

メラノーマ細胞の TRAIL 感受性制御における
オートファジーの役割の研究

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系分子細胞生理学専攻

小野江 明日香

修了年 2020 年

指導教員 日臺 智明

メラノーマ細胞の TRAIL 感受性制御における
オートファジーの役割の研究

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系分子細胞生理学専攻

小野江 明日香

修了年 2020 年

指導教員 日臺 智明

目次

| | |
|-------|----|
| 略語 | 1 |
| 概要 | 2 |
| 緒言 | 3 |
| 研究の目的 | 7 |
| 対象と方法 | 8 |
| 結果 | 11 |
| 考察 | 15 |
| まとめ | 19 |
| 謝辞 | 20 |
| 図表、図説 | 21 |
| 参考文献 | 36 |
| 研究業績 | 42 |

略語

α DR: 抗 DR5 抗体 (Death receptor 5 の作動薬 (アゴニスト))

AM: Antimycin A... 酸化的リン酸化阻害薬

BFM: Bafilomycin A1... オートファジー阻害薬

$[Ca^{2+}]_{cyt}$... 細胞質内カルシウム

$[Ca^{2+}]_{mit}$... ミトコンドリア内カルシウム

CQ: Chloroquine... オートファジー阻害薬

DR4: Death receptor 4... TRAIL 受容体

DR5: Death receptor 5... TRAIL 受容体

EP: Extrinsic pathway... アポトーシスの経路

FCCP: Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone... 酸化的リン酸化阻害薬

IP: Intrinsic pathway... アポトーシスの経路

MCU: Mitochondrial calcium uniporter... 小胞体からミトコンドリアへのカルシウム輸送経路

MM: Malignant melanoma... メラノーマ

MPT: Mitochondrial permeability transition... ミトコンドリア透過性転移

OXOPHOS: Oxidative phosphorylation... 酸化的リン酸化

ROT: Rotenone... 酸化的リン酸化阻害薬

SOCE: Store-operated calcium entry... ストア作動性カルシウム流入

Tg: Thapsigargin... 小胞体膜に局在する SERCA ポンプを阻害し、小胞体 Ca^{2+} を枯渇させることで、ストア作動性カルシウム流入を活性化

TRAIL: Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand

WT: Wortmannin... オートファジー阻害薬

3-MA: 3-methyladenin... オートファジー阻害薬

概要

背景： Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) は、Death receptor (DR) 4 と DR5 の 2 種の受容体に結合して、腫瘍特異的にアポトーシスを誘導することから、次世代の抗腫瘍薬として期待されている。しかし、ヒトメラノーマ (Malignant Melanoma: MM) のような悪性度の高い腫瘍細胞は、TRAIL に抵抗性を示すことがわかってきた。そのため、抗腫瘍薬として用いるためには、腫瘍細胞を TRAIL 感受性にする必要がある。オートファジーは細胞質内のタンパク質や、損傷した細胞小器官を分解する基本的な異化のプロセスであり、腫瘍細胞の生存と、TRAIL を含む様々なタイプの抗腫瘍薬への抵抗性に関与している。MM 細胞の TRAIL 誘導細胞死は、オートファジー阻害薬の併用により増加すること、ミトコンドリア内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$) を増加させても減少させてもミトコンドリアの形態異常の程度が強まり、誘導される細胞死は増加することが報告されている。このことから、オートファジー阻害薬による TRAIL 感受性の亢進には、ミトコンドリアの形態や $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ の変化が関係していると推察されるが、詳細については解明されていない。

目的： MM 細胞では、①TRAIL 誘導細胞死はオートファジー阻害薬で増強されることを示す。その際、②ミトコンドリアの形態変化、③ Ca^{2+} 動態の変化、におけるオートファジーの役割を明らかにする。

対象と方法： MM 細胞を用いて、TRAIL により誘導されるオートファジーの程度、TRAIL とオートファジー阻害薬を併用した際の細胞生存率、ミトコンドリアの形態変化と Ca^{2+} 動態について解析した。

結果： MM 細胞では恒常的にオートファジーが誘導されており、TRAIL や TRAIL 受容体 DR5 の作動薬 (アゴニスト) である抗 DR5 抗体は、MM 細胞のオートファジーを増強した。オートファジー阻害薬は MM 細胞の TRAIL 感受性を増強した。一方、正常線維芽細胞は、TRAIL やオートファジー阻害薬単独、併用による細胞毒性に抵抗性を示した。MM 細胞において、TRAIL、代表的なオートファジー阻害薬である 3-methyladenin (3-MA) は、それぞれ単独、併用で、ミトコンドリアの形態変化を起こした。一方、線維芽細胞では 3-MA はミトコンドリアの形態変化を起こさなかった。MM 細胞で、TRAIL は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を増加させ、オートファジー阻害薬も $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を増加させる傾向があった。しかし、TRAIL とオートファジー阻害薬を併用すると逆に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ は減少した。また、MM 細胞では TRAIL、3-MA はストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) を減少させた。

結語： オートファジー阻害薬は MM 細胞の TRAIL 感受性を増強した。この現象にミトコンドリアの形態変化や Ca^{2+} 動態が関与している可能性がある。本研究は、TRAIL 治療においてオートファジー阻害薬を使用することの新たな実験的根拠となる。TRAIL とオートファジー阻害薬の併用は、MM の治療に有望なアプローチとなる可能性がある。

緒言

メラノーマは現行の多くの治療に抵抗性を示す悪性腫瘍であるため、有効な薬剤の開発が求められている。TRAIL は次世代抗腫瘍薬として期待されているが、メラノーマは TRAIL 抵抗性を示すため、治療にはメラノーマを TRAIL 感受性にする必要がある。オートファジーは腫瘍細胞の生存や抗腫瘍薬への抵抗性に関与することが報告されており、メラノーマの TRAIL 抵抗性とオートファジーの関わりに注目した。

1. メラノーマ (Malignant melanoma: MM)

MM はメラノサイトを由来とする悪性腫瘍である。本邦での発生頻度は、1.12 人/10 万人・年とされ (1)、皮膚癌の中では基底細胞癌、有棘細胞癌に次ぐ頻度であり、近年増加傾向である。MM は、メラノサイトが存在する皮膚、粘膜、眼の脈絡膜、脳軟膜を原発としようが、ほとんどが皮膚に生じ (2)、臨床症状と病理所見から、表在拡大型、末端黒子型、悪性黒子型、結節型の 4 病型に分類されてきた (Clark 分類)。好発部位は人種によって顕著な差があり、本邦では末端黒子型が 42% と最多である (3)。近年、様々な遺伝子変異が報告され、これらの変異は紫外線暴露の程度や解剖学的部位と相関を示すことが判明し、Bastian らにより、MM を日光暴露の累積量、解剖学的部位、遺伝子異常によって分ける新たな分類が提唱されている (4-8)。

治療は外科的切除が原則であるが、進行例で外科的切除が困難な場合は、従来からダカルバジンを中心とした多剤併用化学療法や放射線療法、免疫療法などが行われていたが、予後不良であった。進行期 MM に対し、2014 年 7 月に、免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体のニボルマブが承認された。以降、2014 年 12 月に低分子性分子標的薬 (BRAF 阻害薬) のベムラフェニブ、2015 年 7 月に免疫チェックポイント阻害薬である抗 CTLA-4 抗体のイピリムマブ、2016 年 3 月に低分子性分子標的薬 (BRAF 阻害薬) のダブラフェニブ、(MEK 阻害薬) のトラメチニブ、2016 年 9 月には免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体のペンブロリズマブが承認された。しかし、免疫チェックポイント阻害薬の奏成功率は、抗 CTLA-4 抗体で約 10-20%、抗 PD-1 抗体で約 30-40% とされ、重篤な免疫関連有害事象 (immune-related adverse events : irAEs) をきたしうるという問題点がある (7)。分子標的薬は BRAF^{V600} 遺伝子変異を有する場合のみ適用となり、奏成功率は高いが数ヶ月で再発するといった問題があり (9)、いずれの薬剤も効果、安全の面で解決すべき課題も多い。

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

TRAIL は、1995 年に Wiley らによって報告された (10)、TNF スーパーファミリーに属するサイトカインである。ヒトの 5 種類の TRAIL 受容体のうち、アポトーシスを誘導する Death receptor (DR) として働くのは DR4 と DR5 の 2 種類である。アポトーシスには

Extrinsic pathway (EP) と Intrinsic pathway (IP) がある。EP では、細胞膜の 3 量体を形成する DR4/DR5 に TRAIL が結合すると、DR4/DR5 内の Death domain と Fas-associated death domain が会合し、カスパーゼ 8/10 の活性化、カスパーゼ 3/7 の活性化を通してアポトーシスにつながる。IP では、ミトコンドリアを介して細胞死誘導刺激が起こり、ミトコンドリア膜電位が低下し、膜透過性が上昇し、ミトコンドリア外膜に孔を形成して細胞質へチトクローム c が放出される。このチトクローム c が他の物質と複合体を形成し、カスパーゼ 9 の活性化が起こり、カスパーゼ 3/7 の活性化、アポトーシス誘導につながる (図 1) (11-13)。DR4 と DR5 は悪性腫瘍に高率に発現しており、TRAIL は DR4 と DR5 に結合することで、悪性腫瘍特異的にアポトーシスによる細胞死を誘導するが、正常組織にはほとんど毒性を示さないことから、副作用の少ない次世代の抗腫瘍薬として注目されている (14-20)。しかし、TRAIL の効果は腫瘍細胞によって異なり、白血病細胞、リンパ腫細胞では強く細胞死が誘導されるが、MM や骨肉腫は TRAIL に抵抗性を示すことが臨床試験でわかってきた (21,22)。これらの腫瘍細胞は DR を発現しているにも関わらず、TRAIL に対して抵抗性であり、TRAIL 使用中に TRAIL 抵抗性を獲得する (20-24)。このため、抗腫瘍薬として用いるためには、腫瘍細胞を TRAIL 感受性にする必要がある。

3. オートファジー

オートファジーは細胞質内のタンパク質や、損傷した細胞小器官を分解する基本的な異化のプロセスである。オートファジーには、①マクロオートファジー、②ミクロオートファジー (細胞小器官のオートファジー)、③シャペロン介在性オートファジーの 3 種類がある。オートファジーは、細胞質内の 2 重膜 (隔離膜) の誘導、その伸張とオートファゴソーム形成、オートファゴソームとリソソームの融合によるオートリソソーム形成、オートリソソームの内容物分解、再利用、という多数の複雑なステップから成り立っている (図 2) (25-27)。オートファジー阻害薬としてこの過程をそれぞれ阻害する種々の薬剤がある (図 2)。これらの事象 (オートファゴソームの形成から細胞構成要素の分解) は、オートファジー関連遺伝子 (Atg) によって厳密にコントロールされている (26)。オートファジーの特異的マーカーとして知られる Atg8 (Autophagy-defective Gene-8) の関連タンパクのひとつである LC3 (microtubule-associated protein1 light chain 3) は、細胞と組織内で高レベルに発現し、オートファジー小胞に集積する。LC3 は翻訳後、すぐに LC3- I になり、LC3- I はオートファジーが誘導されると LC3- II になる。

オートファジーは、饑餓のような細胞ストレスに対処し、エネルギーや代謝前駆物質を供給する。オートファジーは、Mammalian target of rapamycin 複合体 I (mTORC1) によって負に制御されており、栄養が枯渇すると、mTORC1 によるこの負の制御は軽減され、オートファジーの誘導につながる (27-29)。その結果、オートファジーは、高いエネルギー要求を満たしたり、損傷した細胞小器官を取り除いたりすることによって、細胞へのストレスを減弱している可能性がある (30,31)。反対に、オートファジーが持続して激しく活性化さ

れると、オートファジー細胞死が活性化し、腫瘍抑制因子として働く (32-34)。オートファジーは腫瘍細胞の生存と、TRAIL、テモゾロミド、エピルビシン、ソラフェニブなどの様々なタイプの抗腫瘍薬に対する抵抗性に関与している (35-41)。Ito らは、MM 細胞では栄養の足りているストレスのない状態でもオートファジーが起きており、3-methyladenin (3-MA) や Chloroquine (CQ) といったオートファジー阻害薬が TRAIL 誘導性アポトーシスに対する感受性を増強することを報告している (42)。正確なメカニズムはまだ不明だが、防御的なオートファジーはこれらの細胞における TRAIL 抵抗性に関与していることをこれらの事象は示唆している。

4. ミトコンドリア

ミトコンドリアは、細胞内外の環境、エネルギー要求に応じて、その形や大きさを変化させる細胞小器官であり、ミトコンドリア膜の分裂と融合のバランスによって制御される管状構造をしている (図 3)。このバランスのとれた分裂と融合は、細胞の機能と生存に必須である (43,44)。分裂は、オートファジーを通して傷害されたミトコンドリアを取り除く (45)。分裂が阻害されると過度に連結されたミトコンドリアになり、傷害されたミトコンドリアが取り除かれず、機能の落ちたミトコンドリアが細胞内にたまる。一方、融合は、ミトコンドリアの機能維持に必要なミトコンドリア DNA 合成と代謝産物の交換を促進する。このため、融合が阻害されると、断片化したミトコンドリアの内部で、DNA の欠損、ミトコンドリア膜電位低下につながる (46,47)。このため、ミトコンドリアの形態変化は癌治療の有力なターゲットと判明してきており (48,49)、Akita らや Suzuki-Karasaki らは、MM 細胞の TRAIL 細胞毒性にも、ミトコンドリアの形態変化に関与していることを報告している (50,51)。

5. カルシウム (Ca^{2+})

