阻害作用<sup>47-48)</sup>、テモゾロミドは、DNA アルキル化薬としてグアニン残基のメチル化作用を有する<sup>49)</sup>。5-FU は、代謝拮抗薬として DNA 及び RNA 合成の阻害作用<sup>50)</sup>、ドセタキセルは微小管脱重合阻害薬として、微小管の安定化作用を有する<sup>51)</sup>。オラパリブは、PARP 阻害薬として PARP1 酵素活性の阻害に加え PARP1 の DNA 損傷部位への捕捉作用を有する<sup>52)</sup>。

**Table 1-1. Mechanisms of pharmacological action of anticancer drug used.**

Drugs	Category	Mechanism of action	Ref
CDDP	DNA crosslinking agent	Binding guanine and adenine residue	46)
SN-38	Topoisomerases I inhibitor	Inhibition of DNA recombination by topoisomerase I	47) 48)
Doxorubicin	Topoisomerases II inhibitor	Inhibition of DNA recombination by topoisomerase II	49)
Temozolomide	DNA alkylating agent	Methylation of guanine residue	
5-FU	Antimetabolite	Inhibition of DNA and RNA synthesis	50)
Docetaxel	Microtubule inhibitor	Stabilization of microtubules	51)
Olaparib	PARP inhibitor	Inhibition of PARP1 enzyme activity Trapping PARP1 on DNA	52)

Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; CDDP, Cisplatin; SN-38, 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin.

### 2. 細胞

ヒト食道がん細胞は、食道扁平上皮がんの日本人患者から樹立した食道がん細胞である KYSE70 及び KYSE140 細胞をヒューマンサイエンス研究資源バンク (Osaka, Japan) より購入した<sup>53)</sup>。BRCA1 変異は、KYSE140 細胞 (p.I1058V; 1058 番目のイソロイシン→バリン) におけるミスセンス突然変異が認められ、KYSE70 細胞は BRCA1/2 野生型である。また、その遺伝子情報は、がん細胞株における遺伝子情報をデータベース化した the Cancer Cell Line Encyclopedia<sup>54)</sup> (<https://portals.broadinstitute.org/>) から取得した。

### 3. 細胞培養液の調製

細胞の培養液には、ダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM、Thermo Fisher Scientific、Waltham, MA, USA) を用いた。D-MEM は、発熱性物質を取り除いた超純水に 3.7 g の炭酸水素ナトリウムと共に溶解し、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (終濃度 ペニシリン 100 U/mL、ストレプトマイシン 100 µg/mL、ナカライテスク株式会社、Kyoto, Japan) を添加した後 30 分間攪拌した。その後、121°C、20 分間にて高压蒸気滅菌 (LSX-500、TOMY、Tokyo, Japan) したメディアボトルに対して、クリーンベンチ内で D-MEM を 0.22 µm のメンブランフィルターを使用し濾過滅菌を行い、さらにウシ胎仔血清 (FBS、終濃度 10 v/v%、GE Healthcare、Little Chalfont, UK) を 0.45 µm のメンブランフィルターを使用し濾過滅菌を行い添加した。調製後 4°C で保存し、使用時には投込式恒温装置サーモメイト (BF 400、ヤマト科学株式会社、kyoto, Japan) により 37°C に維持した温浴中で加温したものをを用いた。

#### 4. 細胞培養法

細胞は、10% FBS 含有細胞培養液中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて培養し、3 又は 4 日ごとに継代した。継代操作は以下のように行った。100 mm ディッシュ (AGC テクノグラス株式会社、Shizuoka, Japan) に培養した細胞を 37°C に加温した滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 2 mL で 2 回洗浄した。1×トリプシン-EDTA 溶液 (ナカライテスク) 2 mL を添加し 37°C で数分間加温することによりディッシュから細胞を剥離した。その後、加温した細胞培養液を 8 mL 添加し、回収した細胞懸濁液を 190×g、室温、6 分間 (Model 6200、株式会社クボタ、Osaka, Japan) で遠心分離をした。上清を吸引除去した後、細胞ペレットに培養液を 10 mL 添加し、よく攪拌した。その後、血球計算盤を用いて細胞数を測定し、1 培養皿あたり 2×10<sup>5</sup> cells/mL の細胞密度にて 100 mm ディッシュに 10 mL の細胞懸濁液を播種し継代培養することで細胞を維持した。

#### 5. 細胞増殖阻害実験

##### 5-1. 薬液調製

CDDP、SN-38、ドキソルビシン、ドセタキセル及びオラパリブはジメチルスルホキシド (DMSO、富士フイルム和光純薬) に、テモゾロミドは D-MEM に、5-FU は超純水に溶解した。薬物を溶解した溶液における DMSO 濃度は、細胞増殖阻害作用を示さない 0.5% 以下にした。オラパリブによる細胞増殖阻害作用の評価では、溶解した薬物を D-MEM で 1000 倍希釈することで最高濃度 (200 µM) の薬液を調製し、順次 2 倍系列希釈することで濃度が 9 段階になるよう調製した。KYSE70 細胞においては、最高濃度から順次 2 倍 (CDDP、SN-38、ドキソルビシン、5-FU 及びドセタキセル) または、3 倍 (テモゾロミド) 系列希釈することで、濃度が 9 段階になるようにした。また、各抗がん薬の最高濃度はそれぞれ CDDP: 20 µM、SN-38: 25 nM、ドキソルビシン: 1000 nM 及びテモゾロミド: 1000 µM、5-FU: 40 µM 及びドセタキセル: 10 nM とした。KYSE140 細胞においては、調製した濃度から、順次 3 倍 (SN-38、ドキソルビシン及び 5-FU) または、4 倍 (CDDP、テモゾロミド及びドセタキセル) 系列希釈することで、濃度が 9 段階になるよう調製した。また、各抗がん薬の最高濃度はそれぞれ、CDDP: 20 µM、

SN-38: 50 nM、ドキソルビシン: 1000 nM、テモゾロミド: 1000  $\mu$ M、5-FU: 40  $\mu$ M 及びドセタキセル: 10 nM とした。KYSE70 及び KYSE140 細胞におけるオラパリブ併用時の処置濃度は、各細胞に対するオラパリブ単独処置時の細胞増殖阻害作用が 10-20%の濃度となるよう、それぞれ 5 及び 1  $\mu$ M とした。

## 5-2. 細胞播種及び薬液の添加

各細胞を 96 穴細胞培養プレート (Corning, Corning, NY, USA) に 1000 cells/well/100  $\mu$ L の細胞密度で播種し 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 24 時間培養した。その後、薬物含有培養液を 50  $\mu$ L ずつ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 1 週間培養した。

## 5-3. 生細胞数の測定

生細胞数の測定には、CellQuanti-Blue™ Cell Viability Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) を用いた。96 穴細胞培養プレートの培養液を吸引除去し、CellQuanti-Blue™ 試薬含有培養液 (CellQuanti-Blue™ 試薬: 培養液 = 1 : 10) を 110  $\mu$ L ずつ添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 5 時間反応させた後、各穴の蛍光強度 (励起波長: 535 nm、蛍光波長: 590 nm) を Power scan® HT multi-mode microplate reader (DS ファーマバイオメディカル株式会社、Osaka, Japan) を用いて測定した。

## 5-4. 50 %細胞増殖阻害濃度の算出

50 %細胞増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) は、次式 (1) に従い非線形最小二乗法 (Solver、Microsoft Excel) により算出した<sup>55)</sup>。

$$E = E_{max} \times \left(1 - \frac{C^\gamma}{C^\gamma + IC_{50}^\gamma}\right) \quad (1)$$

なお  $E$  及び  $E_{max}$  は、それぞれ細胞増殖率 (% of control) 及び最大生存率を示し、 $C$  及び  $\gamma$  はそれぞれ細胞培養液中の薬物濃度及びシグモイド係数を示している。

## 5-5. 相対感度による感受性増強効果の評価

5-4 において算出した抗がん薬の IC<sub>50</sub> 値に及ぼすオラパリブの感受性増強効果の評価は、相対感度 (relative sensitivity: R.S.) を式 (2) に従い算出した。R.S.  $\geq 2$  の場合に強い感受性増強作用を示したと判定した。

$$R.S. = \frac{\text{抗がん薬の } IC_{50}}{\text{オラパリブ共存下の抗がん薬の } IC_{50}} \quad (2)$$

## 5-6. Combination index による併用効果の判定

5-3 項での細胞増殖阻害実験における抗がん薬とオラパリブとの併用効果の判定は、combination index (CI 値) を Chou-Talalay ら<sup>56)</sup>が算出した式 (3) に従い、CompuSyn software

(<http://www.combosyn.com/>) により算出した。薬物の各細胞増殖阻害作用における併用効果を評価するため CI 値を縦軸に、細胞増殖阻害率 (fraction affected; Fa) を横軸にすることで Fa-CI プロット図を作成し、Fa が 0.25 以下の範囲内を細胞増殖阻害率が低値、Fa が 0.75 以上の範囲内を細胞増殖阻害率が高値と判定し、低値及び高値を除く Fa において CI < 0.7 を示す場合を相乗作用と判定した<sup>57,58)</sup>。

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad (3)$$

なお  $D_x$  並びに  $D$  は、それぞれ単独で Fa を得るための薬物濃度並びに併用した際に Fa を得るための濃度を示している。

### 3. コロニー形成法

#### 6-1. 薬液の調製

CDDP、SN-38、ドキソルビシン、ドセタキセル及びオラパリブは DMSO に、テモゾロミドは D-MEM に、5-FU は超純水に溶解した後、D-MEM で 1000 倍希釈することで薬液を調製した。各薬物単独処置時の処置濃度は、それぞれ CDDP: 0.5、1 及び 2  $\mu$ M、SN-38: 1.25、2.5 及び 5 nM、ドキソルビシン: 10、20 及び 40 nM、テモゾロミド: 0.5、1 及び 2  $\mu$ M、5-FU: 0.5、1 及び 2  $\mu$ M、ドセタキセル: 0.25、0.5 及び 1 nM 及びオラパリブ: 2.5 及び 5  $\mu$ M とした。各抗がん薬とオラパリブ併用処置時の薬物処置濃度は、それぞれ、CDDP: 2  $\mu$ M、SN-38: 5 nM、ドキソルビシン: 20 nM、テモゾロミド: 2  $\mu$ M、5-FU: 1  $\mu$ M、ドセタキセル: 0.5 nM 及びオラパリブ: 2.5  $\mu$ M とした。なお、各抗がん薬及びオラパリブの併用時の処置濃度は、KYSE70 細胞に対するコロニー形成阻害作用が 0-50%となる濃度とした。

#### 6-2. 細胞播種及び抗がん薬添加

KYSE70 細胞を 1000 cells/well/2 mL の細胞密度で 6 穴細胞培養プレート (Corning) に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 24 時間培養した。その後、培養液を吸入除去し、調製した薬液を 2 mL ずつ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にてさらに 2 週間培養した。

#### 6-3. コロニー面積の測定

コロニー面積の測定は、Jun ら<sup>59)</sup> の報告を参考に解析した。6 穴細胞培養プレートの培養液を吸引除去し、PBS 1 mL を用いて 2 回洗浄した後 60%メタノールを用いて 0.1 w/v%に調製したメチレンブルー (富士フイルム和光純薬) 溶液を 1 mL ずつ添加し、室温にて 30 分静置することで細胞を固定及び染色した。その後、超純水で 6 穴細胞培養プレートの各穴を洗浄し、1 又は 2 日乾燥させた後、スキャナー (RICOH IPSiO SPC241F、株式会社リコー、Tokyo、Japan) で画像を取り込み、画像処理ソフトウェア Image J (Ver.1.52a、National Institutes of Health、Bethesda、MD、USA) を用いて、各穴のコロニー面積を測定し数値化した。

#### 6-4. 期待値の算出

オラパリブと抗がん薬の各コロニー形成阻害作用を用いて期待値 (expected value: *EXP*) を次式 (4) により算出した。

$$EXP (\%) = \frac{\text{抗がん薬処置時のコロニー面積}}{\text{コントロールのコロニー面積}} \times \frac{\text{オラパリブ処置時のコロニー面積}}{\text{コントロールのコロニー面積}} \times 100 \quad (4)$$

#### 6-5. Drewinko's fraction 法による相乗作用の判定

オラパリブと抗がん薬のコロニー形成阻害作用が相乗、相加又は拮抗のいずれであるかの判定は Drewinko's fraction 法を用いて評価した<sup>60)</sup>。すなわち、抗がん薬とオラパリブ併用処置時の平均コロニー面積の標準誤差 (S.E.) 上限が、*EXP* を下回った場合を相乗作用、S.E.を含む平均コロニー面積が *EXP* 又は抗がん薬単独の S.E.の上下限の範囲と同程度であれば相加作用、S.E.の上限を含む平均コロニー面積が *EXP* と比較して高値ならば拮抗作用と判断した。

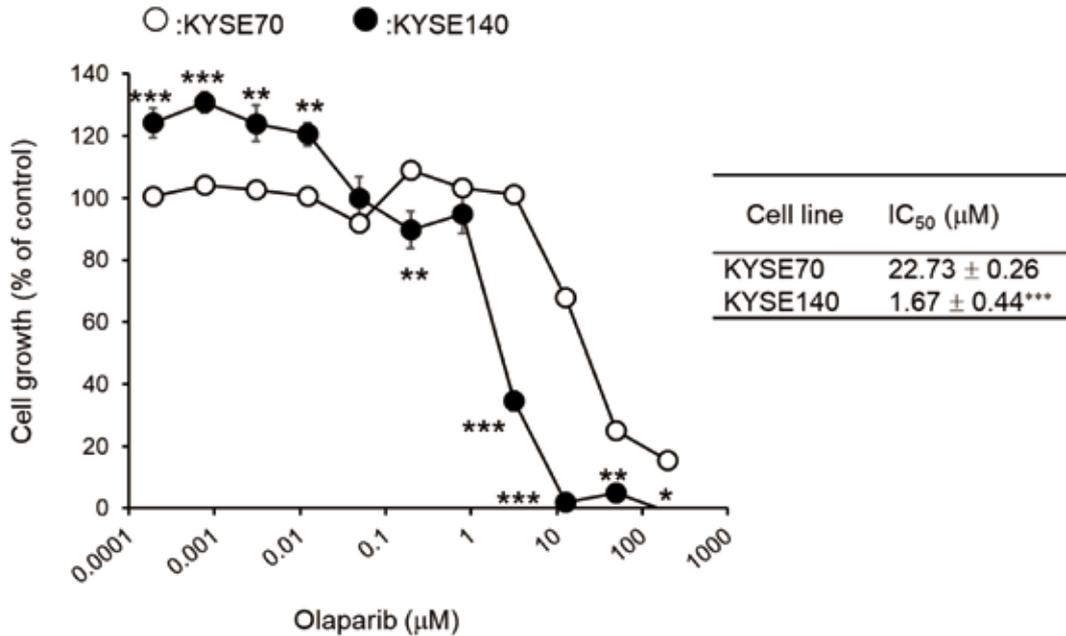
#### 7. 統計学的処理

全ての統計解析は Graph Pad Prism (Ver. 8.31、エムデーエフ、Tokyo、Japan) を使用して行った。得られた実験値は全て平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で表示した。また二群間の比較には、F 検定により分散を評価した後に、等分散の場合は Student's t 検定を適用し、非等分散の場合は、Welch's t 検定を適用した。多群間の比較には、Bartlett 検定により分散を評価し、等分散の場合は、一元配置分散分析の後に Dunnett 検定又は反復測定二元配置分散分析の後に Tukey 検定を適用し、非等分散の場合は Kruskal-Wallis 検定を行った後に Steel-Dwass の多重比較を適用した。なお全ての検定において、危険率 5%未満 (両側) を有意差ありとした。

### 第3節 結果

#### 1. 食道がん細胞に対するオラパリブの細胞増殖阻害作用

オラパリブは、2種類の食道がん細胞において、濃度依存的な細胞増殖阻害作用を示した。KYSE140細胞におけるオラパリブ (0.00019、0.00076、0.0030、0.012、0.19、3.13、12.5、50及び200  $\mu\text{M}$ :  $F_{(11:33)}=65.45$ ,  $P=0.0011$  (0.0030  $\mu\text{M}$ ), 0.033 (0.012  $\mu\text{M}$ ), 0.0051 (0.19  $\mu\text{M}$ ), 0.0031 (50  $\mu\text{M}$ ), 0.03 (200  $\mu\text{M}$ ) 及び  $P<0.001$  (0.00019, 0.00076, 3.13 及び 12.5  $\mu\text{M}$ )) の細胞増殖阻害曲線は、KYSE70細胞のものと比較し低濃度側に位置した。また、KYE140細胞におけるオラパリブの  $\text{IC}_{50}$  値は、KYSE70細胞よりも有意に低値を示した (Figure 1-2;  $t_{(3:3)}=0.35$ ,  $P<0.001$ )。

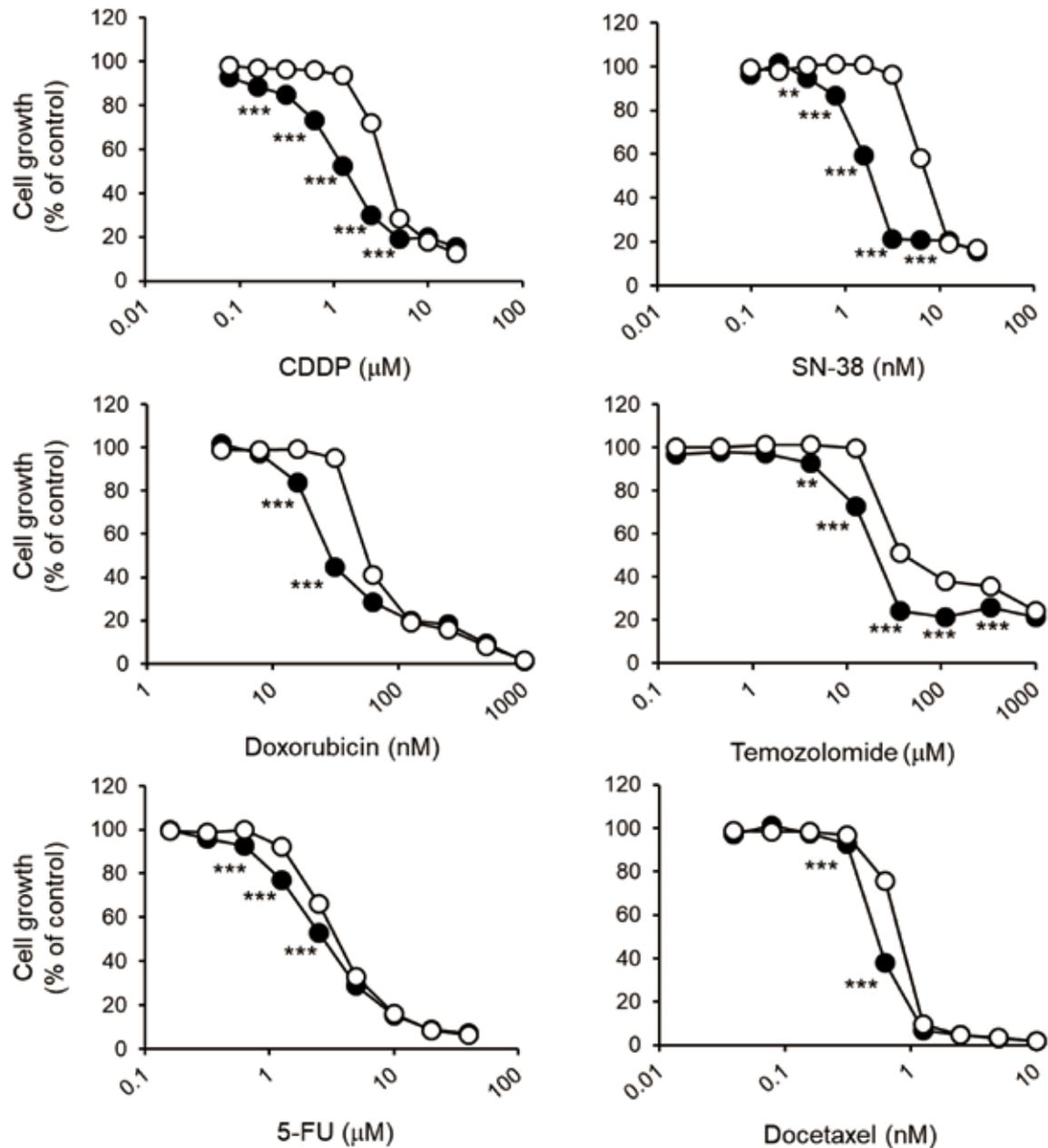


**Figure 1-2. Growth inhibitory effect of olaparib in KYSE70 and KYSE140 cells.**

Cells were seeded onto 96-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to olaparib at the indicated concentrations for one week. Cell viability was determined using the CellQuanti-Blue Cell Viability Assay Kit. The  $\text{IC}_{50}$  was calculated according to nonlinear least-squares method. Each point represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Error bars are shown behind the symbols. Significant differences of cell growth curve and  $\text{IC}_{50}$  value were determined by repeated measure two-way ANOVA followed by Tukey's test ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  vs. olaparib at the indicated concentrations in KYSE70 cells) and the unpaired Student's t-test ( $***P<0.001$  vs. KYSE70 cells), respectively.

