

血清由来マクロファージ活性化因子は  
M2 型から M1 型マクロファージへの  
再構成を介して抗腫瘍活性を発揮する

2024 年 9 月

高良 毅

## 目次

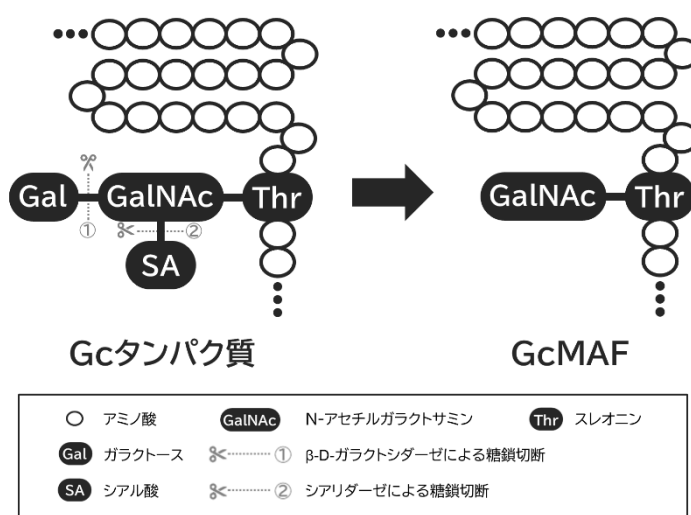
第1章	概要.....	3
第2章	序論.....	4
第3章	結果.....	7
第4章	考察.....	18
第5章	方法.....	20
第6章	謝辞.....	25
第7章	参考文献.....	26

## 第1章 概要

Group-specific component protein derived macrophage activating factor (GcMAF) による様々な抗腫瘍活性が報告されているにもかかわらず, その詳細なメカニズムは未だ不明である. 腫瘍微小環境に存在する腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophages, TAMs) の制御はがん治療において重要である. 本研究では, GcMAF によるマクロファージ活性化に着目し, その抗腫瘍活性発揮メカニズムの解明と, 腫瘍微小環境の TAMs に対する GcMAF の作用の検証を行った. GcMAF で刺激した RAW264.7 細胞と EMT6 細胞を孔径 0.4  $\mu$  m 細胞培養インサートを用いて共培養し, 遺伝子発現, タンパク質発現, EMT6 細胞生存率を解析した. また, GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞の DNA マイクロアレイ解析を行った. さらに, インターロイキン (interleukin, IL) -4, IL-13 を用いて M2 型に誘導した RAW264.7 細胞を用いて, 同様の解析を行った. その結果, GcMAF 刺激によって RAW264.7 細胞では, 細胞壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) と誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) の mRNA 発現と関連タンパク質産生が増加し, RAW264.7 細胞と共培養した EMT6 細胞の細胞生存率が低下した. GcMAF の受容体やシグナル経路の詳細は不明ではあるが, M2 型誘導 RAW264.7 細胞においても確認され, GcMAF の抗腫瘍活性はマクロファージの M1 型への分化誘導および M2 型マクロファージにおける M1 型への再構成によって発揮されることが示唆された. GcMAF による M2 型から M1 型へのマクロファージ再構成を介した抗腫瘍活性の発現は, 新たながん免疫療法の開発に役立つと考える.

## 第2章 序論

Gc タンパク質は、血液中に存在する 51-58 kDa の糖タンパク質で、ビタミン D 輸送やアクチンスカベンジャーとして機能することが知られている [1-3]. 生体内において、Gc タンパク質のガラクトース (galactose, Gal) とシアル酸 (sialic acid, SA) は、B 細胞由来の  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼと T 細胞由来のシアリダーゼによってそれぞれ切断され、N-アセチルガラクトサミン (N-acetyl-galactosamine, GalNAc) 残基を有する Group-specific component protein derived macrophage activating factor (GcMAF) を形成する (図 1) [4].



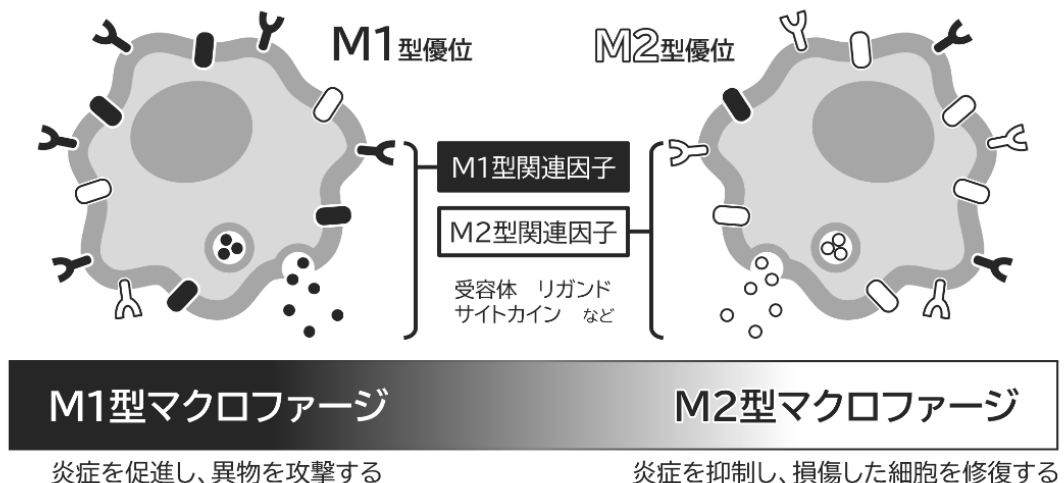
**図 1. Gc タンパク質と GcMAF の模式図**

Gc タンパク質は、GalNAc に Gal と SA が結合した糖鎖がスレオニンに結合した構造を持ち、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼとシアリダーゼによって GalNAc 残基が露出した GcMAF を形成する. 生体内では血中のリンパ球の一種である B 細胞, T 細胞由来の酵素によって GcMAF に変換されるほか、血清から抽出した Gc タンパク質に対して糖鎖切断酵素を作用させることで、人工的に GcMAF を作製することが可能である.

GcMAF はマクロファージ細胞からの抗酸化酵素 superoxide dismutase (SOD) の産生やがん細胞での血管新生阻害をもたらす [5]. 当研究室ではこれまでに、GcMAF が担がんマウスの腹腔マクロファージの貪食活性を亢進すること [6], 血管新生を阻害すること、腫瘍体積を縮小することを明らかにしてきた [7]. さらに、当研究室では人工的に

糖鎖修飾した GcMAF を用いてがん患者の免疫活性を高めるがん免疫療法を発表している [8].

腫瘍の増殖には、腫瘍細胞とそれを取り巻く間質細胞で形成される腫瘍微小環境が大きな影響を与えている。腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophages, TAMs), 線維芽細胞, 血管内皮細胞は腫瘍間質細胞の主要な構成細胞であり, 腫瘍の増殖や浸潤, 血管新生の促進や免疫抑制を促進する [9]. マクロファージは, 炎症性サイトカインの産生や貪食作用などの自然免疫において重要な M1 型と, 免疫抑制性サイトカインを誘導することで抗炎症作用を発揮する M2 型の 2 つの型に大別される (図 2) [10].



## 図 2. M1 型および M2 型マクロファージの概要

マクロファージは, 炎症を促進する M1 型マクロファージ関連因子と炎症を抑制する M2 型マクロファージ関連因子が共発現している. それぞれの因子の有意性によって, M1 型および M2 型マクロファージに大別することができる. TAMs は M2 型マクロファージが優位である傾向にあり, 炎症を抑制させ腫瘍細胞の増殖に寄与してしまう.

