

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 —

金子 学

目次

・ 要旨	3
・ 序文	4
・ 第一章 Temsirolimus の大腸癌に及ぼす影響	
第一節 in vitro study	
1-1-1 目的	12
1-1-2 材料と方法	13
1-1-3 実験結果	18
1-1-4 考察	24
1-1-5 結論	26
第二節 in vivo study	
1-2-1 目的	27
1-2-2 材料と方法	28
1-2-3 実験結果	33
1-2-4 考察	41
1-2-5 結論	43
・ 第二章 クロロキン（オートファジー阻害薬）との併用による Temsirolimus の大腸癌に及ぼす影響	
2-1 目的	44
2-2 材料と方法	45
2-3 実験結果	52

2-4 考察	63
2-5 結論	66
・総括および今後の課題	67
・文献	69

要旨

本研究では、mammalian target of rapamycin (mTOR) を阻害する分子標的薬である temsirolimus (TEM) に着目し、まず、本薬剤単剤での大腸癌に及ぼす影響について検討を行った。TEM は *in vitro* において、大腸癌の細胞周期を G1 期で停止させることにより細胞増殖を濃度依存的に抑制し、さらには血管新生に關与する HIF-1 α と VEGF の発現を抑制した。 *in vivo* においても血管新生抑制作用が認められ、腫瘍増殖が抑制された。一方で、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クロロキン (CQ) を TEM に併用したところ、 *in vitro* および *in vivo* においてアポトーシス誘導および腫瘍抑制効果が増強された。

序文

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 [1]。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る。オキサリプラチンまたはイリノテカンと、従来から存在する 5-フルオロウラシル (5-FU) とロイコボリン (LV) の三剤を組み合わせた FOLFOX または FOLFIRI 療法が導入され、切除不能進行再発大腸癌患者の生存期間中央値は約 20 か月となった [2]。さらに、この 10 年の間に分子標的薬が導入され、大腸癌治療は大きな変化を遂げた。分子標的薬に関する研究のなかで、いくつかの成長因子が大腸癌の増殖や転移能に影響することが明らかとなり、大腸癌においても抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体と抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体の有効性が確認され、これらはすでに臨床応用されている [3, 4]。また、EGFR シグナルの下流に位置する KRAS、BRAF や PIK3CA などの遺伝子変異が抗 EGFR 抗体への感受性を予測する因子となりうることが明らかとなっている [5]。FOLFOX 療法または FOLFIRI 療法に分子標的薬を併用したレジメンが導入された現在では、切除不能進行再発大腸癌患者の生存期間中央値は約 24 か月となっている [2]。しかし、現在使用可能な薬剤だけでは十分な効果が得られない症

例もまだ多く存在するため、新たな薬剤を開発し治療の選択肢を拡げることは、いまだ重要な課題である。今回、その新たな選択肢の候補となる薬剤として、EGFRの下流に存在する PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系の mTOR を阻害する、ラパマイシン (rapamycin、以後 RAPA と略す) という薬剤に着目した。

RAPAは1965年にイースター島の土壌中の*Streptomyces hydroscopi*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、当初は抗真菌剤として開発された [6]。免疫抑制作用を有することから間もなく抗真菌剤としては使用されなくなったが、その後免疫抑制剤として研究が進められた。この研究の中で、RAPAがまずthe 12-kDa FK506-binding protein (FKBP12) に結合し、FKBP12 - RAPA複合体が mTORに結合しこれを抑制することが明らかとなった。mTORはPI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系に属すセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞の成長、生存、代謝において中心的役割を果たしている [6]。mTORはさらに結合分子の違いにより、mTOR、regulatory-associated protein of mTOR (Raptor) 、 mTOR associated protein, LST8 homolog (mLST8) 、 DEP domain-containing mTOR-interacting protein (Deptor) 、 proline-rich Akt substrate 40 (PRAS40) から構成される mTOR complex 1 (mTORC1) と、mTOR、rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor) 、 mLST8、protein observed with Rictor (Protor) 、 Deptor、mammalian stress-activated protein kinase interacting protein (mSIN1) から構成される mTOR complex 2 (mTORC2) とに分類さ

れる。mTORC1の標的タンパクは翻訳促進因子であるp70S6 kinase (p70S6K) と、翻訳阻害因子であるeukariotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) であり [7, 8]、mRNAの翻訳、オートファジーの抑制、リボソームの生合成、そしてミトコンドリアの代謝や脂肪生成につながる転写活性化を含む、数多くの下流の生物現象に関わっている [9]。最近の研究により、後述するmTOR阻害剤の効果は、主にmTORC1の機能を抑制するものであることが明らかとなってきた [10]。mTORC2の研究はまだ始まったばかりであるが、その機能の一つは細胞骨格の調節であると考えられている [11, 12]。

RAPA の臨床応用としては、腎移植時の免疫抑制剤として 1999 年に FDA (アメリカ食品医薬品局) によって承認されており [13]、その作用機序は、mTOR 抑制による T 細胞の増殖抑制が考えられている [14]。その後、血管平滑筋細胞の増殖を抑制することも判明し、血管ステントのコーティング剤として 2003 年に FDA によって承認されている [15]。近年では抗悪性腫瘍薬としても注目され、2007 年に RAPA の誘導体の一つである TEM が腎細胞癌を対象に FDA から承認を受け [16]、現在ではもう一つの RAPA 誘導体である everolimus (EVE) 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、および腎細胞癌で承認を受けている [17]。RAPA、TEM、EVE、さらに最近開発された RAPA 誘導体である ridaforolimus (RIDA) などは、まとめて rapalog

と呼ばれ、現在様々な悪性疾患に対して臨床試験が行われている [18]。rapalog の抗悪性腫瘍薬としての作用機序は、主に mTOR 抑制による G1 期での細胞周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 [19, 20] (図 1)。rapalog は特に、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 [21]、大腸癌においてもこの系が活性化されているものが多く存在するため [22, 23]、rapalog は大腸癌において有用である可能性がある。

rapalog は臨床研究については大腸癌でも pilot study の報告や、少数例の大腸癌患者を含む固形癌を対象とした phase I study の報告が存在するが [24-26]、大腸癌細胞を用いての基礎研究レベルでの作用機序に関する検討はまだ十分ではない。分子・細胞レベルでの rapalog の効果を解析することは、この薬剤による治療対象となり得る大腸癌の特徴がより明確に明らかとなり、ひいては、既存および新規の他剤との併用を含めた治療選択肢を拡大することにも繋がる重要な課題と考えられる。そこで本研究の第 1 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 の影響を、in vitro と in vivo の両面から検証した。

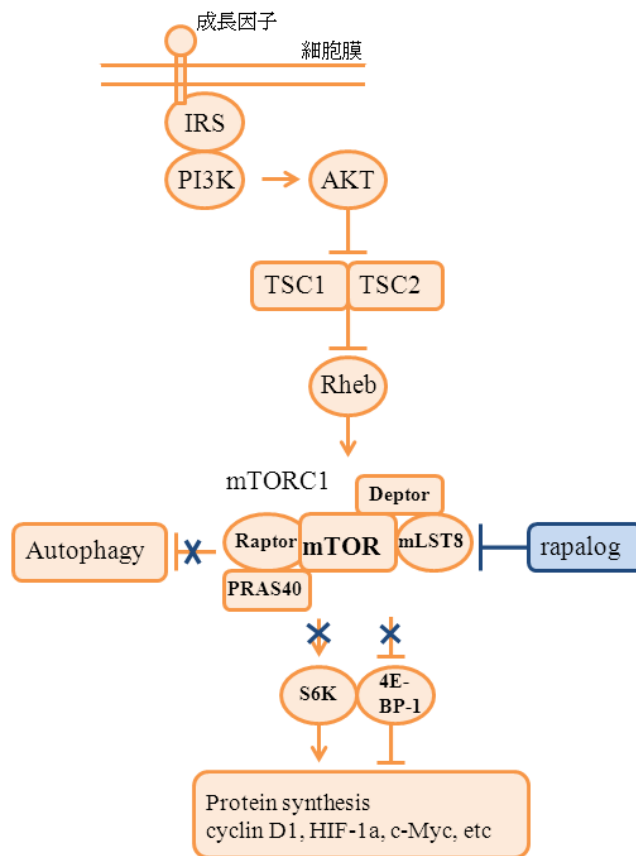


図 1. PI3K/AKT/mTOR signaling と rapalog

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いる。例えば、mTOR や mTOR が結合する FKBP12 に遺伝子変異がみられる場合は、rapalog がうまく結合できずにその阻害効果が発揮されない [27-29]。また、rapalog の使用により、もともと PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系に存在するネガティブフィードバックの減弱による AKT の活性化や ERK/MAPK 系の活性化が生じてしまうことが報告されている [30-34]。そして、オートファジー (autophagy) の誘導も rapalog に抵抗性を示す機序の一つと考えられている [35, 36]。Rapalog による治療成績のさらなる向上のためには、

これらの課題の克服が肝要であると考えられる。大腸癌を用いた本研究では、特にオートファジーを阻害する治療法の併用によって rapalog の抗腫瘍効果を増強することができるのではないかと仮説を立てた。

オートファジーが誘導される過程を図 2 に示す。すなわち、まず細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれてオートファゴソームが形成される。次いでオートファゴソームはリソソームと融合してオートリソソームとなり、内容物が分解される [37]。その後、細胞の生存に必要なアミノ酸やタンパクが再利用される。オートファゴソームとオートリソソームを含む **acidic vesicular organelles (AVOs)** は、アクリジンオレンジ染色で染色することでオートファジーのマーカーとなる。AVOs 以外のオートファジーのマーカーとして LC3 と p62 が知られている。細胞質中に存在する LC3 (LC3-I) はオートファジーが誘導されると **phosphatidylethanolamine** に共有結合した状態 (LC3-II) となり、オートファゴソームの内膜及および外膜に局在する。一方で、オートファジーの選択的基質である p62 は LC3-II との相互作用を介してオートリソソームで分解されるため、オートファジー進行とともに減少する (図 2)。LC3 と p62 は western blotting または蛍光染色することで検出可能である [38-40]。

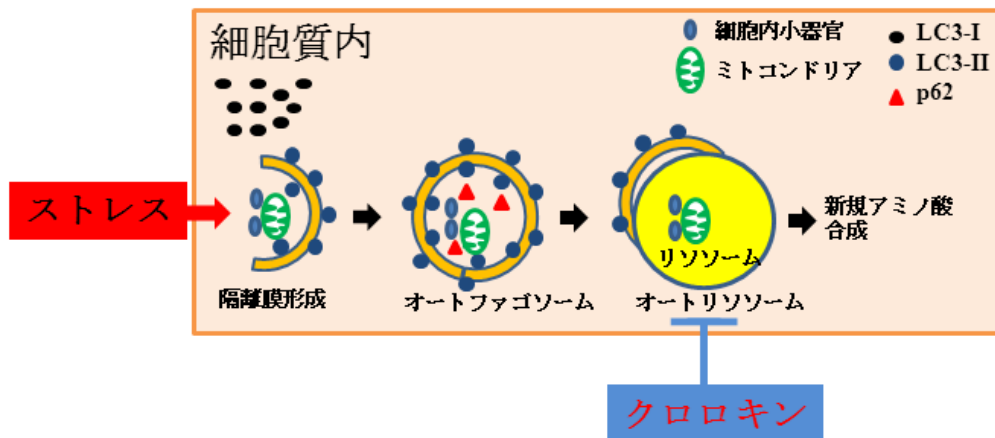


図2. オートファジー

細胞内小器官の隔離膜内への取り込みからオートファゴソームが形成される。次に、オートファゴソームとリソソームが癒合してオートリソソームを形成し、内容物の分解が起こる。クロロキンはオートファジーの後期段階で阻害する薬剤である。LC3-II はオートファジーが誘導されるとオートファゴソームの内外膜に蓄積し増加する。LC3-II の増加はクロロキンにより阻害されないため、クロロキンによるオートファジー阻害では LC3-II はやはり増加という結果になる。一方で、p62 はオートファジーが誘導されるとオートリソソームで分解され減少する。この過程はクロロキンにより阻害されるため、クロロキンによるオートファジー阻害により p62 は分解されずに増加する。

正常細胞では、各種のストレス（栄養欠乏、抗癌剤や放射線）に応答して、オートファジーが高率に誘導され、傷害を受けた細胞内器官などを分解して重要性の高いタンパクの再合成を行い、細胞の恒常性維持に重要な機能を担う [41]。一方、癌細胞では抗悪性腫瘍薬に暴露されるとオートファジーを誘導することにより、その薬剤に対する抵抗性を示すことが示唆されている。実際、オートファジー阻害薬と種々の抗悪性腫瘍薬との併用による効果が研究されており、併用によりアポトーシス誘導を増強し得るとの報告も複数存在する [42-49]。オートファジー阻害作用をもつ薬剤のなかで、現在臨床使用可能なものはクロロキン（CQ）のみである。CQ

は 1950 年代から抗マalaria薬や抗リウマチ薬として広く臨床使用されているが、近年、癌の増殖抑制効果を有することで再び注目を集めている [50-55]。CQ の抗腫瘍効果の一つにオートファジー阻害作用があることが知られており、細胞内酸性コンパートメント内の酸性化を阻害することで、オートファジーの後期段階であるオートリソソーム内での基質の分解を阻害することが知られている (図 2) [56]。

以上を踏まえ、本研究第 2 章では、オートファジーが TEM への抵抗性に寄与しているという仮説に基づき、CQ によるオートファジー阻害により TEM の効果増強が得られるか、を検証することを試みた。TEM の効果に及ぼす CQ 併用の影響について、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。

第一章

Temsirolimus の大腸癌細胞に及ぼす影響

第一節 **in vitro** study

1-1-1. 目的

本節では、**in vitro** の実験系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 mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果を、rapalog の一つである TEM を用いて検証した。

1-1-2. 材料と方法

【細胞株と培養方法】

ヒト大腸癌細胞株であるCaR-1およびHT-29、マウス大腸癌細胞株であるColon-26をJapanese Cancer Research Resource Bank (JCRRB) より購入した。10% 胎児ウシ血清添加 RPMI-1640 培養液 (Sigma, MO, USA、以後10% FCS/RPMIと略す) に1% 抗菌剤/抗真菌剤 (100 U/mL penicillinG, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 250 ng/mL amphotericinB; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を加えて37°C、5% CO₂、21% O₂の環境で培養、実験に用いた (常酸素環境)。また、低酸素環境としては37°C、5% CO₂、1% O₂の環境で培養した。

【TEM】

rapalog の一つであるTEM (分子式; C₅₆H₈₇NO₁₆, 構造式: 図3) をSIGMA Japanより購入し、実験に用いた。溶媒としてdimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, Watford, UK) を用いて溶解し、10 mM のstock solutionとした。

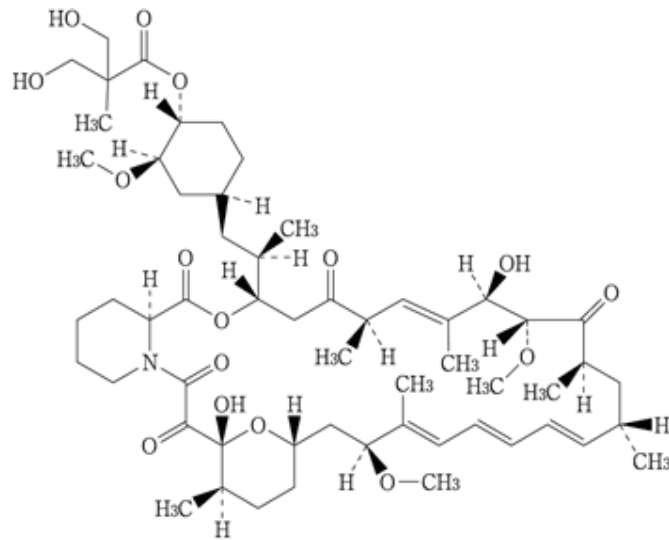


図3. TEMの構造式

【細胞増殖の検討 - MTS 法】

96-well flat-bottomed plate に、 $1-3 \times 10^3$ cells/well ずつ各群の大腸癌細胞を加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の環境で一晩培養した。翌日、各濃度の TEM を加え 4 日間培養した。4 日目に MTS 法にて評価した。評価日に MTS 試験薬 (Promega, Madison, WI) を $20 \mu\text{l/well}$ 加え、さらに 3 時間培養の後、plate reader (InterMed, Tokyo, Japan) にて 490 nm のフィルターを用いて測定した。増殖率は、control 群で得られる値に対する比率として算出した。実験は triplicate (3 wells) で行い、グラフは平均 \pm SD で示した。

【アポトーシスの測定 - フローサイトメトリー法】

10 cm dish を用いて、control 群、TEM 1 nM 投与群、TEM 10 nM 投与群、TEM 100 nM 投与群のように 4 群を設定した。細胞を回収し、PBS で洗浄をした後、FITC 標

