

博 士 学 位 論 文

東 邦 大 学

博士論文

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

東邦大学大学院薬学研究科 博士課程

松坂 憲樹

博士論文

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

東邦大学大学院薬学研究科 博士課程

松坂 憲樹

指導

(分子病態解析学) 多田 周右 教授

目次

序論	1
本論	
第1章 oxaliplatin 処理 HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の変化	4
第1節 細胞株および試薬	
1-1-1 細胞株	6
1-1-2 試薬	6
第2節 実験方法	
1-2-1 細胞培養	7
1-2-2 細胞表面 calreticulin と calnexin の定量	7
1-2-3 ウェスタンブロット用試料の調製	8
1-2-4 タンパク質濃度の定量 (Bradford 色素結合法)	9
1-2-5 リン酸化 eIF2 α の解析	9
1-2-6 統計解析	10
第3節 結果	
1-3-1 細胞表面 calreticulin の経時変化	10
1-3-2 細胞表面 calnexin の経時変化	13
1-3-3 caspase-3 阻害剤の影響	14
1-3-4 リン酸化 eIF2 α の解析	16
1-3-5 caspase-12 阻害剤の影響	18
第4節 考察	20
第2章 THP-1 細胞の分化誘導	25
第1節 細胞株および試薬	
2-1-1 細胞株	26
2-1-2 試薬	27
第2節 実験方法	
2-2-1 細胞培養	27
2-2-2 マクロファージ様細胞への分化誘導	27
2-2-3 樹状細胞様細胞への分化誘導	28
2-2-4 細胞表面抗原の解析	28
2-2-5 統計解析	29
第3節 結果	
2-3-1 THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導	29

2-3-2	THP-1 細胞の樹状細胞様細胞への分化誘導	32
第4節	考察	34
第3章	マクロファージ様細胞と樹状細胞様細胞による HT-29 細胞の貪食	37
第1節	細胞株および試薬	
3-1-1	細胞株	38
3-1-2	試薬	38
第2節	実験方法	
3-2-1	細胞培養	38
3-2-2	THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導	39
3-2-3	THP-1 細胞の樹状細胞様細胞への分化誘導	39
3-2-4	HT-29 細胞に対する oxaliplatin 処理	39
3-2-5	細胞表面 phosphatidylserine の定量	40
3-2-6	細胞表面 calreticulin の定量	40
3-2-7	PS リポソームの調製	41
3-2-8	PKH26 による HT-29 細胞の蛍光標識	41
3-2-9	貪食反応の解析	41
3-2-10	統計解析	42
第3節	結果	
3-3-1	oxaliplatin 4 時間処理後の HT-29 細胞に対する貪食作用	42
3-3-2	oxaliplatin 48 時間処理後の HT-29 細胞に対する貪食作用	44
3-3-3	oxaliplatin 処理した HT-29 細胞の細胞表面 phosphatidylserine の解析	46
3-3-4	Calreticulin Blocking Peptide あるいは PS リポソームの貪食作用に対する影響	47
第4節	考察	51
総括		57
参考文献		63
関連論文目録		67
謝辞		68

Abbreviations

7-AAD: 7-amino-actinomycin D
Ac-DEVD-CHO: acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde
ATF-6: activating transcription factor-6
BiP: binding immunoglobulin protein
BPB: bromophenol blue
BSA: bovine serum albumin
C1q: complement component 1q
CRT: calreticulin
DC: dendritic cell
DMSO: dimethyl sulfoxide
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
eIF2 α : alpha-subunit of eukaryotic initiation factor 2
ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation
ERp57: endoplasmic reticulum stress protein 57
FBS: fetal bovine serum
FITC: fluorescein isothiocyanate
Glc: glucose
GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMGB1: high mobility group box 1
HRP: horseradish peroxidase
ICD: immunogenic cell death
IL: interleukin
IP3: inositol 1,4,5-trisphosphate
IRE-1: inositol requiring protein-1
L-OHP: oxaliplatin
LRP-1: low-density lipoprotein receptor related protein 1
Man: mannose
MFI: mean fluorescence intensity
NAc: *N*-acetylglucosamine
PBS: phosphate buffered saline
PC: phosphatidylcholine
PERK: protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate

PS: phosphatidylserine

PVDF: polyvinylidene difluoride

SERCA: sarcoplasmic / endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase

SNAP-23: synaptosomal associated protein 23

SR-A: scavenger receptor class-A

SREC-I: scavenger receptor expressed by endothelial cell-I

TBS: tris buffered saline

TNF- α : tumor necrosis factor- α

URP: unfolded protein response

VAMP-1: vesicle-associated membrane protein 1

Z-ATAD-FMK: benzyloxycarbonyl-Ala-Thr-Ala-Asp-fluoromethyl ketone

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^{1,2)}。また、樹状細胞などによる病原体あるいは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て免疫系のさらなる活性化を誘導することから³⁾、貪食機構は恒常性の維持や感染防御などに寄与する生体にとって重要な機構である。

細胞の貪食機構は貪食を促進する“eat me” signal と貪食を抑制する“don't eat me” signal と呼ばれる分子群によって制御されていると考えられている⁴⁾。被貪食細胞では細胞表面および細胞内のタンパク質に量的あるいは局在的な変化が起きている。この変化の一つとして“eat me” signal が細胞表面に増加する。マクロファージや樹状細胞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 を認識し細胞を貪食することから²⁾、“eat me” signal は貪食における重要な働きを担っていると考えられる。

calreticulin は正常な細胞では主に小胞体内に存在し、カルシウム結合タンパク質として小胞体内カルシウムの恒常性の維持に寄与すること、シャペロンタンパク質としてタンパク質のフォールディングに関与することが知られている^{5, 6)}。また、わずかに細胞表面にも存在し、細胞の接着や遊走などに関与している^{5, 6)}。近年、抗がん剤によりアポトーシスを誘発したがん細胞では、calreticulin が小胞体から細胞表面へと移行し、増加した細胞表面 calreticulin は“eat me”

signal として機能することが報告された⁷⁾。また、anthracycline 系抗がん剤の mitoxantrone や白金製剤の oxaliplatin などの特定の抗がん剤で処理をしたがん細胞では、細胞表面 calreticulin の増加がアポトーシスによる細胞膜上への phosphatidylserine の露出に先行して起こり⁸⁾、このようなアポトーシスに至る直前の細胞（プレアポトーシス細胞）における細胞表面 calreticulin の増加には小胞体ストレスが関与していることが報告されている^{9,10)}。

さらに、mitoxantrone や oxaliplatin などの特定の抗がん剤などで処理したがん細胞が、通常のアポトーシスと比べて抗腫瘍免疫応答を惹起しやすい細胞死である免疫原性細胞死（immunogenic cell death: ICD）を起こすことが見いだされた。この ICD における主要な特徴として、ATP の細胞外放出、high mobility group box 1（HMGB1）タンパク質の細胞外放出に加えて、細胞表面 calreticulin の増加が知られている¹¹⁾。ICD において増加する細胞表面 calreticulin は、がん細胞上の“eat me” signal として抗原提示細胞による貪食を促進することにより、貪食後にリンパ節へ移行した抗原提示細胞によるがん細胞特異的抗原の提示を介した腫瘍免疫応答の活性化に寄与しており¹²⁾、細胞表面 calreticulin によるがん細胞の貪食を介したがん免疫療法の開発が期待されている。

これまでの当教室の研究により、mitoxantrone で処理をしたヒト大腸がん細胞株 HT-29 細胞では、細胞表面 calreticulin が mitoxantrone 処理 4 時間後の一過性の増加と mitoxantrone 処理 24 時間後以降での持続性の増加の二相性で増加することが見いだされた。さらに、前期での一過性の増加には小胞体ストレス、後期での持続性の増加にはアポトーシスが関与していることが示された¹³⁾。細胞表面 calreticulin が、前期と後期では異なる機序によって増加することから、それぞれの細胞表面 calreticulin には生理的な役割にも違いがあると予想さ

れたが、これらの細胞表面 calreticulin の貪食における実際の意義や役割については、これまでの解析方法では知見を得られなかった。

そこで本研究では、大腸がん由来の培養細胞において細胞表面 calreticulin の増加を誘導することが報告されている¹⁴⁾ oxaliplatin で処理した HT-29 細胞に対する、ヒト単球由来白血病細胞株 THP-1 細胞から分化誘導したマクロファージ様細胞あるいは樹状細胞様細胞による貪食反応を解析することとした。

本論文の第一章では、大腸がん細胞株 HT-29 細胞における oxaliplatin による細胞表面 calreticulin の増加とその増加に関与する因子についての検討結果を示した。第二章では、THP-1 細胞から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評価した。第三章では、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞とマクロファージ様細胞および樹状細胞様細胞を用いた貪食反応を解析し、この結果より細胞表面 calreticulin の貪食における意義について考察した。

本論

第1章 oxaliplatin 処理 HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の変化

細胞には多くの細胞内小器官が存在し、各細胞内小器官は多様な機能を担っている。その中で小胞体はタンパク質の合成とフォールディング、糖鎖修飾、品質管理や脂質の合成を行っており、細胞機能の維持に重要な役割を果たしていることが知られている。小胞体には新規に合成されたタンパク質のフォールディングに必要な多くのシャペロンタンパク質が存在し、その一つが小胞体内腔に存在する calreticulin である⁵⁾。calreticulin は自身と高い相同性を有する小胞体膜タンパク質 calnexin と共に calreticulin / calnexin シャペロンサイクルを形成し、新生された糖タンパク質の Glc₁Man₉GlcNAc₂ への結合を介して糖タンパク質のフォールディングに関与している¹⁵⁾。また、calreticulin と calnexin はジスルフィド結合の架け替えに関与するチオールジスルフィド酸化還元酵素である endoplasmic reticulum stress protein 57 (ERp57) と結合し、ともに機能することで小胞体内での糖タンパク質の品質管理に寄与している¹⁵⁾。これらに加えて、calreticulin は Ca²⁺との結合や、小胞体内に Ca²⁺を取り込む sarcoplasmic / endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) および Ca²⁺を放出する inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3 受容体) と相互作用することで小胞体内の Ca²⁺の貯蔵や Ca²⁺を介したシグナル伝達にも関与している^{16, 17)}。ほとんどの calreticulin は小胞体に存在するが、わずかに細胞表面にも存在しており⁶⁾、正常細胞の細胞表面上の calreticulin は thrombospondin-1、 $\alpha\beta_3$ integrin、low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP-1) と複合

体を形成して細胞膜上に局在している^{18, 19)}。

近年、抗がん剤や放射線などによりアポトーシスを誘発したがん細胞では calreticulin が小胞体から細胞表面へと移行することが明らかにされた^{7, 20)}。増加した細胞表面 calreticulin はマクロファージや樹状細胞による貪食を促進する “eat me” signal として機能することが示されている⁷⁾。さらに、ある種のがん細胞では、抗がん剤の mitoxantrone や oxaliplatin などの処理により、細胞表面 calreticulin の増加が、細胞膜上への phosphatidylserine の露出などのアポトーシスに付随する現象に先行して起こる⁸⁾。小胞体内で calreticulin などのシャペロンによるタンパク質のフォールディング機構は、様々な細胞障害によりその効率が下がり、過剰な負荷がかかった状態になることがある²¹⁾。小胞体の持つタンパク質のフォールディング機構の能力以上の負荷がかかった結果、異常なフォールディング構造のタンパク質が小胞体内に蓄積し、いわゆる小胞体ストレスが誘発される²¹⁾。mitoxantrone や oxaliplatin などによるプレアポトーシス細胞での細胞表面 calreticulin の増加には、この小胞体ストレスが関与していることが報告されている^{9, 10)}。さらに、mitoxantrone や oxaliplatin などにより増加した細胞表面 calreticulin を介した貪食が T 細胞へのがん抗原の提示を促進することが示され、抗がん剤などによる細胞表面 CRT の増加は抗腫瘍免疫応答を誘発する免疫原性細胞死 (immunogenic cell death: ICD) の特徴の一つとされている¹¹⁾。

これまでの当教室の研究により、ヒト大腸がん細胞株 HT-29 細胞に mitoxantrone を作用させると、細胞表面 calreticulin が一過性の前期と持続性の後期の二相性で増加し、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与していることが示されている¹³⁾。それぞれの細胞表面 calreticulin の増加が異なる機序によって引き起こされていることから、これら

の生理的な役割にも違いがあることが推測された。しかし、mitoxantrone の自家蛍光が貪食作用の検出の障害となっていたこともあり、前期と後期で増加した細胞表面 calreticulin の貪食における役割に関する解析は困難であった。

そこで本章では、mitoxantrone と同様に、大腸がん由来の培養細胞において細胞表面 calreticulin の増加を誘導することが報告されている¹⁴⁾ oxaliplatin を用い、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の経時変化を解析した。また、細胞表面 calreticulin の増加に対する小胞体ストレスやアポトーシスの関与について検討を行った。

第 1 節 細胞株および試薬

1-1-1 細胞株

ヒト大腸がん細胞株 HT-29 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。

1-1-2 試薬

ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) は日水製薬製、ウシ胎児血清 (FBS) は Biosera 社製、penicillin は萬有製薬製、streptomycin は明治製菓製を用いた。oxaliplatin (L-OHP) は和光純薬工業製を用いた。caspase-3 阻害剤 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde (Ac-DEVD-CHO) はペプチド研究所製、caspase-12 阻害剤 benzyloxycarbonyl-Ala-Thr-Ala-Asp-fluoromethyl ketone (Z-ATAD-FMK) は MBL 製を用いた。抗 calreticulin monoclonal mouse IgG 抗体 (FMC75) は Enzo Life Science 社製、抗 calnexin monoclonal mouse IgG 抗体 (E-10) と抗 eIF2 α polyclonal rabbit IgG 抗体 (FL315)、抗リン酸化 eIF2 α (Ser51) polyclonal rabbit IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology 製を用いた。フローサ

イトメトリーの 2 次抗体には Invitrogen 製 Alexa Fluor® 488-conjugated 抗 mouse IgG (H+L) goat 抗体 (A11001) を、ウェスタンブロット法の 2 次抗体には Cell Signaling Technology 製 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 抗 rabbit IgG goat 抗体を用いた。7-amino-actinomycin D (7-AAD) と protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail は SIGMA 社製を用いた。Protein Assay reagent®は Bio Rad 製、Blocking One はナカライテスク製、ウェスタンブロット用反応免疫反応促進試薬 Can Get Signal®は東洋紡製、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜と ECL prime は GE Healthcare 製を用いた。その他の試薬は SIGMA、ナカライテスクおよび和光純薬工業製の特級を用いた。

第 2 節 実験方法

1-2-1 細胞培養

HT-29 細胞は L-グルタミン (0.3 mg/mL)、penicillin (100 U/mL)、streptomycin (100 µg/mL)、FBS (10%) を添加した DMEM 培地を用いて 5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の状態に継代培養した。

1-2-2 細胞表面 calreticulin と calnexin の定量

HT-29 細胞を 10% FBS/DMEM 培地で 2×10^5 cells/mL の細胞濃度に調整後、24 ウェルプレートに播種 (1 mL/well) し一晩培養した後、終濃度 20 µM になるよう oxaliplatin (10 mM in DMSO) を添加した。さらに、これらの細胞を 5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境で 0~48 時間培養した後に 0.02% EDTA/PBS を用いて回収し、PBS で洗浄した。1% BSA/PBS で 10 µg/mL に希釈した抗 calreticulin mouse IgG 抗体または抗 calnexin mouse IgG 抗体溶

液 50 μL で回収した細胞を懸濁し、氷上で 30 分間反応させた。反応後 1% BSA/PBS で細胞を洗浄し、1% BSA/PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した Alexa Fluor[®] 488 標識抗 mouse IgG goat 抗体溶液 50 μL で懸濁したのち、氷上でさらに 30 分間反応させた。反応後、1% BSA/PBS で細胞を洗浄し、1% BSA/PBS で 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した 7-AAD 50 μL で染色した。染色後の各細胞のフローサイトメトリー分析を FACS Calibur[™] (BD 社) により行い、Alexa Fluor[®] 488 と、7-AAD の蛍光強度を定量した。得られた結果をフローサイトメトリーデータ解析ソフト FlowJo (FlowJo, LLC) で解析した。7-AAD 陽性細胞を死細胞とみなして 7-AAD 陰性細胞のみを解析対象とし、それらの細胞における Alexa Fluor[®] 488 の蛍光強度の平均値 (平均蛍光強度) を求めた。さらに、1 次抗体の代わりに 1% BSA/PBS で処理した細胞の平均蛍光強度をブランクとして差し引き、この値を細胞表面 calreticulin または calnexin の量の相対値とした。

アポトーシスや小胞体ストレスの関与を検討する実験では、oxaliplatin とともに終濃度 100 μM になるよう caspase-3 阻害剤 Ac-DEVD-CHO (100 mM in DMSO)、または終濃度 5 μM になるよう caspase-12 阻害剤 Z-ATAD-FMK (10 mM in DMSO) を HT-29 細胞に添加して培養したのち、同様の解析を行った。

