HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス腫瘍細胞のネクロプトーシス誘導経路に関する研究
Author(s)	竹村, 龍
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11676号
Issue Date	2015-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11676
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/62576
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号：2158
File Information	Ryo_Takemura.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

マウス腫瘍細胞のネクロプトーシス誘導経路に関する研究
(Poly I:C-induced necroptosis is TLR3/RIP3-dependent in mouse tumor cell lines)

2015 年 3 月

北海道大学

竹村　龍

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

略語表・・2

序章 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4

材料と方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10

第一章　Poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス感受性マウス腫瘍細胞株の探索

緒言・・ 18

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
1.1　Poly I:C と zVAD により細胞死が誘導されるマウス腫瘍細胞株の検索
1.2　ネクロスタチン-1 によるネクロプトーシス阻害

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25

第二章　CT26 細胞におけるネクロプトーシス誘導経路の同定

緒言・・ 26

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27
2.1　CT26 細胞の TLR3 発現と poly I:C によるシグナル誘導能
2.2　I 型 IFN と TNFαが CT26 細胞において poly I:C/zVAD により誘導されるネクロプトーシスに与える影響
2.3　CT26 細胞での poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導経路の解析
2.4　Poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導における活性酸素種の関与について

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

第三章　Poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導の分子メカニズムの解析

緒言・・ 35

結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36
3.1 Poly I:C/zVAD 処理による RIP3 と TICAM-1 結合変化の検討
3.2 ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞の樹立と CT26 細胞との比較
3.3 各種細胞における *Ripk3* mRNA 発現量の比較

考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40

第四章 生体内での CT26 細胞に対する poly I:C/zVAD の抗腫瘍効果の検討

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42
4.1 CT26 細胞担癌マウスにおける poly I:C の抗腫瘍効果の検討
4.2 Poly I:C の抗腫瘍効果における NK 細胞と CD8β陽性 T 細胞の役割
4.3 生体内での poly I:C と zVAD 併用による CT26 細胞への抗腫瘍効果

考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・45

終章 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49

参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に投稿中である。

Ryo Takemura, Hiromi Takaki, Hiroaki Shime, Hiroyuki Oshiumi,

Misako Matsumoto, Takanori Teshima, Tsukasa Seya

Poly I:C-induced necroptosis is TLR3/RIP3-dependent in mouse tumor cell lines.

Oncoimmunology

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 竹村　龍、高木　宏美、志馬　寛明、松本　美佐子、瀬谷　司
Toll-like receptor 3 を介したネクロプトーシス誘導機構の研究
第 86 回日本生化学会大会、 2013 年 9 月 11 日、 横浜

略語表

Azi2	5-azacytidine induced gene 2
BHA	butylated hydroxyanisole
BPB	bromphenol blue
BSA	Bovine serum arubmin
cFLIP	cellular FLICE-inhibitory protein
cIAP	cellular inhibitor of apotosis protein
CM-H_2DCFDA	2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
CYLD	cylindromatosis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Drp1	dynamin-related protein 1
dsRNA	double-stranded ribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas-associated death domain
FBS	fetal bovine serum
FLICE	FADD-like IL- 1 β-converting enzyme
HBSS	Hank's balanced salt solution
HMGB1	High mobility group box 1
HRP	horseradish peroxydase
IFN	Interferon
i.p.	intraperitoneal
IPS-1	Interferon-β promoter stimulator-1
IRF	interferon-regulatory factor
LPS	Lipopolysaccharide
LUBAC	linear ubiquitin chain assembly complex
MAC	mitochondrial attack complex
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein
MLKL	mixed lineage kinase domain-like
MDA5	Melanoma differentiation associated gene 5
MEM	minimal essential medium
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NEAA	Non-essential amino acids solution

Nec-1	Necrostatin-1
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NK	Natural Killer
NP-40	Nonidet P-40
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGAM5	phosphoglycerate mutase family member 5
PS	phosphatidyl serine
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Poly I:C	polyinosinic-polycytidylic acid
PRRs	pattern-recognition receptors
PVDF	polyvinylidene fluoride
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RIP	receptor interacting protein
ROS	Reactive oxygen species
s.c.	subcutaneous
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIRT2	NAD-dependent deacetylase sirtuin-2
TCL	Total cell lysate
TICAM	TIR-containing adapter molecule
TIR	Toll-IL-1 receptor homology
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRADD	TNF receptor-1-associated death domain
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRIF	TIR domain containing adapter inducing IFN-β
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
zVAD	z-Val-Ala-Asp fluromethyl ketone
WT	Wild type

序章

細胞死は感染や炎症を伴う悪性腫瘍においてしばしば起こることが知られている。ウイルス感染もまた細胞死を引き起こし、この細胞死によってウイルスの感染拡大を制御していると考えられている[1]。しかし、近年の細胞死に関する研究より、腫瘍生物学において、死細胞から放出される内容物が腫瘍周囲の免疫系や腫瘍の環境を調節することが明らかとなっている。死細胞の内容物は細胞死のタイプによって異なり、周囲の免疫系に与える影響も変化することが知られている[2,3]。死細胞から産生されるエキソソームはタンパク質と核酸を含んでおり、腫瘍の成長や浸潤を調整していると考えられている[4]。二本鎖 RNA (dsRNA) やステム構造を含む RNA は宿主の免疫応答を引き起こすウイルスのパターン分子である[5-7]。

パターン認識受容体(pattern-recognition recetors, PPRs)はウイルスの RNA や複製中間体である dsRNA を認識し、感染細胞に細胞死を誘導する[6]。腫瘍の確立において細胞死は頻繁に観察され炎症を伴う[8]。polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) は dsRNA の合成アナログであり、線維芽細胞やマクロファージ細胞において直接的に細胞死を引き起こすことが知られている。ウイルスや腫瘍細胞からの RNA は周囲の微小環境の炎症反応の特性に影響を与えると考えられる[8,9]。腫瘍細胞内の骨髄系細胞は正常細胞と比べて dsRNA に対する感受性が高い[4,9]。一方、抗原提示細胞である樹状細胞は dsRNA に応答し成熟することから、細胞生存または細胞死を誘導する経路は細胞種ごとに異なっていると推測される。プログラムされた細胞死はアポトーシス型とネクローシス型に大別されるが、poly I:C はアポトーシス型、ネクローシス型ともに誘導することができる[10]。自然免疫に関する試験管内での研究から poly I:C による細胞死には複数のシグナル経路があり、細胞ごとに多様な細胞死があることが示唆されている[11-13]。しかしながら腫瘍細胞において poly I:C による細胞死を誘導する経路は生体内ではほとんど明らかとなっていない。

Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)と toll-like receptor (TLR) 3 は poly I:C やインターフェロン (IFN) 刺激により発現上昇することからこれらの分子は interferon regulatory factor (IRF)3 と IFN 誘導性の因子である[13]。癌化細胞は通常 TLR3 や MDA5 を高発現しており、poly I:C の刺激により IFN や炎症性サイトカンの産生と同時に細胞死や細胞生存を誘導するシグナルを伝達する[12,14,15]。細胞生存シグナルか細胞死シグナルかを決定する因子は明らかとなっていないが、IRF3 と IFNAR 誘導性の細胞死は多数報告されていることから[12-16]、現在細胞死誘導経路におけるこれらの分子の相違に関する研究が行われている。

MDA5 は 1,000 塩基対より長い 2 本鎖 RNA を認識し、TLR3 は感染細胞や自己細胞由来の 90 塩基対より長い 2 本鎖 RNA や一部の 1 本鎖 RNA を認識している[5,7,17]。MDA5 と異なり、TLR3 はウイルス非感染細胞では RNA やエキソソームに含まれる RNA を認識する[5,14]。エキソソームはエンドソームに取り込まれ、エンドソームに存在する TLR3 がエキソソームに含まれる

RNA を認識する。Poly I:C は TLR3 と MDA5 のリガンドとして報告されており、NF-kB と IRF3 を活性化し、炎症性サイトカインや I または III 型 IFN の産生を誘導する[7,14]。MDA5 と TLR3 はそれぞれアダプター分子として mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS)と toll-IL-1 receptor homology (TIR)-containing adapter molecule-1 (TICAM-1)を介し[14,18]、細胞種依存的に receptor interacting protein kinase (RIP)1/3 の活性化を引き起こす[19 20]。しかしながら、poly I:C の抗腫瘍効果の点において、腫瘍細胞ではどの経路が poly I:C により活性化されるのか不明である。

現在、プログラム細胞死について研究が進んでおり、アポトーシスなどのカスパーゼ依存性細胞死以外にも、カスパーゼ非依存性で RIP3 依存性の細胞死であるネクロプトーシスなど多様な細胞死が報告されている[21]。ネクロプトーシスはネクローシス型の細胞死の一つで、tumor necrosis factor α (TNFα) による非カスパーゼ依存性の細胞死として最初に報告された[22]。TNFαによって惹起されるネクロプトーシス誘導経路は精力的に研究が行われており、近年詳細な分子機構が明らかとなってきている。

TNFα受容体に TNFαが結合すると受容体の細胞内ドメインであるデスドメインを介して、TNF receptor-1-associated death domain (TRADD)、TNF receptor-associated factor (TRAF2)、cellular inhibitor of apotosis protein (cIAP)1/2、linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC)、RIP1 の複合体（複合体 I）を形成し、cIAP1 により RIP1 がユビキチン化され、nuclear factor-kappa B (NF-κB) の活性化シグナルを伝達する[23]。この複合体 I は細胞膜に結合しているが、脱ユビキチン化酵素である cylindromatosis (CYLD) によって RIP1 のポリユビキチン鎖が外されると細胞内へ局在化し、TRADD、FAS-associated death domain (FADD)、カスパーゼ 8、RIP1 の複合体（複合体 II）が形成される[24]。この時、カスパーゼ 8 の活性化が阻害されている場合、RIP1、RIP3、mixed lineage kinase domain-like (MLKL) 複合体[25]（ネクロソームまたは複合体 IIb）が形成される。RIP1 は RIP3 をリン酸化し、リン酸化された RIP3 は MLKL、phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5) L/S をリン酸化する。ネクロソームはリン酸化された PGAM5S を介してミトコンドリアと結合し、PGAM5L/PGAM5S 複合体はミトコンドリア分裂調節タンパクである Dynamin-related protein 1 (Drp1) を二量体化して活性化する。この PGAM5L、PGAM5S、Drp1 複合体はミトコンドリア攻撃複合体 (mitochondrial attack complex, MAC) と呼ばれる。過剰な Drp1 の活性化が誘導されるとミトコンドリアやその他の細胞小器官の機能が失われ、ネクロプトーシスが誘導される(図 1)。また、MAC は活性酸素種やカルシウムイオノフォアによっても活性化されることが明らかとなっている[26,27]。ネクロプトーシスは発生の段階や[28,29]、ウィルス感染防御[30]において生体の恒常性維持に関わっている事が知られている。

TNFα以外にもネクロプトーシスを誘導するリガンドが多数報告されており、TLR リガンドもその一つである[31]。TLR4 リガンドである lipopolysaccharide (LPS) や TLR3 リガンドである poly I:C はその下流分子である TICAM-１ を介して RIP3 依存的に細胞死を誘導するこ

とが報告されている[32,33](図 2)。現在、ネクロプトーシスはウイルス感染や遺伝的欠損、薬剤処理などによりカスパーゼ 8 の活性が阻害されている状況下において、誘導されることが明らかとなっている[22,34,35]。

Poly I:C は担癌モデルマウスを用いた解析からナチュラルキラー（Natural Killer、NK）細胞や細胞障害性 T 細胞（cytotoxic T lymphocyte、CTL）を介した抗腫瘍作用が報告されている[13]。一方で、MAVS や TICAM-1 は炎症性サイトカインや I 型 IFN 産生を誘導するだけでなく、RIP1 と結合してアポトーシスを誘導し[19]、正常細胞だけでなく腫瘍細胞においてもアポトーシスを誘導する[15]。また、poly I:C による抗腫瘍効果は NK 細胞や CTL を介した効果のみならず、ネクロプトーシスを含む直接の殺腫瘍細胞効果も存在すると考えられるが、TLR3 を介した腫瘍細胞のネクロプトーシス誘導機構は十分に解明されていない[12]。

そこで本研究では、腫瘍細胞における poly I:C 誘導性のネクロプトーシス誘導機構を解析した。第一章では TLR3 のリガンドである poly I:C と汎カスパーゼ阻害剤の z-Val-Ala-Asp fluromethyl ketone（zVAD）によってネクロプトーシスが誘導される細胞の探索を行い、第二章では poly I:C と zVAD によるネクロプトーシス誘導経路を明らかにした。更に第３章では、シグナル伝達機構の更なる解析と、ネクロプトーシス抵抗性細胞との比較を行い、ネクロプトーシス誘導感受性を決定する因子の探索を行った。最後に第四章では、生体内において poly I:C と zVAD が抗腫瘍効果を発揮するのか担癌モデルマウスを用いて検討した。

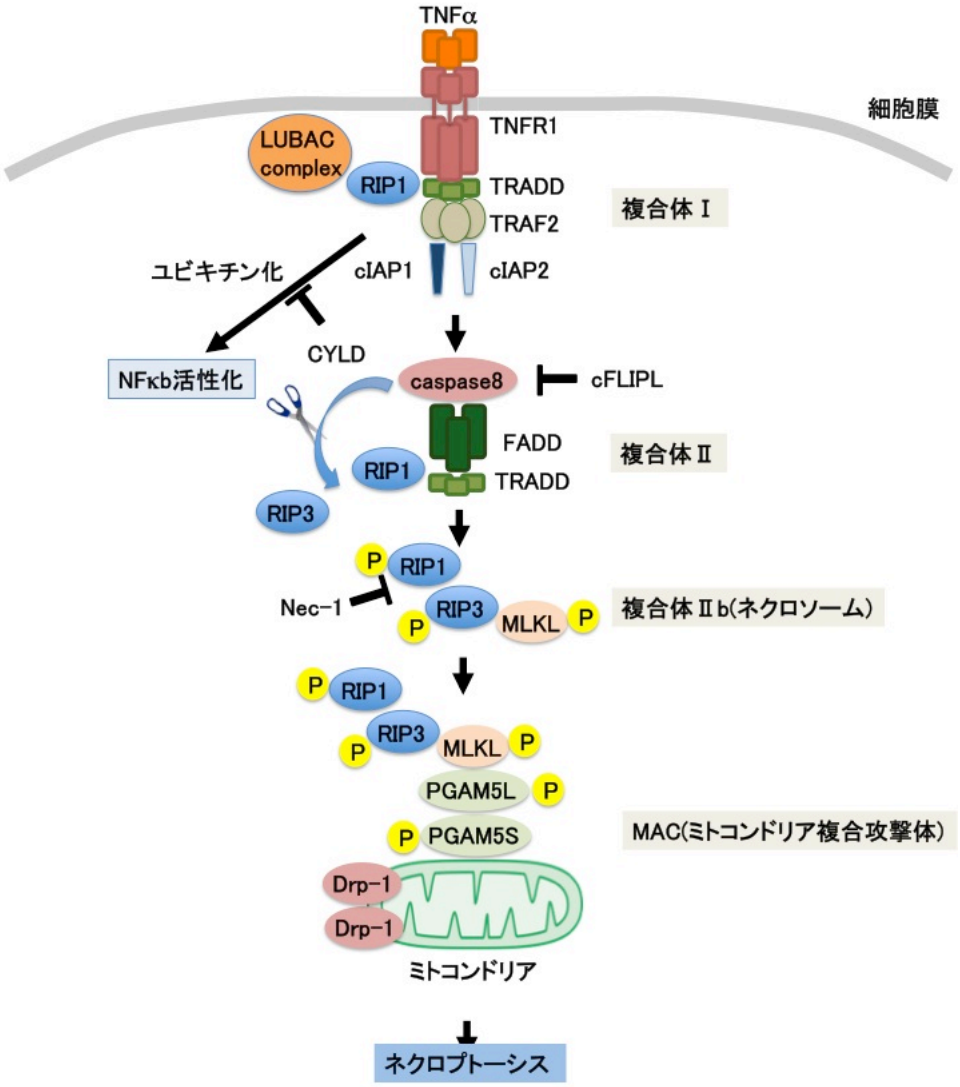


図 1　TNF 受容体を介した細胞死誘導経路

cFLIP: Cellular FLICE (FADD-like IL- 1β-converting enzyme)-inhibitory protein、、cIAP1/2:cellular inhibitor of apotosis protein 1/2、CYLD:cylindromatosis、Drp1:Dynamin-related protein 1、 FADD:FAS-associated death domain、 LUBAC:linear ubiquitin chain、MAC: mitochondrial attack complex、 MLKL:mixed lineage kinase domain-like、 nec-1:necrostatin-1、 NF-κB :nuclear factor-kappa B、PGAM5:phosphoglycerate mutase family member 5、 RIP: receptor interacting protein、TNF:tumor necrosis factor、 TNFR1:tumor necrosis factor-1、TRADD:TNF receptor-1-associated death domain、 TRAF:TNF receptor-associated factor

