

博士論文

論文題目 トリプルネガティブ乳がんにおけるTGF- β シグナル
抑制を介したpolyI:Cの抗腫瘍効果のメカニズム

氏 名 田村 佑介

目次

序文.....	3
1. 乳がんのサブタイプ分類とトリプルネガティブ乳がん	
2. RLR シグナルとがん治療	
3. TGF- β シグナルとがん	
4. RLR シグナル及び TGF- β シグナルの相互作用	
方法.....	12
結果.....	22
1. トリプルネガティブ乳がんにおける polyI:C トランスフェクションの TGF- β シグナルに対する影響	
2. polyI:C による TGF- β シグナルの抑制の細胞死への影響	
3. polyI:C が誘導する細胞死の詳細な解析	
4. polyI:C によるカスパーゼ 3 依存的なパイロトーシスと TGF- β シグナルの関与	
5. Hs578T 細胞で確認された polyI:C の治療有効性と TGF- β シグナルの関与に対する別のトリプルネガティブ乳がん細胞株を使用した検討	
6. caSmad3 の過剰発現で polyI:C による細胞死が減少するメカニズムの探索	
7. polyI:C による治療実験における腫瘍抑制効果と TGF- β シグナルとの関係	
考察.....	70
1. がんにおける RLR シグナルや他の PRR シグナルの活性化	
2. RLR シグナル活性化による TGF- β シグナルの抑制	

3. TGF- β の生存促進作用

4. パイロトーシス

結論.....75

引用文献.....76

謝辞.....82

序文

乳がんは、2018年では世界で年間に約210万人もの患者が診断を受け、62万人以上の患者が死亡している(1)。そのため、乳がんを含むがんに対する新たな治療法の開発やそのメカニズムの提案は切迫した課題であると考えられる。

1. 乳がんのサブタイプ分類とトリプルネガティブ乳がん

乳がんは、診断時の進行度やその特徴、また、患者の背景に応じて外科的手術、放射線療法、薬物療法が選択される。中でも薬物療法は、多くの患者において他の治療と組み合わせられて行われ、乳がん治療における貢献度も大きい(1)。

薬物療法は、乳がんの生物学的な特徴を網羅的遺伝子発現プロファイルに基づいてサブタイプに分類した時の分類ごとに大きく治療方針が変わってくることが知られている。臨床で使用される乳がんの分類は歴史的には様々な変遷をたどったが、現在は世界的に上記網羅的発現プロファイリングによる molecular subtype 分類に対応する形の surrogate intrinsic subtype が使用されており、主に estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PR)、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)、Ki67 の発現に応じて乳がんを luminal A-like、luminal B-like、HER2-enriched、triple negative の4つ、または、luminal B をさらに HER2- または HER2+ に分けた5つに分類している(図1)(1)。

中でも、ER、PR、HER2 の発現がないトリプルネガティブ乳がんは、進行性乳がん患者の16%ほどを占めるとされ、5つのサブタイプの中では予後が悪いと報告されている(2,3)。薬物治療においては、長きにわたりアンストラサイクリン系やタキサン系を中心と

Surrogate intrinsic subtypes of breast cancer	
Luminal A-like	ER+/PR+/HER2-/Ki67 Low
Luminal B-like HER2-	ER+/PR+or- (ER, PR: Lower than in Luminal A) /HER2-/Ki67 High
Luminal B-like HER2+	ER+/PR+or- (ER, PR: Lower than in Luminal A) /HER2+/Ki67 High
HER2-enriched (non-luminal)	ER-/PR-/HER2+
Triple negative	ER-/PR-/HER2-

参考: Harbeck et al. Nat Rev Dis Primers. 2019

図 1. 乳がんのサブタイプ分類

現在臨床で使用されている乳がんのサブタイプ分類は、乳がんを 5 つのサブタイプに分類する "surrogate intrinsic subtype" が使用される場合が多い。乳がんの薬物治療は大きく、乳がんのサブタイプに基づいて行われる。本研究は中でも ER、PR、HER2 がすべて陰性のトリプルネガティブ乳がんに着目した研究である。

した細胞障害性抗がん剤による化学療法しか選択肢がなかったが、近年、BRCA 変異を持つ患者に対する PARP 阻害剤や、PD-L1 陽性患者に対する抗 PD-L1 抗体、抗 PD-1 抗体などが承認された (4)。PD-L1 の発現はトリプルネガティブ乳がんが高いと言われており、近年著しい成長を遂げた免疫チェックポイント阻害剤は、トリプルネガティブ乳がんの治療に対して今後も更なる可能性を秘めているものの、依然として、トリプルネガティブ乳がんの薬物治療における細胞障害性抗がん剤による化学療法以外の治療の選択肢は非常に少ない状況にある (5,6)。

2. RLR シグナルとがん治療

現在提案されているがんに対する新規治療法の一つとして、リガンドを腫瘍内投与することにより、がん細胞内の自然免疫シグナルを活性化する方法があり、免疫チェックポイント阻害剤との併用も含めて検討が行われている (7,8)。細胞内の自然免疫シグナルを活性化するこれら受容体は総称して **pattern recognition receptors (PRRs)** といわれている。PRRs には **Toll-like receptors (TLRs)** や **nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs)** などが含まれ、これら受容体は本来病原体から宿主を守るために、病原体の構成成分のパターンを認識したり、また、感染等によりダメージを受けた細胞が周囲の細胞に危険を知らせるために放出した分子を認識したりと言われている。

これら PRRs を活性化する治療法の中に、**double-stranded RNA (dsRNA)** を細胞内に導入し、**melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)** や **retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)** を主体とする **RIG-I-like receptors (RLRs)** を介したシグナルをがん細胞内で活性化する方法がある。トリプルネガティブにおいては、RLRs に含まれる RIG-I の変異や欠失

の頻度が他のがん関連遺伝子と比べ少ないことから、これらアゴニストが治療に有効である可能性が報告されている (9)。

RLRs は、細胞内の dsRNA を認識し、mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) と複合体を形成することにより最終的に、下流の転写因子 interferon regulatory factor 3 (IRF3) 等を活性化してインターフェロン (IFN) の発現誘導を引き起こし、周囲の細胞に対して、ウイルスが侵入したことを知らせると同時に、自身に対しては細胞死を誘導することが知られている (図 2) (10,11)。すなわち、RLR シグナルをがん細胞内で活性化することにより、がん細胞への細胞死の誘導や、IFN やその他の炎症性サイトカインの発現上昇を介した周囲の細胞の活性化が同時に期待できるとされ、RLR シグナルががんの治療標的になりうる可能性が報告されている (8,12)。実際に、これらアゴニストはマウスの腫瘍モデルにおける、トランスフェクションによる腫瘍細胞内投与によって腫瘍抑制効果が確認されており、現在はヒトに対して多様ながん種に対する治験も進んでいる (13,14)。

3. TGF- β シグナルとがん

Transforming growth factor β (TGF- β) シグナルは、がんの進展に非常に重要な役割を果たしているといわれている。TGF- β と TGF- β II型受容体 (T β RII) との結合によって、I型受容体 (T β RI) とII型受容体がヘテロ 4 量体を形成し、活性化したI型受容体のセリン・スレオニンキナーゼによって下流の転写因子である Smad2 と Smad3 がリン酸化される。リン酸化された Smad2 と Smad3 は Smad4 と複合体を形成したのちに核内に移行し、ゲノムワイドな転写制御を行う (15) (図 3A)。

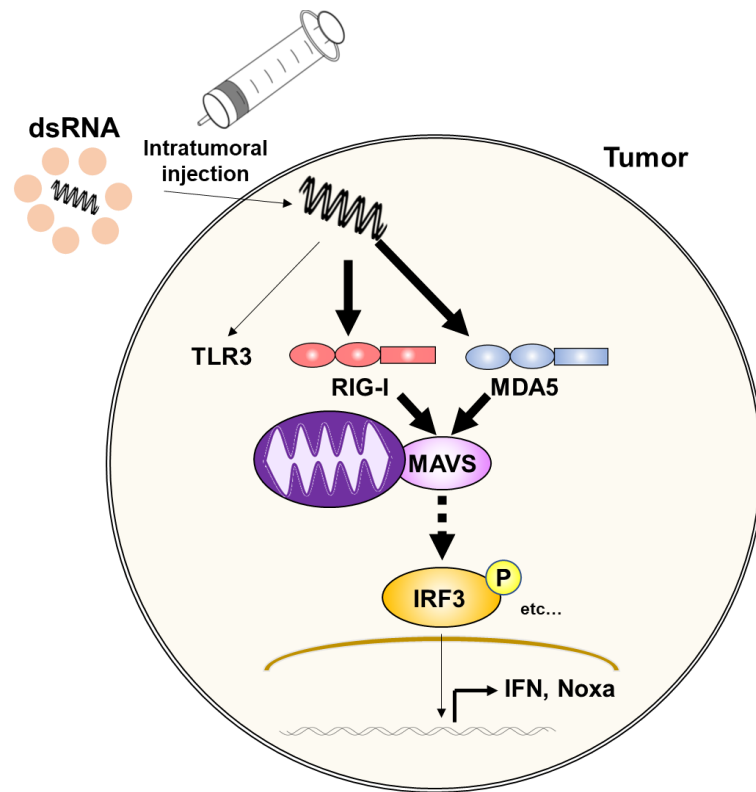


図2. がん細胞における RLR シグナルの活性化

トランスフェクションにより細胞内に導入された dsRNA は、RIG-I や MDA5 により認識され、下流の分子である MAVS 等の分子を介して、最終的に IRF3 等の転写因子が活性化され、IFN の発現上昇や自己の細胞死を誘導する。

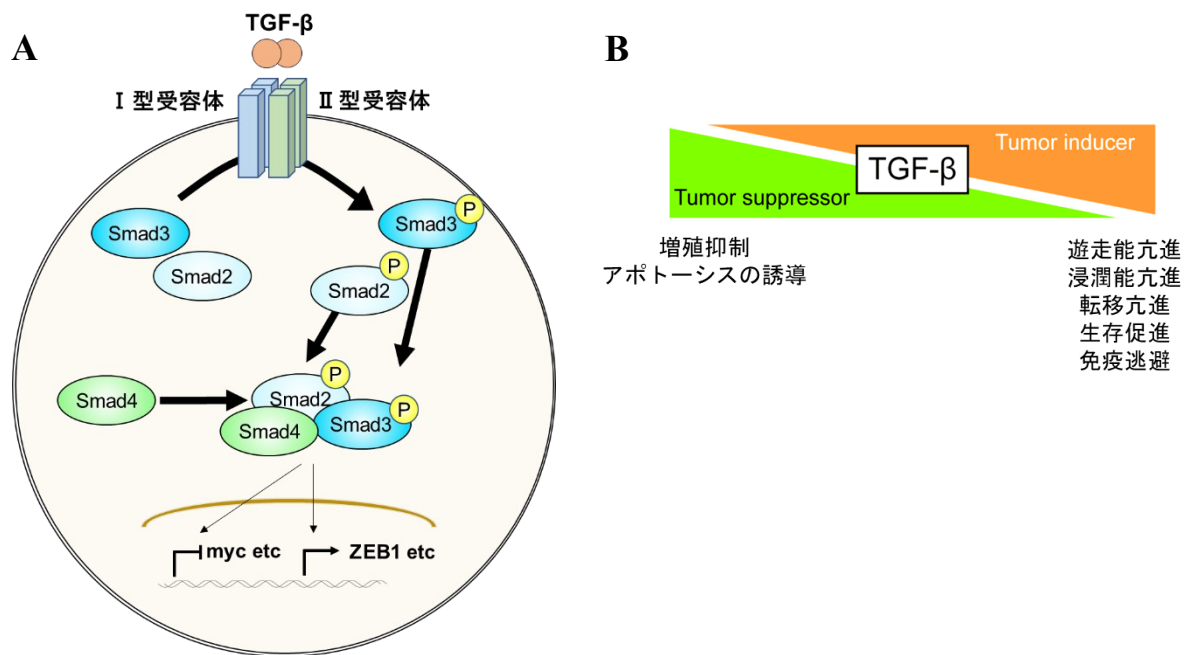


図 3. TGF- β シグナルとそのがんに対する効果

(A) TGF- β シグナルの概要。TGF- β の受容体への結合により、I型受容体 (T β RI)、II型受容体 (T β RII) がヘテロ 4 量体を形成し、T β RIにより、細胞内の Smad2、Smad3 がリン酸化される。リン酸化された Smad2、Smad3 は Smad4 と複合体を形成することにより核内に移行し、転写促進、あるいは転写抑制を行う。

(B) TGF- β の作用にはがんに対して、腫瘍抑制的な側面と、腫瘍促進的な側面があることが知られている。乳がんにおける TGF- β の役割に関しては、腫瘍促進的な側面に関する報告が数多く存在する。

がんに対する TGF- β の作用には、腫瘍抑制作用、腫瘍促進作用の 2 面性があることが知られている (16-18)(図 3B)。腫瘍抑制的な面として、増殖抑制作用や細胞死の誘導などが知られていて、逆にがんでは TGF- β 受容体や Smad の遺伝子の欠失・変異により TGF- β の腫瘍抑制的な面を回避している (18)。一方で、腫瘍促進的な面では、乳がん細胞を使用した実験において、変異 RAS との協調作用によって epithelial-mesenchymal transition (EMT) を引き起こすことや、細胞の浸潤能を上昇させること、また長期 TGF- β 刺激により mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルを安定化させがん幹細胞性の維持に寄与するといった報告、更には、JUNB との協調作用により細胞の浸潤能を上げるといった報告がある (19-22)。同様に、トリプルネガティブ乳がんに関する検討においても、TGF- β による細胞の遊走能や浸潤能の上昇、また、骨転移の亢進、細胞の生存能の上昇などが報告されている (23,24)。また、他のがん種ではあるものの、TGF- β は、がん細胞の major histocompatibility class (MHC) I の発現を低下させることにより、CD8+T 細胞を介した殺傷を回避するといった報告もなされている (25)。以上のことから、がん内在的な TGF- β シグナルを抑制することがトリプルネガティブ乳がんの治療戦略上重要であると考察される。しかしながら、トリプルネガティブ乳がんにおける腫瘍促進的な TGF- β の機能については未だ十分に明らかにはなっていない。

4. RLR シグナル及び TGF- β シグナルの相互作用

ここまで述べてきた RLR シグナルと TGF- β シグナルの間には相互作用が知られており、dsRNA リガンドにより活性化された IRF3 が Smad3 と相互作用することにより、Smad3 の T β RI への結合を阻害し、Smad3 のリン酸化を減弱させるモデルが提案されている (26)(図 4)。しかしながら、過去の検討の多くは非がん細胞を用いて行われており、がんにおけるこのシグナル相互作用の役割、特に、RLR アゴニストを治療薬として位置

付けた際の、RLR アゴニストのもたらす腫瘍抑制作用と、TGF- β シグナル抑制との関係やその生物学的重要性は明らかになっていない。

そこで本研究では、RLR アゴニストとして古典的に使用され、また、トランスフェクションによる腫瘍内投与に関する治験が行われている (13,14) polyI:C を使用し、トリプルネガティブ乳がんに対する polyI:C の腫瘍抑制効果と TGF- β シグナルの関連について検討することとした。

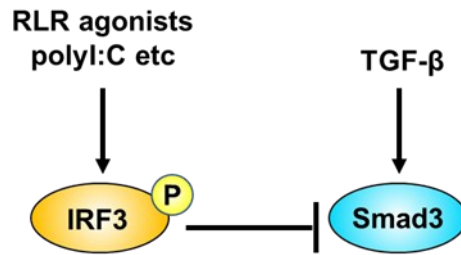


図 4. 過去に報告されている RLR シグナルと TGF-β シグナルの相互作用

RLR アゴニストによる RLR シグナルの活性化によってリン酸化された IRF3 が Smad3 に結合することで、Smad3 のリン酸化を行う TβRI への、Smad3 の集積が妨げられ、TGF-β シグナルが減弱することがあると報告されている (26)。

方法

1) 細胞培養

Hs578T 細胞 (HTB-126) と、BT-549 細胞 (HTB-122) は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) より購入し、10% fetal bovine serum (FBS; #SH30910.03, Thermo Fisher Scientific or #10270-106, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、50 U/mL penicillin、50 µg/mL streptomycin (Penicillin-Streptomycin; #15070-063, Gibco, Thermo Fisher Scientific)、0.01 mg/mL (Hs578T 細胞) または 0.00095 mg/mL (BT-549 細胞) の insulin (#12585 - 014, Gibco, Thermo Fisher Scientific) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; #11965, Gibco, Thermo Fisher Scientific、Hs578T 細胞) または、RPMI1640 media (#11875, Gibco, Thermo Fisher Scientific、BT-549 細胞) 中で培養した。

4T1 細胞は ATCC より、THP-1 細胞は JCRB Cell Bank (Osaka, Japan) より購入し、いずれも 10% FBS、50 U/mL penicillin、50 µg/mL streptomycin を含む RPMI1640 media 中で培養した。

Lenti-X-293T 細胞は、Clontech Laboratories (Takara Bio, Shiga, Japan) より入手し、10% FBS、50 U/mL penicillin、50 µg/mL streptomycin、2 mM L-Glutamine (#25030-081, Gibco, Thermo Fisher Scientific)、1× MEM-NEAA (#11140-050, Gibco, Thermo Fisher Scientific)、1 mM sodium pyruvate (#11360-070, Gibco, Thermo Fisher Scientific) を含む DMEM 中で培養した。細胞は 5% CO₂、37°C の条件下で培養した。

2) 試薬

Recombinant human TGF-β (TGF-β3; #243-B3-010) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より入手した。Nigericin (#t1rl-nig) は InvivoGen (San Diego, CA, USA) より入手し、

コルに従って抽出した。First - strand complementary DNAs (cDNAs) は PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (#6210A, Takara Bio) を用いて合成した。qRT-PCR は FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (#04913914001, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて、StepOnePlus Real-Time PCR System (#4376357, Thermo Fisher Scientific) によって行った。PCR のデータは *TBP* の発現によって補正した。プライマーの配列は以下に示す。

<i>hTBP</i>	Fwd	GTGGGGAGCTGTGATGTGAA
	Rev	TTGTTGGTGGGTGAGCACAA
<i>hZEB1</i>	Fwd	CAATGATCAGCCTCAATCTGCA
	Rev	CCATTGGTGGTTGATCCCA
<i>hLRRC15</i>	Fwd	CATGGTACCCAGACACACCC
	Rev	GCGGTCATCAGTGACCTGAA
<i>hSMAD7</i>	Fwd	TGCAACCCCATCACCTTAG
	Rev	GACAGTCTGCAGTTGGTTTGAGA
<i>hSERPINE1</i>	Fwd	GGCTGACTTCACGAGTCTTTCA
	Rev	ATGCGGGCTGAGACTATGACA
<i>hPMEPA1</i>	Fwd	TGTCAGGCAACGGAATCCC
	Rev	CAGGTACGGATAGGTGGGC
<i>hIFNB1</i>	Fwd	ACGCCGCATTGACCATCTAT
	Rev	GTCTCATTCCAGCCAGTGCT
<i>hPMAIP1 (Noxa)</i>	Fwd	CGCAAGAACGCTCAACCG
	Rev	ACTCGACTTCCAGCTCTGCT

5) RNA シーケンスとその解析

RNA シーケンスのためのライブラリ作成に際しては、RNeasy Mini Kit with RNase-Free DNase Set (QIAGEN)、Dynabeads mRNA DIRECT Micro Purification Kit、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、推奨プロトコルで行った。cDNA ライブラリは Ion Library TaqMan Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) によって定量した。シーケンスは Ion PI Hi Q Chef Kit (Thermo Fisher Scientific)、及び、Ion PI Chip Kit v3 (A26770, Thermo Fisher Scientific) を用いて、Ion Proton System (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った。リードは、TopHat2 open-source bioinformatics tool を使用して、human genome (Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37)/hg19) にアラインした。Fragments per kilobases of exon per million sequence reads (FPKM) 値は Cufflinks の Cuffdiff 機能を用いて算出した。シーケンスの生データは Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession number GSE152414) にデポジットした。

