

博士論文

子宮体癌における PARP(Poly ADP-ribose polymerase)阻害剤
及び放射線照射の抗腫瘍効果に関する検討

宮坂 亞希

目次

要旨	-----	5
第1章 序文	-----	7
1. 子宮体癌の疫学・治療法		
2. 子宮体癌における RAS/MAPK、PI3K/AKT シグナル伝達経路の活性化		
3. 婦人科癌における分子標的治療		
4. 分子標的薬、PARP 阻害薬の新規バイオマーカーの探索		
5. 子宮体癌における放射線による抗腫瘍効果、及び放射線効果を増強する 候補分子標的薬		
6. 本研究の目的		
第2章 対象と方法	-----	18
1. 子宮体癌細胞株・ベクター・形質転換		
2. 試薬		
3. DNA/RNA 抽出		
4. PCR - direct sequence 法		
5. Clonogenic assay		
6. ウェスタンブロット法		
7. 細胞免疫染色		

8. 細胞周期解析
9. X線照射
10. Quantitative-PCR法
11. 遺伝子サイレンシング
12. 低酸素環境
13. 統計解析

第3章 結果 ----- 27

【1】子宮体癌細胞株における PARP 阻害薬の抗腫瘍効果

1-1 PTEN とその他の遺伝子の変異

1-2 PTEN と DNA 修復因子 RAD51 の発現

1-3 PARP 阻害剤の増殖抑制効果

1-4 相同組換え修復因子 γ H2AX と RAD51 の foci 形成試験

1-5 PTEN 導入前と導入後の細胞周期解析

【2】子宮体癌細胞株における放射線照射の抗腫瘍効果

2-1 子宮体癌株の放射線感受性と TP53、PI3K 経路の遺伝子変異

2-2 放射線 (Ionizing radiation, IR) 後の MAPK 経路、PI3K 経路の活性化 (ERK, AKT のリン酸化)

2-3 放射線照射と MAPK 経路阻害薬もしくは PI3K シグナル経路阻害薬との併

用による抗腫瘍効果

2-4 PI3K/mTOR 同時阻害薬は放射線(IR)照射後の HIF-1 α の発現を抑制する

2-5 PI3K/mTOR 同時阻害薬は放射線(IR)照射後の VEGF-A の発現を抑制する

第 4 章 考察 ----- 50

第 5 章 結論 ----- 60

参考文献

謝辞

要旨

PARP (Poly ADP-ribose polymerase) 阻害薬は、*BRCA1/2* 変異で見られるように、DNA の相同組換え修復の障害を来たした癌細胞に対して、特異的に細胞死を誘導することを目的に開発された薬剤である。一方、放射線治療も DNA 損傷に伴う細胞死誘導という共通性を有する。*TP53* が DNA 損傷修復に関わるほか、*PTEN* の相同組換え修復への関与が注目されている。子宮体癌は *PTEN* に高率に変異を有し、PARP 阻害薬への有効性が期待される。また、放射線照射後に活性化するシグナル経路として MAPK 経路や *PTEN* が関わる PI3K/mTOR 経路が知られているが、子宮体癌において放射線治療感受性に関わる経路は明らかではない。

本研究では、子宮体癌細胞株を用いて PARP 阻害薬 Olaparib の有効性を検討し、子宮体癌において Olaparib に高感受性株が存在すること、Olaparib に対する感受性と *PTEN* 変異とが相関しないことを明らかとした。Olaparib 添加により誘導される相同組換え修復関連蛋白 RAD51, γ -H2AX の foci の数についても、*PTEN* 発現の有無は相関を示さなかった。次に、子宮体癌細胞株において *TP53* 変異陽性が放射線抵抗性と相関すること、MAPK 経路・PI3K 経路いずれも放射線照射後に活性化することを示した。MAPK 経路阻害薬 (UO126) または PI3K/ mTOR 同時阻害薬 (NVP-BEZ235) と放射線照射の併用において、NVP-BEZ235 は UO126 に比較して放射線効果を有意に増強した。以上より、子宮体癌では PI3K/mTOR

経路障害が放射線治療効果の増強に有用である可能性がある。

第1章 序文

1. 子宮体癌の疫学・治療法

子宮体癌は世界中の女性の人口で4番目に高い罹患率を有する癌である(29, 55)。病理学的には Type I (ホルモン依存性) と、Type II (ホルモン非依存性) に分類され、Type I は子宮内膜に類似した類内膜腺癌 (Grade1/2) であり、分化度が高く、子宮体癌の約 80% を占める(7)。Type II は類内膜腺癌 (Grade3)、漿液性腺癌や明細胞腺癌などの組織型を示し、頻度は低く発生機序は Type I とは発生機序が異なると考えられている。以後、本研究の主たる対象である Type I の類内膜腺癌について述べる。発症機序にはエストロゲンへの長期的な持続曝露が関与しており(9)、「初潮が早い」「52歳以降での閉経」「月経異常」、「未産」、「エストロゲン産生腫瘍」「エストロゲン単独のホルモン補充療法」「肥満」「高血圧」「糖尿病」がリスクファクターとして挙げられる(35)。好発年齢は閉経後である 50-60代をピークとするが、近年は年齢に関係なく増加傾向であり、晩婚化や生活習慣病の増加によって今後さらに罹患率が増加すると考えられている(1)。

子宮体癌の病期進行度は Stage I から IV に分類され、転移形式としては血行性・リンパ行性・播種が主である。周辺臓器である卵巣への転移率は 5%前後とされる(68)。子宮体癌の治療は主に、手術療法を行い、摘出検体の筋層浸潤、脈

管侵襲、分化度、リンパ節転移の有無などにより低リスク群～高リスク群に分別し、中リスク以上の症例に後療法として化学療法を施行される。欧米では術後に放射線療法が用いられるのが一般的である(5, 66)。主治療法としては手術・化学療法・放射線療法等が挙げられ、再発子宮体癌に対しては一般的に化学療法が選択されるがその奏効率は低く(45)、分子標的薬は新たな治療選択肢として期待されている。

2. 子宮体癌における RAS/MAPK、PI3K/AKT シグナル伝達経路の活性化

MAPK 経路及び PI3K/mTOR 経路は EGFR (Epidermal growth factor Receptor) などのチロシンキナーゼ受容体 (RTK: Receptor Tyrosine Kinases) の下流に位置する。MAPK および PI3K シグナル伝達経路はその下流の分子機構において細胞増殖や分化、タンパク合成を行い、抗アポトーシスに働く (図 1)。子宮体癌では高率にこれらの経路が活性化している。原因はシグナル伝達に関わる分子の遺伝子変異で、*K-RAS* 15%、*PIK3CA* (PI3 kinase) 約 26%、*PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) に約 45% の頻度で遺伝子変異を有し、その変異が共存していることが報告されている(36, 42, 47, 48)。この RAS/MAPK 経路、PI3K/mTOR 経路のシグナルの異常活性化が子宮体癌の増殖メ

カニズムのひとつとされる。また、PI3K/mTOR 経路の活性化は DNA 修復経路の制御にも重要な役割を果たしている(61)。

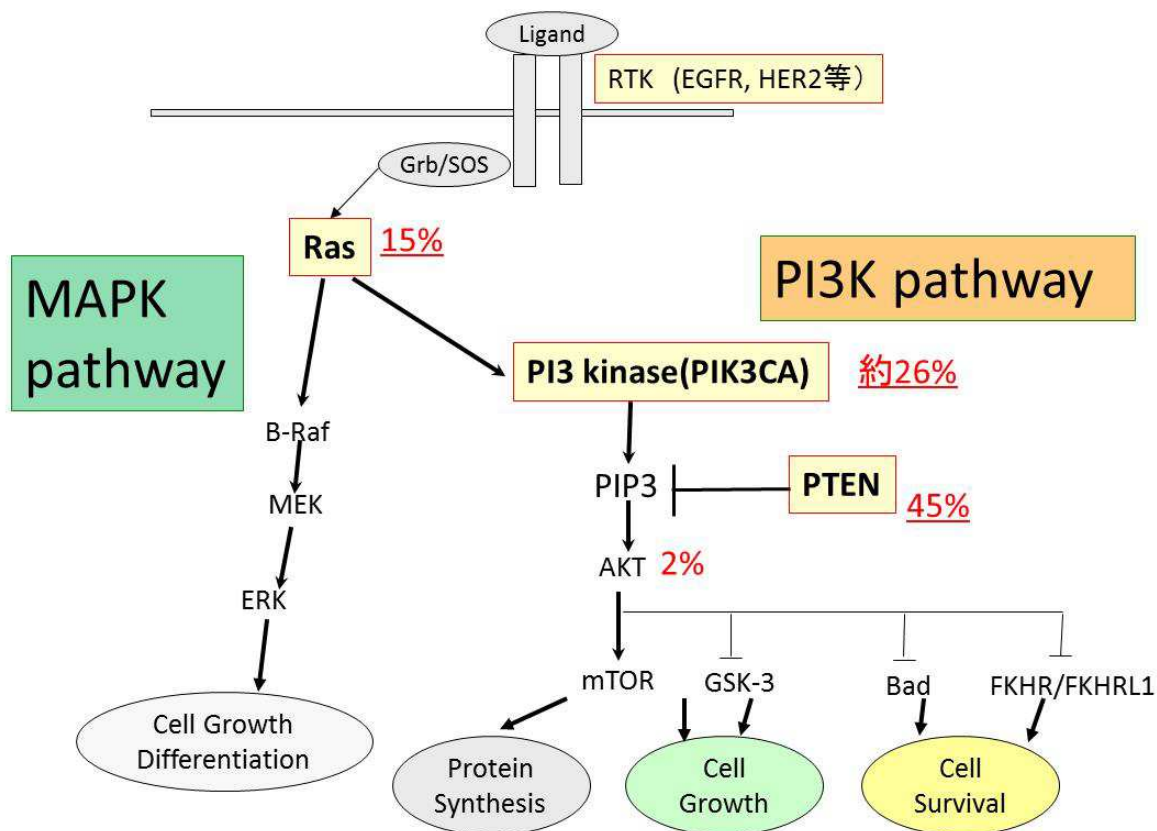


図1. RAS/MAPK、PI3K/mTOR シグナル伝達経路と子宮体癌における遺伝子変異頻度

MAPK 経路はチロシンキナーゼ受容体(RTK)、RAS の変異や過剰発現により活性化され、PI3K/mTOR 経路では、上記の他に *PI3K(PIK3CA)* の変異や *PTEN* の不活化などによっても活性化され、細胞増殖・細胞生存が促進される。mTOR は AKT の下流でリン酸化を受ける分子の一つであり、さらに下流の分子のリン酸化を誘導する。(赤字；子宮体癌における変異率)

3. 婦人科癌における分子標的治療薬

分子標的治療薬は癌の生物学的特徴を標的とする薬剤であり、HER2 受容体陽性乳癌に対するトラスツズマブや、ALK 転座陽性肺癌に対するクリゾチニブは既に実地臨床で活用されている。

分子標的治療薬は標的因子によって①増殖因子受容体/シグナル伝達阻害剤、②DNA 修復・転写制御因子阻害剤、③血管新生阻害剤に分類され、現在開発されている主な薬剤は以下の通りである。

①EGFR 阻害薬： Imatinib, Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab, Trastuzumab,

AKT 阻害薬： Perifosine

mTOR 阻害薬： Temozolimumab, Everolimus

②PARP 阻害薬： Olaparib

HDAC 阻害薬： Vorinostat

③VEGFR 阻害薬： Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib

VEGF 阻害薬： Bevacizumab

その他 葉酸受容体阻剤： Folate receptor antagonist: Methotrexate

婦人科癌における分子標的薬は卵巣癌において Bevacizumab が 2013 年に保険適応となった。その他の婦人科癌（肉腫を除く）では未だ分子標的薬の保険承認はなく、今後の臨床試験の結果が期待されている。子宮体癌においては

PI3K/mTOR dual inhibitor (PF-04691502)、PI3K inhibitor (BKM120) の第 II 相臨床試験が終了しており、mTOR 阻害薬(everolims)は第 II 相、PARP (poly ADP-ribose polymerase) 阻害薬は第 III 相臨床試験が進んでいる(4, 20, 21, 24, 59)。我々は以前、子宮体癌における RAS-MAPK 経路、RAS/PI3K 経路の活性化に着目しいち早く PI3K/mTOR 同時阻害剤の有効性につき報告を行っており(54)、本研究では相同組換え修復(HR: Homologous Recombination) 機構における PARP 阻害薬および PI3K/mTOR 阻害薬に着目した。

4. 分子標的薬、PARP 阻害薬の新規バイオマーカーの探索

細胞内では代謝や紫外線などにより DNA は一本鎖切断 (SSB: Single Strand Break) を起こす。DNA が一本鎖の損傷を受けた場合、PARP が損傷部位に結合して一本鎖切断修復が始まる。しかし PARP が阻害されると、一本鎖切断部位は修復されず、やがて二本鎖切断 (DSB: Double Strand Break) を生じる(8, 15) 。

DSB に働く修復系として相同組換え修復 (HR: Homologous Recombination) が知られている。HR には BRCA1、BRCA2、RAD51、ATM など 30 種類以上の分子が関わる。遺伝性乳がん・卵巣がん症候群では主に BRCA1 または BRCA2 の生殖細胞変異が存在し、癌部位では BRCA の機能が欠損しているため HR が行えない。したがって PARP 阻害剤によって SSB の修復を阻害すると、HR のどちら

も機能せず、結果として癌細胞はアポトーシス（合成致死）を起こす(3, 15) (図2)。

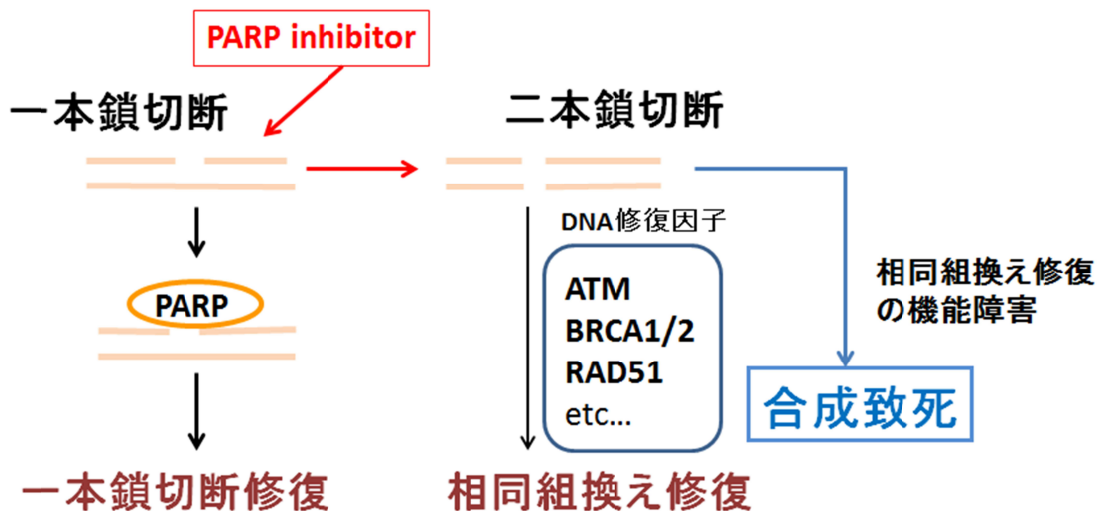
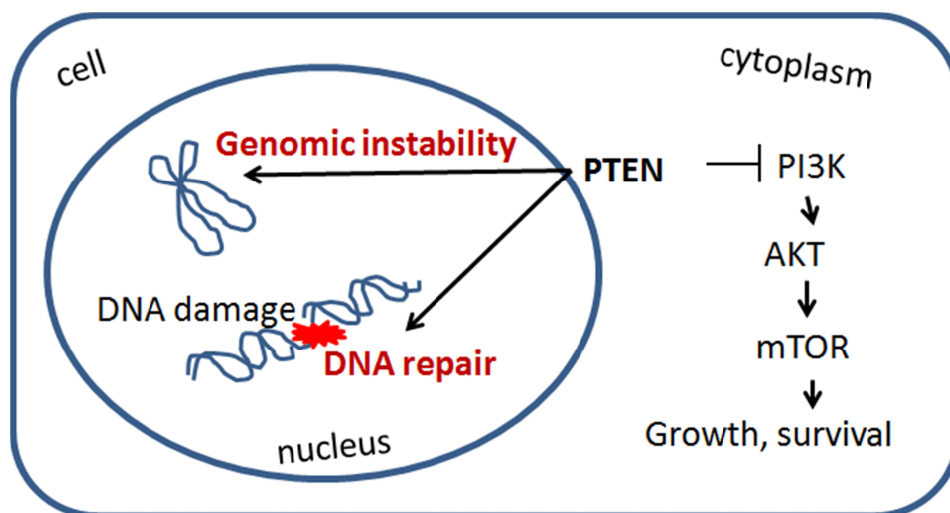


