

博士学位論文

2013

超分子化合物[2]Rotaxane のカスパーゼシグナル伝達を
介したアポトーシス誘導性細胞死に関する研究

Research on apoptotic cell death through the caspase signaling
pathway of the supramolecular substance, [2] rotaxane

指導教授 小野 信文

福岡大学大学院 薬学研究科 博士課程後期

薬学専攻 原 一樹

目次	2
緒言	3
第1章 TRO-A0001 の腫瘍細胞増殖に及ぼす効果	6
第1節 溶剤濃度の検討	6
第2節 TRO-A0001 の細胞増殖に及ぼす効果	10
第3節 Dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 の細胞増殖に及ぼす効果	13
第4節 メラノーマ治療薬、大腸がん治療薬との比較検討	18
考察	20
第2章 TRO-A0001 を暴露した腫瘍細胞の形態学的変化についての検討	22
第1節 細胞核、細胞骨格染色	23
第2節 Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling (TUNEL)染色	31
考察	38
第3章 TRO-A0001 がアポトーシス関連タンパク質発現に及ぼす変化	39
第1節 エフェクターカスパーゼ発現の変化	41
第2節 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)タンパク質発現の変化	50
第3節 Bcl-2-associated X protein(Bax)タンパク質発現の変化と細胞生存への影響	52
考察	59
総括	61
考察	63
引用文献	65

緒言

ロタキサンは、環状分子を棒状分子が貫通したものの両端に、嵩高い構造を結合させることで立体障害を持たせ、環状構造が軸から抜けないように合成した化合物である。ロタキサンの名称は、ラテン語の *rota* と *axis* に由来し(1)、環状分子にはクラウンエーテルやシクロデキストリンなどが、また棒状分子にはポリエチレングリコールやアルキル鎖が用いられることが多い。

一般的に、環状分子 1 個、軸状分子 1 個で構成されるロタキサンは[2]rotaxane と呼ばれ、環状分子を貫通する環状分子数が増えるに従い名称前の数字が増加していくが、多数の環状分子で構成される場合はポリロタキサン(poly-rotaxane)と称される。

ロタキサンは 1967 年に Harrison らが初めて合成し、多数の繰り返し反応を行う方法で 6%の収率を得られることが報告されてから、近年までに収率の高いロタキサン合成法が報告されてきた(2)。

クラウンエーテルと二級アンモニウムを使用した合成系では、24 員環のクラウンエーテルを用いる方法が頻繁に用いられているが、近年までのホスト・ゲスト化学の進展に伴い、様々な官能基を有するクラウンエーテルの合成法が報告されてから、数多くのロタキサンの合成法が報告されている(3-5)。

ロタキサンやポリロタキサンは、細胞への薬物や遺伝子の送達にも応用されている。シクロデキストリン環とポリエチレングリコールで合成されたポリロタキサンを用いて、薬剤や DNA などの遺伝子を細胞内に導入するドラッグデリバリーへの応用研究が報告されている(6-8)。

このように、医療分野への有用性が期待されている中で、ロタキサン化合物が生体へ及ぼす作用は、未だ明らかになっていないことが課題である。

これまでに、dibenzo-24-crown 8-ether と呼ばれる 24 員環クラウンエーテル環状分子と、bis(2-(3,5-dimethylphenylcarbonyloxy)-ethyl) ammonium trifluoromethanesulfonate(NK7-40-2) と呼ばれる軸状分子を含む、Fig.1 に示すような新規[2]rotaxane(TRO-A0001)を合成し(9)、ロタキサン化合物が腫瘍細胞に及ぼす効果について研究を行ってきた。

マウスメラノーマ細胞株 B16/BL6、マウス直腸がん細胞株 Colon-26 を用いてロタキサンの抗腫瘍効果について検討を行い、また遺伝子導入に利用されるエレクトロポレーション法、ソノポレーション法を用い、ロタキサンを効率的に細胞内へ導入する方法も検討した。

その結果、TRO-A0001 がマウス由来メラノーマ B16/BL6 細胞と直腸がん Colon-26 細胞に細胞死を引き起こすことが明らかとなり、さらに、エレクトロポレーション法、ソノポレーション法を用いた細胞内導入法により、低用量の TRO-A0001 で効果を発現することを報告した(10)。これらの結果をもとに、がん細胞から排出されにくく、局所的治療に好適な、新たな抗がん剤の開発を目的とした。

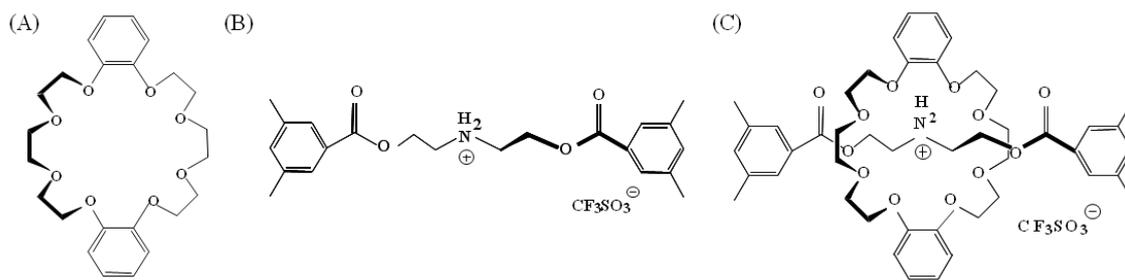


Fig.1 Chemical structure of dibenzo-24-crown 8-ether (A), NK7-40-2 (B) and [2]rotaxane(TRO-A0001)(C)

抗がん剤の多くは相対的に低分子量で安定な構造であるため、比較的容易に細胞内へ吸収されるが、細胞外への排泄も容易に行われ、比較的早期に薬剤耐性を獲得することが化学療法においての問題となっている(11)。さらに、薬物の中でも抗がん剤は重篤な副作用を有するものが多く、薬物治療上困難を極める場合がある。

例えば、メラノーマの術後補助療法では DAVFeron 療法が本邦において頻用されている(12)。DAVFeron 療法はダカルバジン(DTIC)、ニムスチン(ACNU)、ビンクリスチン(VCR)の三剤併用化学療法 DAV 療法にインターフェロン β(IFN-β)の局注を併用するプロトコールであり、旧 Stage III 症例において 5 年生存率を有意に改善する可能性が高いと推察されている。

しかし、高度な骨髄抑制や 2 次性発がんなどの副作用発現が、化学療法における大きな障害となっているため、進行期メラノーマに対する化学療法は、DTIC 単剤が基準となっているが、DTIC の奏効率は約 20% であり、有益な治療法は未だ確立されていない(12, 13)。

大腸がんでは、術後再発抑制を目的とした補助化学療法と、切除不能な進行再発大腸癌を対象とした化学療法で、有用性や保険診療が認められているレジメンがある。

5-フルオロウラシル(5-FU)ベースの補助化学療法はレバミゾール(LEV)やロイコボリン(LV)を併用し結腸癌術後補助化学療法の標準治療として考えられるようになった(14 - 17)。また、テガフル・ウラシル(UFT)/LV 経口療法やカペシタビン療法においても、5-FU/LV と同等の 5 年生存率(OS)を示したが、カペシタビン療法においては 5-FU/LV と比較して Grade3/4 の副作用の減少が見られたものの、好中球減少(32%)や手足症候群(60%)などの有害事象が認められた(18, 19)。

切除不能な進行再発大腸癌を対象とした化学療法では、5-FU/LV 療法にイリノテカン(CPT-11)を併用した FOLFIRI などのレジメンも考慮されたが、CPT-11 の上乘せ効果は認められず、Grade3/4 の消化管毒性や好中球減少の発生率が高かった(20, 21)。

対照的に、オキサリプラチン(L-OHP)を併用した FOLFOX は、5-FU/LV と比較し Stage 別の 5 年無増悪生存期間(DFS)を有意に改善し、好中球減少(1.8%)や消化器毒性などの有害事象も改善したが、L-OHP 特有の神経毒性が加わった(22, 23)。

さらに、これらのレジメンに抵抗性を示す場合の二次治療では、分子標的治療薬として

ベバシズマブやセツキシマブを単独あるいは併用療法で使用されているが、現在のところ期待されていた上乗せ効果は認められていない(24-26)。

これらの臨床における薬剤治療での問題に対して、ロタキサンのような分子量が大きくかつ強い結合を介さない構成分子からなる構造は、構成単位間の分子形状が定まりにくく、またそれぞれの構成分子自体も分子運動を行うため、一度細胞内に取り込まれると容易に排出されにくいことが考えられる。さらに、局所的に細胞内導入を行う方法が確立できれば、正常な細胞に与える副作用が低減される抗がん剤になり得ることが考えられる。

しかし、これらを実現するための課題には、これまでの研究で明らかとなったマウス由来のメラノーマ細胞や大腸がん細胞に引き起こした細胞死の作用機構を解明することが必要である。

これらの背景から、本研究ではヒト由来大腸がん DLD-1 細胞とヒト由来メラノーマ G361 細胞を新たに加え、メラノーマおよび大腸がん細胞に対して有効な抗がん剤となり得るかを目的として検討を行った。さらに、薬物として未だ検討されていないロタキサン構造を持つ、TRO-A0001 の作用機構解明を目的とした。

第1章 TRO-A0001 の腫瘍細胞増殖に及ぼす効果

本章では、マウス由来のメラノーマ B16/BL6、直腸がん Colon-26 細胞、およびヒト由来のメラノーマ G361、結腸腺がん DLD-1 細胞に対して、TRO-A0001 が細胞増殖へ及ぼす効果について検討を行った。

また、TRO-A0001 の構成分子 dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 の細胞増殖に対する効果についても明らかとなっていないため、TRO-A0001 とその構成分子について比較検討を行った。

さらに、TRO-A0001 はクラウンエーテル環、それを貫通する鎖状構造が同分子数で合成されており、dibenzo-24-crown 8-ether と NK7-40-2 が共存しているだけで作用を引き起こす可能性もあるため、構成分子を同時に暴露した場合の腫瘍細胞の増殖についても検討した。

最後に、メラノーマと大腸がんの既存の治療薬である DTIC、5-FU と TRO-A0001 の腫瘍細胞増殖抑制効果について比較検討を行った。

第1節 溶剤濃度の検討

TRO-A0001、dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 は、いずれも室温条件下で白色粉末個体である。また、TRO-A0001 は水に難溶性を示すため、溶剤にはジメチルスルホキシド(DMSO)を使用した。

本節では、TRO-A0001、dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 が細胞増殖に及ぼす効果を調査するため、これらの溶剤として使用した DMSO 自体の細胞増殖に対する影響を調べるとともに、以降の実験で使用する TRO-A0001、dibenzo-24-crown 8-ether および NK7-40-2 の溶解濃度を検討した。

1. 実験材料

【細胞】

実験に用いた細胞は、マウス由来メラノーマ細胞 B16/BL6、直腸がん細胞 Colon-26、ならびにヒト由来結腸腺がん細胞 DLD-1 およびメラノーマ細胞 G361 である。

【使用試薬】

- PrestoBlue[®] Cell Viability Reagent (Life technologies)

【使用機器】

- マルチモードプレートリーダー DTX800(Beckman coulter)

2. 実験方法

生細胞の測定は、PrestoBlue[®] Cell Viability Reagent を使用して行った。試薬中に含まれる resazurin は、細胞内還元反応により赤色蛍光物質である resorufin を生成し、その生成量が生細胞数と比例する原理となっている。生成された resorufin の蛍光強度をマイクロプレートリーダー(測定波長 535 – 60nm/対照波長 590 – 615nm)で測定し、生細胞数を計測した。

【実験操作手順】

- ① 生細胞数を計測し、 5.0×10^4 cells/mL の細胞懸濁液(50 μ L)を 96 マイクロウェルプレートに添加した。
- ② 37°C、5%CO₂ 条件下のインキュベーター中で 12 時間前培養を行った。
- ③ DMSO を溶解した RPMI 培養液 50 μ L を添加した。(DMSO 濃度は、0%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5%、1.0%になるように添加した)
- ④ DMSO 添加後、目的の時間まで、37°C、5%CO₂ 条件下でインキュベートした。(0 – 48 時間まで 12 時間毎に測定を行った)
- ⑤ 各ウェルに PrestoBlue[®] Cell Viability Reagent(10 μ L)を添加した。
- ⑥ 37°C で 2 時間インキュベートし、呈色反応を行った。
- ⑦ マルチモードプレートリーダーDTX800 を使用し、測定波長 535nm、対照波長 595nm の吸光度を測定した。

3. 統計処理

多重比較を行うため Tukey 法を使用した。危険率が 5%未満である場合を統計学的に有意差有りとして設定した。

4. 実験結果

DMSO を暴露した後、12 時間毎に生細胞数を測定した。RPMI 培養液のみで培養した細胞を未処理群とし、DMSO 暴露群の生細胞数と比較した。

結果は Fig. 2 (A) – (D) に示すように、DMSO 暴露後 48 時間まで 12 時間毎に、生細胞数

を測定した結果、B16/BL6、Colon-26、DLD-1、G361 のいずれの細胞でも、DMSO 暴露群と未処理群の生細胞数に有意な差が認められなかった。

したがって、細胞に暴露する DMSO 濃度 0.05 – 1.0% では、細胞増殖に影響がないことから、以降の実験で使用する TRO-A0001、dibenzo-24-crown 8-ether および NK7-40-2 は、DMSO 溶剤を 0.1% 含む条件で行った。

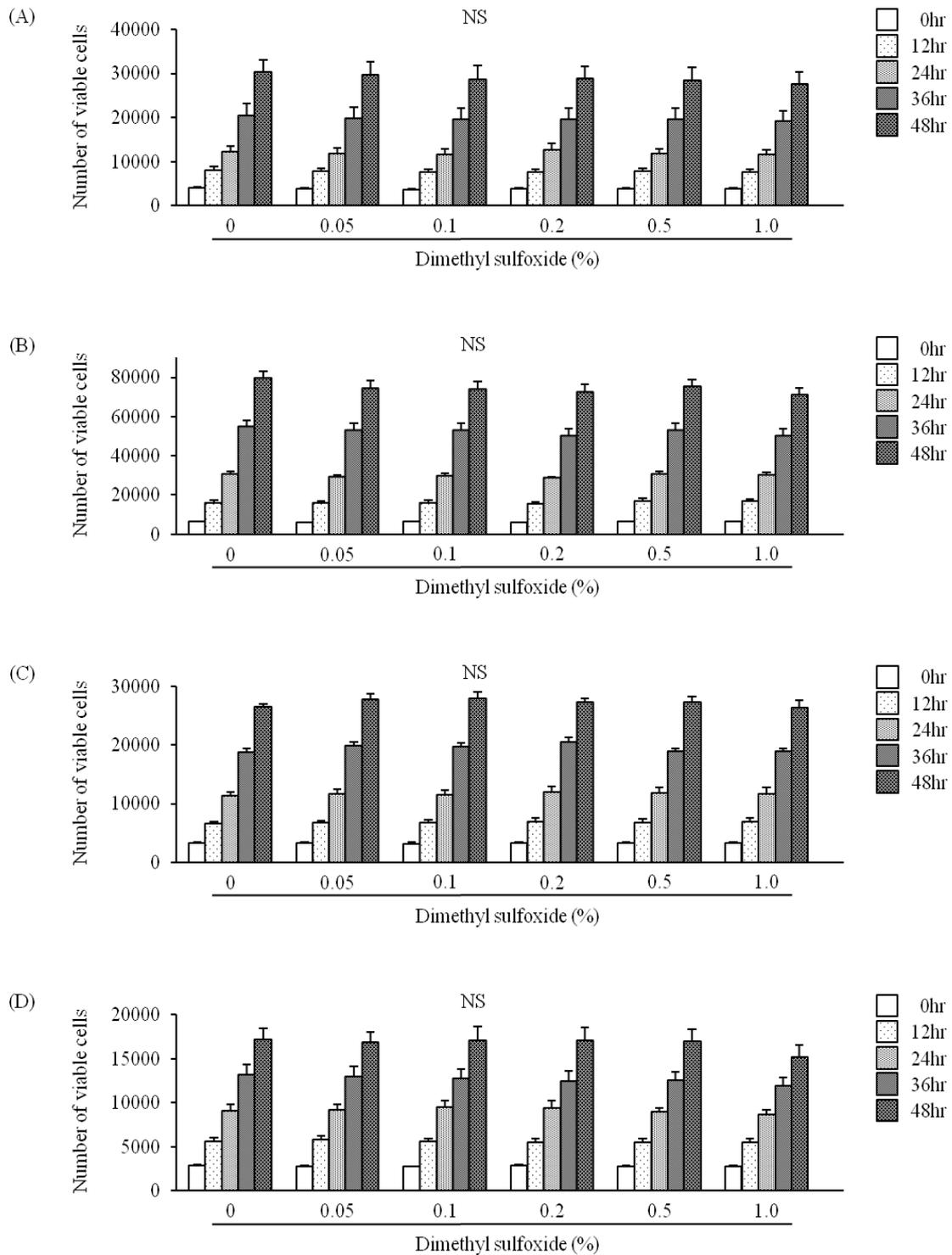


Fig. 2 Effects of dimethyl sulfoxide on the growth of melanoma and colon cancer cell lines. (A) B16/BL6 (B) Colon-26 (C) DLD-1 (D) G361 Data are expressed as the mean \pm S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.01$, compared with control group incubated for each time.

第2節 TRO-A0001 の細胞増殖に及ぼす効果

本節では、マウス由来メラノーマ B16/BL6 細胞、マウス由来直腸がん Colon-26 細胞と、ヒト由来結腸腺がん DLD-1 細胞、ヒト由来メラノーマ G361 細胞について、TRO-A0001 の細胞増殖に及ぼす効果について検討を行った。

1. 実験材料

第1章 第1節と同じものを使用した。

2. 実験方法

第1章 第1節と同じ方法を利用した。

TRO-A0001 濃度は、0.25 μ M、0.5 μ M、1.0 μ M、2.5 μ M、5.0 μ M、10.0 μ M になるよう添加した。

3. 統計処理

第1章 第1節と同じ統計処理を使用した。

4. 実験結果

TRO-A0001 を暴露した後、12 時間毎に生細胞数を測定した。DMSO (0.1%) を暴露した細胞を control 群とし、TRO-A0001 暴露群(0.25 – 10.0 μ M) の生細胞数と比較した。

Fig. 3(A), (B) に示すように、B16/BL6 および Colon-26 では、control 群と比較すると、TRO-A0001 濃度 1.0 μ M より高濃度で生細胞数の有意な減少が認められた。また、Fig. 3(C), (D) に示すように、DLD-1 および G361 でも同様に比較すると、TRO-A0001 濃度 0.5 μ M より高濃度で生細胞数の有意な減少が認められた。

B16/BL6、Colon-26 および G361 細胞では TRO-A0001 濃度 5.0 μ M 以上で、また DLD-1 細胞では、TRO-A0001 濃度 10.0 μ M で、最初に播種した細胞数より生細胞数が減少していることから、細胞死が引き起こされていることが明らかとなった。

また、B16/BL6、Colon-26 および DLD-1 細胞では、TRO-A0001 濃度 1.0 μ M から 2.5 μ M で、また G361 細胞では、TRO-A0001 濃度 0.5 μ M から 1.0 μ M で細胞増殖は認められるが、control 群と比較すると細胞増殖に抑制がかかり、生細胞数に有意な差が認められた。

一方、TRO-A0001 濃度 0.25 μ M を暴露した全ての細胞での生細胞数は、control 群と比較

しても同等であり、細胞増殖に変化はみられなかった。

以上の結果より、TRO-A0001 はマウス由来 B16/BL6、Colon-26 細胞とヒト由来 DLD-1、G361 細胞のそれぞれに共通して、細胞死や増殖抑制を引き起こすことが明らかとなり、細胞種間で効果を及ぼす用量が異なることが示唆された。

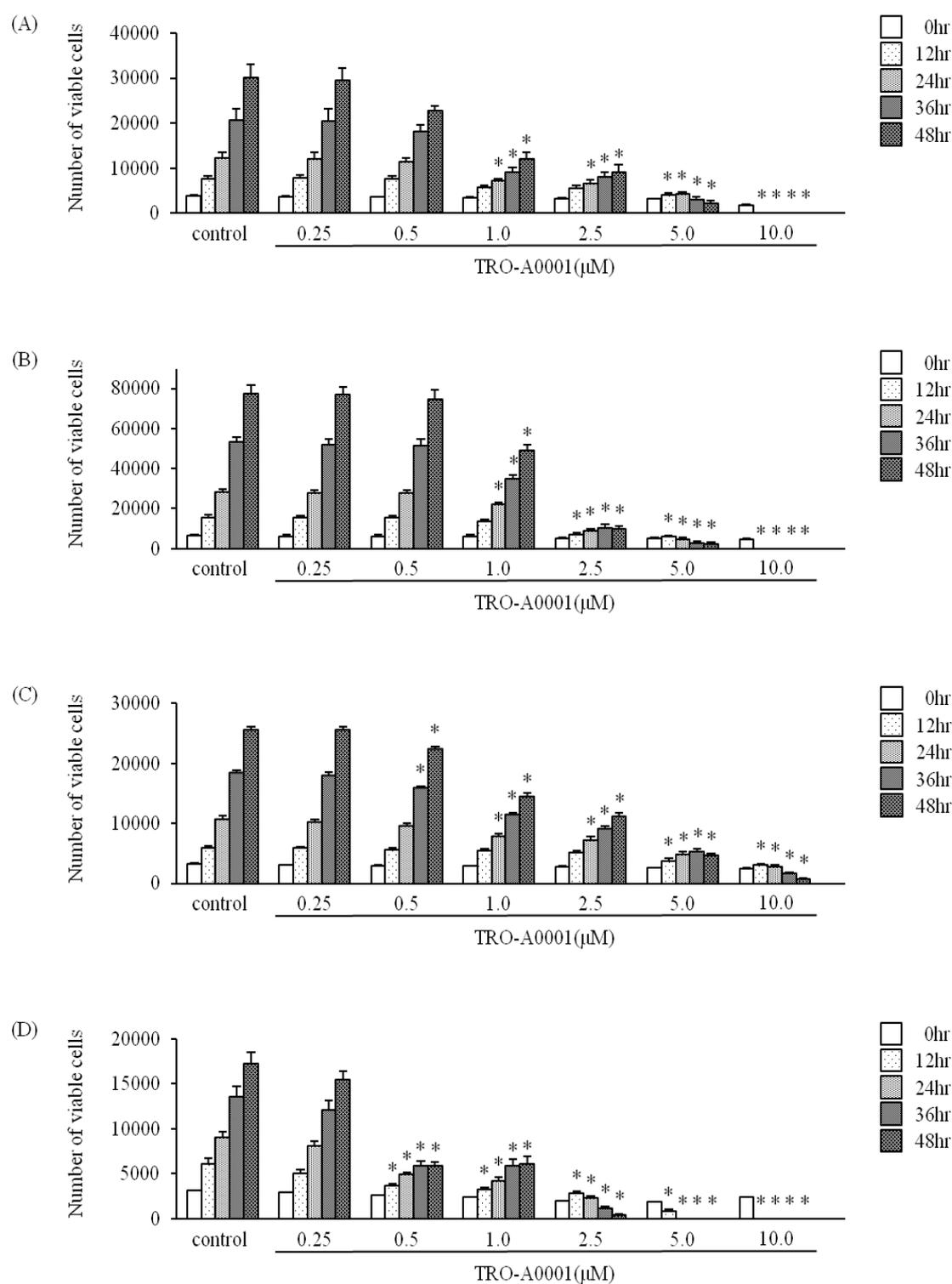


Fig. 3 Effects of TRO-A0001 on the growth in melanoma and colon cancer cell lines.