マクロファージはこれらの型が共存しているにもかかわらず, 悪性腫瘍内で観察される多くの TAMs は M2 型である [11]. 近年の研究では, M2 型は機能的に異なる複数のサブセットの集合であり, 遺伝子発現プロファイルに応じて M2a/M2b/M2c/M2d の表現型に分類されること [12], TAMs は周囲の環境に依存して M1 型と M2 型の表現型を再構成できること [13], TAMs はしばしば M1 型関連遺伝子と M2 型関連遺伝子を共

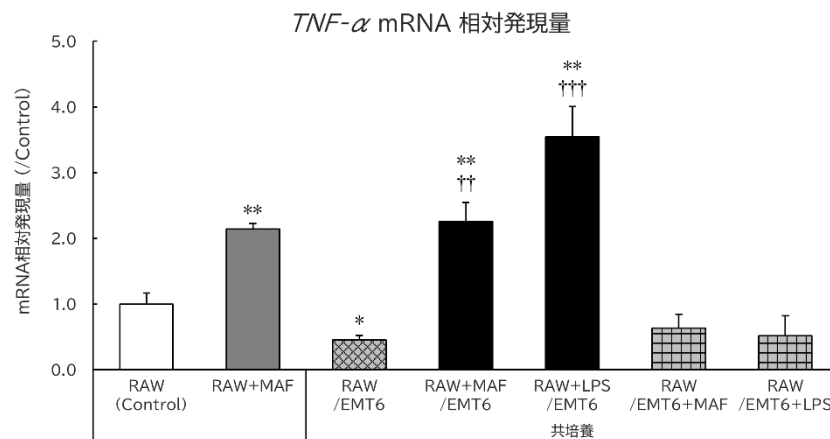
発現すること [14] が報告されている。TAMsは、腫瘍内でインターロイキン (interleukin, IL) -10 や形質転換増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) などの腫瘍促進因子を産生する M2 型を示し [15], 低酸素環境下で血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), IL-8, シクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) などの因子を産生する [16,17]. これらは血管新生に関する因子を活性化し [18], 好ましい腫瘍微小環境を作り出すことから, 腫瘍微小環境におけるマクロファージの制御は, 腫瘍増悪化の阻害において重要である.

GcMAF は, in vitro モデルにおけるマクロファージを介した抗腫瘍活性 [19-22], 腫瘍組織における血管新生阻害作用などの生理活性 [5,19], GcMAF を使用した症例報告における様々な種類のがんに対する抗腫瘍活性 [7,23]が報告されている. 現在は, それらの作用機序と新たな治療薬としての有用性を解明するための研究がおこなわれている. 本研究では, 非接触環境で隣接する腫瘍細胞に対して GcMAF 刺激マクロファージの効果を解明し, さらに M2 型マクロファージにおける GcMAF の効果を評価した.

## 第3章 結果

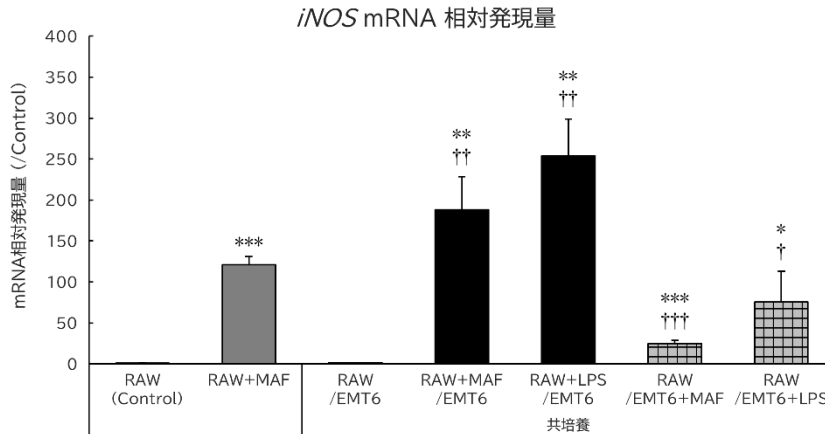
### 3.1 非接触共培養系における GcMAF 刺激細胞の変化

GcMAF 刺激マクロファージと腫瘍細胞を非接触の状態でも培養することで、腫瘍微小環境における GcMAF の抗腫瘍活性に影響を及ぼすマクロファージ由来の液性因子を調査した。GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と EMT6 細胞を孔径 0.4  $\mu$ m 細胞培養インサートを用いて共培養し、細胞から mRNA を抽出し合成した cDNA, 培地上清中のタンパク質発現レベルを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR), 酵素結合免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 測定法を用いて測定した。GcMAF で刺激した RAW264.7 細胞は、未刺激の単独培養 RAW264.7 細胞と比較して、*TNF- $\alpha$*  および *iNOS* mRNA の相対発現量が増加した (図 3, 4)。



**図 3. GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と EMT6 細胞の非接触共培養による RAW264.7 細胞の *TNF- $\alpha$*  mRNA 相対発現量**

0.1  $\mu$ g/mL GcMAF または 1  $\mu$ g/mL リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) で RAW264.7 細胞を 24 時間刺激し、EMT6 細胞と 24 時間共培養した。その後、RT-qPCR を用いて RAW264.7 細胞の遺伝子発現量を測定し、Control 群との mRNA 相対発現量を示した。平均  $\pm$  標準偏差 (standard deviation, SD), N = 3. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs. Control; †† $p$  < 0.01, ††† $p$  < 0.001 vs. (RAW/EMT6)。

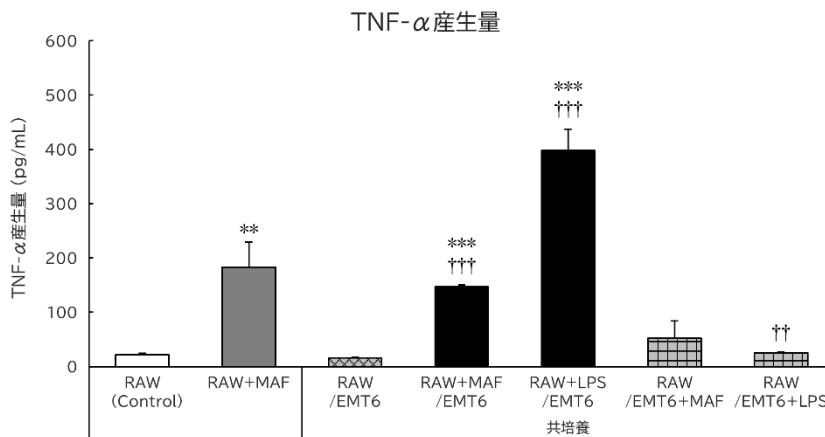


**図 4. GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と EMT6 細胞の非接触共培養による RAW264.7 細胞の *iNOS* mRNA 相対発現量**

0.1  $\mu$ g/mL GcMAF または 1  $\mu$ g/mL LPS で RAW264.7 細胞を 24 時間刺激し, EMT6 細胞と 24 時間共培養した. その後, RT-qPCR を用いて RAW264.7 細胞の遺伝子発現量を測定し, Control 群との mRNA 相対発現量を示した. 平均  $\pm$  SD, N = 3. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. Control; †p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001 vs. (RAW/EMT6).

これらの mRNA 相対発現量は, EMT6 細胞と共培養しても高く維持された.

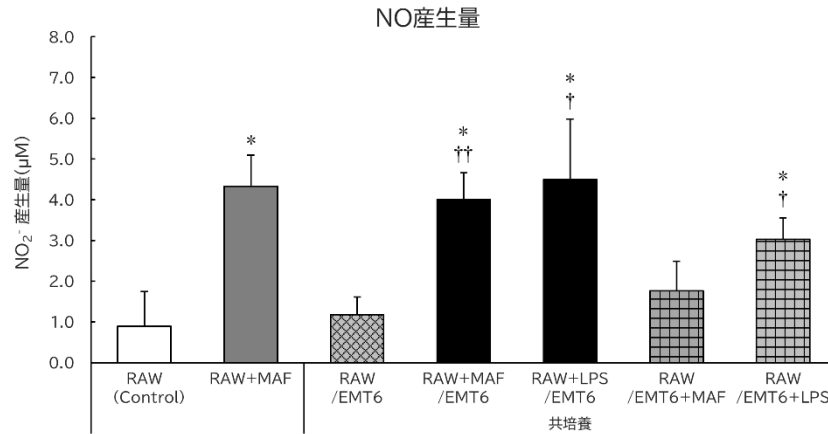
培養上清中の TNF- $\alpha$  産生量と NO 産生量においても同様の変化が確認され, mRNA 相対発現量の変化の結果を裏付けた (図 5, 6).