識 Annexin V 及び Propidium Iodide (PI) (Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) にて染色を行った。フローサイトメトリー法を用いて測定し、Annexin V 陰性/PI 陰性の分画を生細胞、Annexin V 陽性の分画をアポトーシス細胞集団と判定した。同様の実験を 3 回行い、グラフは平均 \pm SD で示した。

【細胞周期の測定 - フローサイトメトリー法】

10 cm dish を用いて、前述のように 4 群を設定した。細胞を回収し PBS で洗浄した後、Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) を用い、核内の DNA を PI にて染色した。フローサイトメトリー法を用いて測定し、G0/G1 期、S 期、G2/M 期の割合を計測した。同様の実験を 3 回行い、グラフは平均 \pm SD で示した。

【各種タンパク発現の評価 - western blotting】

10 cm dish を用いて、control 群として 10% FCS/RPMI のみで 24 時間培養後、TEM 100 nM 24 時間作用後、TEM 100 nM 48 時間作用後に培地を除去し、PBS で洗浄した後、1% Tween20 およびプロテアーゼ阻害剤、フォスファターゼ阻害剤を含む溶解液にて氷上で 1 時間静置し、癌細胞を溶解した。回収した溶解液を遠心し、上清のタンパク濃度を 1 mg/ml に調製した。タンパク抽出液に 2% のメルカプトエタノールを加え、100°C で 5 分間煮沸した。電気泳動は 7.5-15% polyacrylamide ゲルを用いて行った。Hybond ECL ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, England) に転写し、5% スキムミルクにて非特異的結合のブロッキングを 1 時間行った後、ウサギ抗 phospho-AKT (Ser473) モノクローナル抗体 (clone 736E11, Cell Signaling Technology, MA, USA, 500 倍希釈で使用)、マウス抗 phospho-p70 S6 kinase (Thr389) モノクローナル抗体 (clone 1A5, Cell Signaling Technology, MA, USA, 500 倍希釈で使用)、ウサギ抗 phospho-4E-BP1(Thr37/46) モノクローナル抗体 (clone 286B4, Cell Signaling Technology, MA, USA, 500 倍希釈で使用)、ウサギ抗 cyclin D1 ポリクローナル抗体 (clone H-295, Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA, 500 倍希釈で使用)、ウサギ抗 HIF-1 α ポリクローナル抗体 (clone H-206, Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA, 200 倍希釈で使用)、ウサギ抗 VEGF ポリクローナル抗体 (clone 147, Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA, 200 倍希釈で使用)、またはマウス抗 β -actin モノクローナル抗体 (clone A-15, Sigma, MO, USA, 10,000 倍希釈で使用) を一晩反応させた。洗浄した後、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories, Inc, CA, USA)、もしくは抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories, Inc, CA, USA) を各々二次抗体として反応させた。その後、ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて現像した。各 band の濃度は Image J software (open source Image J software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)にて測定し、 β -actin の濃度で標準化し、control 群を 1 とした。

【統計学的解析】

統計学的有意差の検定には two tailed unpaired t-test を用い、p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

1-1-3. 実験結果

【TEMの大腸癌細胞に対する増殖抑制効果 - MTS法】

mTORの上流に存在するAKTが強く活性化されているヒト大腸癌細胞株であるCaR-1、活性化が弱いヒト大腸癌細胞株であるHT-29を用いた[23]。また、マウス大腸癌細胞株であるColon-26はAKTが強く活性化されている細胞株である。それぞれの細胞株を各濃度のTEMと96時間反応させた後の増殖を、MTS法にて測定した(図4)。control群を1として、CaR-1の増殖は、TEM 0.1 nM: 0.83 ± 0.01 、TEM 1 nM: 0.77 ± 0.01 、TEM 10 nM: 0.71 ± 0.02 、TEM 100 nM: 0.65 ± 0.03 、また、Colon-26では、TEM 0.1 nM: 0.55 ± 0.01 、TEM 1 nM: 0.47 ± 0.02 、TEM 10 nM: 0.46 ± 0.02 、TEM 100 nM: 0.42 ± 0.01 となり、両者はともに用量依存的に抑制された。一方、HT-29でのTEM投与による有意な増殖抑制は認められなかった。

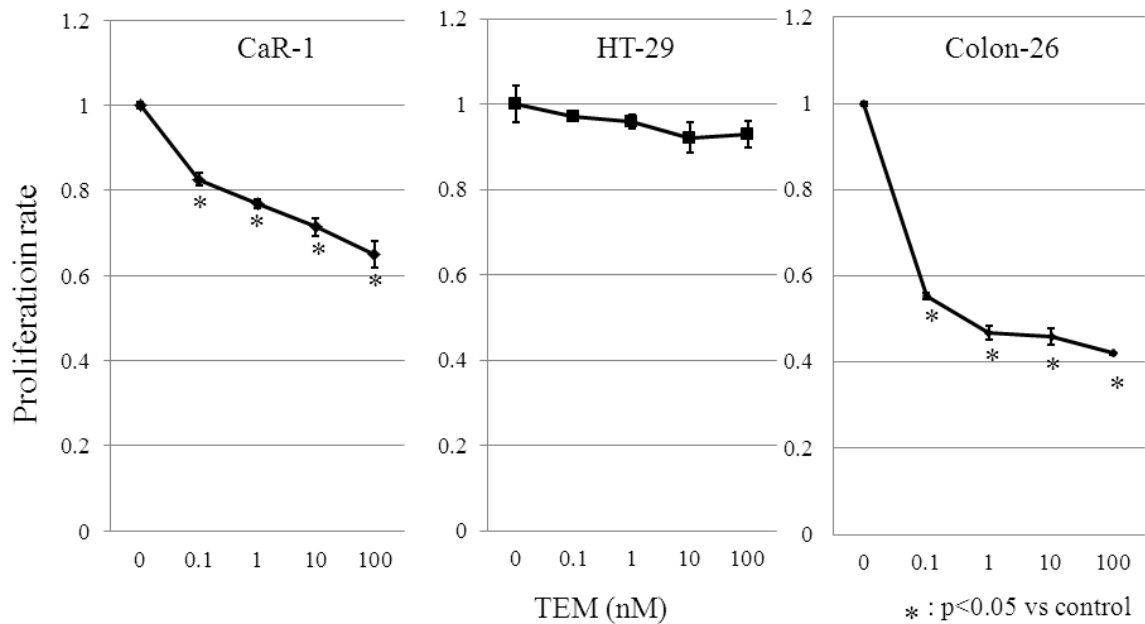


図 4. TEM の大腸癌細胞に対する増殖抑制効果

TEM は反応時間 96 時間において用量依存的に CaR-1 と Colon-26 の増殖を抑制した。一方で、HT-29 では増殖抑制効果は認められなかった。グラフは平均±SD で示した。

【TEM の大腸癌細胞に対するアポトーシス誘導効果 - フローサイトメトリー法】

TEM による大腸癌細胞の増殖抑制効果の機序を解明するために、アポトーシス誘導効果について検討した (図 5)。フローサイトメトリーによる測定で Annexin V 陽性細胞をアポトーシスと判断し、その割合を検討した。48 時間の TEM 投与によりアポトーシスが誘導された割合は、CaR-1 では control: 10.1%、TEM 100 nM: 8.5%、HT-29 では control: 2.3%、TEM 100 nM: 3.3%、Colon-26 では control: 4.2%、TEM 100 nM: 5.1%となり、いずれの大腸癌細胞株においてもアポトーシスを誘導しなかった。

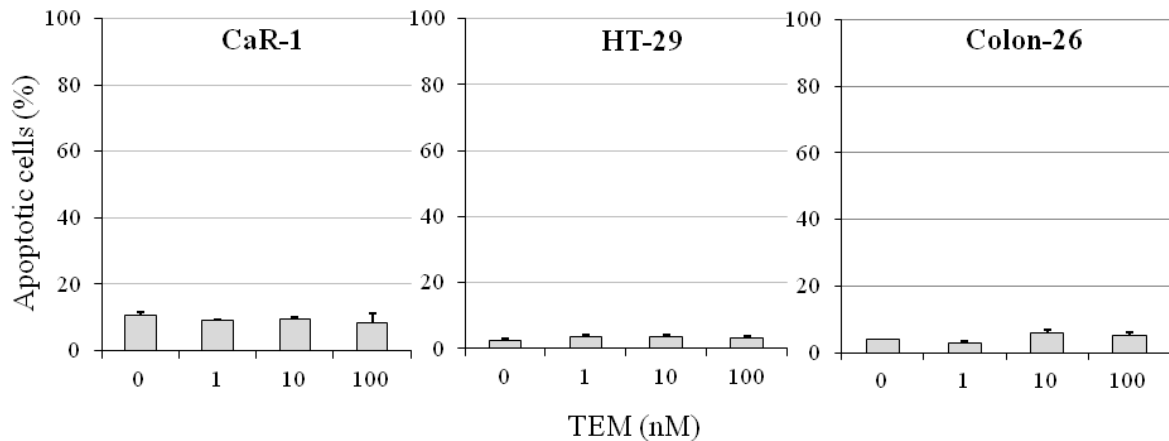


図 5. TEM の大腸癌細胞に対するアポトーシス誘導効果
TEM はいずれの大腸癌細胞株においてもアポトーシスを誘導しなかった。グラフは平均±SD で示した。

【大腸癌細胞の細胞周期に対する TEM の影響 - フローサイトメトリー法】

TEM の細胞周期への影響の検討を行った。図 6 に示すように反応時間 48 時間において、CaR-1 の G1 期は control: $65.6 \pm 0.7\%$, TEM 1 nM: $71.0 \pm 0.7\%$, TEM 10 nM: $73.4 \pm 0.7\%$, TEM 100 nM: $73.6 \pm 0.2\%$ 、Colon-26 の G1 期は control: $57.7 \pm 0.2\%$, TEM 1 nM: $74.5 \pm 1.1\%$, TEM 10 nM: $77.8 \pm 0.7\%$, TEM 100 nM: $77.7 \pm 0.6\%$ であり、CaR-1 と Colon-26 において TEM 100 nM ではそれぞれ 8.0%、20.0% G1 期の割合が上昇し、G1 期停止を示した。一方、HT-29 では、細胞周期への影響は認められなかった。

細胞周期の G1 期から S 期へ移行する際の調節因子の一つに cyclin D1 があり [57, 58]、次の western blotting にて評価を行った。

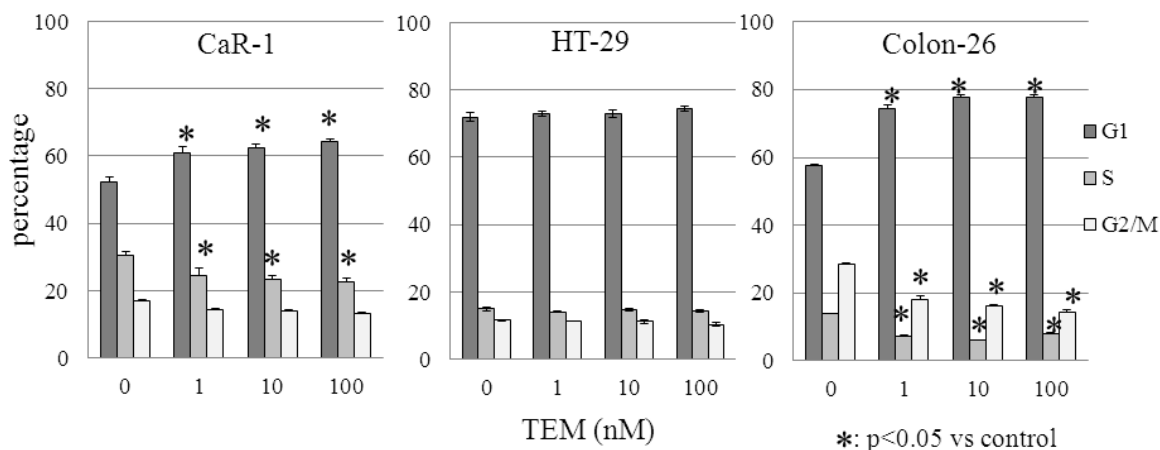


図 6. TEM による大腸癌細胞の細胞周期への影響

TEM は大腸癌細胞 CaR-1 と Colon-26 の細胞周期を G1 期で停止させたが、HT-29 の細胞周期に変化を認めなかった。グラフは平均±SD で示した。

【大腸癌細胞における TEM の mTOR シグナル関連タンパク、cyclin D1 への影響 - western blotting】

常酸素環境下で培養した細胞において、mTOR シグナルの上流に存在する活性化型 AKT である phospho-AKT (p-AKT)、下流に存在する活性化型 p70S6K である phospho-p70S6K (p-p70S6K)、活性化型 4E-BP1 である phospho-4E-BP1 (p-4E-BP1)、cyclin D1 のタンパク発現量について western blotting で検討した。

p-AKT は、CaR-1 および Colon-26 においてやや減少したが、HT-29 では 48 時間処理で 69% 増加した。p-p70S6K はすべての細胞株で 24 時間処理後から減少し、48 時間処理後では 33-57% の減少を認めた。p-4E-BP1 は、すべての細胞株で 24 時間処理後から減少し、48 時間処理後では 11-78% の減少を認めた (図 7)。

cyclin D1 は、CaR-1 では 48 時間処理後に 46% の減少、Colon-26 では 48 時間処理

後に 36% 減少した。HT-29 では 24 時間処理後に 11% 減少したものの、48 時間処理後は control と同レベルであった (図 7)。

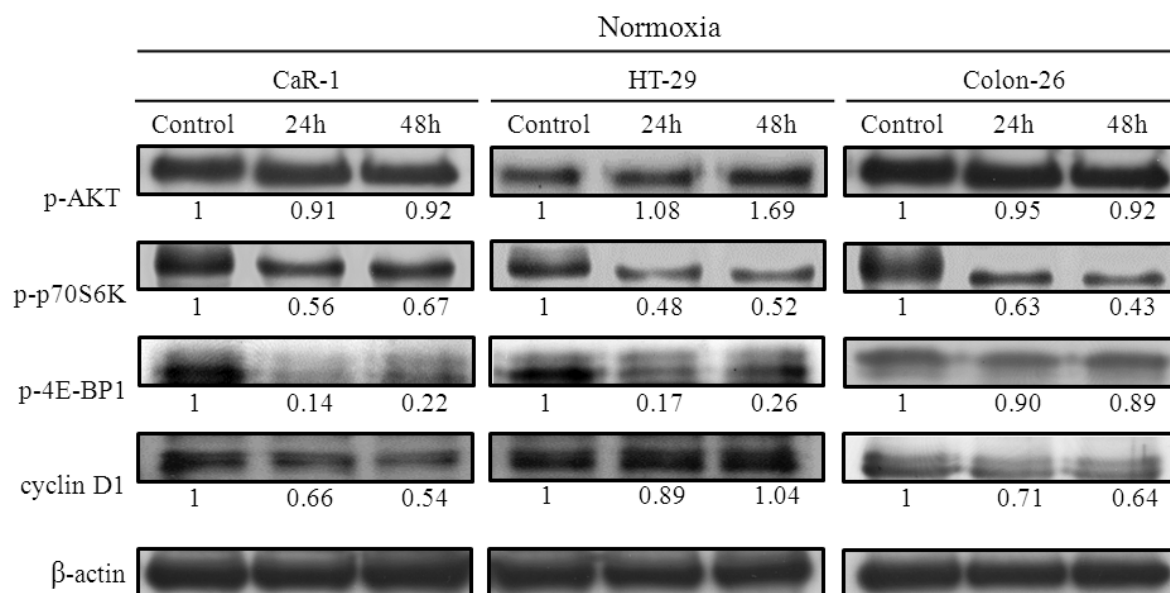


図 7. TEM による大腸癌細胞の mTOR 関連タンパク、cyclin D1 タンパク発現への影響
各細胞株において、常酸素環境下で control、TEM 100 nM 24 時間処理後、TEM 100 nM 48 時間処理後の各種タンパクの発現量を western blotting にて評価した。各 band の下に β -actin の濃度で標準化したうえで control を 1 とした時の濃度を示した。

【大腸癌細胞における TEM の血管新生関連タンパクへの影響 - western blotting】

rapalog の重要な抗腫瘍効果の一つに血管新生抑制があることから、続いて低酸素環境下で培養された大腸癌細胞において、血管新生の重要な調節因子である HIF-1 α と VEGF タンパクの発現への影響についても検討した。すべての細胞株で HIF-1 α は 24 時間処理後から減少がみられ、48 時間処理後には CaR-1 では 89%、HT-29 では 68%、Colon-26 では 80% の減少を認めた。VEGF についても、すべての細胞株で 24

時間処理後から減少がみられ、48 時間処理後には CaR-1 では 73%、HT-29 では 62%、Colon-26 では 32% の減少を認めた (図 8)。