6) Gene set enrichment analysis (GSEA)

FPKM の平均値は 2 回の独立した実験より調製したサンプルのデータから算出した。GSEA に用いた遺伝子は、いずれかの条件の FPKM 値が 10 以上のものを使用した。解析は、デフォルトの設定で行い、chip platform の “Human_NCBI_Entrez_Gene_ID_MSigDB.v7.1.chip” を遺伝子名のデータとして使用した。“M_UP”、“IM_DOWN” の遺伝子セットは、Lehmann et al. (27) より得た。

7) Gene Ontology 解析

Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE, “CCLE_DepMap_18q3_RNAseq_RPKM_20180718.gct”) より、各々のがん細胞株の遺伝子の発現量である reads per kilobases of exon per million sequence reads (RPKM) 値を得た。

各遺伝子リストに対する Gene ontology 解析は、解析ツール “Enrichr” (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) (28,29) を使用して行った。

8) イムノブロット

細胞は、PBS で洗った後に、cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (#05056489001, Roche Diagnostics)、及び Phosphatase Inhibitor Cocktail (EDTA - free; #07575-51, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む RIPA buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.1% SDS; and 0.5% sodium deoxycholate) によって溶解した。gasdermin D (GSDMD)、及び gasdermin E (GSDME) を検出する際は、溶解したサンプルに対して、30 秒のインターバルを挟んで、2 度、30 秒間、power high での超音波処理を Bioruptor UCD-200TM sonicator (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) によって行った。細胞の残渣は 15,000 rpm、10 min、4°C による遠心操作にて取り除いた。すべてのサンプルは、Pierce BCA Protein Assay Reagent A/B (#23223, #23224, Thermo Fisher Scientific) によって、タンパク質を定量し、その量を合わせた。電気泳動によりタンパク質を分子量によって分離する目的で SDS-PAGE を行い、その後、Fluoro Trans W membranes (#BSP0161, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) にトランスファーした。メンブレンは Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T) に懸濁した 5% スキムミルクによってブロッキングを行った。TBS-T によって洗った後、メンブレンは Can Get Signal Solution 1 (#NKB-201, TOYOBO, Osaka, Japan) に懸濁した 1 次抗体中でインキュベートした。プロットは、LAS-4000 image analysis system (Fujifilm, Tokyo, Japan) で可視化した。

使用した抗体は以下に記載する。

anti-GSDME (#ab215191)、anti-Smad3 (#ab40854)、anti-phospho-Smad3 Ser423/Ser425 (#ab52903)、anti-phospho-IRF3 Ser386 (#ab76493) 抗体はアブカムより購入した。

anti-GSDMD (#93709)、anti-phospho-IRF3 Ser396 (#4947)、anti-MDA5 (#5321)、anti-RIG-I (#3743)、anti-Noxa (#14766)、anti-phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182 (#9211)、anti-p38 α MAPK (#9228)、anti-HSP27 (#2402) 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より購入した。

anti-GAPDH (#G8795) と anti-phospho-HSP27 Ser78 抗体は Sigma-Aldrich (Merck) より購入した。

anti-IRF3 (Cat #655704) 抗体は BioLegend (San Diego, CA, USA) より購入した。

9) Annexin V、PI 染色

染色に際しては、浮遊、接着細胞をすべて回収し、eBioscience Annexin V Apoptosis Detection Kit APC (#88-8007-72, Thermo Fisher Scientific) を用いて推奨プロトコルにて染色を行った。フローサイトメトリーは Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を使い、FlowJo software (Franklin Lakes, NJ, USA) にてデータを解析した。

10) 顕微鏡観察

観察には、IX70 microscope with DP72 microscope digital camera (Olympus, Tokyo, Japan)、及び、BZ-X710 microscope (Keyence, Osaka, Japan) を使用した。

11) Lactate dehydrogenase (LDH) 放出アッセイ

細胞がコンフルエントになるのを避けるために、polyI:C のトランスフェクションより 60、72 時間後の LDH 放出値 (%) を求める条件では、Hs578T 細胞を 96 ウェルプレートに 2×10^4 cells/well で播種し、polyI:C のトランスフェクションより 36、48 時間後、及び mock トランスフェクションにおける LDH 放出値 (%) を求める条件では、Hs578T

細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^4 cells/well で播種した。%LDH は 推奨プロトコルに従い、CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (#G1780, Promega) を用いて求めた。発色基質を入れてから 10 分後、反応停止液を入れ 490 nm の吸光度を Model 680 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にて測定した。

12) カスパーゼ 3/7 活性の測定

HA、及び恒常活性型 Smad3 (caSmad3) を発現する Hs578T 細胞は 1×10^4 cells/well で 96 ウェルプレートに播種し、片方のプレートを使用して、推奨プロトコルにて Caspase-Glo 3/7 Assay System (#G8090, Promega) を用いてカスパーゼ 3/7 の活性を測定した。基質を加えてから 1 時間後、発光強度を Mithras LB 940FP microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) を使用して測定した。もう片方のプレートを使用して、トリパンブルー染色にて生細胞をカウントした。

13) Smad2 の Chromatin immunoprecipitation (ChIP) シーケンスデータ

activin A で刺激した Hs578T 細胞に対する抗 Smad2 抗体を使用した ChIP シーケンスデータは過去のデータより取得した (GEO, accession number GSM3301952) (30)。Smad2 の標的遺伝子座への結合は UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly を用いて表示した。

14) レンチウイルス産生と感染

lentiCRISPR v2 プラスミドは Feng Zhang (#52961, Addgene, Watertown, MA, USA; <http://n2t.net/addgene:52961>) より供与を受けた。Cas9 と guide RNAs (gRNAs) を発現するレンチウイルスベクターの作成に当たっては、遺伝子特異的な gRNA を CHOPCHOP

(<https://chopchop.cbu.uib.no/>) を用いてデザインし、lentiCRISPR v2 に挿入した。各遺伝子に対する gRNA、またはコントロール gRNA (31) を発現させるために lentiCRISPR v2 に挿入した gRNA を含むオリゴ配列は以下に示す。caSmad3 の cDNA 及び、CSII-CAG-MCS-IRES-puro のレンチウイルスベクターは (30) に記載されている。具体的には、CSII-EF-RfA に由来し、CAG プロモーター下に挿入した cDNA が発現するようにデザインされた CSII-CAG-MCS-IRES-puro のマルチクローニングサイト (MCS) に caSmad3、またはコントロールである HA を挿入している。CSII-EF-RfA は、故 三好浩之先生 (元慶應大学, Tokyo, Japan) より供与を受けた。caSmad3 の cDNA は Smad3 の C 末端のリン酸化サイト (SSVS) を DDVD に変えたものである (32)。レンチウイルスの作成は、上記プラスミドを pCMV-VSV-G-RSV-Rev、及び pCAG-HIVgp (故 三好浩之先生より供与を受けた) と共に Lenti-X-293T 細胞にトランスフェクションすることにより行った。レンチウイルスを含む培養上清は 0.45 µm のフィルターを通し、Lenti-X Concentrator (#631232, TaKaRa Bio) によって濃縮した。感染細胞は puromycin (ant-pr, InvivoGen) で 4 日間、10 µg/mL (Hs578T 細胞、4T1 細胞)、または 5 日間、10 µg/mL (BT-549 細胞) 処理した。caSmad3 を発現する Hs578T 細胞は樹立後 1 か月の以内に使用した。

MDA5 gRNA#1	Fwd	CACCGCGAATTCCTCGAGTCCAACCA
	Rev	AAACTGGTTGGACTCGGGAATTCGC
MDA5 gRNA#2	Fwd	CACCGTCATGTAGCGGGCGGCCAGA
	Rev	AAACTCTGGCCGCCCGCTACATGAC
RIG-I gRNA#1	Fwd	CACCGGGATTATATCCGGAAGACCC
	Rev	AAACGGGTCTTCCGGATATAATCCC
RIG-I gRNA#2	Fwd	CACCGTACCTACATCCTGAGCTACA

	Rev	AAACTGTAGCTCAGGATGTAGGTAC
control gRNA	Fwd	CACCGATCGTTTCCGCTTAACGGCG
	Rev	AAACCGCCGTTAAGCGGAAACGATC

15) *in vivo* での polyI:C による治療実験

動物実験は、東京大学の動物実験委員会による承認済の実験計画 (承認番号: 医-P16-140) に準拠して行った。マウスは Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) より購入した。イソフルラン (#099-06571, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) で麻酔した、8-10 週齢のメスの BALB/c マウスの乳腺脂肪パッドに、 5×10^5 個の 4T1 細胞を同種移植した。腫瘍径は測径器により計測し、腫瘍体積 (V) は $V = ((\text{長径}) \times (\text{短径})^2) / 2$ によって求めた。

腫瘍内への polyI:C 投与は、推奨プロトコルにて *in vivo* jetPEI transfection reagent with glucose solution (#201, Polyplus-transfection, Illkirch, France) を用いて行い、ionic balance は N/P = 6 とした。1 匹のマウス当たり 20 μg の polyI:C、または相当する精製水を含む計 100 μL の懸濁液を、イソフルランにより麻酔を行ったマウスの腫瘍内に投与した。腫瘍重量は day 21、またはエンドポイント (体重減少 (初めより 20%超、または 1 週当たり 10%超の減少)、腫瘍径平均が 1.2 cm 超、行動障害等見た目の著しい不調) に達した日に計測した。腫瘍サンプルは瞬間凍結し、使用するまで -80°C で保存した。

16) 免疫組織染色

腫瘍サンプルは厚み 7 μm に切断し、4% パラホルムアルデヒドで 10 分固定した。腫瘍切片は洗浄後、Blocking One reagent (#03953-95, Nacalai Tesque) でブロッキングを行った。ブロッキング後の標本は Blocking One reagent に懸濁した 1 次抗体中で 4°C 、O/N でインキュベートした。プレートを洗浄後、Blocking One reagent に懸濁した 2 次抗体中

で 37°C、30 分インキュベートした。更に洗浄後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Fluoromount-G (#0100-20, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) で封入し、BZ-X710 microscope (Keyence) で解析した。解析においては、非特異的なシグナルと思われる強いシグナル強度を持つ箇所は取り除いた。抗体は以下に示すものを使用した。

SMAD3 phospho-S423/phospho-S425 antibody (#600-401-919, Rockland Immunochemicals, Limerick, PA, USA)、 rabbit IgG-UNLB (アイソタイプコントロール, #0111-01, SouthernBiotech)、 goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 (#A-11008, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)。

17) 統計解析

2 群間の比較には Student's t-test を使用し、多群比較には Tukey-Kramer test を使用した。

結果

1. トリプルネガティブ乳がんにおける polyI:C トランスフェクションの TGF- β シグナルに対する影響

トリプルネガティブ乳がんにおける polyI:C トランスフェクションが、TGF- β シグナルに与える影響を評価するために、まず、トリプルネガティブ乳がんにおける RLR シグナルの活性化を確認した。検討においては、トリプルネガティブ乳がん細胞として広く使用されており、かつ、Smad3 のリン酸化による TGF- β シグナルの活性化がすでに報告されている (33)、Hs578T 細胞を使用した。すると、Hs578T 細胞に対する 1 μ g/mL の polyI:C トランスフェクションによって、自身の活性化に重要とされる IRF3 の C 末端のセリン残基のリン酸化 (Ser386) (34) が確認された (図 5)。過去に報告があるように、PRR シグナルの活性化による、IRF3 のタンパク量の減少が同時に確認された (35,36)。次に、polyI:C の TGF- β シグナルに対する影響を評価し、polyI:C が MDA5 や RIG-I の発現上昇を伴って Smad3 のリン酸化を抑制することが分かった (図 6A)。更に、*ZEB1* や *LRRIC15* (37)、*PMEPA1* などの TGF- β の標的遺伝子の、TGF- β による発現誘導も polyI:C のトランスフェクションにより抑制されることが分かった (図 6B)。ちなみに、TGF- β の典型的な標的遺伝子の 1 つである *SERPINE1* は、炎症応答における標的でもあることが知られており、polyI:C のトランスフェクションによって TGF- β の刺激がない状態でも強く誘導され、また、*SMAD7* は本実験条件下においては強く誘導されなかった (図 6C)。以上の結果から、polyI:C のトランスフェクションは、Smad3 のリン酸化を抑制することにより、TGF- β シグナルを抑制し、その標的遺伝子の発現誘導も抑制していることが分かった。

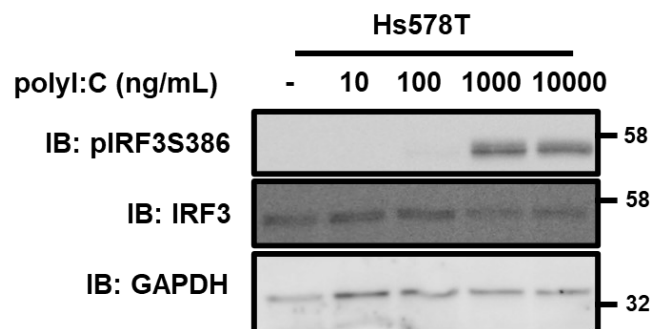


図 5. Hs578T 細胞における polyI:C トランスフェクションに対する応答

Hs578T 細胞に対して polyI:C を図の容量でトランスフェクションした際の、7.5 時間後のタンパク質をイムノブロットにより解析した。IB: イムノブロット。

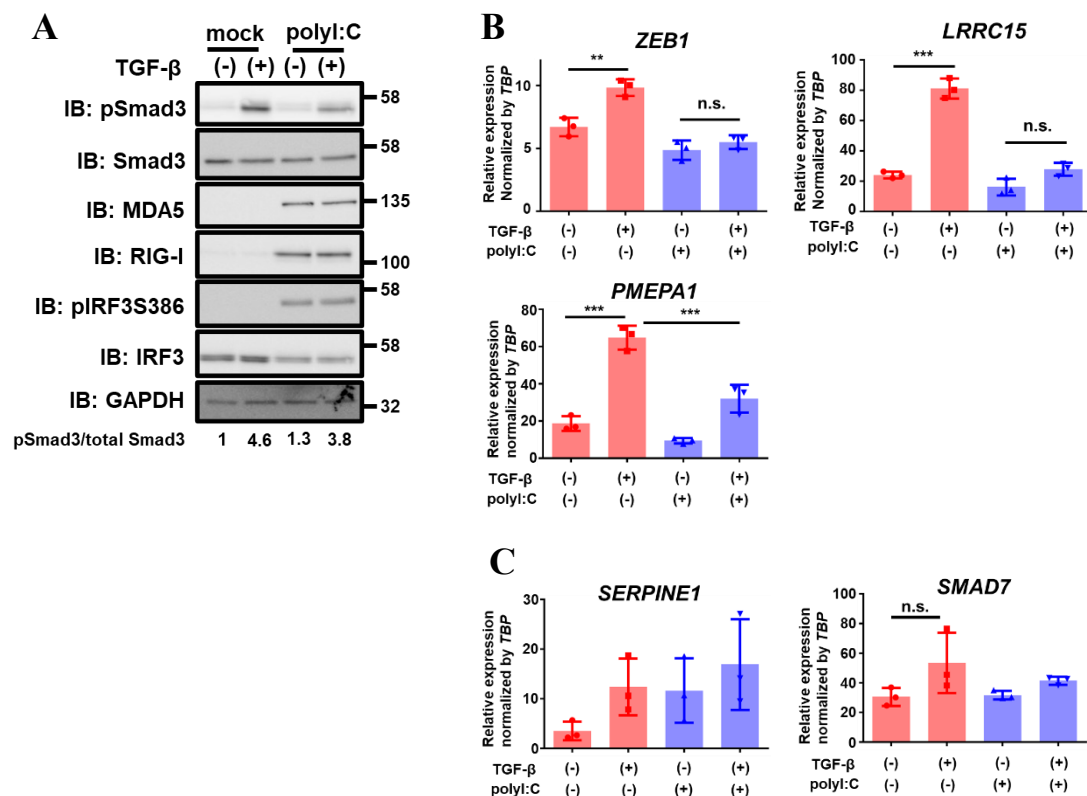


図 6. Hs578T 細胞における polyI:C トランスフェクションによる TGF-β シグナルへの影響

(A) Hs578T 細胞に polyI:C (1 μg/mL) をトランスフェクションしてから 12 時間後に TGF-β (1 ng/mL) で 1.5 時間、細胞を刺激した。回収したタンパク質は免疫ブロットにより解析した。2 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

(B, C) Hs578T 細胞に polyI:C (1 μg/mL) をトランスフェクションしてから 12 時間後に TGF-β (1 ng/mL) で 6 時間、細胞を刺激した。RNA を回収し、*ZEB1*、*LRRC15*、*PMEPA1* の遺伝子発現 (B)、及び、*SERPINE1*、*SMAD7* の遺伝子発現 (C) を qRT-PCR にて解析した。補正には *TBP* を用いた。図は 3 回の独立した実験の結果とその平均を示し、エラーバーは S.D.を示している。 **P < 0.01、***P < 0.001、 n.s.: not significant。

続いて、この polyI:C による TGF- β シグナルの抑制が RLRs 依存的に起きているのか検討した。レンチウイルス感染により、MDA5 と RIG-I に対する gRNA と Cas9 を同時に発現させ、MDA5、RIG-I に対する遺伝子不活化を行った Hs578T 細胞を作成した。すると、MDA5、RIG-I の遺伝子不活化によって、polyI:C によって誘導される IRF3 のリン酸化や MDA5 や RIG-I のタンパク質の上昇、また、IRF3 の標的遺伝子である *IFNB1* の誘導が、それぞれ大きく減弱していた (図 7A、7B) ことから、MDA5 と RIG-I の遺伝子不活化が効率よく達成されていることが示唆された。加えてこの遺伝子不活化効率は、#2 よりも、#1 の gRNA 配列のペアでより良く達成されていることも示唆された。その上で対照 gRNA (con gRNA) 発現群で確認された polyI:C による Smad3 のリン酸の抑制は、MDA5 や RIG-I の遺伝子不活化によって解除されており (図 7A)、また、TGF- β の標的遺伝子の polyI:C による発現誘導の抑制も MDA5 や RIG-I の遺伝子不活化によって部分的に解除された (図 7C)。これらの結果から、MDA5、RIG-I 依存的に polyI:C のトランスフェクションによる TGF- β シグナルの抑制が起きていることが示唆された。

更に、RLR シグナルによる TGF- β シグナルの抑制が腫瘍内発生的にも起きている可能性を検討した。CCLE のデータベースより、トリプルネガティブ乳がん細胞株において、MDA5 と発現が逆相関する遺伝子群を抽出し、Gene ontology 解析を行ったところ、“Panther_2016” のオントロジーにおいて、MDA5 と逆相関する遺伝子群として唯一濃縮していたのが TGF- β シグナルであった (図 8A)。一方、MDA5 と相関する遺伝子群では期待された、“Toll receptor signaling pathway” が最上位に濃縮してきた (図 8A)。別のオントロジーである “WikiPathways_2019_Human” を使用しても、MDA5 と逆相関する遺伝子群にはその上位に TGF- β シグナルが濃縮し、逆に、相関する遺伝子群にはインターフェロンシグナルの濃縮が確認された (図 8B)。また、トリプルネガティブ乳がん