**図 5. GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と EMT6 細胞の非接触共培養による培地上清中の TNF- $\alpha$  産生量**

0.1  $\mu$ g/mL GcMAF または 1  $\mu$ g/mL LPS で RAW264.7 細胞を 24 時間刺激し, EMT6 細胞と 24 時間共培養した. その後, 培地上清中の TNF- $\alpha$  産生量を ELISA で測定した. 平均  $\pm$  SD, N = 3. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. Control; ††p < 0.01, †††p < 0.001 vs. (RAW/EMT6).



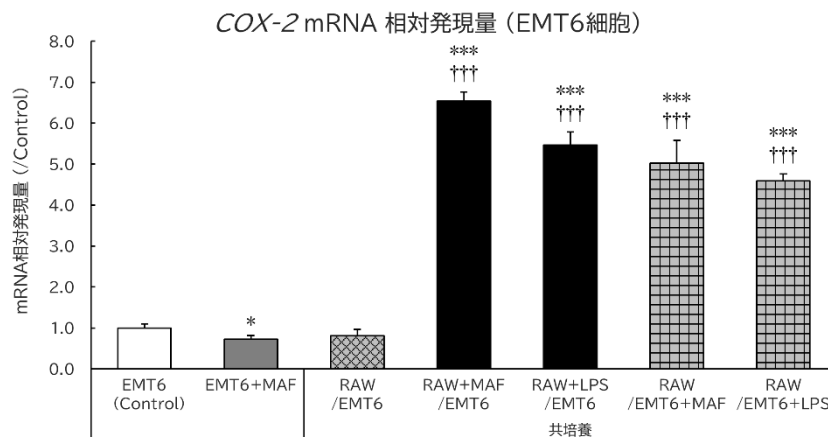


**図 6. GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と EMT6 細胞の非接触共培養による培地上清中の NO 産生量**

0.1 μg/mL GcMAF または 1 μg/mL LPS で RAW264.7 細胞を 24 時間刺激し, EMT6 細胞と 24 時間共培養した. その後, 培地上清中の亜硝酸イオン (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 量を測定し, NO 産生量として示した. 平均 ± SD, N = 3. \*p < 0.05 vs. Control; †p < 0.05, ††p < 0.01 vs. (RAW/EMT6).

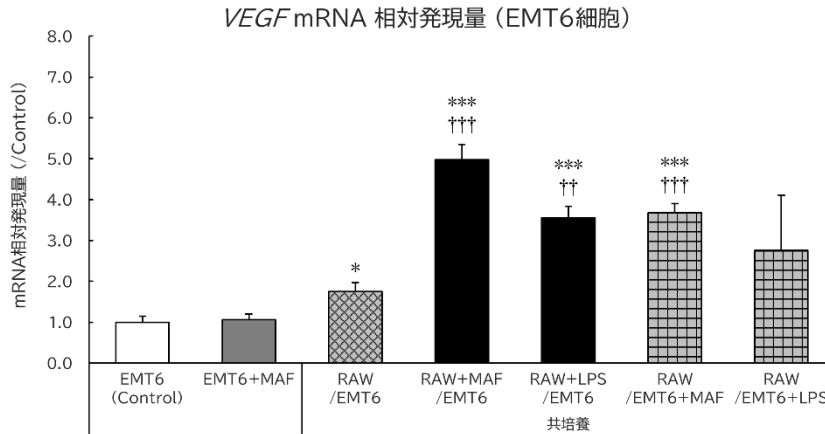
これらの結果は, GcMAF がマクロファージによる炎症性サイトカインの産生を誘導し, その活性は腫瘍細胞の存在の影響を受けないことが示唆している.

RAW264.7 細胞と共培養した EMT6 細胞において, 腫瘍の増殖および浸潤に関連する *COX-2*, *VEGF* mRNA の相対発現量が GcMAF 刺激によって増加した (図 7, 8) [18].



**図 7. GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と EMT6 細胞の非接触共培養による EMT6 細胞の COX-2 mRNA 発現比**

0.1 μg/mL GcMAF または 1 μg/mL LPS で RAW264.7 細胞を 24 時間刺激し, EMT6 細胞と 24 時間共培養した. その後, RT-qPCR を用いて EMT6 細胞の遺伝子発現量を測定し, Control 群との mRNA 相対発現量を示した. 平均 ± SD, N = 3. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 vs. Control; †††p < 0.001 vs. (RAW/EMT6).



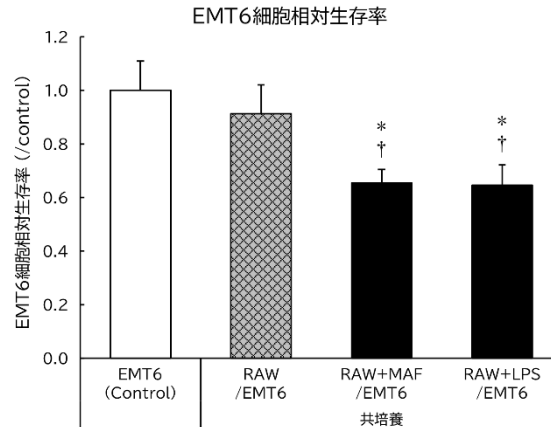
**図 8. GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と EMT6 細胞の非接触共培養による EMT6 細胞の VEGF mRNA 発現比**

0.1  $\mu$ g/mL GcMAF または 1  $\mu$ g/mL LPS で RAW264.7 細胞を 24 時間刺激し、EMT6 細胞と 24 時間共培養した。その後、RT-qPCR を用いて EMT6 細胞の遺伝子発現量を測定し、Control 群との mRNA 相対発現量を示した。平均  $\pm$  SD, N = 3. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 vs. Control; ††p < 0.01, †††p < 0.001 vs. (RAW/EMT6)。

RAW264.7 細胞における GcMAF 刺激による変化は、LPS 刺激でも同様に確認された。したがって、GcMAF はマクロファージを効果的に活性化する可能性がある。

### 3.2 GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞により誘導される EMT6 細胞の変化

LPS で活性化されたマクロファージは、共培養した腫瘍細胞の増殖を抑制する [24]。ここでは、LPS と同様にマクロファージを活性化させる GcMAF が、共培養した EMT6 細胞の生存に変化を与えるかどうか評価した (図 9)。

