

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09678

研究課題名（和文）子宮頸癌におけるWee1阻害薬の検討およびその免疫環境の評価

研究課題名（英文）Effect of Wee1 inhibitors on human papilloma virus-related cervical cancer

研究代表者

池田 悠至（IKEDA, Yuji）

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：80713453

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：HPV16型陽性のSiHa細胞ではシスプラチンおよびAZD1775併用による相乗効果を確認され、Wee1阻害薬によりリン酸化CDC2を阻害していることが確認された。またSiHa細胞において、Sub-G0/G1期の割合がシスプラチンおよびAZD1775併用投与群において顕著に増加していた。さらに、シスプラチンと放射線照射（0-10Gy）による条件にて、AZD1775治療による明らかな細胞コロニー数の減少を示した。以上よりHPV16型陽性 SiHa細胞にて顕著にシスプラチンとWee1阻害薬下における細胞障害性の相乗的な増強が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、HPV16型陽性 SiHa細胞にて顕著にシスプラチンとWee1阻害薬下における細胞障害性の相乗的な増強が確認された。つまり本研究により子宮頸癌におけるWee1の細胞周期調節機序が解明され、既存の標準治療法の増強作用をもたらすWee1を標的にした子宮頸癌の新たな治療開発の一端に貢献することが予測された。特に一般臨床で施行されている放射線化学療法の条件下にてWee1阻害薬の治療増強効果が確認され、今後臨床試験を経て実臨床にこの治療法が応用される事が大きく期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effect of a Wee1 inhibitor on cervical cancer caused by human papilloma virus (HPV). We evaluated the drug sensitivity of the Wee1 inhibitor in vivo using various cell lines including, SiHa (HPV16+, p53 wt), CaSki (HPV16+, p53 wt) C33A (HPV -, p53 mut), and LNCaP (HPV -, p53 wt) and assessed whether the combined use of a Wee1 inhibitor and cisplatin causes a synergistic effect. Accordingly, we confirmed the difference in drug sensitivity among cell lines, enhancement of the synergistic/antitumor effect of the Wee1 inhibitor and cisplatin, and occurrence of apoptosis via DNA damage in cervical cancer cell line SiHa with TP53 loss-of-function caused by HPV16. The result indicates that the most common HPV infection in cervical cancer might possibly become a biomarker, which indicates the efficacy of Wee1 inhibitors.

研究分野：産婦人科

キーワード：Wee1阻害薬 子宮頸癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌、肛門癌、咽頭癌等はヒトパピローマウイルス(Human papilloma virus : HPV)感染に起因する。HPV による発癌機序としては高リスク型 HPV の E6、E7 蛋白質が p53 および RB の不活化をもたらす事に起因する。TP53 は G1 チェックポイントの重要な調節因子である。しかし TP53 の機能欠損を認める細胞では、DNA 修復機構は G2/M チェックポイントのみに依存する。そこで重要な役割を担うものが Wee1 である。Wee1 は G2/M チェックポイントのゲートキーパーであり、その調節機構を介し細胞周期制御を行っている。Wee1 阻害にて G2/M チェックポイントを無効化することで p53 が機能欠損した腫瘍において腫瘍細胞のアポトーシスを促進する可能性が示唆される。事実、子宮頸癌と同様に HPV に起因する頭頸部扁平上皮癌および TP53 の機能欠損を認める卵巣癌において Wee1 阻害剤の併用が細胞障害性抗がん剤の作用増強に参与していることが報告されている。しかし子宮頸癌における Wee1 阻害薬の報告はない。

### 2. 研究の目的

本研究は HPV に発癌機序が起因する子宮頸癌において、DNA 損傷を起こす機序である、標準治療の同時放射線化学療法、ないしプラチナ製剤による化学療法における Wee1 阻害薬による治療増強効果およびその作用機序を解明することである。

### 3. 研究の方法

HPV による発癌が確認されている子宮頸癌細胞株である SiHa 細胞(HPV16 型)、Caski 細胞(HPV16 型)、HPV 陰性である C33A 細胞、および陰性コントロールとして HPV 陰性であり前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞を用意した。すべての実験は、シスプラチンと Wee1 阻害薬 (AZD1775) との併用/非併用下で、または放射線による治療条件下で評価した。