(A) B16/BL6 (B) Colon-26 (C) DLD-1 (D) G361 Data are expressed as the mean \pm S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.01$, compared with control group incubated for each time.

第3節 Dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 の細胞増殖に及ぼす効果

TRO-A0001 の構成分子は、環状分子に dibenzo-24-crown 8-ether を、軸状分子に NK7-40-2 を使用している。TRO-A0001 が引き起こした細胞死や増殖抑制は、これらの構成分子が引き起こしている可能性があるため、本節では dibenzo-24-crown 8-ether と NK7-40-2 それぞれを単独で暴露したときの各腫瘍細胞増殖について、TRO-A0001 と同様の作用があるか検討を行った。また、dibenzo-24-crown 8-ether と NK7-40-2 の両方を同時に暴露した場合の作用についても検討を行った。

1. 実験材料

第1章 第1節と同じものを使用した。

2. 実験方法

第1章 第1節と同じ方法を利用した。

Dibenzo-24-crown 8-ether と NK7-40-2 は、それぞれ 0.25 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M, 2.5 μ M, 5.0 μ M, 10.0 μ M になるように添加した。また、dibenzo-24-crown 8-ether と NK7-40-2 の両方を処理する実験は、各物質が 0.25 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M, 2.5 μ M, 5.0 μ M, 10.0 μ M になるように混合して添加した。

3. 統計処理

第1章 第1節と同じ統計処理を使用した。

4. 実験結果

Dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 及び、dibenzo-24-crown 8-ether と NK7-40-2 の混合物を暴露した後、48 時間まで 12 時間毎に生細胞数を測定した。前節と同様に、DMSO (0.1%) を暴露した細胞を control 群とし、上記の構成分子それぞれを暴露した細胞と生細胞数を比較した。

【Dibenzo-24-crown 8-ether の細胞増殖に及ぼす効果】

Fig. 4 (A) – (D) に示すように、TRO-A0001 の環状分子である dibenzo-24-crown 8-ether は、B16/BL6、Colon-26、DLD-1 及び G361 のいずれの細胞でも、dibenzo-24-crown 8-ether 処理

群の生細胞数に影響を及ぼさず、control 群と有意な差が認められなかった。

【NK7-40-2 の細胞増殖に及ぼす効果】

Fig. 5 (A) – (D) に示すように、TRO-A0001 の軸状分子である NK7-40-2 は、B16/BL6、Colon-26、DLD-1 及び G361 のいずれの細胞でも、NK7-40-2 処理群の生細胞数に影響を及ぼさず、control 群と有意な差が認められなかった。

【Dibenzo-24-crown 8-ether と NK7-40-2 混合物の細胞増殖に及ぼす効果】

Fig. 6 (A) – (D) に示すように、TRO-A0001 の環状分子である dibenzo-24-crown 8-ether と軸状分子である NK7-40-2 の混合物は、B16/BL6、Colon-26、DLD-1 および G361 のいずれの細胞でも生細胞数に影響を及ぼさず、control 群と有意な差が認められなかった。

以上の結果から、B16/BL6、Colon-26、DLD-1 および G361 細胞に対して、TRO-A0001 の環状分子 dibenzo-24-crown 8-ether と軸状分子 NK7-40-2 は、それぞれ単独で暴露しても細胞増殖に影響を及ぼさず、また構成分子を共存させて暴露しても、TRO-A0001 で認められた細胞死や増殖抑制は、引き起こされないことが明らかとなった。

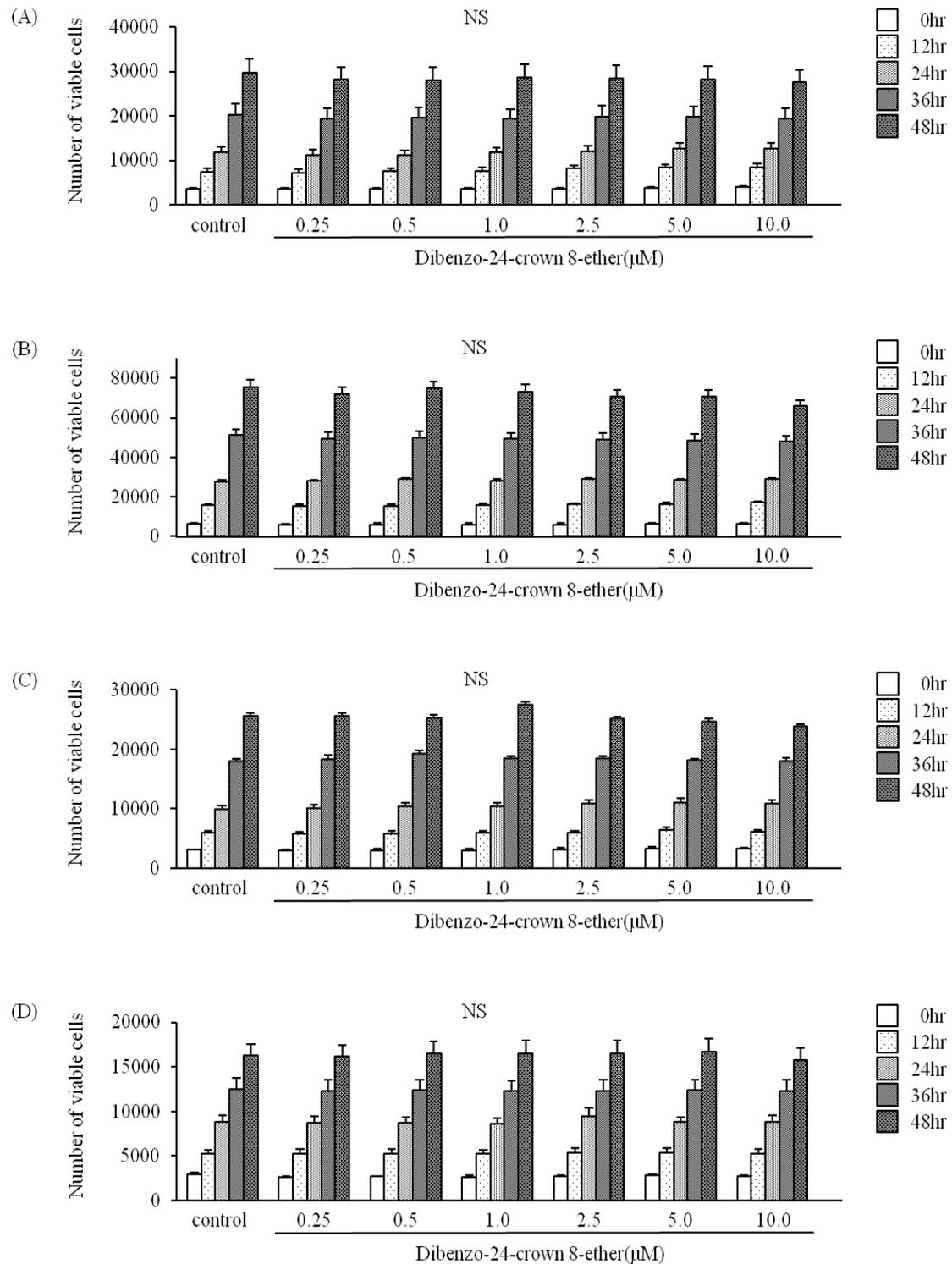


Fig. 4 Effects of dibenzo-24-crown 8-ether on the growth in melanoma and colon cancer cell lines.(A) B16/BL6 (B) Colon-26 (C) DLD-1 (D) G361 Data are expressed as the mean \pm S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, compared with control group incubated for each time.

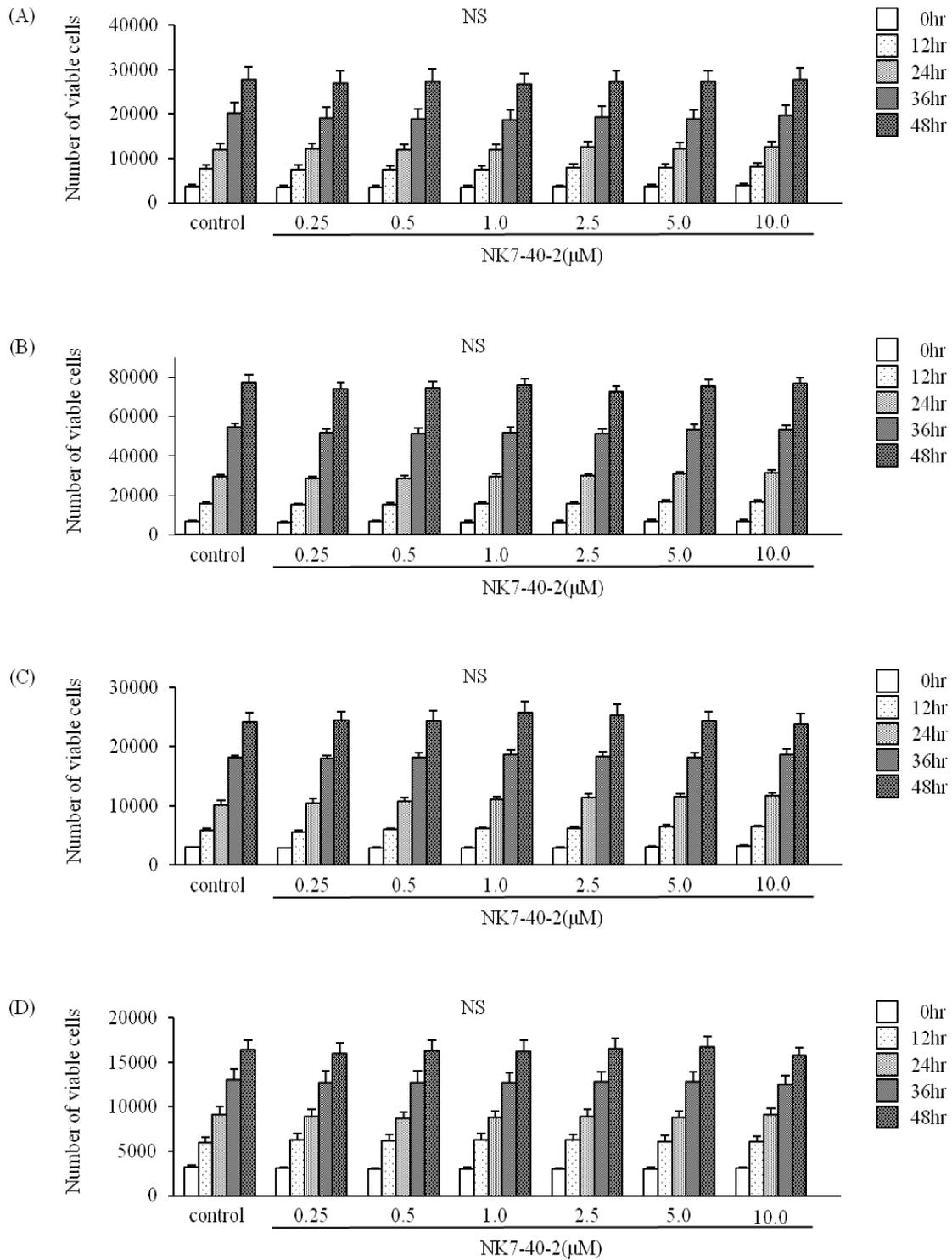


Fig. 5 Effects of NK7-40-2 on the growth in melanoma and colon cancer cell lines.

(A) B16/BL6 (B) Colon-26 (C) DLD-1 (D) G361 Data are expressed as the mean \pm S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, compared with control group incubated for each time.

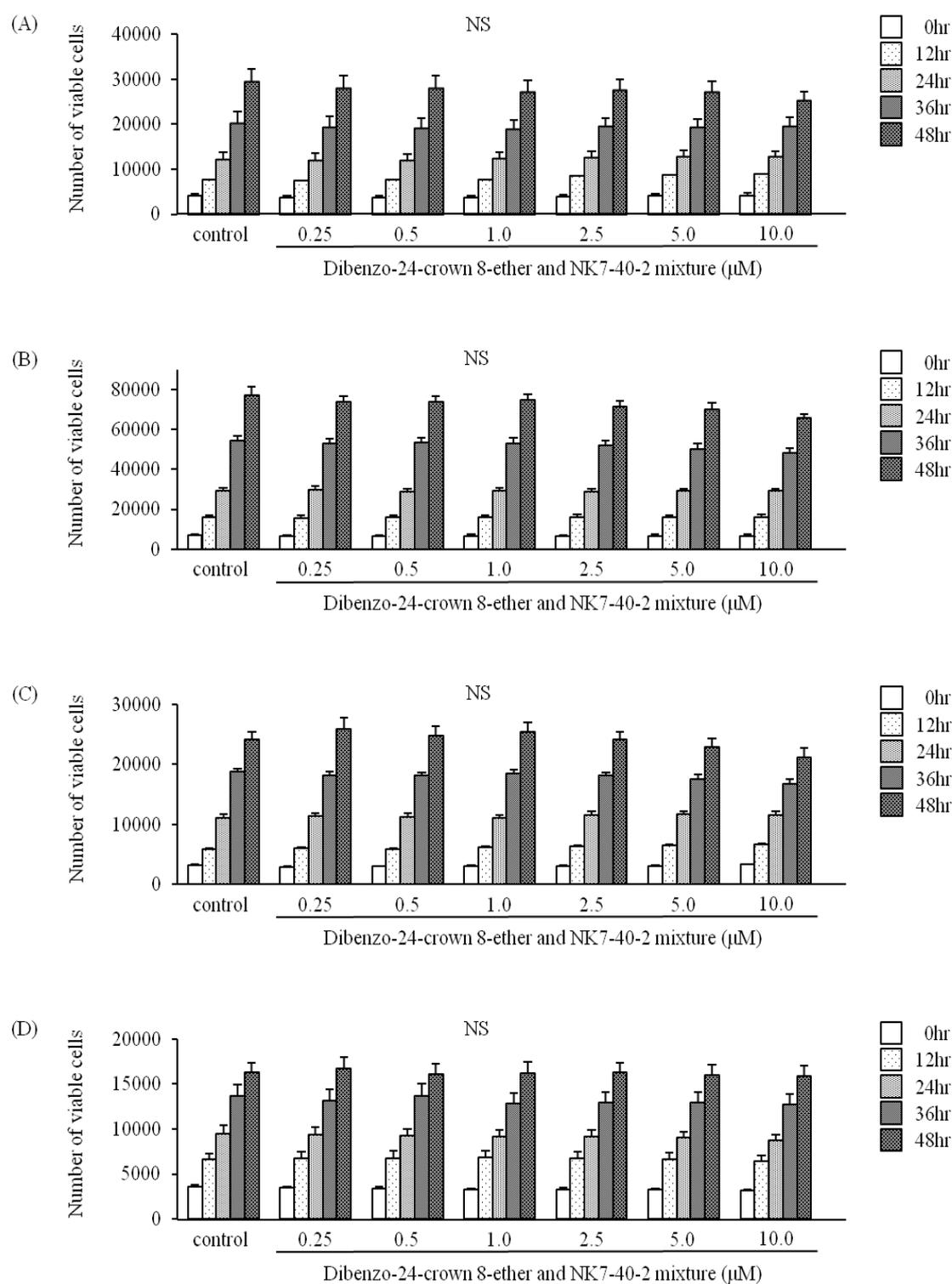


Fig. 6 Effects of dibenzo-24-crown 8-ether and NK7-40-2 mixture on the growth in melanoma and colon cancer cell lines. (A) B16/BL6 (B) Colon-26 (C) DLD-1 (D) G361 Data are expressed as the mean \pm S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, compared with control group incubated for each time.

第4節 メラノーマ治療薬、大腸がん治療薬との比較検討

既存のメラノーマ治療薬である DTIC、および大腸がん治療薬である 5-FU と TRO-A0001 の増殖抑制効果について比較検討を行った。

1. 実験材料

- Dacarbazine (SIGMA)
- 5-Fluorouracil (Wako)

上記以外の実験材料は、第1章 第1節と同じものを使用した。

2. 実験方法

第1章 第1節と同じ方法を利用した。

TRO-A0001、DTIC、および5-FUは、それぞれ1.0 μ M, 10.0 μ Mになるように添加した。

3. 統計処理

独立した2群間の比較を行うため Student's t-test を使用した。危険率が5%未満である場合を統計学的に有意差ありと設定した。

4. 実験結果

TRO-A0001、DTIC、および5-FUを暴露した後、24時間後の生細胞数を測定した。DMSO (0.1%)を暴露した細胞を control 群とし、DTIC、5-FU 暴露群のそれぞれと、TRO-A0001 暴露群との生細胞数と比較した。

Fig. 7(A), (B) に示すように、DTIC 濃度 1.0 μ M, 10.0 μ M での生細胞数は、メラノーマ細胞株 B16/BL6 および G361 のどちらの細胞においても、control 群の90%程度であった。一方、TRO-A0001 は、同濃度での細胞生存率を DTIC より有意に減少させた。

Fig. 8(A), (B) に示すように、5-FU 濃度 1.0 μ M, 10.0 μ M での生細胞数は、大腸がん細胞株 Colon-26 および DLD-1 のどちらの細胞においても、control 群より減少した。一方、TRO-A0001 は、同濃度での細胞生存率を 5-FU より有意に減少させた。

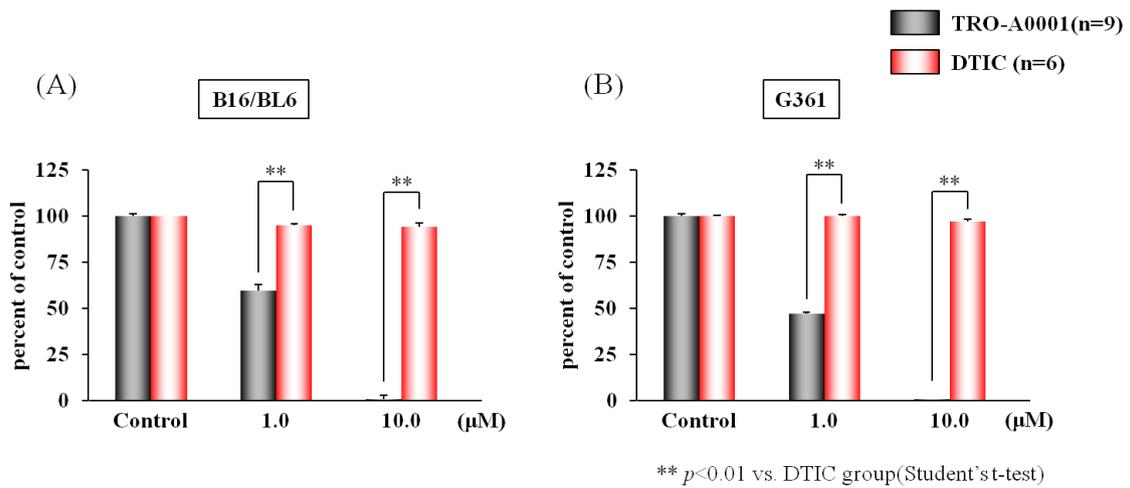


Fig. 7 Antiproliferative effect in melanoma cell lines after treatment with TRO-A0001 or DTIC. Melanoma cell lines, B16/BL6 (A), G361 (B) were treated with the indicated concentration for 24hr with TRO-A0001 or DTIC. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$, between the TRO-A0001 treated cells and the DTIC treated cells.

