

博士(医学) 張 錦 燕

## 論文題目

Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is a potential anti-metastasis therapeutic target for nasopharyngeal carcinoma

(Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ 流入は鼻咽頭癌に対する抗転移療法の標的となる)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

鼻咽頭癌 (NPC) は、世界的に頻度の高い鼻咽頭の腫瘍である。この腫瘍は、放射線療法と化学療法に対し比較的高い感度があり、患者の長期生存を望むことができる。しかし、広範囲な領域のリンパ節への転移があれば予後は不良となり、遠隔転移は、未だに、死の第一原因となっている。腫瘍が転移するには、腫瘍細胞が何らかの方法で移動する必要がある。したがって、細胞の移動を抑えることが、転移の防止に不可欠である。これまでに、Store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) が、何種類かのヒトの悪性腫瘍の細胞周期、アポトーシス、成長、血管形成、移動および転移に関わることが示唆されている。そこでこの研究では、NPC における SOCE の関与を調べるとともに、ゼブラフィッシュの生体内転移モデルを使用して、実際の生体におけるヒトの NPC 細胞の移動および血管外漏出への SOCE の関与を調べた。これによって、抗転移治療には SOCE の活性を抑制することが重要であることが明確に示された。

[材料ならびに方法]

NPC 細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を測定するために、fura-2/AM を使用した。NPC 細胞の SOCE 機能を担う分子である Orai1 は、免疫蛍光染色法によって探索した。RNA 干渉によるノックダウン試験は、MISSION siRNA 製品 (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) を使用して行なった。Orai1 の発現低下は Western ブロットによって確認した。NPC 細胞の移動能は、内皮成長因子(EGF) の刺激で移動を誘発して wound-healing 法、Boyden chamber 法、細胞移動追跡法を用いて評価し、SOCE 機能を抑制したときの効果を調べた。細胞の付着能についても同様に調べた。遺伝子組み換えで内皮細胞に GFP を発現したゼブラフィッシュの血管内に、siRNA で Orai1 の発現を抑えた蛍光化 CNE2 細胞と対照細胞を別々に注入し、5 分おきのタイムラプス蛍光顕微鏡下に 11 時間以上の記録をして、それらの血管外漏出の様子を比較した。

[結果]

2-APB および  $\text{GdCl}_3$  が、EGF 刺激によって引き起こされた NPC 細胞の移動を抑えた。他の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル遮断薬は EGF 誘起性  $\text{Ca}^{2+}$  流入にも移動能にも影響しなかった。Thapsigargin (TG) は、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  の有無に関わらず、細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を引き起こした。2-APB および  $\text{GdCl}_3$  はともに、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵系での枯渇によって引き起こされる  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制した。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵系からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出には影響しなかった。さらに、両者は、G 蛋白質結合性受容体に作用するブラジキニンあるいはヒスタミンによって引き起こされる  $\text{Ca}^{2+}$  反応を著しく弱めた。他の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル遮断薬は

そのような効果を示さなかった。免疫蛍光染色で、Orai1 は NPC 細胞の核膜と細胞膜の両方に局在することがわかった。siRNA による Orai1 の発現抑制は Western ブロット法によって確認できた。Orai1 ノックアウトは、TG による細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵系からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出に影響しなかったが、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  が存在する状態での SOCE を著しく減少させた。Orai1 発現の抑制は、上記 3 種の分析法によって評価される NPC 細胞の移動を低下させ、付着能も低下させた。ゼブラフィッシュ転移モデルでは、対照 siRNA CNE2 細胞の血管外漏出反応が有意に起こる (13 例中 6) のに対して、Orai1-siRNA CNE2 細胞は、同反応を全く示さなかった (12 例中 0)。

#### [考察]

$\text{Ca}^{2+}$  貯蔵系からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出と細胞膜を介しての  $\text{Ca}^{2+}$  流入はともに、NPC 細胞の移動を引き起こすのに必要な信号であることが示された。さらに、SOCE の  $\text{Ca}^{2+}$  流入も不可欠であり、したがって、貯蔵系からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が生ずることで、その信号は引き続いて起こる  $\text{Ca}^{2+}$  流入により増幅される仕組みであると理解される。ほかの細胞膜  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを薬理的に抑制しても、NPC 細胞の移動への効果がなく、それらは関与していないといえる。SOCE による  $\text{Ca}^{2+}$  が NPC 細胞の移動能を制御している主たるシグナルである。ゼブラフィッシュを用いた癌転移モデルは、生体内における腫瘍細胞の血管からの漏出の過程を解析するのに有用である。申請者の行った研究により、生体内で転移が成立するための重要な過程に、SOCE が実際に関与していることが明らかになった。NPC 患者の予後を改善するには、転移の防止が不可欠である。本研究は、SOCE を担う蛋白質である Orai1 が、転移を防ぐための薬理的標的になることを示唆している。

#### [結論]

この研究結果は、NPC の転移を防ぐための潜在的な治療標的として SOCE がよい対象になるであろうことを示している。このような結果を生んだゼブラフィッシュ転移モデルは、NPC 細胞の転移に関わる重要な過程を理解するのに役立つ、我々の手法を拡張することで、癌転移の他の未解決課題が解明される可能性も大きい。

### 論文審査の結果の要旨

鼻咽頭癌 (NPC) は、中国南部に頻度の高い腫瘍で、遠隔転移が死因の第一位である。これまでに、Store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) が、ヒトの悪性腫瘍の細胞周期、アポトーシス、成長、血管形成、移動および転移に関わることが報告されている。そこで申請者は NPC における SOCE の関与を調べた。

2 種類の NPC 細胞株に各種の阻害薬を反応させ、fura-2/AM を用いて細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定した。細胞の移動能は内皮成長因子の刺激で移動を誘発して wound-healing 法、Boyden chamber 法、細胞移動追跡法を用いて評価した。2-APB と  $\text{GdCl}_3$  は、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵系での枯渇によって引き起こされる  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制し、細胞の移動能を低下させた。SOCE チャンネルの構成因子である Orai1 は NPC 細胞の核膜と細胞膜の両方に局在し、Orai1 をノックアウトすると、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵系からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出には影響しなかったが、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  が存在する状態での SOCE

を著しく減少させた。また Orai1 発現の抑制は、NPC 細胞の移動能や付着能を低下させた。さらに血管内皮細胞に GFP を発現させたゼブラフィッシュの血管内に Orai1-siRNA 細胞を注入して、対照 siRNA 細胞と比較した。対照 siRNA 細胞は血管外漏出反応が有意に起こるのに対して、Orai1-siRNA 細胞は反応を示さなかった。これらから申請者は、SOCE による  $Ca^{2+}$  が NPC 細胞の移動能を制御しているシグナルであり、Orai1 が転移を防ぐための薬理的標的になりうることを示した。癌の転移における細胞内  $Ca^{2+}$  の役割と治療標的として SOCE が対象になりうることを、ゼブラフィッシュ転移モデルを用いて証明したことを審査委員会は高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	峯田 周幸
	副査	鈴木 優子
	副査	林 秀晴