MTT assay により各種細胞株におけるシスプラチン使用時の Wee1 阻害薬 (AZD1775) による細胞傷害性を評価し、Wee1 およびその関連タンパク質の発現変化は Western blotting により評価した。また Flow cytometry (FACS) にて同条件下における細胞死および細胞周期の変化を観察し、Colony formation assay にて腫瘍形成抑制能を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) MTT assay における細胞障害性の評価

各種細胞株 Caski (HPV16+), SiHa (HPV16+), C33A (HPV-, P53 mut), and prostate cancer cell line, LNCa (HPV-, P53 wt) に対する in vitro での Wee1 阻害剤 AZD1775 とシスプラチンの組み合わせによる治療効果を評価するため、シスプラチンおよび AZD1775 の併用群/非併用群を用意した。

HPV 陰性コントロールである C33A および LNCaP では AZD 1775 併用による明らかな相乗効果は認めなかったが、HPV 陽性コントロールの SiHa では明らかな相乗効果 (Combination Index : 0.77) を認めた。

	Cisplatin	Wee1i	Cisplatin+Wee1i	CI Index
Caski	10	10.683	10.814	2.094
Siha	13	8.631	3.9991	0.771
C33A	10	18.076	13.685	2.126
LNCaP	3.8	95.23	48.53	13.281

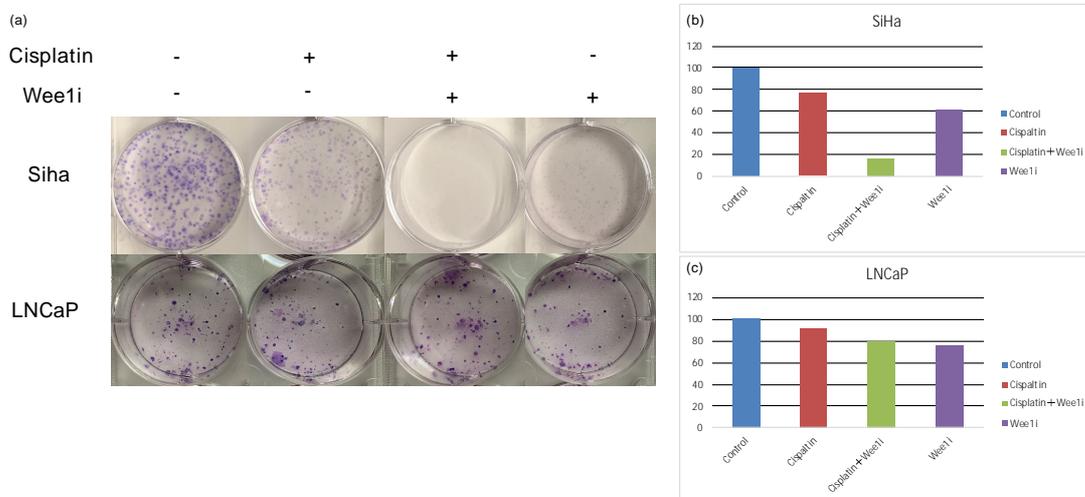
この結果により、HPV 陽性の細胞株に対するシスプラチンと AZD1775 の併用は、シスプラチンに対して相乗的な細胞障害性の増強を呈することが示された。

