

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Oxaliplatin処理により細胞表面に二相性で増加するcalreticulinの貪食における意義
作成者（著者）	松坂, 憲樹
公開者	東邦大学
発行日	2022.07.06
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 檜貝 孝慈 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲1045号
学位記番号	甲第134号
学位授与年月日	2022.07.06
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28203713

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

Oxaliplatin 処理により細胞表面に二相性で 増加する calreticulin の貪食における意義

分子病態解析学講座

松坂 憲樹



【序論】

生体内で不要となった細胞や機能異常を起こした細胞は、免疫系をはじめとする様々な要因で除去される。発生や分化における形態と機能の獲得では、不要となった細胞はアポトーシスと呼ばれるプログラムされた細胞死を起こし、マクロファージなどの貪食細胞によって速やかに貪食除去される。また、樹状細胞などによる病原体に感染した細胞の貪食は、病原体の直接除去のみならず、病原体に特異的な抗原の提示を介した免疫系の活性化を誘導することから、貪食機構は生体の恒常性の維持や感染防御などに寄与する重要な機構である。被貪食細胞では“eat me” signal と呼ばれる分子群が細胞表面に増加する。マクロファージや樹状細胞 (DC) などの貪食細胞はレセプターを介して、被貪食細胞表面に発現している“eat me” signal を認識して細胞を貪食することから、“eat me” signal は貪食における重要な働きを担っている。

Calreticulin (CRT) は正常時ではほとんどが小胞体に局在し、小胞体内のカルシウムの維持やシャペロンタンパク質としてタンパク質の折りたたみに寄与している。一方で、抗がん剤などにより小胞体ストレスやアポトーシスを誘発されると CRT が小胞体から細胞表面へと移行し、“eat me” signal として機能することが明らかになっている。

本研究では、白金製剤 oxaliplatin (L-OHP) で処理したヒト大腸がん細胞株 HT-29 細胞における細胞表面 CRT の経時変化を解析したところ、細胞表面 CRT が前期と後期の二相性での増加を示した。さらに、それぞれの増加に対する小胞体ストレスやアポトーシスの関連を解析したところ、前期の増加には小胞体ストレス、後期の増加にはアポトーシスが関与することが示された。異なる機序により増加したそれぞれの細胞表面 CRT は貪食に対する意義も異なることが考えられた。そこで、ヒト単球由来白血病細胞株 THP-1 細胞から分化させた DC 様細胞とマクロファージ様細胞を貪食細胞として用いて、L-OHP 処理 HT-29 細胞に対する貪食反応を解析し、各期で増加する CRT の貪食に対する意義について検討した。

【結果・考察】

1. L-OHP 処理した HT-29 細胞における細胞表面 CRT の変化

L-OHP で 0~48 時間処理した HT-29 細胞の細胞表面 CRT をフローサイトメトリーで解析したところ、細胞表面 CRT が L-OHP 処理後 4 時間をピークとした前期と、24 時間以降の後期の二相性で増加することが示された (図 1)。これらの細胞表面 CRT 増加に対

する小胞体ストレスやアポトーシスの関与を解析したところ、アポトーシスの活性化因子である caspase-3 の阻害により L-OHP 48 時間処理 HT-29 細胞における細胞表面 CRT の増加が抑制されたが、L-OHP 4 時間処理 HT-29 細胞における細胞表面 CRT の増加は影響を受けなかった。一方で、小胞体ストレスの関連因子である caspase-12 の阻害により L-OHP 4 時間処理 HT-29 細胞における細胞表面 CRT の増加が抑制された (図 2)。これらのことから L-OHP 処理 HT-29 細胞では細胞表面 CRT が二相性で増加し、前期での増加には小胞体ストレス、後期での増加にはアポトーシスが関連していることが示唆された。