おけるゲノムワイドな TGF- β の標的遺伝子を同定するために、Hs578T 細胞に対して TGF- β の刺激の有無で RNA-seq を行い (表 1)、先ほど用いた MDA5 と発現が逆相関する遺伝子群に対して GSEA を行った。すると、トリプルネガティブ乳がん細胞で、MDA5 と発現が逆相関する遺伝子群の多くは Hs578T 細胞における TGF- β の標的遺伝子であることが分かった (図 8C)。加えて、トリプルネガティブ乳がんの分子サブタイプ (27) に着目した解析も行った。TGF- β シグナルの活性化が特徴の一つとして報告されている mesenchymal サブタイプで発現が上昇している遺伝子の多くは、確かに Hs578T 細胞における TGF- β 刺激によっても上昇していた (図 8D)。逆に、免疫に関わるシグナルの活性化が特徴の 1 つとして報告されている immunomodulatory サブタイプで発現が抑制されている遺伝子の多くは、Hs578T 細胞における TGF- β 刺激によって同様に上昇していた (図 8E)。これらの結果から、内在的な RLR シグナルの活性化が同様に TGF- β シグナルを抑制している可能性が示唆された。

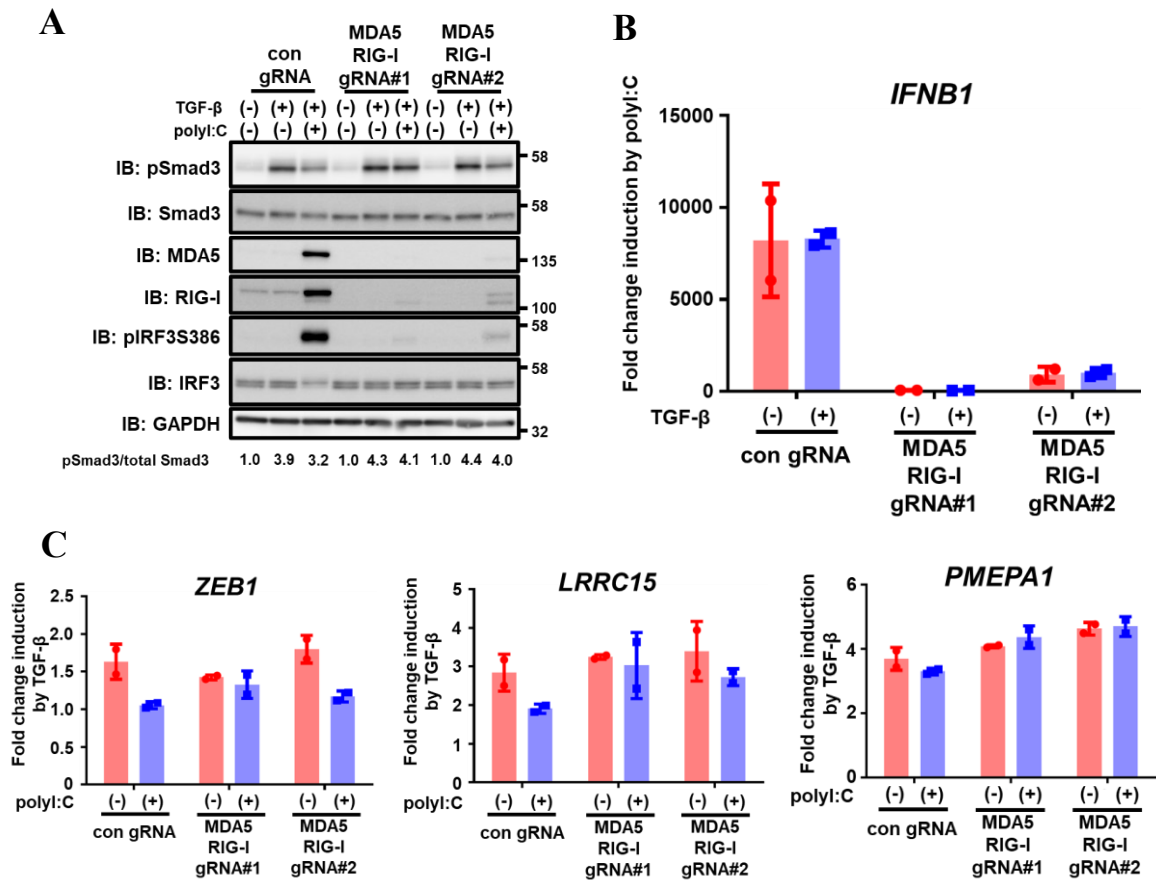


図 7. Hs578T 細胞における MDA-5、RIG-I の遺伝子不活化と polyI:C トランスフェクションによる TGF- β シグナルの抑制に対する影響

MDA5、RIG-I 遺伝子に対する gRNA、または非標的コントロール gRNA を恒常的に発現する Hs578T-Cas9 細胞に対して解析を行った。

(A) polyI:C (1 μ g/mL)をトランスフェクションしてから 12 時間後に TGF- β (1 ng/mL)で 1.5 時間細胞を刺激した。回収したタンパク質は免疫ブロットにより解析した。3 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

(B, C) polyI:C (1 μ g/mL)をトランスフェクションしてから 12 時間後に TGF- β (1 ng/mL)で 6 時間細胞を刺激した。RNA を回収し、*IFNB1* の遺伝子発現 (B) と、*ZEB1*、*LRRC15*、*PMEPA1* の遺伝子発現 (C) を qRT-PCR にて解析し、(B) では、polyI:C による発現上昇を、(C) では TGF- β による発現上昇を fold change で評価した。各遺伝子の発現の補正

には *TBP* を用いた。図は 2 回の独立した実験の結果と平均を示す。エラーバーは S.D. を示している。

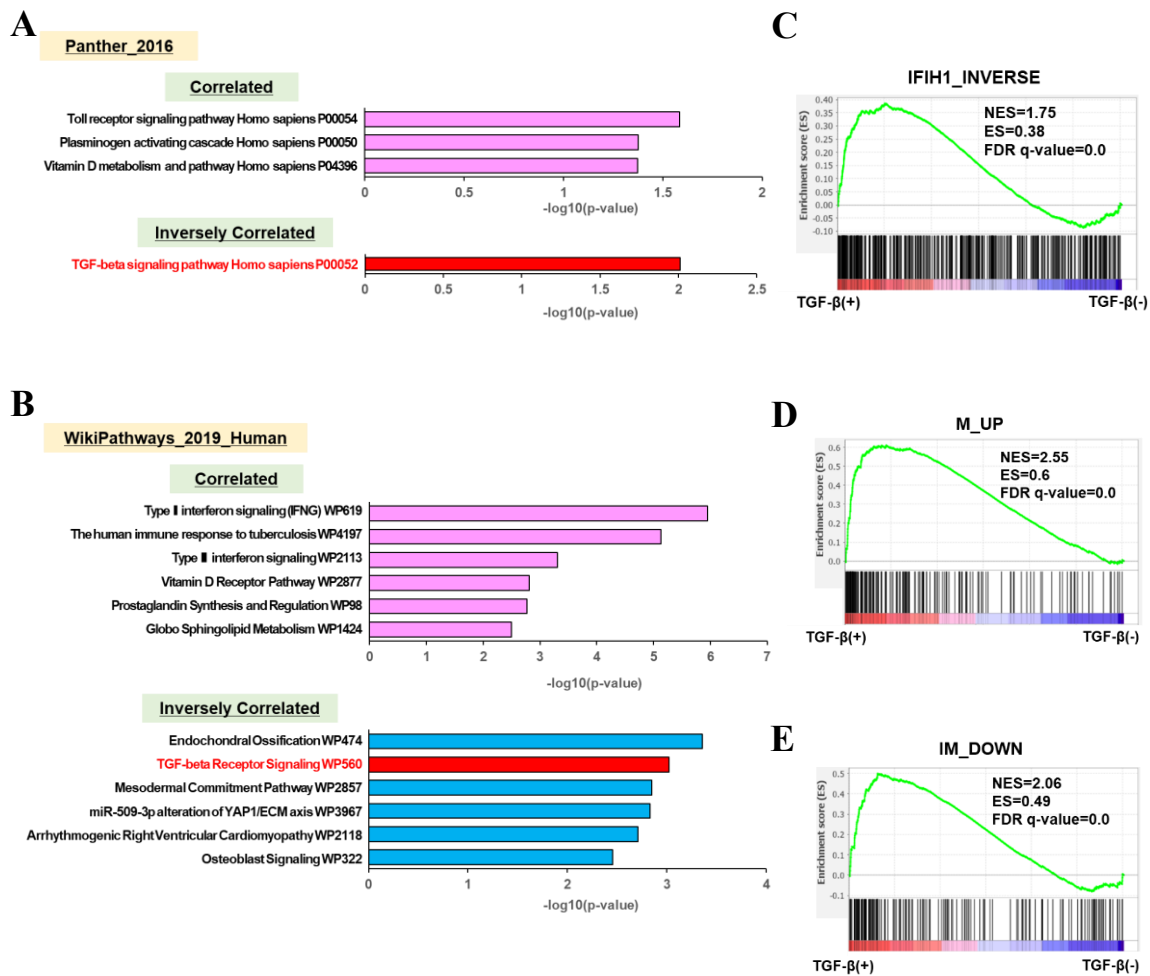


図 8. 腫瘍内在的な RLR シグナルの活性化と TGF- β シグナルの抑制に関する示唆

(A、B) Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) データベースより抽出したトリプルネガティブ乳がん細胞株 ($n=24$) を対象として、MDA5 をコードする *IFIH1* と、発現が相関、及び逆相関する遺伝子群に対する Gene ontology 解析の結果。Log10(RPKM_{MDA5} + 0.1) + 1 と、Log10(RPKM_{gene} + 0.1) + 1 に対して、傾き (S)、相関係数 (T) を求め、正に相関する遺伝子群 ($S > 0.2, T^2 > 0.06, 3,672$ 遺伝子)、及び負に相関する遺伝子群 ($S < -0.2, T^2 > 0.06, 1,598$ 遺伝子) を抽出し、“Panther_2016” (A) と、“WikiPathways_2019_Human” (B) に対して解析を行った。p < 0.05 となる上位 6 つのオントロジーまでを図に示している。

(C-E) Hs578T 細胞に対して TGF- β (1 ng/mL) による刺激を 24 時間行った際の遺伝子発

現データを取得し、(A, B) で抽出した MDA5 と負に相関する遺伝子群 (C)、トリプルネガティブ乳がんサブタイプ (27) の mesenchymal (M) サブタイプで発現の上昇が報告されている遺伝子群 (D)、immunomodulatory (IM) サブタイプで発現の抑制が報告されている遺伝子群 (E)、のそれぞれに対して Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。

Gene symbol	(-) replicate 1	(-) replicate 2	TGF-β replicate 1	TGF-β replicate 2	average (-)	average TGF-β	Fold change
ACTC1	0.8	0.7	10.2	10.4	0.8	10.3	13.6
FOXS1	0.9	0.8	10.6	13.1	0.9	11.9	13.4
CDKN2B	5.2	9.9	78.2	113.7	7.5	95.9	12.7
LRRCL5	3.7	3.0	23.4	23.0	3.3	23.2	6.9
KRT17	92.1	128.3	750.2	723.7	110.2	737.0	6.7
C5orf46	13.1	18.6	113.9	91.2	15.8	102.5	6.5
IL11	18.0	16.3	101.9	113.3	17.1	107.6	6.3
STK3BL	2.3	3.6	15.5	16.3	3.0	15.9	5.4
INHBE	4.9	3.9	21.2	25.2	4.4	23.2	5.3
SERPINE1	314.0	235.1	1440.3	1434.5	274.6	1437.4	5.2
WNT11	4.3	2.7	14.8	20.9	3.5	17.9	5.1
EDN1	31.4	22.8	141.9	126.4	27.1	134.1	5.0
MPFR4	12.2	14.0	62.2	60.1	13.1	61.2	4.7
ADAM19	11.4	8.8	47.8	48.1	10.1	47.0	4.7
RHOB	19.8	18.3	87.4	84.9	19.0	86.2	4.5
TUFT1	3.9	4.5	17.6	19.8	4.2	18.7	4.4
SIK1	4.2	3.9	16.8	19.1	4.0	17.9	4.4
TGFB1	855.3	962.4	3497.8	3995.1	908.8	3746.5	4.1
MAMDC2	2.9	2.1	10.9	9.1	2.5	10.1	4.0
GDF6	3.3	3.3	12.5	13.6	3.3	13.0	4.0
NUAK1	4.5	4.1	17.4	16.7	4.3	17.1	3.9
DACT1	6.3	8.0	24.8	30.0	7.2	27.4	3.8
PMEP1	14.8	11.7	49.0	51.0	13.2	50.0	3.8
CTGF	494.4	508.5	1882.8	1807.6	501.5	1845.2	3.7
GADD45B	55.2	58.3	217.2	198.9	56.7	208.0	3.7
C21orf1	3.1	3.8	13.7	11.4	3.4	12.4	3.6
GLIPR2	4.8	7.4	21.2	22.3	6.1	21.8	3.6
LBH	9.0	7.2	26.4	30.6	8.1	28.5	3.5
ITGA1	4.5	5.4	18.6	15.9	5.0	17.2	3.5
RBP1	2.2	5.3	11.0	14.6	3.7	12.8	3.4
SERPINE2	116.9	90.8	360.9	349.7	103.8	355.3	3.4
LTF2	17.9	13.5	53.8	51.4	15.7	53.8	3.4
DSP	3.5	2.6	11.6	9.0	3.1	10.3	3.4
LMCD1	14.9	19.7	47.2	66.4	17.3	56.8	3.3
IER3	154.4	179.9	483.2	601.2	167.2	542.2	3.2
SIM2	3.8	4.7	14.1	13.1	4.3	13.6	3.2
ACOX3	9.6	10.5	29.9	31.9	10.1	30.9	3.1
IL6	7.8	9.0	24.8	25.6	8.4	25.2	3.0
XYLT1	4.9	4.2	12.9	14.1	4.6	13.5	3.0
F3	23.9	27.2	79.8	69.7	25.5	74.7	2.9
AMIGO2	17.4	14.2	50.7	41.5	15.8	46.1	2.9
C7orf10	9.7	13.3	30.2	36.4	11.5	33.3	2.9
LIPG	7.0	7.7	19.3	23.1	7.3	21.2	2.9
FBXO32	4.7	7.3	15.6	18.9	6.0	17.3	2.9
CHAC1	14.6	15.4	37.5	48.9	15.0	43.2	2.9
PKNOX2	4.0	4.3	11.2	12.5	4.1	11.8	2.9
TNFAIP6	3.6	3.8	10.4	10.4	3.7	10.4	2.8
ENC1	8.6	9.5	24.9	25.8	9.0	25.4	2.8
ADM2	6.3	5.6	16.3	16.5	5.9	16.4	2.8
LOC28382	4.6	4.6	12.0	13.1	4.6	12.8	2.7
BHLHE40	22.2	25.5	61.8	68.3	23.8	65.0	2.7
PIK3CD	8.0	6.9	21.0	19.0	7.5	20.0	2.7
IGFBP3	121.5	195.1	389.2	460.0	158.3	424.6	2.7
CYTH1	11.2	10.6	30.1	28.3	10.9	29.2	2.7
TRIM62	11.4	9.9	29.7	26.5	10.7	28.1	2.6
DUSP7	9.1	13.8	28.2	34.1	11.5	30.2	2.6
INHBA	101.9	86.4	242.4	251.9	94.2	247.1	2.6
CLTCL1	3.9	4.4	10.9	10.8	4.1	10.8	2.6
FSTL3	40.6	30.7	90.7	94.9	35.6	92.8	2.6
VCAN	37.1	40.3	103.9	95.0	38.7	99.5	2.6
GLS	14.0	18.3	44.5	37.6	16.1	41.1	2.5
RNY5	123.3	0.0	0.0	312.4	61.6	156.2	2.5
INVS1ABP	9.9	10.2	25.6	24.1	10.0	25.3	2.5
FBLN5	7.3	6.4	18.6	15.8	6.8	17.2	2.5
KIF26B	6.6	6.3	14.9	17.4	6.5	16.1	2.5
JUNB	25.2	35.4	63.3	87.3	30.3	75.3	2.5
OXTN	33.4	32.2	86.0	75.8	32.8	80.9	2.5
BPGM	26.5	23.6	61.5	61.7	25.1	61.6	2.5
CSRNP1	7.7	7.0	18.8	16.8	7.3	17.8	2.4
TSC22D3	8.8	7.6	17.4	22.3	8.2	19.9	2.4
ASNS	23.8	29.6	65.1	63.2	26.7	64.2	2.4
PAWR	12.6	13.0	31.7	29.6	12.8	30.6	2.4
NREP	64.5	91.3	173.7	198.0	77.9	185.8	2.4
PKDC1	65.1	61.0	155.4	144.2	63.0	149.8	2.4
SORBS2	5.7	7.7	14.0	17.9	6.7	16.0	2.4
UVRAG	5.6	5.3	12.3	13.4	5.4	12.8	2.4
DCLK2	6.4	5.4	12.7	14.9	5.9	13.8	2.4
EFHD1	7.3	8.6	19.4	17.3	8.0	18.4	2.3
MEST	3.3	6.9	12.2	11.3	5.1	11.7	2.3
XBP1	72.1	100.9	207.3	190.9	86.5	199.1	2.3
NEDD9	15.3	18.2	37.7	38.7	16.7	38.2	2.3
COL4A1	314.3	223.5	625.7	601.7	268.9	613.7	2.3
THBS1	181.6	156.1	425.6	344.4	168.9	385.0	2.3
CHSY3	5.2	6.0	12.6	12.9	5.6	12.7	2.3
MEGF6	24.9	17.7	50.4	45.7	21.3	48.0	2.3
FOXF1	3.7	5.3	10.5	9.7	4.5	10.1	2.3
TMEM45A	22.6	21.4	49.0	49.9	22.0	49.5	2.2
CALD1	284.5	303.7	672.9	639.2	294.1	656.0	2.2
ACTG2	534.5	664.0	1252.5	1410.9	599.3	1331.7	2.2
CSRFP2	17.8	36.0	58.1	61.6	26.9	59.8	2.2
RALA	9.5	13.6	26.2	25.1	11.6	25.6	2.2
SEMA3C	9.5	10.1	23.3	19.9	9.8	21.6	2.2
NPR3	4.8	6.1	11.8	12.1	5.4	11.9	2.2
FERMT2	41.5	43.1	101.8	83.8	42.3	92.8	2.2
TRIB1	7.5	7.4	15.2	17.4	7.5	16.3	2.2
HIC1	16.6	22.8	40.8	45.1	19.7	43.0	2.2
EPHB2	10.5	7.8	20.9	19.2	9.2	20.0	2.2
RMRP	6.0	5.9	10.3	15.8	6.0	13.0	2.2
CALM2	236.6	317.1	630.6	570.2	276.8	600.4	2.2
PCLM3	5.5	4.0	10.6	9.8	4.7	10.2	2.1

表 1. Hs578T 細胞に対して TGF-β で刺激した際に発現が上昇する上位 100 遺伝子
Hs578T 細胞を TGF-β (1 ng/mL) で刺激し、回収したサンプルを RNA シーケンスにより解析した。TGF-β による発現上昇 (fold change-induction) は、FPKM の平均値を用いた。いずれかの条件における FPKM 値が 10 以上の遺伝子を抽出している。