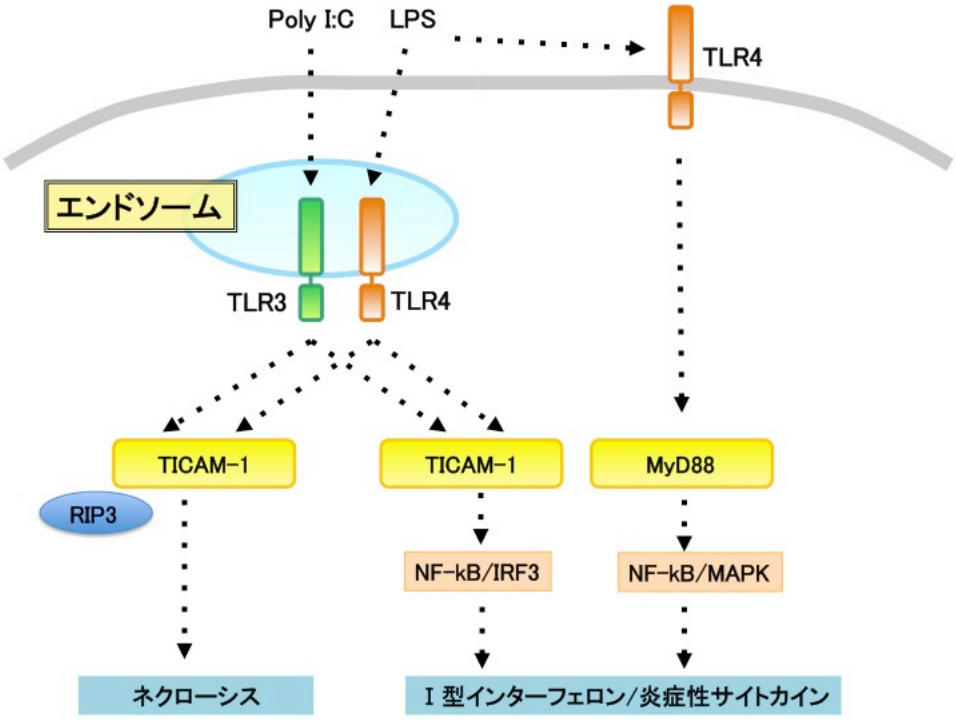


図 2　TLR3/TLR4 を介したシグナル伝達経路

Poly I:C は TLR3 と、LPS は TLR4 と結合し、下流分子である TICAM-1 を介して NF-κB/IRF3 を誘導し I 型インターフェロンや炎症性サイトカインを産生する。また、RIP3 依存的な細胞死を誘導する場合もある。TLR4 は他に、MyD88 を介して NF-κB/MAPK を誘導し、 I 型インターフェロンや炎症性サイトカインを産生する。

IRF:interferon-regulatory factor, LPS: lipopolysaccharide, MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase、MyD88:myeloid differentiation factor 88, NF-κB:nuclear factor-kappa B, poly I:C:polyinosinic-polycytidylic acid, RIP: receptor interacting protein kinase, TICAM-1:toll-IL-1 receptor homology(TIR)-containing adapter molecule-1、
TLR:toll-like receptor

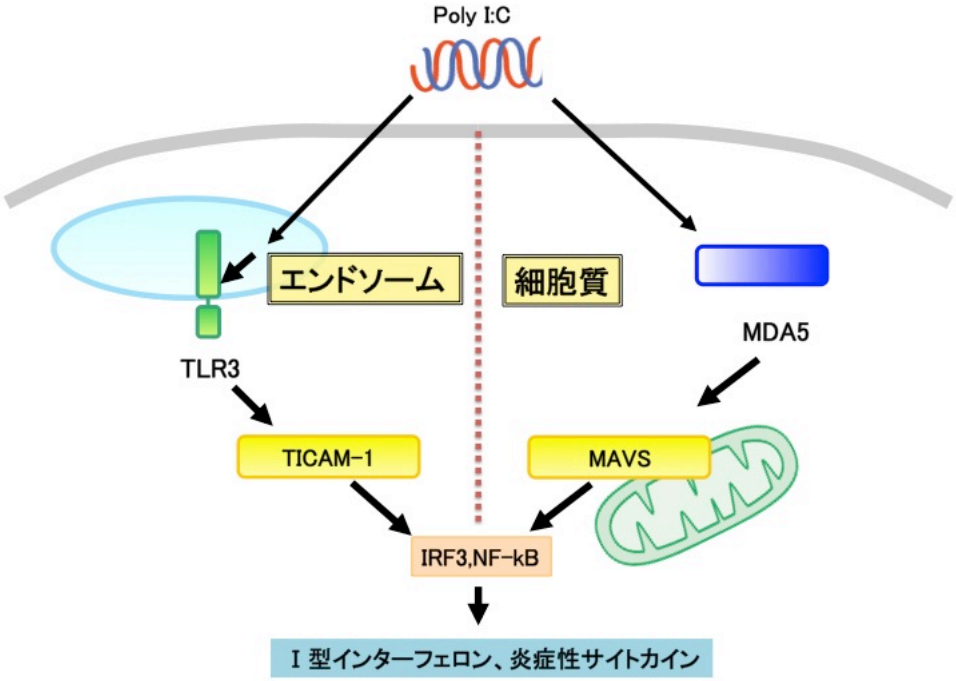


図 3　Poly I:C によるシグナル伝達経路

Poly I:C は TLR3 や MDA5 と結合し、IRF3 や NF-κB を介して炎症性サイトカインや I 型インターフェロン産生を誘導する。MDA5 はアダプター分子として MAVS がシグナル伝達を担い、TLR3 は TICAM-1 がアダプター分子としてシグナルを伝達する。

IRF3:interferon-regulatory factor 3, MAVS:mitochondrial antiviral signaling protein, MDA5: melanoma differentiation-associated protein 5, NF-κB:nuclear factor-kappa B, poly I:C:polyinosinic-polycytidylic acid, TICAM-1:toll-IL-1 receptor homology(TIR)-containing adapter molecule-1、 TLR:toll-like receptor

材料と方法

1.実験材料

1-1　細胞由来

L929（線維芽細胞)、YAC-1（リンパ腫)、 EL-4（リンパ種)、 EG7（リンパ腫)、C1498（急性骨髄性白血病)、B16F1（メラノーマ)、 B16F10 （メラノーマ)、 B16D8（メラノーマ)、Renca（腎細胞癌)、 G1（肝細胞癌)、 G5（肝細胞癌)、 3LL（肺細胞癌)、CT26（大腸癌)マウス腫瘍細胞株

L929 細胞は RIKEN cell bank より、EG7、C1498 は ATCC より、3LL は住友ファーマより購入した。YAC-1、 Renca、 CT26 細胞は大阪府立成人病センターより、EL-4 は札幌医科大学佐藤先生より、B16F1、B16F10 は広島大学櫨木先生より、G1、G5 細胞は大阪府立成人病センター佐伯先生より供与頂いた。

MC38(大腸癌)マウス腫瘍細胞株

MC38 細胞は東京大学田原先生より供与頂いた。

ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞

CT26 細胞培養液中に、25 μg/ml poly I:C (Amersham)、25 μM zVAD (Sigma)を添加した。Poly I:C と zVAD の添加後も生存した細胞のみを回収し、poly I:C と zVAD の添加を行いながら培養を繰り返し行い、poly I:C と zVAD 添加による細胞死が認められなくなるまで細胞の継代をくり返して樹立した。

2. 方法

2-1　細胞培養

溶液および緩衝液の組成

Phosphate-buffered saline(PBS)(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH_2PO_4
トリプシン液	0.25% Trypsin,0.02% EDTA/PBS(-)

L929（線維芽細胞)、YAC-1（リンパ腫)、 EL-4（リンパ種)、 EG7（リンパ腫)、C1498（急性骨髄性白血病)、B16F1（メラノーマ)、 B16F10 （メラノーマ)、 B16D8（メラノーマ)、Renca（腎細胞癌)、 G1（肝細胞癌)、 G5（肝細胞癌)、 3LL（肺細胞癌)、CT26（大腸癌)マウス腫瘍細胞株、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞

細胞は10% (v/v)非働化ウシ胎児由来血清（fatal bovine serum (FBS)) (BioSource Intl)、

100 mU/ml penicillinG (GIBCO-invitrogen)、100 µg/ml streptomycin (GIBCO-invitrogen) を添加した RPMI1640 (GIBCO-invitrogen)を用いて 37 ℃、5% CO_2 の条件下で培養した。

MC38(大腸癌)マウス腫瘍細胞株

細胞は 10% (v/v)非動化済 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin、2 mM グルタミン (GIBCO-invitrogen)、 50 µM 2 メルカプトエタノール (GIBCO-invitrogen)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (GIBCO-invitrogen)を添加した RPMI1640 を用いて 37 ℃、5% CO_2 の条件下で培養した。

2-2 Water soluble tetrazolium salts (WST) -1 アッセイによる生細胞の測定

細胞 (2 x 10^4 個/穴) を 96 穴プレートに播種し、浮遊細胞は播種日に、接着細胞は播種翌日に 25 もしくは 50 µg/ml poly I:C、 25 µM zVAD を各条件に応じて添加した。更に、CT26 細胞は poly I:C、zVAD の添加と同時に、50 µM necrostatin-1 (nec-1) (Sigma), 100 µM butylated hydroxyanisole (BHA) (Sigma)、5 µg/ml 抗 TNFα 抗体 (Biolegend)、5 µg/ml 抗 IFNα/β 受容体 (IFNAR) 抗体 (Biolegend) を各条件に応じて添加した。

添加 24 時間後に、cell counting kit 溶液 (Dojindo) を 10 µl ずつ添加した後、1〜4 時間 37 ℃、5% CO_2 の条件下で培養し、SUNRISE Remote R (TECAN) を用いて 450 nm での吸光度を測定した。

2-3 Fluorescence activated cell sorter (FACS) による解析

A:死細胞の検出

溶液および緩衝液の組成

FACS 緩衝液	0.5% Bovine serum arubmin (BSA), NaN_3/PBS(-)

CT26 細胞 (1 x 10^5 個/穴) を 24 穴プレートに播種し、翌日に 25 µg/ml poly I:C、 25 µM zVAD、50 µM nec-1 を各条件に応じて添加した。24 時間後に細胞を回収し、FACS 緩衝液にて 2 回洗浄した。Propidium iodide (PI) 単染色は、Annexin V-FLUOS staining kit (Roche) を用いて細胞を PI 染色液に再懸濁し、暗所で室温にて 15 分間インキュベーションした。その後、FACS Calibur (BD) を用いて解析した。PI/Annexin V 二重染色は Annexin V-FLUOS staining kit を用いて細胞を PI/Annexin-V 染色液に再懸濁し、暗所で室温にて 15 分間インキュベーションした。その後、FACS Aria Ⅱ (BD) を用いて解析した。

B:Reactive oxygen species (ROS) の検出

CT26 細胞 (2 x 10^4 個/穴) を 96 穴プレートに播種し、翌日に 50 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD、50 μM nec-1、100 μM BHA を各条件に応じて添加した。添加 6 時間後に細胞を回収し、5 μM CM-H_2DCFDA (2', 7'－dichlorodihydrofluorescein diacetate) (Invitorogen) /Hank's balanced salt solution (HBSS) (GIBCO-Invitrogen) で懸濁後 37 ℃、5% CO_2 の条件下で 15 分インキュベーションし、その後通常の培養液で 15 分培養し回収した。FACS 緩衝液で洗浄後、FACS Calibur (BD) を用いて解析した。

C:TLR3 の検出

CT26 細胞を回収し、FACS 緩衝液で洗浄後、5 μg/ml 抗マウス CD16/CD32 抗体 (Biolegend) を加え氷上で 10 分間インキュベーションした。FACS 緩衝液で洗浄後、細胞を膜透過処理と未処理の二群に分けた。膜透過処理は BD cytofix/cytoperm fixation permeabilization kit (Roche) を用いて添付文書に従って行った。具体的には 100 μl fixation/permeabilization solution を加え、氷上で 20 分間インキュベーションした。膜透過処理した細胞は permeabilization/wash solution で二回洗浄し、alexa 647 ラベル化 抗マウス TLR3 抗体 (Biolegend)、ラット IgG2a アイソタイプコントロール抗体 (Biolegend), 未染色の 3 群に分けて氷上で 30 分間染色し、permeabilization/wash solution で 2 回洗浄後 FACS 緩衝液に懸濁した。膜透過未処理群は FACS 緩衝液で再懸濁し、同様に染色した。細胞は FACS Calibur (BD) を用いて解析した。

2-4　光学顕微鏡を用いた形態観察

CT26 細胞 (1 x 10^5 個/穴) を 24 穴プレートに播種し、翌日に 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD、50 μM nec-1 を各条件に応じて添加した。添加 24 時間後に光学顕微鏡を用いて、形態観察を行った。

2-5　共焦点レーザー顕微鏡による死細胞の検出

CT26 細胞 (1 x 10^5 個/穴) を 24 穴プレートに播種し、翌日に 25 μg/ml poly I:C、 25 μM zVAD、50 μM nec-1 を各条件に応じて添加した。添加 24 時間後に細胞を回収し、propidium iodide (PI) /Hoechst 33342 (Dojindo) の染色液に懸濁し、暗所で室温にて 15 分間インキュベーションした。その後、スライドガラスに細胞懸濁液を乗せ、カバーグラスを被せてマニキュアで密封した。各サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 Meta (Zeiss) にて 63 倍対物レンズを用いて観察した。

2-6　Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA)

CT26 細胞（2×10^4 個/穴）を 96 穴プレートに播種し、翌日に 25 μg/ml poly I:C、 25 μM zVAD、50 μM nec-1 を各条件に応じて添加し、24 時間後に細胞上清を回収した。High mobility group box 1 (HMGB1) の測定は、抗体コート済みの ELISA kit（シノテスト）を用いて測定した。TNFαの測定は Nunc-immunoplate (Thermo Scientific) と ELISA MAX Standard Sets (Biolegend) を用い添付文書に従って行った。

2-7　RNA 干渉実験

siRNA は全て ambion-Applied Biosystems より購入した。

遺伝子名	Catalog number
Negative control	AM4635
Tlr3	s100580
Ticam-1	s98708
Mavs	s105943
Ripk3	5'-cgacgaugucuucugucaatt-3'

A:TLR3 を介した IFNβ発現誘導

CT26 細胞 (1 x 10^5 個/穴) を 24 穴プレートに播種し、翌日 10 pmol siRNA を Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した。48 時間後に 50 μg/ml poly I:C を添加し、1 時間後に TRIzol reagent を用いて RNA を精製し、定量 PCR を行った。

B:ノックダウン実験による細胞死誘導経路の検討

Ticam1 と *Mavs* のノックダウンは CT26 細胞（1×10^5 個/穴）を 24 穴プレートに播種し、翌日 10 pmol siRNA を Lipofectamine RNAimax を用いて遺伝子導入した。24 時間後に細胞を回収し、96 穴プレートに 2 x 10^4 個/穴、24 穴プレートに 1 x 10^5 個/穴の細胞数で再度播種した。遺伝子導入 48 時間後に 96 穴プレートに播種した細胞の生存率を WST-1 法により測定した。24 穴プレートに播種した細胞は TRIzol reagent を用いて RNA を精製し、ノックダウン効率を定量 PCR により測定した。

Tlr3 と *Ripk3* のノックダウンは CT26 細胞（2 x 10^4 個/穴）を 96 穴プレートに播種し、15 pmol siRNA を Lipofectamine RNAimax を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 48 時間後に細胞生存率 WST-1 法により測定した。同時に細胞から RNA を精製し、ノックダウン効率を定量 PCR により測定した。

2-8　定量 polymerase chain reaction (PCR)

CT26 細胞、Renca 細胞、L929 細胞、3LL 細胞、B16D8 細胞、B16F10 細胞、MC38 細胞、EL4 細胞、EG7 細胞、C1498 細胞、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞及び、RNA 干渉実験後の CT26 細胞から TRIzol reagent (Invitrogen) を用い添付文書に従って RNA を精製した。精製した RNA は、400-1000 ng の RNA に対し DNase I (Takara Bio) 処理を 37 ℃、20 分行い、2.5 mM EDTA を 1 µl 加え 80 ℃、2 分インキュベーションし DNase を不活化した。DNase 処理した RNA を用いて High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) の添付文書に基づき逆転写反応を行った。逆転写反応により得られた cDNA を鋳型とし、Power SYBR Green master mix (Applied Biosystems) を用いて PCR を行い、増幅産物を Step One Real-time PCR system (Applied Biosystems)より検出した。得られた増幅曲線より Ct 値を算出し、鋳型に含まれる mRNA 量を ddCt 法により算出した。内部標準として*β-actin* を使用した。

使用したプライマーの配列を (表 1) に示す。

表 1. 実験に用いたプライマーの配列

遺伝子名	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
β-actin	tttgcagctccttcgttgc	tcgtcatccatggcgaact
Ripk3	gggacctcaagccctctaa	gatcctgatcctgaccctga
Tlr3	tgcgttgcgaagtgaagaa	acttgccaattgtctggaaaca
Ticam-1	tgttggaaagcagtggcctat	gatgacgtggtgttctgcaga
Mavs	agccctccagagagcatcaa	gaggcaacatttgctgcgt
Ifn-β	ccagctccaagaaaggacga	cgccctgtaggtgaggttgat
Azi2	aagagctgggactactgaggag	gctcggcctgatgacatctctg
Dnm1l	aggcaactggagaggaatgctg	ttcttgcaactggaactggcac
Mlkl	gaggacaagaagcaggaaccag	cttcaaccgcagacagtctctc
Pgam5	ggtgtctccagagtcagcacag	cttcaatccgggctccatcttc

2-9　ウエスタンブロッティング

溶液および緩衝液の組成

Running buffer	25 mM toris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), 192 mM Glycine、 0.1% SDS
Lysis buffer	50 mM Tris (pH 7.4)、 150 mM NaCl、 10 mM EDTA、 1% Nonidet P-40 (NP-40)、 protease inhibitor cocktail、 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、 50 mM NaF、