Ca^{2+} は細胞の活性化、増殖、細胞死など多くの機能に関わっているセカンドメッセンジャーである。真核細胞の細胞膜、ミトコンドリア膜には様々な Ca^{2+} チャネルが存在して Ca^{2+} の濃度は調節されており、通常、細胞内の Ca^{2+} は小胞体に蓄えられ、細胞質では低く維持されている (図 4)。近年、 Ca^{2+} は腫瘍治療の新しいターゲットとしても注目されている (52-54)。様々な腫瘍細胞において、 Ca^{2+} は腫瘍特異的な動態をみせており、腫瘍化、悪性表現型、薬剤耐性、細胞増殖の亢進、アポトーシスの回避などに関与している (53)。Takata らは、ミトコンドリア内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$) を減少させると、MM 細胞の TRAIL の効果を増強することを報告している (55)。このときの細胞死は、主に 24 時間ではアポトーシス、72 時間では非アポトーシスによる細胞死であった。反対に、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を増加させても MM 細胞に対する TRAIL の効果は増強し、24 時間、72 時間ともアポトーシスを促進することを Ohshima らは報告している (56)。そして Ohshima らは、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を増加させても減少させても、TRAIL によるミトコンドリアの形態異常を増強することも報告している (56)。

6. ストア作動性カルシウム流入 (Store-operated calcium entry: SOCE)

SOCE は小胞体 Ca^{2+} の枯渇による、ストア作動性 Ca^{2+} (SOC) チャネルの活性化により起こる、細胞外からの Ca^{2+} 流入のことである。SOCE は腫瘍細胞の増殖、薬剤抵抗性、細胞死回避などに、重要な役割を果たしている (54)。細胞外 Ca^{2+} を EGTA でキレートし、細胞外 Ca^{2+} のない条件下で、小胞体膜に局在する SERCA ポンプを Thapsigargin (Tg) で阻害して小胞体 Ca^{2+} を枯渇させた上で、細胞外に Ca^{2+} を加えると、SOC チャネルを通した細胞内への Ca^{2+} 流入である SOCE を起こすことができる (図 4)。

研究の目的

本研究では、①TRAIL 誘導細胞死はオートファジー阻害薬で増強されることを示す。その際、②ミトコンドリアの形態変化、③Ca²⁺動態の変化、におけるオートファジーの役割を明らかにする（図 5）。

対象と方法

1. 使用試薬・材料

特に記載のない限り、すべての薬剤は Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan) から購入した。可溶性リコンビナントヒト TRAIL は Enzo Life Sciences (San Diego, CA, USA) から購入した。TRAIL 受容体 DR5 の作動薬 (アゴニスト) である、作動性抗ヒト TRAIL-R2/TNFRSF10B 抗体 (抗 DR5 抗体, α DR5) (α DR5, clone 71903; cat. no. MAB631-100) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) から購入した。すべての不溶性試薬はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かし、10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加した高グルコースダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM) (いずれも Sigma-AldrichJapan) もしくはハンクス緩衝塩溶液 (HBSS; pH 7.4; Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) で希釈し、最終 DMSO 濃度 0.1%未満で使用した。なお、TRAIL は 100 ng/ml (42)、3-MA は 0.3-10 mM (42)、CQ は 2.5-100 μ M (42)、Bafilomycin A1 (BFM) は 13-100 nM (42)、Wortmannin (WT) は 100 nM (57)、 α DR5 は 0.1-1 μ g/ml (51) で使用した。

2. 細胞培養

ヒト A375 MM 細胞株 (ATCC® cell number CRL-1619) は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) (51) から購入した。ヒト A2058 MM 細胞株 (cell number IFO 50276) は JCRB Cell Bank of National Institutes of Biomedical Innovation, Health, and Nutrition (Osaka, Japan) (42,51) から購入した。顔面真皮からのヒト皮膚線維芽細胞 (HDFs) (51) は Cell Applications (San Diego, CA, USA) から購入した。すべての細胞は 100 U/ml ペニシリンと 100 μ g/ml ストレプトマイシン添加 10% FBS/DMEM (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) で、5%CO₂ インキュベーター内で、37°Cで培養した。細胞は 0.25% trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) で、37°C、5 分間処理した後、回収した。

3. オートファゴソームのイメージング

オートファゴソームの形態は、製造元の取扱説明書に基づいて、CYTO-ID Autophagy Detection kit (Enzo Life Sciences) を使用して、オートファジーの過程で生成される小胞を緑蛍光に特異的に染色することで、観察した。キットに含まれる蛍光プローブは、陽イオン両親媒性のトレーサー色素であり、細胞内に迅速に分配される。色素はタンパク質との結合や輸送活性を必要とせず、受動的な拡散により細胞膜を通り抜ける。色素の機能部位を精選することで、リソソーム内に色素が蓄積せず、オートファジー過程の小胞のみを染色することができるという利点がある。細胞を CYTO-ID で 37°C、1 時間、暗室内で染色し、試薬を添加した。画像は EVOS FL Cell Imaging System (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan)

を使用して取得し、国立衛生研究所 (NIH) (64 bit Java 1.8.0_112; NIH, Bethesda, MD, USA) からの ImageJ ソフトウェアを用いて解析した (50) (n= 4)。

4. ウェスタンブロット

LC3-II の発現は、過去に記載されたウェスタンブロット検査法に (42)、修正を加えて解析した。試薬で刺激した後に、細胞を洗浄し、プロテアーゼ阻害剤とホスファターゼ阻害剤 クテル (いずれも Sigma-Aldrich) を含有した RIPA 緩衝液に溶解し、超音波処理によって均質化し、20 μ g のタンパクを含む細胞溶解物は 4-12% グラディエント分離ゲルを使用して、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離して、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (いずれも Thermo Fisher Scientific, Inc.) に転写した。Blocking One (Nacalai Tesque Inc.) で 1 時間 22-25°C でブロッキングし、0.05% Tween-20 (TBS-T) 入り TBS で洗浄し、LC3- I / II (#12741, 1:1000; Medical & Biological Laboratory, Nagoya, Japan) と GAPDH (#5174, 1:1,000; Cell Signaling Technology Japan, Tokyo, Japan) に対する一次抗体で標識し、TBS-T 含有 Blocking One の中で、4°C で一晩おいた。TBS-T で洗浄後に、22-25°C で 1 時間かけ、TBS-T に 1:10,000 で希釈した二次抗体 (ECLTM Anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked whole antibody from a doney; FE Healthcare, Little Chalfont, UK) を標識した。シグナルは、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて可視化し、Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

5. 細胞生存率の測定

細胞生存率は、Cell Counting Reagent SF (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を用いて WST-8 法で、修正を加えて過去に記載された通りに測定した (56)。この方法は水溶性ホルマジン生成に基づいた比色分析である。細胞は 8×10^3 cells/well の濃度で 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY, USA) に播種し、37°C で、24 時間もしくは 72 時間試薬と共に培養し、Cell Counting Reagent SF を 10 μ l 添加して 2 時間後に ARVO MX microplate reader (PerkinElmer Japan Co., Ltd., Yokohama, Japan) を使用し、450 nm で吸光度を測定した (n= 3)。

6. ミトコンドリア形態のイメージング

生細胞のミトコンドリア形態は、修正を加えて過去に記載された通りに観察した (51)。8-well imaging chamber (Imaging Chamber 8 CG; Zell-Kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, Germany) に FBS/DMEM で培養し、接着させた細胞 (5.6×10^4 cells/well) に試薬を添加し、5% CO₂ インキュベーター内で、37°C で 24 時間培養した。Medium を吸引除去したあと、細胞は新しい FBS/DMEM で洗浄し、37°C の暗室内で、20 nM MitoTracker Red CMXRos で 1 時間かけてミトコンドリアを染色した。核は Hoechst 33342

(Sigma-Aldrich) で対比染色した。その後、細胞は FluoroBrite™ DMEM (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に浸した。画像は、100X, 1.40 NA UPlanSApo Super-Apochromat、カバーガラス補正油浸対物レンズ (Olympus) を装着した BZ X-700 蛍光顕微鏡 (Keyence Corp., Osaka, Japan) で観察した。それぞれのサンプルで、20-50 個の細胞のミトコンドリアの形態を観察し、その形態から、管状、断片化、融合、分裂/びまん性分布に分類し (58)、それぞれの割合を計算した (図 6)。

7. ミトコンドリア内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$) 測定

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ は rhod 2-AM (Dojindo Kumamoto, Japan) を用いて、過去に記載された通りに測定した (55,56)。rhod 2-AM はミトコンドリアに蓄積する性質を持つため、水素化ホウ素ナトリウムで無蛍光の dihydrorhod 2-AM に還元して用いると、ミトコンドリア内に取り込まれたものだけが酸化されて蛍光性を回復し、 Ca^{2+} とキレートして蛍光を発するため、この性質を利用して $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を測定できる。HBSS に浮遊させた細胞に、最終濃度 4 μM に調整した dihydrorhod 2-AM を添加し、37°C で 40 分おき、HBSS で洗浄した。次に、96-well plates に 1×10^6 個/ml の濃度で細胞を播種し、試薬を加えた。そして microplate reader (Fluoroskan Ascent; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用して、542 nm の光で励起し、592 nm の蛍光を測定した ($n=3$)。

8. SOCE 測定

SOCE は直接計測できないため、細胞質内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) の測定を行うことで間接的に測定した。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ は Fluo 4-AM を用いて、過去に記載された通りに測定した (55)。Fluo4-AM は細胞質内に取り込まれ、 Ca^{2+} とキレートすると強い蛍光を発するため、この性質を利用して $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を測定できる。①最終濃度 4 μM に調整した Fluo4-AM (Dojindo Kumamoto, Japan) を細胞に添加し、37°C で 40 分置き、HBSS で洗浄した。細胞外 Ca^{2+} を取り除くため、EGTA 1 mM を添加した HBSS である Ca^{2+} free medium に細胞を浮遊させ、96-well plates に 1×10^6 個 /ml の濃度で細胞を播種し、試薬を加え、Tg 2 μM を投与した。Tg を投与した時点を 0 分として 10 分間蛍光を測定した。そして CaCl_2 2 mM を添加し、開始後 13 分まで蛍光を測定した。②このときの $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の変化が SOCE によるものであることを確認するため、最初に SOCE 阻害薬である 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) を加え、同様に測定を行った。③小胞体 Ca^{2+} と関係ない細胞外からの Ca^{2+} 流入 (non-SOCE) を確認するため、最初に Tg を投与せず、同様に測定を行った。測定は、microplate reader を使用して、485 nm の光で励起し、538 nm の蛍光を測定した ($n=3$)。

9. 統計処理

データは平均値±標準偏差 (SD) で記載している。データは Exel 統計 2016 (SSRI, Tokyo, Japan) を使用して、分散分析および Tukey test で解析し、 $P<0.05$ を有意とした。

結果

1. TRAIL や DR アゴニストはメラノーマ細胞にオートファジーを誘導する

Ito らは、TRAIL とオートファジー阻害薬を併用すると、MM 細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスが增強されることを報告している (42)。このことは、オートファジー阻害薬は MM 細胞の生存や TRAIL 細胞毒性に影響を及ぼしている可能性を示しており、メラノーマ細胞はオートファジー誘導に対する感受性が亢進している可能性を推測した。この可能性を調べるために、メラノーマ細胞株である A375 細胞 (51) と正常線維芽細胞株である HDFs 細胞 (51) に起きるオートファジーを比較した。

A375 細胞の CYTO-ID Green を使用した生細胞のイメージングでは、薬剤で処理されていないときでも多数の CYTO-ID 陽性細胞がみられた。TRAIL や TRAIL 受容体 DR5 の作動薬 (アゴニスト) である抗 DR5 抗体 (α DR5) で処理すると、CYTO-ID 陽性細胞は有意に増加した。しかし、3-MA 5mM で処理すると、CYTO-ID 陽性細胞は有意に減少した (図 7A)。

HDFs 細胞では、薬剤で処理されていないときは、少数の CYTO-ID 陽性細胞しかみられなかった。CYTO-ID 陽性細胞は α DR5 で処理しても有意に増加せず、3-MA 5mM で処理しても有意に減少しなかった (図 7B)。

ウェスタンブロットで、TRAIL 処理後の LC3-II の発現レベルをみることで、TRAIL がオートファジーに及ぼす効果を調べた。A375 細胞では、TRAIL 処理後に LC3-II の発現が増加した。これは TRAIL 処理後 30 分以内に迅速に観察され、一過性で 1 時間以内に基準値レベルに戻った (図 7C)。一方、HDFs 細胞では A375 細胞のような LC3-II の一過性の増加はみられなかった (図 7C)。

小括-1

MM 細胞では正常細胞よりも強く、恒常的なオートファジーが起きており、TRAIL や DR アゴニストの刺激でオートファジーが誘導される。

2. オートファジー阻害薬はメラノーマ細胞の TRAIL 感受性を増加させる

Ito らは、MM 細胞株である A2058 細胞で TRAIL とオートファジー阻害薬を併用すると、TRAIL 誘導性アポトーシスが增強されることを報告している (42)。

24 時間処理後の A375 細胞 (51) では (図 8A)、①TRAIL 100 ng/ml 単独では約 50% の有意な細胞生存率減少がみられた。②オートファジー阻害薬である 3-MA 単独では、5 mM では有意に生存率は減少せず、10 mM では有意に生存率が減じた。他のオートファジー阻害薬である CQ 単独では、50 μ M で有意に生存率は減少せず、100 μ M で有意な生存率減少がみられた。③TRAIL とオートファジー阻害薬を併用すると、3-MA は 5 mM ではそれぞれ単独と比較して、有意に生存率が減少した。10 mM でもそれぞれ単独と比較して、有意な生存率

