

博士論文

大腸癌放射線療法における

mTOR 経路とオートファジーの活性化

白鳥広志

大腸癌放射線療法における
mTOR 経路とオートファジーの活性化

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 外科学専攻

指導教員 石原聡一郎教授

白鳥広志

目次

目次.....	1
略語一覧.....	3
要旨.....	4
序文.....	5
第1章 大腸癌細胞におけるテムシロリムス/クロロキン併用療法の X 線増感効果 ..	15
1-1 背景と目的.....	15
1-2 方法.....	16
1-3 結果.....	23
1-4 考察.....	44
1-5 小括.....	51
第2章 放射線治療後大腸癌の転移能における mTOR 経路の役割 ..	52
2-1 背景と目的.....	52
2-2 方法.....	55
2-3 結果.....	68
2-4 考察.....	89

2-5 小括.....	96
総括および今後の課題	99
謝辞.....	102
引用文献	103

略語一覽

CRT: chemoradiotherapy

CQ: chloroquine

EMT: epithelial to mesenchymal transition

LC3: light chain 3

mTOR: mammalian target of rapamycin

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

pCR: pathological complete response

S6: S6 ribosomal protein

TEM: temsirolimus

TME: total mesorectal excision

4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

5-FU: 5-fluorouracil

要旨

本研究では、大腸癌放射線療法における局所効果の増強および治療後遠隔転移出現の抑制を可能にするために、放射線療法による mTOR 経路とオートファジーの活性変化に着目し研究を行った。第一章では大腸癌細胞を用いた研究を行い、一部の癌細胞では X 線照射により mTOR 経路とオートファジーが活性化され、mTOR 阻害薬であるテムシロリムスとオートファジー阻害薬であるクロロキンの併用療法が放射線治療の増感剤として有効である可能性を見出した。さらに、第二章では大腸癌の切除検体を用いた臨床研究と大腸癌細胞を用いた基礎研究を行い、放射線療法による mTOR 経路活性化の有無が大腸癌の転移能に関与する可能性のあることを見出した。

序文

直腸癌は全世界で新規罹患者数が年間 45 万人、死亡者数は年間 25 万人にのぼる疾患である [1]。局所進行直腸癌に対しては術前化学放射線療法 (chemoradiotherapy: CRT) と全直腸間膜切除 (total mesorectal excision: TME) を含めた集学的治療を行うことが欧米における標準治療である [2, 3]。一方、本邦においては直腸癌に対する根治治療として TME のみが行われ、特に下部進行直腸癌に対しては側方リンパ節郭清が同時に行われてきた [4]。直腸癌に対する術前 CRT の利点はその良好な局所制御効果にあり、海外の報告では術前 CRT により直腸癌の術後局所再発率は半減することが示されている [5, 6]。また、本邦においては術前 CRT により予防的側方リンパ節郭清を省略し得る可能性が示唆されている [7-9]。このため、近年では本邦においても直腸癌に対する術前 CRT が普及しつつある。しかし、直腸癌に対する術前 CRT には未だ二つの問題点がある。一つは CRT による病理学的完全奏効 (pathological complete response: pCR) 率が低いことである。術前 CRT により一部の症例では癌が完全に消失した状態である pCR の状態となり、pCR となった症例の予後は良好であることが報告されている [10]。また、近年では臨床的に pCR が疑われる症例に対し手術を行わずに経過観察をする方法 (Watch and Wait) が提唱されており、これにより不要な手術を回避できる可能性が示唆されている [11]。このため、直腸癌に対する術前 CRT において、pCR 率を向上させることが重要である。し

かし、従来の 5-fluorouracil (5-FU) をベースとした CRT による pCR 率は 13.8–17.8% と未だ十分ではない [6, 12]。また、直腸癌に対する術前 CRT のもう一つの問題点として、術後遠隔転移出現を抑制する効果が示されておらず生存期間延長に寄与しないことが挙げられる [5, 13, 14]。術前 CRT と根治手術を行った局所進行直腸癌のうち、未だ 18.5–29.8% の症例は術後遠隔転移をきたすことが報告されている [14, 15]。これらの問題点を解消すべく、放射線治療に様々なレジメの化学療法を組み合わせた臨床研究が世界中で行われているが、未だ十分な成績は示されていない [12, 15, 16]。そこで我々は、細胞内タンパク質リン酸化経路の一つである PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系 (以下 mTOR 経路と略す) と細胞内自己食機構であるオートファジーに着目した。

Mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路は受容体型チロシンキナーゼからのリン酸化シグナルを phosphoinositide 3-kinase (PI3K), AKT, mTOR を介して、下流の S6 ribosomal protein (S6), eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) に伝達する細胞内のリン酸化シグナルである (図 1)。活性化されたリン酸化 S6 (phospho-S6: p-S6), リン酸化 4E-BP1 (phospho-4E-BP1: p-4E-BP1) は細胞の成長、生存、代謝に関わる様々なタンパク質の翻訳を促進させ、癌細胞においては癌の増殖、転移に関与するとされている [17]。また、基礎研究では、一部の癌細胞において X 線照射により mTOR 経路が活性化することが示されており、活性化した mTOR

経路は DNA ダメージの修復、アポトーシスの抑制を介して放射線治療抵抗性に寄与すると考えられている [18-21]。mTOR はさらに結合分子の違いにより、regulatory-associated protein of mTOR (Raptor) から構成される mTOR complex 1 (mTORC1) と rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor) から構成される mTOR complex 2 (mTORC2) に分類される。mTORC1 は下流の S6 と 4E-BP1 へリン酸化シグナルを伝達するが、mTORC2 は下流のタンパク質には作用せず上流の AKT をリン酸化させ mTOR 経路の positive feedback として働くことが知られている [17, 22]。

mTOR 経路の活性程度は免疫染色や Western blotting を用いて各リン酸化タンパク質の発現量を評価するのが一般的である (図 2)。特に S6 は mTORC1 からのリン酸化シグナルに対し極めて特異的に反応するタンパク質であり、p-S6 の発現量はこの経路の活性程度をもっとも鋭敏に反映していることが知られている [23]。

この経路を阻害する薬剤として mTOR 阻害薬であるラパマイシンがあり、いくつかの癌腫においてその腫瘍増殖抑制効果が示されている [24-26]。本邦においては 2019 年 4 月現在、ラパマイシン誘導体であるエベロリムスが切除不能または再発乳癌、切除不能または転移性の腎細胞癌および神経内分泌腫瘍に対し保険収載されており、同じくラパマイシン誘導体であるテムシロリムスが切除不能または転移性の腎細胞癌に対し保険収載され臨床使用されている。一方で、このラパマイシンに治療抵抗性を示す機序が報告されており、その一つにオートファジーがある [27, 28]。

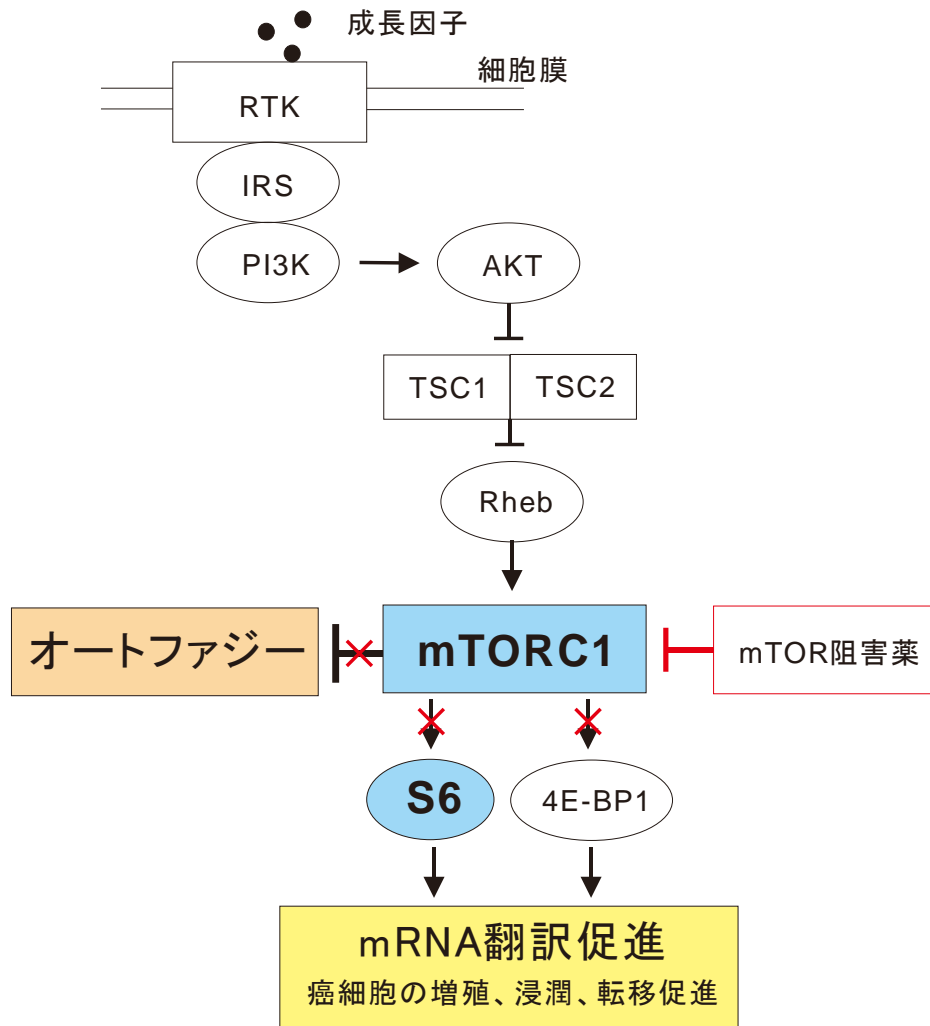


図 1. PI3K/AKT/mTOR シグナリング経路

Insulin growth factor などの成長因子が細胞膜に存在する受容体型チロシンキナーゼ (RTK) に結合することで、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、AKT、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) と細胞内のタンパク質にリン酸化シグナルが伝達される。最終的に S6 ribosomal protein (S6) および eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) がリン酸化され、細胞の生存、増殖に関わる様々な mRNA の翻訳が促進される。また、mTORC1 はオートファジーの強力な阻害因子である。mTOR 阻害薬 (ラパマイシン) により S6 および 4E-BP1 のリン酸化が阻害されるが、同時にオートファジーの抑制が解除されオートファジーが誘導される。

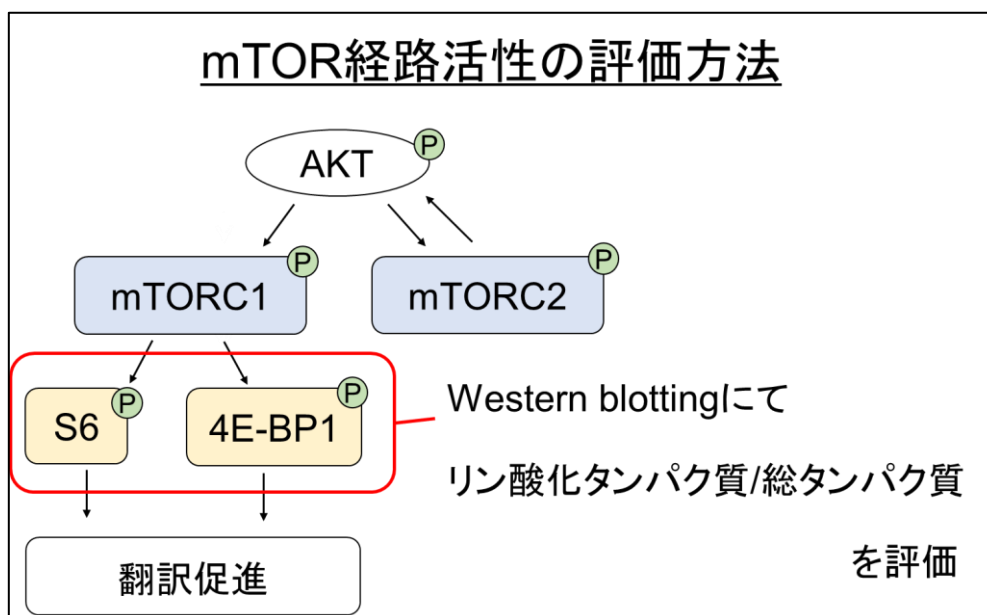


図 2. mTOR 経路活性の評価方法

mTOR には mTOR complex 1 (mTORC1) と mTOR complex 2 (mTORC2) があり、mTORC1 はこの経路の下流にリン酸化シグナルを伝達するが、mTORC2 は上流の AKT に作用する。このため、この経路の活性程度を反映するのは mTORC1 である。しかし、mTORC1 と mTORC2 の活性程度を個別に評価する方法はない。従って、mTORC1 の下流タンパク質のリン酸化アイソフォームの発現量を評価することが、mTOR 経路活性の一般的な評価方法である。

オートファジーは細胞が自己の細胞内成分を自己のリソソームで分解する機構であり、ストレス下における細胞の防御・修復機構である (図 3)。これにより、正常状態においては細胞内での異常なタンパクの蓄積を防止し、低栄養下ではアミノ酸の再利用を行う。癌細胞においては、放射線や化学療法から癌細胞を防御する機構として知られており、それら治療抵抗性の原因の一つであることが報告されている [29, 30]。また、mTORC1 はオートファジーを阻害する強力な因子であることが知られている。このため mTOR 阻害薬によりオートファジーが誘導され細胞が保護されるため、mTOR 阻害薬による十分な細胞障害性が発揮されないことが報告されている [27, 28]。

オートファジーの検出にはその過程で生成あるいは消費されるタンパク質を Western blotting で評価するのが一般的である (図 4)。まず、ストレスにより障害を受けた細胞内小器官は隔離膜により取り込まれ Autophagosome と呼ばれる小胞が形成されるが、隔離膜形成の際に細胞質内の light chain 3-type I (LC3-I) は隔離膜に結合し、light chain 3-type II (LC3-II) へと変換される。これらのタンパク質は電気泳動により分離可能であり、Western blotting により定量化した LC3-II/LC3-I 比はオートファジーの活性を反映するマーカーとして最も頻繁に用いられている [31]。また、ubiquitin-binding protein p62 (p62) タンパク質は損傷した細胞内小器官を凝集させ隔離膜に取り込まれ消化されるため、オートファジーの後期で消費されるタンパク質である。この p62 も Western blotting で検出可能であり、p62 発現量の減少はオートファジーの亢進

を反映する。さらに、アクリジンオレンジ染色を用いて Autophagosome を検出する方法も用いられている [32-34]。Autophagosome は細胞内の酸性オルガネラである。弱塩基性のアクリジンオレンジは生体膜を通過可能で、細胞内の酸性オルガネラに蓄積して赤色の蛍光を発する凝集体を形成するため、その蓄積量はフローサイトメトリーなどで解析することが可能である。

オートファジーを阻害する薬剤としてクロロキンがある。2019年4月現在、クロロキンはヒドロキシクロロキンとして全身性エリテマトーデスや皮膚エリテマトーデスに対し本邦において保険収載されている薬剤であり、免疫抑制剤として臨床で使用されている。一方、近年ではクロロキンの癌細胞に対する殺細胞効果が報告されている [35, 36]。クロロキンは Autophagosome 内に蓄積し、内部の pH を上昇させることで小胞内消化を阻害する作用があり、オートファジーを後期でブロックする。そのため、クロロキン投与下では p62 タンパク質は細胞内消化が阻害されるため増加するが、消化機構が阻害された Autophagosome が蓄積するため、LC3-II/LC3-I 比は上昇しアクリジンオレンジ染色によるオルガネラ蓄積量も増加することが知られている (図 4) [34, 37, 38]。

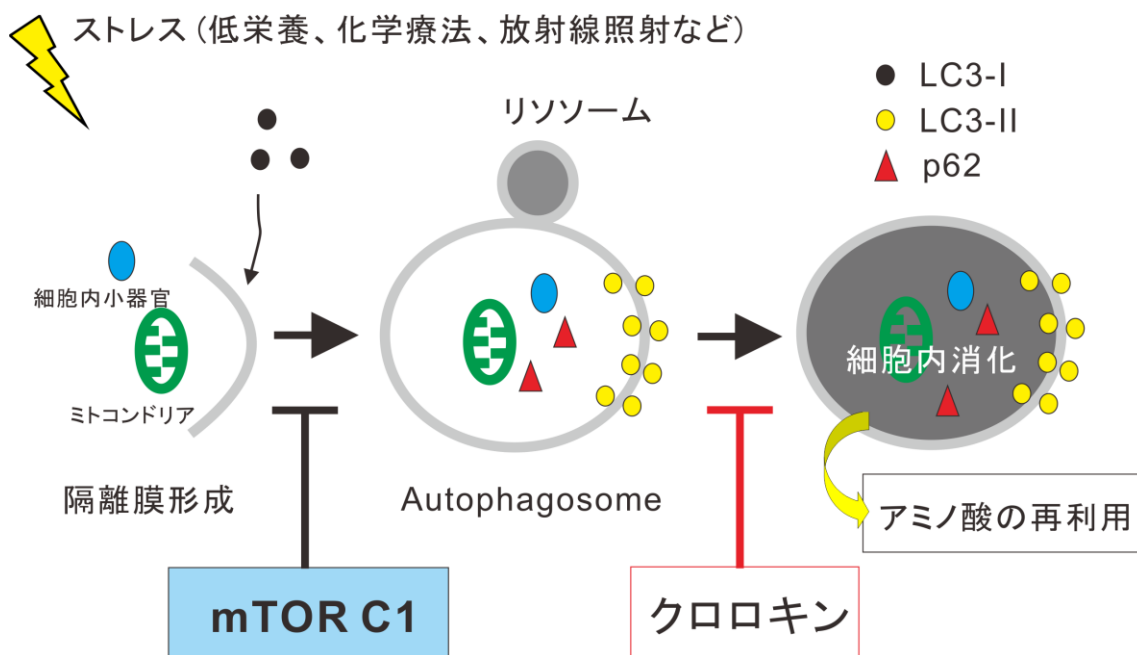


図 3. オートファジー

ストレスにより障害を受けたミトコンドリアなどの細胞内小器官は隔離膜により取り込まれ、Autophagosomeと呼ばれるオルガネラが形成される。Autophagosome にリソソームが融合し、内容物が消化される。隔離膜の形成の際に light chain 3-type I (LC3-I) は light chain 3-type II (LC3-II) へと変換され、細胞内消化の際に ubiquitin-binding protein p62 (p62) タンパク質は消費される。リン酸化 mTORC1 は隔離膜形成を阻害し、オートファジーを抑制する作用があり、mTORC1 の脱リン酸化によりオートファジーは亢進する。クロロキンは Autophagosome 内に蓄積し、内部の pH を上昇させることで細胞内消化を阻害する。

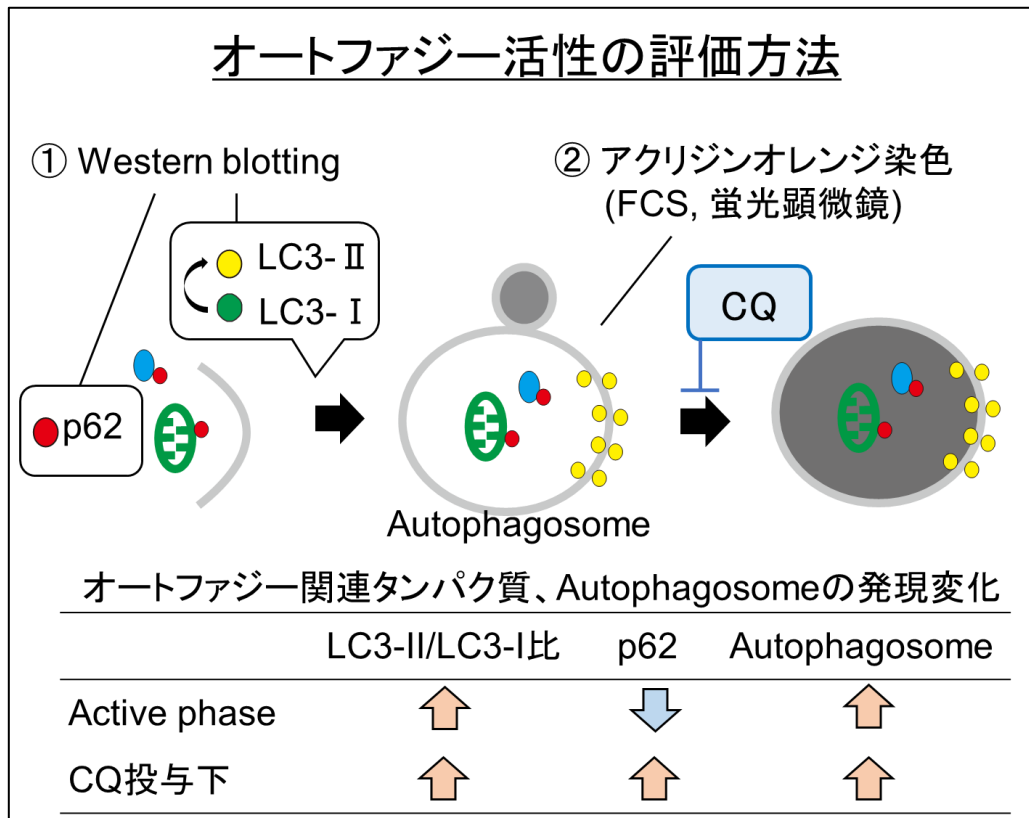


図 4. オートファジー活性の評価方法

オートファジー活性の評価には、関連するタンパク質の発現量を Western blotting で測定、あるいはアクリジンオレンジ染色で同定される酸性オルガネラの蓄積量をフローサイトメトリー (FCS) や蛍光顕微鏡で測定する方法が用いられる。オートファジーの活性化により、light chain 3-type I (LC3-I) は light chain 3-type II (LC3-II) へと変換され、Autophagosome は増加し、ubiquitin-binding protein p62 (p62) タンパク質は消費される。一方、クロロキン (CQ) 投与下では、p62 は細胞内消化が阻害されるため増加するが、消化機構が阻害された Autophagosome が蓄積するため、LC3-II/LC3-I 比は上昇しアクリジンオレンジ染色によるオルガネラ蓄積量も増加する。

過去の報告では、一部の癌細胞において mTOR 経路およびオートファジーが X 線照射により活性化されることが示されており、活性化したこれらの機構はいずれも放射線治療抵抗性に寄与すると考えられている [19, 20, 29, 30]。そこで、第一章では大腸癌細胞を用いて、X 線照射による mTOR 経路活性およびオートファジー活性の変化を評価し、mTOR 阻害薬であるテムシロリムスとオートファジー阻害薬であるクロロキンの併用療法による放射線治療の増強効果を *in vitro* の実験系で検討した。次いで第二章では、特に mTOR 経路に着目し、*in vitro* の実験系における X 線照射による mTOR 経路の活性変化が、臨床サンプルにおいても同様に認められるかどうか、術前 CRT を行った直腸癌の手術検体を用いて検討した。また、mTOR 経路は癌細胞の転移能に関与することが報告されているため [17, 39]、さらにこの章では放射線治療による mTOR 経路の活性変化と術後遠隔転移の関連性についても検討した。

第 1 章

大腸癌細胞におけるテムシロリムス/クロロキン併用療法の X 線増感効果

1-1 背景と目的

いくつかの癌細胞を用いた基礎研究において、X 線照射により mTOR 経路が活性化され、これが X 線照射に対する治療抵抗性として働くことが報告されている [19, 20]。しかし、直腸癌において mTOR 阻害薬であるラパマイシンを術前放射線療法と組み合わせた phase 1-2 臨床試験では、pCR 率 3%と放射線増感作用が認められなかった [40]。一方、mTOR 阻害薬による mTORC1 の阻害によりオートファジーが誘導され、これにより mTOR 阻害薬による細胞障害性が十分に発揮されないことが報告されている [27, 28]。これらの報告から、放射線照射に mTOR 阻害薬を併用した場合においても、オートファジーが誘導されることにより細胞障害性が減弱する可能性が考えられた。当研究室では、これまでに大腸癌細胞において mTOR 阻害薬であるテムシロリムと、オートファジー阻害薬であるクロロキンを併用することで抗腫瘍効果が増強することを報告した [41]。そこで本章では、両方の経路を阻害する薬剤を併用することで放射線感受性の増強が得られるかどうかを明らかにするために、研究を行った。