図 2 相同組換え修復機能の欠損した腫瘍細胞内での合成致死. 正常細胞では PARP 阻害により、一本鎖切断修復が行われずに二本鎖切断が蓄積してきても相同組換え修復 (HR: Homologous Recombination)によって、細胞死を免れる。HR 機能を失ったがん細胞では、PARP 阻害によってもたらされる二本鎖切断を修復できず、合成致死に至る。

よって *BRCA1/2* のみならず、他の HR に関わる遺伝子に異常が認められる場合も高い治療効果を示す可能性がある。また、そのような遺伝子異常が治療効果予測のバイオマーカーとなる可能性がある。

我々は子宮体癌に最も変異を認める遺伝子とされる PTEN の DNA 修復機構への関与に着目した。PTEN は主に PI3K/AKT 経路に抑制的に働く (図 1,3)。一方

で、未だ結論は出ていないものの核内でゲノムの安定性や DNA 相同組換え修復にも関わるとする複数の既報が存在する(14, 22, 28, 40, 52) (図 3)。



Oncogene, 2008

図 3 細胞内における PTEN の役割. 図 1 で示したように脱リン酸化作用により PI3K を抑制する機能に加え、核内に移行し、ゲノム安定性維持や DNA 修復、さらには HR にも関与することが明らかとなってきた。

相同組換え修復機構において BRCA1/2 と並び RAD51 は重要な役割を担っている。PTEN は(i) RAD51 の promoter 領域に結合することによって RAD51 の発現を増強することが明らかとなっている(10, 52)。さらに(ii) RAD51 の損傷部位への結合に促進的に作用する(14)との説もある(図 3)。

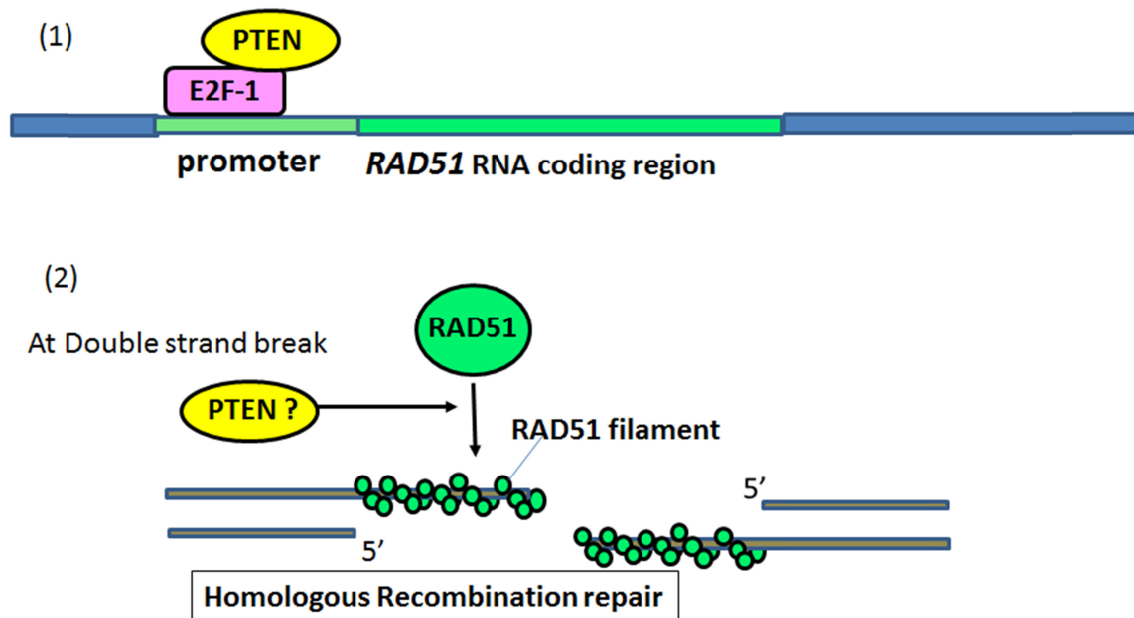


図4 相同組換え修復におけるPTENの作用点. RAD51がDNA損傷部位に結合することを促進する作用を有すると考えられている。

子宮体癌は類内膜腺癌に限定するとPTEN変異の頻度は52%と高い変異率を有し、PTEN機能欠損からHRも障害されている可能性がある。その場合、PTEN変異陽性の場合にPARP阻害薬が有効であると予想される。しかしながら、PTENのHRへの関与については不明な点も多く、実際にPTEN変異とPARP阻害薬感受性との相関は明らかではない。

5. 子宮体癌における放射線による抗腫瘍効果、及び放射線効果を増強する候

補分子標的薬

子宮体癌に対して放射線治療は、術後、脛断端や骨盤内などの局所再発治療に広く用いられている。しかし一方で *in vitro* での放射線による抗増殖抑制効果の報告はほとんど見られない。

他の癌種では、放射線照射後に細胞内の MAPK 経路、PI3K 経路を含むシグナルが活性化する(2, 65)ことが報告されているが、子宮体癌ではすでにこれらのシグナル伝達経路が活性化されているものが多く (図 1)、放射線照射によってどのシグナル伝達経路が影響を受けるのかは知られていない。他癌種では、放射線治療と分子標的薬 (mTOR 阻害薬、PI3K 阻害薬、AKT 阻害薬など) の併用についての解析が試みられており(37, 65)、臨床では肺非小細胞癌において mTOR 阻害薬と放射線併用療法、子宮頸癌にて mTOR 阻害薬と化学放射線療法併用療法の第 I 相試験が終了した。しかし子宮体癌では未だ行われていない。MAPK 経路阻害薬、PI3K 経路阻害薬の例を図 5 に示す。UO126 は MAPK 経路における MEK1/2 を阻害し、BEZ235 は PI3K 経路において、PI3K と mTOR を同時に阻害する (図 5)。

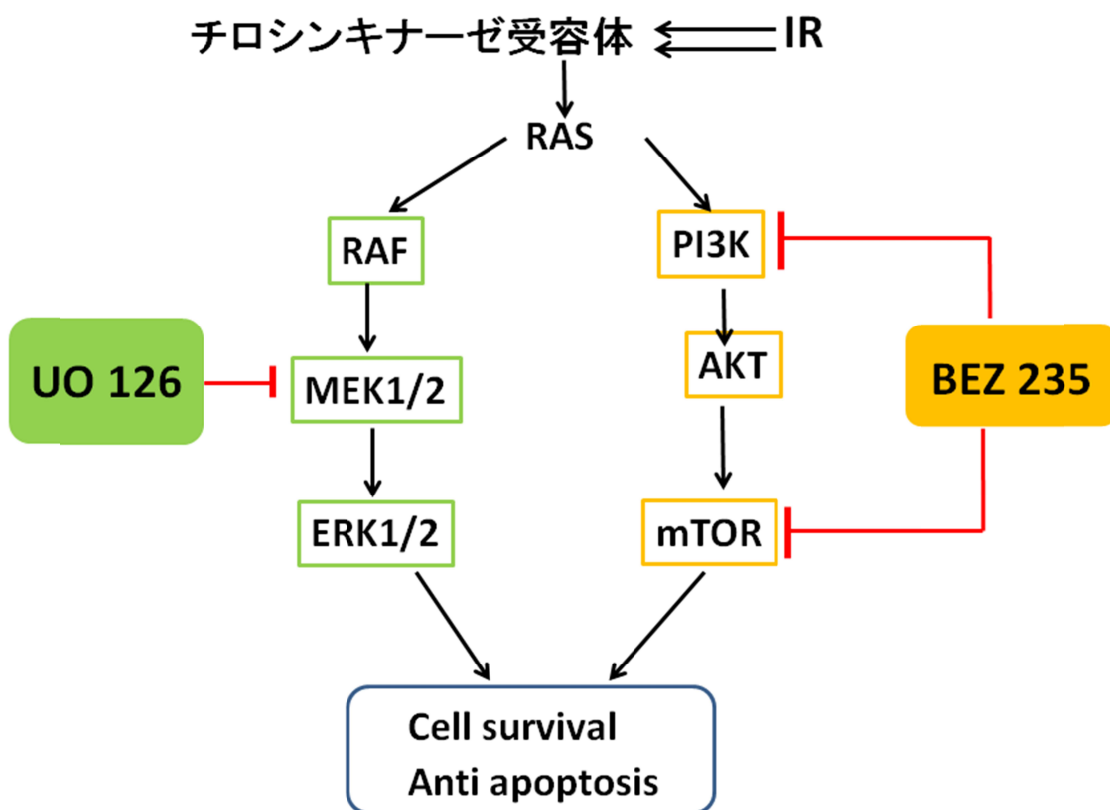


図5 PI3K・MAPK シグナル伝達経路阻害薬の例. UO126 は MAPK 経路における MEK1/2 の阻害薬の一つであり、BEZ235 は PI3K/mTOR 同時阻害薬の一つである。

6. 本研究の目的

本研究では、子宮体癌における PARP 阻害薬の有効性の評価、PARP 阻害薬の効果と *PTEN* 変異の意義、放射線照射により活性化されるシグナル伝達経路、感受性予測因子、放射線効果を増強する分子標的薬について検討することを目的とした。具体的には以下の項目について明らかとすることとした。

- ①PARP 阻害薬に感受性の高い子宮体癌株は存在するか？
- ②PTEN 変異は PARP 阻害薬のバイオマーカーとなりうるか？
- ③放射線照射の感受性に関わる因子として、p53 変異と PTEN 変異のいずれが重要か？
- ④放射線照射によって、MAPK 経路や PI3K/mTOR 経路はさらなる活性化を受けるのか？
- ⑤特定のシグナル伝達経路の阻害が放射線治療効果を増強しうるか？また、その場合、増強作用に関与する分子は何か？

第2章 対象と方法

1. 子宮体癌細胞株・ベクター・形質転換

子宮体癌 16 種類の細胞株を使用した。組織型は漿液性腺癌 1 株(HEC-180)を除き類内膜腺癌である。AN3CA、KLE、HEC-1B、RL-95-2 は American Type Culture Collection(UA, USA)より購入した。HHUA は理研細胞株 BANK (筑波、日本)より購入した。Ishikawa3-H-12 は西田正人先生 (霞ヶ浦医療センター、茨城、日本)より譲渡いただいた。その他 HEC-6、HEC-50B、HEC-59、HEC-88、HEC-108、HEC-116、HEC-151 は蔵本博行先生 (北里大学、神奈川、日本)より譲渡いただいた。

AN3CA、HEC-1B、Ishikawa3-H-12、HEC-6、HEC-50B、HEC-59、HEC-88、HEC-108、HEC-116、HEC-151 は 10%FBS (Invitrogen 社) 添加 MEM 溶液 (Sigma-Aldrich 社) を培地とし、KLE、HHUA、RL-95-2 は 10%FBS 添加 DMEM 溶液を培地とし、37°C 5%CO₂ 下で培養した。

HEC-6 にレトロウィルスベクター (pFB-NEO) (購入場所) を用いて野生型 PTEN を導入し、ネオマイシンによる薬剤選択を経て PTEN 安定発現株を作製した。

2. 試薬

PARP 阻害薬 (Olaparib) は AstraZeneca より原末提供を受けた。DMSO

(dimethylsulfoxide) に溶解し、DMSO 濃度は全ての assay で 0.1% 以下となるように調整した。

NVP-BEZ235 (PI3K/mTOR 阻害剤), と UO126 (MAPK 阻害剤) はそれぞれ Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) より購入した。DMSO 濃度は全ての assay で 0.1% 以下となるように調整した。

3. DNA/RNA 抽出

子宮体癌株 HEC-251、HEC-265、HEC-180、Ishikawa3-H-12 から Qiampr DNA Mini および micro Kit (QIAGEN, Valencia, CA) を使用してプロトコールに従い DNA を抽出した。また、HEC-1B から RNase mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、Super scriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いてプロトコールに従い cDNA を精製した。DNA/RNA 濃度は Nanodrop2000 spectrophotometer (Thermo scientific, USA) にて決定した。

4. PCR - direct sequence 法

既報(23, 30)の中で Ishikawa 細胞株の *TP53* 変異の有無に違いが認められたため、遺伝子変異 (exon 4-8) を検索した。また *PTEN* の遺伝子変異は、これまでの我々

のデータと報告(54, 63)に加え、HEC-251、HEC-265、HEC-180 を調べた。PCR primer は以下の通りである。

TP53 Exon4 Forward: 5'-CTGGTAAGGACAAGGGTTG-3'

Reverse: 5'-CAAAGGGTGAAGAGGAATCC-3'

Exon5 Forward: 5'-TGTTCACTTGTGCCCTGACT-3'

Reverse: 5'-CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG-3'

Exon6 Forward : 5'-GCCTCTGATTCCTCACTGAT-3'

Reverse: 5'-TTAACCCCTCCTCCCAGAGA-3'

Exon7 Forward: 5'-ACTGGCCTCATCTTGGGCCT-3'

Reverse: 5'-TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC-3'

Exon8 Forward: 5'-GAGCTTAGGCTCCAGAAAGG-3'

Reverse: 5'-AGGAAAGAGGCAAGGAAAGG-3'

PTEN に関しては cDNA を精製した後、LA-Taq (Takara BIO, Madison, WI) を用いて RT-PCR を行い、全 Coding region を含む PCR 産物をもとに変異の有無を調べた。PTEN 変異解析で用いた primer は以下の通りである。

PTEN

PCR primer

Forward: 5'-GCCGTTCCGGAGGATTATTCGTCTTCTC-3'

Reverse: 5'-CTGGTAATCTGACACAATGTCCTATTGCC-3'

Sequence primer

①: 5'-ACCAGCAGCTTCTGCCATCT-3'

②: 5'-ACCAATGGCTAAGTGAAGATG-3'

③: 5'-CACACAGGTAACGGCTAGGG-3'

④: 5'-CAGTTTATTCAAGTTTATTTTCATGG-3'

4. Clonogenic assay

- 1) PARP 阻害薬の抗腫瘍効果：6 ウェルプレートに細胞を 2,000 個ずつまいた。PARP 阻害薬を添加し、持続的に 10nM から 100uM の濃度に維持した。14～21 日間培養し、コロニーの数が半数に低下する濃度を SF₅₀ (survival fraction at 50%) として算出した。また、HEC-6 と、HEC-6-PTEN に放射線照射を行い、培養しコロニー数を調べた。
- 2) 放射線照射による抗腫瘍効果：6 ウェルプレートに細胞を 800-14400 個ずつまいた。24 時間後に UO126(MAPK 阻害剤)10μM と BEZ235(PI3K/mTOR 同時阻害剤)50nM, 100nM を添加し、放射線を照射した。24 時間後にコントロールを含め全ての培養液を洗浄し新鮮な培養液を加え 10-14 日間培養し、D₁₀ 値 (細胞が 90%増殖抑制を受ける放射線量) を算出した。