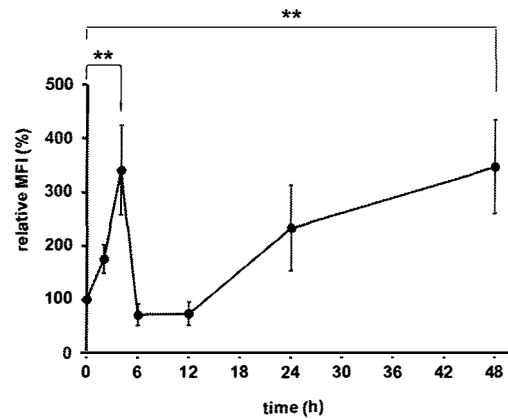


図 1. L-OHP 処理 HT-29 細胞における細胞表面 CRT の経時変化

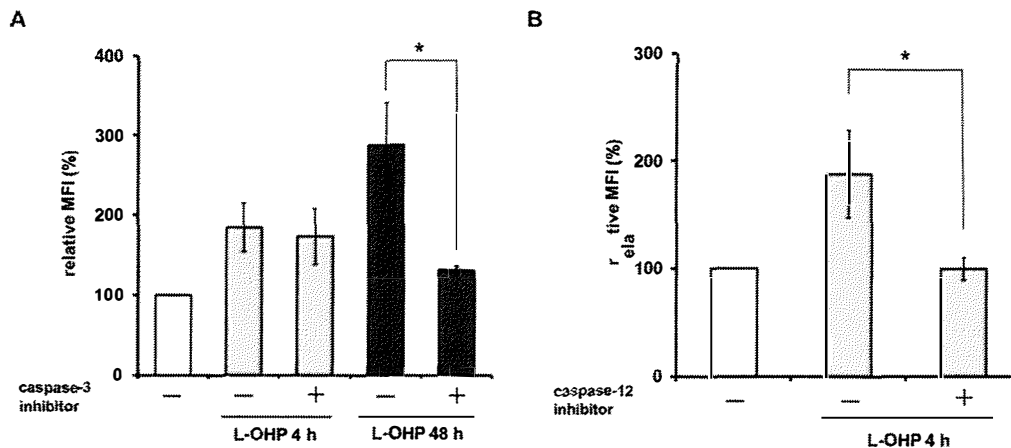


図 2. L-OHP 処理 HT-29 細胞の細胞表面 CRT 増加に対する (A) caspase-3、(B) caspase-12 阻害剤の影響

2. THP-1 細胞のマクロファージ様細胞と DC 様細胞への分化誘導

ヒト単球由来白血病細胞株の THP-1 細胞は phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激によりマクロファージ様細胞に、IL-4 と GM-CSF 刺激により未成熟 DC 様細胞に、IL-4 と GM-CSF、TNF- α 刺激により成熟 DC 様細胞に分化することが示されている。そこで、食食実験に用いる食食細胞を調製するために、PMA で 2 日間、あるいは IL-4 と GM-CSF で 5 日間、IL-4、GM-CSF で 5 日間さらに IL-4、GM-CSF、TNF- α で 2 日間刺激した各 THP-1 細胞を回収し、マクロファージ様細胞および DC 様細胞への分化を確認するため、マクロファージの細胞表面マーカーである CD11b、CD11c、CD14 および DC の細胞表面マーカーである CD80 と CD86 をフローサイトメトリーにより解析した。

その結果、未処理の THP-1 細胞と比較して PMA で刺激した THP-1 細胞では、CD11b、CD11c、CD14 が増加し、CD80 と CD86 は変化が認められなかった。IL-4 と GM-CSF で刺激した THP-1 細胞では CD80、CD86 が増加し、CD14 は減少した。これらの細胞表面抗原の変化は、IL-4、GM-CSF、TNF- α で刺激した THP-1 細胞においてさらに強調された (図 3)。各 CD 抗原量の変化から、THP-1 細胞は PMA 刺激によりマクロファージ様細胞に、IL-4 と GM-CSF 刺激により未成熟 DC 様細胞に、IL-4、GM-CSF、TNF- α 刺激により成熟 DC 様細胞に分化したことが確認された。

