

ヒト悪性黒色腫における H_2O_2 による
細胞内スーパーオキシド産生を介した
細胞死の増強効果の研究

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系皮膚科学専攻

栃木美寿紀

修了年 2014 年

指導教員 落合豊子

ヒト悪性黒色腫における H_2O_2 による
細胞内スーパーオキシド産生を介した
細胞死の増強効果の研究

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系皮膚科学専攻

栃木美寿紀

修了年 2014 年

指導教員 落合豊子

目 次

研究の概要	1
第1章 緒言	2
1. メラノーマ(悪性黒色腫)	3
1-1.メラノーマとは	3
1-2.メラノーマの治療	3
1-3.メラノーマと分子標的薬	3
2. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)	3
2-1. TRAIL とは	3
2-2. TRAIL とアポトーシス経路	4
2-3. TRAIL と化学療法	5
2-4.メラノーマと TRAIL	5
3. 小胞体ストレス	6
3-1.小胞体ストレスによるアポトーシス	6
3-2.メラノーマと小胞体ストレス	7
4. 活性酸素種 (ROS)	7
4-1.ROS の産生と細胞内酸化ストレス	7
4-2.H ₂ O ₂ と細胞死	8
5. 研究の目的	8
6. 期待される研究の成果	8
第2章 対象と方法	9
1. 使用試薬	10
2. 細胞培養	10
3. 蛍光顕微鏡による細胞死の検出	10
4. 細胞死の評価	11
5. ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 脱分極と caspase-3/7 活性化の測定	11
6. caspase-12 活性化の測定	11
7. 細胞内 ROS の測定	11
8. 蛍光顕微鏡を用いた細胞内 ROS の検出	12
9. ウェスタンブロット法	12
10. 統計処理	12
第3章 研究結果	13

1. メラノーマ細胞の蛍光顕微鏡による H ₂ O ₂ 誘導性細胞死の測定	14
1-1. 結果	14
1-2. 小括	14
2. TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞における H ₂ O ₂ 誘導性アポトーシスの測定	16
2-1. 結果	16
2-2. 小括	16
3. H ₂ O ₂ 誘導性細胞死に対する caspase 阻害剤の抑制効果	18
3-1. 結果	18
3-2. 小括	18
4. H ₂ O ₂ によるミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 脱分極と caspase-3/7 活性化の誘導	20
4-1. 結果	20
4-2. 小括	20
5. H ₂ O ₂ は TRAIL 抵抗性ヒトメラノーマ細胞において O ₂ ⁻ の細胞内産生を誘導する	22
5-1. 結果	22
5-2. 小括	22
6. H ₂ O ₂ 誘導性 O ₂ ⁻ の産生は主にミトコンドリアで行われる	24
6-1. 結果	24
6-2. 小括	24
7. H ₂ O ₂ は O ₂ ⁻ 産生を介して caspase-12 を活性化する	27
7-1. 結果	27
7-2. 小括	27
8. H ₂ O ₂ による小胞体ストレス応答タンパク質の発現誘導	29
8-1. 結果	29
8-2. 小括	29
9. ヒト正常上皮由来メラノサイトにおける H ₂ O ₂ の細胞毒性	31
9-1. 結果	31
9-2. 小括	31
10. 研究成果の総括	33
 第4章 考察	 34
 第5章 まとめ	 38

謝辭	40
參考文獻	41
研究業績	46

略 語

ATAD : z-ATAD-fmk, z-Ala-Thr-Ala-Asp-fluoromethylketone
ATF6 : activating transcription factor 6
Apaf-1 : apoptosis-inducing factor-1
CHOP : CCAAT/ enhancer-binding protein (C/EBP) -homologous protein
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4
DCFH-DA : dichlorodihydrofluorescein diacetate
DCF : dichlorodihydrofluorescein
DD : death domain
DED : death effector domain
DEVD : z-DEVD-fmk, z-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylketone
DHE : dihydroethidium
DISC : death inducing signaling complex
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium
DR : death receptor
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
EthD-1 : ethidium bromide homodimer
FADD : Fas-associated protein with DD
FBS : fetal bovine serum
FITC : fluorescein isothiocyanate
GRP78 : glucose-related protein 78
H₂O₂ : hydrogen peroxide
HBSS : Hank's balanced salt solution
IRE1 α : inositol requiring enzyme 1 α
LEVD : z-LEVD-fmk, z-Leu-Glu-Val-Asp-fluoromethylketone
MEK : mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase activating kinase
MitoSOX : MitoSOXTM-Red
MnSOD : manganese superoxide dismutase
MnTBaP : Mn(III) tetrakis (4-benzonic acid) prophyrin chloride
O₂⁻ : superoxide
ONOO⁻ : peroxy nitrite
PD1 : programmed cell death protein-1
PDL1 : PD-ligand 1
PERK : protein kinase (PKR)-like ER kinase
PI : propidium iodide

PVDF : polyvinilidene difluoride
ROS : reactive oxygen species
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SOD : superoxide dismutase
Tg : thapsigargin
TNF : tumor necrosis factor
TRAIL : tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R1 : TRAIL-receptor 1
TRAIL-R2 : TRAIL-receptor 2
UPR : unfolded protein response
VAD : z-VAD-fmk, z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone
XBP-1 : X-box-binding protein-1
•OH : hydroxyl radical
 $\Delta\Psi_m$: mitochondrial membrane potential

研究の概要

背景：悪性黒色腫（メラノーマ）はメラノサイト由来の悪性腫瘍であり、リンパ節や遠隔転移を起こした症例は化学療法や放射線療法などにも治療抵抗性である。Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は Tumor necrosis factor (TNF) superfamily のひとつで death receptors に結合することで癌細胞に選択的に細胞死を誘導するが、メラノーマをはじめとするいくつかの悪性腫瘍は TRAIL に抵抗性である。TRAIL による細胞死誘導には、細胞内活性酸素種 (ROS)、特に過酸化水素 (H_2O_2) が関与するという報告がある一方、 H_2O_2 は細胞保護的に働くという報告もあり、そのアポトーシスにおける役割は明らかとなっていない。

目的：本研究では、 H_2O_2 のメラノーマ細胞の細胞死における役割とその作用機序を検討した。

結論： H_2O_2 添加は、細胞内スーパーオキシド (O_2^-) の産生を介して、TRAIL 抵抗性ヒトメラノーマ細胞の細胞死を誘導した。 H_2O_2 はその濃度によって異なる経路による細胞死を誘導した。すなわち、低濃度 ($\leq 30\mu M$) の H_2O_2 は caspase 依存性のアポトーシスを誘導し、高濃度 ($\geq 100\mu M$) では caspase 非依存的細胞死を誘導した。 H_2O_2 誘導性アポトーシスにはミトコンドリア膜電位の脱分極の増加と、caspase-3/7 の活性化、caspase-12 や X-box-binding protein-1 (XBP-1) の活性化にみられる小胞体ストレス反応の増加が関与していた。さらに、 H_2O_2 添加により細胞内とミトコンドリア内に O_2^- 産生が誘導されたが、TRAIL では誘導されなかった。この O_2^- 産生を阻害するとアポトーシスならびに、XBP-1 と caspase-12 の活性化が抑制された。これに対して、ヒト正常上皮由来メラノサイトでは H_2O_2 添加は O_2^- 産生やアポトーシスを誘導しなかった。

結語：TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞において H_2O_2 添加は細胞内 O_2^- 産生を介した細胞死を誘導することを明らかにした。メラノーマ細胞は正常ヒト上皮メラノサイト細胞よりもこのような酸化的細胞死に感受性が高く、 H_2O_2 などの O_2^- 産生物質は TRAIL 抵抗性のメラノーマの治療において有効である可能性が示唆された。

第1章 緒言

1. メラノーマ (悪性黒色腫)

1-1. メラノーマとは

メラノーマはメラノサイト由来の悪性腫瘍で、多くの場合は皮膚に発症するが、粘膜表面や眼窩底、口腔など神経堤由来の組織から発生しうる。結節型、表在拡大型、末端黒子型、悪性黒子型の4病型に分類される。発生頻度、発生部位は人種や居住地によって大きく異なる [1]。日本人の発生は人口10万人に約1.5~2人であるが、オーストラリアでは20人以上と言われている [1]。白人では遺伝的因子とともに、強い日焼けが危険因子であるが [2]、日本人では過半数が末端黒子型であり [3]、紫外線の関与は少ないと考えられている [4]。

1-2. メラノーマの治療

メラノーマの治療の基本は早期発見、早期外科的切除である [1]。遠隔転移を伴う場合はダカルバジンによる化学療法が中心になるが、その奏効率は約20%、完全奏効率は5-10%、長期完全奏効率は2%以下であり満足できるものではない [4]。多剤併用療法は奏効率の改善は見られたが、生存率は改善できず、毒性が強かったと報告されている [5]。

1-3. メラノーマと分子標的薬

近年、メラノーマに対して分子標的薬の開発が進んでおり、変異 BRAF 阻害剤 vemurafenib、BRAF 阻害剤 dabrafenib、mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase activating kinase (MEK) 阻害剤 trametinib などの有効性が報告されている。また、抗 cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) 抗体 ipilimumab、抗 programmed cell death protein-1 (PD1)、PD-ligand1 (PDL1) の有効性も明らかになり [6]、特に vemurafenib と ipilimumab の併用は overall survival を延長するとして臨床的有用性が示唆されている [7]。

2. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

2-1. TRAIL とは

TRAIL は Tumor necrosis factor (TNF) superfamily のひとつで、ホモ3量体の構造を有している。TRAIL は大腸癌を始めとして、肺、乳、前立腺、膵、腎、中枢神経系、甲状腺や白血病、多発性骨髄腫など多種のヒト癌細胞の cell line でアポトーシスを誘導することから、癌予防と治療におけ

る標的として期待されているが [8]、メラノーマや神経膠腫、非小細胞性肺癌 (NSCLC) などのいくつかの腫瘍は TRAIL 誘導性アポトーシスに抵抗性である [9, 10]。さらに TRAIL 感受性の腫瘍の中には TRAIL 抵抗性を後天的に獲得するものもある [10]。したがって、TRAIL を用いた治療において癌細胞の TRAIL 抵抗性の克服は必要不可欠であり、TRAIL の有効性を増強する薬剤の発見が待たれている [11]。

2-2. TRAIL とアポトーシス経路

TRAIL は death receptor (DR) 4/TRAIL-receptor 1 (TRAIL-R1) と DR5/TRAIL-R2 と呼ばれる、death domain をもつレセプターに結合する [12]。TRAIL が細胞表面に発現する DR4 や DR5 に結合すると、レセプターのオリゴマー化と DR の構造変化がおき、レセプターが活性化される。その結果 death inducing signaling complex (DISC) が形成され、initiator caspase である caspase-8 が活性化され、アポトーシスを実行する effector caspase-3/6/7 が活性化される [13, 14]。caspase-8 の活性化は内因性 (ミトコンドリア性) アポトーシス経路にも関与しており、この経路では caspase-8 が Bcl-2 ファミリー分子である Bid を切断する。切断されて活性化された Bid は Bcl-2 ファミリー分子の Bak、Bax を活性化、オリゴマー化してミトコンドリア外膜に大きなチャンネルを形成させる。ここからチトクロム c ならびに apoptosis-inducing factor-1 (Apaf-1) が細胞質に漏出し、両者により形成された apoptosome を介して別の initiator caspase である caspase-9 が活性化され、この caspase-9 により caspase-3/6/7 が活性化される [13]。TRAIL が活性化するのは以上の 2 経路であるが、これとは別に内因性 (ミトコンドリア性) 経路や外因性 (death receptor) 経路を介さないうで細胞死を惹起する、小胞体ストレスによる経路がある [15-19] (図 1)。

