

論文の内容の要旨

論文題目 Effects of Serum Amyloid A and Lysophosphatidylcholine on Human
Coronary Artery Smooth Muscle Cells: Roles of Transient Receptor Potential
Channels
和訳 ヒト冠動脈平滑筋における Serum Amyloid A 及び Lysophosphatidylcholine
の生理作用：TRP チャンネルの役割
指導教員 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 田中 悌史

血清アミロイド A (SAA) およびリソフォスファチジルコリン (LPC) はいずれも冠動脈疾患患者においてその血中濃度が上昇することが知られている。SAA は血中において高比重リポ蛋白質 (HDL) に結合するアポリポプロテインの一種であり、急性期蛋白である SAA1, SAA2 および常時発現する SAA4 のサブファミリーからなる。SAA の血中濃度は急性炎症の際には約 1000 倍になるとも言われているが、その血中濃度と冠動脈疾患との関連も示唆されており、罹患病変枝数などの重症度との相関も報告されている。一方、LPC はリソレシチンとも呼ばれ、低比重リポ蛋白質 (LDL) の酸化物質である酸化 LDL の主要構成物質である。LPC は、SAA と同様、粥状硬化性疾患や急性および慢性炎症性疾患で重要な役割を担っていると考えられており、実際、冠動脈疾患患者において、LPC の血中濃度や、LPC が生体内で生成される際に必要となる酵素の一つであるレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) の酵素活性も上昇することが報告されている。

このように SAA、LPC はいずれも冠動脈疾患においてその血中濃度が上昇することが報告されているが、近年、これらの物質は疾患のマーカーとしての役割のみならず、物質そのものが粥状硬化を促進する作用を持つことが示唆されている。しかし、その具体的な分子生物学的作用については不明な点が多い。現在までに SAA および LPC は細胞内カルシウム濃度を上昇させることが報告されており、このカルシウム動態の変化が、SAA/LPC による細胞機能に影響を与えていると推測されている。Transient receptor potential (TRP) チャンネルはこのカルシウム動態に関与するチャンネルの一つとして考えられているが、SAA や LPC によるシグナル伝達に関与していることも推測されている。TRP チャンネルは TRPC、TRPV、TRPM、TRPA、TRPP、TRPML の 6 つのサブファミリーからなり、さらに TRPC には C1-C7、TRPV には V1-V6、TRPM

には M1-M8 までのサブタイプが報告され、それぞれ生体内において様々な機能を担っていると考えられている。SAA、LPC によるカルシウム動態の変化に關与する TRP チャンネルについてはいくつかの報告があるが、いまだ特定の TRP チャンネルは定まっておらず、さらにそのチャンネルを活性化させるまでのシグナル伝達経路に關してはほとんど不明である。

そこで本研究では SAA 及び LPC のヒト冠動脈平滑筋 (hCASMCs) に対する作用について、TRP チャンネルおよびシグナル伝達経路という観点から検討を行った。Fura2-AM を用いた 2 波長励起法、リバーシ・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法 (RT-PCR 法)、リアルタイム RT-PCR 法、免疫染色法、ウェスタンブロッティング法、RNA 干渉 (small interfering RNA, siRNA) の手法を用いて実験を行った。

細胞はヒト冠動脈平滑筋 (hCASMCs) を培養し、2-5 代、継代したものを使用した。Fura2-AM を用いた 2 波長励起法による細胞内カルシウム測定では、SAA、LPC いずれも細胞内カルシウム濃度上昇を誘発し、しかもその効果は細胞外液にカルシウムイオンが存在するときに著明に認められた。このことから、SAA および LPC による細胞内カルシウム濃度上昇は、主に細胞外のカルシウムイオンが何らかのチャンネルを介して細胞内に流入することによって起こることが示唆された。しかもいずれによる作用も L 型および T 型カルシウムチャンネル拮抗薬では阻害されず、非特異的な TRP チャンネル拮抗薬であるガドリニウムイオンや 2-APB、SKF96365 などによって抑制されたことから、SAA や LPC による細胞内カルシウムイオン濃度上昇に対する TRP チャンネルの關与が示唆された。

hCASMCs における RT-PCR 法では、TRPC、TRPV、TRPM チャンネルのサブタイプの中で、C1, C4, V1, V2, V4, M7, M8 の発現が確認され、さらにこれらのなかで免疫染色法やウェスタンブロッティング法において、C1, C4, V4, M7 の発現が確認された。