1-2-3 ウェスタンブロット用試料の調製

HT-29 細胞を 10% FBS/DMEM 培地で 1×10^6 cells/mL の細胞濃度に調整して 6 ウェルプレートに播種し一晩培養した。これらの細胞に終濃度 20 μM になるよう oxaliplatin を添加後、5% CO_2 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境で 0~6 時間培養した。培養後の HT-29 細胞を 0.02% EDTA/PBS を用いて回収し、PBS で洗浄後、protease inhibitor cocktail および phosphatase inhibitor

cocktail を各 1/100 溶液量添加した TNE Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、1% NP-40、0.2 mM EDTA) に懸濁した。得られた懸濁液を、超音波ホモジナイザー (TOMY SEIKO 社、UR-20P) を用いて氷冷化でソニケーション (10 秒×3 回) し、細胞溶解液を得た。細胞溶解液の一部をタンパク質濃度定量用に分取したあとの残りに、等量の 2×SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.5、10% グリセロール、2% SDS、0.1% BPB) を加え、100°C で 5 分間加熱処理し、ウェスタンブロット用試料とした。

1-2-4 タンパク質濃度の定量 (Bradford 色素結合法)

ソニケーション後に分取した細胞溶解液 2 μ L に精製水 98 μ L を加え、タンパク質濃度定量用の試料とした。500、250、125、62.5 μ g/mL の BSA 溶液を調製し、タンパク質濃度標準液として使用した。試料、標準液および精製水 (ブランク用) をそれぞれ 20 μ L 取り、5 倍希釈した Protein Assay reagent® を 500 μ L 加えて混和し、室温に 5 分以上放置後、600 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー DTX 800 Multimode Detector (BECKMAN COULTER) で測定した。標準液の吸光度から検量線を作成し、試料のタンパク質濃度を求めた。

1-2-5 リン酸化 eIF2 α の解析

1-2-3 において調製したウェスタンブロット用試料を、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルに 1 レーンあたり eIF2 α 測定用のサンプルは総タンパク質量 10 μ g、リン酸化 eIF2 α 測定用のサンプルは総タンパク質量 50 μ g になるようにアプライした。100 V の定電圧で電気泳動後、blotting buffer (2.5 mM Tris、192 mM glycine、20%メタノール) で平衡化した PVDF 膜に 2 mA/cm² で 1 時間かけて泳動タンパク質を転写した。転写後、シールバッグに PVDF 膜と Blocking

One を入れてシールし、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後 PVDF 膜を 0.1% Tween 20/PBS (PBS-T) あるいは 0.1% Tween 20/TBS (TBS-T) で 15 分間 1 回、5 分間 2 回洗浄した。シールバッグに洗浄後の PVDF 膜と、抗 eIF2 α polyclonal rabbit IgG 抗体あるいは抗リン酸化 eIF2 α (Ser51) polyclonal rabbit IgG 抗体溶液 (Can Get Signal[®] solution 1 で 1000 倍に希釈したもの) を加えてシールし、室温で 1 時間反応させた。ブロッキング時と同様に PVDF 膜を 0.1% PBS-T あるいは 0.1% TBS-T で 3 回洗浄した後、2 次抗体として HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体溶液 (Can Get Signal[®] solution 2 で 1000 倍に希釈したもの) と共にシールし、室温で 1 時間反応させた。PVDF 膜を 0.1% PBS-T あるいは 0.1% TBS-T で洗浄したのちに ECL prime と共にシールバッグに入れて、室温で 5 分間反応させた。HRP の反応で得られる化学発光を Lumino Graph II (ATTO) を用いて検出し、CS Analyzer 4 (ATTO) により結果を解析した。

1-2-6 統計解析

データは平均値 \pm 標準偏差で示した。2 標本間の有意差検定には Student's *t*-test、多群間の比較には一元配置分散分析と Dunnett's multiple comparison test を用いて解析し、有意水準 $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。解析ソフトは Easy R を用いた²²⁾。

第 3 節 結果

1-3-1 細胞表面 calreticulin の経時変化

calreticulin は正常時の細胞の表面にもわずかに見いだされるが、ほとんどが小胞体内に局在している。一方で、mitoxantrone や oxaliplatin などの抗がん剤や放射線などの作用により、calreticulin が小胞体内から細胞表面へ移行する例

が示されている⁷⁾。そこで、大腸がん細胞株 HT-29 細胞において oxaliplatin が細胞表面 calreticulin の増加を誘発するのかを検討するため、20 μ M の oxaliplatin の共存下で 0~48 時間培養した HT-29 細胞を回収し、細胞表面上の calreticulin を抗 calreticulin 抗体と Alexa Fluor[®] 488 標識二次抗体を用いたフローサイトメトリーにより定量した。また、calreticulin は細胞内に多く含まれていることから、抗体が細胞内に進入する死細胞の測定値を排除するために、測定前に 7-AAD で死細胞を染色し、7-AAD 陰性細胞についてのみ評価を行った。その結果、Fig. 1 に示したように oxaliplatin 処理 4 時間後をピークとする一過性の増加と 24 時間後以降での持続性の増加が観察され、HT-29 細胞では oxaliplatin 処理により細胞表面 calreticulin が二相性で増加することが示された。

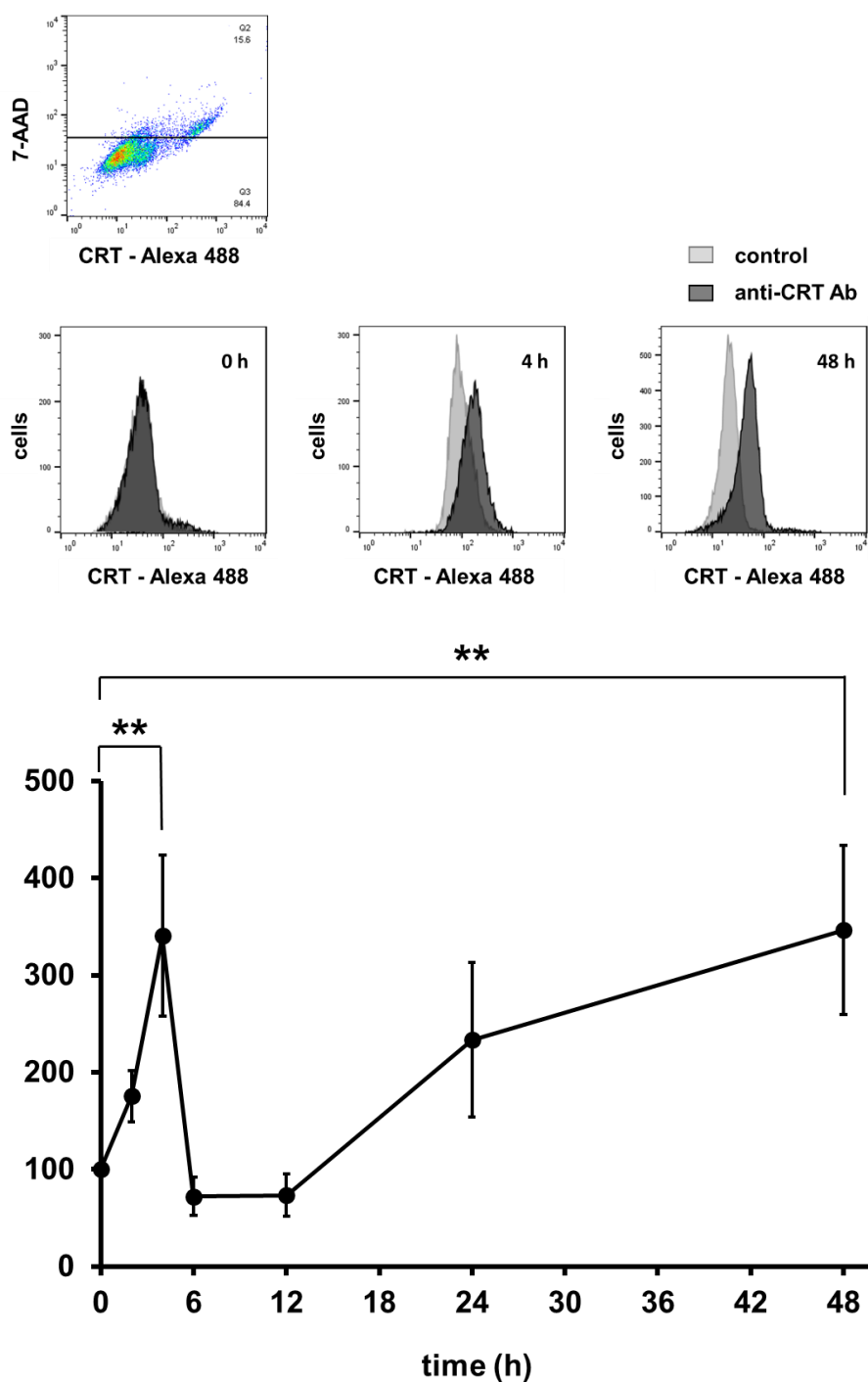


Fig. 1 oxaliplatin 処理による細胞表面 calreticulin の経時的変化

oxaliplatin (20 μ M) で 0~48 時間処理した HT-29 細胞を、抗 calreticulin 抗体 (10 μ g/mL) および Alexa Fluor® 488 標識 2 次抗体 (10 μ g/mL) と反応させ、さらに 7-AAD (0.25 μ g/mL) で染色した。7-AAD 陰性細胞について細胞表面 calreticulin の変化をフローサイトメトリーにより定量し、未処理 (0 h) の HT-29 細胞における値を 100% として表した。結果は平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表した。** p < 0.01

1-3-2 細胞表面 calnexin の経時変化

calnexin は小胞体内膜に存在するタンパク質であり、calreticulin と高い相同性を示す。この calnexin も、アポトーシス細胞では小胞体膜成分と共に細胞膜へ局在変化するという報告がある²³⁾。そこで calnexin の細胞表面への移行を calreticulin と比較するために、HT-29 細胞を 20 μ M の oxaliplatin で 0~48 時間処理し、細胞表面 calnexin を抗 calnexin 抗体と Alexa Fluor[®] 488 標識二次抗体を用いてフローサイトメトリーにより定量したのちに、7-AAD 陰性細胞について解析を行った。その結果、oxaliplatin 処理 24 時間後から持続した細胞表面 calnexin の増加が認められた一方で、oxaliplatin 処理 12 時間後までは細胞表面 calnexin の増加が示されなかった (Fig. 2)。このことから前述した二相性での細胞表面 calreticulin 増加のうち、後期の増加は細胞表面 calnexin の増加と同様の機構により行われていることが示唆された。これに対して、前期の細胞表面 calreticulin の増加は、calnexin とは独立して行われていると考えられ、抗がん剤処理後の前期と後期に、異なるメカニズムにより細胞表面 calreticulin が増加することを支持する結果が得られた。

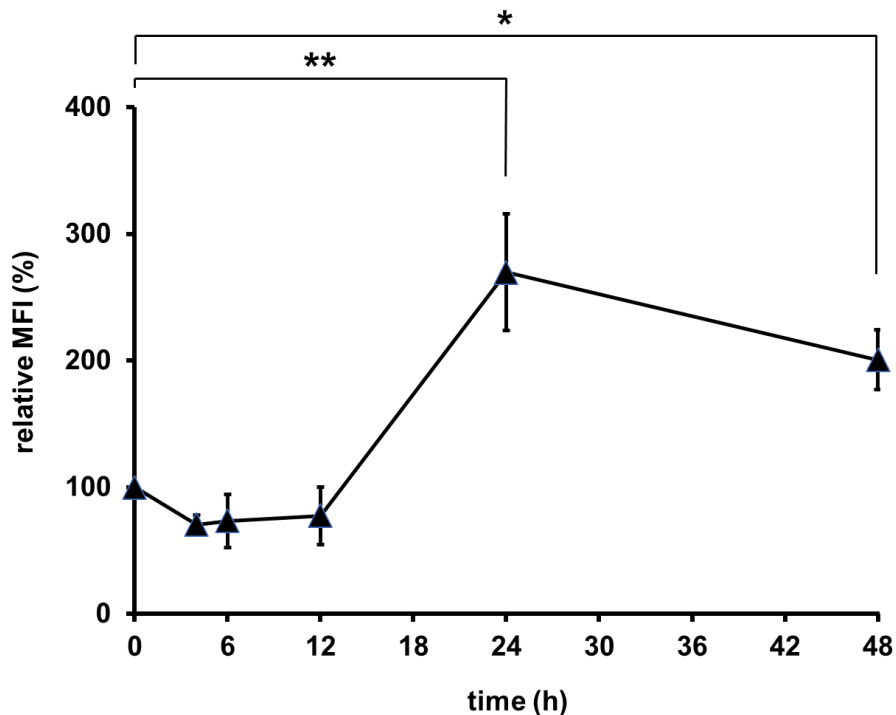


Fig. 2 oxaliplatin 処理による細胞表面 calnexin の経時的変化

oxaliplatin (20 μM) で 0~48 時間処理した HT-29 細胞を、抗 calnexin 抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および Alexa Fluor[®] 488 標識 2 次抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と反応させ、さらに 7-AAD (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で染色した。7-AAD 陰性細胞について細胞表面 calnexin の変化をフローサイトメトリーにより定量し、未処理 (0 h) の HT-29 細胞における値を 100% として表した。結果は 平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

1-3-3 caspase-3 阻害剤の影響

近年、抗がん剤の処理などによりアポトーシスを誘発したがん細胞では細胞表面 calreticulin が増加することが明らかにされている⁷⁾。そこで、oxaliplatin 処理 HT-29 細胞が示した細胞表面 calreticulin の二相性の増加にアポトーシスが関与しているのかを検討するために、アポトーシス誘発因子である caspase-3 の働きを阻害した場合における、細胞表面 calreticulin の経時変化について検討した。HT-29 細胞に 20 μM の oxaliplatin とともに 100 μM の caspase-3 阻

害剤 Ac-DEVD-CHO を添加し、4 時間または 48 時間反応させた。HT-29 細胞を回収し、7-AAD 陰性細胞について各細胞の細胞表面 calreticulin を定量した。その結果、oxaliplatin 48 時間処理における細胞表面 calreticulin の増加は caspase-3 阻害剤により有意に抑制された (Fig. 3)。一方で、oxaliplatin 4 時間処理における細胞表面 calreticulin の増加に対して、caspase-3 阻害剤による顕著な影響は認められなかった。このことから、後期での細胞表面 calreticulin の増加は caspase-3 を介したアポトーシスに関連して起こるが、前期での細胞表面 calreticulin の増加にはアポトーシスとは別の機構が関与していることが示唆された。

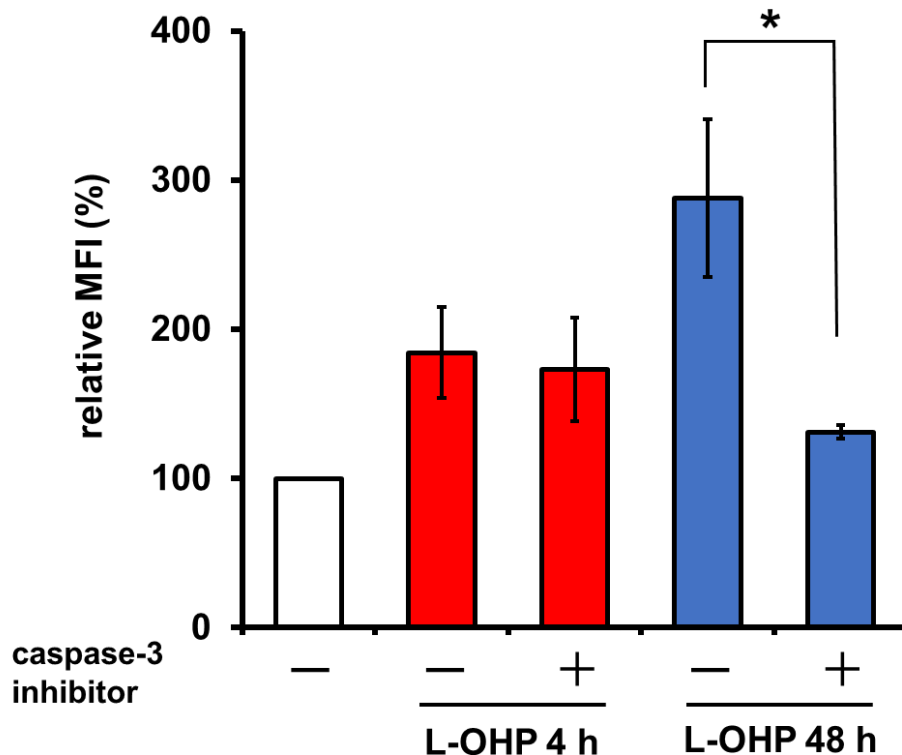


Fig. 3 細胞表面 calreticulin 増加に対する caspase-3 阻害剤の影響

caspase-3 阻害剤 (Ac-DEVD-CHO (100 μ M)) の存在下あるいは非存在下で、oxaliplatin (20 μ M) で4時間あるいは48時間処理した HT-29 細胞の細胞表面 calreticulin を解析した。結果は未処理の HT-29 細胞 (白) における値を 100% として、平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表した。* p < 0.05