減少がみられ、5 mM との併用よりも強く減じた。一方、CQ は 50 μ M と併用、100 μ M と併用のいずれも有意な生存率の減少はみられなかった。

72 時間処理後の A375 細胞 (51) では (図 8B)、①TRAIL 100 ng/ml 単独では 24 時間処理と同程度の有意な生存率減少がみられた。②オートファジー阻害薬である BFM 100 nM 単独では有意な減少はみられず、WT 100 nM 単独では有意な減少がみられた。③TRAIL と併用すると、BFM は生存率が有意に減少しなかったが、WT と 3-MA 5 mM では有意に減少した。A2058 細胞 (42, 51) では (図 8C)、①TRAIL 単独は有意に生存率が減少した。②BFM、WT はいずれも単独で有意な減少はみられなかった。③TRAIL と併用すると、BFM、WT 共に有意な減少を示し、3-MA 5 mM は有意なより強い減少を示した。

3. オートファジー阻害薬は正常線維芽細胞の TRAIL 感受性を増強しない

オートファジー阻害薬の正常細胞における効果を確認するため、正常ヒト線維芽細胞株である HDFs 細胞 (51) における効果を調べた。TRAIL 単独で生存率の有意な減少はみられず、3-MA は 5 mM までの処理でも、生存率はわずかに減少するのみであり、他のオートファジー阻害薬である CQ、BFM、WT に対しても抵抗性を示した (図 9A)。また、TRAIL 受容体 DR5 の作動薬 (アゴニスト) である α DR5 (0.1 μ g/ml, 0.3 μ g/ml) に対しても抵抗性を示した (図 9B)。 α DR5 1 μ g/ml に対しては有意な減少を示した。TRAIL (100 ng/mL) と 3-MA 5 mM を併用しても、それぞれの単独と比較して、細胞生存率の減少は最小限にとどまった。一方、 α DR5 1 μ g/ml と 3-MA 5 mM の併用は、それぞれ単独と比較して、細胞生存率の有意な減少を引き起こした (図 9B)。

小括-2,3

オートファジー阻害薬は MM 細胞の TRAIL 感受性を増強するが、線維芽細胞では増強しない。

4. TRAIL や 3-MA はメラノーマ細胞のミトコンドリア形態に影響を与える

Akita らや Suzuki-Karasaki らは、TRAIL はミトコンドリア形態を変化させ、それが TRAIL の腫瘍特異性に関係していることを報告している (50,51)。このため、オートファジー阻害薬もミトコンドリアの形態を変化させている可能性を考え、MM 細胞のミトコンドリア形態に対する TRAIL と 3-MA の影響を調べた。A2058 細胞 (42,51) では、半数以上の細胞のミトコンドリアは、健常な核の周囲で放射状に管状になっているが、一部は断片化していた (図 10A 最上段, 図 10B)。TRAIL で処理すると、ミトコンドリアの断片化が進み、わずかな核の凝縮が起きた (図 10A 2 段目, 図 10B)。3-MA 1.3mM で処理すると、ほとんどの細胞でミトコンドリアは融合し、核はわずかに凝縮した (図 10A 3 段目, 図 10B)。一方、3-MA 2.5 mM で処理すると、ほとんどの細胞でミトコンドリアは著しく断片化して点状になり、集まって球状の塊を作り、(図 10A 4 段目, 図 10B)、核は凝縮した。TRAIL と 3-MA

1.3mM, 2.5 mM を併用すると、ほとんどの細胞でミトコンドリアは点状に分裂して、細胞内にびまん性に分布し、核の強い凝縮と小型化がみられた (図 10A 5,6 段目, 図 10B)。

一方 HDFs 細胞では、3-MA は 5 mM まで、ミトコンドリアと核の形態にほとんど影響を与えなかった (図 10C)。

小括-4

TRAIL と 3-MA は単独または併用で MM 細胞のミトコンドリアと核の形態に影響を与える。

| | ミトコンドリア形態 | 核の形態 |
|----------------|---------------|-----------|
| TRAIL | 断片化 | わずかに凝縮 |
| 3-MA 1.3mM | 融合 | わずかに凝縮 |
| 3-MA 2.5mM | 著しく断片化、集まり球状塊 | 凝縮 |
| TRAIL+低濃度 3-MA | 点状に分裂、びまん性に分布 | 強く凝縮し、小型化 |

5. TRAIL とオートファジー阻害薬は単独と併用で逆のミトコンドリア Ca^{2+} 動態を示す

Takata らや Ohshima らは、MM 細胞のミトコンドリアの形態変化に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ の変化が、影響を与えることを報告している (55,56)。このため、MM 細胞のミトコンドリアの形態変化を起こす 3-MA も $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ の変化を起こす可能性を考え、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を測定した。A375 細胞 (51) では、TRAIL で処理すると投与直後から測定開始後 10 分まで、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ の著明な増加がみられ、以後 30 分まで微増した (図 11E)。オートファジー阻害薬では、3-MA で処理すると 0.6 mM 以上の濃度で、投与量依存性の有意な $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ の増加を示した (図 11A, B)。他のオートファジー阻害薬でも、投与量依存性に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ が増加する傾向がみられた (図 11C, D)。しかし、TRAIL とオートファジー阻害薬の併用では、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ の著明な減少という、まったく逆の現象がみられた (図 11E, F)。

小括-5

TRAIL やオートファジー阻害薬は単独では $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を増加させるが、併用では逆に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を減少させる。

| | ミトコンドリア内 Ca^{2+} |
|------------------|---------------------------|
| TRAIL | 増加 |
| オートファジー阻害薬 | 増加 |
| TRAIL+オートファジー阻害薬 | 減少 |

6. ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) は TRAIL や 3-MA のミトコンドリア Ca^{2+} 動態に影響を及ぼしている可能性がある

TRAIL とオートファジー阻害薬の単独と併用では逆のミトコンドリア Ca^{2+} 動態を示すことから、この Ca^{2+} 動態を引き起こす要因として、SOCE の関与を調べた。A375 細胞 (51) を Tg 2 μM で処理し、小胞体への Ca^{2+} 流入を抑制して小胞体内の Ca^{2+} を枯渇させると、これに起因する $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の急速で一過性の上昇がみられた。続いて細胞外に Ca^{2+} を加えると、SOCE による強く持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加が起こった (図 12A 赤線)。SOCE 阻害薬である 2-APB 10 μM 投与下で Tg 処理をすると、小胞体への Ca^{2+} 流入抑制による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の一過性の上昇がみられ、細胞外に Ca^{2+} を加えると $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の急速で一過性の上昇がみられるが、SOCE が阻害されている分、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加の程度は少なかった (図 12A 青線)。一方、最初に Tg で処理をしないと、小胞体への Ca^{2+} 流入抑制による小胞体の Ca^{2+} 枯渇がないため、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ は増加せず、SOCE は活性化しなかった。細胞外に Ca^{2+} を加えると、SOCE 以外の経路から細胞質に Ca^{2+} が流入し、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ は著明な増加を起こした (図 12A 灰色線)。

A2058 細胞 (42,51) を TRAIL で処理すると、SOCE はコントロールの約半分程度に有意に減少した。3-MA 5mM で処理しても、SOCE は著明に減少した。TRAIL と 3-MA 5mM を併用しても SOCE は著明に減少した (図 12B, C)。

TRAIL 感受性と SOCE の関連を更に調べるために、MM 細胞の TRAIL 感受性を増強し、ミトコンドリアの形態変化や $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ 増加を引き起こすことが報告されている酸化リン酸化 (OXOPHOS) 阻害薬 (56) を用いて、SOCE に対する影響を調べた。OXOPHOS 阻害薬である Rotenone (ROT) はコントロールの半分以上 SOCE を有意に減少させたが、Antimycin A (AM) や Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) は SOCE を減少させなかった。TRAIL と OXOPHOS 阻害薬を併用すると、特に ROT が強く SOCE を有意に減少させた (図 12B, C)。

小括-6

TRAIL、3-MA はいずれも SOCE を減少させた。TRAIL 感受性を増強し、ミトコンドリアの形態変化、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ 増加を起こす OXOPHOS 阻害薬も SOCE を減少させた。SOCE は、TRAIL や 3-MA のミトコンドリア Ca^{2+} 動態に影響を及ぼしている可能性がある。

考察

TRAIL は腫瘍特異的にアポトーシスによる細胞死を誘導するが、正常組織にはほとんど毒性を示さないことから、副作用の少ない次世代の抗腫瘍薬として注目されている。しかし、MM や骨肉腫などの悪性度の高い腫瘍細胞は TRAIL に抵抗性を示すことがわかっている。このため、TRAIL を抗腫瘍薬として使用するためには、腫瘍細胞を TRAIL 感受性にする必要がある。本研究は、TRAIL とオートファジー阻害薬を併用すると、MM 細胞の TRAIL 感受性が増強されるという過去の報告を元にさらに解析を行ったものである (42)。

MM 細胞では恒常的なオートファジーが起きており、TRAIL や DR アゴニストの刺激でオートファジーが亢進した (図 7)。A375 細胞では 3-MA 5 mM や CQ 50 μ M 単独では有意な生存率減少はみられず、3-MA 10 mM や CQ 100 μ M では単独で有意な生存率減少を示した。TRAIL と併用すると、3-MA はいずれの濃度も著明な生存率減少を示したが、CQ はいずれの濃度も有意な生存率の減少はみられなかった (図 8A)。この原因として、CQ はリソソームの機能を抑制して、種々の膜受容体の寿命を延ばし、それを介するシグナルを活性化させる可能性があることから (59)、MM 細胞の生存に必要な増殖因子の受容体などにそれが起き、細胞保護的に働いた可能性が考えられる。その他のオートファジー阻害薬単独では、WT は生存率減少を示したが、BFM では生存率は有意に減少しなかった。TRAIL との併用では、WT では有意な減少がみられたが、BFM は生存率を有意に減少させなかった (図 8B)。また、WT は A2058 細胞でも TRAIL と併用で生存率減少を示した (図 8C)。以上のように、4 種のオートファジー阻害薬はそれぞれ異なった作用を起こした。この原因として、オートファジーを阻害する作用箇所が異なることを考えたが、CQ と BFM は作用箇所が同一であり、これだけでは説明ができない。オートファジーに関係なく、それぞれの薬剤特有の作用が関係している可能性も考えられる。

24 時間処理と 72 時間処理で比較すると、TRAIL 単独処理では時間を延長しても細胞死の増加はみられず、約 50% の細胞は生存したままであった。TRAIL と 3-MA 5mM 併用では、72 時間処理で細胞死はより顕著であり、72 時間という培養時間が長く、栄養環境の悪い状態の方が、細胞生存のための細胞保護的オートファジーが強く起きており、これが TRAIL 感受性増強に関わっている可能性が推測される。以上のことから、MM 細胞は TRAIL によるアポトーシスシグナルを受けると、DR を介して活性化される細胞保護的オートファジーを誘導することで、TRAIL により誘発されるアポトーシスを回避しており、このことが MM 細胞の TRAIL 抵抗性につながっている可能性が考えられる。この見解は、オートファジーとアポトーシスは密接に関連しており、互いに互いを制御している、という最近の知見に合致している (60-63)。

本研究では、TRAIL とオートファジー阻害薬である 3-MA が MM 細胞のミトコンドリア形態を変化させることを明らかにした。TRAIL で処理すると、ミトコンドリアの断片化がお

きた。3-MA は 1.3 mM で処理するとミトコンドリアの融合がみられ、2.5 mM で処理すると、ミトコンドリアは著しく断片化し、集まり球状の塊を形成した (図 10)。また、核の形態変化をみると、TRAIL ではわずかに凝縮し、3-MA は濃度に比例して凝縮が強くなった。TRAIL と 3-MA を併用すると、核は強く凝縮して小型化しており、この核の形態変化から MM 細胞はアポトーシスを起こしていることが推測される。このことは、TRAIL とオートファジー阻害薬を併用すると TRAIL 誘導性アポトーシスが增強されるという過去の報告と合致している (42)。従って、TRAIL と 3-MA を併用すると、ミトコンドリアの形態変化、アポトーシスが誘導されと考えられる。

過去の報告をみると、Mdivi-1、FCCP、AM、Telmisartan や Isoliquiritigenin は、MM 細胞にミトコンドリアの形態変化を起こし、アポトーシスを誘導している (50,51,55,56,64,65)。アポトーシスに際して起こるミトコンドリアの形態変化の分子メカニズムはまだ解明されていない。しかし、ミトコンドリアの分裂を主に制御している Drp1 の働きからは独立していることが報告されている (50)。断片化したミトコンドリアの出現は、ミトコンドリア膜の異常やミトコンドリア膜電位の崩壊を示唆しており、ミトコンドリア膜電位の崩壊はミトファジーの主要な引き金となる (66)。それゆえに、ミトコンドリア膜電位の崩壊をひき起こす CCCP、FCCP や salinomycin などはミトファジーを活性化する (66,67)。またこの膜電位の崩壊は、ミトコンドリア外膜に PTEN 誘導推定キナーゼ 1 の蓄積を引き起こし、それがパーキンのリン酸化、パーキン媒介ユビキチン化の活性化につながり、最終的に傷害された小器官のオートファジーによる分解がおこる (62)。従って、本研究で観察された過剰に分裂したミトコンドリアは、オートファジーが阻害されることによって、傷害されたミトコンドリアが処理されず、残存したことに起因すると推察される。制御されたオートファジーは傷害されたミトコンドリアを取り除き細胞保護的に働くといえる。

近年 Ca^{2+} は腫瘍治療の新しいターゲットとして注目されている (52-54)。腫瘍特異的な Ca^{2+} 動態は腫瘍細胞がアポトーシスから回避し、細胞が生存する方向に働く (53)。 Ca^{2+} は様々な細胞死も引き起こすことから、腫瘍細胞では諸刃の刃として振る舞う。ミトコンドリアマトリックス内に Ca^{2+} が負荷されると、ミトコンドリア内膜の透過性が亢進する。この現象はミトコンドリア透過性転移 (Mitochondrial permeability transition: MPT) とよばれ、その後にミトコンドリア外膜の浸透圧破裂を起こす。この破裂は、チトクローム c や apoptosis-inducing factor のような前アポトーシスタンパクの放出を次々と引き起こし、アポトーシスにつながっていく (68-70)。また MPT は、急速なミトコンドリア膜電位の崩壊、ATP の喪失、ミトコンドリア外膜の破裂を引き起こす。最終的に、ATP の喪失やミトコンドリアの機能低下はネクローシスにつながる。