一方、コレラ毒素 (cholera toxin, CTX) や百日咳毒素である pertussis toxin (PTX) は G 蛋白結合型受容体と共役した Gs 蛋白質や Gi 蛋白質をそれぞれ活性化・阻害することで、それに引き続くシグナル伝達経路を介するイオンチャンネル等の効果器の作用に影響を及ぼす。CTX や PTX を前処置したヒト冠動脈平滑筋細胞において細胞内カルシウム動態について検討すると、SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は CTX では阻害されず、PTX により著明に阻害された。一方、LPC による細胞内カルシウムイオン濃度上昇はいずれの前処置によっても阻害されなかった。さらに SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇はホスホリパーゼ C (PLC) の阻害薬である U73122 によっても阻害されたことから、Gi 蛋白質および PLC を介したシグナル伝達経路を介している可能性が考えられた。従来までの報告において Gi 蛋白質による活性化が確認されているのは TRPC4 であり、TRPC4 は今回本研究で行った RT-PCR や免疫染色、ウェスタンブロッティングにおいても hCASMCs における発現が確認された。さらに SAA によるカルシウムイオン濃度上昇は 2-APB や SKF96365 で抑制されたという点も、その過程における TRPC4 の關与について矛盾しないと考えられた。

そこで SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇効果における TRPC4 の関与を明らかにするため、TRPC4 に対する small interfering RNA (siRNA) を用いた検討を行った。培養ヒト冠動脈平滑筋細胞に TRPC4 に対する siRNA を transfection させて、TRPC4 をノックダウンさせた細胞では、TRPC4 の mRNA 発現が抑制されるとともに、SAA による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制された。このことから培養ヒト冠動脈平滑筋細胞において SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇には TRPC4 が関与していることが裏付けられた。

さらに細胞内マグネシウムイオン濃度測定のため、細胞内マグネシウムイオンに対する特異的なプローブである mag-fura2-AM を用いた同様の 2 波長励起法を施行した。その結果 LPC はカルシウム同様、細胞内マグネシウムイオン濃度上昇を誘発すること確認されたが、SAA によるこの作用は認められなかった。TRP チャネルサブタイプのうち、TRPM6 および M7 は細胞内マグネシウムホメオスタシスにも関与していることが従来から報告されている。今回本研究で行った RT-PCR や免疫染色、ウエスタンブロッティングでも TRPM7 の発現は確認されており、これらの実験結果から LPC による細胞内カルシウムイオン濃度上昇にはこれらの TRP チャネルが関与している可能性が示唆された。

これらの実験結果から明らかとなったことをまとめると以下のとおりである。(1) SAA および LPC はいずれも細胞外液からのカルシウムイオン流入によって細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる。(2) SAA および LPC による細胞内へのカルシウムイオン流入には TRP チャネルが関与していると考えられた。(3) LPC とは対照的に SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇には G 蛋白質のうち Gi 蛋白を介して PLC 活性を上昇させることが必要である。(4) ヒト冠動脈平滑筋細胞においては TRP チャネルのサブファミリーのうち、TRPC1、C4、V1、V2、V4、M7、M8 が発現している可能性がある。(5) これらの TRP チャネルのうち、SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇には TRPC4 が関与している。

今後、LPC による細胞内カルシウムイオン濃度上昇に関与するチャネルを特定するとともに、SAA や LPC によるこれらの作用がどのような細胞機能に関与し、結果として動脈硬化促進につながるのかを明らかにすることが必要と考えられる。さらには、本研究の結果から、冠動脈疾患を含めた動脈硬化性疾患の新しい治療の標的として特異的な TRP チャネルの阻害薬という可能性が示唆されたが、現時点では特異的な TRP チャネルの阻害薬は明らかとなっておらず、今後臨床的にはさらなる検討が必要であると考えられた。