	1 mM Na_3VO_4
Sample buffer (2×)	100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、 20% glycerol、 4% sodium dodecyl sulfate (SDS)、 0.01% bromphenol blue (BPB)、 5% 2-メルカプトエタノール
Blotting buffer	48 mM Tris、 39 mM Glycine、 20% methanol (pH 9.4)
Washing buffer	0.1% (v/v) Tween20/TBS (-)
Blocking buffer	5% skim milk/TBS (-)
1 次、2 次抗体懸濁液	5% skim milk/TBS (-)
TBS (-)	137 mM NaCl、 2.68 mM KCl、 25 mM Tris

2 x 10^6 個の CT26 細胞、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞を 100 µl lysis buffer で懸濁し、氷上で 30 分間静置した。その後、4 ℃ 12000 g で 10 分間遠心し、上清を 2 x sample buffer で等量希釈し、98 ℃で 5 分間熱した。10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE によりサンプルを泳動分離し、メタノールにより親水処理後 blotting buffer で平衡化した polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (MILLIPORE) へ転写した。blotting buffer を浸したろ紙 3 枚で膜およびゲルをはさみ、100 mA の定電流で 90 分間通電し、転写した。

転写後、PVDF 膜を blocking buffer 中で室温にて 60 分間振盪し、blocking buffer で 2000 倍希釈した抗 RIP3 抗体 (QED Bioscience) または 1000 倍希釈した抗 tubulin 抗体 (COVANCE) と 4 ℃で一晩反応させた。洗浄バッファーで洗浄し、horseradish peroxydase (HRP) 標識二次抗体と室温で 60 分間反応させ、ECL 試薬 (MILLIPORE) により検出した。

2-10　免疫沈降法

A:遺伝子導入

溶液および緩衝液の組成

Lysis buffer	50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40, protease inhibitor cocktail(Roche), 0.1 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4

プラスミド

pcDNA4/TICAM-1 発現プラスミドは、北海道大学瀬谷教授より供与された[36]。pCMV/RIP3 発現プラスミドは Dr. Georges Chappuis より供与された。

CT26 細胞 (1 x 10^5 個/穴) を 6 穴プレートに播種し、翌日 pCMV RIP3-FLAG 2 µg と pCDNA4 TICAM-1-HA 2 µg を CT26 細胞は TransIT 2020 (Mirus) を、B16D8 細胞は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入し、同時に 25 µM zVAD を添加した。24 時間後に 50 µg/ml

poly I:C を添加し、30 分後に 200 µl lysis buffer で懸濁し氷上で 30 分間静置した。その後、4 ℃ 12000 g で 10 分間遠心し上清を回収してサンプルを調製し、免疫沈降を行った。

B:免疫沈降法とウエスタンブロッティングによる検出

遺伝子導入後調製したサンプルの一部を total cell lysate (TCL) として、2 x sample buffer で等量希釈し、98 ℃で 5 分間熱した。残りのサンプルに 2 µg 抗 FLAG ポリクローナル抗体 (SIGMA) または 2 µg 抗 FLAG モノクローナル抗体 (SIGMA) と 10 µl protein G-sepharose (GE Healthcare) を加えて 4 ℃にて転倒混合しながら一晩反応させた。サンプルは 500 µl lysis buffer で 5 回洗浄後、2 x sample buffer で等量希釈し、98 ℃で 5 分間熱した。

10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE によりサンプルを泳動分離し、メタノールにより親水処理後 blotting buffer で平衡化した PVDF 膜 へ転写した。Blotting buffer を浸したろ紙 3 枚で PVDF 膜およびゲルをはさみ、100 mA の定電流で 90 分間の通電し、転写した。

転写後、PVDF 膜を blocking buffer 中で室温にて 60 分間振盪し、blocking buffer で 1000 倍希釈した抗 RIP1 抗体 (BD Biosciences)、または 1000 倍希釈した抗 FLAG ポリクローナル抗体 (SIGMA)、または 1000 倍希釈した抗 FLAG モノクローナル抗体 (SIGMA)、または 1000 倍希釈した抗 HA ポリクローナル抗体 (SIGMA)、または 1000 倍希釈した抗 HA モノクローナル抗体 (COVANCE)、1000 倍希釈した抗β-actin 抗体 (SIGMA) と 4 ℃で一晩反応させた。洗浄バッファーで洗浄し、HRP 標識二次抗体 (Biosource) と室温で 60 分間反応させ、ECL 試薬 (MILLIPORE) により検出した。

2-11　CT26 細胞担癌マウスを用いた poly I:C による腫瘍退縮効果の検討

マウス

BALB/cAJcl WT マウスは日本クレア社より購入した。全てのマウスは北海道大学大学院医学研究科付属動物実験施設の SPF 環境下で飼育された。動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準等に基づき作成された国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程に基づき行った。また、本研究は Toll like receptor を介した免疫活性化機構の解析 (実験計画番号 13-0049) として動物実験委員会より承認された。

以下の阻害抗体を用いた。

Anti-murine CD8β monoclonal antibody (H35.17-2)	愛知癌センター辻村先生より hybridoma 供与
Anti-asialo-GM1 anitbody	Wako

7-9 週齢の雌 BALB/cAJcl WT マウスの背部の毛を剃り、1 x 10^5 個もしくは 5 x 10^5 個の CT26 細胞を 200 µl 皮下注射した。腫瘍移植後、カリパスを用いて腫瘍径径を測定し、腫瘍サイズは以下の式を用いて計算した。

$$\text{腫瘍サイズ}\ (\text{cm}^3) = (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 \times 0.4$$

腫瘍移植後 10-11 日後に、マウスに皮下（s.c.）もしくは腹腔内(i.p.）へ poly I:C を投与した。1 mg zVAD は poly I:C 投与と同時に腫瘍周囲の皮下(s.c.)へ投与した。CD8β陽性 T 細胞除去は H35.17-2 細胞より作成した抗マウス CD8β 抗体を 10 µl、 NK 細胞除去は 10 mg/ml 抗 asialo-GM1 抗体 30 µl を poly I:C 投与 24 時間前に腹腔内投与した。1 つの実験系において阻害抗体は全て同一のロットを使用した。同じ処理を移植後 14-15 日後に行った。

2-12　統計処理

有意差検定には、Student's t-検定を行って p 値を求めた。（* $p < 0.05$、** $p < 0.01$）

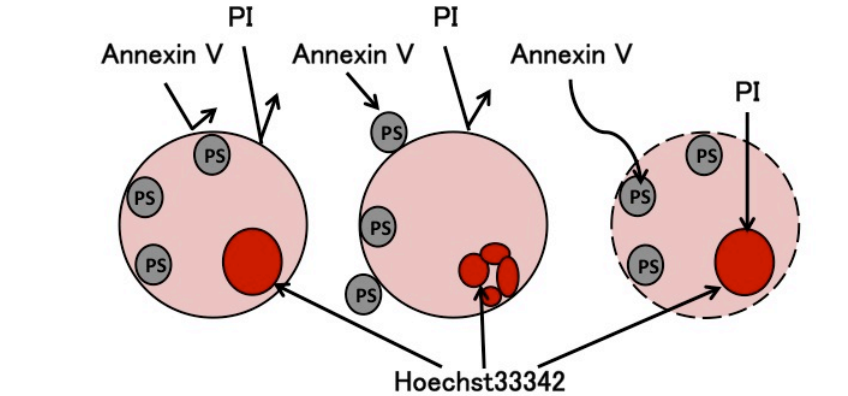
第一章　Poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス感受性マウス腫瘍細胞株の探索

緒言

L929 細胞などの細胞に TNFαと汎カスパーゼ阻害剤である zVAD の投与によりネクロプトーシスが誘導される事が報告されており [37,38]、マウス骨髄由来マクロファージ細胞などでは TLR3 や TLR4 のリガンドと zVAD の併用によってもネクロプトーシスが誘導される事が明らかとなった [32]。ヒト白血病細胞などの腫瘍細胞においても TLR3 のリガンドである合成 2 本鎖 RNA poly I:C や IFNγによってネクロプトーシスが誘導されると報告されている [39]。

しかし、腫瘍細胞におけるネクロプトーシス誘導経路は十分に解明されていない。そこで poly I:C をリガンドとしたネクロプトーシス誘導経路を解明するために、poly I:C と zVAD によるネクロプトーシス感受性を持つマウス腫瘍細胞株の探索を行った。

手法として、生細胞内の脱水素酵素反応により産生される NADH により water soluble tetrazolium salts (WST)-1 がホルマザン色素に還元される反応を利用して生細胞数を測定する WST-1 アッセイを用いて、細胞の生存率を測定した。また、形態的変化を光学顕微鏡で観察し、細胞膜透過性の変化を Hoechst 33342 や propidium iodide (PI) /Annexin V 染色によって検討した。染色に用いた Hoechst 33342 は細胞膜を透過し、生細胞・死細胞共に核を染色するが、PI は正常細胞膜を通過せず、死細胞においてのみ核を染色する。Annexin V は細胞膜の脂質二重膜内側に存在するホスファチジルセリン (phosphatidyl serine, PS) と結合し、早期アポトーシス細胞の検出に用いられる(図 4)。



	生細胞	アポトーシス細胞	ネクローシス細胞
PI	×	×	○
Annexin V	×	○	○

図 4 PI/Annexin V 染色によるネクローシス細胞の評価
PI:propidium iodide

結果

1.1　Poly I:C と zVAD により細胞死が誘導されるマウス腫瘍細胞株の検索

Poly I:C と zVAD によりネクロプトーシスが誘導されるマウス腫瘍細胞を同定するため、細胞死研究において汎用されている L929（線維芽細胞）と、YAC-1（リンパ腫)、 EL-4（リンパ種)、 B16F1（メラノーマ)、 B16F10（メラノーマ)、 B16D8（メラノーマ)、 Renca（腎細胞癌)、 G1（肝細胞癌)、 G5（肝細胞癌)、 3LL（肺細胞癌)、MC38（大腸癌)、CT26（大腸癌)マウス腫瘍細胞株を用いて、poly I:C と zVAD を添加し、24 時間後に WST-1 アッセイを行い細胞の生存率を測定した。

Poly I:C/zVAD 処理による細胞生存率の減少は CT26 細胞と L929 細胞にのみ認められた(表 1)。CT26 細胞は poly I:C や zVAD 単独処理では細胞生存率の減少を認めないが、poly I:C と zVAD の併用により 50%弱まで生存率が減少していた（図 1.1)。光学顕微鏡による観察においても、poly I:C と zVAD の併用により、細胞数の減少とネクローシスの特徴的形態である細胞の肥大化が観察された（図 1.2）[40]。

CT26 細胞において poly I:C/zVAD 処理によって誘導される細胞生存率の減少がアポトーシスかネクローシスかを判別するために、PI/Annexin V 染色及び PI/Hoechst 33342 染色を行った。初めに、PI/Annexin V 二重染色を行いフローサイトメトリーで解析した。 Poly I:C/zVAD 処理群では、poly I:C 単独処理群より Annexin V 単独陽性細胞、及び PI/Annexin V 二重陽性細胞が増加していた（図 1.3)。更に、PI/Hoechst 33342 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察をしたところ、poly I:C/zVAD 処理群において PI 陽性細胞が観察された(図 1.4)。また、poly I:C/zVAD 処理により、ネクロプトーシスのマーカーの一つである high mobility group box 1（HMGB1）が産生されていた（図 1.5)。

1.2　ネクロスタチン-1 によるネクロプトーシス阻害

Poly I:C/zVAD 処理によって CT26 細胞に誘導された細胞死がアポトーシスかネクロプトーシスかを判別するためにネクロプトーシスの実行因子である RIP1 キナーゼの阻害剤(necrostatin1、nec-1）を用いて実験を行った[41]。

Poly I:C と zVAD によって誘導される細胞死は nec-1 によって完全に阻害された（図 1.6 、1.7)。また、フローサイトメトリーの解析から、poly I:C/zVAD 処理により増加した PI 陽性細胞は nec-1 処理により有意に減少していた（1.8)。さらに、nec-1 処理により、PI/Annexin V 二重陽性細胞の割合も減少した（図 1.9)。PI/Hoechst 33342 染色においても PI 陽性細胞が nec-1 によって減少している事が確認された（図 1.10)。

Cell lines	Poly I:C	Poly I:C + zVAD
YAC-1	83.4 ± 14.4	106.8 ± 5.0
EL-4	96.1 ± 3.7	109.8 ± 9.5
B16F1	100.5 ± 11.0	91.2 ± 12.8
B16F10	104.8 ± 19.3	84.6 ± 5.2
B16D8	113.7 ± 2.8	96.2 ± 13.3
Renca	89.4 ± 21.3	89.0 ± 12.0
G1	106.7 ± 14.0	113.5 ± 24.1
G5	127.3 ± 19.3	130.5 ± 16.5
3LL	109.9 ± 1.67	96.8 ± 4.0
MC38	95.4 ± 20.4	86.8 ± 11.0
L929	50.78 ± 5.35**	15.63 ± 0.36**
CT26	85.0 ± 9.0	44.6 ± 11.9**

表 1　マウス由来細胞株における細胞生存率
未処理細胞群の細胞生存率に対し、各処理群での細胞生存率(%)を示した。** = p <0.01

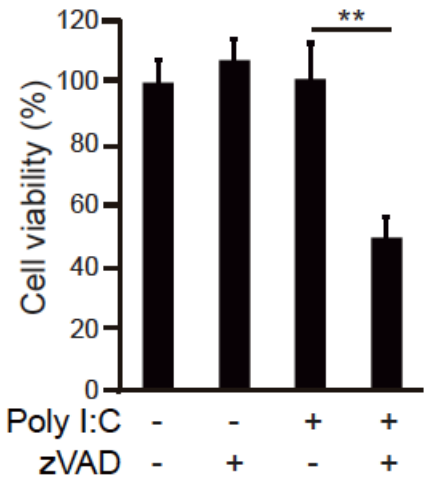


図 1.1　Poly I:C と zVAD 処理による CT26 細胞での細胞生存率の減少
CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C, 25 μM zVAD で 24 時間処理し、WST-1 アッセイで生細胞数を測定した。細胞生存率(%)は未処理群での細胞数を 100 とし、各処理群での生細胞数を割合として示した。データは 3 つの独立したサンプルの平均を示している。** = p <0.01

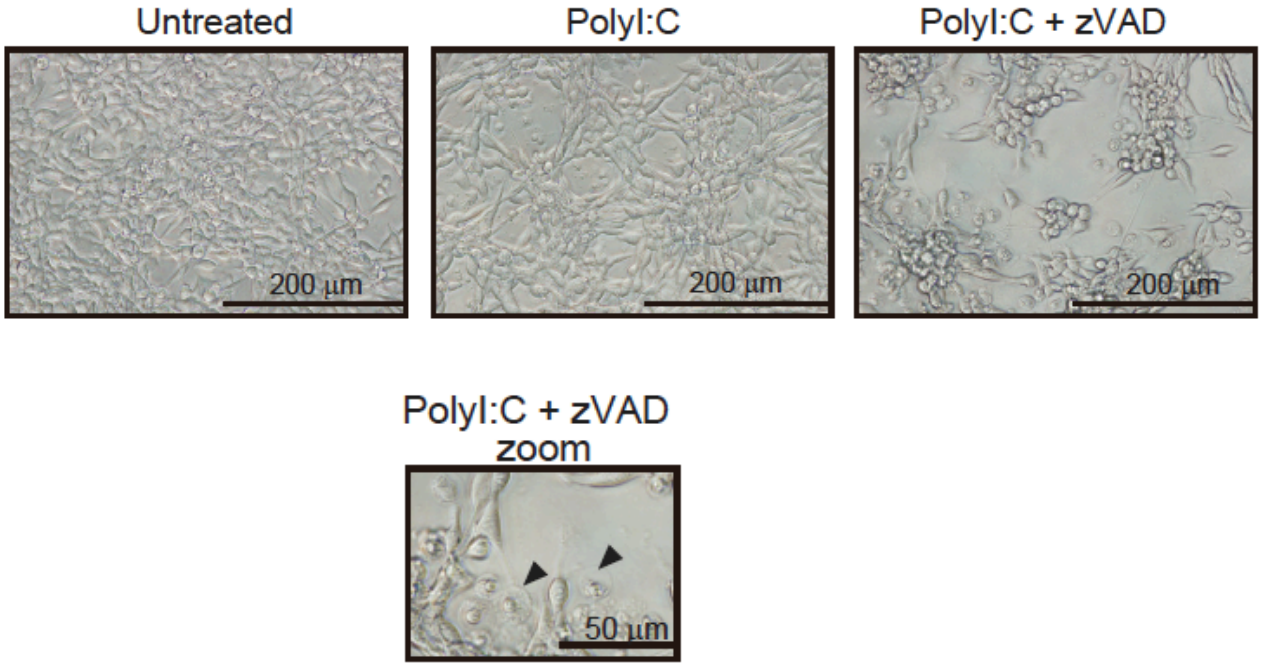


図 1.2　光学顕微鏡による観察
CT26 細胞を 25 µg/ml poly I:C、25 µM zVAD で 24 時間処理し、光学顕微鏡で形態観察を行った。矢頭は細胞の肥大化を示す。