Ca^{2+} はオートファジーや細胞死の制御に重要な役割を果たし (69,70)、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を増加させても減少させても腫瘍細胞の TRAIL 誘導細胞死が增強されることが報告されている (55,56)。本研究では、TRAIL は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を増加させ、3-MA、CQ や BFM などのオートファジー阻害薬も $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ 増加させることを見出した。しかし、TRAIL とオートファジー阻害

薬を併用すると反対に $[Ca^{2+}]_{mit}$ は減少した(図 11)。これらの結果から推察されるのは、TRAIL による刺激は $[Ca^{2+}]_{mit}$ を増加させ、ミトコンドリアの断片化を起こしてアポトーシスを誘導するが、オートファジー阻害薬の併用は、逆に $[Ca^{2+}]_{mit}$ を低下させ、その結果としてアポトーシスをさらに強く誘導したことである。Ohshima らは、 $[Ca^{2+}]_{mit}$ を増加させても減少させても TRAIL によるミトコンドリア形態変化を助長することを報告している (56)。また、Suzuki-Karasaki らは、TRAIL はミトコンドリアの形態変化を起こし、このことが TRAIL の細胞毒性にとって重要であることを報告している (51)。

本研究で観察された $[Ca^{2+}]_{mit}$ の変化の正確なメカニズムは不明だが、MM 細胞の $[Ca^{2+}]_{mit}$ 調節因子として、ミトコンドリア内膜に存在し、ミトコンドリアへ Ca^{2+} の取り込みを担っているミトコンドリア Ca^{2+} ユニporter (Mitochondrial calcium uniporter: MCU) による Ca^{2+} 取り込みや、細胞膜やミトコンドリア内膜に存在する Na^{+}/Ca^{2+} 交換輸送体 (Na^{+}/Ca^{2+} exchanger: NCLX) による Ca^{2+} 流出が重要であるという報告があり (55)、これらのミトコンドリア膜に存在する様々な Ca^{2+} チャネルが関与している可能性がある。

本研究では、 $[Ca^{2+}]_{mit}$ を変化させた要因として、SOCE の関連を検討した。TRAIL、3-MA はいずれも SOCE を減少させており、SOCE が TRAIL、3-MA のミトコンドリア Ca^{2+} 動態に影響を及ぼしている可能性がある(図 12)。腫瘍細胞では、高いエネルギー要求に対処するため、小胞体からミトコンドリアへ持続的に Ca^{2+} を輸送している。イノシトール 3 リン酸受容体 (IP3R) 電位依存性アニオンチャネル 1 (VDAC1)- MCU 経路はこの輸送の主要な経路であることが示唆されている (71,72)。実際、小胞体からミトコンドリアへの持続的な Ca^{2+} の流入は、小胞体の効果的な Ca^{2+} 枯渇につながり、SOCE を促進すると考えられる。すると反対に、SOCE の減少は、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の減少、続く小胞体 Ca^{2+} の欠乏に繋がり、最終的に Ca^{2+} 減少を原因とするミトコンドリアの機能不全を引き起こし得る。もしこれが事実ならば、SOCE が減少すると MM 細胞の成長と生存に強い影響を与える可能性がある。この見解の裏付けとして、 Ca^{2+} キレートによってすべての細胞外 Ca^{2+} を除去する、もしくは MCU 阻害によって $[Ca^{2+}]_{mit}$ を低下させることで、TRAIL 誘導性アポトーシスの感受性が増加することが報告されている (55)。

TRAIL と SOCE の関連についてさらに検討するために、オートファジー阻害薬と同じように MM 細胞の TRAIL 感受性を増強し、ミトコンドリアの形態変化や $[Ca^{2+}]_{mit}$ 増加を引き起こすことが報告されている OXOPHOS 阻害薬 (56) を用いて、実験を行った。OXOPHOS 阻害薬の ROT は単独のとき有意に SOCE を減少させたが、他の OXOPHOS 阻害薬である AM や FCCP は単独で SOCE を減少させなかった。この原因は不明だが、TRAIL と併用するとすべての OXOPHOS 阻害薬で SOCE の著明な減少を引き起こした(図 12)。OXOPHOS 阻害薬もオートファジー阻害薬も、ミトコンドリアの機能異常を引き起こす。SOCE は細胞外から細胞質への Ca^{2+} 流入であり、SOCE 自体がミトコンドリアに直接 Ca^{2+} を流入させているかは不明だが、SOCE は小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入に必要であるという報告がある (73)。以上より、TRAIL や 3-MA の刺激で SOCE の減少が起こり、それがミトコ

ミトコンドリア Ca^{2+} 動態に関与している可能性がある。そして、TRAIL と 3-MA の併用による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ の減少はさらなるミトコンドリア機能低下を起こし、オートファジー阻害薬による TRAIL の感受性増強に関与していることが推測される。

正常線維芽細胞では、TRAIL はオートファジーを誘導しなかった (図 7B)。また、TRAIL、オートファジー阻害薬単独、もしくは両者の併用による細胞毒性に対して抵抗性がみられ (図 9)、ミトコンドリアはオートファジー阻害薬の影響に乏しかった (図 10C)。

これらの結果から、TRAIL とオートファジー阻害薬の併用は、腫瘍への傷害性が強く、健康組織に対する副作用の少ない治療法になる可能性があるといえる。

まとめ

本研究では、オートファジー阻害薬がメラノーマ細胞の TRAIL 感受性を増強することを明らかにした。この現象にはミトコンドリアの形態変化や Ca^{2+} 動態が関与している可能性がある。本研究は、TRAIL 治療においてオートファジー阻害薬を使用することの新たな実験的根拠となる。以上より、TRAIL とオートファジー阻害薬の併用は、TRAIL 抵抗性を持つメラノーマの治療に有望なアプローチとなる可能性があるといえる。

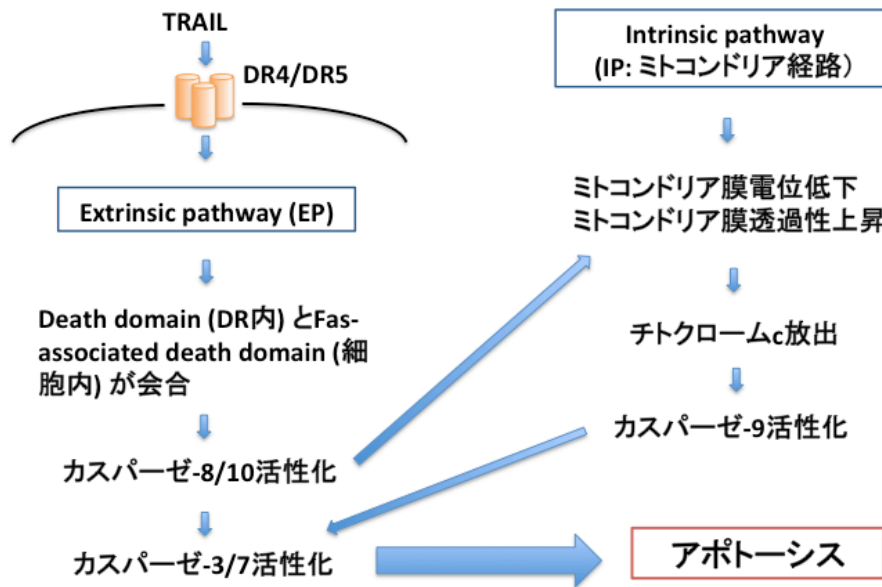
本論文の内容は英文誌 *International Journal of Oncology* に述べたもの (58) を和文にしたものを主体としている。

謝辞

本研究に関し、利益相反はありません。

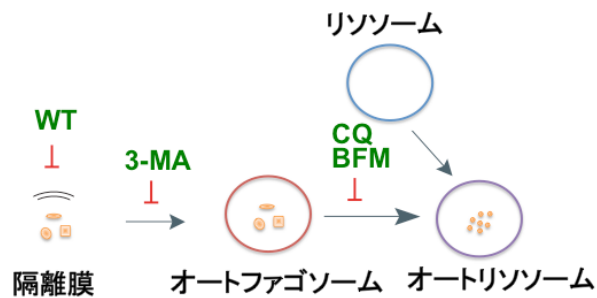
本研究に関して、研究、学会発表、国際雑誌への掲載ならびに学位論文の御指導、御校閲を直接賜りました鈴木良弘先生（前生理学分野助教、現一般社団法人プラズマ化学生物学研究所代表理事、英国王立医学協会フェロー）に深謝致します。本研究の御指導を賜りました、日本大学医学部・医学教育センター、日臺智明教授、日本大学医学部生体機能医学系生理学分野、國分眞一郎研究所教授、日本大学総合科学研究所・日本大学病院総合診療センター皮膚科、落合豊子教授、日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野、照井正教授に深謝致します。また、研究の御指導や御協力を賜りました鈴木美喜研究員をはじめ、研究室の皆様に深謝致します。

図 1. TRAIL によるアポトーシスシグナル伝達



アポトーシスには Extrinsic pathway (EP) と Intrinsic pathway (IP) がある。EP では、細胞膜の 3 量体を形成する DR4/DR5 に TRAIL が結合すると、DR4/DR5 内の Death domain と Fas-associated death domain が会合し、カスパーゼ 8/10 の活性化、カスパーゼ 3/7 の活性化を通してアポトーシスにつながる。IP では、ミトコンドリアを介して細胞死誘導刺激が起こり、ミトコンドリア膜電位が低下し、膜透過性が上昇し、ミトコンドリア外膜に孔を形成して細胞質へチトクローム c が放出される。このチトクローム c が他の物質と複合体を形成し、カスパーゼ 9 の活性化が起こり、カスパーゼ 3/7 の活性化、アポトーシス誘導につながる。

図 2. オートファジー



オートファジー阻害薬

WT: Wortmannin

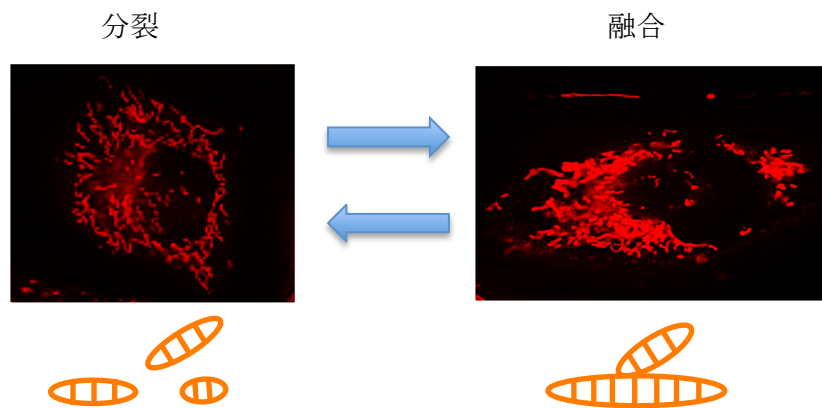
3-MA: 3-methyladenine

CQ: Chloroquine

BFM: Bafilomycin A1

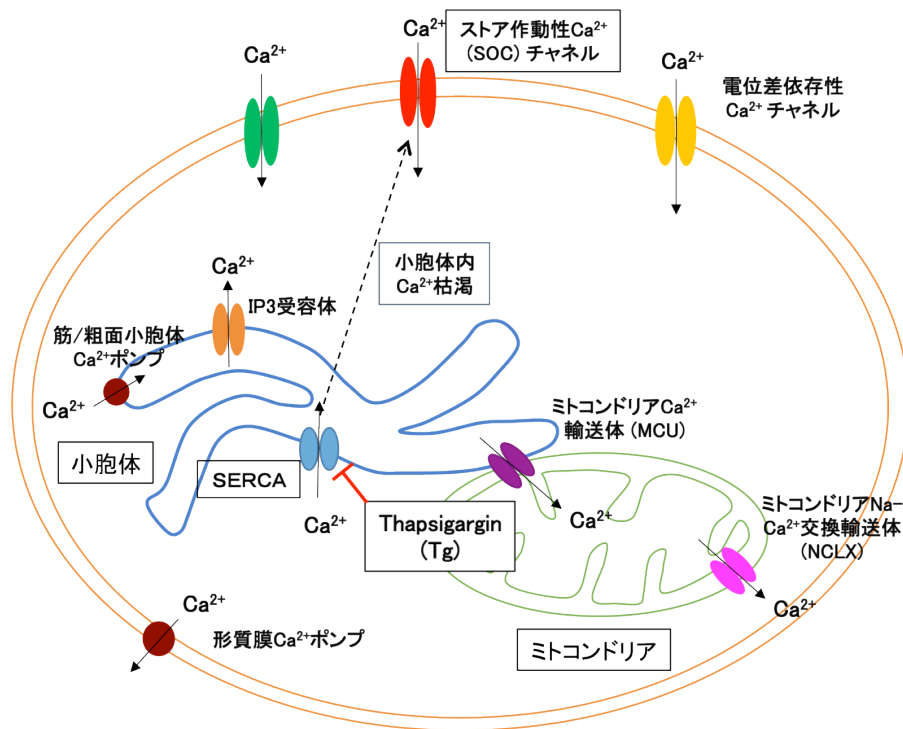
オートファジーとは、細胞質内のタンパク質や損傷した細胞小器官をリソソームで分解する基本的な異化のプロセスである。オートファジーが誘導されると、まず細胞質内に隔離膜が形成される。隔離膜は細胞質成分を取り込みながら伸張してオートファゴソームを形成する。オートファゴソームとリソソームが融合してオートリソソームが形成され、内容物が分解され、再利用される。