5. ウェスタンブロット法

細胞を 1% triton を含むサンプルバッファー (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L sodium chloride, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L sodium orthovanadate, and 10 mmol/L sodium fluoride) を用いて溶解した。これを 15,000rpm で 20 分間、4°C で遠心し、上清をタンパク抽出液とした。タンパク濃度は Bradford assay (Bio-Rad) にて測定した。タンパクは SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により分離し、immobilon トランスファーメンブレン (Millipore) にて転写した。転写膜を TBST に溶解した 5% スキムミルクで 30 分振盪しながらインキュベートした。その後、スキムミルクを洗浄し、一次抗体に浸し 4°C 下に一晚放置した。一次抗体は PTEN (138G6, C 末端抗体), phospho-PTEN (Ser³⁸⁰), AKT, phospho-AKT (Ser⁴⁷³) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), PARP, cleaved PARP (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), RAD51 (Millipore, MA, USA), ERK, phospho-ERK, phospho-4EBP1 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), HIF-1 α (Nobus biologicals, USA), and β -actin (Sigma-Aldrich, MO, USA) を使用した。一次抗体を洗浄後、希釈した二次抗体 (Cell signalling) にて 1 時間インキュベートした後、二次抗体の洗浄を行った。ECL kit (GE healthcare, Piscataway, NJ) で蛍光標識し、撮影機 (GE healthcare) にて画像化した。

6. 細胞免疫染色

Olaparib 10 μ M 下もしくは、10Gy 照射後に 6 ウェルプレート上にて細胞を 24 時間培養した。4% paraformaldehyde で固定し、0.2% (v/v) Triton X-100 の PBS にて透過処理を行った。RAD51 (Millipore, MA, USA) と γ H2AX (Millipore, MA, USA) の一次抗体を使用後、二次抗体 Alexa Fluor 488-conjugated chicken anti-mouse IgG と Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA) にて染色を行い、核はヘキスト染色を施行した。共焦点顕微鏡 (Carl-Zeiss MicroImaging Inc., Oberkochen, Germany) により観察し、RAD51 と γ H2AX の foci の数を 100 個数え、その平均値を算出した。

7. 細胞周期解析

PARP 阻害薬、放射線照射の効果を Flow cytometry 法で解析した。10cm dish 細胞をまき、IR 照射後、またオラパリブを添加した後 24~72 時間培養した。HIF-1 α の knock down 後の解析では siRNA 添加後 24 時間後、新鮮な培養液に変更して IR 照射、48 時間培養した。トリプシン試薬で細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、RNase (0.25mg/ml, Sigma-Ardrich) で 37 $^{\circ}$ C 30 分間処理し、その後 PI (50 μ g/ml, Sigma-Ardrich) で 4 $^{\circ}$ C 30 分間暗所で核染色し、Flow cytometry (FACSCalibur

HG, Franklin Lakes, NJ) で細胞周期解析した。解析ソフトは CELLQuest pro ver.3.1 (Beckman Coulter Epics XL, Beckman Coulter) を用いた。

8. X線照射

島津社 PANTAK HF-350 X-ray generator (1.0 mm Al +0.5 mm Cu filter; 200 kVp; 20 mA)にて 135-140cGy/min の線量率で照射を行った。

9. Quantitative-PCR 法

6 ウェルプレート各々に HEC-1B 細胞を 30%confluency でまいた。24 時間後に UO126(MAPK 阻害剤)10 μ M と BEZ235(PI3K/mTOR 同時阻害薬)の培養液に変え、1 時間後に 10Gy の放射線照射と 1 %低酸素下においた。24 時間後、RNeasy Mini Kits (QIAGEN, Valencia, CA) を用いてプロトコールに従って total RNA を抽出した。次に Super script III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して total RNA から cDNA を精製した。VEGF-A を One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa, Tokyo, Japan) 試薬を用いて、Light Cycler (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) で Real-time PCR 法を行った。VEGF-A の発現レベルは各々のサンプルにおける GAPDH の発現量と比較した。使用したプライマーは以下の通りである。

VEGF-A forward: 5' -CCAGCAGAAAGAGGAAAGAGGTAG-3'

reverse: 5'- CCCCAAAGCAGGTCCTCAC -3'

1 0. 遺伝子サイレンシング

各細胞を 10mm プレートに約 30%の細胞密度になるようにまき、24 時間インキュベーションを行った、一種類の *PTEN*, 2 種類の *HIF-1a* の small interfering RNA (siRNA) duplexes を用いて試薬と共に添加した。トランスフェクション試薬は Lipofectamine 2000 RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) と Opti-MEM medium(GIBCO)を使用した。 *PTEN* と *HIF-1a* の siRNA は Invitrogen 社より購入した。 Negative control Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)をコントロールとして使用した。

1 1. 低酸素環境

細胞をまいてから 24 時間は 37°C 5%CO₂ 下で培養した後、低酸素環境(1% O₂、5% CO₂、94% N₂ 、 37°C) 下で 8 時間または 24 時間培養した。

1 2. 統計解析

各データは3回のアッセイの平均±標準偏差で表した。2群間の有意差に関しては student t 検定を行い、p 値が 0.05 以下のものを有意差ありと判定した。

第3章 結果

【1】子宮体癌細胞株における PARP 阻害薬の抗腫瘍効果

1-1 子宮体癌における *PTEN* の遺伝子変異

PTEN (exon1-9)の変異を調べた。新たに加わった HEC-251、HEC-265、HEC-180 につき解析し(図 6)、これまでの我々のシーケンスデータと既報(54, 63)を併せて表 1 にまとめた。

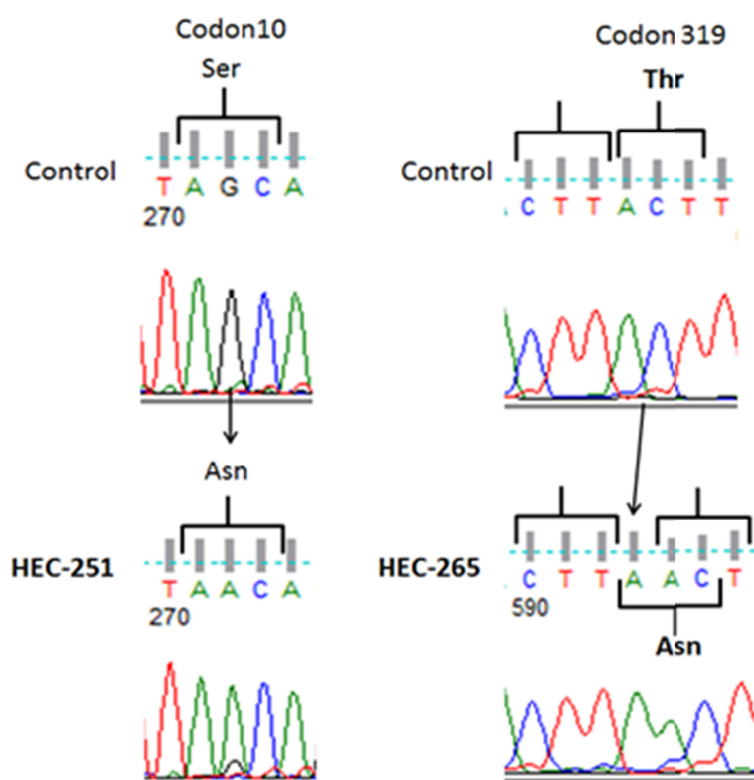


図 6 *PTEN* の遺伝子変異

PCR-Direct Sequence により変異を同定した。HEC-251 では codon 10 に点突然変異を認め、serine から asparagine へのアミノ酸置換が起きている。

HEC-265 では codon 319 で "A" の insertion が起こり frameshift 変異が生じている。HEC-180 では変異は認められなかった。

表 1 子宮体癌細胞株 16 株の組織型と *PTEN* 変異

Histological subtypes	Cell lines	<i>PTEN</i> status		
		Codon	Mutation	Predicted effect
Endometrioid adenocarcinoma	HEC-6	intron 4(+2)	T to C	Splice donor
		289	1bp(A) del	Frameshift
	HEC-59	41	TAC to CAC	Tyr(Y) to His(H)
		233	CGA to TGA	Stop
		246	CCG to CTG	Pro(P) to Leu(L)
		267	1bp(A) del	Frameshift
	HEC-88	130	CGA to GGA	Arg(R) to Gly(G)
		173	CGC to TGC	Arg(R) to Cys(C)
		310	GAT to TAT	Asp(D) to Tyr(Y)
		341	TTT to TGT	Phe(F) to Cys(C)
	HEC-108	6	2bp(AA) del	Frameshift
		289	1bp(A) del	Frameshift
	HEC-116	Intron 2(-1)	G to A	Splice acceptor
		173	CGC to TGC	Arg(R) to Cys(C)
	HEC-151	233	CGA to TGA	Stop
		33	3bp(ATT) del	In-frame deletion
	HHUA	76	2bp(AT) del	Frameshift
		164	1bp(A) del	Frameshift
	AN3CA	289	1bp(A) del	Frameshift
		130	1bp(G) del	Nonsense
Ishikawa 3-H-12	289	1bp(A) del	Frameshift	
	317-318	4bp(ACTT) del	Frameshift	
RL95-2	322	1bp(A) del and 1bp(A) ins	Frameshift	
HEC-251	10	AGC to AAC	Ser(S) to Asn(N)	
HEC-265	319	1bp(A) ins	Frameshift	
KLE	WT	None		
HEC-1B	WT	None		
HEC-50B	WT	None		
Serous adenocarcinoma	HEC-180	WT	None	

PTEN の変異は類内膜腺癌 15 株中 12 株 (80%) に見られ、これは既存の報告における *PTEN* の変異率 35~55% (36, 42, 48) と比較して高い変異率であった。変異はアミノ酸置換を伴う点変異や、Frameshift を生じる変異が多く、1 株に 1~4 か所の点変異を有していた。

1-2 PTEN と DNA 修復因子 RAD51 の発現

子宮体癌株 16 株よりタンパクを抽出し、western blotting を行い、子宮体癌株における PTEN の発現と、RAD51 の発現を評価した。PTEN 変異陰性の 4 株 (HEC-1B, HEC-50B, KLE, HEC-180) ではいずれも PTEN の発現が認められ、12 株の PTEN 変異株については、HEC-116, HEC-88, HEC-151, HEC-251 の 4 株において PTEN 発現を認めた (図 7-A)。いずれも点変異や in-frame 変異の株であり、変異蛋白も検出されていると考えられる。表 2 に表 1 の変異と図 7 の full length の PTEN の発現の関係性についてまとめた。RAD51 は 16 株全てで発現していた。RAD51 の発現は PTEN の変異や発現消失に影響を受けないことが示唆された。

また、PTEN 欠損株である HEC-6 に野生型 PTEN を導入し、PTEN 安定発現細胞株 HEC-6-PTEN を樹立した。まず HEC-6-PTEN において外因性 PTEN が確実に導入されていることを確認した (図 7-B)。AKT のリン酸化 (ser-473) は PTEN 導入によって抑制されているため、導入した細胞株の PTEN が、通常の PTEN と同様に PI3K 経路を抑制する機能を有していることを示している。しかしながら、RAD51 の発現は PTEN の導入によって上昇せず、PTEN とは独立した発現制御を受けていると考えられた。

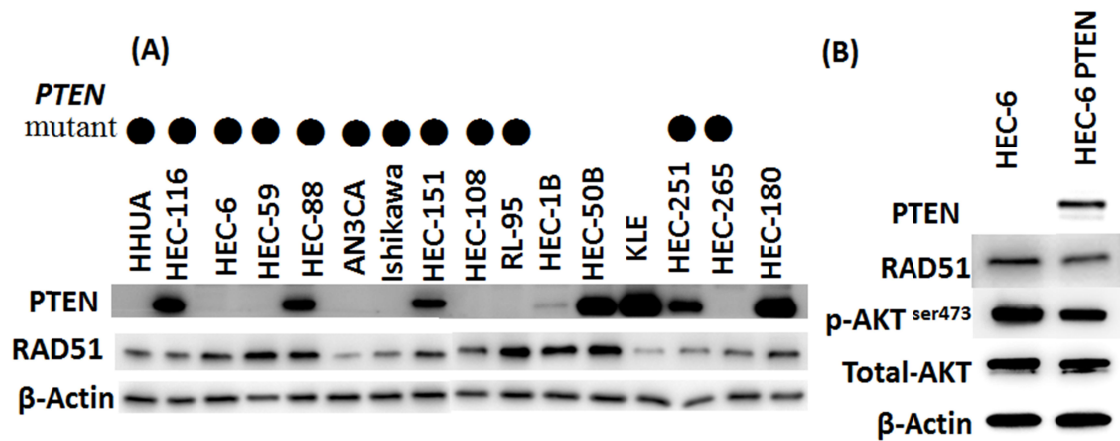


図7 子宮体癌細胞株における PTEN 変異/発現と RAD51 発現

(A) 子宮体癌株 16 株における PTEN と RAD51 発現 を western blotting にて検討した。PTEN 変異陽性 (mutant)株については、●を付した。(B) HEC-6 と HEC-6 の PTEN 導入株における PTEN, pAKT, RAD51 を western blotting にて検討した。

表2 PTEN 変異と発現

	HEC-1B	HEC-50B	KLE	HEC-180	HEC-116	HEC-88	HEC-151	HEC-251	HHUA	HEC-59	HEC-108	Ishikawa	AN3CA	RL-95	HEC-6	HEC-265
PTEN mutation					●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
両alleleのtruncating mutation									○	○	○	○				
片側alleleのtruncating mutation													○	○	○	○
Point mutation/ in-frame mutation					○	○	○	○								
PTEN expression	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

1-3 PARP 阻害剤の増殖抑制効果

PARP 阻害薬の抗腫瘍効果について、clonogenic assay にて検証した。子宮体癌株 16 株に PARP 阻害薬 (olaparib) を添加 (10 nM~100 uM) し、持続的な曝露

のもとに 14–21 日間 incubate した。SF50 値 (survival fraction at 50% : コロニー数がコントロールの 50%となる濃度) は 8~2,500 nM であった (図 8-A, B)。16 株中 4 株 (25%) は、SF50 \leq 100nM (高感受性) を示し、4 株(25%)は SF50 \geq 1,000 nM (低感受性) であった。高感受性の 4 株のうち 3 株は PTEN 変異陽性であったが、低感受性 4 株はいずれも PTEN 変異陽性であった。PTEN 変異株と PTEN 野生株で SF50 値に有意差を認めなかった (p 値 0.26: by Student t- test)。

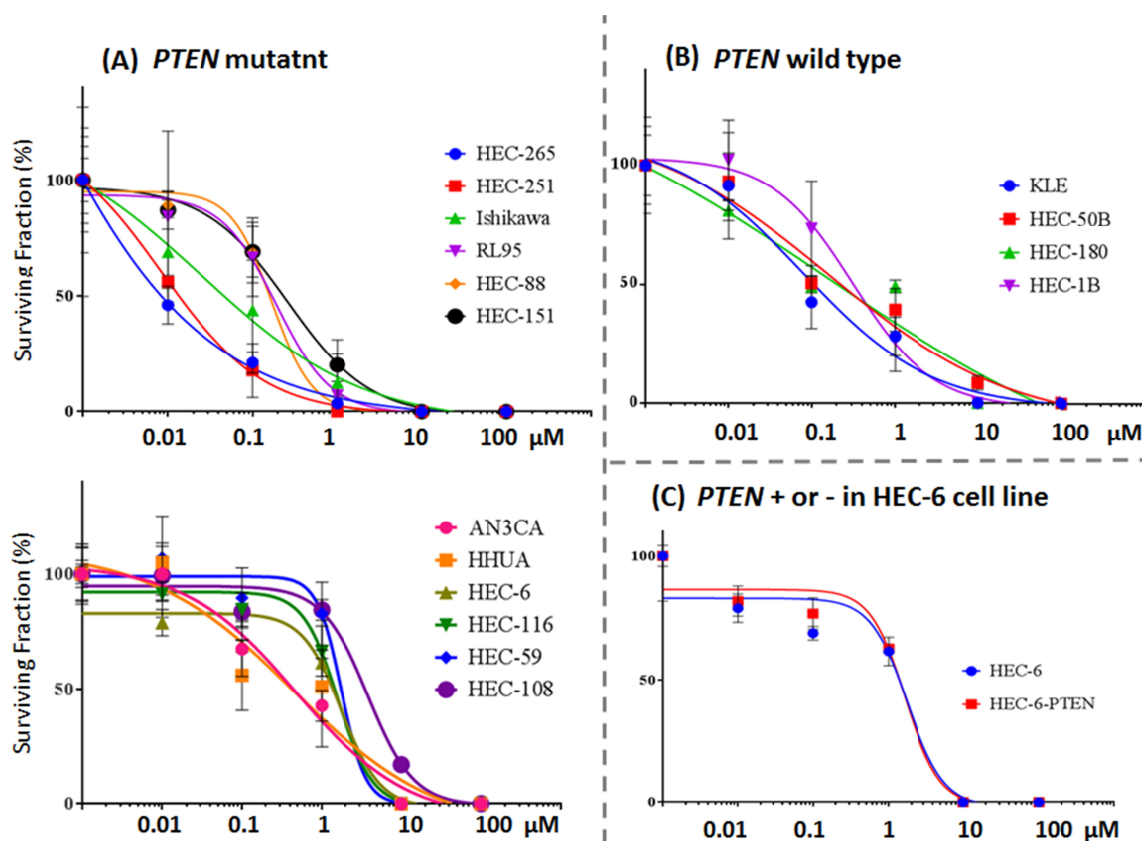


図 8 子宮体癌株における olaparib の増殖抑制効果 (A)(B) 16 株の細胞株を olaparib 10nM から 100 μM の 5 つの濃度下で抗腫瘍効果を clonogenic assay にて評価した。14–21 日間で持続的に olaparib を添加した培養液にて incubation を行った。PTEN 変異株(12 株)を(A)に、PTEN 野生株(4 株)を(B)に示した。(C) HEC-6 と HEC-6-PTEN での clonogenic assay を行ったところ、Surviving fraction curve はほぼ同様であった。

