



Title	RAW264.7細胞におけるcalcitriol の影響に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	笠井, 満知子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15934号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/92483">https://hdl.handle.net/2115/92483</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Machiko_Kasai_abstract.pdf, 論文内容の要旨



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (歯学) 氏名 笠井満知子

## 学位論文題名

RAW264.7 細胞における calcitriol の影響に関する研究

キーワード RAW264.7 細胞, calcitriol, ビタミン D, 細胞死, アポトーシス

ビタミン D は体内で骨やミネラル代謝、細胞分化、免疫の調節に影響を与えることが知られており、さらに疫学的データによりビタミン D ががんの発生率や死亡率にも関与している可能性が示唆されている。また活性型ビタミン D である calcitriol はがん細胞において分化や抗増殖作用、アポトーシスを誘導することが分かっており、これは calcitriol ががん細胞の悪性化に対して抑制的に作用することを示している。しかし反対に calcitriol ががん細胞において細胞死を抑制する作用があることも報告されており、細胞によって calcitriol による影響は様々であると考えられる。またマウス白血病単球由来マクロファージ様細胞 (RAW264.7 細胞) における calcitriol の影響は明らかになっていない。本研究は RAW264.7 細胞における calcitriol 刺激の影響および細胞死の経路を明らかにし、ビタミン D ががん治療に適用される一助となることを目的とした。

RAW264.7 細胞を calcitriol で刺激し、位相差顕微鏡での観察、乳酸脱水素酵素 (LDH) 測定および Annexin V-FITC/PI 染色により細胞死の測定を行った。また Western blot 法にてアポトーシス関連タンパク質である caspase 8 および cleaved caspase 3 の発現レベルを測定した。さらに ELISA による calcitriol 刺激した細胞培養上清中の IL-1 $\beta$  の測定や、汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK またはネクロプトーシス阻害剤である Necrostatin-1 処理後に calcitriol 刺激を行うことで細胞死の経路を検討した。

calcitriol (10  $\mu$  M) で 3 時間刺激すると RAW264.7 細胞の形態が変化することが位相差顕微鏡によって観察された。また calcitriol 刺激により濃度依存的、時間依存的に細胞培養上清中の LDH が増加した。さらに Annexin V-FITC/PI 染色では calcitriol 刺激によりコントロールと比較して Annexin V および PI で染色される細胞が増加した。これらのことから calcitriol が RAW264.7 細胞に細胞死を引き起こすことが明らかとなった。また calcitriol 刺激により RAW264.7 細胞の caspase 8 が減少し、cleaved caspase 3 が増加した。さらに calcitriol によるこれらの変化は Z-VAD-FMK の前処理により抑制されたため、calcitriol による細胞死はカスパーゼ依存的な経路の関与が示唆された。アポトーシスには外因性経路と内因性経路があり、cleaved caspase 3 はその両方の経路で活性化されるが caspase 8 は

外因性経路のみで活性化される。今回 caspase 8 の発現も変化したことから calcitriol による RAW264.7 細胞の細胞死にはアポトーシスの外因性経路が関与していることが示唆された。また caspase 8 は内因性経路にも関与していることが知られており、calcitriol がほかのがん細胞におけるアポトーシスの内因性経路を活性化することも明らかにされていることから、RAW264.7 細胞でも calcitriol によるアポトーシスに内因性経路が関与している可能性がある。

Annexin V-FITC/PI 染色のフローサイトメトリーにおいて calcitriol による Annexin V および PI で染色される細胞の増加は Z-VAD-FMK による前処理では完全には抑制されなかったこと、また calcitriol 刺激で Annexin V のみで染色される細胞だけでなく Annexin V ならびに PI で染色される細胞も増加することから、アポトーシス以外の細胞死が起こっている可能性が示唆された。アポトーシス以外の細胞死の経路として、パイロトーシスとネクロプトーシスが考えられた。パイロトーシスとネクロプトーシスはともに制御された溶解型の細胞死である。パイロトーシスは炎症に関連するインフラマソームの活性化を介在し、IL-1 $\beta$  放出を伴う細胞死として知られている。またネクロプトーシスは細胞受容体が活性化された後 receptor-interacting serine-threonine kinase 1(RIPK1)、RIPK 3、mixed lineage kinase domain-like protein が関与して起こる細胞死として知られている。ELISA では calcitriol (10  $\mu$ M) による 12 時間刺激後の細胞培養上清からは IL-1 $\beta$  は検出されなかったため calcitriol 刺激により RAW264.7 細胞がパイロトーシスを起こしている可能性は低いことが示唆された。また RIPK1 活性阻害剤である Necrostatin-1 の前処理では calcitriol 刺激による細胞培養上清中の LDH の増加が抑制されなかったことから RAW264.7 細胞が calcitriol 刺激により RIPK1 が関与するネクロプトーシスを起こしている可能性も低いことが示唆された。

本研究では calcitriol の刺激が RAW264.7 細胞のアポトーシスを誘導することを示した。calcitriol による RAW264.7 細胞の細胞死経路の一部を明らかにしたことはビタミン D を抗がん剤として適用するための一助となる可能性がある。