

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590311

研究課題名(和文)カルシウムセンサーSTIM1の扁平上皮がん細胞増殖における機能解析

研究課題名(英文)Study on the possible roles of calcium sensor, stromal interaction molecule 1 (STIM1), in human epidermoid carcinoma cell growth

研究代表者

吉田 純子 (YOSHIDA, Junko)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：20064628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内カルシウムイオン濃度制御による新たながん細胞増殖抑制法の確立を目標として、ストア作動性カルシウム流入機構のカルシウムセンサーであるstromal interaction molecule 1 (STIM1)のがん細胞増殖における役割を、ヒト扁平上皮がんA431細胞から樹立したSTIM1ノックダウン細胞株を用いて解析した。その結果、STIM1は、A431細胞の細胞増殖、DNA合成、細胞遊走およびin vivoでの腫瘍増生において重要な因子として機能していること、またSTIM1の機能発現に細胞膜カルシウム透過性CRACチャネルの活性化に關与するCAD領域が必要であることが実証された。

研究成果の概要(英文)：Stromal interaction molecule 1 (STIM1) monitors the calcium levels in the endoplasmic reticulum and activates the plasma membrane calcium release-activated calcium (CRAC) channels to induce the store operated calcium entry (SOCE). To explore the possible roles of STIM1 in human epidermoid carcinoma A431 cell growth, we established the STIM1 knockdown A431 clones by RNA interference. The SOCE, cell proliferation, cell migration and the xenograft growth in nude mice were reduced in the knockdown clones compared to a negative control clone. Re-expression of a siRNA-resistant full-length STIM1, but not CRAC activation domain (CAD)-deleted STIM1 mutant, in the knockdown clones restored the amplitude of SOCE and cell migration. These results indicate that STIM1 plays an important role in SOCE, cell growth and tumorigenicity in human epidermoid A431 cells, suggesting the potential use of STIM1-targeting agents for treating epidermoid carcinoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：ストア作動性カルシウム流入 STIM1 cell proliferation cell migration tumorigenicity ヒト扁平上皮がん

1. 研究開始当初の背景

細胞内へのカルシウム (Ca^{2+}) 流入機構には、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する機構の他に、増殖因子受容体刺激やホスホリパーゼ C (phospholipase C; PLC) 共役受容体刺激によって、細胞内 Ca^{2+} ストアである小胞体の Ca^{2+} 濃度低下が引き金となり、細胞膜のストア作動性 Ca^{2+} チャンネル(store operated Ca^{2+} channel ; SOC) が開いて起こるストア作動性 Ca^{2+} 流入 (store operated Ca^{2+} entry; SOCE) と呼ばれる機構がある。SOCE は、分泌、アレルギー、免疫、細胞増殖、がん転移などさまざまな細胞機能に関与していることが示されてきた。

我々は、これとは別にイオンチャンネルと細胞増殖の関連を調べるための研究を行う中で、ジヒドロピリジン系 Ca^{2+} 拮抗薬が、この薬物の治療標的である電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルの発現を欠くヒト扁平上皮がん(A431) 細胞の増殖を抑制することを見出し、その作用機序に A431 細胞の SOCE 抑制が関与していることを明らかにした (Yoshida J et al, 2003, 2004, 2005)。また、in vitro および in vivo で A431 細胞増殖抑制活性を示すジヒドロピリジン系 Ca^{2+} 拮抗薬アムロジピンについて、細胞周期や上皮増殖因子受容体 (EGFR) シグナリングへの影響を詳細に解析し報告してきた(Yoshida J et al, 2007, 2010)。

SOCE に関与する分子実体として transient receptor potential (TRP) が同定され (1989 年)、2005 年から 2006 年にかけて、 Ca^{2+} 遊離活性化 Ca^{2+} チャンネル(Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel; CRAC) のポア部分を形成する Orai 蛋白質 (Zhang SL et al, 2006; Vig M et al, 2006) と小胞体内 Ca^{2+} 含量のセンサーとして働く stromal interaction molecule (STIM) 蛋白質 (Liou

J et al, 2005; Roos J et al, 2005) が提示され、それらの機能解析が急速に進められている。このうち、STIM1 蛋白質と細胞増殖の関連については、本蛋白質が T リンパ球、平滑筋細胞、および内皮細胞の増殖に重要な役割を果たすとするいくつかの報告が見られるものの、STIM1 とがん増殖における機能解析の報告は未だ少ない。