表 3 子宮体癌における olapaprib の SF50 値と PTEN status

PTEN	Cell lines	SF50(nM)	Mean	SE	SD	P value (Student t test)
Mutation	HEC-265	8	746	253	838	0.26
	HEC-251	15				
	Ishikawa	42				
	HEC-88	170				
	RL95-2	190				
	HEC-151	230				
	AN3CA	400				
	HHUA	400				
	HEC-6	1500				
	HEC-116	1600				
	HEC-59	1900				
HEC-108	2500					
Wild type	KLE	100	215	49	85	
	HEC-180	200				
	HEC-50B	220				
	HEC-1B	340				
Expression (+)	HEC-265	8	809	305	915	0.27
	Ishikawa	42				
	RL95-2	190				
	HEC-1B	340				
	AN3CA	400				
	HHUA	400				
	HEC-6	1500				
	HEC-59	1900				
	HEC-108	2500				
Expression (-)	HEC-251	15	362	208	551	
	KLE	100				
	HEC-50B	220				
	HEC-180	200				
	HEC-88	170				
	HEC-151	230				
	HEC-116	1600				
SE: Standard Error, SD: Standard Deviation						

また PTEN 発現欠損株と PTEN 発現株の間においても、olaparib の感受性に有意な差は見られなかった (p 値 0.27) (表 3)。HEC-6 (親株) と HEC-6-PTEN 安定発現株を比較したところ、SF50 値が 1500nM であり、PTEN 発現による感受性の変化を認めなかった(図 8-C)。

次に、PTEN 発現の有無による olaparib 感受性への影響について他の株でも検討を行った。*PTEN* 野生株の HEC-1B と HEC-50B を用いて、siRNA により *PTEN* をノックダウンし clonogenic assay を行った。2 株ともに、siRNA により PTEN 発現が抑制されたが、PTEN 発現低下による Olaparib への感受性については、有意な差を認めなかった(図 9-A)。また *PTEN* 変異株の AN3CA に 野生型 *PTEN* プラスミド(pcDNA-HA-*PTEN*)を導入し PTEN を過剰発現させ、親株と比較を行ったところ、ノックダウンの際と同様に、Olaparib の感受性に有意な差を認めなかった (図 9-B)。

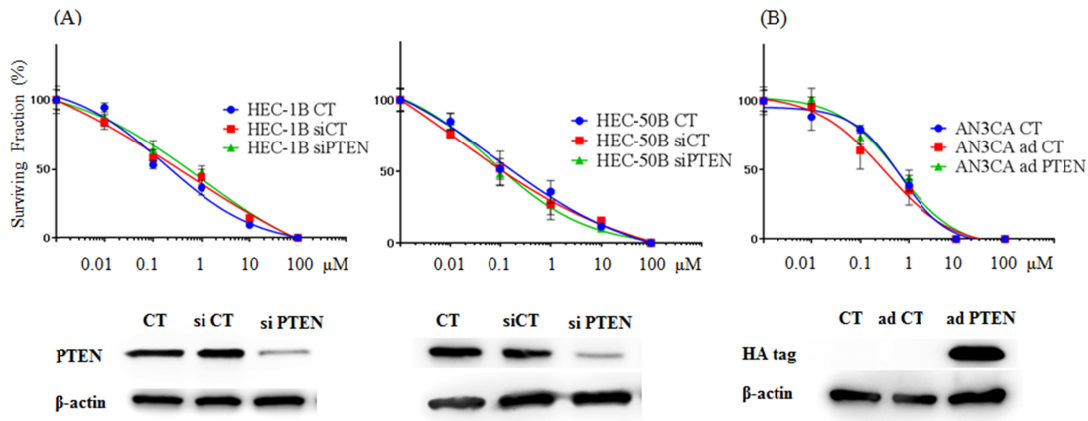


図9 PTEN発現の有無とolaparibの感受性. (A) *PTEN* 変異陰性である、HEC-1B と HEC-50B 株において、*PTEN* に特異的な si RNA (10nM) を用いて *PTEN* のノックダウンを行った。Non-silencing si RNA と親株をコントロールとした。ノックダウン後の細胞は olaparib 添加培養液にて 14 日間培養した。*PTEN* の発現抑制は western blotting にて確認した (下段)。いずれの株でも、olaparib の感受性について、*PTEN* の発現低下は有意な差をもたらさなかった (上段)。(B) *PTEN* 欠損株である AN3CA に HA-tagged-wild type *PTEN* expression plasmid (pcDNA-HA-*PTEN*) を導入し、olaparib 添加培養液にて 14 日間培養を行った。pcDNA-HA と親株をコントロールとした。野生型 *PTEN* の導入は western blotting にて確認した (下段)。olaparib の感受性について、野生型 *PTEN* の導入は有意な差をもたらさなかった。

1-4 相同組換修復因子 γ H2AX と RAD51 の foci 形成試験

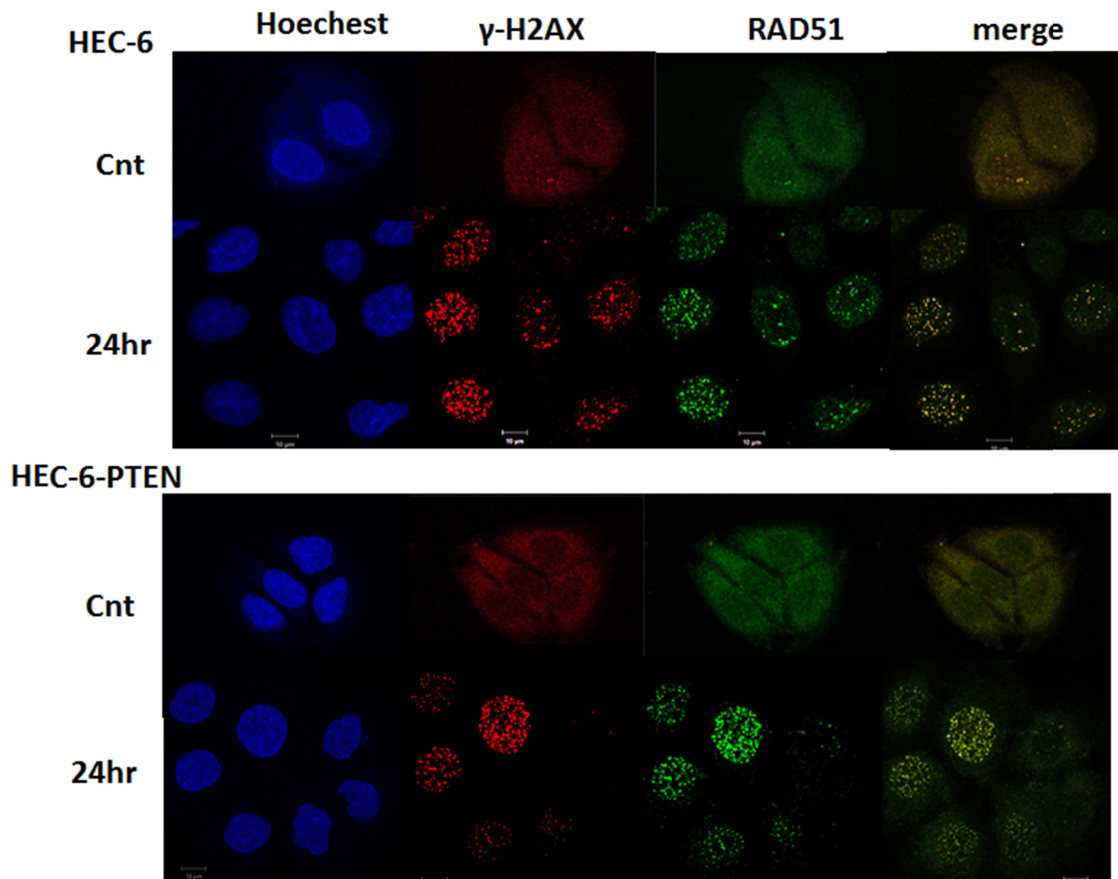
次に、olaparib および放射線照射による DNA 損傷における *PTEN* の関与を検討した。

<olaparib> olaparibによるDNA損傷の影響を γ H2AXとRAD51のfociを用いて評価した。HEC-6とHEC-6-PTENにolaparib (10 μ M)を24時間曝露し、DNA二本鎖切断部位を示す γ -H2AXと修復部位を示すRAD51を細胞免疫蛍光染色にて検出し(図10-A)、そのfoci数をカウントした。いずれのfoci数においても、PTENの有無による有意な差を認めなかった(図10-B)。

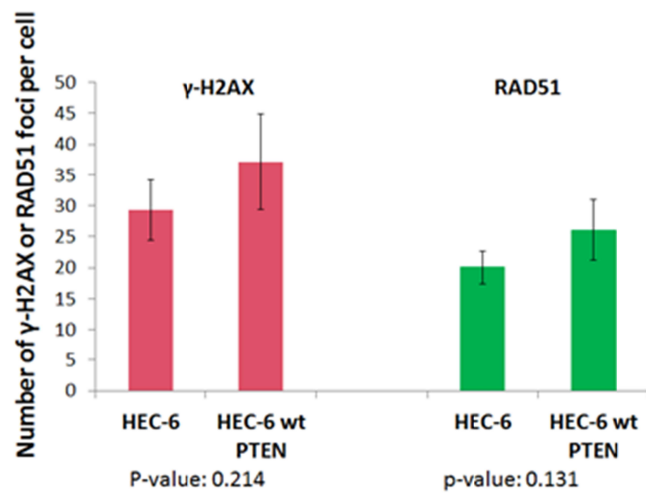
またアポトーシスの重要なマーカーであるPARP cleavageの発現を調べた。両細胞株において、olaparib添加48時間後にcleaved PARPの発現誘導が認められ、72時間ではさらに上昇していた(図10-C)。cleaved PARPについても、PTENの有無による差は明らかではなかった。

<放射線 (IR) 照射,> DNAの二本鎖切断誘発因子としてX線10 GyをHEC-6、HEC-6-PTENにそれぞれ照射した。照射24時間以内にPTENとPTENのリン酸化(p-PTEN, ser-380)の発現が上昇した。cleaved-PARPはPTENの有無に関わらず照射48時間後に著明に発現が増加した(図11-A)。細胞免疫蛍光染色にて γ -H2AXとRAD51のfoci形成を同定した(図11-B)。foci数を調べたところ、15分以内に核内に両タンパクのfociがピークとなり、以後漸減し、24時間後にはピーク時の1/5程度に減少していた(図11-C)。Foci数はPTENの有無によって有意差を認めなかった。さらにclonogenic assayによってsurvival fractionを評価したところ、2株間で感受性に有意差を認めなかった(図11-D)。

(A)



(B)



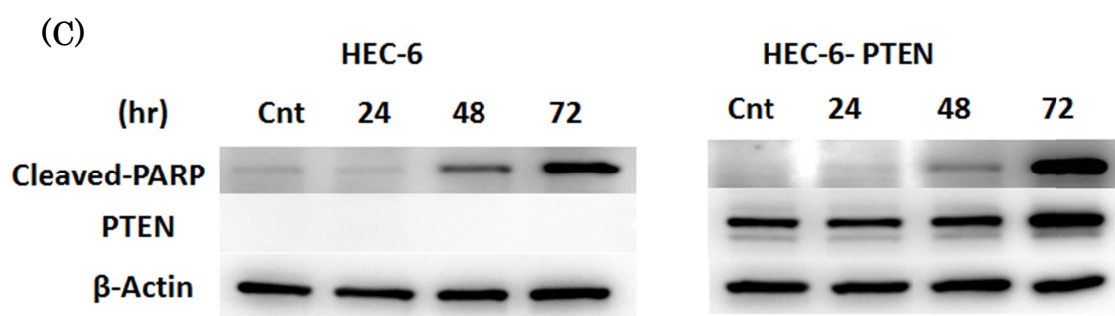


図 10 γ -H2AX と RAD51 の foci 形成試験 (olaparib)

(A) HEC-6 と HEC-6-PTEN の細胞免疫蛍光染色: olaparib (10 uM) 添加 24 時間後。核(blue)、 γ H2AX (red)、RAD51(green)。olaparib により、 γ -H2AX、RAD51 の foci 形成が認められた。(B) 細胞一つあたりの γ -H2AX と RAD51 の foci 数の平均値: 100 個の細胞を数え平均値を求めた。 γ -H2AX と RAD51 の数に PTEN の有無で有意差を認めなかった。

(C) western blotting において、olaparib 添加 24~72 時間後の cleaved-PARP の発現を検証した。HEC-6 と HEC-6-PTEN において cleaved PARP の発現パターンに差を認めなかった。

