

Wee1 阻害薬を用いた子宮頸癌における  
抗腫瘍作用の評価

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系産婦人科学専攻

小林 理

修了年 2020 年

指導教員 川名 敬

【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[1]。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[2]。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(DNA Damage Response : DDR)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[3]。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[4]。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参与していることが報告されている[5, 6]。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。

【考察】本研究では、HPV 発癌の主たる要因である TP53 の機能欠損・変異例が、TP53 正常例に比して、Wee1 阻害薬の薬剤感受性の増強に寄与すること可能性を明らかにした。また HPV16 型陽性細胞 SiHa における Wee1 阻害薬とシスプラチンの併用が Wee1 阻害薬単剤に比して相乗効果を示した。

正常細胞では、DNA 損傷に応じて DDR の活性化が誘導され、G1 および G2/M チェックポイントが機能し、細胞周期が減速あるいは停止する[7]。その後、細胞修復ならびにアポトーシスや細胞老化が誘導される。一方、子宮頸癌細胞は、*p53* などの癌抑制遺伝子に変異・欠失を持つため、*p53* 経路に依存した G1/S および G2/M チェックポイントが機能不全となっている。その場合、Wee1 による G2/M チェックポイントに DDR の依存を高める可能性が示唆されている。また結果的に、*p53* 変異や機能欠損が Wee1 阻害薬の効果発現に関与することが想起され、同様の報告も多数存在する[13]。

今回、Wee1 阻害薬投与による LNCaP(HPV-, *p53* wt)に対する SiHa(HPV16+, *p53* wt)、CaSki(HPV+, *p53* wt)、C33A(HPV-, *p53* mut)の IC50 結果から、TP53 の機能欠損・変異が Wee1 阻害薬の薬剤感受性に顕著に寄与している可能性を示唆する。つまり LNCaP に関しては、TP53 の機能維持が Wee1 阻害薬への抵抗性に寄与している可能性を示唆し、TP53 の機能異常が Wee1 阻害薬の最適な標的である妥当性を示している。

その上で、MTT assay で顕著な差異を示した SiHa および LNCaP における Western blotting、FACS、Colony formation assay の結果からは、2 細胞株間で *p53* の変異や活性の有無に関係なく Wee1 阻害薬による DNA 損傷は誘導されるものの、HPV 感染に伴う TP53 の機能異常を有すると考えられる SiHa においては正常な DDR が破綻していることから、アポトーシスを介して細胞死がより多く誘導さ

れ、あるいは、LNCaP では、DDR としての *p53-p21* 経路からの G1 および G2/M チェックポイントが正常に機能していたため、結果的にアポトーシスの増加、腫瘍増殖能の低下に至らなかったと考察される。さらにこの結果は、シスプラチン併用時のみならず Wee1 阻害薬単剤において有意差を持って示されており、Wee1 阻害薬単剤における細胞障害性の報告や[8-10]、*p53* ステータスの変化や DNA 損傷薬の併用が細胞毒性の増強に寄与するという他癌腫における報告[11, 12]を子宮頸癌細胞株においても証明でき得た。

【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。

1. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H: **A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**(12):3812-3815.
2. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM: **The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53.** *Cell* 1993, **75**(3):495-505.
3. Indovina P, Giordano A: **Targeting the checkpoint kinase WEE1: selective sensitization of cancer cells to DNA-damaging drugs.** *Cancer Biol Ther* 2010, **9**(7):523-525.
4. Bauman JE, Chung CH: **CHK it out! Blocking WEE kinase routes TP53 mutant cancer.** *Clin Cancer Res* 2014, **20**(16):4173-4175.
5. Mendez E, Rodriguez CP, Kao MC, Raju S, Diab A, Harbison RA, Konnick EQ, Mugundu GM, Santana-Davila R, Martins R *et al*: **A Phase I Clinical Trial of AZD1775 in Combination with Neoadjuvant Weekly Docetaxel and Cisplatin before Definitive Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2018, **24**(12):2740-2748.
6. Leijen S, van Geel RM, Pavlick AC, Tibes R, Rosen L, Razak AR, Lam R, Demuth T, Rose S, Lee MA *et al*: **Phase I Study Evaluating WEE1 Inhibitor AZD1775 As Monotherapy and in Combination With Gemcitabine, Cisplatin, or Carboplatin in Patients With Advanced Solid Tumors.** *J Clin Oncol* 2016, **34**(36):4371-4380.
7. Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W: **DNA damage response.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, **3**(1):a000745.
8. Hirai H, Iwasawa Y, Okada M, Arai T, Nishibata T, Kobayashi M, Kimura T, Kaneko N, Ohtani J, Yamanaka K *et al*: **Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**(11):2992-3000.
9. Harris PS, Venkataraman S, Alimova I, Birks DK, Balakrishnan I, Cristiano B, Donson AM, Dubuc AM, Taylor MD, Foreman NK *et al*:

- Integrated genomic analysis identifies the mitotic checkpoint kinase WEE1 as a novel therapeutic target in medulloblastoma.** *Mol Cancer* 2014, **13**:72.
10. Zhang M, Dominguez D, Chen S, Fan J, Qin L, Long A, Li X, Zhang Y, Shi H, Zhang B: **WEE1 inhibition by MK1775 as a single-agent therapy inhibits ovarian cancer viability.** *Oncol Lett* 2017, **14**(3):3580-3586.
  11. Rajeshkumar NV, De Oliveira E, Ottenhof N, Watters J, Brooks D, Demuth T, Shumway SD, Mizuarai S, Hirai H, Maitra A *et al*: **MK-1775, a potent Wee1 inhibitor, synergizes with gemcitabine to achieve tumor regressions, selectively in p53-deficient pancreatic cancer xenografts.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(9):2799-2806.
  12. Hirai H, Arai T, Okada M, Nishibata T, Kobayashi M, Sakai N, Imagaki K, Ohtani J, Sakai T, Yoshizumi T *et al*: **MK-1775, a small molecule Wee1 inhibitor, enhances anti-tumor efficacy of various DNA-damaging agents, including 5-fluorouracil.** *Cancer Biol Ther* 2010, **9**(7):514-522.