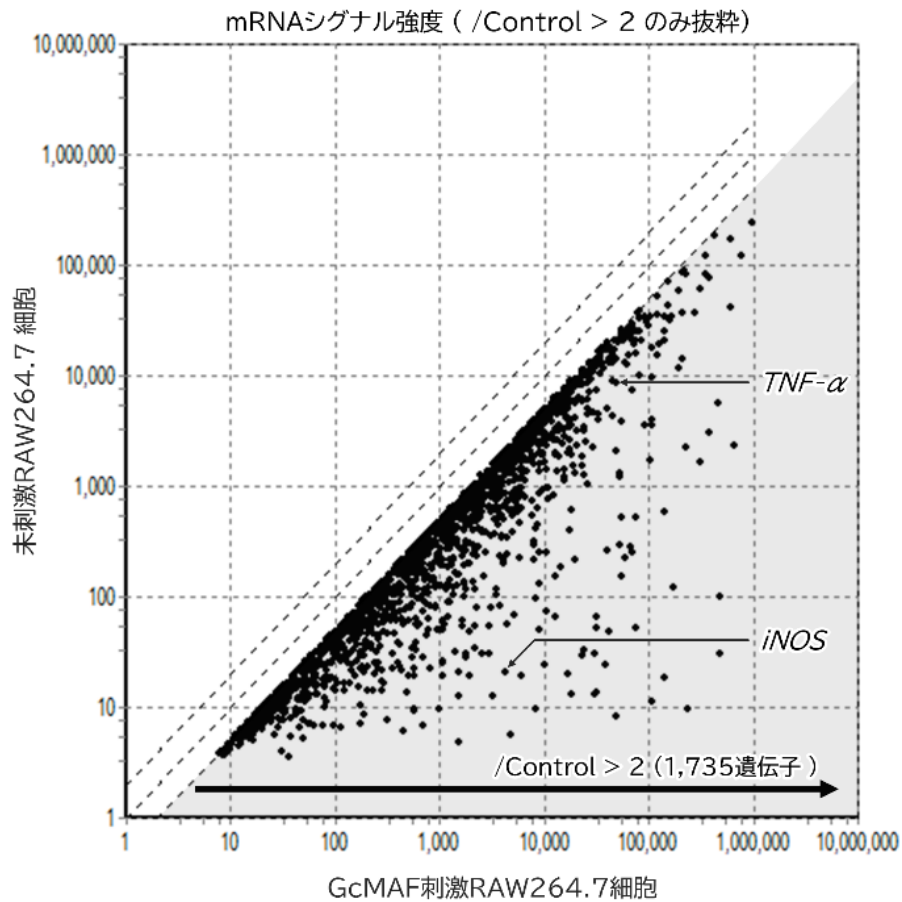


**図 9. GcMAF 刺激 RAW2646.7 細胞と共培養した EMT6 細胞の相対細胞生存率**  
 0.1  $\mu$ g/mL GcMAF または 1  $\mu$ g/mL LPS で RAW264.7 細胞を 24 時間刺激し、EMT6 細胞と 48 時間共培養した。細胞培養インサートを除去した後、EMT6 細胞をクリスタルバイオレットで染色した。水道水で洗浄後、1%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) で細胞中の色素を溶出させた。吸光度を測定し、Control 群との相対細胞生存率を示した。平均  $\pm$  SD, N = 3. \*p < 0.05 vs. Control; †p < 0.05 vs. (RAW/EMT6)。

LPS 刺激 RAW264.7 細胞との共培養と同様に、GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞との 48 時間共培養は、EMT6 細胞の増殖を有意に抑制した。

### 3.3 DNA アレイを用いた GcMAF 刺激マクロファージの網羅的遺伝子発現解析

DNA アレイを用いてマクロファージにおける GcMAF 誘導遺伝子発現変化を解析した (図 10)。



**図 10. DNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析**

GcMAF 刺激した RAW264.7 細胞と未刺激 RAW264.7 細胞の遺伝子発現強度を測定した。横軸は GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞における遺伝子のシグナル強度、縦軸は未刺激 RAW264.7 細胞における遺伝子のシグナル強度にそれぞれ対応している。GcMAF 刺激 RAW264.7 で 2 倍以上発現した遺伝子の点を示した。

GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞では、*TNF-α*、*iNOS*を含む 1,753 遺伝子の発現レベルが、未刺激 RAW264.7 細胞と比較して 2 倍以上に増加した。

M1/M2 型	遺伝子名	未刺激 RAW264.7 細胞	GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞	mRNA シグナル 増強率
M1	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	18.55	140704.30	7585.60
	<i>IL-6</i>	5.58	4874.99	874.42
	<i>iNOS</i>	20.96	4236.32	202.13
	<i>CCL5</i>	64.80	12815.26	197.77
	<i>CXCL2</i>	2988.34	374458.00	125.31
	<i>CD80</i>	1698.87	102798.90	60.51
	<i>CD86</i>	18.94	1074.24	56.73
	<i>CD64</i>	7462.73	70232.34	9.41
	<i>CD32</i>	3364.42	23622.88	7.02
	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	8489.64	48439.59	5.71
	<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	14.75	20.80	1.41
	<i>CD16</i>	52581.80	56959.71	1.08
	<i>IRF-5</i>	107.62	94.58	0.88
	<i>IL-12</i>	13.14	11.36	0.86
	<i>IL-23</i>	9.23	7.31	0.79
	<i>MerTK</i>	9.64	6.40	0.66
<i>CD68</i>	231080.10	147231.50	0.64	
<i>CD369</i>	13034.62	6303.41	0.48	
M2	<i>IL-10</i>	20.55	1554.39	75.62
	<i>CD206</i>	157.57	337.42	2.14
	<i>CD204</i>	37137.88	77810.99	2.10
	<i>VEGF</i>	419.44	875.96	2.09
	<i>TGF-<math>\beta</math></i>	36807.55	50796.77	1.38
	<i>ARG</i>	12.66	12.95	1.02
	<i>CD163</i>	24.99	24.36	0.97
	<i>COX-2</i>	466323.20	448142.40	0.96
	<i>FceRI</i>	12.06	11.11	0.92
	<i>STAT6</i>	9097.94	8083.17	0.89
	<i>CD209</i>	19.85	14.87	0.75
	<i>IRF4</i>	34.07	17.13	0.50
	<i>CSF-1R</i>	135981.20	2938.70	0.02

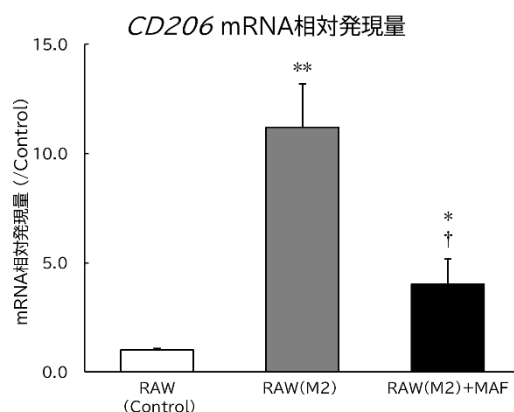
**表 1. DNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析**

未刺激 RAW264.7 細胞と比較して, GcMAF で刺激した RAW264.7 細胞において M1 型あるいは M2 型関連遺伝子のシグナル強度を, 増強率の大きさ順に示した.

GcMAF 刺激によって 2 倍以上増強された遺伝子のうち, M1 型マクロファージ関連遺伝子が 10 種類, M2 型マクロファージ関連遺伝子が 4 種類, それぞれ認められた。さらに, これらの mRNA シグナル増強率を比較したところ, M1 型マクロファージ関連遺伝子の mRNA シグナル増強率の方が高い傾向が認められた。これらの結果から, GcMAF はマクロファージを M1 型マクロファージに誘導していることが示唆された。

### 3.4 GcMAF による M2 型から M1 型マクロファージへの再構成についての評価

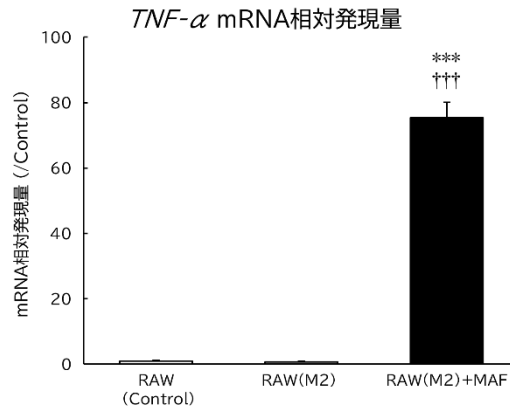
GcMAF はマクロファージを活性化して炎症性細胞に変換することで抗腫瘍活性を発揮する。また, マクロファージは M1 型と M2 型が共存しているにもかかわらず, 悪性腫瘍内で観察される多くの TAMs は M2 型であり [11], RAW264.7 細胞は IL-4, IL-13 で刺激することで, M2 型マクロファージの機能を獲得する [25]。そこで, M2 型 RAW264.7 細胞に対する GcMAF の効果を検証し, M2 型マクロファージが M1 型マクロファージに再構成されるかどうかを評価した [25]。CD206 の mRNA 発現レベルは, 未刺激 RAW264.7 細胞と比較して M2 型 RAW264.7 細胞で増加したが, この効果は GcMAF で刺激した M2 型 RAW264.7 細胞において有意に抑制された (図 11)。