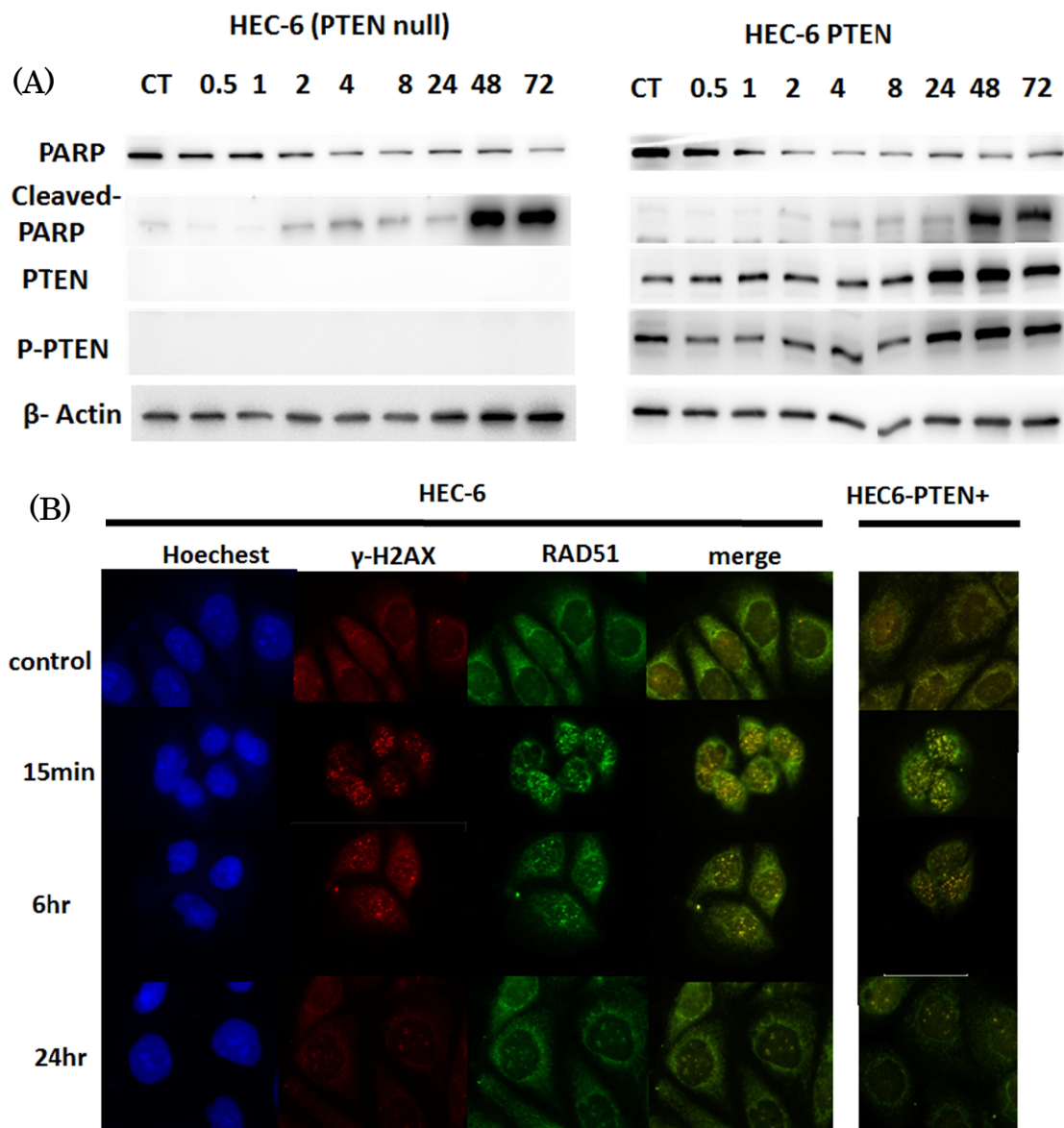


図 11 (A-D) γ -H2AX と RAD51 の foci 形成試験 (放射線照射) (次頁に続く)

(A) HEC-6 と HEC-6-PTEN に 10Gy 照射後に PARP, cleaved-PARP, PTEN, p-PTEN の発現を western blotting により時系列で確認した。24 時間以降に PTEN, p-PTEN は上昇し、Cleaved PARP は 48 時間以降で顕著であったが、2 株間で差は認めなかった。(B) 細胞免疫蛍光染色：2Gy 照射後。核(blue)、 γ -H2AX (red)、RAD51(green)。15 分をピークとして、 γ -H2AX (red)、RAD51 の foci 形成を認めた。

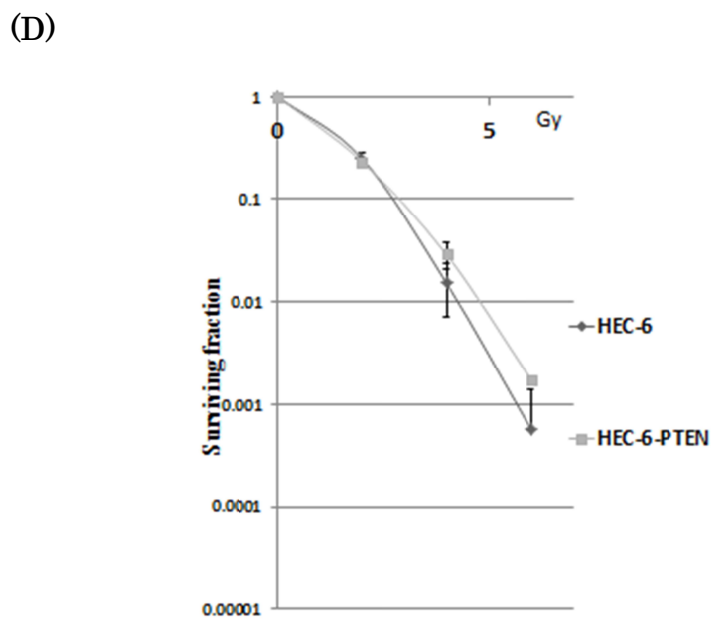
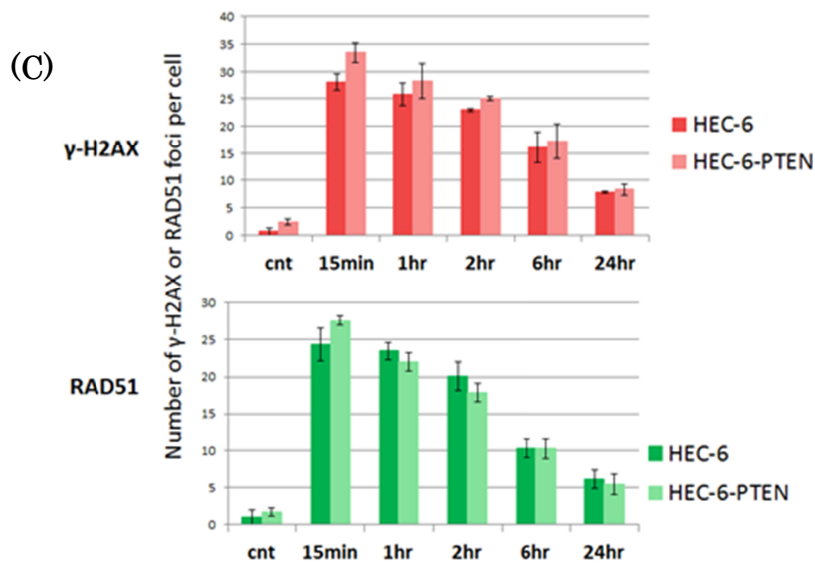


図 11 γ H2AX と RAD51 の foci 形成試験 (放射線照射) (前頁の続き)

(C) 細胞一つあたりの γ -H2AX と RAD51 の foci 数の平均値。二つの細胞株の foci 形成数に有意な差は認められなかった。

(D) Clonogenic assay : 2~6Gy 照射し、HEC-6 と HEC-6-PTEN 間で比較した。二株間におけるの細胞生存曲線に有意な差を認めなかった。

1-5 *PTEN* 導入前と導入後の細胞周期解析

HEC-6 及び HEC-6-PTEN に olaparib (10 μ M) を持続添加(72 時間) した後、細胞周期解析を行った。10Gy の放射線 (Ionizing radiation, IR) 照射 24 時間後についてもあわせて解析した。olaparib 添加、放射線照射のいずれにおいても、Sub-G1 の比率が両株共に増加していた(olaparib では Sub-G1 が 24-32%、IR では 5-8% を占めた)。G1,S,G2/M 期の比率は olaparib 添加と IR では異なるパターンを示し、olaparib では G1 期の比率がいずれの株でも 30%以上を占めたが、IR 照射では著明な G2/M 期停止 (68-78%)を示した。しかしながら、HEC-6 と HEC-6-PTEN を比較するとそれぞれの比率について、明らかな差を示さなかった。

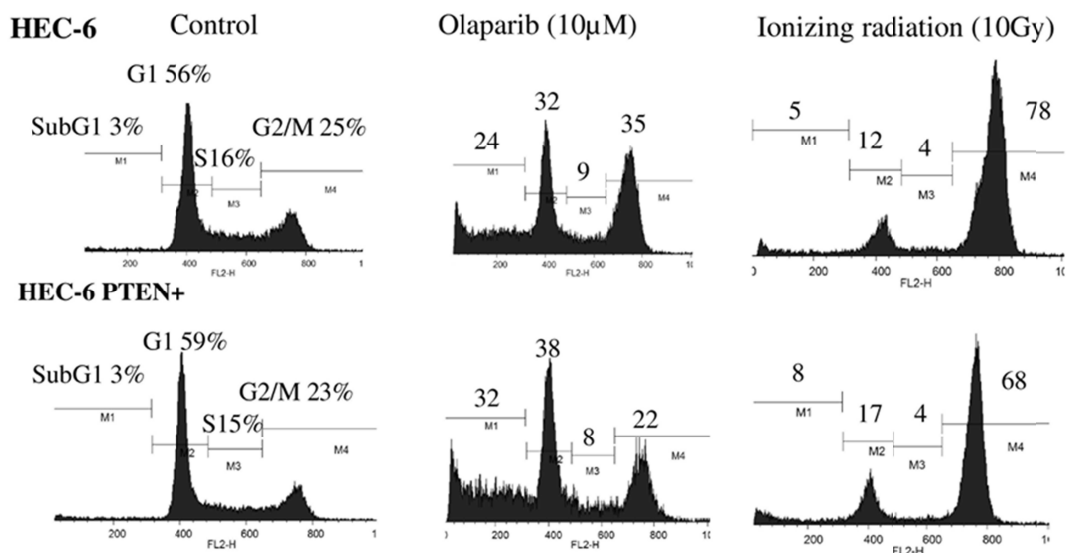


図 12 olaparib (10 μ M), IR (10Gy)照射後の細胞周期解析

HEC-6 と HEC-6-PTEN に対して olaparib (10 μ M, 72 時間), IR (10Gy, 24 時間) 照射後に flow cytometry にて細胞周期解析を行った。

【2】子宮体癌細胞株における放射線照射の抗腫瘍効果

2-1 子宮体癌株の放射線感受性と *TP53*、*PI3K* 経路の遺伝子変異

次に子宮体癌細胞株における放射線照射の抗腫瘍効果、および細胞株間における感受性の相違につき検討を行った。X線照射線量を2, 4, 5, 6Gyに設定し、子宮体癌細胞株8株について clonogenic assay を行った。D₁₀ 値 (90%の細胞増殖を抑制する線量) は2.0 Gy から>6Gy までと株毎に大きな差異が存在した (図13, 表4)。TP53 野生株3株ではいずれも D₁₀ 値が ≤ 3.1 Gyであったが、TP53 変異株5株においてはすべて、D₁₀ 値 ≥ 3.3 Gyであった (表4)。全てのTP53 変異株は *PIK3CA* または *KRAS* に遺伝子発現異常 (遺伝子変異または染色体コピー数増加) を認めた。これらの変異を我々の実験データ及び、既報を表4にまとめた(23, 30) (54, 63)。TP53, *PIK3CA*, *KRAS* に変異を認めない2株(HEC-108 と HEC-151)においては、D₁₀ 値は低値 (2.0Gy, 3.1Gy) であった。*KRAS* に変異を有する2株(HEC-1B, HEC-50B)はいずれもTP53 変異陽性であった。この2株はともに、D₁₀ 値が高く (6Gy, 5.6Gy)、放射線感受性が低かった。PTEN 変異は8株中6株で陽性であり、変異陰性の2株 (HEC-1B, HEC-50B)はいずれもTP53 変異陽性であった。以上より、PTEN 変異を含めたPI3K 経路の遺伝子変異よりも、TP53 が放射線感受性とより強く関連していることが示唆された。

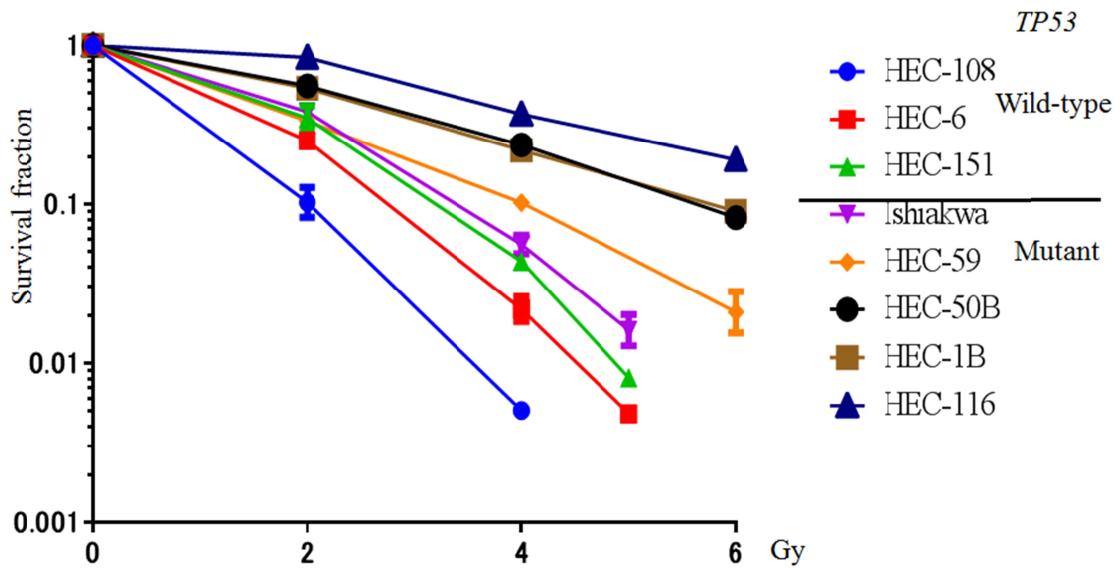


図 13 子宮体癌細胞株における放射線照射による細胞増殖抑制効果
 2,4,5,6Gy の放射線照射後 10-14 日間培養し、clonogenic assay により、
 コロニー数を評価した。8 細胞株中 5 株に *TP53* に変異を認めており、
TP53 変異陰性の 3 株よりも高い D_{10} 値を示した。

表 4
 子宮体癌細胞株の放射線感受性と遺伝子変異

	D10 value (Gy)	<i>TP53</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTEN</i>
HEC-108	2.0	WT	WT	WT	Mut (Frameshift)
HEC-6	2.8	WT	Mut (R108H)	WT	Mut (Frameshift)* ₁
HEC-151	3.1	WT	WT	WT	Mut (Frameshift)* ₂
Ishikawa	3.3	Mut (M246V)	Gain	WT	Mut (Frameshift)* ₃
HEC-59	4.0	Mut (R273H)	Mut (R38C)	WT	Mut (Frameshift)* ₄
HEC-50B	5.6	Splicing Mut (Intron 6)	Gain	Gain	WT
HEC-1B	6.0	Mut (R248Q)	Mut (G1049R)	Mut (G12D)	WT
HEC-116	>6	Mut (R348Q)	Mut (R88Q)	WT	Mut (Nonsense)* ₅

Mut : Mutant, WT : Wild-type, Gain: 染色体コピー数増加
 *1~5 : frameshift 以外の変異も有した (表 1 参照)。

2-2 放射線 (Ionizing radiation, IR) 後の MAPK 経路、PI3K 経路の活性化 (ERK, AKT のリン酸化)

IR 後に MAPK 経路と PI3K 経路が活性化することが他癌種で知られている。そこで、子宮体癌細胞株 HEC-6 と HEC-1B を用いて 10Gy の IR 後に ERK と AKT のリン酸化を検索した。いずれの株でも、ERK のリン酸化は照射 30 分後には上昇し、1 時間以内に一旦減弱した後、4~8 時間後に再上昇が認められた。特に HEC-1B では、p-AKT の上昇が Total AKT の上昇 (24 時間後) より早い段階 (4 時間後) で見られた (図 14)。これらの二つの細胞株では、2 時間後(HEC-6)、または 8 時間後 (HEC-1B) に HIF-1 α の発現上昇が認められた (図 14)。

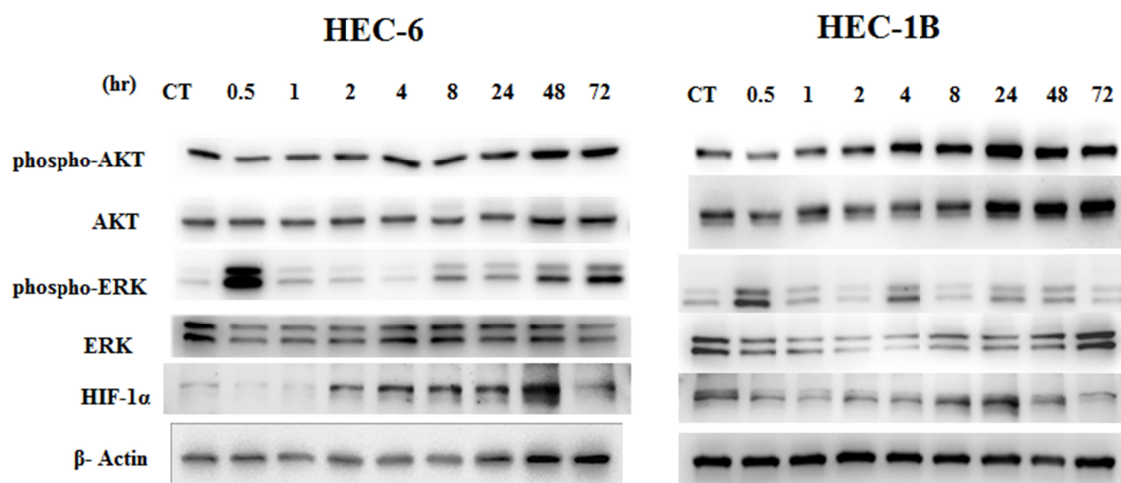


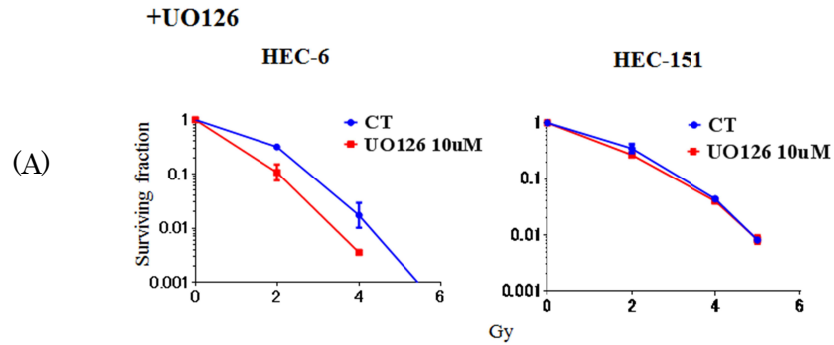
図 14 放射線照射後の MAPK 経路、PI3K 経路の活性化 : ERK, AKT のリン酸化の増強.