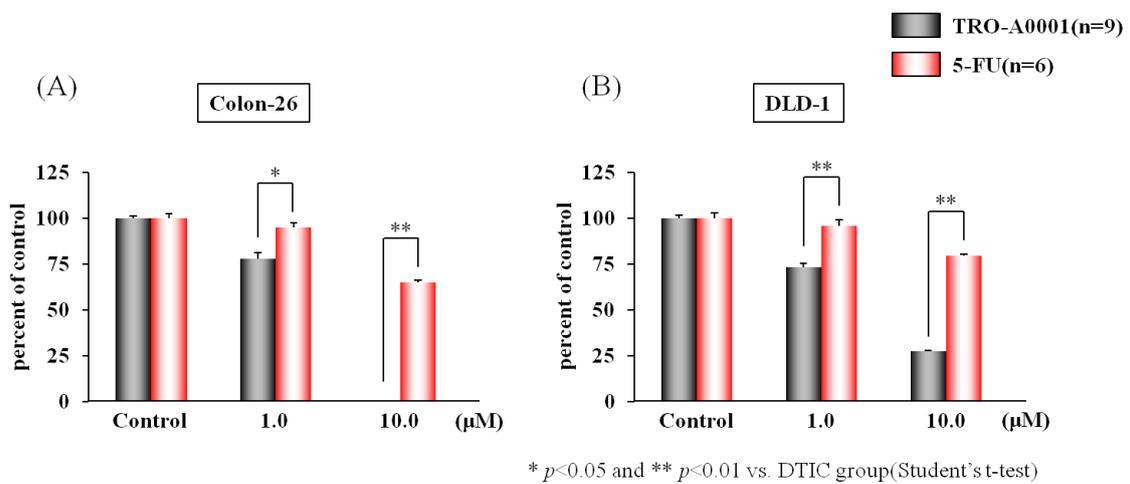


Fig. 8 Antiproliferative effect in colon cancer cell lines after treatment with TRO-A0001 or 5-FU. Colon cancer cell lines, Colon-26 (A), DLD-1 (B) were treated with the indicated concentration for 24hr with TRO-A0001 or 5-FU. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, between the TRO-A0001 treated cells and the 5-FU treated cells.

考察

TRO-A0001 は、マウス由来のメラノーマ、大腸がん細胞に細胞死を引き起こすことが明らかとなり、抗がん剤としての使用を目的にヒト由来の腫瘍細胞についても検討を行った結果、マウス由来の細胞と同様に細胞死を引き起こすことが明らかとなった。

また、TRO-A0001 の引き起こす細胞死は、その構成分子が引き起こしていることも考えられるため、dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 それぞれの作用についても、検討する必要があった。

本章では TRO-A0001、dibenzo-24-crown 8-ether および NK7-40-2 の全ての物質で、マウスとヒト両方に由来するメラノーマ、大腸がん細胞の細胞増殖に及ぼす効果を検討した。

第1節では、TRO-A0001 を腫瘍細胞に作用させるにあたり、溶剤として利用したジメチルスルホキシドが培養細胞の増殖に与える影響を検討した。DMSO は、細胞の分化に影響を及ぼすことが報告されており、高濃度では細胞毒性を有すること認められている(27-29)。

培養液に添加する DMSO 濃度を 0.05% から 1.0% の範囲で設定し、各腫瘍細胞に暴露したところ、48 時間までは未処理細胞と同等の生細胞数を示した。DMSO 濃度が 1.0% 含まれる培養液を暴露した細胞は、未処理細胞と比較すると統計上の有意差は認められていないが、36 時間以上で生細胞数の減少傾向が認められた。

この結果を踏まえ、TRO-A0001 の溶解性と併せて考慮すると、DMSO 濃度が 0.05% から 0.2% の範囲であれば細胞増殖に影響がないと判断し、これを以降の実験の control 群とすることで、DMSO が実験結果に及ぼす影響を省いた。

第2節では、TRO-A0001 の細胞増殖に及ぼす効果を検討した。TRO-A0001 暴露後 48 時間までの生細胞数は、マウス由来の腫瘍細胞である B16/BL6、Colon-26 については TRO-A0001 濃度 1.0 μ M より高濃度で、またヒト由来の腫瘍細胞である DLD-1、G361 においては TRO-A0001 濃度 0.5 μ M より高濃度で有意な減少が認められたことから、TRO-A0001 が細胞死や増殖抑制を引き起こすことが明らかとなった。

この特徴としては、TRO-A0001 暴露時間の経過に伴い増殖率が低下することから用量依存性が示唆される結果となった。

Table 1.には、各腫瘍細胞での TRO-A0001 暴露時間毎の IC₅₀ 値を示した。細胞種間での特性としては、ヒト由来の悪性黒色腫である G361 細胞で一番著効を示しており、ヒト由来の結腸癌である DLD-1 の効果が低いことが明らかとなった。また、全ての細胞で、TRO-A0001 暴露時間の経過に伴い、IC₅₀ 値が減少していることがわかった。

Time(hr)	12	24	36	48
B16/BL6	5.19	2.90	0.93	0.82
Colon-26	2.41	1.75	1.36	1.28
DLD-1		4.24	2.48	1.60
G361	1.65	0.81	0.47	0.41

Table 1. IC₅₀ (μM) values after incubation with TRO-A0001 for 12 - 48 h.

第3節では、TRO-A0001の構造分子である dibenzo-24-crown 8-ether、およびNK7-40-2のそれぞれの細胞増殖への影響を検討した。添加する各構造分子のモル濃度や、細胞に暴露した後のインキュベーション時間は、TRO-A0001と同一条件にした。

その結果、dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2では細胞増殖に変化は認められず、暴露後48時間までcontrol群と同様の生細胞数を示した。このことから、TRO-A0001の構造分子単独での細胞死や増殖抑制は引き起こされず、超分子構造をとる[2]rotaxane特有の作用発現であることが示唆された。

また、dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2が共存しているだけで、細胞死を引き起こす可能性もあるため、構成分子を同時に暴露した場合の腫瘍細胞の増殖についても検討した。Dibenzo-24-crown 8-etherとNK7-40-2の等モル量混合物を暴露した場合の細胞増殖を検討したところ、48時間までDMSO 0.1%を暴露したcontrol群と同様の生細胞数で増殖抑制は認められなかったことから、細胞死や増殖抑制を引き起こしたTRO-A0001との結果と異なるため、TRO-A0001はdibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2が超分子構造を形成することで、作用を引き起こしていると考えられた。

第4節では、既存のメラノーマ治療薬であるDTIC、および大腸がん治療薬である5-FUとTRO-A0001の増殖抑制効果について比較検討を行った。緒言でも述べたように、DTICはメラノーマの術後補助療法や進行期化学療法に使用されており、5-FUは結腸癌の術後化学療法や、切除不能な進行再発大腸癌に使用されている。いずれの治療法においても、DTICおよび5-FUは、併用化学療法のベースとなっており、標準治療薬として位置付けられてきた。

第2節の結果で、TRO-A0001はメラノーマや大腸がん細胞株に細胞死や増殖抑制を引き起こすことが明らかとなったことから、DTICおよび5-FU単剤と効果の比較を行ったところ、TRO-A0001が各細胞株の細胞生存率を有意に減少させた。この中で、ヒト由来のメラノーマG361細胞と結腸腺がんDLD-1細胞でも、既存の治療薬より著効を示したことより、TRO-A0001はメラノーマおよび大腸がん治療に有用である可能性が示唆された。

第2章 TRO-A0001 を暴露した腫瘍細胞の形態学的変化についての検討

近年までの研究報告では、細胞死の分類や特徴が多数報告されており、その実行因子や制御因子の解明が進められている一方で、未だ解明されていない現象がある。

細胞死の主要な分類として i) アポトーシス、ii) オートファジーを伴う細胞死、iii) ネクロシスが報告されており、それぞれの異なる形態学的特徴が細胞死分類上での定義となっている(30–34)。

アポトーシスは、形態学的に細胞核でのクロマチン凝縮や断片化、細胞骨格収縮が特徴であり生化学的にはカスパーゼの関与が報告されている(35)。カスパーゼタンパク質が活性化される経路にも、ミトコンドリアを介するもの、介さないものに大別され細胞死の主要な研究となっている(36, 37)。

オートファジーを伴う細胞死は、カスパーゼ伝達経路に依存しない細胞死として報告されており、ユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ細胞内での分解処理機構が関与している。オートファジーの形態学的特徴は、細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれ、不要なタンパク質やオルガネラを取り囲むオートファゴソームの形成が代表的である(32)。その後、リソソームと融合することで、タンパク分解酵素によりアミノ酸やペプチドに分解され、それを利用して必要なタンパク質を合成することで生命維持に関与している(38)。ファゴソーム形成には Atg タンパク質群の関与が報告されており、近年ではその形成に関わる実行因子についても解明されてきている(39)。

ネクロシスは、外部からの物理化学的なストレスなどが起因となる細胞死として認識されているが、現在ではシグナル伝達を介したネクロシス様の細胞死も報告されている(40, 41)。従来認識されているネクロシスの形態学的特徴としては、細胞内小器官の膨張や細胞膜構造の破綻などが挙げられ、アポトーシスと明確に区別された特徴が示されている。Table 2.にはアポトーシスとネクロシスの代表的な形態変化を示した。

本章では、TRO-A0001 が引き起こす細胞死の形態学的特徴を検討することを目的とし、上述の細胞死機構に属する変化の有無を調査した。

形態	Apoptosis	Necrosis
核の断片化	○	×
クロマチン凝集	○	×
DNA fragment形成	○	×
PSの表出	○	×
細胞膜の破綻	×	○
細胞膜blebbing	○	×
細胞質の凝集	○	×
細胞質の膨潤	×	○
Caspaseの活性化	○	×
ATPの減少	×	○

* PS; Phosphatidyl Serine

Table 2. Characteristic change of apoptosis and necrosis.

第1節 細胞核、細胞骨格染色

本節では、TRO-A0001 を暴露した細胞の核及び細胞骨格を蛍光染色し、TRO-A0001 未処理の細胞構造との相違を検討した。

1. 実験材料

【細胞】

実験に用いた細胞はマウス由来腫瘍細胞 B16/BL6、Colon-26 ならびにヒト由来腫瘍細胞 DLD-1、G361 である。

【使用試薬】

- Hoechst33342, trihydrochloride, trihydrate (invitrogen)
Hoechst33342, trihydrochloride, trihydrate を PBS で 2 μ g/mL に希釈した。
- Alexa Fluor[®] 488 phalloidin (invitrogen)
Alexa Fluor[®] 488 phalloidin と PBS を 1:40 で希釈した。
- DULBECCO'S PBS (DS ファーマバイオメディカル)
1 タブレットにつき 100mL の超純水に溶解させた後、高圧蒸気滅菌した。
- 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (Wako)
- Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether (Wako)
Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether を PBS で 0.1% に希釈した。

【使用機器】

- Keyence BZ-8000 (Keyence)

2. 実験方法

細胞核は Hoechst33342 を、細胞骨格はファロイジンを使用して染色を行った。Hoechst33342 は生細胞に容易に取り込まれ、二本鎖 DNA の AT 配列の副溝に結合する蛍光色素であり、アポトーシス細胞の核濃縮の検出や染色体分析、ブロモデオキシウリジン (BrdU) と併せて細胞周期の解析に用いられる。UV 励起可能な青色蛍光色素で、凝縮された核では特に強い蛍光を発する。

ファロイジンは、タマゴテングダケから抽出された毒素ファミリー(ファロトキシン)の一つである二重環状ペプチドで、高選択的に F-アクチンと結合する。蛍光標識されたファロイジンで、細胞内における F-アクチン分布を蛍光イメージングすることができ、生細胞や固定細胞の細胞骨格機能や構造を観察することができる。

【実験操作手順】

- ① 6 ウェルカルチャープレートに 1.0×10^5 個の細胞を播種した。細胞が接着するまで、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下のインキュベーター中で前培養を行った。
- ② TRO-A0001(ウェルの最終濃度は $2.5 \mu\text{M}$ または $5.0 \mu\text{M}$)、カンプトテシン(ウェルの最終濃度は $5.0 \mu\text{M}$ または $10.0 \mu\text{M}$)を溶解した RPMI 培養液を添加した。Control 群には、DMSO(0.1%)を添加した。
- ③ 24 時間、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下のインキュベーター中で培養した。
- ④ 培養液を除去し、PBS(1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑤ PBS を除去し、再び PBS(1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑥ 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (1mL)を添加し、室温で 10 分間反応させた。
- ⑦ 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution を除去し、PBS(1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑧ PBS を除去し、再び PBS(1mL)で穏やかに洗浄した。

- ⑨ 0.1% Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether 溶液を添加し、室温で 5 分間反応させた。
- ⑩ 0.1% Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether 溶液を除去し、PBS(1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑪ PBS を除去し、再び PBS (1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑫ Alexa Fluor[®] 488 phalloidin 溶液を添加し、遮光、室温条件下で 20 分間反応させた。
- ⑬ Alexa Fluor[®] 488 phalloidin 溶液を除去し、PBS(1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑭ PBS を除去し、再び PBS (1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑮ Hoechst 33342 溶液(2 μ g/mL)を添加し、遮光、室温条件下で 15 分間反応させた。
- ⑯ Hoechst 33342 溶液を除去し、PBS (1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑰ PBS を除去し、再び PBS (1mL)で穏やかに洗浄した。
- ⑱ Keyence BZ-8000 で撮影を行った。

3. 実験結果

TRO-A0001(2.5 μ M, 5.0 μ M)を暴露した細胞と、DMSO(0.1%)を暴露した細胞、およびカンプトテシン(5.0 μ M, 10.0 μ M)を暴露した細胞とを比較した。F-アクチンは、Alexa Fluor[®] 488 で蛍光標識したファロイジンを使用して、また細胞核は Hoechst33342 試薬を使用して蛍光顕微鏡で撮影した。

Fig. 9 – 12; (D), (G) に示すように、DMSO を暴露した B16/BL6、Colon-26、DLD-1、および G361 細胞の F-アクチン繊維は、細胞質の広範囲に渡って分布しており、細胞核は網目状の正常な DNA 染色像が認められた。

Fig. 9 – 12; (H) に示すように、TRO-A0001 を添加した B16/BL6、DLD-1、および G361 細胞は、DMSO やカンプトテシンを添加した細胞と比べて、細胞骨格の外環が細長く縮小しており、Colon-26 細胞では円形状に縮小している細胞が認められ、それに伴う細胞間接着の減少や細胞間隙が広く観察された。

Hoechst33342 染色では Fig. 9 – 12; (E) に示すように、TRO-A0001 を添加した B16/BL6、Colon-26、DLD-1 細胞に濃染された核凝縮様の状態が見られる細胞種があるものの、小球状

の断片化核小体集合像は観察されなかった。

また、Fig. 9-12; (B)に示すように、非染色像においてもこれらの結果を示唆する細胞質の凝縮や空泡化、並びに球状化した現象が B16/BL6、Colon-26、DLD-1、および G361 細胞に認められた。

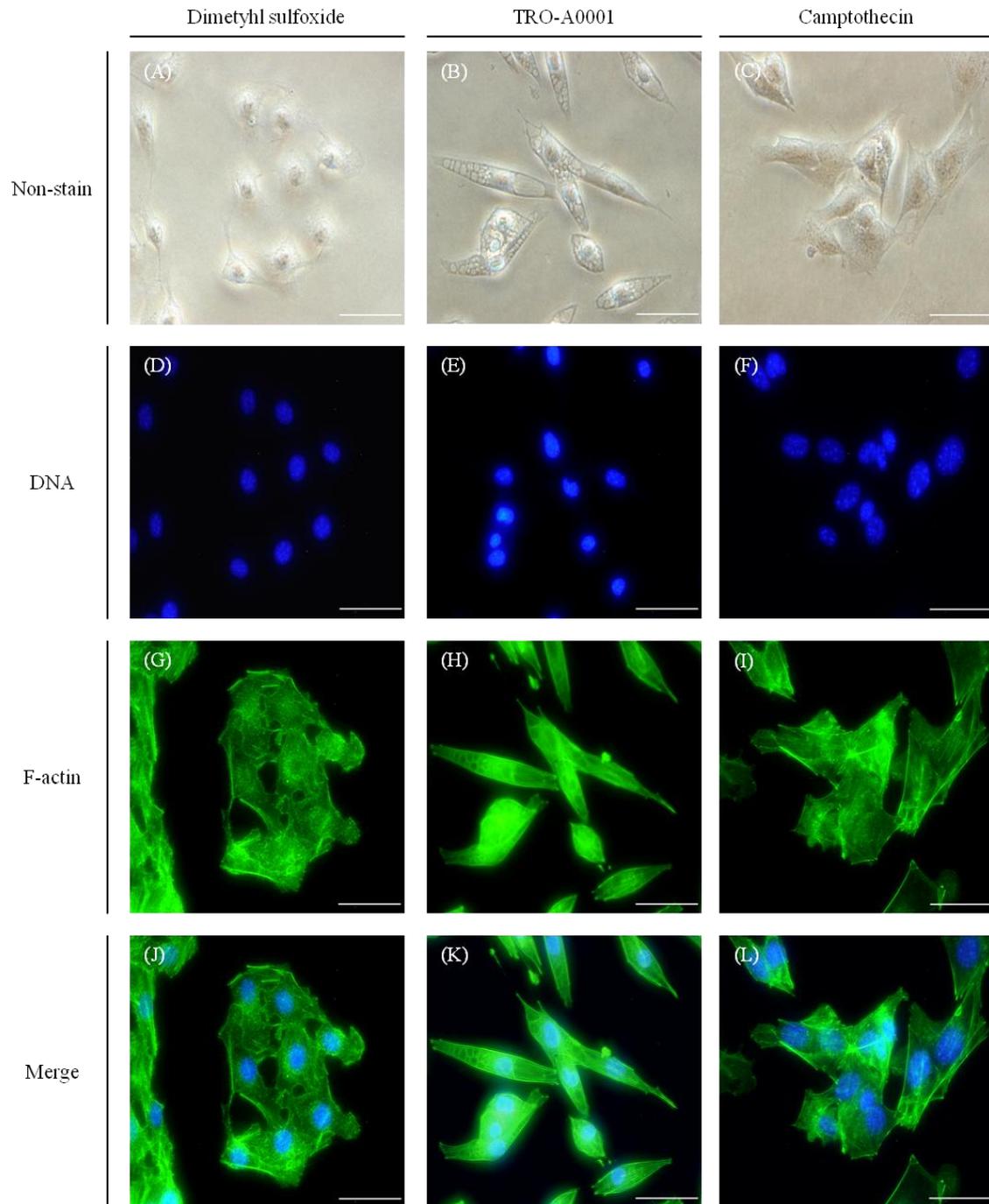


Fig. 9 Effects of TRO-A0001 on the cell nucleus and cytoskeleton in B16/BL6 cells.

B16/BL6 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G, J), 5.0 μ M of TRO-A0001 (B, E, H, K) and 10.0 μ M of camptothecin(C, F, I, L) in RPMI. After 24hr of culture, cells were fixed and immunostained with Hoechst33342 (blue), and Alexa Fluor® 594-conjugated phalloidin (green).

Scale bar = 50 μ m.