1-2 方法

細胞株と試薬

ヒト大腸癌細胞である SW480 細胞および HT29 細胞を Japanese Cancer Research Resource Bank より購入した。これらの細胞は、変異型 *TP53* を有し比較的放射線抵抗性を示す細胞株として知られる [42, 43]。また、SW480 細胞は *KRAS* (G12V) に、HT29 細胞は *BRAF* (V600E), *PIK3CA* (P449T) に変異を有するが、特に *KRAS* や *BRAF* は直腸癌の予後不良因子として臨床上問題となっている遺伝子異常である [44]。細胞は 5% 胎児ウシ血清添加 RPMI-1640 培養液 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) に 1% 抗菌剤/抗真菌剤 (100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 250 ng/ml amphotericin B; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を加えて 37 °C、5% 二酸化炭素、20% 酸素、75% 窒素濃度のインキュベーター内で培養し、実験に用いた。

mTOR 阻害薬であるテムシロリムス (temsirolimus: TEM)、オートファジー阻害薬であるクロロキン (chloroquine diphosphate: CQ)、RPMI-1640 培養液、アクリジンオレンジは Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) より、5%胎児ウシ血清と抗菌剤/抗真菌剤は Life Technologies (Grand Island, NY, USA) より購入した。MTS 試験薬は Promega Corporation (Madison, WI, USA) より、FITC 標識 Annexin V アポトーシスキットは BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) より購入した。ウエスタンブロットティングの 1 次抗体として、anti-phospho-S6 ribosomal protein 抗体 (p-S6; Ser235/236)、anti-

S6 ribosomal protein 抗体 (S6; 5G10)、anti-phospho-4E-BP1 抗体 (p-4E-BP1; Thr37/46) および anti-4E-BP1 抗体は Cell Signaling Technology (東京、日本) より、anti-microtubule-associated protein light chain 3 beta 抗体 (LC3B), anti-protein 62 抗体 (p62; sequestosome-1 (SQSTM1)), および anti- β -actin 抗体は Medical and Biological Laboratories (MBL; 名古屋、日本) より購入した。2次抗体の抗ウサギ IgG-Alkaline phosphatase 抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。

薬剤投与と X 線照射

テムシロリムスとクロロキンの投与濃度は、過去の報告を基にそれぞれ 80 nM、20 μ M とした [41]。X 線照射の前処置として、細胞を培養液のみ (コントロール群)、テムシロリムス添加培養液 (TEM 群)、クロロキン添加培養液 (CQ 群)、およびテムシロリムスとクロロキンを添加した培養液 (TEM + CQ 群) で1時間培養した後、X 線照射を行った。X-ray generator (Pantac HF350; Shimadzu、京都、日本) を用いて、200 kV-20 mA の電流、および銅 (0.5mm) とアルミニウム (1.0 mm) のフィルター設定下に、細胞に毎分 1.0 Gy の照射線量 (計 0, 2, 4, 6 Gy) で X 線照射を行い、続く実験に使用した。

コロニー形成能の評価—clonogenic assay

6-well flat-bottomed plate に 200, 400, 800, 1,200 cell/well の濃度で細胞を培養し、各群の薬剤で 1 時間培養した後、それぞれ 0, 2, 4, 6 Gy の X 線照射を行った。細胞を 24 時間培養した後、薬剤添加のない培養液に交換した。その後 48 時間毎に薬剤添加のない新鮮な培養液に交換し、計 14 日間培養した。評価日に、70% エタノールで細胞固定し、0.5% クリスタルバイオレットで染色した後、コロニー数を計測した。各薬剤治療群において、生存率を次のように求めた;

$$\text{生存率} = \text{各線量 X 線照射後のコロニー数} / \text{X 線非照射のコロニー数}$$

細胞増殖アッセイ—MTS assay

96-well flat-bottomed plat に、 5×10^3 cells/well ずつ細胞を分配し、各群の薬剤で 1 時間培養した後、X 線照射 (0 or 4 Gy) を行った。72 時間培養した後に MTS 試験薬を加え、3 時間インキュベーター内で培養した後、plate reader (InterMed, 東京、日本) にて 490 nm のフィルターを用いて測定した。

mTOR 関連タンパク、オートファジー関連タンパクの発現量評価—Western blotting

mTOR 関連タンパク (p-S6, S6, p-4E-BP1, 4E-BP1)、およびオートファジー関連タンパク (LC3B, p62) の発現量は Western blotting により解析した。各薬剤処理

群の細胞に X 線を照射 (0 or 4 Gy) し、24 時間培養した。評価日に protease inhibitor (Roche, Basel, Germany) と Phosphatase inhibitor (Roche) を添加した Bolt LDS sample buffer (Life Technologies) を用いて細胞を溶解し、抽出液とした。抽出液の濃度は Qubit protein assay kit (Life Technologies) を用いて測定し、検体ごとに 40 µg のタンパク質サンプルとした。各サンプルを 70°C, 10 分で熱変性させた後、SDS-PAGE を用いて 4–12% Bis-Tris Gel (Life Technologies) に分離し、Bolt system (Life Technologies) を用いて 20 V、60 分間で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (pore size 0.2 µm) に転写した。次に、その膜を iBind solution (Life Technologies) を用いて 5 分間、室温でブロッキングした後、iBind Western System (Life Technologies) の中で 1 次抗体と反応させ、iBind solution で洗浄した。その後、2 次抗体と反応させ、iBind solution、Tris Buffered Saline (TBS) で 2 回洗浄した後、CDP-star solution (Life Technologies) で 5 分間反応させ、ChemiDoc XRS system (BIO RAD, 東京、日本) を用いてバンドの化学発光を検出した。各バンドの検出強度は Image J software (version 1. 4. 3) を用いて定量化し、p-S6、p-4E-BP1 の発現量をそれぞれ S6、4E-BP1 の発現量で標準化し算出した。

酸性オルガネラ (Autophagosome) の検出—アクリジンオレンジ染色

各細胞に前述の薬剤処理を行い、X 線照射 48 時間後に細胞を回収し、アク

リジンオレンジ (5 µg/ml) を用いて室温で 15 分間染色した。その後、Ca²⁺/Mg²⁺-free phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し、細胞の赤色蛍光強度を BD FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) にて測定した。また、同様に染色した細胞を、BZ-8100 蛍光顕微鏡 (Keyence、東京、日本) を用いて 400 倍で観察し、蛍光強度を評価した。

アポトーシス、死細胞の測定

アポトーシスの評価は Annexin V/Propidium Iodide (PI) の 2 重染色を用いて、また、Caspase 3/7 の活性度は Cell Event Caspase 3/7 green detection reagent (Life Technologies) を用いて、さらに死細胞の評価はトリパンブルーによる染色を用いて評価した。細胞に前述のように薬剤添加と X 線照射 (0 or 4 Gy) を行い、48 時間培養した後回収しこれをサンプルとした。各サンプルを FITC 標識 Annexin V/PI (Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit, BD, San Jose, CA, USA) を用いて染色し、フローサイトメトリーにて解析した。この方法では Annexin V 陽性/PI 陰性の早期アポトーシス細胞と Annexin V 陽性/PI 陽性の晚期アポトーシス細胞が区別されるが、当研究ではそれらを合わせてアポトーシス細胞と判定し、全体におけるアポトーシス細胞の割合を算出した。また、Caspase 3/7 の活性度を定量化するため、Cell Event Caspase 3/7 green detection reagent を用いた。この試薬は核酸結合性の染料が接合したタンパク質を成

分とし、活性化した caspase 3/7 により分解されて染料が自由に核酸に結合し、蛍光標識される仕組みである。本研究では蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。さらに、トリパンブルーにて染色し死細胞（アポトーシス細胞 + ネクローシス細胞）の割合を測定した。

統計学的解析

全ての実験系は3回以上検討を行った。統計学的有意差の検定において、2群間比較には Student *t* 検定を行い、多群間比較には one-way ANOVA を行った後 Tukey post-test を用いて有意差のある群間を検出した。さらに、照射 X 線線量と各投与薬剤の相互効果を two-way ANOVA を用いて解析した。全ての解析は、JMP Pro 14.0 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いて行なわれ、p 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。

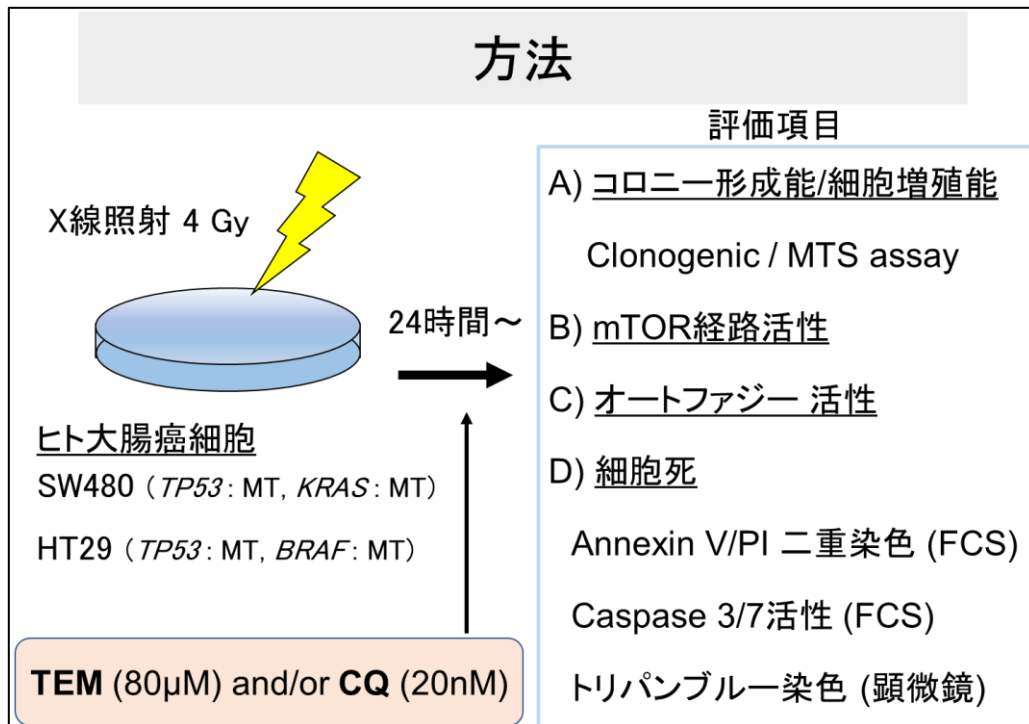


図 5. 実験方法の概略

MT, mutation-type; TEM, temsirolimus; CQ, chloroquine; FCS, flow cytometry standard.

1-3 結果

大腸癌細胞における X 線照射による mTOR 経路およびオートファジーの活性変化

まず、ヒト大腸癌細胞である SW480 細胞と HT29 細胞に 4 Gy の X 線照射を行い、24 時間後の mTOR 関連タンパク質、およびオートファジー関連タンパク質の発現量を Western blotting を用いて評価した (図 6)。いずれの細胞においても、X 線照射により mTOR の下流に存在する S6 および 4E-BP1 のリン酸化アイソフォームの割合が上昇したため、X 線照射により mTOR 経路が活性化したことが示された。また、いずれの細胞においても、X 線照射によりオートファジー活性を反映する LC3-II/LC3-I 比は上昇し、オートファジーの過程で消費される p62 は減少したため、X 線照射によりオートファジーが誘導されたことが示された。

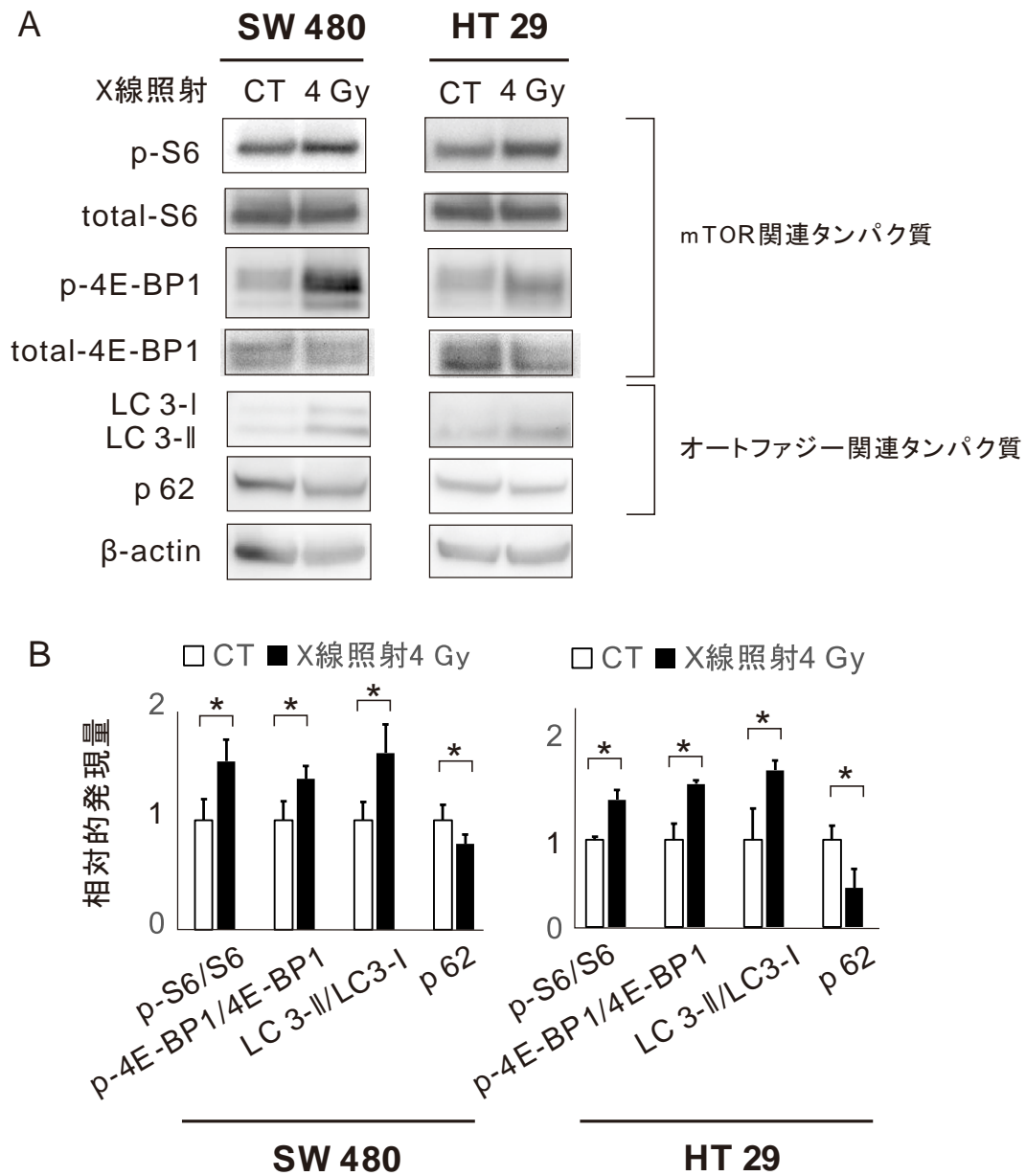


図 6. 大腸癌細胞における X 線照射による mTOR 関連タンパク質およびオートファジー関連タンパク質の発現変化。

大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) に 4 Gy の X 線照射を行い、24 時間後の各蛋白の発現量を Western blotting を用いて評価した (A)。グラフは各バンドの濃さを定量化し、平均値 \pm 標準偏差として示した (B)。

*, $p < 0.05$; CT, control.

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

また、X線照射後のmTOR経路およびオートファジーの活性変化を経時的に評価した(図7)。いずれの細胞においても、mTOR活性を反映するリン酸化S6の発現量はX線照射後速やかに増加し、照射後48時間では減少し始めていた。一方、オートファジーの誘導を反映するLC3-II/LC3-I比はX線照射後に緩徐に増加し、照射後48時間においてもその高値は継続されていた。

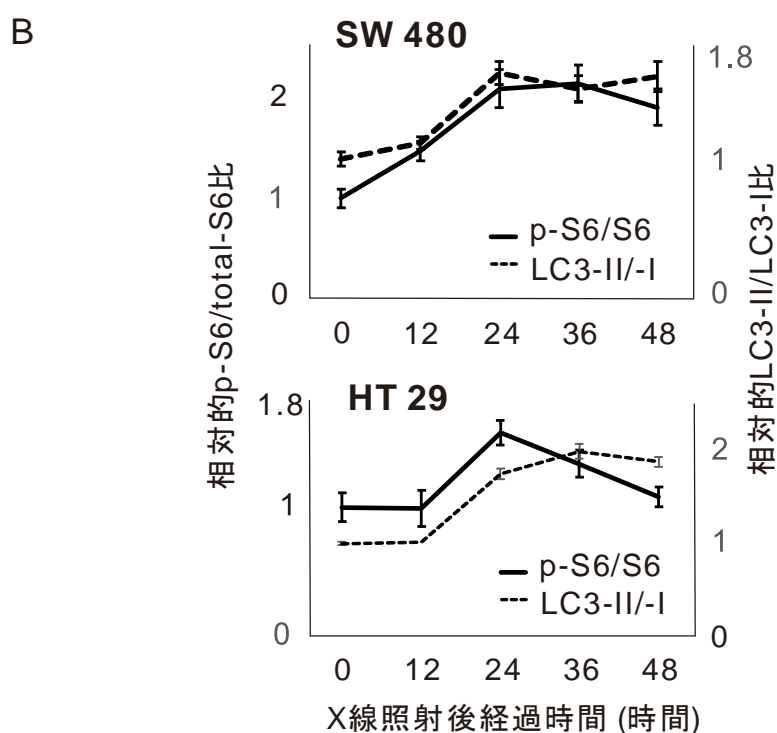
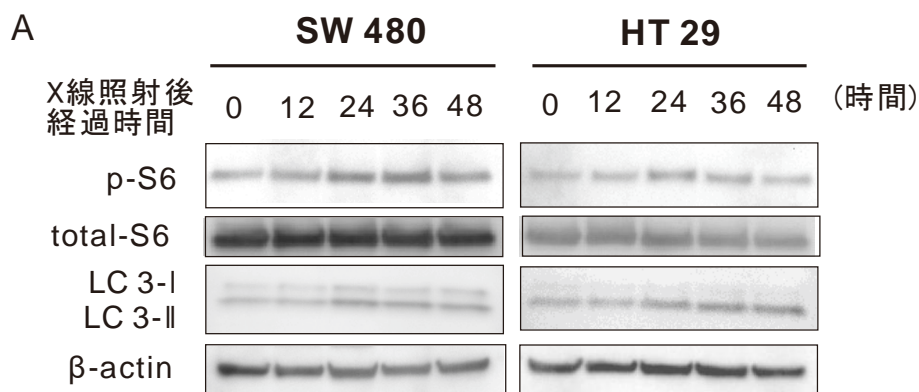


図 7. X 線照射後の mTOR 関連タンパク質およびオートファジー関連タンパク質の経時的発現変化。

大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) に 4 Gy の X 線照射を行い、0、12、24、36、48 時間後の各タンパク質の発現量を Western blotting を用いて評価した (A)。グラフは各バンドの濃さを定量化し、平均値 \pm 標準偏差として示した (B)。

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

さらに、細胞をアクリジンオレンジで染色し、その染色性を蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーで解析することで Autophagosome の蓄積量を評価した (図 8)。蛍光顕微鏡による観察では、いずれの細胞でも、赤色の蛍光を発する酸性オルガネラ (Autophagosome) が時間依存性に蓄積していくのが認められた。また、その赤色蛍光強度をフローサイトメトリーで定量化したところ、いずれの細胞においても X 線照射後 48 時間までの間に有意に酸性オルガネラが増加していた。

以上より、大腸癌細胞 SW480 および HT29 細胞において、X 線照射により mTOR 経路が活性化され、同時にオートファジーも活性化されることが示された (図 9)。そして、活性化されたこれらの機構は、大腸癌細胞に対する X 線治療効果を減弱させる要因となっている可能性が考えられたため、mTOR 阻害薬、オートファジー阻害薬、および両者を併用することで X 線治療効果が増強されるか検討を行うこととした。

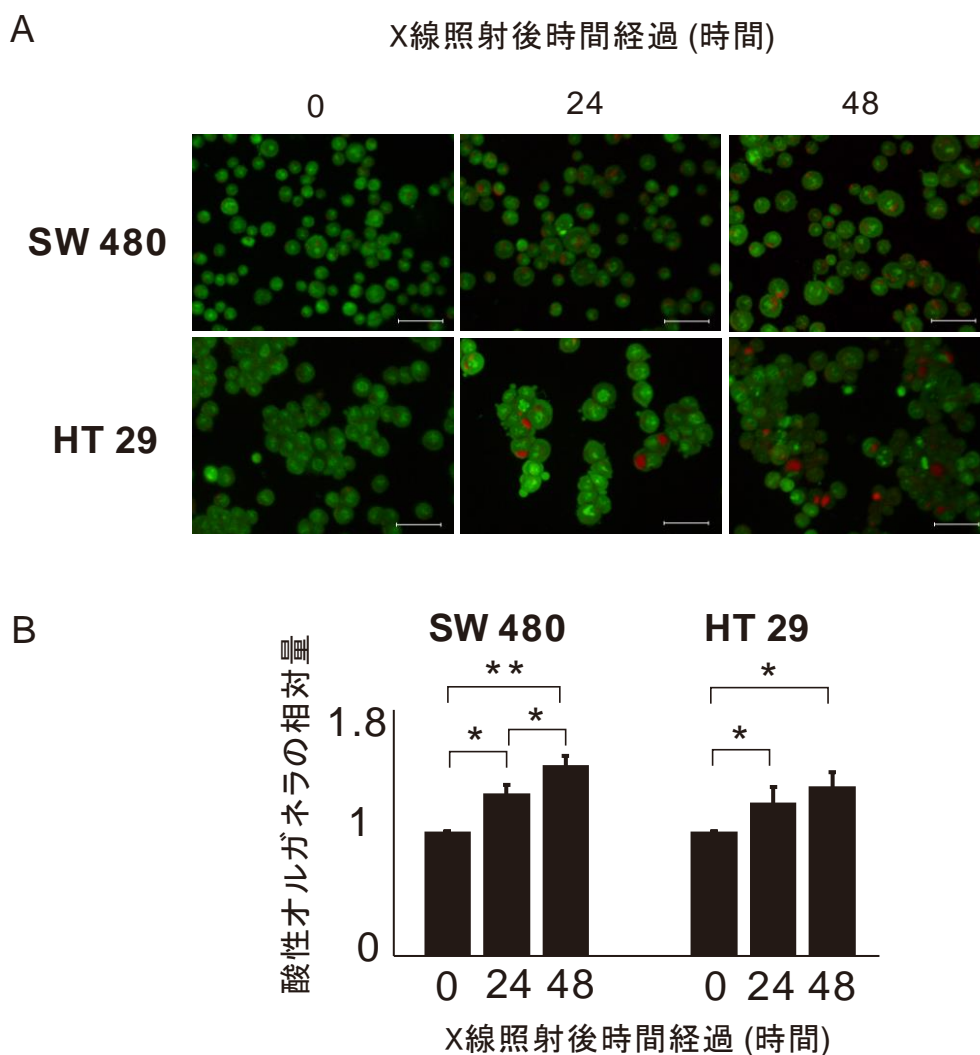


図 8. 大腸癌細胞における X 線照射後の酸性オルガネラの蓄積量の変化。
大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) に 4 Gy の X 線照射を行い、24 時間後、48 時間後にアクリジンオレンジで染色された酸性オルガネラの蓄積量を蛍光顕微鏡で評価した (A: スケールバー, 100 μ m)。また、アクリジンオレンジで染色した細胞の赤色蛍光強度をフローサイトメトリーで評価した (B)。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