2. polyI:C による TGF- β シグナルの抑制の細胞死への影響

細胞死の誘導は、polyI:C のトランスフェクションによって期待される表現型の 1 つであることから (8,12)、Hs578T 細胞における polyI:C による TGF- β シグナルの抑制が、細胞死をより促進するのか検討した。具体的には、Smad3 の C 末端のリン酸化部位のセリン残基 SSVS をアスパラギン酸残基 DDVD に変えた恒常活性型 Smad3 (caSmad3) (32) を Hs578T 細胞に恒常的に発現させた株を作成し (図 9)、解析を行った。caSmad3 を恒常的に発現させることにより、polyI:C により阻害される Smad3 を介したシグナルの下流での、シグナルの活性化が期待される。polyI:C のトランスフェクションにより、コントロールである Hs578T-HA 細胞では細胞死の過程と考えられる多くの浮遊細胞を認めたが、caSmad3 を過剰発現した細胞では、浮遊せず培養プレートに接着し続ける細胞が増えていた (図 10A)。そこで、これら浮遊してきた細胞、接着し続ける細胞をすべて回収し、annexin V と propidium iodide (PI) で染色することによって、フローサイトメーターによる解析を行い、細胞死を評価した。その結果、polyI:C のトランスフェクションによって大きく増加する annexin V 陽性、PI 陽性の細胞の割合が caSmad3 の過剰発現により、減少していた (図 10B、C)。一方、TGF- β を投与した群では細胞死は回避できておらず、polyI:C により TGF- β の下流の因子である Smad3 のリン酸化が抑制され、機能が阻害されることで、細胞死を抑制するための十分なシグナル強度が得られていないのではないかと考えた。そこで、TGF- β を前処理した条件で同様の実験を行うと、TGF- β の前処理によって、polyI:C による細胞死が抑制される傾向を認めたがその程度はやはり限られており、異なる条件においても polyI:C による抑制により、細胞死を抑制するために十分なシグナル強度が得られないことが示唆された (図 11)。これらの結果から、caSmad3 の過剰発現が、Hs578T における polyI:C による細胞死を抑制することが考察された。

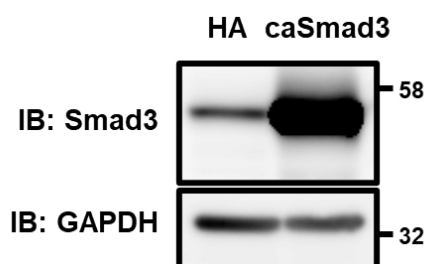


図 9. レンチウイルスによる遺伝子導入を行った caSmad3 を過剰発現する Hs578T 細胞における Smad3 の発現の確認

レンチウイルスによる遺伝子導入によって樹立した Hs578T-caSmad3 細胞の Smad3 の発現を、細胞のタンパク質を回収することによるイムノブロットにより解析した。

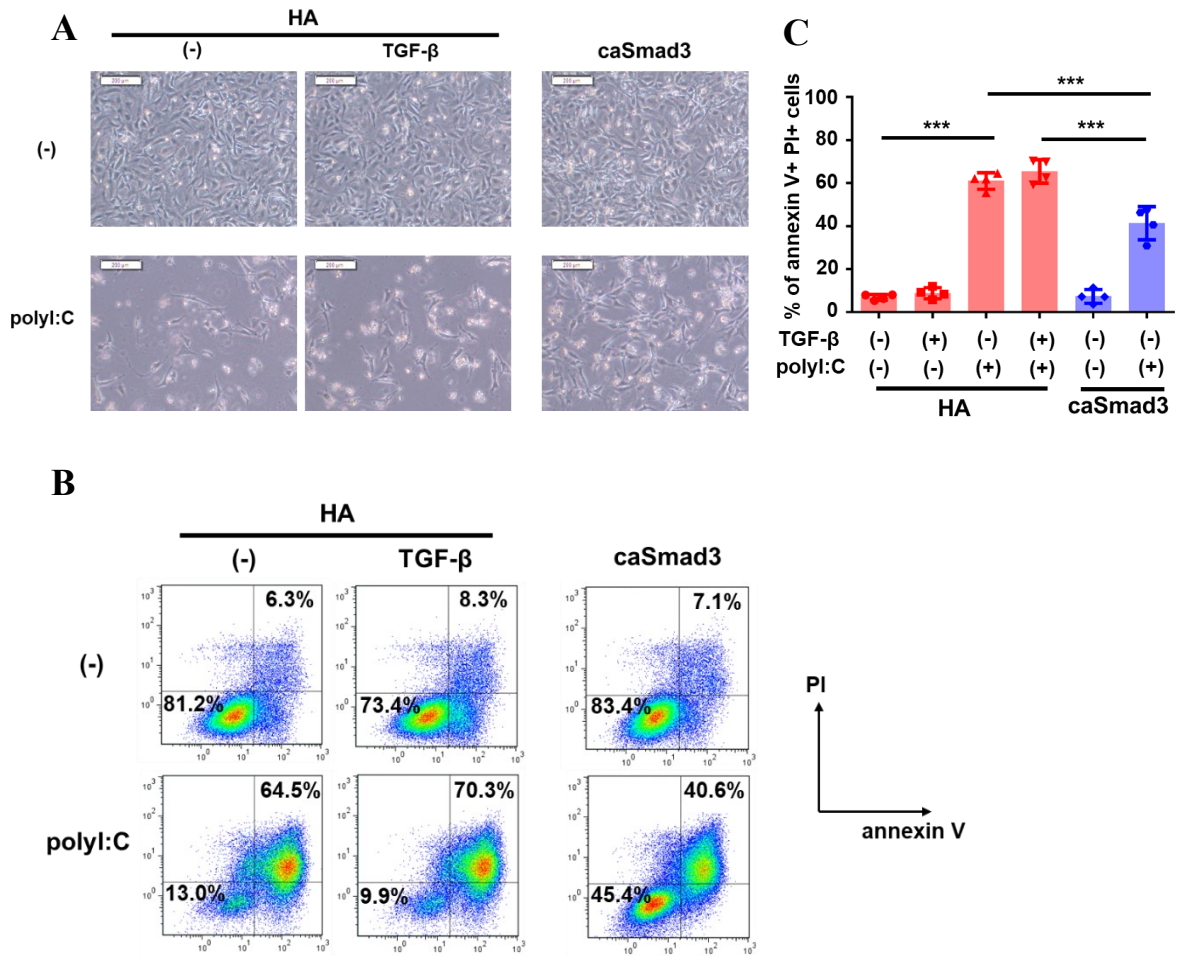


図 10. Hs578T 細胞において caSmad3 の過剰発現は polyI:C による細胞死を部分的に抑制した

HA(コントロール) または、caSmad3 を恒常的に発現する Hs578T 細胞に対して、polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 12 時間後、無血清培地に変え、該当する細胞には TGF- β (1 ng/mL) の刺激を行った。更に 36 時間後、以下の解析を行った。

(A) Hs578T-HA、及び-caSmad3 細胞における polyI:C をトランスフェクションしたのちの位相差顕微鏡像の比較。スケールバーは 200 μm を示す。

(B、C) polyI:C をトランスフェクションした細胞を annexin V-APC 及び propidium iodide (PI) で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。forward scatter (FSC)、及び

side scatter (SSC) によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の細胞の割合を評価した。得られたプロットの代表的な図 (B)、及び、annexin V 陽性、PI 陽性細胞の割合を 4 回の独立した実験の結果のドットプロット及び、平均 (C) で示す。エラーバーは S.D.を示している。***P<0.001。

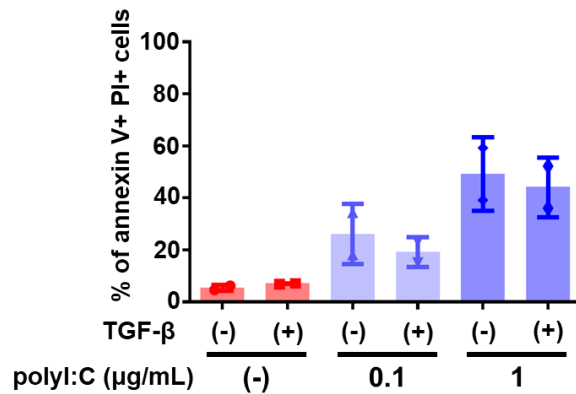


図 11. Hs578T 細胞において TGF-β の前処理を行うと polyI:C による細胞死はわずかに抑制される

Hs578T-HA 細胞に対して、播種と同時に TGF-β (1 ng/mL) で刺激を行い、24 時間後、polyI:C (0.1 または 1 μg/mL) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 6 時間後、無血清培地に変え、該当する細胞には TGF-β (1 ng/mL) の刺激を再び行った。トランスフェクションより 48 時間後、annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の細胞の割合を評価した。annexin V 陽性、PI 陽性細胞の割合を 2 回の独立した実験の結果のドットプロット及び、平均で示す。エラーバーは S.D.を示している。

3. polyI:C が誘導する細胞死の詳細な解析

polyI:C のトリプルネガティブ乳がんへの治療有効性をさらに評価するために、polyI:C により起こる細胞死のより詳細な解析を行った。まず細胞死のカスパーゼ依存性が細胞死機構を解析するうえで重要な項目であることから、汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK を使用して、Hs578T 細胞における polyI:C による細胞死のカスパーゼ依存性を検討した。すると、polyI:C によって顕著に増加する annexin V 陽性、PI 陽性の細胞の割合は Z-VAD-FMK 処理によって大きく減少した (図 12A、B)。このことから、polyI:C のトランスフェクションが誘導する細胞死はカスパーゼの機能に大きく依存していることが考察された。過去の報告によると、RLR シグナルが誘導するカスパーゼ依存的な細胞死には、内因性アポトーシス、外因性アポトーシス、パイロトーシスがあるといわれている (12)。パイロトーシスの定義は、時代によって移り変化しているが、近年では“切断されたガスダーミン分子による、プログラムされたネクローシス様の細胞死”であると考えられている (38,39)。そこで、次に、polyI:C によってパイロトーシスが起きている可能性を検討した。Hs578T 細胞に対する polyI:C のトランスフェクションによって、パイロトーシスに特徴的な細胞の泡沫化が確認され (図 13A)、培養上清中の LDH を測定することにより、細胞内容物の放出が確認された (図 13B)。また、(図 10B、12A) で示したように、早期アポトーシスを示す annexin V 陽性、PI 陰性の分画が出現しないことも観察された。更に、細胞内で切断され、パイロトーシスに寄与することが示されているガスダーミン分子のうち、その報告が多い GSDMD 及び GSDME に関して polyI:C トランスフェクションによる N 末端の切断断片の有無を、イムノブロットにより評価した。すると、THP-1 細胞に LPS、続いて nigericin 処理したポジティブコントロールでは観察された GSDMD の N 末端の切断断片が、Hs578T 細胞に対する polyI:C のトランスフェクションでは観察されなかった (図 13C)。一方で、GSDME の N 末端の切

断断片が、polyI:C をトランスフェクションした Hs578T 細胞で観察された (図 13C)。以上の結果から、polyI:C のトランスフェクションは Hs578T 細胞に対して GSDME の切断を伴うパイロトーシスを引き起こすことが示唆された。

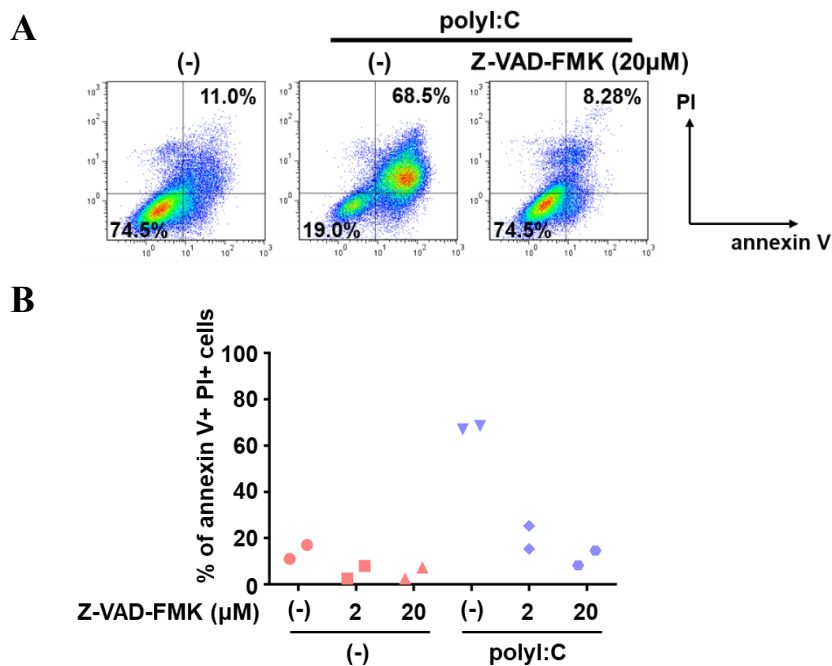


図 12. polyI:C による細胞死に対する汎カスパーゼ阻害剤の影響

(A、B) Hs578T-HA 細胞に対して、Z-VAD-FMK を図の濃度で処理すると同時に polyI:C (1 μg/mL) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 12 時間後、無血清培地に変え、該当する群には引き続き Z-VAD-FMK 処理を行った。更に 36 時間後、annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行い、FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の割合を評価した。得られたプロットの代表的な群の代表的な図 (A)、及び、annexin V 陽性、PI 陽性細胞の割合の 2 回の独立した実験の結果のドットプロット (B) を示している。

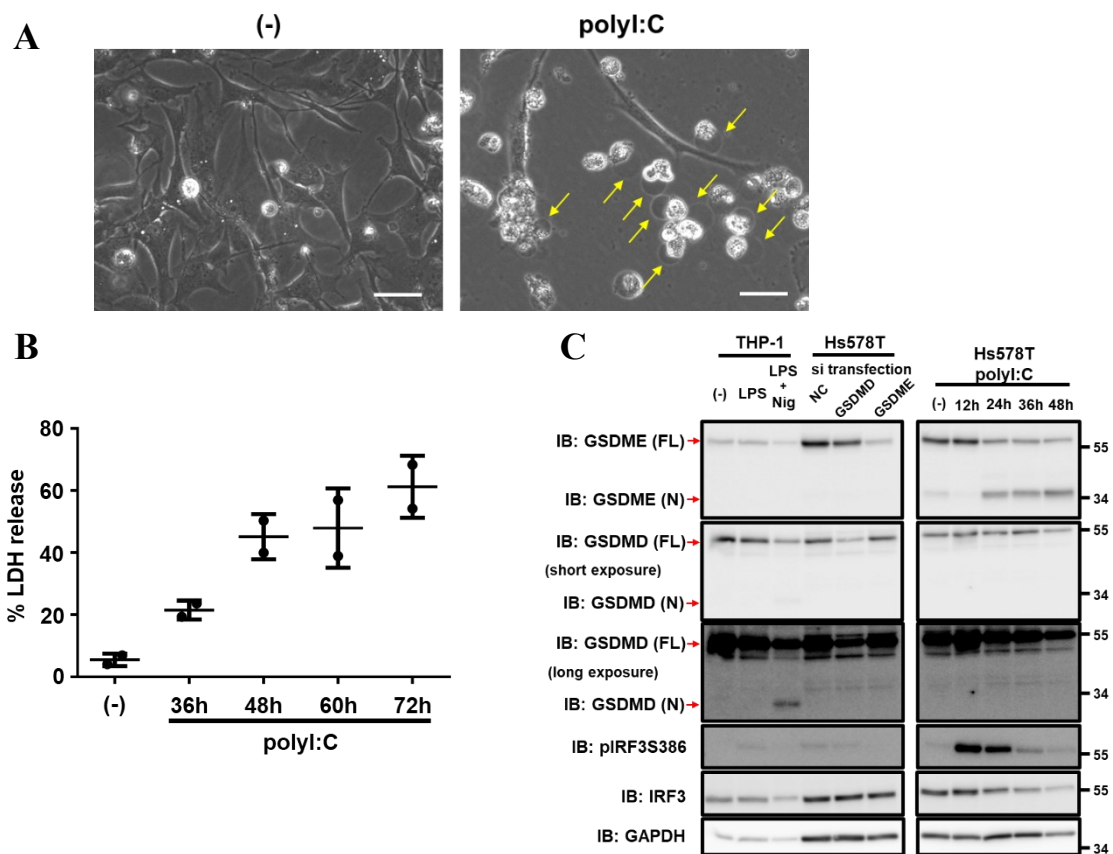


図 13. polyI:C が誘導する細胞死の特徴の評価

(A) Hs578T-HA 細胞に対して polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をトランスフェクションし、12 時間後に無血清培地に変え、更に 36 時間後に位相差顕微鏡で観察を行った際の顕微鏡像。矢印で示す細胞が泡沫化した細胞。スケールバーは 50 μm を示す。

(B) Hs578T 細胞への polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のトランスフェクションから図に示す時間が経過した時の放出されていた LDH の割合。2 回の独立した実験の結果を示す。エラーバーは S.D.を示している。

(C) Hs578T 細胞への polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のトランスフェクションから図に示す時間が経過した際にタンパク質を回収した。但し、polyI:C のトランスフェクションから 12 時間後に無血清培地に変えて培養を行っている。タンパク質はイムノブロットにより解析した。GSDMD、及び GSDME のバンドは GSDMD、及び GSDME を siRNA によりノック

ダウンした Hs578T 細胞、及び、LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 時間)、そののちに nigericin (20 μM , 2 時間) を処理した THP-1 細胞を使用して確認した。2 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

4. polyI:Cによるカスパーゼ3依存的なパイロトーシスと TGF- β シグナルの関与

Z-VAD-FMKによる polyI:C 誘導性の細胞死の抑制、及び、polyI:Cによる GSDME の切断が観察されたことから、polyI:Cによる細胞死の実行にカスパーゼ3が大きく寄与していることが考察された。カスパーゼ3は、現在の報告では GSDME を切断、活性化する唯一のカスパーゼとして知られている。そこで、polyI:C のトランスフェクションに際して、カスパーゼ3 特異的阻害剤である Z-DEVD-FMK 処理を行ったところ、polyI:C のトランスフェクションによって増加する annexin V 陽性、PI 陽性の細胞の割合が Z-DEVD-FMK 処理により大きく減少した (図 14A)。また、Z-DEVD-FMK 処理により、polyI:C 誘導性の GSDME の切断も Z-DEVD-FMK の濃度依存的に抑制された (図 14B)。これらの結果より、polyI:C が引き起こすパイロトーシスは大きくカスパーゼ3 に依存して起きていることが示唆された。

上述のように、polyI:Cによる TGF- β シグナルの抑制が Hs578T 細胞における細胞死を促進したこと、また、caSmad3 の過剰発現では annexin V 陽性、PI 陰性を介さずに annexin V 陽性、PI 陽性の細胞が減少し、生存していると考えられる annexin V 陰性、PI 陰性の細胞が増加したことから、caSmad3 の過剰発現は polyI:C 誘導性のカスパーゼ3 を介したパイロトーシスを抑制している可能性が考察された。そこで、まずカスパーゼ3/7 の活性を測定したところ、polyI:C のトランスフェクションによってカスパーゼ3/7 の活性は上昇し、caSmad3 の過剰発現でその活性は減少した (図 15A)。また、caSmad3 の過剰発現によって polyI:C が誘導する LDH の放出も減少し (図 15B)、GSDME の N 末端の切断断片も減少していた (図 15C)。

GSDME の発現は細胞死の特徴をアポトーシスからパイロトーシスにスイッチさせるこ

とが報告されている (39)。GSDME の発現は他のがん種の細胞株と比較すると乳がんではやや低かったものの (図 16A)、乳がんに限定すると、トリプルネガティブ乳がんにおける GSDME の発現は、非トリプルネガティブ乳がんの細胞株と比較して優位に高いことが分かり (図 16B)(27,40)、これは過去の報告とも矛盾しなかった (41)。また、GSDME を切断すると報告されるカスパーゼ 3 (CASP3) は、非トリプルネガティブ乳がんとトリプルネガティブ乳がんではその発現がほとんど変わらなかったものの、いずれの細胞においても普遍的にカスパーゼ 3 は発現していることがわかった (図 16C)。これらの結果から、他のサブタイプの乳がんと比較して、トリプルネガティブ乳がんにおいて発現の高い GSDME は polyI:C が誘導するカスパーゼ 3 依存的なパイロトーシスに関与し、これらは caSmad3 の過剰発現によって抑制されることが分かった。