1-3-4 リン酸化 eIF2 α の解析

oxaliplatin は核内の DNA に作用するだけでなく、小胞体にも作用し小胞体ストレスを引き起こすことが知られている⁹⁾。そこで、oxaliplatin 処理4時間における細胞表面 calreticulin の増加に対する小胞体ストレスの関与を検討するため、20 μ M の oxaliplatin の共存下で0~6時間培養した HT-29 細胞を回収し、小胞体ストレスの際に起こる翻訳開始因子 alpha-subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) のリン酸化について、ウェスタンブロット法により

検討した。その結果、oxaliplatin 処理 30 分後から eIF2 α のリン酸化が認められた (Fig. 4)。これにより、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞において小胞体ストレスが誘発されることが示された。

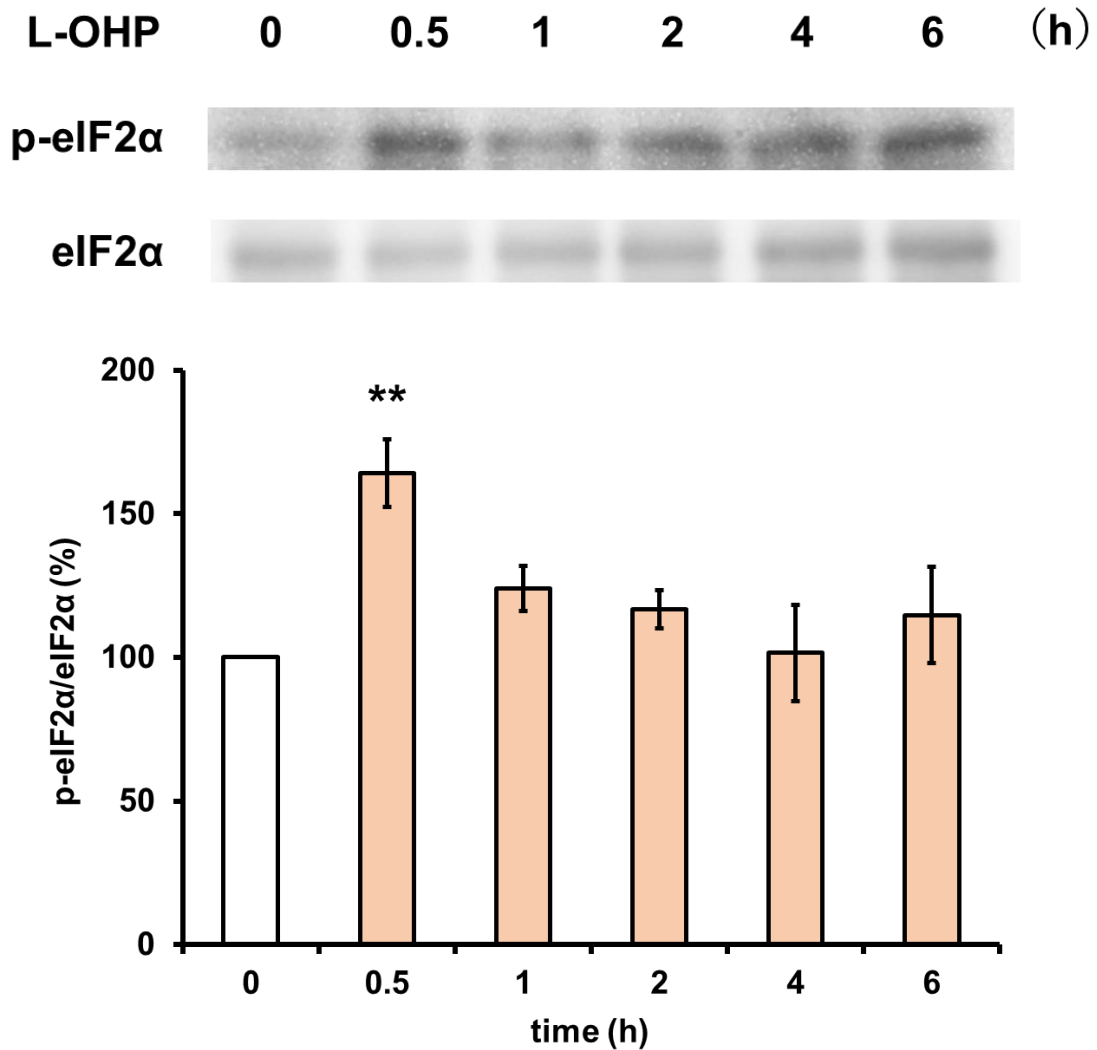


Fig. 4 oxaliplatin 処理による eIF2 α のリン酸化

HT-29 細胞を oxaliplatin (20 μ M) で 0~6 時間処理した後、細胞内 eIF2 α 、リン酸化 eIF2 α をウェスタンブロット法により検出し、定量した。結果は細胞内の eIF2 α に対するリン酸化 eIF2 α の割合として算出し、未処理 (0 h) の HT-29 細胞 (白) における値を 100% として、平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表した。* p<0.05

1-3-5 caspase-12 阻害剤の影響

小胞体ストレスが oxaliplatin 4 時間処理後に誘起される前期の細胞表面 calreticulin の増加に関与しているのかを検討するために、小胞体の膜に局在して小胞体ストレスの際に活性化される caspase-12 に着目し (Fig. 5)、その阻害剤による細胞表面 calreticulin の増加への影響について検討した。HT-29 細胞に 20 μM の oxaliplatin とともに 5 μM の caspase-12 阻害剤 Z-ATAD-FMK を添加して 4 時間反応させた後、HT-29 細胞を回収し、7-AAD 陰性細胞について細胞表面 calreticulin を定量した。その結果、oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の増加に対して、caspase-12 阻害剤の添加による抑制が認められた (Fig. 6)。この結果より、oxaliplatin 4 時間処理後の細胞表面 calreticulin の増加は、小胞体ストレスにより活性化される caspase-12 を介して起こることが示唆された。

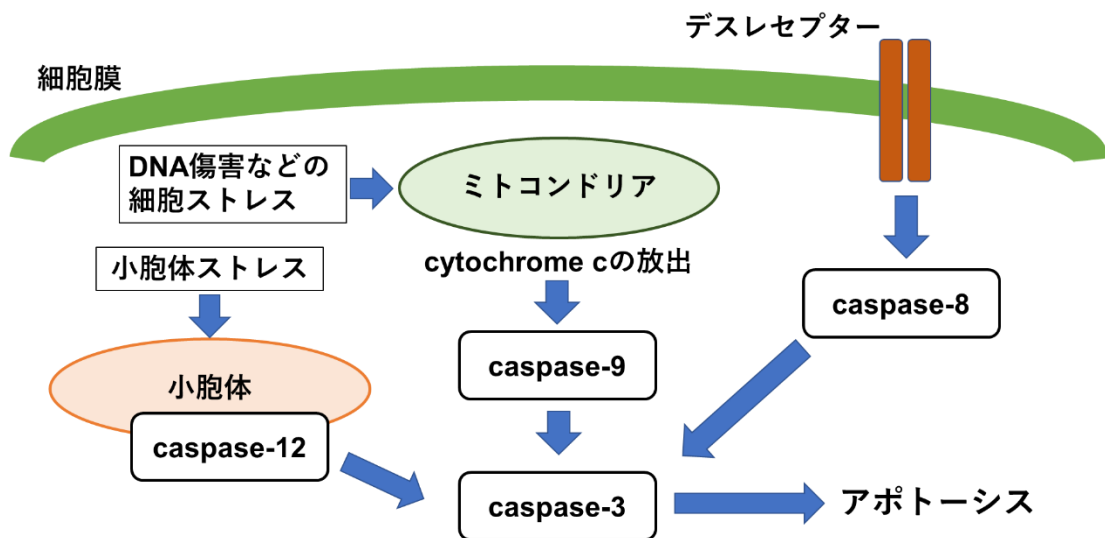


Fig. 5 caspase を介したアポトーシス誘発経路

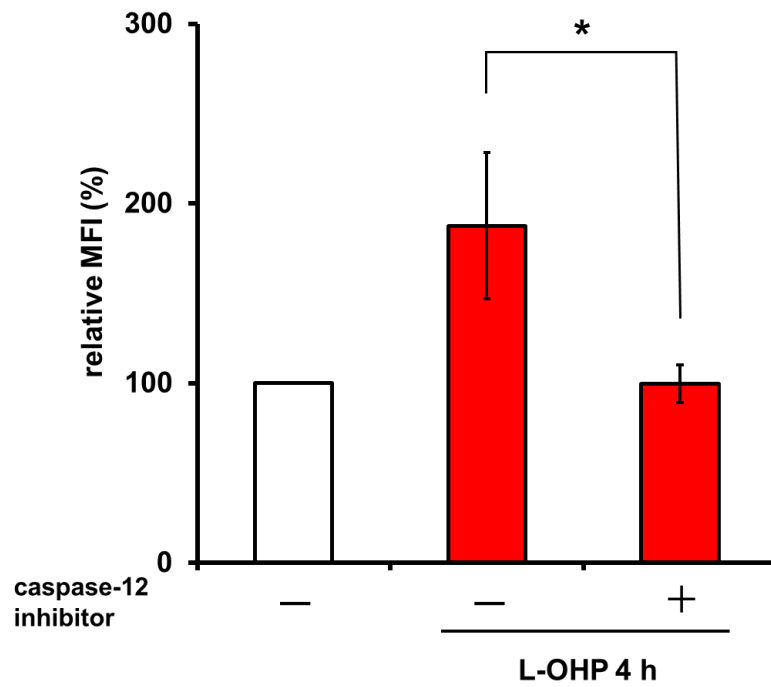


Fig. 6 細胞表面 calreticulin 増加に対する caspase-12 阻害剤の影響

caspase-12 阻害剤(Z-ATAD-FMK(5 μ M))の存在下あるいは非存在下で、oxaliplatin (20 μ M)で4時間処理したHT-29細胞の細胞表面 calreticulinを定量した。結果は未処理のHT-29細胞(白)における値を100%として、平均値 \pm 標準偏差(n=3)で表した。

* $p < 0.05$

第4節 考察

シャペロンタンパク質である calreticulin は通常時には小胞体に局在するが、ある種の抗がん剤で処理されたがん細胞では小胞体から細胞表面へと移行することが知られている^{7,9)}。そこで本章では、oxaliplatin 処理による HT-29 細胞の細胞表面 calreticulin の経時変化を解析した。その結果、細胞表面 calreticulin が oxaliplatin 処理後 4 時間をピークとした前期と処理後 24 時間以降の後期の二相性を示して増加することが観察された。細胞表面 calreticulin の増加にはアポトーシスや小胞体ストレスが関与していることが報告されていることから^{7,9)}、ここで示された細胞表面 calreticulin の増加には、これらの機構が関与していることが考えられた。

calreticulin と同様に小胞体膜に存在するシャペロンタンパク質であり、calreticulin と高い相同性を示すことが知られている calnexin も、アポトーシスを誘発した細胞で細胞表面へ移行することが報告されている²³⁾。本研究において、細胞表面 calnexin の増加は oxaliplatin 処理後 24 時間から認められたことから (Fig. 2)、oxaliplatin 処理 24 時間以降の HT-29 細胞ではアポトーシスが誘発されていると考えられた。さらに、アポトーシス誘発因子である caspase-3 の阻害剤 Ac-DEVD-CHO を oxaliplatin 処理時に添加し、細胞表面 calreticulin の増加に対する影響を検討したところ、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞での細胞表面 calreticulin の増加が抑制されたことから、後期の細胞表面 calreticulin の増加には caspase-3 を介したアポトーシスが関与していることが示唆された。一方で、oxaliplatin 処理 4 時間後の細胞表面 calreticulin の増加は、細胞表面 calnexin の増加よりも先行していたこと、caspase-3 阻害剤が oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞の細胞表面 calreticulin の増加に影響を与えなかったことから、前期での細胞表面 calreticulin の増加にはアポトーシ

スとは異なるメカニズムが関与していることが考えられた。

詳細な機序は不明であるが oxaliplatin は核の他に小胞体にも作用し、小胞体ストレスを誘発することが知られている⁹⁾。小胞体ストレスが誘発されると、異常なタンパク質が小胞体膜に存在する3つのセンサータンパク質である protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、inositol requiring protein-1 (IRE-1)、activating transcription factor-6 (ATF-6) により感知されることで小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) が開始される。このうち IRE-1 と ATF-6 はシャペロンタンパク質の転写を促進させ、タンパク質フォールディングの機能を亢進するとともに、小胞体内に蓄積したミスフォールドタンパク質を細胞質に放出してプロテアソームで分解する endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) を働かせる。また、PERK は会合タンパク質の binding immunoglobulin protein (BiP) と解離することにより二量化したのち自己リン酸化を経て活性化され、翻訳開始因子である eIF2 α をリン酸化し、タンパク質の翻訳を抑制することで小胞体内のミスフォールドタンパク質のさらなる増加を防ぐ^{24,25)} (Fig. 7)。これまでに PERK のノックダウ

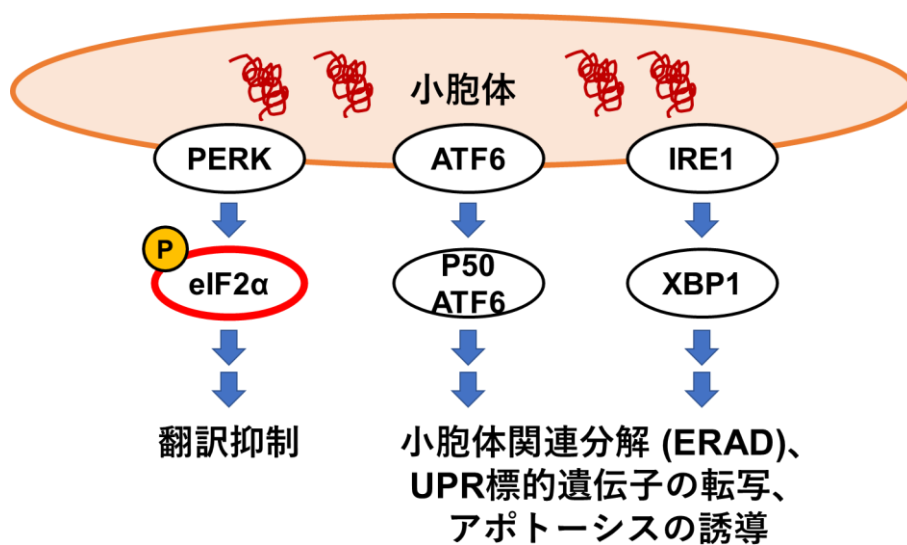


Fig. 7 小胞体ストレス応答の概要

ンや PERK によりリン酸化される eIF2 α のアミノ酸残基の置換により、抗がん剤で誘起される calreticulin の小胞体から細胞表面への calreticulin の移行が抑制されることが報告されており⁹⁾、細胞表面 calreticulin の増加において eIF2 α のリン酸化は非常に重要であると考えられている⁹⁾。本研究では eIF2 α のリン酸化による細胞表面 calreticulin の増加に対する影響について検討していないが、oxaliplatin で処理をした HT-29 細胞において、oxaliplatin 添加 30 分後から eIF2 α のリン酸化を確認しており (Fig. 4)、oxaliplatin が HT-29 細胞に小胞体ストレスを誘発することが示された。また、前期の細胞表面 calreticulin の増加が oxaliplatin 処理 4 時間後に観察されることから、この calreticulin の増加が eIF2 α のリン酸化に依存している可能性は十分に考えられる。

続いて、小胞体膜に局在し小胞体ストレスにより活性化される caspase-12 の阻害剤、Z-ATAD-FMK の細胞表面 calreticulin 増加に対する影響について検討した。その結果、oxaliplatin で 4 時間処理した際に観察される HT-29 細胞の細胞表面 calreticulin の増加が抑制されたことから (Fig. 6)、前期での細胞表面 calreticulin の増加には caspase-12 の活性化が関与していることが示唆された。caspase-12 の活性化には、小胞体ストレス誘発時に小胞体内から放出される Ca²⁺を介して活性化したシステインプロテアーゼ calpain が関与していることが示されていることから²⁶⁾、今後 oxaliplatin による細胞表面 calreticulin の増加が、小胞体からの Ca²⁺の放出と calpain の活性化に依存しているかについて確認する必要がある。

本研究で観察された前期の細胞表面 calreticulin の増加は oxaliplatin 処理 4 時間後をピークとした一過性の増加であった。つまり、前期で細胞表面に移行した calreticulin は、速やかに細胞表面から消失していることになるが、そのメカニズムは明らかではない。calreticulin の構造には膜貫通ドメインが存在しない