**図 11. GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 細胞における CD206 mRNA 発現比**

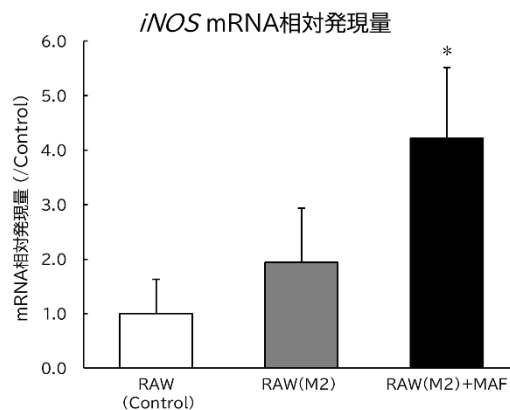
RAW264.7 細胞を IL-4 および IL-13 各 20 ng/mL で 72 時間刺激し (M2), その後 GcMAF 0.1  $\mu$ g/mL で 24 時間刺激した。その後, RT-qPCR を用いて RAW264.7 細胞の遺伝子発現量を測定し, Control 群との mRNA 相対発現量を示した。平均  $\pm$  SD, N = 3. \*\*p < 0.01 vs. Control; †p < 0.05 vs. (RAW(M2))。

GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 細胞では, 未刺激 RAW264.7 細胞と比較して, M1 型マクロファージ関連遺伝子である  $TNF-\alpha$  および  $iNOS$  の mRNA 発現レベルが増加した (図 12, 13).



**図 12. GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 細胞における  $TNF-\alpha$  mRNA 発現比**

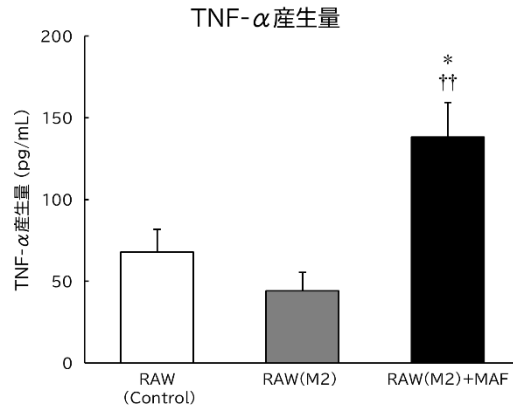
RAW264.7 細胞を IL-4 および IL-13 各 20 ng/mL で 72 時間刺激し (M2), その後 GcMAF 0.1  $\mu$ g/mL で 24 時間刺激した. その後, RT-qPCR を用いて RAW264.7 細胞の遺伝子発現量を測定し, Control 群との mRNA 相対発現量を示した. 平均  $\pm$  SD, N = 3. \*\*\*p < 0.001 vs. Control; †††p < 0.05 vs. (RAW(M2)).



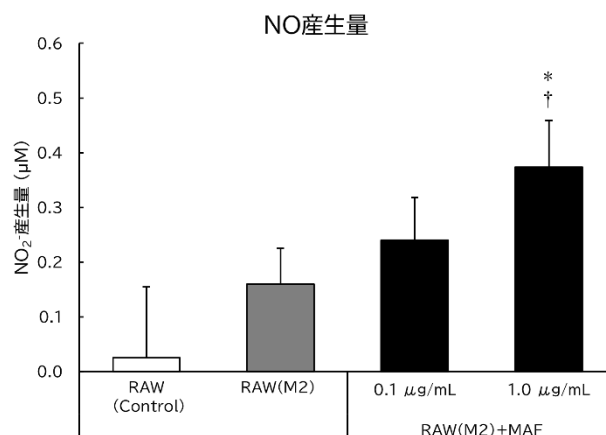
**図 13. GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 細胞における  $iNOS$  mRNA 発現比**

RAW264.7 細胞を IL-4 および IL-13 各 20 ng/mL で 72 時間刺激し (M2), その後 GcMAF 0.1  $\mu$ g/mL で 24 時間刺激した. その後, RT-qPCR を用いて RAW264.7 細胞の遺伝子発現量を測定し, Control 群との mRNA 相対発現量を示した. 平均  $\pm$  SD, N = 3. \*p < 0.05 vs. Control.

培養上清中の  $TNF-\alpha$  および NO 産生量でも同様の傾向が認められた (図 14, 15).



**図 14. GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 細胞における培地上清中の TNF- $\alpha$  産生量**  
 RAW264.7 細胞を IL-4 および IL-13 各 20 ng/mL で 72 時間刺激し ((RAW(M2)), その後 GcMAF 0.1  $\mu$ g/mL で 24 時間刺激した. その後, 培地上清中の TNF- $\alpha$  産生量を ELISA で測定した. 平均  $\pm$  SD, N = 3. \*p < 0.05 vs. Control; ††p < 0.01 vs. (RAW(M2)).



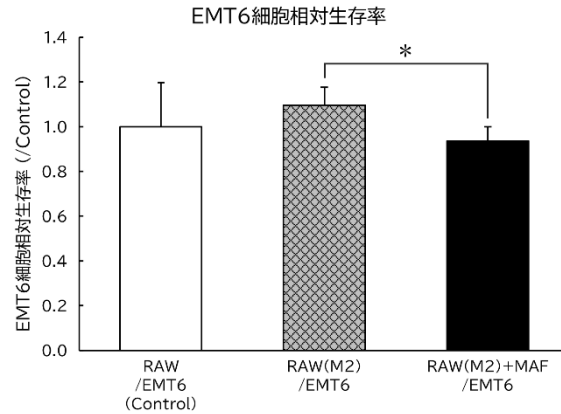
**図 15. GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 細胞における培地上清中の NO 産生量**  
 RAW264.7 細胞を IL-4 および IL-13 各 20 ng/mL で 72 時間刺激し (RAW(M2)), その後 GcMAF で 24 時間刺激した. その後, 培地上清中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>量を測定し, NO 産生量として評価した. 平均  $\pm$  SD, N = 3. \*p < 0.05 vs. Control; †p < 0.05 vs. (RAW(M2)).

これらの結果は, GcMAF が M2 型から M1 型マクロファージへの再構成を誘導することを示唆している.

### 3.5 GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 による EMT6 細胞増殖抑制

GcMAF が M2 型 RAW264.7 細胞に対して抗腫活性を発揮するかどうかを検証した (図 16).





**図 16. GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 細胞と共培養後の EMT6 細胞の相対細胞生存率**

RAW264.7 細胞を IL-4 および IL-13 各 20 ng/mL で 72 時間刺激し (M2), その後 GcMAF 0.1  $\mu$ g/mL で 48 時間共培養した. 共培養インサートを除去した後, EMT6 細胞を cell counting kit-8 (CCK-8) で染色した. 吸光度を測定し, Control 群との相対細胞生存率を示した. 平均  $\pm$  SD, N = 3. \*p < 0.05.

CCK-8 による細胞生存率解析により, GcMAF 刺激した M2 型 RAW264.7 細胞との共培養は, 未刺激の M2 型 RAW264.7 細胞との共培養よりも EMT6 細胞の増殖を有意に阻害していることが示された. この結果は, GcMAF によるマクロファージへの刺激は, 抗腫瘍活性の発揮と腫瘍細胞の細胞死をもたらすことを示唆している.

