



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1951号
学位記番号	第1381号
氏名	原田 真之資
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	AZD6738 promotes the tumor suppressive effects of trifluridine in colorectal cancer cells (AZD6738は大腸癌細胞におけるトリフルリジンの腫瘍抑制効果を促進する)  Oncology Reports49: 52, 2023
論文審査担当者	主査： 片岡 洋望 副査： 稲垣 宏, 高橋 智

## 論文内容の要旨

【背景】Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) は、DNA 損傷を修復するキナーゼである。昨今、ATR を選択的に標的とする阻害剤が開発されており、胃癌や膵癌領域において ATR 阻害剤の臨床試験が進んでいる。しかし、大腸癌に対する ATR 阻害剤の有効性はほとんど解明されていない。我々はこれまで、5-フルオロウラシル (5-FU) と ATR 阻害剤である AZD6738 の併用療法が治療効果を増強することを報告してきた。殺細胞性抗癌薬により DNA に機能障害を来した細胞は G2/M チェックポイントで修復されるが、AZD6738 が G2/M チェックポイントで Chk1 のリン酸化を抑制し、その修復を阻害する。結果として最終的に癌細胞はアポトーシスに導かれるものと考えている。我々は、G2/M チェックポイントの直前の S 期で DNA 損傷を来し、5-FU より DNA 取り込み率の高い薬剤こそが AZD6738 の併用薬としてより適すると仮説を立てた。今回、我々は、その条件を満たす薬剤 trifluridine (FTD) に着目し、AZD6738 との併用療法について検討した。

【方法】細胞実験において大腸癌細胞株 HT29, HCT116, DLD-1, SW480 を使用した。細胞増殖アッセイでは、すべての細胞株を用いて FTD の各濃度における AZD6738 の併用効果について検討した。以下すべての実験においては Control 群, AZD6738 単剤群, FTD 単剤群, FTD + AZD6738 群に分けて検討した。細胞増殖アッセイで HT29, HCT116 を用いて、時系列における生存率の変化を検討した。Flow cytometry では HT29 を用いて時系列における細胞周期の局在について検討した。Western blotting では HT29 を用いてリン酸化される Chk1 蛋白の発現強度, HT29, HCT116 を用いて DNA 損傷とアポトーシスの程度を示す蛋白の発現強度について検討した。動物実験において HT29 を用いて BALB/c nu/nu マウスに異種皮下移植させ、腫瘍の増大抑制効果, 体重減少について 3 週間、毎日評価した。FTD は経口投与により肝臓でチミジンが分解され十分な血中濃度が得られない為、トリフルリジンを代謝する酵素を阻害する tipiracil を一定の比で混合した TAS-102 と呼ばれる薬剤を使用した。その後、腫瘍を摘出し、免疫染

色による DNA 損傷について検討した。

【結果】細胞増殖アッセイによりすべての細胞株において AZD6738 は FTD の増殖抑制を増強した。Flow cytometry により FTD 単剤群に比べ FTD + AZD6738 群で G2/M チェックポイントにおいて細胞周期の停止が解除されていることが示された。また細胞増殖アッセイで時間経過と共に細胞生存率は低下し AZD6738 の上乗せ効果が示された。Western blotting により HT29 で FTD 単剤群に比べ FTD + AZD6738 群でリン酸化された Chk1 蛋白の発現が抑制されることが示された。また、HT29、HCT116 で DNA 損傷とアポトーシスの程度を示す蛋白の発現強度は FTD 単剤群に比べ FTD + AZD6738 群で増強した。マウスに皮下移植された腫瘍の増大抑制効果は FTD 単剤群に比べ FTD + AZD6738 群で増強した。体重減少については特に有意な差はなかった。摘出された腫瘍を DNA 損傷の程度を示す  $\gamma$ H2A.X で免疫染色すると、FTD 単剤群に比べ FTD + AZD6738 群で増強した。