## 2. 食道がん細胞株における抗がん薬の細胞増殖阻害作用に及ぼすオラパリブの影響

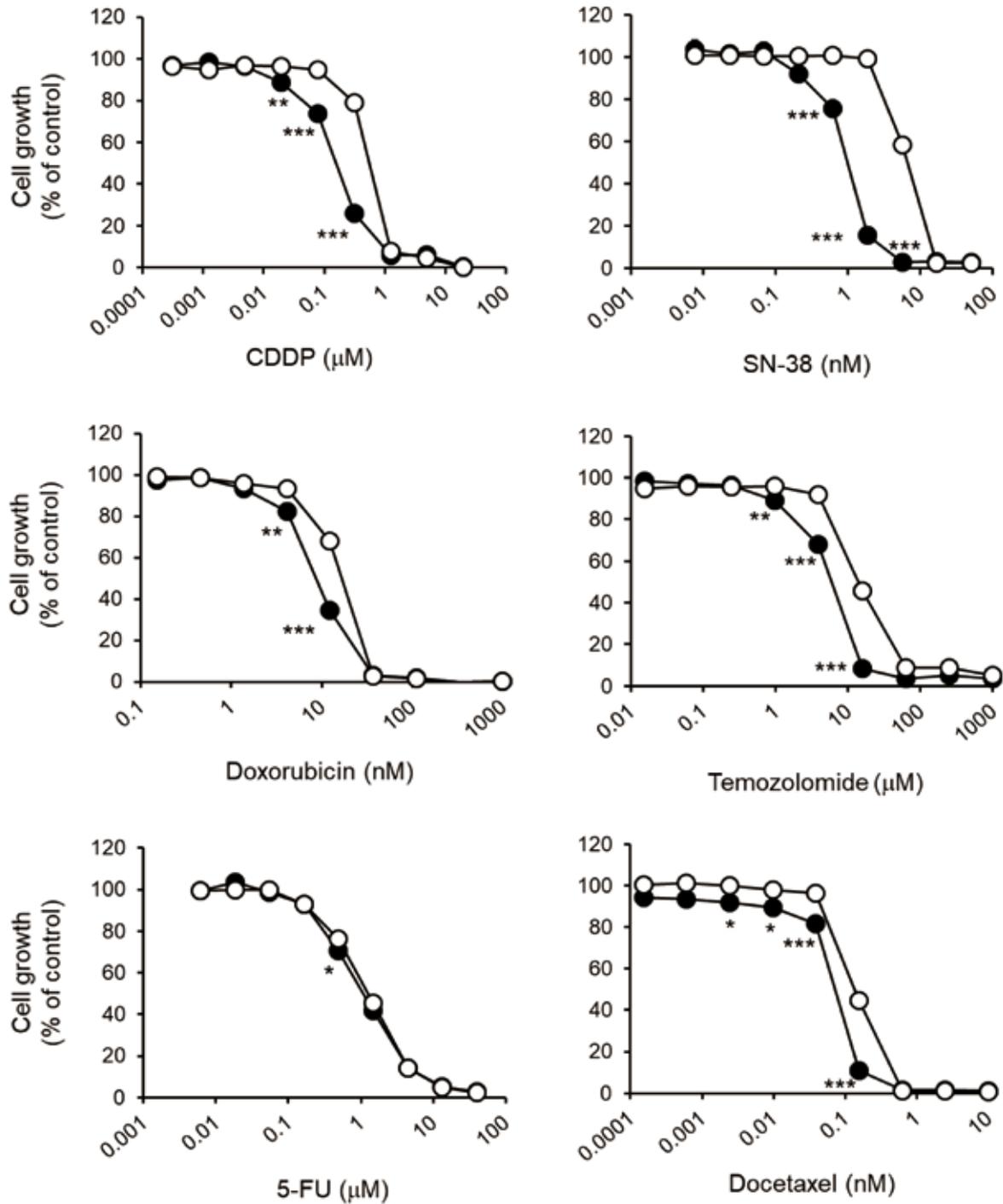
CDDP、SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセルは、KYSE70 細胞 (Figure 1-3) 及び KYSE140 細胞 (Figure 1-4) のいずれにおいても、濃度依存的に細胞増殖を阻害した。またオラパリブは、KYSE70 及び KYSE140 細胞において、それぞれ CDDP (KYSE70、0.16、0.32、0.63、1.25、2.5 及び 5  $\mu\text{M}$ :  $F_{(9;27)}=128.6$ 、 $P < 0.001$ ; KYSE140、0.031、0.063 及び 0.125  $\mu\text{M}$ :  $F_{(9;27)}=118.7$ 、 $P = 0.006$  (0.031  $\mu\text{M}$ ) 及び  $P < 0.001$  (0.063 及び 0.125  $\mu\text{M}$ )), SN-38 (KYSE70、0.39、0.78、1.56、3.13 及び 6.25 nM:  $F_{(9;27)}=533.3$ 、 $P < 0.001$ ; KYSE140、0.61、1.85 及び 5.56 nM:  $F_{(9;27)}=120.40$ 、 $P < 0.001$ )、ドキソルビシン (KYSE70、31.25、62.5 及び 125 nM:  $F_{(9;27)}=127.3$ 、 $P < 0.001$ ; KYSE140、4.12 及び 12.34 nM:  $F_{(9;27)}=21.37$ 、それぞれ  $P = 0.0045$  及び  $P < 0.001$ )、テモゾロミド (KYSE70、4.12、12.34、37.03、111.11 及び 333.33  $\mu\text{M}$ :  $F_{(9;27)}=43.21$ 、 $P = 0.0013$  (4.12  $\mu\text{M}$ )、 $P < 0.001$  (12.34、37.03、111.11 及び 333.33  $\mu\text{M}$ ); KYSE140、0.97、43.91 及び 15.63 nM:  $F_{(9;27)}=92.96$ 、 $P = 0.0027$  (0.97  $\mu\text{M}$ ) 及び  $P < 0.001$  (43.91 及び 15.63 nM))、5-FU (KYSE70、0.63、1.25、2.5 及び 5  $\mu\text{M}$ :  $F_{(9;27)}=32.12$ 、 $P < 0.001$ ; KYSE140、0.49  $\mu\text{M}$ :  $F_{(9;27)}=3.29$ 、 $P = 0.025$ )、ドセタキセル (KYSE70、0.31 及び 20.63 nM:  $F_{(9;27)}=7.31$ 、 $P < 0.001$ ; KYSE140、0.0024、0.0098、0.039 及び 0.14 nM:  $F_{(9;70)}=27.08$ 、 $P = 0.046$  (0.0024 nM)、0.024 (0.0098 nM)、 $P < 0.001$  (0.039 及び 0.14 nM)) の増殖曲線を低濃度側へシフトさせた (Figure 1-3)。



**Figure. 1-3. Effects of olaparib on the inhibition of cell growth by anticancer drugs in KYSE70 cells.**

Cells were seeded onto 96-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to an anticancer drug at the indicated concentrations for one week without (○) or with 5 μM olaparib (●). Cell viability was determined using the CellQuanti-Blue Cell Viability Assay Kit. Each point represents the mean ± SE (n = 4). Error bars are shown behind the markers. Significant differences of cell growth curve were determined by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. anticancer drug only at the indicated concentrations in KYSE70 cells)

Miyamoto K., *et al.*, *Anticancer Res.* **2019**, 39, 1813-1820, Figure 1.



**Figure 1-4. Effects of olaparib on the inhibition of cell growth by anticancer drugs in KYSE140 cells.**

Cells were seeded onto 96-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to an anticancer drug at the indicated drug concentrations for one week without (○) or with 1 μM olaparib (●). Cell viability was determined using the CellQuanti-Blue Cell Viability Assay Kit. Each point represents the mean ± SE (n = 4). Error bars are shown behind the symbols. Significant differences of cell growth curve were determined by repeated measures two-way ANOVA followed by Tukey's test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. anticancer drug only at the indicated concentrations in KYSE140 cells).

オラパリブは、KYSE70 及び KYSE140 細胞において、CDDP (KYSE70、 $P < 0.001$ ; KYSE140、 $P < 0.001$ )、SN-38 (KYSE70、 $P < 0.001$ ; KYSE140、 $P < 0.001$ )、ドキソルビシン (KYSE70、 $P < 0.001$ ; KYSE140、 $P < 0.001$ )、テモゾロミド (KYSE70、 $P < 0.001$ ; KYSE140、 $P < 0.001$ )、5-FU (KYSE70、 $P < 0.001$ ; KYSE140、 $P = 0.029$ ) 及びドセタキセル (KYSE70、 $P < 0.001$ ; KYSE140、 $P < 0.001$ ) の  $IC_{50}$  値を有意に低下させた。さらに、オラパリブにより CDDP、SN-38 及びテモゾロミドの R.S. は、2 以上となり、ドキソルビシンにおいても KYSE70 細胞において 2 以上の R.S. を示し、それぞれ強い感受性増強が認められた (Table 1-2)。

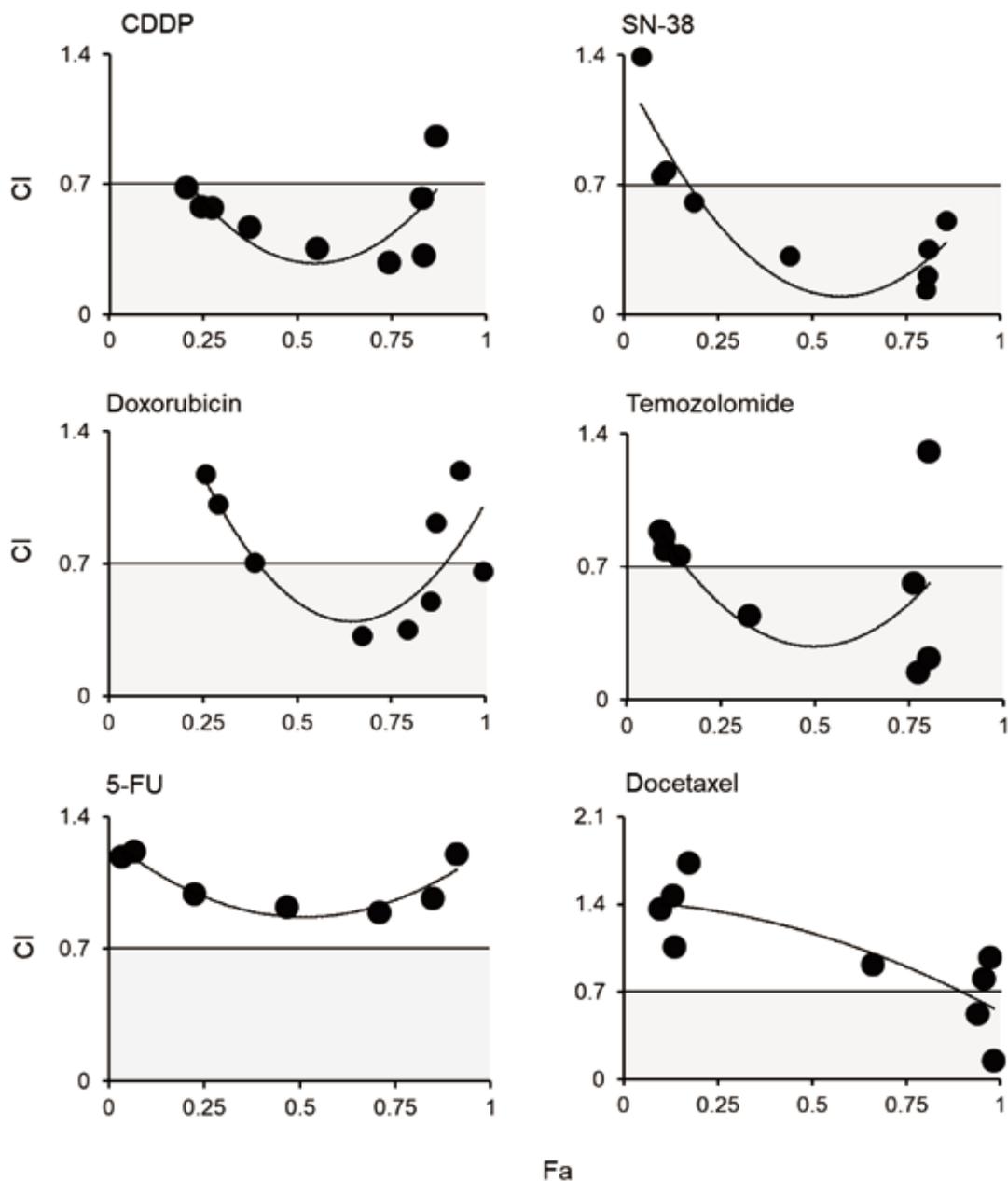
Table 1-2. IC<sub>50</sub> values of anticancer drugs without or with olaparib in KYSE70 and KYSE140 cells.

Anticancer drugs	KYSE70				KYSE140			
	Control	Olaparib (5 $\mu$ M)	<i>t</i> value	R.S.	Control	Olaparib (1 $\mu$ M)	<i>t</i> value	R.S.
CDDP ( $\mu$ M)	3.8 $\pm$ 0.073	1.4 $\pm$ 0.076***	1.09	2.71	0.54 $\pm$ 0.018	0.16 $\pm$ 0.010***	3.4	3.38
SN-38 (nM)	7.4 $\pm$ 0.10	1.9 $\pm$ 0.10***	2.06	3.89	6.1 $\pm$ 0.32	9.3 $\pm$ 0.067***	250.2	6.48
doxorubicin (nM)	61 $\pm$ 1.2	24 $\pm$ 2.0***	3.1	2.54	15 $\pm$ 0.081	0.078 $\pm$ 0.0013***	1.5	1.62
temozolomide ( $\mu$ M)	78 $\pm$ 4.9	24 $\pm$ 1.5***	11.7	3.25	15 $\pm$ 0.49	5.7 $\pm$ 0.081***	36.0	2.63
5-FU ( $\mu$ M)	3.6 $\pm$ 0.10	2.5 $\pm$ 0.065***	2.3	1.44	1.3 $\pm$ 0.10	1.1 $\pm$ 0.017*	17.1	1.18
docetaxel (nM)	0.49 $\pm$ 0.0011	0.44 $\pm$ 0.010***	39.5	1.11	0.15 $\pm$ 0.0048	0.078 $\pm$ 0.0013***	13.9	1.92

The IC<sub>50</sub> values are given as means  $\pm$  SE (n = 4). R.S. = the IC<sub>50</sub> value (control)/the IC<sub>50</sub> value (olaparib). Significant differences were determined by the unpaired Student's *t*-test or Welch's *t*-test correction when sample variances were not equal (\**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001 vs. control). Miyamoto K. *et al.*, *Anticancer Res* 2019, 39, 1813-1820, Table I

### 3. 食道がん細胞における抗がん薬とオラパリブの併用効果の判定

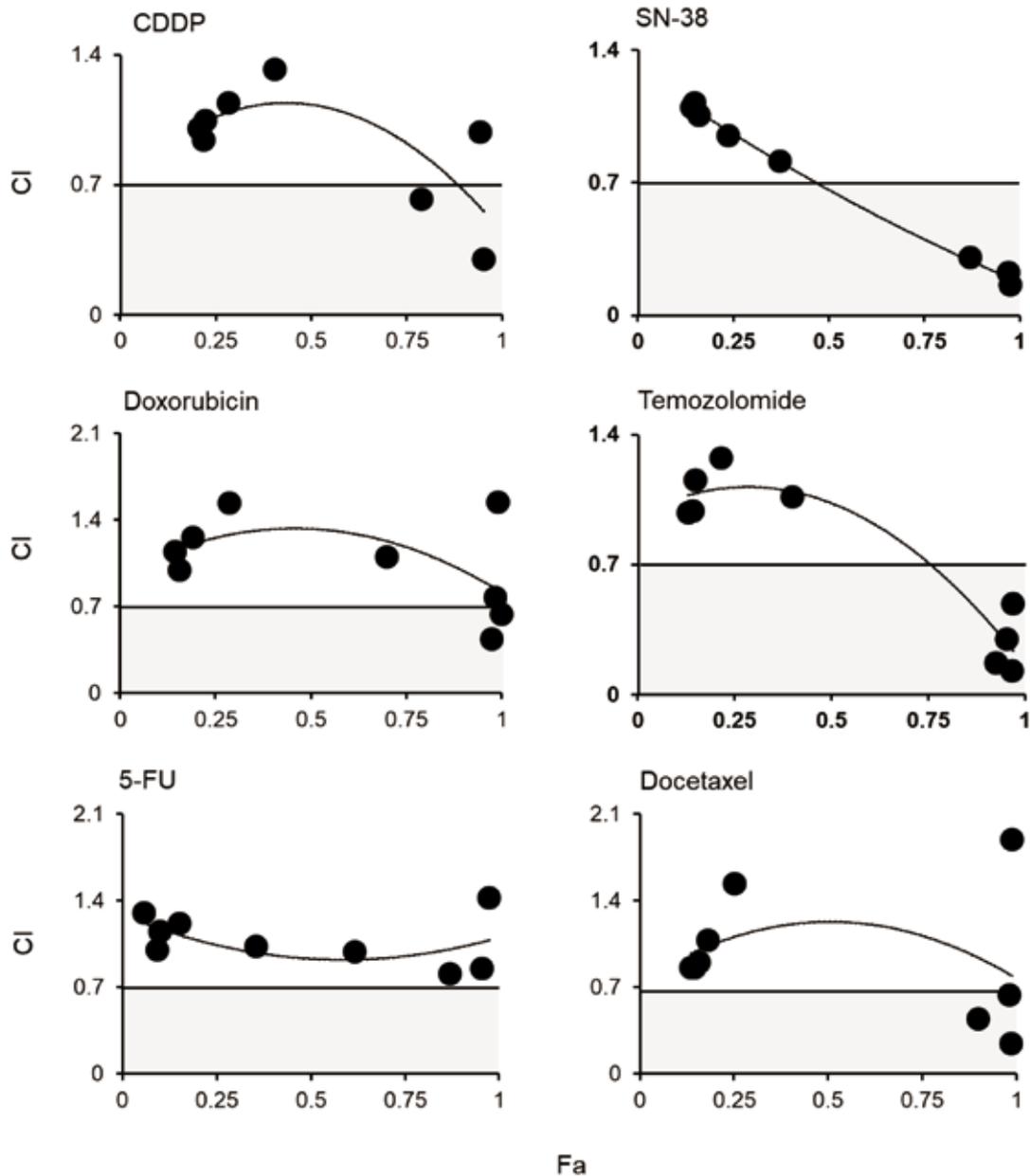
薬物の併用効果の判定に用いられる CI 値は、0.7 未満を示した場合を相乗的な併用効果と判定する<sup>57,58)</sup>。KYSE70 細胞において、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドは、Fa が 0.25 以上及び 0.75 以下の範囲内でオラパリブとの CI 値が 0.7 未満であり、相乗的な作用であった。一方で、5-FU とオラパリブとの併用は、CI 値が 0.7 以上となり、ドセタキセルとオラパリブの併用は、Fa が高値である 0.9 以上を除き CI 値は 0.7 以上となり、両薬剤とも相乗的な併用効果は認められなかった (Figure 1-5)。



**Figure 1-5. CI values of anticancer drugs with olaparib in KYSE70 cells**

Fa-CI plots were calculated from data of Figure 1-3 by using CompuSyn software based on Chou-Talalay method. CI value less than 0.7 is determined as synergism.

KYSE140 細胞において、CDDP、ドキソルビシン、SN-38 及びテモゾロミドは、オラパリブと併用した時の細胞増殖を Fa が高値である 0.75 以上において CI が 0.7 未満であったものの、Fa が 0.75 未満では CI 値は 0.7 以上であった。一方 5-FU とオラパリブの併用は、CI 値が 0.7 以上となり、ドセタキセルとオラパリブの併用は、Fa が高値である 0.75 以上を除き CI 値は 0.7 以上であり、両薬剤とも相乗的な併用効果は認められなかった (Figure 1-6)。



**Figure 1-6. CI values of anticancer drugs with olaparib in KYSE140 cells**

Fa-CI plots were calculated from data of Figure 1-4 by using CompuSyn software based on Chou-Talalay method. CI value less than 0.7 is determined as synergism.