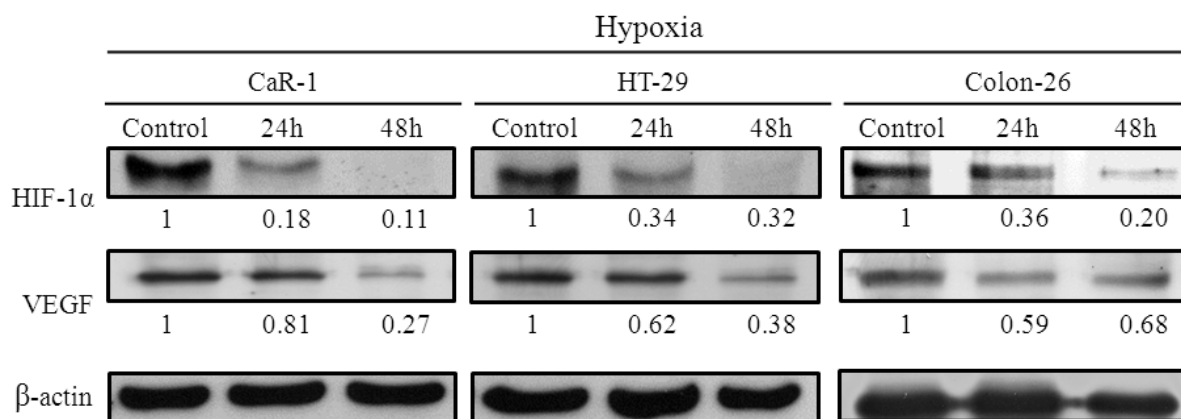


図 8. TEM による大腸癌細胞の血管新生関連タンパク発現への影響

各細胞株において、低酸素環境下で control、TEM 100 nM 24 時間処理後、TEM 100 nM 48 時間処理後の各種タンパクの発現量を western blotting にて評価した。各 band の下に β -actin の濃度で標準化したうえで control を 1 とした時の濃度を示した。

1-1-4. 考察

本節では、TEM 単剤での大腸癌への影響を、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 の増殖を著明に抑制し、これはアポトーシスの誘導ではなく、細胞周期を G1 期で停止させることによるものであることが確認された。一方で、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 AKT のリン酸化には大きな変化を認めなかったが、p-p70S6K と cyclin D1 は両者で著明に減少していた。TEM による cyclin D1 発現の減少は、過去の前立腺癌、神経膠芽腫および肝細胞の細胞株において rapalog を用いた実験の結果に合致する [59, 60]。4E-BP1 のリン酸化は CaR-1 では 80% 程度、Colon-26 では 10% 程度の抑制であった。以上から、CaR-1 と Colon-26 においては、TEM により mTOR の下流に位置する p-p70S6K および p-4E-BP1 の減少が生じ、さらに cyclin D1 の減少が起こり、最終的に細胞周期の G1 期停止に至ったものと考えられた。一方、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、また、cyclin D1 には変化がなかった。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が示されている [61]。

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も報告されている [62]。これらの研究結果からは、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るが、これに関しての解析は本研究では行っておらず、今後の検討課題である。

続いて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、低酸素環境下で培養した大腸癌細胞を用いて western blotting にて検討したところ、すべての細胞株で 48 時間処理後には両者の著明な減少を認めた。rapalog による HIF-1 α と VEGF のタンパク発現の抑制に関しては、過去に RAPA を用いた前立腺癌細胞株での報告や TEM を用いた横紋筋肉腫細胞株での報告でも同様の結果が示されている [63, 64]。in vitro の実験系において TEM による増殖抑制を認めない HT-29 においても、HIF-1 α と VEGF の発現は著明に抑制されたことから、TEM による腫瘍血管新生抑制に基づく増殖抑制効果を in vivo の実験系において検討する必要があると考えられた。

1-1-5. 結論

in vitro の実験系において、TEM は AKT の活性化が強い細胞株では細胞周期を G1 期で停止させ増殖抑制効果を示した。AKT の活性化が弱い細胞株では細胞周期への影響は認めず、増殖抑制を認めなかった。一方で、血管新生の重要な調節因子である HIF-1 α と VEGF のタンパク発現は、AKT の活性化の状態によらず抑制された。

第一章

第二節 **in vivo study**

1-2-1. 目的

前節の *in vitro* の実験系では、TEM による増殖抑制効果を認めない HT-29 においても HIF-1 α と VEGF のタンパク発現は著明に抑制されていた。そこで本節では、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、特に、HT-29 においても腫瘍抑制効果が得られるかに注目して検証した。

1-2-2. 材料と方法

【細胞株と培養方法】

ヒト大腸癌細胞株である CaR-1 および HT-29、マウス大腸癌細胞株である Colon-26 を Japanese Cancer Research Resource Bank (JCRRB) より購入した。10% 胎児ウシ血清添加 RPMI-1640 培養液 (Sigma, MO, USA、以後 10% FCS/RPMI と略す) に 1% 抗菌剤/抗真菌剤 (100 U/mL penicillinG, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 250 ng/mL amphotericinB; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を加えて 37°C、5% CO₂、21% O₂ の環境で培養、実験に用いた。

【TEM】

Pfeizer 社より無償供与された TEM を用いた。4.8% Tween80、4.8% PEG400、4% ethanol 添加 PBS を溶媒とした。

【マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM 単剤投与の影響】

生後 4-5 週の BALB/c と BALB/c nu/nu の雌マウスをオリエンタル酵母工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。動物実験は、東京大学の実験動物使用ガイドラインに従って行った。各大腸癌細胞を回収後、RPMI-1640 培養液に浮遊させ、CaR-1 と HT-29 は 3×10^6 個を BALB/c マウス腹側皮下に、Colon-26 は 5×10^5 個を BALB/c nu/nu マウス腹側皮下に接種した。図 9 に示すように、接種 1-2 週後、腫瘍が 100-200 mm³

に成長したところで、長期投与グループ（3回/週、3週間）は control（4% ethanol/PBS）群、TEM 0.1 mg/kg 群、TEM 1 mg/kg 群、TEM 10 mg/kg 群の4群にわけ、短期投与グループ（3回/週、1週間）は control（4% ethanol/PBS）群、TEM 10 mg/kg 群の2群にわけ、各群を5-8匹とした。TEMは0.2 mlの溶媒（4.8% Tween80、4.8% PEG400、4% ethanol/PBS）に溶解してマウスに腹腔内投与を行った。投与開始日を day 0 とした。長期投与グループの腫瘍の大きさは下記の計算式を用いて、腫瘍体積（tumor volume; TV）を求めた。

- 腫瘍体積（TV） = （短径）² x （長径） x 0.5

薬剤投与から長期投与群は24-30日後、短期投与群は1週間後にマウスを犠牲死せしめた。短期投与群の腫瘍組織は摘出し、組織学的検討を行った。

動物	BALB/c nu/nu	BALB/c	長期投与群
細胞	CaR-1, HT-29	Colon-26	① Control: PBS 0.2 ml/body
実験モデル	皮下腫瘍		② TEM 0.1 mg/kg
薬物	temsirolimus (TEM) (i.p.)		③ TEM 1 mg/kg
			④ TEM 10 mg/kg
			短期投与群
			① Control: PBS 0.2 ml/body
			② TEM 10 mg/kg

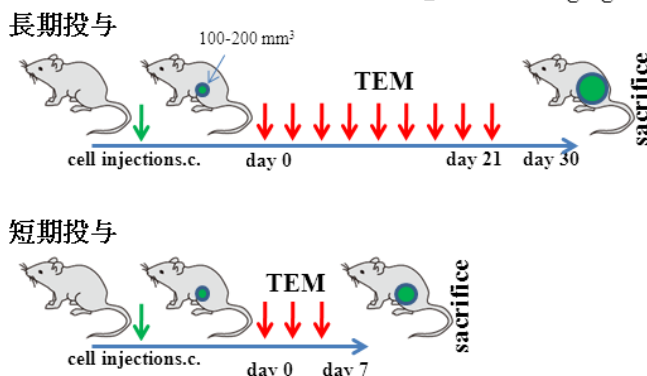


図9. マウス皮下腫瘍モデル（TEM単剤）における投与スケジュール

【組織学的検討】

短期投与グループの control 群、TEM 10 mg/kg 群それぞれの皮下腫瘍を用いて組織学的検討を行った。摘出した腫瘍組織はそれぞれ、一部は免疫組織化学染色用に 10% ホルマリンで固定後パラフィン包埋し切片を作成、一部は O.C.T. compound で包埋し液体窒素で凍結後 -80°C で保存し cryostat で凍結切片を作成した。

【5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling 法】

マウス犠牲死 1 時間前に BrdU (Sigma) 2 mg を腹腔内投与し、マウス皮下腫瘍のパラフィン切片を作成した。マウス抗 BrdU モノクローナル抗体 (clone BMC9318, Roche Diagnostics, IN, U.S.A、10 倍希釈で使用) を一次抗体として用いた。1 治療群につき 2 つの皮下腫瘍の切片から無作為にそれぞれ 3 視野選択のうえ、光学顕微鏡下 400 倍で観察した。1 視野ごとに陽性細胞の全体に占める割合を算出し、グラフは平均 \pm SE で示した (n=6)。

【terminal transferase uridyl end labeling (TUNEL) 法】

アポトーシスは TUNEL 法を用いた。マウス皮下腫瘍パラフィン切片を、in-situ cell death detection kit, POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて染色した。1 治療群につき 2 つの皮下腫瘍の切片から無作為にそれぞれ 3 視野選択のうえ、光学顕微鏡下 400 倍で観察した。1 視野ごとに陽性細胞の全体に占める割合を算出し、グラフは平均 \pm SE で示した (n=6)。

【腫瘍血管内皮の染色】

腫瘍血管新生は、血管内皮細胞特異的結合能を有する FITC 標識トマトレクチン (VECTOR Laboratories, INC.) を用いて染色を行った。すなわち、マウス犠牲死 5 分前に内眼角の静脈叢より FITC 標識トマトレクチンを静注したマウス皮下腫瘍の凍結切片を用い、細胞核を DAPI にて染色した。1 治療群につき 2 つの皮下腫瘍の切片から血管数高密度な腫瘍部分をそれぞれ 3 視野選択のうえ、光学顕微鏡下 200 倍で血管数を数えた。1 視野ごとに微小血管密度 (micro vessel density、以後 MVD と略す) として算出し、グラフは平均 \pm SE で示した (n=6)。

【HIF-1 α と VEGF の免疫組織化学染色】

血管新生に関わる重要な因子である HIF-1 α と VEGF のタンパク発現を検討するため、それぞれの免疫組織化学染色を行った。マウス抗 HIF-1 α モノクローナル抗体 (clone ESEE122, Abcam, Cambridge, UK、1,000 倍希釈で使用)、マウス抗 VEGF モノクローナル抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA、100 倍希釈で使用)、一次抗体として用いた。抗原の賦活化処理として、脱パラフィンした切片を 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸し、オートクレーブ装置で 95°C 10 分間処理した。室温まで冷却後 PBS で 3 回洗浄し、H₂O₂ 加メタノールで 20 分処理し内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。PBS で 3 回洗浄後、Protein Block Serum-Free (DAKO) で 60 分間ブロッキングし、それぞれの一次抗体を一晚 4°C で反応させた。その後ヒス

トファイン マウスステイン キット (Nichirei Corp., Tokyo, Japan) を用い、酵素抗体反応を行い、DAB 発色を行った。

【統計学的解析】

統計学的有意差の検定には two tailed unpaired t-test を用い、p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

1-2-3. 実験結果

【マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM の大腸癌抑制効果】

すべての細胞株で、TEM 投与中は用量依存的に腫瘍の増殖を抑制する傾向を認めた。投与開始 21 日後の時点で、CaR-1 細胞由来腫瘍の体積は control 群 (n=7) : $750 \pm 110 \text{ mm}^3$ 、TEM 0.1 mg/kg 投与群 (n=7) : $560 \pm 89 \text{ mm}^3$ 、TEM 1 mg/kg 投与群 (n=7) : $270 \pm 90 \text{ mm}^3$ 、TEM 10 mg/kg 投与群 (n=8) : $190 \pm 36 \text{ mm}^3$ であり、TEM 10 mg/kg 投与群の腫瘍体積は control 群の 0.25 倍 ($p=0.0002$) であった。HT-29 細胞由来腫瘍の体積は control 群 (n=7) : $1700 \pm 350 \text{ mm}^3$ 、TEM 0.1 mg/kg 投与群 (n=6) : $840 \pm 220 \text{ mm}^3$ 、TEM 1 mg/kg 投与群 (n=7) : $480 \pm 120 \text{ mm}^3$ 、TEM 10 mg/kg 投与群 (n=6) : $360 \pm 120 \text{ mm}^3$ であり、TEM 10 mg/kg 投与群の腫瘍体積は control 群の 0.21 倍 ($p=0.007$) であった。Colon-26 細胞由来腫瘍の体積は control 群 (n=5) : $9200 \pm 2900 \text{ mm}^3$ 、TEM 0.1mg/kg 投与群 (n=8) : $4600 \pm 700 \text{ mm}^3$ 、TEM 1 mg/kg 投与群 (n=8) : $3300 \pm 310 \text{ mm}^3$ 、TEM 10 mg/kg 投与群 (n=8) : $1600 \pm 190 \text{ mm}^3$ であり、TEM 10 mg/kg 投与群の腫瘍体積は control 群の 0.17 倍 ($p=0.006$) であった (図 10A)。典型例写真として CaR-1 細胞由来腫瘍の control 群と TEM 10 mg/kg 投与群の TEM 投与開始日と 21 日後の写真を示す (図 10B)。各治療群間において、観察期間中に体重の有意差はなく、また肉眼的に観察できる範囲で明らかな副作用を認めなかった (data 略)。

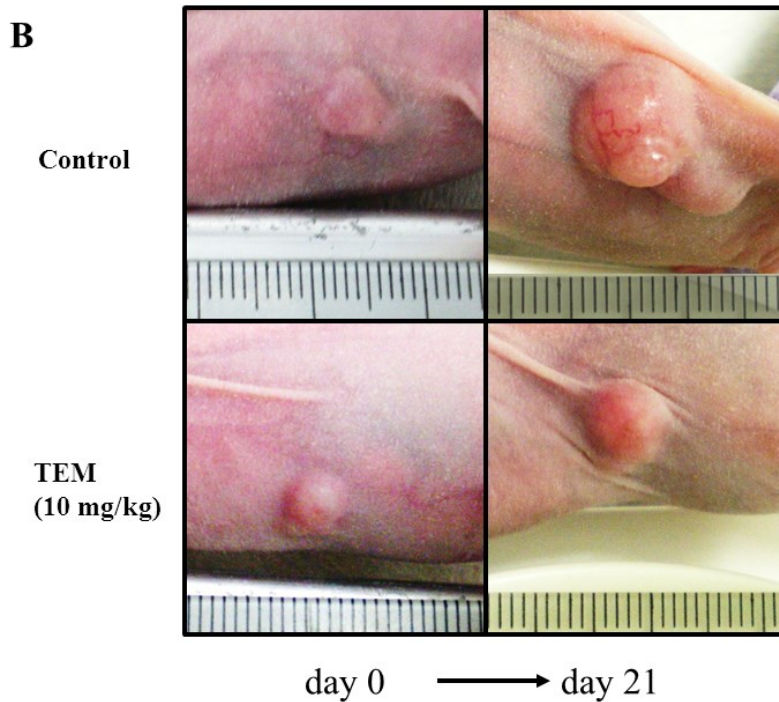
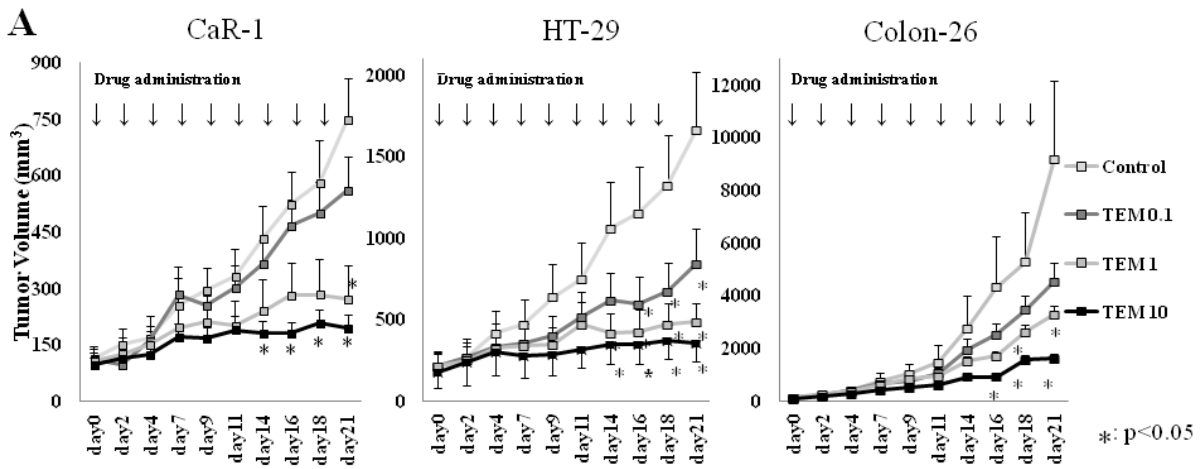


