

# 論文の内容の要旨

論文題目 大腸癌の抗癌剤感受性に対する抗マラリア薬  
(クロロキン) の影響

氏名 佐々木和人

## 研究の背景と目的

悪性新生物は本邦における死因の第1位を占めており、その中でも大腸癌は男女ともに増加傾向が著明である。大腸癌の治療としては、根治可能な症例は外科的切除が第一選択であり、根治手術不能例や進行再発大腸癌に対しては化学療法や放射線療法を含む集学的治療が行われているが、現状では十分な治療効果が得られていない。治療効果が限定される要因の一つに、癌細胞における抗癌剤の感受性低下が挙げられる。したがって、この感受性低下に関係する機序を解明し、効率よく制御することによって化学療法の効果を増強することは、大腸癌治療における重要な課題であり、大腸癌患者の予後改善に大きく寄与するものと考えられる。

近年、抗癌剤の感受性低下のメカニズムの一つとして、オートファジーが注目されている。オートファジーは、細胞がある種のストレスにさらされた際に誘導され、細胞成分や傷害を受けた細胞内器官などを自己のリソソームで分解して重要性の高いタンパク質の再合成に使用するという、正常細胞の恒常性維持に重要な機能である。抗癌剤や放射線によって傷害を受けた癌細胞においても、同様のメカニズムを介して、生存に必要な内部環境が維持されると考えられており、オートファジー阻害薬が癌細胞の治療感受性の増強につながるという概念が提唱されている。

本研究では、この仮説を検証すべく、オートファジー阻害薬として、抗マラリア薬や抗リウマチ薬として広く使用されているクロロキン (CQ) に注目し、大腸癌治療の中心

的薬剤である 5-fluorouracil(5-FU)の感受性に対する CQ 併用の効果について *in vitro*、*in vivo* の両面から検討した。

## 方法・結果

### 1) 大腸癌細胞の抗癌剤感受性に及ぼすクロロキンの影響

癌細胞に対する最小限の細胞毒性でオートファジー阻害効果を有する CQ の濃度および作用時間を確認した後、5-FU の抗腫瘍効果に及ぼす CQ の影響を検討した。CQ 併用により、5-FU の増殖抑制効果の著明な増強を認めた(増殖抑制率: 5-FU;  $21 \pm 10.0\%$ 、pre-CQ+5-FU;  $48 \pm 1.2\%$ 、 $P < 0.001$ )。この実験系にて、5-FU 単独群では AVOs、LC3-II の発現増加と p62 の発現低下をきたし、オートファジーを誘導することが確認されたが、CQ の併用により、p62 の低下が有意に抑制され、オートファジーの抑制が増殖抑制効果の増強につながっている事実が確認された。また、細胞周期の解析にて、5-FU 単独群では S 期停止を認めたのに対し、CQ 併用群では高度の G0-G1 期停止を認めた。さらに、CQ 併用により、G1 期から S 期の進行に必要な細胞周期調節因子であるサイクリン依存性キナーゼ 2(CDK2)の低下と CDK 活性阻害因子(CKI)の p21<sup>Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> の増加を認めた。さらに、CQ 前処置により、5-FU によるコロニー形成能の低下は長期にわたり持続した。

### 2) 大腸癌皮下移植モデルの抗癌剤感受性に及ぼすクロロキンの影響

上記 1) の結果を *in vivo* で検証するため、マウス大腸癌細胞株 Colon26 の皮下移植腫瘍モデルを用いて検討したところ、5-FU 単独群では明らかな抗腫瘍効果は示さなかったが、CQ の併用群で腫瘍の成長が有意に抑制された。腫瘍組織由来のタンパク成分を Western blot にて解析したところ、5-FU 単独群では LC3-II の発現増加と軽度の p62 の発現低下をきたし、オートファジーを誘導することが確認されたが、CQ の併用により p62 の低下が抑制されることから、大腸癌皮下移植モデルにおいて、CQ は 5-FU 誘導性オートファジーを阻害することが確認された。腫瘍組織のパラフィン包埋切片を用いて TUNEL 染色によるアポトーシスの解析を行ったところ、CQ の併用群では、control 群、5-FU 群と比較して有意なアポトーシスの増加を認めた(CQ+5-FU 群;  $7.80\%$  ( $34.9-4.2$ )、vs control 群  $P = 0.008$ 、vs 5-FU 群  $P = 0.031$ )。また、western blot にて解析したところ、5-FU 単独群では、プロアポトーシスタンパク Bax の増加と抗アポトーシスタンパク Bcl-2 の低下を認めたが、この変化は CQ 併用群でより顕著になることが確認された。さらに、

5-FU 単独群では変化を認めなかったプロアポトーシスタンパク Bad が、CQ の併用によって有意に増加することが判明した。以上より、大腸癌皮下移植モデルにおいては、CQ は 5-FU によって誘導される腫瘍細胞のアポトーシスを増強することによって、その抗腫瘍効果を増強していると考えられた。

## 考察

大腸癌細胞株 HT-29 において、CQ によるオートファジーの阻害が、5-FU による増殖抑制作用を著明に増強することを確認した。また、5-FU 単独により、G1 期から S 期への進行を阻害する p21<sup>Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> の発現が低下し、G1 期から S 期への進行を促進する CDK2 の発現が増加したが、CQ 併用により、これらのタンパクの量的変化が抑制されることから、CQ がこれらの細胞周期関連タンパクの発現を調節する事によって G0/G1 期での細胞周期の停止を誘導し、これが 5-FU の効果を増強する直接の原因である事が推測された。また、5-FU 単独では細胞増殖抑制と S 期細胞の増加が認められることから、S 期から G2/M 期への移行が阻害されている。CQ 併用により S 期細胞の減少と G0/G1 期細胞の増加が認められることから、CQ が G2/M check point を阻害し細胞周期のリエンターリーを増やし、genome の異常をきたした細胞が分裂して、アポトーシス細胞の増加とともに G0/G1 期細胞の増加をきたした可能性も考えられ、CQ の及ぼす細胞周期への影響については今後の詳細な検討が必要と思われる。

一方、*in vivo* の検討においても、CQ 併用によって皮下移植したマウス大腸癌細胞株 colon26 の成長に対する 5-FU の抗腫瘍効果が顕在化すると共に、Bcl-2 の減少や Bad の発現増加が誘導された。Bad は、Bcl-2 と選択的に結合することで Bcl-2 から Bax の解離を誘導してアポトーシスの進行を促す一方、オートファジーを誘導し、細胞保護的な働きを有することが報告されている。Bad の活性化が低レベル(sub-apoptotic level)ではオートファジーを誘導し、高レベル(apoptotic level)では Bax、Bak などの発現増加が誘導された結果、アポトーシスの方向へ導き細胞死に至ると推測されることから、Bad と Bcl-2 は共にオートファジーとアポトーシスを関連づける重要な因子と考えられる。In vivo における CQ と 5-FU の相乗効果はアポトーシスに対する作用に起因することが推測された。

本研究を通して、CQ と 5-FU の併用が、大腸癌に対する新たなる治療戦略として有望であることが示唆された。CQ は抗マラリア薬として既に広く臨床使用されていることから、癌治療への応用が比較的容易であり得られる経済効果も大きいと考えられるが、網

膜症などの副作用も報告されており、5-FU との併用が人体に与える影響についてはさらなる検討が必要と思われる。