#### (2) 腫瘍形成能の評価

Colony formation assay を用いて各細胞株でシスプラチンおよび Wee1 阻害薬併用/非併用時の腫瘍形成能を評価した。

SiHa では、シスプラチンおよび AZD1775 の併用群において最も腫瘍形成能の低下を認め

た。一方、LNCaP では、薬剤添加有無にかかわらず、明らかな腫瘍形成能の変化を認めなかった。

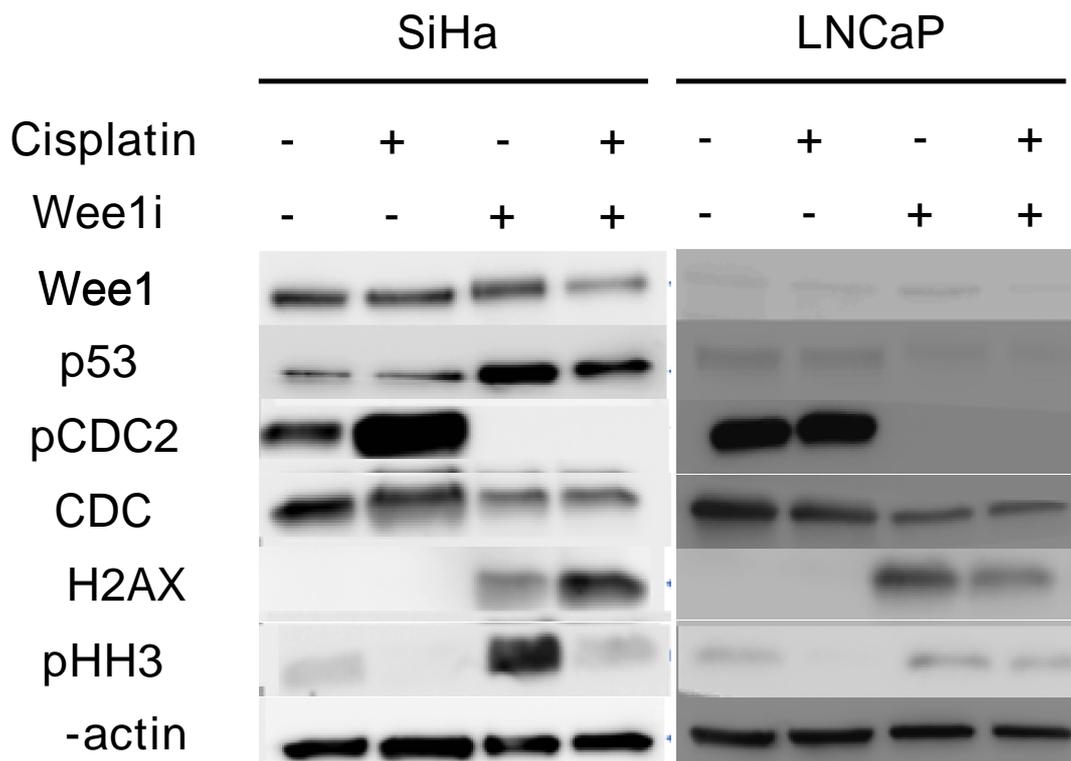


### (3) Western blotting による Wee1 関連蛋白の動態

DNA 損傷の誘発は、癌における Wee1 阻害剤の主要な細胞毒性の結果として報告されている。子宮頸癌での AZD1775 およびシスプラチンの細胞毒性の増大の機序を評価するために、DNA 損傷に対する典型的な DNA アルキル化剤であるシスプラチンの併用有無による AZD1775 の影響を評価した。

Wee1 は CDC2 をリン酸化することにより、細胞周期を減速させ DNA 修復をもたらすが、Western blotting にて AZD1775 の投与下では、SiHa ならび LNCaP においてリン酸化 CDC2 の発現が減弱あるいは消失した。これは、AZD1775 により Wee1 による G2/M checkpoint の不活性化がもたらされたことを示唆する。

また DNA 二本鎖切断の代表的なマーカーである  $\gamma$ H2AX の発現が AZD1775 の投与によって増加し、特に SiHa 細胞においてシスプラチンの併用下でその発現は増強した。つまり AZD1775 投与は、G2 / M チェックポイントの不活性化をもたらし、生じた DNA

