

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 宮坂 亜希

### [序論]

新たな治療法の選択肢として分子標的薬の開発が進んでおり、婦人科癌の治療においても、従来の手術・化学・放射線療法(IR: Ionizing radiation)以外の治療法の確立が期待されている。しかしながら、子宮体癌で臨床応用されている分子標的薬は未だ存在しない。分子標的薬は癌の生物学的特徴をもとに開発された薬剤であるが、バイオマーカーが明確でない薬剤も存在する。PARP (poly ADP-ribose polymerase) 阻害薬は、DNA の一本鎖切断修復を阻害する薬剤であり、DNA 二本鎖切断の蓄積を誘導するため、DNA の相同組換え修復(HR: Homologous Recombination) の障害を来した癌細胞において、殺細胞効果が期待される。現在、乳癌・卵巣癌を中心に、特に *BRCA1/2* 変異陽性例に対して臨床試験が進んでいる。HR には *PTEN* を含めて様々な分子の関与が報告されており、PARP 阻害薬において、*BRCA1/2* 以外のバイオマーカーが存在する可能性がある。また、放射線照射も DNA 損傷を起こすことを通して、殺細胞効果をもたらす治療法であり、PARP 阻害薬と共通性がある。

本研究では、子宮体癌における PARP 阻害薬の有効性、*PTEN* 変異が PARP 阻害薬のバイオマーカーとなりうるか、IR の感受性と相関する因子の解明、IR により活性化されるシグナル伝達経路の同定、IR による抗腫瘍効果を増強する分子標的薬とその効果に関わる分子の解明を目的とした。

### [方法]

#### (1) 子宮体癌細胞株における PARP 阻害薬の抗腫瘍効果

子宮体癌 16 種類の細胞株を用いて検討を行った。cDNA を用いて、PCR-ダイレクトシーケンシング法にて *PTEN* の変異を検索した。Western blot を行い、*PTEN* の発現を調べた。全 16 株について *olaparib* を添加し、clonogenic assay により細胞増殖抑制効果を評価した。SF50 値 (コロニーの数が半数に低下する濃度) を算出し、*PTEN* の変異、および *PTEN* の発現と感受性との相関の有無を検討した。HEC-6 (*PTEN* 欠損株) にレトロウィルスベクター

(pFB-NEO)を用いて野生型 *PTEN* を安定導入した (HEC-6-PTEN)。HEC-6 と HEC-6-PTEN を用いて olaparib を添加し、clonogenic assay により、細胞増殖抑制能を評価した。またこの両細胞株について、DNA 二本鎖切断部位の  $\gamma$ -H2AX と二本鎖切断修復部位を示す RAD51 の foci の数を細胞免疫染色によって評価した。さらに PTEN の細胞周期に与える影響を Flow cytometry を用いて調べた。放射線照射(IR: Ionizing radiation)についても、同様に PTEN 発現の有無により、 $\gamma$ -H2AX、RAD51 の foci 数や、細胞死の比率が異なるか、検討を行った。

## (2) 子宮体癌細胞株における IR の抗腫瘍効果

子宮体癌 8 株の細胞株に IR (2~6Gy) を加えた後、clonogenic assay を行った。*TP53*, *PTEN*, *KRAS*, *PIK3CA* の遺伝子変異と感受性との相関を調べた。western blot により、IR によって PI3K 経路や MAPK 経路が活性化されるかを、同経路の蛋白のリン酸化 (AKT, ERK) レベルにより評価した。続いて MAPK 経路阻害薬、もしくは PI3K/mTOR 経路阻害薬を IR と併用し、clonogenic assay にて IR 単独での効果と比較した。さらに MAPK 経路、PI3K/mTOR 経路の下流にあたる、HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A の発現について western blotting、Quantitative RT-PCR を用いて検討した。

## [結果]

### (1) 子宮体癌細胞株における PARP 阻害薬の抗腫瘍効果

16 株において、olaparib 添加における clonogenic assay では、SF50 は 8 ~2,500 nM であった。このうち 4 株 (25%) では SF50 値が 100 nM 未満であり、高い感受性を示した。その一方、4 株(25%)では、SF50 値が 1,000 nM 以上と低感受性であった。このように olaparib 感受性は個々の細胞株で大きく異なることが示された。*PTEN* の変異は 16 株中 12 株 (75%) と高頻度に認められた。12 株の *PTEN* 変異株のうち 8 株では *PTEN* の発現消失を認めた。*PTEN* 変異・発現の有無は、Olaparib の SF50 値と有意な相関を示さなかった。また、RAD51 は全ての株で発現がみられたが、*PTEN* と RAD51 の発現についても相関はみられなかった。さらに、HEC-6 と HEC-6-PTEN を用いて Olaparib の効果を比較したが、SF50 値 (1,500 nM)、細胞周期への影響 (Sub-G1, G2/M 比の上昇) のいずれも有意な差を認めなかった。細胞免疫染色による  $\gamma$ -H2AX と RAD51 の foci 数の評価においても、両細胞株間で有意差はみられなかった。*PTEN* 野生型株(HEC-1B, HEC-50B)で *PTEN* 発現を si RNA にてノックダウンし、また *PTEN* 発現欠損株 (AN3CA)に野生型 *PTEN* を強制発現させたが、olaparib の感受性に有意な差は認められなかった。以上より、子宮体癌の中で Olaparib に高感受性のものが存在することが示されたが、効果を予測するバイオマーカーは *PTEN* 非依存性の因子と考えられた。