HEC-6(*TP53* 野生株)と HEC-1B(*TP53* wild type)に 10Gy 照射後にタンパクを抽出し western blotting にて ERK と AKT のリン酸化レベルを評価した。放射線照射による ERK, AKT のリン酸化、および HIF-1 α の発現が誘導された。

2-3 放射線照射と MAPK 経路阻害薬もしくは PI3K シグナル経路阻害薬との併用による抗腫瘍効果

IR 照射後に MAPK 及び PI3K シグナル伝達経路が活性化していることから、MEK 阻害薬(UO126)と PI3K/mTOR 同時阻害薬(BEZ235)が放射線感受性を高める可能性が考えられた。子宮体癌株 5 株 (*TP53* 変異株 : HEC-1B, HEC-50B, Ishikawa, *TP53* 野生株: HEC-6, HEC-151) を用いて clonogenic assay を行った。細胞に UO126 (10 μ M) または BEZ235 (50 nM, 100 nM) を含む培養液を添加し、放射線を 2,4,5,6 Gy の線量で照射した。5 株のいずれにおいても、UO126 併用に比べ、

TP53 野生株



TP53 変異株

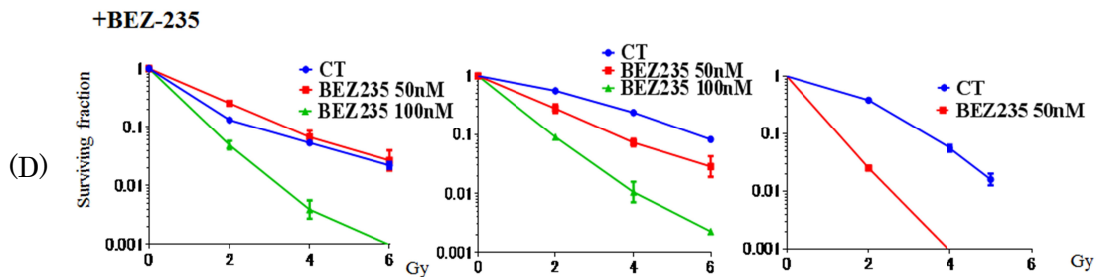
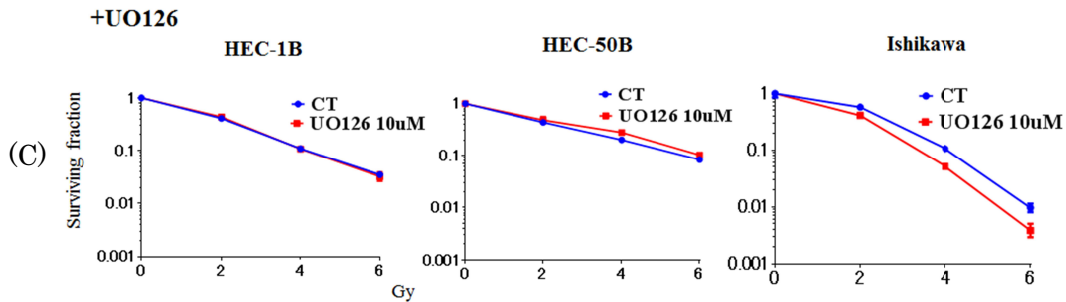
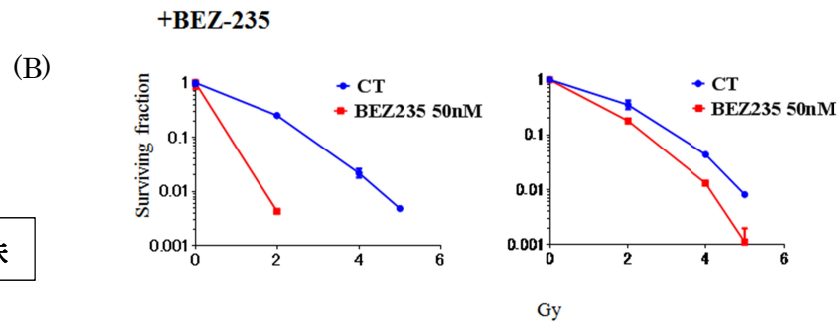


図 15 MEK 阻害薬 (UO126)及び PI3K/mTOR 同時阻害薬(BEZ235)の放射線感受性増強効果 MEK 阻害薬 (UO126)10uM または PI3K/mTOR 阻害薬(BEZ235)(50nM, 100nM)を含む培養液を添加後、放射線(2,4,5,6Gy 照射、incubate を行った。24 時間後に阻害薬を含まない培養液に変え、10-14 日間培養した (clonogenic assay)。(A, C) UO126 (10 μ M) と IR (A) *TP53* 野生株 (HEC-6, HEC-151) (C) *TP53* 変異株 (HEC-1B, HEC-50B, Ishikawa). (B, D) NVP-BEZ235 (50 or 100 nM) と IR (B) *TP5* 野生株 (D) *TP53* 変異株

BEZ235 併用のほうが、高い増殖抑制効果を示した (図 15 A-D)。5 株のうち、HEC-6, Ishikawa 以外の 3 株では UO126 による感受性増強効果は認めなかった (図 15-A-C)。一方、BEZ235 は *TP53* の変異の有無によらず 5 つの細胞株全てにおいて放射線増強効果を認めた (図 15-B,D)。*TP53* wild type の HEC-6, HEC-151 では、低用量(50 nM)の BEZ235 併用でも感受性が有意に増強した (図 15-B,D)。*TP53* 変異株 3 株においては、Ishikawa では 50 nM から顕著な相乗効果が得られており、残りの 2 株 (HEC-1B, HEC-50B) においても、高用量(100 nM)の BEZ235 併用により、有意に放射線の増強効果を示した。*TP53* 変異株においても BEZ235 併用により、すべて D_{10} 値 $< 2.0\text{Gy}$ となることが示された (図 15-D)。

2-4 PI3K/mTOR 同時阻害薬は放射線(IR)照射後の HIF-1 α の発現を抑制する

放射線照射後に HIF-1 α の発現が増強していることから、MEK 及び PI3K の抑制と HIF-1 α の発現の相関について検討した。まず、HEC-6 と HEC-1B において BEZ235 は p-AKT(Thr308)と p-4EBP1(mTOR の下流分子)を抑制し、UO126 は p-ERK を抑制することを確認した (図 16-A)。次に、IR (10Gy) または 1%低酸素環境 (8 時間) により、HIF-1 α の発現を誘導する条件下で、BEZ235 または UO126 を添加した。BEZ235 を IR または Hypoxia と併用したところ、いずれに

においても HIF-1 α の発現を抑制した(図 16-B)。一方、UO126 を併用しても、IR, Hypoxia のいずれにおいても、HIF-1 α の抑制は認められなかった(図 16-B)。

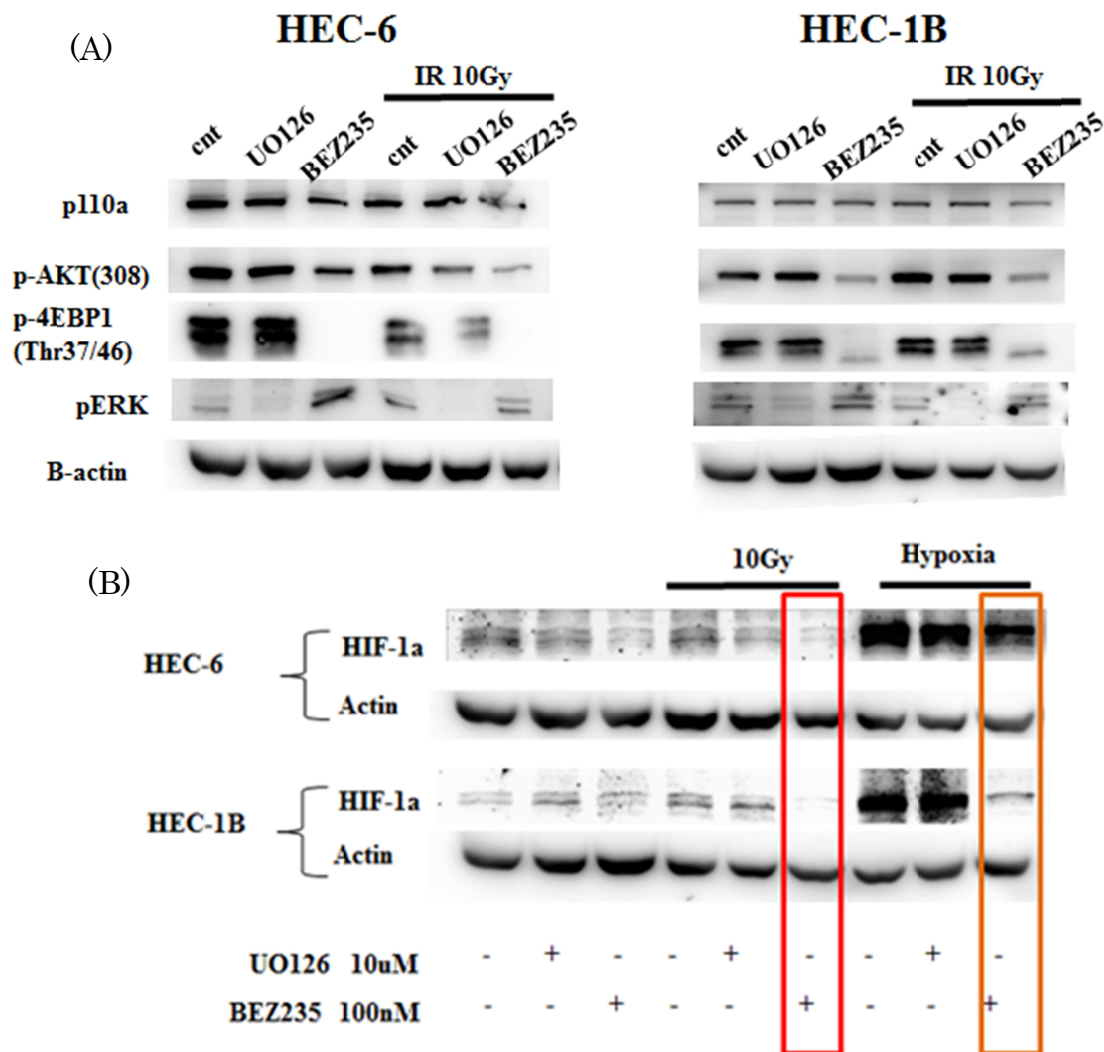


図 16 PI3K/mTOR 同時阻害薬(BEZ235)の HIF-1 α 抑制効果

(A) HEC-6, HEC-1B)において、UO126(10 uM)または BEZ235 (100 nM) を添加し、Western blotting により、AKT, 4EBP1 または ERK のリン酸化が抑制されていることを確認した。10Gy の IR 照射下でもリン酸化抑制効果が認められた。(B) UO126 (10 uM)または BEZ235 (100 nM)を添加し、10Gy の IR もしくは 1%低酸素の刺激を加え、8 時間培養したところで蛋白を回収した。Western blot において、IR, Hypoxia 条件下いずれにおいても、HEC-6, HEC-1B の両株で、BEZ235 を添加した時のみ HIF-1 α が抑制された。

2-5 PI3K/mTOR 同時阻害薬は放射線(IR)照射後の VEGF-A の発現を抑制する

血管増殖因子 VEGF-A は HIF-1 α によって発現が誘導される。そこで、HEC-1B を用いて IR 照射後と低酸素環境における VEGF-A の発現を評価した。IR (10 Gy) または 1%低酸素下 24 時間 incubation の条件下にて、予想通り VEGF-A の顕著な発現上昇を認めた (図 17-A)。そこで、BEZ235 を併用したところ、IR,低酸素いずれの状況下においても、VEGF-A の発現は著明に抑制された(p 値<0.01) (図 17-A)。一方、UO126 (10 μ M) を添加しても VEGF-A 発現に有意な減少を認めなかった (図 17-A)。

そこで、HIF-1 α /VEGF 経路の抑制が、BEZ235 による IR の効果の増強に重要な役割をはたしているという仮説を立て、HEC-6 細胞において、HIF-1 α をノックダウンし、IR を併用した。HIF-1 α の二種類の siRNA (siHIF1①、siHIF1②) のいずれにおいても、HIF-1 α の蛋白発現レベルを抑えていることを確認した (図 17-B)。そこで、HIF-1 α の siRNA と 2Gy または 3Gy の IR を併用し、48 時間後に flow cytometry にて sub-G1 の比率を測定した。IR 照射のみでもコントロールに比較し、sub-G1 の比率が上昇 (細胞死の誘導) がみられたが、HIF-1 α のノックダウン併用により、IR 単独の場合に比べて、有意に sub G1 の比率の上昇が認められた (p<0.01) (図 17-C)。