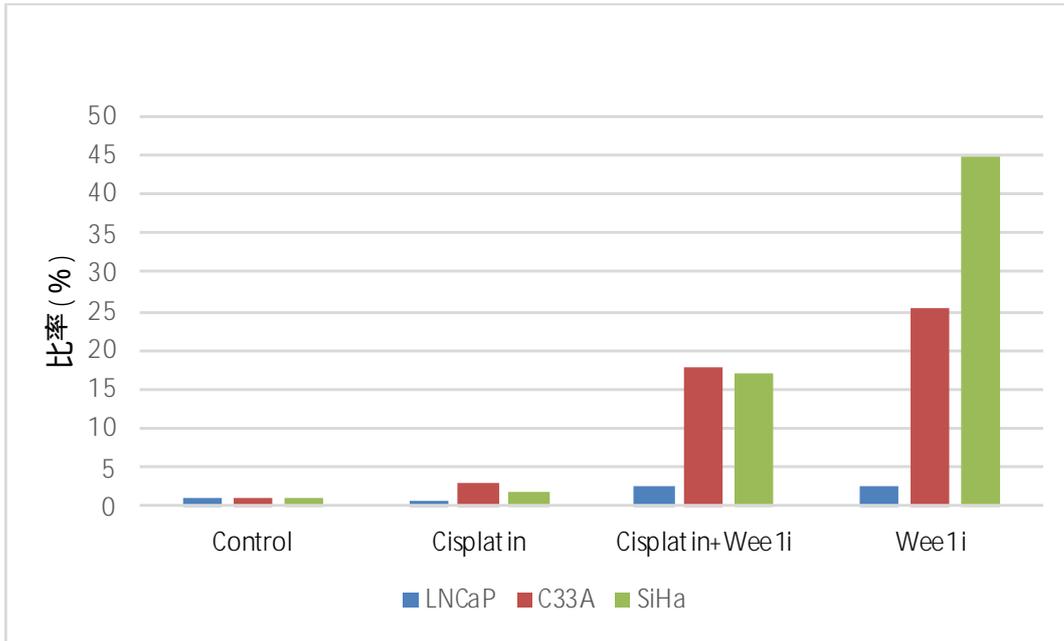


損傷の増加が、HPV 陽性細胞に対する AZD1775 とシスプラチンの相乗効果の主因であると考えられた。

(4) Wee1 阻害薬による細胞毒性の機序

AZD1775 およびシスプラチンの抗腫瘍効果は、DNA 損傷応答後のアポトーシスの誘導に依存する[23, 24]。シスプラチンと AZD1775 の併用群/非併用群において、アポトーシスを示す SubG0/G1 期の割合を同定する事を目的に Flowcytometry で細胞周期分析を行った。AZD1775 またはシスプラチンの単独投与は、SiHa、C33A においてコントロール群に比してアポトーシスを誘発し、シスプラチンと AZD 1775 併用群ではさらにより多くのアポトーシスが誘発された。しかしながら、HPV 陰性細胞である LNCaP では、単独投与ならびに併用投与いずれにおいても明らかなアポトーシスの増加は認めなかった。

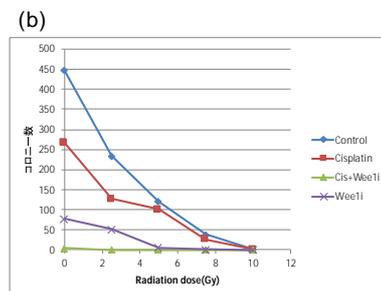
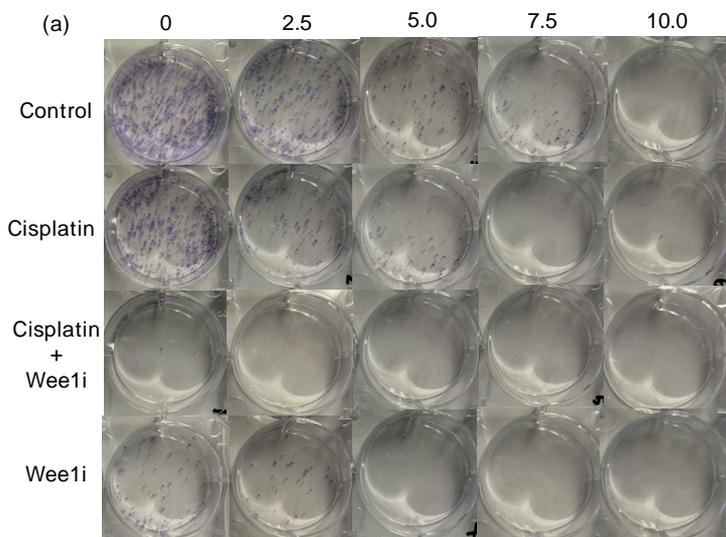
SiHa においては、H2AX の増加と一致してアポトーシスが增強していることから、シスプラチンと AZD1775 の併用は、DNA 損傷の増加とそれに続くアポトーシス誘導によって相乗効果がもたらされていることを示した。



(5) Radiation 併用による細胞障害性の変化

シスプラチンと放射線照射 (0-10Gy) による同時放射線化学療法に準じた条件にて、SiHa におけるシスプラチンおよび AZD1775 添加時における腫瘍形成能を評価した。

放射線照射により、AZD1775 のみ、またはシスプラチンおよび AZD1775 の併用下において、顕著に腫瘍形成能の低下を示した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Osamu Kobayashi
2. 発表標題 Inhibitor of Wee1 kinase enhances effect of chemoradiotherapy in human papilloma virus associated cervical cancer
3. 学会等名 第72回日本産婦人科学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清谷 一馬  (KIYOTANI Kazuma)  (30433642)	公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター 免疫ゲノム医療開発プロジェクト・主任研究員    (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------