小括 1-1

大腸癌細胞 (SW480, HT29) において、X線照射後
mTOR経路は活性化し、オートファジーは亢進した

図 9. 小括 1-1

テムシロリムスとクロロキンの併用療法による X 線治療効果の増強

大腸癌細胞 SW480 細胞と HT29 細胞を、それぞれ薬剤添加なし群 (No drug 群)、mTOR 阻害薬添加群 (TEM 群)、オートファジー阻害薬添加群 (CQ 群) および mTOR 阻害薬とオートファジー阻害薬の併用群 (TEM + CQ 群) に分け、0、2、4、6 Gy の X 線照射後のコロニー形成能を評価した (図 10)。測定結果より、各治療群における X 線照射後の生存率を算出し、two-way ANOVA により生存率に対する各薬剤と X 線線量との相互作用を解析した。いずれの細胞においても、テムシロリムス単剤およびクロロキン単剤は X 線照射との間に有意な相互効果は認められなかった。しかし、テムシロリムスとクロロキンの併用処理は、SW480 細胞においては 2 Gy、4 Gy、6 Gy の X 線線量との間に、HT29 細胞では 4 Gy、6 Gy の X 線線量との間に、生存率に対する有意な相互効果が認められた (各 $p < 0.01$)。

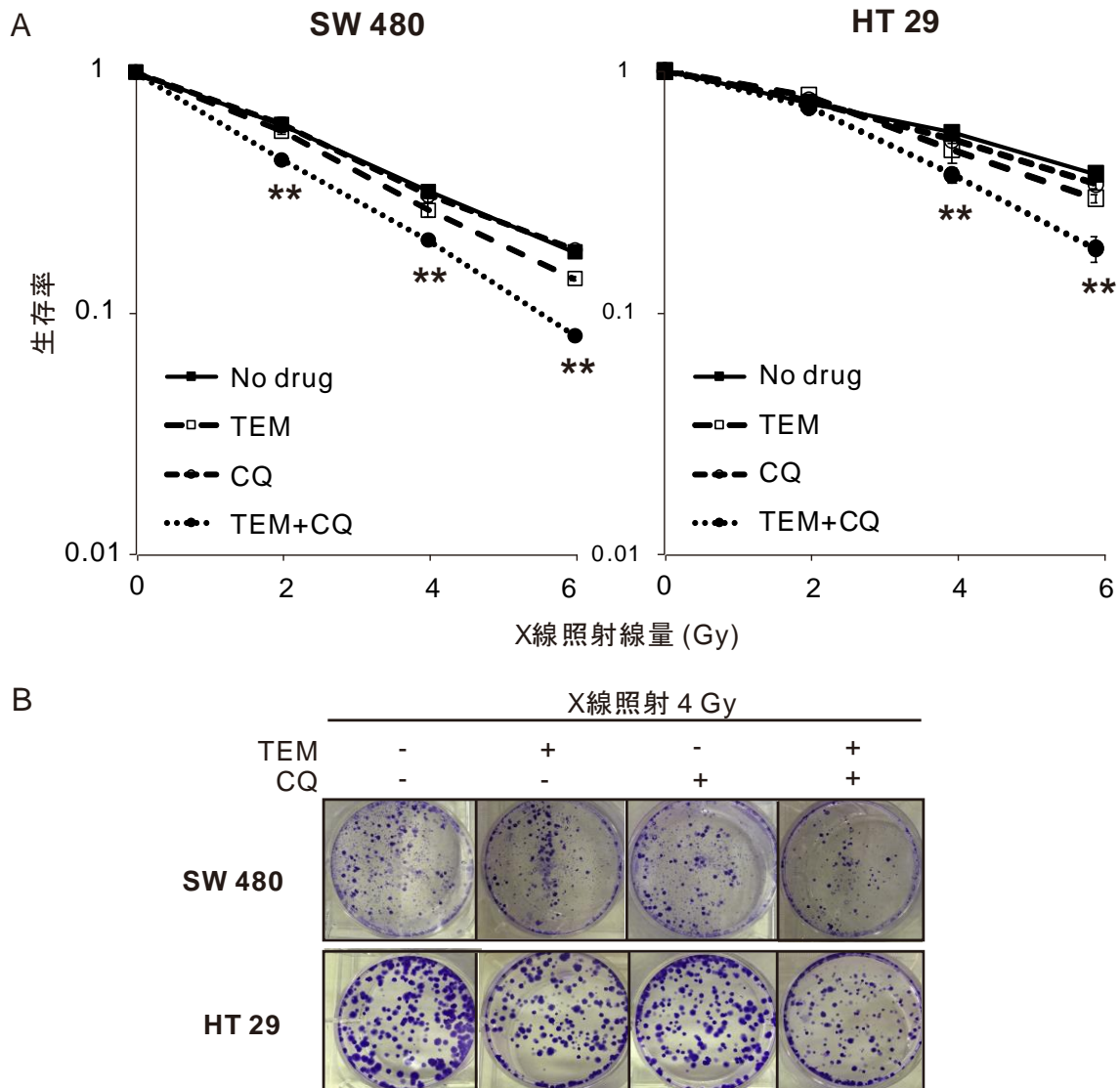


図 10. mTOR 阻害薬 (temsirolimus, TEM) とオートファジー阻害薬 (chloroquine, CQ) の併用処理による細胞生存率に対する X 線照射効果の増強。

大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) を各薬剤で処理した 4 群 (No drug 群、TEM 群、CQ 群、TEM + CQ 群) に分け、0、2、4、6 Gy の X 線照射後 14 日間培養した。各群のコロニー数を測定し、生存率を算出し、各群の生存率を平均値 ± 標準偏差で示した (A)。B は 4 Gy の X 線照射後の各群におけるコロニー形成結果の代表例を示した。

**、各線量の X 線照射と各薬剤処理との間における生存率に対する相乗効果の有意性 ($p < 0.01$: two-way ANOVA)

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

また、X線照射下におけるテムシロリムスとクロロキンの併用処理の細胞増殖能に与える影響を、MTS アッセイを用いて検討した (図 11)。4 Gy の X 線照射後の大腸癌細胞において、テムシロリムスとクロロキンの併用処理はテムシロリムス単剤およびクロロキン単剤の処理にくらべ有意に増殖能を低下させた。

以上より、大腸癌に対する X 線治療において、テムシロリムスとクロロキンの併用処理は、テムシロリムス単剤およびクロロキン単剤の処理にくらべてより強力な生存率の低下効果、増殖能の抑制効果を示すこと確認された。私は、テムシロリムスとクロロキンの併用処理のこのような効果は mTOR 経路とオートファジーの共阻害に起因しているのではないかと考え、各群における mTOR 経路活性、オートファジー活性を検討することとした。

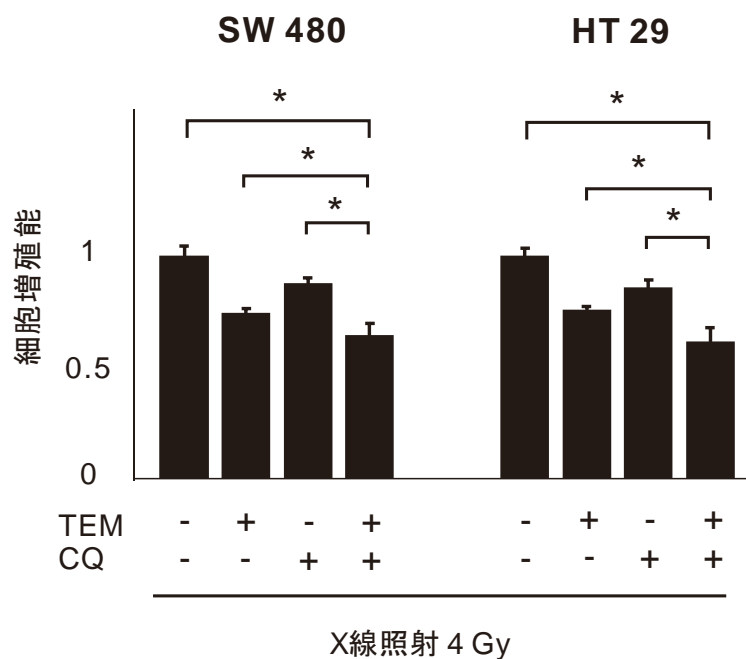


図 11. 大腸癌 X 線照射における、mTOR 阻害薬 (temsirolimus, TEM) とオートファジー阻害薬 (chloroquine, CQ) の併用処理による細胞増殖能に対する効果。大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) を各薬剤で処理した 4 群 (No drug 群、TEM 群、CQ 群、TEM + CQ 群) に分け、4 Gy の X 線照射を行い、72 時間後に MTS アッセイを行った。各群の増殖能の値は No drug 群の値により標準化され、平均値 ± 標準偏差として示す。

*; p < 0.05

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

テムシロリムスとクロロキンの併用療法による mTOR 経路およびオートファジーの抑制

各薬剤処理群の細胞に 4 Gy の X 線照射を行った後 24 時間培養した細胞を用いて Western blotting を行い、mTOR 経路関連タンパク質およびオートファジー関連タンパク質の発現量を評価した。まず、mTOR 関連タンパク質の発現変化を図 12 に示す。SW480 細胞および HT29 細胞のいずれにおいても、X 線照射により S6 および 4E-BP1 のリン酸化アイソフォームの割合が上昇したが、それらの反応はテムシロリムス処理により抑制された。このことから、X 線照射により活性化された mTOR 経路は、テムシロリムスにより抑制されたことが確認された。一方、クロロキンで処理した場合、各リン酸化タンパク質の発現量は変わらず、クロロキンによる処理は mTOR 経路活性に影響を与えないことが示唆された。そして、テムシロリムスとクロロキンの併用処理は、テムシロリムス単剤で処理した場合と同様に mTOR 経路活性を抑制した。

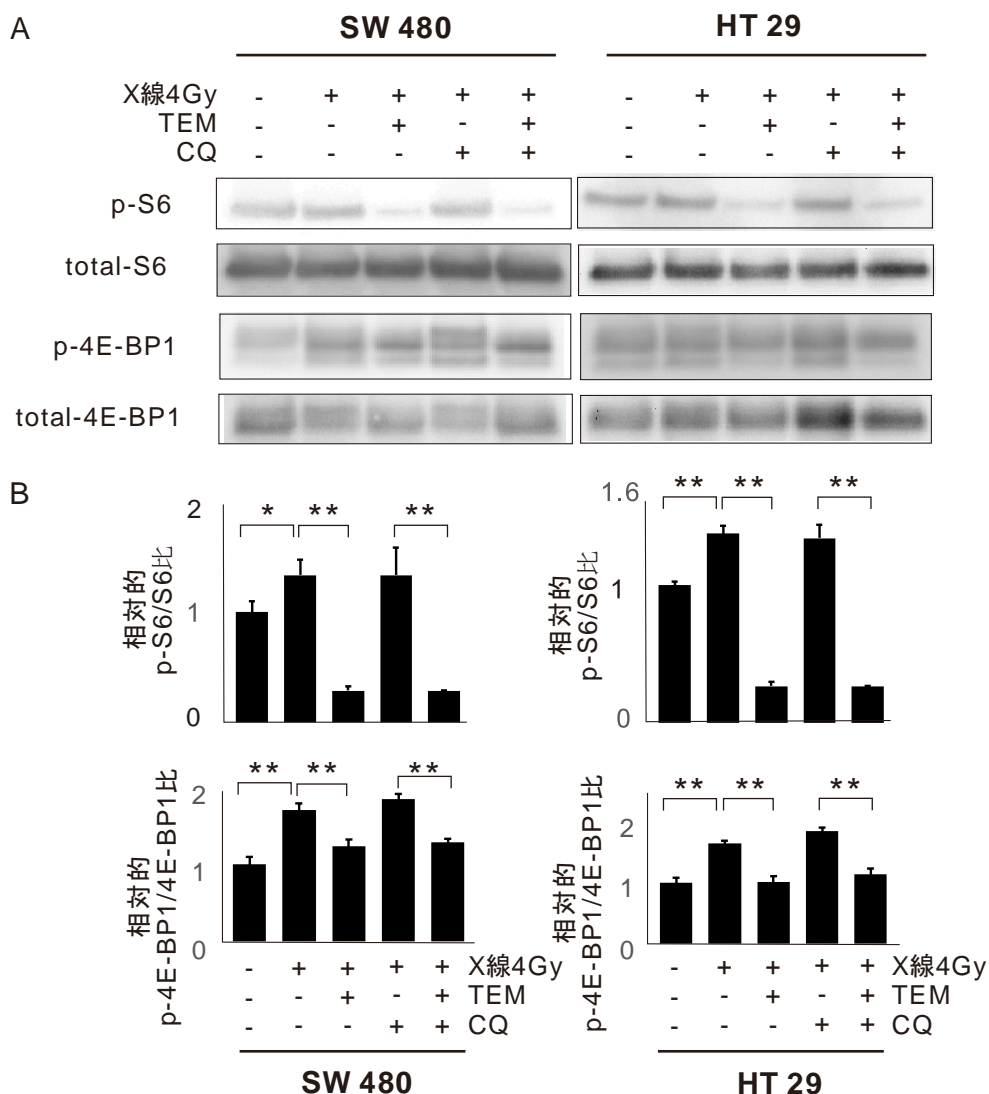


図 12. 大腸癌 X 線照射における mTOR 阻害薬 (temsirolimus, TEM) とオートファジー阻害薬 (chloroquine, CQ) の併用処理による mTOR 経路関連タンパク質の発現変化。

大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) を各薬剤で処理した 4 群 (No drug 群、TEM 群、CQ 群、TEM + CQ 群) に分け、4 Gy の X 線照射を行い 24 時間後に mTOR 関連タンパク質に対する Western blotting を行った (A)。各バンドの濃さを定量化し、リン酸化タンパク質は非リン酸化タンパク質で標準化し、平均値 ± 標準偏差として示した (B)。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

次いで、オートファジー関連タンパク質の発現変化を示す (図 13)。SW480 細胞および HT29 細胞のいずれにおいても、X 線照射により LC3-II/LC3-I 比は上昇し p62 の発現量は低下したため、X 線照射によりオートファジーが亢進した。そして、テムシロリムスで処理することでさらに LC3-II/LC3-I 比の上昇および p62 の発現低下が認められたため、テムシロリムスによりオートファジーがさらに亢進したことが確認された。一方、クロロキンで処理した場合、LC3-II/LC3-I 比は上昇したが、オートファジーの過程で消費される p62 の発現も増加したため、クロロキンによりオートファジー機構が後期相で停止されたことが示された。そして、テムシロリムスとクロロキンの併用処理は LC3-II/LC3-I 比および p62 発現量を最も増加させた。

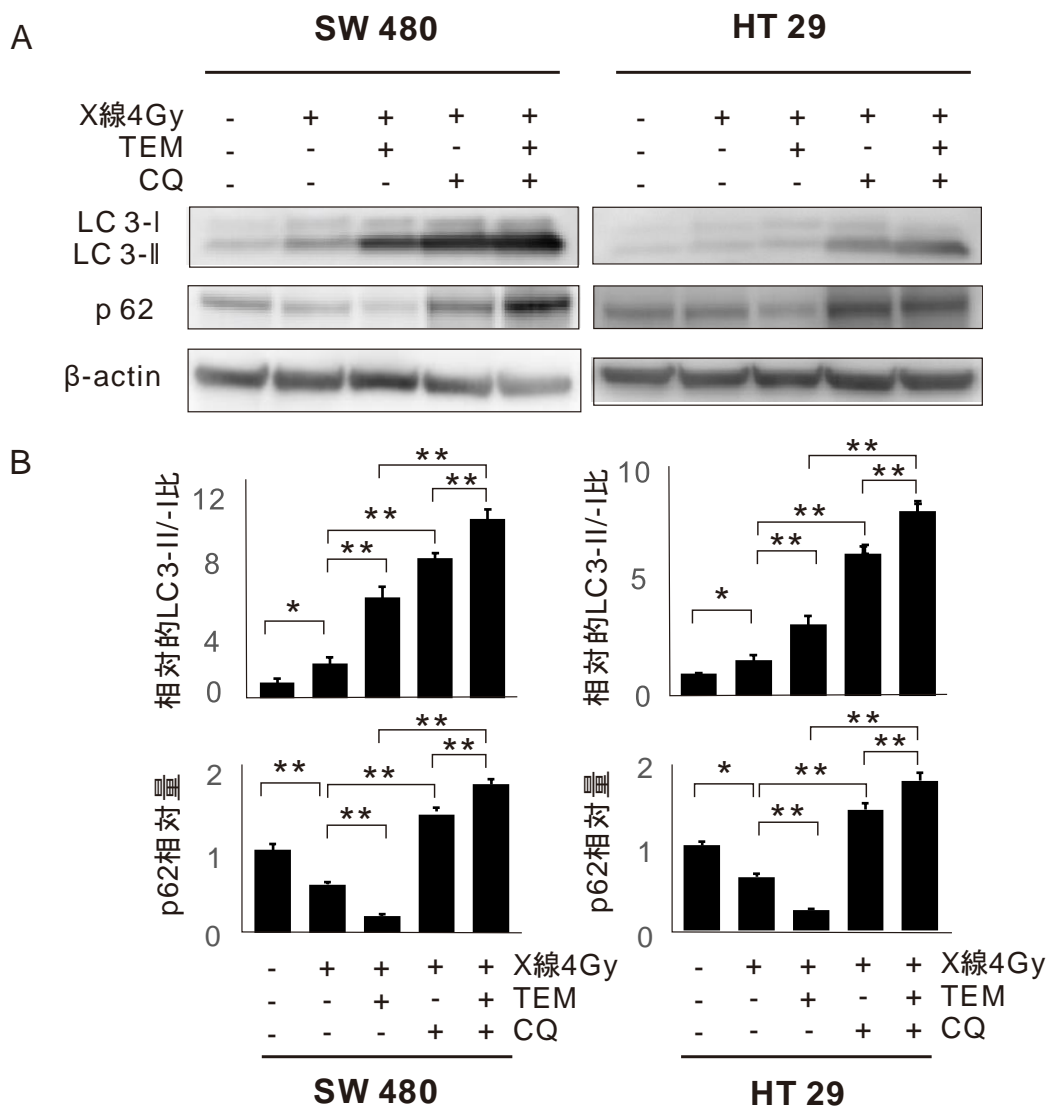


図 13. 大腸癌 X 線照射における mTOR 阻害薬 (temsirolimus, TEM) とオートファジー阻害薬 (chloroquine, CQ) の併用処理によるオートファジー関連タンパク質の発現変化。

大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) を各薬剤で処理した 4 群 (No drug 群、TEM 群、CQ 群、TEM + CQ 群) に分け、4 Gy の X 線照射を行い 24 時間後にオートファジー関連タンパク質に対する Western blotting を行った (A)。グラフは各バンドの濃さを定量化し、平均値 ± 標準偏差で示した (B)。

* , p < 0.05; ** , p < 0.01

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

さらに、各群における Autophagosome の蓄積量をアクリジンオレンジ染色の染色性で評価した (図 14)。X 線照射により、酸性オルガネラの蓄積を示す赤色蛍光強度は増加し、テムシロリムス処理によりさらにその赤色蛍光強度が増強したが、これはテムシロリムスによるオートファジーの亢進を反映しているものと考えられた。そして、クロロキンで処理した場合も同様に赤色蛍光強度を増強させたが、これは Western blotting の検討でクロロキンがオートファジーを後期相で阻害した結果に矛盾がない所見であった。そして、テムシロリムスとクロロキン併用群では最も強い蛍光強度を示したが、これはテムシロリムスによるオートファジーの誘導と、クロロキンによるオートファジー後期相での阻害を反映しているものと考えられた。

ここで、mTOR 経路とオートファジーの共阻害はどのような機序で X 線による増殖能抑制効果を増強させたのか、各群に対し死細胞の割合を解析することとした。

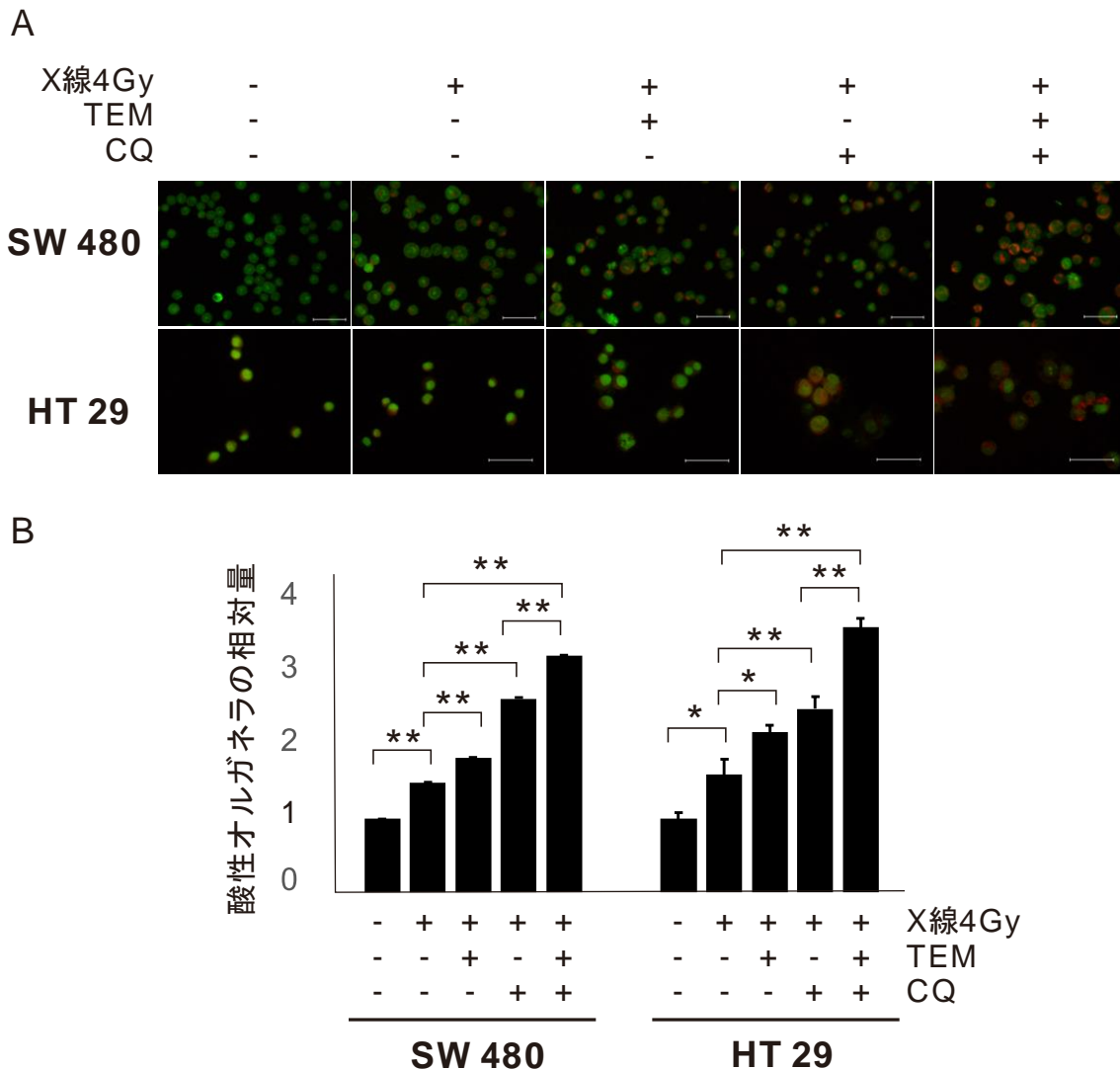


図 14. 大腸癌 X 線照射における mTOR 阻害薬 (temsirolimus, TEM) とオートファジー阻害薬 (chloroquine, CQ) の併用処理後の酸性オルガネラ蓄積量の変化。大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) を各薬剤で処理した 4 群 (No drug 群、TEM 群、CQ 群、TEM + CQ 群) に分け、4 Gy の X 線照射を行い 48 時間後にアクリジンオレンジで染色し酸性オルガネラの蓄積量を蛍光顕微鏡で評価した (A: スケールバー, 100 μ m)。また、アクリジンオレンジで染色した細胞の赤色蛍光強度をフローサイトメトリーで評価した (B)。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