ことから、細胞表面に移行した calreticulin は他の分子との結合を介して細胞表面に局在していると考えられている^{6, 27)}。anthracycline 系抗がん剤や oxaliplatin での作用による小胞体ストレスを介した calreticulin の小胞体から細胞表面への移行では、同じく小胞体に存在するチオールジスルフィド酸化還元酵素である endoplasmic reticulum stress protein 57 (ERp57) とともに小胞体からゴルジ体に輸送された後、輸送小胞によって細胞骨格の一つであるアクチン上を運ばれ、細胞膜に移動する。その際、膜融合を調節する小胞膜上の vesicle-associated membrane protein 1 (VAMP-1) と細胞膜上の synaptosomal associated protein 23 (SNAP-23) が融合し、エキソサイトーシスにより細胞表面に移行する機構が考えられている^{9, 10, 12)}。さらに、mitoxantrone や oxaliplatin などに誘起された小胞体ストレスを介して細胞表面に移行した calreticulin は、細胞膜上で ERp57 と共局在することが明らかにされている^{28, 29)}。また近年、小胞体ストレスを誘導した卵巣がん細胞で、増加した細胞表面 calreticulin が細胞表面から放出されることが報告されている³⁰⁾。同様な現象が oxaliplatin 処理した HT-29 細胞でも起きているとすれば、前期に細胞表面に移行した calreticulin の速やかな消失は、細胞膜からの calreticulin の離脱、放出によるものと推察できる。すなわち、ERp57 とともに小胞体から細胞表面に移行した calreticulin が ERp57 から解離し細胞表面から放出されることが、前期での細胞表面 calreticulin の増加が一過性である理由として考えられる。

oxaliplatin 処理の後期に観察される、アポトーシスによる calreticulin の小胞体から細胞表面への移行では、活性化した caspase-3 がアクチンの切断などを起こすことで細胞内輸送系に破綻をきたし³¹⁾、これにより calreticulin が細胞表面に運ばれてしまうと考えられている。アポトーシスの誘発により小胞体から細胞質に放出された calreticulin は、細胞内膜の phosphatidylserine と結

合した後に、アポトーシスに伴う細胞膜反転により phosphatidylserine と共に細胞表面に露出する機構が提起されている^{6,27)}。アポトーシス細胞において、細胞表面で calreticulin と phosphatidylserine が共局在していることも報告されている⁷⁾。

これらのことから、前期と後期で増加した細胞表面 calreticulin はそれぞれ異なる分子と相互作用していると考えられ、そのため前期の増加が一過性で、後期の増加が持続性になったと推測される。本研究では、細胞表面 calreticulin とその他の細胞表面分子の相互作用に関する解析にまでは至らなかったが、今後は細胞表面 calreticulin と他の分子の相互作用の違いによる calreticulin の動態や機能への影響に着目していく必要がある。

本章では、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞において、細胞表面 calreticulin の増加が処理後 4 時間をピークとした前期と処理後 24 時間以降の後期の二相性を示すことを明らかにした。さらに oxaliplatin 処理 30 分以後の HT-29 細胞では、小胞体ストレスのマーカーである eIF2 α のリン酸化が示された。また、小胞体ストレスにより活性化する caspase-12 の阻害により、oxaliplatin 4 時間処理後の HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の増加が抑制されたことから、前期の細胞表面 calreticulin 増加に小胞体ストレスが関与していることが示唆された。

一方、oxaliplatin 処理 24 時間以降の HT-29 細胞では、後期の細胞表面 calreticulin の増加と同様に、アポトーシスにともなう細胞表面 calnexin の増加が認められた。さらに、アポトーシスの活性化因子である caspase-3 の阻害により、oxaliplatin 処理 48 時間後の HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の増加が抑制された。これらの結果より、後期の細胞表面 calreticulin の増加には caspase-3 を介したアポトーシスが関与していることが示唆された。

第2章 THP-1細胞の分化誘導

生体内で不要となった細胞や回復不能な異常を起こした細胞は、多くの場合、免疫系をはじめとする様々な方法で除去される。組織や器官の発生や機能の獲得の過程、あるいは様々な病態において死細胞が生成するが、それらの細胞は貪食細胞によって速やかに貪食除去される^{1,2)}。また、貪食細胞による病原体あるいは病原体に感染した細胞の貪食は、病原体の除去のみならず、特異的抗原の提示を介した獲得免疫の活性化を誘導することから³⁾、貪食機構は生体の恒常性維持において重要な機構である。

マクロファージと樹状細胞はどちらも単球の分化によって生じる貪食細胞である。このうち樹状細胞は、体内に侵入した微生物やウイルス感染細胞の貪食後に異物となる抗原を細胞表面に提示し、ナイーブ T 細胞を活性化することで獲得免疫を起動する役割を持つと考えられている³²⁾。一方、アポトーシス細胞は主にマクロファージによって貪食除去されるなど³³⁾、免疫機構におけるマクロファージと樹状細胞の役割には違いがある。

ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞は phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) の作用によりマクロファージの特徴を有する細胞 (マクロファージ様細胞) に分化することが示されている³⁴⁾ (Fig. 8)。さらに近年には、THP-1 細胞を interleukin 4 (IL-4) と granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) の共存下で培養することにより、貪食能力が高く抗原提示能力が低い未成熟な樹状細胞の特徴を持つ細胞 (未成熟樹状細胞様細胞) に分化すること、得られた未成熟樹状細胞様細胞に IL-4 と GM-CSF に加えて tumor necrosis factor- α (TNF- α) を作用させることにより、貪食能力が低く抗原提示能力が高い成熟した樹状細胞の特徴を持つ細胞 (成熟樹状細胞様細胞) に分化することが

報告されている³⁵⁾ (Fig. 8)。

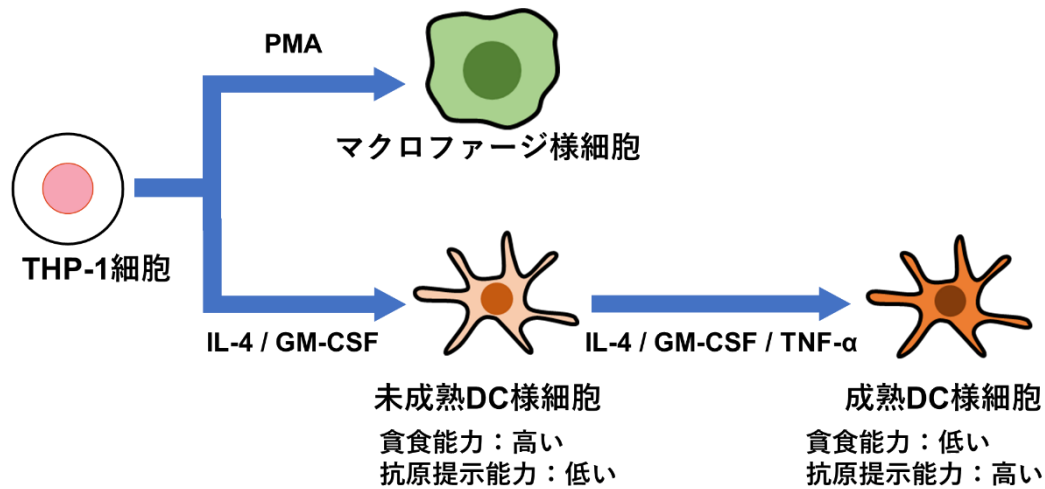


Fig. 8 THP-1 細胞のマクロファージ様細胞と樹状細胞様細胞への分化誘導

本章では、貪食実験に用いる貪食細胞を調製するために、THP-1 細胞に PMA、IL-4 と GM-CSF、あるいは IL-4、GM-CSF、TNF- α の組み合わせで刺激し、マクロファージ様細胞あるいは樹状細胞様細胞への分化を誘導した。この方法により THP-1 細胞がマクロファージ様細胞あるいは樹状細胞様細胞に分化することを確認するため、マクロファージへの分化の指標となる細胞表面抗原（細胞表面マーカー）の CD11b、CD11c、CD14、または樹状細胞への分化の指標となる細胞表面マーカーの CD80 と CD86 について、細胞表面への発現をフローサイトメトリーにより解析した。

第 1 節 細胞株および試薬

2-1-1 細胞株

ヒト単球由来骨髓性白血病細胞株 THP-1 細胞は Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) から購入した。

2-1-2 試薬

RPMI1640 培地は日水製薬製、樹状細胞培養液 (ImmunoCult™-ACF Dendritic Cell Medium) は STEMCELL Technologies 社製、ウシ胎児血清 (FBS) は Biosera 社製、penicillin は萬有製薬製、streptomycin は明治製薬製を用いた。ヒトリコンビナント interleukin-4 (rhIL-4) とヒトリコンビナント granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) は Pepro Tech 社製、ヒトリコンビナント tumor necrosis factor- α (rhTNF- α) は R&D Systems 社製を用いた。phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は SIGMA 社製を用いた。抗 CD80 monoclonal mouse IgG 抗体 (F-7)、抗 CD86 monoclonal mouse IgG 抗体 (BU63)、FITC-conjugated 抗 CD11b 抗体 (2 LPM19 c)、Alexa Fluor® 488-conjugated 抗 CD11c 抗体 (3.9) は Santa Cruz Biotechnology 社製、FITC-conjugated 抗 CD14 抗体 (UCHM1) は AbD Serotec 社製を用い、フローサイトメトリーの 2 次抗体には Invitrogen 製 Alexa Fluor® 488-conjugated 抗 mouse IgG (H+L) goat 抗体 (A11001) を用いた。その他の試薬は SIGMA、ナカライテスクおよび和光純薬工業製の特級を用いた。

第 2 節 実験方法

2-2-1 細胞培養

THP-1 細胞は L-グルタミン (0.3 mg/mL)、penicillin (100 U/mL)、streptomycin (100 μ g/mL)、FBS (10%) を添加した RPMI1640 培地を用いて 5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の状態にて継代培養した。

2-2-2 マクロファージ様細胞への分化誘導

THP-1 細胞を 10% FBS/RPMI1640 培地で 5×10^5 cells/mL の細胞濃度に調整

した後、24 ウェルプレートに播種し、PMA (100 nM) の添加後、5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境で 48 時間培養することにより、マクロファージ様細胞への分化を誘導した。

2-2-3 樹状細胞様細胞への分化誘導

THP-1 細胞の樹状細胞様細胞への分化誘導は、Berges らの方法に準じて行った³⁵⁾。THP-1 細胞を樹状細胞培養液で 5×10^5 cells/mL の細胞濃度に調整した後、24 ウェルプレートに播種し、rhIL-4 (35 ng/mL)、rhGM-CSF (50 ng/mL) の添加後、5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境で 5 日間培養することにより未成熟樹状細胞様細胞への分化を誘導した。

得られた未成熟樹状細胞様細胞に rhIL-4、rhGM-CSF に加えて rhTNF- α (40 ng/mL) を添加し、5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境でさらに 2 日間培養することにより成熟樹状細胞様細胞への分化を誘導した。

2-2-4 細胞表面抗原の解析

マクロファージに特異的な細胞表面抗原の解析は、以下の通り行った。マクロファージ様細胞、または樹状細胞様細胞への分化誘導を行った THP-1 細胞を 0.02% EDTA/PBS を用いて回収し、PBS で洗浄した後、1% BSA/PBS で 10 μ g/mL に希釈した FITC 標識抗 CD11b 抗体、Alexa Fluor[®] 488 標識抗 CD11c 抗体、または FITC 標識抗 CD14 抗体溶液 50 μ L で懸濁し、氷上で 30 分間反応させた。反応後、1% BSA/PBS で洗浄し、フローサイトメトリー分析により FITC あるいは Alexa Fluor[®] 488 の蛍光強度を定量した。得られた結果より算出された平均蛍光強度から、抗 CD 抗体の代わりに 1% BSA/PBS で処理した細胞の平均蛍光強度をブランクとして差し引き、各細胞表面抗原の量の相対値とした。

樹状細胞に特異的な細胞表面抗原の解析は、以下の通り行った。マクロファージ様細胞、または樹状細胞様細胞への分化誘導を行った THP-1 細胞を PBS で洗浄した後、1% BSA/PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した抗 CD80 マウス IgG 抗体、または抗 CD86 マウス IgG 抗体溶液 50 μL で懸濁し、氷上で 30 分間反応させた。反応後、1% BSA/PBS で洗浄し、1% BSA/PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した Alexa Fluor[®] 488 標識抗マウス IgG ヤギ抗体溶液 50 μL で懸濁し、氷上で 30 分間反応させた。反応後、1% BSA/PBS で洗浄し、マクロファージ特異的細胞表面抗原の解析と同様に、フローサイトメトリーによる定量と各細胞表面抗原量の算出を行った。

2-2-5 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。多群間の比較には一元配置分散分析と Dunnett's multiple comparison test を用いて解析し、有意水準 $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。解析ソフトは Easy R を用いた²²⁾。

第3節 結果

2-3-1 THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導

THP-1 細胞は PMA の作用によりマクロファージ様細胞に分化することが知られている³⁴⁾。そこで、PMA 存在下で 48 時間培養した THP-1 細胞に対して、マクロファージ様細胞への分化を確認した。分化の確認のために、マクロファージの細胞表面マーカーとして用いられる CD11b、CD11c、CD14 および樹状細胞の細胞表面マーカーとして用いられる CD80 と CD86 をフローサイトメトリーにより定量した。

その結果、Fig. 9 に示したように、未処理の THP-1 細胞と比較して PMA を

作用させた THP-1 細胞では、マクロファージの細胞表面マーカーである CD11b、CD11c、CD14 が有意に増加した。一方、樹状細胞の細胞表面マーカーである CD80 と CD86 では、PMA の作用による有意な変化は認められなかった。

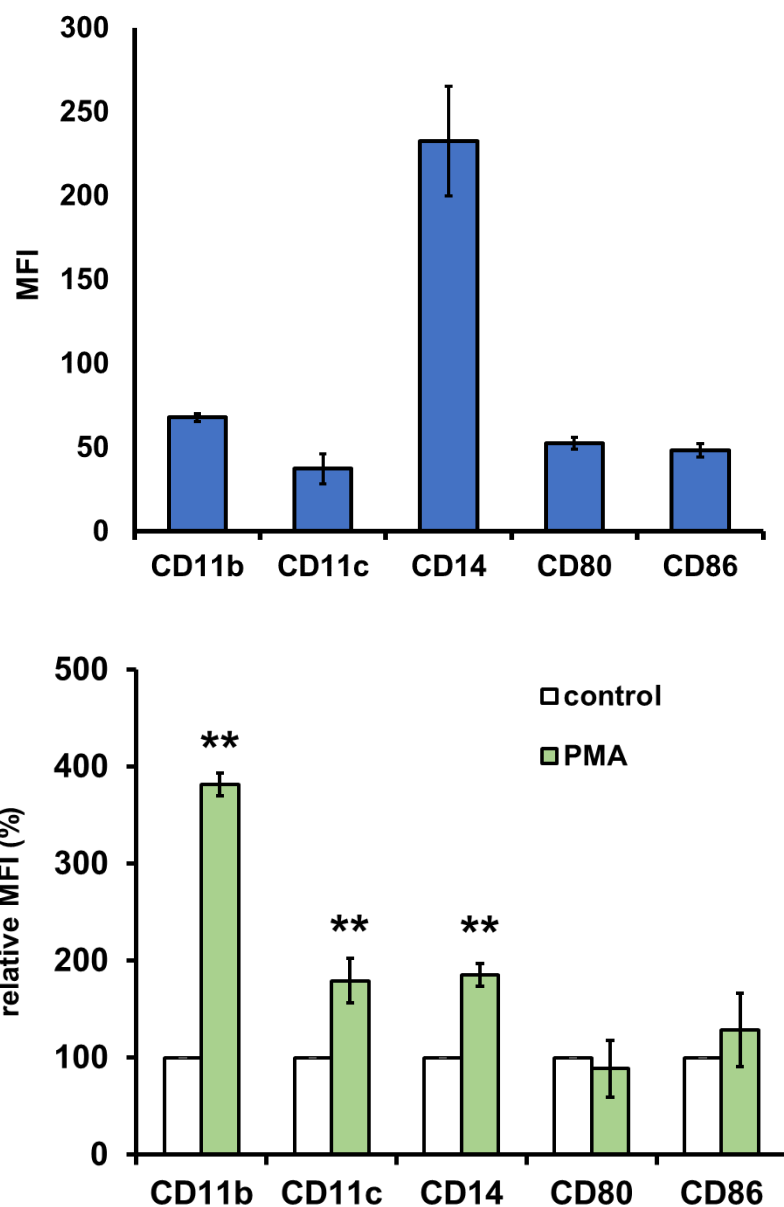


Fig. 9 マクロファージ様細胞への分化誘導による THP-1 細胞表面抗原の変化

PMA(100 nM)存在下で 2 日間培養した THP-1 細胞における細胞表面 CD11b、CD11c、CD14、CD80、CD86 をフローサイトメトリーにより定量した。結果は未処理の THP-1 細胞における値(青)を 100%として、平均値±標準偏差(n=3)で表した。** p<0.01