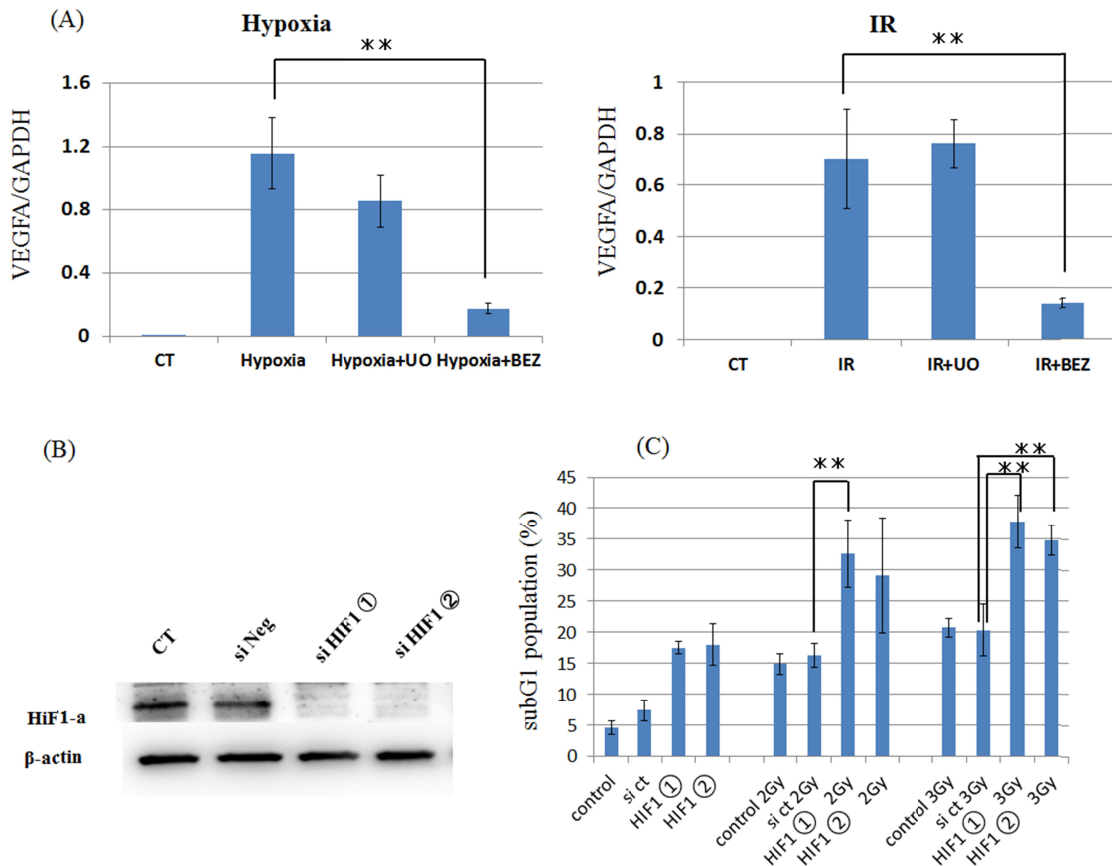


図 17 PI3K/mTOR 同時阻害薬による VEGF-A の抑制、および HIF-1 α ノックダウンによる sub-G1 の増加 (A) HEC-1B を UO126 (10 μ M) または BEZ235 (100 nM) と共に 1% 低酸素下または 10Gy の IR 照射を行った。低酸素、IR によって VEGF-A の発現は増加したが、BEZ235 を投与した細胞は VEGF-A の発現が有意に抑制された。(B) HEC-6 を用いて HIF-1 α に特異的な二種類の siRNA (9nM) にて HIF-1 α のノックダウンを行い、いずれにおいても HIF-1 α の発現を抑制していることを確認した。(C) HEC-6 に 2Gy, 3Gy の IR 照射を行い、48 時間後に flow cytometry にて sub-G1 population を調べた。control (IR 単独) に比較して HIF-1 α をノックダウンした細胞では sub-G1 population が有意に上昇した。

** p value <0.01

第4章 考察

相同組換え修復 (HR : Homologous recombination) は DNA 二本鎖切断(double strand brake, DSB)を修復するうえで重要な DNA 修復機序である。PARP 阻害薬は、一本鎖切断(Single strand brake, SSB)修復を阻害することで DSB を蓄積させる効果をもたらすが、これのみでは HR によって DNA 修復が行われるため、殺細胞効果は期待できない。一方、HR 機能がもともと欠損している癌細胞においては、DSB を修復することができないため、結果的に細胞死に至る。すなわち、HR 機能を失った癌細胞に特異的に作用する (合成致死をもたらす) 薬剤として PARP 阻害薬が期待されている。

olaparib は PARP 阻害の Specificity が高い薬剤であり(12)、臨床試験でも最も開発が進んでいる。HR に関わる代表的な分子として、BRCA1/2 が広く知られているものの、他の癌抑制遺伝子と HR との関係性は不明な点が多い。実際、卵巣漿液性腺癌における第 II 相臨床試験において、BRCA1/2 に変異を認めない患者でも奏功例が多く認められた(6, 12)。そのため、BRCA1/2 に変異を有する

"BRCAness"陽性の乳癌や卵巣癌以外にも、PARP 阻害薬が有効な癌種が存在すると期待される。これまで PTEN が欠損すると HR 機能が障害されるという報告があり(6)、PTEN 変異を有する癌種は、PARP 阻害薬の候補となりうる。そこで本研究では、PTEN 変異率の高い癌種として、子宮体癌に着目し、PARP 阻害薬が

の有効性を検討した。また DNA の SSB, DSB をもたらす癌治療として、olaparib に加えて、放射線照射にも着目した。子宮体癌でも放射線治療は広く行われているが、放射線感受性を予測するバイオマーカーについての基礎的研究は乏しい。また、放射線感受性を高める薬剤として、子宮頸癌ではプラチナ製剤が挙げられているが、子宮体癌において放射線感受性を高める治療法は確立されていない。そこで、本研究では子宮体癌細胞株を用いて、以下の検討を行った。

- 1) olaparib の抗腫瘍効果
- 2) *PTEN* 変異と olaparib 感受性との相関、及びと HR 関連分子（RAD51 と γ -H2AX）との関係
- 3) 放射線照射（IR）の感受性と *PTEN*, *TP53* を含む遺伝子変異との関連
- 4) IR によって活性化を受けるシグナル伝達経路としての MAPK 経路と PI3K 経路の意義
- 5) MAPK 経路阻害と PI3K 経路阻害に放射線感受性を高める効果の有無、及び感受性増強に関わる因子の同定

1. 子宮体癌細胞株における PTEN 変異と、PARP 阻害薬 (olaparib) の抗腫瘍効果

子宮体癌細胞株 16 株における解析の結果、olaparib の SF50 値は 8~2,500 nM までの幅があり、感受性に大きな差異があることが判明した。このうち、SF50 値が 100 nM と高い感受性を示す株が 4 株 (25%) 存在しており、子宮体癌の中にも PARP 阻害薬が有効であるものが存在すると考えられた。

近年、PTEN と PARP 阻害薬の感受性が注目されているが、関連しないとする報告もあり、未だ結論が得られていない(15, 22, 40)。子宮体癌において *PTEN* 欠損株は *PTEN* 野生株に比較して PARP 阻害薬の感受性が高いとする報告が一編存在するのみであり(14)、その結果を支持するような続報はみられていない。

今回新たに入手した 3 株につき、*PTEN* の PCR-direct シークエンスを行った結果、図 6 から HEC-265 細胞株はホモ変異と考えられる。子宮体癌では類内膜腺癌の約 30-40%の頻度に LOH (Loss of heterozygosity) を認める(49, 58)。western blotting によって HEC-265 の *PTEN* 発現が消失(図 7)していたことから、LOH が存在し、対側のアレルで変異が生じていると推測することができる。一方 HEC-251 はわずかに G の波が見られること、*PTEN* が発現していることからヘテロ変異であると考えられる。また、表 2 に示すように HHUA、HEC-59、HEC-108、Ishikawa は両アレルで Frame shift が起きていると予測され、western blotting にて

band を認めなかった。これに対し Point mutation のみでも band が消失している AN3CA や RL-95 では LOH が併存している可能性がある。

Western blotting では PTEN の C 末端に対する抗体を用いたため、band を認めていない細胞株では C 末端を欠損した short length の PTEN が発現している可能性が考えられる。PTEN は N 末端側は phosphatase ドメイン、膜結合に関わる C2 ドメインが中心に存在する。これらの活性を調整する役割を担っているのが C 末端であり、この部位を失った PTEN は機能障害に陥っていると考えられている(53, 60)。

本研究において、PTEN の変異と olaparib の感受性を遺伝子変異の観点と蛋白発現の双方から検討したが、いずれにおいても相関は認められなかった。特に、低感受性株(SF50>1,000 nM) 4 株はすべて PTEN 変異陽性であり、PTEN の機能喪失が HR 機能喪失に直結していないと考えられる。同様に PTEN 変異率の高い前立腺癌でも PTEN と PARP 阻害薬の感受性に否定的な報告がみられることより(22)、子宮体癌を含めて、PTEN 変異と HR 機能との関連について更なる解析が必要と考えられる。

次に野生型 PTEN の有無が実際に HR に影響を与えるのか否かについてさらに解析した。RAD51 は HR において重要な分子であり、実際に PTEN が RAD51 の発現を上昇させることを示唆する報告もみられる(41, 52)。しかしながら、今回

子宮体癌細胞株において、野生型 *PTEN* の発現と *RAD51* の発現との間に相関は認められなかった。さらに *PTEN null* の細胞株に野生型 *PTEN* を導入した場合にも、*RAD51* の発現は増加しなかった。 *PTEN* と *PARP* 阻害薬の感受性が関連するとしている *Deds* らの報告においても、*RAD51* の発現が *PTEN* 変異とは相関していない(14)。脳腫瘍や前立腺癌の細胞株でも相関がないという結果が出ている(22, 40)。以上より、子宮体癌を含めた複数の癌種において、*RAD51* 依存性の *HR* 機能と *PTEN* の *status* が相関していないと考えられた。一方、大腸癌細胞においては、野生型 *PTEN* 発現と *RAD51* の発現に正の相関がみられている(6)。従って癌種によっては *PTEN* が *RAD51* の発現誘導を介して *HR* に寄与している可能性があると考えられた。

DSB 部位にはヒストンタンパク、*H2AX* が *ser139* がリン酸化し、 γ -*H2AX* となり、これ以後 *DSB* 修復のカスケードが進む(50, 57)。*RAD51* は *DSB* 修復過程の *factor* のひとつで、切断部位に *filament* を形成する。したがって γ -*H2AX* は損傷部位の指標、*RAD51* は修復部位の指標となる。*RAD51* と同様に、野生型 *PTEN* の有無は γ -*H2AX* の *foci* 数にも影響を与えなかった。また、*olaparib* によって *G2/M* で細胞周期が停止し、細胞死(*sub-G1* 増加)につながることを報告されている(18, 39)。*HEC-6* と *HEC-6-PTEN* 細胞株において、*olaparib* 添加により *G2/M* 期停止、*sub-G1* の増加が誘導されたが、*PTEN* の有無によって、*G2/M* 期や *sub G1*

の比率は同様な傾向を示した(図 12)。以上の結果からも、子宮体癌において PTEN の欠失が、損傷部位、修復部位の指標となる分子の活性化、さらには殺細胞効果にも直接関与しておらず、PTEN が PARP 阻害薬のバイオマーカーとなっていないことが妥当であると考えられた。

本研究からは PTEN 機能欠損は PARP 阻害薬のバイオマーカーとはなりえないものの、一部の子宮体癌は PARP 阻害薬に高感受性を示し、PTEN, RA51 発現以外の因子によって、PARP 阻害薬の感受性が規定されている可能性がある。また olaparib と IR・化学療法の併用実験において、抗腫瘍効果が上昇したとの報告もあり(11, 43)、併用における抗腫瘍効果については今後の検討課題である。

2. 子宮体癌細胞株における放射線照射の抗腫瘍効果

TP53 はがん抑制遺伝子として、細胞周期停止やアポトーシス誘導作用が広く知られているが、DNA 修復にも関与することが明らかとなっている。実際に IR の効果と TP53 変異の有無が関係するとする報告は多い(16), 17)。しかしながら、子宮体癌での TP53 の status と IR の感受性との相関については、未だ基礎的な研究がなされていない。子宮体癌では TP53 変異は 20-30%に認められており、本研究では 3 株の TP53 野生株と 5 株の TP53 変異株を用いて、IR の効果を検討した。D₁₀ 値が低値を示した上位 3 株はいずれも TP53 野生型の細胞株であり、TP53 変異陰性の子宮体癌では放射線感受性が高いことが示唆された。IR によっ

て DNA の二本鎖切断 (DSB) が起こると、ATM, CHK1, CHK2 などのチェックポイントを活性化し、さらに TP53 と MDM2 との結合を解除することで TP53 の安定性を高める(19, 62)。TP53 は cell cycle arrest や DSB 修復、アポトーシス、IR 照射への応答など多くの重要な役割を担う(19, 46)。また、子宮体癌では TP53 以外に上記のような DSB 修復遺伝子の変異は少ないことが知られている(31)。

一方、我々はこれまでに、子宮体癌においては KRAS, PTEN, PIK3CA を含めた様々な因子により PI3K 経路が活性化されていることを報告しており(54)、放射線抵抗性と PI3K 経路の活性化との関連についても他の癌種では明らかとなってきた(25, 34)。今回、PTEN 変異は 8 株中 6 株にみられ、PTEN 変異と放射線感受性の間に相関を認めなかった。また、HEC-6 と HEC-6-PTEN 株において、IR 後に γ -H2AX、RAD51 の foci 数に両細胞株間に有意差はなかったことも、PTEN そのものが IR の感受性のバイオマーカーとはならないことを支持する結果と言える。本経路の活性化に関わる、KRAS 変異や PIK3CA 変異においても、それぞれ単独では IR の感受性との相関関係は明らかではなかった。今後更なる検討が望まれる。

本研究により、他の癌種と同様に(2, 65)、IR によって MAPK 経路と PI3K 経路の両方が活性化されることが示された。興味深い点として、以下の2つが挙げられる。一つは時系列において、活性化を受ける時間帯が両経路で大きく異な

ることである。MAPK 経路では短時間で一旦急峻に活性化が起こり、一旦消退後に緩やかな再活性化を来すのに対し、PI3K 経路の活性化は 24 時間以降の Late event として生じていた。cleaved PARP の誘導が IR から 48 時間以降に起こっていることと合わせると、PI3K 経路の更なる活性化は抗アポトーシス作用と関連しており、PI3K 経路の活性化と IR によるアポトーシス誘導作用とが拮抗している可能性があると考えられた。もう一つは、もともと PTEN 変異により PI3K 経路が活性化された状態であるにもかかわらず、IR によってさらに p-AKT の上昇が起こっていることである。子宮体癌では、本研究でも示したように、PI3K 経路の遺伝子変異が複数共存しているものが多く、実際に複数の変異の共存が PI3K 経路の更なる活性化や癌の浸潤能獲得に寄与していることが明らかとなっている(47, 48)。本研究において、子宮体癌では IR 等の刺激によって、PI3K 経路が Hyper-activate されうることが示唆された。

IR の併用薬として、MEK (MAPK 経路) 阻害薬と PI3K/mTOR 同時阻害薬を比較したところ、PI3K/mTOR 阻害薬のほうが IR の増強作用が強いことが明らかとなった。また、併用による増強効果は TP53 変異株においても認められた。しかしながら、TP53 変異陰性株では、PI3K/mTOR 同時阻害薬による感受性の増強がより低濃度 (BEZ235: 50 nM) で確認された。PI3K 経路を阻害すると MDM2 が脱リン酸化を起こし、TP53 が活性化する(33)。従って、PI3K 経路阻害薬による IR

の効果増強作用は、TP53 変異がない場合に、より強く生じる可能性がある。また、TP53 変異陽性であっても増強作用がみられたことより、PI3K 経路阻害薬には、TP53 非依存性に IR の効果を増強する機序が存在すると考えられた。

これまで様々な分子標的薬が放射線の増感剤として試用され、MAPK 阻害薬・PI3K 阻害薬、mTOR 阻害薬(25) (26, 27)(37)(38) (44)の他、HDAC (histone deacetylase) 阻害薬(67)や PARP(Poly ADP-ribose polymerase)阻害薬(13)も併用薬の候補としてあげられている。子宮体癌では KRAS 変異はみられるものの、MAPK 経路を特異的に活性化する B-Raf 変異の頻度は極めて低い(51)。すなわち、子宮体癌では、増殖シグナルとして MAPK 経路への依存度は PI3K 経路に比べて低い癌種であると考えられており(63)、MAPK 経路阻害薬が IR の増強効果が弱かったことと相関している可能性が考えられた。もともとの増殖シグナルの活性化の程度により、各薬剤の IR の増強効果が異なる可能性があり、今後他の癌種においても、検討が必要であろう。

