

論文内容の要旨

論文題目 ストア依存性カルシウム流入関連タンパク STIM1 の血管内皮機能

調節における役割の解析

指導教員 藤田 敏郎 教授

東京大学医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

西本 光宏

正常な血管内皮は血管トーン、血栓形成、血管透過性、血球接着、新生血管形成など血管全体の環境を制御している。血管内皮は種々の生理活性物質すなわち、一酸化窒素(NO)、prostacyclin(PGI₂)、bradykinin(BK)などの血管拡張物質と、endothelin-1やangiotensin II といった血管収縮物質をそれぞれ分泌し、そのバランスによって機能を保っている。血管内皮が障害を受けて一旦これらのバランスが崩れると血管透過性の亢進や血小板凝集、白血球接着、サイトカイン産生など一連の反応によって動脈硬化病変が進行すると考えられている。また臨床的には、血管内皮機能はアセチルコリン(ACh)による血管拡張反応として評価されており、最近ではプレチスモグラフィや超音

波検査装置によるFlow Mediated Dilatation(FMD)の計測によっても評価されている。これらの検査の結果、高血圧、糖尿病、脂質異常症など動脈硬化性疾患においては血管内の血栓などが存在しない時期でもすでに血管内皮機能の低下した患者が存在することが報告されている。しかもその後の高血圧の発症や冠動脈イベントの発症にこの血管内皮機能障害が相関することが分かっており、将来の心血管病の発症の重大な危険因子あるいは予知因子とされる。

上記のような血管内皮機能は NO に大きく依存しており、機能障害時には著明に NO の産生や活性が低下することが知られている。NO は強力な血管拡張物質であり、血管平滑筋細胞に作用して血圧を低下させるだけでなく、細胞接着因子の発現を阻害し、ケモカインの分泌、血小板凝集を抑制し、線溶傾向に働くなど抗炎症的に作用して動脈硬化に対して保護的に働くことが知られている。NO は血管内皮においては恒常的に発現する内皮型 NO 合成酵素(eNOS)によって産生される。eNOS は細胞内局在、リン酸化、タンパク-タンパク相互作用など様々なレベルの修飾によって活性が調節されている。特に Ca^{2+} シグナルは直接に Ca^{2+} /calmodulin 経路を活性化するとともに Akt を活性化して eNOS をリン酸化し、活性化させる。その際にストアからの Ca^{2+} 放出よりも細胞外からの Ca^{2+} 流入がより強力に作用するとされている。血管内皮を含む非興奮性細胞では細胞外からの Ca^{2+} 流入は"ストア依存性 Ca^{2+} 流入(Store-operated Calcium Entry:SOCE)"と呼ばれる現象に依存している。ストア依存性 Ca^{2+} 流入は BK や ACh、

thrombin、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などのアゴニスト、あるいは shear stress など様々な刺激によって起こることが知られている。これらの刺激が細胞膜上の受容体に結合することによりストアからの Ca^{2+} 放出を起し、ストア内 Ca^{2+} 濃度が低下すると細胞外から Ca^{2+} が流入することが以前から知られていたが、このストア内 Ca^{2+} 濃度低下の情報が細胞膜上に伝達され、チャネルが開口する経路については長年にわたって不明であった。しかし 2005 年にストア内 Ca^{2+} のセンサーとして STIM1 が同定され、ストア依存性 Ca^{2+} 流入に主要な役割を果たしていることが様々な細胞で確認されてきた。STIM1 は 1 回膜貫通型タンパクで N 末端側に EF hand motif と sterile alpha motif(SAM)をもち、N 末端側を内側として小胞体膜上に存在する。EF hand motif は Ca^{2+} を挟む形で結合する構造であり、STIM1 はこの部分で Ca^{2+} を感知すると考えられている。ストア内 Ca^{2+} 枯渇を感知した STIM1 は SAM によってオリゴマーを形成し、膜近傍あるいは膜上に移動して Ca^{2+} チャネルを活性化させる。さらに STIM1 の過剰発現は種々の細胞でストア依存性 Ca^{2+} 流入を増加させることが報告されており、ストア内 Ca^{2+} 枯渇の感知だけでなく、ストア依存性 Ca^{2+} 流入の大きさにも寄与していることが分かっている。

上記のようにストア依存性 Ca^{2+} 流入は血管内皮機能調節において重要であると考えられ、血管内皮細胞においてその分子メカニズムの解析は動脈硬化性疾患の最初期の病態生理の解明に有用であると考えられる。

しかし、ストア依存性 Ca^{2+} 流入制御の分子の実体であると考えられる STIM1 が血管内皮細胞においても、他の細胞においてと同様にストア依存性 Ca^{2+} 流入を調節しているのか、さらに直接に血管内皮機能に影響を与えるのかについては未だ明らかでなく、その解析によって血管内皮機能調節に対してより理解が深まることが期待された。

そこで本研究では STIM1 の血管内皮細胞における動態、発現量変化による eNOS 活性化、NO 産生に及ぼす影響を解析するとともに、血管内皮障害時の反応を検討するため TNF α 障害刺激による NF κ B 活性化に対する影響を検討した。