2-3-2 THP-1 細胞の樹状細胞様細胞への分化誘導

これまでに THP-1 細胞は IL-4 と GM-CSF の作用により未成熟樹状細胞様細胞に、IL-4、GM-CSF に加えて TNF- α を作用させることにより成熟樹状細胞様細胞に分化することが報告されている³⁵⁾。そこで IL-4 と GM-CSF の両者の共存下で 5 日間培養した THP-1 細胞、あるいは IL-4 と GM-CSF を添加して 5 日間培養したのちに、さらに IL-4、GM-CSF、TNF- α の共存下で 2 日間培養した THP-1 細胞に対して、樹状細胞様細胞への分化を確認した。分化の確認では、樹状細胞の細胞表面マーカーとして用いられる CD80 と CD86 およびマクロファージの細胞表面マーカーとして用いられる CD11b、CD11c、CD14 をフローサイトメトリーにより定量した。

その結果 Fig. 10 に示したように、未処理の THP-1 細胞と比較して、IL-4 と GM-CSF を作用させた THP-1 細胞では、樹状細胞の細胞表面マーカーである CD80 が有意に増加し、CD86 は有意差が認められなかったものの増加傾向を示した。一方で、マクロファージの細胞表面マーカーである CD11b は有意に増加し、有意差は認められなかったものの CD11c は増加傾向を、CD14 は減少傾向を示した。しかしながら、これらのマクロファージ細胞表面マーカーの変化は、樹状細胞の細胞表面マーカーに比べて小さかった。

この細胞表面抗原の変化は、さらに TNF- α を添加して 2 日間培養することにより強調され、CD80、CD86、CD11b、CD11c の増加、および CD14 の減少は、いずれも統計的な有意差を持って示された。なかでも、樹状細胞の細胞表面マーカーである CD80 と CD86 の増加が顕著であった。

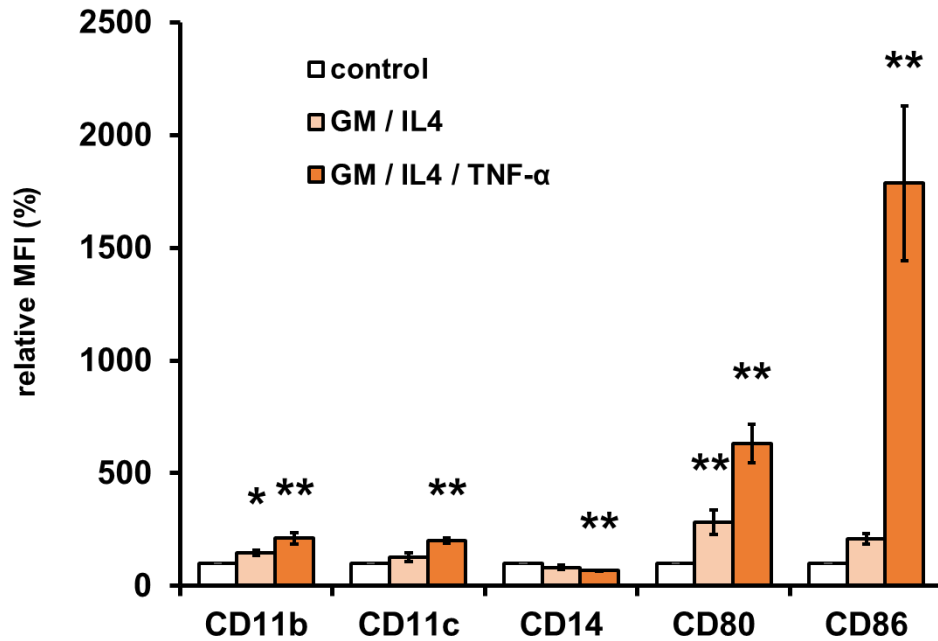


Fig. 10 樹状細胞様細胞への分化誘導による THP-1 細胞表面抗原の変化

GM-CSF (50 ng/mL) と IL-4 (35 ng/mL) の存在下で 5 日間培養した THP-1 細胞、または GM-CSF、IL-4 存在下で 5 日間培養後、さらに GM-CSF、IL-4、TNF- α (40 ng/mL) 共存下で 2 日間培養した THP-1 細胞における細胞表面抗原 CD11b、CD11c、CD14、CD80、CD86 をフローサイトメトリーにより定量した。結果は未処理の THP-1 細胞における値を 100% として、平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表した。* p<0.05、** p<0.01

第4節 考察

これまでに THP-1 細胞は PMA の作用によりマクロファージ様細胞に分化することが報告されている³⁴⁾。また、近年では THP-1 細胞を IL-4 と GM-CSF で刺激すると未成熟樹状細胞様細胞、IL-4、GM-CSF、TNF- α で刺激すると成熟樹状細胞様細胞に分化することが報告されている³⁵⁾。本章では、PMA あるいは上記のサイトカインの共存下で培養した THP-1 細胞で、実際に分化誘導が行われることを確認した。このために、マクロファージの細胞表面マーカーである CD11b、CD11c、CD14 および樹状細胞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定量し、解析した。その結果、Fig. 9 に示したように PMA を作用させた THP-1 細胞では、CD11b、CD11c、CD14 が増加し、CD80 と CD86 には有意な変化が認められなかった。マクロファージの細胞表面マーカーである CD11b、CD11c、CD14 が増加したことから、THP-1 細胞が PMA の作用により、マクロファージ様細胞へ分化することが確認された。

これに対し、Fig. 10 に示したように IL-4 と GM-CSF の存在下で培養した THP-1 細胞では、CD11b、CD80 の有意な増加が認められ、CD86 も有意差は示されなかったものの増加傾向が認められた。また、IL-4、GM-CSF 存在下で培養した後に、さらに TNF- α を加えて培養した THP-1 細胞では、CD11b、CD11c、CD80、CD86 の増加と CD14 の減少が有意に認められた。IL-4、GM-CSF、TNF- α を作用させた THP-1 細胞では、樹状細胞のマーカーである CD80 と CD86 が顕著に増加したこと、マクロファージのマーカーである CD14 が減少したことなどから、この操作で得られた細胞はマクロファージ様細胞とは異なる細胞に分化していると考えられた。

IL-4 および GM-CSF のみで THP-1 細胞を処理した場合にも、CD80、CD86

が増加していたが、その変化は IL-4、GM-CSF、TNF- α の 3 種のサイトカインで処理した場合よりも少なかった。CD80 と CD86 は T 細胞の活性化に関わる分子で、抗原を取り込んでいない食前未成熟樹状細胞では発現が少なく、食による抗原の取り込みと抗原由来ペプチドの MHC 分子へのローディングを経て成熟した樹状細胞において増加することが知られる³⁶⁾。すなわち、IL-4 と GM-CSF のみで処理した THP-1 細胞と IL-4、GM-CSF、TNF- α の 3 種のサイトカインを作用させた THP-1 細胞との CD80、CD86 の増加の程度の違いは、前者が未成熟樹状細胞様細胞に、後者が成熟樹状細胞様細胞に分化したことを反映していると考えられた。

樹状細胞の細胞表面マーカーとして用いられる CD80、CD86 だけでなく、マクロファージの細胞表面マーカーとして用いられる CD11b、および CD11c も、樹状細胞にわずかに発現していることが近年報告されている³⁶⁾。本研究においても、IL-4、GM-CSF の 2 種のサイトカインのみを作用させた THP-1 細胞と、IL-4、GM-CSF、TNF- α の 3 種のサイトカインを作用させた THP-1 細胞のいずれの場合においても、未処理の THP-1 細胞に比較して CD11b および CD11c がわずかに増加することが認められた。

本章では、各種細胞表面 CD 抗原の量の違いを検討することにより、THP-1 細胞は PMA の処理によりマクロファージ様細胞へ、IL-4、GM-CSF の 2 種のサイトカインの処理により未成熟樹状細胞様細胞へ、IL-4、GM-CSF、TNF- α の 3 種のサイトカインの処理により成熟樹状細胞様細胞への分化が誘導されることについて確認を行った。得られた結果は、上記の結論に矛盾しないものであった。

次章（第 3 章）では、上記の処理をした THP-1 細胞をそれぞれマクロファージ様細胞、未成熟樹状細胞様細胞、成熟樹状細胞様細胞であるとみなし、

oxaliplatin 処理した HT-29 細胞に対するこれらの細胞の貪食作用について検討することとした。

第3章 マクロファージ様細胞と樹状細胞様細胞による HT-29 細胞 の食食

正常な細胞では、ほとんどの calreticulin が小胞体内に存在し、小胞体内のカルシウムの恒常性の維持やタンパク質のフォールディングに寄与している^{5, 6)}。これらに加えて、抗がん剤などでアポトーシスを起こしたがん細胞では、calreticulin が小胞体から細胞表面に移行し、マクロファージや樹状細胞による食食を促進する“eat me” signal として機能することが、近年になり示されるようになってきている⁷⁾。さらに、mitoxantrone や oxaliplatin のような特定の抗がん剤などで処理したがん細胞では、通常のアポトーシスよりも抗腫瘍免疫応答を惹起しやすい免疫原性細胞死 (immunogenic cell death: ICD) を起こすことが示されている。ICD では、細胞表面 calreticulin の増加が主要な特徴の一つとして挙げられており¹¹⁾、この calreticulin が“eat me” signal として抗原提示細胞による食食を促進することにより、がん細胞特異的抗原の取り込みを介して免疫系の活性化に寄与している¹²⁾。

第一章では、HT-29 細胞の細胞表面の calreticulin が、oxaliplatin 処理後に一過的に増加し回復したのちに、再度持続的に増加する様子が観察された。このとき、前期の細胞表面 calreticulin の増加は小胞体ストレスに依存し、後期の増加はアポトーシスに依存することが示唆された。このため、これらの異なる機構により誘導される細胞表面 calreticulin には、それぞれ異なる役割が与えられている可能性が考えられた。

そこで本章では、HT-29 細胞の oxaliplatin 処理により増加する 2 種の細胞表面 calreticulin の食食における意義について知見を得るために、THP-1 細胞か

ら調製したマクロファージ様細胞または樹状細胞様細胞による oxaliplatin 処理 HT-29 細胞の貪食について検討した。

第 1 節 細胞株および試薬

3-1-1 細胞株

ヒト大腸がん細胞株 HT-29 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から、ヒト単球由来骨髄性白血病細胞株 THP-1 細胞は Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) から購入した。

3-1-2 試薬

ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) と RPMI1640 培地は日水製薬製、樹状細胞培養液 (ImmunoCult™-ACF Dendritic Cell Medium) は STEMCELL Technologies 社製、ウシ胎児血清 (FBS) は Biosera 社製、penicillin は萬有製薬製、streptomycin は明治製菓製を用いた。ヒトリコンビナント interleukin-4 (rhIL-4) とヒトリコンビナント GM-CSF (rhGM-CSF) は Pepro Tech 社製、ヒトリコンビナント TNF- α (rhTNF- α) は R&D Systems 社製を用いた。phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylserine (PS)、oxaliplatin (L-OHP) は和光純薬工業製、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit は SIGMA 社製を用いた。Blocking One はナカライテスク製、Calreticulin Blocking Peptide は BioVision 製を用いた。その他の試薬は SIGMA、ナカライテスクおよび和光純薬工業製の特級を用いた。

第 2 節 実験方法

3-2-1 細胞培養

HT-29 細胞は L-グルタミン (0.3 mg/mL)、penicillin (100 U/mL)、streptomycin (100 µg/mL)、FBS (10%) を添加した DMEM 培地を用いて、THP-1 細胞は L-グルタミン、penicillin、streptomycin、FBS を添加した RPMI1640 培地を用いて 5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の状態です継代培養した。

3-2-2 THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導

THP-1 細胞を 10% FBS/RPMI1640 培地で 5×10^5 cells/mL の細胞濃度に調整した後、24 ウェルプレートに播種し PMA (100 nM) の添加後、5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境で 48 時間培養することにより、マクロファージ様細胞への分化を誘導した。

3-2-3 THP-1 細胞の樹状細胞様細胞への分化誘導

THP-1 細胞の樹状細胞様細胞への分化誘導は、Berges らの方法に準じて行った³⁵⁾。THP-1 細胞を樹状細胞培養液で 5×10^5 cells/mL の細胞濃度に調整した後、24 ウェルプレートに播種し rhIL-4 (35 ng/mL)、rhGM-CSF (50 ng/mL) の添加後、5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境で 5 日間培養することにより未成熟樹状細胞様細胞への分化を誘導した。

得られた未成熟樹状細胞様細胞に rhIL-4、rhGM-CSF に加えて rhTNF-α (40 ng/mL) を添加し、5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境でさらに 2 日間培養することにより成熟樹状細胞様細胞への分化を誘導した。

3-2-4 HT-29 細胞に対する oxaliplatin 処理

HT-29 細胞を 10% FBS/DMEM 培地で 1×10^6 cells/mL の細胞濃度に調整し

た後、6 ウェルプレートに播種し一晚培養した。これらの細胞の培養液に終濃度 200 μM になるように oxaliplatin (100 mM in DMSO) を添加し、5% CO_2 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境で 4 時間または 48 時間培養した。

3-2-5 細胞表面 phosphatidylserine の定量

200 μM の oxaliplatin で 4 時間または 48 時間処理した HT-29 細胞を 0.02% EDTA/PBS を用いて回収し、PBS で洗浄した。FITC 標識 Annexin V (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した binding buffer (10 nM HEPES/NaOH pH7.4、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl_2) 50 μL で回収した細胞を懸濁した後、室温、暗所で 10 分間放置した。細胞を binding buffer で洗浄した後、FITC の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定した。得られた結果から平均蛍光強度を算出し、細胞表面 phosphatidylserine の量の相対値とした。

3-2-6 細胞表面 calreticulin の定量

200 μM の oxaliplatin で 4 時間あるいは 48 時間処理した HT-29 細胞を 0.02% EDTA/PBS を用いて回収し、PBS で洗浄した。1% BSA/PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した抗 calreticulin マウス IgG 抗体溶液 50 μL で回収した細胞を懸濁し、氷上で 30 分間反応させた。反応後、1% BSA/PBS で細胞を洗浄し、1% BSA/PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した Alexa Fluor® 488 標識抗マウス IgG ヤギ抗体溶液 50 μL で懸濁したのち、氷上でさらに 30 分間反応させた。反応後、1% BSA/PBS で細胞を洗浄し、1% BSA/PBS で 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した 7-AAD 50 μL で懸濁して細胞を染色した。染色後の各細胞が示す Alexa Fluor® 488 と 7-AAD の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。得られた結果を Flow Jo で解析した。7-AAD 陰性細胞における Alexa Fluor® 488 の平均蛍光強度を求め、1

次抗体の代わりに 1% BSA/PBS で処理した細胞の平均蛍光強度をブランクとして差し引いた値を、細胞表面 calreticulin の量の相対値とした。

3-2-7 PS リポソームの調製

PS リポソームは、Fadok らの方法に準じて調製した³⁷⁾。クロロホルム/メタノール (=9 : 1) でそれぞれ 13.5 mM に調製した phosphatidylserine と phosphatidylcholine を 3 : 7 で混合し、その 13.3 μ L を減圧下で乾固した。ここに HEPES buffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl₂) 54 μ L を加え、超音波ホモジナイザー (TOMY SEIKO 社、UR-20P) を用いて、氷上にて 5 分間超音波処理 (output level 5) することにより、PS リポソームの懸濁液 (5 mM) を調製した。

3-2-8 PKH26 による HT-29 細胞の蛍光標識

未処理あるいは 200 μ M の oxaliplatin で 4 時間または 48 時間処理した 1×10^6 cells の HT-29 細胞を、培養面に付着している細胞と浮遊している細胞を合わせて被貪食細胞として回収した。PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit 付属の希釈液 Diluent C で終濃度 1×10^{-6} M に希釈した PKH26 linker 100 μ L で回収した細胞を懸濁し、5 分間室温に放置した。PKH26 による細胞染色を止めるため、FBS 50 μ L を添加して 1 分間放置した後、PBS を 150 μ L 加えて懸濁した。細胞を PBS で洗浄した後、非特異的な貪食反応を抑えるために Blocking One 1 mL を加えて室温で 10 分間置いてから、再度 PBS で洗浄した。

3-2-9 貪食反応の解析

THP-1 細胞より分化させたマクロファージ様細胞あるいは樹状細胞様細胞を

貪食細胞として、oxaliplatin 処理した PKH26 標識 HT-29 細胞を被貪食細胞として用いた。24 ウェルプレートで THP-1 細胞の分化を誘導した後、培養液を取り除き、PKH26 標識 HT-29 細胞 (1×10^6 cells) を 1 mL の 10%FBS 添加 DMEM に懸濁して添加した。これを 5% CO₂ 存在下、37°C、水蒸気飽和の環境で 30 分間において貪食反応を行わせた。貪食反応後、未反応の HT-29 細胞を培養液とともに除き、プレートに付着した貪食細胞を PBS で洗浄した後に、貪食細胞上に非特異的に接着した HT-29 細胞を除去するために 0.02% EDTA/PBS を加えて 1 分間放置後、さらに PBS で洗浄した。さらに、0.02% EDTA/PBS を加えて 37°C で 10 分間置くことで、プレートに付着した貪食細胞を回収した。得られた細胞が示す、PKH26 の蛍光強度をフローサイトメトリーにより定量し、Flow Jo により結果を解析した。HT-29 細胞と共培養しなかった貪食細胞よりも高い蛍光強度を示す細胞を、PKH26 標識 HT-29 細胞を貪食した細胞として、貪食細胞全体に対する割合 (貪食率) を算出した。貪食阻害実験では、PKH26 標識 HT-29 細胞と共に Calreticulin Blocking Peptide (10 µg/mL) または PS リポソーム (50 µM) を貪食細胞に添加したのち、同様に貪食反応の解析を行った。