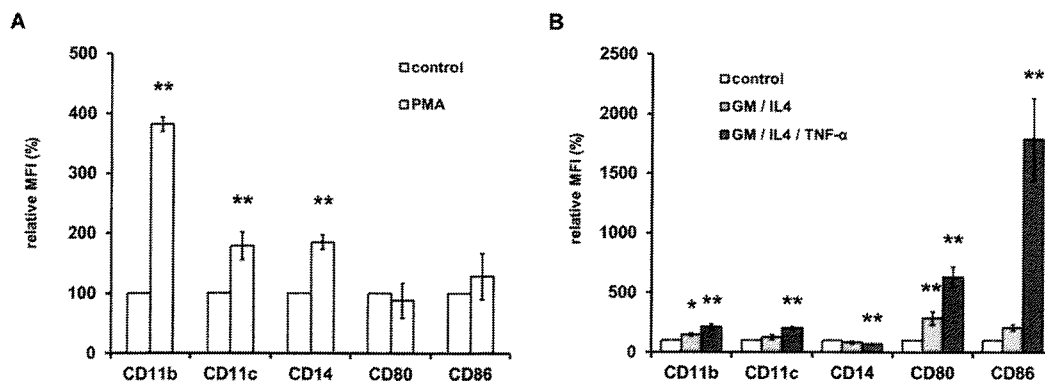


図 3. (A)PMA あるいは(B)サイトカイン刺激した THP-1 細胞における細胞表面 CD 抗原の発現

3. L-OHP 処理した HT-29 細胞のマクロファージ様細胞と DC 様細胞による貪食

マクロファージ様細胞と DC 様細胞を用いて L-OHP 処理 HT-29 細胞の貪食を解析したところ、L-OHP 4 時間処理の HT-29 細胞に対する未成熟 DC 様細胞の貪食率が高かったが、マクロファージ様細胞では差が示されなかった。一方で、L-OHP 48 時間処理の HT-29 細胞に対するマクロファージ様細胞の貪食率が高かったが、未成熟 DC 様細胞では差が示されなかったことから、貪食細胞によって貪食の標的が異なることが示された (図 4)。

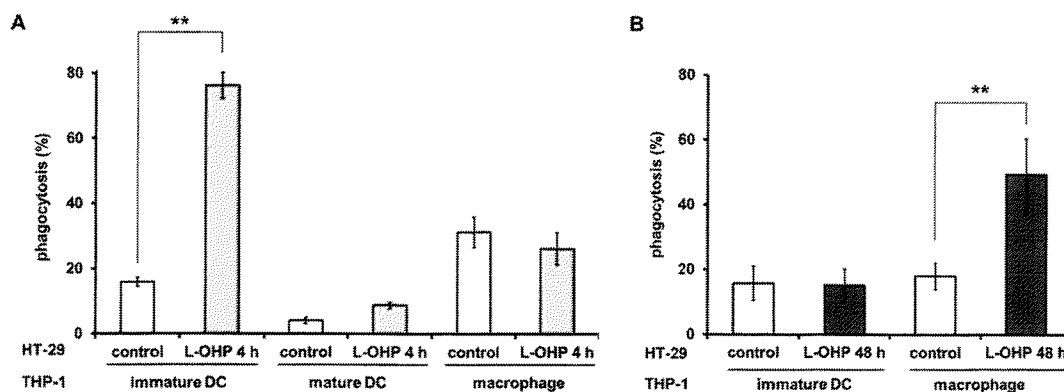


図 4. L-OHP(A)4 時間、(B)48 時間処理した HT-29 細胞の DC 様細胞とマクロファージ様細胞による貪食

これらの貪食に対する細胞表面 CRT の関与を検討するために、CRT の配列の一部で構成される CRT Blocking Peptide による貪食への影響を解析したところ、ともに CRT Blocking Peptide により阻害されたことから、細胞表面 CRT が関与する貪食であることが強く示唆された (図 5)。しかし、未成熟 DC 様細胞による L-OHP 4 時間処理の HT-29 細胞の貪食が大きく阻害された一方で、マクロファージ様細胞による L-OHP 48 時間処理の HT-29 細胞の貪食は部分的にしか阻害されなかった。L-OHP 48 時間処理の HT-29 細胞ではアポトーシスにより、別の “eat me” signal である細胞表面 phosphatidylserine (PS) が増加していた。そこで、PS リポソームによる貪食への影響を解析したところ、貪食が PS リポソームにより阻害されたことから、マクロファージによる貪食は細胞表面 PS も関与していることが示唆された。

