

審査の結果の要旨

氏名 陳 潔

血管内皮細胞 (EC) は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 Ca^{2+} (Ca^{2+}_i) 濃度は上記の機能を制御する。特に、EC 内 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、临床上の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。EC において Ca^{2+} 動態に NO の役割はまだ明らかでない。今回、この研究の目的は EC 由来の内因性 NO を用いて二段階で EC の Ca^{2+} 動態における修飾作用を検討した、下記の結果を得ている。

- (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) $p\text{G}.\text{IP}_3\text{R}_1\text{-AS}$ を導入した EC 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。 $p\text{G}.\text{IP}_3\text{R}_1\text{-S}$ 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、 $p\text{G}.\text{IP}_3\text{R}_1\text{-AS}$ 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) $p\text{G}.\text{IP}_3\text{R}_1\text{-AS}$ を導入した EC 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_3 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 $p\text{G}.\text{IP}_3\text{R}_1\text{-AS}$ 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、内貯蔵と排出機構。
 - (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、有意な差が無かった。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_3 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_3 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 Ca^{2+} 存在する条件で、PMCA を抑制した後、BK 刺激より Ca^{2+}_i 濃度は上昇したが、 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、 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、 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 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 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 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 Ca^{2+}_i spike が増強した。PMCA を抑制した後 BK による initial 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、この結果に差が無かった。一方 NCX を抑制しても、 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 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 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 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 Ca^{2+} 流入機構を促進することによって sustained phase の Ca^{2+}_i を増加させた。

以上、本論文は EC 内 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を明らかにした。本研究は EC において Ca^{2+} 動態に NO の役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。