3-2-10 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。2 標本間の有意差検定には Student's t-test、多群間の比較には一元配置分散分析と Dunnett's multiple comparison test を用いて解析し、有意水準 $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。解析ソフトは Easy R を用いた²²⁾。

第 3 節 結果

3-3-1 oxaliplatin 4 時間処理後の HT-29 細胞に対する貪食作用

HT-29 細胞の oxaliplatin 処理により、二相性の増加を示した細胞表面 calreticulin が貪食に関与するのかを検討するために、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞を被貪食細胞とし、THP-1 細胞から調製したマクロファージ様細胞、樹状細胞様細胞を貪食細胞とした貪食作用について検討した。oxaliplatin で処理した HT-29 細胞を回収し、PKH26 で蛍光染色した後、マクロファージ様細胞または樹状細胞様細胞に加えて 30 分間培養した。培養後、貪食されていない HT-29 細胞を除去し、貪食細胞に取り込まれた PKH26 の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定することで、この測定値を貪食作用の指標とした。PKH26 の蛍光が検出された細胞が HT-29 細胞を貪食した細胞であるとし、これらの細胞が全細胞中に占める割合を貪食率として算出した。まず、200 μ M の oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞に対する貪食について検討した (Fig. 11)。その結果、HT-29 細胞の oxaliplatin 処理により、未成熟樹状細胞様細胞による貪食反応が顕著に亢進された。一方、マクロファージ様細胞あるいは成熟樹状細胞様細胞による貪食については、HT-29 細胞の oxaliplatin 処理による有意な変化は認められなかった。また、成熟樹状細胞様細胞を貪食細胞とした場合には、未処理、oxaliplatin 処理後のいずれの HT-29 細胞に対しても、未成熟樹状細胞様細胞と比べて貪食率が低かった。

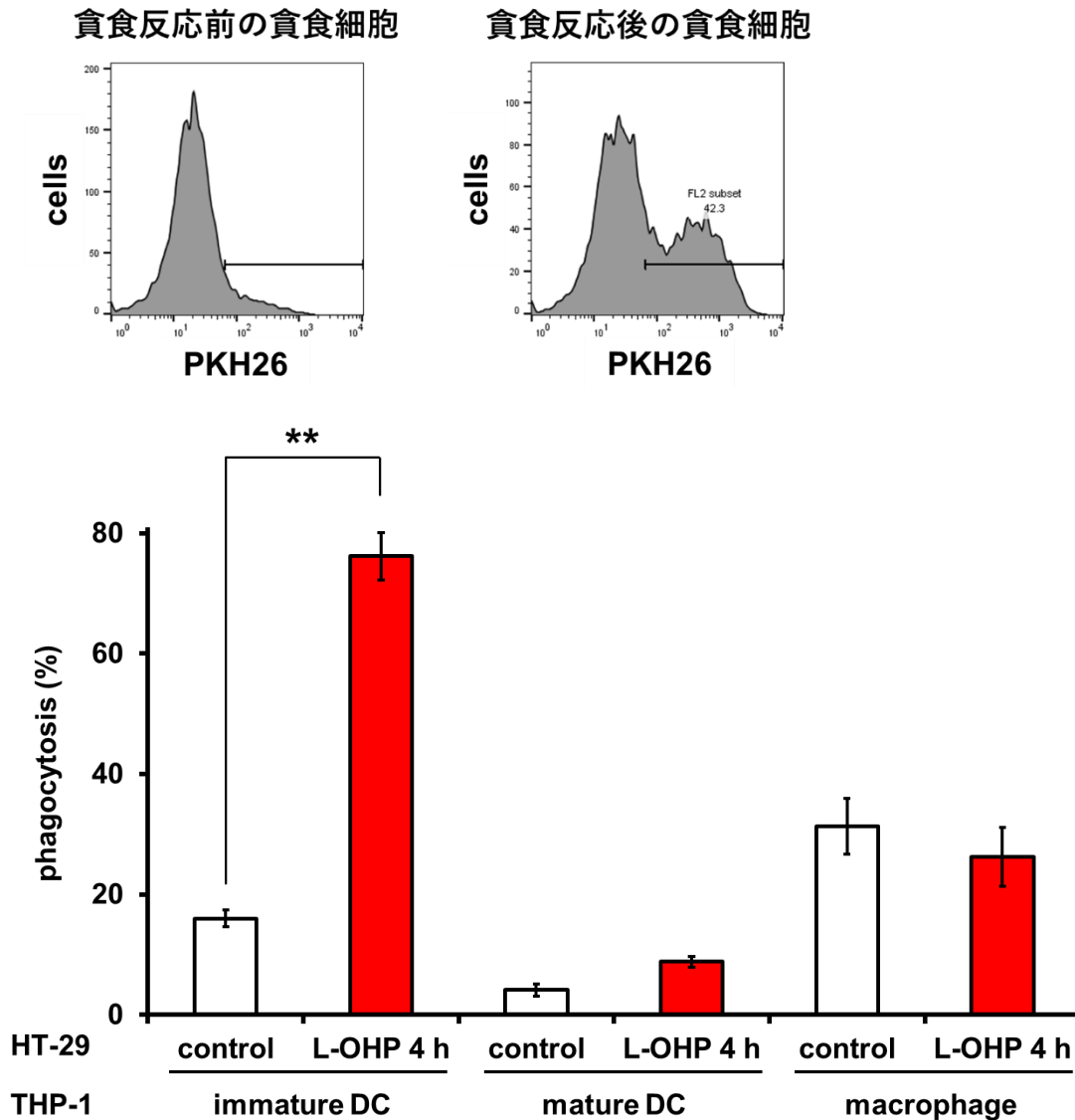


Fig. 11 oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞に対する貪食作用

oxaliplatin (200 μ M) で 4 時間処理した HT-29 細胞を PKH26 で染色した。染色後の HT-29 細胞を、未成熟樹状細胞様細胞、成熟樹状細胞様細胞あるいはマクロファージ様細胞とともに 30 分間培養した。培養後に回収した各貪食細胞における PKH26 の蛍光をフローサイトメトリーにより解析した。結果は平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表した。** p<0.01

3-3-2 oxaliplatin 48 時間処理後の HT-29 細胞に対する貪食作用

次に、200 μ M oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞を被貪食細胞とし、この細胞に対するマクロファージ様細胞と未成熟樹状細胞様細胞の貪食作用に

ついて検討した (Fig. 12)。その結果、HT-29 細胞の oxaliplatin 処理により、マクロファージ様細胞による貪食の亢進が認められたが、未成熟樹状細胞様細胞による貪食反応には変化が見られなかった。

以上の、oxaliplatin で 4 時間あるいは 48 時間処理した HT-29 細胞に対する貪食反応の検討から、未成熟樹状細胞様細胞は oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞を積極的に貪食し、マクロファージ様細胞は oxaliplatin 48 時間処理の HT-29 細胞を積極的に貪食することが示された。これらの結果より、未成熟樹状細胞とマクロファージでは、異なる標的細胞を優先的に貪食することが示唆された。

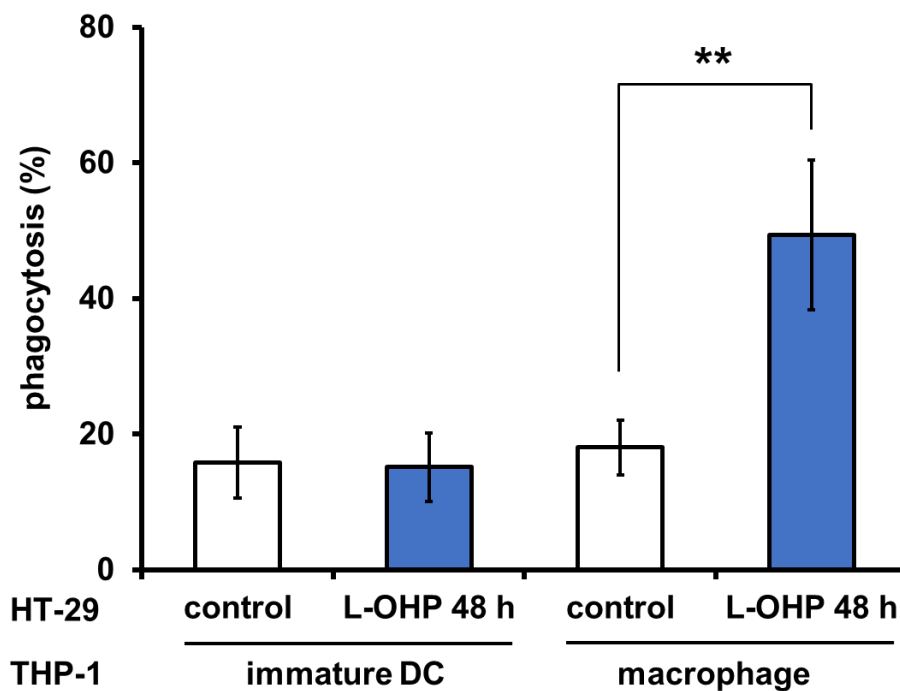


Fig. 12 oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞に対する貪食作用

oxaliplatin (200 μ M) で 48 時間処理した HT-29 細胞を PKH26 で染色した。染色後の HT-29 細胞を、未成熟樹状細胞様細胞、マクロファージ様細胞とともに 30 分間培養した。培養後に回収した各貪食細胞における PKH26 の蛍光をフローサイトメトリーにより解析した。結果は平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表した。** p < 0.01

3-3-3 oxaliplatin 処理した HT-29 細胞の細胞表面 phosphatidylserine の解析

リン脂質である phosphatidylserine は正常時の細胞では細胞膜の内葉に局在しているが、アポトーシスを起こした細胞では phosphatidylserine が細胞膜内葉から細胞表面へ移行すること、細胞表面 phosphatidylserine はアポトーシス細胞の代表的な “eat me” signal であることがよく知られている。

第 1 章の解析結果から、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の増加にはアポトーシスが関与していることが示唆された。そこで、200 μ M oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞における、アポトーシス細胞の “eat me” signal である、phosphatidylserine の細胞表面への移行について検討した。

フローサイトメトリーにより細胞表面に存在する calreticulin と phosphatidylserine を定量した (Fig. 13)。その結果、これまでに確認した通り、200 μ M の oxaliplatin で 4 時間あるいは 48 時間処理した HT-29 細胞のいずれにおいても、細胞表面 calreticulin の増加が認められた。これに対して、細胞表面に存在する phosphatidylserine は、oxaliplatin 処理で 48 時間処理した HT-29 細胞において増加したが、4 時間の処理では有意な増加は認められなかった。

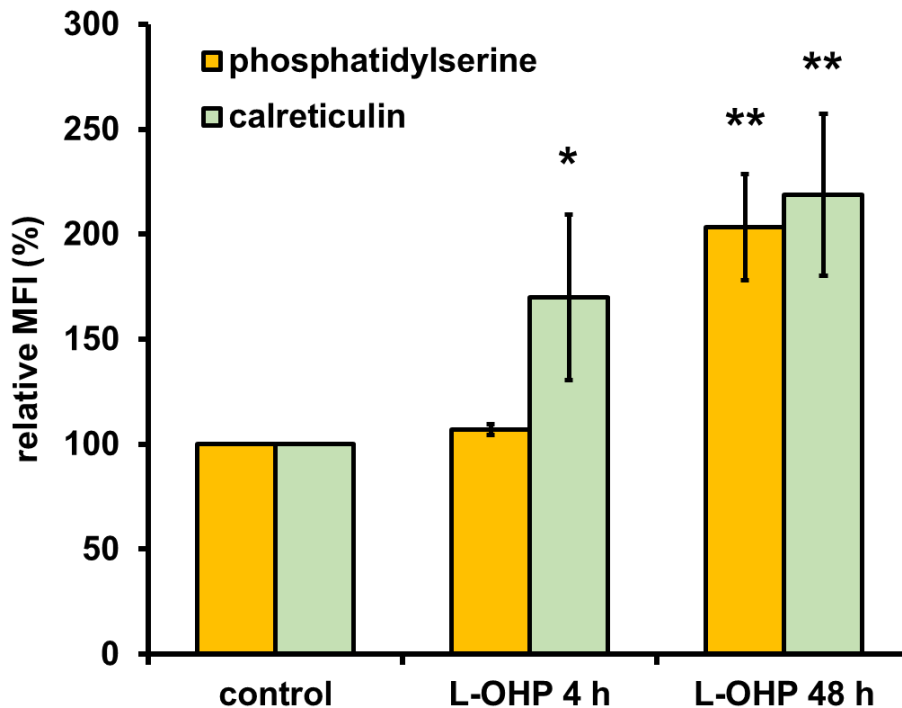


Fig. 13 oxaliplatin 処理による細胞表面 phosphatidylserine と細胞表面 calreticulin の変化

oxaliplatin (200 μ M) で 4 時間あるいは 48 時間処理した HT-29 細胞を、FITC 標識 Annexin V (5 μ g/mL)、または抗 calreticulin 抗体および Alexa Fluor® 488 標識 2 次抗体と反応させ、細胞表面に存在する phosphatidylserine または calreticulin の量をフローサイトメトリーにより測定し、未処理の HT-29 細胞における値を 100% として表した。結果は平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表した。* p<0.05、** p<0.01

3-3-4 Calreticulin Blocking Peptide あるいは PS リポソームの貪食作用に対する影響

oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞に対する未成熟樹状細胞様細胞の貪食において、本研究で確認した HT-29 細胞表面の calreticulin が認識されているかについて確認するため、calreticulin の C 末側領域の一部と同じアミノ酸配列からなる合成ペプチド (Calreticulin Blocking Peptide) を貪食に対する阻害剤として貪食反応時に添加し、貪食反応に対する影響について検討した。その

結果、oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞に対する未成熟樹状細胞様細胞の貪食は、Calreticulin Blocking Peptide により著しく阻害され、この貪食反応に oxaliplatin 処理による細胞表面 calreticulin の増加が強く寄与していることが示唆された (Fig. 14)。

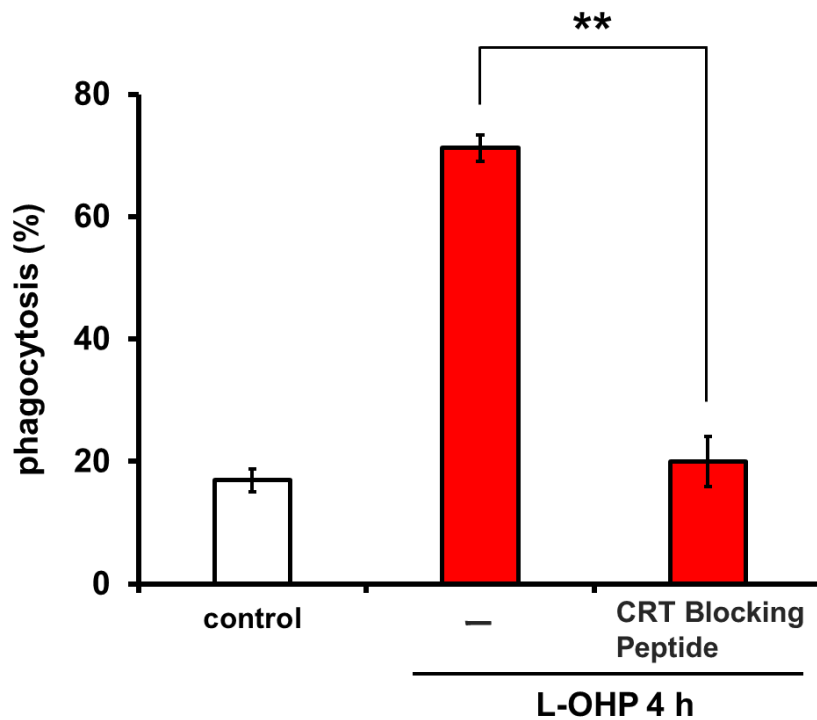


Fig. 14 Calreticulin Blocking Peptide による未成熟樹状細胞様細胞の貪食作用への影響
oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞を PKH26 で染色後、Calreticulin Blocking Peptide の存在下あるいは非存在下で未成熟樹状細胞様細胞とともに 30 分間培養した。培養後に回収した未成熟樹状細胞様細胞における PKH26 の蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。結果は平均値±標準偏差(n=3)で表した。** p<0.01

一方、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞に対するマクロファージ様細胞の貪食が Calreticulin Blocking Peptide により阻害され、この貪食反応にも oxaliplatin 処理で増加した細胞表面 calreticulin が寄与していることが示唆された。しかし、Calreticulin Blocking Peptide によるマクロファージ様細胞の貪