#### 4. KYSE70 細胞におけるオラパリブによる抗がん薬のコロニー形成阻害に及ぼす影響

オラパリブ、CDDP、SN-38、5-FU 及びドセタキセルは、コントロールと比較して濃度依存的に KYSE70 細胞のコロニー面積を減少させ、ドキソルビン及びテモゾロミドにおいては、検討した濃度範囲において KYSE70 細胞のコロニー面積を減少させなかった (Figures 1-7A 及び 1-7B)。またそれらコロニー面積を画像解析した結果、オラパリブ、CDDP、SN-38、5-FU 及びドセタキセルのコロニー形成阻害作用が認められた (Figures 1-7C 及び 1-7D)。また以上検討より、併用時の薬物濃度をオラパリブ: 2.5  $\mu$ M、CDDP: 0.5  $\mu$ M、SN-38: 2.5 nM、テモゾロミド: 5  $\mu$ M、5-FU: 1  $\mu$ M、ドセタキセル: 40 nM とした。

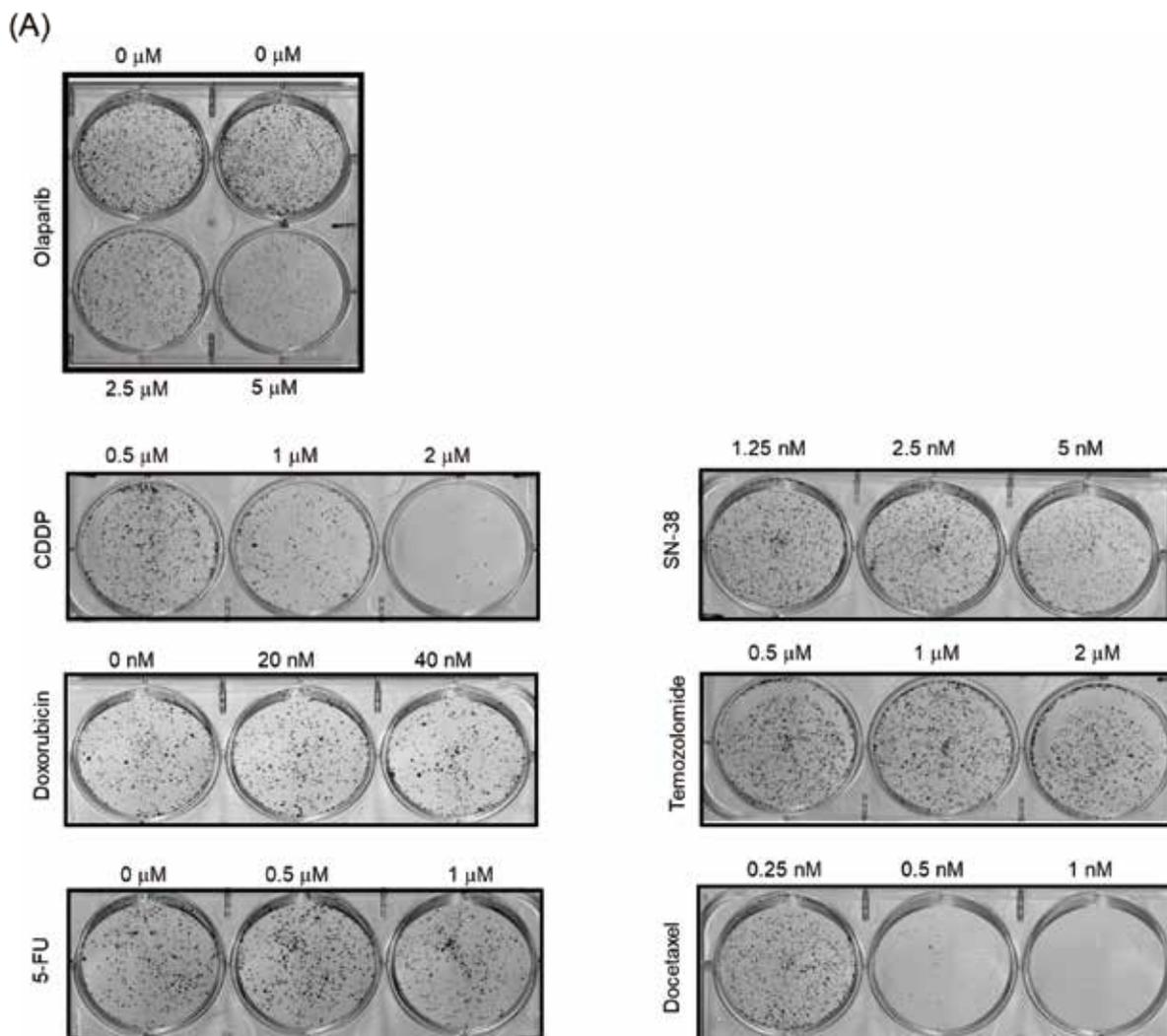
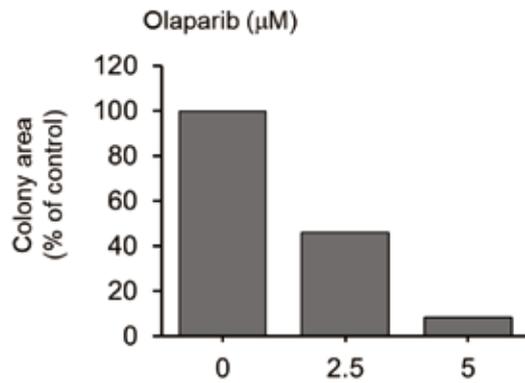
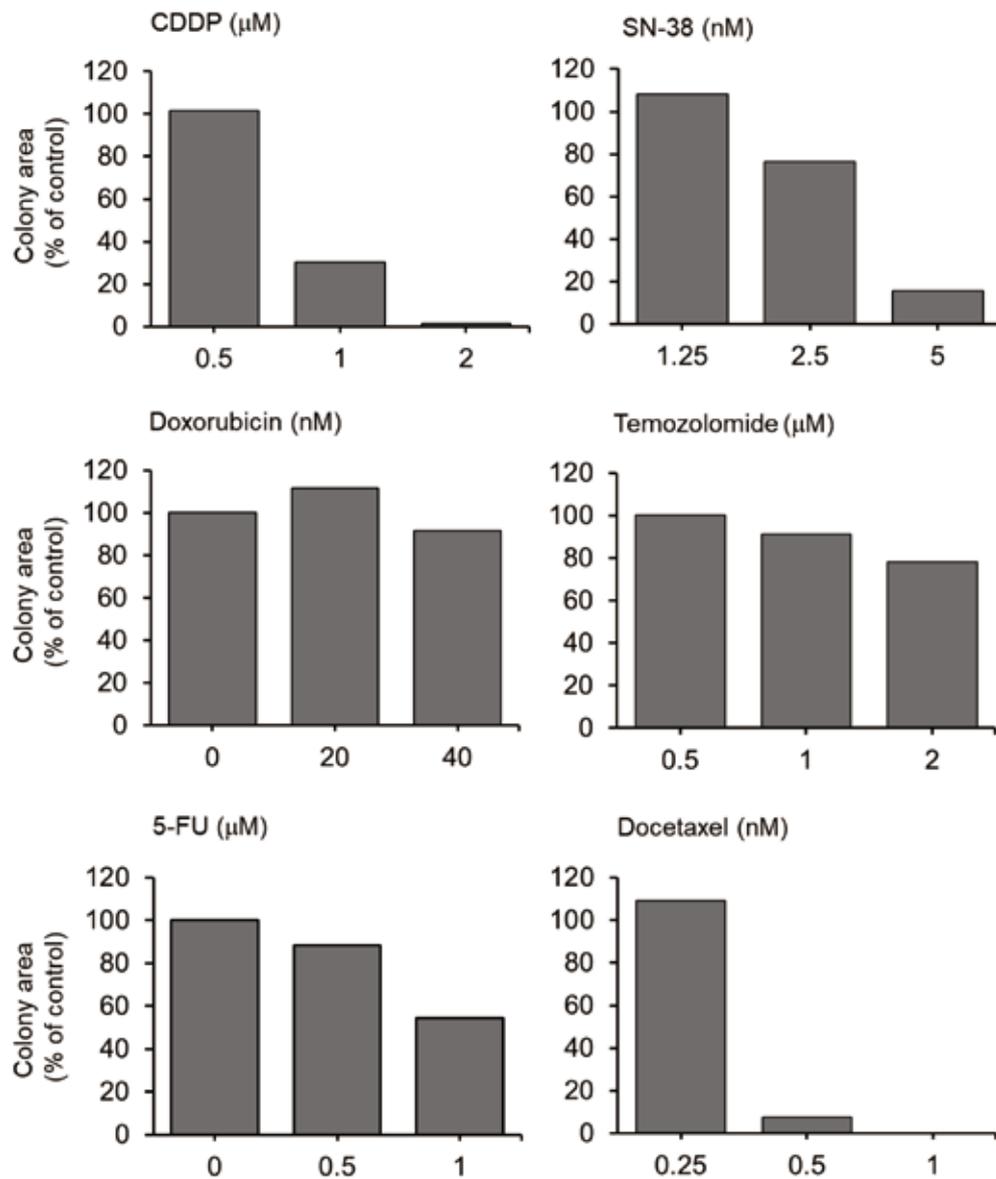


Figure 1-7. continued.

(C)



(D)

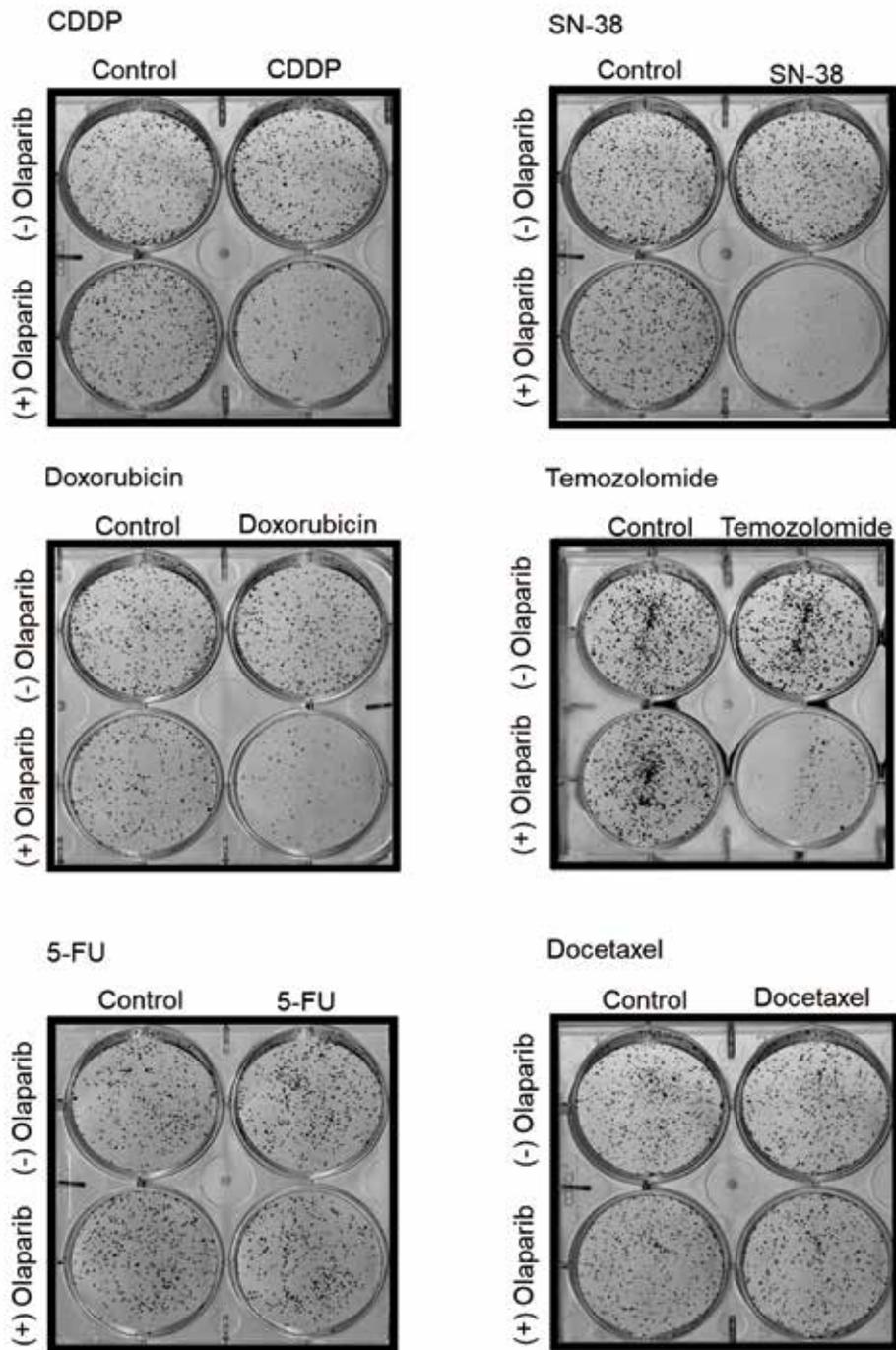


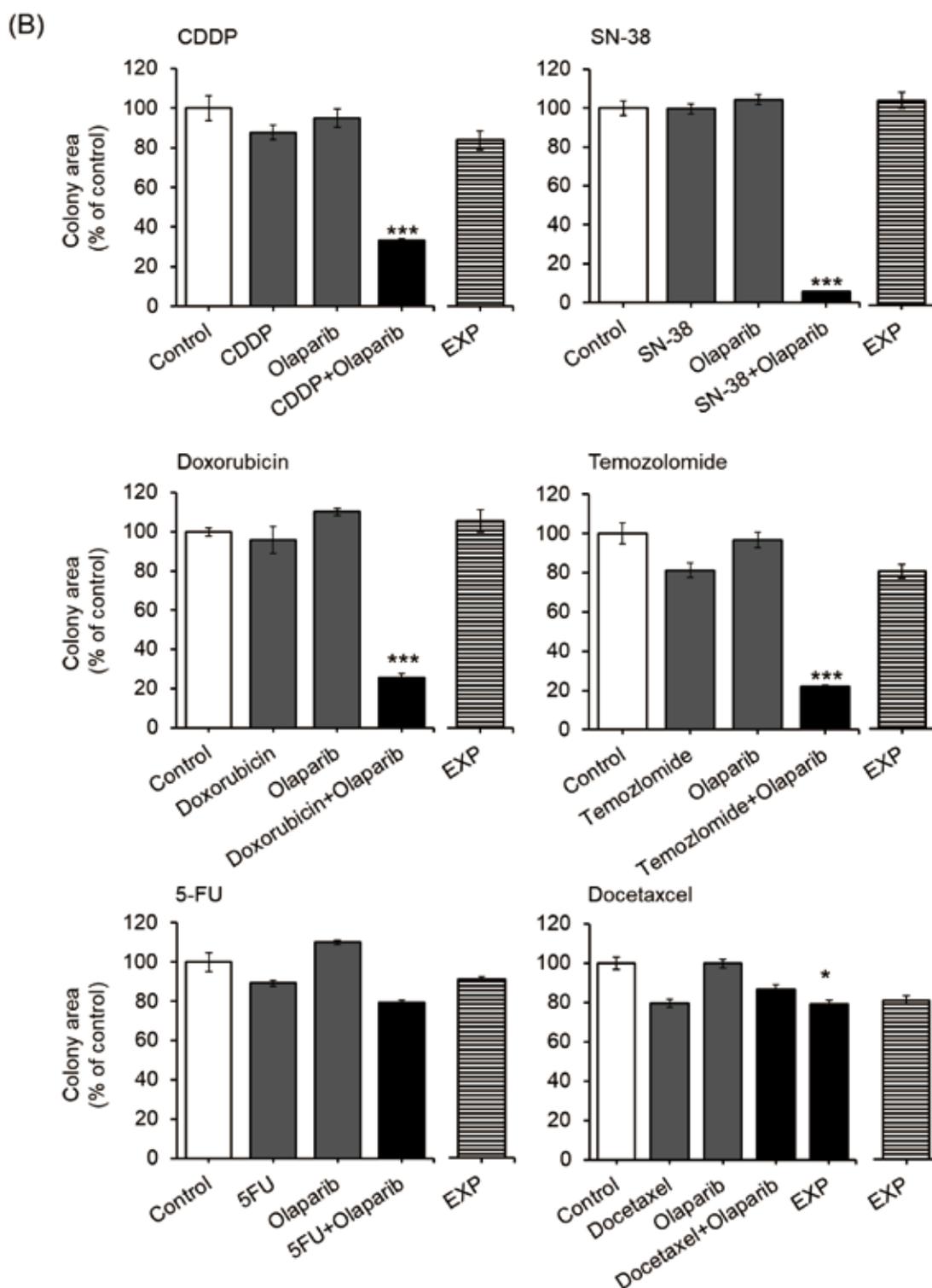
**Figure. 1-7. Effects of olaparib or anticancer drugs on the inhibition of cell colony formation in KYSE70 cells.**

Cells were seeded onto 6-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to an anticancer drug for 2 weeks with or without 2.5  $\mu\text{M}$  olaparib ( $n = 1$ ). Cell colonies were stained with 0.1% methylene blue in 60% methanol. (A) or (B) Representative images of colonies. (C) or (D) Representative graph of colony area (%).

KYSE70 細胞において、オラパリブ (2.5  $\mu\text{M}$ ) 共存下の CDDP (0.5  $\mu\text{M}$ )、SN-38 (2.5 nM)、ドキソルビシン (40 nM) 及びテモゾロミド (5  $\mu\text{M}$ ) は、コントロールと比較してコロニー面積の顕著に低下させた (Figure 1-8A)。それらコロニー面積に対する画像解析の結果では、オラパリブ (2.5  $\mu\text{M}$ ) は、CDDP (0.5  $\mu\text{M}$ :  $F_{(3:6)}=41.76, P<0.001$ )、SN-38 (2.5 nM:  $F_{(3:6)}=248.8, P<0.001$ )、ドキソルビシン (40 nM:  $F_{(3:6)}=93.91, P<0.001$ ) 及びテモゾロミド (5  $\mu\text{M}$ :  $F_{(3:6)}=210.1, P<0.001$ ) のコロニー形成阻害作用を抗がん薬単独処置時よりも有意に増強し、*EXP* よりも低値を示した。一方、オラパリブによる 5-FU (1  $\mu\text{M}$ :  $F_{(3:8)}=22.34, P=0.14$ ) のコロニー形成阻害作用は、コントロールと同程度であり、ドセタキセル (40 nM:  $F_{(3:6)}=14.85, P=0.041$ ) では、抗がん薬単独時と比較して有意に増強が認められた。さらに、オラパリブ共存下の 5-FU 及びドセタキセルのコロニー形成阻害作用は、それぞれ *EXP* と同程度であった (Figure 1-8B)。

(A)





**Figure 1-8. Effects of olaparib on the inhibition of cell colony formation by anticancer drugs in KYSE70 cells.**

Cells were seeded onto 6-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to an anticancer drug for 2 weeks with or without 2.5  $\mu\text{M}$  olaparib. The concentrations of anticancer drugs are as follows: CDDP, 0.5  $\mu\text{M}$ ; SN-38, 2.5 nM; doxorubicin, 40 nM; temozolomide, 5  $\mu\text{M}$ ; 5-FU, 1  $\mu\text{M}$ ; docetaxel, 0.25 nM. Cell colonies were stained with 0.1% methylene blue in 60% methanol. Each bar represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). (A) Representative images of cell colonies. (B) Representative graph of colony area (%). Significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test ( $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  vs. control).

Miyamoto K., *et al.*, *Anticancer Res.* **2019**, 39, 1813-1820, Figure 3.