TEMとCQの併用療法によるアポトーシスの誘導

各群の細胞に4 GyのX線照射を行った後48時間培養した細胞を用いて、Annexin V/PIの2重染色を行いフローサイトメトリーによりアポトーシス細胞の割合を評価した(図15)。薬剤非処理のSW480細胞におけるAnnexin V陽性を呈するアポトーシス細胞の割合は、X線非照射群、X線照射群それぞれ3.1%、5.1%であり、SW480細胞においてはX線照射により軽微なアポトーシスが誘導されることが確認された。また、テムシロリムス(TEM)およびクロロキン(CQ)処理後にX線照射を行ったSW480細胞のアポトーシス細胞割合はそれぞれ6.6%、7.4%であり、各薬剤を添加したことによる有意なアポトーシス率の上昇は認めなかった。しかし、テムシロリムスとクロロキンの併用処理にX線照射を行った細胞のアポトーシス細胞割合は14.3%であり、X線照射単独群、TEM+X線照射群、およびCQ+X線照射群のアポトーシス率に比べ有意に高値であった。また、HT29細胞におけるアポトーシス細胞割合は、コントロール群で1.6%、X線照射単独群で6.0%、TEM+X線照射群で6.3%、CQ+X線照射群で9.4%、およびTEM+CQ+X線照射群で17.0%であり、SW480細胞と同様にテムシロリムスとクロロキンの併用処理によりX線照射により誘導されるアポトーシス細胞の有意な増加が認められた。

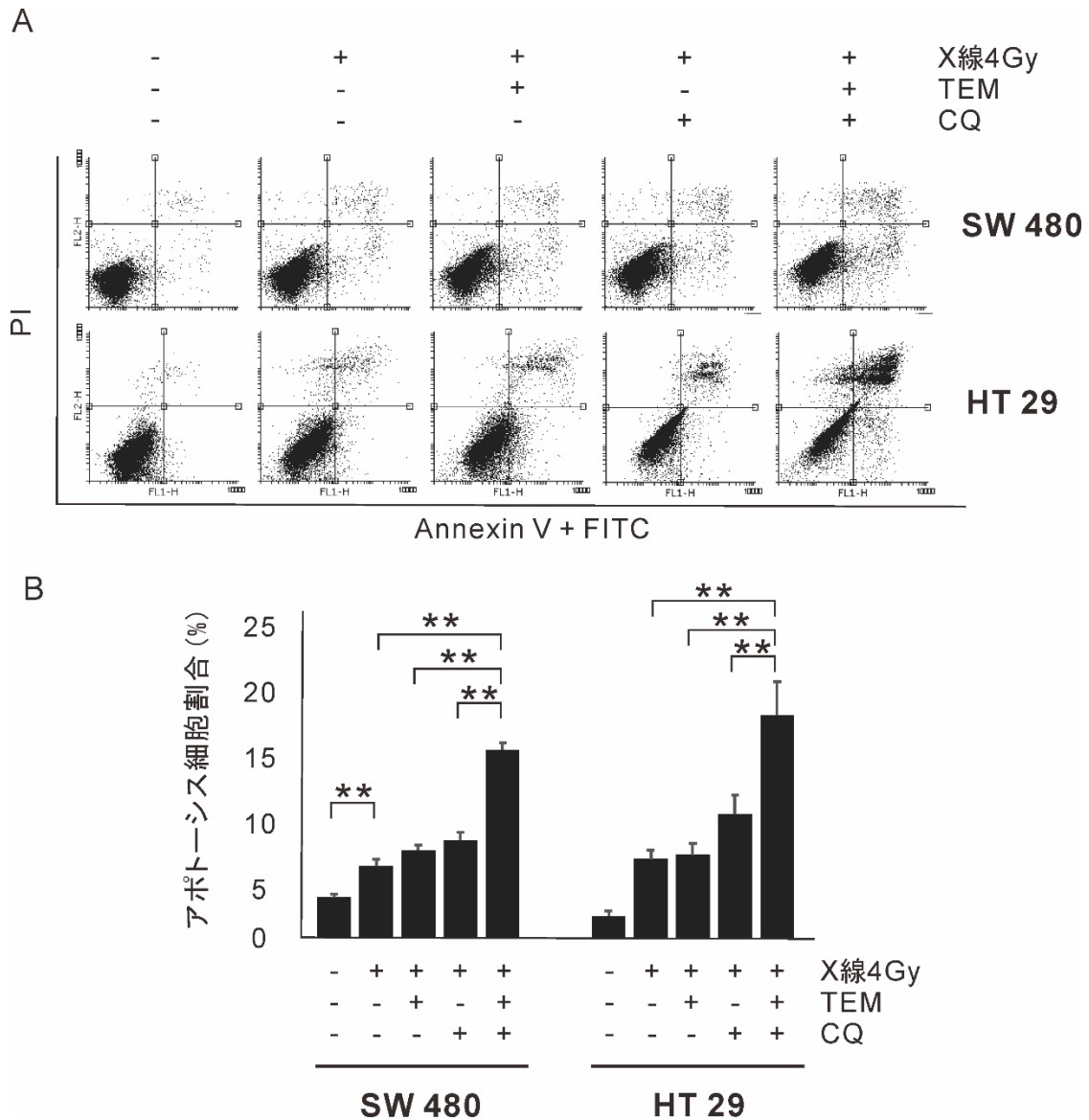


図 15. 大腸癌 X 線照射における mTOR 阻害薬 (temsirolimus, TEM) とオートファジー阻害薬 (chloroquine, CQ) の併用処理によるアポトーシス細胞割合の変化。大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) を各薬剤で処理した 4 群 (No drug 群、TEM 群、CQ 群、TEM + CQ 群) に分け、4 Gy の X 線照射を行い、48 時間後に Annexin V/Propidium Iodide (PI) の 2 重染色を行いフローサイトメトリーで評価した (A)。Annexin V 陽性の細胞をアポトーシス細胞とし、その割合を平均値 ± 標準偏差で示した (B)。

** $p < 0.01$

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

さらに、テムシロリムスとクロロキンの併用による X 線照射誘導性アポトーシスの増強効果を確認するため、caspase3/7 活性の評価、およびトリパンプルー染色による死細胞割合の評価を行った。SW480 細胞における各群の caspase 3/7 活性化細胞の割合は、コントロールで 3.5%、X 線照射単独群 で 7.0%、TEM+X 線照射群で 9.3%、CQ+X 線照射群で 11.0%、および TEM+CQ+X 線照射群で 15.5%であり、TEM+CQ+X 線照射群は他群に比べ有意に caspase 3/7 活性化細胞の割合が多かった (図 16A)。同様に、SW480 細胞におけるトリパンプルー染色による死細胞の割合は、コントロールで 1.1%、X 線照射単独群 で 2.5%、TEM+X 線照射群で 2.9%、CQ+X 線照射群で 3.3%、および TEM+CQ+X 線照射群で 5.2%であり、TEM+CQ+X 線照射群は他群に比べ有意に死細胞の割合が多かった (図 16B)。これらの結果は HT29 細胞においても同様の結果であった。

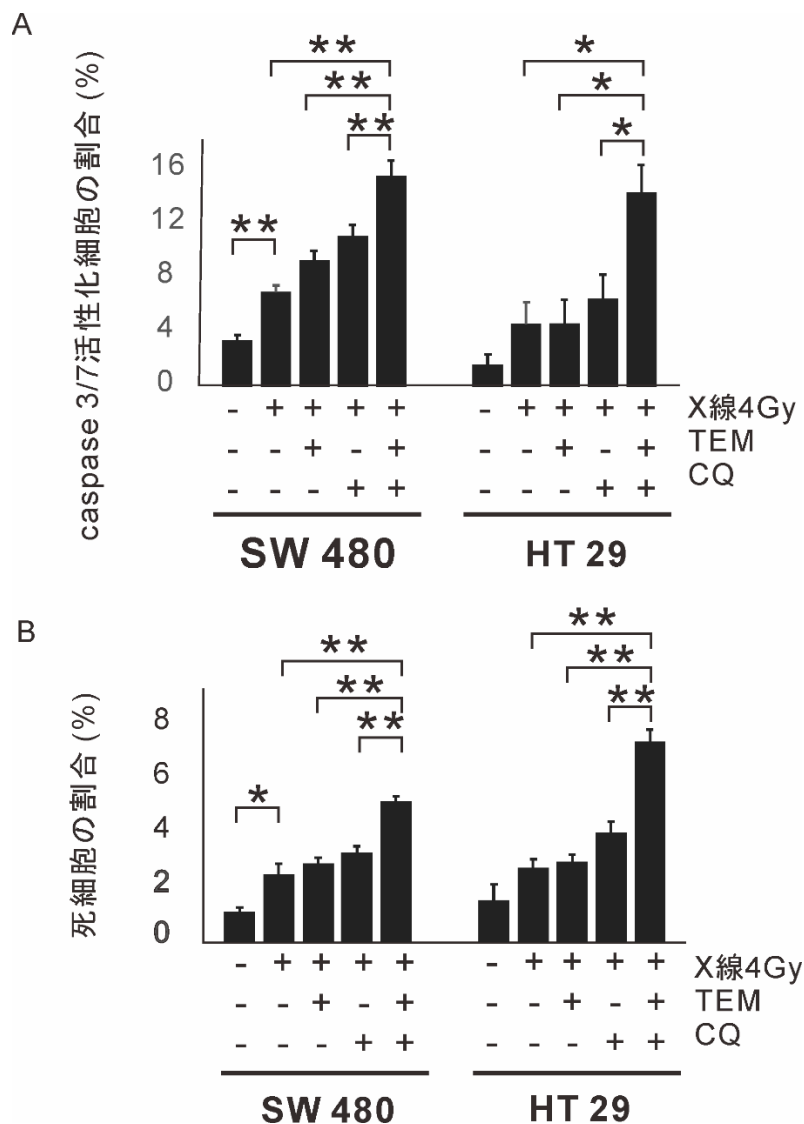


図 16. 大腸癌 X 線照射における mTOR 阻害薬 (temsirolimus, TEM) とオートファジー阻害薬 (chloroquine, CQ) の併用処理による caspase 3/7 活性化細胞率および死細胞率の変化。

大腸癌細胞 (SW480 細胞、HT29 細胞) を各薬剤で処理した 4 群 (No drug 群、TEM 群、CQ 群、TEM + CQ 群) に分け、4 Gy の X 線照射を行い、48 時間後に cleaved-caspase 3/7 detection kit を用いて caspase 3/7 活性化細胞の割合 (A) およびトリパンブルー染色により死細胞の割合 (B) を評価した。各割合は平均値 ± 標準偏差で示した。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

Oncology Reports. 2019 (DOI: 10.3892/or.2019.7134) より引用

小括 1-2

大腸癌細胞 (SW480, HT29) において
TEM / CQ 併用療法はアポトーシスを誘導し
X線治療効果を増強させた

図 17. 小括 1-2

TEM, temsirolimus; CQ, chloroquine

1-4 考察

癌細胞における mTOR 経路の活性化により、腫瘍の増殖、血管新生、アポトーシスの抑制が誘導されることが知られている [17]。当研究では、大腸癌細胞において X 線照射後に 24-36 時間後をピークとする S6, 4E-BP1 のリン酸化を認め、X 線照射により mTOR 経路が活性化されることを示した。過去の報告では、子宮体癌 [45]、乳癌 [19]、HUVEC [18]において、X 線照射による mTOR 経路の活性化が示されているが、大腸癌における報告はこれまでにない。乳癌細胞株を用いた過去の報告では、mTOR 阻害薬により X 線による DNA double strand breaks (DSBs) の修復が阻害されることが示されており [20]、X 線により活性化された mTOR 経路は X 線照射に対する治療抵抗性として働くと考えられている。また、当研究では、X 線照射後 36 時間以降に p62 の減衰、LC3-IIの発現亢進および酸性オルガネラの増加が認められたため、大腸癌細胞において X 線照射によりオートファジーが誘導されることが示された。過去にも大腸癌を含む多くの癌細胞において X 線照射によりオートファジーが誘導されることが示されており [46-48]、X 線照射により誘導されたオートファジーもまた、放射線抵抗性に働いていると考えられている [29, 49]。X 線照射によるオートファジーの誘導には、様々な因子が関与していることが報告されている [30]。mTORC1 はオートファジーの阻害因子として知られているが、本研究では X 線照射により誘導された mTORC1 によるオートファジーの抑制効果を上回る、強いオートファジーの誘導活性が働いたのではないかと考えられた。

次いで、大腸癌細胞において X 線照射により活性化される mTOR 経路、オートファジーあるいはその両方を抑制することで X 線感受性が増強するかどうかを確かめるために、テムシロリムス単剤、クロロキン単剤およびテムシロリムスとクロロキンの併用処理を行った細胞に各線量の X 線照射を行い、Clonogenic assay を用いて各群における細胞生存率を評価した (図 10)。テムシロリムス単剤、クロロキン単剤処理では SW480、HT29 いずれの細胞においても X 線照射による生存率の抑制効果は弱かったが、テムシロリムスとクロロキンを併用することで X 線照射による生存率の抑制効果は増強した。タンパク質発現量の検討では (図 11, 12)、テムシロリムスを使用することで X 線照射により活性化された mTOR 経路は抑制され、p62 の減少、LC3-II/LC3-I 比の上昇を認めたことからオートファジーが誘導されたことが確認された。一方、クロロキンによりオートファジーは後期相で阻害されたが、p-S6, p-4E-BP1 の発現量は変化なくクロロキンによる mTOR 経路への影響はないものと考えられた。テムシロリムスとクロロキンの併用下においてはテムシロリムスにより mTOR 経路は抑制され、また、テムシロリムスにより誘導されたオートファジーはクロロキンにより後期相で阻害されたため p62 の発現量、LC3-II/LC3-I 比は最も上昇していた。これより、テムシロリムス単剤ではオートファジーが活性化したこと、クロロキン単剤では mTOR 経路の活性が維持されていたことが各単剤処理では X 線増感効果が得られなかった原因ではないかと考えられた。そして、X 線により活性化された mTOR 経路とオートファジーの両方を阻害す

ることにより X 線による増殖抑制効果が増強したのではないかと考えられた。過去の報告では、mTOR 阻害薬単剤による X 線感受性増強効果は膀胱癌、乳癌、前立腺癌などで示されているが [19, 50, 51]、直腸癌における臨床試験では X 線増感効果を認めなかった [40]。同様に、クロロキン単剤による X 線感受性増強効果は乳癌細胞では示されているが [52]、大腸癌細胞では X 線感受性を増強させなかったとする報告がある [53]。このように、mTOR 阻害薬単剤、クロロキン単剤の X 線感受性増強効果は、細胞毎に異なるとされている。しかし、mTOR 阻害薬とクロロキン併用による X 線感受性増強効果を決定づける因子について検討した報告はこれまでにない。一方、mTOR 阻害薬、クロロキンの併用療法の X 線感受性増強効果を検討した報告はこれまでにないが、X 線非照射の検討では大腸癌細胞を含む多くの癌細胞で mTOR 阻害薬とクロロキンの強力な抗腫瘍効果が示されている [28, 41, 54-56]。これらの過去の報告より、少なくとも一部の直腸癌に対して X 線感受性を増強させるためには、mTOR 経路、オートファジーのいずれかを阻害するだけでは十分でなく、両方を阻害する必要があると考えられた。

細胞死に関する検討 (図 15) では、テムシロリムス単剤あるいはクロロキン単剤処理による有意なアポトーシス率の上昇は認めず、テムシロリムスとクロロキンを併用することで相乗的なアポトーシス率の上昇を認めた。mTOR 阻害薬の抗腫瘍効果は主に cell cycle を停止させることであり、抗アポトーシスとして働く AKT のリン酸化が維

持されるため、アポトーシスはほとんど誘導されないことが知られており [57-59]、本研究においても同様の結果であった。また、オートファジーは損傷されたミトコンドリアを捕食することでミトコンドリアの品質を維持し、活性酸素の異常蓄積を防いでいるが、オートファジーを阻害することで活性酸素の異常蓄積を来し、アポトーシスが誘導されるとされている [30]。しかし、本研究ではクロロキン単剤によるアポトーシス誘導は軽微であった。一方、mTOR 阻害薬とクロロキン併用療法の抗腫瘍効果を検討した過去の報告では、本研究結果と同様に相乗的なアポトーシスの誘導が確認されている [28, 41, 55, 56]。mTOR 阻害薬は、Autophagosome やリソソームを誘導することが知られているが、クロロキンは Autophagosome 膜やリソソーム膜の透過性を亢進させることで内部の消化酵素が細胞質内へ漏れ出し、アポトーシスを誘導していると考えられている [37, 60]。本研究では、X 線照射により増加した Autophagosome は mTOR 阻害薬で処理することでさらに増加した。そして、ここにクロロキンを加えることで増加した Autophagosome 膜の透過性が亢進され、強力なアポトーシスが誘導されたものと考えられた。また、mTOR 阻害薬であるラパマイシンや、オートファジー関連遺伝子の抑制によるオートファジー阻害は、共に DNA ダメージの修復を阻害することが報告されている [20, 46]。このことから、mTOR 経路とオートファジーの両方を阻害することで X 線照射による DNA 損傷の修復が強く抑制され、その結果、アポトーシスが強く誘導された可能性も考えられた。

今回我々が使用したテムシロリムスとクロロキンの併用療法は、既に様々な固形癌を対象とした phase 1 臨床試験が行われている。比較的頻度が高かった Grade 3 以上の合併症として食思不振 (8%)、倦怠感 (8%)、嘔気 (15%)、貧血 (10%) が報告されているがいずれも対症療法でコントロール可能であったと報告されている [61]。しかし、テムシロリムスとクロロキンの併用療法を放射線増感剤として用いた臨床研究はこれまでになく、前向きな臨床検討が待たれる。本研究で用いた各薬剤の投与量は、過去の臨床試験で用いられた用量と比較してテムシロリムスはやや少ない可能性があり、クロロキンは多い可能性がある。したがって、本研究結果から実際に臨床研究を始める場合には、phase 1 試験から始める必要があると考える。

本研究の限界としては、第一に *in vitro* に限った検討であり、必ずしも *in vivo* で同様の効果が得られるとは限らないことである。特に、X 線照射線量やその効果は生体内と *in vitro* で異なる可能性があるため、今後、*in vivo* での検討が必要である。第二に、本研究では mTOR 阻害薬としてテムシロリムスを、オートファジー阻害薬としてクロロキンを使用した。各薬剤の特異的な効果による X 線増感作用であった可能性は否定できない点である。そのため、他の mTOR 阻害薬、オートファジー阻害薬でも同様の効果が得られるか検討する必要がある。

当研究では、大腸癌細胞においてテムシロリムスとクロロキンの併用療法は X 線照射によるアポトーシスの誘導効果を増強させると結論した。したがって、直腸癌に

おける術前放射線療法において併用する化学療法の一選択肢になり得ると考えられた。

1-5 小括

大腸癌細胞において、X線照射により mTOR 経路が活性化され、オートファジーが誘導された。mTOR 阻害薬であるテムシロリムス、オートファジー阻害薬であるクロロキンの各々単剤処理では X線照射による増殖抑制効果は弱いですが、テムシロリムスとクロロキンの併用処理はアポトーシスの誘導を介して X線照射による増殖抑制効果を増強させた。

第 2 章

放射線治療後大腸癌の転移能における mTOR 経路の役割

2-1 背景と目的

我々は第一章において、二つの大腸癌細胞 (SW480 細胞と HT29 細胞) を用いて X 線照射により mTOR 経路が活性化することを示した。一方で、別の大腸癌細胞 (HCT116 細胞) を使用した過去の研究では、X 線照射により mTOR 経路が不活性化されることが報告されている [62]。これらの結果から、X 線照射による mTOR 経路の活性化は細胞毎に異なることが示唆される。このため、実臨床の大腸癌において放射線治療により mTOR 経路が活性化するかどうかは未知数であり、臨床検体を用いた検討が必要である。

もう一つ考慮することとして、mTOR 経路は大腸癌を含めた多くの癌細胞において遠隔転移の形成を促進する経路として報告されている [17, 39]。固形癌細胞が転移する際、細胞の性質が上皮細胞系から移動能をもつ間葉細胞系へと転換することが知られており、この可逆的な変化は上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) と呼ばれる [63]。mTOR 経路は癌細胞の EMT において中心的な役割を担っており、基礎研究の分野では多くの癌細胞において mTOR 阻害薬や mTORC1/C2 の発現抑制により EMT および転移能が抑制されたことが報告されている [39, 64-66]。しかし、放射線照射により活性化された mTOR 経路が、癌細胞の転移

能に寄与するかどうかは不明である。このため、放射線治療後 mTOR 経路活性の実臨床における意義について検証を行う必要があると考えた。

基礎研究の分野では、一部の癌細胞において放射線照射により癌細胞の転移能が向上することが報告されている [42, 67, 68]。放射線治療後に生存した癌細胞は遊走能、浸潤能が高く、EMT 様のタンパク質発現変化を示した *aggressive phenotype* であることが報告されている [43, 69, 70]。しかし、放射線治療はどのようなメカニズムで癌細胞の EMT を誘導するかはよく分かっていない。また、実臨床では多くの固形癌に対し放射線治療が行われているが、放射線治療により遠隔転移の出現が増加したという報告はない。一方、CRT 後直腸癌の臨床研究では、CRT 後に EMT 様タンパク質発現変化が生じた症例と生じなかった症例が存在し、前者は後者にくらべて有意に遠隔転移を含めた術後再発が多かったことが報告されている [67]。このため、同じ直腸癌であっても、放射線治療により遠隔転移が増加する症例と増加しない症例が存在するのではないかと考えられた。今回我々は、放射線治療により活性化された mTOR 経路が EMT の誘導を介して転移能の向上に寄与し、そして放射線治療による mTOR 経路の活性変化は術後の遠隔転移出現の指標になるのではないかという仮説を立て、術前 CRT 後直腸癌症例の臨床検体および大腸癌細胞を用いてこれを検証することとした。

方法

臨床研究: CRT後直腸癌の切除検体を用いる
p-mTOR, p-S6Iに対する免疫染色 (IHC) を行い、
mTOR経路活性と術後遠隔転移の関連性を評価

In vitro 研究: 大腸癌細胞を用いる
X線照射によるmTOR活性変化とEMT変化を評価

図 18. 方法

IHC, immunohistochemistry; EMT, epithelial to mesenchymal transition.

2-2 方法

臨床研究

研究デザイン

進行大腸癌の切除検体を用いた過去の検討では、免疫染色によるリン酸化 mTOR の発現量は、表層部より癌浸潤部で高いことが示されている [71]。従って、大腸癌検体において mTOR 経路活性を評価するのに、癌の表層しか採取できない生検検体を用いる事は不適切であると考えられる。東京大学医学部附属病院大腸肛門外科では、遠隔転移のない cStage II/III 大腸癌のうち下部直腸癌の症例に対しては術前 CRT 後に手術を行い、その他の大腸癌の症例に対して術前治療は行わず根治的切除を行っている。従って、本研究では、CRT 後の mTOR 経路活性を評価するために術前 CRT を行った下部直腸癌の切除検体 (CRT 群) を、また、CRT による影響がない状態の mTOR 経路活性を評価するために術前治療を行っていない大腸癌の切除検体 (非 CRT 群) を利用した (図 19)。

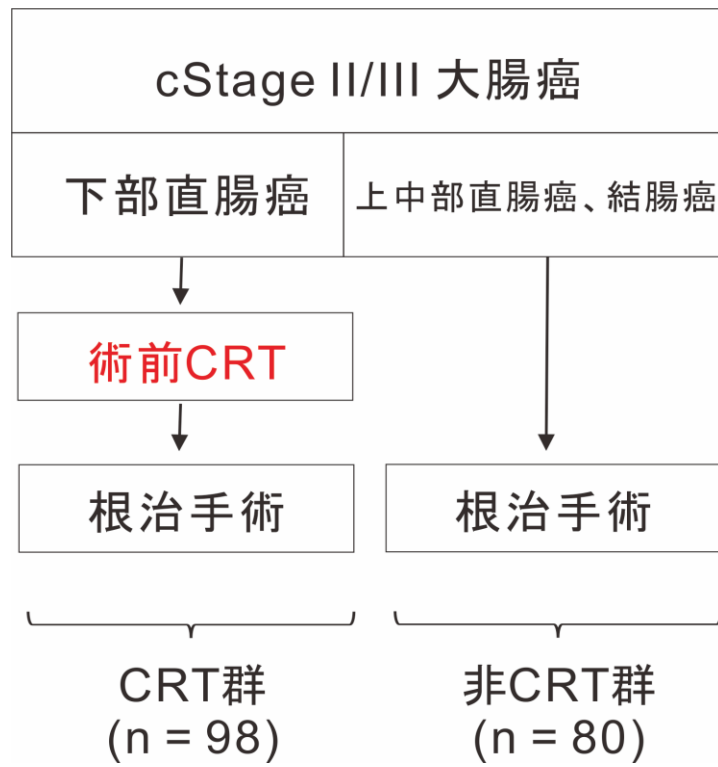


図 19. 対象患者選定におけるフローチャート

CRT, chemoradiotherapy

症例

2003年1月から2013年12月まで東京大学医学部附属病院大腸肛門外科にて進行下部直腸腺癌と診断され、術前CRTの後に根治的切除を施行された症例をCRT群の対象とした。術前CRTの適応は原発巣が腹膜反転部以下の下部直腸にあり、深達度がcT3以上あるいはリンパ節転移陽性の症例である。全症例に50.4 Gyを28分割した放射線照射およびTegafur/uracil (UFT)の内服を基本とした化学療法を行い、6-10週間後に定型的根治手術を行った。また、2012年1月から同年12月までに深達度がcT2以上あるいはリンパ節転移陽性の進行大腸腺癌と診断され、術前治療を行わずに根治切除を行った症例を非CRT群の対象とした。いずれの群においても術前に遠隔転移が確認された症例および同時多発癌を有した症例は対象から除外した。また、CRT群においては、CRT後に病理学的完全奏効を来した症例および少量の腫瘍しか残らなかった症例は免疫染色による評価が難しく対象から除外した(表1)。

表 1. 除外症例の詳細

除外理由	CRT 群	非 CRT 群
同時多発癌	1 例	7 例
術前に遠隔転移が出現	4 例	-
病理学的完全奏効 (pCR)	10 例	-
遺残癌細胞が極少量 ¶	5 例	-

CRT, chemoradiotherapy; pCR, pathological complete response.