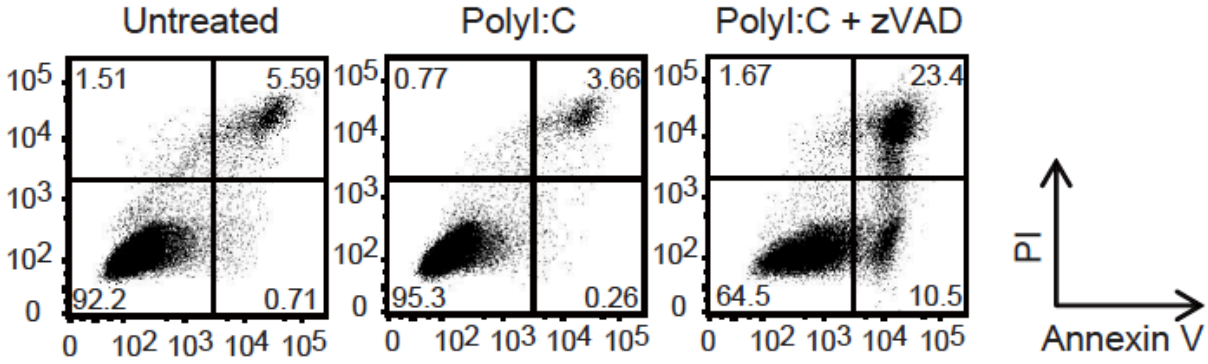


図 1.3　PI/Annexin V 染色細胞のフローサイトメトリーによる解析
CT26 細胞を 25 µg/ml poly I:C、25 µM zVAD で 24 時間処理し、PI/Annexin V 二重染色を行いフローサイトメトリーで解析した。数値は各領域内の細胞数の割合を示す。2 つの実験結果のうちの 1 つを示した。

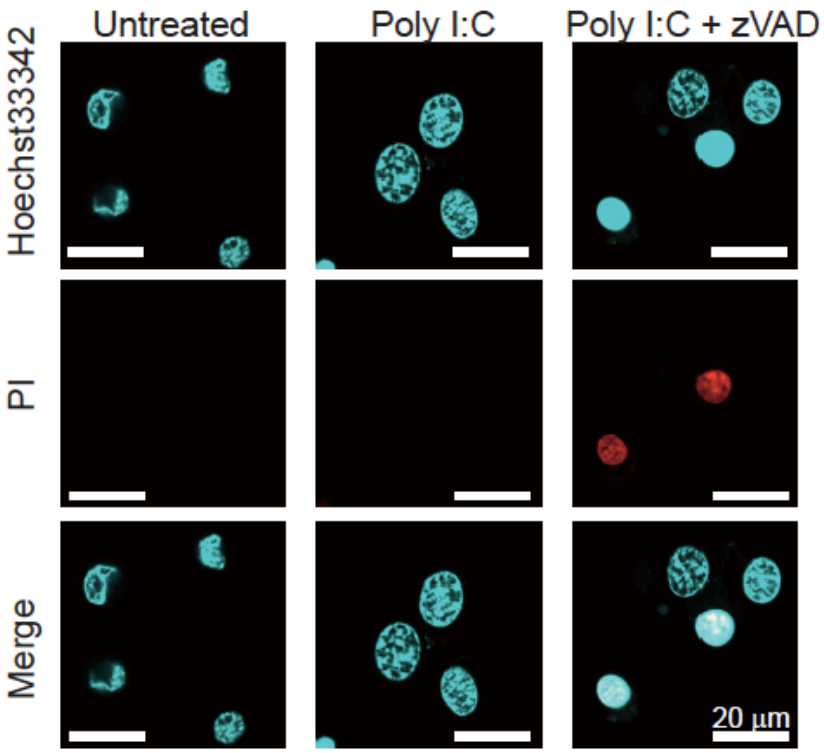


図 1.4　PI/Hoechst 33342 による染色
CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD で 24 時間処理し、PI/Hoechst 33342 染色を行い、蛍光顕微鏡で解析した。2 つの実験データのうちの 1 つを示した。

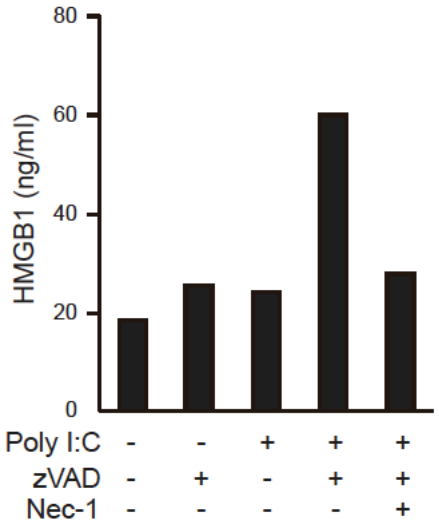


図 1.5　HMGBI 産生測定
CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD で 24 時間処理し、上清中の HMGB1 を HMGB1 ELISA kit を用いて測定した。

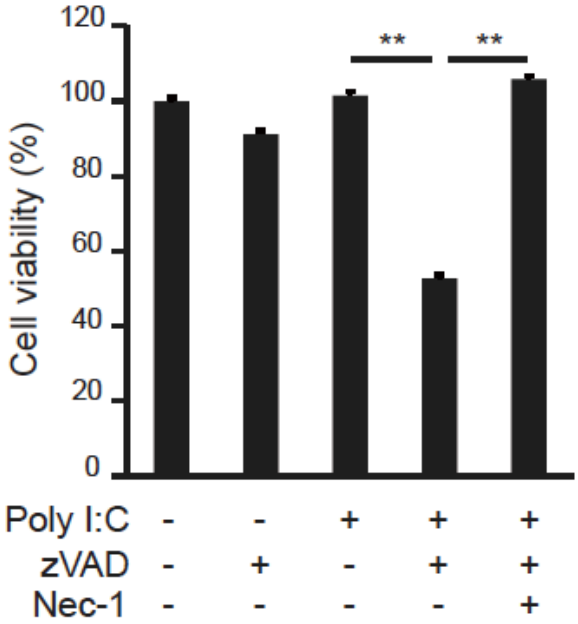


図 1.6　Nec-1 による細胞生存率低下の阻害

CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C、 25 μM zVAD、50 μM nec-1 で 24 時間処理し、WST-1 アッセイで生細胞数を測定した。細胞生存率(%)は未処理群での細胞数を 100 とし、各処理群での生細胞数を割合として示した。データは 3 つの独立したサンプルの平均を示している。** = $p < 0.01$

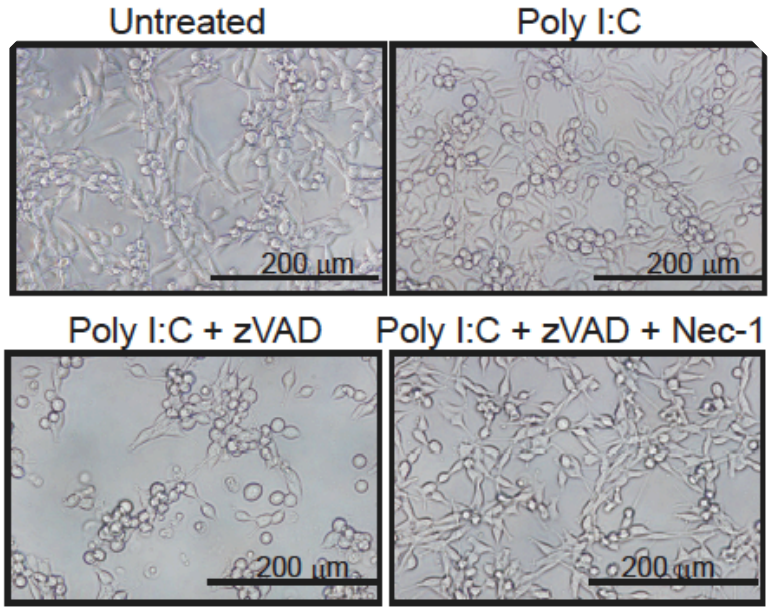


図 1.7　光学顕微鏡による nec-1 効果の観察

CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD、50 μM nec-1 で 24 時間処理し、光学顕微鏡で形態観察を行った。

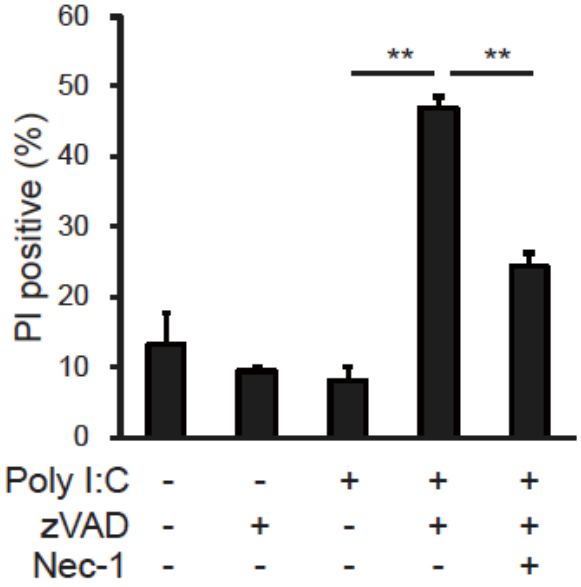


図 1.8　PI 染色細胞のフローサイトメトリーによる解析
CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD、50 μM nec-1 で 24 時間処理後 PI 染色を行い、フローサイトメトリーで PI 陽性細胞の割合を比較した。グラフは各条件での PI 陽性細胞の割合を示している。データは 3 つの独立したサンプルの平均を示している。** = p <0.01

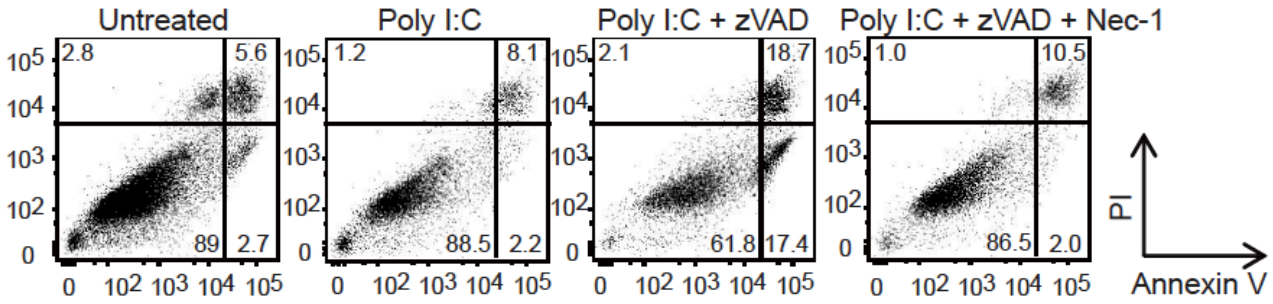


図 1.9　PI/Annexin V 染色細胞のフローサイトメトリーによる解析
CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD、50 μM nec-1 で 24 時間処理し、PI/Annexin V 二重染色を行いフローサイトメトリーで解析した。数値は各領域内の細胞数の割合を示す。2 つの実験結果のうちの 1 つを示した。

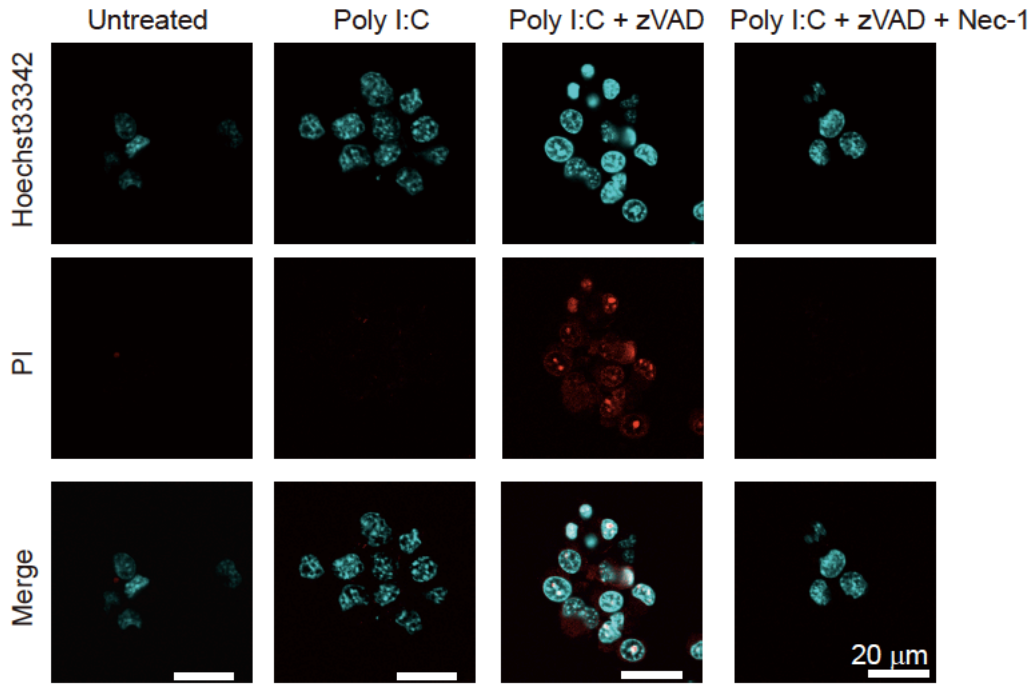


図 1.10　PI/Hoechst 33342 による染色
CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD で 24 時間処理し、PI/Hoechst 33342 染色を行い蛍光顕微鏡で解析した。2 つの実験データのうちの 1 つを示した。

考察

汎カスパーゼ阻害薬である zVAD と poly I:C により、マウス線維芽細胞株である L929 細胞及びマウス大腸癌細胞株である CT26 細胞において生細胞数の減少を認めた。

CT26 細胞は光学顕微鏡による観察の結果、poly I:C/zVAD 処理により、細胞の肥大化が観察された。また、PI/Annexin V 二重染色では PI/Annexin V 二重陽性細胞が増加していたことから、CT26 細胞における細胞死はネクローシスであることが推測された。さらに、HMGB1 の産生が誘導されていたこと、ネクロプトーシス阻害剤である nec-1 により細胞死が阻害されたことから、poly I:C/zVAD による細胞死はネクロプトーシスであることが明らかとなった。

次に、次章では CT26 細胞に誘導されたネクロプトーシスがどのようなシグナル伝達機構により誘導されているかについて検討する。

第二章 CT26 細胞におけるネクロプトーシス誘導経路の同定

緒言

第一章において poly I:C と zVAD は CT26 細胞にネクロプトーシスを誘導することを明らかにした。第二章ではネクロプトーシス誘導経路を同定することを目的とし、ノックダウン法や阻害抗体を用いた検討を行った。

Poly I:C は細胞質に存在する MDA5 やエンドソームに存在する TLR3 によって認識され、それぞれのアダプター分子である MAVS、TICAM-1 を介して下流にシグナルを伝達し、炎症性サイトカインや I 型 IFN の産生を惹起する[18,19]。先行研究ではマウスのマクロファージ細胞において poly I:C 処理によるネクロプトーシス誘導は TLR3-TICMA1 経路に依存した活性酸素種の産生によるとの報告がある[32]。TNFαなどにより産生された活性酸素種は様々な細胞種において細胞死を誘導することが知られており、RIP1/RIP3 のネクロソーム形成以降のシグナル伝達においても活性酸素種が重要な役割を担っていることが報告されている[42]。

また、ヒト腫瘍細胞において poly I:C が I 型 IFN や TNFαの産生を誘導し、自己分泌、傍分泌的に細胞死を誘導することも報告されている[15]。そこで CT26 細胞において poly I:C/zVAD によって誘導される細胞死が poly I:C 認識経路のいずれの経路に依存しているかを明らかにすることにした（図 5)。さらに、poly I:C/zVAD による細胞死が活性酸素種、I 型 IFN、TNFαの産生を介しているかについて検討するため、活性酸素の阻害剤と I 型 IFN 受容体（IFNAR)、TNFαに対する阻害抗体を用いて細胞死に与える影響を調べた。

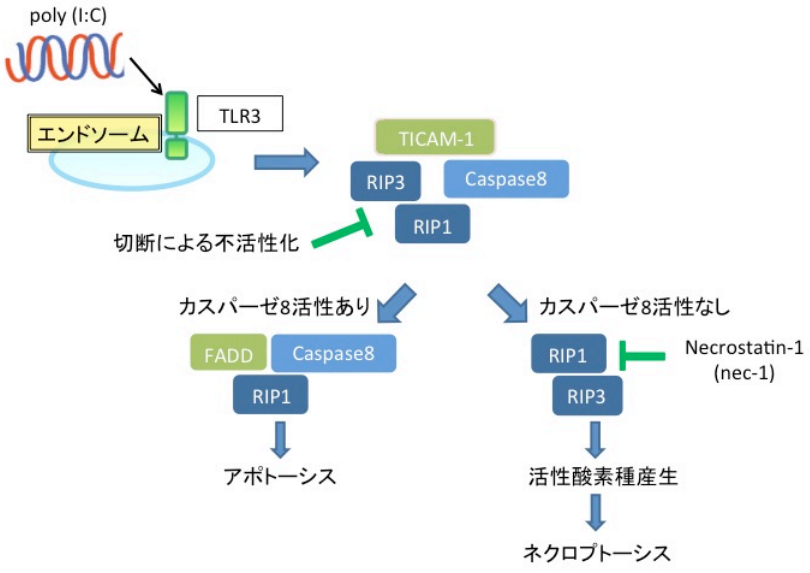


図 5　TLR3 を介した腫瘍細胞でのネクロプトーシス誘導機構（仮説）

結果

2.1　CT26 細胞における TLR3 発現と poly I:C によるシグナル誘導能

CT26 細胞において poly I:C の受容体の一つである TLR3 の発現の有無を TLR3 に対する特異的抗体を用いて、フローサイトメトリーで解析した（図 2.1)。細胞膜透過未処理群では、抗 TLR3 抗体で染色した細胞はアイソタイプコントロール抗体で染色した細胞と比して、蛍光強度の増強は確認されなかった。一方、細胞膜透過処理群では、抗 TLR3 抗体で染色した細胞はアイソタイプコントロール抗体で染色した細胞と比して、蛍光強度の増強が観察された。