図 10. マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM の腫瘍増殖抑制効果 - A: 皮下腫瘍の体積の変化、B: CaR-1 細胞由来腫瘍の代表的写真

A: TEM は用量依存的に大腸癌細胞の増殖を抑制する傾向を示した。グラフは平均 ±SE で示した。B: TEM 投与群の腫瘍は control 群のものと比較し増殖が抑制されていた。

【マウス皮下腫瘍における TEM の増殖抑制効果-BrdU labeling 法】

TEM による皮下腫瘍増殖抑制効果を BrdU labeling 法にて検討した。CaR-1、HT-29 と Colon-26 細胞由来腫瘍で、control 群と比較し TEM 10 mg/kg 投与群は BrdU 陽性細胞がそれぞれ、4.4%、4.1%、5.1% 低下しており、すべての細胞株において TEM 投与群で増殖が抑制されていた（図 11）。CaR-1 と Colon-26 は in vitro での検討と合致する結果であった。一方、HT-29 は in vitro の検討では増殖抑制効果を認めなかったが、マウス皮下腫瘍の検討では抑制効果を認めた。

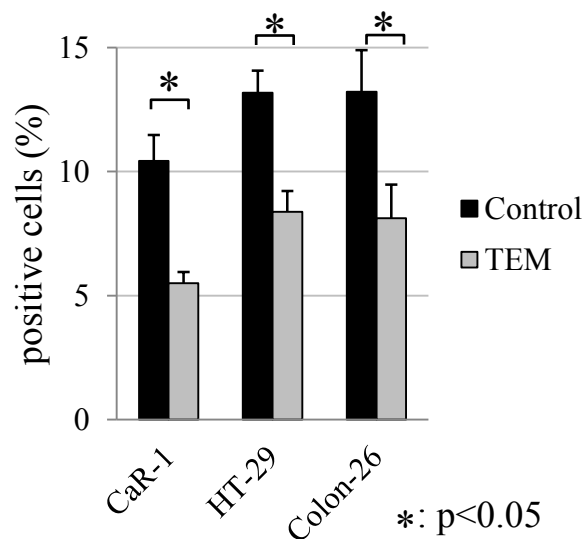
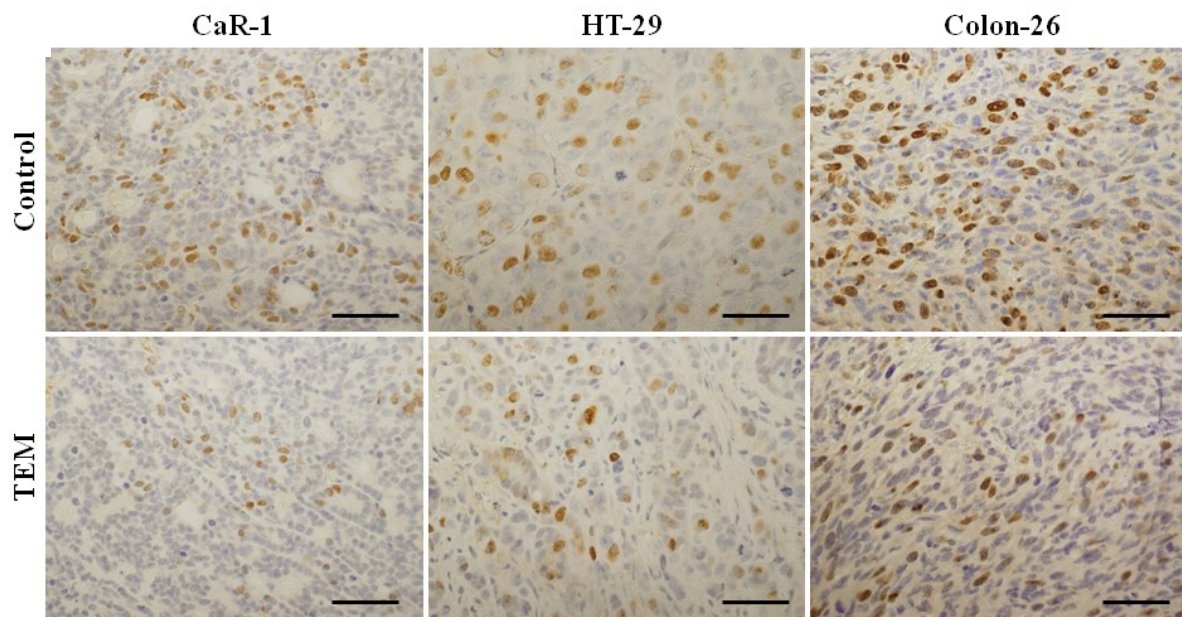


図 11. マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM の腫瘍増殖抑制効果
 すべての細胞株で、TEM 10 mg/kg 投与群は control 群に比べて BrdU 陽性細胞（茶色に染色）の割合が低下した。bar は 25 μ m を示す。グラフは平均 \pm SE で示した。

【マウス皮下腫瘍における TEM のアポトーシス誘導効果 - TUNEL 法】

TEM によるアポトーシス誘導効果を TUNEL 法で評価した。CaR-1、HT-29 と Colon-26 細胞由来腫瘍で、TEM 10 mg/kg 投与群は control 群と比較し TUNEL 陽性細

胞がそれぞれ、0.25%、0.53%、0.21% 上昇しており、すべての細胞株において TEM 投与群でアポトーシスが有意に増加していた（図 12）。*in vitro* の実験結果と異なり、マウス皮下腫瘍の検討では TEM のアポトーシスの誘導効果を認めた。

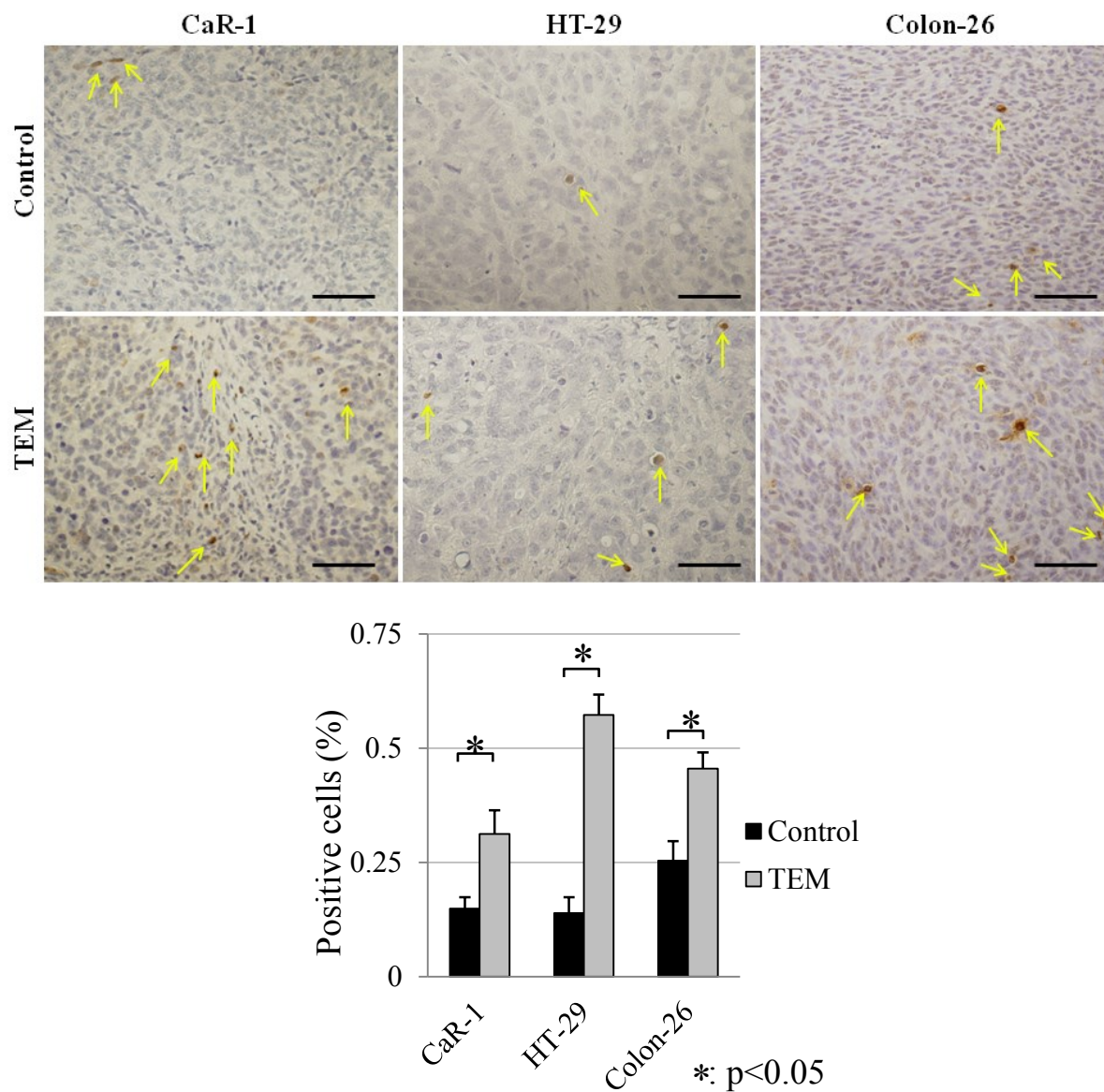


図 12. マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM のアポトーシス誘導効果
すべての細胞株で、TEM 10 mg/kg 投与群は control 群に比べて TUNEL 陽性細胞（矢印）の割合が上昇していた。bar は 25 μ m を示す。グラフは平均 \pm SE で示した。

これまでの結果から、マウス皮下腫瘍モデルでは、*in vitro* の実験系において TEM による増殖抑制効果を認めなかった HT-29 においても TEM が増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。また、*in vitro* の実験系では TEM は大腸癌細胞のアポトーシスを誘導しなかったが、マウス皮下腫瘍モデルでは割合としては小さいながらもアポトーシスを誘導することが明らかとなった。そこで、TEM の細胞周期停止効果以外の機序を確認するため、腫瘍血管新生への影響を検討することとした。

【マウス皮下腫瘍における TEM の血管新生抑制効果 - 微小血管密度、HIF-1 α ・VEGF 免疫組織化学染色】

TEM の血管新生抑制効果を、血管内皮細胞特異的結合能を有する FITC 標識トマトレクチンを用いて、微小血管密度として評価した。CaR-1、HT-29 と Colon-26 細胞由来腫瘍で、TEM 10 mg/kg 投与群は control 群と比較し MVD がそれぞれ、61%、67%、58% 低下し、すべての細胞株において TEM の血管新生抑制効果を認めた (図 13)。

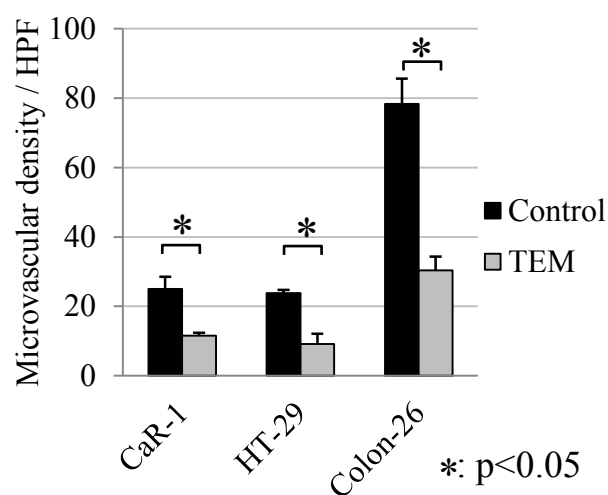
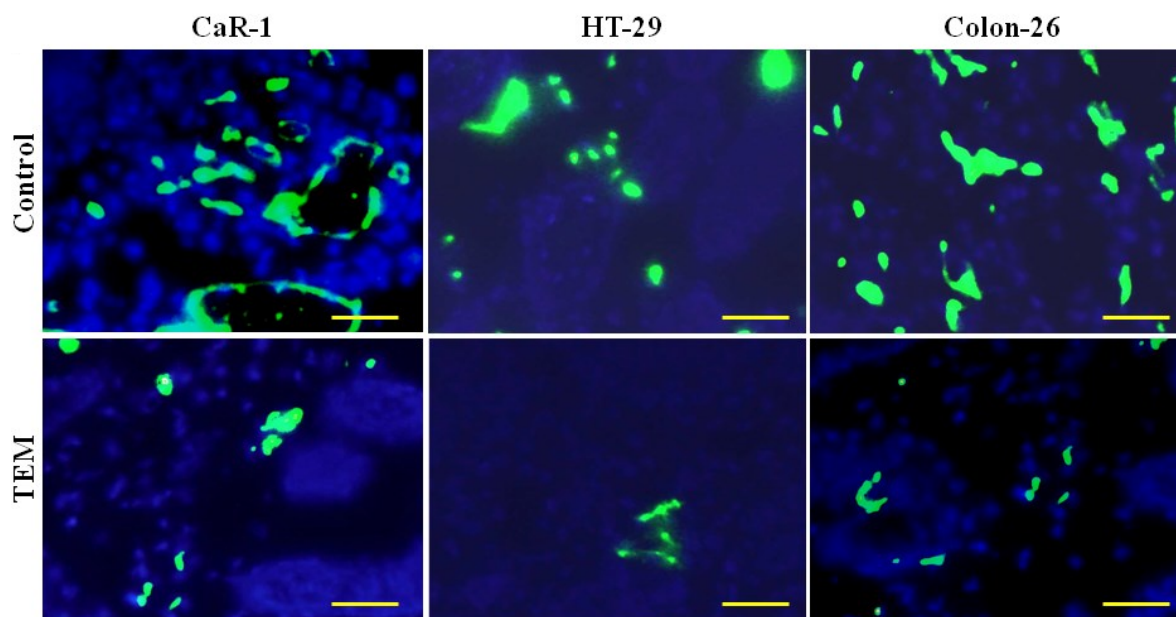


図 13. マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM の血管新生抑制効果 - FITC 標識トマトレクチンによる血管内皮の検出
 すべての細胞株で、TEM 10 mg/kg 投与群は control 群に比べて MVD が減少していた。bar は 50 μ m を示す。グラフは平均 \pm SE で示した。

続いて、血管新生に関わる重要な因子である HIF-1 α と VEGF の発現を、皮下腫瘍のパラフィン切片を用いて免疫組織化学染色にて評価したところ、すべての細胞株で HIF-1 α と VEGF の発現は低下していた (図 14)。