食反応の阻害は部分的であったことからマクロファージ様細胞による貪食作用には他の因子も関与している可能性が考えられた (Fig. 15)。そこでアポトーシス細胞の代表的な “eat me” signal として知られ、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞でも増加することが確認された細胞表面 phosphatidylserine がマクロファージ様細胞による貪食反応に関与している可能性を考えた。これを検証するため、細胞表面 phosphatidylserine を介した細胞間相互作用に競合する PS リポソームを貪食反応時に添加し、貪食反応に対する影響について検討した。その結果、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞に対するマクロファージ様細胞の貪食作用は、PS リポソームにより顕著に阻害された (Fig. 15)。この結果より、マクロファージ様細胞による oxaliplatin 処理 HT-29 細胞の貪食には、細胞表面 phosphatidylserine が主要に関与し、細胞表面 calreticulin は補助的な機能を果たしていることが示唆された。

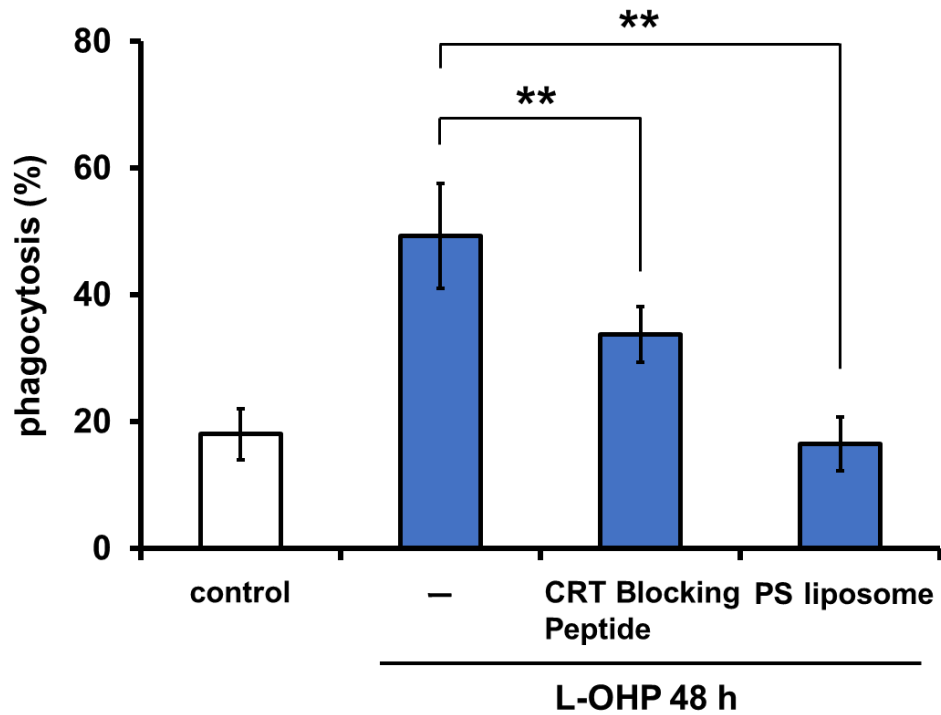


Fig. 15 Calreticulin Blocking Peptide および PS リポソームによるマクロファージ様細胞の貪食作用への影響

oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞を PKH26 で染色した後、Calreticulin Blocking Peptide または PS リポソームの存在下あるいは両者の非存在下で、マクロファージ様細胞とともに 30 分間培養した。培養後に回収したマクロファージ様細胞における PKH26 の蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。結果は平均値±標準偏差 (n=3) で表した。** p<0.01

第4節 考察

本章では、oxaliplatin 処理により二相性で増加した細胞表面 calreticulin の貪食作用における意義について検討した。特に、前期と後期に誘起される calreticulin の増加が、貪食作用において異なる役割を果たしているかについて着目をした。まず、oxaliplatin で4時間処理し、前期の細胞表面 calreticulin の増加が誘導された HT-29 細胞を用いて、THP-1 細胞から分化させて得たマクロファージ様細胞、未成熟樹状細胞様細胞、成熟樹状細胞様細胞の各貪食細胞における貪食作用について検討したところ、Fig. 11 に示したように、未成熟樹状細胞様細胞による貪食が HT-29 細胞の oxaliplatin 処理により亢進した。さらに、この未成熟樹状細胞様細胞による貪食が Calreticulin Blocking Peptide の共存により阻害されたことから (Fig. 14)、小胞体ストレスにより前期で増加した細胞表面 calreticulin が、未成熟樹状細胞様細胞に認識されて貪食作用を誘起することが示唆された。通常のアポトーシスと比べて抗腫瘍免疫応答を惹起しやすい ICD による細胞死では、小胞体ストレスによる calreticulin の小胞体から細胞表面への移行が特徴の一つであり、細胞表面 calreticulin を介してがん細胞を貪食した未成熟樹状細胞が成熟し、取り込んだがん細胞特異的抗原をヘルパーT細胞に提示することにより、がん細胞に対する免疫応答の活性化を促進する³⁸⁾。本研究では、貪食後の未成熟樹状細胞様細胞の成熟や T 細胞の活性化については解析できなかったが、前期で増加した細胞表面 calreticulin を介して未成熟樹状細胞様細胞による貪食作用が亢進されたことから、このような前期の細胞表面 calreticulin はヘルパーT細胞への抗原提示に寄与するものであると考えられた。

近年、小胞体ストレスを誘導したがん細胞で、増加した細胞表面 calreticulin が細胞表面から放出されること³⁰⁾、リコンビナント calreticulin の投与により

樹状細胞が成熟することが報告されている³⁹⁾。これらのことから、小胞体ストレスにより増加した細胞表面 calreticulin は、“eat me” signal として未成熟樹状細胞による貪食を亢進することによりがん細胞特異的抗原を取り込ませるだけではなく、さらに細胞の表面から遊離することで抗原を取り込んだ未成熟樹状細胞の成熟にも貢献していることが考えられる。

一方、マクロファージ様細胞では、oxaliplatin で HT-29 細胞を 48 時間処理し、後期の細胞表面 calreticulin の増加を誘導することにより、HT-29 細胞に対する貪食作用が亢進された (Fig. 12)。このマクロファージ様細胞による貪食作用に関しても Calreticulin Blocking Peptide の共存により阻害されたことから、アポトーシスにより後期で増加した細胞表面 calreticulin がマクロファージ様細胞に認識されて貪食作用を誘起することが示唆された。生体内では、アポトーシスを起こした細胞はマクロファージなどによって速やかに貪食除去されていると考えられていることから⁴⁰⁾、アポトーシスと関連して増加した後期の細胞表面 calreticulin は、死細胞の貪食除去を促す役割を持っていることが考えられる。すなわち、前期と後期で増加した細胞表面 calreticulin はいずれも“eat me” signal としての役割を持って貪食細胞に認識されるが、それぞれ異なる生理的意義を有していると推測された。

oxaliplatin 処理で 4 時間あるいは 48 時間処理した HT-29 細胞は、どちらも細胞表面における calreticulin 量が増加していたにもかかわらず (Fig. 13)、未成熟樹状細胞様細胞による HT-29 細胞の貪食は、oxaliplatin 4 時間処理により亢進したが、oxaliplatin 48 時間処理の HT-29 細胞に対する貪食と未処理の HT-29 細胞の貪食との間では、有意な違いが認められなかった。これに対し、マクロファージ様細胞では、oxaliplatin 48 時間処理により HT-29 細胞に対する貪食が亢進したが、oxaliplatin 4 時間処理の HT-29 細胞に対する貪食は、未処理

の HT-29 細胞と同じ程度であったことから、同じ “eat me” signal を介した貪食であっても、貪食細胞の種類によって標的となる細胞を認識する機構が異なることが示唆された。

未成熟樹状細胞様細胞とマクロファージ様細胞において貪食の標的として認識される細胞が異なる原因として、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞の表面に増加した calreticulin と他の細胞表面分子との相互作用の違いが影響している可能性が考えられる。calreticulin は、その構造中に膜貫通領域を持っていないため、他の細胞表面分子との結合を介して細胞表面に局在していると考えられている^{6, 27)}。アポトーシスに先行する細胞表面 calreticulin の増加では、calreticulin はシャペロンタンパク質である endoplasmic reticulum resident protein 57 (ERp57) と共に細胞表面に移行し、細胞表面で共局在していることが報告されている^{28, 29)}。アポトーシス細胞の指標とされる細胞表面 phosphatidylserine の量は、oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞と oxaliplatin 処理をしていない HT-29 細胞との間で差が見られなかったことから (Fig. 13)、oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞の多くはアポトーシスの過程が開始される前の段階の細胞であり、前期で増加した細胞表面 calreticulin は ERp57 と共局在していることが考えられる (Fig. 16)。

未成熟樹状細胞様細胞が oxaliplatin 4 時間処理後の HT-29 細胞を貪食する際には、HT-29 細胞表面の calreticulin が認識されることが示唆されたことから、未成熟樹状細胞様細胞の貪食には細胞表面 calreticulin と ERp57 の相互作用が重要であることが考えられる。一方で、第一章で示したように oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞で見られるような後期の細胞表面 calreticulin の増加には、アポトーシスが関与することが示唆される。このとき、アポトーシス細胞の

指標となる細胞表面 phosphatidylserine が、HT-29 細胞で検出されたことから、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞は、アポトーシスの過程に進入した細胞が多く含まれていると考えられる。アポトーシス細胞において増加した細胞表面 calreticulin は、phosphatidylserine と細胞膜上で共局在していることが報告されていることから⁴¹⁾、oxaliplatin 48 時間処理後の HT-29 細胞において細胞表面に移行した calreticulin は、細胞表面で phosphatidylserine と共局在していると推測される (Fig. 16)。細胞表面 phosphatidylserine はアポトーシス細胞の代表的な “eat me” signal であり、oxaliplatin 48 時間処理後の HT-29 細胞のマクローファージ様細胞による貪食には、細胞表面 calreticulin と細胞表面 phosphatidylserine の両者が関与していることが示唆された。したがって、アポトーシスが誘起された HT-29 細胞のマクローファージ様細胞による貪食には、細胞表面における calreticulin と phosphatidylserine の相互作用が重要であると考えられる。

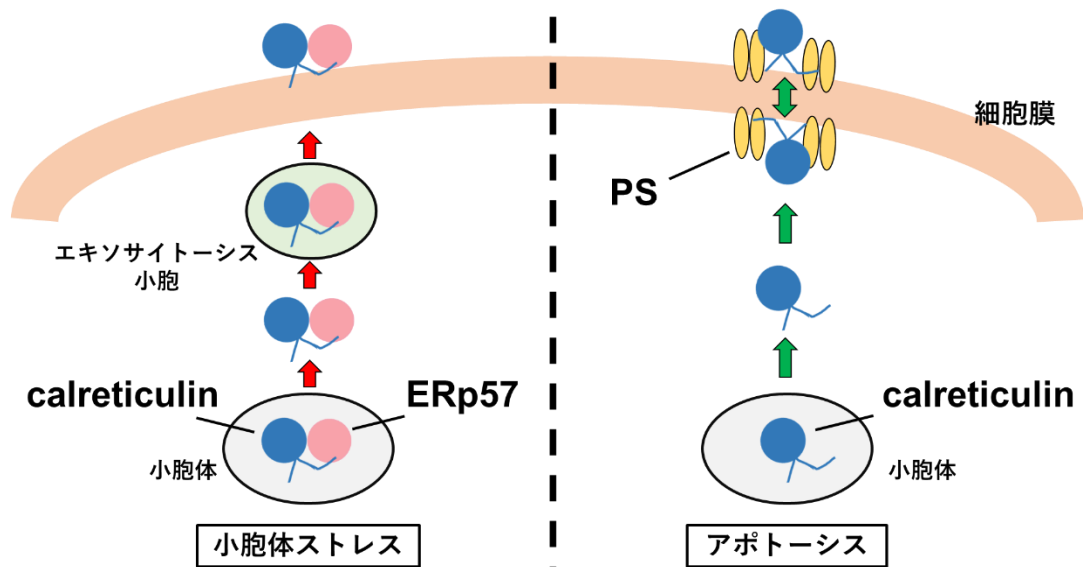


Fig. 16 小胞体ストレスあるいはアポトーシスによる calreticulin の細胞表面への移行と細胞表面 calreticulin の相互作用

さらに、被貪食細胞の細胞表面 calreticulin と補体の component 1q (C1q) との相互作用が、貪食作用に影響することも報告されており⁴²⁾、細胞表面での calreticulin と他の分子との相互作用が貪食細胞による認識に影響し、それによって細胞表面 calreticulin の生理的役割が決定されることは十分に考えられる。本研究では、細胞表面 calreticulin の他の分子との相互作用に関する解析を行うことはできなかったが、今後、細胞表面 calreticulin と ERp57、phosphatidylserine、C1q などとの相互作用が貪食作用に与える影響についても注目していきたい。

一方で、未成熟樹状細胞様細胞とマクロファージ様細胞の貪食作用の違いには、貪食細胞上に発現する分子の違いが影響している可能性も考えられる。calreticulin を介した貪食には、貪食細胞上の lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) と被貪食細胞上の calreticulin との相互作用が関与していることが明らかにされているが⁷⁾、近年、LRP-1 以外に scavenger receptor class-A (SR-A) と scavenger receptor expressed by endothelial cell-I (SREC-I) も calreticulin と相互作用することが報告されている^{43, 44)}。さらに、細胞表面 calreticulin が増加したがん細胞を標的とした樹状細胞による貪食が LRP-1 の阻害による影響を受けないこと、樹状細胞において SR-A と SREC-I の発現が高まっており、細胞表面 calreticulin を介した貪食にこの樹状細胞上の SR-A と SREC-I が関与している可能性があることが報告されている¹⁴⁾。本研究では、Calreticulin Blocking Peptide により未成熟樹状細胞様細胞の貪食作用は著しく阻害された一方で、マクロファージ様細胞の貪食作用の阻害は部分的であったことから、LRP-1 や SR-A、SREC-I の発現の違いが未成熟樹状細胞様細胞とマクロファージ様細胞による細胞表面 calreticulin を介した貪食作用の違いに反映されているのかもしれない。

アポトーシス細胞の貪食については、貪食細胞上の CD14 が関与していることがこれまでに報告されている⁴⁵⁾。Fig. 9 および 10 で示したように、本研究で用いたマクロファージ様細胞では、分化前の THP-1 細胞と比べて CD14 が増加していた。対して、樹状細胞様細胞の CD14 の量は、分化前の THP-1 細胞と比べて変化がないか減少する傾向にあった。この CD14 の量的な違いが、未成熟樹状細胞様細胞とマクロファージ様細胞による oxaliplatin 48時間処理後の HT-29 細胞に対する貪食作用に影響している可能性も考えられる。

以上のように、細胞の貪食は被貪食細胞上の“eat me” signal の発現だけでなく、様々な要因により制御されていることが考えられる。本研究では、“eat me” signal の 1 つである細胞表面 calreticulin に腫瘍抗原提示における役割と死細胞の貪食除去における役割の 2 つの役割がある、という可能性を提起し、これに関する重要な知見を示すことができた。これらの 2 つの役割を区別するものとして、被貪食細胞上に局在する calreticulin が置かれている環境や相互作用する分子、貪食細胞表面上に発現する“eat me” signal 受容体の違い等が考えられる。本研究では、これらについての検討を行えなかったが、今後はこれらの違いが貪食の標的の選別に影響を与えるかについても注目して解析する必要がある。

総括

calreticulin は主に小胞体内に存在し、カルシウム結合タンパク質として小胞体内カルシウムの恒常性の維持に関与するとともに、シャペロンタンパク質として主に糖タンパク質のフォールディングを担っている。さらに、わずかに細胞表面にも存在し、細胞の接着や遊走などに関与している多くの機能をもったタンパク質である。プログラムされた細胞死であるアポトーシスを誘発した細胞は、細胞表面に貪食を誘発する“eat me” signal を発現することでマクロファージや樹状細胞により速やかに貪食除去されている。抗がん剤や放射線などで処理したがん細胞では、アポトーシスにともない calreticulin が小胞体から細胞表面へと移行し、増加した細胞表面 calreticulin は“eat me” signal として機能することが明らかになっている。また、anthracycline 系抗がん剤の mitoxantrone や白金製剤の oxaliplatin など特定の抗がん剤では、小胞体ストレスを介した細胞表面 calreticulin の増加が確認されている。これまでに当教室では、ヒト大腸がん由来の培養細胞株 HT-29 細胞を mitoxantrone で処理することにより、細胞表面 calreticulin が一過的に増加して回復した後に、再度持続的に増加する二相性のパターンで増加すること、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に関与していることを示した。異なる機構によって細胞表面に移行することで引き起こされる前期および後期の細胞表面 calreticulin の増加は、貪食作用に対してもそれぞれ異なる役割を持っているのではないかと推測されたが、それらの生理的意義については明らかにされていなかった。