次に、CT26 細胞において TLR3 が機能的に働いているかを検討するため、*Tlr3* に対する siRNA を用いて *Tlr3* をノックダウンし、poly I:C によって惹起される I 型 IFN の発現を指標に評価した（図 2.2)。SiRNA による *Tlr3* のノックダウン効率は実験を通して 90%程度であった（データ未掲載)。コントロール細胞では poly I:C 処理 1 時間後において *Ifn-β* mRNA が 2 倍程度発現誘導された。一方、*Tlr3* ノックダウン細胞では poly I:C による *Ifn-β* mRNA の発現誘導が完全に阻害されていた。

2.2　CT26 細胞において I 型 IFN と TNFα が poly I:C/zVAD により誘導されるネクロプトーシスに与える影響

Poly I:C による細胞死は、poly I:C によって発現誘導された I 型 IFN [43] や TNFα [44,45] が自己分泌、傍分泌の作用機序により引き起こすことが報告されている。そこで CT26 細胞で誘導されるネクロプトーシスにこれらの分子が関与しているか、阻害抗体を用いて検討した。抗 IFNAR 抗体または抗 TNFα抗体存在下においても、poly I:C と zVAD による細胞生存率の低下は抑制されなかった（図 2.3)。また、ELISA 法により poly I:C/zVAD または poly I:C 刺激 24 時間後の細胞培養上清中の TNFα を測定したが、いずれの刺激においても TNFα は産生されていなかった（データ未掲載)。以上の結果より、CT26 細胞で観察された poly I:C/zVAD によるネクロプトーシスは TNFα や I 型 IFN の産生を介して誘導されているのではないことが示唆された。

2.3　CT26 細胞での poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導経路の解析

Poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導経路を明らかにするために、poly I:C 認識経路に関するタンパク質をコードする遺伝子を siRNA によりノックダウンし、細胞生存率に与える影響について検討した。*Tlr3*、 *Ticam-1*、 *Mavs* 遺伝子に対する特異的 siRNA を用いたノックダウン効率は 50%以上であった（図 2.4)。*Tlr3*、*Ticam-1* ノックダウン細胞では poly I:C/zVAD による細胞生存率の低下が回復したが、*Mavs* ノックダウン細胞での細胞生存率は

コントロール細胞と同程度のままであった（図 2.4)。RIP3 をコードする遺伝子 *Ripk3* を siRNA によりノックダウンしたところ、poly I:C/zVAD による細胞生存率が完全に回復した。

2.4 Poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導における活性酸素種の関与について

腫瘍細胞である CT26 細胞でのネクロプトーシスに活性酸素種の産生が関与するかについて検討を行った。まず、poly I:C や zVAD で処理した細胞を活性酸素種の検出剤である CM-H_2DCFDA（2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate）と共培養し、細胞内活性酸素種の検出をフローサイトメトリーで解析した（図 2.5)。Poly I:C 単独処理細胞では蛍光強度の増加は確認されなかったが、poly I:C/zVAD 処理細胞において蛍光強度の増加が見られた。この蛍光強度の増加はネクロプトーシス阻害剤 nec-1 や活性酸素種のスカベンジャーである butylated hydroxyanisole（BHA）処理によって完全に抑制された。さらに BHA 処理によって poly I:C/zVAD による細胞生存率の低下が完全に阻害された（図 2.6)。

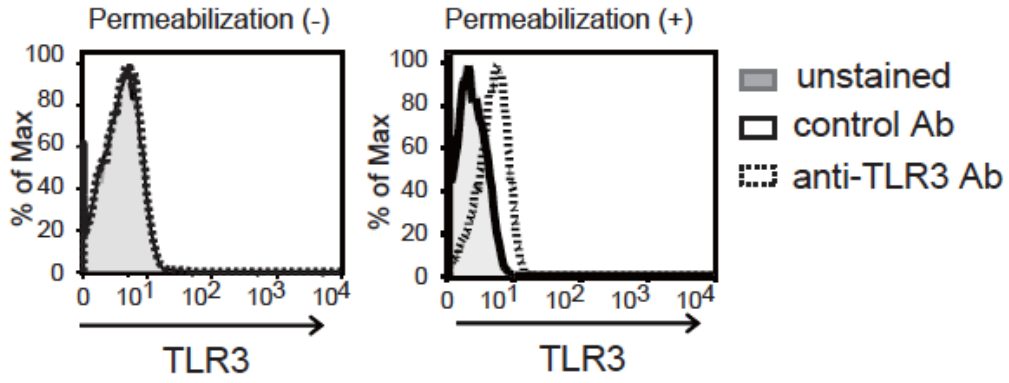


図 2.1　CT26 細胞における TLR3 発現
CT26 細胞を細胞膜透過処理群、未処理群に分け、APC 抗 TLR3 抗体とアイソタイプコントロール抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーで解析した。2 つの実験データのうちの 1 つを示した。

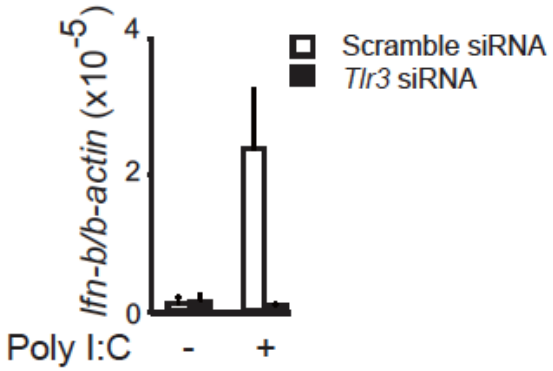


図 2.2　CT26 細胞における poly I:C によるシグナル誘導能
Tlr3 特異的 siRNA を用いて CT26 細胞での *Tlr3* ノックダウンを行い、50 μg/ml poly I:C 処理 1 時間後の *Ifnβ* mRNA 発現量を定量 PCR で解析した。mRNA 発現量は*β-actin* を内部標準として用い、*β-actin* に対する *Ifnβ*の発現量比で示した。

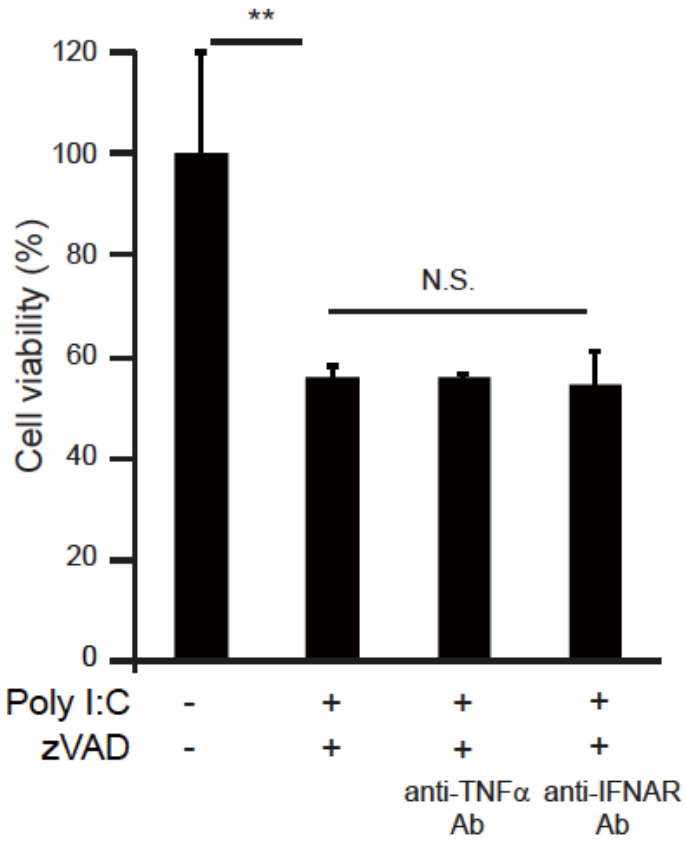


図 2.3　I 型 IFN と TNFαが poly I:C/zVAD により誘導されるネクロプトーシスに与える影響
CT26 細胞を 10 μg/ml 抗 IFNAR 抗体、または 10 μg/ml TNFα 抗体とともに、 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD で 24 時間処理し、WST-1 アッセイにより生細胞数を測定した。未刺激群に対する刺激群での細胞生存率(%)を示している。データは 3 つの独立したサンプルの平均を示している。** = $p < 0.01$

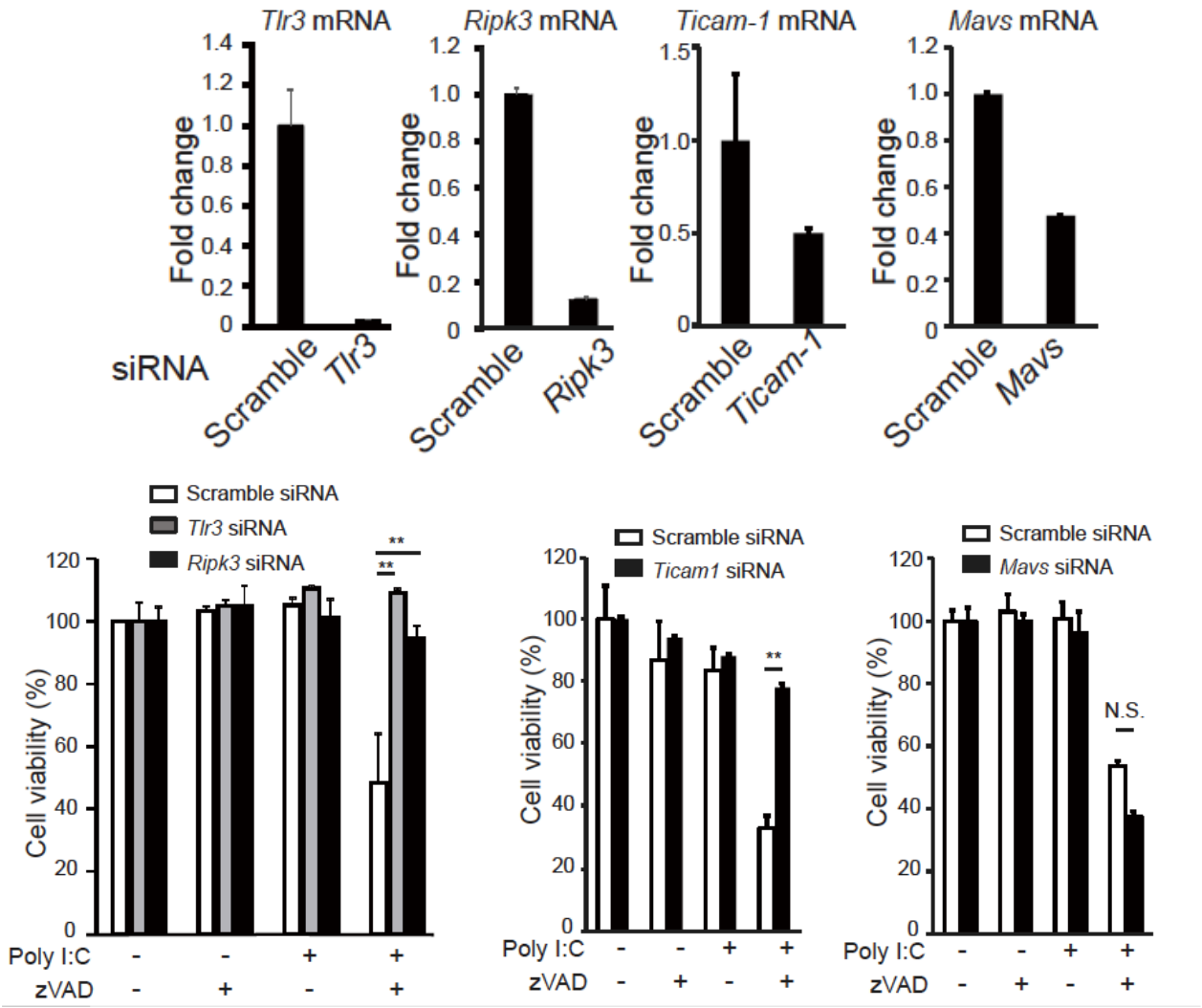


図 2.4　CT26 細胞での poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導経路の解析

（上段）*Tlr3, Ticam-1, Mavs, Ripk3* に対する特異的 siRNA を用いてノックダウンを行い、遺伝子の mRNA の発現量を定量 PCR で測定した。各遺伝子の発現は*β-actin* を内部標準として用い補正し、コントロール細胞に対してノックダウン細胞での各遺伝子の発現量比として示した。
（下段）各遺伝子のノックダウン細胞を用いて poly I:C、zVAD 処理し、24 時間後に WST-1 アッセイを行った。未刺激群に対する各刺激群での細胞生存率(%)を示している。データは 3 つの独立したサンプルの平均を示している。** = $p < 0.01$

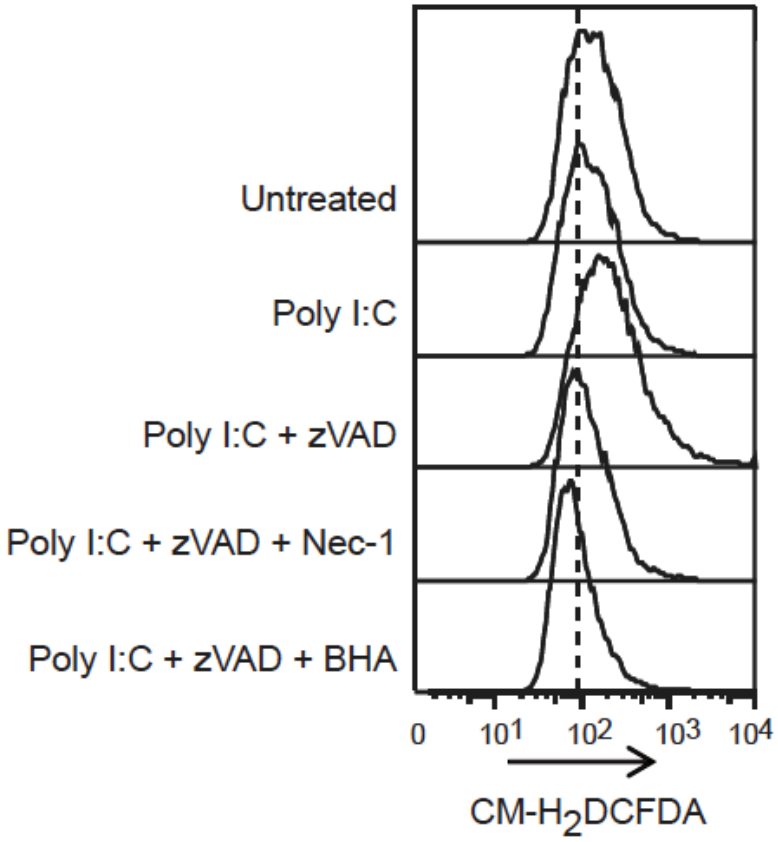


図 2.5　Poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導における活性酸素種の関与について
CT26 細胞を 50 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD、50 μM nec-1、100 μM BHA で 6 時間処理し、CM-H2DCFDA と共培養し、フローサイトメトリーで解析した。2 つの実験データのうちの 1 つを示した。

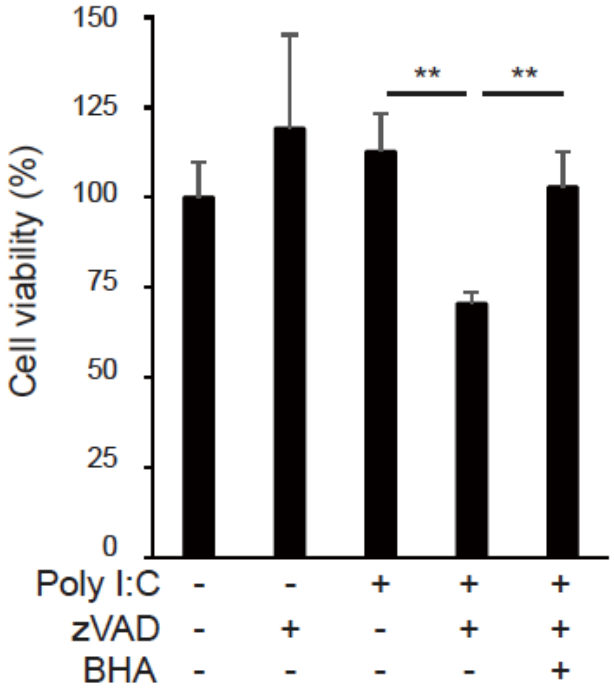


図 2.6　BHA による poly I:C/zVAD により誘導される細胞死阻害
CT26 細胞を 50 µg/ml poly I:C、25 µM zVAD、50 µM nec-1、100 µM BHA で 24 時間処理し、WST-1 アッセイで生存細胞を比較した。生存細胞(%)は未処理をコントロールとした。データは 3 つの独立したサンプルの平均を示している。** = p <0.01

考察

先行研究においてpoly I:Cによる細胞死は、刺激により産生されるTNFαやⅠ型IFNが二次的に作用することで引き起こされることが明らかとなっていた。今回、抗 TNFα抗体や抗IFNAR抗体を用いた実験より、CT26細胞においてpoly I:C/zVADにより誘導されるネクロプトーシスはTNFαやⅠ型IFNの産生による二次的な現象ではないことが明らかとなった。