以上のような SOCE あるいはその機能分子 STIM1 と細胞増殖に関する国内外の学術的成果と Ca^{2+} 拮抗薬を用いて得た我々の知見を踏まえ、STIM1 介在性 Ca^{2+} シグナリング修飾による新たな細胞増殖抑制法を探索するために、本研究課題「カルシウムセンサー-STIM1 の扁平上皮がん細胞増殖における機能解析」に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) 機構の Ca^{2+} センサー分子である STIM1 に注目し、STIM1 のがん細胞増殖における役割を解析する。ヒト扁平上皮がん A431 細胞を用いて、(1) SOCE とがん細胞増殖に STIM1 がどのように関与しているか、(2) 上皮増殖因子受容体 (EGFR) 刺激や PLC 共役受容体刺激などの分裂刺激シグナル伝達系に STIM1 がいかに関わっているか、(3) 細胞膜 SOC チャンネルの 1 つである CRAC チャンネルのポア蛋白質 Orai 1 と STIM1 がどのように関連し、がん細胞増殖や細胞遊走に関わっているかなどその詳細を明らかにすることで、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度制御による新たながん細胞増殖制御法の確立を見据えた研究を行う。

3. 研究の方法

研究目的を達成するために、まず(1) RNA 干渉法により STIM1 ノックダウン

A431 細胞株を樹立した。STIM1 に対する siRNA を発現する shRNA plasmid (ピューロマイシン耐性マーカーを持つ) を A431 細胞に導入し、ピューロマイシン耐性かつ STIM1 の発現を欠く細胞株を複数樹立した。

(2) 細胞内 Ca^{2+} イメージングによる SOCE 測定。 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2 にて STIM1 ノックダウン細胞を標識後、小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬であるタブシガルギン thapsigargin や PLC 共役受容体アゴニストである UTP 刺激によっておこる SOCE の大きさを細胞内 Ca^{2+} イオン濃度測定装置 (ARGUS/HiSCA, 浜松ホトニクス) にて測定した。

(3) 試験管内細胞増殖能の評価。 STIM1 ノックダウン細胞の試験管内増殖を MTT アッセイまたはトリパンブルー色素排除試験にて評価し、A431 親細胞や negative control 細胞のそれと比較した。また核酸前駆体 BrdU 取り込みアッセイにて、DNA 合成能を測定した。加えて上皮増殖因子 EGF による分裂刺激で起こる EGF 受容体 (EGFR) チロシンリン酸化レベルを western blot 法にて評価した。

(4) 細胞遊走能の評価。 Radius Cell Migration Assay Kit (Cell Biolabs) を用いて経時的に細胞遊走能を評価した。

(5) レスキュー実験による特異的 STIM1 ノックダウンの確認と STIM1 機能領域の探索。 STIM1 ノックダウン細胞に shRNA-resistant full length STIM1 を一過性または恒常的に再発現させて、SOCE、増殖抑制活性および細胞遊走能を調べた。一方、STIM1 が小胞体内の Ca^{2+} レベルの低下を感知して細胞膜の CRAC チャネルを活性化するためには STIM1 の CAD (CRAC activation domain) 領域が必要であることが示されているため、A431 細胞でも必須のドメインとして機能している

か否かを調べるため、CAD 領域を欠損する shRNA-resistant STIM1 mutant を STIM1 ノックダウン細胞に再発現させて同様の機能解析を行った。

(6) 生体内 (ヌードマウス) での腫瘍増生能評価。 Balb/c ヌードマウスに A431 親細胞、negative control 細胞および STIM1 ノックダウン細胞を皮下移植し、経時的に腫瘍径を計測して固型腫瘍の増生を比較した。また固型腫瘍のパラフィン包埋切片に免疫組織染色を施し、STIM1 発現レベルや分裂増殖の指標となる EGFR チロシンリン酸化レベルを対照のそれらと比較した。