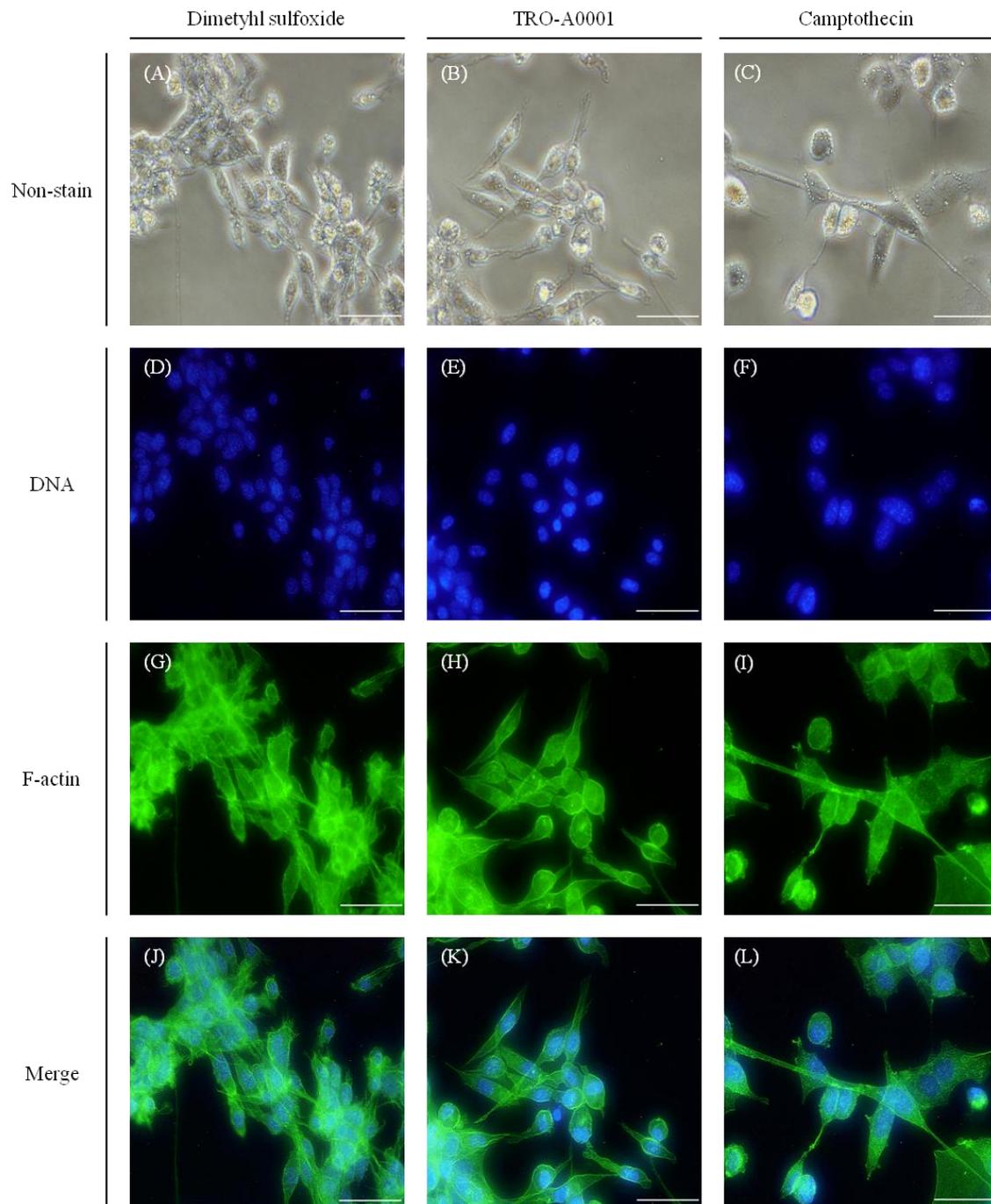


Fig. 10 Effects of TRO-A0001 on the cell nucleus and cytoskeleton in Colon-26 cells.

Colon-26 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G, J), 5.0 μ M of TRO-A0001 (B, E, H, K) and 10.0 μ M of camptothecin(C, F, I, L) in RPMI. After 24hr of culture, cells were fixed and immunostained with Hoechst33342 (blue), and Alexa Fluor® 594-conjugated phalloidin (green).

Scale bar = 50 μ m.

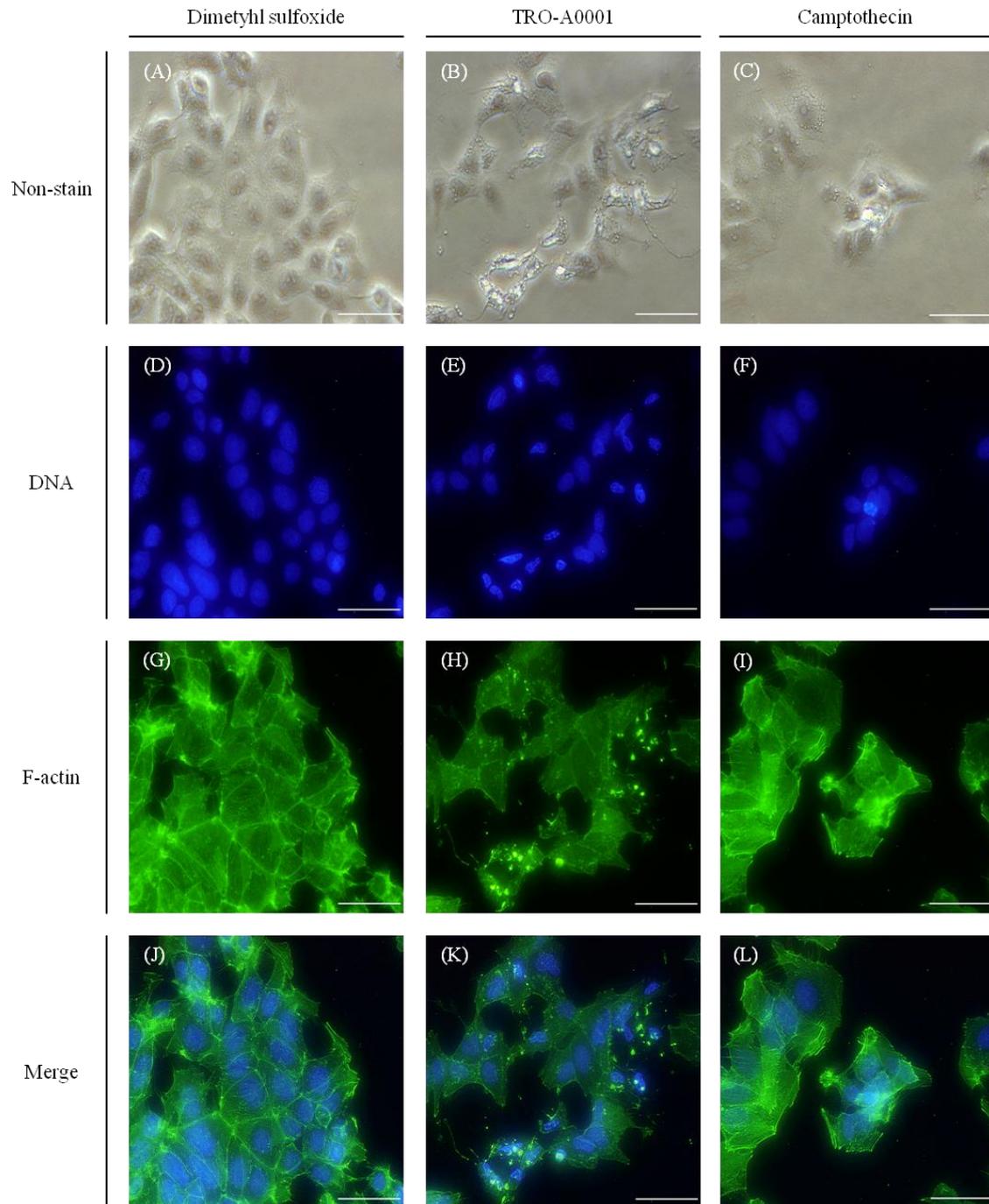


Fig. 11 Effects of TRO-A0001 on the cell nucleus and cytoskeleton in DLD-1 cells.

DLD-1 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G, J), 5.0 μ M of TRO-A0001 (B, E, H, K) and 10.0 μ M of camptothecin(C, F, I, L) in RPMI. After 24hr of culture, cells were fixed and immunostained with Hoechst33342 (blue), and Alexa Fluor® 594-conjugated phalloidin (green).

Scale bar = 50 μ m.

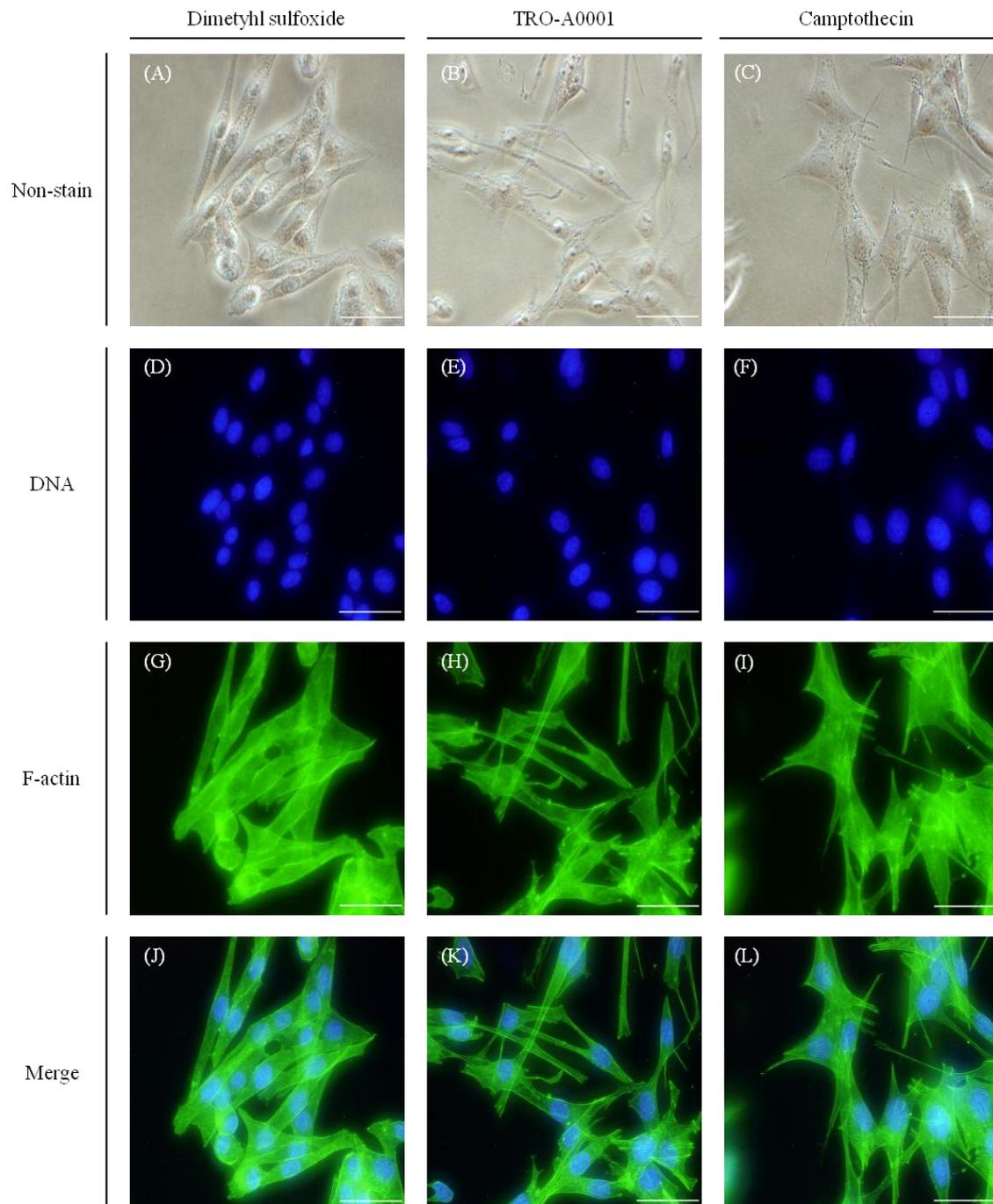


Fig. 12 Effects of TRO-A0001 on the cell nucleus and cytoskeleton in G361 cells.

G361 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G, J), 2.5 μM of TRO-A0001 (B, E, H, K) and 5.0 μM of camptothecin (C, F, I, L) in RPMI. After 24hr of culture, cells were fixed and immunostained with Hoechst33342 (blue), and Alexa Fluor® 594-conjugated phalloidin (green).

Scale bar = 50 μm .

第2節 Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling (TUNEL)染色

本節では、TRO-A0001 を暴露することで引き起こされる細胞死がアポトーシスであるか否かを検討した。

1. 実験材料

【細胞】

第2章 第1節と同じものを利用した。

【使用試薬】

- Click-iT[®] TUNEL Alexa Fluor[®] 594 Imaging Assay, for microscopy & HCS (Life technologies)
 1. TdT reaction buffer (Component A)
 2. EdUTP nucleotide mixture (Component B)
 3. TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) recombinant (Component C)
 4. Click-iT[®] reaction buffer (Component D)
 5. Click-iT[®] reaction buffer additive (Component E)
 6. Hoechst 33342 (Component F)
Hoechst 33342 を PBS で 5000 倍に希釈した。
 7. DNase I (deoxyribonuclease I) (Component G)
 8. DNase I buffer (Component H)
- DULBECCO'S PBS (DS ファーマバイオメディカル)
- 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (Wako)
- Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether (Wako)
Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether を PBS で 0.25% に希釈した。
- Albumin, from Bovine Serum (BSA), Cohn Fraction V, pH7.0 (Wako)
Albumin, from Bovine Serum を PBS で 3% に溶解した。

【使用機器】

- Keyence BZ-8000 (Keyence)

2. 実験方法

アポトーシスは多くの細胞種において、内在するエンドヌクレアーゼによる DNA 断片化を特徴とする細胞死である。本法は、組み換え型の Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)

を使用することで、DNA の 3'-OH 末端に 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-5-triphosphate, sodium salt (EdUTP)を取り込ませた後、蛍光標識アジドとアルキン基のクリック反応を利用し、切断された DNA を蛍光発色する原理を利用している。この染色法で蛍光標識された細胞はアポトーシス陽性細胞として検出されることから、細胞死の判別に広く用いられている手法である。

【実験操作手順】

- ① 96 ウェルカルチャープレートに 1.0×10^4 個の細胞を接種した。細胞が接着するまで、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下のインキュベーター中で前培養を行った。
- ② TRO-A0001(ウェルの最終濃度は $5.0\mu\text{M}$ または $10.0\mu\text{M}$)を溶解した RPMI 培養液を添加した。Control 群には、DMSO(0.1%)を添加した。
- ③ 培養液を除去し、PBS ($100\mu\text{L}$)で穏やかに洗浄した。
- ④ 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution ($100\mu\text{L}$)を添加し、室温で 15 分間反応させた。
- ⑤ 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution を除去し、0.25% Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether を添加し、室温で 20 分間反応させた。
- ⑥ Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether を除去し、脱イオン水($100\mu\text{L}$)で洗浄した。
- ⑦ 脱イオン水を除去し、再び脱イオン水($100\mu\text{L}$)で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した。
- ⑧ 1 検体あたり、脱イオン水($89\mu\text{L}$)、DNase I buffer ($10\mu\text{L}$)、DNase I ($1\mu\text{L}$)を穏やかに混合し、DNase I 溶液を作製した。
- ⑨ ⑧を添加し、室温条件下で 30 分間反応させた。
- ⑩ DNase I 溶液を除去し、脱イオン水($100\mu\text{L}$)で洗浄した。
- ⑪ TdT reaction buffer ($100\mu\text{L}$)を添加し、室温で 10 分間反応させた。
- ⑫ 1 検体あたり、TdT reaction buffer ($47\mu\text{L}$)、EdUTP nucleotide mixture ($1\mu\text{L}$)、TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) recombinant ($2\mu\text{L}$)を混合し、TdT reaction cocktail を作製した。

- ⑬ ⑪の TdT reaction buffer を除去した後⑫を添加し、37°C で 1 時間反応させた。
- ⑭ 3% Albumin, from Bovine Serum (100 μ L)を添加し、2 分間反応させた。この操作を 2 回繰り返した。
- ⑮ 1 検体あたり、Click-iT[®] reaction buffer (97.5 μ L)、Click-iT[®] reaction buffer additive (2.5 μ L)を混合した後 15 分間反応させ、Click-iT[®] reaction cocktail を作製した。
- ⑯ ⑮を直ちに添加し、遮光、室温条件下で 30 分間反応させた。
- ⑰ Click-iT[®] reaction cocktail を除去し、3% Albumin, from Bovine Serum (100 μ L)を添加し、5 分間反応させた。
- ⑱ Hoechst 33342 溶液(100 μ L)を添加し、遮光、室温条件下で 15 分間反応させた。
- ⑲ Hoechst 33342 溶液を除去し、PBS (100 μ L)で 2 回洗浄した。
- ⑳ Keyence BZ-8000 で撮影を行った。

3. 実験結果

TRO-A0001(10.0 μ M)と DMSO(0.1%)を、それぞれ 12 時間暴露した細胞を比較した。また、TUNEL 陽性コントロールには、DNase I 試薬を反応させた DMSO (0.1%)を暴露した細胞を用意した。細胞核は Hoechst33342 試薬により青色に呈色し、さらに TUNEL 陽性細胞の DNA は Alexa Fluor[®] 594 試薬により赤色に呈色した。

Fig. 13 – 16; (C), (F), (I) に示すように、DNase I 試薬を反応させた TUNEL 陽性コントロール細胞は、Hoechst33342 試薬と Alexa Fluor[®] 594 試薬の両方で染色されたため、これを TUNEL 陽性と判断した。

Fig. 13 – 16; (A), (D), (G) に示すように、DMSO (0.1%) を暴露した B16/BL6、Colon-26、DLD-1、および G361 細胞は、Hoechst33342 試薬で染色されるが、TUNEL 陽性細胞はほとんど検出されなかった。

一方で Fig. 13 – 16; (B), (E), (H)に示すように、TRO-A0001(10.0 μ M)を暴露した B16/BL6、Colon-26、DLD-1、および G361 細胞は、TUNEL 陽性細胞が明らかに増加しており、ほとんどの細胞で、Hoechst33342 試薬と TUNEL 染色の両方呈色したことから、TRO-A0001 暴露により DNA 断片化された細胞であることが示唆された。

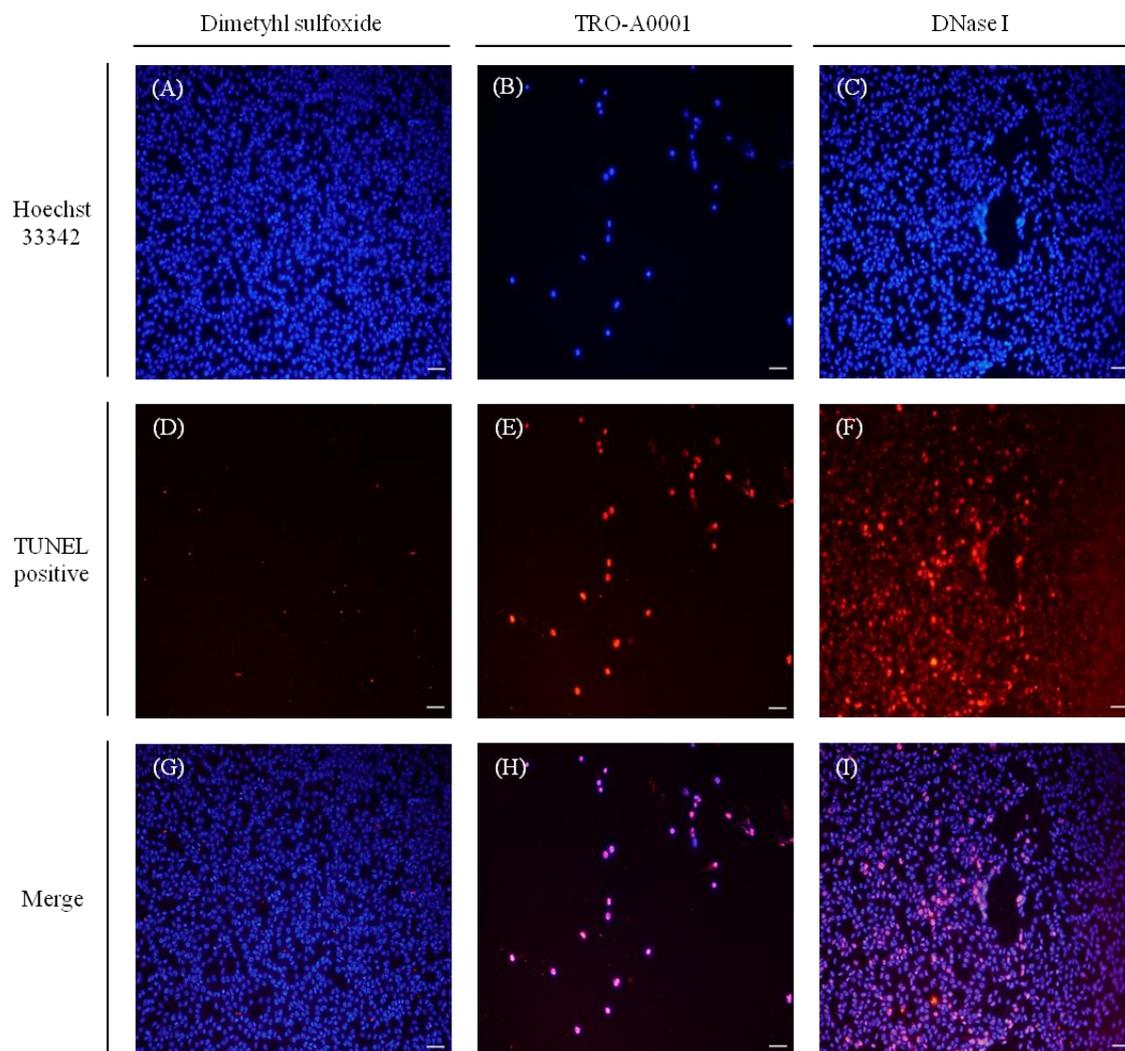


Fig. 13 Effects of TRO-A0001 on B16/BL6 cell apoptosis as assessed by TUNEL assay and fluorescent microscopy. B16/BL6 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G), 10.0 μM of TRO-A0001 (B, E, H) in RPMI for 12hr. To provide a positive TUNEL group, we added DNase I to another control group (C, F, I). TUNEL-positive cells stained red and nuclei stained blue with Hoechst 33342. Scale bar = 50 μm .