## 第4章 考察

本研究において、GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞が炎症性サイトカインの産生を誘導し、液性因子を介して非接触環境下で隣接する EMT6 細胞の増殖を抑制することが明らかになった。当研究室の先行研究において、酵素処理したウシ初乳 MAF はマウス腹腔マクロファージの貪食活性を亢進したが、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの産生は誘導しなかった [26]。このことから、血清から精製した GcMAF と初乳 MAF (GcMAF を含むタンパク質混合物) は異なる性質を有することが示唆された。GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と共培養することで、EMT6 細胞は浸潤や増殖に関与する COX-2 や VEGF の遺伝子発現の増強が確認された。これらの反応は、GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞の影響下で生存した EMT6 細胞に起因したと推察する [27]。GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と共培養された EMT6 細胞の増殖が抑制されたことから、GcMAF はマクロファージの活性化を介して腫瘍細胞の増殖シグナルを抑制することが示唆された。

腫瘍微小環境において、腫瘍細胞の産生するコロニー刺激因子 colony-stimulating factor-1 の刺激を受けた TAMs は、上皮成長因子 epidermal growth factor を分泌し、腫瘍細胞の増殖や浸潤を促進する M2 型マクロファージとして存在する [28]。一方、M1 型マクロファージは、活性酸素種や一酸化窒素を産生して直接腫瘍細胞を攻撃したり、抗腫瘍抗体を介した抗体依存性細胞傷害により間接的に腫瘍細胞を攻撃したりする [29,30]。M2 型マクロファージが優位な腫瘍環境でも GcMAF が抗腫瘍作用を発揮できるかを検証するために、M2 型マクロファージに対する GcMAF の作用を検証した。マクロファージを IL-4 と IL-13 を含む培地で培養し、in vitro で未分化マクロファージを M2 型マクロファージに分化させた [25]。本研究において、M2 型に誘導した RAW264.7 細胞を GcMAF で刺激したところ、M1 型機能にシフトしていることが mRNA 発現および培地上清に産生される成分の解析によって観察された。共培養した EMT6 細胞の細胞生存率の低下は、腫瘍細胞を皮下移植されたマウスモデルを用いた in vivo 研究の結果と類似していた [31]。これらの結果は、GcMAF は腫瘍微小環境のマク

ロファージを刺激して M1 型マクロファージの機能を発揮させる, あるいは M2 型マクロファージを再構成して M1 型の機能を発揮させることによって抗腫瘍活性を発揮していることを示唆している. 本研究は, GcMAF 刺激マクロファージの隣接腫瘍細胞に対する抗腫瘍メカニズムを明らかにし, がん免疫療法における GcMAF の潜在的な有用性を強調した.

## 第5章 方法

### 5.1 試薬

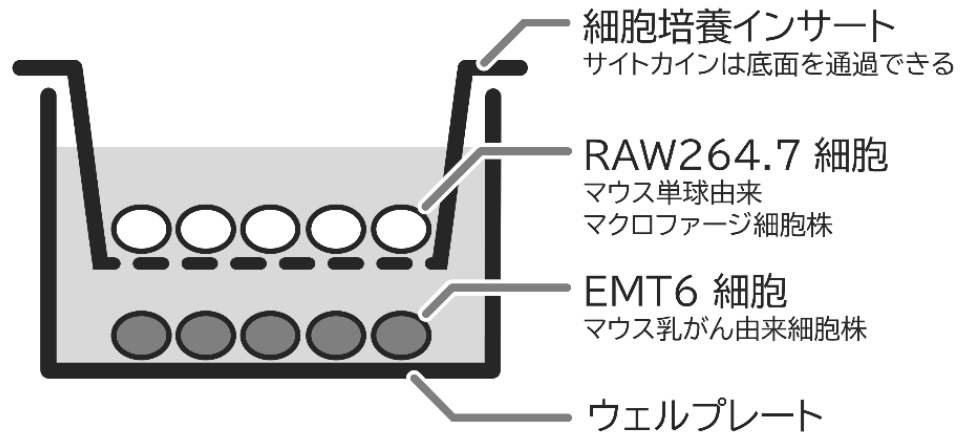
Gcタンパク質は、先行研究に記載されていた 25 (OH) D3-セファロースカラムによる低圧カラムクロマトグラフィー法を用いて抽出された[6]. GcMAF を産生するため、Gc protein を  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で 37°C, 3 時間処理した後, シアリダーゼ (シグマアルドリッチジャパン合同会社, 東京, 日本) で 37°C, 3 時間処理した. GcMAF は 25 (OH) D3-セファロースカラムを用いて精製された.

### 5.2 細胞株

マウス単球由来マクロファージ細胞株 RAW264.7 (株式会社ケー・エー・シー, 京都, 日本) は, 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS; ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本), 100 units/mL ペニシリン G, 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で培養した. マウス乳がん細胞株 EMT6 (鳥取大学大崎教授より供与, 鳥取, 日本)は, 10%FBS, 100 units/mL ペニシリン G, 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを添加したイーグル最小必須培地 (Eagle's minimum essential medium, EMEM; 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で培養した.

### 5.3 RAW264.7 細胞と EMT6 細胞の共培養

RAW264.7 細胞を, 0.4  $\mu$ m 孔の 6 ウェル細胞培養インサート (株式会社グライナー・ジャパン, 東京, 日本) に  $5 \times 10^5$  /insert で播種し, 6 ウェルプレート (アズワン株式会社, 大阪, 日本) に設置して一晩培養した (図 17).



### 図 17. 共培養実験の概要

RAW264.7 細胞と EMT6 細胞は  $0.4 \mu\text{m}$  孔の細胞培養インサートで隔てられ、非接触環境下で培養された。

りん酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS; ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) で洗浄後, GcMAF ( $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), または LPS (*Escherichia coli O111:B4*;  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; シグマアルドリッチジャパン合同会社, 東京, 日本) を FBS 不含 DMEM 培地に添加し, 24 時間培養した. EMT6 細胞は 6 ウェルプレートに  $5 \times 10^5$  /well で播種し, 一晚培養した後, FBS 不含 EMEM で刺激した RAW264.7 細胞と 24 時間共培養した (細胞比 1:1). 培養後, 細胞と培地上清を回収し, 使用時まで  $-80^\circ\text{C}$  で保管した.

### 5.4 RT-qPCR

RNA は Nucleo Spin RNA (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を用いて抽出され, PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を用いて cDNA に逆転写した. RT-qPCR は Power up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) と StepOne Plus Real-Time system (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて実施した. リアルタイム PCR は  $95^\circ\text{C}$  で 3 秒間 (変性),  $60^\circ\text{C}$  で 30 秒間 (アニーリングおよび伸長) からなる増幅サイクルを 40 回適用した.  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法を用いて算出した相対発現を, グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH*) の結果を内部コントロールとして解析した. ここで使用した全プライマー (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) の配列は以下の通りである [32-34].

<i>GAPDH</i>	Forward, 5'-ATGGCCTTCCGTGTTTCCTAC-3'
	Reverse, 5'-TAGCCCAAGATGCCCTTCAG-3'
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Forward, 5'-AATGGCCTCCCTCTCATCAG-3'
	Reverse, 5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
<i>iNOS</i>	Forward, 5'-GGAATCTTGGAGCGAGTTGT-3'
	Reverse, 5'-GCAGCCTCTTGTCTTTGACC-3'
<i>CD206</i>	Forward, 5'-GGAGGCTGATTACGAGCAGT-3'
	Reverse, 5'-CATAGGAAACGGGAGAACCA-3'
<i>COX-2</i>	Forward, 5'-CCACTTCAAGGGAGTCTGGA-3'
	Reverse, 5'-AGTCATCTGCTACGGGAGGA-3'
<i>VEGF</i>	Forward, 5'-TACCTCCACCATGCCAAGTGGT-3'
	Reverse, 5'-AGGACGGCTTGAAGATGTAC-3'

## 5.5 NO 解析

回収された上清は Griess 法で評価し、溶液中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>量を測定することで NO 産生を推定する Griess 法を用いて評価した. 1%スルファニルアミド (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本), 2.5%リン酸 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本), 0.1% N-1-ナフチルエチレンジアミン塩酸塩 (東京化成工業株式会社, 東京, 日本) を含む Griess 試薬を調製し、亜硝酸と混和した. マイクロプレートリーダー (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) を用いて亜硝酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) 水溶液で調製した既知濃度サンプルと培地上清の波長 550 nm における吸光度を測定し、亜硝酸イオンの量を算出した.