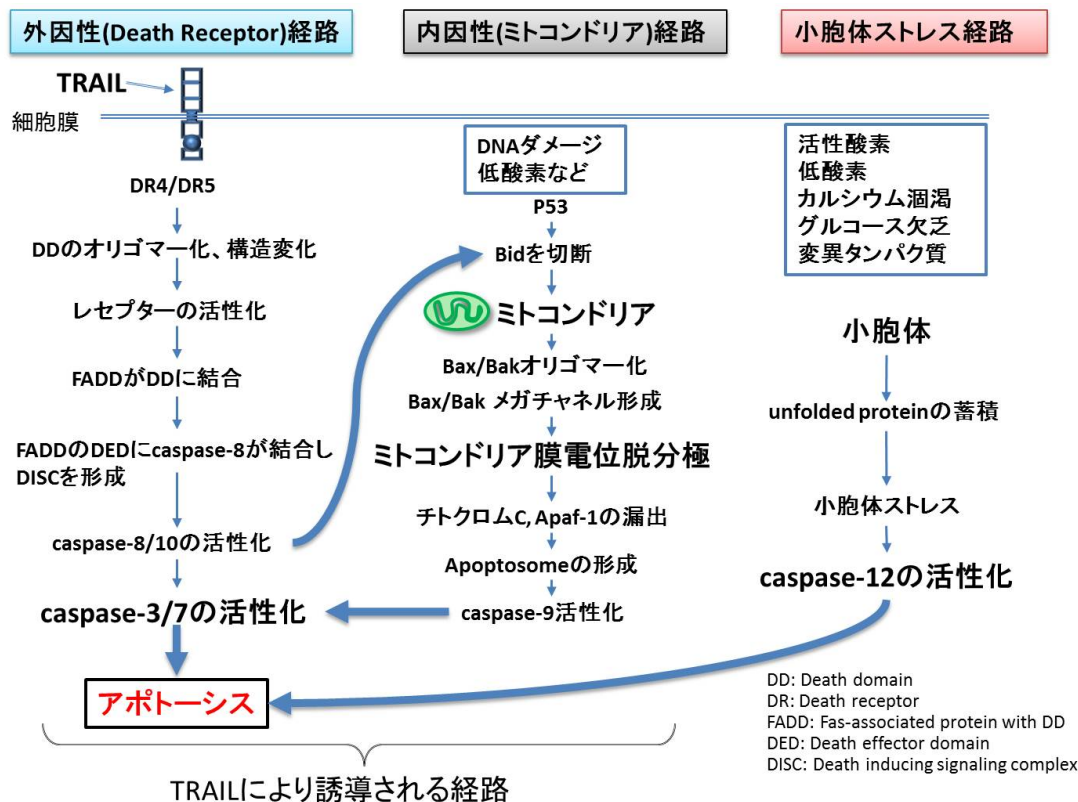


図 1. TRAIL とアポトーシス
文献 [10]を元に改変

2-3. TRAIL と化学療法

近年、遺伝子組み換えヒト TRAIL や DR4/DR5 受容体特異的抗体などの、アポトーシス促進性の受容体作用薬がメラノーマや NSCLC 細胞を含む多種の癌細胞で臨床試験の段階に入っているが、未だ有意な効果は実証されていない [20]。今までの化学療法は、ミトコンドリア性アポトーシスの誘導が第一の標的であったが、このアポトーシス経路を増幅するだけでは癌細胞の TRAIL 抵抗性を解決することができないことがわかってきた。

2-4. メラノーマと TRAIL

メラノーマの TRAIL 感受性は、10 の cell line 中 7 cell line で感受性が見られたという報告がある一方で [21-23]、患者検体からの分離株は TRAIL 感受性が低かったという報告がある [24]。また、TRAIL に対しての感受性の多様性は、結果として TRAIL 抵抗性の細胞を増殖させることになり、TRAIL によるメラノーマ治療の限界を生じてしまう恐れがある [25]。

3. 小胞体ストレス

3-1. 小胞体ストレスによるアポトーシス

小胞体は内因性 (ミトコンドリア性) 経路や外因性 (death receptor) 経路を介さない経路で細胞死を惹起することができ、小胞体関連細胞死は caspase-12 を介していると考えられている [15-19]。小胞体ストレスはグルコース欠乏や、低酸素、カルシウム恒常性の崩壊、ROS の過剰など様々な細胞の状況下で引き起こされ、unfolded protein (折り畳まれていない蛋白) の蓄積を特徴とする。小胞体ストレスは蛋白合成阻害やシャペロン蛋白質の発現増加、蛋白分解の増加から細胞を保護する働きのある適応型 unfolded protein response (UPR) を活性化するが、この UPR 活性化が小胞体ストレスを十分に軽減できなければ、小胞体関連アポトーシスが誘導される [15-19]。小胞体ストレス下ではシャペロン分子 GRP78 が inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α) や activating transcription factor 6 (ATF6) などの膜貫通型蛋白から分離する。遊離 ATF6 はゴルジ体に移動し活性化される。活性化された ATF6 は核内に入り、転写因子 XBP-1 の発現を惹起する。活性化された IRE1 α は転写された XBP-1 mRNA をスプライシングし、転写因子であり小胞体機能に関与する数多くの遺伝子の転写発現を上昇させ、成熟 XBP-1 蛋白への翻訳を開始させる [16, 26, 27] (図 2)。

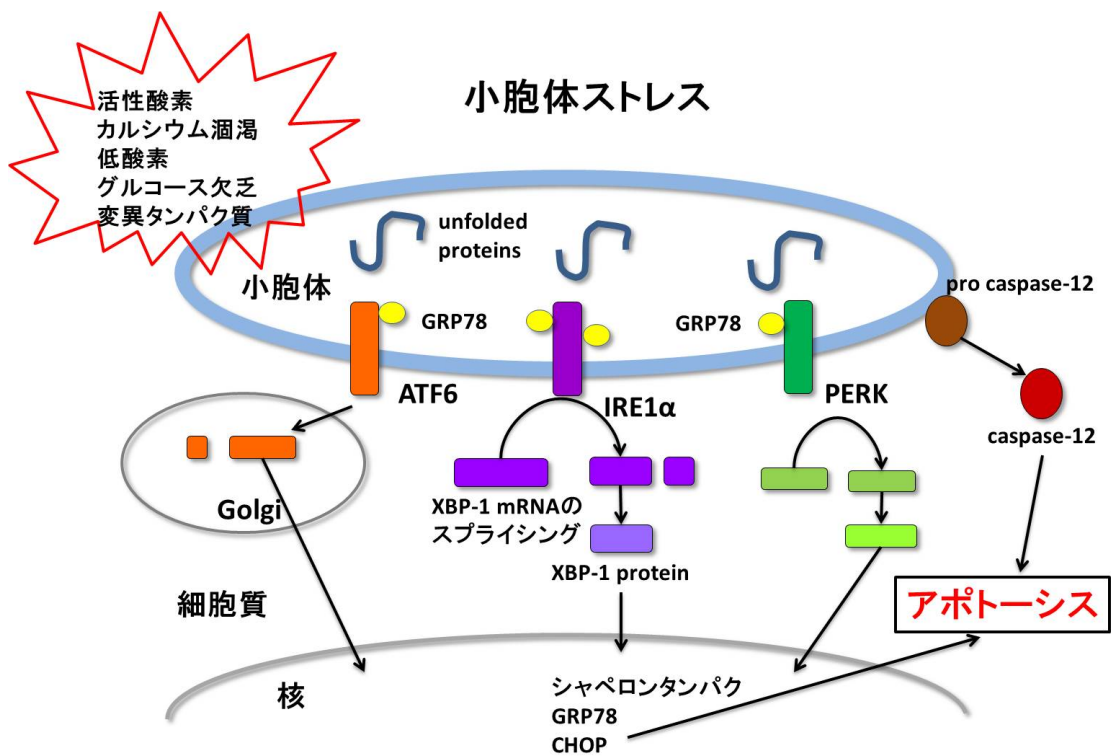


図 2. 小胞体ストレス
文献 [28]を元に改変

3-2. メラノーマと小胞体ストレス

小胞体ストレスを tunicamycin や thapsigargin (Tg) を用いて誘導しても、メラノーマの cell line は比較的抵抗性であり、20%以下の細胞死しか誘導されなかった [29]。メラノーマでは小胞体ストレスに対して保護的なメカニズムが働いている可能性がある [28]。このことから、小胞体ストレスへの適応が治療抵抗性につながっていると考えられるため [30]、この適応メカニズムを標的とした治療がメラノーマの治療抵抗性を克服すると考えられている [28]。

4. 活性酸素種 (ROS)

4-1. ROS の産生と細胞内酸化ストレス

過酸化水素 (H_2O_2) やスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)などの活性酸素種 (ROS) は 実質的にすべての好気性生物の代謝産物であると同時に、異物曝露に続いて産生される [31, 32]。細胞内で ROS の産生は主にミトコンドリアの呼吸鎖の電子伝達系、複合体 I や複合体 III で行われる [32]。その他に虚血、再灌流、プリン体代謝、脂質酸化、

好中球・単球マクロファージの食作用、アラキドン酸代謝などの内因性要因に加えて、電離放射線、紫外線、重金属、化学オキシダントなどの外的要因でも ROS が生じる。ミトコンドリアで産生された O_2^- から manganese superoxide dismutase (MnSOD) の作用により H_2O_2 が産生され、さらに金属イオンの存在下でフェントン/Haber Weiss 反応により $\cdot OH$ が産生される [32, 33]。生理学的低濃度の ROS は細胞内シグナリングで二次メッセンジャーとして正常の細胞機能に必要な不可欠である一方、過剰な ROS は小胞体ストレスの誘因のひとつでもあり [34]、多種の高分子の損傷や細胞機能障害を惹起し、細胞死を誘導する [32]。この有害作用を酸化ストレスと呼ぶ [35]。ROS 産生 (酸化系) と、酸化物を解毒、修復する生物学的システム (抗酸化系) との間に不均衡が起きた結果、細胞内酸化ストレスが引き起こされる。

4-2. H_2O_2 と細胞死

腫瘍細胞においては、細胞内 H_2O_2 が DR 誘導性アポトーシスのメディエーターとなるという報告がある。フラボノイドの一種 wogonin は TNF- α 抵抗性 T 細胞性白血病細胞において、細胞内 H_2O_2 レベルの上昇を介して TNF- α もしくは TRAIL 誘導性アポトーシスへの感受性を増加して、細胞死を誘導した [36]。また、LY303511 は H_2O_2 の細胞内産生を介してヒト神経芽細胞の TRAIL 感受性を増加させたという報告がある [37]。一方、Jurkat 細胞では低濃度の H_2O_2 が pro-caspase-9 を不活化させることで caspase を介したアポトーシスを抑制すること [38]、ヒト星状細胞では caspase 依存性に H_2O_2 が産生され、TRAIL 誘導性アポトーシスに抵抗性に働くこと [39] など、DR リガンド誘導性アポトーシスにおいて H_2O_2 が抗アポトーシスに働くという報告もあり、未だに H_2O_2 の DR 誘導性アポトーシスにおける役割は明らかではない。

5. 研究の目的

ヒトメラノーマ細胞において H_2O_2 が TRAIL によるアポトーシス誘導を増強するかどうか、増強するのであれば H_2O_2 の細胞死における役割、作用機序を解明するのが目的である。

6. 期待される研究の成果

本研究の成果は、TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞において TRAIL の感受性を上げる標的の解明につながり、メラノーマ治療の可能性を拡大することが期待される。

第2章 対象と方法

1. 使用試薬

可溶性遺伝子組み換え TRAIL は Enzo Life Sciences (San Diego, CA) から、Thapsigargin (Tg) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手した。z-VAD-fluoromethylketone (fmk) (VAD)、z-DEVD-fmk (DEVD)、Mn (III) tetrakis (4-benzonic acid) porphyrin chloride (MnTBaP) は Calbiochem (La Jolla, CA) から購入した。z-LEVD-fmk (LEVD)、z-ATAD-fmk (ATAD) は BioVision (Mountain View, CA) から購入した。Dichlorohydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)、dihydroethidium (DHE)、MitoSOX™-Red (MitoSOX) は Life Technologies Japan (Tokyo, Japan) から入手した。試薬はジメチルスルホキシドに溶解し、ハンクス液 [Hank's balanced salt solution; HBSS [pH 7.4]] は最終的にジメチルスルホキシド濃度 0.1% 以下で使用した。この濃度のジメチルスルホキシドは本研究で測定したどのパラメータにも影響しなかった。抗 X-box-binding protein-1 (XBP-1) ポリクローナル抗体と抗 glucose-related protein 78 (GRP78) ポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) から購入した。

2. 細胞培養

ヒト A2058、SK-MEL-2 メラノーマ細胞は Health Science Reserch Resource Bank (Osaka, Japan) から入手した。ヒト A375 メラノーマ細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。細胞は 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium; DMEM (Sigma-Aldrich)) を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。細胞は、0.25% トリプシン- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Life Technologies Japan) で、37°C、5 分間処理した後、回収した。ヒト正常上皮メラノサイトは Cascade Biologics (Portland, OR) から購入し、DermaLife M LifeFactors (Kurabo, Osaka, Japan) を加えた DermaLife Basal Medium (Kurabo, Osaka, Japan) を用いて 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。細胞は、0.25% トリプシン-EDTA で 37°C、5 分間処理した後、回収した。

3. 蛍光顕微鏡による細胞死の検出

細胞 (1×10^4 cells) を 8-chamber coverslips (Asahi Glass Co., Tokyo, Japan) に播種し、試薬で処理した後に 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。その後、細胞を LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Life Technologies Japan) を用いて calcein-AM と ethidium bromide homodimer

(EthD-1) を用いて生細胞と死細胞それぞれを染色して生存度を判定した。細胞形態ならびに蛍光を蛍光顕微鏡 (IX71 inverted microscope, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて測定し LuminaVision software (Mitani Corporation, Fukui, Japan) を用いて分析した。