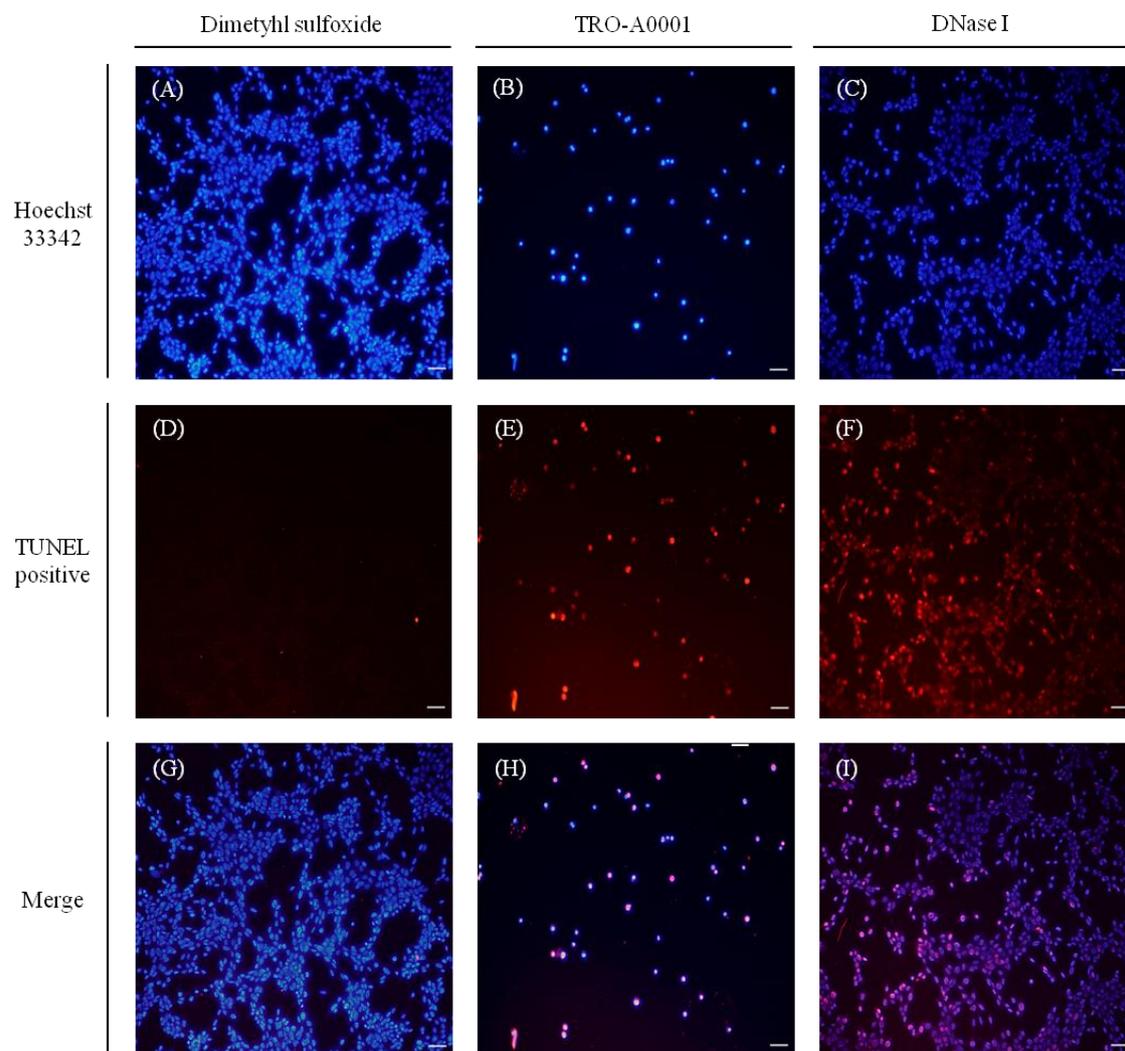


Fig. 14 Effects of TRO-A0001 on Colon-26 cell apoptosis as assessed by TUNEL assay and fluorescent microscopy. Colon-26 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G), 10.0 μ M of TRO-A0001 (B, E, H) in RPMI for 12hr. To provide a positive TUNEL group, we added DNase I to another control group (C, F, I). TUNEL-positive cells stained red and nuclei stained blue with Hoechst 33342. Scale bar = 50 μ m.

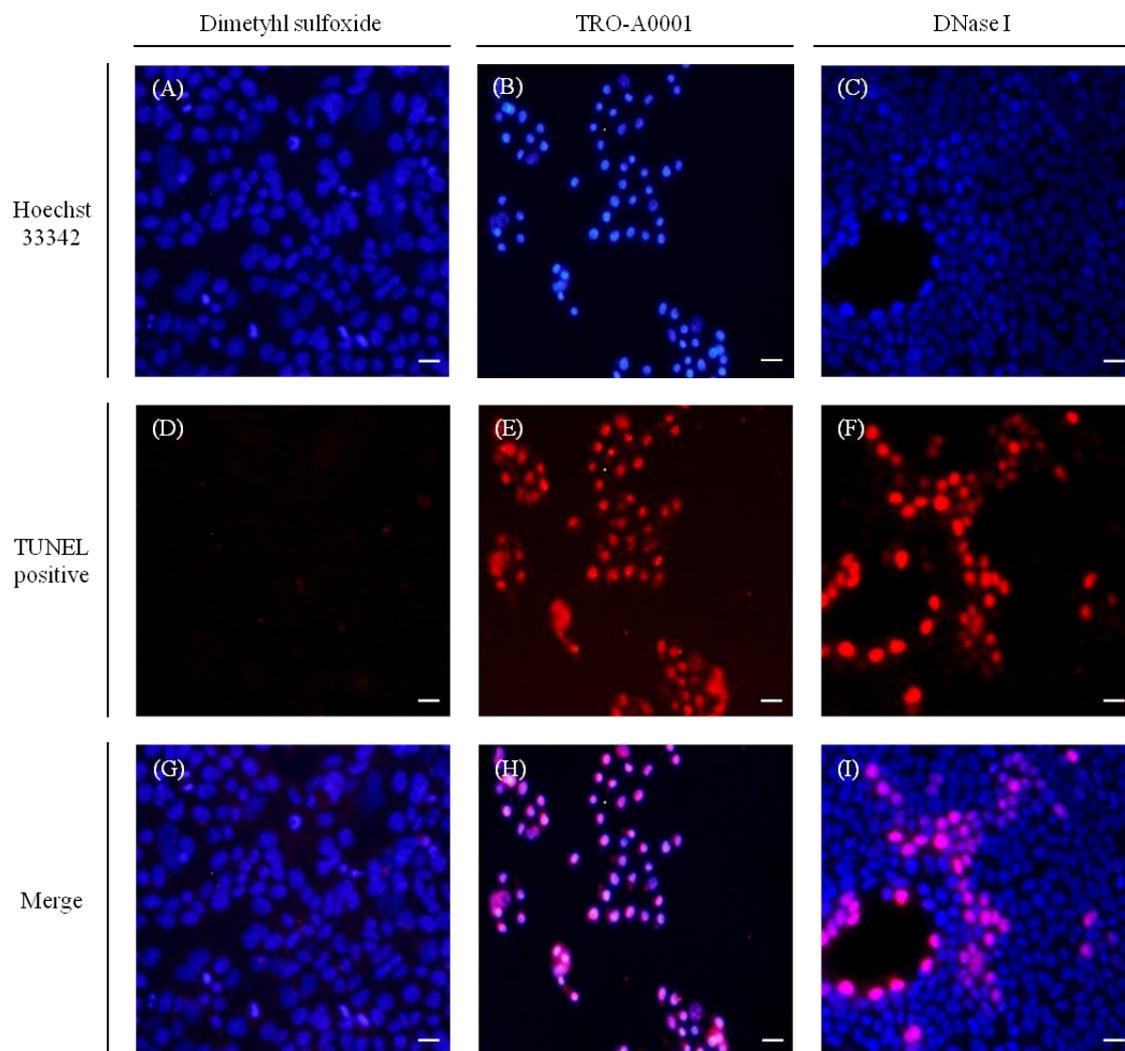


Fig. 15 Effects of TRO-A0001 on DLD-1 cell apoptosis as assessed by TUNEL assay and fluorescent microscopy. DLD-1 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G), 10.0 μ M of TRO-A0001 (B, E, H) in RPMI for 12hr. To provide a positive TUNEL group, we added DNase I to another control group (C, F, I). TUNEL-positive cells stained red and nuclei stained blue with Hoechst 33342. Scale bar = 50 μ m.

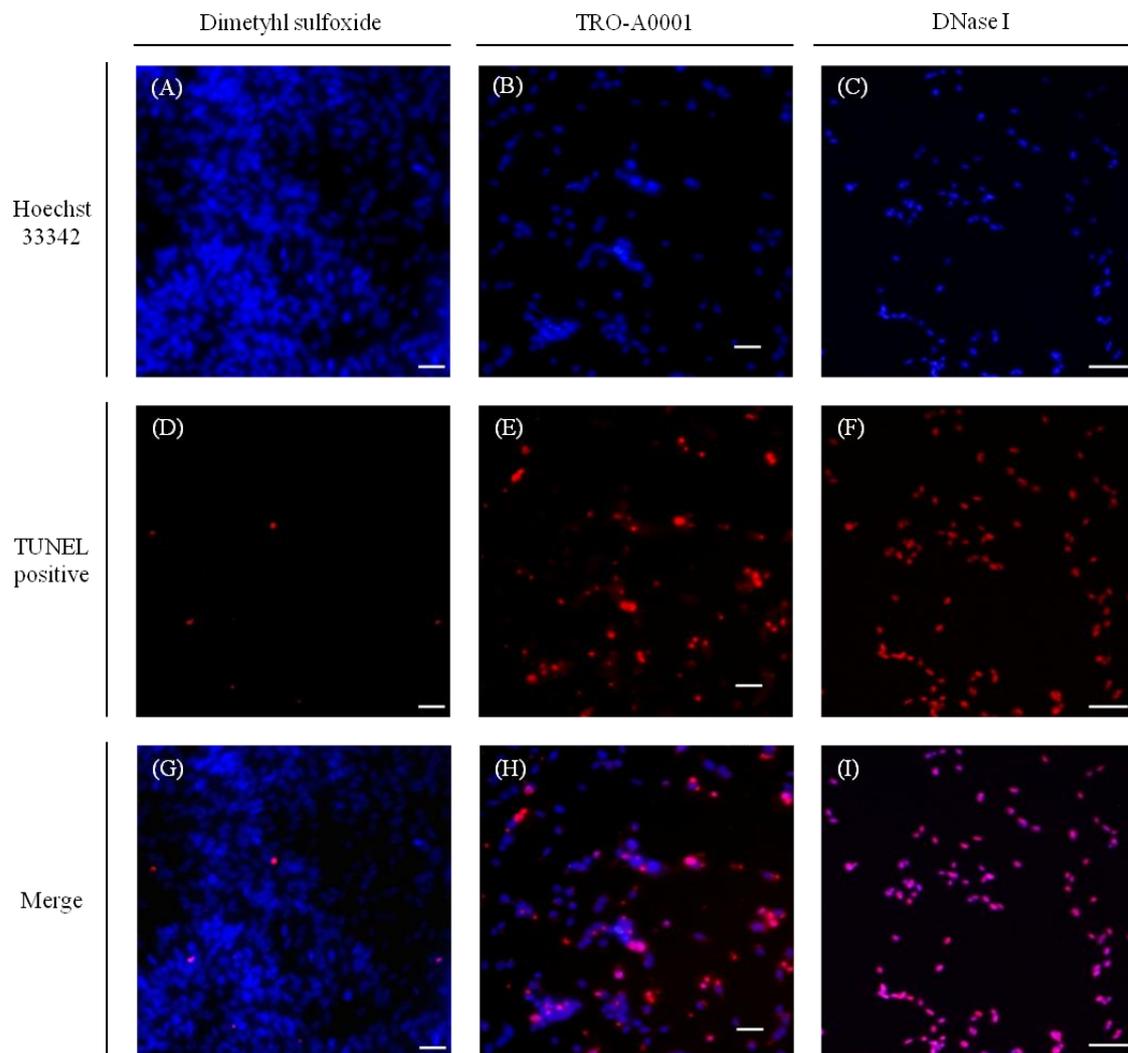


Fig. 16 Effects of TRO-A0001 on G361 cell apoptosis as assessed by TUNEL assay and fluorescent microscopy. G361 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G), 10.0 μ M of TRO-A0001 (B, E, H) in RPMI for 12hr. To provide a positive TUNEL group, we added DNase I to another control group (C, F, I). TUNEL-positive cells stained red and nuclei stained blue with Hoechst 33342. Scale bar = 50 μ m.

考察

本章では、TRO-A0001 により誘導される細胞死の特徴を形態学的に検討した。アポトーシスは、形態学的に細胞核でのクロマチン凝縮や断片化、細胞骨格収縮が特徴であるため、TRO-A0001 暴露後の細胞に、これらの特徴が示されれば、TRO-A0001 が引き起こす細胞死がアポトーシスであることが推測される。

第1節では、ファロイジンを使用し細胞骨格の形成を担う F-アクチン繊維を蛍光染色し、細胞質繊維状態および細胞骨格の変化を観察した。

DMSO で処理した細胞と比較すると、TRO-A0001 を処理したいずれの細胞でも共通して、細胞骨格の外環が細長く縮小している状態や円形状に縮小している状態が認められ、正常な細胞接着を維持できておらず、球状に縮小し接着面からの剥離を起こしていることが観察された。

細胞骨格の縮小に伴う細胞質の収縮や空泡化は、アポトーシスに特徴的な形態学的変化の一つであり(33)、TRO-A0001 が引き起こす細胞骨格への特徴がアポトーシス様であることが示唆された。

細胞核は Hoechst33342 試薬を使用して染色を行い、TRO-A0001 で処理した細胞に濃染された核凝縮様の状態が見られる細胞種があるものの、クロマチン凝集体や小球状の断片化された核小体集合像は観察されなかった。

そこで、第2節では断片化 DNA について TUNEL 染色法を利用し、Hoechst33342 試薬とともに二重染色を行った。TUNEL 陽性コントロールで使用した DNase I 試薬を添加した細胞は、Hoechst33342 試薬とともに染色されており、断片化された DNA が検出されていることがわかる。

これと同様の結果が TRO-A0001(10.0 μ M)で処理した細胞で示されており、TRO-A0001 が引き起こす細胞死の特徴に、DNA の断片化が関与していることが示唆された。

以上の結果より、TRO-A0001 が引き起こす細胞死は、細胞内構造の形態学的な知見からアポトーシスである可能性が示唆された。

第3章 TRO-A0001 がアポトーシス関連タンパク質発現に及ぼす変化

アポトーシスは、カスパーゼタンパク質を活性化させ、一連のカスケードを進行させるシグナル伝達の特徴である。

システインプロテアーゼの一群であるカスパーゼは、活性部位にシステイン残基を持ち、基質となるタンパク質のアスパラギン酸残基のカルボキシル基側のペプチド結合を切断する。

細胞内では、活性を持たない前駆体として翻訳され、他のプロテアーゼの作用でプロドメイン、p20 サブユニット、p10 サブユニットの三つに切断される。この p20 サブユニット、p10 サブユニットのそれぞれに活性部位が存在し、ヘテロダイマーを形成することで活性中心がつけられ、さらにヘテロダイマーが二量体を形成することで活性型酵素となる (42) (Fig.17)。

現在、カスパーゼは哺乳類で caspase-1 から caspase-14 まで知られており、種類によって基質特異性の高いタンパク質切断を行う(42-45)。その基質特異性が、機能的な特性を反映しており、サイトカインのプロセッシングや炎症誘導に関連するカスパーゼ、アポトーシス誘導の初期に関連するイニシエーターカスパーゼ、アポトーシスの実行に関連するエフェクターカスパーゼの三つに分類されている(43-45)(Fig. 18)。

その中でも、イニシエーターカスパーゼとエフェクターカスパーゼは、アポトーシスに関連するカスパーゼカスケードと呼ばれる一連のシグナル伝達経路を形成している。アポトーシス開始のシグナルを伝達されることでイニシエーターカスパーゼは活性型となりエフェクターカスパーゼを切断する。活性化されたエフェクターカスパーゼは、細胞死を実行する種々のタンパク質を分解する(46, 47)。

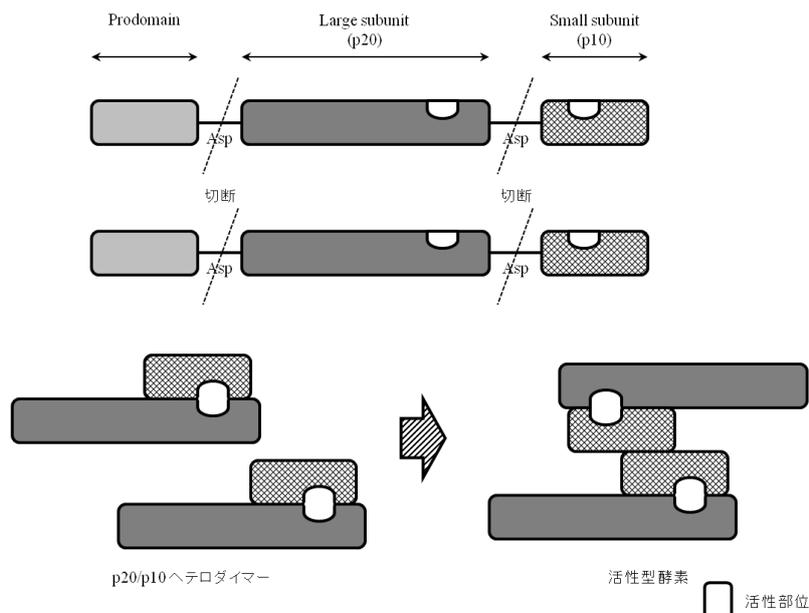


Fig. 17 Activation of caspase.

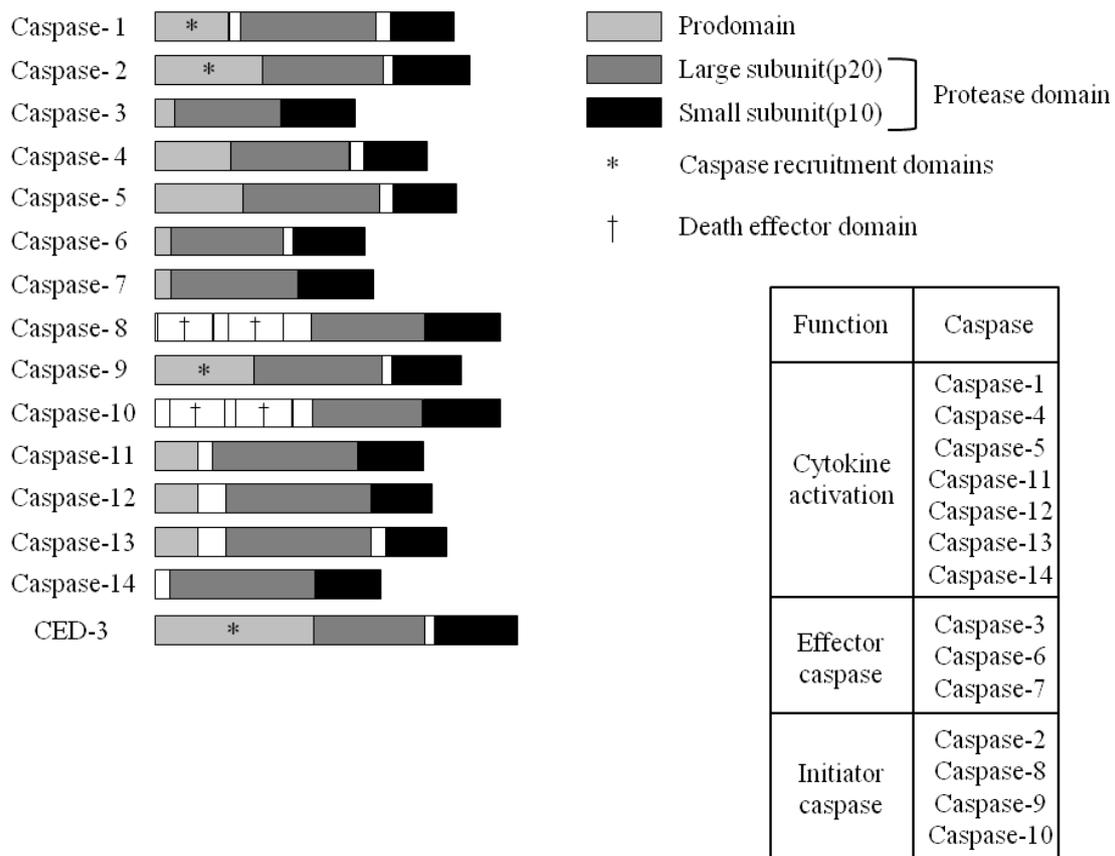


Fig. 18 The structure and function of mammalian caspase family.