#### 第4節 考察

オラパリブは、食道がん細胞 KYSE70 及び KYSE140 細胞において濃度依存的な細胞増殖阻害作用を示し、特に KYSE140 細胞において高い感受性が認められた (Figure 1-2)。さらに、KYSE70 及び KYSE140 細胞においてオラパリブは、CDDP、SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセルの感受性を増強し (Figures 1-3 及び 1-4、Table 1-2)、特に CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性を顕著に増強し、その作用は KYSE70 細胞において相乗的であった (Figures 1-5、1-6 及び 1-8)。

PARP1 は、その酵素活性に依存して細胞の DNA 損傷応答 (DNA 修復機構の亢進及び DNA 修復関連因子の転写促進) や遺伝子転写の制御 (細胞増殖及び細胞生存シグナル) を調節することが知られている<sup>42)</sup>。またオラパリブは、PARP1 酵素活性を競合的に阻害する作用に加えて、PARP1 をアロステリックに阻害することが知られている<sup>61)</sup>。PARP 阻害薬による PARP1 のアロステリック阻害は、PARP1-DNA 複合体を安定化させ、DNA 上に PARP1 タンパク質を捕捉する作用を示す<sup>62)</sup>。DNA 上に捕捉された PARP1 タンパク質は、DNA ヌクレアーゼによりタンパク質-DNA 複合体が切除され、DNA 損傷を誘発することが知られている<sup>62)</sup>。特にオラパリブは、同じ PARP 阻害薬であるベリパリブと比較して、PARP1-DNA 捕捉作用が高く、強い細胞増殖阻害作用を示すことが報告されている<sup>63)</sup>。すなわち、食道がん細胞において、オラパリブは、PARP1 酵素活性の阻害作用並びに DNA 上への PARP1 捕捉作用により濃度依存的に細胞増殖阻害したと推測される。

The Cancer Cell Line Encyclopedia<sup>54)</sup> によれば、KYSE70 及び KYSE140 細胞は、それぞれ *BRCA1/2* 野生型及び *BRCA1* 変異型 (p.I1058V: ミスセンス突然変異, 1058 番目のイソロイシン→バリンへの変換) の食道がん細胞であるとされている。*BRCA1* の機能抑制は、卵巣がん細胞において相同組み換え修復の機能を低下させることにより、オラパリブの細胞増殖阻害作用を増強する。さらにその増殖阻害作用は、オラパリブ共存下のがん細胞に蓄積する染色体異常に起因する<sup>64, 65)</sup>。*BRCA1* は、がん抑制因子である p53<sup>66)</sup> や相同組み換え修復に必須である Rad51<sup>67)</sup> 並びに *BRCA2* と結合し複合体形成することで、DNA 損傷応答反応を誘導する<sup>68)</sup>。*BRCA1* における p.I1058V 変異は、*BRCA1* 及び Rad51 との結合部位に存在していること<sup>69)</sup>、さらに、*BRCA1* における p.I1058V 変異は、細胞における相同組み換え修復機能を低下させることが *in silico* により予測されている (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)<sup>70)</sup>。すなわち、オラパリブが KYSE70 細胞と比較して KYSE140 細胞において高い感受性を示した要因には、*BRCA1* 変異 (p.I1058V) による相同組み換え修復の機能低下が関与すると考えられる。

オラパリブは、PARP1 依存性の DNA 修復機構の阻害<sup>52)</sup> や PARP1 の DNA 上への捕捉作用に加え<sup>52)</sup>、S 期における DNA 合成の阻害<sup>71)</sup>、ゲノムストレスの増加による G2/M 期の細胞周期の停止<sup>72)</sup>、AKT シグナルの阻害を介した抗アポトーシス作用の抑制<sup>73)</sup> など様々な作用を細胞に引き起こす。大腸がん細胞において、5-FU は DNA 複製を阻害することで細胞毒性を示すこと<sup>74)</sup>、また乳がん細胞においてドセタキセルは、AKT 経路の活性化により感受性が低下することが報告されている<sup>75)</sup>。さらに、肺がん細胞、乳がん細胞、頭頸部がん細胞及び多形性膠芽腫細胞において、それぞれ CDDP<sup>76)</sup>、ドキソルビシン<sup>77)</sup>、SN-38<sup>78)</sup> 及びテモゾロミド<sup>79)</sup>

による DNA 損傷を誘発することが認められている。すなわち、食道がん細胞においてオラパリブは、PARP1 活性を誘発する抗がん薬の感受性を増強させることが示唆された。

PARP1 酵素活性の阻害は、DNA 損傷を誘発する典型的な抗がん薬であるメタンスルホン酸メチルやヒドロキシウレアの細胞毒性を相乗的に増強する<sup>80, 81)</sup>。さらに、CDDP 及びドキソルビシンは、子宮頸がん細胞及び乳がん細胞において DNA 損傷の誘発することで、それぞれ PARP1 発現及び活性を増大させること<sup>82, 83)</sup>、SN-38 が誘発する DNA 損傷は、PARP1 活性に依存した DNA 末端の切り出しにより修復されること<sup>84)</sup>、テモゾロミドは、アデニンの N3 やグアニンの N7 をメチル化し、その DNA 損傷は、PARP1 依存的な塩基除去修復により修復が行われる<sup>85)</sup>。すなわち、食道がん細胞において、オラパリブは CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドが誘発する PARP1 依存性の DNA 損傷修復を阻害するため、相乗的な感受性増強効果を示すと考えられる。

5-FU は細胞内にてリン酸化及び代謝されることで、5-fluoro-2'-deoxyuridine 及び 2'-deoxy-5-fluorouridine 変換され、それぞれ DNA 及び RNA 合成を阻害する<sup>86)</sup>。卵巣がん細胞において、5-FU の活性代謝産物である 5-fluoro-2'-deoxyuridine は、単独処置により DNA 損傷を誘発するとともに、オラパリブ及びベリパリブが感受性を相乗的に増強する<sup>87)</sup>。その一方で、5-FU においては、単独処置により DNA 損傷を細胞に誘発せず、PARP 阻害薬による相乗的な感受性増強作用が認められていない<sup>87)</sup>。つまり、卵巣がん細胞において 5-FU は、2'-deoxy-5-fluorouridine でなく主に 5-fluoro-2'-deoxyuridine に変換されることで細胞増殖阻害作用を示していると推察される。またドセタキセルと同じ微小管脱重合阻害剤であるパクリタキセルは、メタンスルホン酸メチルと比較して、細胞に対する DNA 損傷をほとんど誘発しない<sup>88)</sup>。すなわち、*BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞において 5-FU は、DNA 合成を阻害する代謝物へ変換されないため、ドセタキセルは、DNA 損傷を誘発する機序を有していないため、オラパリブは、これら抗がん薬の感受性を相乗的に増強しなかったと考えられる。

*BRCA1* 変異を有する KYSE140 細胞では、オラパリブは DNA 損傷を誘発する抗がん薬との併用において、Fa が高値を示す場合を除き相乗作用を示さなかった (Figure 1-6)。 *BRCA1* 野生型の前立腺がん細胞において、オラパリブは CDDP 及びドキソルビシンの感受性の相乗的な増強を生じる<sup>89, 90)</sup>。その一方で、*BRCA1* 変異型の前立腺がん細胞では、CDDP 及びドキソルビシンと同じトポイソメラーゼ II 阻害薬であるエトポシドとオラパリブの併用は、相乗作用を示さなかった<sup>58)</sup>。一方 *BRCA1* は、p53 結合タンパク質 1 (53BP1) と共役することにより DNA 修復エラー頻度の高いマイクロホモロジー末端結合を促進する<sup>91)</sup>。さらに、我々は *BRCA1/2* 野生型である KYSE70 細胞において、オラパリブは DNA 損傷を誘発する抗がん薬に対して 53BP1 を介した DNA 損傷応答に依存し相乗作用を示す可能性を報告している<sup>92)</sup>。すなわち、これらのことを考え併わせると、*BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞においてオラパリブは、*BRCA1* を介した経路により DNA 損傷を誘発する抗がん薬の感受性を相乗的に増強する可能性が示唆されている。

オラパリブは、乳がん耐性タンパク質 (BCRP) 及び P 糖タンパク質 (p-gp) の基質/阻害剤である<sup>93)</sup>。P-gp 及び BCRP は、ATP 結合カセット輸送体であり、細胞内に蓄積した異物を細

胞外へ排出する薬物トランスポーターとしての役割を有する<sup>94)</sup>。これらトランスポーターは、抗がん薬の細胞内蓄積量に影響を及ぼし、高発現することで、抗がん作用を減弱させることが知られている<sup>95)</sup>。本研究で使用した6種類の抗がん薬について、5-FU及びドキソルビシンはBCRPの基質であり<sup>96)</sup>、ドセタキセル及びドキソルビシンはP-gpの基質である<sup>97,98)</sup>。すなわち、食道がん細胞でのオラパリブによる抗がん薬の感受性増強作用には、薬力学的な機序のみならず、抗がん薬の細胞内蓄積量の増加といった薬物動態学的な機序も関与している可能性が考えられる。KYSE70細胞においてオラパリブは、5-FU及びドセタキセルに対する感受性を相加的に増強させ、ドキソルビシンに対する感受性を相乗的に増強した(Figures 1-5及び1-8)。したがって、オラパリブによるこれら抗がん薬の感受性増強作用には、薬物の細胞内濃度の変化が一部関与すると考えられる。そのため今後、薬物の細胞内蓄積量の評価などの詳細な検討が必要である。

以上よりオラパリブは、食道がんにおいても*BRCA1*変異型の食道がん細胞において高い感受性を示した。さらにオラパリブは、*BRCA1*野生型及び変異型の食道がん細胞において、CDDP、ドキソルビシン、SN-38、テモゾロミド、5-FU及びドセタキセルの感受性を増強し、*BRCA1*変異型ではなく*BRCA1/2*野生型の食道がん細胞においてCDDP、ドキソルビシン、SN-38及びテモゾロミドの感受性を相乗的に増強することが示された。

## 第5節 小括

本章では、食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響について検討した結果、次の知見を得た。

食道がん細胞においてオラパリブは、

- 1 濃度依存的に細胞増殖阻害作用を示し、特に *BRCA1* 変異を有する KYSE140 細胞は *BRCA1/2* 野生型である KYSE70 細胞と比較して高い感受性を示した。
- 2 *BRCA1/2* 変異の有無に関わらず CDDP、ドキソルビシン、SN-38、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセルの感受性を増強した。
- 3 特に DNA 損傷を誘発する抗がん薬である CDDP、ドキソルビシン、SN-38 及びテモゾロミドの感受性を増強し、その作用は *BRCA1/2* 野生型の KYSE70 細胞において相乗的であった。

## 第2章 *BRCAl/2* 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる DNA 損傷応答を介した抗がん薬感受性の増強機序の解明

### 第1節 緒言

第1章では、*BRCAl/2* 変異が患者の数%と限られる食道がんにおいて、*BRCAl/2* 野生型であっても PARP 阻害薬と DNA 損傷を誘発する抗がん薬を組み合わせることにより良好な治療効果を得られる可能性を明らかにした。

PARP1 は、1 本鎖損傷に対する DNA 修復機構である塩基除去修復などの修復経路に加え、相同組み換え修復の補完的な DNA 二本鎖損傷修復経路である代替的末端結合を促進する<sup>99)</sup>。さらに PARP1 はその酵素活性により DNA 損傷部位への Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体などの DNA 修復因子を呼び込むことで、相同組み換え修復の開始に関与する<sup>42)</sup>。したがって、PARP1 を標的とするオラパリブは、細胞における様々な DNA 修復反応に影響を及ぼすと考えられる。また食道がん細胞において、DNA 損傷マーカーである核内リン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX) 集積量の増加と、オラパリブ自身の感受性の増強が相関することが報告されている<sup>43)</sup>。すなわち、*BRCAl/2* 野生型の食道がん細胞においてオラパリブによる PARP1 酵素活性の阻害は、DNA 損傷応答反応を抑制することにより CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの感受性を相乗的に増強すると推測される。

PARP 阻害薬は、相同組み換え修復能力が低下している *BRCAl/2* 変異型のがん細胞において、DNA 修復エラー頻度の高い古典的非相同末端結合を亢進させ、強い細胞増殖阻害作用を示す<sup>26)</sup>。その一方で、相同組み換え修復は、修復可能な期間や能力に限られるため<sup>100)</sup>、*BRCAl/2* 野生型のがん細胞において過剰な DNA 損傷が誘導された場合には、修復能力の高い古典的非相同末端結合が亢進する<sup>101)</sup>。すなわち、*BRCAl/2* 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの相乗的な感受性増強作用にも、古典的非相同末端結合の亢進が関与することが予想される。

そこで本章では、*BRCAl/2* 野生型の KYSE70 細胞におけるオラパリブによる PARP1 の DNA 損傷応答に対する阻害作用による CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの相乗的な感受性増強機序を明らかにするため *in vitro* にて検討した。

## 第2節 実験方法

### 1. 試薬

DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) 阻害薬である NU7441 は、富士フイルム和光純薬から購入した。CDDP、SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU、ドセタキセル及びドセタキセルは、第1章、第2節で述べたものを使用した。

### 2. 細胞

ヒト食道がん細胞である KYSE70 細胞は、第1章、第2節で述べたものを使用した。

### 3. 細胞培養液の調製

細胞の培養液には、第1章、第2節で述べた D-MEM を用いた

### 3. 細胞培養法

細胞培養は、第1章、第2節で述べた方法にて行った。

### 4. ウェスタンブロット

#### 4-1. 薬液の調製

使用した薬物は、第1章、第2節で述べた方法にて溶解した。処置濃度は、Table 1-2 における KYSE70 細胞に対する各薬物の IC<sub>50</sub> 値付近になるよう設定し、それぞれ、5-FU: 5 μM、CDDP: 5 μM、ドセタキセル: 2 nM、ドキソルビシン: 100 nM、SN-38: 50 nM、テモゾロミド: 100 μM 及びオラパリブは 10 μM とした。

#### 4-2. 細胞播種及び抗がん薬の添加

KYSE70 細胞を 2×10<sup>6</sup> cells/well/5 mL の細胞密度で 60 mm ディッシュ (AGC テクノグラス株式会社) に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 47 時間培養した。その後、培養液を吸引除去し、0.1%DMSO 含有 D-MEM 又はオラパリブ (10 μM) 含有培養液を添加した。そして、オラパリブ添加から 1 時間後に再び培養液を除去し、各薬物を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 24 時間培養した。

#### 4-3. 試薬調製

##### 4-3-1. 6×サンプルバッファー

Tris-HCl (富士フイルム和光) 6.06 g を超純水に溶解後、0.1M HCl にて pH 6.8 とし、100 mL にて溶解した 0.5 M Tris HCl (pH 6.8) 350 μL、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS、富士フイルム和光) 0.1 g、β-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich) 300 μL、グリセロール (富士フイルム和光) 300 μL、1%ブロモフェノールブルー (富士フイルム和光) 50 μL を混合し調製した。調製後は室温にて保存した。

#### 4-3-2. 1×泳動バッファー

Tris-HCl 30.3 g 及びグリシン (富士フイルム和光純薬) 144.1 g を超純水にて 1L にメスアップすることで 10×泳動バッファーを作成し、その 300 mL に SDS 3 g を溶解して 3L とすることで調製した。調製後は室温にて保存した。

#### 4-3-3. ブロッキングバッファー

Tris-HCl 9.084 g、グリシン 43.24 g、メタノール (ナカライテスク) 0.6 L、超純水 2.4 L を溶解し混合することで調製した。調製後は室温にて保存した。

#### 4-4. 検体の回収及び調製

CelLytic™-M Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) 1 mL に対し、DMSO に溶解した 10 mg/mL フッ化フェニルメチルスルホニル (富士フイルム和光純薬) を 5 µL を加え、細胞溶解液を調製した。細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、氷冷 PBS を添加しスクレイパーにて細胞を剥離した。得られた細胞懸濁液を 4°C、1,700×g で 5 分間遠心分離 (Model 6200、株式会社クボタ) した。その後、上清を吸引除去し、細胞ペレットに対して調製した Lysis 試薬 50 µL を添加し、細胞を溶解させた。得られた細胞懸濁液は、10 分間氷冷下にて静置し、4°C、9100×g、15 分間遠心分離した後に、その上清を回収した。回収した上清におけるタンパク量は、プロテインアッセイブラッドフォード試薬 (富士フイルム和光純薬) を用いてブラッドフォード法<sup>101)</sup>にて測定した。その後、各細胞懸濁液のタンパク質量を細胞溶解液で 2 µg/µL に希釈した。希釈した検体は、調製した 6×サンプルバッファーとそれぞれ 5 : 1 の割合にて混合した後、95°C、5 分間処置 (My cycler、Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) することで熱変性処理を行い以降の実験に用いた。

#### 4-5. 電気泳動

7.5% (PAR) または 10% (β-actin) の SuperSep™ Ace (富士フイルム和光純薬) を用い、ゲル一枚当たり 20 mA の定電流を AE-8135 マイパワーII 300 (アトー株式会社、Tokyo、Japan) を用いて 1×泳動バッファー内で通電することにより電気泳動を行った。電気泳動時のタンパク質量は、PAR の検出に 20 µg 及びβ-actin の検出に 10 µg とした。

#### 4-6. ブロッキング及びブロッキング

電気泳動終了後、冷却しながら POWER PAC 1000 (Bio-Rad Laboratories) を用いて 100 V の低電圧にて 1 時間通電することにより、あらかじめメタノールにより 5 分間親水化処置を行ったポリフッ化ビニリデン膜 (Clear Trans® SP PVDF Membrane、富士フイルム和光純薬) に転写した。その後、1% スキムミルク (富士フイルム和光純薬) 含有 PBS-T (0.1% Tween®20 含有 PBS) を用いて、転写後の膜を 37°C、1 時間振盪することによりブロッキングを行った。

#### 4-7. 抗体反応及び検出

一次抗体は、Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution I (東洋紡株式会社、Osaka、Japan) を希釈液として用い調製したマウス由来抗ヒト PAR 抗体 (Catalog No. 4335-MC-100-AC、Clone No.10HA、1000: 1、TREVIGEN、Gaithersburg、MD、USA) 及び PBS-T を希釈液として調製したマウス由来抗ヒトβ-actin 抗体 (Catalog No. 010-27841、Clone No. 2F3、1000: 1、富士フイルム和光純薬) を使用した。PAR 及びβ-actin における二次抗体は、それぞれ Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution II (東洋紡株式会社) 及び PBS-T を希釈液として用い調製したペルオキシダーゼ標識抗マウスモノクローナル IgG 抗体 (PAR、10000: 1、β-actin、25000: 1、GE Healthcare) を使用した。ブロッキング後のメンブレンを PBS-T で洗浄し、4°C にて一次抗体を一晩反応させた。メンブレンを PBS-T で洗浄した後、ImmunoStar® LD (富士フイルム和光純薬) に浸し、5 分間静置することで、HRP 反応を起こした。HRP 反応の検出は、VersaDOC™5000 (Bio-Rad Laboratories) により検出した。

### 5. 細胞免疫蛍光染色法

#### 5-1. 薬液の調製

薬物は第 1 章、第 2 節に述べた方法を用いて溶解した。各抗がん薬の濃度は、それぞれ CDDP: 1、5 及び 10 μM、SN-38: 20、50 及び 100 nM、ドキシソルビシン: 200、500 及び 1000 nM、テモゾロミド: 100、500 及び 1000 μM、5-FU: 1、5 及び 10 μM 及びドセタキセル: 1、5 及び 10 nM とし、オラパリブは 5 μM となるようにした。なお抗がん薬の処置濃度は、Figure 1-3 における KYSE70 細胞における細胞増殖阻害実験に使用した最高濃度をもとに設定した。

#### 5-2. 細胞播種及び抗がん薬の添加

KYSE70 細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well/ 100 μL の細胞密度で黒色 96well plate (Corning) に細胞播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 24 時間培養した。その後、培養液を吸入除去し、調製した薬液を 100 μL ずつ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にてさらに 24 時間培養した。

#### 5-3. 細胞固定及び透過処理

黒色 96well plate の D-MEM を吸引除去し、細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した。その後、4% パラホルムアルデヒド (富士フイルム和光純薬) 含有 PBS を添加し、氷冷下にて 15 分静置することで細胞を固定した。その後細胞を 2 回洗浄し、0.2% ポリオキシレン (10) オクチルフェニルエーテル (富士フイルム和光純薬) 含有 PBS を添加し室温で 30 分静置した。

#### 5-4. 免疫蛍光染色

細胞を PBS で 2 回洗浄した後、1% ウシ血清由来アルブミン (富士フイルム和光純薬) 含有 PBS-T を添加し、室温で 60 分間静置し、ブロッキングを行った。次に、細胞を PBS-T で 2 回洗浄した後、1 次抗体として PBS-T を用いて 200 倍に希釈した抗 γH2AX (ser139)、clone JBW301 (Merck Millipore、Billerica、MA、USA) を 40 μL/well ずつ添加し、4°C にて一晩反応させた。

その後細胞を PBS-T で 2 回洗浄し、二次抗体として PBS-T を用いて 500 倍希釈した抗マウス IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、Alexa Fluor<sup>®</sup>488 Conjugate (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を 40  $\mu$ L/well ずつ添加し、室温で 60 分間静置した。

#### 5-5. 蛍光測定

細胞を PBS-T で 2 回洗浄した後、PBS-T にて 0.2  $\mu$ g/mL に希釈した DAPI を添加し、室温で 10 分間静置することで細胞核を染色した。次に、細胞を PBS-T で 1 回洗浄した後、蛍光退色防止剤として 2% 1,4-ジアザビスクロ[2.2.2]オクタン (Sigma-Aldrich) 含有 PBS 及びグリセロール (富士フイルム和光純薬) を 1:8 で混合した溶液を 1 well 当たり、1、2 滴ずつ添加した。作成した検体は、細胞イメージング&アナリシス機器 Operetta (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて、40 倍の倍率にて蛍光画像データを取得した。その後、Harmony software (PerkinElmer) を用いて画像内の DAPI 染色領域 (細胞核) を認識し、各細胞核内に存在する Alexa Fluor<sup>®</sup>488 の蛍光強度を評価し、各 96 穴の平均蛍光強度を算出した。各検体における核内  $\gamma$ H2AX の集積量は、1 well あたり 100 個以上の細胞を測定し、それら細胞における Alexa Fluor<sup>®</sup>488 の平均蛍光強度を算出した。

### 6. 細胞増殖阻害実験

#### 6-1. 薬液調製

NU7441 は DMSO に溶解した。オラパリブ、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドは、第 1 章、第 2 節に述べた方法を用いて溶解した。さらに薬液は最高濃度から、順次 2 倍 (CDDP、SN-38、ドキソルビシン、5-FU、ドセタキセル及び NU7441) 系列希釈または、3 倍 (テモゾロミド) 系列希釈することで、濃度が 9 段階になるようにした各抗がん薬の最高濃度はそれぞれ、CDDP: 20  $\mu$ M、SN-38: 25 nM、ドキソルビシン: 1000 nM、テモゾロミド: 1000  $\mu$ M、5-FU: 40  $\mu$ M、ドセタキセル: 10 nM、オラパリブは 5  $\mu$ M 及び NU7441: 100  $\mu$ M とした。なお抗がん薬及びオラパリブと NU7441 併用時における処置濃度は 0.5  $\mu$ M とした。各抗がん薬の処置濃度は、Figure 1-3 における KYSE70 細胞の細胞増殖阻害実験に使用した最高濃度をもとに設定し、NU7441 の併用時における濃度は、KYSE70 細胞に対し増殖阻害作用を示さず、DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) の機能を阻害することが報告されている濃度を用いた<sup>102)</sup>。

