



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	https://hdl.handle.net/2115/92483
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Machiko_Kasai_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 笠井満知子

審査担当者 主査 教授 長谷部 晃
副査 特任教授 田村 正人
副査 教授 飯村 忠浩
副査 教授 佐藤 嘉晃

学位論文題名

RAW264.7細胞における calcitriol の影響に関する研究

審査は、主査、副査を含めてWeb形式の公聴会として行われ、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。その後審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。

以下に論文内容と審査の要旨を述べる。

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（1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ : 1,25-dihydroxyvitamin D₃）は Calcitriol として骨粗鬆症の治療に応用されている。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 刺激で細胞死が誘導されないことや、Calcitriol ががん細胞に対し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。そこで本研究では、マクロファージをマウス白血病ウイルスで不死化した細胞である 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 β 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 μ 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 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 による細胞死の一部にはカスパーゼ依存的な経路の関与が示唆された。また Caspase-8 の発現が変化したことから 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。ELISA では Calcitriol による 12 時間刺激後の細胞培養上清からは IL-1 β は検出されなかったため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。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 RIPK1 依存的なネクロ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 によるマクロファージ系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。

上記の論文内容及び関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

1. アポトーシス以外の細胞死が起こっている場合、パイロトーシスとネクロトーシスが否定されたとすると、ほかにはどのようなことが起こっていると説明されるか。
2. カスパーゼ阻害剤で完全に初期アポトーシスがなくならなかったのはなぜか。
3. ヒトの血中の Calcitriol 濃度に対して今回実験で用いた濃度はどれくらいの濃度になるか。
4. 一般的にはビタミン D はビタミン D レセプターを介して作用するが、今回の外因性経路のアポトーシスはビタミン D レセプターを介していない反応が起こっているということではどうか。またこの細胞において細胞死以外でビタミン D レセプターを介した反応がおこっていると考えられるか。
5. 外因性と内因性のアポトーシスはどちらが主に起こっていると考えられるか。また今後それを明らかにするにはどうしたらよいか。
6. 今回は Calcitriol を用いているが、他の部分が水酸化したビタミン D を用いたらどうなると考えられるか。
7. がんの治療としてビタミン D を実際に用いるとするとどのように用いるか。
8. 細胞によって Calcitriol に対する反応が違うのはなぜか。
9. RAW264.7 細胞の樹立法について。
10. 老化に伴って血中ビタミン D レベルは減少するが、老化と白血病発症の関連はあるか。

これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答および説明が得られ、研究の立案と遂行ならびに結果の収集とその評価について、申請者が十分な能力を有していることを確認した。本研究業績は、Calcitriol による単球・マクロファージ系がん細胞の細胞死誘導メカニズムの一部を明らかにしたものであり、今後のビタミン D の抗がん剤への応用に非常に貢献することが期待された。したがって審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに相応しいと認めた。