### (2) 子宮体癌細胞株における IR の抗腫瘍効果

8 細胞株に X 線 2~6Gy を照射して clonogenic assay を行ったところ、D<sub>10</sub> 値 (90%の細胞増殖を抑制する線量) は 2~>6Gy と細胞株毎で感受性が大きく異なっていた。*TP53* 野生株

3株ではD<sub>10</sub>値が $\leq 3.1\text{Gy}$ 、TP53変異株5株においてはD<sub>10</sub>値 $\geq 3.3\text{Gy}$ であり、TP53変異がIRの抵抗性と相関することが示唆された。TP53変異株5株は全ての株でPIK3CAに変異を有し、2株にKRASの変異を、3株にPTEN変異が存在した。IR照射した細胞株において、ERKおよびAKTのリン酸化の上昇がみられ、MAPK経路とPI3K経路がいずれも活性化することを確認した。また、MAPK経路に比べ、PI3K経路の活性化は遅れて生じており、24-48時間以降でAKTリン酸化の著明な上昇があった。またHIF-1 $\alpha$ も時間とともに発現が増加した。MEK阻害薬(UO126)またはPI3K/mTOR阻害薬(BEZ235)とIRを併用し、IR単独と比較したところ、全ての株でBEZ235併用により有意なSF50値の低下( $\leq 2\text{Gy}$ )が認められたが、UO126併用では、2株を除いて併用効果は見られなかった。IR高感受性であったTP53野生株では、低濃度(50 nM)でもBEZ235によりIRの感受性が増強していた。IR低感受性であったTP53変異株では、50-100 nMのBEZ235添加により、IRの感受性が増強した。

UO126・BEZ235によるMAPK経路またはPI3K経路の抑制とHIF-1 $\alpha$ の発現の相関についてwestern blot法で検討したところ、HIF-1 $\alpha$ の発現はBEZ235でのみ抑制された。さらにUO126・BEZ235の添加時のVEGF (Vasucular endometrial growth factor)の発現についても、BEZ235においてのみ、有意な発現抑制を認めた。HIF-1 $\alpha$ の発現抑制とIRの併用により、sub-G1(細胞死)の比率がIR単独よりも有意に増加した。

#### [考察]

本研究では、子宮体癌においてDNA損傷・修復機序に着目し、PARP阻害薬olaparibとIRによる抗腫瘍効果の検討、バイオマーカーの探索、IRの効果を増強する分子標的薬の探索について解析を行った。

今回、子宮体癌株のうち、25%ではPARP阻害薬olaparibに高感受性を示し、25%では低感受性を示したが、PTEN変異の有無はそのバイオマーカーとはならなかった。しかし子宮体癌においても、HRの機能障害を有し、olaparibが有効なものが存在する可能性が示された。さらに、子宮体癌ではBRCA1/2の変異頻度は低いことが知られており、BRCA1/2やPTEN以外の因子によって、HRに何らかの機能異常を有するものが存在することが示唆された。子宮体癌においても、PARP阻害薬の感受性を予測するバイオマーカーについて更なる検討が必要である。

子宮体癌においてIRの効果を予測するバイオマーカーや効果を増強する治療薬は報告が見られなかった。今回の解析により、子宮体癌における放射線の感受性はTP53変異が関与していることが強く示唆された。また、TP53変異は5株すべてでPIK3CA変異と共存しており、PI3K経路も感受性と関わっている可能性がある。実際にIRによって活性化を受けるMAPK経路とPI3K経路のそれぞれを阻害したところ、PI3K/mTOR阻害薬(BEZ235)において、IRの効果が強く増強されることが明らかとなった。HIF-1 $\alpha$ の発現はBEZ235により有

意に抑制され、BEZ235 による IR 効果の増強には HIF-1/VEGF 経路の関与が示唆された。以上より、PI3K/mTOR 阻害薬や HIF-1 $\alpha$ /VEGF 阻害薬が IR の効果を高める併用薬として期待され、今後の臨床応用につながる可能性が示唆された。