#### 6-2. 細胞播種及び薬液の添加

第 1 章、第 2 節に述べた方法にて行った。

#### 6-3. 生細胞数の測定

第 1 章、第 2 節に述べた方法にて行った。

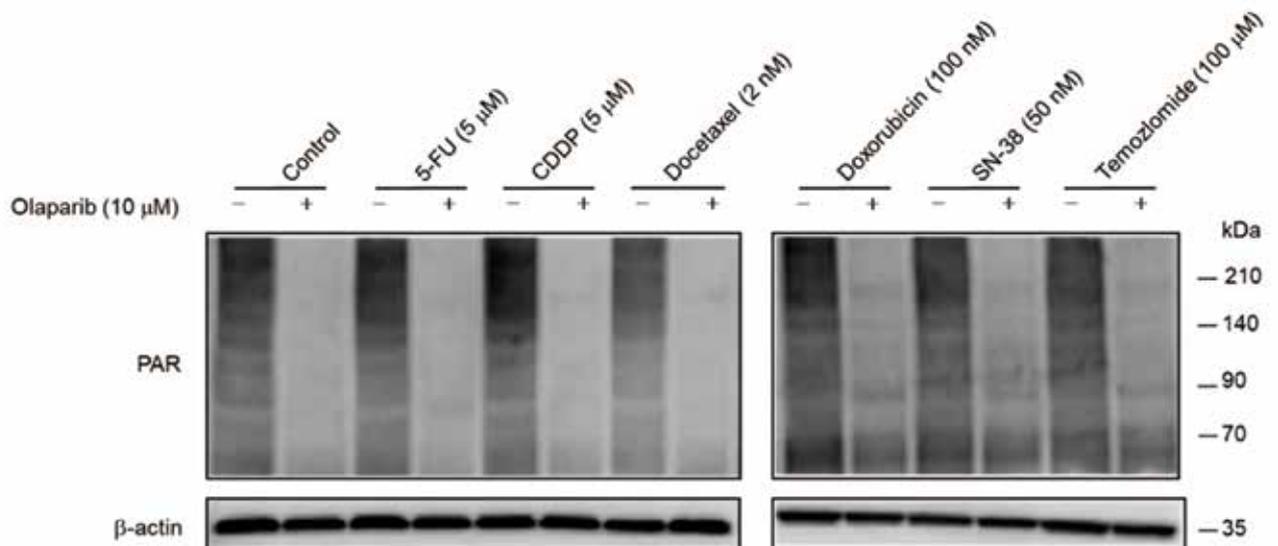
### 7. 統計学的処理

全ての統計解析は Graph Pad Prism (Ver. 8.31、エムデーエフ) を使用して行った。得られた実験値は全て平均値  $\pm$  標準誤差 (S.E.) で表示した。多群間の比較には、Bartlett 検定により分散を評価し、等分散の場合は、一元配置分散分析後に Dunnett 検定を、反復測定二元配置分散分析の後に Tukey 検定を適用し、非等分散の場合は Kruskal-Wallis 検定を行った後に Steel-Dwass の多重比較を適用した。なお全ての検定において、危険率 5%未満 (両側) を有意差ありとした。

### 第3節 結果

#### 1 PARP 活性に及ぼすオラパリブの影響

KYSE70 細胞において PARP 活性の指標である PAR タンパク質の発現量に及ぼすオラパリブの影響を検討した。その結果、KYSE70 細胞において抗がん薬処置の有無に関わらず 70-210kDa の PAR タンパク質の発現が認められた。オラパリブは、抗がん薬の共存下及び非共存下のいずれにおいても 70-210kDa の PAR タンパク質の発現を顕著に減少させた (Figure 2-1)。

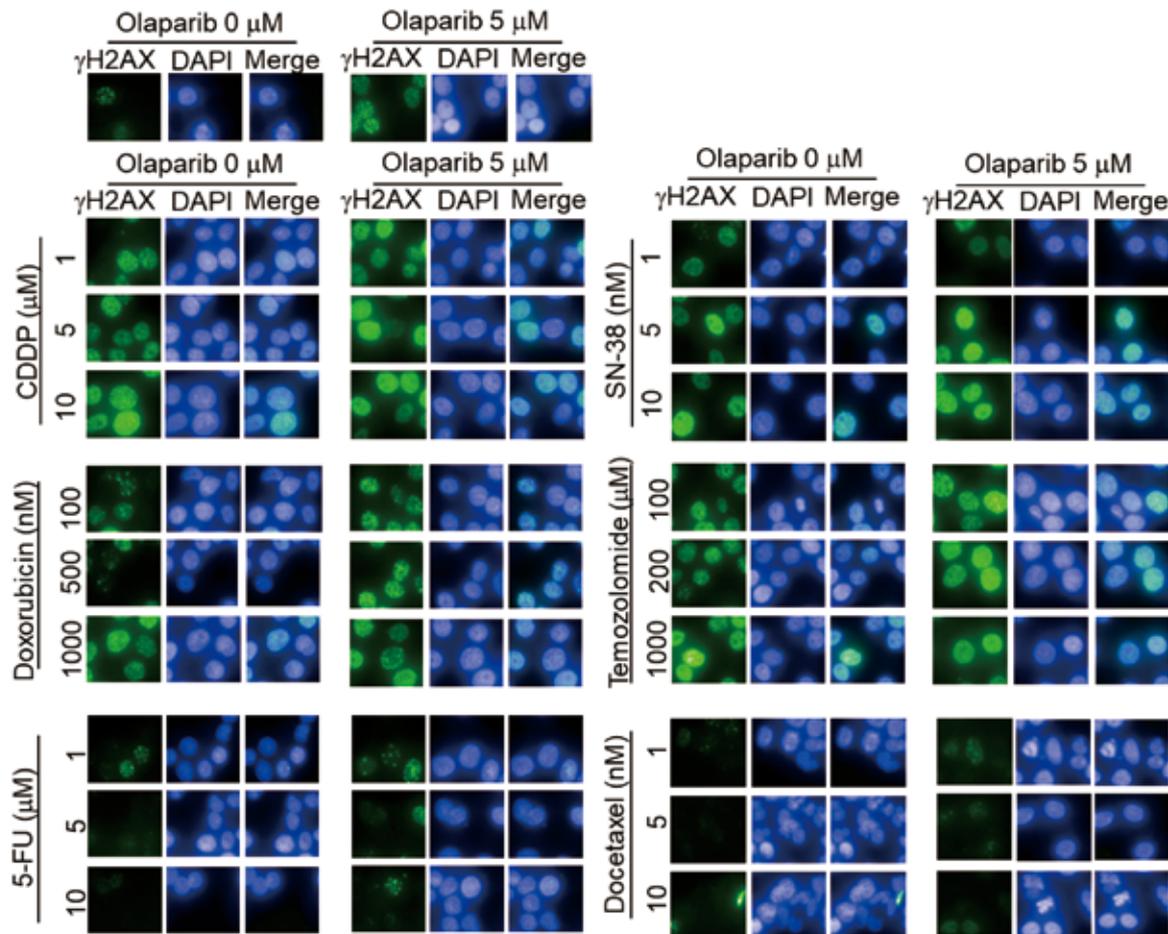


**Figure 2-1. Effect of olaparib on the PAR levels in anticancer drug-treated KYSE70 cells.**

Cells were seeded onto 60-cm dishes. After culturing for 47 h, cells were treated with or without 10 μM olaparib for 1 h, then exposed to an anticancer drugs for 24 h with or without 10 μM olaparib. Total protein was extracted from whole cell lysates and western blotted for PAR and β-actin (reference) proteins. Miyamoto K., *et al.*, *Anticancer Res.* **2019**, 39, 1813-1820, Figure 2.

## 2 抗がん薬が誘導する核内 $\gamma$ H2AX の集積に及ぼすオラパリブの影響

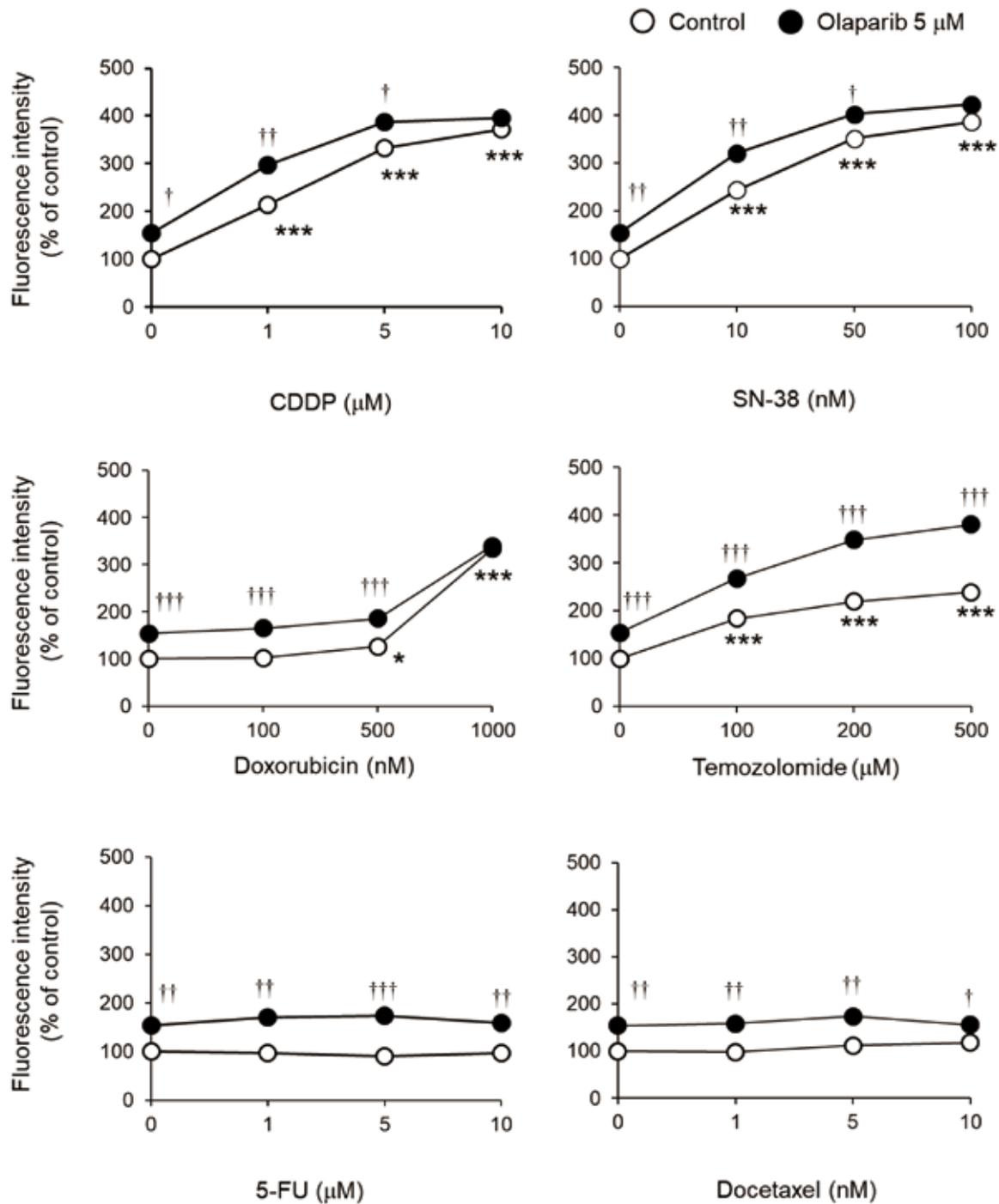
PARP1 は DNA 一本鎖及び二本鎖損傷修復を促進するため、抗がん薬共存下における DNA 損傷マーカーである核内 $\gamma$ H2AX の集積に及ぼすオラパリブの影響を検討した。その結果、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドにおいて DAPI(細胞核) 染色された領域に、顕著な $\gamma$ H2AX の免疫活性が認められ、オラパリブ処置によりその増強が確認できた (Figure 2-3)。一方、5-FU 及びドセタキセルに関しては、細胞核領域での $\gamma$ H2AX の免疫活性は、オラパリブ処置群においてのみ検出された (Figure 2-2)。



**Figure 2-2. Representative images of  $\gamma$ H2AX accumulation caused by anticancer drugs with or without olaparib in KYSE70 cells.**

Cells were seeded onto black 96-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to an anticancer drug concentrations without or with 5  $\mu$ M olaparib for 24 h. Cells were immunostained for  $\gamma$ H2AX and its accumulation in the nucleus was examined by Hamony software after counterstaining with DAPI.

Figure2-2 に示した画像における核内 $\gamma$ H2AX 蛍光強度を定量解析した結果、KYSE70 細胞においてオラパリブ (5  $\mu$ M:  $F_{(3:6)} = 7.43$ ,  $P < 0.001$ )、CDDP (1, 5 及び 10  $\mu$ M:  $F_{(3:6)} = 7.43$ ,  $P < 0.001$ )、SN-38 (10, 50 及び 100 nM:  $F_{(3:6)} = 3.51$ ,  $P < 0.001$ )、ドキソルビシン (500 及び 1000 nM:  $F_{(3:6)} = 21.02$ , それぞれ  $P = 0.01$  及び  $P < 0.001$ ) 及びテモゾロミド (100, 200 及び 1000  $\mu$ M:  $F_{(3:6)} = 20.55$ ,  $P < 0.001$ ) は、核内  $\gamma$ H2AX の集積を顕著に増大させた。一方、5-FU (1, 5 及び 10  $\mu$ M:  $F_{(3:16)} = 73.67$ , それぞれ  $P = 0.99$ ,  $0.91$  及び  $0.99$ ) 及びドセタキセル (1, 5 及び 10 nM:  $F_{(7:16)} = 50.24$ , それぞれ  $P = 0.99$ ,  $0.67$  及び  $0.32$ ) は、KYSE70 細胞における核内  $\gamma$ H2AX の集積を誘発しなかった。さらに、オラパリブ (5  $\mu$ M) と CDDP (1 及び 5  $\mu$ M:  $F_{(3:6)} = 7.43$ , それぞれ  $P < 0.001$  (1  $\mu$ M) 及び  $P = 0.0011$ )、SN-38 (10 及び 50 nM:  $F_{(3:6)} = 3.51$ , それぞれ  $P = 0.0015$  及び  $0.013$ ) 及びドキソルビシン (500 nM:  $F_{(3:6)} = 21.02$ ,  $P < 0.001$ ) の共存は、最大濃度以外の抗がん薬における核内  $\gamma$ H2AX の集積を有意に増強した。しかしながら、オラパリブは、テモゾロミド (100, 200 及び 500  $\mu$ M:  $F_{(3:6)} = 20.55$ ,  $P < 0.001$ ) との共存において、最高濃度も含めテモゾロミドが誘発する核内  $\gamma$ H2AX の集積を有意に増強した。一方、オラパリブ共存下における 5-FU (1, 5 及び 10  $\mu$ M:  $F_{(3:6)} = 2.51$ , それぞれ  $P = 0.48$ ,  $0.33$  及び  $0.99$ ) 及びドセタキセル (1, 5 及び 10 nM:  $F_{(3:6)} = 50.24$ , それぞれ  $P = 0.99$ ,  $0.25$  及び  $0.99$ ) が誘導する核内  $\gamma$ H2AX の蓄積はオラパリブと同程度であった。したがって KYSE70 細胞において、オラパリブはテモゾロミド濃度依存的に誘導する核内  $\gamma$ H2AX の集積を濃度依存的に増大させ、CDDP、SN-38 及びドキソルビシンにおいては、誘導する核内  $\gamma$ H2AX 蓄積量の相加的な増強が認められた (Figure 2-3)。



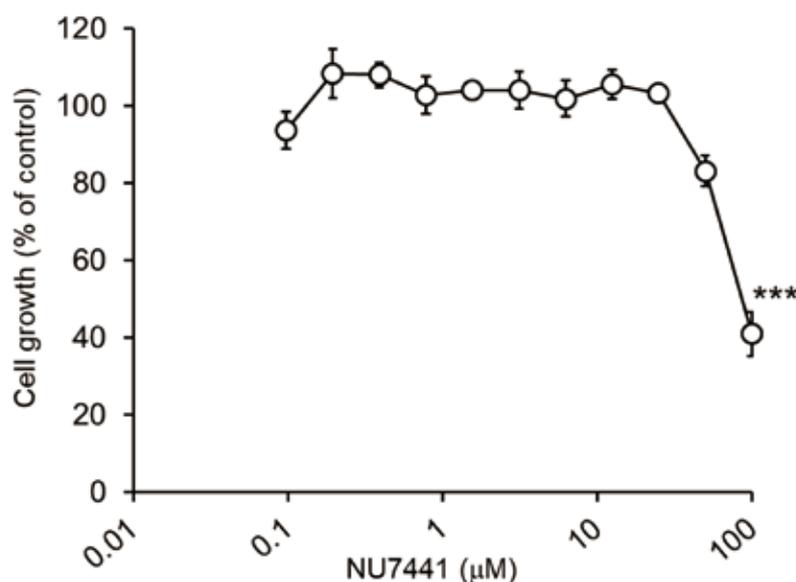
**Figure 2-3. Effects of olaparib on the  $\gamma$ H2AX accumulation caused by anticancer drugs in KYSE70 cells.**

Nuclear  $\gamma$ H2AX fluorescence intensity was obtained based on the results show anticancer drugs with or without olaparib in Figure 2-2. Each point represents the mean  $\pm$  SE (n=3). Error bars are shown behind the symbols. Significant differences were determined by repeated measures two-way ANOVA followed by Tukey's test (\* $P$  < 0.05, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control, † $P$  < 0.05, †† $P$  < 0.01, ††† $P$  < 0.001 vs. anticancer drug only).

Miyamoto K., *et al.*, *Anticancer Res.* **2019**, 39, 1813-1820, Figure 4.

### 3 オラパリブ共存下の抗がん薬感受性に及ぼす DNA-PK 阻害薬の影響

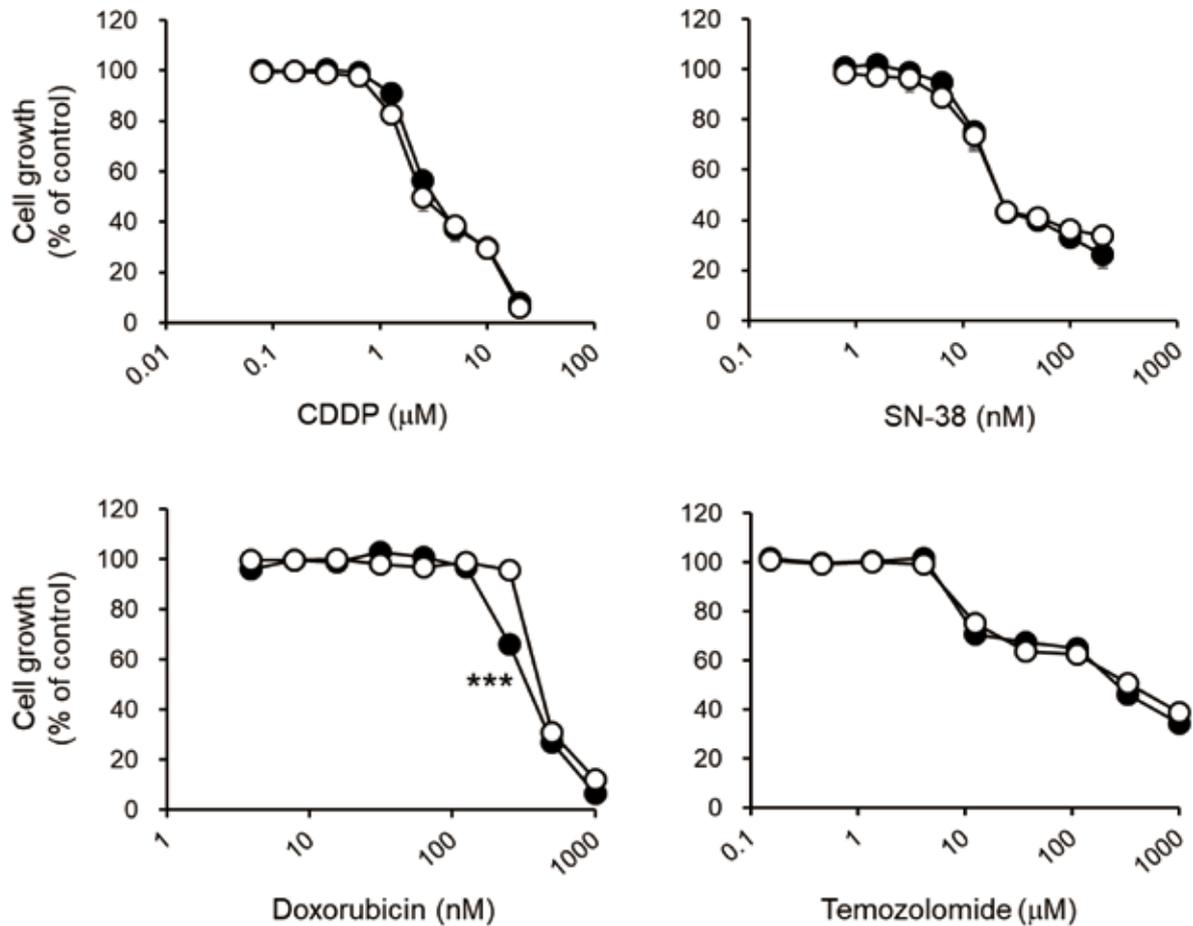
*BRCA1/2* 変異型のがん細胞に対するオラパリブの細胞増殖抑制作用は、DNA-PK が中心的な役割を担う DNA 修復エラー頻度の高い古典的非相同末端結合の亢進に依存する<sup>22)</sup>。そのため本研究では、*BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞における抗がん薬感受性の相乗的な増強効果に、古典的非相同末端結合の亢進が関与すると考えた。そこで DNA-PK 阻害薬である NU7441 の使用濃度について検討したところ、KYSE70 細胞において、100  $\mu$ M の NU7441 ( $F_{(11:36)} = 18.09$ ,  $P < 0.001$ ) における細胞増殖阻害作用が認められ、100  $\mu$ M 以下の NU7441 は、細胞増殖に影響しなかった (Figure 2-4)。



**Figure 2-4. Effects of DNA-PK inhibitor on cell growth in KYSE70 cells.**

Cells were seeded onto 96-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to Cell viability was determined using the CellQuanti-Blue Cell Viability Assay Kit. Each point represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Error bars are shown behind the markers. Significant difference of cell growth curve were determined by one-way ANOVA followed by Dunnett test (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs. control).

