

(様式4)

## 学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

牛島 弘毅 印

**Radiosensitization effect of an mTOR inhibitor, temsirolimus, on lung adenocarcinoma A549 cells under normoxic and hypoxic conditions**

（通常酸素・低酸素条件下でのヒト肺腺癌A549に対する、mTOR阻害剤Temsirrolimusの放射線増感効果）

【背景】低酸素条件下の細胞は放射線抵抗性を示すことが知られており、臨床においても腫瘍内の低酸素細胞分画の多少と局所制御率が相関することが報告されている。

mammalian target of rapamycin (mTOR) はAkt-PI3 kinase経路の下流の蛋白であり、細胞の増殖・生存と深く関わっていることが知られ、すでにmTOR阻害剤は本邦でも腎癌などに対する分子標的薬として臨床応用されている。近年、mTORが低酸素条件下の細胞生存に関連する蛋白として注目されており、mTORは低酸素条件下でのHIF-1 $\alpha$ 発現の修飾に関係しているとの報告がある。また、mTOR阻害剤が放射線の効果を増感するという報告もある。

今回我々は、低酸素条件下の放射線治療抵抗性にmTORが関連している可能性を考え、通常酸素状態・低酸素状態におけるmTOR阻害剤（Temsirrolimus）による放射線感受性の修飾について比較・検討した。

【方法】実験にはヒト肺腺癌由来細胞株A549を使用した。X線はFaxitron RX-650を用いて照射した。最初にA549の、X線単独での通常酸素条件下、および低酸素条件下における細胞生存率をcolony assay法で計測した。低酸素条件のために、低酸素チャンバー（京都科学）を使用し、酸素分圧をリアルタイムに評価しながら95%N<sub>2</sub>と5%CO<sub>2</sub>の混合ガスでチャンバー内を満たし、酸素分圧<0.1mmHgの条件を作成した。低酸素条件の細胞は、X線照射前24時間、およびX線照射中、照射後1時間酸素分圧<0.1mmHgの条件を保った。酸素増感比（OER）を求めるため、細胞の生存が10%の値となる線量（D10）の比を計算した。次に、mTOR阻害剤としてTemsirrolims（Pfizer）を用い、48時間、A549に暴露した後の細胞生存率をcolony assay法で求めた。最初にTemsirrolims単剤で濃度の違いによる細胞生存率を検討し、TemsirrolimusとX線照射を併用する際の濃度を決定した。最後に、TemsirrolimsとX線照射併用による細胞の生存率を、通常酸素条件および低酸素条件下で計測し、同様にOERを計算した。

細胞のタンパク質発現に関してはウェスタンブロット法を用いた。mTORの関連タンパク、およびHIF1- $\alpha$ に関して、Temsirrolimsによる発現への影響を、通常酸素、低酸素の両方の条件下で検討した。

【結果】X線単独での、通常酸素条件、低酸素条件下の細胞生存率をcolony assay法を用いて検討した結果、D10は、それぞれ5.1Gy、14.2Gyで、OERは2.8であった。Temsirrolimus単独の細胞生

存率をcolony assay法にて求め、X線照射に併用するTemsirrolimusの濃度は、1nMとした。TemsirrolimusをX線照射に併用した場合では、通常酸素条件・低酸素条件下のD10は、それぞれ4.8Gy、5.4Gyで、OERは1.1であった。また、ウエスタンブロット法による細胞内タンパクに関しては、通常酸素条件下、低酸素条件下ともに、Temsirrolimus使用によりmTORの発現は同様に抑制されていた。また、1nMの濃度のTemsirrolimusで、低酸素条件下で誘導されるHIF-1 $\alpha$ の発現が減少していることが確認された。

【考察】通常酸素条件下でTemsirrolimusを併用した場合、明らかな放射線増感効果は認められなかった。一方、低酸素条件下ではTemsirrolimus併用により、細胞生存率は特に高線量域において著明に低下した。mTOR阻害薬（Temsirrolimus）の併用により、低酸素条件下で放射線増感効果が認められ、mTORが低酸素細胞の放射線治療抵抗性に関連する因子である可能性が示唆された。その作用メカニズムにはmTOR阻害薬によるHIF-1 $\alpha$ 発現低下が関連している可能性が考えられた。今後は複数の細胞株を用いて増感作用の更なるメカニズムの解析を進める必要があるが、本研究ではmTOR阻害剤が低酸素増感剤として有用である可能性を示し、臨床応用に向けた初期研究として意義があると考えられる。