## 5.6 ELISA

培地上清中の TNF- $\alpha$  濃度は、製造元の指示書に沿って ELISA キット (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて測定された.

### **5.7 クリスタルバイオレット染色法による EMT6 細胞数の評価**

EMT6 細胞を 6 ウェルプレートに  $5 \times 10^5$  /well で播種し, GcMAF 刺激 RAW264.7 細胞と 48 時間共培養した (細胞比 1:1). EMT6 細胞を PBS で洗浄し, 0.5%クリスタルバイオレット (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) と 20%メタノール (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を含むクリスタルバイオレット溶液で 15 分間染色した. 溶液を除去し, 細胞を水道水で 4 回洗浄した. 染色した細胞を 1%SDS (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で溶出した. マイクロプレートリーダーを用いて, 波長 720 nm の吸光度をリファレンスとして 570 nm の吸光度を測定し, 生存細胞数を評価した.

### **5.8 DNA マイクロアレイ解析**

RAW264.7 細胞を 60 mm 培養プレートに  $6 \times 10^6$ /plate で播種し, 一晩培養した. RAW264.7 細胞を終濃度  $1 \mu\text{g/mL}$  の GcMAF で 24 時間刺激し, RNA を抽出した. DNA マイクロアレイ解析は GeneChip Clariom S Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いてフィルジエン株式会社 (愛知, 日本) にて実施された. マイクロアレイデータは Microarray Data Analysis Tool v.3.2 (フィルジエン株式会社, 愛知, 日本) を使用して解析された.

### **5.9 RAW264.7 細胞の M2 分極化**

RAW264.7 細胞を 6 ウェルプレートに  $8 \times 10^5$  /well で播種し, 一晩培養した. PBS 洗浄後, M2 分極化のために IL-4 および IL-13 (各  $20 \text{ ng/mL}$ , Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を添加した FBS 不含 DMEM で 72 時間培養した. M2 分極化刺激した RAW264.7 細胞を GcMAF ( $0.1 \mu\text{g/mL}$ ) で 24 時間刺激し, 処理後の細胞および培地上清を回収した.

### **5.10 CCK-8 法による EMT6 細胞数の評価**

EMT6 細胞を 24 ウェルプレートに  $3 \times 10^4$  /well で播種し, GcMAF 刺激 M2 型 RAW264.7 細胞と 48 時間共培養した (細胞比 1:1). EMT6 細胞を PBS で洗浄し,

CCK-8 (株式会社 同仁化学研究所, 熊本, 日本) を用いて分析した. 生細胞数はマイクロプレートリーダーを用いて, 波長 600 nm の吸光度をリファレンスとして 450 nm の吸光度を測定し, 細胞生存率を評価した.

### 5.11 統計解析

データは平均と SD で示した. 統計的有意差は少なくとも 3 つの実験結果を Student's t-test を用いて解析した. p 値が 0.05 未満の場合, 統計的に有意であるとみなした.



## 第6章 謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教員として終始多大なご指導、ご鞭撻を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部 宇都義浩教授に深謝いたします。並びに、研究に対するご指導、ご助言をいただいた学位論文主査および副指導教員の同学部 浅田元子教授、学位論文副査の同学部 田端厚之教授、アドバイザー教員の同学部 山田久嗣准教授に心よりお礼申し上げます。

GcMAF 精製に係るカラムビーズ合成においてご指導いただいた同学部 篠原侑成助教、ならびに実験手技の指導や細胞実験へのご協力をいただいた同学部 学術研究員の小林彩博士に心から感謝いたします。

実験へのご協力や議論に参加していただいた株式会社盛コーポレーション医療研究開発部 安倍忍氏、徳島大学大学院創成科学研究科創成科学専攻 高良玲衣氏、同大学大学院創成科学研究科生物資源学専攻 白形妃菜氏に心からお礼申し上げます。

最後に、様々な機会にご支援いただきました徳島大学生物 C2 講座の皆様および徳島大学大学院で接する機会がありました関係各位に誠意の意を表します。

## 第7章 参考文献

1. Daiger, S.P.; Schanfield, M.S.; Cavalli-Sforza, L.L. Group-Specific Component (Gc) Proteins Bind Vitamin D and 25-Hydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1975**, *72*, 2076-2080, doi:10.1073/pnas.72.6.2076.
2. White, P.; Cooke, N. The Multifunctional Properties and Characteristics of Vitamin D-Binding Protein. *Trends Endocrinol Metab* **2000**, *11*, 320-327, doi:10.1016/S1043-2760(00)00317-9.
3. Yamamoto, N.; Homma, S. Vitamin D3 Binding Protein (Group-Specific Component) Is a Precursor for the Macrophage-Activating Signal Factor from Lysophosphatidylcholine-Treated Lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 8539-8543, doi:10.1073/pnas.88.19.8539.
4. Yamamoto, N.; Kumashiro, R. Conversion of Vitamin D3 Binding Protein (Group-Specific Component) to a Macrophage Activating Factor by the Stepwise Action of Beta-Galactosidase of B Cells and Sialidase of T Cells. *J Immunol* **1993**, *151*, 2794-2802, doi:10.4049/jimmunol.151.5.2794.
5. Kisker, O.; Onizuka, S.; Becker, C.M.; Fannon, M.; Flynn, E.; D'Amato, R.; Zetter, B.; Folkman, J.; Ray, R.; Swamy, N.; et al. Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor (DBP-Maf) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in Mice. *Neoplasia* **2003**, *5*, 32-40, doi:10.1016/S1476-5586(03)80015-5.
6. Uto, Y.; Yamamoto, S.; Takeuchi, R.; Nakagawa, Y.; Hirota, K.; Terada, H.; Onizuka, S.; Nakata, E.; Hori, H. Effect of the Gc-Derived Macrophage-Activating Factor Precursor (PreGcMAF) on Phagocytic Activation of Mouse Peritoneal Macrophages. *Anticancer Res* **2011**, *31*, 2489-2492.
7. Nonaka, K.; Onizuka, S.; Ishibashi, H.; Uto, Y.; Hori, H.; Nakayama, T.; Matsuura, N.; Kanematsu, T.; Fujioka, H. Vitamin D Binding Protein-

- Macrophage Activating Factor Inhibits HCC in SCID Mice. *J Surg Res* **2012**, *172*, 116-122, doi:10.1016/j.jss.2010.07.057.
8. Inui, T.; Kuchiike, D.; Kubo, K.; Mette, M.; Uto, Y.; Hori, H.; Sakamoto, N. Clinical Experience of Integrative Cancer Immunotherapy with GcMAF. *Anticancer Res* **2013**, *33*, 2917-2919.
  9. DeNardo, D.G.; Ruffell, B. Macrophages as Regulators of Tumour Immunity and Immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2019**, *19*, 369-382, doi:10.1038/s41577-019-0127-6.
  10. Orecchioni, M.; Ghosheh, Y.; Pramod, A.B.; Ley, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.01084.
  11. Yang, Q.; Guo, N.; Zhou, Y.; Chen, J.; Wei, Q.; Han, M. The Role of Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Tumor Progression and Relevant Advance in Targeted Therapy. *Acta Pharm Sin B* **2020**, *10*, 2156-2170, doi:10.1016/j.apsb.2020.04.004.
  12. Röszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* **2015**, *2015*, 1-16, doi:10.1155/2015/816460.
  13. Vitale, I.; Manic, G.; Coussens, L.M.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab* **2019**, *30*, 36-50, doi:10.1016/j.cmet.2019.06.001.
  14. Müller, S.; Kohanbash, G.; Liu, S.J.; Alvarado, B.; Carrera, D.; Bhaduri, A.; Watchmaker, P.B.; Yagnik, G.; Di Lullo, E.; Malatesta, M.; et al. Single-Cell Profiling of Human Gliomas Reveals Macrophage Ontogeny as a Basis for Regional Differences in Macrophage Activation in the Tumor Microenvironment. *Genome Biol* **2017**, *18*, 234, doi:10.1186/s13059-017-1362-4.