図 3. ミトコンドリアの分裂と融合



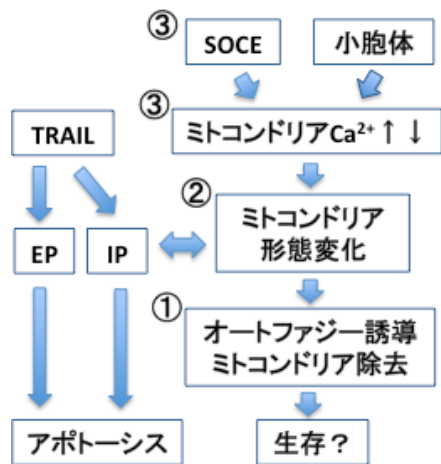
ミトコンドリアは細胞内外の環境、エネルギー要求に応じて、形や大きさを変化させる。分裂と融合のバランスによって制御される管状ネットワーク構造をしており、このバランスのとれた分裂と融合は細胞の機能と生存に必須とされている。

図 4. ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (Store-operated calcium entry: SOCE)



SOCE は小胞体 Ca^{2+} の枯渇による、ストア作動性 Ca^{2+} (SOC) チャンネルの活性化により起こる、細胞外からの Ca^{2+} 流入のことである。細胞外 Ca^{2+} を EGTA でキレートし、細胞外 Ca^{2+} のない条件下で、小胞体膜に局在する SERCA ポンプを Thapsigargin (Tg) で阻害して小胞体 Ca^{2+} を枯渇させた上で、細胞外に Ca^{2+} を加えると、SOC チャンネルを通した細胞内への Ca^{2+} 流入である SOCE を起こすことができる。

図 5. 研究の目的



本研究では、

①TRAIL 誘導細胞死はオートファジー阻害薬で増強されることを示す。

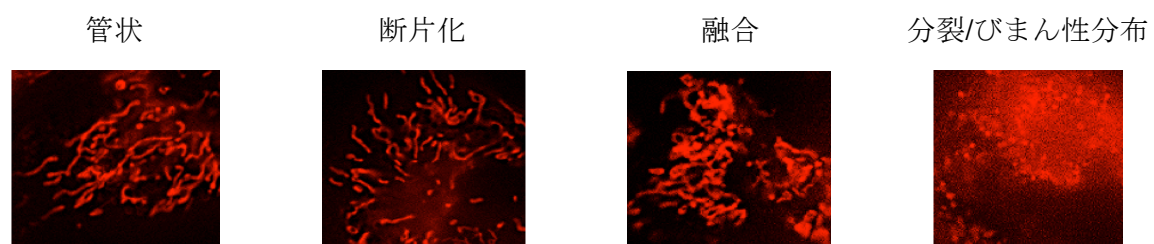
その際、

②ミトコンドリアの形態変化

③Ca²⁺動態の変化

におけるオートファジーの役割を明らかにする。

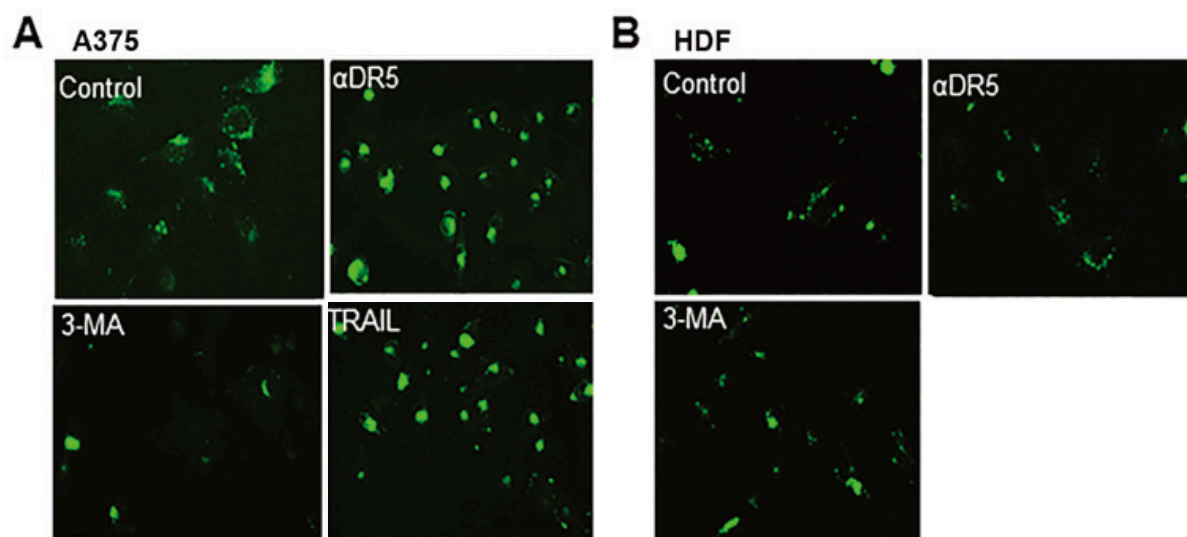
図 6. ミトコンドリア形態



観察したミトコンドリアは、その形態から、管状、断片化、融合、分裂/びまん性分布に分類した。

図 7. TRAIL や DR アゴニストはメラノーマ細胞にオートファジーを誘導する

オートファゴソームのイメージング- A375 細胞, HDFs 細胞

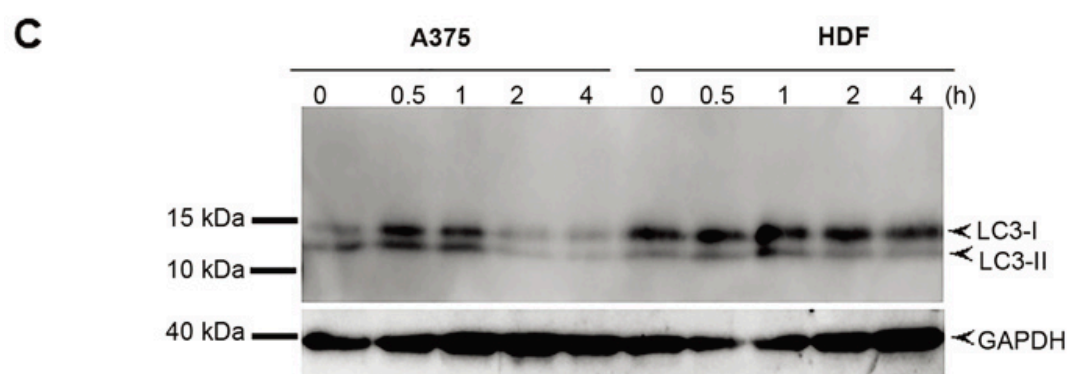


(A) A375 細胞と (B) HDFs 細胞を試薬で 24 時間処理し、暗室で 37℃1 時間 CYTO-ID で染色した。画像は EVOS FL Cell Imaging System を使用して取得した。

(A) A375 細胞の CYTO-ID 陽性細胞は、Control で多数みられ、αDR5 や TRAIL で有意に増加し、3-MA 5mM で有意に減少した。(B) HDFs 細胞では、Control の CYTO-ID 陽性細胞は少数で、αDR5、3-MA 5mM いずれも有意に増減しなかった。P<0.05 (n=4)。

3-MA は 3-methyladenine、αDR5 は抗 DR5 抗体 (TRAIL 受容体 DR5 の作動薬 (アゴニスト)) を示す。

LC3- I /II の発現 (ウエスタンブロット)- A375 細胞, HDFs 細胞

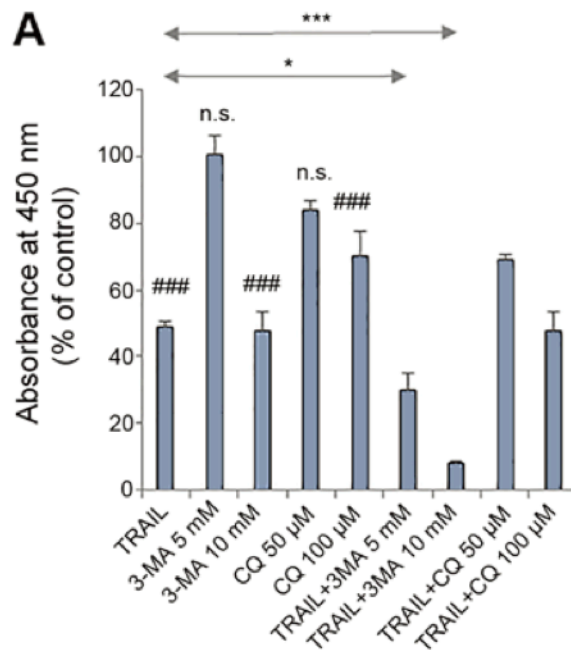


(C) A375 細胞と HDFs 細胞を TRAIL (100 ng/ml) で、37℃、0.5 時間、1 時間、2 時間、4 時間処理した。細胞は PBS で洗浄し、溶解した。タンパクはドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、LC3- I /II の発現をウエスタンブロットで解析した。

GAPDH はローディングコントロールとして使用した。

図 8. オートファジー阻害薬はメラノーマ細胞の TRAIL 感受性を増加させる

細胞生存率- A375 細胞 (24 時間処理)



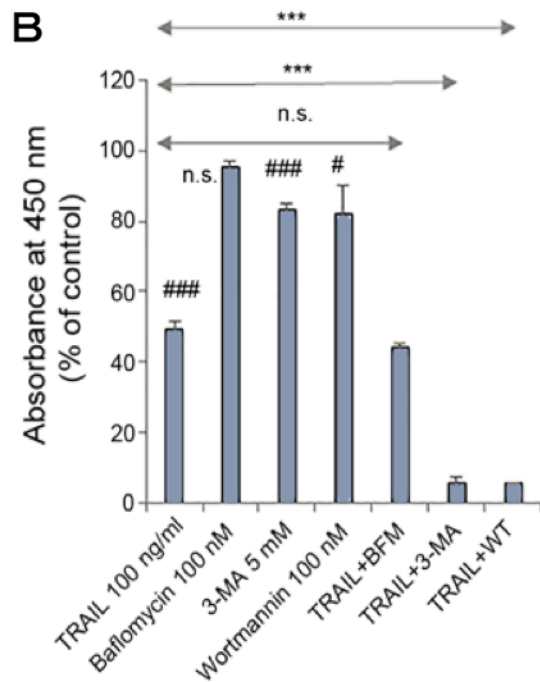
(A) A375 細胞を試薬で 24 時間処理し、細胞生存率を WST-8 法で測定した。

データは平均値±SD で示している。# $P < 0.05$ 、### $P < 0.001$ は試薬の入っていないコントロールと比較している。n.s は試薬の入っていないコントロールと比較して有意差はないことを示す。 $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ ($n = 3$)。

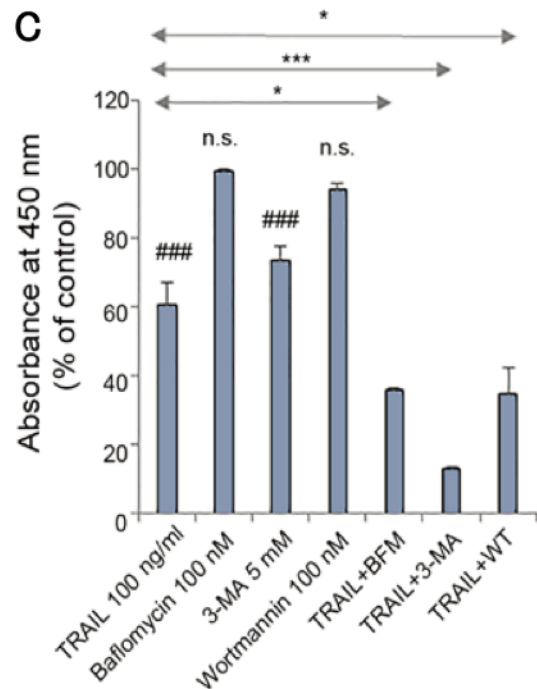
3-MA は 3-methyladenine、CQ は Chloroquine を示す。

図 8. オートファジー阻害薬はメラノーマ細胞の TRAIL 感受性を増加させる

細胞生存率-A375 細胞 (72 時間処理)



細胞生存率-A2058 細胞 (72 時間処理)



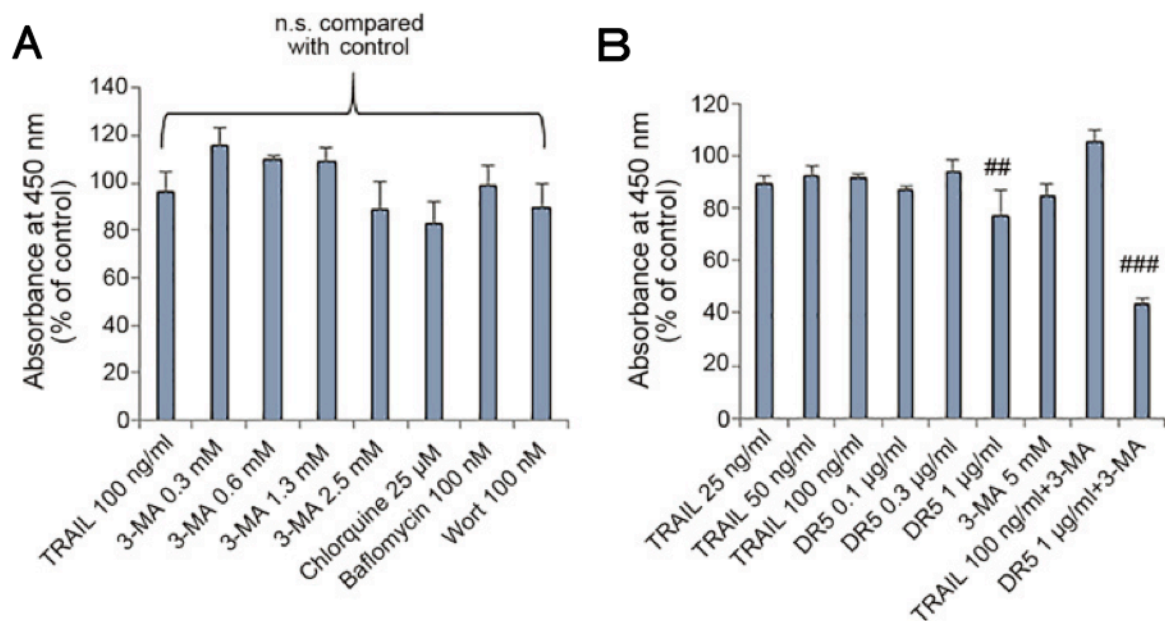
(B) A375 細胞、(C) A2058 細胞を試薬で 72 時間処理し、細胞生存率を WST-8 法で測定した。