4. 研究成果

細胞内 Ca^{2+} イオン濃度制御による新たながん細胞増殖制御法の確立を目標として、SOCE の Ca^{2+} ストアセンサーである STIM1 のがん細胞増殖における役割を解析した。(1) まず、ヒト扁平上皮がん細胞 A431 に、STIM1 特異的 siRNA を発現する shRNA plasmid を安定的に導入し、STIM1 蛋白質発現レベルと SOCE の大きさを指標として 2 つの STIM1 ノックダウン細胞株 (STIM1 KD3-3, STIM1 KD3-17) を樹立した。STIM1 ノックダウンによって、STIM1 のホモログである STIM2 の発現や Orai 1 蛋白質の発現は共に影響を受けないことを確認した。(2) STIM1 ノックダウン細胞の増殖、DNA 合成能および細胞遊走能は negative control 細胞のそれらに比べて有意に低下した。また EGF 刺激で起こる EGFR のチロシンリン酸化レベルは negative control 細胞に比べて STIM1 ノックダウン細胞では有意に低下していた。(3) さらに、STIM1 ノックダウン細胞をヌードマウスへ皮下移植すると、その腫瘍増生は negative control 細胞に比べて有意に遅延した。特に STIM1

KD3-17 細胞を皮下移植した群では腫瘍移植後 24 日においてすべてのマウス (5 匹) で固型腫瘍の増生はほとんど認められなかった。摘出腫瘍パラフィン包埋切片の免疫組織染色では、若干の腫瘍増生を認めた STIM1 KD3-3 投与群でも STIM1 発現レベルと EGFR のチロシンリン酸化レベルは共に negative control 群に比べて低いものであった。(4) STIM1 ノックダウン細胞に shRNA-resistant full length STIM1 を再発現させると、STIM1 の蛋白質発現レベルと SOCE が元のレベルに戻ったことから、得られた STIM1 ノックダウン細胞の特異性が確認された。一方、細胞膜の CRAC チャネルを活性化させるために必要な CAD 領域を欠く shRNA-resistant STIM1 mutant を再発現させても、SOCE、細胞遊走能および in vivo 腫瘍増生能は回復しなかった。これらの結果から、STIM1 はヒト扁平上皮がん A431 細胞の SOCE、細胞遊走ならびに試験管内、生体内腫瘍増殖に必須の分子として機能していることが明らかになった。またその機能発現に STIM1 の CAD 領域と CRAC チャネルの連携が必要であることが実証された。このことは、STIM1 や STIM1 介在性 Ca^{2+} シグナリング関連分子が扁平上皮がん細胞増殖抑制のための新たな標的分子になる可能性を強く示唆している。

以上の結果は、日本薬理学会および日本癌学会学術総会にて発表(学会発表 1-5)すると共に、原著論文として報告した (Yoshida J et al., 2012)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Junko Yoshida, Kuniyoshi Iwabuchi, Tadashi Matsui, Takaharu Ishibashi, Takayoshi Masuoka, Matomo Nishio,

Knockdown of stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses store-operated calcium entry, cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 84: 1592-1603, 2012 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

1. 吉田純子、岩淵邦芳、カルシウムストアセンサー-STIM1 はヒト扁平上皮がんの細胞遊走・腫瘍形成を制御する、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日、横浜(パシフィコ横浜)
2. 吉田純子、石橋隆治、益岡尚由、西尾眞友、ヒト扁平上皮がん増殖におけるカルシウムセンサー-STIM1 の役割、第 123 回日本薬理学会近畿部会、2013 年 7 月 12 日、名古屋(ウインクあいち)
3. 吉田純子、岩淵邦芳、石橋隆治、益岡尚由、西尾眞友、カルシウムセンサー-STIM1 ノックダウンによるヒト扁平上皮がん A431 細胞増殖抑制と腫瘍形成抑制、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日~2013 年 3 月 23 日、福岡(福岡国際会議場)
4. 吉田純子、岩淵邦芳、カルシウムセンサー-STIM1 ノックダウンによるヒト扁平上皮がん A431 細胞のストア作動性カルシウム流入抑制と増殖抑制、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日~2012 年 9 月 21 日、札幌(ロイトン札幌)
5. 吉田純子、岩淵邦芳、石橋隆治、益岡尚由、西尾眞友、カルシウムセンサー

STIM1 ノックダウンによるヒト扁平
上皮がん A431 細胞のストア枯渴性
カルシウム流入抑制と増殖抑制、第
85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月
14 日～2012 年 3 月 16 日、京都（京
都国際会館）

〔その他〕

ホームページ等

金沢医科大学ホームページ

<http://kanazawa-med.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 純子(YOSHIDA, Junko)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：20064628

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岩淵 邦芳 (IWABUCHI, Kuniyoshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232696