細胞死の実行に関与するタンパク質の中で、Lamin A は細胞周期調節、DNA 複製、クロマチン構成に関与し、caspase-6 により切断されることで核内機能の異常化を引き起こし、細胞死に至ることが報告されている(48 – 52)。

細胞膜機能調節に関与する α -Fodrin は、caspase-3 により切断され膜機能の異常化や細胞収縮に関与することが報告されている(53 – 56)。Caspase-3 は、他にも DNA Fragmentation Factor 45(DFF45)/Inhibitor of Caspase-activated DNase(ICAD)を限定分解することで、放出された CAD が核内に侵入し DNA 分解を引き起こすことや(57 – 60)、caspase-7 と共に DNA 修復に関与する poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)を分解することでアポトーシスに関与する重要な役割を果たしている(61, 62)。

TRO-A0001 が引き起こす細胞死が、形態学的にアポトーシス性細胞死であることから、本章では、カスパーゼシグナル伝達の活性化を検討するため、エフェクターカスパーゼである caspase-3, -7 についてタンパク質発現を測定した。

さらに、前章での TUNEL 染色で DNA 断片化を引き起こしていることが示唆されたため、DNA 修復に関与する PARP タンパク質発現について検討した。

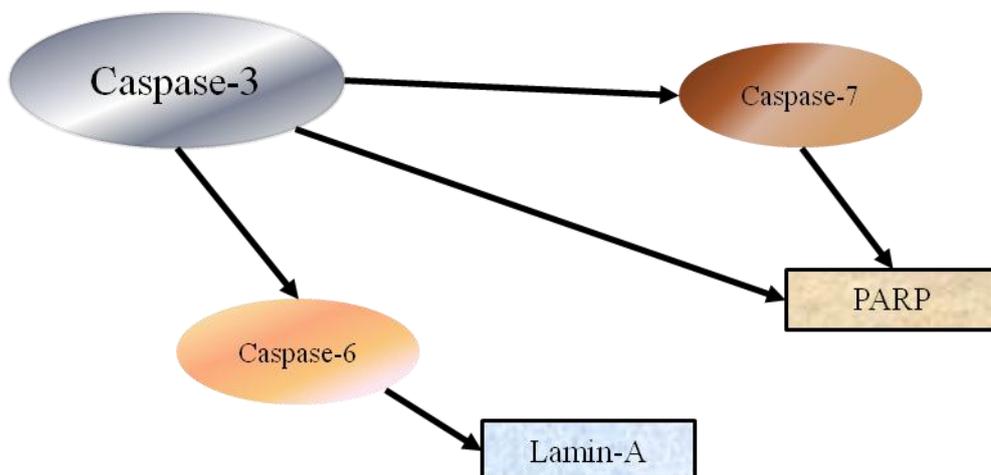


Fig.19 Effector caspase signaling.

第1節 エフェクターカスパーゼ発現の変化

Caspase-3, -6, -7に代表されるエフェクターカスパーゼは、カスパーゼカスケードの中で細胞死を実行するタンパク質の分解に関与している。

中心的な役割を担っている caspase-3 は、ミトコンドリアを介する経路、Fas-7-associated cell surface antigen(Fas)や tumor necrosis factor- α (TNF- α)などのデスリガンドが細胞膜上の受容体に結合して開始する経路、小胞体ストレス応答から誘導される経路といった代表的なアポトーシス伝達経路に関与している(63 – 66)。

Caspase-6, -7 もその下流で caspase-3 から切断を受けて活性化し、それぞれ Lamin A や PARP を分解することでアポトーシスの実行に関与している(Fig. 19)。

本節では caspase-3, -7 に着目し、TRO-A0001 暴露後の細胞でのタンパク質発現についてウエスタンブロット法を用いて検討した。

1. 実験材料

【細胞】

実験に用いた細胞はマウス由来腫瘍細胞 B16/BL6、Colon-26 ならびにヒト由来腫瘍細胞 DLD-1、G361 である。

2. 実験方法

1) サンプル作製

【使用試薬】

- RIPA Buffer(Thermo SCIENTIFIC)

Contents: 25mM Tris·HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS

*略記は以下の試薬とする。

Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol)

NP-40 (Polyoxyethylene (9) octyphenyl ether)

SDS (Sodium dodecyl sulfate)

- Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo SCIENTIFIC)

Contents: AEBSF·HCl(100mM), Aprotinin(80 μ M), Bestatin(5mM), E-64(1.5mM), EDTA(0.5M), Leupeptin (2mM), Pepstatin A (1mM)

*略記は以下の試薬とする。

AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride)

E-64 (N-[N-(L-3-Trans-carboxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine)

EDTA (2-({2-[bis (carboxymethyl)amino]ethyl}(carboxymethyl)amino)acetic acid)

- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC)

- DULBECCO'S PBS (DS ファーマバイオメディカル)

- 2 \times SDS sample buffer

Contents: 0.25M Tris-HCl (pH 6.8) (25mL)、SDS (2.0g)、Sucrose (5.0g)、Bromophenol blue (2.0mg)を混合し、超純水を加えて 50mL とした。

-0.25M Tris-HCl (pH 6.8)-

Tris (30.25g)を超純水 (1000mL)に溶解し、pH 6.8 になるまで 6N HCl を滴下した。

- 2-Mercaptoethanol, 99% (Wako)

【使用機器】

- マルチモードプレートリーダーDTX800 (Beckman coulter)

【実験操作手順】

① 75 cm² カルチャーフラスコで前培養した細胞に、TRO-A0001(培養液中の最終濃度は 2.5 μ M、5.0 μ M または 10.0 μ M)を溶解した RPMI 培養液を暴露した。Control 群には、DMSO (0.1%)を暴露した細胞を用意した。

② 24 時間、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下のインキュベーター中で培養した。

③ 細胞および培養液を回収し、1500rpm、5 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離した。

④ 上清を除去し、ペレットに PBS (1mL)を添加し洗浄した。

- ⑤ 1500rpm、5°C で 10 分間遠心分離した。
- ⑥ ④と⑤を繰り返し 2 回行った。
- ⑦ RIPA Buffer に Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit を混合した。(Protease Inhibitor Cocktail Kit / RIPA Buffer=10 μ L/mL で調製)
- ⑧ ペレットに⑦で調製した溶液を添加し、懸濁した。
- ⑨ 氷上で 5 分間インキュベートした。
- ⑩ 15000rpm で 15 分間遠心分離し、上清を取った。
- ⑪ タンパク質量を測定した後、総タンパク質量/RIPA Buffer =1mg/mL の検体を作製した。
- ⑫ 2 \times SDS sample buffer と 2-Mercaptoethanol を 9:1 で混合した溶液を、⑪で作製した検体と 1:1 で混合した。
- ⑬ 95°C で 5 分間インキュベートし、これをサンプルとした。

2) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

【使用試薬】

- 30% アクリルアミド mix
Acrylamide (73g)、N,N'-Methylene-bis(acrylamide)-HG (2.0g)を超純水 (250mL)に溶解した。
- 0.75M Tris-HCl (pH 8.8)
Tris (90.75g)を超純水 (1000mL)に溶解し、pH 8.8 になるまで 6N HCl を滴下した。
- 0.25M Tris-HCl (pH 6.8)
- 25% Ammonium persulfate (APS)
Ammonium persulfate (250mg)を超純水 (1mL)に溶解した。
- N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED) (BIO-RAD)
- 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)
SDS (10g)を超純水 (100mL)に溶解した。
- Running buffer
Tris (3.03g)、Glycine (14.4g)、SDS (1.0g)を超純水 (1000mL)に溶解した。
- SeeBlue Plus2 Prestained Standard (invitrogen)

【使用機器】

- PowerPac™ HC Power Supply (BIO-RAD)
- ミニプロテイン Tetra セル(BIO-RAD)

【実験操作手順】

(1) 12% アクリルアミドゲル作製

① 30% アクリルアミド mix (6mL)、0.75M Tris-HCl (pH 8.8) (7.5mL)、10% SDS (150 μ L)、超純水 (1.3mL)、TEMED (12 μ L)、25% APS (50 μ L)を混合し、ゲル作成用の Glass plates 上部から素早く流し込んだ。

*液量の目安は Glass plates の下端から 7-8 割程度。

② Glass plates 上端まで超純水を流し込み、下層のゲルが重合するまで静置した。

③ 上層の超純水を除去した。

④ 30% アクリルアミド mix (750 μ L)、0.25M Tris-HCl (pH 6.8) (3.75mL)、10% SDS (75 μ L)、超純水 (2.9mL)、TEMED (6 μ L)、25% APS (25 μ L)を混合し、Glass plates 上端まで素早く流し込んだ。

⑤ コームを差し込み、上層のゲルが重合するまで静置した。

(2) 電気泳動

① バッファー槽に電極アッセンブリとアクリルアミドゲルをセットし、Running buffer で満たした。

② アクリルアミドゲルからコームを抜き取り、作製したサンプルをゲル上部にアプライした。

③ 分子量マーカーSeeBlue Plus2 Prestained Standard (5.0 μ L)をアプライした。

④ 定電圧(200V)で電気泳動を行った。

*分子量マーカーの泳動距離を目安に泳動時間を決定した。

3) ブロットニング

【使用試薬】

- Methanol (Wako)

- Cathode Buffer (pH 7.6)

Tris (3.03g)、6-Aminohexanoic acid (5.25g)を超純水に溶解し、Methanol (200mL)を添加して混和した後、超純水を加えて HCl で pH 7.6 に調製し、超純水で全量を 1000mL とした。

- Anode Buffer I (pH 10.4)

Tris (36.3g)を超純水に溶解し、Methanol (200mL)を添加して混和した後、超純水を加えて HCl で pH 10.4 に調製し、超純水で全量を 1000mL とした。

- Anode Buffer II (pH 10.4)

Tris (3.03g)を超純水に溶解し、Methanol (200mL)を添加して混和した後、超純水を加えて HCl で pH 10.4 に調製し、超純水で全量を 1000mL とした。

【使用機器】

- PowerPac™ HC Power Supply (BIO-RAD)

- Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD)

【実験操作手順】

- ① PVDF メンブレンを Methanol に 20 秒間浸した。
- ② PVDF メンブレンを超純水に 1 分間浸した。
- ③ PVDF メンブレンを Cathode Buffer (pH 7.6)に 5 分間浸した。
- ④ SDS-PAGE 後のゲルを Cathode Buffer (pH 7.6)に 10 分間浸した。
- ⑤ 転写装置に Anode Buffer I に浸したブロッキングペーパーを置いた。
- ⑥ ⑤の上に Anode Buffer II に浸したブロッキングペーパーを重ねた。
- ⑦ ⑥の上に PVDF メンブレンを重ねた。
- ⑧ ⑦の上に①のゲルを重ねた。
- ⑨ ⑧の上に Cathode Buffer (pH 7.6)に浸したブロッキングペーパーを重ねた。
- ⑩ 電極を設置した後、ゲルサイズに対し、電流値 $0.8\text{mA}/\text{cm}^2$ 、電圧値 10-20V で 90 分間転写を行った。

4) 抗体反応

【使用試薬】

• T-PBS Buffer

NaCl (8.0g)、KCl (0.2g)、NaH₂PO₄·2H₂O (1.26g)、KH₂PO₄ (0.2g)、Tween-20 (0.5g)を超純水 (1000mL)に溶解した。

• 5% スキムミルク/T-PBS

スキムミルク (5g)を T-PBS Buffer (100mL)に溶解した。

• Can Get Signal (TOYOBO)

1. Solution1 (一次抗体用)

2. Solution2 (二次抗体用)

• Apoptosis Antibody Sampler Kit (Cell Signaling Technology)

1. Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb

2. Caspase-3 Antibody

3. PARP Antibody

4. Cleaved PARP (Asp214) (D64E10) XP Rabbit mAb

5. Caspase-7 Antibody

6. Cleaved Caspase-7 (Asp198) Antibody

7. Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody

• Bax antibody (Cell Signaling Technology)

• Anti-beta Actin antibody - Loading Control (abcam)

【実験操作手順】

① ブロッキング後のメンブレンを T-PBS Buffer で洗浄した。

② メンブレンを 5% スキムミルク/T-PBS に浸し、インキュベートした。

③ ブロッキング後のメンブレンを T-PBS Buffer で洗浄した。

④ 一次抗体を Solution1 で希釈し、インキュベートした。

*一次抗体濃度は、ドットプロット法により目的タンパク質ごとに至適濃度を検討した。

⑤ 二次抗体を Solution2 で希釈し、インキュベートした。

*二次抗体濃度は、ドットプロット法により目的タンパク質ごとに至適濃度を検討した。

5) 検出反応

【使用試薬】

- ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)
 1. Lumigen TMA-6 Solution A
 2. Lumigen TMA-6 Solution B
- T-PBS Buffer

【使用機器】

- FluorChem FC2 (Alpha Innotech)

【実験操作手順】

- ① 二次抗体反応後のメンブレンを T-PBS Buffer で洗浄した。
- ② Lumigen TMA-6 Solution A と Lumigen TMA-6 Solution B を等量混合した。
- ③ ②の溶液をメンブレン表面に添加した。
- ④ 遮光で 5 分間インキュベートした。
- ⑤ FluorChem FC2 で化学発光を検出した。

3. 実験結果

DMSO (0.1%)で暴露した細胞を control (0 μ M)とし、TRO-A0001(2.5 μ M、5.0 μ M、10.0 μ M)で暴露した細胞とのタンパク質発現を比較した。サンプル毎の総タンパク質量を 2.5 μ g に設定し、サンプル間の目的タンパク質のローディングコントロールには β -actinを利用した(Fig. 20)。

1) Caspase-3 タンパク質の発現

Fig. 20; (A), (C) に示すように、メラノーマ細胞株である B16/BL6、G361 では、TRO-A0001で暴露した細胞は、control 群と比較して減少する傾向がみられた。

Fig. 20; (B), (D) に示すように、大腸がん細胞株である Colon-26、DLD-1 では、TRO-A0001暴露群と control 群で、発現の差はみられなかった。

一方、Fig. 20; (A) – (D)に示すように、全ての細胞での cleaved caspase-3 タンパク質発現は、control 群でほとんど発現がみられなかったことに対し、TRO-A0001 暴露群での発現増加が

みられた。

2) Caspase-7 タンパク質の発現

Fig. 20; (A)–(D) に示すように、caspase-7 発現は TRO-A0001 暴露群と control 群を比較すると、B16/BL6 細胞で変化がみられず、Colon-26 細胞と G361 細胞では発現の減少がみられ、DLD-1 細胞では発現の増加がみられた。

一方、ヒト由来の G361 細胞、DLD-1 細胞における cleaved caspase-7 発現は control 群と比較すると、TRO-A0001 暴露群に発現の増加がみられた。

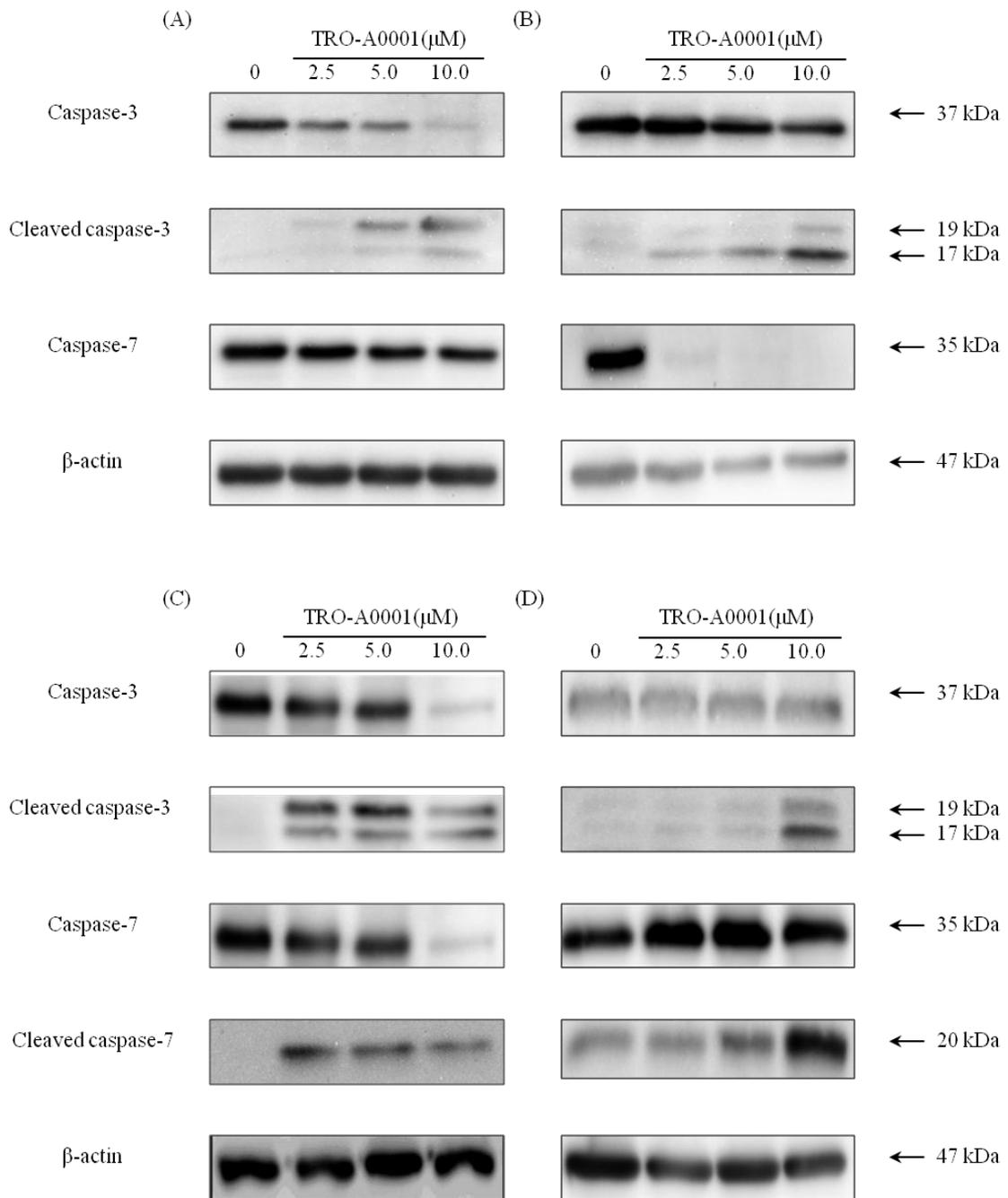


Fig. 20 Expression levels of caspase-3 and -7 in B16/BL6 (A), Colon-26 (B), G361(C) and DLD-1 (D) cells by western blotting. Cells were exposed to TRO-A0001 (2.5, 5.0, 10.0 μM), and control (0 μM) cultures were treated with 0.1% DMSO in RPMI for 24 h. β -actin was used as the internal control for protein loading and transfer efficiency.

第2節 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)タンパク質発現の変化

PARP タンパク質は 116kDa の核内タンパク質で、正常時に DNA 修復や安定化などに関与している。上流にあるエフェクターカスパーゼの caspase-3 や caspase-7 タンパク質に切断されることにより生じる 89kDa の cleaved PARP フラグメントの検出は、初期アポトーシスの重要な指標となる。

1. 実験材料

第3章 第1節と同じものを利用した。

2. 実験方法

第3章 第1節と同じ方法を利用した。

2. 実験結果

DMSO (0.1%)で暴露した細胞を control (0 μ M)とし、TRO-A0001(2.5 μ M、5.0 μ M、10.0 μ M)で暴露した細胞とのタンパク質発現を比較した。サンプル毎の総タンパク質量を 2.5 μ g に設定し、サンプル間の目的タンパク質のローディングコントロールには β -actin を利用した。

Fig. 21; (A)–(D) に示すように、TRO-A0001 を暴露した B16/BL6 細胞、Colon-26 細胞、DLD-1 細胞における PARP タンパク質発現は、control 群と比較して減少する傾向がみられたが、G361 細胞では発現の増加がみられた。一方、全ての細胞における cleaved PARP タンパク質は、control 群ではほとんど発現がみられなかったことに対し、TRO-A0001 暴露群の発現増加がみられた。

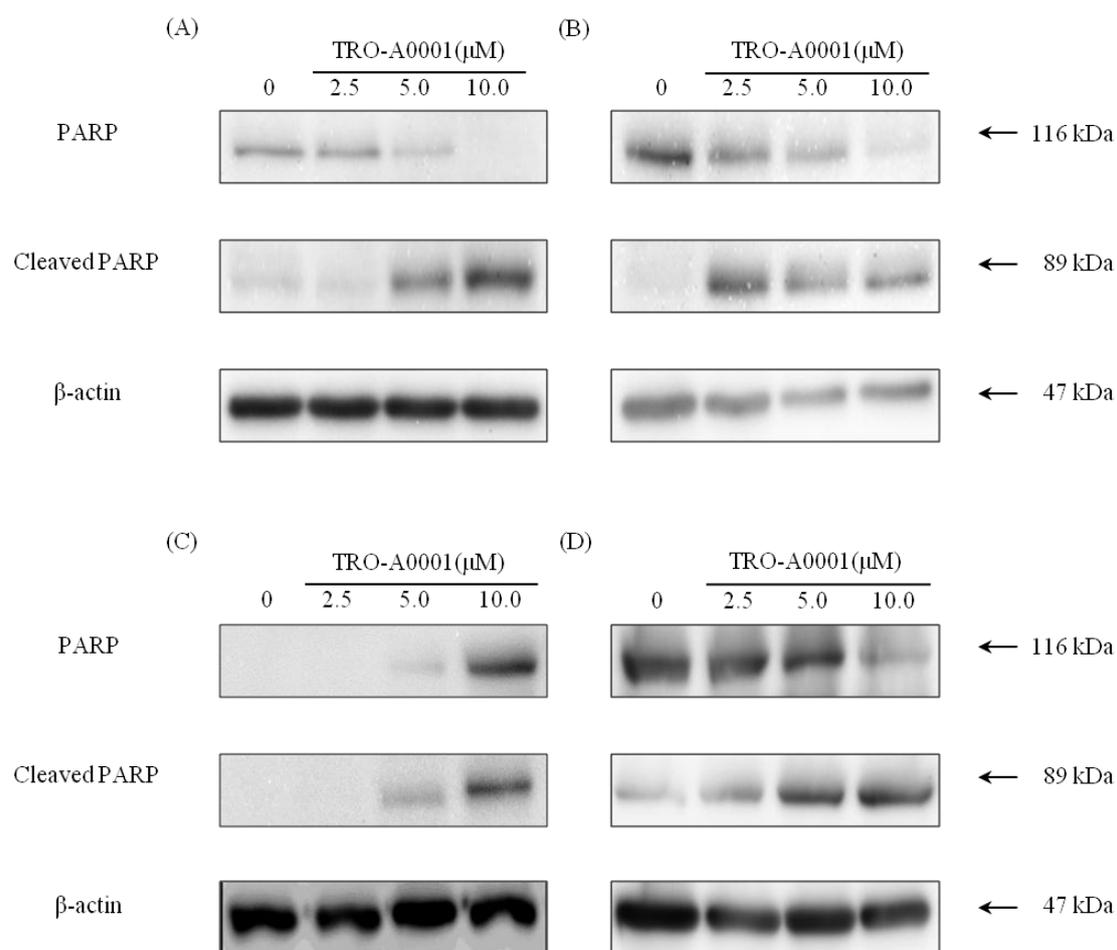


Fig. 21 Expression levels of PARP in B16/BL6 (A), Colon-26 (B), G361(C) and DLD-1 (D) cells by western blotting. Cells were exposed to TRO-A0001 (2.5, 5.0, 10.0 μM), and control (0 μM) cultures were treated with 0.1% DMSO in RPMI for 24 h. β-actin was used as the internal control for protein loading and transfer efficiency.