データは平均値±SD で示している。# $P<0.05$ 、### $P<0.001$ は試薬の入っていないコントロールと比較している。n.s は試薬の入っていないコントロールと比較して有意差はないことを示す。* $P<0.05$ 、*** $P<0.001$ ($n=3$)。

3-MA は 3-methyladenine、BFM は Bafilomycin A1、WT は Wortmannin を示す。

図 9. オートファジー阻害薬は正常線維芽細胞の TRAIL 感受性を増強しない

細胞生存率・HDFs 細胞 (72 時間処理)



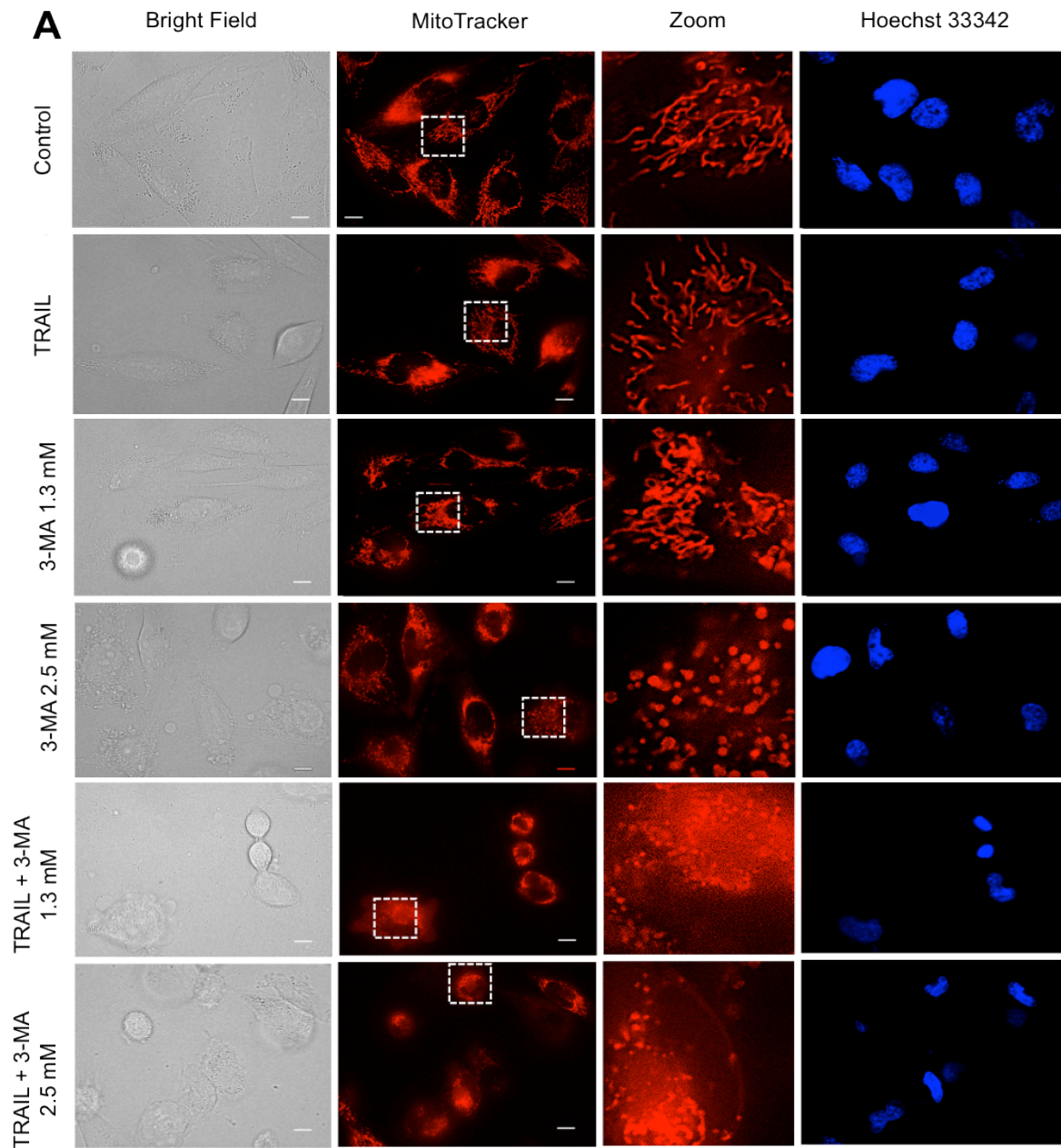
(A,B) HDFs 細胞を試薬で 72 時間処理し、細胞生存率を WST-8 法で測定した。

データは平均値 \pm SD で示している。## $P<0.01$ 、### $P<0.001$ は試薬の入っていないコントロールと比較している。n.s はコントロールと比較して有意差はないことを示す (n=3)。

3-MA は 3-methyladenine、Wort は Wortmannin、DR5 は TRAIL 受容体 DR5 の作動薬 (アゴニスト) である抗 DR5 抗体を示す。

図 10. TRAIL や 3-MA はメラノーマ細胞のミトコンドリア形態に影響を与える

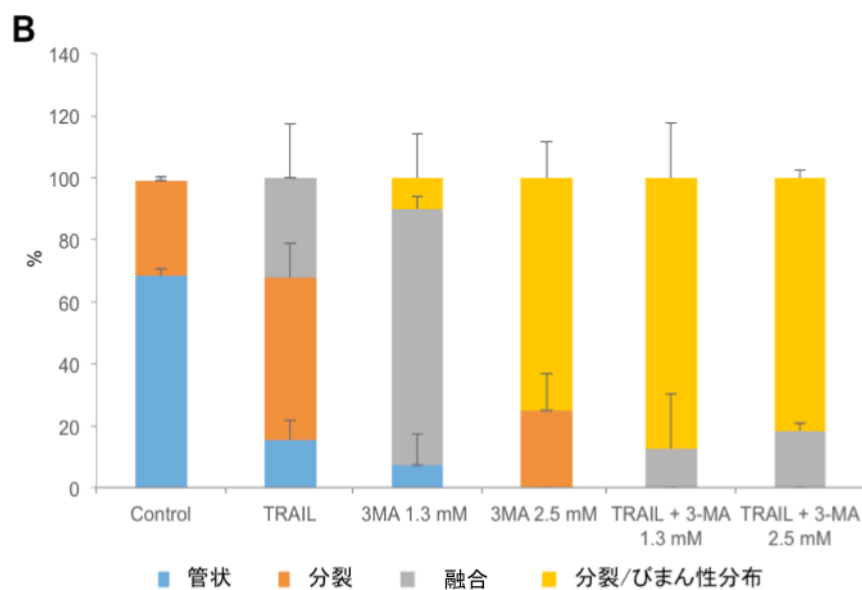
ミトコンドリア、核のイメージング- A2058 細胞



(A) A2058 細胞を試薬で 37°C24 時間処理。ミトコンドリアを MitoTracker Red CMXRos で、核を Hoechst 33342 で染色し、画像は蛍光顕微鏡を使用して取得した。拡大したパネルは、MitoTracker の画像内に白色で四角く囲んだ部分の拡大像である。スケールバーは 10 μ m を示す。

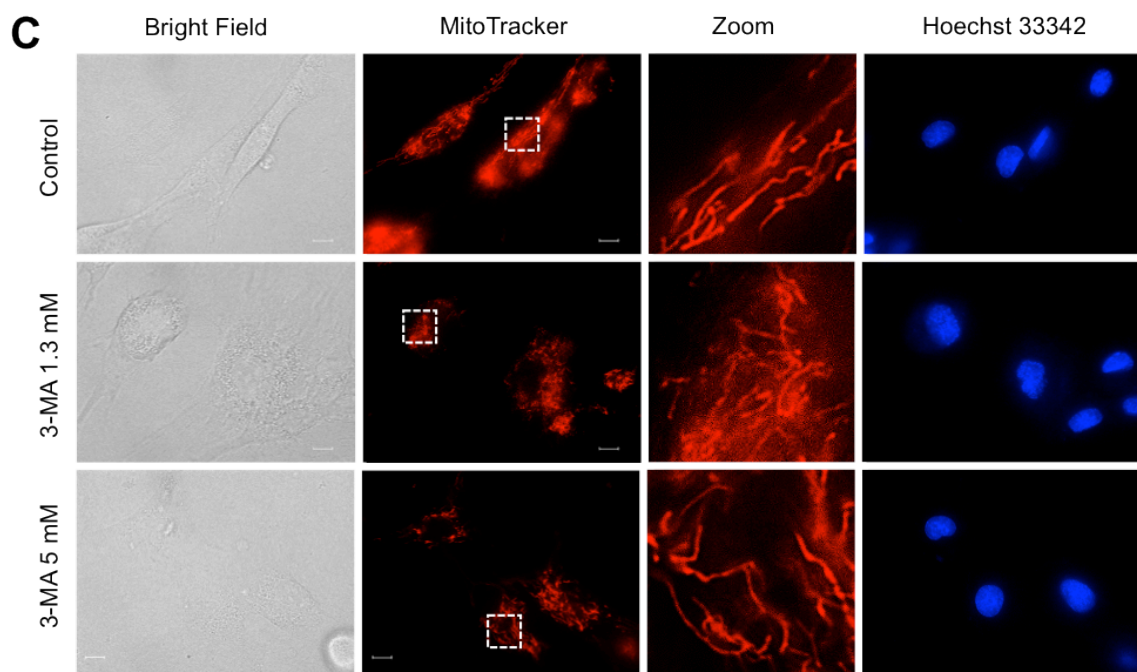
図 10. TRAIL と 3-MA はメラノーマ細胞のミトコンドリア形態に影響を与える

ミトコンドリア形態- A2058 細胞



(B) ミトコンドリアの形態の割合。

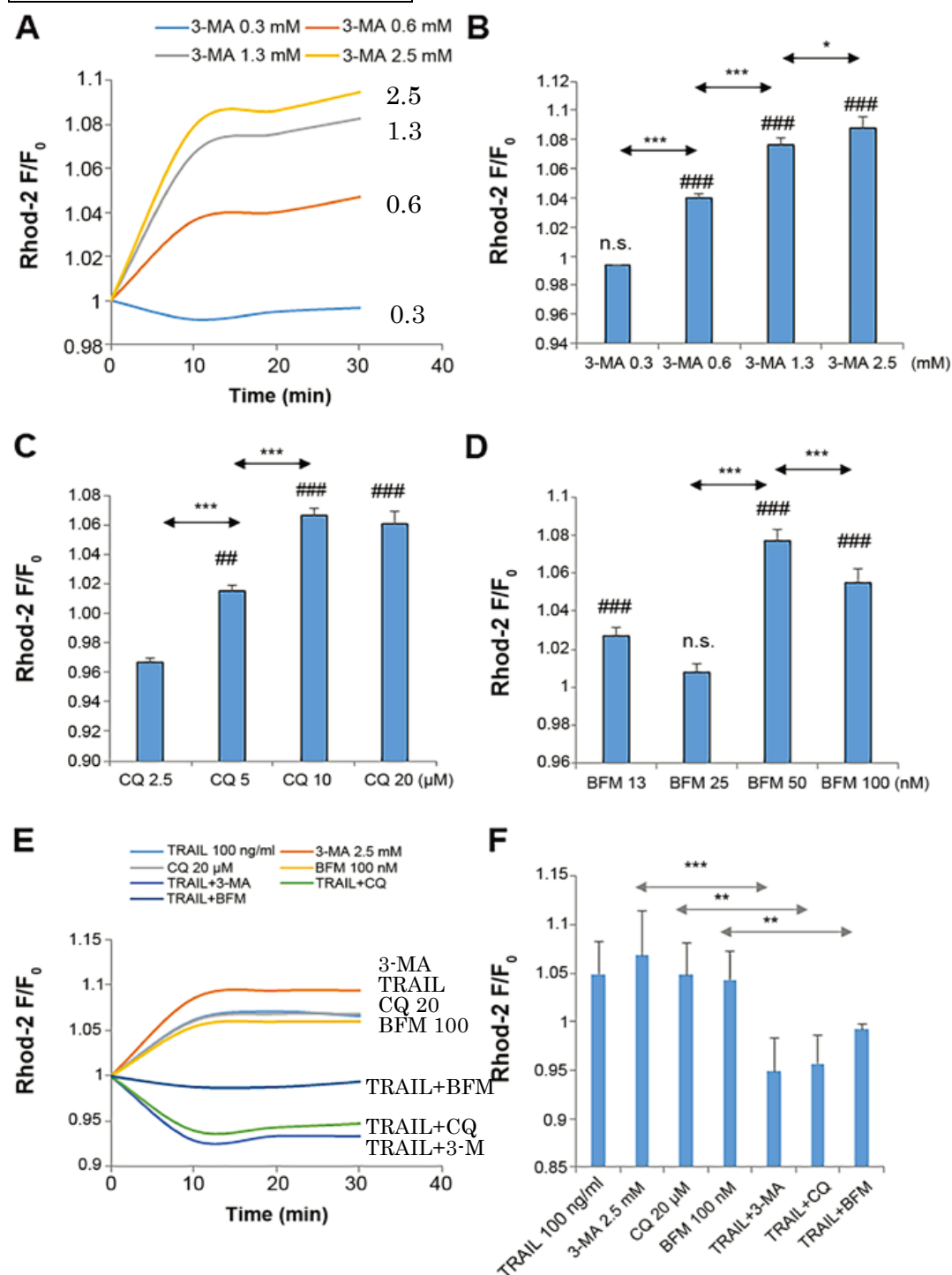
ミトコンドリア、核のイメージング- HDFs 細胞



(C) HDFs 細胞を試薬で 37°C24 時間処理。ミトコンドリアを MitoTracker Red CMXRos で、核を Hoechst 33342 で染色し、画像は蛍光顕微鏡を使用して取得した。拡大したパネルは、MitoTracker の画像内に白色で四角く囲んだ部分の拡大像である。スケールバーは 10 μ m を示す。

