

## 論文の内容の要旨

論文の題目: Investigations on the Mechanisms of Intracellular Calcium  
Dynamics by Using Novel Calcium Channel Antagonists

新規カルシウムチャネル阻害剤を用いた細胞内カルシウム動態の  
分子機構の解析

指導教官: 御子柴 克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 周 虹

$Ca^{2+}$ は細胞内におけるセカンドメッセンジャーとして、筋収縮、神経伝達物質やホルモンの開口放出、外分泌、シナプスの可塑性、遺伝子発現など多彩な細胞機能に対して重要な調節因子として働いている。一般に細胞質内  $Ca^{2+}$ 濃度は低く、細胞内  $Ca^{2+}$ ストア内及び細胞外の  $Ca^{2+}$ 濃度は高く保たれているため、刺激に応じて細胞質内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇し、 $Ca^{2+}$ がメッセンジャーとして働くことができる。細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇は主として二つの経路、細胞外からの  $Ca^{2+}$ 流入、及び、細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$ 放出により達成される。後者の  $Ca^{2+}$ 放出機構としては、一般に筋細胞などではリアノジン受容体を介する  $Ca^{2+}$ 依存性  $Ca^{2+}$ 放出が、その他の細胞では  $IP_3$ 受容体を対する  $IP_3$ 依存性  $Ca^{2+}$ 放出 ( $IP_3$ -induced  $Ca^{2+}$  release: IICR) が知られている。IICRは、細胞内で  $Ca^{2+}$ 波、 $Ca^{2+}$ 振動など時間的空間的に制御された上昇パターンを引き起こし、様々な生理機能を誘導する。一方で、細胞膜上に存在する  $Ca^{2+}$ チャネルが  $Ca^{2+}$ 流入機構を担う。興奮性細胞では電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルが主たる経路となるが、これに対して、細胞内  $Ca^{2+}$ ストアの枯渇により活性化される Store-Operated  $Ca^{2+}$  Channels (SOCs) と呼ばれるチャネルが、非興奮性細胞を中心に最近注目を浴びている。ストア枯渇により引き起こされる容量性  $Ca^{2+}$ 流入 (capacitative  $Ca^{2+}$  entry: CCE) は、ストアを再充填するための合理的なメカニズムである。これを媒介する SOCs が形質膜上に存在するこ

とは電気生理学的にも明らかにされてはいるが、しかしながら、その分子の実体や活性化機構などはまだ不明である。また具体的な生理的役割についても不明な点が多い。阻害剤もいくつか知られているがそれらの SOCs に対する特異性は高くない。Ca<sup>2+</sup>による刺激応答反応の分子機構の詳細についてはまだ不明の点も多く、複数の Ca<sup>2+</sup>上昇経路の役割分担、さらにそれらのクロストークなど、多くの解明すべき点が今後に残されている。新たに注目されている SOCs が、多彩な Ca<sup>2+</sup>シグナリングにどのように関与しているか、特に興味深いところであるが、それを解明するためには今までより強力で特異的な Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤が不可欠と言える。強力かつ特異的な阻害剤があれば、SOCs の生理的役割の解明に役立つはずである。あるいはその分子の実体を明らかにする一助となる可能性もある。したがって、本研究では、まずそのような化合物を見つけることを第一の目的とした。

2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) は、元々は IP<sub>3</sub> 受容体に対する阻害剤として報告された化合物であるが、近年、それ以外にも SOCs、ER の Ca<sup>2+</sup>ポンプなどに対する阻害作用を持つことが次々と報告された。そこで私は、より特異的な SOCs の阻害剤を見つける目的で、2-APB と類似の構造を持つ 166 個の新規合成化合物 (2-APB analogues) の IICR 及び CCE に対する影響を調べた。その結果、いくつか選択的な SOC 阻害剤を見つけることができた。また、これらの化合物を用いることにより、IICR を介して生じる細胞内 Ca<sup>2+</sup>振動現象の発現持続に SOCs が必須の役割をしていることを明らかにすることができた (本論文第一章)。

また、2-APB は現在までに知られている唯一の膜透過性の IICR 阻害剤であるが、一部の 2-APB analogue はオリジナルの化合物である 2-APB よりも強力に IICR を抑制することが分かった。そこで、IICR を生じ、かつ、その生体内での役割が明確な細胞として初代培養血管平滑筋細胞を選び、その新規化合物の IICR 抑制作用を確認することを第二の目的とした。結果、その新規化合物は、血管平滑筋細胞においても 2-APB よりも強い IICR 抑制作用を示すことがわかった。IICR は様々な細胞での機能調節においてきわめて重要な現象であるので、本研究で発見した新規化合物が、今後、生体標本における強力な機能解析ツールとなることが期待される (本論文第二章前半)。

さらに、IP<sub>3</sub>受容体各サブタイプ (1、2、3型) のノックアウトマウスが近年確立されたので、血管平滑筋細胞機能に IP<sub>3</sub>受容体のどのサブタイプが関与するのか、それを知ることが第三の目的として、IP<sub>3</sub>R 各サブタイプのノックアウトマウスから初代培養大動脈平滑筋細胞を作成し、IICR を観察した。その結果、血管平滑筋の Ca<sup>2+</sup>シグナリングと収縮に 1 型 IP<sub>3</sub>受容体が中心的な役割を果たしていることが分かった。すなわち、本研究により血管平滑筋収縮に関与する細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇の分子機構の一部を明らかにすることができた (本論文第二章後半)。