フローサイトメトリーの解析より、CT26細胞でのTLR3の発現は細胞表面ではなく、細胞内に発現していることが示され、*Tlr3*特異的siRNAを用いたノックダウン実験より、poly I:Cによるシグナル伝達は主に TLR3 に依存していることが明らかとなった。SiRNA によるノックダウン実験により、CT26細胞におけるネクロプトーシスはTLR3-TICAM1-RIP3経路に依存しており、poly I:C の細胞質内受容体である MDA5/RIG-I-MAVS 経路には非依存的であることが示された。この結果はpoly I:CによるⅠ型IFNの発現誘導がTLR3に依存していることと一致している。

活性酸素は様々なリガンド刺激によって産生され、様々な生理活性をもつ[46]。先行研究ではマクロファージ細胞においてpoly I:C 処理により TICAM-1 の下流で活性酸素の産生が誘導され、ネクロプトーシスに重要な役割を担っていることが報告されている[32]。マウス腫瘍細胞でも poly I:C/zVAD 処理により活性酸素の産生が誘導され、Nec-1、BHA 処理によってその産生が抑制された。このことは活性酸素種の産生はRIP1の下流で起こっており、poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導において活性酸素種の産生は必須であることを示している。

Poly I:C と zVADにより CT26 細胞に誘導されるネクロプトーシスはTLR3-TICAM-1-RIP3経路によるものである事が判明した。TICAM-1とRIPはRIP homotypic interaction motif (RHIM) を介して結合する[38]。第三章ではPoly I:C処理によるTICAM-1とRIP3の結合の変化について検討した。また、CT26 細胞と他の腫瘍細胞を比較し、ネクロプトーシス抵抗性細胞との相違点を検討した。

第三章　Poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導の分子メカニズムの解析

緒言

第二章において、CT26 細胞では TLR3-TICAM-1-RIP3 経路によりネクロプトーシスが誘導される事が判明した。第三章では、ネクロプトーシス誘導に必要なシグナル伝達機構について調べるため、TICAM-1 と RIP3 の相互作用を免疫沈降法により検討した。また、第一章において複数の腫瘍細胞で poly I:C/zVAD 処理によりネクロプトーシスが誘導されるか検討したが、ネクロプトーシスが誘導されたのは CT26 細胞のみであった。そこで、同処理によるネクロプトーシスが誘導されない細胞として、B16D8 細胞（メラノーマ細胞）における TICAM-1 と RIP3 間のシグナル伝達機構について CT26 細胞との比較を行った。

更に、ネクロプトーシス感受性がどのような遺伝子発現に依存するかについて検討するために、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞を樹立した。このネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞及び、ネクロプトーシスが誘導されない他の腫瘍細胞において、ネクロプトーシスの調節に関わる遺伝子の mRNA 量や蛋白量を CT26 細胞と比較して検討した。

TICAM-1 は RIP homotypic interaction motif (RHIM) ドメインを有しており、RIP のような他の RHIM ドメインを含む蛋白と RHIM ドメインを介して結合する事ができる[47]。マウスマクロファージのネクロプトーシス誘導経路において TLR3 や TLR4 へのリガンド刺激により TICAM-1 は RHIM を介して RIP3 と結合する事が報告されている[32]。ネクロプトーシスが誘導された腫瘍細胞である CT26 細胞とネクロプトーシスが誘導されなかった腫瘍細胞である B16D8 細胞を用いて、poly I:C 処理後の TICAM-1 と RIP の結合を免疫沈降法により解析した。

また、TICAM-1の下流でIRF3を介してⅠ型IFN産生を誘導する経路を担う5-azacytidine induced gene 2 (*Azi2*) [14]と、TNFαの下流でネクロプトーシスの実行因子とされる*Ripk3* [28]、*Mlkl*[25]、*Pgam5*、*Drp1*[26]のmRNA発現量をネクロプトーシスが誘導される細胞とされない細胞の間で比較した。

結果

3.1　Poly I:C/zVAD 処理による RIP3 と TICAM-1 結合変化の検討

Poly I:C と zVAD により誘導されるネクロプトーシス分子メカニズムを解明するために、poly I:C 処理による TICAM-1 と RIP1、RIP3 の結合を免疫沈降法で検討した。

CT26 細胞に zVAD 処理と HA タグ付きの TICAM-1 プラスミドと FLAG タグ付き *Ripk3* プラスミドを遺伝子導入し、24 時間後に poly I:C 処理を行った。抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法を行い、RIP3 と TICAM-1、RIP1 との結合をウエスタンブロッティング法で評価した。zVAD 処理下での poly I:C 処理は CT26 細胞の RIP3 と TICAM-1、RIP3 と RIP1 の結合を誘導する事が明らかになった（図 3.1)。

しかし、同様に zVAD 処理下で遺伝子導入した B16D8 細胞において、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法を行い、RIP3 と TICAM-1 の結合を評価したが、poly I:C 処理による RIP3 と TICAM-1 の結合は誘導されず、むしろ刺激により減弱した（図 3.2)。

3.2　ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞の樹立と CT26 細胞との比較

Poly I:C/zVAD 処理によるネクロプトーシス誘導を左右する因子を更に調べるために、poly I:C/zVAD を添加した培養液で CT26 細胞を培養し、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞を樹立した（図 3.3)。CT26 細胞とネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞において、TICAM-1 の下流で細胞死に影響する分子の mRNA 発現量を比較したところ、*Ripk3* の mRNA 発現量が 20%近くまで低下していた（図 3.5)。 ウエスタンブロッティング法を行い RIP3 の蛋白発現量を比較した結果、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞の RIP3 は蛋白レベルで発現量が低下している事が明らかとなった（図 3.5)。

3.3　各種細胞における *Ripk3* mRNA 発現量の比較

B16D8、B16F10、3LL、MC38、Renca、EL-4、C1498 細胞といった poly I:C/zVAD 処理でネクロプトーシス誘導されない細胞と、CT26 細胞、L929 細胞といったネクロプトーシス誘導感受性のある細胞において *Ripk3* mRNA 発現量を定量 PCR 法で比較した結果、EL-4 以外のネクロプトーシス抵抗性細胞は *Ripk3* mRNA 発現量が極めて低かった（図 3.6)。

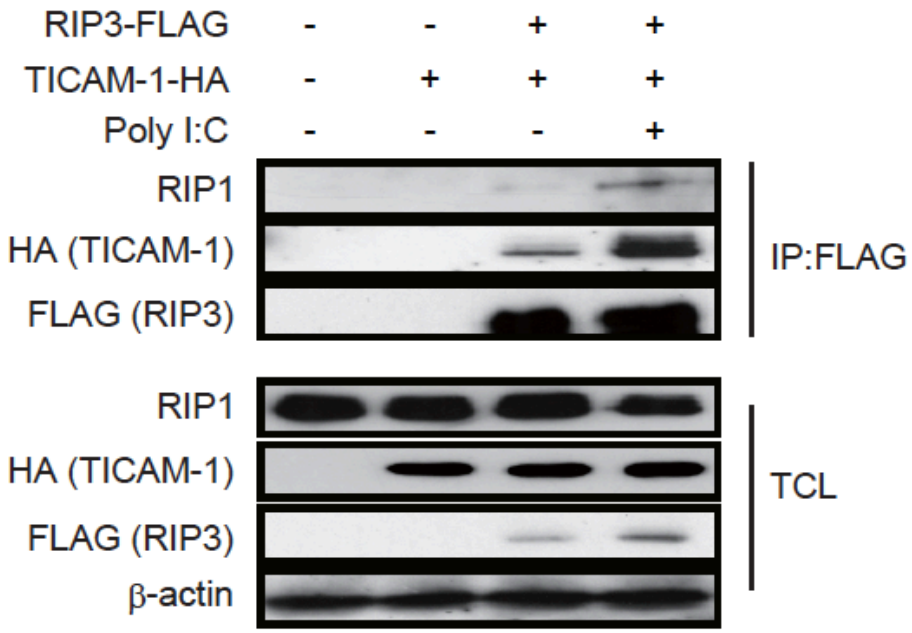


図 3.1　Poly I:C/zVAD 処理による TICAM-1 と RIP3、RIP1 と RIP3 結合変化（CT26 細胞）
CT26 細胞に 2 μg pCMV RIPK3-FLAG と 2 μg pcDNA4 TICAM-1-HA を遺伝子導入し、25 μM zVAD で処理した。24 時間後に 50 μg/ml poly I:C で処理し、30 分後に lysis buffer で回収した。Total cell lysate（TCL）の一部で抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、抗 FLAG 抗体、抗 HA 抗体、抗 RIP1 抗体、抗β-actin 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。

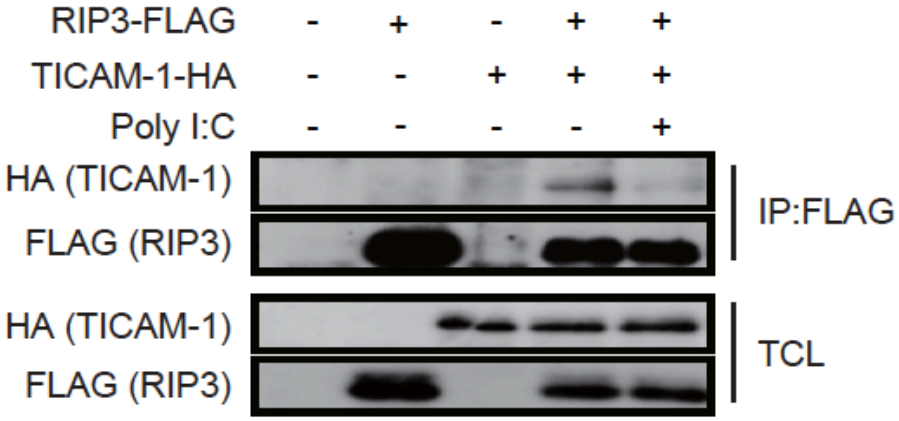


図 3.2　Poly I:C/zVAD 処理による TICAM-1 と RIP3 結合変化（B16D8 細胞）
B16D8 細胞に 2 μg PCMV RIPK3-FLAG と 2 μg pCDNA4 TICAM-1-HA を遺伝子導入し、25 μM zVAD で処理した。24 時間後に 50 μg/ml poly I:C で処理し、30 分後に lysis buffer で回収した。Total cell lysate（TCL）の一部で抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、抗 FLAG 抗体, 抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。

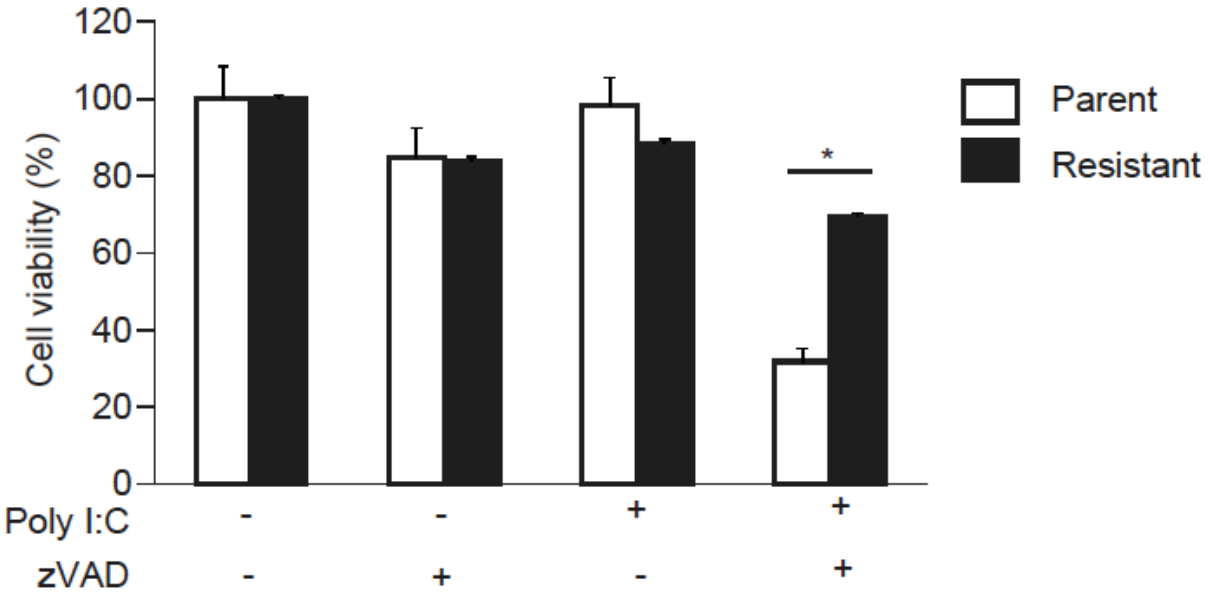


図 3.3　ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞の樹立
Poly I:C/zVAD を添加した培養液で培養したネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞と CT26 細胞を 25 μg/ml poly I:C、25 μM zVAD で 24 時間処理し、WST-1 アッセイで生細胞数を測定した。細胞生存率(%)は未刺激群での細胞数を 100 とし、各刺激群での生細胞数を割合として示した。データは 3 つの独立したサンプルの平均を示している。** = $p < 0.01$

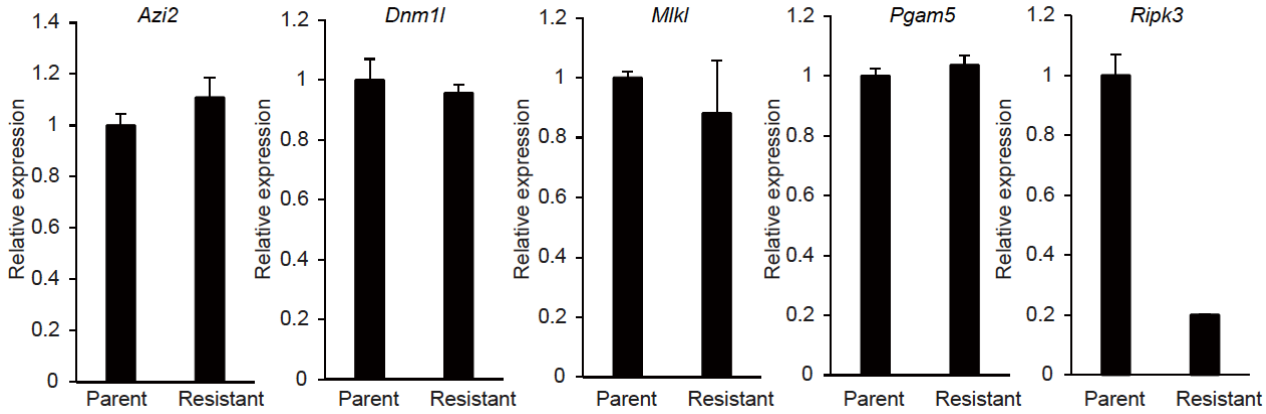


図 3.4　細胞死に関連する遺伝子の mRNA 発現量比較
CT26 細胞とネクロプトーシス 抵抗性 CT26 細胞の mRNA 発現量を定量 PCR で解析し比較した。mRNA 発現量はβ-*actin* を内部標準として用い、β-*actin* に対する各遺伝子の発現量比で示した。

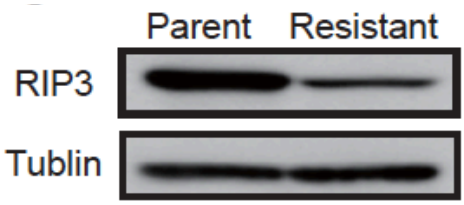


図 3.5　RIP3 蛋白発現量の比較
CT26 細胞とネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞を lysis buffer で回収し、抗 RIP3 抗体と抗 tubulin 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。

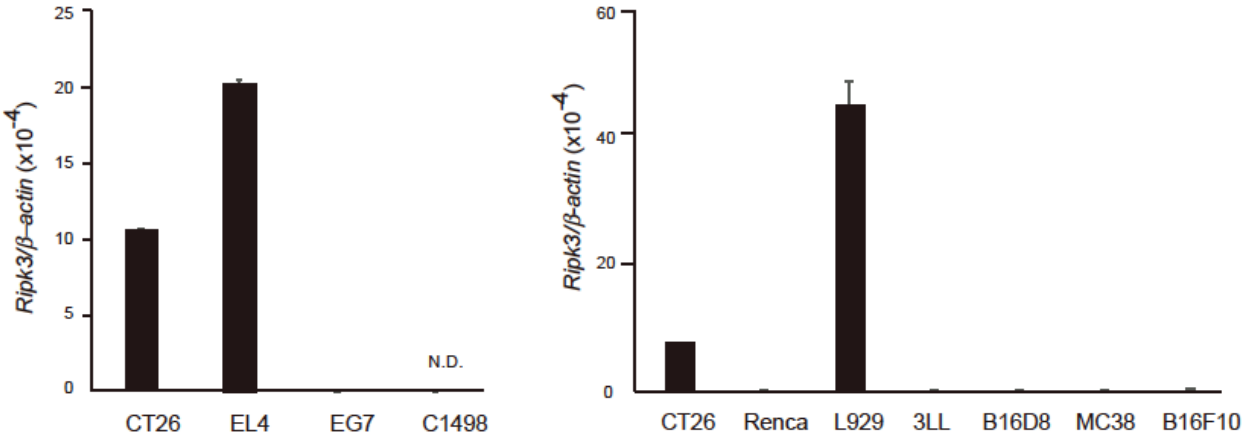


図 3.6　マウス細胞の *Ripk3* mRNA 発現量の比較
CT26 細胞、Renca 細胞、L929 細胞、3LL 細胞、B16D8 細胞、MC38 細胞、B16F10 細胞、EL4 細胞、EG7 細胞、C1498 細胞の *Ripk3* mRNA 発現量を定量 PCR で解析し比較した。mRNA 発現量は*β-actin* を内部標準として用い、*β-actin* に対する *Ripk3* の発現量比で示した。