図 11. TRAIL とオートファジー阻害薬は単独と併用で逆のミトコンドリア Ca^{2+} 動態を示す

ミトコンドリア内 Ca^{2+} - A375 細胞

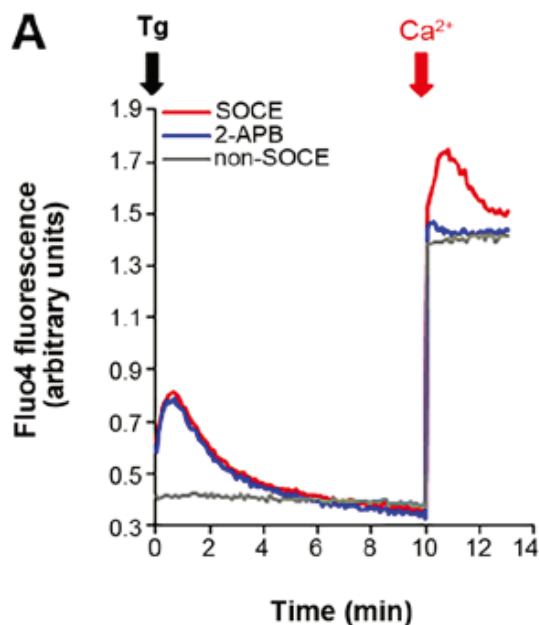


(A-F) A375 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ を rhod-2AM を用いて蛍光測定した。データは F/F_0 (F と F_0 は、試薬処理された細胞とコントロール細胞のそれぞれの蛍光強度) として示している。

##P<0.01、###P<0.001 はコントロールと比較している。n.s はコントロールと比較して有意差はないことを示す。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001 (n=3)。

図 12. SOCE は TRAIL や 3-MA のミトコンドリア Ca^{2+} 動態に影響を及ぼしている可能性がある

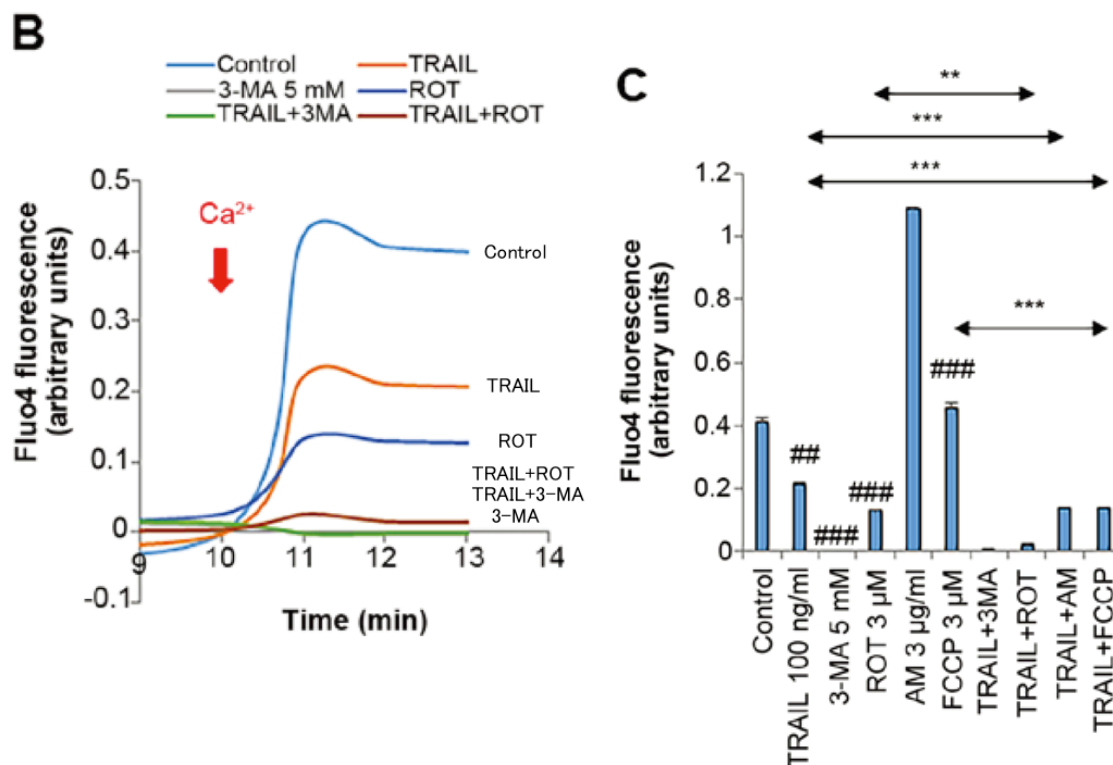
細胞質内 Ca^{2+} - A375 細胞



(A) A375 細胞を Ca^{2+} -free medium (1mM EGTA の添加された HBSS) に浮遊させ、Fluo4-AM を用いて $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を測定した。Tg 2 μM 投与直後を 0 分とし、10 分間蛍光測定。 CaCl_2 2 mM を添加し、13 分まで蛍光測定した。この $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の変化が SOCE であることを確認するため、2-APB 10 μM を添加して、13 分間同様に測定した。小胞体 Ca^{2+} と関係のない Ca^{2+} 流入 (non-SOCE) の影響を確認するために、最初に Tg を投与せず同様に 13 分間測定した。(n=3)。

図 12. SOCE は TRAIL や 3-MA のミトコンドリア Ca^{2+} 動態に影響を及ぼしている可能性がある

細胞質内 Ca^{2+} - A2058 細胞



(B, C) A2058 細胞を Ca^{2+} -free medium (1mM EGTA の添加された HBSS) に浮遊させ、Fluo4-AM を用いて $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を測定。Tg 2 μM 投与直後を 0 分とし 10 分間蛍光測定。 CaCl_2 2 mM を添加し、13 分まで蛍光測定した。(C) データは、10-13 分間の平均蛍光強度を平均値 \pm SD で示した。

$P < 0.01$ 、### $P < 0.001$ はコントロールと比較している。n.s はコントロールと比較して有意差はないことを示す。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (n=3)。

OXOPHOS 阻害薬である ROT は Rotenone、AM は Antimycin A、FCCP は Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone を示す。

参考文献

1. International Agency for Research on Cancer CI5plus Cancer Incidence in Five Continents Time Trends <http://ci5.iarc.fr/CI5plus/Default.aspx>
2. 玉置邦彦: 最新皮膚科学体系 11, 中山書店: 225-268, 2002.
3. 藤澤康弘, 藤本学: 悪性黒色腫全国統計調査: 2005-2013 年度の集計結果. 日皮会誌; 29: 189-194, 2014.
4. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D and Bastian BC: Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med 353: 2135-2147, 2005.
5. Bastian BC: The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. Annu Rev Pathol 9: 239-271, 2014.
6. Elder DE, Massi D, Scolyer R and Willemze R: WHO Classification of Skin Tumours. 4th Ed, Geneva, Switzerland, WHO Press 2018: 66-152.
7. 猪爪隆史: 免疫チェックポイント阻害剤の効果と副作用. 日皮会誌; 128: 1291-1299, 2018.
8. 芦田敦子: メラノーマの遺伝子異常. 日皮会誌; 128: 1301-1308, 2018.
9. 福島聡: 進行期悪性黒色腫の治療戦略. 臨床皮膚科; 71: 131-136, 2017.
10. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA and Goodwin RG: Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 3: 673-682, 1995.
11. Wang S: The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. Oncogene 27: 6207-6215, 2008.
12. Sayers TJ: Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. Cancer Immunol Immunother 60: 1173-1180, 2011.
13. Yerbes R, Palacios C and López-Rivas A: The therapeutic potential of TRAIL receptor signalling in cancer cells. Clin Transl Oncol 13: 839-847, 2011.
14. Almasan A and Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL: Apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev 14: 337-348, 2003.
15. Johnstone RW, Frew AJ and Smyth MJ: The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. Nat Rev Cancer 8: 782-798, 2008.
16. Wang S: The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. Oncogene 27: 6207-6215,

2008.

17. Gonzalvez F and Ashkenazi A: New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29: 4752-4765, 2010.
18. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ and Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 611-620, 2000.
19. LeBlanc HN and Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10: 66-75, 2003.
20. Ivanov VN, Bhoumik A and Ronai Z: Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 22: 3152-3161, 2003.
21. Dyer MJ, MacFarlane M and Cohen GM: Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. *J Clin Oncol* 25: 4505-4506, 2007.
22. 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, 2013.
23. Guiho R, Biteau K, Heymann D and Redini F: TRAIL-based therapy in pediatric bone tumors: How to overcome resistance. *Future Oncol* 11: 535-542, 2015.
24. de Miguel D, Lemke J, Anel A, Walczak H and Martinez-Lostao L: Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ* 23: 733-747, 2016.
25. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A and Kroemer G: Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 741-752, 2007.
26. Mizushima N, Yoshimori T and Ohsumi Y: The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 107-132, 2011.
27. Codogno P and Meijer AJ: Autophagy and signaling: Their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12 (Suppl 2): 1509-1518, 2005.
28. Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Florencio FJ and Crespo JL: The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4: 851-865, 2008.
29. Dennis MD, Baum JI, Kimball SR and Jefferson LS: Mechanisms involved in the coordinate regulation of mTORC1 by insulin and amino acids. *J Biol Chem* 286: 8287-8296, 2011.
30. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B and Bao JK: Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 45: 487-498, 2012.
31. Bhutia SK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Das DN, Panda PK, Patra SK, Maiti TK, Mandal M, Dent P, Wang XY, et al: Autophagy: Cancer's friend or foe? *Adv Cancer*

- Res 118: 61-95, 2013.
32. Gozuacik D and Kimchi A: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23: 2891-2906, 2004.
 33. Fulda S and Kögel D: Cell death by autophagy: Emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene* 34: 5105-5113, 2015.
 34. Fulda S: Autophagy in cancer therapy. *Front Oncol* 7: 128, 2017.
 35. Knoll G, Bittner S, Kurz M, Jantsch J and Ehrenschwender M: Hypoxia regulates TRAIL sensitivity of colorectal cancer cells through mitochondrial autophagy. *Oncotarget* 7: 41488-41504, 2016.
 36. He W, Wang Q, Xu J, Xu X, Padilla MT, Ren G, Gou X and Lin Y: Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation. *Autophagy* 8: 1811-1821, 2012.
 37. Lim SC, Jeon HJ, Kee KH, Lee MJ, Hong R and Han SI: Involvement of DR4/JNK pathway-mediated autophagy in acquired TRAIL resistance in HepG2 cells. *Int J Oncol* 49: 1983-1990, 2016.
 38. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y and Kondo S: Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 11: 448-457, 2004.
 39. Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M and Kaina B: Survival and death strategies in glioma cells: Autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One* 8: e55665, 2013.
 40. Guo W, Wang Y, Wang Z, Wang YP and Zheng H: Inhibiting autophagy increases epirubicin's cytotoxicity in breast cancer cells. *Cancer Sci* 107: 1610-1621, 2016.
 41. Prieto-Domínguez N, Ordóñez R, Fernández A, García-Palomo A, Muntané J, González-Gallego J and Mauriz JL: Modulation of Autophagy by Sorafenib: Effects on Treatment Response. *Front Pharmacol* 7: 151, 2016.
 42. Ito T, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Tokunaga T, Yoshida Y, Ochiai T, Tokuhashi Y and Suzuki-Karasaki Y: Cold PSM, but not TRAIL, triggers autophagic cell death: A therapeutic advantage of PSM over TRAIL. *Int J Oncol* 53: 503-514, 2018.
 43. Landes T and Martinou JC: Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The role of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1813: 540-545, 2011.
 44. Elgass K, Pakay J, Ryan MT and Palmer CS: Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833: 150-161, 2013.