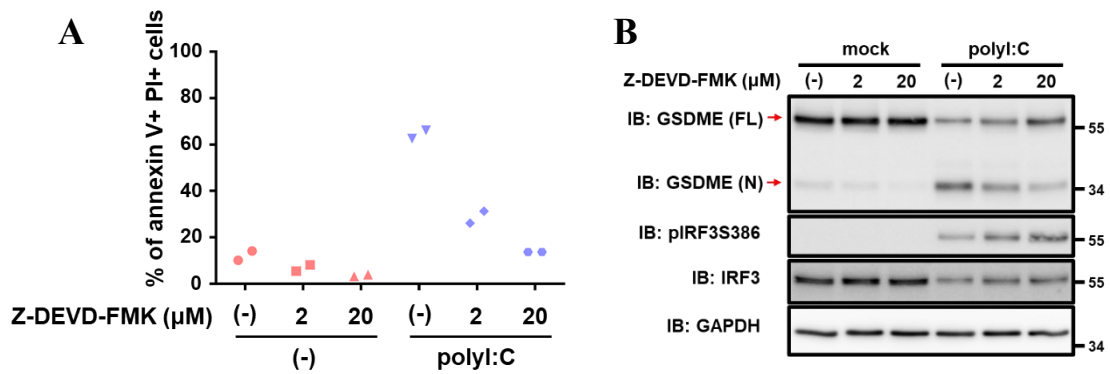


図 14. polyI:C が誘導するパイロトーシスに対するカスパーゼ 3 特異的阻害剤の影響

(A、B) Hs578T-HA 細胞に対して、Z-DEVD-FMK を図の濃度で処理すると同時に polyI:C (1 μg/mL) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 12 時間後、無血清培地に変え、該当する群には引き続き Z-DEVD-FMK 処理を行った。

(A) 更に 36 時間後、annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行い、FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の細胞の割合を評価した。annexin V 陽性、PI 陽性細胞の割合の 2 回の独立した実験の結果のドットプロットを示している。

(B) 培地交換から 12 時間後、タンパク質を回収し、イムノブロットにより解析した。2 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

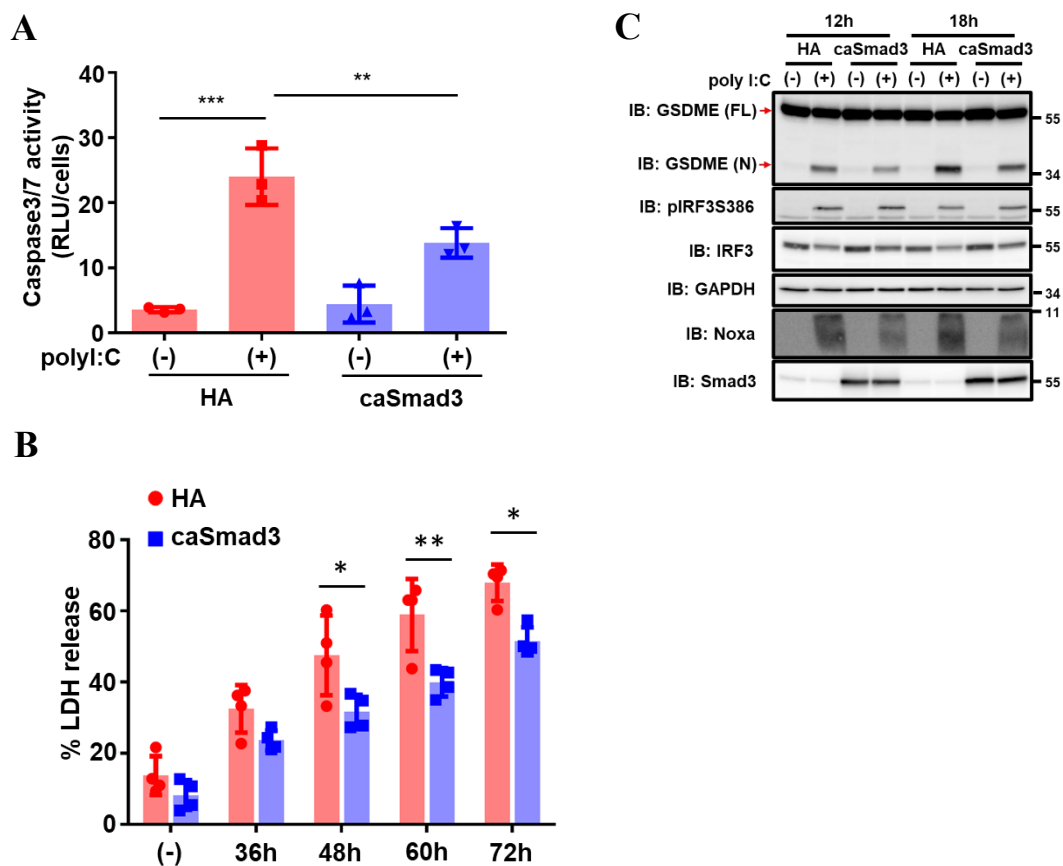


図 15. caSmad3 の過剰発現によりカスパーゼ 3 依存的なパイロトーシスが抑制される

(A) Hs578T-HA または、Hs578T-caSmad3 細胞に対して、polyI:C (1 μ g/mL) のトランスフェクションを行い、12 時間後に無血清培地に培地交換した。更に 12 時間後、細胞のカスパーゼ 3/7 の活性を、Caspase-Glo 3/7 Assay System によって評価した。カスパーゼ 3/7 の活性は、解析時の生細胞の数で補正した。図は 3 回の独立した実験の結果とその平均を示し、エラーバーは S.D.を示している。 **P < 0.01、***P < 0.001。

(B) Hs578T-HA または、Hs578T-caSmad3 細胞への polyI:C (1 μ g/mL) のトランスフェクションから図に示す時間が経過した時の放出されていた LDH の割合。図は 4 回の独立した実験の結果とその平均を示し、エラーバーは S.D.を示している。 *P < 0.05、**P < 0.01。

(C) Hs578T-HA または、Hs578T-caSmad3 細胞への polyI:C (1 μ g/mL) のトランスフェク

シヨンから図に示す時間が経過した際にタンパク質を回収し、イムノブロットにより解析した。3回の独立した実験の代表的なデータを示している。

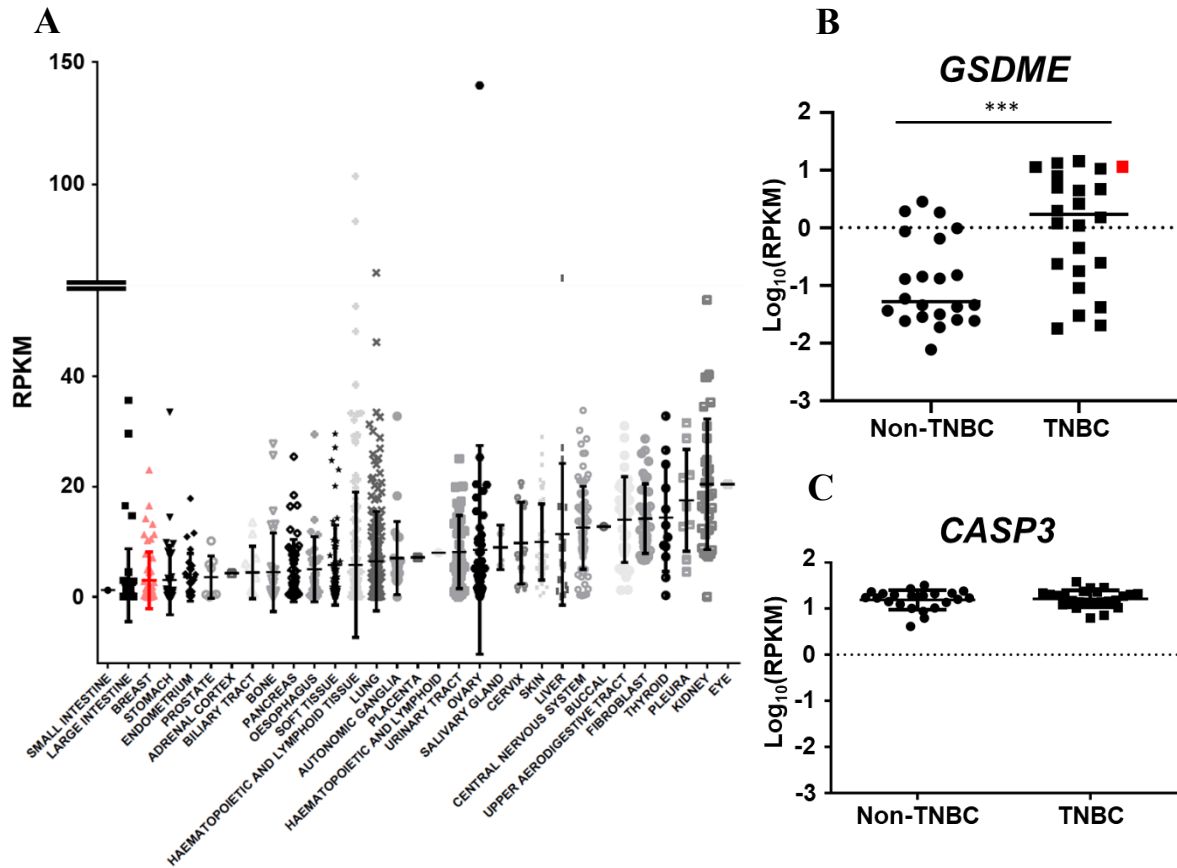


図 16. トリプルネガティブ乳がんにおける GSDME の発現とカスパーゼ 3 の発現

(A) CCLE のデータベースより得た、様々ながん種の細胞株における *GSDME* の発現の比較。エラーバーは S.D.を示し、乳がんの細胞株のプロットは赤で示している。

(B) CCLE のデータベースより得た、非トリプルネガティブ乳がん (non-TNBC) 細胞 (n = 22) とトリプルネガティブ乳がん (TNBC) 細胞 (n = 24) における *GSDME* の発現の比較。Hs578T 細胞のプロットを赤で示している。***P < 0.001。

(C) CCLE のデータベースより得た、non-TNBC 細胞と TNBC 細胞におけるカスパーゼ 3 (*CASP3*) の発現の比較。

5. Hs578T 細胞で確認された polyI:C の治療有効性と TGF- β シグナルの関与に対する別のトリプルネガティブ乳がん細胞株を使用した検討

次に、Hs578T 細胞で確認された polyI:C による TGF- β シグナルの抑制と、それに伴うパイロトーシスの促進に関して、トリプルネガティブ乳がんにより一般的に確認されるか検討した。検討にあたっては、Hs578T 細胞と同様に TGF- β シグナルの悪性化への寄与が報告され、かつ、GSDME の発現が CCLE にて確認されている細胞として、BT-549 細胞を選択した (24)。polyI:C のトランスフェクションによって、TGF- β により誘導される Smad3 のリン酸化が抑制され (図 17A)、TGF- β の標的遺伝子である *PMEPA1*、*SERPINE1*、*SMAD7* の発現が抑制された (図 17B)。ちなみに、Hs578T 細胞で TGF- β による誘導と polyI:C による抑制効果が観察された *ZEB1* と *LRRIC15* については、BT-549 細胞においては顕著な誘導が認められず (図 17B)、細胞による TGF- β の標的遺伝子の違いに起因するものと考えられた (42)。次に、Z-VAD-FMK を用いて、polyI:C による細胞死のカスパーゼ依存性を確認した。すると、polyI:C によって annexin V 陽性、PI 陽性の細胞の割合が上昇し、Z-VAD-FMK 処理によってこれらの集団の顕著な減少が認められ、BT-549 細胞でも、Hs578T 細胞と同様に polyI:C によるカスパーゼ依存的な細胞死が起きていることが考察された (図 18)。さらに、BT-549 細胞に polyI:C をトランスフェクションした際のガスダーミン分子の切断を確認したところ、Hs578T 細胞の時と同様に、GSDMD の N 末端の切断断片は確認されなかったものの、GSDME の N 末端の切断断片が確認された (図 19)。そこで、同様に caSmad3 を BT-549 細胞に恒常的に発現させたところ、caSmad3 の過剰発現は polyI:C による細胞死を顕著に抑制し (図 20A-C)、GSDME の N 末端の切断断片も大きく減少した (図 20D)。加えて、TGF- β の前処理はわずかに polyI:C による細胞死を抑制していた (図 21)。以上のことから、BT-549 細胞でも、Hs578T 細胞と同様、polyI:C による TGF- β シグナルの抑制により、GSDME の

切断を伴うパイロトーシスがより促進することが考察された。

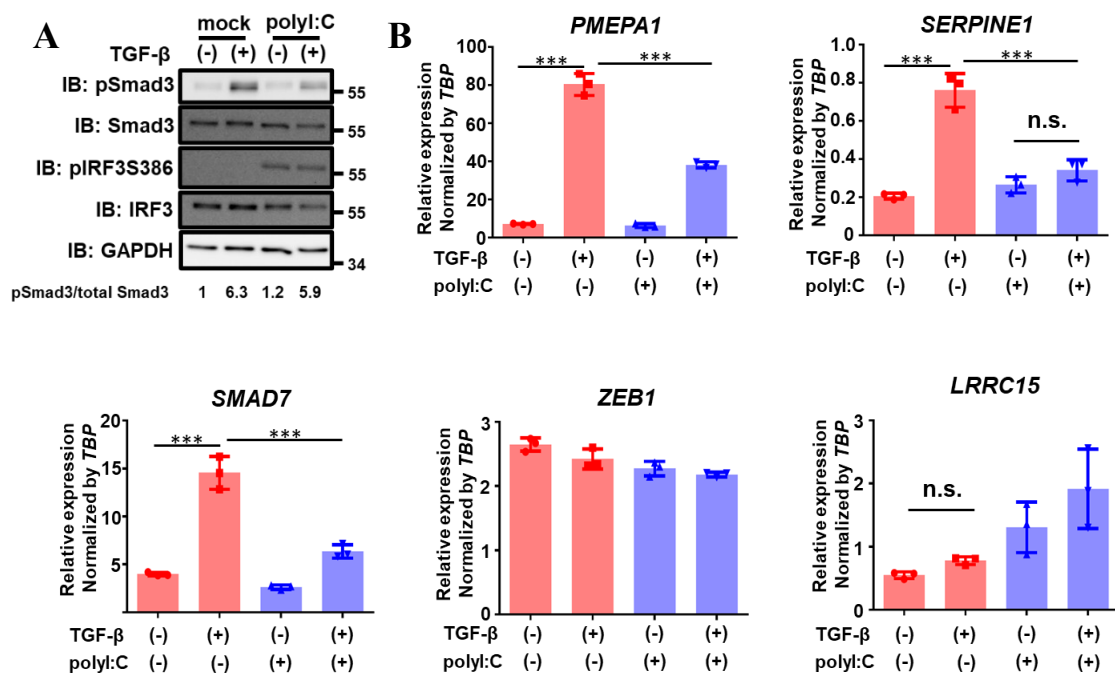


図 17. BT-549 細胞における polyI:C トランスフェクションによる TGF-β シグナルへの影響

(A) BT-549 細胞に polyI:C (1 μg/mL) をトランスフェクションしてから 4 時間後に TGF-β (1 ng/mL) で 1.5 時間、細胞を刺激した。回収したタンパク質はイムノブロットにより解析した。3 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

(B) BT-549 細胞に polyI:C (1 μg/mL) をトランスフェクションしてから 4 時間後に TGF-β (1 ng/mL) で 6 時間、細胞を刺激した。RNA を回収し、*PMEPA1*、*SERPINE1*、*SMAD7*、*ZEB1*、*LRRC15* の遺伝子発現を qRT-PCR にて解析した。補正には *TBP* を用いた。図は 3 回の独立した実験の結果とその平均を示し、エラーバーは S.D.を示している。***P < 0.001、n.s.: not significant.

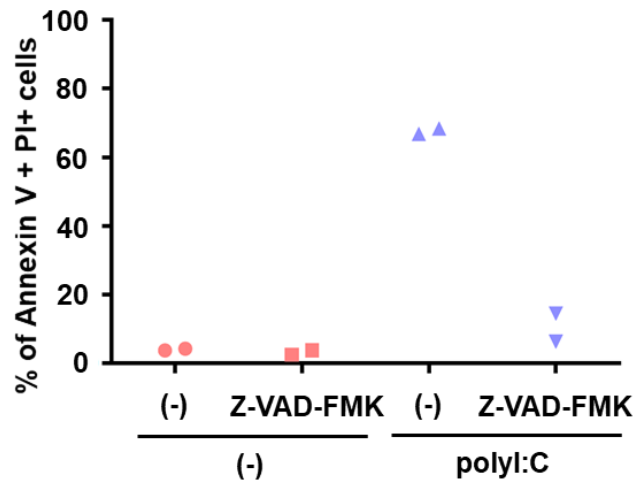


図 18. BT-549 細胞における、polyI:C による細胞死に対する汎カスパーゼ阻害剤の影響

BT-549 細胞に対して、Z-VAD-FMK を 50 μ M で処理すると同時に polyI:C (1 μ g/mL) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 6 時間後、無血清培地に変え、該当する群には引き続き Z-VAD-FMK 処理を行った。トランスフェクションより 48 時間後、annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行い、FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の割合を評価した。図は、annexin V 陽性、PI 陽性細胞の割合の 2 回の独立した実験の結果のドットプロットを示している。

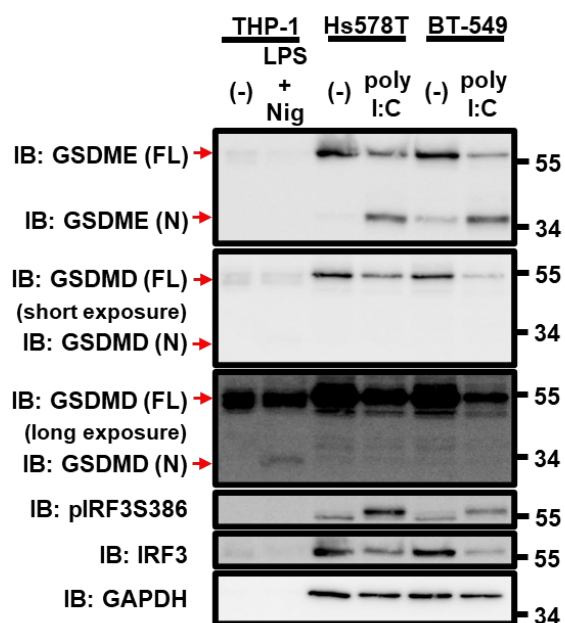


図 19. polyI:C をトランスフェクションした際の BT-549 細胞におけるガスダーミン分子の切断への影響

BT-549、及び Hs578T 細胞への polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のトランスフェクションから 18 時間後、タンパク質を回収した。タンパク質はイムノブロットにより解析した。THP-1 細胞は、LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 時間)、そののちに nigericin (20 μM , 2 時間) を処理したサンプルを使用した。2 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