4. 細胞死の評価

アポトーシスと細胞生存率は、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate (FITC)) 標識 Annexin V とプロピジウムヨウ化物 (propidium iodide (PI)) を用いた二重染色法によって評価した。細胞を 24-well plates (2×10^5 cells/well) に播種し、10%FBS 含有 DMEM (FBS/DMEM) の中で被検薬剤と 24 ないし 72 時間インキュベートした。Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて FITC-複合 Annexin V と PI で染色し、染色した細胞を FACSCalibur (BD Biosciences) で測定し、CellQuest ソフトウェア (BD Biosciences) で解析した。Annexin V 陰性、PI 陰性細胞を生細胞、Annexin V 陽性、PI 陰性細胞を初期アポトーシス細胞、Annexin V 陽性、PI 陽性細胞を後期アポトーシス細胞、Annexin V 陰性、PI 陽性細胞をネクローシスないし傷害された細胞とし、Annexin V 陽性細胞をアポトーシス細胞とした。

5. ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 脱分極と caspase-3/7 活性化の測定

細胞を 24-well plates (2×10^5 cells/well) に播種し、FBS/DMEM の中で被検薬剤と 24 時間インキュベートし dual sensor MitoCasp (Cell Technology Inc., Mountain View, CA) で染色した。染色した細胞を FACSCalibur で測定し、Caspase-3/7 活性化およびミトコンドリア膜電位の変化を CellQuest ソフトウェアで解析した [40]。

6. caspase-12 活性化の測定

生細胞における caspase-12 の活性化は FITC 標識 caspase-12 阻害剤 (FITC-ATAD) を用いて測定した [41]。この複合体は活性化 caspase-12 にのみ結合し、非活性化型には結合しない。細胞 (2×10^5 cells/ml) を被検薬剤で 24 時間インキュベートした後、CaspGLOW Fluorescein Caspase-12 Staining Kit (BioVision) を用いて FITC-ATAD で 37°C 30 分染色した。蛍光は FACSCalibur の FL-1 チャネルを用いて検出し、CellQuest ソフトウェアで解析した。

7. 細胞内 ROS の測定

細胞内 ROS の産生は DHE と DCFH-DA を用いてフローサイトメトリで測定した [42]。細胞 (4×10^5 cells/500 μ l) を HBSS 中に懸濁し、被検薬剤と 37°C で一定時間インキュベートした。その後 5 μ M の DHE または DCFH-DA を 15 分間インキュベートによって細胞に負荷した。細胞を洗浄した後に氷上で HBSS 中に再懸濁、4°C で遠心分離し、緑色蛍光 (DCF) と赤色蛍光 (DHE) を FACSCalibur の FL-1 と FL-2 チャネルでそれぞれ測定し、CellQuest ソフトウェアで解析した。ミトコンドリア O_2^- 産生はミトコンドリア標的プローブである MitoSOXTM- Red (MitoSOX) を用いて測定した。細胞 (4×10^5 cells/500 μ l) を HBSS 中に懸濁し、被検薬剤と 37°C で一定時間インキュベートした。その後 5 μ M の MitoSOX を負荷し、赤色蛍光を FACSCalibur の FL-2 チャネルで測定し、CellQuest ソフトウェアで解析した。

8. 蛍光顕微鏡を用いた細胞内 ROS の検出

細胞 (1×10^4 cells) を 8-chamber coverslips (Asahi Glass Co., Tokyo, Japan) に播種し被検薬剤で 37°C、30 分インキュベートした。培地を除去した後に細胞を各 4 μ M の DCFH-DA と DHE で染色し、蛍光顕微鏡を用いて蛍光を測定し LuminaVision software を用いて解析した。

9. ウェスタンブロット法

細胞を 6-well plates (1×10^6 cells/ml/well) に播種し被検薬剤で 37°C、24 時間インキュベートした。その後細胞を洗浄し SDS-サンプルバッファーに溶解した。全細胞溶解液中のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、polyvinilidene difluoride 膜 (PVDF 膜, Nippon Millipore, Tokyo, Japan) に転写した。BlockAce (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan) を用いて PVDF 膜を室温で 60 分ブロッキングした後、特異抗体を用いて GRP78 および XBP-1 タンパク質を染色後、ECL Prime Western Blotting Reagent (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いて抗原抗体複合体を検出した。各サンプルのタンパク量が均一であることを確認するために、PVDF 膜を特異的抗 β -actin 抗体を用いてリプローブした。

10. 統計処理

データは平均値 \pm 標準誤差で示し、実験群間の統計的有意性は、Student's-t 検定または分散分析 (analysis of variance; ANOVA) ならびに Tukey test で解析し、 $p < 0.05$ を有意とした。

第3章 研究結果

1. メラノーマ細胞の蛍光顕微鏡による H₂O₂ 誘導性細胞死の測定

細胞外から添加した H₂O₂ がメラノーマ細胞の生存に影響を与えるかどうかを調べた。H₂O₂ 処理 A375、A2058、SK-MEL-2 メラノーマ細胞を calcein-AM と EthD-1 で染色し、蛍光顕微鏡解析を行った。生細胞は calcein-AM で緑色蛍光を呈し、細胞膜が損傷された死細胞は EthD-1 で赤色蛍光を呈した。

1-1. 結果

100 μ M H₂O₂ で 24 時間処理した細胞は細胞死が増加したのに対して、100ng/ml TRAIL ではわずかしか増加しなかった (図 3A)。同様に SK-MEL-2 細胞と A2058 細胞でも H₂O₂ は細胞死を増加したが、TRAIL では効果が見られなかった (図 3B, C)。さらに、H₂O₂ または TRAIL 単独よりも、両方の併用の方が細胞死を増強した。

1-2. 小括

H₂O₂ により TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞の細胞死が誘導された。また、H₂O₂ と TRAIL の併用により細胞死が増強された。

図 3. メラノーマ細胞の蛍光顕微鏡による H_2O_2 誘導性細胞死の測定

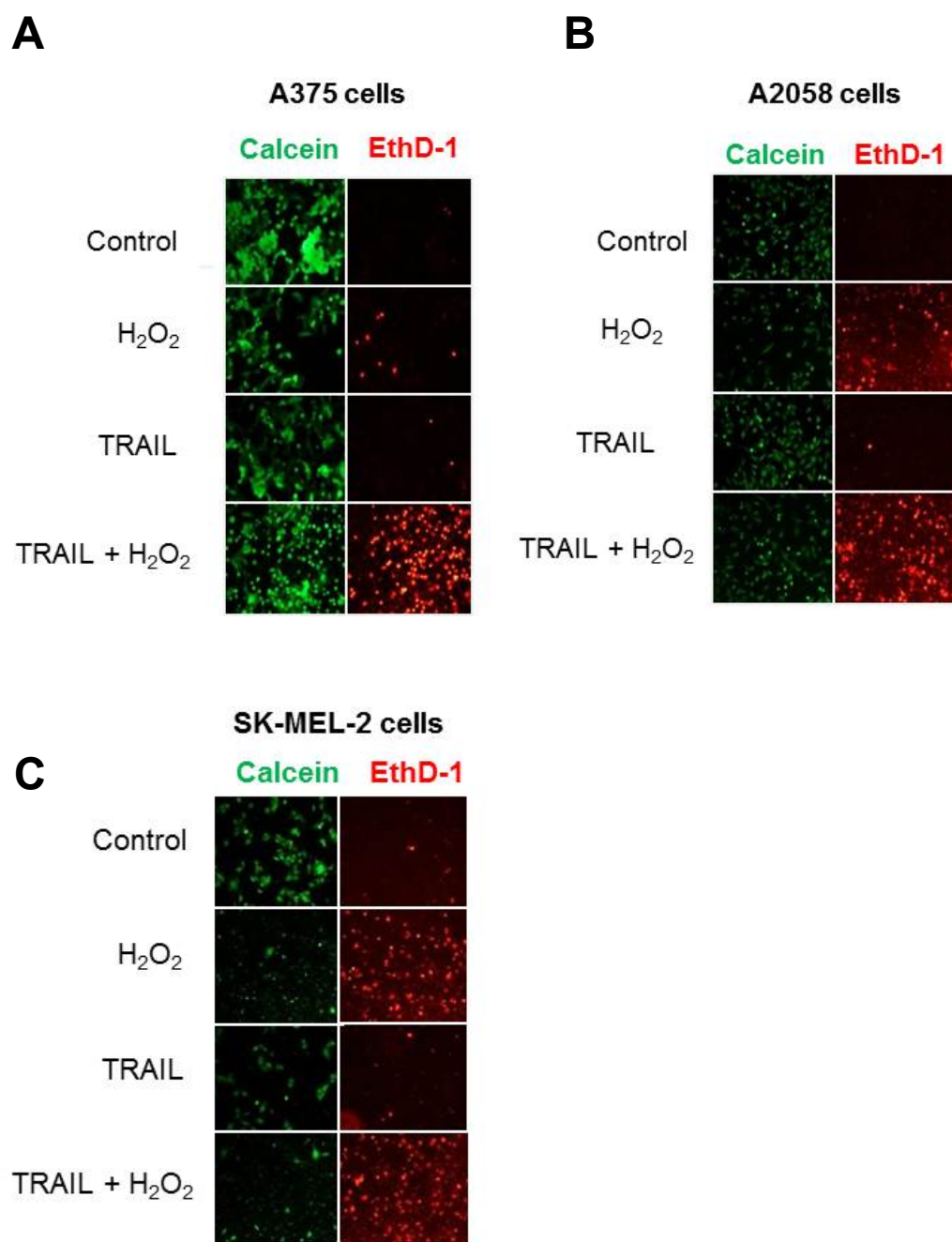


図 3. ヒトメラノーマ細胞 A375 (A), A2058 (B), SK-MEL-2 (C)を H_2O_2 で 24 時間処理した。培地を除去した後に細胞を calcein-AM と ethidium bromide homodimer (EthD-1) を用いて生細胞 (緑色)と、細胞膜が損傷された死細胞 (赤色)を染色した。代表的な蛍光顕微鏡画像を示す($\times 100$)。

2. TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞における H₂O₂ 誘導性アポトーシスの測定

TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞における H₂O₂ の細胞毒性を Annexin V/PI 染色を用いて確認した。

2-1. 結果

30 μ M H₂O₂ は 24 時間処理 (図 4A,C) でアポトーシス(Annexin V 陽性細胞) をわずかに増加させ (最大 15%)、72 時間処理 (図 4B) で中等度増加させた (35%)。100 μ M H₂O₂ は 24 時間処理で中等度にアポトーシスを増加させ、72 時間処理では 70-90%の細胞にアポトーシスを誘導した。30 μ M H₂O₂ ではネクローシス(Annexin V 陰性、PI 陽性細胞) は殆ど増加しなかったのに対し、100 μ M H₂O₂ はネクローシスも増加した。ネクローシスの誘導の程度は実験時のコントロール細胞の前期アポトーシス(Annexin V 陰性、PI 陽性細胞) の割合に応じて変動した。ネクローシスは通常 1.6-9.2%増加したが、すでに前期アポトーシスのみられるコントロール細胞では 25%に上った。TRAIL と 30 μ M H₂O₂ を併用するとアポトーシスは強く増強されたが、TRAIL と 100 μ M H₂O₂ では増強されなかった (図 4D)。

2-2. 小括

A375 細胞において H₂O₂ は濃度および時間依存的にアポトーシスを誘導した。前期アポトーシスのみられる条件下ではネクローシスも促進した。また、TRAIL 誘導性細胞死の増強効果は高濃度よりも低濃度の H₂O₂ でのみ見られた。

図4 .TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞における H₂O₂ 誘導性アポトーシスの測定