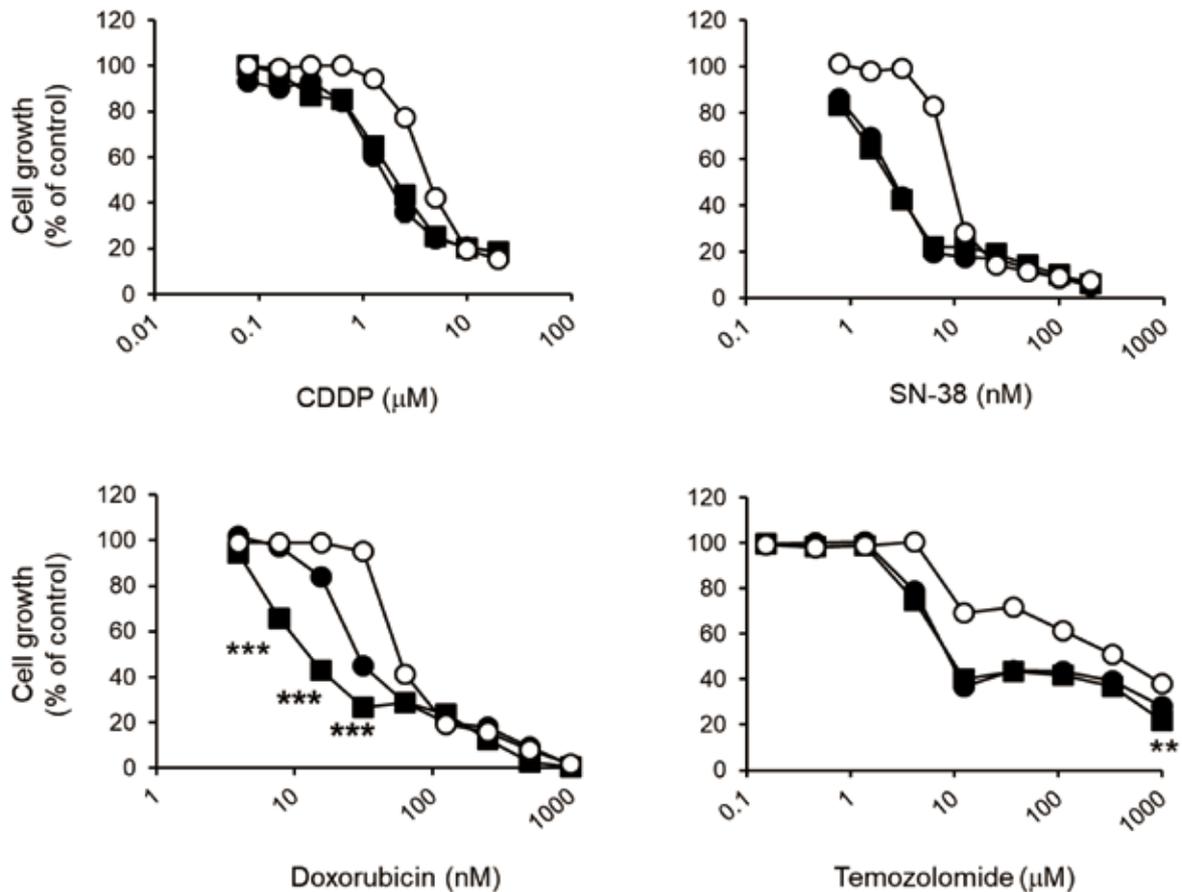
抗がん薬の細胞増殖阻害作用へ及ぼす DNA-PK 阻害薬 NU7441 の影響を検討したところ、KYSE70 細胞において 0.5  $\mu\text{M}$  の NU7441 はドキソルビシン ( $F_{(9;27)} = 35.1$ ,  $P < 0.001$ ) の細胞増殖阻害曲線を低濃度側へシフトさせたものの、CDDP、SN-38 及びテモゾロミドの細胞増殖阻害作用には影響を及ぼさなかった (Figure 2-5)。



**Figure 2-5. Effects of NU7441 on cell growth inhibition by anticancer drugs in KYSE70 cells.**

Cells were seeded onto 96-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to an anticancer drugs without (○) or with 0.5  $\mu\text{M}$  NU7441 (●) for one week. Cell viability was determined using the CellQuant-Blue Cell Viability Assay Kit. Each point represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Error bars are shown behind the symbols. Significant difference of cell growth curve were determined by repeated measures two-way ANOVA followed by Tukey's test (\*\* $P < 0.001$  vs. anticancer drug only at the indicated concentrations in KYSE70 cells).

オラパリブによる抗がん薬の相乗的な感受性増強作用に及ぼす DNA-PK 阻害薬 NU7441 の影響は、KYSE70 細胞において 0.5  $\mu\text{M}$  の NU7441 は、オラパリブ共存下における CDDP、SN-38 及びテモゾロミドの細胞増殖阻害曲線に影響しなかったものの、オラパリブ共存下におけるドキシソルビシン (3.91、7.81、15.63 及び 31.25 nM:  $F_{(9;27)} = 44.03$ ,  $P = 0.033$  (3.91) 及び  $P < 0.001$  (7.81、15.63 及び 31.25 nM)) の細胞増殖阻害曲線をさらに低濃度側へシフトさせた (Figure 2-6)。



**Figure 2-6. Effects of NU7441 on cell growth inhibition by anticancer drugs with or without olaparib in KYSE70 cells.**

Cells were seeded onto 96-well plates. After culturing for 24 h, cells were exposed continuously to the anticancer drugs without (○) or with 5  $\mu\text{M}$  olaparib (●), with olaparib plus 0.5  $\mu\text{M}$  NU7441 (■) for one week. Cell viability was determined using the CellQuanti-Blue Cell Viability Assay Kit. Each point represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Error bars are shown behind the symbols. Significant difference of cell growth curve were determined by repeated measures two-way ANOVA followed by Tukey's test (\*\* $P < 0.001$  vs. anticancer drug plus olaparib 5  $\mu\text{M}$  at the indicated concentrations).

Miyamoto K., *et al.*, *Anticancer Res.* **2019**, 39, 1813-1820, Figure 5.

#### 第4節 考察

オラパリブは、KYSE70 細胞において、抗がん薬の共存下及び非共存下における PAR タンパク質を抑制した (Figure 2-2)。さらにオラパリブは、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドが誘導する核内 $\gamma$ H2AX の集積量を有意に増大させた (Figure 2-4)。しかしながら、DNA-PK 阻害薬である NU7441 は、オラパリブによるこれら抗がん薬の感受性増強効果を減弱しなかった (Figure 2-6)。したがって、*BRC1/2* 野生型である食道がん細胞におけるオラパリブによる抗がん薬の相乗的な感受性増強作用には、PARP1 活性の抑制による DNA 損傷の増大に起因すると推察される。

膀胱がん細胞における PARP の活性は、細胞周期の G1 期から S 期への移行に必要なサイクリン E の発現を増大させ細胞増殖を促進する<sup>103, 104</sup>)。つまり、抗がん薬非存在下の食道がん細胞における PAR タンパク質の発現誘導は、細胞における PARP1 依存性の細胞増殖を示している。一方、CDDP、SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセルは、それぞれ肝臓がん細胞<sup>105</sup>)、子宮頸がん細胞<sup>106</sup>)、ヒト胎児腎細胞<sup>107</sup>)、大腸がん細胞<sup>108</sup>)、乳がん細胞<sup>109</sup>) 及びメラノーマ細胞<sup>110</sup>) において PAR タンパク質の発現を誘導する。PARP1 は、17 種存在する PARP ファミリーの中で、細胞において最も発現量が多い<sup>111</sup>)。また、オラパリブは、PARP ファミリーのなかでも PARP1 特異的に酵素活性を阻害する<sup>112</sup>)。したがって、KYSE70 細胞における PARP 活性は、オラパリブにより PAR タンパク質がほぼ完全に消失したことから、PARP1 依存性であることが示されている。したがって、*BRC1/2* 野生型の食道がん細胞においてオラパリブは、細胞の PARP1 活性を阻害することで CDDP、SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセルに対する感受性を増強する可能性が考えられる。

核内 $\gamma$ H2AX の集積は、DNA 損傷応答チェックポイント因子である *ataxia telangiectasia mutated* によりヒストン H2AX がリン酸化されることにより増大する<sup>113</sup>)。その一方で核内 $\gamma$ H2AX の集積は、DNA 損傷に対する修復経路である古典的非相同末端結合や相同組み換え修復を行う因子を損傷部位へ集積させ、DNA 損傷修復を促進し、必要に応じて細胞死経路を亢進させる<sup>114</sup>)。乳がん細胞においてオラパリブ単独処置時の核内 $\gamma$ H2AX 集積量は、オラパリブ非感受性細胞と比較して感受性細胞において多い<sup>115</sup>)。食道がん以外のがん種において PARP 阻害薬は、CDDP<sup>116</sup>)、ドキソルビシン<sup>117</sup>)、SN-38<sup>118</sup>) 及びテモゾロミド<sup>119</sup>) が誘導する DNA 損傷量を増大させることで細胞死を誘導することが認められている。さらに我々は、KYSE70 細胞においてオラパリブは、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドが誘発する核内 $\gamma$ H2AX を増大させ、比例して核内 $\gamma$ H2AX の下流因子である 53BP1 の集積を増大させることを明らかにしている<sup>92</sup>)。すなわち、53BP1 の DNA 損傷部位への集積はオラパリブの感受性を増強することから、これら知見はオラパリブが核内 $\gamma$ H2AX 集積量の増大を介して、抗がん薬の相乗的な感受性増強作用を誘導している可能性を示唆している。

前立腺がん細胞において SN-38 と同じトポイソメラーゼ I 阻害薬であるカンプトテシンや CDDP と比較して、オラパリブは、テモゾロミド処置時における PARP1-DNA 複合体形成量を増大させる<sup>58</sup>)。またオラパリブ共存下のテモゾロミドは、PARP1 の DNA への捕捉作用の増強を介して相乗的な感受性増強作用を示し、その一方でカンプトテシンに対しては PARP1

酵素活性の阻害により相乗的な感受性増強を示すことが認められている<sup>58)</sup>。DNA上に捕捉されたタンパク質は、DNAヌクレアーゼによって、DNAを切除することで除去され<sup>84)</sup>、DNA損傷を誘発することが報告されている<sup>63)</sup>。すなわちKYSE70細胞において、CDDP、SN-38及びドキソルビシンと比較して、オラパリブがテモゾロミドにより誘導されるDNA損傷量を増大させた要因には、DNA上に捕捉されるPARP1が関与していると推測される。

DNA-PK阻害薬であるNU7441は、トポイソメラーゼII阻害薬が誘導するDNA損傷に対する修復を遅延させ<sup>120)</sup>、抗がん薬感受性を増強する<sup>121)</sup>。細胞では、抗がん薬が誘導するDNA損傷に対して、その損傷様式に応じた特異的なDNA修復経路を亢進させる<sup>122)</sup>。各抗がん薬と特異的なDNA修復経路は、CDDPなどのDNA架橋形成薬は相同組み換え修復、損傷乗り越えDNA合成並びに塩基除去修復、SN-38を含むトポイソメラーゼI阻害薬は相同組み換え修復及び一本鎖損傷修復、ドキソルビシンを含むトポイソメラーゼII阻害薬は古典的非相同末端結合、そしてテモゾロミドを含むDNAアルキル化薬は一本鎖損傷修復及び塩基除去修復である<sup>122)</sup>。また、DNA-PKの阻害は、細胞における古典的非相同末端結合を阻害する<sup>123)</sup>。すなわちKYSE70細胞におけるNU7441は、ドキソルビシンが誘導するDNA損傷に対して特異的な古典的非相同末端結合を阻害することで、オラパリブ共存下及び非共存下の感受性を増強し、その一方で他の抗がん薬の感受性には影響を及ぼさなかったと推察される。

*BRCA1/2*変異型の卵巣がん細胞におけるPARP阻害薬の細胞増殖阻害作用は、DNA-PK阻害薬であるNU7441により減弱し<sup>22)</sup>、同様にDNA-PKが重要な役割を担う古典的非相同末端結合を促進するshieldin複合体の阻害によっても減弱することが報告されている<sup>124,125)</sup>。すなわち、*BRCA1/2*変異を有するがん細胞におけるオラパリブの細胞増殖阻害作用には、DNA修復エラー頻度の高い古典的非相同末端結合が重要な働きをすると考えられる。そのため、*BRCA1/2*野生型であるKYSE70細胞におけるPARP阻害薬によるCDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する相乗的な感受性増強作用には、古典的非相同末端結合の亢進が寄与する可能性が考えられる。しかしながらDNA-PKの阻害は、オラパリブ共存下のCDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性を減弱しなかった(Figure 2-7)。すなわち、*BRCA1/2*野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる相乗的な感受性増強効果には、*BRCA1/2*変異型のがん細胞におけるオラパリブの細胞増殖阻害作用と異なり古典的非相同末端結合は関与していないと推察される。一方で、第1章では、古典的非相同末端結合とは異なるBRCA1及び53BP1に依存したDNA損傷エラー頻度の高い修復経路の亢進がオラパリブによるCDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する相乗的な感受性増強作用に寄与する可能性を示唆している。そのため、*BRCA1/2*野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる相乗的な感受性増強効果には、BRCA1に着目した更なる検討が必要と考えられる。

以上、オラパリブは、*BRCA1/2*野生型の食道がん細胞において抗がん薬に対する感受性をPARP1活性の阻害を介してDNA損傷を増大させ、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの感受性を相加的に増強することを明らかにした。また、その機序としてDNA修復エラー頻度が高い古典的非相同末端結合は関与しない可能性を示した。

## 第5節 小括

本章では、*BRCAl/2* 野生型 KYSE70 細胞を用いて、オラパリブによる PARP1 依存性の DNA 損傷応答の阻害を介した抗がん薬感受性増強作用について検討した結果、次の知見を得た。

*BRCAl/2* 野生型の食道がん細胞においてオラパリブは、

1. DNA 損傷を誘発する CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの感受性を相乗的に増強し、その作用はオラパリブによる PARP1 活性の阻害に基づく DNA 損傷量の増大に起因していた。
2. 特にテモゾロミドが誘発する DNA 損傷を増大した。
3. CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの相乗的な感受性増強効果は、DNA-PK 非依存的であった。

## 総括

本論文では、食道がん細胞を用いた *in vitro* 実験系において、抗がん薬の感受性に及ぼすオラパリブの影響について検討した結果、次の知見を明らかにした。

第 1 章においてオラパリブは、KYSE70 細胞及び KYSE140 細胞において細胞増殖を阻害し、*BRCA1* 変異を有する KYSE140 細胞において高い感受性が認められた。一方でオラパリブは、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性を増強し、特に *BRCA1/2* 野生型の KYSE70 細胞において相乗的であることを示した。しかしながら、その作用は *BRCA1* 変異を有する KYSE140 細胞においては認められなかった。

第 2 章において、オラパリブによる DNA 損傷を誘発する CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性の相乗的増強は、PARP1 活性の阻害に基づく DNA 損傷量の増大に起因することを示した。

これら本知見は、食道がん細胞において、オラパリブが感受性を増強させる抗がん薬の特徴を明確にするものであり、オラパリブは、DNA 損傷を誘発する CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの組み合わせることで、*BRCA1/2* 野生型の食道がんに有用性を示す可能性を明らかにした。したがって、本研究の成果は *BRCA1/2* 野生型の患者が大部分を占める食道がんにおけるオラパリブなどの PARP 阻害薬を用いたがん化学療法構築のための基礎的な知見になるものと考えられる。

## 謝辞

終わり臨み、本研究の機会を賜り、御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 西口工司 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査をして頂き、御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学薬剤学分野 山本昌教授ならびに京都薬科大学衛生化学分野 長澤一樹 教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 峯垣哲也 助教に哀心により深甚なる謝意を表します。

数々の有益なご助言を戴いた京都薬科大学 臨床薬学分野 辻本雅之 講師に深謝します。

本研究の遂行に際し、ご協力戴いた京都薬科大学臨床薬学分野 向井（棚橋）真実氏、大隈（山本）彩佳氏、森山由美氏、和田明莉氏、松本彩夏氏、太田圭祐氏、田中麻衣氏、増田詩子氏、並びに数々のご助言と共に研究の遂行に際し、ご協力戴いた平野沙耶香氏、林逸佳氏、青山淑美氏、西野翔太氏に深く御礼申し上げます。

加えて大学院生活を共に過ごさせて頂いた吉田拓弥 博士（現 仁真会白鷺病院薬剤科）、勝部友理恵 博士（現 九州大学病院薬剤部）、小出博義 博士（現 滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部）、臨床薬学分野の諸氏ならびに学生の皆様に心より感謝を申し上げます。

また、大学院生活を送る上でご助言頂きました東和薬品（株）内山仁 博士に深く御礼申し上げます。

最後に、長きに渡る学生生活において、研究に専念できる自由を与えてくださり、精神面・健康面ともにご支援いただきました母、兄及び姉に深く感謝いたします。また学位を取得するという父との生前の約束を果たせたことに対して深甚なる謝意を表します。

## 引用文献

1. Suresh H, Moolgavkar E, Georg Luebeck. Multistage Carcinogenesis: Population-Based Model for Colon Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1992**, 84, 610-608.
2. Torgovnick A., Schumacher B. DNA Repair Mechanisms in Cancer Development and Therapy. *Front Genet.* **2015**, 6, 157.
3. White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Henley SJ. Age and Cancer Risk: A Potentially Modifiable Relationship. *Am. J. Prev. Med.* **2014**, 46, S7-15.
4. World Health Organization. Fact sheet, the top 10 causes of death **2018**.
5. Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, Freddie Bray. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J.Cancer* **2015**, 136, E359-386.
6. World Health Organization. World Cancer Report **2014**.
7. 厚生労働省. 平成 30 年 (2018) 人口動態統計月報年計 (概数) の概況 **2018**.
8. 厚生労働省. がん対策推進基本計画に基づく新たながん研究戦略 **2014**.
9. 国立がん研究センター. グラフデータベース. [http://gdb.ganjoho.jp/graph\\_db/gdb3](http://gdb.ganjoho.jp/graph_db/gdb3). (Accessed, February 11, 2020)
10. Claudia Allemani, Tomohiro Matsuda, Veronica Di Carlo, Rhea Harewood, Melissa Matz, Maja Nikšić, Audrey Bonaventure, Mikhail Valkov, Christopher J Johnson, Jacques Estève, Olufemi J Ogunbiyi, Gulnar Azevedo E Silva, Wan-Qing Chen, Sultan Eser, Gerda Engholm, Charles A Stiller, Alain Monnereau, Ryan R Woods, Otto Visser, Gek Hsiang Lim, Joanne Aitken, Hannah K Weir, Michel P Coleman, CONCORD Working Group. Global Surveillance of Trends in Cancer Survival 2000-14 (CONCORD-3): Analysis of Individual Records for 37 513 025 Patients Diagnosed with One of 18 Cancers From 322 Population-Based Registries in 71 Countries. *Lancet* **2018**, 391, 1023-1075.
11. 国立がん研究センター. 最新がん統計 **2019**.
12. Hanna Dillekås, Michael S Rogers, Oddbjørn Straume. Are 90% of Deaths From Cancer Caused by Metastases? *Cancer Med.* **2019**, 8, 5574-5576.
13. Natsuya Katada, Keishi Yamashita, Chikatoshi Katada, Hiromitsu Moriya, Kei Hosoda, Hiroaki Mieno, Katsuhiko Higuchi, Shoko Komori, Hiromichi Ishiyama, Kazushige Hayakawa, Mitsuhiro Sugawara, Satoshi Tanabe, Wasaburo Koizumi, Shiro Kikuchi, Masahiko Watanabe. Neoadjuvant chemotherapy using concurrent Docetaxel/CDDP/5-FU (DCF) in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Short-term Prognosis. *Esophagus* **2014**, 11, 173-181.
14. Yukihiisa Tamaki, Yoko Hieda, Masanobu Nakajima, Kazuhiro Kitajima, Rika Yoshida, Takeshi Yoshizako, Atsushi Ue, Mutsumi Tokudo, Noriyuki Hirahara, Ichiro Moriyama, Hiroyuki Kato, Taisuke Inomata. Concurrent Chemoradiotherapy With Docetaxel, Cisplatin, and 5-fluorouracil