¶, 免疫染色による判定が難しい症例

腫瘍の病期および術前 CRT の組織学的効果判定は本邦の大腸癌取り扱い規約第 9 版に基づきなされた。術前 CRT の組織学的効果判定; Grade 0 (無効: 癌細胞に治療による変性、壊死などを認めない), Grade 1 (軽度の効果: 癌の 2/3 未満で癌細胞の変性、壊死、融解がある), Grade 2 (かなりの効果: 癌の 2/3 以上で著明な変性、壊死、融解、消失がある), Grade 3 (著効: 癌全体がすべて壊死に陥っているか、または融解、消失した場合、肉芽腫様組織あるいは線維化巣で置き換えられている)。本研究では、grade 1 以下を非反応性、grade 2 以上を反応性と定義し、術前 CRT の組織学的効果を評価した。また、術後サーベイランスは大腸癌治療ガイドラインに基づき、3 か月ごとの診察と腫瘍マーカーの測定、6 か月ごとの直腸診と CT 検査、12 か月ごとの内視鏡検査を行った。術後の予後評価には、全生存期間、無再発生存期間、および遠隔転移出現までの期間を評価した。なお、初回再発として局所再発をきたした症例も引き続き遠隔転移の出現を評価した。

免疫染色

免疫染色には切除検体のホルマリン固定、パラフィン包埋組織ブロックから 4- μm の厚さで切り出した未染標本を用いた。まず、未染標本を脱パラフィンおよび脱水処理した後、10 mM クエン酸バッファー (pH=6.0) 処理と 120°C のオートクレーブで 5

分間加熱による抗原賦活化を行い、緩徐に冷ました後、0.3%過酸化水素水含有メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼのブロックを行った。その後、10%ヤギ血清 (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて非特異的反応のブロッキングを行った後、100 倍に希釈したウサギモノクローナル抗体である抗リン酸化 mTOR 抗体 (p-mTOR, Ser2448; CST)、および 200 倍に希釈したウサギモノクローナル抗体である抗リン酸化 S6 抗体 (p-S6, Ser235/236, 91B2; CST) を反応させ、4°Cにて 8 時間程度インキュベートした。次にビオチン標識抗ウサギ、ヒツジ抗体 (Nichirei) を室温で 20 分間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアジピン (Nichirei) を 10 分間反応させた。発色は 50 mM tris-buffer に溶解した 2% DAB (3,30-diaminobenzidine tetrahydrochloride) に 10 分間反応させ、背景の染色にはマイヤーヘマトキシリン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を用いた。

本研究では、既報の半定量的スコリング法を用いて各タンパクに対する染色性の評価を行った [72]。染色強度は次の通りに評価した; スコア 0, no staining; スコア 1, weak; スコア 2, moderate; スコア 3, strong staining。p-mTOR, p-S6 に対する代表的な染色強度を図 20 に示す。また、染色細胞の割合は次の通りに評価した; スコア 0, 0-10%; スコア 1, 11-25%; スコア 2, 26-50%; スコア 3, 51-100%。最終的に、染色強度スコアと割合スコアを掛け合わせた値を、0-9 の値の染色スコアとして算出した。判定は、二人の評価者が臨床病理学的情報を伏せた状態で、各症例の癌先進部

における細胞質あるいは細胞膜の染色性を 400 倍で評価した。また、評価者間で判定結果が一致しなかった対象においては、第三者が臨床病理学的情報を伏せた状態で評価し、その判定結果を採用した。

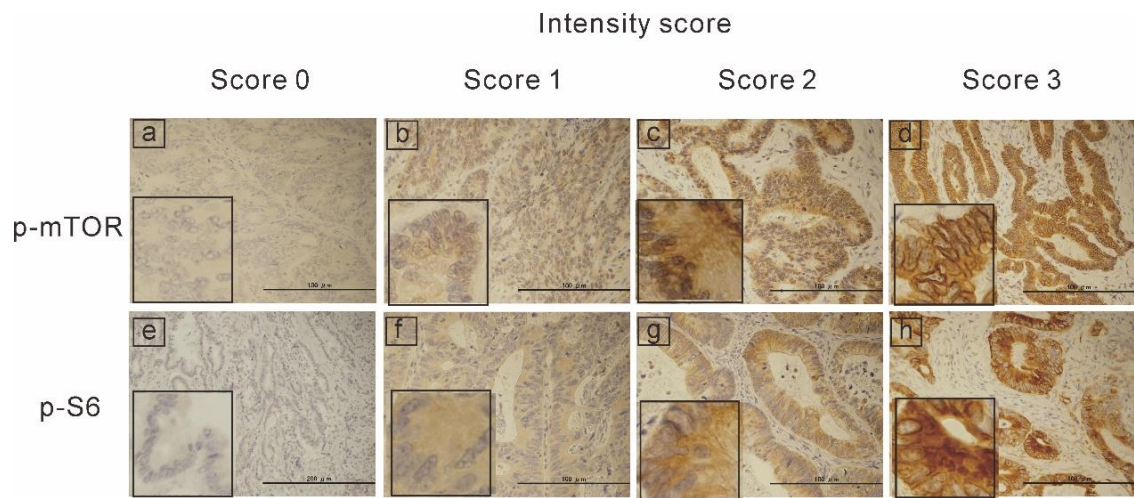


図 20. 大腸癌における phospho-mTOR (p-mTOR), phospho-S6 ribosomal protein (p-S6) 染色強度の代表例

a-d: 大腸癌組織における p-mTOR 染色強度スコア 0 (a)、1 (b)、2 (c)、3 (d) の代表例。

e-h: 大腸癌組織における p-S6 染色強度スコア 0 (e)、1 (f)、2 (g)、3 (h) の代表例。

各画像は 100 倍率 (スケールバー: 100 μ m) および 400 倍率 (左下枠内) で撮影した画像を含む。

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

In vitro 研究

細胞培養

ヒト大腸癌細胞株のうち、遊走能の評価に適した SW480 および LoVo 細胞を用いた。SW480 (変異型 *TP53*、変異型 *KRAS* (G12V)) は転移のない局所進行結腸癌由来であり、LoVo 細胞 (野生型 *TP53*、変異型 *KRAS* (G13D;A14V)) は結腸癌の左鎖骨上リンパ節転移巣由来である [73]。このため、SW480 細胞は比較的低い転移能を、LoVo 細胞は高い転移能を有する細胞株として知られている [42]。細胞は Japanese Cancer Research Resource Bank より購入し、5% FBS および 1% antibiotic/antimycotic solution を添加した RPMI 1640 (Sigma Aldrich) で、5% 二酸化炭素、37°C のインキュベーター内で培養した。mTOR 阻害薬である テムシロリムス (TEM; Sigma Aldrich) は既報より 80 nM の濃度で使用した [41]。細胞はテムシロリムスを添加した培養液で 1 時間培養した後、X 線装置 (Pantac HF350) を用いて 200 kV-20 mA の電流、および銅 (0.5mm) とアルミニウム (1.0 mm) のフィルター設定下に 3 Gy あるいは 6 Gy (1.0 Gy/分) の X 線照射を行った。

免疫細胞染色

6-well flat-bottomed plat の底にコーティングされていないカバーガラスを置き、各細胞を分配し 24 時間培養した。カバーガラス上に細胞が十分に接着、増殖してい

ることを確認し、前述の薬剤処理および X 線照射を行った。24 時間後に培養液を取り除き、4% パラフォルムアルデヒドにて間細胞固定後、0.1% Tween 液で膜透過処理を行った。洗浄の後、10%ヤギ血清 (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて非特異的反応のブロッキングを行った後、200 倍に希釈したウサギモノクローナル抗体である抗リン酸化 S6 抗体 (p-S6, Ser235/236, 91B2; CST) を反応させ、4°Cにて 8 時間程度インキュベートした。次にビオチン標識抗ウサギ、ヒツジ抗体 (Nichirei) を室温で 20 分間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアジピン (Nichirei) を 10 分間反応させた。発色は 50 mM tris-buffer に溶解した 2% DAB に 10 分間反応させて行い、背景の染色にはマイヤーヘマトキシリン (Sigma Chemical Co) を用いた。染色性の評価には、「2-2 方法 免疫染色」において記載した半定量的スコアリング法を用いた。

タンパク質発現量の評価—Western blotting

前述の薬剤処理および X 線照射を行った細胞を 24 時間培養し、「1-2 方法 Western blotting」に記載した通りに Western blotting を行った。1 次抗体は抗 p-S6 ウサギ抗体 (Ser235/236, 91B2, CST; 1000 倍希釈) および S6 ウサギ抗体 (5G10, #2217, CST; 1000 倍希釈) を用い、2 次抗体は Alkaline phosphatase 標識した抗ウサギ-ヤギ IgG 抗体 (ab97048, Abcam; 2000 倍希釈) を用いた。各バンドの検出強度は Image J software (version 1. 4. 3) を用いて定量化され、p-S6 の発現量を S6 の発現量で標準

化し算出した。

細胞遊走能の評価—スクラッチアッセイ

6-well flat-bottomed plate を用いて細胞を培養し、前述の薬剤処理および X 線照射を行った。24 時間培養した後、プレート底部に単層に接着した細胞を 200- μ l マイクロチップで搔爬し、TEM 非含有の培養液で 48 時間培養した。細胞を microscope (BZ-8100) 下に 40 倍で観察し、Migration index を次の通りに算出した;

Migration index = (搔爬直後の傷の距離 - 搔爬後 48 時間の傷の距離) / 搔爬直後の傷の距離

EMT 関連タンパク質発現量の評価—フローサイトメトリー

EMT の指標として、細胞表面タンパク質である E-カドヘリンと細胞内タンパク質であるビメンチンなどの発現量の変化を評価するのが一般的である [73, 74]。癌細胞が EMT を来すと、E-カドヘリンの細胞表面発現量は減少し、ビメンチンの細胞内発現量は増加する。本研究では、これらのタンパク質発現量をフローサイトメトリーで解析することとした。各細胞に前述の薬剤処理および X 線照射を行い、24 時間後に細胞を回収した。ここで、細胞表面タンパク質である E-カドヘリンの発現量を評価する細胞は 25 倍希釈の PE 標識マウス CD324 (E-cadherin) 抗体 (BD Pharmingen, San

Diego, CA, USA) で 30 分間、37 °Cの暗所インキュベーターで培養した後、洗浄し解析に使用した。一方、細胞内タンパク質であるビメンチンの発現量を評価する細胞は 4% パラフォルムアルデヒドにて細胞を固定し、0.1% Tween 液で膜透過処理を行った後、25 倍希釈の PE 標識マウス Vimentin 抗体 (BD Pharmingen) を反応させた。解析は BD FACS Calibur flow cytometer (BD) を用いて行い、各タンパク質の蛍光強度を算出した。

統計解析

臨床研究において、2 人の評価者間の免疫染色性評価の一致率は *Kappa* 値を算出し評価した。CRT 群と非 CRT 群における p-mTOR, p-S6 発現スコアの違いは Mann-Whitney U 検定を用いて評価した。患者背景因子と p-mTOR, p-S6 発現スコアの関係性は χ^2 検定あるいは Fisher 正確検定で評価した。生存曲線、累積遠隔転移出現率は Kaplan-Meier 法で評価し、log-rank 検定を用いて比較した。また、遠隔転移出現に関わる因子の多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを使用した。

一方、*in vitro* 研究においては、全ての実験系は 3 回以上行い、one-way ANOVA を用いて多群間比較を行い、Tukey post-test を用いて有意差のある群間を検出した。全ての解析は、JMP Pro 14.0 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いて行なわれ、*p* 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。

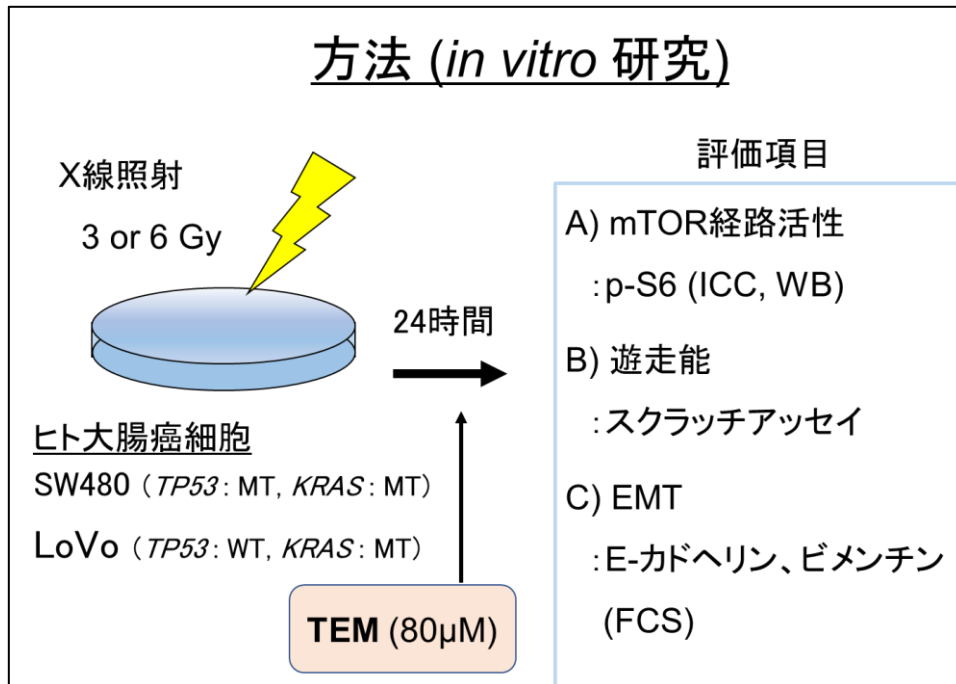


図 21. 方法 (*in vitro* 研究)

MT, mutation-type; WT, wild-type; TEM, temsirolimus; ICC, immunocytochemistry; WB, Western blotting; EMT, epithelial to mesenchymal transition; FCS, flow cytometry standard.

2-3 結果

臨床研究

大腸癌組織に対する免疫染色

大腸癌組織に対する免疫染色結果の代表例を図 22 に示す。過去の報告と同様に、本研究におけるほとんどの症例で、p-mTOR と p-S6 の染色性は大腸癌の表層より浸潤部において強い染色性を示した。これら大腸癌組織における p-mTOR と p-S6 の染色性の分布を考慮して、今回の研究では癌組織の浸潤部において最も染色性が強かった領域を評価した。二人の判定者における免疫染色スコアの一致率を評価するために *Kappa* 値を算出したところ、p-mTOR に対する免疫染色においては *Kappa* 値 0.787、p-S6 に対しては *Kappa* 値 0.732 であり、いずれも良好な一致率であった。

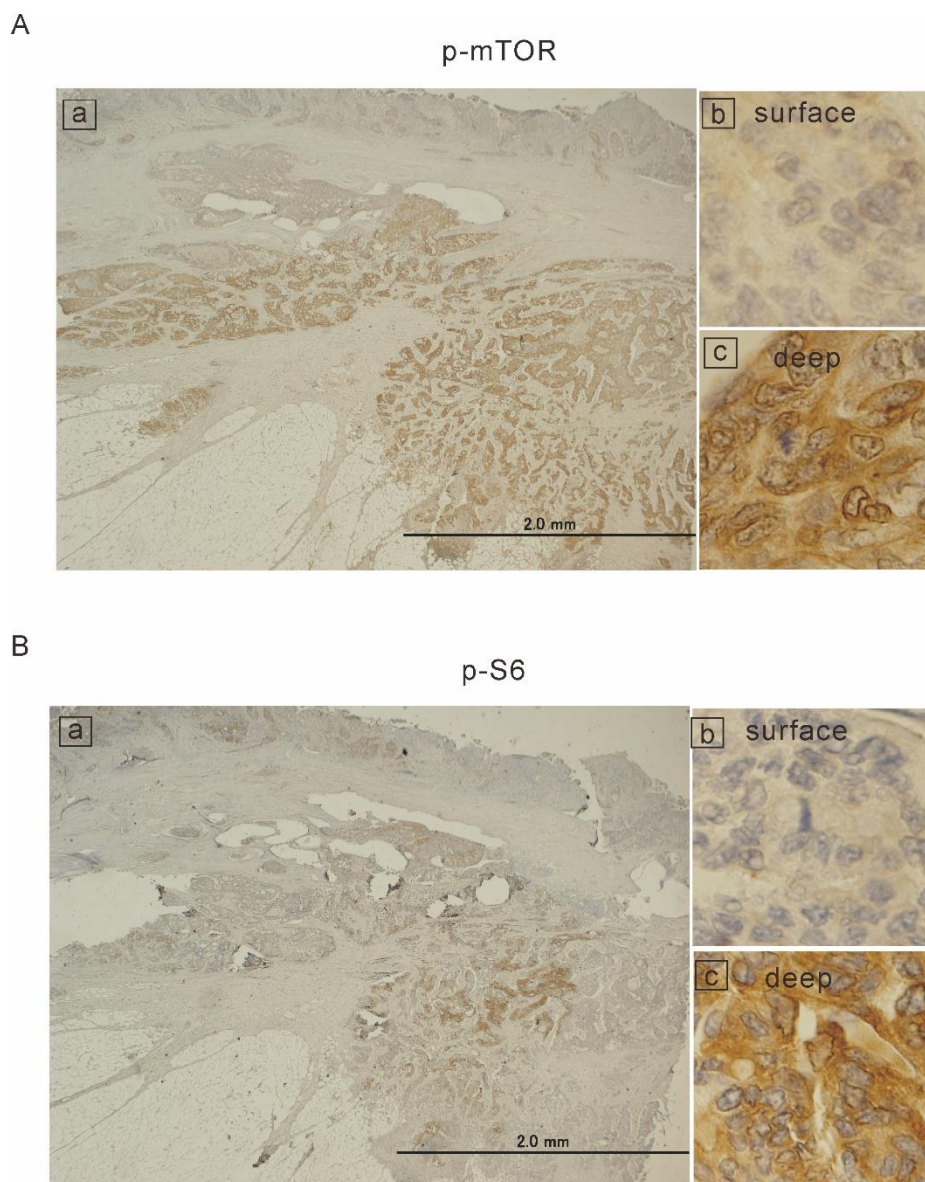


図 22. 術前治療を行っていない大腸癌組織における、phospho-mTOR (p-mTOR; A) と phospho-S6 ribosomal protein (p-S6; B) に対する免疫染色の代表例。左 (a) は 10 倍率で観察した大腸癌組織の全層を示す。右 (b, c) はそれぞれ高倍率像 (400 倍) を示し、右上 (b) は大腸癌の表層を、右下 (c) は大腸癌の先進部 (深層) をそれぞれ示す。

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

患者背景

CRT 群は 98 症例、また非 CRT 群は 80 症例が該当した。観察期間中央値は、CRT 群では 87.4 ヶ月 (範囲:67.9 ヶ月-115.6 ヶ月)、非 CRT 群では 73.1 ヶ月 (範囲:63.0 ヶ月-77.8 ヶ月) であった。各群における臨床病理学的特徴を表 2 に示す。CRT 群のうち 36 例 (37%) は CRT により良好な組織学的効果が得られた。非 CRT 群においては、結腸癌が 66 例 (83%)、直腸癌が 14 例 (17%) を占めていた。

表 2. 患者背景

		CRT 群 (n = 98)	非 CRT 群 (n = 80)
年齢 (歳) 中央値 (範囲)		65 (56–75)	65 (56–75)
性別	男性	59 (60%)	46 (58%)
腫瘍部位	結腸/直腸	0/98 (100%)	66 (83%)/14 (17%)
肛門縁からの距離 (cm) 中央値 (範囲)		4 (2–6)	-
<u>病理組織学的所見</u> ¶			
深達度	T1/T2/T3/T4	11/30/49/8	0/10/51/19
リンパ節転移	あり	23 (23%)	37 (46%)
脈管侵襲	あり	57 (58%)	61 (76%)
組織型	分化型	91 (93%)	76 (95%)
CRT の組織学的効果	反応性	36 (37%)	-

CRT, chemoradiotherapy; p-mTOR, phospho-mTOR; p-S6, phospho-S6 ribosomal protein.