第3節 Bcl-2-associated X protein(Bax)タンパク質発現の変化と細胞生存への影響

B cell lymphomal leukemia-2 (Bcl-2)ファミリーにはアポトーシスを抑制するタンパク質 (Bcl-2、Bcl-XL、A1、myeloid cell leukemia-1(Mcl-1)、Bcl-2 associated athanogene-1(BAG-1)など)と、誘導するタンパク質(Bax、Bcl-XS、Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter(Bad)、Bcl-2 homologous antagonist/killer(Bak)など)があり、ミトコンドリアが主要な役割を果たすアポトーシスの場合、これらのタンパク質がミトコンドリア膜透過性を制御することによって、アポトーシスを調節している(36, 67, 68)。

アポトーシスが進行する場合、細胞質に存在する Bax などのプロアポトーシスタンパク質が、ミトコンドリアへ移動することで膜電位が低下し、電位依存性陰イオンチャンネル (VDAC)から、シトクロム c やアポトーシスプロテアーゼ活性化因子 1(Apaf-1)の放出が促進される(69 – 71)。

放出されたシトクロム c と Apaf-1 は、イニシエーターカスパーゼの一つである caspase-9 と結合してアポトソームと呼ばれる集合体を形成し、これにより活性化された caspase-9 は、エフェクターカスパーゼである caspase-3、-7 を活性化することで、カスパーゼカスケードを進行させると考えられている(72 – 74)(Fig. 22)。

Bax と Bcl-2 などの作用が相反するタンパク質によるヘテロダイマーの形成により、互いの働きを干渉している状態から Bax の過剰状態になると、Bax ホモダイマー形成が促進されアポトーシスが進行すると考えられているが、ミトコンドリア膜透過性の調節との関連性は明らかになっていない(75)。

本節では、ミトコンドリアに関与するアポトーシスシグナル伝達における Bax タンパク質発現を検討した。さらに、Bax タンパク質の発現を低下させることで、アポトーシスの進行を抑制することが考えられるため、RNA 干渉法を使用して Bax タンパク質発現を低下させた細胞では、アポトーシス性細胞死が抑制されるかを検討した。

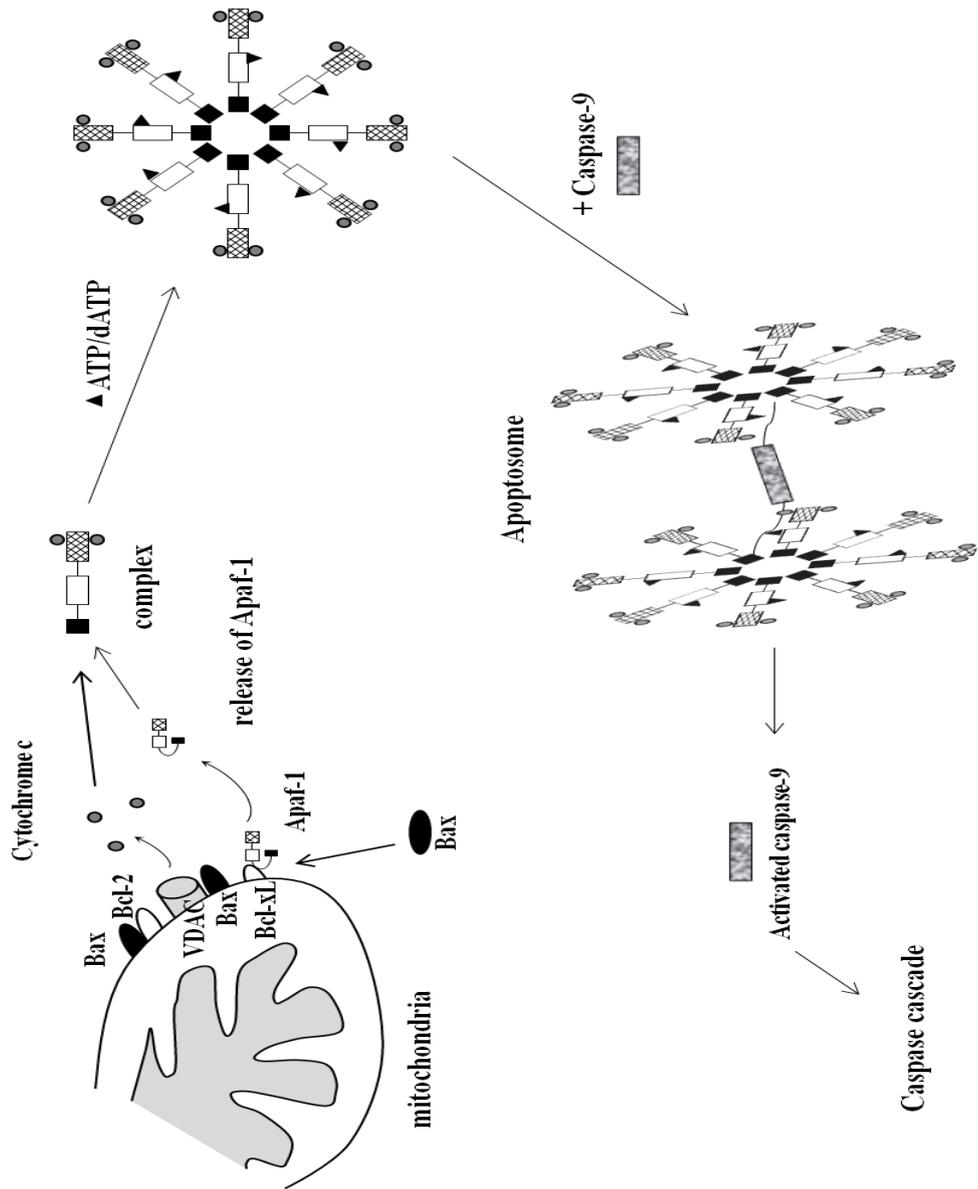


Fig. 22 Bcl-2 family functions of the caspase cascade.

1. 実験材料

【使用試薬】

1) ウェスタンブロット法

第3章 第1節と同じものを使用した。

2) 生細胞数測定

第1章 第1節と同じものを使用した。

3) small interfering RNA (siRNA) transfection

- SignalSilence Control siRNA (Fluorescein Conjugate) (Cell Signaling Technology)
- SignalSilence Control siRNA (Unconjugated) (Cell Signaling Technology)
- SignalSilence Bax siRNA I (Cell Signaling Technology)
- TransIT-siQUEST Transfection Reagent (Mirus)

【使用機器】

1) ウェスタンブロット法

第3章 第1節と同じものを使用した。

2) 生細胞数測定

第1章 第1節と同じものを使用した。

2. 実験方法

【実験操作手順】

1) ウェスタンブロット法

第3章 第1節と同じ方法を利用した。

2) 生細胞数測定

第1章 第1節と同じ方法を利用した。

3) siRNA transfection

- ① 各培養容器で細胞が接着するまで、37°C、5%CO₂ 条件下のインキュベーター中で前培養を行った。

- ② 無血清培養液、TransIT-siQUEST Transfection Reagent、および使用する siRNA を、検体あたり下記の量で混合した。

Culture vessel	96-well	24-well	6-well	T25	T75
Surface area (cm ²)	0.35	1.9	9.6	25	75
Serum-free medium (μL)	9	50	250	650	1900
TransIT-siQUEST Transfection Reagent (μL)	0.75	5	15	30	60
siRNA (10μM) (μL)	0.75	5	15	30	60
合計 (μL)	10.5	60	280	710	2020

- ③ ②で混合した溶液を、遮光、室温条件下で 20 分間静置した。

- ④ ①の容器から上清を取り除き、下記の量で培養液を添加した。

Culture vessel	96-well	24-well	6-well	T25	T75
Complete growth medium (μL)	64.5	440	1220	2290	3980

- ⑤ ③の溶液を④の容器に穏やかに少量ずつ滴下した。

- ⑥ 37°C、5%CO₂ 条件下のインキュベーター中で 24 時間インキュベートした。

- ⑦ ⑥から培養液を取り除き、細胞を目的の実験で使用した。

3. 統計処理

独立した 2 群間の比較を行うため Student's t-test を使用した。危険率が 5%未満である場合を統計学的に有意差有りとして設定した。

4. 実験結果

1) Bax タンパク質の発現

DMSO (0.1%)で暴露した細胞を control (0μM)とし、TRO-A0001(2.5μM、5.0μM、10.0μM)で暴露した細胞とのタンパク質発現を比較した。サンプル毎の総タンパク質量を 2.5μg に設定し、サンプル間の目的タンパク質のローディングコントロールには β-actin を利用した。

Fig. 23; (B), (C), (D) に示すように、TRO-A0001 を暴露した Colon-26 細胞、G361 細胞、DLD-1 細胞での Bax タンパク質発現は、control 群と比較して増加する傾向がみられた。一方、Fig. 23; (A) に示すように、B16/BL6 細胞の Bax タンパク質発現は control 群と比較して同等であった。

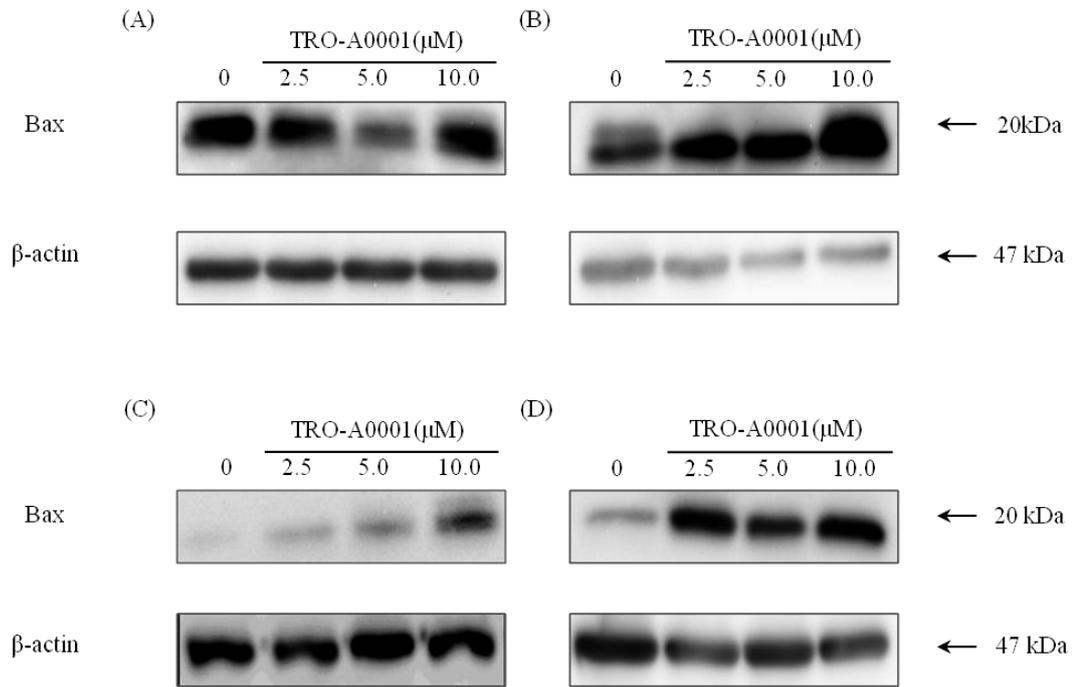


Fig. 23 Expression levels of Bax in B16/BL6 (A), Colon-26 (B), G361(C) and DLD-1 (D) cells by western blotting. Cells were exposed to TRO-A0001 (2.5, 5.0, 10.0 μ M), and control (0 μ M) cultures were treated with 0.1% DMSO in RPMI for 24 h. β -actin was used as the internal control for protein loading and transfer efficiency.

2) Bax siRNA 処理を行った細胞における TRO-A0001 の細胞増殖への影響

トランスフェクション試薬を使用して、Bax siRNA と Control siRNA を細胞に導入した。導入後 24 時間経過した細胞を回収し、トリパンブルー染色で生細胞数を計算した後 96 マイクロウェルプレートに播種し、12 時間接着させた細胞に TRO-A0001(各ウェルの最終濃度; 0.5 μ M, 1.0 μ M, 2.5 μ M, 5.0 μ M, 10.0 μ M)、DMSO (0.1%)を暴露し 36 時間経過した細胞における生細胞数を測定した。

Fig. 24; (A), (B), (C) に示すように、B16/BL6 細胞、Colon-26 細胞、および DLD-1 細胞では、Bax siRNA 処理を行った細胞は Control siRNA で処理した細胞と比較して、TRO-A0001 暴露による細胞生存率を改善する傾向がみられた。

一方、Fig. 24; (D) に示すように、G361 細胞は同様の条件下で TRO-A0001 暴露による細胞生存率を改善する傾向はみられたものの、統計的に有意な差はみられなかった。

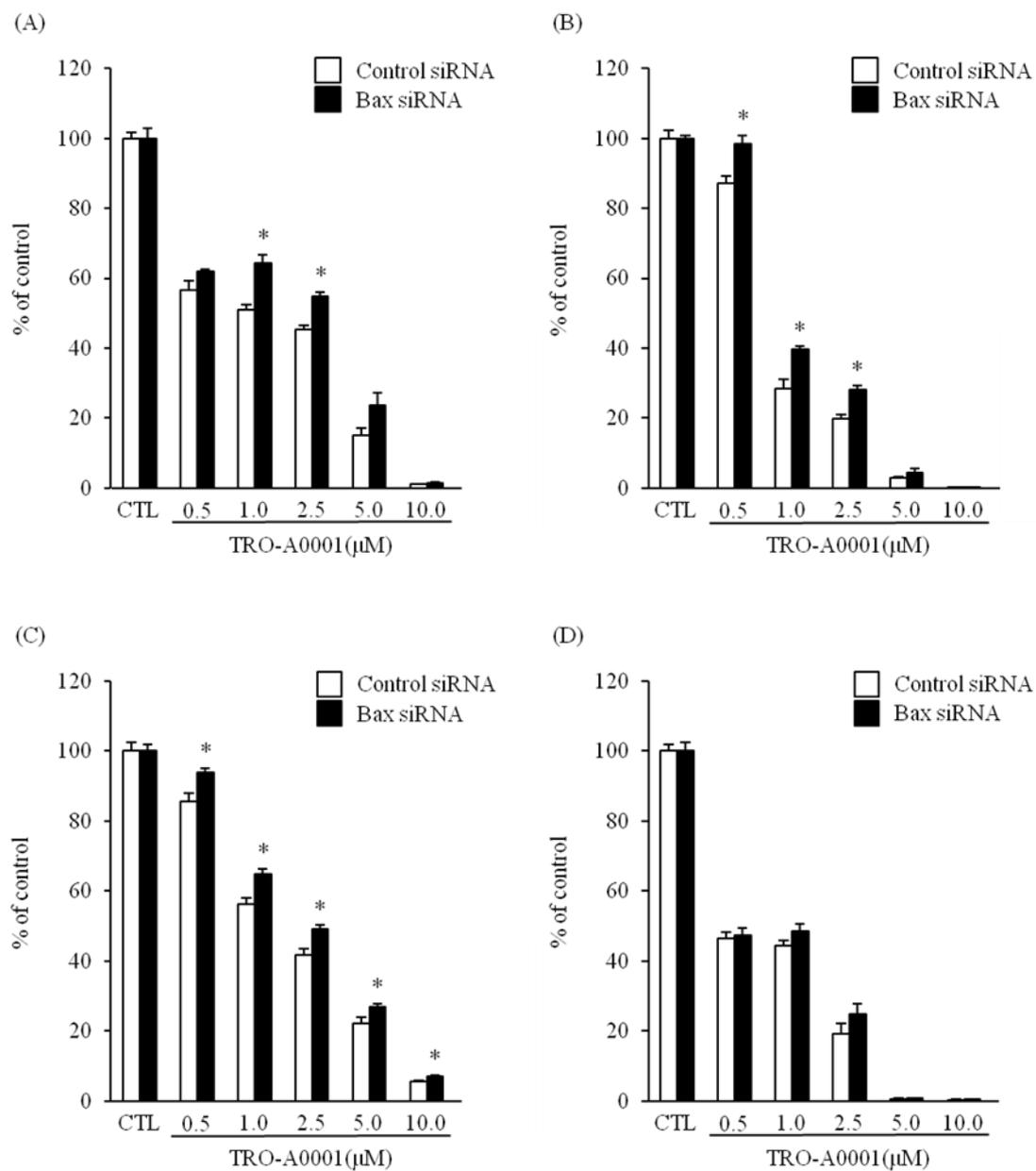


Fig. 24 Effects of Bax knockdown on apoptosis. (A) B16/BL6 (B) Colon-26 (C) DLD-1 (D) G361 Cells were transfected with siRNA (100nM) for 24 h. After transfection, cells were treated with TRO-A0001 on various concentrations (0.5 – 10.0 μM), and control (CTL) cultures were treated with 0.1% DMSO in RPMI for 36 h. Data are expressed as the mean ± S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, between the control siRNA group and the Bax siRNA group.

