

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Modification of Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Handling by Endogenous Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells --- Contribution of Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry

内因性一酸化窒素の血管内皮細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態に及ぼす作用、特に PMCA および SOCE の関与について

指導教官 : 豊岡照彦

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 陳 潔

### 【背景と目的】

血管内皮細胞 (EC) は NO、 $\text{PGI}_2$ 、endothelin などの血管作動性物質の分泌や選択的な物質透過のバリアとしての機能を介し、血圧と血流の調節などの血管生理機能を担っている。EC 内  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) 濃度は上記の機能を制御する。特に、EC 内  $\text{Ca}^{2+}_i$  の上昇は NO の生産をもたらす。NO が血管平滑筋細胞の収縮と増殖を抑制し、臨床上的高血圧と動脈硬化の発病機構に重要な役割を果たしている。

アゴニスト刺激による内皮細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の典型的な経時変化として、まず急速に上昇し、ピークに達した後、徐々に下降する二相性を示す。最初のピーク (initial spike) は  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (IICR) を介する細胞内貯蔵からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出、下降相 (sustained phase) の一部は用量依存性の細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入 (Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry, SOCE) の二成分よりなる。また、いったん上昇した  $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度は、以下の3種類の経路を経てその濃度を低下させる。1) 細胞膜上にある  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ポンプ (PMCA) で細胞外に吸み出す。2)  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系 (NCX) による細胞外に排出する。3) 小胞体の膜上にある  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ポンプ (SERCA) で細胞内貯蔵に取り込んで calsequestrin と結合する。

我々は以前 IICR は EC の SOCE の発生に必要であることと SOCE は NO が連続して生産される過程に重要であることを示した。一方、NO は他の細胞系において  $\text{Ca}^{2+}_i$  動態を修飾する作用がある。NO は IICR の各ステップに対して全て抑制作用を示すが、SOCE に対する作用は一定していない、これは SOCE によって開口する channel とその調節機構が細胞の種類によって異なるためと考えられる。しかし、EC において  $\text{Ca}^{2+}$  動態に NO の役割はまだ明らかでない。

又、従来の研究において NO の作用を検討する際に外因性の NO donor を投与したのはほとんどで、それは多くの欠点を有する。実際の NO の作用を究明するには EC からの天然 NO を利用し、生体に近い環境で機能を解析できるのは一番望ましい。我々は EC が常に NO を少量放出している事を示した。今回、この研究の目的はその EC 由来の内因性 NO を用いて次の二段階で EC の  $Ca^{2+}$  動態における修飾作用を検討した。

「計画 1」basal  $Ca^{2+}_i$  濃度における NO の効果を解明するために、 $IP_3R_1$  の antisense DNA による発現抑制、又は heparin を microinjection して EC の IICR を抑制した後、ATP 又は bradykinin (BK) を加え、周囲の IICR-intact 細胞から放出の NO が IICR を抑制した細胞の basal  $Ca^{2+}_i$  濃度に対する影響を解析した。「計画 2」上昇した  $Ca^{2+}_i$  濃度における NO の効果を解明する為に、IICR-intact 細胞において NO を生産する場合と NO の生産を抑制する 2 つの条件を作って、ATP 又は BK の刺激による  $Ca^{2+}_i$  反応の違いを比較した。

#### 【材料と方法】

- (a) 細胞培養：牛大動脈から分離した EC を継代培養した。
- (b) 抗体作製：ヒトの 1、2、3 型  $IP_3$  受容体の抗体を作りました。
- (c) 牛の  $IP_3R_1$  遺伝子部分的 cloning：379bp の DNA fragment の配列を決定した。
- (d) Antisense と Sense vector の作製：DNA fragment を vector に入れた。
- (e) トランスフェクション：pG. $IP_3R_1$ -AS と pG. $IP_3R_1$ -S を EC へ導入した。
- (f) 細胞内微量注射(microinjection)：heparin を細胞に注入した。
- (g) 細胞内  $Ca^{2+}_i$  濃度の測定と  $Ca^{2+}$  の流入量の測定。
- (h) 免疫染色：トランスフェクションされた EC を  $IP_3R_1$  抗体で免疫染色を行った。
- (i)  $NO_2^-$  の測定：NO の代謝物質  $NO_2^-$  を測定した。
- (j)  $IP_3$  濃度の測定： $IP_3$  [ $^3H$ ] assay kit で  $IP_3$  の radioimmunoassay を行った。
- (k) NO gas solution の用意と各種な buffer の用意。
- (l) SERCA 機能を thapsigargin (TG) で抑制した。