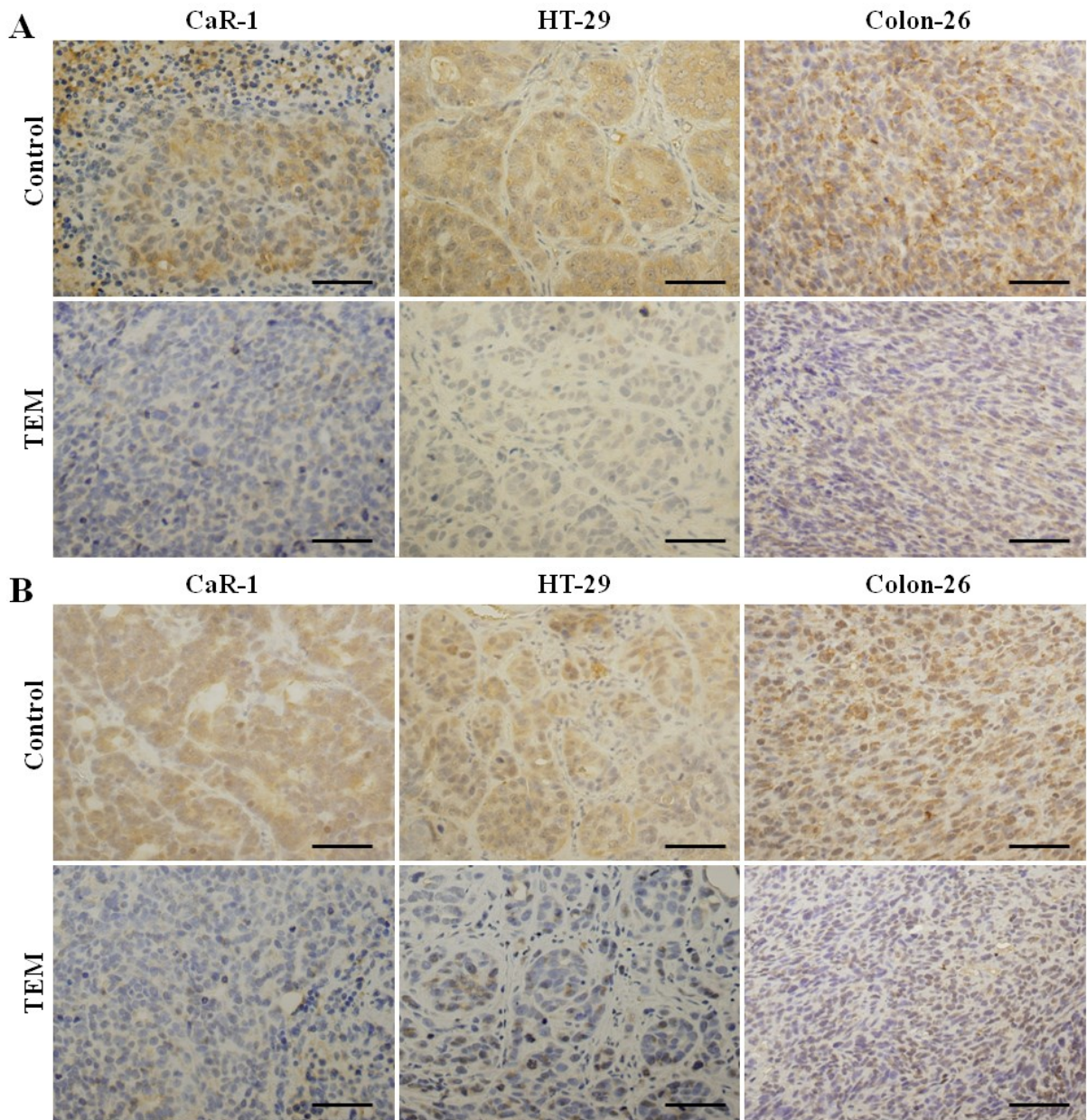


図 14. マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM の血管新生抑制効果 - HIF-1 α (A)、VEGF (B) 免疫組織化学染色

すべての細胞株で、TEM 10 mg/kg 投与群は control 群に比べて HIF-1 α と VEGF タンパクの発現を抑制した。bar は 25 μ m を示す。

1-2-4. 考察

本節では、マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM 単剤での大腸癌への影響を、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 の活性化が弱いヒト大腸癌細胞 HT-29 を用いて検証した。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 による増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果を認めた。そこで、TEM の細胞周期以外への影響を確認するため、腫瘍血管新生への影響を検討した。トマトレクチンによる血管内皮の染色による評価で、すべての細胞株において、皮下腫瘍の MVD の減少を確認した。また、血管新生における重要な因子である HIF-1 α と VEGF の免疫組織化学染色を行い、両者のタンパク発現がすべての細胞株で低下していることを確認した。これは、in vitro の実験系における低酸素環境で培養された大腸癌細胞の western blotting による評価で、TEM により HIF-1 α と VEGF タンパクがすべての細胞株で減少していたことと合致する結果であった。従って、血管新生の抑制は大腸癌細胞の AKT の活性化の状態によらず、TEM により抑制されることが確認された。腫瘍微小環境は腫瘍細胞以外の種々の細胞（血管内皮細胞、線維芽細胞、免疫細胞など）や間質、その他によって構成されている。in vitro の実験系では認めなかった腫瘍細胞増殖抑制およびアポトーシス増加がマウス皮下腫瘍では認められた点に関しては、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 [65] 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る。

これまでも rapalog の抗腫瘍効果の一つは血管新生の抑制と考えられており、腫瘍細胞に対する直接の作用と血管新生抑制を介した間接的な作用の両者が影響することを示唆する報告はあるが [66, 67]、実際に *in vitro* で rapalog の増殖抑制効果の程度が異なる大腸癌細胞株を用いて *in vivo* で検討した報告はなく、本研究で得られた新しい知見である。ただし、血管新生抑制、腫瘍細胞の増殖抑制、腫瘍細胞のアポトーシス誘導が、それぞれどの程度の割合で全体として腫瘍サイズの抑制に寄与しているかは不明である。

以上から、TEM による大腸癌の抑制効果は、AKT が強く活性化されている細胞株では細胞周期の G1 期停止と血管新生抑制によるものであることが確認された。また、AKT の活性化が弱い細胞株では細胞周期への影響は認めず血管新生抑制のみ認められるが、血管新生抑制のみでも腫瘍への増殖抑制効果を示すことが確認された。これらの結果から、TEM による血管新生抑制は大腸癌の発現・進展に大きな影響を及ぼしており、二次的に生じた腫瘍細胞の低酸素、低栄養状態により、腫瘍増殖抑制およびアポトーシス誘導を来たしている可能性も示唆された。

1-2-5. 結論

マウス皮下腫瘍モデルにおいて、TEM は細胞株の AKT の活性化の状態によらず、大腸癌の血管新生を抑制し、増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。in vitro の実験系における検討で TEM による増殖抑制効果を認めなかった HT-29 でもマウス皮下腫瘍の増殖が抑制されたことから、TEM は AKT が強く活性化されている大腸癌のみでなく、AKT の活性化が弱い大腸癌においても、血管新生抑制効果により抗腫瘍効果を発揮するものと考えられた。

第二章

クロロキン（CQ）との併用による

Temsirolimus の大腸癌細胞に及ぼす影響

2-1. 目的

本章では 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検証すること、特に、併用によりアポトーシス誘導を増強し得るという仮説の検証を目的とした。

2-2. 材料と方法

【細胞株と培養方法】

マウス大腸癌細胞株 Colon-26 を Japanese Cancer Research Resource Bank (JCRRB) より購入した。10% FCS/RPMIに1% 抗菌剤/抗真菌剤 (100 U/mL penicillinG, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 250 ng/mL amphotericinB; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を加えて培養、実験に用いた。

【薬剤】

rapalog の一つである TEM (分子式; $C_{56}H_{87}NO_{16}$, 構造式: 図 3) を用いた。in vitro の実験系では SIGMA Japan より購入したもの、マウス皮下腫瘍モデルでは Pfizer 社 より無償供与されたものを実験に用いた。オートファジー阻害薬としてクロロキン (CQ, 分子式: $C_{18}H_{26}ClN_3$, 構造式: 図 15) を Sigma 社 (St Louis, MO, USA) より購入し実験に用いた。実験の際に溶媒として、TEM には in vitro の実験では dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, Watford, UK) を用いて溶解し、10 mM の stock solution とした。in vivo の実験では 4.8% Tween80、4.8% PEG400、4% ethanol 加 PBS を溶媒とした。CQ の溶媒には PBS を用いた。

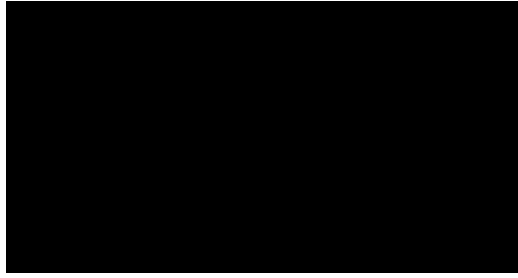


図 15. CQ の構造式

【TEM と CQ の併用投与時における細胞増殖の検討 - MTS 法】

96-well flat-bottomed plate に 3×10^3 cells/well ずつのマウス大腸癌細胞株 Colon-26 を加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の環境で一晩培養した。翌日、各薬剤を添加し、48 時間培養後に MTS 法にて評価した。増殖率は、control に対する比率として算出した。実験は 3 wells で行い、グラフは平均 \pm SD で示した。

以後の実験では、control 群 (TEM 0 nM、CQ 0 μM)、CQ 単独群 (CQ 20 μM 、TEM 0 nM)、TEM 単独群 (CQ 0 μM 、TEM 100 nM)、CQ と TEM 併用群 (CQ 20 μM 、TEM 100 μM) の 4 群を設定して検討を行った。

【AVOs の測定 - フローサイトメトリー法】

37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の環境で、10 cm dish に 1×10^6 cells ずつのマウス大腸癌細胞株 Colon-26 を加え、一晩培養した。翌日、前述のように、control 群、CQ 群、TEM 群、TEM+CQ 併用群の 4 群を設定した。48 時間後、細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、5 $\mu\text{g/ml}$ の acridine orange にて 10 分間常温で染色し、洗浄後すぐにフローサイトメト

リー法を用いて測定した。測定結果は平均蛍光強度 (Mean fluorescein intensity) にて評価した。同様の実験を3回行い、グラフは平均 \pm SDで示した。

【各種タンパク発現の評価 - western blotting】

37°C、5% CO₂ の環境で、10 cm dish に 1x10⁶ cells ずつのマウス大腸癌細胞株 Colon-26 を加え、一晩培養した。翌日、前述のように、control 群、CQ 群、TEM 群、TEM+CQ 併用群の4群を設定した。48時間作用後に培地を除去し、PBSで洗浄した後、1% Tween20 およびプロテアーゼ阻害剤を含む溶解液にて氷上で1時間静置し、癌細胞を溶解した。回収した溶解液を遠心し、上清のタンパク濃度を 1 mg/ml に調製した。タンパク抽出液に 2% のメルカプトエタノールを加え、100°C で5分間煮沸した。電気泳動は 7.5-15% polyacrylamide ゲルを用いて行った。Hybond ECL ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) に転写し、5% スキムミルクにて非特異的結合のブロッキングを1時間行った後、ウサギ抗 LC3 ポリクローナル抗体 (Medical Biological Laboratories CO, Nagoya, Japan、500倍希釈で使用)、ウサギ抗 p62 ポリクローナル抗体 (Medical Biological Laboratories CO, Nagoya, Japan、500倍希釈で使用)、マウス抗 Bax モノクローナル抗体 (clone B-9, Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA、500倍希釈で使用)、マウス抗 Bcl-2 モノクローナル抗体 (clone C-2, Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA、500倍希釈で使用)、 β -actin モノクローナル抗体 (clone A-15, Sigma, MO, USA、10,000倍希釈で使用) を一晩反

応させた。洗浄した後、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories, Inc, CA, USA)、もしくは抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories, Inc, CA, USA) を各々二次抗体として反応させた。その後、ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて現像した。各 band の濃度は Image J software (open source Image J software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)にて測定し、 β -actin の濃度で標準化し、control 群を 1 とした。同様の実験を 3 回行い、グラフは平均 \pm SD で示した。

【アポトーシスの測定 - フローサイトメトリー法】

37°C、5% CO₂の環境で、10 cm dish に 1×10^6 cells ずつ各群のマウス大腸癌細胞株 Colon-26 を加え、一晚培養した。翌日、各種、各濃度の薬剤含有通常培地にて 48 時間培養した。細胞を回収し、PBS で洗浄をした後、FITC 標識 Annexin V 及び Propidium Iodide (PI) (Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) にて染色を行った。フローサイトメトリーを用いて測定し、Annexin V 陰性 / PI 陰性の分画は生細胞、Annexin V 陽性の分画はアポトーシス細胞集団と判定した。同様の実験を 3 回行い、グラフは平均 \pm SD で示した。

【マウス皮下腫瘍モデルにおける TEM と CQ 併用による影響】

生後 4-5 週の BALB/c の雌マウスをオリエンタル酵母工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。動物実験は、東京大学の実験動物使用ガイドラインに従って行った。Colon-26 は 5×10^5 個をマウス背側皮下に接種した。図 16 に示すように、接種 1-2 週

後、腫瘍が 100-200 mm³に成長したところで、長期投与グループ（3回/週、3週間）および短期投与グループ（3回/週、1週間）ともに、control群（TEM 0 mg/kg、CQ 0 mg/kg）、CQ単独群（CQ 50 mg/kg、TEM 0 mg/kg）、TEM単独群（CQ 0 mg/kg、TEM 10 mg/kg）、TEMとCQ併用群（CQ 50 mg/kg、TEM 10 mg/kg）の4群を設定して検討を行った。各群は6-8匹とした。TEMは0.2 mlの溶媒（4.8% Tween80、4.8% PEG400、4% ethanol/PBS）に溶解して、CQは0.1 mlのPBSに溶解して、マウスに腹腔内投与を行った。投与開始日をday 0とした。長期投与グループの腫瘍の大きさは下記の計算式を用いて、腫瘍体積（tumor volume ; TV）を求めた。

- 腫瘍体積（TV）=（短径）² x（長径）x 0.5

動物	BALB/c	長期投与群 / 短期投与群
細胞	Colon-26	① Control: PBS 0.2 ml/body
実験モデル	皮下腫瘍	② CQ 50 mg/kg
薬物	temsirolimus (TEM) (i.p.) chloroquine (CQ) (i.p.)	③ TEM 10 mg/kg ④ TEM 10 mg/kg + CQ 50 mg/kg

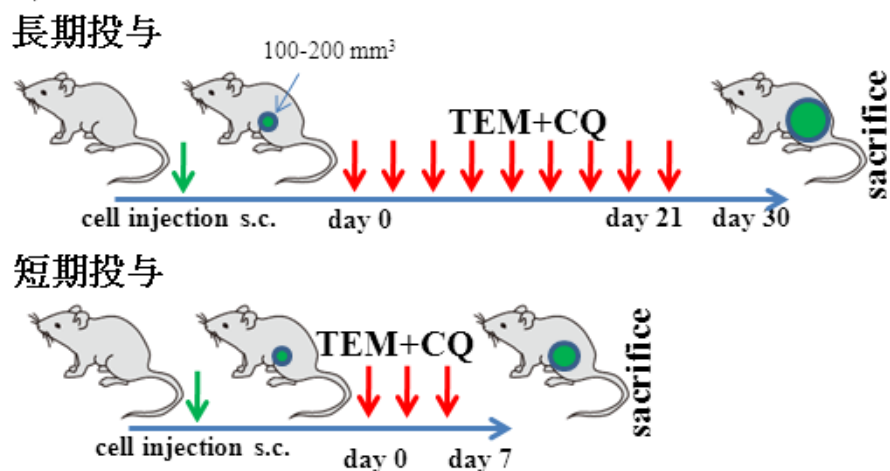


図 16 マウス皮下腫瘍モデル（TEMとCQ併用）での投与スケジュール

薬剤投与から長期投与群は 30 日後、短期投与群は 1 週間後にマウスを犠牲死せしめた。短期投与群の腫瘍組織は摘出し、それぞれ免疫組織化学染色用に 10% ホルマリンで固定後パラフィン包埋し切片を作成、一部は western blotting 用にホモジェナイズ後に上記のようにタンパク抽出液を作成した。

【マウス皮下腫瘍における各種タンパク発現の評価 – western blotting】

各群それぞれの 3 つの皮下腫瘍からのタンパク抽出液を用いた。オートファジー (LC3、p62) の測定を、前述の方法と同様に western blotting により施行した。また、アポトーシス関連タンパクの検出を、マウス抗 Bax モノクローナル抗体 (clone B-9, Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA、200 倍希釈で使用) マウス抗 Bcl-2 モノクローナル抗体 (clone C-2, Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA、500 倍希釈で使用) を一次抗体として western blotting により施行した。グラフは平均 \pm SE で示した。

【組織学的検討】

短期投与グループの各群それぞれの皮下腫瘍を用いて組織学的検討を行った。摘出した腫瘍組織はそれぞれ、一部を免疫組織化学染色用に 10% ホルマリンで固定後パラフィン包埋し切片を作成した。

【terminal transferase uridyl end labeling (TUNEL) 法】

アポトーシスの評価は TUNEL 法を用いた。マウス皮下腫瘍パラフィン切片を、in-situ cell death detection kit, POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を

用いて染色した。1 治療群につき 2 つの皮下腫瘍の切片から無作為にそれぞれ 3 視野
選択のうえ、光学顕微鏡下 400 倍で観察した。1 視野ごとに陽性細胞の全体に占める
割合を算出し、グラフは平均 \pm SE で示した (n=6)。

【統計学的解析】

統計学的解析は、two tailed unpaired t-test を用いた。p 値が 0.05 未満を統計学的に
有意とした。

2-3. 実験結果

【TEM と CQ の大腸癌細胞に対する増殖抑制効果】

薬剤と 24 時間反応させた後の増殖は、control 群を 1 として CQ 単剤投与群: 0.81 ± 0.01 、TEM 単剤投与群: 0.79 ± 0.01 、TEM+CQ 併用群: 0.67 ± 0.01 、また、48 時間の反応では、control 群を 1 として、CQ 単剤投与群: 0.64 ± 0.01 、TEM 単剤投与群: 0.54 ± 0.01 、TEM+CQ 併用群: 0.41 ± 0.01 であった。TEM と CQ 併用群は他のいずれの群よりも有意に増殖が抑制された (図 17)。