また、PI3K/mTOR 経路では、様々な下流分子がリン酸化を受け、細胞増殖や抗アポトーシスに関与している。その一つが、HIF-1 α /VEGF 経路の活性化(32)であり、HIF-1 α は mTOR の下流分子として、VEGF を介して血管新生等を惹起する。本研究でも、IR により HIF-1 α の発現が上昇していた。さらに、HIF-1 α の発現を抑制することで、IR による細胞死の増加が認められた。HIF-1 α ・VEGF

は MAPK 経路からも活性化されうるが、子宮体癌株においては、UO126 (MEK 阻害薬)では HIF-1 α を発現は低下せず、BEZ235 によって抑制された。この結果は、UO126 でなく BEZ235 が IR 効果をより強く増強していたことと合致する。以上より BEZ235 は HIF-1 α の抑制を介して、子宮体癌において放射線効果を増強することが示唆された。HIF-1 α 以外にも放射線効果の増強に寄与する下流分子が存在しているか否か、今後の検討が待たれる。

本研究により、IR の効果を増強する併用薬の候補として、PI3K/mTOR 同時阻害剤が一つの候補となることが示された。さらに HIF-1 α 阻害薬、VEGF 阻害薬も候補として挙げられる。特に VEGF 阻害薬のベバシズマブは、すでに卵巣癌で保険収載されており、臨床試験への発展も考慮される。PARP 阻害薬、放射線照射を用いた本研究で得られた知見は DNA 傷害に着目した治療法の開発を子宮体癌において進める上で、有用であると期待される。しかしながら今回は *in vitro* の研究成果にとどまる。細胞株に対する PARP 阻害薬の感受性と、細胞株のマウスへの移植後の感受性に矛盾はないとする報告もあれば(18, 64)、*in vitro* と *in vivo* での細胞培養で、多数のタンパクの種類に発現量に差が出るとする報告もあり(56)、*in vitro* での結果を *in vivo* のものに必ずしも置き換えることはできない。*in vivo* における検討、またどの分子標的薬が最も有効な放射線増強因子となるか等を今後解析する必要がある。

第5章 結論

今回、子宮体癌細胞株を用いた PARP 阻害薬の抗腫瘍効果、放射線照射(IR)の効果とそのバイオマーカー、IR の効果を増強する治療薬を探索することを通して、以下のことを明らかとした。

- 1) PARP 阻害薬は一部の子宮体癌株で高い抗腫瘍効果を示した。子宮体癌の中には HR 機能を喪失している症例が存在している可能性がある。
- 2) PARP 阻害薬の効果を予測するバイオマーカーとして、*PTEN* 変異は否定的であった。他の HR 関連因子が関与している可能性が考えられる。
- 3) IR に対して感受性の高い子宮体癌株はいずれも *TP53* 変異陽性であり、*TP53* 変異の有無は IR 効果を予測するバイオマーカーと考えられる。*PI3K* 経路の活性化も IR 抵抗性に寄与している可能性がある。
- 4) IR により MAPK 経路、*PI3K* 経路が活性化され、それとともに *HIF-1 α* /*VEGF* も発現が上昇する。
- 5) IR の効果を増強する薬剤として、*PI3K*/*mTOR* 同時阻害薬が有効であると考えられる。さらに *HIF-1 α* /*VEGF* 阻害そのものが、IR の効果を増強する可能性がある。

子宮体癌における新たな分子標的治療薬の活用法として、**PARP** 阻害薬、および、**IR** の併用としての **PI3K/mTOR** 経路阻害薬の 2 面から解析した本研究結果が、今後の子宮体癌における分子標的薬の臨床応用に寄与するものと期待される。

参考文献

1. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 1998: estimates based on data from 12 population-based cancer registries. *Japanese journal of clinical oncology* 33: 241-245, 2003.
2. Affolter A, Drigotas M, Fruth K, Schmidtman I, Brochhausen C, Mann WJ, and Brieger J. Increased radioresistance via G12S K-Ras by compensatory upregulation of MAPK and PI3K pathways in epithelial cancer. *Head & neck* 35: 220-228, 2013.
3. Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26: 3785-3790, 2008{Ashworth, 2008 #169}.
4. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N, Lu K, Schmutzler RK, Matulonis U, Wickens M, and Tutt A. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 376: 245-251, 2010.
5. Baekelandt MM and Castiglione M. Endometrial carcinoma: ESMO clinical

- recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19 Suppl 2: ii19-20, 2008.
6. Banerjee S and Kaye S. PARP inhibitors in BRCA gene-mutated ovarian cancer and beyond. *Current oncology reports* 13: 442-449, 2011.
 7. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology* 15: 10-17, 1983.
 8. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, and Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434: 913-917, 2005.
 9. Buring JE, Bain CJ, and Ehrmann RL. Conjugated estrogen use and risk of endometrial cancer. *American journal of epidemiology* 124: 434-441, 1986.
 10. Carreira A and Kowalczykowski SC. BRCA2: Shining light on the regulation of DNA-binding selectivity by RAD51. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8: 3445-3447, 2009.
 11. Chatterjee P, Choudhary GS, Sharma A, Singh K, Heston WD, Ciezki J, Klein EA, and Almasan A. PARP inhibition sensitizes to low dose-rate radiation TMPRSS2-ERG fusion gene-expressing and PTEN-deficient prostate cancer cells. *PloS one* 8: e60408, 2013.
 12. Chen Y, Zhang L, and Hao Q. Olaparib: a promising PARP inhibitor in ovarian cancer therapy. *Archives of gynecology and obstetrics* 288: 367-374, 2013.

13. Chow JP, Man WY, Mao M, Chen H, Cheung F, Nicholls J, Tsao SW, Li Lung M, and Poon RY. PARP1 is overexpressed in nasopharyngeal carcinoma and its inhibition enhances radiotherapy. *Molecular cancer therapeutics* 12: 2517-2528, 2013.
14. Dedes KJ, Wetterskog D, Mendes-Pereira AM, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Vatcheva R, Savage K, Mackay A, Lord CJ, Ashworth A, and Reis-Filho JS. PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors. *Science translational medicine* 2: 53ra75, 2010.
15. Dedes KJ, Wilkerson PM, Wetterskog D, Weigelt B, Ashworth A, and Reis-Filho JS. Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 10: 1192-1199, 2011.
16. El-Deiry WS. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 22: 7486-7495, 2003.
17. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Buzard GS, Miki H, Tanizawa O, and Rice JM. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer research* 51: 5308-5314, 1991.
18. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, and Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*

434: 917-921, 2005.

19. Fei P and El-Deiry WS. P53 and radiation responses. *Oncogene* 22: 5774-5783, 2003.

20. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, and de Bono JS. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *The New England journal of medicine* 361: 123-134, 2009.

21. Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, De Greve J, Lubinski J, Shanley S, Messiou C, A'Hern R, Tutt A, Ashworth A, Stone J, Carmichael J, Schellens JH, de Bono JS, and Kaye SB. Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28: 2512-2519, 2010.

22. Fraser M, Zhao H, Luoto KR, Lundin C, Coackley C, Chan N, Joshua AM, Bismar TA, Evans A, Helleday T, and Bristow RG. PTEN deletion in prostate cancer cells does not associate with loss of RAD51 function: implications for radiotherapy and chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18: 1015-1027, 2012.

23. Fujisawa T, Watanabe J, Kamata Y, Hamano M, Hata H, and Kuramoto H. VEGF expression and its regulation by p53 gene transfection in endometrial carcinoma cells. *Human cell* 16: 47-54, 2003.
24. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, Hirte H, Huntsman D, Clemons M, Gilks B, Yerushalmi R, Macpherson E, Carmichael J, and Oza A. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *The Lancet Oncology* 12: 852-861, 2011.
25. Gottschalk AR, Doan A, Nakamura JL, Stokoe D, and Haas-Kogan DA. Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase causes increased sensitivity to radiation through a PKB-dependent mechanism. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 63: 1221-1227, 2005.
26. Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Cheng Y, Bernhard EJ, Muschel RJ, and McKenna WG. The Ras radiation resistance pathway. *Cancer research* 61: 4278-4282, 2001.
27. Herzog A, Bian Y, Vander Broek R, Hall B, Coupar J, Cheng H, Sowers AL, Cook JD, Mitchell JB, Chen Z, Kulkarni AB, and Van Waes C. PI3K/mTOR inhibitor PF-04691502 antitumor activity is enhanced with induction of wild-type TP53 in human xenograft and

murine knockout models of head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19: 3808-3819, 2013.

28. Hunt CR, Gupta A, Horikoshi N, and Pandita TK. Does PTEN loss impair DNA double-strand break repair by homologous recombination? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18: 920-922, 2012.

29. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, and Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61: 69-90, 2011.

30. Kamata Y, Watanabe J, Hata H, Hamano M, and Kuramoto H. Quantitative study on the correlation between p53 gene mutation and its expression in endometrial carcinoma cell lines. *European journal of gynaecological oncology* 25: 55-60, 2004.

31. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, and Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497: 67-73, 2013.

32. Karar J and Maity A. Modulating the tumor microenvironment to increase radiation responsiveness. *Cancer biology & therapy* 8: 1994-2001, 2009.

33. Kashiyama T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji K, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O,

- Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, and Fujii T. Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR inhibitor DS-7423. *PloS one* 9: e87220, 2014.
34. Kim DW, Huamani J, Fu A, and Hallahan DE. Molecular strategies targeting the host component of cancer to enhance tumor response to radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 64: 38-46, 2006.
35. Ko EM, Walter P, Clark L, Jackson A, Franasiak J, Bolac C, Havrilesky L, Secord AA, Moore DT, Gehrig PA, and Bae-Jump VL. The complex triad of obesity, diabetes and race in Type I and II endometrial cancers: prevalence and prognostic significance. *Gynecologic oncology* 133: 28-32, 2014.
36. Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, Yokoyama T, Yamakawa H, Furukawa T, Sato M, Ohuchi N, Sato S, Yin J, Wang S, Abraham JM, Souza RF, Smolinski KN, Meltzer SJ, and Horii A. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nature genetics* 17: 143-144, 1997.
37. Lee CM, Fuhrman CB, Planelles V, Peltier MR, Gaffney DK, Soisson AP, Dodson MK, Tolley HD, Green CL, and Zempolich KA. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12: 250-256, 2006.

38. Manegold PC, Paringer C, Kulka U, Krimmel K, Eichhorn ME, Wilkowski R, Jauch KW, Guba M, and Bruns CJ. Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (Everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14: 892-900, 2008.
39. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, Giavara S, O'Connor MJ, Tutt AN, Zdzienicka MZ, Smith GC, and Ashworth A. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer research* 66: 8109-8115, 2006.
40. McEllin B, Camacho CV, Mukherjee B, Hahm B, Tomimatsu N, Bachoo RM, and Burma S. PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Cancer research* 70: 5457-5464, 2010.
41. Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim JS, Waldman T, Lord CJ, and Ashworth A. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO molecular medicine* 1: 315-322, 2009.
42. Minaguchi T, Yoshikawa H, Oda K, Ishino T, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Matsumoto K, Kawana K, and Taketani Y. PTEN mutation located only outside exons 5, 6,

and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7: 2636-2642, 2001.

43. Minami D, Takigawa N, Takeda H, Takata M, Ochi N, Ichihara E, Hisamoto A, Hotta K, Tanimoto M, and Kiura K. Synergistic effect of olaparib with combination of cisplatin on PTEN-deficient lung cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* 11: 140-148, 2013.

44. Nagata Y, Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Ohnishi T, Tojo T, and Taniguchi S. Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity of lung cancer cells having different p53 gene status. *International journal of oncology* 37: 1001-1010, 2010.

45. Nomura H, Aoki D, Takahashi F, Katsumata N, Watanabe Y, Konishi I, Jobo T, Hatae M, Hiura M, and Yaegashi N. Randomized phase II study comparing docetaxel plus cisplatin, docetaxel plus carboplatin, and paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Japanese Gynecologic Oncology Group study (JGOG2041). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22: 636-642, 2011.

46. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, and Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of

p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102: 849-862, 2000.

47. Oda K, Okada J, Timmerman L, Rodriguez-Viciana P, Stokoe D, Shoji K, Taketani Y, Kuramoto H, Knight ZA, Shokat KM, and McCormick F. PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. *Cancer research* 68: 8127-8136, 2008.

48. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, and McCormick F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer research* 65: 10669-10673, 2005.

49. Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, and Goodfellow PJ. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer research* 55: 1922-1926, 1995.

50. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, and Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273: 5858-5868, 1998.

51. Salvesen HB, Kumar R, Stefansson I, Angelini S, MacDonald N, Smeds J, Jacobs IJ, Hemminki K, Das S, and Akslen LA. Low frequency of BRAF and CDKN2A mutations in endometrial cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 115:

930-934, 2005.

52. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, and Yin Y. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128: 157-170, 2007.

53. Shi Y, Paluch BE, Wang X, and Jiang X. PTEN at a glance. *Journal of cell science* 125: 4687-4692, 2012.

54. Shoji K, Oda K, Kashiyama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Koso T, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, and Taketani Y. Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas. *PloS one* 7: e37431, 2012.

55. Siegel R, Ma J, Zou Z, and Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 64: 9-29, 2014.

56. Sivanathan L, Chow A, Wong A, Hoang VC, and Emmenegger U. In vivo passage of human prostate cancer cells in mice results in stable gene expression changes affecting numerous cancer-associated biological processes. *The Prostate* 74: 537-546, 2014.

57. Sung P, Krejci L, Van Komen S, and Sehorn MG. Rad51 recombinase and recombination mediators. *The Journal of biological chemistry* 278: 42729-42732, 2003.

58. Toda T, Oku H, Khaskhely NM, Moromizato H, Ono I, and Murata T. Analysis of

microsatellite instability and loss of heterozygosity in uterine endometrial adenocarcinoma.

Cancer genetics and cytogenetics 126: 120-127, 2001.

59. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, and Carmichael J. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 376: 235-244, 2010.

60. Wang X and Jiang X. PTEN: a default gate-keeping tumor suppressor with a versatile tail. *Cell research* 18: 807-816, 2008.

61. Wang Z, Huang Y, and Zhang J. Molecularly targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway can sensitize cancer cells to radiotherapy and chemotherapy. *Cellular & molecular biology letters* 19: 233-242, 2014.

62. Ward JF. The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *International journal of radiation biology* 57: 1141-1150, 1990.

63. Weigelt B, Warne PH, Lambros MB, Reis-Filho JS, and Downward J. PI3K pathway dependencies in endometrioid endometrial cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19: 3533-3544, 2013.

64. Weston VJ, Oldreive CE, Skowronska A, Oscier DG, Pratt G, Dyer MJ, Smith G, Powell JE, Rudzki Z, Kearns P, Moss PA, Taylor AM, and Stankovic T. The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* 116: 4578-4587, 2010.
65. Williams TM, Flecha AR, Keller P, Ram A, Karnak D, Galban S, Galban CJ, Ross BD, Lawrence TS, Rehmulla A, and Sebolt-Leopold J. Cotargeting MAPK and PI3K signaling with concurrent radiotherapy as a strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Molecular cancer therapeutics* 11: 1193-1202, 2012.
66. Wright JD, Barrena Medel NI, Sehouli J, Fujiwara K, and Herzog TJ. Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet* 379: 1352-1360, 2012.
67. Zhou Y, Xu Y, Wang H, Niu J, Hou H, and Jiang Y. Histone deacetylase inhibitor, valproic acid, radiosensitizes the C6 glioma cell line. *Oncology letters* 7: 203-208, 2014.
68. 牛島公生. 子宮体癌に対する卵巣温存の適応と限界. *日本産科婦人科学会雑誌* 58, 2006

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導・ご協力いただきました、東京大学医学部産科婦人科教室の藤井知行教授、大須賀穰教授、矢野哲客員准教授、織田克利准教授に深く感謝いたします。また、実験計画・実験手技につきご指導・ご協力いただいた、東京大学医学部産科婦人科教室の川名敬先生、平池修先生、池田悠至先生、谷川道洋先生、檜山智子先生、神尊貴裕先生、稲葉可奈子先生、福田友彦先生、牧井千波先生、栗川玲子様にご心より御礼申し上げます。