#### 【結果】

- (1) IICR が抑制された EC における basal  $Ca^{2+}_i$  濃度の NO による修飾作用
  - (a)  $IP_3$  受容体として EC には 1 型( $IP_3R_1$ )のみ存在することを immunoblotting 法で示した。EC の ryanodine と caffeine に対する反応が微弱だったため小胞体からの  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release の機構も重要でないことを確認した。
  - (b) pG. $IP_3R_1$ -AS を導入した EC の中、12%の細胞で  $IP_3R_1$  蛋白発現が抑制されている事を抗体による免疫染色で確認した。pG. $IP_3R_1$ -S を導入した EC と隣接する EC の  $IP_3R_1$  蛋白発現は変化しなかった。この結果、pG. $IP_3R_1$ -AS は  $IP_3R_1$  発現を特異的に抑制する効果があることを示した。

- (c)  $pG.IP_3R_1$ -AS を導入した EC の中 15% は ATP 又は BK の刺激による  $Ca^{2+}$  反応は部分的に抑制され、12% は  $Ca^{2+}$  反応が完全に抑制された。この結果は上記の免疫染色の結果と一致した。更に、 $Ca^{2+}$  反応が完全に抑制された細胞は初回の ATP 刺激による  $Ca^{2+}_i$  濃度は basal level より大幅に低下した。その現象は 30 分間後の二回目の ATP 刺激に再現された。NO 合成酵素阻害薬の L-NMMA で EC を 30 分間前処理し、二回目の ATP を加えると、 $Ca^{2+}_i$  の低下は消失した。IP<sub>3</sub> の競合阻害物質の heparin を microinjection し、IICR を抑制すると、ATP 刺激後の  $Ca^{2+}_i$  の低下が上記の  $pG.IP_3R_1$ -AS を導入した EC と同じだった。L-NMMA (1 mM) 前処理で  $Ca^{2+}_i$  濃度が低下しなかった。一方、培養状態を変え sparse に培養した EC は heparin を microinjection して、ATP の刺激により  $Ca^{2+}_i$  の低下は見えなかったが、NO gas が  $Ca^{2+}_i$  を低下させた。従って、ATP 刺激後の  $Ca^{2+}_i$  濃度低下は周囲の細胞から放出された内因性 NO の paracrine 作用によることを示唆した。
- (2) IICR が抑制された EC における  $Ca^{2+}$  流入、内貯存と排出機構。
- (a) IICR を抑制した EC は ATP 又は BK の刺激による  $Ca^{2+}$  濃度を低下させると共に  $Ca^{2+}$  流入も停止していることが  $Mn^{2+}$  quenching の記録で判明した。アゴニストを除去後、 $Ca^{2+}_i$  は速やかに basal レベルに戻り、同時に  $Ca^{2+}$  流入も増加した。
- (b) IICR を抑制した EC において、ATP 刺激により  $Ca^{2+}_i$  の低下後に、細胞外  $Ca^{2+}$  が free の状態で ionomycin で刺激し、 $Ca^{2+}_i$  濃度が上昇した。その上昇程度は ATP 刺激無しに直接 ionomycin 刺激で起こした  $Ca^{2+}_i$  濃度の上昇と比較すると、有意な差がなかった。更に、TG を加えて、SERCA を抑制し、20 秒後の ATP 又は BK 刺激より basal  $Ca^{2+}_i$  濃度が低下した。これは低下した  $Ca^{2+}_i$  は NO 依存性 SERCA 機能促進により内貯存に取り込んでなかったことを示唆した。
- (c) PMCA の機能を抑制した後、IICR が抑制された EC における  $Ca^{2+}_i$  濃度の低下が消失した。NCX の機能を抑制した後、 $Ca^{2+}_i$  濃度はまた低下した。又 NCX と PMCA 両方の機能を抑制した後、 $Ca^{2+}_i$  濃度の低下が消失した。これらの実験結果は、IICR を抑制した EC の  $Ca^{2+}_i$  濃度の低下は、NO 依存性 PMCA 機能促進により細胞外排出したことを示す。
- (3) IICR が intact な EC におけるアゴニストで刺激後の上昇した  $Ca^{2+}_i$  濃度の NO による修飾作用
- (a) L-NMMA で前処理して NO の産生を抑制すると培地中の  $Ca^{2+}$  の有無に拘わらず ATP 又は BK の刺激による initial  $Ca^{2+}_i$  spike は上昇したが、IP<sub>3</sub> 濃度は L-NMMA で前処理の有無によらず変化しなかった。これは NO は IP<sub>3</sub> 産生を抑制しないことを示す。 $Ca^{2+}$ -free の状態で、initial  $Ca^{2+}_i$  spike 後の IM 刺激で起こした  $Ca^{2+}_i$  上昇は L-NMMA 前処理の有無によらず大きく変化しなかった為、NO が SERCA を促進