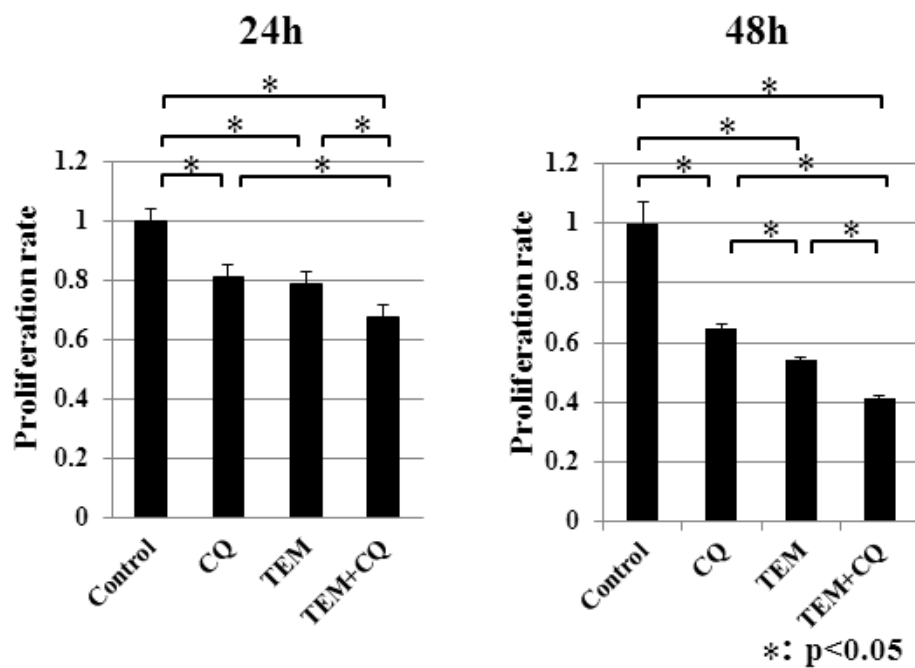


図 17. TEM と CQ 併用による大腸癌増殖への影響 (左: 24 時間後、右: 48 時間後) TEM と CQ との併用により相加的な増殖抑制効果を認めた。グラフは平均 \pm SD で示した。

【TEMによるオートファジー誘導に及ぼすCQの影響】

図 18 に示すように、control 群、CQ 単剤投与群と TEM 単剤投与群の平均蛍光強度はそれぞれ、 3.5 ± 0.3 、 5.3 ± 0.1 、 4.9 ± 0.1 で、CQ 単剤投与群と TEM 単剤投与群はそれぞれ control 群と比較し AVOs の増加を認めた。TEM と CQ 併用群で、AVOs はさらに増加した（平均蛍光強度: 7.1 ± 0.6 ）。CQ 単剤投与による AVOs の増加は、オートファジーを後期段階で阻害することによるもの、TEM 単剤投与による AVOs の増加はオートファジーの誘導によるものであり、併用することによりさらに増加したものと考えられた。

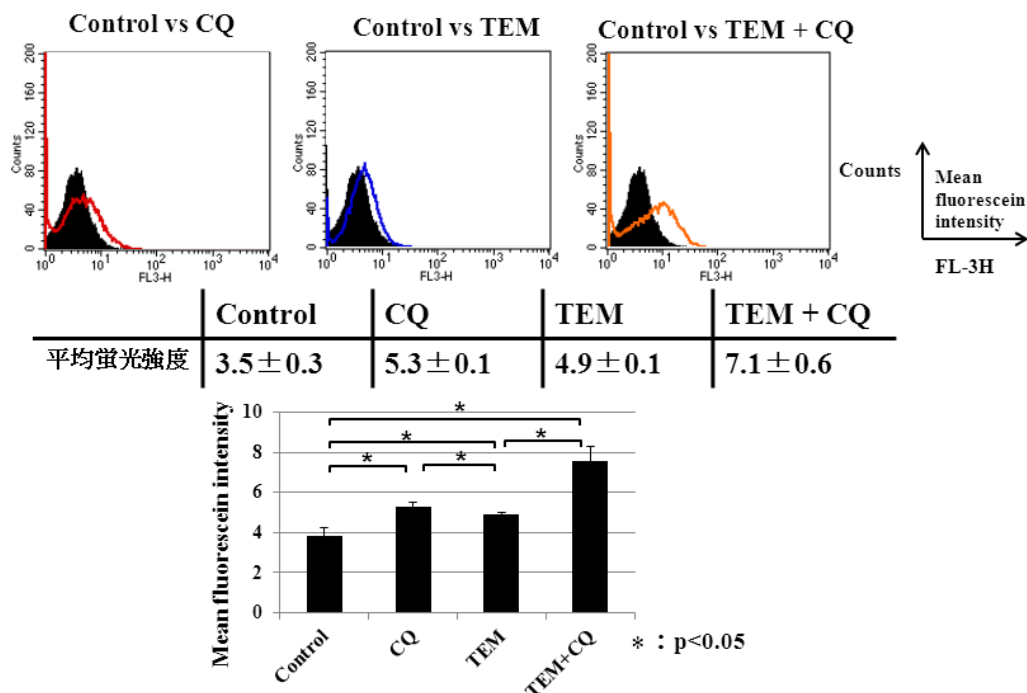


図 18. TEM による AVOs 形成に対する CQ の影響

フローサイトメトリー法による計測。CQ 併用により、TEM 単剤投与に 比較し AVOs 形成の増加を認めた。上段の図中の線はそれぞれ左から赤: CQ、青: TEM、橙: TEM+CQ 投与時、中塗りの黒線はいずれも control である。グラフは平均 \pm SD で示した。

次に、CQによるオートファジー阻害を明らかにするため、LC3-IからLC3-IIへの転換、p62の発現について検討した。図19に示すように、CQ単剤投与群はcontrol群と比較しLC3-IIへの転換は2.37倍、p62は1.18倍と両者とも有意に増加を認め、オートファジーの後期段階での阻害作用が確認された。一方、TEM単剤投与群ではcontrol群と比較しLC3-IIへの転換は1.42倍と有意に増加し、p62は0.82倍と有意に減少し、TEM単剤投与によってオートファジーが進行していることが確認された。TEMとCQ併用により、LC3-IIへの転換はcontrol群と比較し3.73倍とさらなる増加を認めたが、p62はcontrol群と比較しむしろ1.23倍と増加する傾向であった。

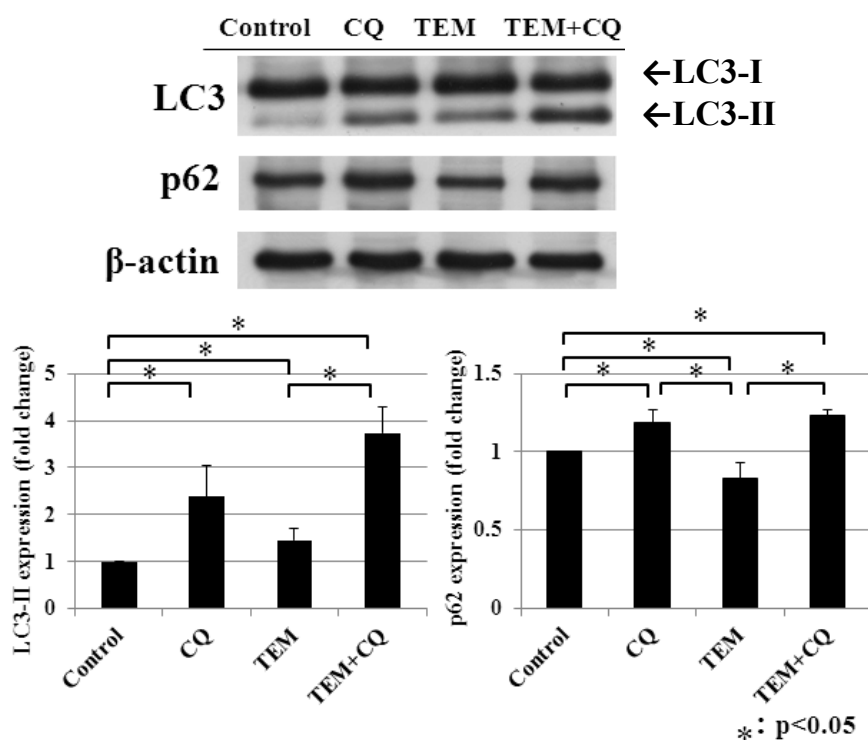


図19. TEMによるオートファジー誘導に対するCQの影響

western blottingによる評価。TEM単剤投与によりLC3-IIへの転換ならびにp62の減少が認められた。CQ併用によりp62、およびLC3-II転換の増加を認めた。グラフは平均±SDで示した。

【TEM と CQ 併用による大腸癌細胞のアポトーシス誘導】

次に、TEM と CQ 併用による Colon-26 の増殖抑制効果の機序に関して、アポトーシスの誘導について検討した (図 20)。Annexin V 陽性細胞をアポトーシスとし、その割合を検討した。CQ 単剤投与によりわずかにアポトーシスが誘導されたが、TEM 単剤投与のみではアポトーシスを誘導しなかった。両者を併用することにより著明なアポトーシス誘導効果を認めた (control: $2.7 \pm 0.8\%$ 、CQ: $4.4 \pm 0.3\%$ 、TEM: $3.1 \pm 1.2\%$ 、TEM+CQ: $7.8 \pm 0.1\%$)。

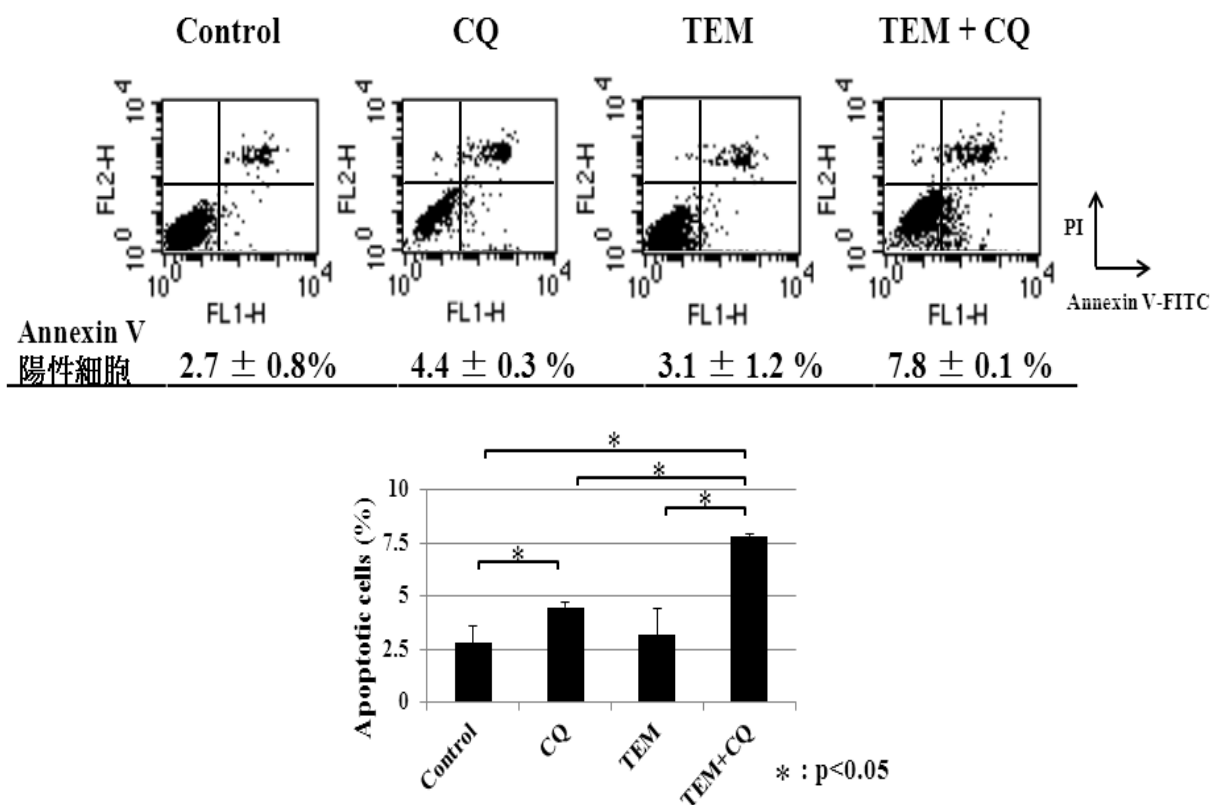


図 20. TEM と CQ 併用による大腸癌のアポトーシスへの影響
フローサイトメトリー法による計測。TEM と CQ を併用することにより著明なアポトーシス誘導効果を認めた。グラフは平均 \pm SD で示した。

さらに、TEM と CQ 併用によるアポトーシス誘導の機序に関して、アポトーシス関連タンパクである Bax および Bcl-2 について western blotting にて検討した。Bax は death signal により細胞質から移動し、ミトコンドリアでシトクロム c 放出を刺激するプロアポトーシスタンパクである。Bcl-2 は抗アポトーシスタンパクの一つで、電位依存性陰イオンチャンネルに影響を与え、シトクロム c の放出制御の一端を担っていると考えられている。この両者の比である Bax/Bcl-2 ratio が上昇すると、アポトーシスの増加につながると考えられている [68, 69]。図 21 に示したように、CQ 単剤投与により、control 群と比較し Bax は 1.23 倍と有意に増加し、Bcl-2 は 0.77 倍と有意に減少を認めた。TEM 単剤投与により、control 群と比較し Bcl-2 は 0.59 倍と有意に減少を認めた。TEM と CQ 併用により、Bcl-2 は control 群と比較し 0.52 倍と有意に減少し、また、Bax/Bcl-2 ratio は control 群と比較し 1.63 倍であり、他のいずれの群と比較しても有意な上昇であった。

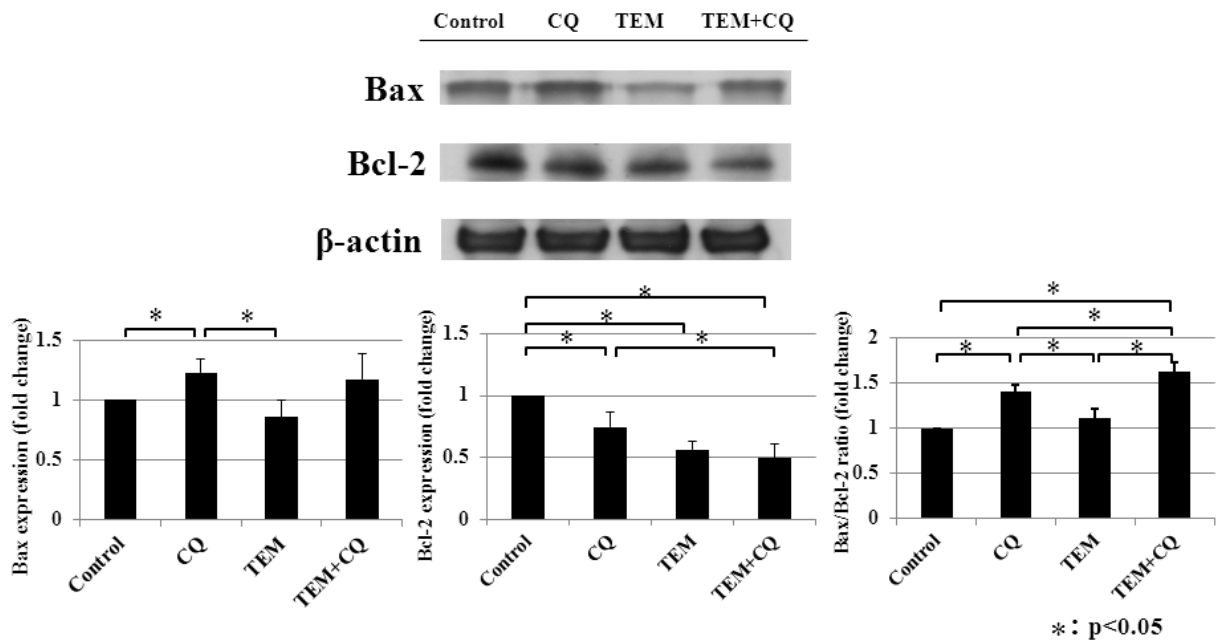


図 21. TEM と CQ 併用による大腸癌のアポトーシス関連タンパクへの影響
 CQ 単剤投与により Bax が増加した。CQ 単剤投与と TEM 単剤投与いずれも Bcl-2 の減少を認めた。TEM と CQ 併用群の Bax/Bcl-2 ratio は control 群と比較し 1.63 倍と最大であった。グラフは平均 \pm SD で示した。

