

本研究は、新たな抗悪性腫瘍薬であり、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系のmTORを阻害する作用をもつ、temsirolimusの大腸癌細胞に対する抗腫瘍効果を明らかにするため、*in vitro*およびマウス皮下腫瘍モデルを用いた*in vivo*の実験系にて、腫瘍増殖抑制効果や血管新生抑制効果、さらにオートファジー阻害剤との併用効果の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *in vitro*の実験系において、temsirolimusはmTORの上流に存在するAKTの活性化の強い大腸癌細胞株では、細胞周期のG1期停止により、用量依存的に増殖抑制効果を示すことが確認された。一方で、AKTの活性化の弱い大腸癌細胞株では増殖抑制効果を認めなかった。細胞周期のG1期からS期への移行に關与するcyclin D1についてwestern blottingを行ったところ、AKTの活性化の強い大腸癌細胞株ではcyclin D1の発現が減少するが、AKTの活性化の弱い大腸癌細胞株ではcyclin D1の発現は変化しないことが示された。
2. *in vitro*の実験系において、血管新生関連タンパクであるHIF-1 α とVEGFのtemsirolimusによる発現抑制効果についてwestern blottingを行ったところ、大腸癌細胞のAKTの活性化の状態によらず両者が抑制されることが示された。
3. *in vivo*の実験系においては、大腸癌細胞のAKTの活性化の状態によらず、temsirolimusが皮下腫瘍の増殖抑制効果を有することが示された。皮下腫瘍の血管内皮を染色したところ、大腸癌細胞のAKTの活性化の状態によらず、temsirolimusは血管新生抑制作用を有することが確認され、さらに免疫染色を行ったところ、HIF-1 α とVEGFタンパクの発現が抑制されていることが示された。したがって、temsirolimusは、AKTの活性化の強い大腸癌細胞に対してはG1期停止による直接的な増殖抑制効果およびHIF-1 α とVEGFを介した血管新生抑制による間接的な増殖抑制効果を有し、AKTの活性化の弱い大腸癌細胞に対しては血管新生抑制による増殖抑制効果を有すると考えられた。
4. temsirolimusとオートファジー阻害剤であるクロロキンの併用効果について*in vitro*および*in vivo*の実験系において検証したところ、temsirolimusとクロロキンを併用することで、それぞれを単剤で用いた時よりも強い腫瘍増殖

抑制効果を有することが示された。オートファジー関連タンパクについて **western blotting** を行ったところ、**temsirolimus** により誘導されたオートファジーがクロロキンの併用により阻害されることが示された。さらに両者の併用により、大腸癌細胞のアポトーシス誘導効果の増強を認め、**Bax/Bcl-2 ratio** の上昇がこの機序の一つであることが示された。

以上、本論文は大腸癌細胞において、**temsirolimus** の抗腫瘍効果が細胞周期のG1期停止による直接的なものと、血管新生抑制による間接的なものの二つを有することを明らかにした。さらにオートファジー阻害剤との併用により大腸癌細胞に対する**temsirolimus** の抗腫瘍効果を増強しうることを明らかにした。本研究はこれまで詳細不明であった分子細胞レベルでの大腸癌細胞への抗腫瘍効果を解明し、今後の臨床応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。