¶, 根治手術による切除検体 (CRT 群では CRT 後となる) の所見

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

CRT 施行後直腸癌および CRT 非施行大腸癌の mTOR 関連タンパクの発現性

CRT 群および非 CRT 群の切除検体における、p-mTOR 及び p-S6 に対する免疫染色スコアを図 23 に示す。p-mTOR 染色スコアは、CRT 群で中央値 9 (範囲: 6-9)、非 CRT 群で中央値 6 (範囲: 4-8) であり、CRT 群において有意に高い染色スコアであった ($p = 0.001$)。一方、p-S6 染色スコアの中央値は両群共に 3 (範囲: 2-6) であり、両群における有意差は認めなかった ($p = 0.41$)。

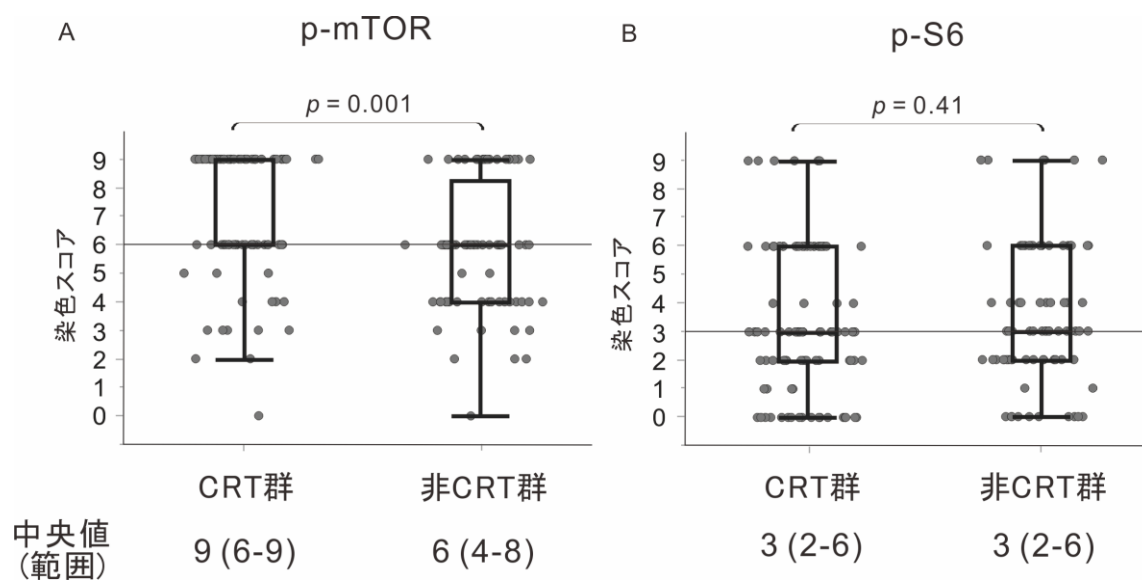


図 23. phospho-mTOR (p-mTOR; A)、phospho-S6 ribosomal protein (p-S6; B)に対する免疫染色スコア

CRT 群 (術前化学放射線療法を施行した下部直腸癌症例) および非 CRT 群 (術前療法を施行しなかった大腸癌症例) における、p-mTOR (A)、p-S6 (B) に対する免疫染色スコア。横線は非 CRT 群における p-mTOR の染色スコア中央値 (A; スコア 6)、および p-S6 の染色スコア中央値 (B; スコア 3) を示す。

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

次いで、非 CRT 群における各タンパク染色スコアの中央値 (p-mTOR に対しては 6, p-S6 に対しては 3) をカットオフとし、各群において評価タンパク質の高発現と低発現の 2 群に分け、どのような背景因子が mTOR 関連タンパク質の発現量に関連しているのかを検討した (表 3)。CRT 群においては、女性に p-S6 高発現の症例が有意に多い ($p = 0.002$) という結果であったが、癌の深達度やリンパ節転移陽性率など癌の進行度を表す因子はいずれのタンパク質発現量とも関連しなかった。また、CRT の組織学的効果とも関連しなかった ($p = 0.08$)。一方、非 CRT 群においては、リンパ節転移がない症例の方が有意に p-mTOR 高発現の割合が高かったが ($p = 0.03$)、リンパ節転移以外の癌の進行度は、CRT 群と同様に mTOR 関連タンパク質の発現量と関連しなかった。また、結腸と直腸で各タンパク質の発現量に差を認めなかった。

表 3. mTOR 関連タンパク質発現量に関わる患者背景因子

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

		p-mTOR 発現量			p-S6 発現量		
		低発現 ($<$ score 6)	高発現 (\geq score 6)	<i>p</i> 値	低発現 ($<$ score 3)	高発現 (\geq score 3)	<i>p</i> 値
CRT 群		N=15	N=83		N=39	N=59	
年齢、歳	中央値 (範囲)	62 (58–66)	63 (57–70)	0.87	63 (58 - 70)	63 (57–69)	0.80
性別	男性	12 (80%)	47 (57%)	0.09	31 (79%)	28 (47%)	0.002
肛門縁からの距離	$<$ 4 cm	12 (80%)	49 (59%)	0.12	28 (72%)	33 (56%)	0.11
深達度	T1/T2/T3/T4	2/5/7/1	9/25/42/7	0.98	2/13/20/4	9/17/29/4	0.45
リンパ節転移	陽性	4 (27%)	19 (23%)	0.75	8 (21%)	15 (25%)	0.58
脈管侵襲	陽性	6 (40%)	51 (61%)	0.12	23 (59%)	34 (58%)	0.90
組織型	分化型	1 (7%)	6 (7%)	0.94	2 (5%)	5 (8%)	0.53
51 CRT による組織学的効果	反応性	8 (53%)	28 (34%)	0.08	10 (26%)	26 (44%)	0.13
非 CRT 群		N=27	N=53		N=29	N=51	
年齢、歳	中央値 (範囲)	69 (59–75)	64 (55–72)	0.19	68 (55–78)	64 (56–74)	0.91
性別	男性	1 (4%)	29 (55%)	0.48	15 (52%)	31 (61%)	0.43
腫瘍部位	直腸	4 (15%)	10 (19%)	0.65	7 (24%)	7 (14%)	0.24
深達度	T1/T2/T3/T4	3/19/5	7/32/14	0.67	4/20/5	6/31/14	0.59
リンパ節転移	陽性	17 (63%)	20 (38%)	0.03	13 (45%)	24 (47%)	0.85
脈管侵襲	陽性	22 (81%)	39 (74%)	0.43	22 (76%)	39 (77%)	0.95
組織型	分化型	26 (96%)	50 (94%)	0.70	27 (93%)	49 (96%)	0.56

CRT, chemoradiotherapy; p-mTOR, phosphor-mTOR; p-S6, phosphor-S6 ribosomal protein

予後との相関

各群において、mTOR 関連タンパク質発現量による患者予後の違いを検討した (図 24)。全生存率の検討では、いずれの群においても mTOR 関連タンパク質発現量による生存率の違いは認めなかった。無再発生存率および累積遠隔転移出現率の検討では、非 CRT 群においては mTOR 関連タンパク質発現量による無再発生存率および累積遠隔転移出現率の違いは認めなかった。一方、CRT 群においては、mTOR 関連タンパク質が高発現の症例は無再発生存率が低く、術後遠隔転移出現率が高い傾向にあった。特に、CRT 群において p-S6 高発現の症例は低発現の症例に比べ、有意に累積遠隔転移出現率が高かった ($p = 0.01$)。したがって CRT 群に焦点をあて、術後遠隔転移出現と相関する因子を検討することとした。

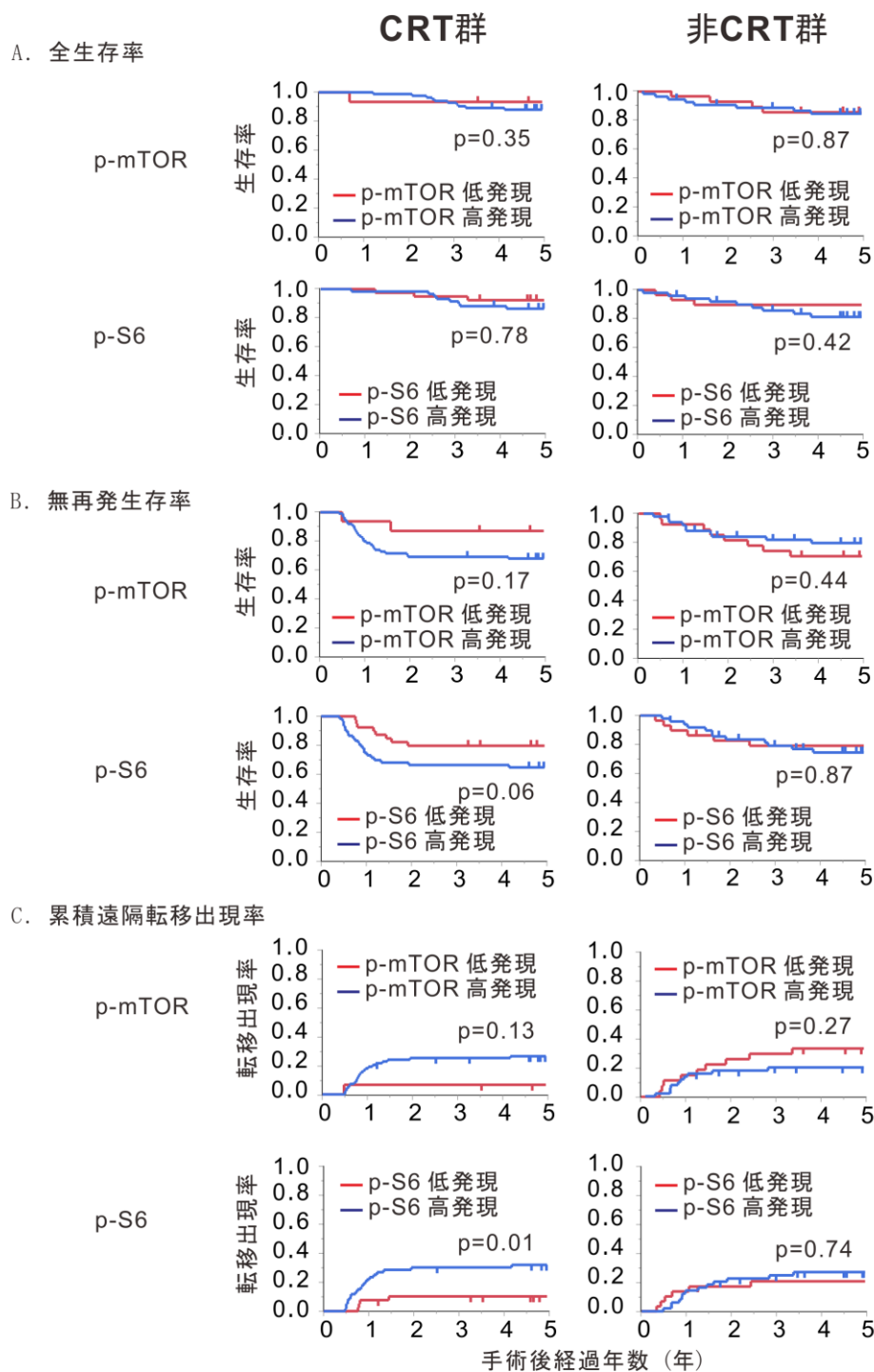


図 24. mTOR 関連タンパク質発現量と予後との関係

CRT 群および非 CRT 群における、mTOR 関連タンパク質 (p-mTOR, p-S6) の高発現症例 (赤線) と低発現症例 (青線) の全生存率 (A)、無再発生存率 (B)、および累積遠隔転移出現率 (C) を Kaplan-Meier 曲線で示す。有意差は log-rank 法で評価した。

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

CRT 群における、術後遠隔転移に関連する因子の単変量および多変量解析の結果を表 4 に示す。単変量解析の結果では、腫瘍の肛門縁からの距離 (≥ 4 cm vs. < 4 cm、 $p = 0.01$)、病理学的深達度 (T1/2 vs. T3/4、 $p = 0.007$)、病理学的リンパ節転移 (なし vs. あり、 $p = 0.03$)、免疫染色に基づく腫瘍の p-S6 発現量 (低発現 vs. 高発現、 $p = 0.006$) が術後遠隔転移出現を予測しうる因子であった。また、有意差はないものの、脈管侵襲 (なし vs. あり、 $p = 0.051$)、および CRT の組織学的効果 (反応性 vs. 非反応性、 $p = 0.068$) もまた術後遠隔転移出現を反映する傾向があった。これらの因子に対して多変量解析を行うと、免疫染色に基づく腫瘍の p-S6 高発現は、高い病理学的深達度 (ハザード比 3.73、 $p = 0.04$) とともに、術後遠隔転移を予測する独立した因子であった (ハザード比 4.51、 $p = 0.02$)。一方、p-mTOR 発現量に関しては、低発現の症例における術後遠隔転移出現数が極めて少なく ($n=1$)、評価不能であった。

これらの結果から、大腸癌において術前治療の影響を受けていない mTOR 経路活性は転移形成に大きく影響しないが、CRT の影響を受けた mTOR 経路活性は転移形成に寄与することが予想され、大腸癌細胞を用いて放射線照射による mTOR 経路活性と遊走能の変化を検証することとした。

表 4. 術前化学放射線療法を行った症例 (CRT 群) における、術後遠隔転移を予測する因子の単変量および多変量解析

		n	単変量解析			多変量解析		
			ハザード比	95%信頼区間	p 値	ハザード比	95%信頼区間	p 値
年齢	≤60 歳	39	1	-	0.32			
	>60 歳	59	0.67	0.30–1.48				
性別	男性	59	1	-	0.43			
	女性	39	0.71	0.30–1.65				
肛門縁からの距離	≥4 cm	61	1	-	0.01	1	-	0.11
	<4 cm	37	2.78	1.23–6.29		2.01	0.85–4.75	
深達度	T1/2	41	1	-	0.007	1	-	0.04
	T3/4	57	4.34	1.48–12.71		3.73	1.22–14.09	
リンパ節転移	なし	75	1	-	0.03	1	-	0.15
	あり	23	2.53	1.10–5.80		1.97	0.80–4.61	
脈管侵襲	なし	41	1	-	0.051	1	-	0.67
	あり	57	2.51	0.99–6.32		1.20	0.44–3.70	
組織型	分化型	91	1	-	0.15			
	非分化型	7	0.41	0.12–1.37				
CRT の組織学的効果	反応性	62	1	-	0.068	1	-	0.32
	非反応性	36	2.51	0.94–6.72		1.91	0.64–5.71	
p-mTOR 発現量	低発現	12	1	-	1.00	1	-	1.00
	高発現	86	1.70e+9	0– \mathbb{P}		1.22e-9	0– \mathbb{P}	
p-S6 発現量	低発現	39	1	-	0.006	1	-	0.02
	高発現	59	3.74	1.28–10.95		-	4.51	

CRT, chemoradiotherapy; \mathbb{P} , 評価不能

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

小括 2-1

- 非CRT群では、mTOR経路活性は
癌の進行度、予後と関連しなかった
- CRT群では、CRT後にmTOR経路が高活性で
あった症例は術後遠隔転移が多かった

図 25. 小括 2-1

CRT, chemoradiotherapy

In vitro 研究

X線照射によるリン酸化 S6 タンパク発現量の変化

ヒト大腸癌細胞 SW480 細胞 と LoVo 細胞 に 6 Gy の X 線を照射し、24 時間後に p-S6 に対する細胞染色を行った (図 26)。SW480 細胞では X 線照射により p-S6 染色性が増強し、逆に LoVo 細胞では X 線照射により p-S6 染色性が減少した。そして、mTOR 阻害薬であるテムシロリムスを添加する事により、いずれの細胞でも p-S6 染色性は減少した。

p-S6タンパク質に対する免疫細胞染色

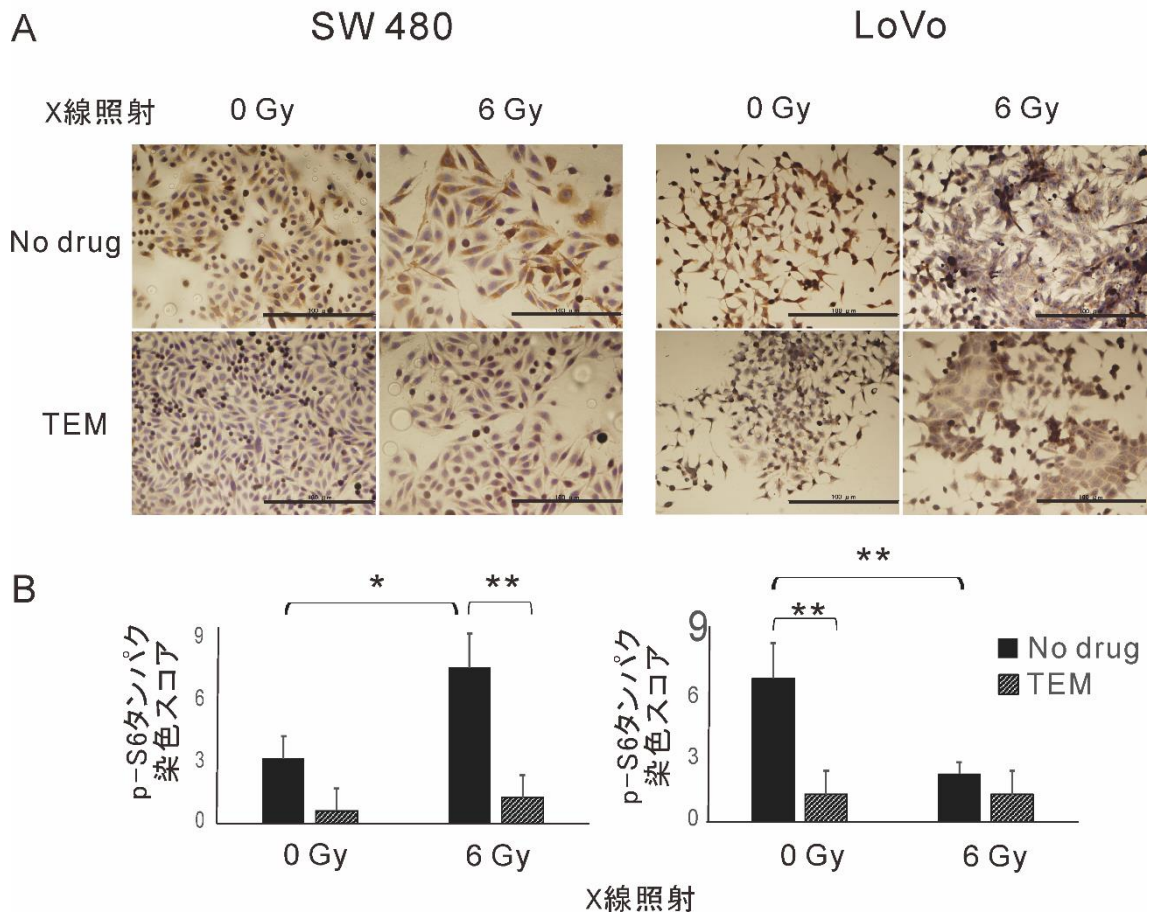


図 26. 大腸癌細胞における X 線照射によるリン酸化 S6 タンパク質 (p-S6) 発現量の変化。

大腸癌細胞 SW480 細胞と LoVo 細胞に 6 Gy の X 線照射およびテムシロリムス (temsirolimus: TEM) 80 nM を加え、24 時間後に免疫細胞染色を用いて p-S6 発現量を評価した。400 倍で観察した免疫細胞染色の代表例 (A: スケールバー, 100 μm) と、各群における細胞の染色スコアを平均値 ± 標準偏差で示す (B)。

*; p < 0.05; **; p < 0.01.

同様に、Western blotting においても p-S6 発現量を評価した (図 27)。SW480 細胞では p-S6 発現量は X 線照射により上昇し、逆に、LoVo 細胞では減少した。そしてテムシロリムスの処理により、いずれの細胞においても p-S6 発現量は減少した。

これら免疫細胞染色および Western blotting の結果から、大腸癌細胞には、X 線照射により mTOR 経路が活性化する細胞 (SW480 細胞) と抑制される細胞 (LoVo 細胞) が存在することが示唆された。

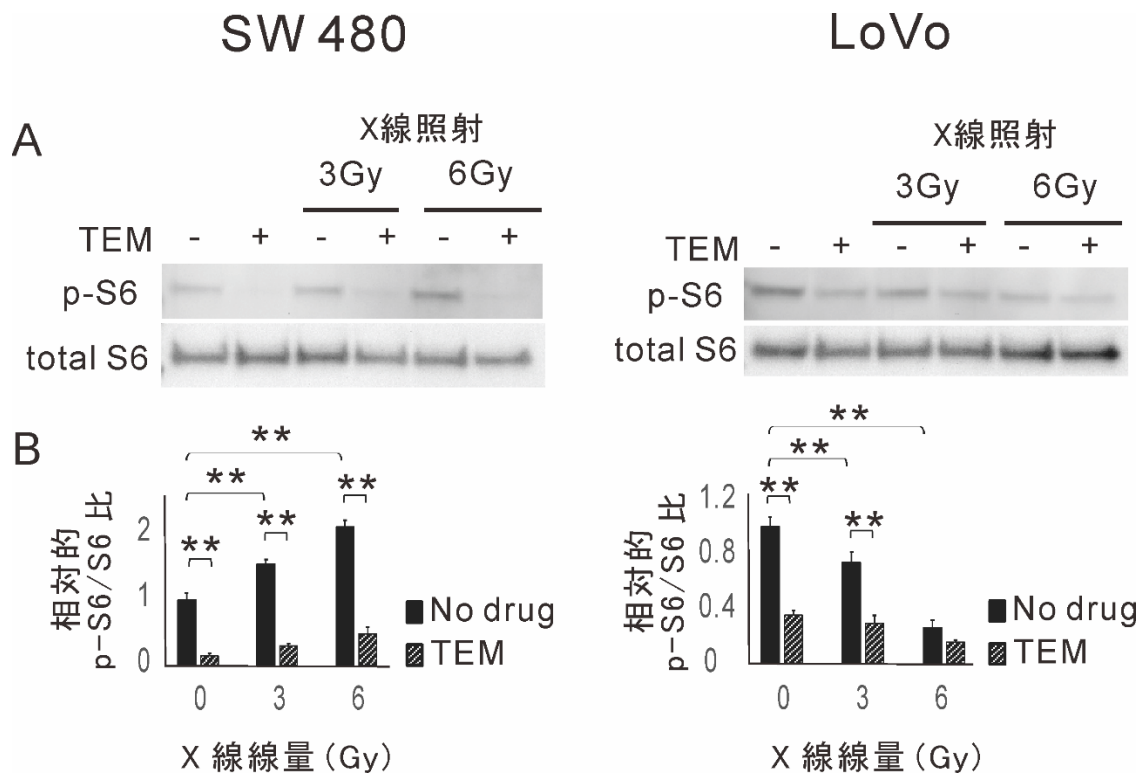


図 27. 大腸癌細胞における、X 線照射によるリン酸化 S6 タンパク質 (p-S6) 発現量の変化。

大腸癌細胞 SW480 と LoVo に 3 Gy、6 Gy の X 線照射およびテムシロリムス (temsirolimus: TEM) 80 nM を加え、24 時間後の p-S6 発現量を Western blotting を用いて評価した (A)。各群におけるバンドの濃さを定量化し、平均値 ± 標準偏差で示す (B)。

*; $p < 0.05$; **; $p < 0.01$.

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

X線照射による遊走能の変化

次いで、同様の薬剤処理、X線照射を行った SW480 および LoVo 細胞に対し、スクラッチアッセイを用いて遊走能を評価した (図 28)。X線照射により mTOR 経路が活性化した SW480 細胞においては X線照射により遊走能は増加し、X線照射により mTOR 経路が抑制された LoVo 細胞では逆に減弱した。そして、テムシロリムスはいずれの細胞においても p-S6 発現を減少させたが、それに伴い遊走能も減少させた。

これらの結果から、一部の大腸癌では X線照射により mTOR 経路が活性化され、活性化した mTOR 経路により癌細胞の遊走能が増加する可能性が示唆された。

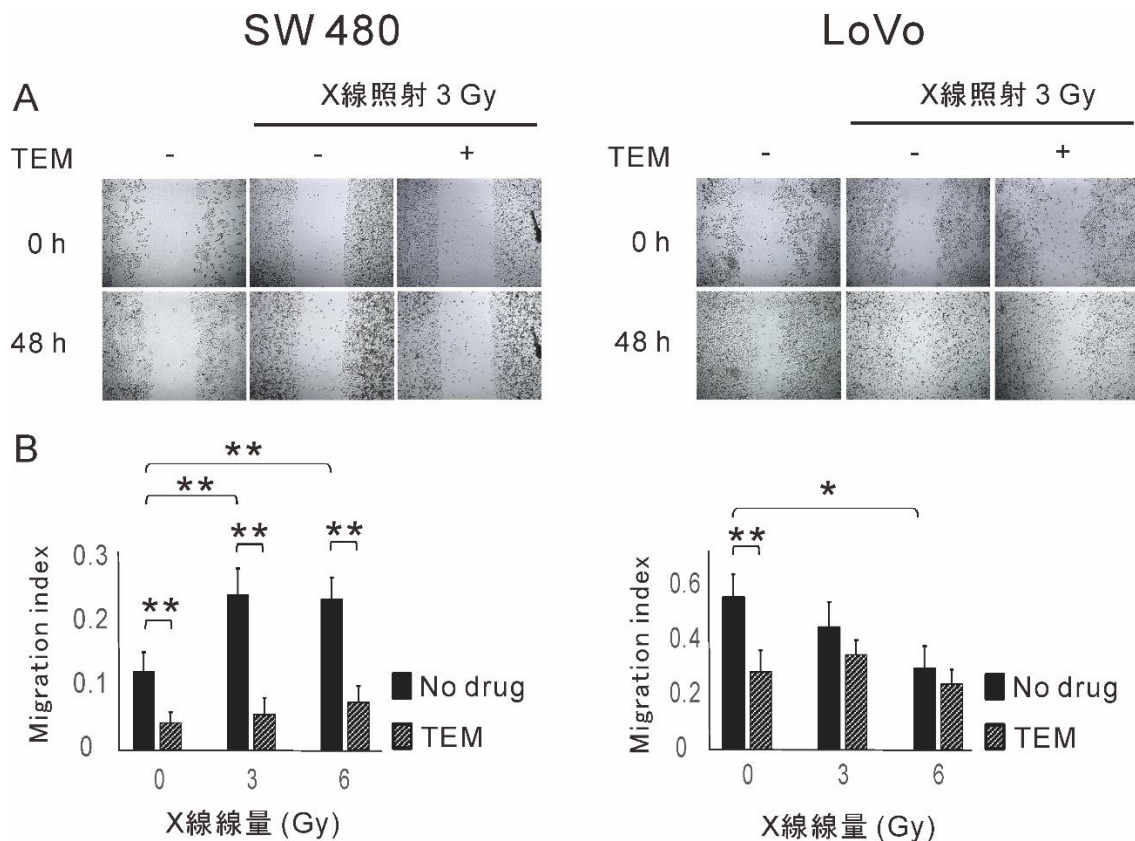


図 28. 大腸癌細胞における、X 線照射による遊走能の変化。

3 Gy、6 Gy の X 線照射およびテムシロリムス (temsirolimus: TEM) 80 nM を加えた大腸癌細胞 SW480 と LoVo に対し、スクラッチアッセイを行った (A)。以下の式で求められる Migration index を、平均値 ± 標準偏差で示す (B)。

Migration index = (搔爬直後の傷の距離 - 搔爬後 48 時間の傷の距離) / 搔爬直後の傷の距離

*; p < 0.05; **; p < 0.01.