考察

マウスマクロファージ細胞において、poly I:C/zVAD による細胞死には RIP3 と TICAM-1 の結合が必要である事が報告されている [32]。今回、マウス大腸癌細胞である CT26 細胞においても、poly I:C/zVAD 処理は RIP3 と TICAM-1 の結合を増強している事が明らかとなった(図 3.1)。一方、poly I:C/zVAD 処理でネクロプトーシスの誘導されない B16D8 細胞ではこの結合は増強されなかった。これらの結果から、poly I:C と zVAD 処理によってネクロプトーシスが誘導されるためには、RIP3 と TICAM-1 の結合が重要である事がわかった。

更に、poly I:C/zVAD 添加培養液で樹立したネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞と CT26 細胞を比較検討した結果、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞では *Ripk3* の mRNA 発現量が低下しており、蛋白レベルでも発現が低下している事が明らかとなった（図 3.4、図 3.5)。ネクロプトーシスが誘導されなかった腫瘍細胞とネクロプトーシスが誘導される CT26 及び L929 細胞との間で *Ripk3* の mRNA 発現を比較した結果（図 3.6)、CT26、L929、及び EL4 細胞の *Ripk3* の mRNA 発現量が高かった。EL4 細胞は *Ripk3* の mRNA 発現量が高いにもかかわらずネクロプトーシスが誘導されない他の要因があると考えられた。EL4 細胞の poly I:C 処理による *Ifnβ* mRNA 誘導能を検討したところ誘導能が認められず（データ未掲載)、使用した EL4 細胞は poly I:C と TLR3 と結合や下流のシグナル伝達が何らかの理由で働いていないと考えられた。

これらの結果は、マウス腫瘍細胞である CT26 細胞においてもマウスマクロファージ細胞同様、poly I:C/zVAD によるネクロプトーシス誘導は、TICAM-1 と RIP3 の結合が重要であることを示唆している。第四章では生体内での poly I:C/zVAD による CT26 細胞への抗腫瘍効果が得られるか検討した。

第四章　生体内での CT26 細胞に対する poly I:C/zVAD の抗腫瘍効果の検討

緒言

第一章から第三章において、poly I:C/zVAD 処理は CT26 細胞に TLR3-TICAM-1-RIP3 シグナルを介して、活性酸素種産生を誘導した結果、ネクロプトーシスを誘導する事が明らかとなった。第四章では生体内において poly I:C/zVAD が抗腫瘍効果を示すかについて検討した。

Poly I:C は直接腫瘍細胞に細胞死を誘導する [43]。Poly I:C の受容体である TLR3 はマウスの樹状細胞などの免疫細胞にも発現しており [48]、リガンド刺激を受けると TICAM-1 を介して樹状細胞の成熟・活性化を起こす [13]。活性化した樹状細胞は CTL や NK 細胞による抗腫瘍作用を示す [12,13,49](図 6)。

そこで、CT26 細胞を移植した担癌マウスを用いて、poly I:C 投与による抗腫瘍効果を検討した。Poly I:C による抗腫瘍効果が CTL や NK 細胞によって担われているかについても併せて検討した。次に、zVAD が poly I:C による抗腫瘍効果に与える影響について検討した。本実験では、先行研究において FAS 刺激による肝細胞のアポトーシス阻害に用いられた量と等量の zVAD を、腫瘍周囲の皮下に投与して腫瘍内濃度を高める投与法を選択した [50]。

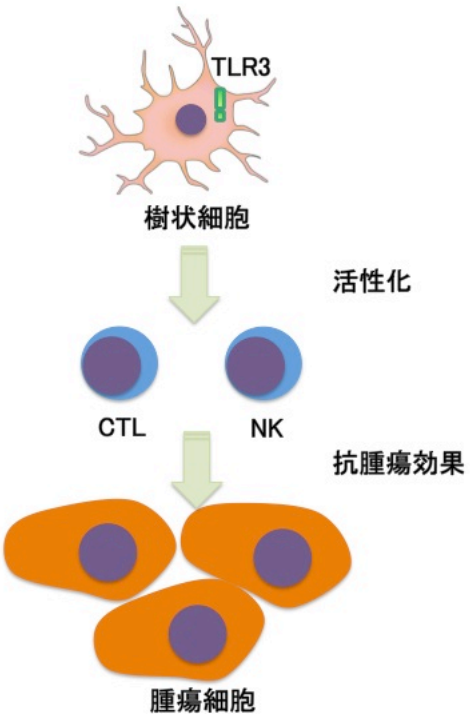


図 6　Poly I:C による免疫細胞を介した抗腫瘍効果

結果

4.1　CT26 細胞担癌マウスにおける poly I:C の抗腫瘍効果の検討

Balb/c マウス大腸癌細胞由来の CT26 細胞を Balb/c マウスに移植し、腫瘍径を測定し、腫瘍の体積を算出した（図 4.1)。CT26 細胞は Balb/c マウスにおいて生着し、増殖することが確認された。腫瘍細胞の生着が確認されたマウスに対して、細胞移入後 10-11 日後に poly I:C を種々の濃度で腹腔内投与（intraperitoneal、i.p.）し、その後腫瘍の体積を測定した。その結果、poly I:C の用量依存的に腫瘍退縮効果が認められた（図 4.1)。

4.2　Poly I:C の抗腫瘍効果における NK 細胞と CD8βT 細胞の役割

生体内での CT26 細胞に対する poly I:C の抗腫瘍効果が NK 細胞や CTL を介しているか検討した。NK 細胞と CTL を特異的に除去するために、抗 asialo GM1 抗体と抗 CD8β抗体を用いて poly I:C の抗腫瘍効果に与える影響を検討した。抗 asialo GM1 抗体により poly I:C の抗腫瘍効果は消失し、抗 CD8β抗体の投与は軽度腫瘍退縮効果を低下させた。抗 asialo GM1 抗体と抗 CD8β抗体の併用により、poly I:C による腫瘍縮小効果は完全に消失した（図 4.2)。

4.3　生体内での poly I:C と zVAD 併用による CT26 細胞への抗腫瘍効果

生体内において、poly I:C による抗腫瘍効果を zVAD が増強するか検討するために、抗 asialo GM1 抗体、抗 CD8β抗体により、免疫細胞を介した poly I:C の抗腫瘍効果を排除した状態下で、poly I:C と zVAD を同時投与して腫瘍が縮小するか検討した。

Poly I:C 腹腔内投与と zVAD 腫瘍周囲皮下投与（subcutaneous、s.c.）を行った結果、NK 細胞と CTL 阻害抗体により poly I:C 単独の抗腫瘍効果が完全に阻害されている状況においても抗腫瘍効果を認めた（図 4.3)。一方、同様の実験を poly I:C 皮下投与と zVAD 腫瘍周囲皮下投与を行った系では、抗腫瘍効果を認めなかった（図 4.4)。

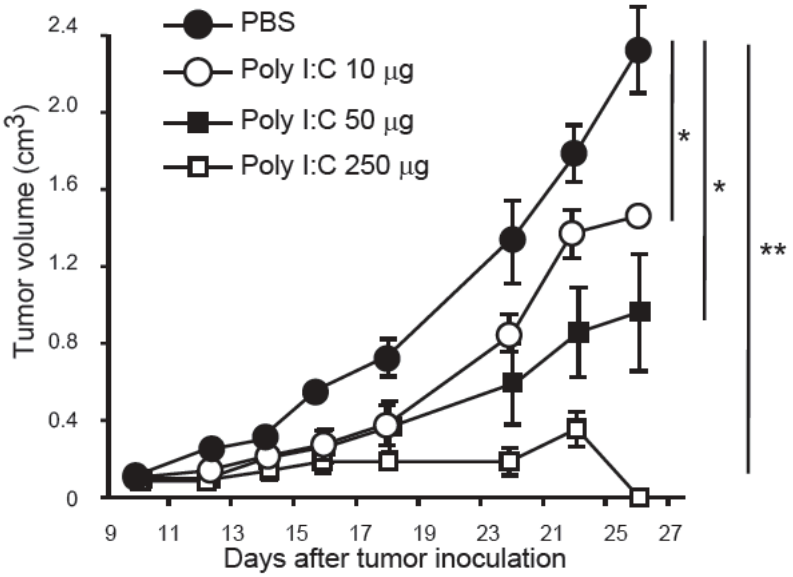


図 4.1　CT26 細胞担癌マウスに対する poly I:C の抗腫瘍効果
1 x 10^5 の CT26 細胞を Balb/c マウスの背部に皮下注射し、10 日後に poly I:C を図中に示す量で腹腔内投与した。Poly I:C 投与追加投与を 17 日後と 24 日後に行い腫瘍径を測定した。データは 3 匹のマウスの平均を示している。** = p <0.01

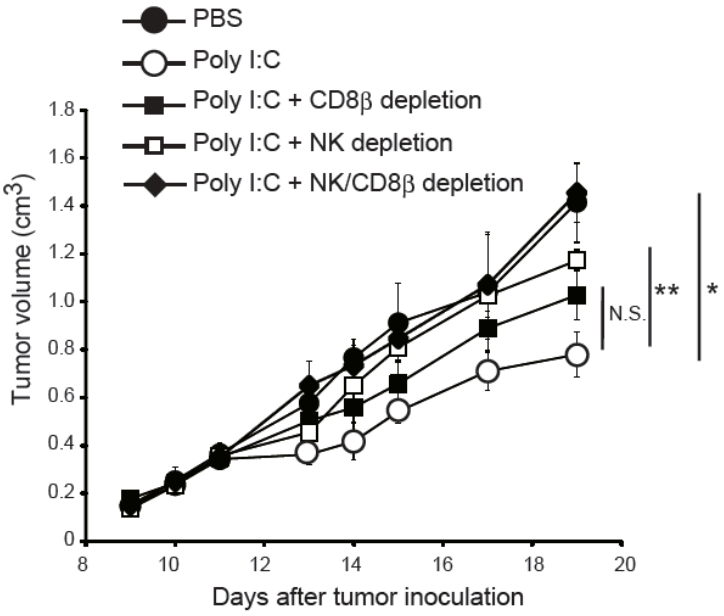


図 4.2　 Poly I:C の抗腫瘍効果と NK 細胞/CD8β陽性 T 細胞の関係
5 x 10^5 の CT26 細胞を Balb/c マウス背部に皮下注射し、10 日後に抗 asialo GM1 抗体と抗 CD8β抗体を腹腔内投与し、抗体投与 24 時間後に poly I:C 100 μg を腹腔内投与した。同様の投与を腫瘍移植 14 日後に行い腫瘍径を測定した。データは 3 匹のマウスの平均を示している。* = p<0.05 ** = p<0.01

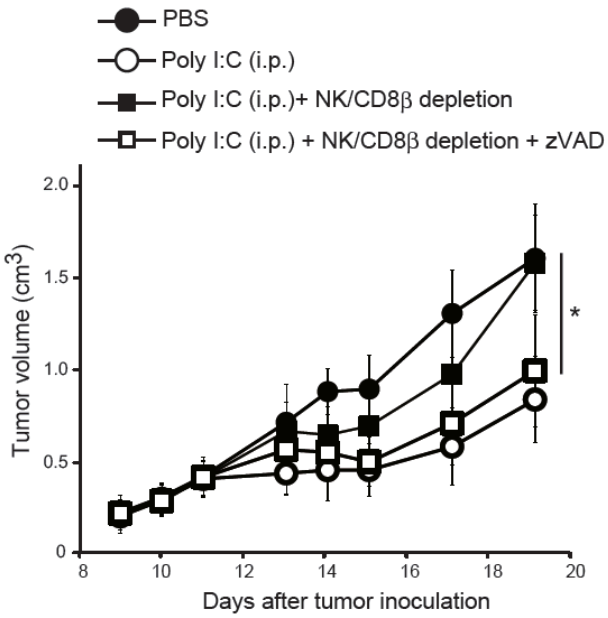


図 4.3　CT26 細胞担癌マウスに対する zVAD 皮下投与/poly I:C 腹腔内投与の抗腫瘍効果
5 x 10^5 の CT26 細胞を Balb/c マウスの背部に皮下注射した 10 日後に抗 asialo GM1 抗体と CD8β抗体を腹腔内投与し、抗体投与 24 時間後に poly I:C 100 μg 腹腔内投与、zVAD 1 mg 腫瘍周囲皮下投与した。同様の投与は 14 日後に行い腫瘍径を測定した。データは 3 匹のマウスの平均を示している。* = p<0.05 ** = p<0.01

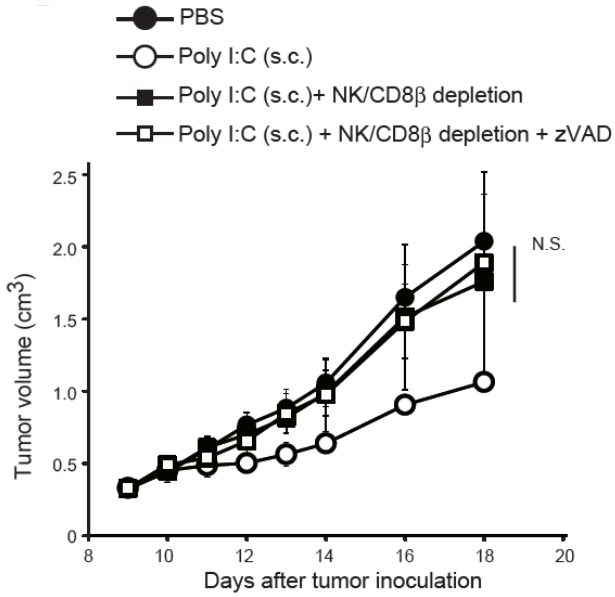


図 4.4　CT26 細胞担癌マウスに対する zVAD 皮下投与/poly I:C 皮下投与の抗腫瘍効果
5 x 10^5 の CT26 細胞を Balb/c マウスの背部に皮下注射した 9 日後に抗 asialo GM1 抗体と CD8β抗体を腹腔内投与し、抗体投与 24 時間後に poly I:C 100 μg を腫瘍周囲皮下投与、zVAD1 mg 腫瘍周囲皮下投与した。同様の投与は 13 日後に行い腫瘍径を測定した。データは 3 匹のマウスの平均を示している。** = p<0.01. n.s., not significant.

考察

CT26 細胞担癌マウスへ poly I:C と zVAD 投与を行った結果、poly I:C 単独による抗腫瘍効果が生体内において認められた。試験管内の実験では poly I:C 単独投与は CT26 細胞に対する抗腫瘍効果を示さなかったが、CTL や NK 細胞阻害抗体を用いた実験により、生体内での poly I:C 投与は CTL や NK 細胞を介して抗腫瘍効果を示す事が明らかとなった。

Poly I:C 単独投与の治療効果を CTL、NK 細胞阻害抗体を用いて除去した条件において、poly I:C 腹腔内投与と、zVAD 腫瘍周囲皮下注射を行った。Poly I:C の腹腔内投与と zVAD の腫瘍周囲皮下投与により腫瘍径の縮小が認められ、poly I:C/zVAD 投与が腫瘍細胞に直接抗腫瘍効果を示す事を示唆した。一方、poly I:C の投与経路を腫瘍周囲皮下投与に変更して行った実験では、腫瘍細胞の縮小は認められなかった。Poly I:C 単独の抗腫瘍効果は腹腔内投与、腫瘍周囲皮下投与いずれも CTL と NK 細胞阻害抗体によって阻害されており、NK 細胞、CTL を介するものであったが、poly I:C 腫瘍周囲皮下投与では zVAD との併用による抗腫瘍効果が見られなかった。原因として、poly I:C 腫瘍周囲皮下投与は腫瘍内の poly I:C 自体の濃度が低い可能性や、poly I:C/zVAD がマウス腹腔内マクロファージにネクロプトーシスを誘導するように[32]、皮膚の樹状細胞にネクロプトーシスを誘導され、腫瘍の増殖抑制がされていない可能性も考えられる。

今回の実験結果により、poly I:C と zVAD 投与は生体内でも CTL や NK 細胞非依存性の抗腫瘍効果を示した。Poly I:C と zVAD の投与は poly I:C による免疫細胞を介した抗腫瘍効果だけでなく、直接腫瘍細胞に抗腫瘍効果を誘導する事により、より優れた抗腫瘍療法となり得る可能性を示唆した。

終章

本研究において、以下の知見が得られた。

1. 合成2本鎖RNAであるpoly I:Cと汎カスパーゼ阻害薬のzVAD投与はマウス大腸癌細胞のCT26細胞にネクロプトーシスを引き起こす。

2. CT26細胞においてPoly I:C/zVADにより誘導されるネクロプトーシスはTLR3-TICAM-1-RIP3経路依存的に引き起こされる。また、その下流で活性酸素種が産生され細胞死を実行する。

3. CT26細胞においてpoly I:C/zVADにより、TICAM-1とRIP3、RIP1とRIP3の結合が増強される。

4. Poly I:C/zVADでネクロプトーシスが誘導されないB16D8細胞ではpoly I:C/zVADによるTICAM-1とRIP3の結合は増強しない。

5. ネクロプトーシス抵抗性CT26細胞やpoly I:C/zVADによるネクロプトーシス誘導が起こらない他の腫瘍細胞と、ネクロプトーシスが誘導されるL929細胞及びCT26細胞と比較すると、ネクロプトーシスが誘導される細胞では*Ripk3*のmRNA発現量が多い。