しないことを示唆した。

- (b) 細胞外に  $\text{Ca}^{2+}$  存在する条件で、PMCA を抑制した後、BK 刺激より  $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度は上昇したが、 $\text{Ca}^{2+}$  流入は減少した。NO の産生量は軽度減少した。L-NMMA 前処理しても、結果的に変化しなかった。逆に、NCX を抑制しても、 $\text{Ca}^{2+}_i$  上昇に大きく影響しなかった。NCX と PMCA 両方を抑制して、 $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度の上昇は PMCA だけの抑制と同じだった。これらの結果は NO 依存性 PMCA 機能促進がアゴニスト刺激による  $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度の上昇を抑制した可能性があることを示した。
- (c) これを更に証明するため、我々は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  非存在の状態では TG (SERCA を抑制する) 刺激後 20 秒の時に BK を投与し  $\text{Ca}^{2+}_i$  を上昇させた。この状況下で NO 産生を抑制すると、initial  $\text{Ca}^{2+}_i$  spike が増強した。PMCA を抑制した後 BK による initial  $\text{Ca}^{2+}_i$  spike は上昇し、半減期が延長した。NO 産生量を抑制しても、この結果に差がなかった。一方 NCX を抑制しても、 $\text{Ca}^{2+}_i$  上昇が大きく変化しなかった。更に NO 産生も抑制すると BK による initial  $\text{Ca}^{2+}_i$  spike はやや上昇した。NCX と PMCA 両方を抑制した後、結果は PMCA だけの抑制後のと同じだった。L-NMMA 前処理しても、結果は変化しなかった。TG だけを使用して  $\text{Ca}^{2+}_i$  を上昇させて、同じ傾向の結果が得られた。これらの結果は NO 依存性 PMCA 機能促進がアゴニスト刺激後の  $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度の上昇を低下させる重要な役割を果たすことを強く示唆した。
- (d) 一方、内因性 NO は  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構を促進することによって sustained phase の  $\text{Ca}^{2+}_i$  を増加させた。

### 【結論】

EC 内  $\text{Ca}^{2+}_i$  動態は内因性 NO の PMCA と SOCE の促進作用により修飾されることが明らかになった。(1) Basal  $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度とアゴニスト刺激による initial  $\text{Ca}^{2+}_i$  spike は NO の PMCA 促進作用のため、basal  $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度は低いレベルに維持され、アゴニスト刺激による  $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度の急速な上昇は緩和された。(2) アゴニスト刺激後の sustained phase において、NO が PMCA を促進させるほか、主に SOCE を亢進させ  $\text{Ca}^{2+}_i$  濃度の上昇を維持して NO 産生量を増加させる positive feedback の機構を有する可能性を示した。