考察

本章では、TRO-A0001 処理した細胞におけるアポトーシス関連タンパク質の発現について調べた。カスパーゼは相対的に不活性な酵素前駆体で合成されており、細胞内における一連のカスケードにおいて上流のプロテアーゼによる切断によって活性化される。

イニシエーターカスパーゼは、その下流に存在するエフェクターカスパーゼを切断して活性化し、その結果アポトーシスが実行されると考えられている。アポトーシスはプログラム化された細胞死であり、デスレセプターやミトコンドリアを経由するアポトーシスシグナル伝達は、caspase-3 の活性化に集約されることも報告されている(63, 64)。

第1節ではエフェクターカスパーゼの中でも caspase-3 と caspase-7 に着目し、TRO-A0001 暴露後のタンパク質発現について検討を行った。不活性な状態で内在している caspase-3(37kDa)は、TRO-A0001 による発現低下もしくは発現に変化がみられないなど、細胞種間での相異も認められたが、cleaved caspase-3(17, 19kDa)に関してはタンパク質発現の上昇がみられた。

さらに、caspase-3 によって活性化される caspase-7 においても、ヒト由来の細胞種において TRO-A0001 暴露による cleaved caspase-7(20kDa)タンパク質発現の上昇が認められた。つまり、これらの結果はその下流に存在する PARP タンパク質に、シグナル活性化が伝達されたことを示唆している。

第2節では、カスパーゼカスケードの最終ターゲットの一つである PARP タンパク質発現について検討した。通常、PARP タンパク質は DNA 修復や安定化など細胞生存の調節に関与しているが(76, 77)、caspase-3 に切断されて生じる分解産物 (Cleaved PARP) は、初期アポトーシスの指標とされる(62, 78-80)。これは、核内 DNA への損傷が開始されていることを示唆しており、結果として DNA フラグメントの増加などアポトーシスの特徴的な現象の一つとして検出される。

TRO-A0001 処理後の cleaved PARP(89kDa)の発現上昇が認められた結果と、前章における TUNEL 陽性細胞の増加から、DNA フラグメントを特徴としたアポトーシスが実行されていることが推測される。

以上の結果より、TRO-A0001 によって引き起こされるシグナル伝達は caspase-3 活性化を伴う一連のカスケードを進行させ、最終的にアポトーシスの形態を特徴とする細胞死を実行していることが示唆された。

さらに、第3節ではアポトーシスを調節する Bcl-2 ファミリーの一つである、Bax タンパク質に着目した。アポトーシスを誘導する経路の中でミトコンドリアを経由する経路において、Bax はアポトーシスを誘導するタンパク質の一つである(81, 82)。

TRO-A0001 を処理した Colon-26 細胞、G361 細胞、DLD-1 細胞における Bax タンパク質発現は、control 群と比較して増加する傾向がみられたが、B16/BL6 細胞の Bax タンパク質

発現にはあまり変化がみられていない。

一方で **Bax siRNA** でタンパク質発現を低下させると、**Control siRNA** で処理した細胞と比較して、**TRO-A0001** 処理による細胞生存率を改善する傾向がみられた。

この結果は、**TRO-A0001** 処理後のアポトーシスではミトコンドリアの関与を示唆しているが、**Bax** 発現低下による細胞生存率は、**control** 群と同等まで改善していない結果を踏まえると、他の **Bcl-2** ファミリーによるアポトーシスの調節についても検討する必要性が考えられた。

総括

本研究では、マウスとヒト由来の悪性黒色腫 B16/BL6、G361 細胞、および結腸癌細胞株 Colon-26、DLD-1 細胞を使用して、超分子化合物[2]rotaxane (TRO-A0001)が各腫瘍細胞に及ぼす効果について検討した。

1) TRO-A0001 の細胞増殖に及ぼす効果

TRO-A0001 を暴露後 48 時間までの細胞増殖に対する影響については、マウス由来の腫瘍細胞である B16/BL6、Colon-26 で TRO-A0001 濃度 1.0 μ M より高濃度で、またヒト由来の腫瘍細胞である DLD-1、G361 では TRO-A0001 濃度 0.5 μ M より高濃度で細胞死や増殖抑制を引き起こすことが認められた。

その特徴に TRO-A0001 添加時間の経過に伴い生細胞数が減少することや、TRO-A0001 の用量依存性が示唆された(第 1 章 第 2 節)。

一方、TRO-A0001 の構造分子である dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 のそれぞれを暴露した細胞の増殖は、各腫瘍細胞で生細胞数の変化は認められず、暴露後 48 時間まで control 群の細胞と同様の細胞増殖が認められた。

また、dibenzo-24-crown 8-ether と NK7-40-2 の等モル量混合物を暴露した場合の細胞増殖についても生細胞数の変化は認められず、暴露後 48 時間まで control 群の細胞と同様の細胞増殖が認められた(第 1 章 第 3 節)。

以上の結果より、TRO-A0001 の構造分子単独での細胞死や増殖抑制は引き起こされず、超分子構造をとる TRO-A0001 特有の作用発現であることが示唆された。

さらに、既存のメラノーマ治療薬である DTIC、および大腸がん治療薬である 5-FU と TRO-A0001 の増殖抑制効果について比較検討を行ったところ、TRO-A0001 は DTIC および 5-FU より細胞生存率を有意に減少させた(第 1 章 第 4 節)。

2) TRO-A0001 を暴露した腫瘍細胞の形態学的変化についての検討

TRO-A0001 が引き起こした細胞死を形態学的な特徴から検討するために、細胞核及び細胞骨格を染色した。細胞核染色においては、TRO-A0001 を暴露した各腫瘍細胞に濃染された核凝縮様の状態が見られる細胞種があるものの、小球状の断片化核小体集合像は観察されなかった。

一方、細胞骨格染色においては、TRO-A0001 処理した B16/BL6、DLD-1、および G361 細胞は細胞骨格の外環が細長く縮小しており、Colon-26 細胞では円形状に縮小している細胞が認められ、それに伴う細胞間接着の減少や細胞間隙が広く観察された。また、非染色像においても、これらの結果を示唆する細胞質の凝縮や空泡化、並びに球状化した細胞が

認められた(第2章 第1節)。

TRO-A0001 処理で引き起こされる細胞死に、アポトーシス様の形態学的特徴が示唆されたため TUNEL 染色にて検討を行ったところ、TRO-A0001 処理した各腫瘍細胞に TUNEL 陽性細胞の増加が認められ、DNA の断片化に参与していることが示唆された(第2章 第2節)。

以上の結果より TRO-A0001 が引き起こす細胞死は、細胞内構造の形態学的な知見からアポトーシスである可能性が認められた。

3) TRO-A0001 がアポトーシス関連タンパク質発現に及ぼす変化

エフェクターカスパーゼである caspase-3 と caspase-7 のタンパク質発現について検討したところ、不活性な状態で内在している caspase-3 は、TRO-A0001 処理による発現低下、もしくは発現に変化がみられないなど、細胞種間での相異も認められたが、cleaved caspase-3 では、全ての腫瘍細胞でのタンパク質発現の上昇がみられた。

さらに、caspase-3 によって活性化される caspase-7 においても、DLD-1、G361 細胞において TRO-A0001 処理による cleaved caspase-7 タンパク質発現の上昇が認められた。この結果から、エフェクターカスパーゼの下流に存在する PARP タンパク質に、シグナル伝達が行われたことが示唆された(第3章 第1節)。

次に、PARP タンパク質発現について検討を行ったところ、初期アポトーシスの指標とされる cleaved PARP の発現上昇が、全ての腫瘍細胞で認められた(第3章 第2節)。

以上の結果より、TRO-A0001 によって引き起こされるシグナル伝達は、caspase-3 活性化を伴う一連のカスケードを進行させ、最終的にアポトーシスの形態を特徴とする細胞死を実行していることが示唆された。

また、アポトーシスを調節する Bcl-2 ファミリーの一つである、Bax タンパク質発現について検討したところ、TRO-A0001 処理した Colon-26 細胞、G361 細胞、および DLD-1 細胞での Bax タンパク質発現が増加する傾向がみられたが、B16/BL6 細胞の Bax タンパク質発現にはあまり変化がみられなかった。

一方で、Bax siRNA 処理を行った B16/BL6、Colon-26、および DLD-1 細胞では、TRO-A0001 による細胞生存率を改善する傾向がみられたことから、アポトーシスシグナル伝達経路における Bcl-2 ファミリーの関与が示唆された(第3章 第3節)。

考察

既存の代表的抗がん剤である 5-FU の作用機序は、3 系統のメカニズムが確立されている (Fig. 25)。

1 系統は、細胞内のチミジンホスホリラーゼ(TP)により、5-FU が 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン(FdUrd)となり、これが更にリン酸化を経て、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン-5'-一リン酸(FdUMP)、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸(FdUTP)へと代謝され、DNA に組み込まれることで機能を抑制する。

2 系統は、DNA 合成ではデオキシウリジン一リン酸(dUMP)が、チミジル酸シターゼ(TS)により、デオキシチミジン一リン酸(dTMP)へ変化し DNA に組み込まれるが、1 系統で作られた FdUMP、ならびに内在する 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸と TS の共有結合複合体が形成され、この複合体が TS 活性を阻害し、dTMP を枯渇させることで DNA 合成阻害を起こす。

3 系統は、5-FU がオロチン酸ホスホリボシル転移酵素(OPRT)により、5-フルオロウリジン一リン酸(FUMP)を経て 5-フルオロウリジン三リン酸(FUTP)となり、UTP の代わりに RNA に組み込まれ、フルオロウリジン-RNA(F-RNA)が、正規の RNA プロセッシングや mRNA 翻訳を阻害する。

これまでに報告されている従来の 5-FU の作用機序に加え、近年ではアポトーシスに関連する報告がなされている。Aresvik らは 5-FU が Jurkat 細胞にアポトーシスを引き起こし、その特徴として PARP タンパク質切断が認められたことを報告している(83)。

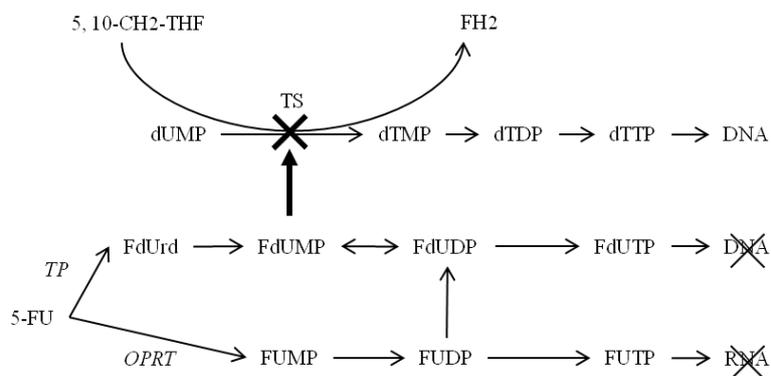


Fig. 25 Action mechanism of 5-FU

5-FU; 5-fluorouracil, TP; thymidine phosphorylase, OPRT; orotate phosphoribosyl transferase, TS; thymidylate synthase, FH2; dihydrofolate, 5, 10-CH₂-THF; 5, 10-metylenetetrahydrofolate, dUMP; deoxyuridine monophosphate, dTMP; deoxythymidine monophosphate, dTDP; deoxythymidine diphosphate, dTTP; deoxythymidine triphosphate, FdUrd; fluorodeoxyuridine, FdUMP; fluorodeoxyuridine monophosphate, FdUDP; fluorodeoxyuridine diphosphate, FdUTP; fluorodeoxyuridine triphosphate, FUMP; fluorouridine monophosphate, FUDP; fluorouridine diphosphate, FUTP; fluorouridine triphosphate.

また、Borrallho らは結腸、直腸がん細胞を使用して、5-FU が DNA 断片化や caspase-3, -8, -9 活性を増加させ、Bax タンパク質発現の増加に関与することを報告している(84)。これらの研究は、5-FU 代謝系による作用機序のほかにアポトーシスを介した作用機序が関与することを示唆している。

5-FU に従来認識されていた代謝系による作用機序の他に、これらの研究で報告されているアポトーシスを介した作用機序が関与しているならば、本研究で TRO-A0001 がアポトーシス誘導性細胞死を示したことと、5-FU より著効を示した結果を踏まえると、より効果的な大腸がん治療薬としての開発が期待できる。

さらに、本研究ではマウス由来細胞の他に、ヒト由来の腫瘍細胞についても検討を行っていることから、TRO-A0001 がヒト由来の腫瘍細胞にアポトーシス性細胞死を引き起こし、臨床でも応用できる可能性を示す重要なエビデンスとなり得る。

したがって、本研究から明らかとなったメラノーマや大腸がん細胞における、ロタキサンのカスパーゼシグナル伝達を介するアポトーシスは、抗腫瘍薬としての応用が十分に期待できると考える。

一方、TRO-A0001 の構造分子である dibenzo-24-crown 8-ether、NK7-40-2 は、それぞれ細胞生存に影響を及ぼさず、超分子構造を形成する TRO-A0001 においてのみ細胞死を引き起こすことが明らかとなった。

[2]Rotaxane はそれぞれの構成分子が有する分子運動に加え、軸状分子(axle)上を環状分子(wheel)が“shuttling”と呼ばれる分子間運動を行う(9, 10, 85)。この超分子化合物に特有の複雑な分子間運動が、TRO-A0001 が引き起こす細胞死の要因となる可能性があると考えている。

今回の研究で用いた[2]rotaxane がアポトーシス誘導に関与することが明らかとなったことから、ロタキサンが有する特徴的な構造と構造分子のバリエーションによって、将来数多くのさらに有効な抗悪性腫瘍薬の開発が期待される。

引用文献

1. Gibson HW, Marand H. Polyrotaxanes: Molecular composites derived by physical linkage of cyclic and linear species. *Adv Mater.* 1993 Jan;5(1):11-2.
2. Harrison IT, Harrison S. Synthesis of a stable complex of a macrocycle and a threaded chain. *J Am Chem Soc.* 1967;89(22):5723-4.
3. Kolchinski AG, Busch DH, Alcock NW. Gaining control over molecular threading: benefits of second coordination sites and aqueous-organic interfaces in rotaxane synthesis. *J Chem Soc Chem Commun.* 1995;(12):1289-91.
4. Ashton PR, Campbell PJ, Glink PT, Philp D, Spencer N, Stoddart JF, Chrystal EJT, Menzer S, Williams DJ, Tasker PA. Dialkylammonium Ion/Crown Ether Complexes: The Forerunners of a New Family of Interlocked Molecules. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1995 Sep 15;34(17):1865-9
5. Harrison IT. Preparation of rotaxanes by the statistical method. *J Chem Soc Perkin Trans 1.* 1974;(0):301-4.
6. Yamada Y, Nomura T, Harashima H, Yamashita A, Katoono R, Yui N. Intranuclear DNA release is a determinant of transfection activity for a non-viral vector: biocleavable polyrotaxane as a supramolecularly dissociative condenser for efficient intranuclear DNA release. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(7):1218-22.
7. Adeli M, Kalantari M, Parsamanesh M, Sadeghi E, Mahmoudi M. Synthesis of new hybrid nanomaterials: promising systems for cancer therapy. *Nanomedicine.* 2011 Dec;7(6):806-17.
8. Ooya T, Choi HS, Yamashita A, Yui N, Sugaya Y, Kano A, Maruyama A, Akita H, Ito R, Kogure K, Harashima H. Biocleavable polyrotaxane-plasmid DNA polyplex for enhanced gene delivery. *J Am Chem Soc.* 2006 Mar 29;128(12):3852-3.
9. Kihara N, Koike Y, Takata T. Effect of steric barrier on the shuttling of rotaxane having crown ether wheel. *Chem Lett.* 2007;36:208-9.

10. 稲倉 和幸. 超分子化合物の抗腫瘍効果を目的とした新規治療法の可能性. 福岡大学. 修士学位論文. 2007
11. Jabir NR, Tabrez S, Ashraf GM, Shakil S, Damanhour GA, Kamal MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4391-408.
12. 日本皮膚科学会. 科学的根拠に基づく皮膚悪性腫瘍ガイドライン (第1版). 金原出版. 2007.
13. Crosby T, Fish R, Coles B, Mason MD. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2)
14. NIH consensus conference: *JAMA*. 264(11): 1444-1450, 1990
15. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, McCormack GW, Gerstner JB, Krook JE, Malliard J, et al. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol*. 1989 Oct;7(10):1447-56.
16. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, Jones J, Mamounas EP, Ore L, Petrelli NJ, et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol*. 1993 Oct;11(10):1879-87.
17. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL, Bear HD, Atkins JN, Dimitrov NV, Glass AG, Fisher ER, Fisher B. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol*. 1999 Nov;17(11):3553-9.
18. Lembersky BC, Wieand HS, Petrelli NJ, O'Connell MJ, Colangelo LH, Smith RE, Seay TE, Giguere JK, Marshall ME, Jacobs AD, Colman LK, Soran A, Yothers G, Wolmark N. Oral uracil and tegafur plus leucovorin compared with intravenous fluorouracil and leucovorin in

stage II and III carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06. *J Clin Oncol.* 2006 May 1;24(13):2059-64.

19. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H 3rd, Carrato A, Cassidy J, Cervantes A, Fagerberg J, Georgoulas V, Hussein F, Jodrell D, Koralewski P, Kröning H, Maroun J, Marschner N, McKendrick J, Pawlicki M, Rosso R, Schüller J, Seitz JF, Stabuc B, Tujakowski J, Van Hazel G, Zaluski J, Scheithauer W. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med.* 2005 Jun 30;352(26):2696-704.
20. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, Fields AL, Mayer RJ. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol.* 2007 Aug 10;25(23):3456-61.
21. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, Topham C, Tabernero J, André T, Sobrero AF, Mini E, Greil R, Di Costanzo F, Collette L, Cisar L, Zhang X, Khayat D, Bokemeyer C, Roth AD, Cunningham D. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 1;27(19):3117-25.
22. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun 3;350(23):2343-51.
23. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 1;27(19):3109-16.
24. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, Atkins JN, Seay TE, Fehrenbacher L, Goldberg RM, O'Reilly S, Chu L, Azar CA, Lopa S, Wolmark N. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol.* 2011 Jan 1;29(1):11-6.

25. Alberts SR, et al.: ASCO 2010, abst #CRA3507
26. Goldberg RM, et al.: ASCO 2010, abst #3508
27. Pommier RF, Woltering EA, Milo G, Fletcher WS. Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide and antineoplastic combinations against human tumors. *Am J Surg.* 1988 May;155(5):672-6.
28. Jiang G, Bi K, Tang T, Wang J, Zhang Y, Zhang W, Ren H, Bai H, Wang Y. Down-regulation of TRRAP-dependent hTERT and TRRAP-independent CAD activation by Myc/Max contributes to the differentiation of HL60 cells after exposure to DMSO. *Int Immunopharmacol.* 2006 Jul;6(7):1204-13.
29. Young DA, Gavrilov S, Pennington CJ, Nuttall RK, Edwards DR, Kitsis RN, Clark IM. Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 24;322(3):759-65.
30. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl).* 1990;181(3):195-213.
31. Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differ.* 1995 Apr;2(2):87-96.
32. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 1973 Jun;7(3):253-66.
33. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3-11.
34. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 2004

Dec;6(12):1221-8.

35. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
36. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.
37. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
38. Uchiyama Y, Shibata M, Koike M, Yoshimura K, Sasaki M. Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol*. 2008 Apr;129(4):407-20.
39. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2679-88.
40. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Oct;11(10):700-14.
41. Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, Orenstein J, Moss B, Lenardo MJ. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51613-21.
42. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002 Mar;9(3):459-70.
43. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18;272(29):17907-11.

44. Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev*. 2002 Dec;102(12):4489-500.
45. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998 Dec 24;17(25):3237-45.
46. Krajewska M, Rosenthal RE, Mikolajczyk J, Stennicke HR, Wiesenthal T, Mai J, Naito M, Salvesen GS, Reed JC, Fiskum G, Krajewski S. Early processing of Bid and caspase-6, -8, -10, -14 in the canine brain during cardiac arrest and resuscitation. *Exp Neurol*. 2004 Oct;189(2):261-79.
47. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):443-6.
48. Gruenbaum Y, Wilson KL, Harel A, Goldberg M, Cohen M. nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol*. 2000 Apr;129(2-3):313-23.
49. Yabuki M, Miyake T, Doi Y, Fujiwara T, Hamazaki K, Yoshioka T, Horton AA, Utsumi K. Role of nuclear lamins in nuclear segmentation of human neutrophils. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 1999;31(2):77-84.
50. Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem*. 1996 Jul 12;271(28):16443-6.
51. Oberhammer FA, Hohegger K, Fröschl G, Tiefenbacher R, Pavelka M. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol*. 1994 Aug;126(4):827-37.
52. Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*. 1996 Dec;135(6 Pt 1):1441-55.

53. Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31075-85.
54. Cryns VL, Bergeron L, Zhu H, Li H, Yuan J. Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31277-82.
55. Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB, Morrow JS. Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem.* 1998 Aug 28;273(35):22490-7.
56. Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19;273(25):15540-5.
57. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998 Jan 1;391(6662):43-50.
58. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998 Jan 1;391(6662):96-9.
59. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem.* 1999 Oct 22;274(43):30651-6.
60. Tang D, Kidd VJ. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem.* 1998 Oct 30;273(44):28549-52.

61. Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He WW, Dixit VM. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1996 Jan 19;271(3):1621-5.
62. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16.
63. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
64. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell.* 1998 Sep 18;94(6):695-8.
65. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science.* 2003 Apr 4;300(5616):135-9.
66. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000 Jan 28;287(5453):664-6.
67. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.
68. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells.* 1998 Nov;3(11):697-707.
69. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 8;95(25):14681-6.

70. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prévost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. 1998 Sep 25;281(5385):2027-31.
71. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channelVDAC. *Nature*. 1999 Jun 3;399(6735):483-7.
72. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997 Aug 8;90(3):405-13.
73. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):11549-56.
74. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem*. 1999 Jun 18;274(25):17941-5.
75. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993 Aug 27;74(4):609-19.
76. Satoh MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):356-8.
77. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem*. 1998 Dec 11;273(50):33533-9.
78. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994 Sep 22;371(6495):346-7.

79. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):37-43.
80. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 1995 Jun 2;81(5):801-9.
81. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001 Apr 27;292(5517):727-30.
82. Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 28;95(9):4997-5002.
83. Aresvik DM, Pettersen RD, Abrahamsen TG, Wright MS. 5-fluorouracil-induced death of Jurkat T-cells--a role for caspases and MCL-1. *Anticancer Res*. 2010 Oct;30(10):3879-87.
84. Borralho PM, Moreira da Silva IB, Aranha MM, Albuquerque C, Nobre Leitão C, Steer CJ, Rodrigues CM. Inhibition of Fas expression by RNAi modulates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT116 cells expressing wild-type p53. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan;1772(1):40-7
85. Makita Y, Kihara N, Takata T. Quantitative active transport in [2]rotaxane using a one-shot acylation reaction toward the linear mole