

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 白鳥 広志

【研究の目的】直腸癌に対しては、腫瘍の局所制御を目的とした術前化学放射線療法 (Chemoradiotherapy: CRT) を行うことが一般的である。これまで、術前 CRT による腫瘍の局所制御効果の増強と予後の改善を目的とした研究が盛んに行われてきたが、既存の化学療法をベースとした CRT では十分な成績は示されていない。そこで我々は、細胞内タンパクリン酸化経路の一つである phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (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。癌細胞における mTOR 経路の活性化は、増殖能、転移能の亢進に関与するとされている。一方、癌細胞におけるオートファジー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。第 1 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およびオートファジー阻害薬であるクロロキンが放射線治療による局所制御効果を増強し得るかどうか、*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、この *in vitro* の実験系における X 線照射による mTOR 経路の活性変化が実臨床においても普遍的に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、この章では放射線照射による mTOR 経路の活性変化と術後遠隔転移出現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

【背景】過去の報告では、一部の癌細胞において mTOR 経路が X 線照射により活性化することが示されており、活性化した mTOR 経路は X 線抵抗性に寄与すると考えられている。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 CRT と組み合わせた phase 1-2 臨床試験では、既存の CRT に比べ良好な奏効率が得られなかった。一方、mTOR を阻害すること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。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ス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。そこで本章では、テムシロリムスとクロロキン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。

**【実験方法】** ヒト大腸癌細胞 (SW480, HT29) に対して 4 Gy の X 線照射を行い、mTOR 経路活性およびオートファジー活性の変化を経時的に評価した。mTOR 経路活性は mTOR 下流タンパク質のリン酸化アイソフォーム (p-S6, p-4EBP-1) の発現量を評価した。オートファジー活性はその関連タンパク質の発現量と酸性オルガネラの蓄積量を評価した。次いで、各細胞を薬剤処理なし、テムシロリムス (80 nM) 単剤処理、クロロキン (20  $\mu$ M) 単剤処理、およびテムシロリムス (80 nM) + クロロキン (20  $\mu$ M) 併用処理した群に分けた後 0-6 Gy の X 線照射を行い、Clonogenic assay を用いて各薬剤の X 線増感作用を評価した。また、4 Gy の X 線照射後の各群における mTOR 経路活性およびオートファジー活性を上述の通り評価し、さらにアポトーシス細胞率およびカスパーゼ活性を評価した。

**【結果】** 大腸癌細胞 (SW480, HT29) において、X 線照射後に mTOR 経路は活性化し、またオートファジーも誘導された。Clonogenic assay では、テムシロリムス単剤およびクロロキン単剤処理における X 線の細胞増殖抑制効果は弱かったが、テムシロリムスとクロロキンの併用処理は X 線の細胞増殖抑制効果を相乗的に増強させた。テムシロリムス単剤は mTOR 経路を抑制したがオートファジーを亢進させ、クロロキン単剤はオートファジーを抑制したが mTOR 経路活性には影響を及ぼさなかった。一方、テムシロリムスとクロロキンの併用により mTOR 経路活性とオートファジーはいずれも抑制した。また、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おいて著明なアポトーシスの誘導が認められた。これらの結果は SW480, HT29 のいずれの細胞においても同様に認められた。

**【考察】** 大腸癌細胞 (SW480, HT29) において X 線照射により mTOR 経路およびオートファジーが活性化し、これらは各細胞において X 線抵抗性に働いていると考えられた。そして、テムシロリムスとクロロキンの併用は mTOR 経路とオートファジーを阻害し、X 線照射によるアポトーシスの誘導効果を増強させ、X 線感受性を増強させた。したがって、テムシロリムスとクロロキンの併用療法は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。

## 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

**【背景】** 第 1 章では二つの大腸癌細胞 (SW480, HT29) 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) 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。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照射後に mTOR 経路が活性化するかどうか、臨床検体を用いて検証する必要がある。また、癌細胞における mTOR 経路の活性化は上皮間葉転換 (EMT) を介して遠隔転移の形成を促進することが報告されている。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

能に影響を与えるかどうかは不明である。今回我々は、放射線照射により活性化した mTOR 経路が EMT の誘導を介して癌細胞の転移能を増強させ、そして放射線照射による 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】** 進行大腸癌の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未染標本を切り出し、p-mTOR および p-S6 に対する免疫染色を行った。東京大学医学部附属病院大腸肛門外科では cStage II/III の進行大腸癌のうち下部直腸癌症例に対しては術前 CRT の後に手術を行い、その他の大腸癌症例に対しては術前治療を行わず根治手術を行っている。したがって、CRT 後の mTOR 経路活性を評価するために術前 CRT を行った直腸癌 98 症例 (2003 年 1 月から 2013 年 12 月までに手術) を CRT 群、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 80 症例 (2012 年 1 月から同年 12 月までに手術) を非 CRT 群とした。各タンパク質に対する染色性の評価は半定量スコアリング法を用いて行い、患者の臨床病理学的因子や予後との関連につき評価を行った。また、ヒト大腸癌細胞 (SW480、LoVo) を用いて *in vitro* の実験を行った。テムシロリムス (80 nM) 処理/非処理の細胞群に 3, 6 Gy の X 線照射を行い、p-S6 発現量、細胞遊走能、および EMT 関連タンパク発現量を評価した。

**【結果】** CRT 群における p-mTOR の染色スコアは非 CRT 群のものより有意に高かった ( $p < 0.001$ )。CRT 群、非 CRT 群のいずれにおいても、p-mTOR および p-S6 の染色性は腫瘍部位や癌の進行度、CRT の組織学的効果などのほとんどの因子とは関連しなかった。また、非 CRT 群においては p-mTOR、p-S6 の染色性は患者予後と関連しなかった。一方、CRT 群においてはこれらのタンパク質の染色スコアが高い症例は術後遠隔転移の出現が多い傾向にあり、特に p-S6 高染色性は CRT 群における術後遠隔転移の出現を予測する独立した因子であった (HR 4.51,  $p = 0.002$ )。 *in vitro* の実験系では、SW480 において X 線照射後に p-S6 の増加、遊走能の増加、E-カドヘリンの減少、およびビメンチンの増加が認められ、X 線照射による mTOR 経路の活性化と EMT の亢進が認められた。そして、これらの変化はテムシロリムスの投与により抑制された。一方、LoVo においては X 線照射後に p-S6 が減少、遊走能が減少、E-カドヘリンは増加、ビメンチンは減少した。

**【考察】** 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増強に関与している可能性が示唆された。

**【総括】** 本研究結果から、大腸癌には放射線照射により 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た。癌細胞において p53 機構や RAS 経路などは 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、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、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。また、今回は細胞毎の X 線照射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 機構などと密接に関連していることが知られており、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。