【マウス皮下移植モデル - TEM と CQ の併用による腫瘍増殖抑制効果】

マウス大腸癌皮下腫瘍モデルにおいて、TEM と CQ 併用による効果を *in vivo* で検証した。実験にあたり、前章での TEM 単剤投与群での検討および、BALB/c マウス大腸癌皮下腫瘍モデルにおける CQ 単剤での安全性および抗腫瘍効果に関する過去の研究に準じて、TEM は 10 mg/kg/day、CQ は 50 mg/kg/day [51] と投与量を設定した。図 22 に示すように、薬剤投与開始 21 日後において、CQ 単剤投与群では明らかな腫瘍抑制効果を示さなかったが、TEM 単剤投与群、TEM と CQ 併用群で腫瘍抑制効果を認めた。投与開始 21 日後の TEM と CQ 併用群 (n=8) の皮下腫瘍体積は、

control 群 (n=8) と比較し 0.27 倍 (p=0.006)、CQ 単剤投与群 (n=8) の 0.25 倍 (p=0.002)、TEM 単剤投与群 (n=8) の 0.62 倍 (p=0.035) と、いずれとも有意差をもってより強い増殖抑制効果を認めた。各治療群間において、観察期間中に体重の有意差はなく、また肉眼的に観察できる範囲で明らかな副作用を認めなかった (data 略)。

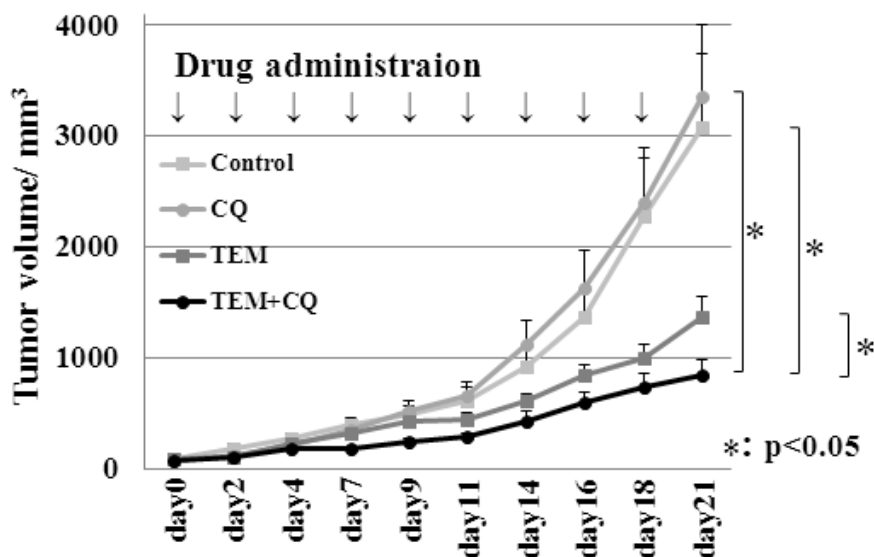


図 22. TEM と CQ 併用による皮下腫瘍の増殖抑制効果

TEM と CQ 併用群は、control 群、CQ 単剤投与群、TEM 単剤投与群のいずれと比較しても有意に強い腫瘍増殖効果を認めた。グラフは平均±SE で示した。

【マウス皮下移植モデル - TEM によるオートファジー誘導に対する CQ の影響 - western blotting】

皮下腫瘍組織由来のタンパク成分におけるオートファジー関連タンパクの変化を検証した。CQ 単剤投与群は control 群と比較し、LC3-II への転換は 2.05 倍と有意に

増加、p62 は 1.16 倍と有意に増加を認め、オートファジーの後期段階での阻害作用が確認された。一方、TEM 単剤投与群は control 群と比較し、LC3-II への転換は有意差を認めないものの 1.48 倍の増加、p62 は 0.86 倍と有意に減少を認め、TEM 単剤投与によって Colon-26 におけるオートファジーが進行しているものと推察された。

TEM と CQ 併用群では control 群と比較し、いずれも有意差を認めないものの、LC3-II への転換は 1.78 倍、p62 は 1.52 倍と増加していた (図 23)。この結果から、in vivo でも in vitro と同様に、CQ が TEM により誘導されたオートファジーを抑制しているものと推察された。

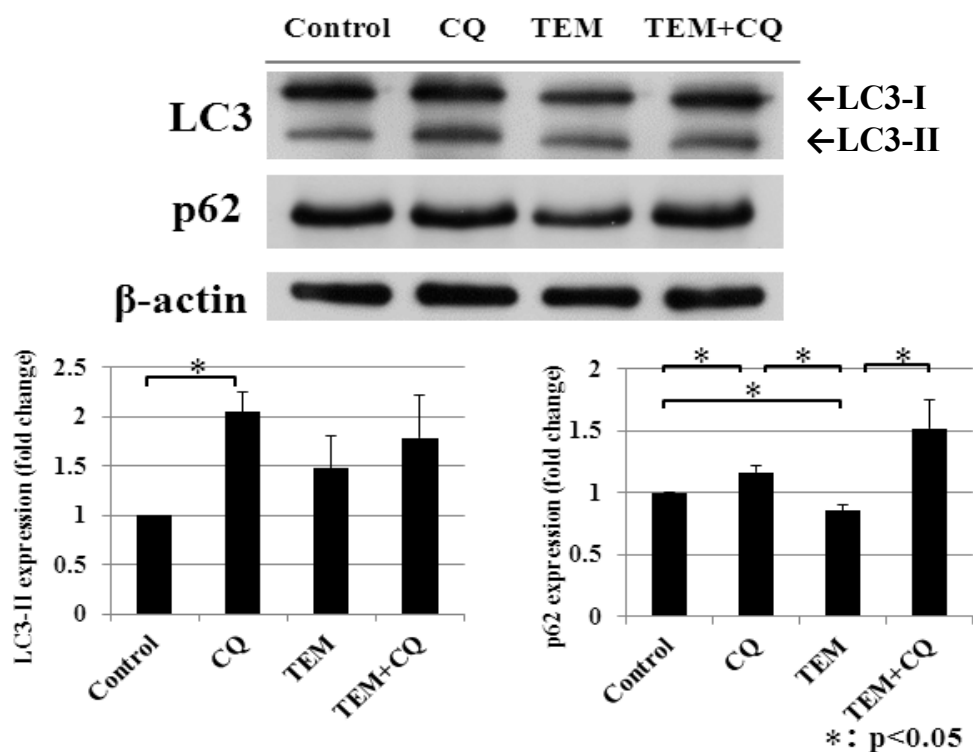


図 23. TEM によるオートファジー誘導に対する CQ の影響

western blotting による評価。TEM 単剤投与群では LC3-II 発現の増加および p62 発現の減少が認められた。TEM と CQ 併用により、p62 発現の増加を認めた。グラフは平均±SE で示した。

**【マウス皮下移植モデル - TEM と CQ の併用によるアポトーシス誘導への影響 -
TUNEL 法、western blotting】**

TEM と CQ 併用によるアポトーシス誘導効果を TUNEL 法で評価した。TUNEL 陽性細胞はそれぞれ、control 群: $0.24 \pm 0.02\%$ 、CQ 単剤投与群: $0.31 \pm 0.03\%$ 、TEM 単剤投与群: $0.43 \pm 0.02\%$ 、TEM と CQ 併用群: $0.80 \pm 0.06\%$ であり、TEM と CQ 併用群は他のいずれの群との比較においても有意に TUNEL 陽性細胞の割合が上昇していた (図 24)。

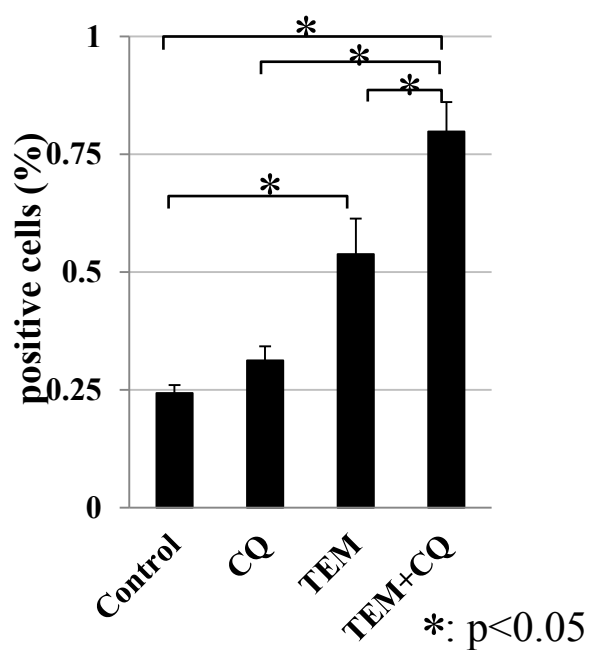
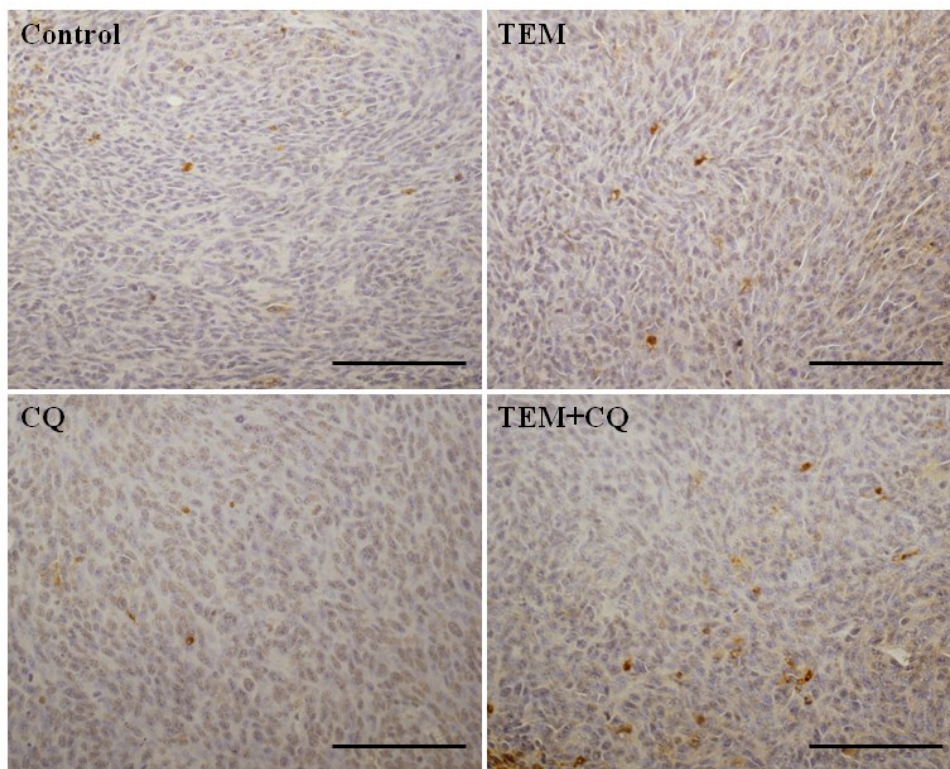


図 24. TEM と CQ 併用によるアポトーシス誘導への影響 - TUNEL 法

TEM と CQ 併用群は他のいずれの群との比較においても有意にアポトーシス（茶色に染色された細胞）の割合が上昇していた。bar は 50 μ m を示す。グラフは平均 \pm SE で示した。

次に、in vitro での実験同様、各群の皮下腫瘍組織由来のタンパク成分における、アポトーシス関連タンパクである Bax および Bcl-2 について western blotting にて検討した。有意差を認めないものの、CQ 単剤投与群は control 群と比較し Bax が 1.47 倍と増加を認めた。TEM 単剤投与群は control 群と比較し、Bcl-2 が 0.71 倍と有意に減少した。TEM と CQ 併用群での Bax/Bcl-2 ratio は、CQ 単剤投与群および TEM 単剤投与群と比較し有意差を認めないものの、control 群と比較し 1.74 倍と最大であった (図 25)。

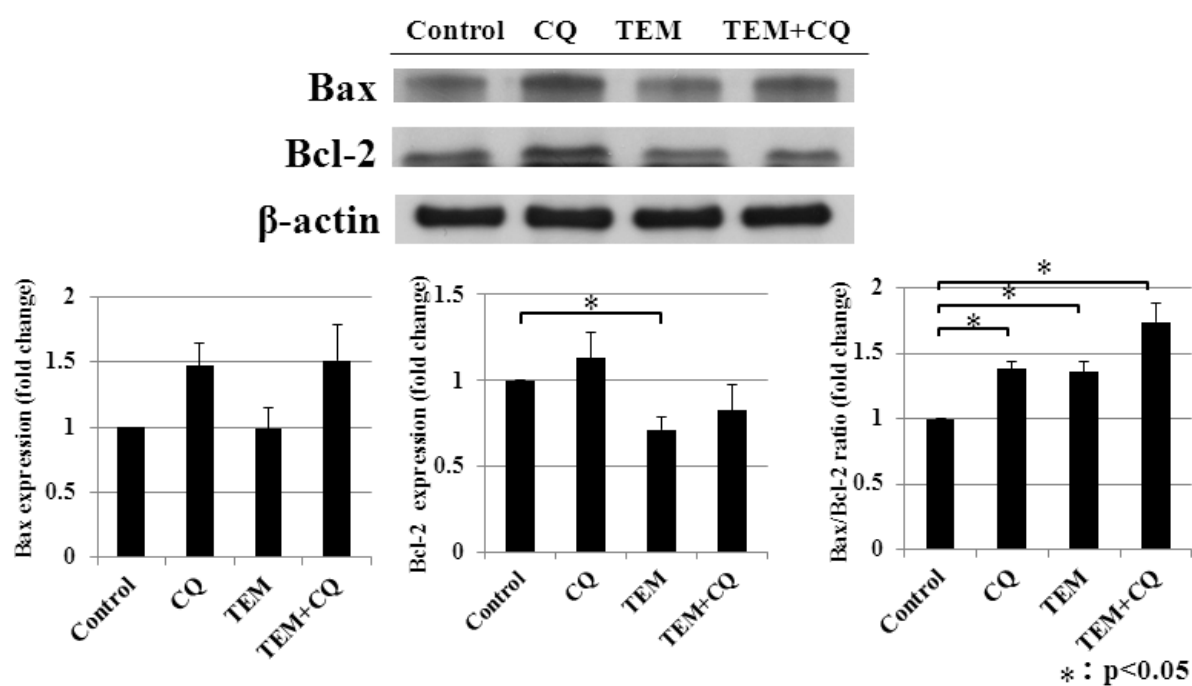


図 25. TEM と CQ の併用によるアポトーシス関連タンパクへの影響 western blotting による評価。TEM と CQ 併用群は 4 群の中で Bax/Bcl-2 ratio が最大であった。グラフは平均 \pm SE で示した。

2-4. 考察

これまでの抗悪性腫瘍薬としての臨床使用の経験から、rapalog の問題点もいくつか指摘されている。rapalog の作用が主に cytotoxic なものではなく cytostatic なものであるということや [70-72]、またこの薬剤に耐性を示す腫瘍が少なからず存在することなどである。このため他の薬剤との併用療法に関する研究も活発に行われている [73]。rapalog への抵抗性を示す原因の一つにオートファジー誘導も考えられていることから、本章では TEM とオートファジー阻害剤である CQ を併用することにより TEM の抗腫瘍効果を増強できるかを検証した。

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相加的な腫瘍増殖抑制効果を認めた。オートファジーに関して検討を行ったところ、図 18 に示したように、AVOs は TEM 単剤で増加を認めたが、CQ との併用によりさらに発現の増強を認めた。CQ はオートファジーを後期段階で阻害するため、AVOs の評価だけでなく、western blotting により LC3-II と p62 の評価を行った。LC3-II は AVOs と同様 TEM 単剤で増加を認めたが、CQ との併用によりさらに発現の増強を認めた。さらに直接の基質である p62 の評価を行った。p62 は TEM により減少したが、CQ との併用によりむしろ増加した。つまり、TEM により誘導されたオートファジーが CQ 投与により阻害されることが確認された。

次に、TEM と CQ の併用により、アポトーシス誘導が増強されるかについての検討を行った。フローサイトメトリーによる評価において、TEM と CQ の併用は、他のいずれの群との比較においても有意にアポトーシスが増加していた (図 20)。これまでに、CQ がプロアポトーシスタンパクである Bax を増加させるという報告 [74, 75] や、RAPA が抗アポトーシスタンパクである Bcl-2 を減少させるという報告 [76-78] があることから、TEM と CQ 併用によりアポトーシスが増加した機序に関する検討として、western blotting にて Bax/Bcl-2 ratio を測定した。定量化すると、TEM と CQ 併用群で有意に Bax/Bcl-2 ratio の上昇があり (図 21)、これがアポトーシス増加の機序の一つであると考えられた。