そこで、本研究では二相性で増加する細胞表面 calreticulin の貪食における意義を明確にすることを目的として、oxaliplatin で処理した HT-29 細胞における

細胞表面 calreticulin について解析するとともに、ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 細胞から分化誘導したマクロファージ様細胞と樹状細胞様細胞を用いて oxaliplatin 処理 HT-29 細胞に対する貪食反応について検討した。

これまでに、oxaliplatin 処理したがん細胞で細胞表面 calreticulin の増加が起こることが示されていることから、oxaliplatin 処理 HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の経時変化について検討したところ、mitoxantrone で処理した場合と同様に、処理開始後 4 時間をピークとした前期と 24 時間以降の持続した後期の増加が起こることが確認された。そこで、それぞれの細胞表面 calreticulin の増加に小胞体ストレスやアポトーシスが関与しているかについて検討を行った。小胞体ストレスの指標のひとつとなる eIF2 α のリン酸化が oxaliplatin 処理開始後 0.5~6 時間の HT-29 細胞で確認され、小胞体ストレスにより活性化される caspase-12 の阻害により oxaliplatin 4 時間処理 HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin の増加が抑制された。一方、アポトーシスにより増加するとされる細胞表面 calnexin の増加が oxaliplatin 処理開始後 24 時間以降で確認され、アポトーシス活性化因子である caspase-3 の阻害により oxaliplatin 48 時間処理 HT-29 細胞における細胞表面 calreticulin 増加が抑制された。

以上の結果から、oxaliplatin 処理 HT-29 細胞における前期での細胞表面 calreticulin の増加は小胞体ストレスにより活性化した caspase-12 を介していること、後期での細胞表面 calreticulin の増加には caspase-3 の活性化を介したアポトーシスが関与していることが示唆された。

これまでに、THP-1 細胞に PMA を処理するとマクロファージ様細胞に、IL-

4 と GM-CSF を作用させると未成熟樹状細胞様細胞に、得られた未成熟樹状細胞様細胞にさらに IL-4 と GM-CSF、TNF- α を作用させると成熟樹状細胞様細胞に分化誘導できることが報告されている。そこで、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞に対する貪食作用を検討するための貪食細胞を調製することを目的として、THP-1 細胞を PMA 共存下で 48 時間、あるいは IL-4 と GM-CSF の共存下で 5 日間培養して、マクロファージ様細胞と未成熟樹状細胞様細胞への分化を試みた。さらに、未成熟樹状細胞様細胞を IL-4 と GM-CSF、TNF- α の共存下でさらに 2 日間培養して成熟樹状細胞様細胞とした。これらの分化が意図した通りに誘導されていることを確認するために、マクロファージや樹状細胞への分化の指標となる細胞表面抗原（細胞表面マーカー）の発現について解析した。PMA で処理した THP-1 細胞では、マクロファージの細胞表面マーカーである CD11b、CD11c、CD14 が増加し、樹状細胞の細胞表面マーカーである CD80 と CD86 は変化が認められなかった。一方、IL-4 と GM-CSF を作用させた THP-1 細胞では、CD11b、CD80、CD86 が増加し、CD14 が減少する傾向を示した。この IL-4 と GM-CSF で刺激した THP-1 細胞における細胞表面抗原の変化は、成熟樹状細胞様細胞への分化を誘導する処理によりさらに強調され、統計的な有意差を持って認められるようになった。

以上の結果から、THP-1 細胞は PMA 処理によりマクロファージ様細胞に分化していると考えられた。また、THP-1 細胞に IL-4 と GM-CSF を作用させることにより未成熟樹状細胞様細胞に、未成熟樹状細胞様細胞にさらに IL-4、GM-CSF、TNF- α を作用させることにより成熟樹状細胞様細胞に分化したと考えられた。

これまでに、抗がん剤や放射線などの作用でアポトーシスを誘発したがん細胞

胞において細胞表面に移行した calreticulin は “eat me” signal としてマクロファージや樹状細胞などによる貪食を促進することが知られている。また、細胞表面 calreticulin を介してがん細胞を貪食した樹状細胞は、腫瘍細胞に特異的な抗原を提示することでヘルパーT 細胞を活性化し、抗腫瘍免疫応答を誘導する。本研究の結果より、HT-29 細胞を oxaliplatin で処理したところ、細胞表面 calreticulin が二相性で増加し、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していることが示された。そこで、oxaliplatin により増加する細胞表面 calreticulin の貪食作用への関与を検討するために、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞を被貪食細胞として、THP-1 細胞から分化誘導したマクロファージ様細胞または樹状細胞様細胞による貪食反応について検討した。まず、oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞に対する貪食反応と未処理の HT-29 細胞に対する貪食反応を比較したところ、未成熟樹状細胞様細胞による貪食反応には oxaliplatin 処理による亢進が認められたが、マクロファージ様細胞による貪食反応では有意な変化が認められなかった。これに対して、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞に対する貪食反応と未処理の HT-29 細胞に対する貪食反応を比較したところ、マクロファージ様細胞による貪食反応の亢進が示されたが、未成熟樹状細胞様細胞による貪食反応では有意な変化は示されなかった。これらの結果から、未成熟樹状細胞様細胞とマクロファージ様細胞では、それぞれ異なる標的細胞を優先的に貪食することが示唆された。さらに、これらの貪食作用に細胞表面 calreticulin が関与しているかについて検討するため、calreticulin の C 末側領域に由来する合成ペプチドである Calreticulin Blocking Peptide を calreticulin の分子間結合を抑制する阻害剤として用い、このペプチドの貪食反応への影響について調べた。その結果、oxaliplatin で 4 時間処理した HT-29 細胞に対する未成熟樹状細胞様細胞の貪食反応は、Calreticulin

Blocking Peptide により著しく阻害された。一方、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞に対するマクロファージ様細胞の貪食反応の Calreticulin Blocking Peptide による阻害は、部分的なものであった。この結果より、今回の研究で確認されたマクロファージ様細胞による貪食反応には、細胞表面 calreticulin 以外の因子が関与していることが考えられた。oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞はアポトーシスを誘発しており、アポトーシス細胞における代表的な “eat me” signal として知られる phosphatidylserine が細胞表面に増加していたことから、phosphatidylserine の貪食への寄与を検討した。このために、phosphatidylserine を介した細胞間認識反応を競合的に阻害する PS リポソームを用い、貪食反応に対する影響を解析した。その結果、oxaliplatin で 48 時間処理した HT-29 細胞に対するマクロファージ様細胞の貪食反応は、PS リポソームにより著しく阻害された。

以上の結果から、HT-29 細胞において oxaliplatin 処理の前期で増加した細胞表面 calreticulin は、未成熟樹状細胞様細胞による貪食において “eat me” signal として認識されること、oxaliplatin 処理の後期で増加した細胞表面 calreticulin は細胞表面 phosphatidylserine とともにマクロファージ様細胞による貪食に寄与することが示唆された。

以上、本研究により、oxaliplatin 処理した HT-29 細胞では細胞表面 calreticulin が二相性で増加し、前期の増加には小胞体ストレスや caspase-12 の活性化が、後期の増加には caspase-3 を介したアポトーシスが関与していることが示唆された。また、前期で一過性に増加した細胞表面 calreticulin は未成熟樹状細胞様細胞による貪食反応に寄与し、後期で持続的に増加した細胞表面 calreticulin はマクロファージ様細胞による貪食反応に寄与することが示唆され

る結果を得た (Fig. 17)。

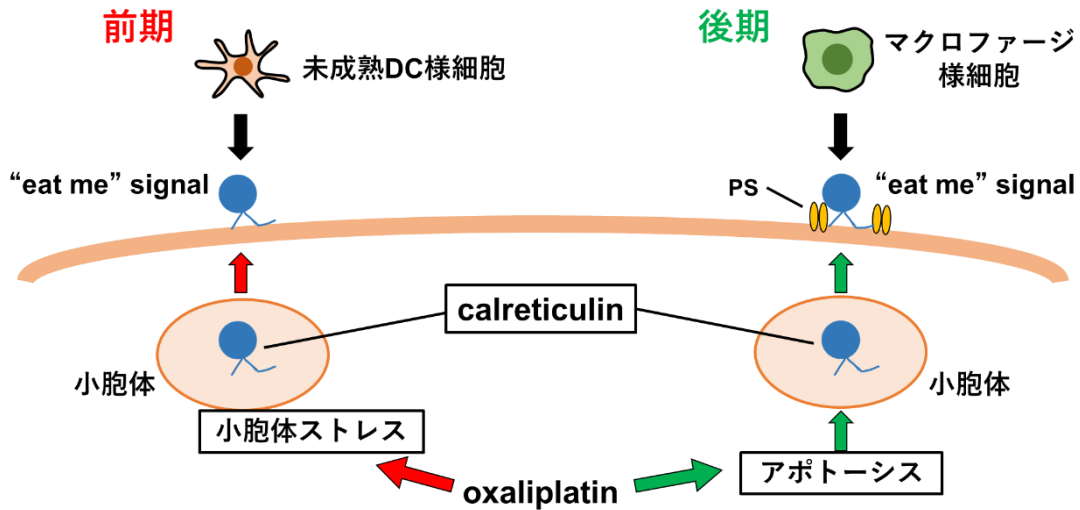


Fig. 17 oxaliplatin 処理により細胞表面に二相性で増加する calreticulin の貪食への寄与

これらの結果から、前期で増加した細胞表面 calreticulin は樹状細胞による抗原提示につながる貪食を促進し、後期で増加した細胞表面 calreticulin はマクロファージによる死細胞の貪食除去を促進するという異なる役割を担っていることが考えられた。今後、貪食後の樹状細胞様細胞やマクロファージ様細胞における細胞表面分子やサイトカイン分泌の変化、被貪食細胞上での分子間相互作用や、貪食細胞と被貪食細胞との間の分子間相互作用などについて解析していくことで、細胞表面 calreticulin を介した貪食の役割や貪食機構の詳細が明らかになることが期待される。これらの成果は、腫瘍免疫応答の開始を司る分子メカニズムとして、将来のがん治療に貢献できるものになると考えている。

参考文献

- 1) Sattler S. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 1003:3-14
- 2) Li W. *J Cell Physiol.* 2012; 227 (4): 1291-1297
- 3) Théry C, Amigorena S. *Curr Opin Immunol.* 2001 Feb;13(1):45-51
- 4) Grimsley C, Ravichandran K S. *Trends Cell Biol.* 2003 Dec;13(12):648-56
- 5) Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold L I and Opas M. *Biochem J.* 2009; 417 (3): 651-666
- 6) Gold L I, Eggleton P, Sweetwyne M T, Van Duyn L B, Greives M R, Naylor S, Michalak M and Murphy-Ullrich J E. *FASEB J.* 2010; 24 (3): 665-683
- 7) Gardai S J, McPhillips K A, Frasch S C, Janssen W J, Starefeldt A, Murphy-Ullrich J E, Bratton D L, Oldenborg P, Michalak M and Henson P M. *Cell.* 2005; 123 (2): 321-334
- 8) Tufi R, Panaretakis T, Bianchi K, Criollo A, Fazi B, Di Sano F, Tesniere A, Kepp O, Paterlini-Brechot P, Zitvogel L, Piacentini M, Szabadkai G and Kroemer G. *Cell Death Differ.* 2008; 15 (2): 274-282
- 9) Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund A, Chapman D C, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, van Endert P, Yuan J, Zitvogel L, Madeo F, Williams D B and Kroemer G. *EMBO J.* 2009; 28 (5): 578-590
- 10) Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N and Kroemer G. *Clin Cancer Res.* 2010; 16 (12): 3100-3104
- 11) Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O and Zitvogel L. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31 51-72
- 12) Kielbik M, Szulc-Kielbik I and Klink M. *Cells.* 2021; 10 (1):
- 13) Azuma Y, Suzuki K, Higai K, Matsumoto K and Tada S. *Biol Pharm Bull.* 2020; 43 (10): 1595-1599
- 14) Di Blasio S, Wortel I M N, van Bladel, Diede A. G., de Vries L E, Duiveman-de Boer T, Worah K, de Haas N, Buschow S I, de Vries, I.

- Jolanda M., Figdor C G and Hato S V. *Oncoimmunology*. 2016; 5 (8): e1192739
- 15) Ellgaard L and Frickel E. *Cell Biochem Biophys*. 2003; 39 (3): 223-247
 - 16) Michalak M, Corbett E F, Mesaeli N, Nakamura K and Opas M. *Biochem J*. 1999; 344 Pt 2 281-292
 - 17) Gelebart P, Opas M and Michalak M. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37 (2): 260-266
 - 18) Li S S, Liu Z, Uzunel M and Sundqvist K. *Blood*. 2006; 108 (9): 3112-3120
 - 19) Forsl w A, Liu Z and Sundqvist K -. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64 (1): 66-76
 - 20) Tarr J M, Young P J, Morse R, Shaw D J, Haigh R, Petrov P G, Johnson S J, Winyard P G and Eggleton P. *J Mol Biol*. 2010; 401 (5): 799-812
 - 21) Oakes S A and Papa F R. *Annu Rev Pathol*. 2015; 10 173-194
 - 22) KANDA Y. *Bone marrow transplantation (Basingstoke)*. 2013; 48 (3): 452-458
 - 23) Franz S, Herrmann K, F rnrohr B G, F hrrohr B, Sheriff A, Frey B, Gaipf U S, Voll R E, Kalden J R, J ck H - and Herrmann M. *Cell Death Differ*. 2007; 14 (4): 733-742
 - 24) Hotamisligil G S and Davis R J. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016; 8 (10)
 - 25) Frakes A E and Dillin A. *Molecular Cell*. 2017; 66 (6): 761-771
 - 26) Szegezdi E, Fitzgerald U and Samali A. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1010 186-194
 - 27) Krysko D V, Garg A D, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P and Vandenabeele P. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12 (12): 860-875
 - 28) Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia G M, Kepp O, Piacentini M, Froehlich K -, van Endert P, Zitvogel L, Madeo F and Kroemer G. *Cell Death Differ*. 2008; 15 (9): 1499-1509

- 29) Obeid M. *J Immunol.* 2008; 181 (4): 2533-2543
- 30) Abdullah T M, Whatmore J, Bremer E, Slibinskas R, Michalak M and Eggleton P. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2021
- 31) Mashima T, Naito M and Tsuruo T. *Oncogene.* 1999; 18 (15): 2423-2430
- 32) Ouaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y and Beg A A. *Immunity.* 2002; 16 (2): 257-270
- 33) Nagata S, Hanayama R and Kawane K. *Cell.* 2010; 140 (5): 619-630
- 34) Schwende H, Fitzke E, Ambs P and Dieter P. *Journal of leukocyte biology.* 1996; 59 (4): 555-561
- 35) Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wiczorek H, Höh A, Sadeghi M, Opelz G and Daniel V. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333 (3): 896-907
- 36) Wallet M A, Sen P and Tisch R. *Clin Med Res.* 2005; 3 (3): 166-175
- 37) Fadok V A, Voelker D R, Campbell P A, Cohen J J, Bratton D L and Henson P M. *J Immunol.* 1992; 148 (7): 2207-2216
- 38) Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y and Cai Z. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2019; 23 (8): 4854-4865
- 39) Bajor A, Tischer S, Figueiredo C, Wittmann M, Immenschuh S, Blasczyk R and Eiz - Vesper B. *Clinical and experimental immunology.* 2011; 165 (2): 220-234
- 40) Lemke G. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19 (9): 539-549
- 41) Wijeyesakere S J, Bedi S K, Huynh D and Raghavan M. *The Journal of immunology (1950).* 2016; 196 (9): 3896-3909
- 42) Verneret M, Tacnet-Delorme P, Osman R, Awad R, Grichine A, Kleman J and Frachet P. *J Innate Immun.* 2014; 6 (4): 426-434
- 43) Berwin B, Hart J P, Rice S, Gass C, Pizzo S V, Post S R and Nicchitta C V. *EMBO J.* 2003; 22 (22): 6127-6136
- 44) Berwin B, Delneste Y, Lovingood R V, Post S R and Pizzo S V. *J Biol Chem.* 2004; 279 (49): 51250-51257

45) Devitt A, Pierce S, Oldreive C, Shingler W H and Gregory C D. *Cell Death Differ.* 2003; 10 (3): 371-382

関連論文目録

本論文は、以下の論文の内容をもとに作成されている。

Matsusaka K, Azuma Y, Kaga Y, Uchida S, Takebayashi Y, Tsuyama T and Tada S. 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>.

謝辞

本論文の作成ならびに研究の遂行に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました東邦大学薬学部 分子生物学教室 多田周右教授に謹んで感謝申し上げます。

研究開始から一貫して熱心な御指導、御助言を賜りました同教室 東祐太郎准教授に心から感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、有益な御指導、御助言を頂きました同教室 津山崇講師に深く感謝申し上げます。

本研究に多大な御支援を頂いた同教室 内田冴香さん、竹林佑理さん、加賀優妃さんに心から感謝申し上げます。

そして、共に過ごし支えとなってくれました分子生物学教室の皆様に心から感謝申し上げます。

松坂 憲樹