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

X線照射による EMT 関連タンパク質の発現変化

次いで、同様の薬剤処理、X線照射を行った SW480 および LoVo 細胞に対し、フローサイトメトリーを用いて EMT 関連タンパク質の発現量を評価した (図 29)。

SW480 細胞においては X線照射により細胞表面 E-カドヘリン発現量は減少し、細胞内ビメンチン発現量は増加したため、X線照射により EMT が誘導されたことが示された。さらに、テムシロリムスを加えることで、それらのタンパク質発現変化は抑制された。一方、LoVo 細胞では、X線照射により E-カドヘリン発現量は増加し、細胞内ビメンチン発現量は減少した。

これらの結果から、X線照射により mTOR 経路が活性化された SW480 細胞においては、EMT を介して遊走能が増加する可能性が示唆された。

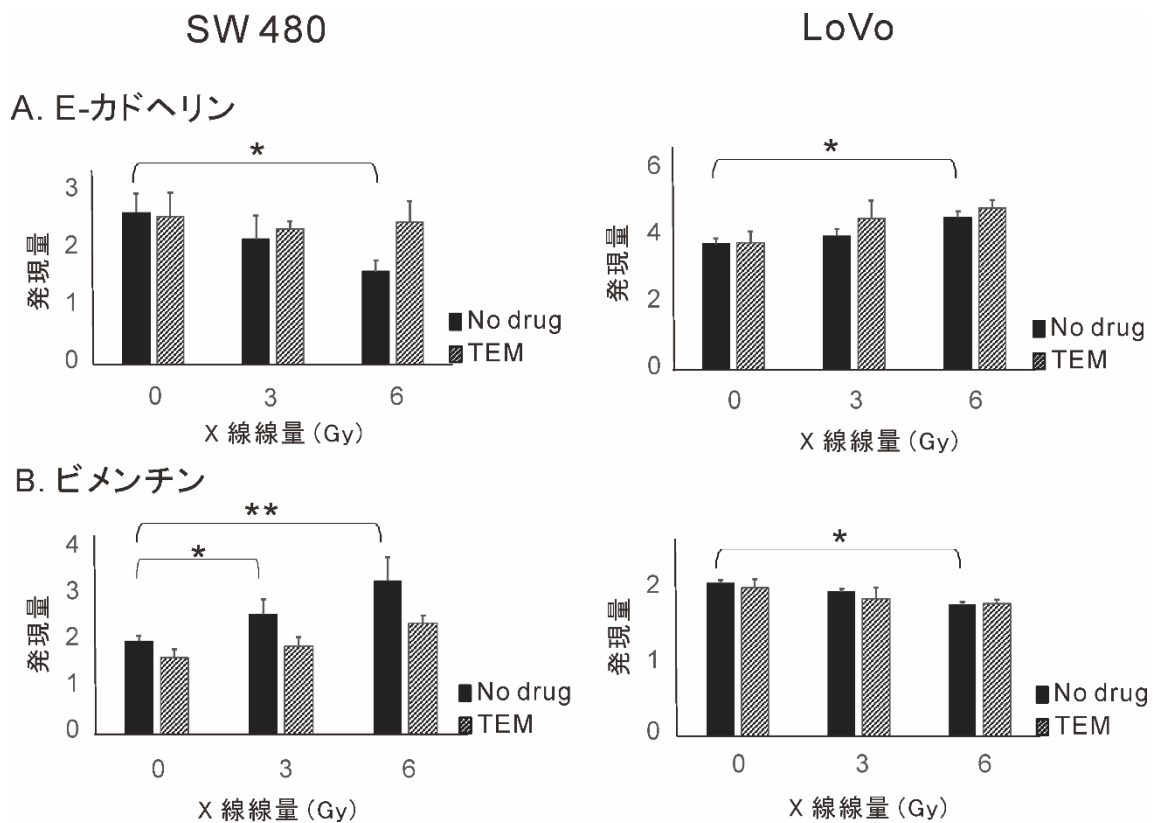


図 29. 大腸癌細胞における、X 線照射による EMT 関連タンパク質の発現変化
 大腸癌細胞 SW480 と LoVo に 3 Gy、6 Gy の X 線照射およびテムシロリムス (temsirolimus: TEM) 80 nM を加え、24 時間後に細胞表面 E-カドヘリン発現量 (A) および細胞内ビメンチン発現量 (B) を、フローサイトメトリーを用いて評価した。各タンパク質発現量を平均値 ± 標準偏差で示す。

*; $p < 0.05$; **; $p < 0.01$.

Cancer Science. 2020 (DOI: 10.1111/cas.14332) より引用

小括 2-2				
	X線		X線 + TEM	
	p-S6	EMT	p-S6	EMT
SW480	↑	↑	↓	↓
LoVo	↓	↓	↓	↓

図 30. 小括 2-2

TEM, temsirolimus; EMT, epithelial to mesenchymal transition.

2-4 考察

大腸癌切除検体を用いて mTOR 関連タンパク質に対する免疫染色を行ったところ、CRT 群における p-mTOR の染色スコアは非 CRT 群に比べて高かったため、術前 CRT により p-mTOR の発現が亢進したことが考えられた (図 23)。一方、p-S6 の染色スコアは CRT 群、非 CRT 群で差を認めなかった。2 つの大腸癌細胞を用いた *in vitro* の検討では、SW480 細胞では X 線照射により p-S6 が増加したが LoVo 細胞では逆に減少したため、大腸癌細胞には X 線照射により p-S6 が増加する細胞と減少する細胞が存在することが示唆された (図 26, 27)。従って、術前 CRT により p-S6 が増加した症例と減少した症例が存在したことが、本研究において CRT 群と非 CRT 群の p-S6 発現量が変わらなかった原因であると考えられた。ただし、臨床研究においては化学療法が併用されているため、化学療法による mTOR 経路への影響は今後検討する必要がある。

X 線照射による mTOR 経路の活性変化は p53 タンパク質の機能によるものとされている [74]。TP53 遺伝子に変異のない癌細胞では、X 線照射による DNA 障害に反応して p53 タンパク質の転写が亢進され、それが mTOR の抑制経路である AMP-responsive protein kinase (AMPK) や phosphatase and tensin homolog (PTEN) を活性化させることにより mTOR 経路を抑制する [74-76]。しかし、TP53 遺伝子に変異を有する癌細胞では、非機能性の p53 タンパク質によりこれらの X 線照射に対する反応は障害されており、mTOR 経路は十分に抑制されないことが知られている (図 31) [77,

78]。実際、本研究、過去の研究において X 線照射により mTOR 経路が抑制された LoVo 細胞、HCT116 細胞は野生型 TP53 であり、mTOR 経路が活性化された SW480 細胞、HT29 細胞は変異型 TP53 である [73]。また、癌細胞に対する高エネルギー照射はストレス応答タンパク質である p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) の産生を介して AKT が活性化され、mTOR 経路が活性化することが知られている [79]。このことから、SW480 細胞および HT29 細胞においては、p53 機構の破綻により mTOR 経路の抑制経路が働かず p38 を介した mTOR 経路の活性経路が優位となったことが、X 線照射後に mTOR 経路が活性化した原因ではないかと考えられた。

術前治療のない大腸癌を用いた過去の検討において、p-mTOR 発現量は癌の進行度が増す毎に増加するという報告があるが [80]、一方で、癌の進行度と関連がなかったとする報告もあり [81]、mTOR 経路の活性程度と癌の進行度との関連性は不明である。当研究では、CRT 群、非 CRT 群のいずれにおいても、ほとんどの臨床病理学的因子は p-mTOR, p-S6 の発現程度と関連しなかった (表 3)。なお、非 CRT 群において、p-mTOR 高発現の症例は低発現の症例に比べリンパ節転移の頻度が低いという結果であったが、これは過去の報告とは逆の結果である [80]。また、CRT 群においては p-S6 高発現の症例は低発現の症例に比べ女性の割合が多いという結果であったが、これまでに性差による予後の違いや mTOR 経路活性の違いは報告されていない。従って、これらの有意差が認められた項目に関しては統計上の type 1 エラー

と考えられる。一方、過去の基礎研究において、X線照射により活性化された mTOR 経路は X線治療に対する治療抵抗性として働くことが報告されているが [18-21]、本研究では mTOR 経路活性と CRT の組織学的効果に関連性は認めず、CRT 群に特徴的な p-mTOR および p-S6 の発現パターンは認められなかった。これら臨床病理学的因子と mTOR 経路活性の関連性に関しては、今後症例数を重ね更なる検討が必要である。

次いで、我々は mTOR 経路活性と患者予後との関連性についても評価した (図 24)。非 CRT 群においては、p-mTOR, p-S6 のいずれの発現量も予後との相関を認めず、これは過去の報告と同様であった [81]。また、転移進行大腸癌に対し mTOR 阻害薬を使用した臨床研究では、mTOR 阻害薬単剤では良好な予後が得られておらず [82, 83]、このことから大腸癌において術前治療の影響を受けていない mTOR 経路活性は予後に寄与しない可能性が示唆された。一方、直腸癌における CRT 後の mTOR 経路活性と予後の関連性を検討した報告はこれまでにない。当研究の CRT 群においては、p-mTOR 高発現あるいは p-S6 高発現の症例は、術後生存率には差を認めないものの、無再発生存期間が短く、術後遠隔転移出現が多い傾向にあった。特に p-S6 高発現の症例は有意に術後遠隔転移出現が多く、病理学的深達度と共に術後遠隔転移出現を予測する独立した因子であった (ハザード比 4.51、 $p = 0.02$; 表 4)。なお、CRT 後の mTOR 経路活性と術後生存率の関係性に関しては、死

亡のイベント数が少ないため、今後症例数を重ねた検証が必要と考える。これらの結果から、CRT による mTOR 経路活性、特に S6 活性の変化が、遠隔転移の出現に寄与しているのではないかと考えられ、2 つの大腸癌細胞を用いてこれを検証した。

SW480 細胞においては X 線照射により p-S6 発現量が増加し、それに伴い遊走能が亢進した (図 26-28)。一方、LoVo 細胞においては X 線照射によりむしろそれらは抑制された。そして、mTOR 阻害薬であるテムシロリムスはいずれの細胞においても p-S6 発現量を減少させ、それに伴って遊走能も抑制した。このことから、X 線照射による S6 活性化が癌細胞の遊走能を増加させたことが示唆された。ここで、活性化した mTOR 経路がどのようなメカニズムを経て SW480 細胞の遊走能を向上させたかを検討するために、上皮間葉転換 (EMT) に着目した。癌細胞の EMT において mTOR 経路は重要な役割を担っているとされており、過去の基礎研究の報告では大腸癌細胞、膀胱癌細胞および子宮頸癌細胞などにおいてラパマイシンによる EMT 抑制および転移能抑制が示されている [39, 66, 84, 85]。一方、大腸癌細胞を含めた多くの癌細胞において X 線照射により EMT が誘導されることが報告されているが、そのメカニズムはよく分かっていない [42, 67, 68]。本研究では、SW480 細胞において X 線照射により E-カドヘリンが減少、ビメンチンが増加したため、過去の報告と同様に X 線照射により EMT が誘導されたことが示された。一方、LoVo 細胞では逆に X 線照射により EMT が抑制される傾向にあった。そして、テムシロリムスは SW480 細胞において X 線照射に

よる EMT 誘導を抑制した。これらの結果から、SW480 細胞においては X 線照射により活性化した mTOR 経路が EMT の誘導を介して細胞遊走能を増加させたことが示唆された。ただし、本研究では 2 つの細胞株しか使用していないため、今後、多数の細胞株を使用して検証する必要がある。また、X 線照射による mTOR 経路の活性化を決定付ける因子や、活性化した mTOR 経路が EMT を促進させるメカニズムなども今後の検討が必要である。

mTOR 経路は前述した *TP53* だけでなく、*RAS/RAF* や *PTEN* などの遺伝子からも調整を受けていることが知られている [59, 86, 87]。今後、それらの遺伝子異常と放射線による mTOR 経路の活性変化の関係性を明らかにすることで、患者の遺伝子プロファイルから術後の遠隔転移出現をある程度予測できる可能性があると考えられる [88, 89]。また、CRT により mTOR 経路が活性化し術後遠隔転移が出現する可能性が高い症例に対して、術前に mTOR 阻害薬を使用すること、および術後の補助化学療法を強化することで、術後遠隔転移の出現を抑制できる可能性が考えられる。

本研究の限界については、第一に単施設における限られた症例数の後方視的検討であることである。第二に、CRT 群と非 CRT 群で腫瘍の局在が統一されていないことである。本来であれば、非 CRT 群には術前 CRT を行っていない直腸癌を選択することが最適であると考えられ、今後、術前 CRT を行っていない他施設のデータなどを用いて検証する必要がある。第三に、mTOR 経路活性に対する免疫染色の評価

において定まった方法がなく、今回行った半定量評価が実際にどれほど mTOR 経路活性の程度を正確に反映しているかは不明である点である。第四に、CRT により pCR が得られた症例や少量の腫瘍しか残らなかった症例は臨床研究の対象から除外されているため、本研究は比較的 CRT の効果が悪かった症例を対象としている点である。さらに、今回は臨床検体を用いた検討が中心であり、今後は基礎的な X 線照射による mTOR 経路の活性化のメカニズムおよび活性化した mTOR 経路による遠隔転移形成のメカニズムについて解明する必要がある。

本研究から、大腸癌には CRT により mTOR 経路が活性化する症例と活性化しない症例が存在することが示唆され、活性化する症例は術後の遠隔転移出現のリスクが高い可能性があると考えられた (図 32)。

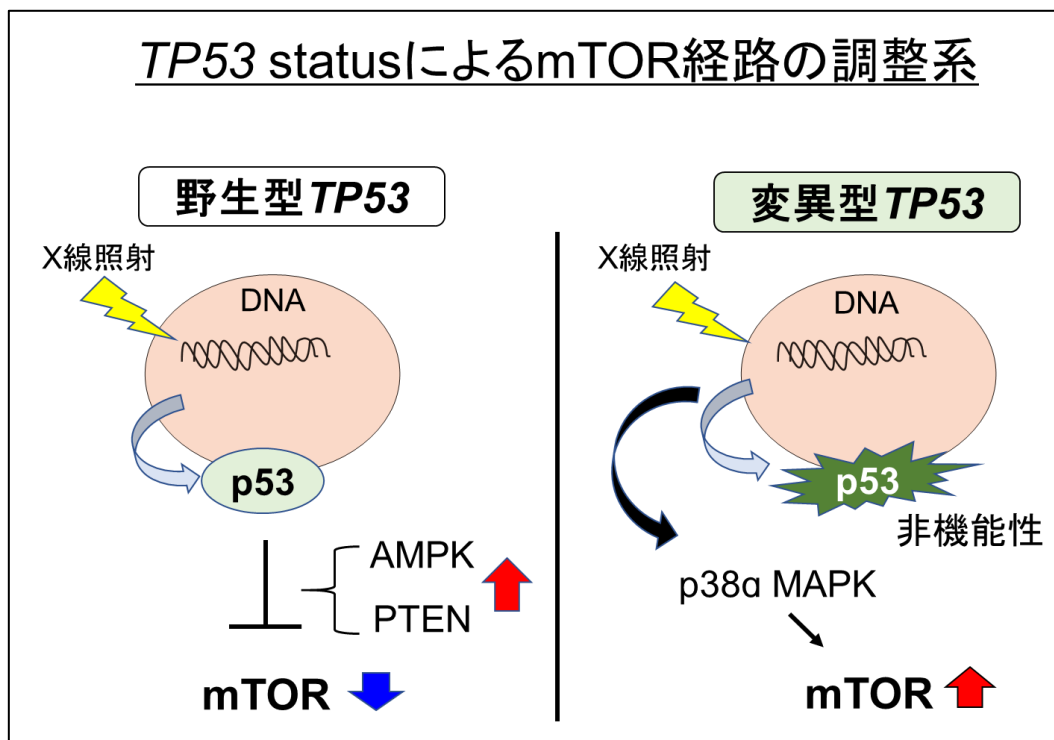


図 31. TP53 status による mTOR 経路の調整

AMPK, AMP-responsive protein kinase; PTEN, phosphatase and tensin homolog; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

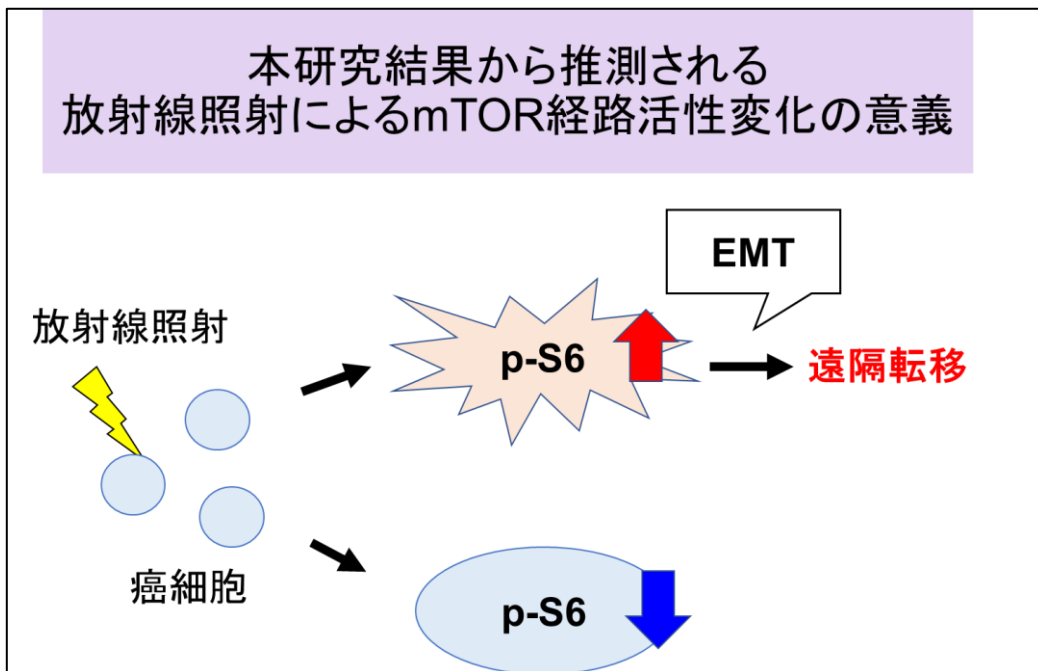


図 32. 本研究結果から推測される、放射線照射による mTOR 経路活性変化の意義
EMT, epithelial to mesenchymal transition.

2-5 小括

局所進行下部直腸癌において、CRT 後 p-S6 高発現の症例は術後遠隔転移出現の頻度が高かった。CRT による mTOR 経路の活性化が直腸癌の術後遠隔転移形成に関与している可能性が考えられた。

総括および今後の課題

本研究では、大腸癌 X 線治療におけるテムシロリムスとクロロキン併用療法の効果と、直腸癌における術前 CRT 後 mTOR 経路活性変化の術後遠隔転移形成における意義の探索を目的とし、基礎研究と後方視的観察研究を行い、以下の結果を得た。

1. 一部の大腸癌細胞では X 線照射により mTOR 経路およびオートファジーが活性化され、mTOR 阻害薬であるテムシロリムスとオートファジー阻害薬であるクロロキンの併用療法はアポトーシスの誘導を介して X 線照射の細胞増殖抑制効果を増強させた。
2. CRT を行った直腸癌において、CRT 後に mTOR 経路が高活性であった症例は術後遠隔転移出現が多かった。CRT による mTOR 経路活性化の有無が EMT を介した直腸癌の転移能向上に関与している可能性が示唆された。

本研究結果およびこれまでの報告から予想される、大腸癌放射線療法における mTOR 経路およびオートファジーの調節系とその臨床的意義を図 33 に示す。癌細胞において p53 機構や RAS シグナルは mTOR 経路活性に大きな影響を与えているこ

とが知られており [74, 78, 90-92]、実臨床においても CRT による mTOR 経路の活性変化はこれらの遺伝子変異により規定される可能性があると考えられる。直腸癌には症例により多様な遺伝子変異があるが [93]、遺伝子変異のタイプと放射線照射による mTOR 経路活性変化のパターンを解明することができれば、将来的には治療前の遺伝子プロファイリングにより放射線治療の効果や予後を予測することができるのではないかと考えられる [88, 89]。また、今回は細胞毎の CRT 後オートファジー活性変化の違いは検討していないが、mTOR と同様にオートファジーも p53 機構と密接に関連していることが知られており [94]、今後オートファジーに関しても同様な遺伝子プロファイリングとの関連性を解明することで、さらに CRT の効果予測が高まるのではないかと考えられる。そして、そのようにして得られた効果予測結果から、本研究で用いたテムシロリムス/クロロキン併用療法を放射線治療と組み合わせることや、CRT 後に化学療法を追加すること [95, 96] などのオーダーメイド治療が有用となることが期待される。本研究結果は、そのような将来的展望を実現するための導入として位置づけられる。今後、当科において更なる検討を継続する予定である。