45. Twig G and Shirihai OS: The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14: 1939-1951, 2011.
46. Chen H, Chomyn A and Chan DC: Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280: 26185-26192, 2005.
47. Hoppins S, Lackner L and Nunnari J: The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 751-780, 2007.
48. Pendin D, Filadi R and Pizzo P: The concerted action of mitochondrial dynamics and positioning: New characters in cancer onset and progression. *Front Oncol* 7: 102, 2017.
49. Kingnate C, Charoenkwan K, Kumfu S, Chattipakorn N and Chattipakorn SC: Possible roles of mitochondrial dynamics and the effects of pharmacological interventions in chemoresistant ovarian cancer. *EBioMedicine* 34: 256-266, 2018.
50. Akita M, Suzuki-Karasaki M, Fujiwara K, Nakagawa C, Soma M, Yoshida Y, Ochiai T, Tokuhashi Y and Suzuki-Karasaki Y: Mitochondrial division inhibitor-1 induces mitochondrial hyperfusion and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol* 45: 1901-1912, 2014.
51. Suzuki-Karasaki Y, Fujiwara K, Saito K, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T and Soma M: Distinct effects of TRAIL on the mitochondrial network in human cancer cells and normal cells: Role of plasma membrane depolarization. *Oncotarget* 6: 21572-21588, 2015.
52. Marchi S and Pinton P: Alterations of calcium homeostasis in cancer cells. *Curr Opin Pharmacol* 29: 1-6, 2016.
53. Monteith GR, Prevarskaya N and Roberts-Thomson SJ: The calcium-cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer* 17: 367-380, 2017.
54. Jardin I and Rosado JA: STIM and calcium channel complexes in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1863: 1418-1426, 2016.
55. Takata N, Ohshima Y, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y and Suzuki-Karasaki Y: Mitochondrial Ca²⁺ removal amplifies TRAIL cytotoxicity toward apoptosis-resistant tumor cells via promotion of multiple cell death modalities. *Int J Oncol* 51: 193-203, 2017.
56. Ohshima Y, Takata N, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y and Suzuki-Karasaki Y: Disrupting mitochondrial Ca²⁺ homeostasis causes tumor-selective TRAIL sensitization through mitochondrial network abnormalities. *Int J Oncol* 51: 1146-1158, 2017.
57. Cho IR, Koh SS, Min HJ, Park EH, Srisuttee R, Jhun BH, Kang CD, Kim M, Johnston RN and Chung YH: Reovirus infection induces apoptosis of TRAIL-resistant

- gastric cancer cells by down-regulation of Akt activation. *Int J Oncol* 36:1023-1030, 2010.
58. Onoe-Takahashi A, Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T and Suzuki-Karasaki Y: Autophagy inhibitors regulate TRAIL sensitivity in human malignant cells by targeting the mitochondrial network and calcium dynamics. *Int J Oncol* 54: 1734-1746, 2019.
 59. Maes H, Kuchnio A, Peric A, Moens S, Nys K, De Bock K, Quaegebeur A, Schoors S, Georgiadou M, Wouters J, Vinckier S, Vankelecom H, Garmyn M, Vion AC, Radtke F, Boulanger C, Gerhardt H, Dejana E, Dewerchin M, Ghesquière B, Annaert W, Agostinis P and Carmeliet P. Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell* 26: 190-206, 2014.
 60. Lockshin RA and Zakeri Z: Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2405-2419, 2004.
 61. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU and Kimchi A: Life and death partners: Apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 16: 966-975, 2009.
 62. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN and Bhutia SK: Autophagy and apoptosis: Where do they meet? *Apoptosis* 19: 555-566, 2014.
 63. Kulikov AV, Luchkina EA, Gogvadze V and Zhivotovsky B: Mitophagy: Link to cancer development and therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 482: 432-439, 2017.
 64. Grahovac J, Srdić-Rajić T, Francisco Santibañez J, Pavlović M, Čavić M and Radulović S: Telmisartan induces melanoma cell apoptosis and synergizes with vemurafenib in vitro by altering cell bioenergetics. *Cancer Biol Med* 16: 247-263, 2019.
 65. Chen XY, Ren HH, Wang D, Chen Y, Qu CJ, Pan ZH, Liu XN, Hao WJ, Xu WJ, Wang KJ, Li DF and Zheng QS: Isoliquiritigenin Induces Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis by Inhibiting mitoNEET in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner in A375 Human Melanoma Cells. *Oxid Med Cell Longev*: 2019:9817576, 2019.
 66. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR and Youle RJ: PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8: e1000298, 2010.
 67. Jangamreddy JR, Ghavami S, Grabarek J, Kratz G, Wiechec E, Fredriksson BA, Rao Pariti RK, Cieślak-Pobuda A, Panigrahi S and Łos MJ: Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: Differences between primary and cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2057-2069, 2013.
 68. Izzo V, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Kroemer G and Galluzzi L: Mitochondrial

- permeability transition: New findings and persisting uncertainties. *Trends Cell Biol* 26: 655-667, 2016.
69. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O and Kroemer G: Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cell Mol Life Sci* 73: 2405-2410, 2016.
70. Orrenius S, Gogvadze V and Zhivotovsky B: Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 72-81, 2015.
71. Danese A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Previati M, Giorgi C and Pinton P: Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and Mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1858: 615-627, 2017.
72. Elustondo PA, Nichols M, Robertson GS and Pavlov EV: Mitochondrial Ca^{2+} uptake pathways. *J Bioenerg Biomembr* 49: 113-119, 2017.
73. Deak AT, Blass S, Khan MJ, Groschner LN, Waldeck-Weiermair M, Hallström S, Graier WF and Malli R: IP3-mediated STIM1 oligomerization requires intact mitochondrial Ca^{2+} uptake. *J Cell Sci* 127: 2944-2955, 2014.

研究業績

小野江 明日香

I 発表 ①一般発表 16 (共 8)

②特別発表 なし

II 論文 ①原著論文 4 (共 1)

②症例報告 11 (共 7)

③総説 なし

III 著書 なし

I 発表

① 一般発表

1. 高橋明日香, 中川千夏, 松浦大輔, 落合豊子, 稲毛康司, 車谷峰子: 頬部の環状紅斑を契機として診断しえた小児の Sjogren 症候群, 日本皮膚科学会第 856 回東京地方会, 東京都, 2014 年 9 月
2. 高橋明日香, 藤川一穂, 落合豊子, 中野創, 澤村大輔, 藤塚章子: 遺伝子解析から確定診断しえた先天性赤芽球性ポルフィリン症(CEP), 日本皮膚科学会第 859 回東京地方会, 東京都, 2015 年 1 月
3. 尾本百香, 松浦大輔, 藤川一穂, 高橋明日香, 半田梓, 落合豊子: 乳癌に対する化学療法の経過中に帯状疱疹から異型水痘を発症した 1 例, 日本皮膚科学会第 860 回東京地方会, 東京都, 2015 年 4 月
4. 高橋明日香, 原弘之, 相川美和, 落合豊子, 森嶋智津子, 高山篤子, 早川道郎: 腫瘍径 3mm 以下の小型色素性基底細胞癌のダーモスコピーによる検討, 第 31 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 大阪府, 2015 年 7 月
5. 武田絢, 内田真由美, 松浦大輔, 藤川一穂, 半田梓, 高橋明日香, 落合豊子: 鼻尖部に皮膚転移を来した肝細胞癌の 1 例, 日本皮膚科学会第 861 回東京地方会, 東京都, 2015 年 7 月
6. 遠藤未希, 高橋明日香, 藤川一穂, 松浦大輔, 落合豊子, 山崎律子: 小児のハブクラゲ刺症の一例, 日本皮膚科学会第 863 回東京地方会, 東京都, 2015 年 11 月
7. 尾本百香, 高橋明日香, 半田梓, 藤川一穂, 落合豊子, 小川克彦, 鈴木裕: 汎発性帯状疱疹を契機として診断に至った水痘・帯状疱疹ウイルス性髄膜・仙髄神経根炎, 日本皮膚科学会第 864 回東京地方会, 東京都, 2015 年 12 月
8. 高橋明日香, 藤川一穂, 鈴木 美喜[唐崎], 落合 豊子, 鈴木 良弘[唐崎]: ヒトメラノーマ細胞の TRAIL 耐性におけるオートファジーの関与, 第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 鹿児島県, 2016 年 5 月
9. 小野江明日香, 松浦大輔, 落合豊子, 森嶋智津子, 照井正, 石井文人, 橋本隆: 潰瘍性大腸炎(UC)に併発した線状 IgA/IgG 水疱性皮膚症(LAGBD), 日本皮膚科学会第 868 回東京地方会, 東京都, 2016 年 9 月

10. 遠藤未希, 小野江明日香, 藤川一穂, 相川美和, 松浦大輔, 落合豊子, 小川眞広, 照井正 : 手指爪部 glomus tumor 7 例における超音波診断の有用性の検討, 日本皮膚科学会第 870 回東京地方会, 東京都, 2016 年 12 月
11. 小野江明日香, 松浦大輔, 落合豊子, 藤井雅志, 森川英雄, 照井正 : 顔面に生じた Primary Signet-ring Cell/Histiocytoid Carcinoma の 1 例, 日本皮膚科学会第 871 回東京地方会, 東京都, 2017 年 1 月
12. 小野江明日香, 松浦大輔, 中川千夏, 遠藤未希, 藤川一穂, 落合豊子, 照井正 : 当院における水疱性類天疱瘡 (BP) と DPP-4 阻害薬内服の関連性の検討, 第 80 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京都, 2017 年 2 月
13. 遠藤未希, 小野江明日香, 藤川一穂, 松浦大輔, 落合豊子, 絹川典子, 川田望, 照井正 : 免疫組織化学的所見が確定診断に有用であった腎細胞癌皮膚転移, 日本皮膚科学会第 872 回東京地方会, 東京都, 2017 年 6 月
14. 徳永智彦, 小野江明日香, 相馬正義, 落合豊子、鈴木良弘 : Plasma-stimulated media (PSM)の悪性黒色腫に対する抗腫瘍効果, 第 33 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 秋田県, 2017 年 6 月
15. 小野江明日香, 松浦大輔, 藤川一穂, 落合豊子, 照井正 : Granulomatous purpuric dermatosis の 1 例, 日本皮膚科学会第 873 回東京支部合同臨床地方会, 東京都, 2017 年 7 月
16. 遠藤未希, 小野江明日香, 藤川一穂, 松浦大輔, 落合豊子, 照井正, 鈴木寛丈 : 抗セントロメア抗体陽性の強皮症合併が疑われた爪扁平苔癬, 日本皮膚科学会第 81 回東京支部学術大会, 東京都, 2017 年 11 月

② 特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

1. Takahashi A, Hara H, Aikawa M, Ochiai T: Dermoscopic features of small size

pigmented basal cell carcinomas, The Journal of Dermatology, 43: 543-546, 2015.

2. Tokunaga T, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Ito T, Onoe-Takahashi A, Ochiai T, Soma M, Suzuki-Karasaki Y: Plasma-stimulated medium kills TRAIL-resistant human malignant cells by promoting caspase-independent cell death via membrane potential and calcium dynamics modulation, International Journal of oncology, 52: 697-708, 2018.
3. 小野江明日香, 松浦大輔, 落合豊子, 照井正: 当院における水疱性類天疱瘡 (BP) と DPP-4 阻害薬内服の関連性の検討, 皮膚科の臨床; 60: 487-491, 2018.
4. Onoe-Takahashi A, Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T and Suzuki-Karasaki Y: Autophagy inhibitors regulate TRAIL sensitivity in human malignant cells by targeting the mitochondrial network and calcium dynamics. Int J Oncol 54: 1734-1746, 2019.

② 症例報告

1. 高橋明日香, 落合豊子, 稲毛康司, 車谷峰子: 頬部の環状紅斑を契機として診断し得た小児の Sjogren 症候群, 皮膚科の臨床; 58: 219-222, 2016.
2. 尾本百香, 松浦大輔, 藤川一穂, 高橋明日香, 半田梓, 落合豊子: 乳癌に対する化学療法の経過中に汎発性帯状疱疹を発症した 1 例, 皮膚科の臨床; 58: 1627-1630, 2016.
3. 武田絢, 内田真由美, 松浦大輔, 藤川一穂, 半田梓, 高橋明日香, 落合豊子: 鼻尖部に皮膚転移をきたした肝細胞癌の 1 例, 皮膚科の臨床; 58: 1427-1430, 2016.
4. 遠藤未希, 高橋明日香, 藤川一穂, 松浦大輔, 山崎律子, 落合豊子: 小児のハブクラゲ刺症の 1 例, 皮膚科の臨床; 59: 263-266, 2017.
5. Onoe A, Matsuura D, Terui T, Ishii N, Hashimoto T, Ochiai T: Linear IgA/IgG bullous dermatosis associated with ulcerative colitis, The Journal of Dermatology, 44: 1295-1298, 2017.
6. 尾本百香, 松浦大輔, 藤川一穂, 小野江明日香, 半田梓, 落合豊子, 小川克彦, 鈴木裕, 照井正: 水痘・帯状疱疹ウイルスによる汎発疹が先行した髄膜炎・尿閉症候群の 1 例, 皮膚科の臨床; 60: 457-461, 2018.

7. 小野江明日香, 松浦大輔, 落合豊子, 照井正 : Granulo matous purpuric dermatosis の 1 例, 皮膚科の臨床; 60: 1379-1384, 2018.
8. 遠藤未希, 松浦大輔, 小野江明日香, 藤川一穂, 絹川典子, 川田望, 照井正, 落合豊子: 免疫組織化学所見が確定診断に有用であった乳頭状腎細胞癌皮膚転移, 皮膚科の臨床; 60: 1785-1790, 2018.
9. 遠藤未希, 小川眞広, 小野江明日香, 藤川一穂, 相川美和, 松浦大輔, 照井正, 落合豊子 : 手指爪部のグロムス腫瘍に対する超音波検査, 特に血流評価の有用性の検討, 皮膚科の臨床; 61: 399-403, 2019.
10. Onoe A, Matsuura D, Terui T, Morikawa H, Fujii M, Ochiai T: Erythematous lesion with peripheral purpura on the face, Clinical and experimental Dermatology, 44: 428-431, 2019.
11. 遠藤未希, 松浦大輔, 小野江明日香, 藤川一穂, 照井正, 落合豊子: 抗セントロメア抗体陽性の全身性強皮症を合併した爪扁平苔癬, 皮膚病診療; 41: 829-832, 2019.

③ 総説 なし

Ⅲ 著書

なし