6. CT26細胞担癌マウスに対するpoly I:C投与はCTL､NK細胞依存的な抗腫瘍効果を示す。

7. Poly I:C腹腔内投与とzVAD腫瘍周囲皮下投与はCT26細胞担癌マウスにCTL、NK細胞非依存的な抗腫瘍効果を示す。

以上の結果より、試験管内でpoly I:C/zVADはCT26細胞においてネクロプトーシスを誘導した。生体内においてもpoly I:CとzVADはCT26細胞へ直接抗腫瘍効果を示し、ネクロプトーシスを誘導した可能性がある（図7)。また、poly I:C/zVADによりネクロプトーシスが誘導されるか否かは、細胞の*Ripk3*発現量とRIP3とTICAM-1の結合が誘導されるかどうかが重要な要素となると考えられる。

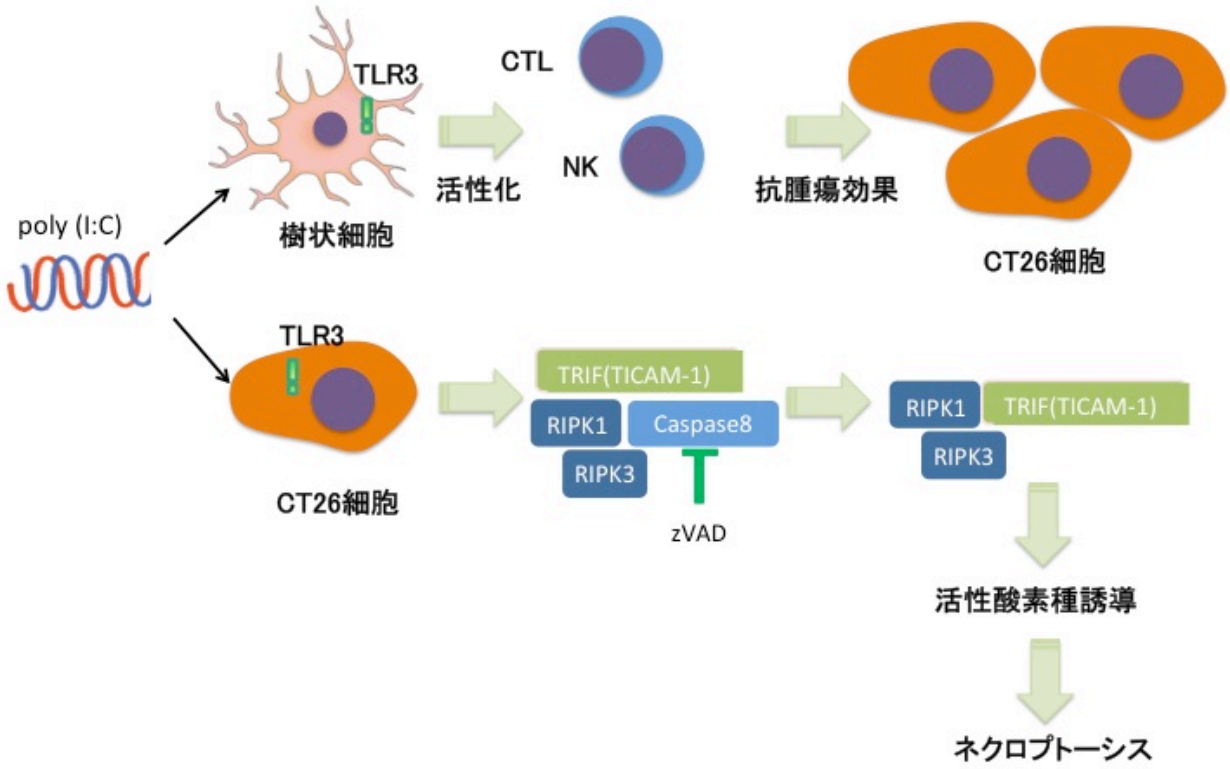


図 7　CT26 細胞に対する poly I:C/zVAD の抗腫瘍効果

本研究において、zVAD によりカスパーゼ 8 を含むカスパーゼが阻害された条件での poly I:C 処理は CT26 細胞にネクロプトーシスを誘導する事が明らかとなった。Poly I:C は MDA5 や TLR3 を介してシグナル伝達を行うが、CT26 細胞では poly I:C 刺激により TLR3 依存的に *Ifn-β* mRNA が誘導されたことから、この細胞では poly I:C 処理時に TLR3-TICAM-1 経路が優位に働く事が示された。CT26 細胞は zVAD でカスパーゼが阻害された状況で poly I:C によって処理されると、急速に RIP3 と RIP1 が結合し、ネクロプトーシスを誘導するシグナルが開始され、活性酸素種の産生を引き起こす。活性酸素種の増加は、PGMA5-Drp1 経路によるミトコンドリアの酸化ストレスを反映して生じるという報告もなされている [25,26]。

RIP1 と RIP3 はネクロプトーシス誘導に必要と考えられているが、ネクロプトーシスは RIP1 が欠損していても誘導されるという報告もある [34,51]。また、RIP1 はいくかの細胞においてはネクロプトーシスを抑制するという報告もある [52-54]。このように RIP の中でも、ネクロプトーシス誘導は RIP3 が RIP1 よりも重要な分子であると考えられる。L929 細胞同様 CT26 細胞は poly I:C/zVAD によりネクロプトーシスが誘導される [37,39]。しかし、本研究では他の腫瘍細胞ではネクロプトーシスは誘導されなかった。ネクロプトーシスが誘導されない細胞である B16D8 細胞における *Ripk3* mRNA 発現量は、CT26 細胞や L929 細胞といったネクロプトーシス誘導される細胞よりも著明に少なかった [55]。さらに、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞でも *Ripk3* mRNA 発現量が大きく低下していた。一方でネクロプトーシス誘導シグナルの抑制性因子である cFLIP (Cellular FLICE (FADD-like IL- 1β -converting enzyme)-inhibitory protein) や cIAP などのネクロプトーシス誘導経路制御に関する分子

の発現は大きな差を認めなかった（データ未掲載）。これらの結果は *Ripk3* の発現量が細胞によって様々であり、poly I:C によるネクロプトーシス誘導感受性に関連している事を示唆していた。

但し、*Ripk3* の過剰発現を行った B16D8 細胞においても、poly I:C によるネクロプトーシスは誘導されなかった事から、*Ripk3* の高発現だけではネクロプトーシス誘導を引き起こすには不十分である事を示していた。更なるネクロプトーシス誘導の制御因子が関係していると考えられる。近年、NAD-dependent deacetylase sirtuin-2 (SIRT2)、MLKL、PGAM5 などの TNFαによるネクロプトーシスを正に制御する因子が報告されているが、ヒトやマウス、細胞種などでも異なると言われている[26,56-58]。MLKL は、マウス線維芽細胞においても TLR の下流で RIP3 と結合しネクロプトーシス誘導に関与すると言われている[38]。PGAM5 や MLKL の mRNA 発現量はネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞と CT26 細胞を比較しても変化なかった。これらの結果より、更に別の因子がマウス腫瘍細胞におけるネクロプトーシス誘導に関与していると考えられた。

報告された腫瘍ワクチン実験において、凍結融解した細胞やホルムアルデヒド固定した細胞、浸透圧差で破壊して作製したネクローシス細胞は抗腫瘍効果を誘導しなかったが[59-61]、熱処理されたネクローシス細胞が抗原提示細胞を刺激して、IL-12 や TNFαの産生を誘導したという報告もされている[62]。これらの異なる結果は細胞死を誘導する手法によりネクローシス細胞から放出される RNA を含めた DAMPs の内容や量が異なり、多様な免疫応答が誘導されるためではないかと考えられる。また、自己由来の RNA も TLR3 を刺激する事が明らかとなっている[63]。

Poly I:C は TLR3 の合成リガンドであり、樹状細胞や CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞に優れた作用を示すため、抗がん剤やがんワクチンのアジュバンドとして用いられている[12]。CD8α陽性樹状細胞は TLR3 を高発現しており、poly I:C 刺激によって活性化され、TLR3-TICAM-1 経路で T 細胞へのクロスプライミングを行い、担癌マウスの CTL や NK 細胞を誘導する[64,65]。更に、poly I:C は間質細胞の MAVS 経路で I 型 IFN 産生を誘導し、CTL や NK 細胞を活性化して腫瘍増殖を抑制する[66]。Poly I:C は腫瘍細胞に対する免疫細胞を介した抗腫瘍効果以外にも、直接腫瘍にアポトーシスを誘導する作用も報告されている[67,68]。TLR3 はマウスやヒトの腫瘍細胞に発現されており[67-71]、TLR3 の腫瘍細胞での発現は 2 本鎖 RNA による乳癌治療の有効性を示すマーカーとなり得るとも報告されている[43]。

TNFαによって誘導されるネクロプトーシスは zVAD やウイルスによる抗カスパーゼ阻害蛋白などによるカスパーゼ 8 の阻害下で誘導されるが[72]、本研究では TLR3 リガンド刺激がカスパーゼ 8 の阻害下で腫瘍細胞にネクロプトーシスを誘導した。RNA によって誘導される細胞死の分子メカニズムの解明は、poly I:C による腫瘍微小環境や樹状細胞を介した抗腫瘍療法に更なる可能性を付加すると考えられる。

謝辞

本研究の遂行において、終始適切なご指導、ご討論を賜り、本論文作成にあたって惜しみないご助力をいただきました北海道大学大学院医学研究科免疫学分野、高木宏美特別研究員、瀬谷司教授に深く感謝いたします。

終始有益なご指導、ご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究科免疫学分野、志馬寛明助教、押海裕之講師、松本美佐子准教授に深く感謝いたします。

研究生活のあらゆる面でお世話になりました、北海道大学免疫学分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたりご配慮・ご教示頂きました、北海道大学医学部医学専攻血液内科学分野、今村雅寛前教授、豊嶋崇徳教授、教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

2015 年 3 月

参考文献

1 Galluzzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Touat, Z. & Kroemer, G. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS. pathog.* **4**, e1000018(2008).

2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674(2011).

3 Criscitiello, C., Esposito, A. & Curigliano, G. Tumor-stroma crosstalk: targeting stroma in breast cancer. *Curr. opin. oncol.* **26**, 551-555(2014).

4 Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R. & Baptista, P. V. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed. res. int.* **2014**, 179486(2014).

5 Tatematsu, M., Nishikawa, F., Seya, T. & Matsumoto, M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat. Commun.* **4**, 1833(2013).

6 Danthi, P. Enter the kill zone: initiation of death signaling during virus entry. *Virology* **411**, 316-324(2011).

7 Tatematsu, M., Seya, T. & Matsumoto, M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochem. J.***458**, 195-201 (2014).

8 Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immuno.* **9**, 353-363(2009).

9 Kono, H. & Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immuno.* **8**, 279-289(2008).

10 Piccinini, A. M. & Midwood, K. S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators. Inflamm.* **2010**, 672395(2010).

11 Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell. Death. Differ.* **19**, 107-120(2012).

12 Seya, T. *et al.* TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. *Oncoimmunology* **1**, 917-923(2012).

13 Seya, T. & Matsumoto, M. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1175-1184(2009).

14 Matsumoto, M. & Seya, T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **60**, 805-812(2008).

15 Van, D. N. *et al.* Innate immune agonist, dsRNA, induces apoptosis in ovarian cancer cells and enhances the potency of cytotoxic chemotherapeutics. *FASEB. J.* **26**, 3188-3198(2012).

16 Chawla-Sarkar, M. *et al.* Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis.* **8**, 237-249(2003).

17 Berke, I. C., Li, Y. & Modis, Y. Structural basis of innate immune recognition of viral RNA. *Cell. Microbiol.* **15**, 386-394(2013).
18 Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**, 981-988(2005).
19 Kaiser, W. J. & Offermann, M. K. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J. Immunol.* **174**, 4942-4952(2005).
20 Michallet, M. C. *et al.* TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**, 651-661(2008).
21 Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S. & Anders, H. J. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat. Rev. Immuno.* **14**, 759-767(2014).
22 Vercammen, D. *et al.* Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **187**, 1477-1485(1998).
23 Silke, J. The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 620-626(2011).
24 Han, J., Zhong, C. Q. & Zhang, D. W. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat. Immunol.* **12**, 1143-1149(2011).
25 Sun, L. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* **148**, 213-227(2012).
26 Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F. & Wang, X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* **148**, 228-243(2012).
27 Chan, F. K. & Baehrecke, E. H. RIP3 finds partners in crime. *Cell* **148**, 17-18(2012).
28 Cho, Y. S. *et al.* Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* **137**, 1112-1123(2009).
29 He, S. *et al.* Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* **137**, 1100-1111(2009).
30 Sridharan, H. & Upton, J. W. Programmed necrosis in microbial pathogenesis. *Trends. Microbiol.* **22**, 199-207(2014).
31 Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 135-147(2014).
32 He, S., Liang, Y., Shao, F. & Wang, X. Toll-like receptors activate programmed

necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20054-20059(2011).

33 Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **5**, 461(2014).

34 Upton, J. W., Kaiser, W. J. & Mocarski, E. S. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell. Host. Microbe.* **7**, 302-313(2010).

35 Oberst, A. *et al.* Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* **471**, 363-367(2011).

36 Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat. Immunol.* **4**, 161-167(2003).

37 Wu, Y. T. *et al.* zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNFalpha mediated by the PKC-MAPKs-AP-1 pathway. *Cell. death. Differ.* **18**, 26-37(2011).

38 Kaiser, W. J. *et al.* Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J. Biol. Chem.* **288**, 31268-31279(2013).

39 Kalai, M. *et al.* Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell. Death. Differ.* **9**, 981-994(2002).

40 Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell. Death. Differ.* **16**, 3-11(2009).

41 Degterev, A., Maki, J. L. & Yuan, J. Activity and specificity of necrostatin-1, small-molecule inhibitor of RIP1 kinase. *Cell. Death. Differ.* **20**, 366(2013).

42 Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 700-714(2010).

43 Salaun, B., Coste, I., Rissoan, M. C., Lebecque, S. J. & Renno, T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J. Immunol.* **176**, 4894-4901 (2006).

44 Steelman, A. J. & Li, J. Poly(I:C) promotes TNFalpha/TNFR1-dependent oligodendrocyte death in mixed glial cultures. *J. Neuroinflammation.* **8**, 89(2011).

45 Chiron, D., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., Bataille, R. & Jego, G. TLR3 ligand induces NF-κB activation and various fates of multiple myeloma cells depending on IFN-α production. *J. Immunol.* **182**, 4471-4478(2009).

46 Ray, P. D., Huang, B. W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**, 981-990(2012).

47 Meylan, E. *et al.* RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* **5**, 503-507(2004).

48 Edwards, A. D. *et al.* Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* **33**, 827-833(2003).
49 Ammi, R. *et al.* Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: Knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol. Ther.* (2014).
50 Nussbaum, A. K. & Whitton, J. L. The contraction phase of virus-specific CD8+ T cells is unaffected by a pan-caspase inhibitor. *J. Immunol.* **173**, 6611-6618 (2004).
51 Zhang, D. W. *et al.* RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* **325**, 332-336(2009).
52 Roderick, J. E. *et al.* Hematopoietic RIPK1 deficiency results in bone marrow failure caused by apoptosis and RIPK3-mediated necroptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 14436-14441(2014).
53 Dannappel, M. *et al.* RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis. *Nature* **513**, 90-94(2014).
54 Takahashi, N. *et al.* RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature* **513**, 95-99(2014).
55 Vanlangenakker, N., Bertrand, M. J., Bogaert, P., Vandenabeele, P. & Vanden Berghe, T. TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell. Death. Dis.* **2**, e230(2011).
56 Zhao, J. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5322-5327(2012).
57 Narayan, N. *et al.* The NAD-dependent deacetylase SIRT2 is required for programmed necrosis. *Nature* **492**, 199-204(2012).
58 Remijsen, Q. *et al.* Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *Cell. Death. Dis.* **5**, e1004(2014).
59 Scheffer, S. R. *et al.* Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int. J. Cancer.* **103**, 205-211(2003).
60 Bartholomae, W. C. *et al.* T cell immunity induced by live, necrotic, and apoptotic tumor cells. *J. Immunol.* **173**, 1012-1022(2004).
61 Goldszmid, R. S. *et al.* Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J. Immunol.* **171**, 5940-5947(2003).
62 Yoon, T. J. *et al.* Anti-tumor immunostimulatory effect of heat-killed tumor cells. *Exp. Mol. Med.* **40**, 130-144(2008).
63 Bernard, J. J. *et al.* Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat. Med.* **18**, 1286-1290(2012).

64 Azuma, M., Ebihara, T., Oshiumi, H., Matsumoto, M. & Seya, T. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + poly I:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8alpha(+) dendritic cells. *Oncoimmunology* **1**, 581-592(2012).

65 Akazawa, T. *et al.* Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 252-257(2007).

66 McCartney, S. *et al.* Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. *J. Exp. Med.* **206**, 2967-2976(2009).

67 Goto, Y. *et al.* Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. *Mol. Cancer. Ther.* **7**, 3642-3653(2008).

68 Jiang, Q., Wei, H. & Tian, Z. Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC. Cancer.* **8**, 12(2008).

69 Huang, B. *et al.* Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer. Res.* **65**, 5009-5014(2005).

70 Morikawa, T. *et al.* Identification of Toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer. Res.* **13**, 5703-5709(2007).

71 Salaun, B., Lebecque, S., Matikainen, S., Rimoldi, D. & Romero, P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin. Cancer. Res.* **13**, 4565-4574(2007).

72 Mocarski, E. S., Upton, J. W. & Kaiser, W. J. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 79-88(2012).