マウス皮下腫瘍モデルでの in vivo の検討においても、TEM と CQ 併用群は他のどの群との比較においても有意に腫瘍増殖が抑制されていた (図 22)。皮下腫瘍のタンパク抽出液による western blotting による評価においても、LC3-II は TEM 単剤で増加を認め、CQ との併用によりさらに発現の増強を認めた。p62 は TEM 単剤で減少を認め、CQ との併用により増加した (図 23)。故に in vitro の結果と同様に、in vivo でも TEM により誘導されたオートファジーが CQ 投与により阻害されることが確認された。皮下腫瘍における TUNEL 法によるアポトーシスの評価では、TEM と CQ 併用群は他の群と比較し有意にアポトーシスの割合が増加していた (図 24)。この機序に関する検討として、Bax/Bcl-2 ratio を western blotting にて評価したところ、TEM と

CQ併用群では control 群と比較し 1.74 倍と最大であった (図 25)。

以上より、TEM とオートファジー阻害剤である CQ を併用することにより、大腸癌細胞のアポトーシスを増強し得ることが、in vitro と in vivo の両面から確認された。

本研究により得られた結果は、他の抗悪性腫瘍薬とオートファジー阻害剤を併用することでアポトーシス誘導が増強したとするこれまでの報告と相違ない結果である

[42-49]。これまでに悪性腫瘍に対する mTOR 阻害剤とオートファジー阻害剤の併用の影響に関する報告は比較的少ない[79-83]。膀胱癌細胞、神経鞘腫細胞、神経芽腫細胞、肺癌細胞でアポトーシスを誘導したという報告があり、その機序に関する検討としては、神経芽腫細胞を用いた in vitro の実験系において Bax が増加し caspase 9、caspase 3 が増加したという報告と、神経鞘腫細胞を用いた in vivo の実験系において caspase 3 が増加したという報告のみである。我々の知り得る限り、大腸癌において mTOR 阻害剤とオートファジー阻害剤の併用効果を検討したことと、in vivo の実験系において Bax/Bcl-2 ratio が上昇したという結果は、いずれも初めての知見である。

TEM と CQ とともにすでに安全性が確認されている薬剤であるため、臨床応用が比較的容易であり、今後大腸癌での臨床応用が期待される。

2-5. 結論

TEM と CQ の併用はマウス大腸癌細胞株 Colon-26 の皮下移植腫瘍において、オートファジー誘導を抑制し、アポトーシスを誘導することによって腫瘍増殖を抑制する。アポトーシスの誘導の機序の一部はアポトーシスを制御する Bax/Bcl-2 ratio の上昇によるものと考えられる。以上の結果より、TEM と CQ との併用療法は進行再発大腸癌に対する新たな治療選択肢となり得ると考えられた。

総括および今後の課題

大腸癌細胞を用いた実験系にて、TEM の抗腫瘍効果を確認し、その効果は細胞周期の G1 期停止と血管新生抑制によるものであることを解明した。また、CQ による TEM の抗腫瘍効果増強を確認し、その効果は大腸癌細胞が TEM に対する防御機構として誘導したオートファジーが CQ によって阻害されたことと、Bax/Bcl-2 ratio の上昇によるアポトーシス誘導のためであることを証明した。この結果より、TEM 単剤および TEM と CQ との併用療法は、進行再発大腸癌に対する新しい治療戦略になりうると考えられた。

rapalog は免疫抑制作用も持つことから、免疫系への影響の検討も必要である。今回、in vivo の実験において、TEM 投与によるマウス脾細胞分画への影響をフローサイトメトリーで検討したところ、有意な変化を認めなかったが (data 略)、さらなる検討が必要と考えられる。

TEM と CQ とともにすでに他臓器の癌や疾患で臨床応用されている薬剤であり、大腸癌への臨床応用は比較的容易であると思われる。今後進行再発大腸癌患者における有効性と安全性を示すべく、第 I/II 相臨床試験の実施が望まれる。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、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 渡邊聡明教授、名川弘一名誉教授、北山丈二准教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜りました。そして、腫瘍外科学 須並英二先生、野澤宏彰先生、輸血医学 津野寛和先生には、具体的な実験方法、実験手技の習得、データの解釈、研究の進め方など、多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。同大学院輸血医学 高橋孝喜教授には実験の場を提供していただき、また論文の作成にあたってはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜りました。

さらに、実際の実験に際しては、輸血医学 田中実先生、腫瘍外科学 川合一茂先生、西川武司先生、佐々木和人先生、本郷久美子先生、日吉雅也先生、多田訓子先生、室野浩司先生、仁禮貴子先生、網谷かほる氏、そして輸血部 松橋美佳氏、三島由祐子氏には多大なる御協力を頂きました。

Pfizer 社には *in vivo* 実験用に TEM を無償供与して頂きました。

ここに深甚なる謝意を表します。

文献

1. 財団法人厚生統計協会 国民衛生の動向 2010/2011 年. 47-51, 2010.
2. Chau I, Cunningham D. Treatment in advanced colorectal cancer: what, when and how? *Br J Cancer* 100: 1704–1719, 2009.
3. Winder T, Lenz HJ. Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer. *Gastroenterology* 138: 2163-2176, 2010.
4. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337-345, 2004.
5. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 12: 594-603, 2011.
6. Y. Alvarado, M.M. Mita, S. Vemulapalli, D. Mahalingam, A.C. Mita. Clinical activity of mammalian target of rapamycin inhibitors in solid tumors. *Target Oncol* 6: 69-94, 2011.

7. Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Takase K, Gelfand EW. Rapamycin inhibits the phosphorylation of p70 S6 kinase in IL-2 and mitogen-activated human T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 1315-1321, 1992.
8. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulić A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC Jr, Abraham RT. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277: 99-101, 1997.
9. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293, 2012.
10. Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, Tokunaga C, Hara K, Eguchi S, Avruch J, Yonezawa K. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 9: 359-366, 2004.
11. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Bio* 14: 1296-1302, 2004.

12. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6: 1122-1128, 2004.
13. Aspeslet LJ, Yatscoff RW. Requirements for therapeutic drug monitoring of sirolimus, an immunosuppressive agent used in renal transplantation. *Clin Ther* 22: Suppl B:B86-B92, 2000.
14. Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci* 58: 373-395, 1996.
15. Vishnevetsky D, Patel P, Tijerino H, Gandhi PJ. Sirolimus-eluting coronary stent. *Am J Health Syst Pharm* 61: 449-456, 2004.
16. Kwitkowski VE, Prowell TM, Ibrahim A, Farrell AT, Justice R, Mitchell SS, Sridhara R, Pazdur R. FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* 15: 428-435, 2010.
17. <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-everolimus>, [accessed on Nov 30, 2012] .
18. <http://www.clinicaltrials.gov>, [accessed on Nov 30, 2012] .

19. Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivières S, Mercep L, Ferrari S.
Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J Biol Chem* 273: 14424-14429, 1998.
20. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8: 128-135, 2002.
21. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5: 671–688, 2006.
22. Johnson SM, Gulhati P, Rampy BA, Han Y, Rychahou PG, Doan HQ, Weiss HL, Evers BM. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 210: 767-776, 776-778, 2010.
23. Nozawa H, Watanabe T, Nagawa H. Phosphorylation of ribosomal p70 S6 kinase and rapamycin sensitivity in human colorectal cancer. *Cancer Lett* 251: 105-113, 2007.

24. Ghiringhelli F, Guiu B, Chauffert B, Ladoire S. Sirolimus, bevacizumab, 5-Fluorouracil and irinotecan for advanced colorectal cancer: a pilot study. *World J Gastroenterol* 15: 4278-4283, 2009.
25. Okamoto I, Doi T, Ohtsu A, Miyazaki M, Tsuya A, Kurei K, Kobayashi K, Nakagawa K. Phase I clinical and pharmacokinetic study of RAD001 (everolimus) administered daily to Japanese patients with advanced solid tumors. *Jpn J Clin Oncol* 40: 17-23, 2010.
26. Fujisaka Y, Yamada Y, Yamamoto N, Horiike A, Tamura T. A Phase 1 clinical study of temsirolimus (CCI-779) in Japanese patients with advanced solid tumors. *Jpn J Clin Oncol* 40: 732-738, 2010.
27. Dumont FJ, Staruch MJ, Grammer T, Blenis J, Kastner CA, Rupperecht KM. Dominant mutations confer resistance to the immunosuppressant, rapamycin, in variants of a T cell lymphoma. *Cell Immunol* 163: 70-79, 1995.
28. Fruman DA, Wood MA, Gjertson CK, Katz HR, Burakoff SJ, Bierer BE. FK506 binding protein 12 mediates sensitivity to both FK506 and rapamycin in murine mast cells. *Eur J Immunol* 25: 563-571, 1995.

29. Lorenz MC, Heitman J. TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J Biol Chem* 270: 27531–27537, 1995.
30. Bhatt AP, Bhende PM, Sin SH, Roy D, Dittmer DP, Damania B. Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood* 115: 4455–4463, 2010.
31. Kharas MG, Janes MR, Scarfone VM, Lilly MB, Knight ZA, Shokat KM, Fruman DA. Ablation of PI3K blocks BCRABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL+ leukemia cells. *J Clin Invest* 118: 3038-3050, 2008.
32. Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate 1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther* 4: 1533-1540, 2005.
33. Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin like growth factor-1

receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* 111: 379-382, 2008.

34. Janes MR, Limon JJ, So L, Chen J, Lim RJ, Chavez MA, Vu C, Lilly MB, Mallya S, Ong ST, Konopleva M, Martin MB, Ren P, Liu Y, Rommel C, Fruman DA. Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nat Med* 16: 205–213, 2010.

35. Carew JS, Kelly KR, Nawrocki ST. Mechanisms of mTOR inhibitor resistance in cancer therapy. *Target Oncol* 6: 17-27, 2011.

36. Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett* 278: 130-138, 2009.

37. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 (Suppl 2): 1542-1552, 2005.

38. 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 Res* 61: 439-444, 2001.

39. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2491-2502, 2004.
40. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol* 32: 431-436, 2010.
41. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21: 2861-2873, 2007.
42. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas Tikhonenko A, Thompson CB. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 117: 326-336, 2007.
43. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, Galavotti S, Young KW, Selmi T, Yacobi R, Van Etten RA, Donato N, Hunter A, Dinsdale D, Tirro E, Vigneri P, Nicotera P, Dyer MJ, Holyoake T, Salomoni P, Calabretta B. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest* 119: 1109-1123, 2009.

44. Carew JS, Espitia CM, Esquivel JA 2nd, Mahalingam D, Kelly KR, Reddy G, Giles FJ, Nawrocki ST. Lucanthone: a novel inhibitor of autophagy that induces cathepsin D-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 286: 6602-6613, 2011.
45. Carew JS, Medina EC, Esquivel JA 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, Zhang H, Huang P, Mita AC, Mita MM, Giles FJ, Nawrocki ST. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* 14: 2448-2459, 2010.
46. Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, Zhang H, Yang C, Chung L, Houghton JA, Huang P, Giles FJ, Cleveland JL . Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* 110: 313-322, 2007.
47. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 131: 548-557, 2012.

48. Nakamura O, Hitora T, Akisue T, Kawamoto T, Yamagami Y, Yamamoto T. Inhibition of induced autophagy increases apoptosis of Nara-H cells. *Int J Oncol* 39: 1545-1552, 2011.
49. Guo XL, Li D, Hu F, Song JR, Zhang SS, Deng WJ, Sun K, Zhao QD, Xie XQ, Song YJ, Wu MC, Wei LX. Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Lett* 28: 171-179, 2012.
50. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis* 3: 722-727, 2003.
51. Zheng Y, Zhao YL, Deng X, Yang S, Mao Y, Li Z, Jiang P, Zhao X, Wei Y. Chloroquine inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis. *Cancer Invest* 27: 286-292, 2009.
52. Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem* 14: 3218-3222, 2006.
53. Jiang PD, Zhao YL, Shi W, Deng XQ, Xie G, Mao YQ, Li ZG, Zheng YZ, Yang SY, Wei YQ. Cell growth inhibition, G2/M cell cycle arrest, and apoptosis induced by chloroquine in human breast cancer cell line Bcap-37. *Cell Physiol Biochem* 22: 431-440, 2008.

54. Munshi A. Chloroquine in glioblastoma--new horizons for an old drug. *Cancer* 115: 2380-2383, 2009.
55. Rahim R, Strobl JS. Hydroxychloroquine, chloroquine, and all-trans retinoic acid regulate growth, survival, and histone acetylation in breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 20: 736-745, 2009.
56. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 117: 326-336, 2007.
57. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-91, 1997.
58. Berthet C, Kaldis P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 26: 4469-4477, 2007.
59. Gera JF, Mellinger IK, Shi Y, Rettig MB, Tran C, Hsu JH, Sawyers CL, Lichtenstein AK. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem* 279: 2737-2746, 2004.

60. Nelsen CJ, Rickheim DG, Tucker MM, Hansen LK, Albrecht JH. Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *J Biol Chem* 278: 3656-3663, 2003.
61. Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, Khuri FR. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res* 65: 7052-7058, 2005.
62. Hoang B, Benavides A, Shi Y, Yang Y, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. The PP242 mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor activates extracellular signal-regulated kinase (ERK) in multiple myeloma cells via a target of rapamycin complex 1 (TORC1)/eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF-4E)/RAF pathway and activation is a mechanism of resistance. *J Biol Chem* 287: 21796-21805, 2012.
63. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60:1541-1545, 2000.

64. Wan X, Shen N, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ. CCI-779 inhibits rhabdomyosarcoma xenograft growth by an antiangiogenic mechanism linked to the targeting of mTOR/Hif-1alpha/VEGF signaling. *Neoplasia* 8: 394-401, 2006.
65. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 454-460, 2005.
66. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8: 128-135, 2002.
67. Pencreach E, Guérin E, Nicolet C, Lelong-Rebel I, Voegeli AC, Oudet P, Larsen AK, Gaub MP, Guenot D. Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. *Clin Cancer Res* 15: 1297-1307, 2009.
68. Perlman H, Zhang X, Chen MW, Walsh K, Buttyan R. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ* 6: 48-54, 1999.

69. Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, Papathanasopoulos P, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Petsas T, Dougenis D. Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo* 21: 123-132, 2007.
70. Willems L, Tamburini J, Chappuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep* 14: 129-38, 2012.
71. Martelli AM, Evangelisti C, Chappell W, Abrams SL, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo V, Ruvolo P, Kempf CR, Steelman LS, McCubrey JA. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia* 25: 1064-1079, 2011.
72. Ma WW, Jimeno A. Temsirolimus. *Drugs Today (Barc)* 43: 659-669, 2007.
73. Alvarado Y, Mita MM, Vemulapalli S, Mahalingam D, Mita AC. Clinical activity of mammalian target of rapamycin inhibitors in solid tumors. *Target Oncol* 6: 69-94, 2011.

74. Park BC, Park SH, Paek SH, Park SY, Kwak MK, Choi HG, Yong CS, Yoo BK, Kim JA. Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. *Toxicol Lett* 178: 52-60, 2008.
75. Lagneaux L, Delforge A, Dejefeffe M, Massy M, Bernier M, Bron D. Hydroxychloroquine-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia involves activation of caspase-3 and modulation of Bcl-2/bax/ratio. *Leuk Lymphoma* 43: 1087-1095, 2002.
76. Miyake N, Chikumi H, Takata M, Nakamoto M, Igishi T, Shimizu E. Rapamycin induces p53-independent apoptosis through the mitochondrial pathway in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 28: 848-854, 2012.
77. Hayun R, Okun E, Berrebi A, Shvidel L, Bassous L, Sredni B, Nir U. Rapamycin and curcumin induce apoptosis in primary resting B chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 50: 625-632, 2009.
78. Zhang JF, Liu JJ, Lu MQ, Cai CJ, Yang Y, Li H, Xu C, Chen GH. Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transpl Immunol* 17: 162-168, 2007.

79. Xu CX, Zhao L, Yue P, Fang G, Tao H, Owonikoko TK, Ramalingam SS, Khuri FR, Sun SY. Augmentation of NVP-BEZ235's anticancer activity against human lung cancer cells by blockage of autophagy. *Cancer Biol Ther* 12: 549-555, 2011.
80. Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S, Christofidou-Solomidou M, Rengan R, Koumenis C, Maity A. Inhibition of Autophagy as a Strategy to Augment Radiosensitization by the Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor NVP-BEZ235. *Mol Pharmacol* 82: 1230-1240, 2012.
81. Seitz C, Hugel 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. *Int J Cancer*, 2012; Nov 13 [Epub ahead of print].
82. Ghadimi MP, Lopez G, Torres KE, Belousov R, Young ED, Liu J, Brewer KJ, Hoffman A, Lusby K, Lazar AJ, Pollock RE, Lev D. Targeting the PI3K/mTOR axis, alone and in combination with autophagy blockade, for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Mol Cancer Ther* 11: 1758-1769, 2012.
83. Mirzoeva OK, Hann B, Hom YK, Debnath J, Aftab D, Shokat K, Korn WM. Autophagy suppression promotes apoptotic cell death in response to inhibition of the PI3K-mTOR pathway in pancreatic adenocarcinoma. *J Mol Med (Berl)* 89: 877-889, 2011.