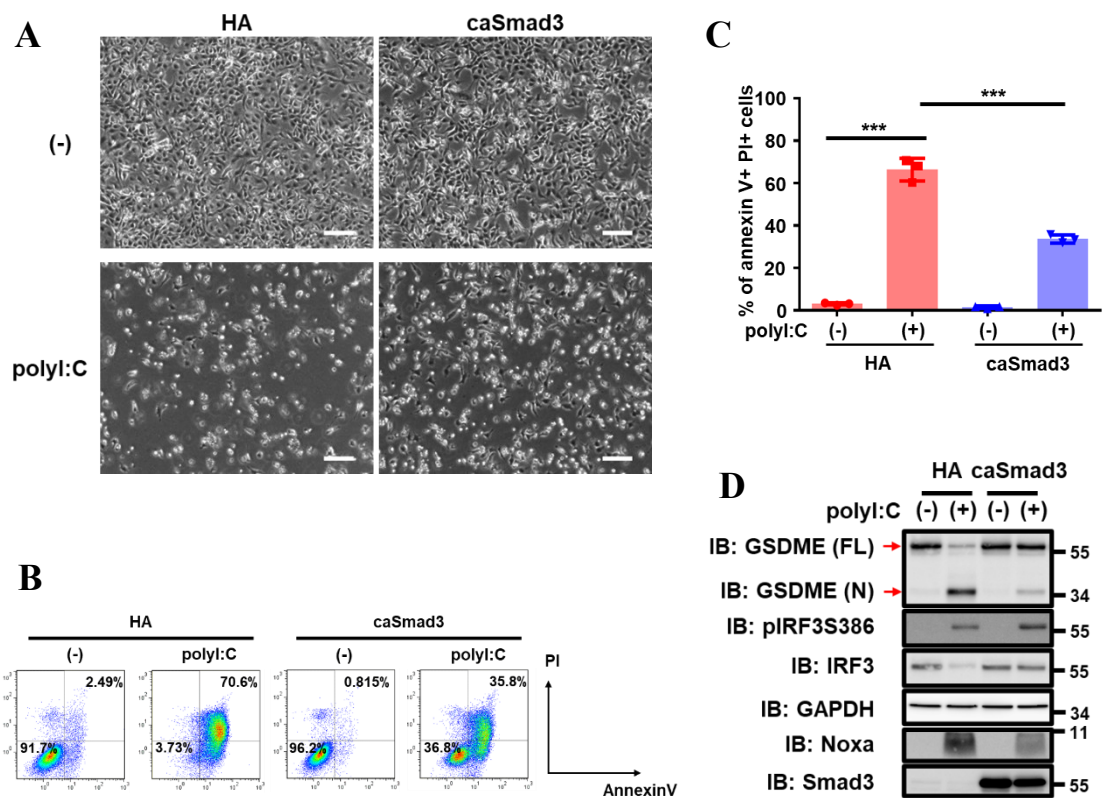


図 20. BT-549 細胞における caSmad3 の過剰発現による polyI:C 誘導性の細胞死への影響 (A-C) HA (コントロール) または、caSmad3 を恒常的に発現する BT-549 細胞に対して、polyI:C (1 μ g/mL) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 6 時間後、無血清培地に変えた。トランスフェクションから 48 時間後、以下の解析を行った。(A) BT-549-HA、及び-caSmad3 細胞における polyI:C をトランスフェクションしたのちの位相差顕微鏡像の比較。スケールバーは 200 μ m を示す。(B、C) polyI:C をトランスフェクションした細胞を annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の細胞の割合を評価した。得られたプロットの代表的な図 (B)、及び、annexin V 陽性、PI 陽性細胞の割合の 3 回の独立した実験の結果のドットプロット及び、平均 (C) を示す。エラーバーは S.D.を示している。***P<0.001。

(D) BT-549-HA または、BT-549-caSmad3 細胞への polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のトランスフェクションから 18 時間後にタンパク質を回収し、イムノブロットにより解析した。3 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

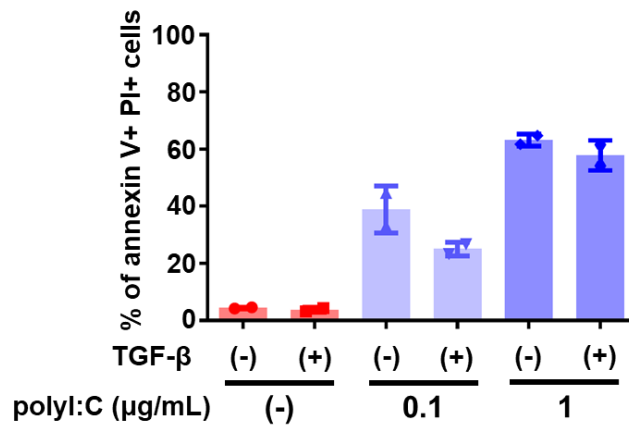


図 21. TGF-β の前処理により、BT-549 細胞でも polyI:C による細胞死はわずかに抑制された

BT-549-HA 細胞に対して、播種と同時に TGF-β (1 ng/mL) の刺激を行い、24 時間後、polyI:C (0.1 または 1 μg/mL) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 6 時間後、無血清培地に変え、該当する細胞には TGF-β (1 ng/mL) の刺激を再び行った。トランスフェクションより 48 時間後、annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の細胞の割合を評価した。annexin V 陽性、PI 陽性細胞の割合を 2 回の独立した実験の結果のドットプロット及び、平均で示す。エラーバーは S.D.を示している。

6. caSmad3 の過剰発現で polyI:C による細胞死が減少するメカニズムの探索

次に、トリプルネガティブ乳がんにおける caSmad3 の発現が polyI:C による細胞死を減弱させるメカニズムについて検討した。Hs578T 細胞に対して TGF- β 刺激を行った RNA-seq の結果では、anti-apoptotic Bcl-2 factor の発現の大きな変動は見られなかった (図 22)。また、T β RI 阻害剤である LY364947 処理では細胞死の増加は認められなかったことから (図 23A、B)、TGF- β シグナル自体ではなく、polyI:C によって活性化されるシグナル、または分子に対する caSmad3 の抑制効果が細胞死を抑制している可能性が考察された。

RLR シグナルが誘導する細胞死に対する、報告されているメカニズムの 1 つとして BH3-only protein の 1 つである Noxa の誘導があることから、Noxa に関する検討を行った。まず、polyI:C のトランスフェクションによって、Noxa は強く誘導され、この発現誘導は MDA5、RIG-I の遺伝子不活化によって抑制されることが確認された (図 24A)。ちなみに、polyI:C トランスフェクション条件下で TGF- β による刺激が Noxa の発現に影響していないのは (図 10C) の結果と矛盾しなかった。次に、caSmad3 の発現の有無における polyI:C による Noxa の発現誘導を比較したところ、Hs578T 細胞ではごく弱いながらも Noxa の mRNA の減少と (図 24B)、タンパク質の減少 (図 15C)、BT-549 細胞ではより顕著な Noxa の mRNA の減少と (図 24C)、タンパク質の減少 (図 20D) が確認された。更に、caSmad3 による Noxa の発現抑制が、Smad による直接的な転写抑制機能である可能性を考察するために、過去に報告された、Hs578T 細胞を TGF- β ファミリー分子の 1 つである activin A で刺激した Smad2 の chromatin immunoprecipitation (ChIP) シーケンスのデータ (30) を再解析したところ、Noxa をコードする *PMAIP1* の遺伝子座のプロモーター領域に Smad2 の結合が確認された (図 24D)。Hs578T 細胞に TGF- β 刺激を行った Smad2/3 の ChIP シーケンスのデータの再解析でも、そのシグナルは弱いもの

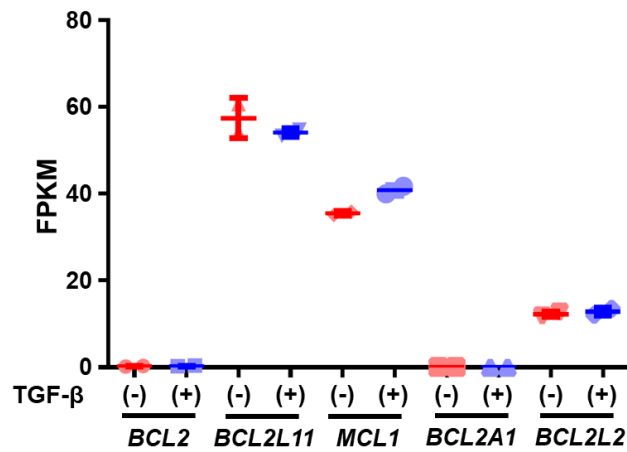


図 22. TGF-β による anti-apoptotic Bcl-2 factor の発現変動

Hs578T 細胞における 24 時間の TGF-β (1 ng/mL) の刺激の有無における anti-apoptotic Bcl-2 factor の発現。図は、独立して RNA を回収した 2 回の実験の結果とその平均を示し、エラーバーは S.D.を示している。

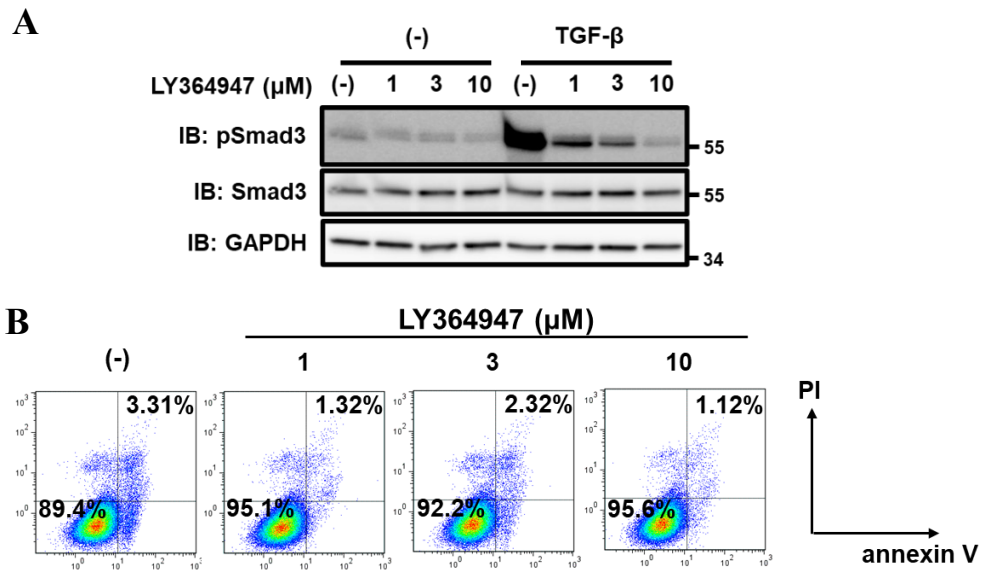


図 23. Hs578T 細胞における TβRI 阻害剤の細胞死への影響

(A) Hs578T-HA 細胞に TβRI の阻害剤である LY364947 を図の濃度で 8 時間前処理したのちに、TGF-β(1 ng/mL)で 1.5 時間刺激し、タンパク質を回収した。回収したタンパク質はイムノブロットにより解析した。

(B) Hs578T-HA 細胞に対して、LY364947 を図の濃度で無血清培地条件下で処理し、36 時間後、annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して、得られたプロットを示す。

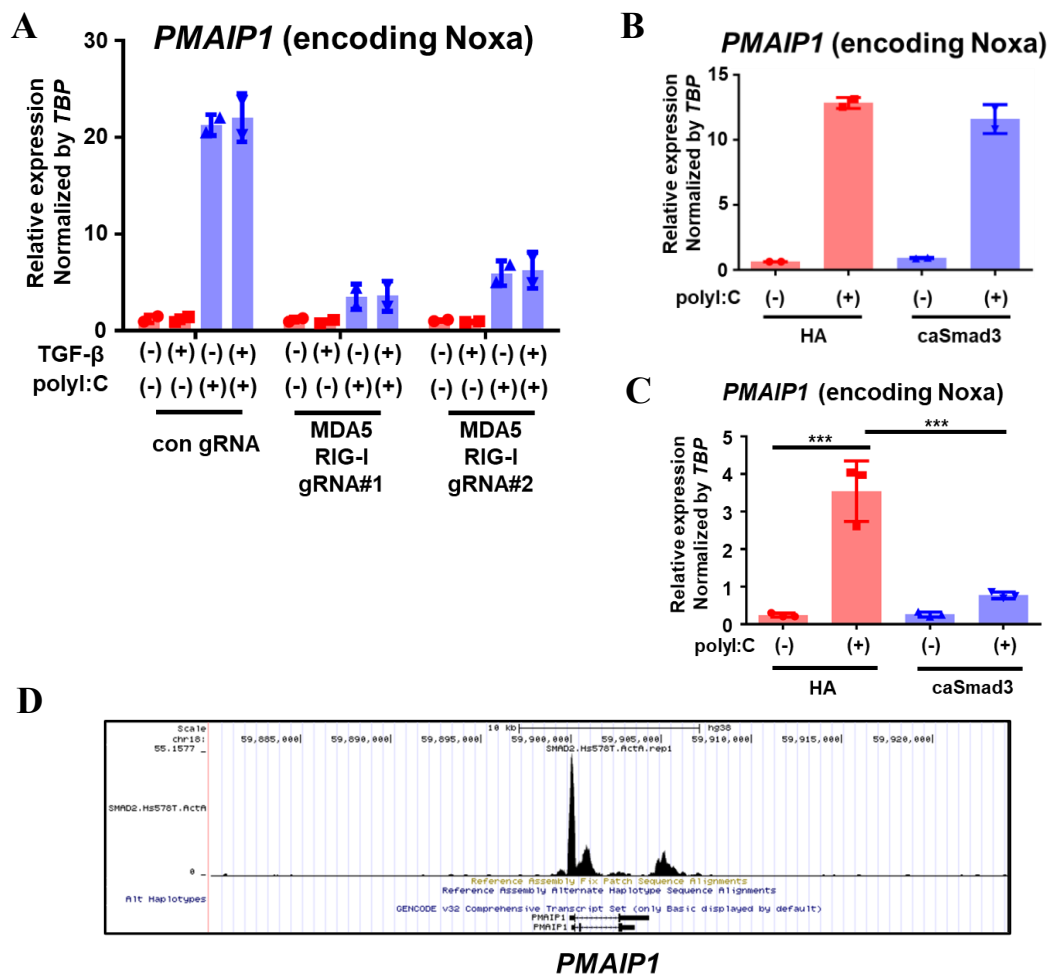


図 24. caSmad3 の過剰発現で polyI:C による細胞死が減少するメカニズムに対する Noxa の検討

(A) MDA5、RIG-I 遺伝子に対する gRNA、または非標的コントロール gRNA を恒常的に発現する Hs578T-Cas9 細胞に対して、polyI:C (1 μg/mL) をトランスフェクションしてから 12 時間後に TGF-β (1 ng/mL) で 6 時間細胞を刺激した。RNA を回収し、Noxa (*PMAIP1*) の遺伝子発現を qRT-PCR にて解析した。補正には *TBP* を用いた。図は 2 回の独立した実験の結果とその平均を示し、エラーバーは S.D.を示している。

(B) Hs578T-HA または、Hs578T-caSmad3 細胞に polyI:C (1 μg/mL) をトランスフェクションしてから 12 時間後に RNA を回収し、Noxa (*PMAIP1*) の遺伝子発現を qRT-PCR に

て解析した。補正には *TBP* を用いた。図は 2 回の独立した実験の結果とその平均を示し、エラーバーは S.D.を示している。

(C) BT-549-HA または、BT-549-caSmad3 細胞に polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をトランスフェクションしてから 6 時間後に RNA を回収し、Noxa (*PMAIP1*) の遺伝子発現を qRT-PCR にて解析した。補正には *TBP* を用いた。図は 3 回の独立した実験の結果とその平均を示し、エラーバーは S.D.を示している。*** $P < 0.001$ 。

(D) Hs578T 細胞に対して Activin A (50 ng/mL) で 1.5 時間刺激した際の Smad2 の過去に報告された ChIP-seq のデータ (GEO, accession number GSM3301952) における、*PMAIP1* の遺伝子座での Smad2 の結合。

の、近傍におけるピークが観察されている (21)。これらの結果から、Smad による転写抑制が Noxa の発現抑制に関わり、結果として caSmad3 過剰発現によって polyI:C 誘導性の細胞死が抑制されている可能性が示唆された。

しかしながら、特に Hs578T 細胞では、Smad による Noxa の発現抑制は限定的なものであったことから、TGF- β シグナル抑制によるパイロトーシスの促進に対して、その他のメカニズムも関与している可能性が考察された。そこで次に、caSmad3 による細胞死の抑制に対する p38 の関与を検討した。Hs578T 細胞における caSmad3 の過剰発現により、polyI:C 誘導性の p38 のリン酸化が抑制されており (図 25A)、これは、p38 の脱リン酸化酵素として知られる *DUSP1* の誘導が関与している可能性が考察された (図 25B)。そこで、2 種類の p38 阻害剤を用いて、p38 の polyI:C による細胞死への寄与を検討したところ (図 25C)、SB203580 では、部分的な細胞死の抑制傾向が観察された一方、SB202190 ではその影響は更に弱いものであった (図 25D)。

これらの結果から、caSmad3 過剰発現による、polyI:C 誘導性のパイロトーシスの抑制は、Noxa の発現抑制や p38 のリン酸化の抑制など複数のメカニズムによって起きていることが考察された。

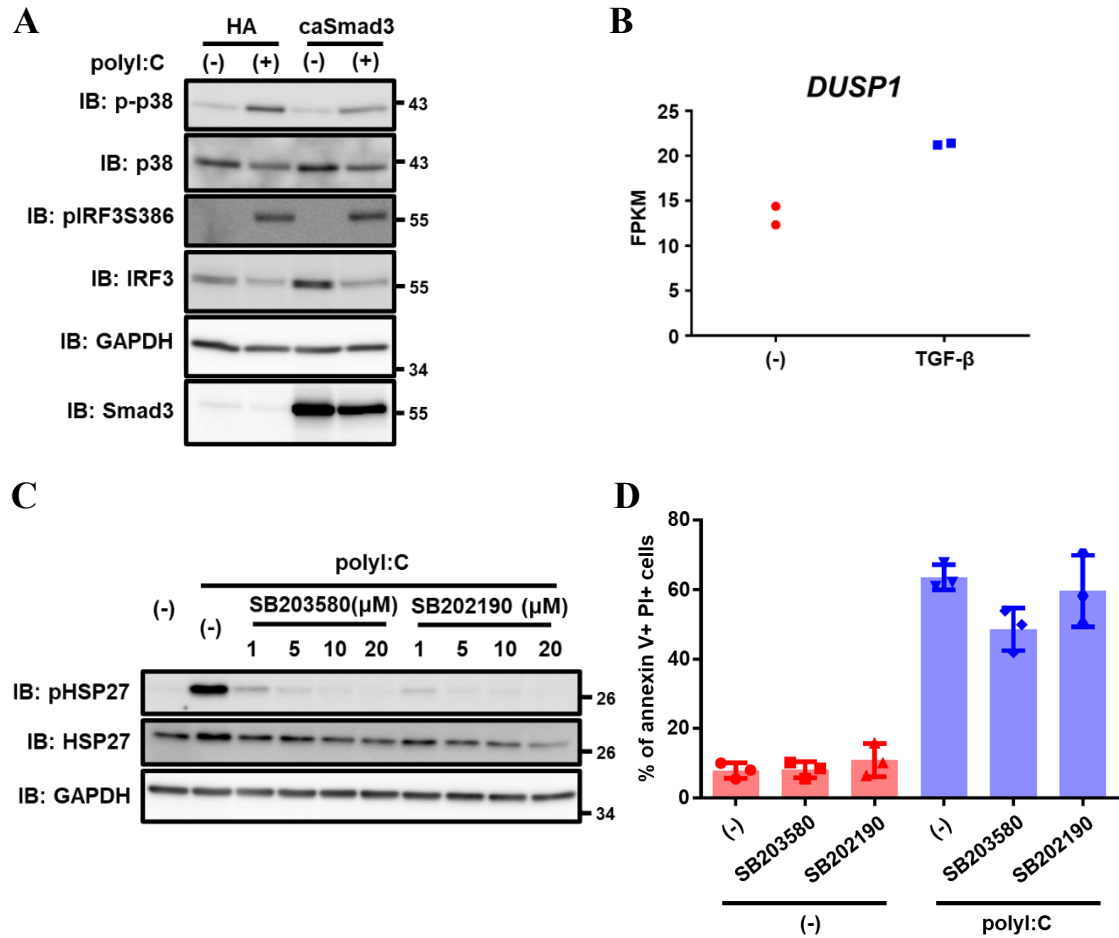


図 25. caSmad3 の過剰発現で polyI:C による細胞死が減少するメカニズムに対する p38 の検討

(A) Hs578T-HA または、Hs578T-caSmad3 細胞に対して polyI:C (1 μg/mL) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 12 時間後、無血清培地に変え、更に 12 時間後、タンパク質を回収し、イムノブロットにより解析した。3 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