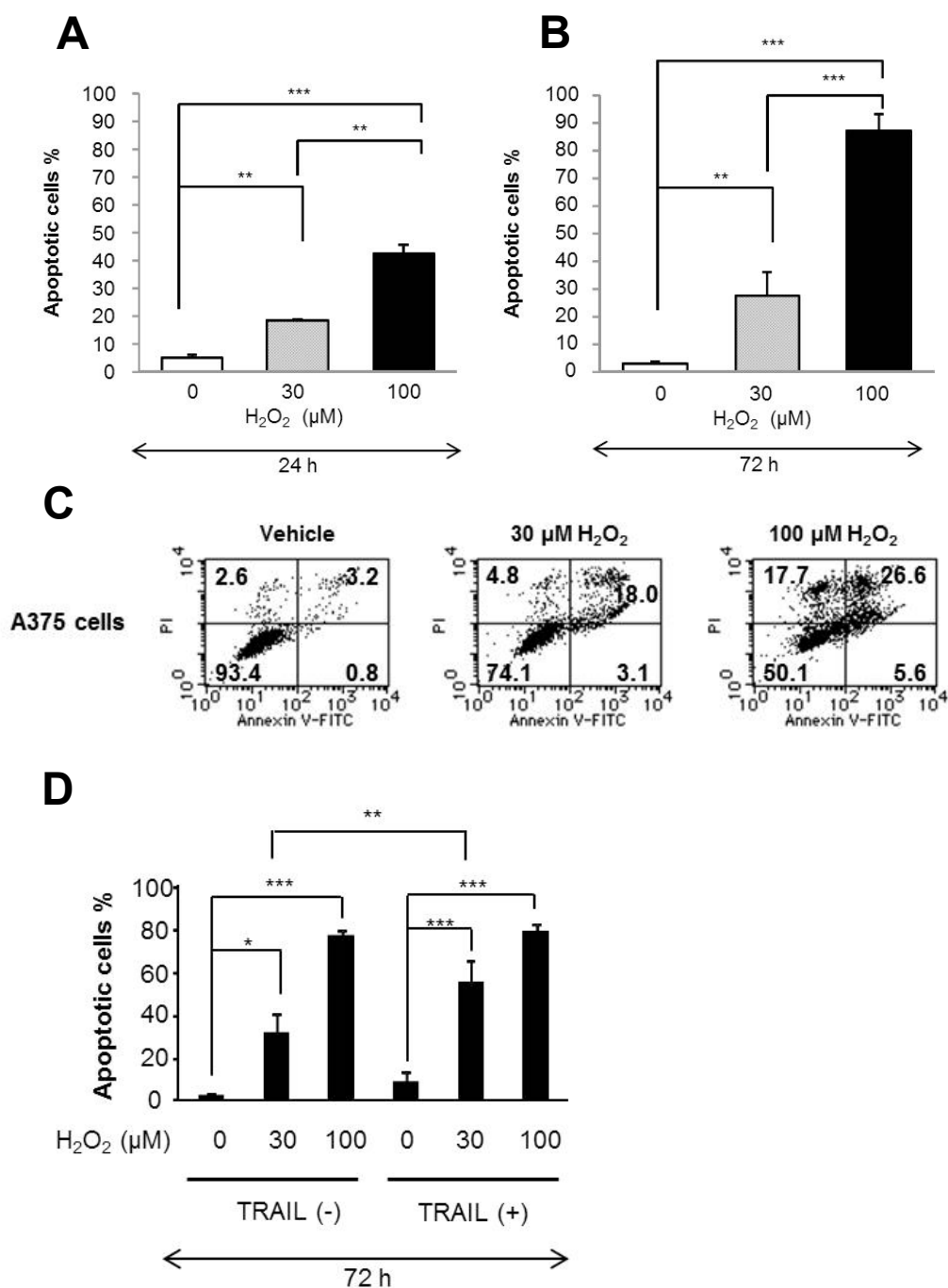


図4. A375 細胞を 30μM もしくは100μM H₂O₂ と 100ng/ml TRAIL を用いて、各々単独ないし併用で 24 時間 (A,C)、72 時間 (B,D) 処理した。FITC-Annexin V/ PI で染色し、フローサイトメトリを用いて解析した。Annexin V 陽性細胞をアポトーシス細胞とした。n=4~8, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001。

3. H₂O₂ 誘導性細胞死に対する caspase 阻害剤の抑制効果

A375 細胞を用いて H₂O₂ 誘導性細胞死がどのような経路で誘導されるのかを調べた。まずこの細胞死が caspase 依存性であるかを検討した。

3-1. 結果

30μM H₂O₂ で誘導されたアポトーシスは汎 caspase 阻害剤である VAD で著名に抑制 (最大 63%の抑制) され、caspase-3/7 の阻害剤である DEVD では 40%のアポトーシスが抑制されたが、caspase-12 阻害剤である ATAD の抑制効果は VAD と同等でかつ DEVD よりも強かった (図 5A,C)。また、caspase-4 の阻害剤である LEVD はアポトーシスを促進した。しかし、これら全ての阻害剤は 100μM H₂O₂ で誘導されるアポトーシスを殆ど抑制しなかった (図 5B)。

3-2. 小括

H₂O₂ は caspase 依存性ないし非依存性経路で細胞死を誘導し、その経路は H₂O₂ 濃度に依存することが示された。また、caspase 依存性細胞死には、caspase-3/7 よりも caspase-12 の関与がより強い可能性が示された。

図 5. H₂O₂ 誘導性細胞死への caspase 阻害剤の抑制効果

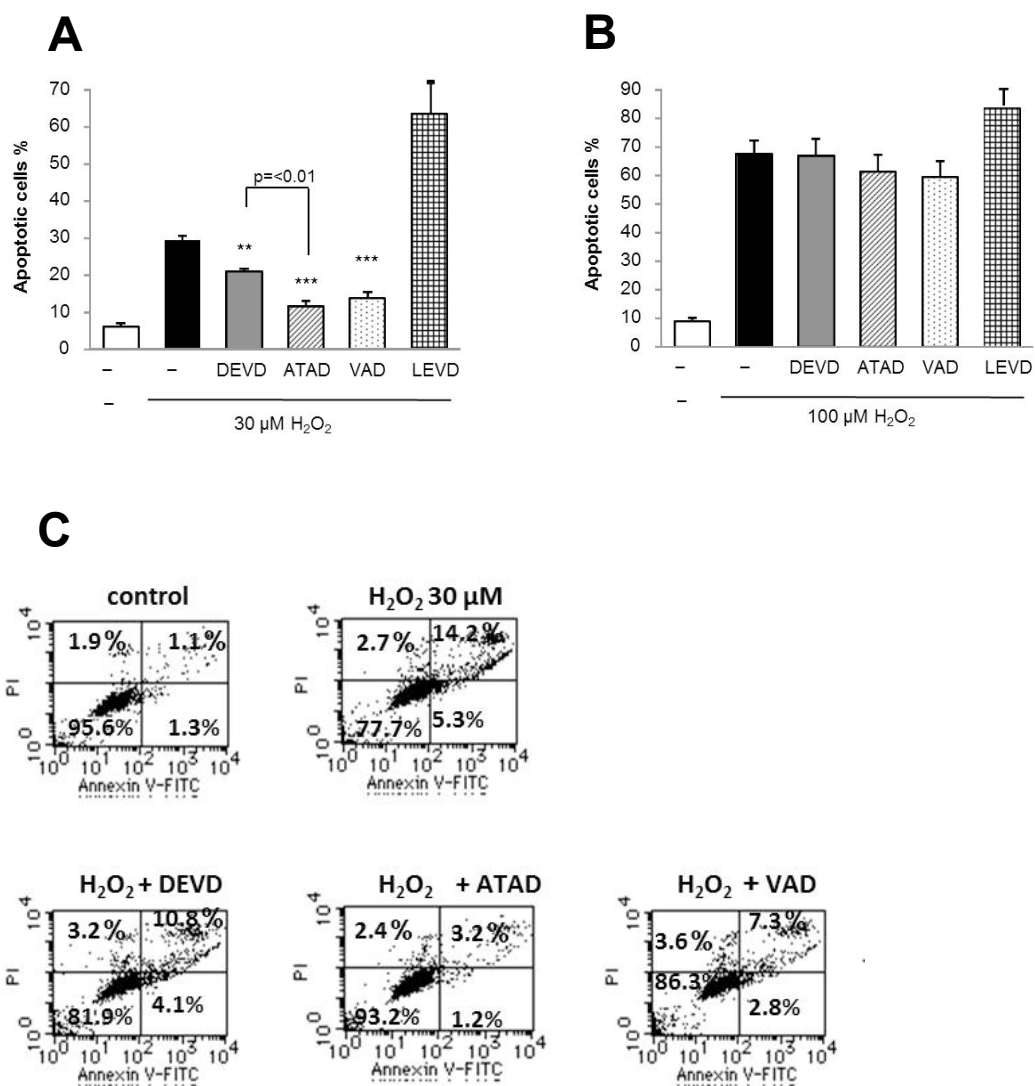


図 5. A375 細胞を 30μM (A,C)と 100μM H₂O₂ (B) で、30μM の z-DEVD-fmk (DEVD, caspase-3/7 特異的阻害剤), z-ATAD-fmk (ATAD, caspase-12 特異的阻害剤), z-LEVD-fmk (LEVD, caspase-4 特異的阻害剤), z-VAD-fmk (VAD, 汎 caspase 阻害剤) 存在下に 24 時間処理した。アポトーシス細胞は Annexin V/PI を用いて染色し、測定した。n=5~7, **p<0.01; ***p<0.001。

4. H₂O₂によるミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)脱分極と caspase-3/7 活性化の誘導

アポトーシスにおける主要な機序として内因性ミトコンドリア経路が挙げられるため、H₂O₂誘導性アポトーシスにおける内因性アポトーシス経路の役割を調べた。内因性アポトーシス経路の指標となるミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) と caspase-3/7 の活性化を測定した。

4-1. 結果

$\Delta\Psi_m$ 感受性の蛍光色素と caspase-3/7 特異的蛍光標識を用いたフローサイトメトリ解析により、H₂O₂が濃度依存的に $\Delta\Psi_m$ 脱分極と caspase-3/7 の活性化を引き起こすことが示された (図 6A,B)。

4-2. 小括

H₂O₂が濃度依存的に、内因性アポトーシス経路や caspase 依存性のアポトーシス経路、ネクローシス経路などのいくつかの細胞死経路を活性化することが示された。

図 6. H₂O₂ によるミトコンドリア膜電位脱分極と caspase-3/7 活性化の誘導

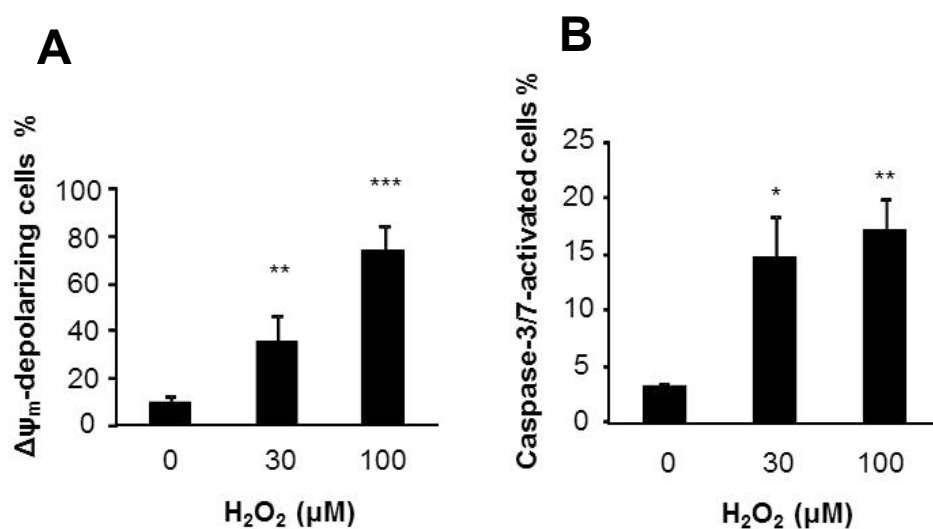


図 6. A375 細胞を 30 μ M と 100 μ M H₂O₂ で 24 時間処理後 dual sensor MitoCasp で染色し、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の脱分極(A)と caspase-3/7 の活性化(B)をフローサイトメトリで検出した。n=4, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001。

5. H₂O₂ は TRAIL 抵抗性ヒトメラノーマ細胞において O₂⁻ の細胞内産生を誘導する

H₂O₂ 誘導性細胞死における ROS の役割を解明するために、酸化感受性色素である DCF と DHE を用いて、TRAIL もしくは H₂O₂ 処理後の細胞内 ROS 産生を分析した。DCF は H₂O₂ やパーオキシナイトライト(ONOO⁻)、[•]OH など複数の酸化剤に反応するが、H₂O₂ がこれらの DCF 反応性酸化剤の中で最も安定であることから、DCF 蛍光の増強は主に H₂O₂ レベルの上昇を示していると考えられている。DHE は DNA 結合性エチジウムブロマイドを形成するために二電子酸化をすることから、この反応は H₂O₂ や ONOO⁻ ではなく O₂⁻ を介して行われる。DCFH-DA と DHE は、げっ歯類やヒトの細胞における、細胞内の H₂O₂ 産生と細胞内 O₂⁻ 産生の測定に使用されてきた [43-46]。A375 細胞を試薬で 30 分処理した後に蛍光顕微鏡を用いてその DCF と DHE 蛍光を観察した。

5-1. 結果

TRAIL で処理した細胞は、DCF (緑色蛍光) は軽度増加し、DHE (赤色蛍光) は増加が見られず (図 7A) 、また DCF の蛍光は 1 時間で無処理と同等のレベルに下がった。一方 H₂O₂ で処理した細胞は DCF、DHE 両方の蛍光が増加し、細胞内で O₂⁻ が産生されたことを示した。この酸化反応はフローサイトメトリ解析でも確認された。DHE シグナルの増加は最初に 1 時間で見られ (図 7B)、4 時間持続したが、この効果はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様抗酸化性物質である MnTBaP により完全に阻害された (図 7C)。

