

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 竹村 龍

学位論文題名

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
(PolyI:C-induced necroptosis is TLR3/RIP3-dependent in mouse tumor cell lines)

【背景と目的】

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。近年の細胞死に関する研究により、死細胞から放出される内容物が腫瘍周囲の免疫径や腫瘍の環境を調節する事が明らかとなった。また、近年になり、アポトーシスはプログラムされた細胞死の一部であり、非アポトーシス型のプログラムされた細胞死の存在が明らかとなってきた。

カスパーゼ非依存性細胞死の一つであるネクロプトーシスは、tumor necrosis factor (TNF) による非カスパーゼ性の細胞死として最初に報告され、Receptor interacting protein kinase (RIP) 依存性の細胞死である事が判明した。TNF 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、Toll-like receptor (TLR) 3 のリガンドもその一つである。TLR3 のリガンドは、ウイルスや自己由来の 2 本鎖 RNA やステム構造を含む RNA であり、腫瘍細胞そのものや腫瘍微小環境に影響し腫瘍免疫に関与していると考えられる。

合成 2 本鎖 RNA の polyI:C は、ナチュラルキラー (NK) 細胞や細胞障害性 T 細胞 (CTL) を介した抗腫瘍作用を有する事が報告されている。また、polyI:C はマウスマクロファージ細胞などにおいてネクロプトーシスを誘導する事が知られているが、TLR3 を介した腫瘍細胞へ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。そこで、本研究では腫瘍細胞におけるネクロプトーシス誘導機構を解析した。

【材料と方法】

PolyI:C と汎カスパーゼ阻害剤である zVAD により細胞死が誘導されるマウス腫瘍細胞株を検索するため、polyI:C/zVAD 処理後の細胞生存率を WST-1 アッセイにより測定した。細胞死が誘導された腫瘍細胞株を光学顕微鏡による形態観察、PI/Annexin-V 染色などを用いたフローサイトメトリー、蛍光顕微鏡による解析と、RIP1 選択阻害剤である necrostatin-1 (nec-1) により細胞死が阻害されるかどうか検討し、ネクロプトーシスが誘導されているかについて検討した。更に、ネクロプトーシス誘導経路を同定するため、polyI:C により活性化するシグナル伝達経路上の分子である、TLR3、TICAM-1、MAVS、および、ネクロプトーシス誘導に重要と報告されている RIP3 について siRNA を用いてノックダウンし、polyI:C 刺激によるネクロプトーシス誘導への影響を検討した。また、活性酸素種の関与についてフローサイトメトリーや活性酸素種のスカベンジャーである BHA を用いて解析した。次に、CT26 細胞と、ネクロプトーシスが誘導されない腫瘍細胞である B16D8 (マウスメラノーマ) 細胞を用いて、免疫沈降法により TICAM-1 および RIP3 の相互作用について解析した。その後、polyI:C と zVAD 処理後生存する CT26 細胞を選択的に培養することで、

ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞を樹立した。CT26 細胞、ネクロプトーシスが誘導されると報告されている L929 細胞 (マウス線維芽細胞)、ネクロプトーシスが誘導されない複数の腫瘍細胞、ネクロプトーシス抵抗性 CT26 細胞を用いてネクロプトーシスが誘導される細胞とされない細胞との比較を行い、定量 PCR 法を用いてネクロプトーシス誘導を制御する因子の探索を行った。同時にネクロプトーシスが誘導された細胞をマウスに移植し、生体内での polyI:C と zVAD による抗腫瘍効果を polyI:C 単独投与、NK 細胞や CTL に対する阻害抗体を用いた手法で検討した。

【結果】

マウス大腸癌細胞株である CT26 細胞は polyI:C と zVAD による生存細胞数の減少を認めた。光学顕微鏡による解析では、ネクロプトーシス細胞で見られる細胞の肥大化があり、PI/AnnexinV 染色をフローサイトメトリーで解析すると、ネクロトーシス細胞が占める二重陽性細胞が増加していた。同様に PI 染色を蛍光顕微鏡で観察した結果、polyI:C と zVAD により PI 陽性細胞が増加していた。また、Nec-1 は polyI:C と zVAD により誘導する細胞死を阻害した。CT26 細胞において、TLR3、TICAM-1、RIP3 のノックダウンによりネクロプトーシスが阻害されたが、MAVS のノックダウンは細胞死に影響を与えなかった。PolyI:C と zVAD により活性酸素種が産生され、nec-1 投与で産生が阻害された。さらに、BHA はネクロプトーシス誘導を阻害した。免疫沈降実験により、CT26 細胞において zVAD 存在下での polyI:C 処理により、RIP3 と RIP1、RIP3 と TICAM-1 の結合が増強される事が明らかとなった。この結合は B16D8 細胞では RIP3 を過剰発現しても誘導されなかった。更に、ネクロプトーシスが誘導される細胞とされない細胞の比較をした結果、CT26 細胞と L929 細胞は *Ripk3* の発現が高い事が判明した。CT26 細胞担癌マウスに対して polyI:C を投与すると抗腫瘍効果を認め、NK 細胞/CTL 阻害抗体により抗腫瘍効果は消失した。一方、PolyI:C 腹腔内投与と zVAD 腫瘍周囲皮下投与は、NK 細胞/CTL 阻害抗体使用下でも抗腫瘍効果を認めたが、polyI:C を腫瘍周囲皮下投与にすると zVAD との併用による抗腫瘍効果は認められなかった。

【考察】

CT26 細胞において、polyI:C と zVAD により TLR3-TICAM-1-RIP3 依存性のネクロプトーシスが誘導される。このとき、RIP3 の下流で活性酸素種が産生され、ネクロプトーシスが誘導されると考えられた。CT26 細胞においてネクロプトーシスが誘導された要因の一つは *Ripk3* の発現が高い事であるが、何らかの他の要因も加わりネクロプトーシス感受性が決まるものと考えられた。PolyI:C は CT26 細胞担癌マウスに NK 細胞/CTL 依存性の抗腫瘍効果を誘導する。PolyI:C 腹腔内投与と zVAD 腫瘍周囲皮下投与は NK 細胞/CTL 非依存性の抗腫瘍効果を CT26 細胞に誘導しており、生体内でも直接の抗腫瘍効果を示した。

【結論】

カスパーゼ活性を阻害した環境での polyI:C 投与はマウス大腸癌細胞株 (CT26 細胞) に TLR3-TICAM-1-RIP3 経路でネクロプトーシスを誘導し、その実行には活性酸素種が関与している。生体内においても、PolyI:C と zVAD は CT26 細胞に抗腫瘍効果を示す。PolyI:C は抗がん作用、抗がんワクチンとして免疫細胞を介した作用だけでなく、直接腫瘍細胞を障害する作用が考えられ、更なる分子メカニズムの解明が求められる。