(B) Hs578T 細胞における 24 時間の TGF-β (1 ng/mL) の刺激の有無における *DUSP1* の発現変動。図は独立して RNA を回収した 2 回の実験の結果とその平均を示している。

(C) Hs578T-HA 細胞に p38 に対する阻害剤である SB203580 と SB202190 を図の濃度で 1 時間前処理したのちに、polyI:C (1 μg/mL) のトランスフェクションを行った。トラン

スフェクションから 12 時間後、タンパク質を回収し、回収したタンパク質はイムノブロットにより解析した。

(D) Hs578T-HA 細胞に対して、SB203580 (5 μ M) と SB202190 (5 μ M) を 1 時間前処理したのちに、polyI:C (1 μ g/mL) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 12 時間後、無血清培地に変え、該当する群には引き続き阻害剤投与を行った。更に 36 時間後、annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行い、FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の細胞の割合を評価した。図は annexin V 陽性、PI 陽性細胞の割合の 3 回の独立した実験の結果をドットプロットで示している。

7. polyI:Cによる治療実験における腫瘍抑制効果と TGF- β シグナルとの関係

最後に、polyI:Cによる TGF- β シグナルの抑制を *in vivo* にて評価した。検討にあたっては、トリプルネガティブ乳がんのモデルとして以前より報告されているマウス乳がん 4T1 細胞を使用した (43)。polyI:C の 4T1 細胞へのトランスフェクションにより、TGF- β で刺激した際の Smad3 のリン酸化の上昇が減弱した (図 26)。次に、4T1 細胞における polyI:C 誘導性の細胞死に対する検討を行った。すると、細胞の泡沫化や (図 27A)、annexin V 陽性 PI 陰性を介さない細胞死 (図 27B)、GSDME の切断 (図 27D) が 4T1 細胞に対する polyI:C のトランスフェクションでも確認され、polyI:C が 4T1 細胞においてもパイロトーシスを引き起こすことが示唆された。さらに、caSmad3 の過剰発現は、部分的に polyI:C による細胞死を抑制し (図 27B、C)、GSDME の切断も抑制した (図 27D)。Z-VAD-FMK 処理を行うと、polyI:C による細胞死が部分的に解除された (図 27B、C)。これらの結果から、4T1 細胞においては、カスパーゼ依存的、及び非依存的な polyI:C による細胞死が起きていることが考察され、このことが、caSmad3 の過剰発現によって抑制された細胞死が部分的であった理由であると考察された。

続いて、4T1 細胞を同所移植した BALB/c マウスに、polyI:C をトランスフェクションすることによる治療実験を行った (図 28A)。polyI:C 投与群では、腫瘍体積の顕著な減少は認められなかったが (図 28B)、腫瘍重量の有意な減少が認められた (図 28C)。また、それに伴い、腫瘍組織中の Smad3 のリン酸化の減少も認められた (図 28D、E)。以上のことから、4T1 細胞においても、polyI:C のトランスフェクションによる TGF- β シグナルの抑制が一部寄与することで、パイロトーシスが起これ、その結果として腫瘍抑制効果をもたらしている可能性が示唆された。

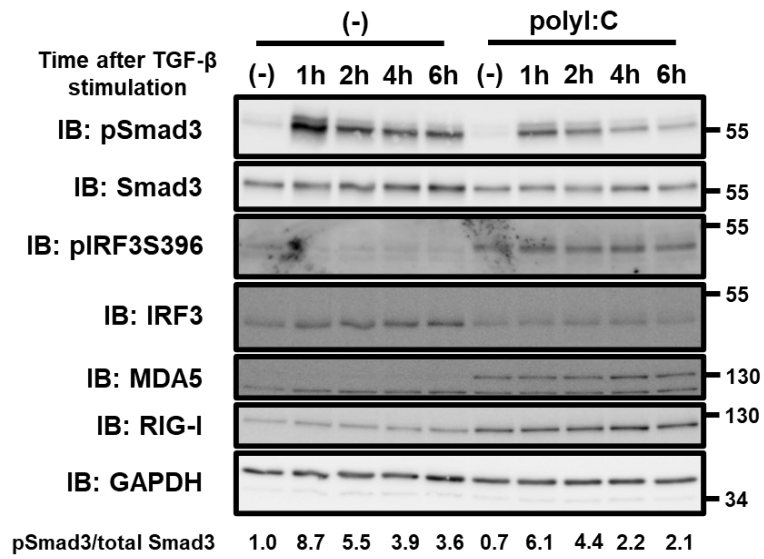


図 26. マウス 4T1 細胞における polyI:C トランスフェクションによる TGF- β シグナルへの影響

4T1 細胞に polyI:C (1 μ g/mL) をトランスフェクションしてから 12 時間後に TGF- β (1 ng/mL) で図に示す時間、細胞を刺激した。回収したタンパク質はイムノブロットにより解析した。2 回の独立した実験の代表的なデータを示している。

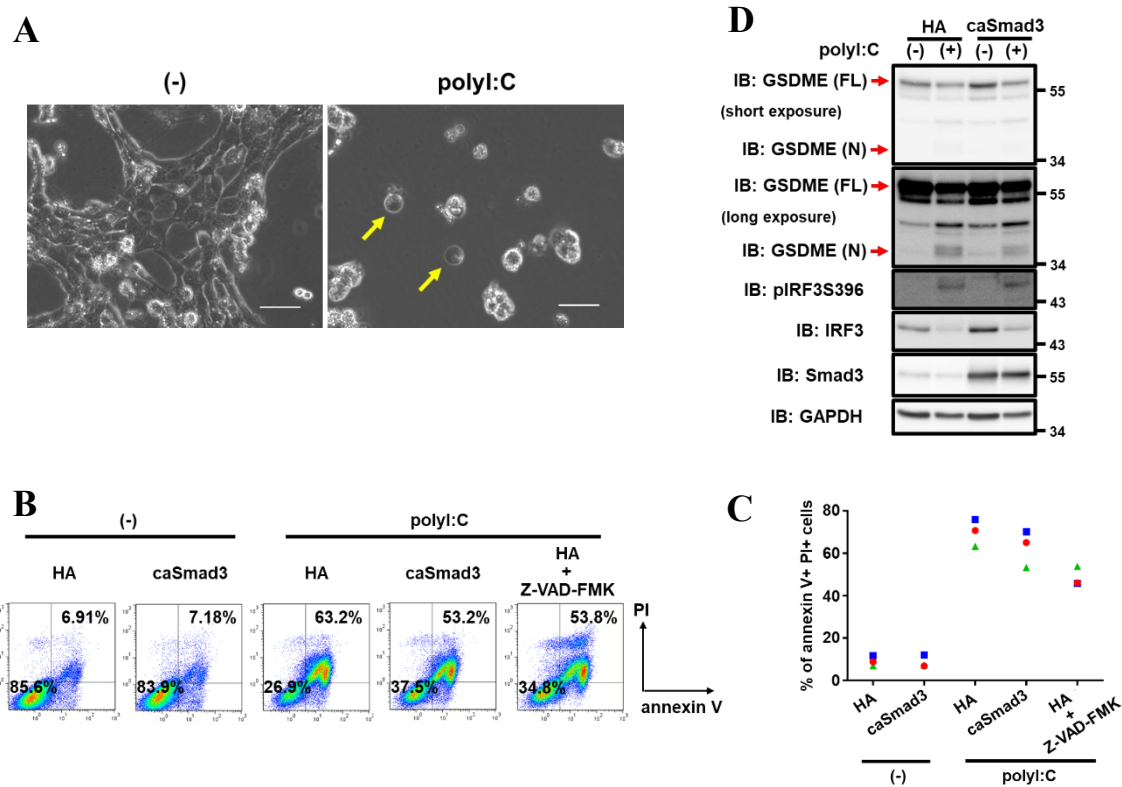


図 27. 4T1 細胞における polyI:C 誘導性の細胞死と caSmad3 の過剰発現による影響

(A) 4T1-HA 細胞に対して polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をトランスフェクションし、12 時間後に無血清培地に変え、更に 36 時間後に位相差顕微鏡で観察を行った際の顕微鏡像。矢印で示す細胞が泡沫化した細胞。スケールバーは 50 μm を示す。

(B, C) HA (コントロール) または、caSmad3 を恒常的に発現する 4T1 細胞に対して、polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のトランスフェクションを行った。該当する群には、同時に Z-VAD-FMK (50 μM) 処理を行った。トランスフェクションから 12 時間後、無血清培地に変え、該当する群には引き続き Z-VAD-FMK 処理を行った。更に 36 時間後、細胞を回収し、annexin V-APC 及び PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。FSC、及び SSC によってゲートされた細胞に対して annexin V 陽性、及び PI 陽性の細胞の割合を評価した。得られたプロットの代表的な図 (B)、及び、annexin V 陽性、PI 陽性細胞

の割合を3回の独立した実験の結果のドットプロット (C) にて示す。

(D) 4T1-HA または、4T1-caSmad3 細胞に対して polyI:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をトランスフェクションしてから 24 時間後にタンパク質を回収し、イムノブロットにより解析した。2回の独立した実験の代表的なデータを示している。

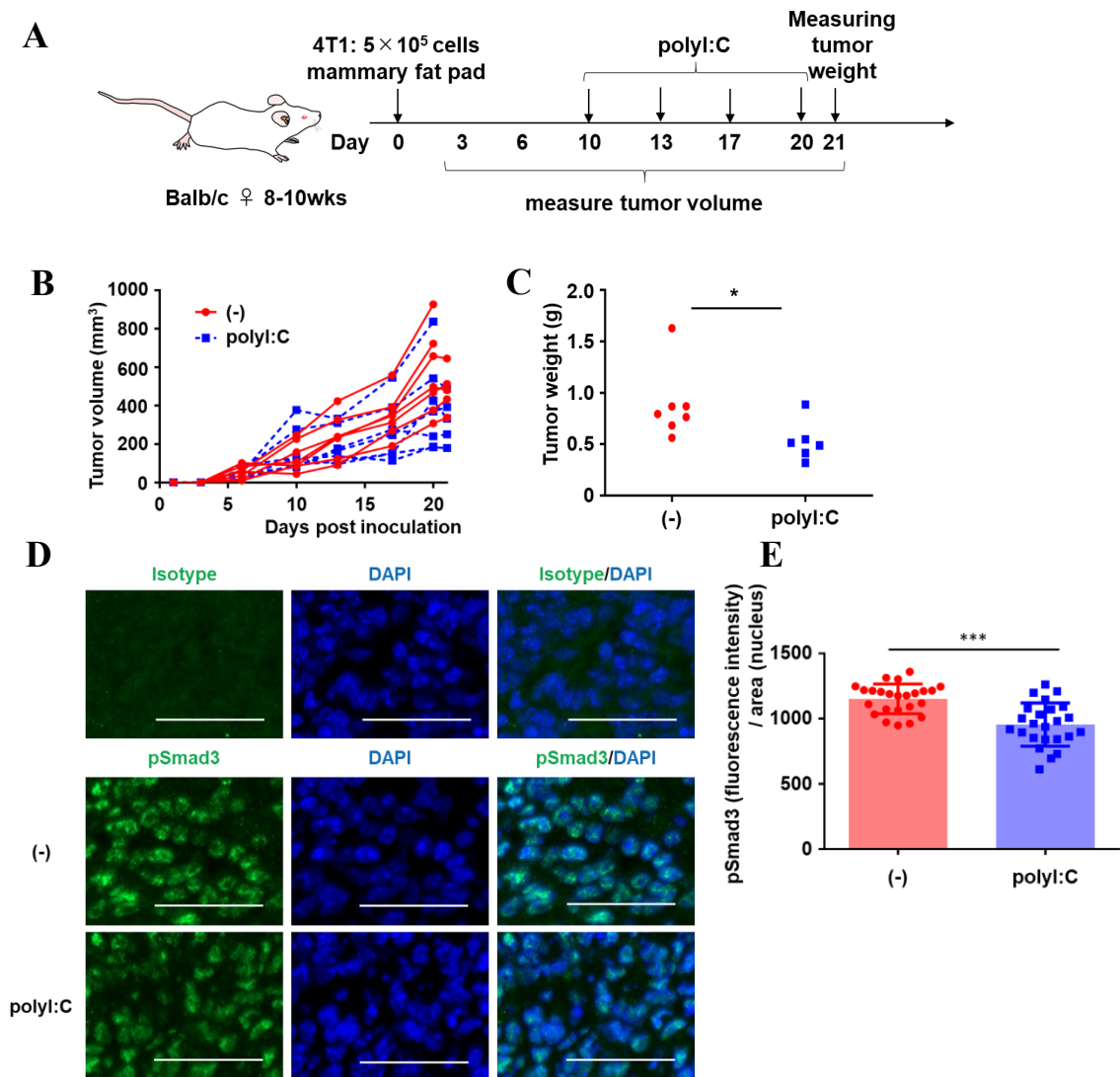


図 28. *in vivo* における polyI:C トランスフェクションの抗腫瘍作用と TGF- β シグナルへの影響に関する検討

(A-C) 4T1 細胞を同所移植した BALB/c マウスに対する polyI:C トランスフェクションの治療実験。BALB/c マウスの乳腺脂肪パッドに 4T1 細胞を day0 に移植し、day 10、13、17、20 に、polyI:C を 1 匹当たり 20 μg 腫瘍内投与した。実験概要を図に示す (A)。腫瘍径を day 3、6、10、13、17、20、21 に測定し (B)、最後の polyI:C 投与の翌日である day 21、または予め定めたエンドポイントに達した日に腫瘍重量を測定した (C)。実験は 3 回独立して行い、各群 7 匹分のデータを示している。day 20 に 1 匹のマウスが原因不明

で死亡し、(C) の評価からは除いている。*P<0.05。

(D、E) polyI:C による治療の有無における 4T1 腫瘍組織中の核内 pSmad3 の蛍光免疫染色による解析。(B) と (C) から得られた各群 2 匹ずつの腫瘍サンプルを抗 pSmad3 抗体及び DAPI で染色した。各腫瘍サンプル当たり 12 視野の顕微鏡像を撮影した。

(D) polyI:C による治療の有無における、アイソタイプコントロール抗体、及び抗 pSmad3 抗体により染色された代表的な顕微鏡像。スケールバーは 50 μm を示す。

(E) 1 つの視野における核のシグナルが検出された領域面積当たりの核内の pSmad3 の蛍光強度をプロットした (n=24)。エラーバーは S.D.を示している。***P<0.001。

考察

がん細胞における、細胞内への dsRNA 導入による RLR シグナルの活性化は、がん治療における有望な治療法として広く認識されつつある。本研究により、トリプルネガティブ乳がん細胞に対して、合成された dsRNA をトランスフェクションにより導入することで TGF- β シグナルが抑制されることが明らかとなった。更に、この TGF- β シグナルの抑制によりパイロトーシスを促進するという、更なる治療上の利点を polyI:C による治療は獲得していることも明らかとなった。

1. がんにおける RLR シグナルや他の PRR シグナルの活性化

ウイルスの複製を防ぐために、宿主は、感染細胞を死に追いやるシステムを持っている (44)。重要なことに、この細胞死の経路は多くのがん細胞にも備わっており、近年、RLR シグナルの活性化が腫瘍抑制効果をもたらすことが数多く報告されている。MDA5 の過剰発現や (45)、内在性レトロウイルス (46,47)、細胞内への polyI:C の導入 (13,48-50)、RLRs により認識される他のリガンド (9) などはいずれもがん細胞の細胞死をもたらし、腫瘍抑制効果があると報告されている。このことから、トリプルネガティブ乳がんを含めたがんに対する治療薬として、polyI:C の治験が行われていることは不思議ではない。本研究において、細胞内に導入された polyI:C は MDA5、RIG-I により認識され、TGF- β シグナルの減弱を引き起こし、細胞死を促進させることが明らかとなった。今回の知見に基づけば、がんの治療に対する他の RLR リガンドも、RLR シグナルの活性化を介して TGF- β シグナルを抑制し、腫瘍抑制効果をもたらす可能性がある。

トリプルネガティブ乳がんの治療という観点では、近年承認された BRCA 変異を持つ

患者に対する PARP 阻害薬は DNA 修復機能を阻害し、DNA の損傷を引き起こす。その結果、“micronuclei” と呼ばれる微小な DNA が細胞質に放出され、cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) による DNA 認識経路の活性化を引き起こし、結果として、TANK-binding kinase 1 (TBK1)、IRF3 の活性化をもたらすことが報告されている (51,52)。すなわち、PARP 阻害剤は TBK1 によるリン酸化 IRF3 の産生を引き起こすことで、同時に TGF- β シグナルを抑制する可能性があり、PARP 阻害剤によるがん細胞死のメカニズムの 1 つになっている可能性がある。加えて、dsRNA の導入や、PARP 阻害剤による核酸認識シグナルの活性化は免疫チェックポイント分子の発現を上昇させることも報告されている (53-55)。すなわち、PARP 阻害剤や polyI:C と、抗 PD-1/PD-L1 抗体との併用療法もまた、部分的に TGF- β シグナルを抑制することにより、トリプルネガティブ乳がんに対する腫瘍抑制効果を示すことが期待される。しかし、PARP は Smad の ADP リボシル化を介して TGF- β -Smad シグナルを負に制御することが報告されており (56)、それぞれの PARP 阻害剤の阻害様式と抗腫瘍効果、及び cGAS-STING シグナルと TGF- β シグナルへの影響に関しては、今後更なる解析が必要であると考えられる。

2. RLR シグナル活性化による TGF- β シグナルの抑制

シグナル相互作用は、時として重要な生物学的表現型を示すことがあり、過去の報告では、正常表皮角化細胞である HaCaT 細胞で IRF3 のノックダウンにより TGF- β が誘導する EMT がより促進すると報告されており、活性化された IRF3 が Smad3 に結合し、受容体による Smad3 の活性化を阻害することで、TGF- β シグナルを抑制するメカニズムが提案されている (26)。このモデルは、IRF3 の C 末端の構造が、タンパク質間の相互作用に重要といわれる Smad3 の MH2 ドメインに類似している報告からも支持される

(57-60)。更に TGF- β は乳がんにおいて、薬剤耐性に関わるがん幹細胞の維持に寄与していることが報告されていることを考慮すると、polyI:C はがん幹細胞も標的にできる可能性が示唆され、今後の検討が期待される。