15. Zhu, X.; Liang, R.; Lan, T.; Ding, D.; Huang, S.; Shao, J.; Zheng, Z.; Chen, T.; Huang, Y.; Liu, J.; et al. Tumor-Associated Macrophage-Specific CD155 Contributes to M2-Phenotype Transition, Immunosuppression, and Tumor Progression in Colorectal Cancer. *J Immunother Cancer* **2022**, *10*, e004219, doi:10.1136/jitc-2021-004219.
16. Hou, P.; Shi, P.; Jiang, T.; Yin, H.; Chu, S.; Shi, M.; Bai, J.; Song, J. DKC1 Enhances Angiogenesis by Promoting HIF-1  $\alpha$  Transcription and Facilitates Metastasis in Colorectal Cancer. *Br J Cancer* **2020**, *122*, 668-679, doi:10.1038/s41416-019-0695-z.
17. Delprat, V.; Tellier, C.; Demazy, C.; Raes, M.; Feron, O.; Michiels, C. Cycling Hypoxia Promotes a Pro-Inflammatory Phenotype in Macrophages via JNK/P65 Signaling Pathway. *Sci Rep* **2020**, *10*, 882, doi:10.1038/s41598-020-57677-5.
18. Mu, G.; Zhu, Y.; Dong, Z.; Shi, L.; Deng, Y.; Li, H. Calmodulin 2 Facilitates Angiogenesis and Metastasis of Gastric Cancer via STAT3/HIF-1A/VEGF-A Mediated Macrophage Polarization. *Front Oncol* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.727306.
19. Pacini, S.; Punzi, T.; Morucci, G.; Gulisano, M.; Ruggiero, M. Effects of Vitamin D-Binding Protein-Derived Macrophage-Activating Factor on Human Breast Cancer Cells. *Anticancer Res* **2012**, *32*, 45-52.
20. Gregory, K.J.; Zhao, B.; Bielenberg, D.R.; Dridi, S.; Wu, J.; Jiang, W.; Huang, B.; Pirie-Shepherd, S.; Fannon, M. Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor Directly Inhibits Proliferation, Migration, and UPAR Expression of Prostate Cancer Cells. *PLoS One* **2010**, *5*, e13428, doi:10.1371/journal.pone.0013428.
21. Thyer, L.; Ward, E.; Smith, R.; Fiore, M.; Magherini, S.; Branca, J.; Morucci, G.; Gulisano, M.; Ruggiero, M.; Pacini, S. A Novel Role for a Major Component of the Vitamin D Axis: Vitamin D Binding Protein-Derived Macrophage

- Activating Factor Induces Human Breast Cancer Cell Apoptosis through Stimulation of Macrophages. *Nutrients* **2013**, *5*, 2577-2589, doi:10.3390/nu5072577.
22. Hamilton, G.; Rath, B.; Klameth, L.; Hochmair, M.J. Small Cell Lung Cancer: Recruitment of Macrophages by Circulating Tumor Cells. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1093277, doi:10.1080/2162402X.2015.1093277.
23. Chaiyasit, K.; Inui, T.; Wiwanitkit, V. The Use of Gc Protein-Derived Macrophage Activating Factor for Management of Thyroid Cancer. *J Cancer Res Ther* **2015**, *11*, 1041, doi:10.4103/0973-1482.151448.
24. Smith, M.; Young, H.; Hurlstone, A.; Wellbrock, C. Differentiation of THP1 Cells into Macrophages for Transwell Co-Culture Assay with Melanoma Cells. *Bio Protoc* **2015**, *5*, doi:10.21769/BioProtoc.1638.
25. Wu, Z.; Zhou, J.; Chen, F.; Yu, J.; Li, H.; Li, Q.; Li, W. 13-Methyl-Palmatrubine Shows an Anti-Tumor Role in Non-Small Cell Lung Cancer via Shifting M2 to M1 Polarization of Tumor Macrophages. *Int Immunopharmacol* **2022**, *104*, 108468, doi:10.1016/j.intimp.2021.108468.
26. Uto, Y.; Kawai, T.; Sasaki, T.; Hamada, K.; Yamada, H.; Kuchiike, D.; Kubo, K.; Inui, T.; Mette, M.; Tokunaga, K.; et al. Degalactosylated/Desialylated Bovine Colostrum Induces Macrophage Phagocytic Activity Independently of Inflammatory Cytokine Production. *Anticancer Res* **2015**, *35*, 4487-4492.
27. Hangai, S.; Kawamura, T.; Kimura, Y.; Chang, C.-Y.; Hibino, S.; Yamamoto, D.; Nakai, Y.; Tateishi, R.; Oshima, M.; Oshima, H.; et al. Orchestration of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment by Ubiquitous Cellular Protein TCTP Released by Tumor Cells. *Nat Immunol* **2021**, *22*, 947-957, doi:10.1038/s41590-021-00967-5.
28. Wyckoff, J.; Wang, W.; Lin, E.Y.; Wang, Y.; Pixley, F.; Stanley, E.R.; Graf, T.; Pollard, J.W.; Segall, J.; Condeelis, J. A Paracrine Loop between Tumor Cells

- and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. *Cancer Res* **2004**, *64*, 7022-7029, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1449.
29. Lewis, J.S.; Landers, R.J.; Underwood, J.C.; Harris, A.L.; Lewis, C.E. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor by Macrophages Is Up-Regulated in Poorly Vascularized Areas of Breast Carcinomas. *J Pathol* **2000**, *192*, 150-158, doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH687>3.0.CO;2-G.
30. Bruns, H.; Büttner, M.; Fabri, M.; Mougiakakos, D.; Bittenbring, J.T.; Hoffmann, M.H.; Beier, F.; Pasemann, S.; Jitschin, R.; Hofmann, A.D.; et al. Vitamin D-Dependent Induction of Cathelicidin in Human Macrophages Results in Cytotoxicity against High-Grade B Cell Lymphoma. *Sci Transl Med* **2015**, *7*, doi:10.1126/scitranslmed.aaa3230.
31. Dolgova, E. V.; Kirikovich, S.S.; Levites, E. V.; Ruzanova, V.S.; Proskurina, A.S.; Ritter, G.S.; Taranov, O.S.; Varaksin, N.A.; Ryabicheva, T.G.; Leplina, O.Yu.; et al. Analysis of the Biological Properties of Blood Plasma Protein with GcMAF Functional Activity. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 8075, doi:10.3390/ijms23158075.
32. Chen, L.; Sha, M.-L.; Li, D.; Zhu, Y.-P.; Wang, X.-J.; Jiang, C.-Y.; Xia, S.-J.; Shao, Y. Relaxin Abrogates Renal Interstitial Fibrosis by Regulating Macrophage Polarization via Inhibition of Toll-like Receptor 4 Signaling. *Oncotarget* **2017**, *8*, 21044-21053, doi:10.18632/oncotarget.15483.
33. Font-Nieves, M.; Sans-Fons, M.G.; Gorina, R.; Bonfill-Teixidor, E.; Salas-Pérdomo, A.; Márquez-Kisinousky, L.; Santalucia, T.; Planas, A.M. Induction of COX-2 Enzyme and Down-Regulation of COX-1 Expression by Lipopolysaccharide (LPS) Control Prostaglandin E2 Production in Astrocytes. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 6454-6468, doi:10.1074/jbc.M111.327874.

34. Gonzalez-Perez, R.R.; Xu, Y.; Guo, S.; Watters, A.; Zhou, W.; Leibovich, S.J. Leptin Upregulates VEGF in Breast Cancer via Canonic and Non-Canonical Signalling Pathways and NF  $\kappa$  B/HIF-1  $\alpha$  Activation. *Cell Signal* **2010**, *22*, 1350-1362, doi:10.1016/j.cellsig.2010.05.003.