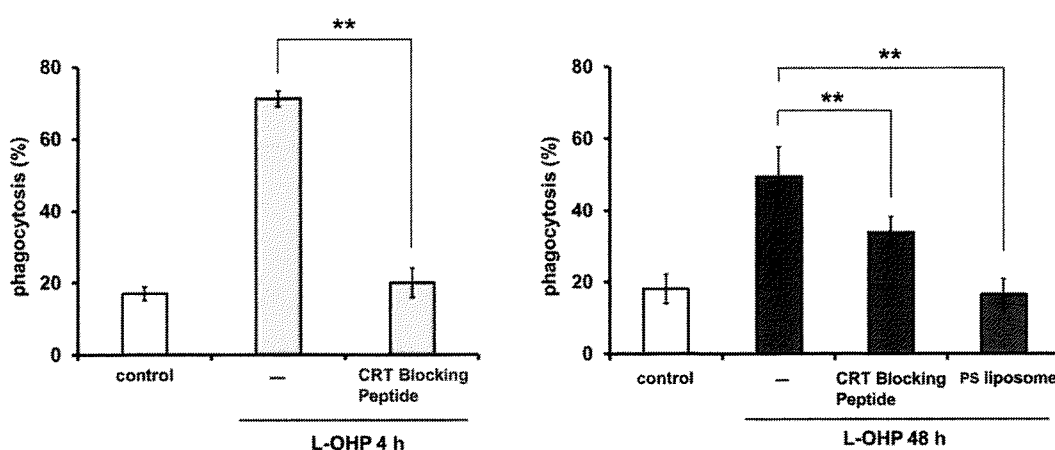


図 5. CRT Blocking Peptide あるいは PS リポソームによる貪食への影響

【総括】

本研究の結果から、小胞体ストレスと関連して前期で増加した細胞表面 CRT は未成熟 DC 様細胞の貪食に大きく寄与し、アポトーシスと関連して後期で増加した細胞表面 CRT はマクロファージ様細胞による貪食に寄与することが示された。さらに、細胞表面 CRT を介した DC の貪食は T 細胞への抗原提示を通じて免疫系の活性化に寄与することから、前期で増加した細胞表面 CRT は DC による抗原提示のための “eat me” signal としての意義があると考えられた。一方で、後期で増加した細胞表面 CRT はマクロファージによる死細胞の貪食除去のための “eat me” signal としての意義があると考えられた。これらの細胞表面 CRT を介した貪食のメカニズムや機能を解明することで、抗腫瘍免疫応答の誘導やアポトーシス腫瘍細胞の除去促進によるがん治療への応用が期待される。

【対象論文】

Kenju Matsusaka, Yutaro Azuma, Yuki Kaga, Saeka Uchida, Yuri Takebayashi, Takashi Tsuyama, Shusuke Tada. Distinct roles in phagocytosis of the early and late increases of cell surface calreticulin induced by oxaliplatin. *Biochemistry and Biophysics Reports*, Volume 29, 101222, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101222>.

学位論文審査報告書

報告書記載:2022 年 6月 8日

学位申請者名	松坂 憲樹
論文題目	Oxaliplatin処理により細胞表面に二相性で増加する calreticulinの貪食における意義
審査委員名	主査 檜貝 孝慈 副査 根本 清光 副査 山本 千夏

学位論文の審査結果の要旨：

本論文は、小胞体中存在するシャペロンタンパク質であるcalreticulin (CRT) に着目し、その細胞表面への露出の意義を、免疫学的観点より解析することを目的とした基礎的検討について記述されたものである。第一章では、oxaliplatin (L-OHP) 処理したヒト大腸がん細胞株HT-29細胞における細胞表面CRTの経時的発現の検討を行い、L-OHP処理4時間後をピークとする一過性の増加と24時間以降での持続的な増加を見出している。それらの二相性の増加は、前期では小胞体ストレスに起因する可能性が高いこと、後期はアポトーシスに起因することを関連分子およびその阻害剤を用いた検討より明らかにした。第二章では、CRT発現増加細胞の被貪食性を評価するために、ヒト単球系細胞株THP-1細胞から貪食能を持つマクロファージ様細胞および樹状細胞様細胞への分化誘導について、細胞表面抗原を指標に評価・検討を行い、マクロファージ様細胞、未成熟/成熟樹状細胞様細胞への *in vitro* での分化誘導条件を樹立した。第三章では、第一章で見出されたCRT発現増加細胞に対するマクロファージ様細胞および樹状細胞様細胞による貪食を比較・検討し、小胞体ストレスに起因する4時間後のCRT増加細胞は、未成熟樹状細胞により効率的に貪食され、アポトーシスに起因する24時間後のCRT増加細胞は主としてマクロファージ様細胞に貪食されることを見出した。本研究は、抗がん剤を取り込んだがん細胞は、細胞上CRTの発現量、発現機序や発現様式の違いによって異なった細胞種に貪食され、その結果、抗腫瘍免疫における樹状細胞による抗原提示やマクロファージによる組織からの異物除去が行われることを示唆する重要な知見を含んでおり、がんに対する細胞障害に加え獲得免疫の誘導を指向した抗がん剤や治療法の開発など社会的貢献が期待される。

本論文は、異なる機序で増加したCRTの生体内および免疫学的な意義の一部を明らかにした研究成果を著しており、腫瘍免疫応答を基盤とした創薬や治療法の開発に大きく貢献するものである。本論文の学術的意義、研究の妥当性、倫理的配慮、論文の体系はいずれも基準を満たしていると評価した。審査委員との論文審査に際して、背景や方法、結果について、わかり易く的確に説明され、審査委員による指摘に対しても真摯に対応した点は、学術的な知識や論理的な思考を含め審査委員全員が評価している。

松坂 憲樹氏の研究成果は、抗がん剤の開発や治療において、新たな知見を与えるものと考えられる。学位論文に掲載されている研究成果は、学位論文申請者を筆頭著者とした英文原著論文として公表されている。以上より、本論文審査は、博士（薬学）の学位取得に値する論文と評価する。