## 第一章 新規 2-APB analogues の CCE 及び IICR に対する阻害作用の解析

実験方法：

- 1、IP<sub>3</sub>R を完全に欠失した DT40 細胞における CCE に対して、166 個の 2-APB analogues の阻害効果を調べた。
- 2、精製マウス小脳 microsomes を用いて、2-APB analogues の IICR に対する阻害効果を調べた。
- 3、CHO-K1 細胞において、SOC 選択的阻害作用を持ついくつかの化合物の IICR、CCE 及び細胞内 Ca<sup>2+</sup>振動の阻害効果を単一細胞レベルで調べた。

#### 結果のまとめと結論：

- 1、166 個の 2-APB アナログ化合物をスクリーニングした結果、2-APB より強力に CCE を阻害する化合物を見出した。これらの化合物の IC<sub>50</sub> は 2-APB よりも 10 倍から 100 倍低いものであった。もっとも強力な化合物は ONO-IP-163 で、その IC<sub>50</sub> は 59 nM であった。
- 2、小脳 microsomes を用いて IICR 阻害作用を調べた結果、これらの化合物は 100 倍から 1000 倍程度、SOCs に高い選択的阻害作用を持つことが明らかになった。
- 3、これらの化合物は CHO-K1 細胞においても、2-APB よりも低濃度で CCE を阻害した。またその濃度ではアゴニスト刺激による IICR は阻害しなかった。以上のことから、これらの化合物は CHO-K1 細胞においても SOC 選択的であり、その阻害作用は DT40 細胞特異的なものではなく他の細胞でも有効であることが分かった。
- 4、これらの SOC 選択的阻害剤を用いて、CHO-K1 細胞におけるアゴニスト刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態への SOCs の関与を検討した結果、細胞内 Ca<sup>2+</sup>振動の維持に SOC を介した Ca<sup>2+</sup>流入が必須の役割を果たしていることが示された。すなわち、細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態パターン形成における異なる Ca<sup>2+</sup>上昇機構のクロストークの一端を解明することが出来た。
- 5、細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態の分子機構、特に SOCs の関与を明らかにする上で、本研究において見出された新規 SOC 選択的阻害剤の有用性が示された。今後、様々な細胞、組織における SOCs の生理的役割の解明への応用が期待される。

## 第二章 血管平滑筋機能における IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプの役割の解析と新規 2-APB analogue の作用

### 実験方法：

- 1、生後 15 日齢のマウス胸部大動脈血管平滑筋細胞の初代培養をした。
- 2、 $\alpha$ -actin に対する免疫染色により培養細胞が分化型平滑筋細胞であることを確認した。
- 3、培養血管平滑筋細胞に対して Ca<sup>2+</sup>イメージングを行い、第一章で発見した新規化合物の IICR 阻害作用を検討した。
- 4、血管平滑筋細胞の初代培養を IP<sub>3</sub> 受容体各サブタイプのノックアウトマウス胸部大動脈から行い、Ca<sup>2+</sup>イメージングにより IICR を観察した。
- 5、生後 15 ~ 20 日齢の IP<sub>3</sub> 受容体各サブタイプのノックアウトマウスの胸部大動脈摘出標本において、アゴニスト誘発性収縮を記録した。

- 6、ウェスタンブロットにより、胸部大動脈に発現している IP<sub>3</sub> 受容体各サブタイプを検討した。
- 7、HE 染色により IP<sub>3</sub> 受容体各サブタイプのノックアウトマウスの胸部大動脈の組織学的検討を行った。

#### 結果のまとめと結論：

- 1、培養血管平滑筋細胞においては、ATP により再現よく濃度依存的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇が見られた。この上昇は IP<sub>3</sub>-sponge、PLC inhibitor により阻害されたことから IICR であると結論された。
- 2、この ATP 誘発性 IICR に対して、ONO-IP-163 は 2-APB よりも低濃度で阻害作用を示した。すなわち、IP<sub>3</sub> 受容体を介する Ca<sup>2+</sup>シグナリングを調べる上でも、新規 2-APB analogue が有効であることが示された。
- 3、IP<sub>3</sub> 受容体各サブタイプのノックアウトマウスから得られた培養血管平滑筋細胞におけるアゴニスト誘発性の IICR を観察した結果、低濃度のアゴニスト刺激に際し、1 型 IP<sub>3</sub> 受容体が優先的に Ca<sup>2+</sup>シグナリングを誘発することが分かった。
- 4、摘出血管標本におけるノルアドレナリン性アゴニスト刺激による収縮力の発生においても、同様の 1 型 IP<sub>3</sub> 受容体の優先性が見られた。
- 5、蛋白レベルではどの IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプも発現していたが、量的には 1 型が最も多く発現し、次いで 3 型が多く、そして 2 型の発現はかなり低いことが分かった。1 型は 3 型に比べて IP<sub>3</sub> 結合の親和性が高いことに加えて、その発現量も多いため、血管平滑筋においてその機能をより強く発現すると考えられた。
- 6、どの IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプのノックアウトマウスにおいても、胸部大動脈血管組織に目立った異常は見られなかった。
- 7、以上の結果は交感神経系や血管収縮性ホルモンによる血管トーン調節の分子機構の一部として 1 型 IP<sub>3</sub> 受容体がほかのサブタイプに比べて中心的に関与していることを示唆している。

#### 結論

本研究において発見した新規 Ca<sup>2+</sup>チャネルブロッカーや、近年確立されたノックアウトマウスを用いることにより、細胞における Ca<sup>2+</sup>振動現象の発現維持に SOCs が必須の役割をはたしていること、血管平滑筋収縮では 1 型 IP<sub>3</sub> 受容体が中心的に機能していることなどが分かった。本研究により、生体機能維持に関与する Ca<sup>2+</sup>シグナリングメカニズムに関し、その分子機構の一部を解明することができた。