

論文の内容の要旨

氏名：小 林 理

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：Wee1 阻害薬を用いた子宮頸癌における抗腫瘍作用の評価

【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 Rb1 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 損傷応答は 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 TP53 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。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 阻害薬の併用が細胞障害性抗がん剤の作用増強に関与していることが報告されている。子宮頸癌における Wee1 阻害薬の報告は極めて少なく、本研究では HPV に起因する子宮頸癌に対する Wee1 阻害薬の効果を検討する事とした。

【実験方法】HPV 陽性の子宮頸癌細胞株である SiHa 細胞 (HPV16+,p53 wt)、CaSki 細胞 (HPV16+,p53 wt)、HPV 陰性の子宮頸癌細胞株である C33A 細胞 (HPV-,p53 mut)、また HPV 陰性の前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞 (HPV-,p53 wt) を用意した。すべての実験は、Wee1 阻害薬 (AZD1775) とシスプラチン併用/非併用下で評価した。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 にて腫瘍形成能を評価した。

【結果】MTT assay にて HPV16 型陽性の SiHa 細胞、CaSki 細胞および p53 変異を有する C33A では Wee1 阻害薬により、HPV 陰性 LNCaP 細胞に対して相対的な薬剤感受性の上昇を示した。また SiHa 細胞では Wee1 阻害薬に対してシスプラチン併用による相乗効果を認めた。Western blotting では Wee1 阻害薬により HPV 感染の有無に関係なくリン酸化 CDC2 を阻害していることが確認できた。それに加え、リン酸化ヒストン H2AX およびリン酸化ヒストン H3 の強発現を SiHa 細胞においてシスプラチン併用投与群で確認した。FACS では、SiHa 細胞において、アポトーシスを示唆する Sub-G0/G1 期の割合がシスプラチン併用投与群において顕著に増加し、同条件にて Colony の形成能低下を認めたが、LNCaP 細胞においては明らかな抗腫瘍効果は認めなかった。

【結論】各細胞株間における薬剤感受性の相違を確認し、HPV16 型感染により TP53 機能欠損を有する子宮頸癌細胞株 SiHa において Wee1 阻害薬とシスプラチンの抗腫瘍効果の相乗効果を確認した。またその作用機序として DNA 損傷を介してアポトーシスに至ることを確認した。今まで子宮頸癌細胞における Wee1 阻害薬の機序やその治療効果への可能性を示した報告は極めて少なく新規性があり、既存治療法の増強作用をもたらす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る。