

論文の内容の要旨

論文題目 **Temsirolimus (Rapamycin 誘導体) の大腸癌に対する
抗腫瘍効果の研究—in vitro および in vivo 解析—**

氏名 金子 学

研究の背景と目的

本邦における死因の第 1 位は悪性新生物であり、このなかで大腸癌は男性で第 3 位、女性で第 1 位を占めている。大腸癌に対する根治的な治療は現在でも外科的切除のみで、切除不能な進行または再発大腸癌に対しては、緩和的治療として化学療法や放射線療法が行われている。近年の分子標的薬の導入により、切除不能進行再発大腸癌患者の生存期間中央値は約 24 か月となった。しかし、十分な効果が得られない症例も多く存在するため、新たな薬剤を開発し治療の選択肢を拓けることは重要な課題である。今回、その新たな選択肢の候補となる薬剤として、epidermal growth factor receptor の下流に存在し PI3K/AKT/ mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル伝達系の mTOR を阻害するラパマイシン (rapamycin) という薬剤に着目した。

ラパマイシンは 1965 年にイースター島の土壌中の *Streptomyces hydroscopius* という放線菌の一種から産生される物質として発見されたが、その後抗悪性腫瘍薬として注目され、現在その誘導体 (rapalog) が結節性硬化症にみられる上衣下巨細胞性星細胞腫、ホルモンレセプター陽性・HER2 陰性の進行乳癌、進行性膵内分泌腫瘍、および腎細胞癌で臨床応用されている。作用機序は、主に PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系に属する mTOR 抑制による細胞周期の G1 期停止と血管新生抑制が考えられており、細胞株によってはアポトーシスを誘導すると報告されている。特に、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系が活性化されている腫瘍においてより強い効果を示すことが知られており、この系が活性化されているものが多く存在する大腸癌でも有効である可能性がある。

一方で、これまでの腎細胞癌に対する rapalog の臨床使用の経験から、rapalog への抵抗性を示す腫瘍の存在も徐々に知られてきており、オートファジー誘導もその一つと考えられている。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、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新たにタンパクの合成に利用するという、正常細胞の恒常性維持にとって重要な機能である。近年、抗悪性腫瘍薬

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。

本研究第一章では、ヒト大腸癌細胞株およびマウス大腸癌細胞株に対する rapalog の抗腫瘍効果を、rapalog の一つである temsirolimus (TEM) を用いて、*in vitro* と *in vivo* の両面から検証した。また、本研究第二章では、オートファジーが rapalog への抵抗性に寄与しているという仮説に基づき、オートファジー阻害剤であるクロロキン (CQ) を TEM と併用することにより TEM の効果増強が得られるかを検証すべく、マウス大腸癌細胞株を用いた *in vitro* と *in vivo* の検討を行った。

方法・結果

1-1) TEM の大腸癌に及ぼす影響- *in vitro*

mTOR の上流に位置する AKT が強く活性化されているヒト大腸癌細胞 CaR-1 とマウス大腸癌細胞 Colon-26、および AKT の活性化が比較的弱いヒト大腸癌細胞 HT-29 を用いて、*in vitro* の実験系での検討を行った。TEM は CaR-1 と Colon-26 の増殖を用量依存的に抑制し、これはアポトーシスの誘導ではなく、細胞周期の G1 期停止によるものであることが確認された。しかし、HT-29 では増殖抑制は認められなかった。mTOR シグナルに関わるタンパクについて western blotting による検討を行ったところ、CaR-1 と Colon-26 では、TEM により phospho-AKT (p-AKT) には大きな変化を認めなかったが、phospho-p70S6K (p-p70S6K) は両者で著明に減少していた。phospho-4E-BP1 (p-4E-BP1) は CaR-1 では 80% 程度、Colon-26 では 10% 程度の抑制であった。HT-29 では p-p70S6K は 50% 程度、p-4E-BP1 は 80% 程度減少したが、p-AKT は逆に 70% 程度の著明な増加を認めた。一方で、血管新生における重要な調節因子である、HIF-1 α と VEGF のタンパク発現について western blotting にて検討したところ、TEM 100 μ M 48 時間処理によってすべての細胞株で両者の著明な減少を認めた。

1-2) TEM の大腸癌に及ぼす影響- *in vivo*

マウス皮下腫瘍モデルにおける、ヒト大腸癌細胞株およびマウス大腸癌細胞株に対する TEM の影響を検討した。*in vitro* の実験結果と異なり HT-29 を含むすべての細胞株で、TEM による皮下腫瘍増殖抑制効果を認めた。そこで、血管新生に関して検討を行ったところ、すべての細胞株において、HIF-1 α と VEGF のタンパク発現抑制による血管新生抑制を認め、さらにアポトーシス誘導効果が確認された。以上から、血管新生抑制は大腸癌細胞株の AKT 活性の状態によらず、TEM により抑制されることが明らかとなった。*in vitro* の実験系では認めなかったアポトーシス誘導の増強がマウス皮下腫瘍で認められた点についても、血管新生抑制による低酸素、低栄養状態による影響が原因の一つと推察された。