5-2. 小括

H₂O₂ により細胞内 O₂⁻ 産生が誘導されたが、TRAIL では誘導されなかった。

図 7. H_2O_2 は TRAIL 抵抗性ヒトメラノーマ細胞において O_2^- の細胞内産生を誘導する

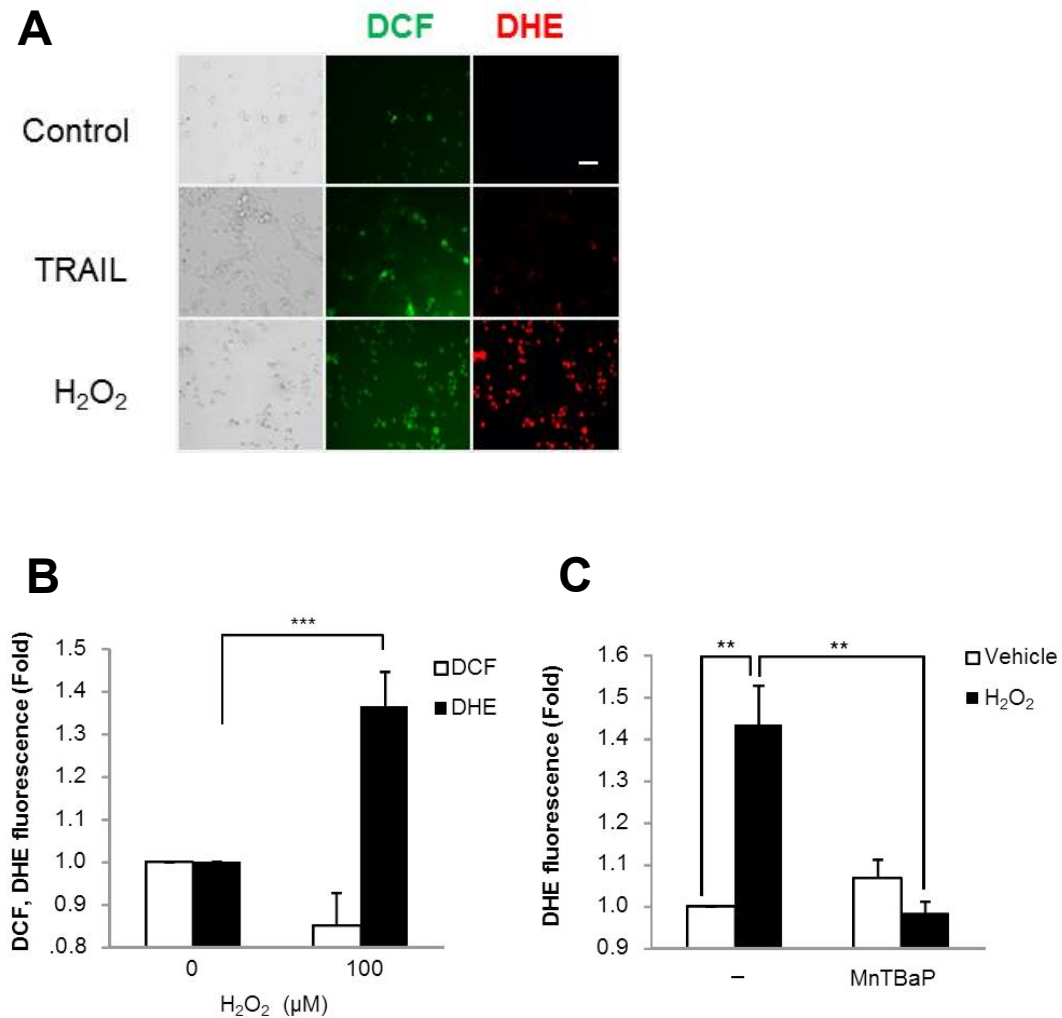


図 7. (A) A375 細胞 $100\mu\text{M}$ H_2O_2 もしくは 100ng/ml TRAIL で 30 分処理した。培地を除去した後に細胞を DCFH-DA (緑色)と DHE (赤色)で染色し、細胞内 H_2O_2 と O_2^- を検出した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 ($\times 100$; scale bar = $100\mu\text{m}$)を用いて解析した。(B) A375 細胞を $100\mu\text{M}$ H_2O_2 で 60 分処理し、細胞内 ROS 産生を DHE と DCFH-DA を用いて染色しフローサイトメトリで検出した。n=3, ***p<0.001。(C) A375 細胞を $100\mu\text{M}$ H_2O_2 単独ないし $30\mu\text{M}$ MnTBaP と併用して 4 時間処理し、フローサイトメトリを用いて細胞内の O_2^- 産生を検出した。n=7, **p<0.01。

6. H₂O₂ 誘導性 O₂⁻ の産生は主にミトコンドリアで行われる

生理的条件下の主要な ROS 産生の際はミトコンドリアであることから [32]、H₂O₂ 誘導性 O₂⁻ の産生におけるミトコンドリアの役割を調べた。MitoSOX はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア内での O₂⁻ 検出の蛍光プローブとして使用されることから [43, 47]、これを用いてミトコンドリア内 ROS を測定した。

6-1. 結果

H₂O₂ 処理 1 時間後には MitoSOX シグナルの明らかな増強がみられ(図 8A)、4 時間持続したが、この効果は MnTBaP により完全に阻害された (図 8B)。同様の効果は A2058 細胞でも見られた。H₂O₂ 誘導性細胞死における細胞内 O₂⁻ の役割を解明するために、MnTBaP の細胞死に対する効果を調べたところ、30μM H₂O₂、100μM H₂O₂ のいずれのアポトーシスも抑制した (図 8C,D)。さらに 100μM H₂O₂ で誘導されたネクローシスも減少した。一方、カタラーゼでは細胞死の抑制効果は見られなかった。

6-2. 小括

TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞において、H₂O₂ がミトコンドリア内で、O₂⁻ 産生を誘導し、この O₂⁻ を介してアポトーシスが引き起こされることが示された。

図 8. H₂O₂ 誘導性 O₂⁻ の産生は主にミトコンドリアで行われる

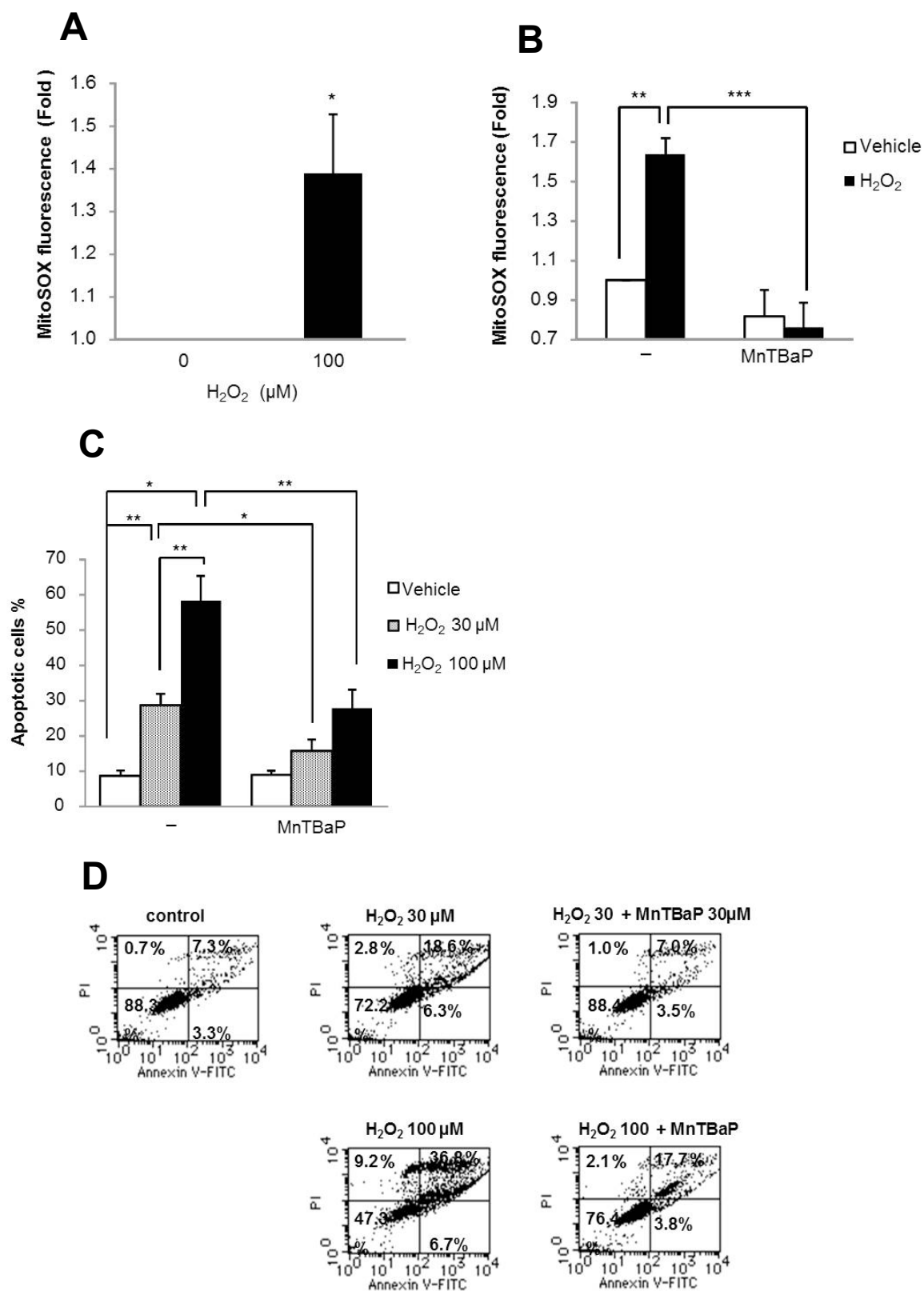


図 8. (A) A375 細胞を 100 μ M H₂O₂ で 60 分処理し、ミトコンドリア標的 O₂⁻プローブである MitoSOX を用いてフローサイトメトリでミトコンドリアの O₂⁻ 産生を検出した。n=7, *p<0.05。 (B) A375 細胞を 100 μ M H₂O₂ を単独ないしは 30 μ M MnTBaP と併用で 4 時間処理しフローサイトメトリを用いてミトコンドリア O₂⁻ 産生を検出した。n=6, **p<0.01; ***p<0.001。 (C,D) A375 細胞を 30 もしくは 100 μ M H₂O₂ 単独ないし 30 μ M MnTBaP と併用で 24 時間処理し、Annexin V/PI で染色した後にフローサイトメトリを用いてアポトーシス細胞を解析した。n=5, *p<0.05; **p<0.01。

7. H₂O₂ は O₂⁻ 産生を介して caspase-12 を活性化する

H₂O₂ が caspase-12 の活性化を調節するかどうかを調べた。caspase-12 は広範囲に発現し、小胞体の膜に局在している。小胞体ストレスによって特異的に活性化し、小胞体ストレス誘導性アポトーシスでの中心的な役割を果たす [15-18]。

7-1. 結果

FITC-ATAD を用いた蛍光定量的解析では、H₂O₂ はアポトーシスを有意に誘導する濃度 (30μM, 100μM) で濃度依存的に caspase-12 を活性化した (図 9A,B)。さらに、MnTBaP (30μM) で処理したところ、30μM H₂O₂ の効果はほぼ完全に阻害され、100μM H₂O₂ の効果は 50%まで阻害された(図 9C)。

7-2. 小括

H₂O₂ は濃度依存的に caspase-12 を活性化した。細胞内 O₂⁻ を除去すると H₂O₂ 誘導性の細胞死と caspase-12 活性化が阻害された。

