

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 根本 寛子

横浜市立大学大学院医学研究科 外科治療学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	分子生物学	主任教授	高橋 秀尚
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学	主任教授	折舘 伸彦
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	病態病理学	准教授	奥寺 康司

Store-operated calcium entry via ORAI1 regulates doxorubicin-induced apoptosis and prevents cardiotoxicity in cardiac fibroblasts

(ストア作動性カルシウム流入機構を介するドキソルビシン心不全の新たな機序)

本研究は、抗がん剤のドキソルビシン(DOX)投与後の心不全における、心臓線維芽細胞での p53 を介した反応と、カルシウム(Ca^{2+})シグナルの一つであるストア作動性 Ca^{2+} 流入機構(SOCE)との関係を初めて実証した。

DOX による非可逆的な心不全の機序については、過去に心筋細胞で様々な研究が行われてきたが、心臓線維芽細胞では未だ不明な点が多い。一方で、心不全の発症には、 Ca^{2+} 調節機構の破綻も関与する。SOCE は、小胞体内の Ca^{2+} 濃度低下を感じて細胞内 Ca^{2+} 濃度を調整する機構で、ORAI1 は SOCE の重要な構成因子である。ORAI1 は心不全組織で機能が亢進しているとされるが、DOX 心不全における心臓線維芽細胞の ORAI1 の役割は不明である。本研究の目的は、心臓線維芽細胞の ORAI1/SOCE と DOX 心不全との関係を明らかにすることである。

まず、既報の DOX 心不全の機序を心臓線維芽細胞で示せるかどうか確認した。ヒト心臓線維芽細胞 (HCF) に DOX を接触させ、CTRL 群(コントロール群)と DOX 群で p53 タンパクの発現量を比較し、DOX 群で p53 タンパクの発現が有意に上昇することを示した。次にアポトーシス解析、細胞周期解析を行い、まず DOX 群で早期アポトーシス細胞の割合が有意に上昇した。また、DOX 群で p21 タンパクの発現が増加し、細胞周期解析では G1 期の割合の有意な低下、G2 期の割合の有意な上昇を認めた。さらに、活性酸素 (ROS) 産生量が DOX 群で有意に上昇した。

次に、DOX による上記の結果が、ORAI1/SOCE を薬剤または遺伝子ノックダウンで阻害することにより影響を受けるかどうかを評価した。薬剤阻害には、YM-58483 を使用し、CTRL 群、DOX 群、YM 群、YM+DOX 群の 4 群を比較した。遺伝子ノックダウンにおいては、CTRL siRNA HCF 群と、ORAI1 siRNA HCF 群 (ORAI1 遺伝子ノックダウン群) の 2 群を、それぞれ CTRL 群と DOX 群に分けて、計 4 群を比較した。YM-58483 または ORAI1 遺伝子ノックダウンにより、DOX 群または CTRL siRNA HCF-DOX 群で亢進した早期アポトーシスや ROS 産生が、YM+DOX 群、ORAI1 siRNA HCF-DOX 群で抑制された。また YM-58483 は DOX による細胞周期の変化を抑制する傾向にあった。動物実験では、CTRL 群、DOX 群、YM 群、YM+DOX 群の 4 群のマウスの左心室のアポトーシスを比較したところ、DOX 群で有意に上昇したアポトーシス細胞の割合が YM+DOX 群で有意に低下した。しかし、心臓線維芽細胞と心筋細胞を区別することはできなかった。

本研究により、心臓線維芽細胞において、ORAI1/SOCE が p53 タンパクの発現を調整し、アポトーシス、細胞周期の停止、ROS 産生といった DOX 心不全発生にお

ける重要な反応に関与していることが示された。ORAI1 は DOX 心不全の予防や治療の新たなターゲットとなる可能性が示唆された。しかし、これらの機序に関わる因子の詳細な関係や、ORAI1/SOCE 阻害による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化、心臓線維化に関与する心臓線維芽細胞特有の変化などについては、今後さらなる解明を進めていきたい。

審査にあたり、申請者により以上の論文要旨が説明され、続いて質疑応答が行われた。

はじめに、奥寺副査より、以下の論評と質問がなされた。

1. 心臓線維芽細胞をあえて選んだにもかかわらず、結果はアポトーシスが主で、心臓線維化細胞ならではの变化も示しておらず、研究の全体像が不透明に感じられる。 Ca^{2+} シグナルに着目して心不全を評価するのであれば、*in vivo* で心機能評価を行うなどの、生理学的変化をみるような実験を行った方が良かったのではないか。

回答：心臓線維化細胞を選択するからには、心臓の線維化に関係する因子や、内分泌機能に関わる因子などを評価すべきである。そのため、予備実験では α -SMA や TGF- β など検討したが、Western blotting で変化を示せなかった。今回、心臓線維芽細胞で得られた結果は、*in vivo* の結果から心筋細胞でも同様の結果を示す可能性が高く、あえて心臓線維芽細胞を選択した根拠については示せなかった。また本研究を臨床に生かすには、 Ca^{2+} シグナルの影響を受ける生理学的変化についても確認しておくべきであり、心臓全体を捉えて心機能を評価することは重要である。実際に予備実験でマウスの心臓エコーも試みたが、有意な結果が得られなかったので、内容を見直し今後に生かしたい。