3. TGF- β の生存促進作用

TGF- β は細胞運命に対しても 2 面性を持つといわれている。すなわち、細胞死誘導作用と生存促進作用であり、これらは文脈や細胞種に依存するものである。例えば、TGF- β は抗アポトーシス作用を持つといわれる Bcl-2、Bcl-X_L の発現を抑制し、細胞死を誘導することが報告されている一方で (61-63)、他の文脈においてはこれらの分子が TGF- β によって誘導され、生存促進的に働くといわれている (64-66)。本研究は TGF- β の生存促進作用に着目したものであり、その作用はミクログリア、膵 β 細胞、制御性 T 細胞などにおいても見られ、カスパーゼ 8 の機能を抑制する FLICE-inhibitory protein (FLIP、CFLAR) を誘導するためであるといわれている (67-69)。がんの文脈では、TGF- β が deleted in esophageal cancer 1 (DEC1) をコードする *BHLHE40* を誘導することで乳がんに対して生存促進的に機能するといった報告もある (23)。しかしながら、TGF- β の刺激によって、Bcl-2、Bcl-X_L、FLIP の顕著な発現誘導が確認されなかったこと (図 22) や、Hs578T 細胞における caSmad3 の過剰発現で、DEC1 の顕著な増加が確認されなかったことから、トリプルネガティブ乳がんにおける TGF- β による生存促進作用にはその他のメカニズムも存在することが考察された。本研究では、細胞によって程度に差はあるものの、caSmad3 の過剰発現が polyI:C による細胞死に機能していると報告がある Noxa の発現を抑制することを見出した (48,50)。そしてこれは Smad による転写抑制を介している可能性を見出した (70)。Noxa は、DNA 損傷や低酸素状態、ER ストレスなどの細胞のストレスに応じて、それぞれ p53 や p73、HIF-1 α 、ATF4 や ATF3 によって誘導

され、細胞死に寄与することが報告されている (71)。本研究の polyI:C による Noxa の発現誘導メカニズムの詳細な検証は今後の検討課題であるが、特に、Smad3 は ATF3 と結合し、細胞の分化に関わる *ID1* の転写抑制を行う報告があることから (72)、本研究で確認された Smad3 による Noxa の転写抑制は、Smad3 の ATF3 との結合を介している可能性があると考えている。しかしながら、Hs578T 細胞においては caSmad3 の過剰発現による Noxa の抑制程度は弱く、その他 p38 のリン酸化抑制を含む (図 25) 他のメカニズムが関与している可能性も本研究により考察された。

本研究で使用したトリプルネガティブ乳がん細胞における caSmad3 の過剰発現による実験では生理的な条件を超えるレベルのシグナル活性化状態である可能性も考えられる。caSmad3 による活性化状態と臨床検体での活性化状態の直接的な比較検討は、何を指標とするかなど難しい。一方、TGF- β シグナルの受容体キナーゼ阻害剤による検討が考えられるが、多くが実用濃度においても MAP キナーゼなど細胞増殖に関わるシグナルへの非特異的阻害活性を有することが分かっており、シグナル特異的な影響の評価は困難である。しかしながら 4T1 細胞を用いた同種移植モデルにて、腫瘍内で TGF- β シグナルが活性化していることが見出されたように (図 28D)、*in vitro* の培養条件での限られたシグナル活性化と異なり、腫瘍組織内ではがん細胞における TGF- β 活性化がより強く起きていると考えられる。少なくとも、今回確認された TGF- β シグナルの生存促進作用は *in vitro* よりも *in vivo* ではより強く起こっている可能性が示唆される。今後、polyI:C による細胞死に対する TGF- β シグナルの抑制の寄与度をより正確に把握するために、内在的な TGF- β シグナルを阻害する阻害剤による検討やドミナントネガティブ変異を有する TGF- β の II 型受容体を発現する細胞を使用した検討、また、発現レベルを内在的なものに近づけるために遺伝子操作などにより SMAD3 遺伝子座を caSmad3 で

置換した細胞などを使用した検討を行う必要があることも考察された。

4. パイロトーシス

元々“パイロトーシス”は、カスパーゼ 1 依存的な炎症を伴う細胞死と定義されていたものの (73)、パイロトーシスの際に観察される細胞膜透過性の亢進がガスダーミン分子によって実行されていることが見出されたこと等を経て、その定義は少しずつ変わっていった (38,74-76)。細胞死を誘導するシグナルの後期では、ガスダーミンはカスパーゼやその他の細胞障害性のプロテアーゼにより切断を受けることで、切断断片の N 末端側がオリゴマー化し、細胞膜への孔の形成を経て、パイロトーシスを実行するとされ、その結果本研究で確認されたような細胞死における特徴が現れると考えられている。近年では、パイロトーシスががんの進展に大きく関わることが報告されており、がん細胞でパイロトーシスが起きると、死細胞からの HMGB1 などの damage-associated molecular patterns (DAMPs) の放出によって、細胞障害性 T 細胞や natural killer (NK) 細胞の集積、活性化を引き起こし、これが腫瘍の免疫微小環境を cold な状態から hot な状態に変えると報告された (77,78)。腫瘍の免疫微小環境の活性化はがん免疫療法の奏効に関与していること (79)、並びに、GSDME はトリプルネガティブ乳がんによく発現していること ((41)、図 16B) を鑑みると polyI:C がパイロトーシスを引き起こすことはトリプルネガティブ乳がんの治療に対して期待していた以上の治療効果をもたらす可能性がある。加えて、caSmad3 の過剰発現がカスパーゼ 3 の活性抑制を介して polyI:C の誘導するパイロトーシスを抑制したことから、本研究で見出した現象が、腫瘍微小環境で TGF- β が免疫抑制作用を示すと言われる理由の 1 つである可能性があると考えている。

結論

本研究では、治験薬 polyI:C が MDA5、RIG-I を介して TGF- β シグナルを抑制することにより、TGF- β シグナルの重要な腫瘍促進的機能の一つである生存促進作用を減弱させることで、細胞死をより促進していることが考察された。更にその生存促進作用とは、カスパーゼ 3 の活性を抑制する機能であり、TGF- β シグナルが抑制されない caSmad3 の過剰発現では、polyI:C が誘導するカスパーゼ 3 の活性の上昇が抑制された。また、polyI:C のトランスフェクションは GSDME の切断を伴うパイロトーシスを引き起こし、caSmad3 の過剰発現はこのパイロトーシスを抑制することも示唆された。本研究から得られた知見が将来、トリプルネガティブ乳がん患者に対する dsRNA アナログによる治療という、新たな治療選択肢の提示につながることを強く期待する。

引用文献

1. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, *et al.* Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2019**;5:66
2. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* **2010**;363:1938-48
3. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* **2012**;486:395-9
4. Caparica R, Lambertini M, de Azambuja E. How I treat metastatic triple-negative breast cancer. *ESMO Open* **2019**;4:e000504
5. Cyprian FS, Akhtar S, Gatalica Z, Vranic S. Targeted immunotherapy with a checkpoint inhibitor in combination with chemotherapy: A new clinical paradigm in the treatment of triple-negative breast cancer. *Bosn J Basic Med Sci* **2019**;19:227-33
6. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, *et al.* PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res* **2014**;2:361-70
7. Agrawal S, Kandimalla ER. Intratumoural immunotherapy: activation of nucleic acid sensing pattern recognition receptors. *Immuno-Oncology Technology* **2019**;3:15-23
8. Demaria O, Cornen S, Daeron M, Morel Y, Medzhitov R, Vivier E. Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature* **2019**;574:45-56
9. Elion DL, Jacobson ME, Hicks DJ, Rahman B, Sanchez V, Gonzales-Ericsson PI, *et al.* Therapeutically active RIG-I agonist induces immunogenic tumor cell killing in breast cancers. *Cancer Res* **2018**;78:6183-95
10. Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **2011**;34:680-92
11. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **2010**;140:805-20
12. Elion DL, Cook RS. Harnessing RIG-I and intrinsic immunity in the tumor microenvironment for therapeutic cancer treatment. *Oncotarget* **2018**;9:29007-17
13. Aznar MA, Planelles L, Perez-Olivares M, Molina C, Garasa S, Etxeberria I, *et al.* Immunotherapeutic effects of intratumoral nanoplexed poly I:C. *J Immunother Cancer* **2019**;7:116
14. Márquez-Rodas I, Longo F, Rodriguez-Ruiz ME, Calles A, Ponce S, Jove M, *et al.* Intratumoral nanoplexed poly I:C BO-112 in combination with systemic anti-PD-1 for patients with anti-PD-1-refractory tumors. *Sci Transl Med* **2020**;12
15. Miyazono K, Katsuno Y, Koinuma D, Ehata S, Morikawa M. Intracellular and extracellular TGF- β signaling in cancer: some recent topics. *Front Med* **2018**;12:387-411
16. Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci Signal* **2019**;12

17. Ikushima H, Miyazono K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2010**;10:415-24
18. Massague J. TGF β in cancer. *Cell* **2008**;134:215-30
19. Arase M, Tamura Y, Kawasaki N, Isogaya K, Nakaki R, Mizutani A, *et al.* Dynamics of chromatin accessibility during TGF- β -induced EMT of Ras-transformed mammary gland epithelial cells. *Sci Rep* **2017**;7:1166
20. Katsuno Y, Meyer DS, Zhang Z, Shokat KM, Akhurst RJ, Miyazono K, *et al.* Chronic TGF- β exposure drives stabilized EMT, tumor stemness, and cancer drug resistance with vulnerability to bitopic mTOR inhibition. *Sci Signal* **2019**;12
21. Sundqvist A, Morikawa M, Ren J, Vasilaki E, Kawasaki N, Kobayashi M, *et al.* JUNB governs a feed-forward network of TGF β signaling that aggravates breast cancer invasion. *Nucleic Acids Res* **2018**;46:1180-95
22. Vasilaki E, Morikawa M, Koinuma D, Mizutani A, Hirano Y, Ehata S, *et al.* Ras and TGF- β signaling enhance cancer progression by promoting the Δ Np63 transcriptional program. *Sci Signal* **2016**;9:ra84
23. Ehata S, Hanyu A, Hayashi M, Aburatani H, Kato Y, Fujime M, *et al.* Transforming growth factor- β promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer Res* **2007**;67:9694-703
24. Fang Y, Chen Y, Yu L, Zheng C, Qi Y, Li Z, *et al.* Inhibition of breast cancer metastases by a novel inhibitor of TGF β receptor 1. *J Natl Cancer Inst* **2013**;105:47-58
25. Chen XH, Liu ZC, Zhang G, Wei W, Wang XX, Wang H, *et al.* TGF- β and EGF induced HLA-I downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells. *Mol Immunol* **2015**;65:34-42
26. Xu P, Bailey-Bucktrout S, Xi Y, Xu D, Du D, Zhang Q, *et al.* Innate antiviral host defense attenuates TGF- β function through IRF3-mediated suppression of Smad signaling. *Mol Cell* **2014**;56:723-37
27. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* **2011**;121:2750-67
28. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **2013**;14:128
29. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* **2016**;44:W90-7
30. Harada M, Morikawa M, Ozawa T, Kobayashi M, Tamura Y, Takahashi K, *et al.* Palbociclib enhances activin-SMAD-induced cytostasis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Sci*

- 2019**;110:209-20
31. Golden RJ, Chen B, Li T, Braun J, Manjunath H, Chen X, *et al.* An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature* **2017**;542:197-202
 32. Chipuk JE, Cornelius SC, Pultz NJ, Jorgensen JS, Bonham MJ, Kim SJ, *et al.* The androgen receptor represses transforming growth factor- β signaling through interaction with Smad3. *J Biol Chem* **2002**;277:1240-8
 33. Yang KM, Kim W, Bae E, Gim J, Weist BM, Jung Y, *et al.* DRAK2 participates in a negative feedback loop to control TGF- β /Smads signaling by binding to type I TGF- β receptor. *Cell Rep* **2012**;2:1286-99
 34. Mori M, Yoneyama M, Ito T, Takahashi K, Inagaki F, Fujita T. Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* **2004**;279:9698-702
 35. Higgs R, J NG, Ben Larbi N, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA. The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN- β production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol* **2008**;181:1780-6
 36. Lei CQ, Zhang Y, Xia T, Jiang LQ, Zhong B, Shu HB. FoxO1 negatively regulates cellular antiviral response by promoting degradation of IRF3. *J Biol Chem* **2013**;288:12596-604
 37. Purcell JW, Tanlimco SG, Hickson J, Fox M, Sho M, Durkin L, *et al.* LRRC15 is a novel mesenchymal protein and stromal target for antibody-drug conjugates. *Cancer Res* **2018**;78:4059-72
 38. Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* **2020**;20:143-57
 39. Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, *et al.* Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* **2017**;547:99-103
 40. Smith SE, Mellor P, Ward AK, Kendall S, McDonald M, Vizeacoumar FS, *et al.* Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. *Breast Cancer Res* **2017**;19:65
 41. Thompson DA, Weigel RJ. Characterization of a gene that is inversely correlated with estrogen receptor expression (ICERE-1) in breast carcinomas. *Eur J Biochem* **1998**;252:169-77
 42. David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**;19:419-35
 43. Kim IS, Gao Y, Welte T, Wang H, Liu J, Janghorban M, *et al.* Immuno-subtyping of breast cancer reveals distinct myeloid cell profiles and immunotherapy resistance mechanisms. *Nat Cell Biol* **2019**;21:1113-26
 44. Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol* **2017**;17:151-64

45. Yu X, Wang H, Li X, Guo C, Yuan F, Fisher PB, *et al.* Activation of the MDA-5-IPS-1 viral sensing pathway induces cancer cell death and type I IFN-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* **2016**;76:2166-76
46. Cañadas I, Thummalapalli R, Kim JW, Kitajima S, Jenkins RW, Christensen CL, *et al.* Tumor innate immunity primed by specific interferon-stimulated endogenous retroviruses. *Nat Med* **2018**;24:1143-50
47. Sheng W, LaFleur MW, Nguyen TH, Chen S, Chakravarthy A, Conway JR, *et al.* LSD1 ablation stimulates anti-tumor immunity and enables checkpoint blockade. *Cell* **2018**;174:549-63.e19
48. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Berking C, *et al.* Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* **2009**;119:2399-411
49. Bhoopathi P, Quinn BA, Gui Q, Shen XN, Grossman SR, Das SK, *et al.* Pancreatic cancer-specific cell death induced in vivo by cytoplasmic-delivered polyinosine-polycytidylic acid. *Cancer Res* **2014**;74:6224-35
50. Tormo D, Checińska A, Alonso-Curbelo D, Pérez-Guijarro E, Cañón E, Riveiro-Falkenbach E, *et al.* Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* **2009**;16:103-14
51. Pantelidou C, Sonzogni O, De Oliveria Taveira M, Mehta AK, Kothari A, Wang D, *et al.* PARP inhibitor efficacy depends on CD8(+) T-cell recruitment via intratumoral STING pathway activation in BRCA-deficient models of triple-negative breast cancer. *Cancer Discov* **2019**;9:722-37
52. Reisländer T, Groelly FJ, Tarsounas M. DNA damage and cancer immunotherapy: A STING in the tale. *Mol Cell* **2020**;80:21-8
53. Brockwell NK, Owen KL, Zanker D, Spurling A, Rautela J, Duivenvoorden HM, *et al.* Neoadjuvant interferons: critical for effective PD-1-based immunotherapy in TNBC. *Cancer Immunol Res* **2017**;5:871-84
54. Kwon J, Bakhoun SF. The cytosolic DNA-sensing cGAS-STING pathway in cancer. *Cancer Discov* **2020**;10:26-39
55. Sen T, Rodriguez BL, Chen L, Corte CMD, Morikawa N, Fujimoto J, *et al.* Targeting DNA damage response promotes antitumor immunity through STING-mediated T-cell activation in small cell lung cancer. *Cancer Discov* **2019**;9:646-61
56. Lönn P, van der Heide LP, Dahl M, Hellman U, Heldin CH, Moustakas A. PARP-1 attenuates Smad-mediated transcription. *Mol Cell* **2010**;40:521-32
57. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **2006**;25:349-60
58. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**;13:616-30

59. Qin BY, Liu C, Lam SS, Srinath H, Delston R, Correia JJ, *et al.* Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nat Struct Biol* **2003**;10:913-21
60. Takahasi K, Suzuki NN, Horiuchi M, Mori M, Suhara W, Okabe Y, *et al.* X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol* **2003**;10:922-7
61. Chipuk JE, Bhat M, Hsing AY, Ma J, Danielpour D. Bcl-xL blocks transforming growth factor- β 1-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release and not by directly antagonizing Apaf-1-dependent caspase activation in prostate epithelial cells. *J Biol Chem* **2001**;276:26614-21
62. Francis JM, Heyworth CM, Spooncer E, Pierce A, Dexter TM, Whetton AD. Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells. *J Biol Chem* **2000**;275:39137-45
63. Lafon C, Mathieu C, Guerrin M, Pierre O, Vidal S, Valette A. Transforming growth factor β 1-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and bcl-2. *Cell Growth Differ* **1996**;7:1095-104
64. Franco DL, Mainez J, Vega S, Sancho P, Murillo MM, de Frutos CA, *et al.* Snail1 suppresses TGF- β -induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *J Cell Sci* **2010**;123:3467-77
65. Prehn JH, Bindokas VP, Marcuccilli CJ, Krajewski S, Reed JC, Miller RJ. Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type β confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**;91:12599-603
66. Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. The bcl, NF κ B and p53/p21/WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF- β or TNF- α on activated hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol* **2001**;80:554-61
67. Maedler K, Fontana A, Ris F, Sergeev P, Toso C, Oberholzer J, *et al.* FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic β cells from apoptosis to cell replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**;99:8236-41
68. Plaza-Sirvent C, Schuster M, Neumann Y, Heise U, Pils MC, Schulze-Osthoff K, *et al.* c-FLIP expression in Foxp3-expressing cells is essential for survival of regulatory T cells and prevention of autoimmunity. *Cell Rep* **2017**;18:12-22
69. Schlapbach R, Spanaus KS, Malipiero U, Lens S, Tasinato A, Tschopp J, *et al.* TGF- β induces the expression of the FLICE-inhibitory protein and inhibits Fas-mediated apoptosis of microglia. *Eur J Immunol* **2000**;30:3680-8
70. Kang JS, Alliston T, Delston R, Derynck R. Repression of Runx2 function by TGF- β through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *Embo j* **2005**;24:2543-55
71. Guikema JE, Amiot M, Eldering E. Exploiting the pro-apoptotic function of NOXA as a therapeutic modality in cancer. *Expert Opin Ther Targets* **2017**;21:767-79

72. Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGF β response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* **2003**;11:915-26
73. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* **2001**;113-4.
74. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **2015**;526:666-71
75. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **2015**;526:660-5
76. Zhou Z, He H, Wang K, Shi X, Wang Y, Su Y, *et al.* Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science* **2020**;368
77. Erkes DA, Cai W, Sanchez IM, Purwin TJ, Rogers C, Field CO, *et al.* Mutant BRAF and MEK inhibitors regulate the tumor immune microenvironment via pyroptosis. *Cancer Discov* **2020**;10:254-69
78. Zhang Z, Zhang Y, Xia S, Kong Q, Li S, Liu X, *et al.* Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity. *Nature* **2020**;579:415-20
79. Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* **2019**;18:197-218

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導ご鞭撻を頂きました東京大学医学系研究科分子病理学教室の宮園浩平教授に深く感謝申し上げます。また、手技的なものから研究方針へのアドバイスまで、長きにわたりアドバイスを賜りました鯉沼代造准教授に感謝申し上げます。また、実験の進行に関するご助言を賜りました森川真大助教、田邊諒博士に感謝申し上げます。更に、技術的にご支援くださった森下保幸さん、結城圭子さんにも感謝申し上げます。また、全般にわたり、ご助言いただきました江幡正悟准教授、勝野蓉子助教、高橋恵生助教をはじめとする東京大学医学系研究科分子病理学教室の皆様にも感謝申し上げます。また、研究の遂行を支援して下さった一條秀憲教授に深く感謝申し上げます。更に、本研究を遂行するにあたり、ベクターを供与して下さった元慶應大学の故 三好浩之先生、Massachusetts Institute of Technology の Feng Zhang 先生に感謝申し上げます。また、GO 解析にてそのプラットフォームを提供して下さったウェブツール Enrichr に関わった方々にも感謝申し上げます (28,29)。