図9. H_2O_2 は O_2^- 産生を介して caspase-12 を活性化する

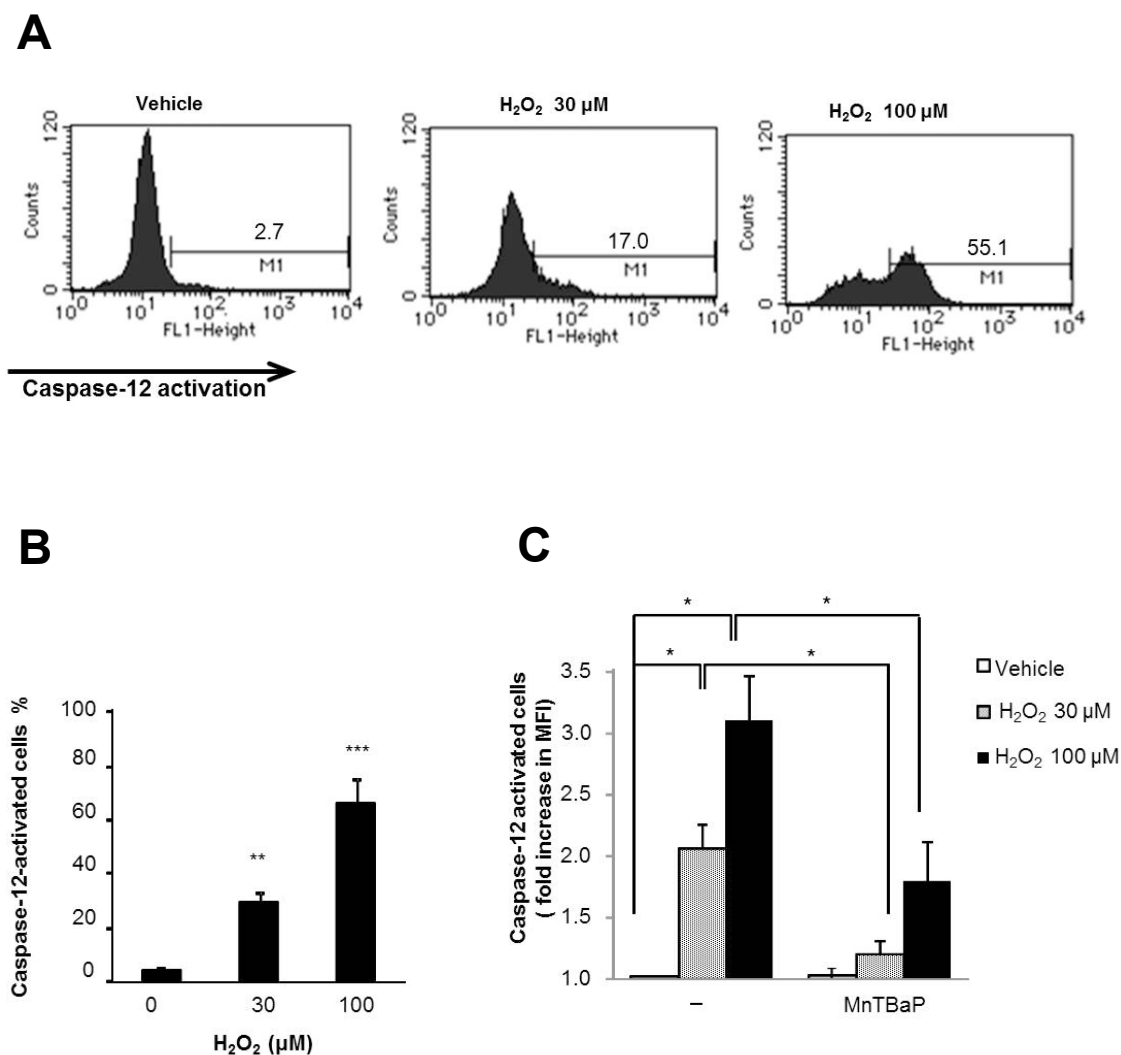


図9. (A,B) A375 細胞を 30 μM もしくは 100 μM H_2O_2 で 24 時間処理し、フローサイトメトリを用いて細胞透過性基質である FITC-ATAD-fmk の切断を指標として caspase-12 の機能活性を測定した。パネル A は代表的なヒストグラムを示す。n=4, *p<0.05; **p<0.01。 (C) A375 細胞を 30 μM もしくは 100 μM H_2O_2 単独ないし 30 μM MnTBaP と併用で 24 時間処理しフローサイトメトリを用いて caspase-12 の活性化を解析した。 n=4, *p<0.05。

8. H₂O₂による小胞体ストレス応答タンパク質の発現誘導

小胞体ストレス誘導のさらなる検証をするために 2 種類の小胞体ストレス応答タンパク質 GRP78 と XBP-1 の発現をウェスタンブロット法を用いて調べた。

8-1. 結果

陽性コントロールであるタプシカギン(Tg) で 24 時間処理すると GRP78 の発現が有意に増加していたが、H₂O₂ 処理では増加は見られなかった (図 10A)。これに対して XBP-1 の発現は、実験によりその程度は異なるものの、H₂O₂ 処理で XBP-1 の活性型 (XBP-1s) と非活性型(XBP-1u) 両方の発現が増加し、これらの増加は MnTBaP 処理で完全に阻害された (図 10B)。

8-2. 小括

H₂O₂ が小胞体ストレス応答を誘導し、その効果は細胞内 O₂⁻ を介することが示された。

図 10. H₂O₂ による小胞体ストレス応答タンパク質の発現誘導

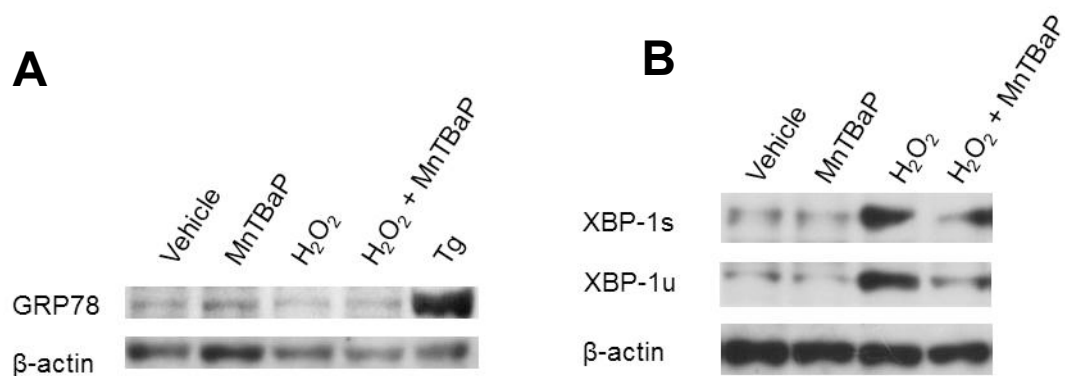


図 10. A375 細胞を 100 μ M H₂O₂ 単独ないし 30 μ M MnTBaP と併用、1 μ M Tg で 24 時間処理した。細胞を洗浄し SDS-サンプルバッファーに溶解した後に、ウェスタングロブット特異抗体を用いて GRP78 蛋白(A)と XBP-1 蛋白(B)を検出した。

9. ヒト正常上皮由来メラノサイトにおける H_2O_2 の細胞毒性

9-1. 結果

蛍光顕微鏡解析では、ヒト正常上皮由来メラノサイトを 100ng/ml TRAIL や 100 μM H_2O_2 単独ないし併用で 24 時間処理しても細胞死 (図 11A)、アポトーシス (図 11B) とともにほとんど誘導しなかった。さらに H_2O_2 4 時間処理により細胞内ならびにミトコンドリアでの O_2^- 産生はほとんどみられなかった (図 11C,D)。

9-2. 小括

メラノサイトは H_2O_2 誘導性細胞死と O_2^- 産生に抵抗性であることが示された。

図 11. ヒト正常上皮由来メラノサイトにおける H_2O_2 の細胞毒性

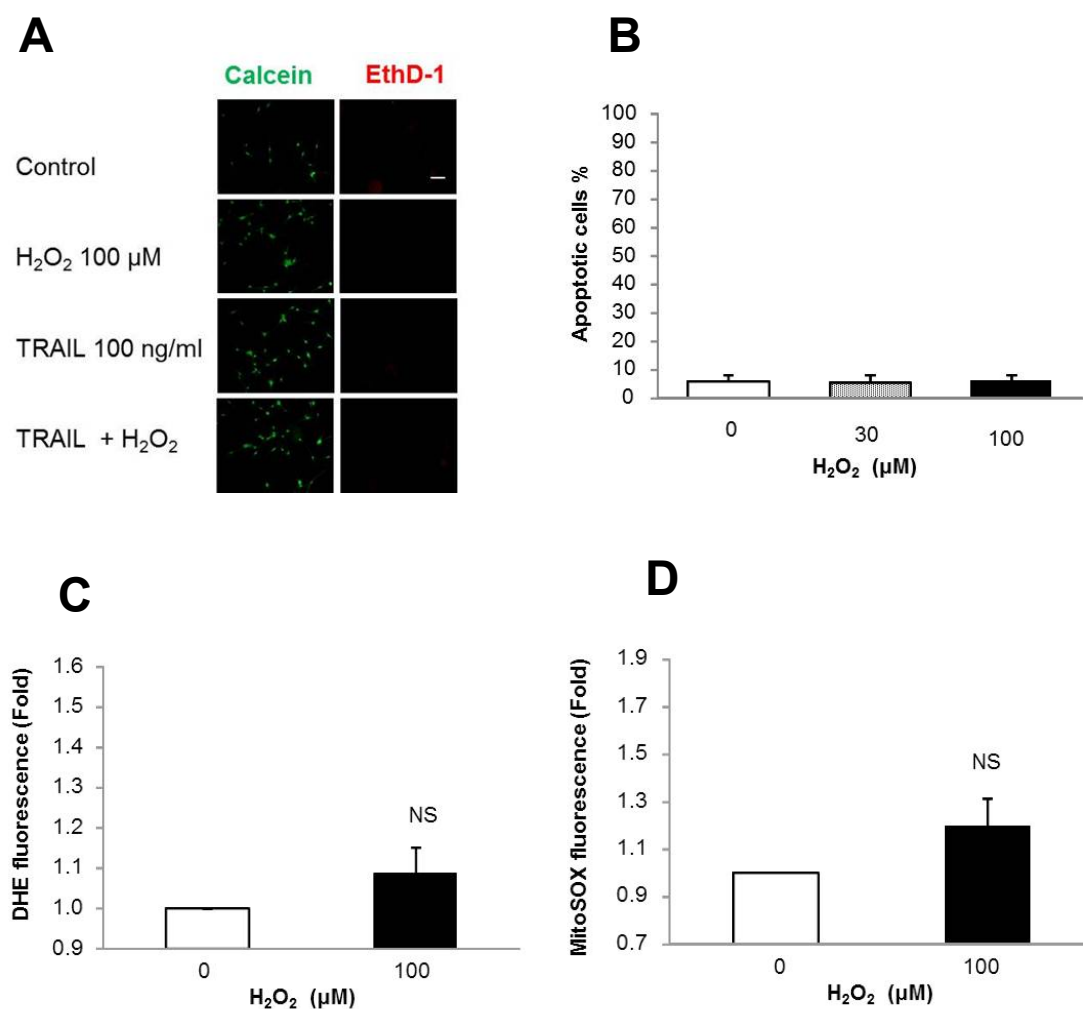


図 11. (A) メラノサイトを $100\mu M H_2O_2$ と $100ng/ml$ TRAIL を用いて、各々単独ないし併用で 24 時間処理し、培地を除去した後に細胞を calcein-AM と EthD-1 を用いて生細胞 (緑色) と細胞膜が損傷された死細胞 (赤色) を染色した。画像は蛍光顕微鏡を用いて撮影した ($\times 100$)。 (B) メラノサイトを $30\mu M$ もしくは $100\mu M H_2O_2$ で 24 時間処理した。FITC-Annexin V/PI で染色し、フローサイトメトリを用いて解析した。Annexin V 陽性細胞をアポトーシス細胞とした。n=4。 (C,D) DHE (C) と MitoSOX (D) でロードしたメラノサイトを $100\mu M H_2O_2$ で 4 時間処理し、細胞内およびミトコンドリア内 O_2^- 産生をフローサイトメトリで検出した。n=4。

10. 研究成果の総括

H_2O_2 は TRAIL 抵抗性ヒトメラノーマ細胞において細胞死を誘導し、 H_2O_2 の濃度依存的に、内因性アポトーシス経路や小胞体ストレスを介した経路などいくつかの細胞死経路を刺激することが示された。

H_2O_2 は細胞内 O_2^- 産生を誘導し、それを介して TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞のアポトーシスを誘導することが示された。

H_2O_2 がミトコンドリア内を主とする細胞内で、 O_2^- 産生を誘導し、この O_2^- を介して caspase-12 活性化と小胞体ストレス応答が誘導されることが示された。

H_2O_2 はヒト正常メラノサイトにおいては細胞死や O_2^- 産生は誘導しないことが示された。

第4章 考察

本研究は、TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞の細胞死における H_2O_2 の役割を明らかにすることを目的に行われた。TRAIL は高い腫瘍選択性から臨床応用が期待されている一方で [8]、メラノーマを始めとして、いくつかの癌細胞では TRAIL に対し抵抗性があるといわれている [9, 10]。ヒトメラノーマ細胞の TRAIL に対する感受性は cell line によって異なり、その感受性の違いが問題視されている [25]。本研究では、使用した 3 種類すべてのメラノーマ細胞で TRAIL に対する抵抗性が確認され、いずれの細胞でも H_2O_2 による増強効果が見られたが、 H_2O_2 と TRAIL による相乗効果が明らかに見られたことと、細胞の安定性から A375 細胞を中心に研究を進めた。

本研究で使用した H_2O_2 の濃度は 30-100 μ M であり、 H_2O_2 の成人男性全血中の濃度 114-577 μ M [48]と比較しても低濃度と考えられる。 H_2O_2 は喘息などの呼吸器疾患、細菌、ウィルス、真菌感染症や関節炎、心疾患、癌に有効な代替療法として点滴投与をする治療法がある [49]。しかし、本研究では H_2O_2 の濃度を高濃度で処理すると、PI 陽性、カスパーズ阻害剤抵抗性のネクローシスと考えられる細胞の割合が高くなった。ネクローシスを引き起こすと炎症を引き起こすことから [50]、 H_2O_2 の濃度は低濃度のまま、効果的に細胞死を誘導できる方法を検討した結果、 H_2O_2 と TRAIL を併用することで腫瘍選択性を保ったまま H_2O_2 の濃度を上げずにアポトーシスを効果的に誘導できると考えた。