2. 心不全モデルの作製で抗がん剤を使う場合は、抗がん剤自体への影響も考慮すべきである。SOCE が p53 を介して DOX 心不全を抑制する経路が、p53 を介したがん抑制の経路と重なってしまうと、DOX の抗がん作用を弱めてしまうのではないか。

回答：SOCE 阻害薬が p53 を抑制することで、心不全の抑制のみならず、抗がん剤の効果まで抑制してしまう可能性は理論的にはあり得るが、本研究の中では検討していない。SOCE を抗がん剤心不全で使用するには、例えば DOX の血中濃度測定を行い、SOCE 阻害薬を併用しても DOX の濃度が下がらないことなどを確認できたかもしれない。

続いて、折館副査より、以下の論評と質問がなされた。

1. 先の質問で、DOX により線維芽細胞と心筋細胞が同じような変化を示すのではないかと回答したが、線維芽細胞が増殖するのに対し、心筋細胞はほぼ増殖しないという違いがある。心筋細胞の細胞周期に関しては何か知見はあるか。

回答：心不全の心筋細胞では、DNA 複製を伴わない細胞の肥大が起こっていて、サイクリン D が活性化し、G0 期から G1 期への移行が進み、G1 期の細胞が増えているという報告はあった。心臓線維芽細胞に関しては、細胞周期について具体的な記載がある文献は見つからなかったが、心臓線維芽細胞も TGF- β などの因子を介して心筋細胞の肥大を促進する可能性が示唆されている。

2. 学位研究報告書で細胞周期の結果を示した図 6 と図 14 を比較すると、縦軸の細胞割合の数値がかなり異なっているが、なぜこのような結果になったのか。

回答：図 6 と図 14 の実験では、HCF の継代数や細胞の状態が異なっていることや、細胞周期アッセイがかなり繊細な技術を必要とするアッセイであるので、実験手技が不安定であったことが結果の違いに影響した可能性は否定できない。

3. 論文要旨でも述べているように、in vivo は、心臓線維芽細胞と心筋細胞の区別がない状態での評価となったが、それについてどのように考察するか。

回答：中間審査での指摘を踏まえ、心臓線維芽細胞のアポトーシスを評価するために、TUNEL 染色＋核染色＋ α -SMA 免疫染色の多重染色を行ったが、 α -SMA に染色された部分が少なく、アポトーシスの評価が困難であった。一方で、心筋細胞を染色する α -Sarcometric actin で免疫染色を行うと、心筋組織の大半が染色された。実際の心筋組織の多くは心筋細胞である可能性が高い。今回の結果は、心臓線維芽細胞のアポトーシスを評価するという本来の目的とは異なってしまったが、心筋組織全体においても、SOCE 阻害にて DOX によるアポトーシスが抑制されるという報告は過去にないので、論文に採用した。また今回は DOX 急性投与しか評価していないので、もし慢性投与モデルが作製できれば、心臓線維芽細胞の変化がわかるような結果が得られたかもしれない。

最後に高橋主査より、以下の論評と質問がなされた。

1. p53 が DOX で増加し、SOCE を阻害することで p53 が抑制されることのメカニズムはどのように考えているか。細胞質内の Ca^{2+} 濃度測定や、Ca 濃度と

p53 の発現量の関係などについては検討したか. SOCE 阻害により p53 が劇的に減少しているので, p53 と Ca^{2+} との関係をもっと掘り下げても良いのではないと思われる.

回答: p53 の発現が亢進すると SOCE の機能も亢進するという報告はあり, p53 が小胞体膜上で Ca^{2+} チャンネルとしても働く Bcl-2 の発現を抑制したり, 小胞体の Ca^{2+} APTase に作用して小胞体内に Ca^{2+} を取り込んだりすることが関与しているようである. Bcl-2 の抑制は, アポトーシスと関係している可能性がある. 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は実際に行ったが, まず DOX により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを安定して示せなかったため, SOCE 阻害による変化の検討までには至らなかった.

2. 細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇し, ミトコンドリア膜電位が変化してアポトーシスが促進される可能性はある. このように p53 を介さずに ORAI による Ca^{2+} 濃度の変化のみによってアポトーシスが起るメカニズムもあるのではないか. Caspase などは評価したか.

回答: 本研究では示せていないが, p53 を介さずに ORAI1 が直接アポトーシスを起る経路もあると考えている. Caspase 3 や 8 は Western blotting で確認したが, どれも有意な変化がみられなかった. p53 の阻害薬を使用した状態で SOCE 阻害をした場合の結果を比較することも有効ではないかと考えられる.

3. 申請者の研究に対する貢献度について.

回答: 実験計画の立案, 実験の実施, データ解析, 論文執筆の全てを申請者が施行した. 結果の再現性を示せずに論文に繋がらなかった実験も沢山あり, 内容を再検討しぜひ今後につけていきたい.

本学位論文は, 抗がん剤心不全という臨床現場における重大な問題の詳細解明に寄与する報告である. 申請者は全ての研究を自身で遂行し, 審査員からの質問に対しても適切な回答がなされ, 本研究に対し深い理解と洞察力を有している. 以上より博士 (医学) の学位授与に値すると判断された.