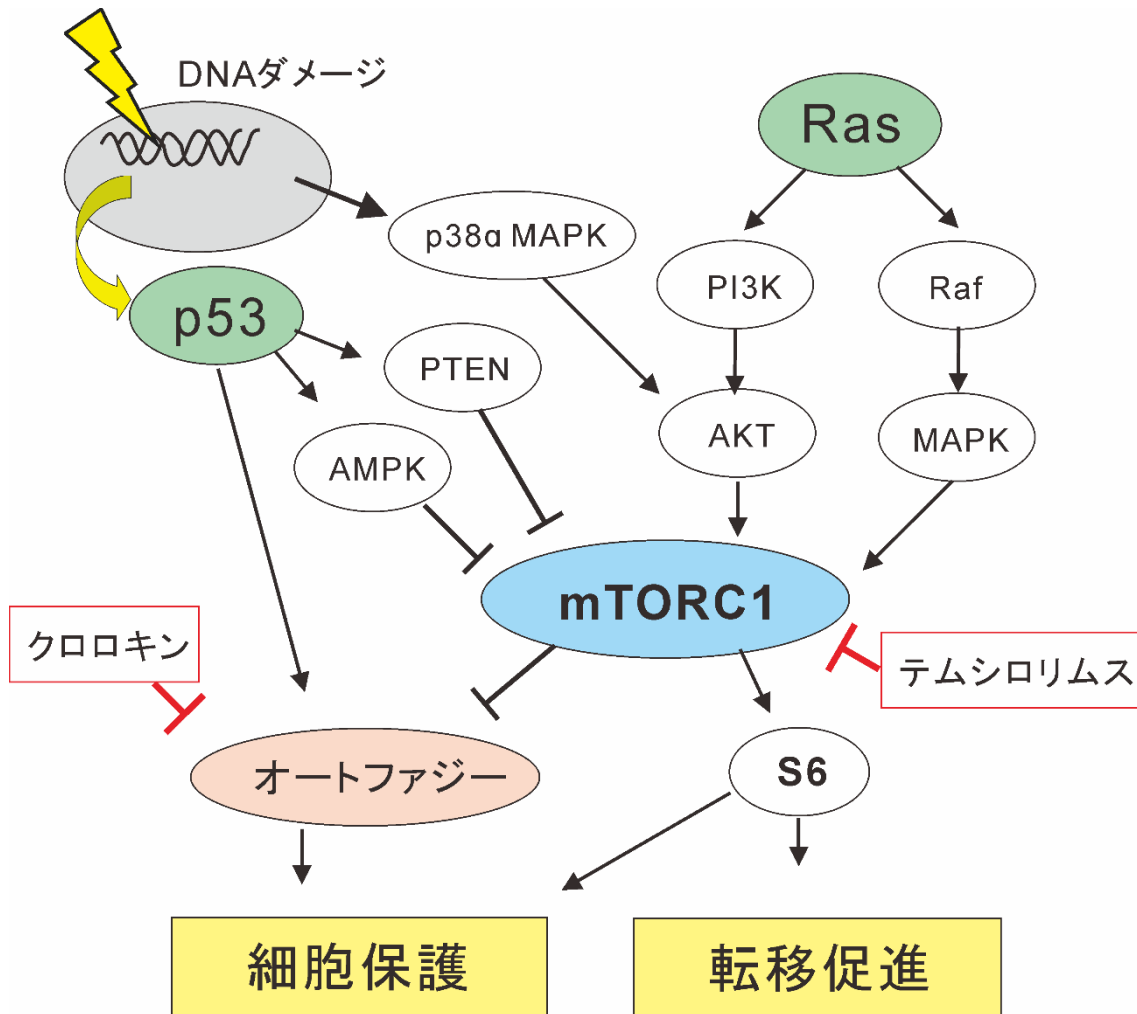


図 33. 放射線照射下における mTOR 経路活性およびオートファジー活性の調節系
 放射線照射後の癌細胞では、p53 が mTOR の抑制経路として、p38 MAPK が活性経路として誘導される。このため、TP53 遺伝子変異は放射線照射後の mTOR 活性変化を決定づける上で重要な因子である。また、mTOR 活性はその他にも RAS/RAF や PTEN などの遺伝子変異にも影響を受ける。放射線照射により活性化された mTORC1 は放射線治療効果を妨げるように働き、同時に癌細胞の転移能を向上させる。一方、放射線照射により p53 や活性酸素の蓄積などを介してオートファジーも誘導される。mTOR と同様に放射線照射により誘導されたオートファジーもまた細胞を保護するように働くと考えられている。そして、mTORC1 はオートファジーの強力な阻害因子である。このように放射線照射後の癌細胞では、様々な因子により mTOR 経路およびオートファジーが調整を受け放射線治療効果を決定づけているものと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 石原聡一郎教授、並びに故 渡邊聡明前教授には研究全般にわたり御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。また、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学 川合一茂講師には研究の概要をはじめ研究の進め方、具体的な実験方法、データの解釈、また論文の作成など、多岐に渡る詳細な御指導を頂き、深く感謝いたします。

また、実際の実験に際しましては、多くの先生方に多大なる御協力を頂きました。ここに深甚なる謝意を表します。

引用文献

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*; 69: 7-34.2019.
2. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 2. 2019: Rectal cancer. Accessed Jun 19, 2019.
3. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rodel C, Cervantes A, Arnold D. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*; 28: iv22-iv40.2017.
4. Hashiguchi Y, Muro K, Saito Y, Ito Y, Ajioka Y, Hamaguchi T, Hasegawa K, Hotta K, Ishida H, Ishiguro M, Ishihara S, Kanemitsu Y, Kinugasa Y, Murofushi K, Nakajima TE, Oka S, Tanaka T, Taniguchi H, Tsuji A, Uehara K, Ueno H, Yamanaka T, Yamazaki K, Yoshida M, Yoshino T, Itabashi M, Sakamaki K, Sano K, Shimada Y, Tanaka S, Uetake H, Yamaguchi S, Yamaguchi N, Kobayashi H, Matsuda K, Kotake K, Sugihara K. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer. *International journal of clinical oncology* 2019.
5. van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EM, Putter H, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van de Velde CJ. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *The Lancet Oncology*; 12: 575-82.2011.
6. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Ollier JC. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The New England journal of medicine*; 355: 1114-23.2006.
7. Nagawa H, Muto T, Sunouchi K, Higuchi Y, Tsurita G, Watanabe T, Sawada T. Randomized, controlled trial of lateral node dissection vs. nerve-preserving resection in patients with rectal cancer after preoperative radiotherapy. *Diseases of the colon and rectum*; 44: 1274-80.2001.
8. Kim MJ, Chan Park S, Kim TH, Kim DY, Kim SY, Baek JY, Chang HJ, Park JW, Oh JH. Is lateral pelvic node dissection necessary after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer patients with initially suspected lateral pelvic node? *Surgery*; 160: 366-76.2016.

9. Ishihara S, Kawai K, Tanaka T, Kiyomatsu T, Hata K, Nozawa H, Morikawa T, Watanabe T. Oncological Outcomes of Lateral Pelvic Lymph Node Metastasis in Rectal Cancer Treated With Preoperative Chemoradiotherapy. *Diseases of the colon and rectum*; 60: 469-76.2017.
10. Martin ST, Heneghan HM, Winter DC. Systematic review and meta-analysis of outcomes following pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *The British journal of surgery*; 99: 918-28.2012.
11. van der Valk MJM, Hilling DE, Bastiaannet E, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Beets GL, Figueiredo NL, Habr-Gama A, Perez RO, Renehan AG, van de Velde CJH. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet (London, England)*; 391: 2537-45.2018.
12. O'Connell MJ, Colangelo LH, Beart RW, Petrelli NJ, Allegra CJ, Sharif S, Pitot HC, Shields AF, Landry JC, Ryan DP, Parda DS, Mohiuddin M, Arora A, Evans LS, Bahary N, Soori GS, Eakle J, Robertson JM, Moore DF, Jr., Mullane MR, Marchello BT, Ward PJ, Wozniak TF, Roh MS, Yothers G, Wolmark N. Capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multimodality treatment of rectal cancer: surgical end points from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trial R-04. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*; 32: 1927-34.2014.
13. Asli LM, Johannesen TB, Myklebust TA, Moller B, Eriksen MT, Guren MG. Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer and impact on outcomes - A population-based study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*; 123: 446-53.2017.
14. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab HR, Villanueva MT, Witzigmann H, Wittekind C, Beissbarth T, Rodel C. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*; 30: 1926-33.2012.
15. Rodel C, Graeven U, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Arnold D, Hofheinz RD, Ghadimi M, Wolff HA, Lang-Welzenbach M, Raab HR, Wittekind C, Strobel P, Staib L, Wilhelm M, Grabenbauer GG, Hoffmanns H, Lindemann F, Schlenska-Lange A, Folprecht G, Sauer R, Liersch T. Oxaliplatin added to fluorouracil-based

- preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*; 16: 979-89.2015.
16. Kawai K, Sunami E, Hata K, Tanaka T, Nishikawa T, Otani K, Sasaki K, Nozawa H. Phase I/II Study of Preoperative Chemoradiotherapy With TEGAFIRI for Locally Advanced Rectal Cancer. *Clinical colorectal cancer*; 17: 240-6.2018.
 17. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*; 168: 960-76.2017.
 18. Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer research*; 62: 4671-7.2002.
 19. Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*; 5: 1183-9.2006.
 20. Chen H, Ma Z, Vanderwaal RP, Feng Z, Gonzalez-Suarez I, Wang S, Zhang J, Roti Roti JL, Gonzalo S, Zhang J. The mTOR inhibitor rapamycin suppresses DNA double-strand break repair. *Radiation research*; 175: 214-24.2011.
 21. Chang L, Graham PH, Hao J, Ni J, Bucci J, Cozzi PJ, Kearsley JH, Li Y. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. *Cell death & disease*; 5: e1437.2014.
 22. Gaubitz C, Prouteau M, Kusmider B, Loewith R. TORC2 Structure and Function. *Trends in biochemical sciences*; 41: 532-45.2016.
 23. Li S, Kong Y, Si L, Chi Z, Cui C, Sheng X, Guo J. Phosphorylation of mTOR and S6RP predicts the efficacy of everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BMC cancer*; 14: 376.2014.
 24. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grunwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Kay A, Ravaud A. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma : final results and analysis of prognostic factors. *Cancer*; 116: 4256-65.2010.
 25. Yardley DA, Noguchi S, Pritchard KI, Burris HA, 3rd, Baselga J, Gnant M, Hortobagyi GN, Campone M, Pistilli B, Piccart M, Melichar B, Petrakova K, Arena FP, Erdkamp F, Harb WA, Feng W, Cahana A, Taran T, Lebwohl D, Rugo HS. Everolimus plus exemestane in postmenopausal patients with HR(+) breast cancer: BOLERO-2 final progression-free survival analysis. *Advances in therapy*;

- 30: 870-84.2013.
26. Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, Tomasek J, Raderer M, Lahner H, Voi M, Pacaud LB, Rouyre N, Sachs C, Valle JW, Fave GD, Van Cutsem E, Tesselaar M, Shimada Y, Oh DY, Strosberg J, Kulke MH, Pavel ME. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet (London, England)*; 387: 968-77.2016.
 27. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of clinical investigation*; 125: 25-32.2015.
 28. Rosich L, Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Campo E, Colomer D, Roue G. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*; 18: 5278-89.2012.
 29. Chaurasia M, Bhatt AN, Das A, Dwarakanath BS, Sharma K. Radiation-induced autophagy: mechanisms and consequences. *Free radical research*; 50: 273-90.2016.
 30. Hu L, Wang H, Huang L, Zhao Y, Wang J. Crosstalk between autophagy and intracellular radiation response (Review). *International journal of oncology*; 49: 2217-26.2016.
 31. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *International journal of molecular sciences*; 18:2017.
 32. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer research*; 61: 439-44.2001.
 33. Nishikawa T, Tsuno NH, Okaji Y, Shuno Y, Sasaki K, Hongo K, Sunami E, Kitayama J, Takahashi K, Nagawa H. Inhibition of autophagy potentiates sulforaphane-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Annals of surgical oncology*; 17: 592-602.2010.
 34. Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Tsurita G, Kawai K, Okaji Y, Nishikawa T, Shuno Y, Hongo K, Hiyoshi M, Kaneko M, Kitayama J, Takahashi K, Nagawa H. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC cancer*; 10: 370.2010.
 35. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*; 17: 654-66.2011.
 36. Chude CI, Amaravadi RK. Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *International journal of molecular sciences*; 18:2017.

37. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL, Roumier T, Perfettini JL, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*; 22: 3927-36.2003.
38. Shi TT, Yu XX, Yan LJ, Xiao HT. Research progress of hydroxychloroquine and autophagy inhibitors on cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*; 79: 287-94.2017.
39. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, Evers BM. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer research*; 71: 3246-56.2011.
40. Buijsen J, van den Bogaard J, Jutten B, Belgers E, Sosef M, Leijtens JW, Beets GL, Jansen RL, Riedl RG, Clarijs R, Lammering G, Lambin P. A phase I-II study on the combination of rapamycin and short course radiotherapy in rectal cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*; 116: 214-20.2015.
41. Kaneko M, Nozawa H, Hiyoshi M, Tada N, Murono K, Nirei T, Emoto S, Kishikawa J, Iida Y, Sunami E, Tsuno NH, Kitayama J, Takahashi K, Watanabe T. Temsirolimus and chloroquine cooperatively exhibit a potent antitumor effect against colorectal cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*; 140: 769-81.2014.
42. Zhou YC, Liu JY, Li J, Zhang J, Xu YQ, Zhang HW, Qiu LB, Ding GR, Su XM, Mei S, Guo GZ. Ionizing radiation promotes migration and invasion of cancer cells through transforming growth factor-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition. *International journal of radiation oncology, biology, physics*; 81: 1530-7.2011.
43. Bastos LG, de Marcondes PG, de-Freitas-Junior JC, Leve F, Mencalha AL, de Souza WF, de Araujo WM, Tanaka MN, Abdelhay ES, Morgado-Diaz JA. Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT-like phenotype and activate Wnt/beta-catenin pathway. *Journal of cellular biochemistry*; 115: 2175-87.2014.
44. Sclafani F, Wilson SH, Cunningham D, Gonzalez De Castro D, Kalaitzaki E, Begum R, Wotherspoon A, Capdevila J, Glimelius B, Rosello S, Thomas J, Tait D, Brown G, Oates J, Chau I. Analysis of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and TP53 mutations in a large prospective series of locally advanced rectal cancer patients. *International journal of cancer*; 146: 94-102.2020.

45. Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, Sone K, Fukuda T, Inaba K, Makii C, Enomoto A, Hosoya N, Tanikawa M, Uehara Y, Arimoto T, Kuramoto H, Wada-Hiraike O, Miyagawa K, Yano T, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. PI3K/mTOR pathway inhibition overcomes radioresistance via suppression of the HIF1-alpha/VEGF pathway in endometrial cancer. *Gynecologic oncology*; 138: 174-80.2015.
46. Mo N, Lu YK, Xie WM, Liu Y, Zhou WX, Wang HX, Nong L, Jia YX, Tan AH, Chen Y, Li SS, Luo BH. Inhibition of autophagy enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma by reducing Rad51 expression. *Oncology reports*; 32: 1905-12.2014.
47. Sun Q, Liu T, Yuan Y, Guo Z, Xie G, Du S, Lin X, Xu Z, Liu M, Wang W, Yuan Q, Chen L. MiR-200c inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in breast cancer cells by targeting UBQLN1. *International journal of cancer*; 136: 1003-12.2015.
48. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer research*; 68: 1485-94.2008.
49. Tang J, Di J, Cao H, Bai J, Zheng J. p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy. *Cancer letters*; 363: 101-7.2015.
50. Cao C, Subhawong T, Albert JM, Kim KW, Geng L, Sekhar KR, Gi YJ, Lu B. Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer research*; 66: 10040-7.2006.
51. Manegold PC, Paringer C, Kulka U, Krimmel K, Eichhorn ME, Wilkowski R, Jauch KW, Guba M, Bruns CJ. Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (Everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer. *Clin Cancer Res*; 14: 892-900.2008.
52. Schonewolf CA, Mehta M, Schiff D, Wu H, Haffty BG, Karantza V, Jabbour SK. Autophagy inhibition by chloroquine sensitizes HT-29 colorectal cancer cells to concurrent chemoradiation. *World journal of gastrointestinal oncology*; 6: 74-82.2014.
53. Yan C, Luo L, Goto S, Urata Y, Guo CY, Doi H, Kitazato K, Li TS. Enhanced autophagy in colorectal cancer stem cells does not contribute to radio-resistance. *Oncotarget*; 7: 45112-21.2016.
54. Loehberg CR, Strissel PL, Dittrich R, Strick R, Dittmer J, Dittmer A, Fabry B, Kalender WA, Koch T, Wachter DL, Groh N, Polier A, Brandt I, Lotz L, Hoffmann I, Koppitz F, Oeser S, Mueller A, Fasching PA, Lux MP, Beckmann MW,

- Schrauder MG. Akt and p53 are potential mediators of reduced mammary tumor growth by chloroquine and the mTOR inhibitor RAD001. *Biochemical pharmacology*; 83: 480-8.2012.
55. Enzenmuller S, Gonzalez P, Debatin KM, Fulda S. Chloroquine overcomes resistance of lung carcinoma cells to the dual PI3K/mTOR inhibitor PI103 by lysosome-mediated apoptosis. *Anti-cancer drugs*; 24: 14-9.2013.
 56. Seitz C, Hugle M, Cristofanon S, Tchoghandjian A, Fulda S. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and chloroquine synergize to trigger apoptosis via mitochondrial-lysosomal cross-talk. *International journal of cancer*; 132: 2682-93.2013.
 57. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology*; 24: 200-16.2004.
 58. Gulhati P, Cai Q, Li J, Liu J, Rychahou PG, Qiu S, Lee EY, Silva SR, Bowen KA, Gao T, Evers BM. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*; 15: 7207-16.2009.
 59. Francipane MG, Lagasse E. mTOR pathway in colorectal cancer: an update. *Oncotarget*; 5: 49-66.2014.
 60. Lakhter AJ, Sahu RP, Sun Y, Kaufmann WK, Androphy EJ, Travers JB, Naidu SR. Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *The Journal of investigative dermatology*; 133: 2247-54.2013.
 61. Rangwala R, Chang YC, Hu J, Algazy KM, Evans TL, Fecher LA, Schuchter LM, Torigian DA, Panosian JT, Troxel AB, Tan KS, Heitjan DF, DeMichele AM, Vaughn DJ, Redlinger M, Alavi A, Kaiser J, Pontiggia L, Davis LE, O'Dwyer PJ, Amaravadi RK. Combined MTOR and autophagy inhibition: phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy*; 10: 1391-402.2014.
 62. Seiwert N, Neitzel C, Stroh S, Frisan T, Audebert M, Toulany M, Kaina B, Fahrer J. AKT2 suppresses pro-survival autophagy triggered by DNA double-strand breaks in colorectal cancer cells. *Cell death & disease*; 8: e3019.2017.
 63. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathology, research and practice*; 211: 557-69.2015.

64. Chang L, Graham PH, Hao J, Ni J, Bucci J, Cozzi PJ, Kearsley JH, Li Y. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell death & disease*; 4: e875.2013.
65. Kim EY, Kim A, Kim SK, Kim HJ, Chang J, Ahn CM, Chang YS. Inhibition of mTORC1 induces loss of E-cadherin through AKT/GSK-3 β signaling-mediated upregulation of E-cadherin repressor complexes in non-small cell lung cancer cells. *Respiratory research*; 15: 26.2014.
66. Zong H, Yin B, Zhou H, Cai D, Ma B, Xiang Y. Inhibition of mTOR pathway attenuates migration and invasion of gallbladder cancer via EMT inhibition. *Molecular biology reports*; 41: 4507-12.2014.
67. Kawamoto A, Yokoe T, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Radiation induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Oncology reports*; 27: 51-7.2012.
68. Lin S, Chen S, Chen Z, Dai Q, Ke C. X-ray-induced epithelial-mesenchymal transition in SW480 colorectal cancer cells and its potential mechanisms. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*; 22: 1457-62.2017.
69. Moncharmont C, Levy A, Guy JB, Falk AT, Guilbert M, Trone JC, Alphonse G, Gilormini M, Ardail D, Toillon RA, Rodriguez-Lafrasse C, Magne N. Radiation-enhanced cell migration/invasion process: a review. *Critical reviews in oncology/hematology*; 92: 133-42.2014.
70. de Marcondes PG, Morgado-Diaz JA. The Role of EphA4 Signaling in Radiation-Induced EMT-Like Phenotype in Colorectal Cancer Cells. *Journal of cellular biochemistry*; 118: 442-5.2017.
71. Lee H. Phosphorylated mTOR Expression Profiles in Human Normal and Carcinoma Tissues. *Disease markers*; 2017: 1397063.2017.
72. Shim BY, Sun S, Won HS, Lee MA, Hong SU, Jung JH, Cho HM, Ko YH. Role of autophagy-related protein expression in patients with rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *BMC cancer*; 16: 207.2016.
73. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*; 2: e71.2013.
74. Hasty P, Sharp ZD, Curiel TJ, Campisi J. mTORC1 and p53: clash of the gods? *Cell cycle (Georgetown, Tex)*; 12: 20-5.2013.
75. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*; 149: 274-93.2012.

76. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S, Mak TW. Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular cell*; 8: 317-25.2001.
77. Leontieva OV, Novototskaya LR, Paszkiewicz GM, Komarova EA, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Dysregulation of the mTOR pathway in p53-deficient mice. *Cancer biology & therapy*; 14: 1182-8.2013.
78. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer research*; 67: 3043-53.2007.
79. Kim MJ, Byun JY, Yun CH, Park IC, Lee KH, Lee SJ. c-Src-p38 mitogen-activated protein kinase signaling is required for Akt activation in response to ionizing radiation. *Molecular cancer research : MCR*; 6: 1872-80.2008.
80. Lu Q, Wang J, Yu G, Guo T, Hu C, Ren P. Expression and clinical significance of mammalian target of rapamycin/P70 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in human colorectal carcinoma tissue. *Oncology letters*; 10: 277-82.2015.
81. Melling N, Simon R, Izbicki JR, Terracciano LM, Bokemeyer C, Sauter G, Marx AH. Expression of phospho-mTOR kinase is abundant in colorectal cancer and associated with left-sided tumor localization. *International journal of clinical and experimental pathology*; 8: 7009-15.2015.
82. Ng K, Tabernero J, Hwang J, Bajetta E, Sharma S, Del Prete SA, Arrowsmith ER, Ryan DP, Sedova M, Jin J, Malek K, Fuchs CS. Phase II study of everolimus in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma previously treated with bevacizumab-, fluoropyrimidine-, oxaliplatin-, and irinotecan-based regimens. *Clin Cancer Res*; 19: 3987-95.2013.
83. Spindler KL, Sorensen MM, Pallisgaard N, Andersen RF, Havelund BM, Ploen J, Lassen U, Jakobsen AK. Phase II trial of temsirolimus alone and in combination with irinotecan for KRAS mutant metastatic colorectal cancer: outcome and results of KRAS mutational analysis in plasma. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*; 52: 963-70.2013.
84. Roshan MK, Soltani A, Soleimani A, Kahkhaie KR, Afshari AR, Soukhtanloo M. Role of AKT and mTOR Signaling Pathways in the Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Process. *Biochimie* 2019.
85. Cheng KY, Hao M. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Regulates Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1)-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Decreased Pyruvate Kinase M2 (PKM2) Expression in Cervical Cancer Cells. *Medical science monitor : international medical journal*

- of experimental and clinical research*; 23: 2017-28.2017.
86. He K, Chen D, Ruan H, Li X, Tong J, Xu X, Zhang L, Yu J. BRAFV600E-dependent Mcl-1 stabilization leads to everolimus resistance in colon cancer cells. *Oncotarget*; 7: 47699-710.2016.
 87. Yi Z, Ma F. Biomarkers of Everolimus Sensitivity in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Journal of breast cancer*; 20: 321-6.2017.
 88. Peng J, Ma W, Zhou Z, Gu Y, Lu Z, Zhang R, Pan Z. Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway predict tumor response and disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy and radical surgery. *Journal of Cancer*; 9: 1067-77.2018.
 89. Chow OS, Kuk D, Keskin M, Smith JJ, Camacho N, Pelossof R, Chen CT, Chen Z, Avila K, Weiser MR, Berger MF, Patil S, Bergsland E, Garcia-Aguilar J. KRAS and Combined KRAS/TP53 Mutations in Locally Advanced Rectal Cancer are Independently Associated with Decreased Response to Neoadjuvant Therapy. *Annals of surgical oncology*; 23: 2548-55.2016.
 90. Nagata Y, Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Ohnishi T, Tojo T, 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: 1001-10.2010.
 91. Christy B, Demaria M, Campisi J, Huang J, Jones D, Dodds SG, Williams C, Hubbard G, Livi CB, Gao X, Weintraub S, Curiel T, Sharp ZD, Hasty P. p53 and rapamycin are additive. *Oncotarget*; 6: 15802-13.2015.
 92. Di Nicolantonio F, Arena S, Tabernero J, Grosso S, Molinari F, Macarulla T, Russo M, Cancelliere C, Zecchin D, Mazzucchelli L, Sasazuki T, Shirasawa S, Geuna M, Frattini M, Baselga J, Gallicchio M, Biffo S, Bardelli A. Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. *The Journal of clinical investigation*; 120: 2858-66.2010.
 93. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa EMF, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*; 21: 1350-6.2015.
 94. Cordani M, Butera G, Pacchiana R, Donadelli M. Molecular interplay between

- mutant p53 proteins and autophagy in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*; 1867: 19-28.2017.
95. Garcia-Aguilar J, Chow OS, Smith DD, Marcet JE, Cataldo PA, Varma MG, Kumar AS, Oommen S, Coutsoftides T, Hunt SR, Stamos MJ, Ternent CA, Herzig DO, Fichera A, Polite BN, Dietz DW, Patil S, Avila K. Effect of adding mFOLFOX6 after neoadjuvant chemoradiation in locally advanced rectal cancer: a multicentre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*; 16: 957-66.2015.
96. Habr-Gama A, Perez RO, Sao Juliao GP, Proscurshim I, Fernandez LM, Figueiredo MN, Gama-Rodrigues J, Buchpiguel CA. Consolidation chemotherapy during neoadjuvant chemoradiation (CRT) for distal rectal cancer leads to sustained decrease in tumor metabolism when compared to standard CRT regimen. *Radiation oncology (London, England)*; 11: 24.2016.