TRAIL 抵抗性ヒトメラノーマ細胞では、TRAIL によって細胞内 H_2O_2 はほとんど誘導されなかった。一方、細胞外から H_2O_2 (30-100 μ M) を投与すると細胞死が誘導された。さらに、 H_2O_2 と TRAIL で同時に処理すると相乗的にアポトーシスが誘導された。これらの結果は、 H_2O_2 が TRAIL の細胞毒性のメディエータではなく調節因子であることを示唆する。また、この相乗効果は高濃度の H_2O_2 よりも低濃度の H_2O_2 でより顕著に見られたことから、高濃度 H_2O_2 はその固有のアポトーシス経路に加えて、TRAIL 誘導アポトーシス経路を活性化すると考えられる。アポトーシスの主要な機序として内因性ミトコンドリア経路が挙げられる。低濃度の H_2O_2 で誘導された細胞死は caspase 依存性であり、 $\Delta\Psi_m$ 脱分極と caspase-3/7 とも関与していたが、caspase-3/7 を阻害してもアポトーシスは一部しか抑制されないことから、この caspase 依存性アポトーシスでは、内因性ミトコンドリア経路が働いているだけでなく、他の caspase カスケードも関与していることが示唆された。

小胞体は内因性経路や外因性経路を介さない経路で細胞死を惹起することができ、小胞体関連細胞死は caspase-12 を介していると考えられている [15-19]。小

胞体ストレス下では XBP-1 mRNA がスプライシングされ、成熟 XBP-1 蛋白への翻訳が開始される [16, 26, 27]。本研究では H₂O₂ が caspase-12 活性化を誘導し、成熟 XBP-1 蛋白の発現を増加させたことから、小胞体ストレスが誘導されたことが示された。さらに、caspase-12 を阻害すると H₂O₂ 誘導性アポトーシスは強く抑制された。以上の結果は、H₂O₂ 誘導性アポトーシスでは caspase-12 に代表される小胞体関連アポトーシス経路が主に働いていることを示唆する。

マウス、ラット、ウサギ、ウシなど数々の哺乳類の細胞では小胞体ストレスにひき続いて caspase-12 が活性化される報告がある一方で [19]、ヒトの小胞体関連アポトーシスにおける caspase-12 の役割は未だに明らかではない。その原因としてヒト caspase-12 遺伝子には、発現を阻害する変異があることが挙げられる [51]。しかし、いろいろなヒト腫瘍細胞で、H₂O₂ やシスプラチン、テトロカルチン A、温度上昇などの細胞死誘導剤で誘導された小胞体ストレスに引き続いて、caspase-12 様蛋白が存在し、活性化されているという報告が相次いでおり [41, 52-57]、caspase-12 のアポトーシスにおける役割についてはさらなる研究が必要である。

近年、小胞体ストレスへの適応が腫瘍の悪性化や治療抵抗性につながり、メラノーマ細胞においては、GRP78 が小胞体ストレスへの適応に大きな役割を果たしているといわれている [28, 30]。GRP78 の発現は腫瘍の発生や成長に関与し、シスプラチンやアドリアマイシンなどの化学療法への抵抗性と相関している [28, 30, 58]。本研究では、メラノーマ細胞において GRP78 の発現は Tg 処理で増加したが、H₂O₂ 処理では減少した。同時に Tg では細胞死は誘導されず H₂O₂ では細胞死が誘導された。また、Tg に感受性のある Jurkat 白血病細胞において GRP78 の発現はごく僅かしか増加しなかった [59]。GRP78 は caspase-4 と caspase-7 活性を阻害することで抗アポトーシス作用を発揮するが [58]、本研究では caspase-4 の酵素活性を抑制するとアポトーシスが増加したことから、H₂O₂ 誘導性アポトーシスにおいてはむしろ促進的に働くと考えられた。caspase-4 と caspase-12 の構造類似性を考えると、小胞体関連アポトーシスに抵抗するために GRP78 が caspase-12 も標的にしている可能性も考えられる。

ROS レベルは、O₂⁻ が H₂O₂ に不均化されるのを触媒する抗酸化防御システムによって制御されている。このシステムはマンガンスーパーオキシドジスムターゼや銅・亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ、H₂O₂ を分解するカタラーゼやグルタチオン還元酵素などの抗酸化酵素に代表される [32, 33]。H₂O₂ は細胞膜を容易に通過し細胞外に拡散できる分子である。カタラーゼによって細胞外 H₂O₂

を除去すると、最終的に細胞内 H_2O_2 レベルを低下させることにつながるが、カタラーゼが H_2O_2 誘導性細胞死を抑制しなかったということは、内在性 H_2O_2 自体が細胞死のメディエータではないことを示している。これは、MnTBaP 処理により細胞内 H_2O_2 を増加させても細胞死が促進されなかったことから裏付けられる。代わりに、本研究は H_2O_2 誘導性細胞死において O_2^- が重要な働きをすることを明らかにした。細胞死を有意に誘導する濃度の H_2O_2 はミトコンドリアにおける持続的な細胞内 O_2^- 産生を誘導し、この O_2^- を消去すると H_2O_2 による細胞死が抑制され、さらに caspase-12 や XBP-1 活性化など H_2O_2 誘導性の小胞体ストレス反応も抑制された。以上より、 H_2O_2 によりミトコンドリアで産生される O_2^- が、小胞体関連アポトーシスを介して、細胞死を促進すると結論された。

本研究は H_2O_2 が TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞において細胞内 O_2^- 産生を介して細胞死を誘導することを初めて示した。その後の実験で、17 種類のメラノーマ細胞すべてで H_2O_2 による TRAIL の細胞死に対する増強効果がみられ、正常細胞においては本研究で用いたヒト正常メラノサイトの他に、肺や上皮の線維芽細胞でも H_2O_2 や TRAIL で細胞死が誘導されなかったことから、腫瘍選択性が保たれていることが確認された。以上のことから H_2O_2 など細胞内で O_2^- 産生を誘導する物質の併用が、TRAIL 抵抗性メラノーマの新たな治療法の確立につながると思われる。

第5章 　　まとめ

本研究は、 H_2O_2 が TRAIL 抵抗性ヒトメラノーマ細胞においてミトコンドリアの O_2^- 産生を介して細胞死を誘導することを初めて示した。 H_2O_2 が O_2^- 産生を誘導する機序についてはさらなる研究が必要であるが、今後のメラノーマの治療において、 H_2O_2 など細胞内で O_2^- 産生を誘導する物質が有効である可能性が示された。

謝 辞

本研究は日本大学医学部大学院医学研究科先端医学系分子細胞免疫・アレルギー学研究室 (羅 智靖教授) において実施したものです。

本研究に関して、研究ならびに学位論文の御指導、御校閲を直接賜りました同研究室の鈴木良弘博士 (現在 日本大学医学部生物機能医学系・生理学分野、日本大学総合医学研究所・難治疾患治療開発グループ) に深謝いたします。また、研究の御指導を賜りました井上寿男博士に深謝いたします。

本研究の御指導を賜りました日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野、落合豊子教授ならびに日本大学大学院医学研究科先端医学系分子細胞免疫・アレルギー学分野、羅 智靖教授に深謝いたします。

参考文献

1. 清水宏: 悪性黒色腫. あたらしい皮膚科学 第2版: 457-462, 中山出版, 東京, 2011.
2. Elwood JM, Jopson J: Melanoma and sun exposure: An overview of published studies. *Int J Cancer* 73:198-203, 1997.
3. Ishihara K, Saida T, Yamamoto A, et al.: Updated statistical data for malignant melanoma in Japan. *Int J Clin Oncol* 6:109-16, 2001.
4. 齋田俊明, 真鍋求, 竹之内辰也, 清原隆宏, 山本明史, 清原祥夫, 高田実, 山崎直也, 師井洋一, 神谷秀喜, 八田尚人, 宇原久, 幸野健, 鹿間直人, 土田哲也, 古賀弘志: 皮膚悪性腫瘍診療ガイドライン. *日皮会誌* 117: 1855-1925, 2007.
5. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA: Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology* 23: 488-496, 2009.
6. 高橋俊二: 悪性黒色腫に対する新しい分子標的薬. *癌と化学療法* 40:19-25, 2013.
7. Melanoma treatment PDQ[®]. National Cancer Institute at the National Institute of Health. online, available from <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/HealthProfessional>>, (accessed Nov 19, 2013)
8. Ashkenazi A: Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2: 420-430, 2002.
9. Dyer MJ, MacFarlane M and Cohen GM: Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. *J Clin Oncol* 25: 4505-4506, 2007.
10. Zhang L, Fang B: Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12: 228-237, 2005.
11. Johnstone RW, Frew AJ and Smyth MJ: The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 782-798, 2008.
12. LeBlanc HN and Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10: 66-75, 2003.
13. Wang S: The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* 27: 6207-6215, 2008.
14. Sayers TJ: Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 60: 1173-1180, 2011.
15. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103, 2000.

16. Groenendyk J and Michalak M: Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 52: 381-395, 2005.
17. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277: 21836-21842, 2002.
18. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T and Yasuhiko Y: An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277: 34287-34294, 2002.
19. Szegezdi E, Fitzgerald U and Samali A: Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 186-194, 2003.
20. Dimberg LY, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A and Ford HL: On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 32: 1341-1350, 2012
21. Thomas WD, Hersey P: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol* 161: 2195-2200, 1998.
22. Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T and Hersey P: Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* 59: 2747-2753, 1999.
23. Zhang XD, Zhang XY, Gray CP, Nguyen T, and Hersey P: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res* 61:7339-7348, 2001.
24. Nguyen T, Zhang XD, Hersey P: Relative resistance of fresh isolates of melanoma to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 7(3 Suppl):966s-973s, 2001.
25. Zhang XD, Wu JJ, Gillespie S, Borrow J, Hersey P: Human melanoma cells selected for resistance to apoptosis by prolonged exposure to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand are more vulnerable to necrotic cell death induced by cisplatin. *Clin Cancer Res* 12, 1355-1364, 2006.
26. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP et al: Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22: 8608-8618, 2003
27. Boyce M and Yuan J: Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13: 363-373, 2006.

28. Hersey P and Zhang XD: Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 358-367, 2008.
29. Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Kiejda KA, Mhaidat N, Wang YF, Thorne R, Zhang XD, and Hersey P: Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response. *Cancer Res* 67: 5880-5888, 2007.
30. Rutkowski DT and Kaufman RJ: That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci* 32: 469-476, 2007.
31. Wu H, Xing K, Lou MF: Glutaredoxin 2 prevents H₂O₂-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1705-1715, 2010.
32. Circu ML and Aw TY: Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48: 749-762, 2010.
33. 川内康弘: 角化症診療のカッティング・エッジ 1. 表皮の酸化ストレスとその防御機構. *日皮会誌* 123: 1915-1921, 2013.
34. Bhandary B, Marahatta A, Kim HR, Chae HJ: An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *Int J Mol Sci* 14, 434-456, 2012.
35. Kamata H, Hirata H: Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11: 1-14, 1999.
36. Fas SC, Baumann S, Zhu JY, et al: Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNFalpha- and TRAIL-induced apoptosis. *Blood* 108: 3700-3706, 2006.
37. Shenoy K, Wu Y, Pervaiz S: LY303511 enhances TRAIL sensitivity of SHEP-1 neuroblastoma cells via hydrogen peroxide-mediated mitogen-activated protein kinase activation and up-regulation of death receptors. *Cancer Res* 69: 1941-1950, 2009.
38. Barbouti A, Amorgianiotis C, Kolettas E, Kanavaros P, Galaris D: Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic Biol Med* 43: 1377-1387, 2007.
39. Choi K, Ryu SW, Song S, Choi H, Kang SW, Choi C: Caspase-dependent generation of reactive oxygen species in human astrocytoma cells contributes to resistance to TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 17:833-845, 2010.
40. Suzuki Y, Yoshimaru T, Inoue T and Ra C: Mitochondrial Ca²⁺ flux is a critical determinant of the Ca²⁺ dependence of mast cell degranulation. *J Leukoc Biol* 79:

508-518, 2006.

41. Suzuki Y, Inoue T, Murai M, et al: Depolarization potentiates TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells: Role for ATP-sensitive K⁺ channels and endoplasmic reticulum stress. *Int J Oncol* 41:465-475, 2012.
42. Inoue T, Suzuki Y, Yoshimaru T, and Ra C: Reactive oxygen species produced up-or downstream of calcium influx regulate proinflammatory mediator release from mast cells: Role of NADPH oxidase and mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 1783: 789-802, 2008.
43. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, et al: Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15038-15043, 2006.
44. Carter WO, Narayanan PK and Robinson JP: Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* 55:253-258, 1994.
45. Devadas S, Hinshaw JA, Zaritskaya L, Williams MS. Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis. *Free Radic Biol Med* 35: 648-661, 2003.
46. Suzuki Y, Yoshimaru T, Inoue T, Ra C: Discrete generations of intracellular hydrogen peroxide and superoxide in antigen-stimulated mast cells: reciprocal regulation of store-operated Ca²⁺ channel activity. *Mol Immunol* 46: 2200-2209, 2009.
47. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Kashiwaya Y, Haskó G., Pacher P: Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 203- 208, 2007.
48. Varma SD, Devamanoharan PS: Hydrogen peroxide in human blood. *Free Radic Res Commun* 14: 125-131, 1991.
49. Questionable methods of cancer management: hydrogen peroxide and other 'hyperoxygenation' therapies. *CA Cancer J Clin* 43 : 47-56, 1993.
50. Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15, 1995.
51. Fischer H, Koenig U, Eckhart L and Tschachler E: Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 722-726, 2002.
52. Palapati P and Averill-Bates DA: Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: Protective role of mild heat preconditioning at 40°C. *Biochim Biophys Acta* 12: 1987-1999, 2011.
53. Mandic A, Hansson J, Linder S and Shoshan MC: Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* 278:

9100-9106, 2003.

