

学位論文の要旨

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
ドキソルビン心不全の新たな機序)

September, 2023

(2023年9月)

Hiroko Nemoto

根本 寛子

Department of Surgery

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 外科治療学

(Research Supervisor: Yoshihiro Ishikawa, Professor)

横浜市立大学 大学院医学研究科 循環制御医学

(研究指導教員：石川 義弘 教授)

(Doctoral Supervisor: Aya Saito, Professor)

(指導教員：齋藤 綾 教授)

学位論文の要旨

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)

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0278613>

1. 序論

近年、抗がん剤治療に循環器系の有害事象を伴うことが知られるようになり、Onco-Cardiology（腫瘍循環器学）という分野が注目されている。アントラサイクリン抗がん剤のドキソルビシン(Doxorubicin, DOX)は、がん治療に幅広く使用されているが、投与後に非可逆的な心不全を起こすことが問題となっている。心不全発症例の予後は不良で、現在は根本的な治療方法が存在しない。DOX 心毒性の分子生物学的機序を解明するために、過去に様々な研究が行われてきたが、これらの多くは、心筋細胞を使用していた(Prathumsap et al., 2020)。心筋組織の構成要素には、心筋細胞の他に心臓線維芽細胞がある。心臓線維芽細胞は、細胞外マトリックスの維持や成長因子、サイトカインの合成に関与し、心不全の発症機序に重要であるため、DOX 心不全に対しても重要な役割を果たすと考えられる。一方で、心不全の発症には、カルシウム(Ca^{2+})調節機構の破綻の関与も大きい。 Ca^{2+} 調整機構の一つであるストア作動性 Ca^{2+} 流入機構(Store-operated Ca^{2+} entry, SOCE)は、小胞体内の Ca^{2+} 濃度低下を感知して細胞内 Ca^{2+} 濃度を調整する(Trebak et al., 2013)。その中でも、ORAI1 タンパクは、SOCE の最も重要な構成因子の Ca^{2+} チャネルである。ORAI1 は心臓線維芽細胞に多く発現し、心不全組織では ORAI1 の機能が亢進しているとされる(Ross et al., 2017)。しかしながら、DOX 心不全においては、心臓線維芽細胞内の ORAI1 がどのような役割を果たしているかは過去に報告がなく知られていない。本研究で、われわれ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。

2. 実験材料と方法

細胞実験には、ヒト心臓線維芽細胞 (Human cardiac fibroblast, HCF) を使用した。また、低分子干渉 RNA(siRNA)により ORAI1 遺伝子をノックダウンした HCF を作製した。まず、HCF に DOX を接触させ、CTRL 群 (DOX なし)と DOX 群 (DOX あり)で p53 タ

ンパク発現の変化を Western blotting 法で確認した。アポトーシス解析，細胞周期解析を，蛍光活性化セルソーティング (fluorescence-activated cell sorting, FACS) にて行い，早期アポトーシス細胞の割合と，各細胞周期の細胞の割合を比較した。さらに，蛍光測定にて活性酸素 (Reactive oxygen species, ROS) 産生量を比較した。次に，DOX による上記の実験結果が，ORAI1/SOCE を薬剤または遺伝子ノックダウンにて阻害することにより影響を受けるかどうか評価した。薬剤阻害には，SOCE 阻害薬である YM-58483 を使用し，CTRL 群 (コントロール)，DOX 群 (DOX のみ)，YM 群 (YM-58483 のみ)，YM+DOX 群 (DOX 接触前に YM-58483 を添加) 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 (Control siRNA を導入した HCF) と，ORAI1 siRNA HCF 群 (ORAI1 against siRNA を導入して ORAI1 遺伝子をノックダウンした HCF) 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。最後に動物実験を行った。マウスを CTRL 群，DOX 群，YM 群，YM+DOX 群の 4 群に分け，左心室組織の TUNEL 染色を行い，アポトーシスの割合を比較した。本実験は，横浜市立大学動物実験委員会の審査を経て，学長の承認を得て行われた (承認番号：F-A-20-079)。

3. 結果

CTRL 群と DOX 群との比較において，DOX 群で p53 タンパクの発現が有意に上昇した。アポトーシス解析では，DOX 群で早期アポトーシス細胞の割合が有意に上昇した。DOX 群で細胞周期に関与する p21 タンパクの発現が増加した上に，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。DOX 群では ROS 産生も有意に上昇した。HCF に DOX を投与すると，ORAI1 タンパクの発現も増加した。

YM-58483 と ORAI1 遺伝子ノックダウンにより ORAI1/SOCE を阻害した場合は，DOX 群，CTRL siRNA HCF-DOX 群でそれぞれ亢進した早期アポトーシスや ROS 産生が，YM+DOX 群，ORAI1 siRNA HCF-DOX 群では抑制された。また YM-58483 は DOX による細胞周期の G2 期での停止を抑制した。動物実験では，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。

4. 考察

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 心不全発症における重要な反応に関与していることが示された。ORAI1 が 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，今後はさらなる詳細な機序の解明を進めていく。

引用論文

Prathumsap, N., Shinlapawittayatorn, K., Chattipakorn, S. C., Chattipakorn, N. (2020), Effects of doxorubicin on the heart: From molecular mechanisms to intervention strategies. *Eur J Pharmacol.* 866, 172818. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172818.