2) クロロキン (CQ) との併用による TEM の大腸癌に及ぼす影響

TEM とオートファジー阻害剤である CQ との併用の大腸癌への影響について、マウス大腸癌細胞株 Colon-26 を用いて、*in vitro* と *in vivo* 両面から検証した。*in vitro* の実験系において、TEM と CQ を併用することにより、それぞれを単剤で用いた場合よりも腫瘍増殖抑制効果が増強された。この実験系において、TEM 単剤投与群では LC3-II の発現増加と p62 の発現低下をきたし、オートファジーが誘導されていると考えられたが、CQ 併用により、p62 の低下が有意に抑制された。故に、オートファジーの抑制が増殖抑制効果の増強につながると考えられた。また、TEM+CQ 併用群は、TEM 単剤投与群と CQ 単剤投与群と比較し有意に高いアポトーシス誘導効果を示した。この機序に関する検討として、プロアポトーシスタンパクである Bax と、抗アポトーシスタンパクである Bcl-2 の比である Bax/Bcl-2 ratio を測定したところ、TEM+CQ 併用群では他の群と比較し有意に Bax/Bcl-2 ratio が上昇していることが確認された。

続いて *in vitro* での結果をマウス皮下腫瘍モデルを用いて *in vivo* でも検討した。TEM+CQ 併用群では、他の群と比較し腫瘍増殖が有意に抑制された。オートファジーに関しては、*in vitro* の実験と同様、TEM により誘導されたオートファジーを CQ が抑制することが確認された。アポトーシスに関しては、TEM と CQ の併用群では他の群と比較し、Bax/Bcl-2 ratio の上昇により有意に高いアポトーシス誘導効果を示した。以上より、皮下腫瘍モデルにおいても、TEM と CQ の併用が腫瘍細胞のアポトーシスをより誘導することによって、TEM の抗腫瘍効果を増強することが明らかとなった。

考察

TEM 単剤での大腸癌への影響を検討したところ、*in vitro* においては、AKT の活性化が強い大腸癌細胞では細胞周期を G1 期停止することにより細胞増殖を濃度依存的に抑制した。しかし、AKT の活性化が弱い細胞株の細胞周期には影響せず増殖抑制を認めなかった。過去の報告では、非小細胞肺癌細胞株において mTOR 阻害剤を投与することにより、ネガティブフィードバックが働かなくなり、上流の分子である AKT の活性化が生じることや、また、骨髄腫細胞株に mTOR 阻害剤を加えた実験では同様にネガティブフィードバックがなくなるために Ras-Raf-MEK-ERK 経路が活性化されることなどが報告されており、これらの研究結果から、mTOR 阻害によって cyclin D1 を制御する他のシグナル伝達経路の活性化が引き起こされる可能性が推察された。一方で、AKT 活性の状態に関わらず TEM 投与による HIF-1 α と VEGF のタンパク発現抑制効果を認めた。

in vivo においては、細胞株の AKT の活性化によらず腫瘍の増殖抑制効果を認め、さらに、*in vitro* の実験系では認められなかったアポトーシス誘導効果が認められた。この点に関しては、HIF-1 α ・VEGF 抑制を介した血管内皮細胞に対する血管新生抑制作用によって、腫瘍細胞に低酸素・低栄養状態がもたらされ、間接的に腫瘍増殖が抑えられたこ

とが原因の一つと推察された。

続いて、TEM 作用に対する防御機構として大腸癌細胞がオートファジーを誘導することが確認されたため、オートファジー阻害薬である CQ を TEM に併用することにより、TEM の抗腫瘍効果を増強しうるかを、*in vitro* および *in vivo* で検討した。*in vitro* と *in vivo* 両面において、CQ を併用することで TEM により誘導されるオートファジーが阻害されること、さらに、Bax/Bcl-2 ratio の上昇によりアポトーシスが誘導され、腫瘍増殖が抑制されることが明らかとなった。

本研究を通して、rapalog 単剤または CQ との併用療法が切除不能・進行再発大腸癌に対する新たな治療戦略として有望であることが示唆された。rapalog と CQ とともに、すでに他の疾患に対して実臨床で使用されており、人体に対する安全性も既に確認されているため、大腸癌への臨床応用も比較的容易と考えられる。今後、大腸癌を対象とした第 I/II 相臨床試験の実施が望まれる。