【考察・結語】AZD6738 は、in vitro 及び in vivo において FTD の腫瘍抑制効果を増強することが確認された。また、細胞実験の中で ATR 阻害剤は p53 変異体に対して有効であると言われてきたが、本研究では、p53 野生型大腸癌細胞株である HCT116 に対しても有効であることが示された。動物実験において 5-FU と AZD6738 の併用療法は腫瘍の大きさが 5-FU 単剤に比して 50%であったことに対し、TAS-102 と AZD6738 の併用療法では腫瘍は TAS-102 単剤に比し 25%であり、5-FU より FTD の方が効率的に腫瘍を抑制し、より適した AZD6738 との併用薬であると推察された。今後は大腸癌の化学療法のキードラッグである 5-FU に耐性をもつ細胞株を作成し、ATR 阻害剤の有効性を示していきたい。

### 論文審査の結果の要旨

【背景】大腸癌の薬物療法は様々な組み合わせによる治療法が多様化してきている。現行の大腸癌治療ガイドラインの切除不能進行・再発大腸癌の薬物療法で5-fluorouracil (以下5-FU) が1次及び2次治療で使用された後、3次治療以降でtrifluridine (以下FTD) が使用される。FTDは腫瘍縮小効果に乏しく、単剤治療には限界がある。昨今、細胞周期のG2/M checkpointで作用するATR阻害剤の研究が散見され、様々な癌腫で併用され効果が示されている。FTDは他剤に比して、DNAへの取り込み率も高く、S期のみで作用し機能障害を来たす為、AZD6738と組み合わせた治療増強効果が期待される。今回、大腸癌に対し新規治療としてAZD6738とFTDの併用療法の有効性について検証した。

【目的】大腸癌細胞株に対するAZD6738とFTDの併用療法は、FTDの治療増強効果を示すか検討することを目的とした。

【方法】4種類の大腸癌細胞株 (HT29, HCT116, DLD-1, SW480) に対してWST-1 assayを行い、大腸癌細胞株にFTDとAZD6738を加えると腫瘍増殖の抑制効果は増強を示すか検討した。Flow cytometryで、FTDとAZD6738を加えると時系列で、細胞周期の局在はどの様に変化するか検討した。Western blotting (WB)でFTD, AZD6738によるChk1リン酸化抑制の有無、また細胞死がapoptosisによるものか発現蛋白を検討した。In vivoでHT29細胞株のマウス異種皮下移植モデルを作成し、AZD6738とFTDを加えた腫瘍体積の変化や免疫染色でDNA損傷の蓄積について検討した。

【結果】In vitroでAZD6738の適正濃度はFlow cytometryと既報した実験より0.5  $\mu$ Mに設定した。4種類の大腸癌細胞株にFTDにAZD6738を加えるとWST-1 assayにおいて複数の濃度のFTDでAZD6738併用による増殖抑制が示された。Flow cytometryでFTDにAZD6738を併用するとG2/M checkpointに局在する細胞が48時間以上で著明に低下し、細胞増殖実験もまた同群で抑制された。WBではFTDにAZD6738を併用した群でChk1のリン酸化が抑制され、 $\gamma$ H2A.XやCleaved-caspase3やCleaved-PARPの発現強度は増強した。In vivoで皮下移植された腫瘍体積はTAS102にAZD6738を併用した群で抑制され、腫瘍の免疫染色もまた同群で $\gamma$ H2A.Xが蓄積していた。

【結語】AZD6738は大腸癌細胞株においてFTDの腫瘍抑制効果を増強した。

【審査内容】主査からは①5-FUとロンサーフの基礎的、臨床的違いは何か、②なぜTAS102単剤ではin vivoにおいて腫瘍抑制効果がないのか、③AZD6738の臨床的開発の現状についてなど計8項目の質問がなされた。第1副査の稲垣宏教授からは、①なぜ消化器癌にはピリミジン系を標的にした抗がん剤が頻用されるのか、②胃癌や膀胱癌でATR阻害剤の試験が進んでいる一方、大腸癌では臨床試験が進まない理由について、③骨髄抑制の評価はしたのかなど、計12項目の質問がなされた。第2副査の高橋智教授からは、①Combination index scoreの具体的な計算方法、②Discussionでin vivoにおいて5-FUとFTDを比較しているが単純には比較できないのではないかと、③精巢についてブアン固定して組織を調べていないのか、など計10項目の質問がなされた。これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが概ね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は大腸癌に対するAZD6738とFTDの併用が治療増強効果を示唆し、今後の発展も期待できると考えられた。よって、これらの新知見を理解し報告した本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。