Ross, G.R., Bajwa, T. Jr., Edwards, S., Emelyanova, L., Rizvi, F., Holmuhamedov, E. L., Werner, P., Downey, F. X., Tajik, A. J., Jahangir, A. (2017), Enhanced store operated Ca^{2+} influx and ORAI1 expression in ventricular fibroblasts from human failing heart, *Biol Open*, 6, 326–332. doi: 10.1242/bio.022632.

Trebak, M., Zhang, W., Ruhle, B., Henkel, M. M., González-Cobos, J. C., Motiani, R. K., Stolwijk, J. A., Newton, R. L., Zhang, X. (2013), What role for store-operated Ca^{2+} entry in muscle?, *Microcirculation*, 20, 330–336. doi: 10.1111/micc.12042.

論文目録

I 主論文

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

Nemoto, H., Umemura, M., Suzuki, F., Nagasako, A., Nagao, K., Hidaka, Y., Nakakaji, R., Uchida, K., Suzuki, S., Masuda, M., Ishikawa, Y.: *PLoS One*. Vol. 17, No. 12, e0278613, 2022.

II 副論文

なし

III 参考論文

英文

1. A two-stage reconstruction for aorto-esophageal fistula after replacement of thoracic aorta for Stanford Type B dissecting aortic aneurysm: esophagectomy and a double-tract reconstruction using the pedicled jejunum: a case report and literature review.

Sato, S., Kunisaki, C., Tanaka, Y., Sato, K., Miyamoto, H., Yukawa, N., Nemoto, H., Uchida, K., Nishii, T., Kosaka, T., Akiyama, H., Endo, I.: *Clinical Journal of Gastroenterology*. Vol. 13, No. 5, Pages 722-727, 2020.

2. Venous-arterio-pulmonary-arterial extracorporeal membrane oxygenation in descending aortic surgery.

Minami, T., Uchida, K., Yasuda, S., Cho, T., Matsuki, Y., Nemoto, H., Kobayashi, Y., Kasama, K., Machida, D., Masuda, M.: *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Vol. 69, No. 4, Pages 727-730, 2021.

3. A massive postoperative stroke caused by a carotid thrombus that occurred during the surgical repair of an aortic dissection.

Nemoto, H., Uchida, K., Minami, T., Yasuda, S., Cho, T., Masuda, M.: *SAGE Medical Case*

Reports. Vol. 9, Pages 1–4, 2021.

4. Remote simulator training of coronary artery bypass grafting during the coronavirus disease 2019 pandemic.

Takahashi, K., Tanaka, C., Numaguchi, R., Kuroda, Y., Nemoto, H., Yoshino, K., Noda, M., Inoue, Y., Wada, K.: Committee of The Japanese Society for Cardiovascular Surgery Under Forty. *JTCVS Open*. Vol.8, Pages 524-533, 2021.

和文

1. 心臓血管外科専門医制度(No.2) 心臓血管外科専門医資格取得の現実.

根本 寛子, 伊藤 貴弘, 出淵 亮, 坂田 朋基, 新津 宏和, 北條 竜司, 三木 隆生, 横山 泰孝: *日本心臓血管外科学会雑誌*. 第 49 巻第 6 号, U1 頁-U5 頁, 令和 2 年.

2. 【循環器系疾患の線維化メカニズムの解明と治療戦略】ドキシソルビシンの心臓線維芽細胞に注目した心毒性メカニズムの解明と治療戦略.

梅村 将就, 成川 雅俊, 田中 遼, 根本 寛子, 中鍛治 里奈, 永迫 茜, 石川 義弘: *日本薬理学雑誌*. 第 156 巻第 3 号, 146 頁-151 頁, 令和 3 年.

3. 市販医薬品の薬効成分を磁性化する画期的技術の開発.

梅村 将就, 中鍛治 里奈, 永迫 茜, Islam Md Rafikul, 大竹 誠, 長尾 景充, 根本 寛子, 水野 雄斗, 石川 聡一郎, 鈴木 文菜, 石川 義弘: *横浜医学*. 第 72 巻第 4 号, 537 頁-544 頁, 令和 3 年.