- Improves Survival of Patients with Advanced Esophageal Cancer Compared with Conventional Concurrent Chemoradiotherapy with Cisplatin and 5-fluorouracil. *J. Cancer* **2018**, *9*, 2765-2772.
15. J Robert O'Neill, Ewan D Kennedy, Vicki Sav, Barbara Langdale-Brown, Lucy Wall, Richard J E Skipworth, Simon Paterson-Brown. Patients Unfit for Neoadjuvant Therapy May Still Undergo Resection of Locally Advanced Esophageal or Esophagogastric Junctional Cancer with Acceptable Oncological Results. *Int. J. Surg. Oncol.* **2019**, *2*, e09.
  16. Christiane Maria Rosina Thallinger, Markus Raderer, Michael Hejna. Esophageal Cancer: A Critical Evaluation of Systemic Second-Line Therapy. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 4709-4714.
  17. Ken Kato, Byoung Chul Cho, Masanobu Takahashi, Morihito Okada, Chen-Yuan Lin, Keisho Chin, Shigenori Kadowaki, Myung-Ju Ahn, Yasuo Hamamoto, Yuichiro Doki, Chueh-Chuan Yen, Yutaro Kubota, Sung-Bae Kim, Chih-Hung Hsu, Eva Holtved, Ioannis Xynos, Mamoru Kodani, Yuko Kitagawa. Nivolumab Versus Chemotherapy in Patients with Advanced Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Refractory or Intolerant to Previous Chemotherapy (ATTRACTION-3): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 1506-1517.
  18. Manish A Shah, Takashi Kojima, Daniel Hochhauser, Peter Enzinger, Judith Raimbourg, Antoine Hollebecque, Florian Lordick, Sung-Bae Kim, Masahiro Tajika, Heung Tae Kim, A Craig Lockhart, Hendrik-Tobias Arkenau, Farid El-Hajbi, Mukul Gupta, Per Pfeiffer, Qi Liu, Jared Lunceford, S Peter Kang, Pooja Bhagia, Ken Kato. Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Heavily Pretreated Patients with Advanced, Metastatic Adenocarcinoma or Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: The Phase 2 KEYNOTE-180 Study. *JAMA. Oncol.* **2019**, *5*, 546-550.
  19. Mark Robson, Seock-Ah Im, Elżbieta Senkus, Binghe Xu, Susan M Domchek, Norikazu Masuda, Suzette Delaloge, Wei Li, Nadine Tung, Anne Armstrong, Wenting Wu, Carsten Goessl, Sarah Runswick, Pierfranco Conte. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 523-533.
  20. Eric Pujade-Lauraine, Jonathan A Ledermann, Frédéric Selle, Val Gebski, Richard T Penson, Amit M Oza, Jacob Korach, Tomasz Huzarski, Andrés Poveda, Sandro Pignata, Michael Friedlander, Nicoletta Colombo, Philipp Harter, Keiichi Fujiwara, Isabelle Ray-Coquard, Susana Banerjee, Joyce Liu, Elizabeth S Lowe, Ralph Bloomfield, Patricia Pautier, SOLO2/ENGOT-Ov21 investigators. SOLO2/ENGOT-Ov21 investigators. Olaparib Tablets as Maintenance Therapy in Patients with Platinum-Sensitive, Relapsed Ovarian Cancer and a BRCA1/2 Mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet. Oncol.* **2017**, *18*, 1274-1284.
  21. Chun-Chin Chen, Weiran Feng, Pei Xin Lim, Elizabeth M Kass, Maria Jasin. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. *Annu. Rev. Cancer. Biol.* **2018**, *2*, 313-336.

22. Anand G Patel, Jann N Sarkaria, Scott H Kaufmann. Nonhomologous End Joining Drives poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor Lethality in Homologous Recombination-Deficient Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 3406-3411.
23. Panagiotis A Konstantinopoulos, Raphael Ceccaldi, Geoffrey I Shapiro, Alan D D'Andrea. Homologous Recombination Deficiency. Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov.* **2015**, 5, 1137-1154.
24. Rajat Gupta, Kumar Somyajit, Takeo Narita, Elina Maskey, Andre Stanlie, Magdalena Kremer, Dimitris Typas, Michael Lammers, Niels Mailand, Andre Nussenzweig, Jiri Lukas, Chunaram Choudhary. DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity. *Cell* **2018**, 173, 972-988.
25. Da Li, Fang-Fang Bi, Na-Na Chen, Ji-Min Cao, Wu-Ping Sun, Yi-Ming Zhou, Chun-Yan Li, Qing Yang. A Novel Crosstalk Between BRCA1 and Poly (ADP-ribose) Polymerase 1 in Breast Cancer. *Cell Cycle* **2014**, 13, 3442-3449.
26. Panagiotis A Konstantinopoulos, Raphael Ceccaldi, Geoffrey I Shapiro, Alan D D'Andrea. Homologous Recombination Deficiency. Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov.* **2015**, 5, 1137-1154.
27. Talia Golan, Pascal Hammel, Michele Reni, Eric Van Cutsem, Teresa Macarulla, Michael J Hall, Joon-Oh Park, Daniel Hochhauser, Dirk Arnold, Do-Youn Oh, Anke Reinacher-Schick, Giampaolo Tortora, Hana Algül, Eileen M O'Reilly, David McGuinness, Karen Y Cui, Katia Schlienger, Gershon Y Locker, Hedy L Kindler. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 381, 317-327.
28. Joaquin Mateo, Suzanne Carreira, Shahneen Sandhu, Susana Miranda, Helen Mossop, Raquel Perez-Lopez, Daniel Nava Rodrigues, Dan Robinson, Aurelius Omlin, Nina Tunariu, Gunther Boysen, Nuria Porta, Penny Flohr, Alexa Gillman, Ines Figueiredo, Claire Paulding, George Seed, Suneil Jain, Christy Ralph, Andrew Protheroe, Syed Hussain, Robert Jones, Tony Elliott, Ursula McGovern, Diletta Bianchini, Jane Goodall, Zafeiris Zafeiriou, Chris T Williamson, Roberta Ferraldeschi, Ruth Riisnaes, Bernardette Ebbs, Gemma Fowler, Desamparados Roda, Wei Yuan, Yi-Mi Wu, Xuhong Cao, Rachel Brough, Helen Pemberton, Roger A'Hern, Amanda Swain, Lakshmi P Kunju, Rosalind Eeles, Gerhard Attard, Christopher J Lord, Alan Ashworth, Mark A Rubin, Karen E Knudsen, Felix Y Feng, Arul M Chinnaiyan, Emma Hall, Johann S de Bono. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 373, 1697-1708.
29. Hsien-Ming Hu, Xin Zhao, Swati Kaushik, Lilliane Robillard, Antoine Barthelet, Kevin K Lin, Khyati N Shah, Andy D Simmons, Mitch Raponi, Thomas C Harding, Sourav Bandyopadhyay. A Quantitative Chemotherapy Genetic Interaction Map Reveals Factors Associated With PARP Inhibitor Resistance. *Cell Rep.* **2018**, 23, 918-929.
30. Joaquin Mateo, Nuria Porta, Diletta Bianchini, Ursula McGovern, Tony Elliott, Robert Jones, Isabel Syndikus, Christy Ralph, Suneil Jain, Mohini Varughese, Omi Parikh, Simon Crabb, Angus

- Robinson, Duncan McLaren, Alison Birtle, Jacob Tanguay, Susana Miranda, Ines Figueiredo, George Seed, Claudia Bertan, Penny Flohr, Berni Ebbs, Pasquale Rescigno, Gemma Fowler, Ana Ferreira, Ruth Riisnaes, Rita Pereira, Andra Curcean, Robert Chandler, Matthew Clarke, Bora Gurel, Mateus Crespo, Daniel Nava Rodrigues, Shahneen Sandhu, Aude Espinasse, Peter Chatfield, Nina Tunariu, Wei Yuan, Emma Hall, Suzanne Carreira, Johann S de Bono. Olaparib in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with DNA Repair Gene Aberrations (TOPARP-B): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol.* **2019**, 21, 162-174.
31. Jennifer K Litton, Hope S Rugo, Johannes Ettl, Sara A Hurvitz, Anthony Gonçalves, Kyung-Hun Lee, Louis Fehrenbacher, Rinat Yerushalmi, Lida A Mina, Miguel Martin, Henri Roché, Young-Hyuck Im, Ruben G W Quek, Denka Markova, Iulia C Tudor, Alison L Hannah, Wolfgang Eiermann, Joanne L Blum. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 379, 753-763.
  32. Robert L Coleman, Amit M Oza, Domenica Lorusso, Carol Aghajanian, Ana Oaknin, Andrew Dean, Nicoletta Colombo, Johanne I Weberpals, Andrew Clamp, Giovanni Scambia, Alexandra Leary, Robert W Holloway, Margarita Amenedo Gancedo, Peter C Fong, Jeffrey C Goh, David M O'Malley, Deborah K Armstrong, Jesus Garcia-Donas, Elizabeth M Swisher, Anne Floquet, Gottfried E Konecny, Iain A McNeish, Clare L Scott, Terri Cameron, Lara Maloney, Jeff Isaacson, Sandra Goble, Caroline Grace, Thomas C Harding, Mitch Raponi, James Sun, Kevin K Lin, Heidi Giordano, Jonathan A Ledermann, ARIEL3 investigators. Rucaparib Maintenance Treatment for Recurrent Ovarian Carcinoma After Response to Platinum Therapy (ARIEL3): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet* **2017**, 390, 1949-1961.
  33. Antonio González-Martín, Bhavana Pothuri, Ignace Vergote, René DePont Christensen, Whitney Graybill, Mansoor R Mirza, Colleen McCormick, Domenica Lorusso, Paul Hoskins, Gilles Freyer, Klaus Baumann, Kris Jardon, Andrés Redondo, Richard G Moore, Christof Vulsteke, Roisin E O'Cearbhaill, Bente Lund, Floor Backes, Pilar Barretina-Ginesta, Ashley F Haggerty, Maria J Rubio-Pérez, Mark S Shahin, Giorgia Mangili, William H Bradley, Ilan Bruchim, Kaiming Sun, Izabela A Malinowska, Yong Li, Divya Gupta, Bradley J Monk, PRIMA/ENGOT-OV26/GOG-3012 Investigators. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *Engl. J. Med.* **2019**, 381, 2391-2402.
  34. Felix Y Feng, Johann S de Bono, Mark A Rubin, Karen E Knudsen. Chromatin to Clinic: The Molecular Rationale for PARP1 Inhibitor Function. *Mol. Cell* **2015**, 5, 925-934.
  35. Shifalika Tangutoori, Paige Baldwin, Srinivas Sridha. PARP Inhibitors: A New Era of Targeted Therapy. *Maturitas* **2015**, 81, 5-9.
  36. Robert L Coleman, Gini F Fleming, Mark F Brady, Elizabeth M Swisher, Karina D Steffensen, Michael Friedlander, Aikou Okamoto, Kathleen N Moore, Noa Efrat Ben-Baruch, Theresa L Werner, Noelle G Cloven, Ana Oaknin, Paul A DiSilvestro, Mark A Morgan, Joo-Hyun Nam,

- Charles A Leath 3rd, Shibani Nicum, Andrea R Hagemann, Ramey D Littell, David Cella, Sally Baron-Hay, Jesus Garcia-Donas, Mika Mizuno, Katherine Bell-McGuinn, Danielle M Sullivan, Bruce A Bach, Sudipta Bhattacharya, Christine K Ratajczak, Peter J Ansell, Minh H Dinh, Carol Aghajanian, Michael A Bookman. Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, 381, 2403-2415.
37. Amit M Oza, David Cibula, Ana Oaknin Benzaquen, Christopher Poole, Ron H J Mathijssen, Gabe S Sonke, Nicoletta Colombo, Jiří Špaček, Peter Vuylsteke, Holger Hirte, Sven Mahner, Marie Plante, Barbara Schmalfeldt, Helen Mackay, Jacqui Rowbottom, Elizabeth S Lowe, Brian Dougherty, J Carl Barrett, Michael Friedlander. Olaparib Combined with Chemotherapy for Recurrent Platinum-Sensitive Ovarian Cancer: A Randomised Phase 2 Trial. *Lancet Oncol.* **2015**, 16, 87-97.
38. Joyce F Liu, William T Barry, Michael Birrer, Jung-Min Lee, Ronald J Buckanovich, Gini F Fleming, Bj Rimel, Mary K Buss, Sreenivasa Nattam, Jean Hurteau, Weixiu Luo, Philippa Quy, Christin Whalen, Lisa Obermayer, Hang Lee, Eric P Winer, Elise C Kohn, S Percy Ivy, Ursula A Matulonis. Combination Cediranib and Olaparib Versus Olaparib Alone for Women With Recurrent Platinum-Sensitive Ovarian Cancer: A Randomised Phase 2 Study. *Lancet Oncol.* **2014**, 15, 1207-1214.
39. Noel Clarke, Pawel Wiechno, Boris Alekseev, Nuria Sala, Robert Jones, Ivo Kocak, Vincenzo Emanuele Chiuri, Jacek Jassem, Aude Fléchon, Charles Redfern, Carsten Goessl, Joseph Burgents, Robert Kozarski, Darren Hodgson, Maria Learoyd, Fred Saad. Olaparib Combined with Abiraterone in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol.* **2019**, 19, 975-986.
40. Cancer Genome Atlas Research Network, Analysis Working Group: Asan University, BC Cancer Agency, Brigham and Women's Hospital, Broad Institute, Brown University, Case Western Reserve University, Dana-Farber Cancer Institute, Duke University, Greater Poland Cancer Centre, Harvard Medical School, Institute for Systems Biology, KU Leuven, Mayo Clinic, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, National Cancer Institute, Nationwide Children's Hospital, Stanford University, University of Alabama, University of Michigan, University of North Carolina, University of Pittsburgh, University of Rochester, University of Southern California, University of Texas MD Anderson Cancer Center, University of Washington, Van Andel Research Institute, Vanderbilt University, Washington University, Genome Sequencing Center: Broad Institute, Washington University in St. Louis, Genome Characterization Centers: BC Cancer Agency, Broad Institute, Harvard Medical School, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins University, University of North Carolina, University of Southern California Epigenome Center, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Van Andel Research Institute, Genome Data Analysis Centers: Broad Institute, Brown University:, Harvard Medical School, Institute for Systems Biology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, University of California Santa Cruz,

University of Texas MD Anderson Cancer Center, Biospecimen Core Resource: International Genomics Consortium, Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Tissue Source Sites: Analytic Biologic Services, Asan Medical Center, Asterand Bioscience, Barretos Cancer Hospital, BioreclamationIVT, Botkin Municipal Clinic, Chonnam National University Medical School, Christiana Care Health System, Cureline, Duke University, Emory University, Erasmus University, Indiana University School of Medicine, Institute of Oncology of Moldova, International Genomics Consortium, Invidumed, Israelitisches Krankenhaus Hamburg, Keimyung University School of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, National Cancer Center Goyang, Ontario Tumour Bank, Peter MacCallum Cancer Centre, Pusan National University Medical School, Ribeirão Preto Medical School, St. Joseph's Hospital & Medical Center, St. Petersburg Academic University, Tayside Tissue Bank, University of Dundee, University of Kansas Medical Center, University of Michigan, University of North Carolina at Chapel Hill, University of Pittsburgh School of Medicine, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Disease Working Group: Duke University, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, National Cancer Institute, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Yonsei University College of Medicine, Data Coordination Center: CSRA Inc., Project Team: National Institutes of Health. Integrated Genomic Characterization of Oesophageal Carcinoma. *Nature* **2017**, 541, 169-175.

41. Arielle L Heeke, Michael J Pishvaian, Filipa Lynce, Joanne Xiu, Jonathan R Brody, Wang-Juh Chen, Tabari M Baker, John L Marshall, Claudine Isaacs. Prevalence of Homologous Recombination-Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types. *JCO. Precis. Oncol.* **2018**.
42. Matthew J Schiewer, Karen E Knudsen. Transcriptional Roles of PARP1 in Cancer. *Mol. Cancer Res.* **2014**, 12, 1069-1080.
43. Tomomitsu Nasuno, Sachiyo Mimaki, Makito Okamoto, Hiroyasu Esumi, Katsuya Tsuchihara. Effect of a Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitor Against Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Cancer Sci.* **2014**, 105, 202-210.
44. L Zhan, Q Qin, J Lu, J Liu, H Zhu, X Yang, C Zhang, L Xu, Z Liu, J Cai, J Ma, S Dai, G Tao, H Cheng, X Sun. Novel Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibitor, AZD2281, Enhances Radiosensitivity of Both Normoxic and Hypoxic Esophageal Squamous Cancer Cells. *Dis. Esophagus* **2016**, 29, 215-223.
45. Adam C Palmer, Peter K Sorger. Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability Without Drug Additivity or Synergy. *Cell* **2017**, 171, 1678-1691.
46. Zahid H Siddik. Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance. *Oncogene* **2003**, 22, 7265-7279.
47. Yves Pommier. Topoisomerase I Inhibitors: Camptothecins and Beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 789-802.
48. Douglas B Sawyer. Anthracyclines and Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **2013**, 368, 1154-1156.

49. Friedman HS.; Kerby T.; Calvert H. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clin Cancer Res.* **2000**, 6, 2585-2597.
50. Daniel B Longley, D Paul Harkin, Patrick G Johnston. 5-fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 330-338.
51. Alberto Montero, Frank Fossella, Gabriel Hortobagyi, Vicente Valero. Docetaxel for Treatment of Solid Tumours: A Systematic Review of Clinical Data. *Lancet Oncol.* **2005**, 6, 229-239.
52. Konecny GE.; Kristeleit RS. PARP Inhibitors for BRCA1/2-mutated and Sporadic Ovarian Cancer: Current Practice and Future Directions. *Br. J. Cancer* **2019**, 115, 1157-1173.
53. Shimada Y, Imamura M, Wagata T, Yamaguchi N, Tobe T. Characterization of 21 Newly Established Esophageal Cancer Cell Lines. *Cancer* **1992**, 69, 277-284.
54. Mahmoud Ghandi, Franklin W Huang, Judit Jané-Valbuena, Gregory V Kryukov, Christopher C Lo, E Robert McDonald 3rd, Jordi Barretina, Ellen T Gelfand, Craig M Bielski, Haoxin Li, Kevin Hu, Alexander Y Andreev-Drakhlin, Jaegil Kim, Julian M Hess, Brian J Haas, François Aguet, Barbara A Weir, Michael V Rothberg, Brenton R Paolella, Michael S Lawrence, Rehan Akbani 8, Yiling Lu, Hong L Tiv, Prafulla C Gokhale, Antoine de Weck, Ali Amin Mansour, Coyin Oh, Juliann Shih, Kevin Hadi, Yanay Rosen, Jonathan Bistline, Kavitha Venkatesan, Anupama Reddy, Dmitriy Sonkin, Manway Liu, Joseph Lehar, Joshua M Korn, Dale A Porter, Michael D Jones, Javad Golji, Giordano Caponigro, Jordan E Taylor, Caitlin M Dunning, Amanda L Creech, Allison C Warren, James M McFarland, Mahdi Zamanighomi, Audrey Kauffmann, Nicolas Stransky, Marcin Imielinski, Yosef E Maruvka, Andrew D Cherniack, Aviad Tsherniak, Francisca Vazquez, Jacob D Jaffe, Andrew A Lane, David M Weinstock, Cory M Johannessen, Michael P Morrissey, Frank Stegmeier, Robert Schlegel, William C Hahn , Gad Getz, Gordon B Mills, Jesse S Boehm, Todd R Golub, Levi A Garraway, William R Sellers. Next-generation Characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* **2019**, 569, 503-508.
55. Kohji Takara, Toshiyuki Sakaeda, Tatsurou Yagami, Hironao Kobayashi, Nobuko Ohmoto, Masanori Horinouchi, Kohshi Nishiguchi, Katsuhiko Okumura. Cytotoxic Effects of 27 Anticancer Drugs in HeLa and MDR1-overexpressing Derivative Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 771-778.
56. Ting-Chao Chou. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.* **2010**, 70, 440-446.
57. Ting-Chao Chou. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 621-681.
58. Junko Murai, Yiping Zhang, Joel Morris, Jiuping Ji, Shunichi Takeda, James H Doroshow, Yves Pommier. Rationale for poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Combination Therapy with Camptothecins or Temozolomide Based on PARP Trapping Versus Catalytic Inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, 349, 408-416.