54. Tinhofer I, Anether G, Senfter M et al: Stressful death of T-ALL tumor cells after treatment with the anti-tumor agent Tetrocarcin-A. *FASEB J* 16: 1295-1297, 2002.
55. Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC et al: Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 36: 592-601, 2002.
56. Trisciuglio D, Uranchimeg B, Cardellina JH et al: Induction of apoptosis in human cancer cells by candidaspongiolide, a novel sponge polyketide. *100*: 1233-1246, 2008.
57. Shellman Y, Howe WR, Miller LA et al: Hyperthermia induces endoplasmic reticulum-mediated apoptosis in melanoma and non-melanoma skin cancer cells. *J Invest Dermatol* 128: 949-956, 2007.
58. Jiang CC, Mao ZG, Avery-Kiejda KA, Wade M, Hersey P, Zhang XD: Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 30: 197-204, 2009.
59. Inoue T and Suzuki-Karasaki Y: Mitochondrial superoxide mediates mitochondrial and endoplasmic reticulum dysfunctions in TRAIL-induced apoptosis in Jurkat cells. *Free Radic Biol Med* 61: 273-284, 2013.

研究業績

栃木美寿紀

I	発表 ①一般発表	28	
	②特別発表	なし	
II	論文 ①原著論文	5 (共	5)
	②症例報告	7 (共	7)
	③総説	なし	
III	著書	2	

I. 発表

① 一般発表

1. 栃木美寿紀, 小峯志保子, 佐々木重胤, 久野宗一郎, 宮川康司, 正岡直樹, 栃木明人, 山本樹生: 胎盤血腫を認めた二絨毛膜性双胎の一例, 第 324 回日本産婦人科学会東京地方部会, 東京, 2002 年 12 月
2. 市川剛, 栃木美寿紀, 山代美和子, 永石匡司, 正岡直樹, 栃木明人, 山本樹生: 妊娠中呼吸障害を呈した肺リンパ管筋腫症の 1 例, 第 104 回関東連合産科婦人科学会学術大会, 東京, 2002 年 10 月
3. 栃木美寿紀, 田村正明, 清水八尋, 永井宣久, 吉永陽樹, 正岡直樹, 栃木明人, 山本樹生: 下大静脈フィルターを挿入し帝王切開術後に血栓除去術を行った妊娠 32 週発症の深部静脈血栓症の一例, 第 105 回日本産科婦人科学会関東連合地方部会総会・学術講演会, 東京, 2003 年 6 月
4. 栃木美寿紀, 五島順子, 松永晶江, 横山愛, 清水秀直, 小林麻衣子, 原弘之, 照井正, 竹村卓也: Münchhausen 症候群の 1 例, 第 793 回日本皮膚科学会東京地方会(城西), 東京, 2004 年 9 月
5. 相川美和, 西尾晴子, 福田恭子, 栃木美寿紀, 落合豊子: 腎機能低下に伴い出現した acquired reactive perforating collagenosis, 第 799 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2005 年 5 月
6. 栃木美寿紀, 一迫玲, 須田たかね, 原弘之, 照井正: ALK 1 陽性 Primary Cutaneous Anaplastic Large Cell Lymphoma の 1 例, 第 800 回日本皮膚科学会東京地方会(合同), 東京, 2005 年 6 月
7. Mizuki Tochigi, Hiroyuki Hara, Hidenao Shimizu, Ai Yokoyama, Tadashi Terui: Cutaneous Munchausen's syndrome caused by self-injection of fermented beans, the 14th Japan-Korea Joint Meeting of Dermatology, 熊本, 2005 年 11 月
8. 栃木美寿紀, 須田たかね, 岡田知善, 原弘之, 照井正, 劉美成, 藤田之彦, 原田研介: 帯状疱疹に髄膜炎を併発した 9 歳女児の 1 例, 第 806 回日本皮膚科学会東京地方会(城西), 東京, 2006 年 4 月
9. 栃木美寿紀, 岡田知善, 原弘之, 照井正: Disseminated Superficial Actinic Porokeratosis の dermoscopy 所見-免疫組織化学的検討を加えて-, 第 105 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2006 年 6 月
10. 栃木美寿紀, 羽尾貴子, 鎌田英明, 松永晶江: Bednar 腫瘍の一例, 第 70 回日本皮膚科学会東京支部学術大会総会, 東京, 2007 年 2 月
11. 栃木美寿紀, 羽尾貴子, 鎌田英明: 斑状皮膚萎縮症の 1 例, 第 23 回

日本臨床皮膚科医会総会, 広島, 2007年5月

12. 栃木美寿紀, 松本千幸, 落合豊子: 石灰化物質の経表皮排泄現象を伴った Pseudoxanthoma elasticum (PXE), 第 817 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2008年1月
13. 栃木美寿紀, 目片千幸, 落合豊子, 西山宏幸, 山中健次郎, 安澤数史, 河崎昌子: タクロリムス内服中, 自家接種によって病変が多発した スポロトリコーシス, 第 72 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京, 2009年2月
14. 東郷香奈, 西尾晴子, 栃木美寿紀, 久保田圭子, 落合豊子, 東海林忍, 江頭富士子, 富永善照, 菊島公夫: 透析患者に生じ血漿交換療法により救命し得た TEN 型蕁麻疹, 第 108 回日本皮膚科学会総会, 福岡, 2009年4月
15. Mizuki Tochigi, Toyoko Ochiai, Chiyuki Mekata, Hiroyuki Nishiyama, Kenjiro Yamanaka, Kazushi Anzawa, Masako Kawasaki: Sporotrichosis on the face by autoinoculation associated with tacrolimus treatment, the 17th congress of the International society for human and animal mycology, 東京, 2009年5月
16. 福田恭子, 相川美和, 栃木美寿紀, 落合豊子, 佐々木健司, 小川眞広: 大腿部に生じた Low-grade fibromyxoid sarcoma, 第 824 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2009年6月
17. 松浦大輔, 栃木美寿紀, 相川美和, 西尾晴子, 東郷香奈, 落合豊子, 林輝信: 水疱性類天疱瘡と落葉状天疱瘡の合併例, 第 825 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2009年7月
18. 松浦大輔, 栃木美寿紀, 落合豊子, 中野創, 澤村大輔, 桑原京介: 色素異常型単純型先天性表皮水疱症の母子例, 第 827 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2009年11月
19. 栃木美寿紀, 田中雅子, 落合豊子, 桑原京介: 塩酸ピリドキシンによる光線過敏型蕁麻疹, 第 831 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2010年7月
20. 佐野紘子, 栃木美寿紀, 松浦大輔, 福田恭子, 落合豊子, 鈴木寛丈, 橋本隆: DDS が奏功した線状 IgA 水疱性皮膚症 (lamina lucida 型), 第 832 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2010年9月
21. Mizuki Tochigi, Yoshihiro Suzuki, Toshio Inoue, Mayumi Murai, Miki Suzuki-Karasaki, Toyoko Ochiai, Chisei Ra: H₂O₂ induces apoptosis and synergizes with TRAIL in human melanoma cells through caspase-12 activation, 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th

- International Symposium on Molecular Medicine, ギリシャ, 2010年10月
22. Yoshihiro Suzuki, Toshio Inoue, Mayumi Murai, Mizuki Tochigi, Miki Suzuki-Karasaki, Toyoko Ochiai, Chisei Ra : Persistent plasma membrane depolarization sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, ギリシャ, 2010年10月
 23. Mizuki Tochigi, Yoshihiro Suzuki, Toshio Inoue, Mayumi Murai, Miki Suzuki-Karasaki, Toyoko Ochiai, Chisei Ra : H₂O₂ induces apoptosis and synergizes with TRAIL in human melanoma cells through a caspase-12-dependent pathway, 日本研究皮膚科学会第35回年次学術大会・総会, 和歌山, 2010年12月
 24. Yoshihiro Suzuki, Toshio Inoue, Mayumi Murai, Mizuki Tochigi, Miki Suzuki-Karasaki, Toyoko Ochiai, Chisei Ra : Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis, 日本研究皮膚科学会第35回年次学術大会・総会, 和歌山, 2010年12月
 25. Yoshihiro Suzuki, Toshio Inoue, Mizuki Tochigi, Mayumi Murai, Miki Suzuki-Karasaki, Toyoko Ochiai, Chisei Ra : H₂O₂ acts as a tumor-selective cytotoxic agent toward human melanoma cells: Roles of mitochondrial superoxide generation and endoplasmic reticulum stress, 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine, ギリシャ, 2011年10月
 26. Mizuki Tochigi, Yoshihiro Suzuki, Toshio Inoue, Mayumi Murai, Miki Suzuki-Karasaki, Toyoko Ochiai, Chisei Ra : H₂O₂ induces caspase-dependent or -independent apoptosis in TRAIL-resistant human melanoma cells through mitochondrial superoxide generation, 日本研究皮膚科学会第36回年次学術大会・総会, 京都, 2011年12月
 27. Mayumi Murai, Yoshihiro Suzuki, Toshio Inoue, Mizuki Tochigi, Toyoko Ochiai, Chisei Ra : Sensitization of human melanoma cells to death receptor -induced apoptosis by diallyl trisulfide, 日本研究皮膚科学会第36回年次学術大会・総会, 京都, 2011年12月
 28. 山下紘子, 栃木美寿紀, 落合豊子 : 乳児に生じた spindle cell xanthogranuloma の1例, 第842回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2012年6月

II. 論文

① 原著論文

1. Hara H, Kobayashi M, Yokoyama A, Tochigi M, Matsunaga A, Shimizu H, Goshima J, Suzuki H : Drug-induced hypersensitivity syndrome due to carbamazepine associated with reactivation of human herpesvirus 7, *Dermatology*, 211:159-161, 2005.
2. Tochigi M, Hara H, Goshima J, Kobayashi M, Shimizu H, Yokoyama A, Matsunaga A, Takemura T, Terui T : Cutaneous Munchausen's syndrome caused by self-injections of fermented beans, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22: 886-887, 2008.
3. 栃木美寿紀, 岡田知善, 原弘之, 照井正 : 日光表在播種型汗孔角化症のダーモスコピー所見－病理組織学的検討を加えて－, *皮膚科の臨床*, 51:1811-1815, 2009.
4. Mizuki Tochigi, Toyoko Ochiai, Chiyuki Mekata, Hiroyuki Nishiyama, Kazushi Anzawa, Masako Kawasaki : Sporotrichosis of the face by autoinoculation in a patient undergoing tacrolimus treatment, *The Journal of Dermatology*, 39:796-798, 2012.
5. Mizuki Tochigi, Toshihiro Inoue, Miki Suzuki-Karasaki, Toyoko Ochiai, Chisei Ra, Yoshihiro Suzuki-Karasaki : Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation, *International Journal of Oncology*, 42:863-872, 2013.

② 症例報告

1. 栃木美寿紀, 小峯志保子, 佐々木重胤, 久野宗一郎, 宮川康司, 正岡直樹, 栃木明人, 山本樹生 : 胎盤血腫を認めた二絨毛膜性双胎の一例, *日本産科婦人科学会東京地方部会会誌*, 52 : 80-84, 2003.
2. 栃木美寿紀, 原弘之, 照井正 : 納豆の混入した異物の皮膚への刺入により生じた Münchhausen 症候群, *皮膚病診療*, 27 : 405-408, 2005.
3. 相川美和, 西尾晴子, 福田恭子, 栃木美寿紀, 落合豊子 : 脱水と腎機能低下を契機に発症した後天性反応性穿孔性膠原線維症, *皮膚科の臨床*, 48 : 1801-1804, 1757-1758, 2006.
4. 栃木美寿紀, 羽尾貴子, 鎌田英明 : 斑状皮膚萎縮症の1例, *日本臨床皮膚科医会雑誌*, 24 : 13-16, 2007.

5. 栃木美寿紀, 落合豊子, 目片千幸: 多数の石灰化物質が経表皮性に排泄された弾力線維性仮性黄色腫, 皮膚科の臨床, 52 : 543-547, 2010.
6. 西尾晴子, 落合豊子, 栃木美寿紀, 東郷香奈, 谷樹昌, 砂川恵伸: 播種性糞線虫症による出血性肺炎で死亡した重症薬疹: 皮膚科の臨床, 52 : 1855-1858, 2010.
7. 山下紘子, 栃木美寿紀, 松浦大輔, 福田恭子, 鈴木寛丈, 橋本隆, 落合豊子: ジアフェニルスルホンが奏効した線状 IgA 水疱性皮膚症 (Lamina Lucida 型), 皮膚科の臨床, 55 : 819-822, 2013.

III. 著書

1. 栃木美寿紀, 原弘之: 足底の色素斑, 皮膚科診療カラーアトラス大系 6 巻: 18-19, 株式会社講談社, 東京, 2010.
2. 栃木美寿紀: Munchausen 症候群, 皮膚科診療カラーアトラス大系 8 巻: 179, 株式会社講談社, 東京, 2011.