59. Jun Hong, Dunfa Peng, Zheng Chen, Vikas Sehdev, Abbas Belkhiri. ABL Regulation by AXL Promotes Cisplatin Resistance in Esophageal Cancer. *Cancer Res.* **2013**, 73, 331-340.
60. Drewinko B.; Green C.; Loo TL. Combination Chemotherapy In Vitro with Cis-dichlorodiammineplatinum(II). *Cancer Treat. Rep.* **1976**, 60, 1619-1625.
61. Yuqiao Shen, Mika Aoyagi-Scharber, Bing Wang. Trapping Poly (ADP-Ribose) Polymerase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, 353, 446-457.
62. Yves Pommier, Mark J O'Connor, Johann de Bono. Laying a Trap to Kill Cancer Cells: PARP Inhibitors and Their Mechanisms of Action. *Sci. Transl. Med.* **2016**, 8, 362.
63. Junko Murai, Shar-yin N Huang, Benu Brata Das, Amelie Renaud, Yiping Zhang, James H Doroshow, Jiuping Ji, Shunichi Takeda, Yves Pommier. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* **2012**, 72, 5588-5599.
64. Z Ping Lin, Elena S Ratner, Margaret E Whicker, Yashang Lee, Alan C Sartorelli. Triapine Disrupts CtIP-mediated Homologous Recombination Repair and Sensitizes Ovarian Cancer Cells to PARP and Topoisomerase Inhibitors. *Mol. Cancer Res.* **2014**, 12, 381-393.
65. Harveer Dev, Ting-Wei Will Chiang, Chloe Lescale, Inge de Krijger, Alistair G Martin, Domenic Pilger, Julia Coates, Matylda Sczaniecka-Clift, Wenming Wei, Matthias Ostermaier, Mareike Herzog, Jonathan Lam, Abigail Shea, Mukerrem Demir, Qian Wu, Fengtang Yang, Beiyuan Fu, Zhongwu Lai, Gabriel Balmus, Rimma Belotserkovskaya, Violeta Serra, Mark J O'Connor, Alejandra Bruna, Petra Beli, Luca Pellegrini, Carlos Caldas, Ludovic Deriano, Jacqueline J L Jacobs, Yaron Galanty, Stephen P Jackson Shieldin Complex Promotes DNA End-Joining and Counters Homologous Recombination in BRCA1-null Cells. *Nat. Cell Biol.* **2018**, 20, 954-965.
66. David W Meek. Tumour Suppression by p53: A Role for the DNA Damage Response? *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 714-723
67. Luther Davis, Nancy Maizels. Two Distinct Pathways Support Gene Correction by Single-Stranded Donors at DNA Nicks. *Cell Rep.* **2016**, 17, 1872-1881.
68. Inês Godet, Daniele M Gilkes. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Treatment Strategies for Breast Cancer. *Integr. Cancer Sci. Ther.* **2017**, 4.
69. Steven A Narod, William D Foulkes. BRCA1 and BRCA2: 1994 and Beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 665-676.
70. Simon A Forbes, David Beare, Harry Boutselakis, Sally Bamford, Nidhi Bindal, John Tate, Charlotte G Cole, Sari Ward, Elisabeth Dawson, Laura Ponting, Raymund Stefancsik, Bhavana Harsha, Chai Yin Kok, Mingming Jia, Harry Jubb, Zbyslaw Sondka, Sam Thompson, Tisham De, Peter J Campbell. COSMIC: Somatic Cancer Genetics at High-Resolution. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 777-783.
71. Hana Hanzlikova, Ilona Kalasova, Annie A Demin, Lewis E Pennicott, Zuzana Cihlarova, Keith W Caldecott. The Importance of Poly (ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments During DNA Replication. *Mol. Cell* **2018**, 71, 319-331.

72. Petar Jelinic, Douglas A Levine. New Insights Into PARP Inhibitors' Effect on Cell Cycle and Homology-Directed DNA Damage Repair. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13, 1645-1654.
73. Shuai Wang, Huibo Wang, Ben C Davis, Jiyong Liang, Rutao Cui, Sai-Juan Chen, Zhi-Xiang Xu. PARP1 Inhibitors Attenuate AKT Phosphorylation via the Upregulation of PHLPP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, 412, 379-384.
74. Sotos GA.; Grogan L.; Allegra CJ. Preclinical and Clinical Aspects of Biomodulation of 5-fluorouracil. *Cancer Treat. Rev.* **1994**, 20, 11-49.
75. Pienta KJ.; Preclinical Mechanisms of Action of Docetaxel and Docetaxel Combinations in Prostate Cancer. *Semin. Oncol.* **2001**, 28, 3-7.
76. Catherine R Sears, Sean A Cooney, Helen Chin-Sinex, Marc S Mendonca, John J Turchi. DNA Damage Response (DDR) Pathway Engagement in Cisplatin Radiosensitization of Non-Small Cell Lung Cancer. *DNA Repair (Amst)* **2016**, 40, 35-46.
77. Caroline F Thorn, Connie Oshiro, Sharon Marsh, Tina Hernandez-Boussard, Howard McLeod, Teri E Klein, Russ B Altman. Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenet Genomics* **2011**, 21, 440-446.
78. W Voigt, S Matsui, M B Yin, W C Burhans, H Minderman, Y M Rustum. Topoisomerase-I Inhibitor SN-38 Can Induce DNA Damage and Chromosomal Aberrations Independent From DNA Synthesis. *Anticancer Res.* **1998**, 18, 3499-3505.
79. Zhikuan Yang, Danping Wei, Xiaoli Dai, Malcolm F G Stevens, Tracey D Bradshaw, Ying Luo, Jihong Zhang. C8-Substituted Imidazotetrazine Analogs Overcome Temozolomide Resistance by Inducing DNA Adducts and DNA Damage. *Front. Oncol.* **2019**, 9, 485.
80. Junko Murai, Shar-Yin N Huang, Amèlie Renaud, Yiping Zhang, Jiuping Ji, Shunichi Takeda, Joel Morris, Beverly Teicher, James H Doroshow, Yves Pommier. Stereospecific PARP Trapping by BMN 673 and Comparison with Olaparib and Rucaparib. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13, 433-443.
81. Yun-Gui Yang, Ulrich Cortes, Srinivas Patnaik, Maria Jasin, Zhao-Qi Wang. Ablation of PARP-1 Does Not Interfere with the Repair of DNA Double-Strand Breaks, but Compromises the Reactivation of Stalled Replication Forks. *Oncogene* **2004**, 23, 3872-3882.
82. P Chandra Bhushan Prasad, Shyam Babu Prasad, Suresh Singh Yadav, Laxmi Kant Pandey, Sunita Singh, Satyajit Pradhan, Gopeshwar Narayan. Olaparib Modulates DNA Repair Efficiency, Sensitizes Cervical Cancer Cells to Cisplatin and Exhibits Anti-Metastatic Property. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 12876.
83. Hui Wang, Changqing Lu, Qing Li, Jun Xie, Tongbing Chen, Yan Tan, Changping Wu, Jingting Jiang. The Role of Kif4A in Doxorubicin-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Mol. Cells* **2014**, 37, 812-818.
84. Benu Brata Das, Shar-yin N Huang, Junko Murai, Ishita Rehman, Jean-Christophe Amé, Souvik Sengupta, Subhendu K Das, Papiya Majumdar, Hongliang Zhang, Denis Biard, Hemanta K

- Majumder, Valérie Schreiber, Yves Pommier. PARP1-TDP1 Coupling for the Repair of Topoisomerase I-induced DNA Damage. *Nucleic. Acids. Res.* **2014**, 42, 4435-4449.
85. Koji Yoshimoto, Masahiro Mizoguchi, Nobuhiro Hata, Hideki Murata, Ryusuke Hatae, Toshiyuki Amano, Akira Nakamizo, Tomio Sasaki. Complex DNA Repair Pathways as Possible Therapeutic Targets to Overcome Temozolomide Resistance in Glioblastoma. *Front. Oncol.* **2012**, 2, 186.
86. Loganayagam A.; Arenas Hernandez M.; Corrigan A.; Fairbanks L.; Lewis CM.; Harper P.; Maisey N.; Ross P.; Sanderson JD.; Marinaki AM. Pharmacogenetic Variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR Genes Are Clinically Significant Predictors of Fluoropyrimidine Toxicity. *Br. J. Cancer* **2013**, 108, 2505-2515.
87. Amelia M Huehls, Jill M Wagner, Catherine J Huntoon, Liyi Geng, Charles Erlichman, Anand G Patel, Scott H Kaufmann, Larry M Karnitz. Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Synergizes with 5-fluorodeoxyuridine but Not 5-fluorouracil in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* **2011**, 71, 4944-4954.
88. Yuanfeng Wu, Xinming Qi, Likun Gong, Guozhen Xing, Min Chen, Lingling Miao, Jun Yao, Takayoshi Suzuki, Chie Furihata, Yang Luan, Jin Ren. Identification of BC005512 as a DNA Damage Responsive Murine Endogenous Retrovirus of GLN Family Involved in Cell Growth Regulation. *PLoS One* **2012**, 7, e35010.
89. Daisuke Minami, Nagio Takigawa, Hiromasa Takeda, Minoru Takata, Nobuaki Ochi, Eiki Ichihara, Akiko Hisamoto, Katsuyuki Hotta, Mitsune Tanimoto, Katsuyuki Kiura. Synergistic Effect of Olaparib With Combination of Cisplatin on PTEN-deficient Lung Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* **2013**, 11, 140-148.
90. Hye Jeong Park, Jun Sang Bae, Kyoung Min Kim, Young Jae Moon, See-Hyoung Park, Sang Hoon Ha, Usama Khamis Hussein, Zhongkai Zhang, Ho Sung Park, Byung-Hyun Park, Woo Sung Moon, Jung Ryul Kim, Kyu Yun Jang. The PARP Inhibitor Olaparib Potentiates the Effect of the DNA Damaging Agent Doxorubicin in Osteosarcoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, 37, 107.
91. Ronja Biehs, Monika Steinlage, Olivia Barton, Szilvia Juhász, Julia Künzel, Julian Spies, Atsushi Shibata, Penny A Jeggo, Markus Löbrich. DNA double-strand break resection occurs during non-homologous end joining in G1 but is distinct from resection during homologous recombination. *Mol. Cell* **2017**, 65, 671-684.
92. Keisuke Miyamoto, Tetsuya Minegaki, Sayaka Hirano, Itsuka Hayashi, Masyayuki Tsujimoto, Koshi Nishiguchi. Olaparib potentiates anticancer drug cytotoxicity via 53BP1 in oesophageal squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res.* **2020**, 40, 813-823.
93. LYNPARZA (olaparib) tablets.  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/208558s001lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/208558s001lbl.pdf).  
(Accessed, February 11, 2020).
94. Franciska Erdő, Péter Krajcsi. Age-Related Functional and Expressional Changes in Efflux Pathways at the Blood-Brain Barrier. *Front Aging Neurosci* **2019**, 11, 196.

95. Pauline Breedveld, Jos H Beijnen, Jan H M Schellens. Use of P-glycoprotein and BCRP Inhibitors to Improve Oral Bioavailability and CNS Penetration of Anticancer Drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 17-24.
96. Jianhui Yuan, Hui Lv, Bo Peng, Chengkun Wang, Yanhui Yu, Zhimin He. Role of BCRP as a Biomarker for Predicting Resistance to 5-fluorouracil in Breast Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, 63, 1103-1110.
97. Taku Kato, Kosuke Mizutani, Koji Kameyama, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Keita Nakane, Yusuke Kanimoto, Hidetoshi Ehara, Hiroyasu Ito, Mitsuru Seishima, Takashi Deguchi, Masafumi Ito. Serum Exosomal P-glycoprotein Is a Potential Marker to Diagnose Docetaxel Resistance and Select a Taxoid for Patients with Prostate Cancer. *Urol. Oncol.* **2015**, 33, 385.
98. Golam Kibria, Hiroto Hatakeyama, Kosuke Akiyama, Kyoko Hida, Hideyoshi Harashima. Comparative Study of the Sensitivities of Cancer Cells to Doxorubicin, and Relationships Between the Effect of the Drug-Efflux Pump P-gp. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, 37, 1926-1935.
99. Raphael Ceccaldi, Beatrice Rondinelli, Alan D D'Andrea. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* **2016**, 26, 52-64.
100. Regulation of Single-Strand Annealing and Its Role in Genome Maintenance. Ragini Bhargava, David O Onyango, Jeremy M Stark. Regulation of Single-Strand Annealing and Its Role in Genome Maintenance. *Trends Genet.* **2016**, 32, 566-575.
101. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
102. Yan Zhao, Huw D Thomas, Michael A Batey, Ian G Cowell, Caroline J Richardson, Roger J Griffin, A Hilary Calvert, David R Newell, Graeme C M Smith, Nicola J Curtin. Preclinical Evaluation of a Potent Novel DNA-dependent Protein Kinase Inhibitor NU7441. *Cancer Res.* **2006**, 66, 5354-5362.
103. Karolin Léger, Ann-Katrin Hopp, Monika Fey, Michael O Hottiger. ARTD1 Regulates Cyclin E Expression and Consequently Cell-Cycle Re-Entry and G1/S Progression in T24 Bladder Carcinoma Cells. *Cell Cycle* **2016**, 15, 2042-2052.
104. Masaaki Yamamoto, Makoto Yamasaki, Yukiko Tsukao, Koji Tanaka, Yasuhiro Miyazaki, Tomoki Makino, Tsuyoshi Takahashi, Yukinori Kurokawa, Kiyokazu Nakajima, Shuji Takiguchi, Masaki Mori, Yuichiro Doki. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 Inhibition Decreases Proliferation Through G2/M Arrest in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncol. Lett.* **2017**, 14, 1581-1587.
105. Chandra Bhushan Prasad, Shyam Babu Prasad, Suresh Singh Yadav, Laxmi Kant Pandey, Sunita Singh, Satyajit Pradhan, Gopeshwar Narayan. Olaparib Modulates DNA Repair Efficiency, Sensitizes Cervical Cancer Cells to Cisplatin and Exhibits Anti-Metastatic Property. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 12876.
106. Makiko Tahara, Takeshi Inoue, Futoshi Sato, Yasuyuki Miyakura, Hisanaga Horie, Yoshikazu Yasuda, Hirofumi Fujii, Kenjiro Kotake, Kokichi Sugano. The Use of Olaparib (AZD2281)

- Potentiates SN-38 Cytotoxicity in Colon Cancer Cells by Indirect Inhibition of Rad51-mediated Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13, 1170-1180.
107. Hui Wang, Changqing Lu, Yan Tan, Jun Xie, Jingting Jiang. Effect of Adriamycin on BRCA1 and PARP-1 Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, 7, 5909-5915.
108. Anna Maria Cseh, Zsolt Fabian, Ruben Quintana-Cabrera, Aliz Szabo, Krisztian Eros, Maria Eugenia Soriano, Ferenc Gallyas, Luca Scorrano, Balazs Sumegi. PARP Inhibitor PJ34 Protects Mitochondria and Induces DNA-Damage Mediated Apoptosis in Combination with Cisplatin or Temozolomide in B16F10 Melanoma Cells. *Front. Physiol.* **2019**, 10, 538.
109. Jing-Qiu Li, Xian Wu, Lu Gan, Xiang-Liang Yang, Ze-Hong Miao. Hypoxia Induces Universal but Differential Drug Resistance and Impairs Anticancer Mechanisms of 5-fluorouracil in Hepatoma Cells. *Acta. Pharmacol. Sin.* **2017**, 38, 1642-1654.
110. Lisa Kashima, Masashi Idogawa, Hiroaki Mita, Miki Shitashige, Tesshi Yamada, Kazuhiro Ogi, Hiromu Suzuki, Minoru Toyota, Hiroyoshi Ariga, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino. CHFR Protein Regulates Mitotic Checkpoint by Targeting PARP-1 Protein for Ubiquitination and Degradation. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 12975-12984.
111. Eva Barkauskaite, Gytis Jankevicius, Ivan Ahel. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. *Mol. Cell* **2015**, 58, 935-946.
112. Claire E Knezevic, Gabriela Wright, Lily L Remsing Rix, Woosuk Kim, Brent M Kuenzi, Yunting Luo, January M Watters, John M Koomen, Eric B Haura, Alvaro N Monteiro, Caius Radu, Harshani R Lawrence, Uwe Rix. Proteome-wide Profiling of Clinical PARP Inhibitors Reveals Compound-Specific Secondary Targets. *Cell Chem. Biol.* **2016**, 23, 1490-1503.
113. Eva Barkauskaite, Gytis Jankevicius, Ivan Ahel. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. *Mol. Cell* **2015**, 58, 935-946.
114. Claire E Knezevic, Gabriela Wright, Lily L Remsing Rix, Woosuk Kim, Brent M Kuenzi, Yunting Luo, January M Watters, John M Koomen, Eric B Haura, Alvaro N Monteiro, Caius Radu, Harshani R Lawrence, Uwe Rix. Proteome-wide Profiling of Clinical PARP Inhibitors Reveals Compound-Specific Secondary Targets. *Cell Chem. Biol.* **2016**, 23, 1490-1503.
115. Jone Michelena, Aleksandra Lezaja, Federico Teloni, Thomas Schmid, Ralph Imhof, Matthias Altmeyer. Analysis of PARP Inhibitor Toxicity by Multidimensional Fluorescence Microscopy Reveals Mechanisms of Sensitivity and Resistance. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 2678
116. Daisuke Minami, Nagio Takigawa, Hiromasa Takeda, Minoru Takata, Nobuaki Ochi, Eiki Ichihara, Akiko Hisamoto, Katsuyuki Hotta, Mitsune Tanimoto, Katsuyuki Kiura. Synergistic Effect of Olaparib With Combination of Cisplatin on PTEN-deficient Lung Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* **2013**, 11, 140-148.

117. Germano Mariano, Maria Rosaria Ricciardi, Daniela Trisciuglio, Michele Zampieri, Fabio Ciccarone, Tiziana Guastafierro, Roberta Calabrese, Elisabetta Valentini, Agostino Tafuri, Donatella Del Bufalo, Paola Caiafa, Anna Reale. PARP Inhibitor ABT-888 Affects Response of MDA-MB-231 Cells to Doxorubicin Treatment, Targeting Snail Expression. *Oncotarget* **2015**, 6, 15008-150021.
118. Makiko Tahara, Takeshi Inoue, Futoshi Sato, Yasuyuki Miyakura, Hisanaga Horie, Yoshikazu Yasuda, Hirofumi Fujii, Kenjiro Kotake, Kokichi Sugano. The Use of Olaparib (AZD2281) Potentiates SN-38 Cytotoxicity in Colon Cancer Cells by Indirect Inhibition of Rad51-mediated Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13, 1170-1180.
119. Oihane Erice, Michael P Smith, Rachel White, Ibai Goicoechea, Jorge Barriuso, Chris Jones, Geoffrey P Margison, Juan C Acosta, Claudia Wellbrock, Imanol Arozarena. MGMT Expression Predicts PARP-Mediated Resistance to Temozolomide. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, 14, 1236-1246.
120. Nada Albarakati, Tarek MA Abdel-Fatah, Rachel Doherty, Roslin Russell, Devika Agarwal, Paul Moseley, Christina Perry, Arvind Arora, Nouf Alsubhi, Claire Seedhouse, Emad A Rakha, Andrew Green, Graham Ball, Stephen Chan, Carlos Caldas, Ian O Ellis, Srinivasan Madhusudan. Targeting BRCA1-BER Deficient Breast Cancer by ATM or DNA-PKcs Blockade Either Alone or in Combination with Cisplatin for Personalized Therapy. *Mol. Oncol.* **2015**, 9, 204-217.
121. Wojciech M Ciszewski, Michele Tavecchio, Jarosław Dastyk, Nicola J Curtin. DNA-PK Inhibition by NU7441 Sensitizes Breast Cancer Cells to Ionizing Radiation and Doxorubicin. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, 143, 47-55.
122. Jessica S Brown, Brent O'Carrigan, Stephen P Jackson, Timothy A Yap. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov.* **2017**, 7, 20-37.
123. Francis Robert, Mathilde Barbeau, Sylvain Éthier, Josée Dostie, Jerry Pelletier. Pharmacological Inhibition of DNA-PK Stimulates Cas9-mediated Genome Editing. *Genome Med.* **2015**, 7, 93.
124. Guotai Xu, J Ross Chapman, Inger Brandsma, Jingsong Yuan, Martin Mistrik, Peter Bouwman, Jirina Bartkova, Ewa Gogola, Daniël Warmerdam, Marco Barazas, Janneke E Jasper, Kenji Watanabe, Mark Pieterse, Ariena Kersbergen, Wendy Sol, Patrick H N Celie, Philip C Schouten, Bram van den Broek, Ahmed Salman, Marja Nieuwland, Iris de Rink, Jorma de Ronde, Kees Jalink, Simon J Boulton, Junjie Chen, Dik C van Gent, Jiri Bartek, Jos Jonkers, Piet Borst, Sven Rottenberg. REV7 Counteracts DNA Double-Strand Break Resection and Affects PARP Inhibition. *Nature* **2015**, 521, 541-544.
125. Junya Tomida, Kei-Ichi Takata, Sarita Bhetawal, Maria D Person, Hsueh-Ping Chao, Dean G Tang, Richard D Wood. FAM35A Associates with REV7 and Modulates DNA Damage Responses of Normal and BRCA1-defective Cells. *EMBO J.* **2018**, 37.