最初にウェスタンブロッティング法と免疫蛍光染色によって正常ウシ大動脈内皮細胞(BAEC)に内在性の STIM1 が存在することを確認した。つぎにストア内 Ca^{2+} 枯渇刺激に対する細胞内動態を検討した。YFP 融合 STIM1 を BAEC に発現させて、共焦点顕微鏡によってリアルタイムモニターした。小胞体上の Ca^{2+} -ATPase ポンプ(SERCA) 阻害薬である thapsigargin 投与によりストア枯渇刺激を行うと STIM1 は速やかにその細胞内分布を変化させ、clustering による点状構造(puncta)分布に変化した。したがって血管内皮細胞でもストア内 Ca^{2+} 枯渇刺激に対しての局在変化が他の細胞におけるこれまでの報告と同様に起こることが確認された。発現量と機能の関係について解析するため、STIM1 の発現量を変化させてストア内 Ca^{2+} 枯渇刺激後の Ca^{2+} 再流入に対する影響を検討した。STIM1-YFP、STIM1siRNA のトランスフェクションにより STIM1 の発現量が増加、減少することをウェスタンブロッティング法により確認した

上で蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Fura red、および Ca^{2+} 指示タンパク GCaMP3 を用いてこれらの細胞でストア依存性 Ca^{2+} 流入を観察した。thapsigargin/ATP によるストア内 Ca^{2+} 枯渇刺激に続けて、 Ca^{2+} 添加によって再流入刺激(以下 SOCE 刺激)を行って流入の大きさを検討したところ、過剰発現させた細胞はコントロールの細胞に比較して SOCE が約 30%増加した。一方でノックダウンした細胞では SOCE は 95%以上の減少を認めた ($\Delta F/(F_{max}-F_0)=0.90\pm 0.05$ vs 0.03 ± 0.02 , $p<0.005$)。以上より血管内皮細胞においても STIM1 の発現量によって SOCE の大きさが調節されることが確認された。

血管内皮細胞では SOCE は eNOS を活性化し、NO 産生を起こすことから、STIM1 発現量が SOCE 調節を介して NO 産生を調節することが予想された。SOCE 刺激により活性化型 eNOS である Ser¹¹⁷⁹ リン酸化 eNOS が有意に増加したが、この増加は STIM1 ノックダウン細胞ではコントロールに比較して約 70%の抑制を認めた(pSer¹¹⁷⁹/total eNOS が control の $32\pm 5\%$ に減少, $p<0.03$)。さらに生理的に SOCE 刺激を誘導すると考えられる 100nM VEGF 15 分間刺激によっても同様の eNOS 活性化と STIM1 ノックダウンによる eNOS 活性化の著明な抑制が認められた。この反応は細胞内 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM、SOCE 抑制剤 2-APB によっても同様に抑制されたことからストア依存性 Ca^{2+} 流入を介するものと考えられた。さらに実際の NO 産生に及ぼす影響を検討するため SOCE 刺激により誘導される NO 産生を DAF2DA により評価した。その結果 STIM1 ノックダウン細胞では NO 産生がコントロール細胞の 20%まで低下した

($F_{max}/F_0=1.75\pm 0.21$ vs 1.15 ± 0.04 , $p<0.03$)。STIM1 が強い血管保護作用をもつ NO の産生に大きな影響を与えたことから、炎症性障害刺激に対する血管内皮の反応に影響する可能性が考えられた。障害刺激として TNF α 処置を行い、種々の炎症性障害の制御因子と考えられる NF κ B へ及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。その結果、TNF α により増強した NF κ B 活性は STIM1 ノックダウン細胞では 30% まで抑制された (TNF 処置後 fLuc/rLuc: 3.02 ± 0.55 vs 0.99 ± 0.23 , $p<0.004$)。Ca²⁺シグナルが NF κ B の活性化に影響する事はこれまで様々な細胞で報告されており、特に急峻な Ca²⁺濃度上昇の繰り返し(Ca²⁺ oscillation)は NF κ B を活性化し、且つその周期によってその活性が制御されることが報告されている。TNF α の直接刺激によるストア依存性 Ca²⁺流入をはじめとする Ca²⁺流入反応は観察されず、これまで非興奮性細胞において TNF α 刺激がストア依存性 Ca²⁺流入を起こすという報告もみられないことから今回の実験系で TNF α が直接ストア依存性 Ca²⁺流入を介して NF κ B 活性化を起こしたとは考えられない。一方で、リンパ球細胞株において酸化ストレス負荷が STIM1 分子を修飾し、ストア依存性 Ca²⁺流入を増強したという報告があり、TNF α も生理的に起きている Ca²⁺ oscillation の頻度や強度に対して何らかの修飾を起こした可能性が考えられる。血管内皮細胞において高濃度リガンド存在下で観察される Ca²⁺ oscillation が 2-APB や細胞外 Ca²⁺ 除去により消失することより、ストア依存性 Ca²⁺流入が oscillation の形成・維持に関与している可能性は高く、STIM1 による制御が行われて

いることが想定される。しかし、本研究では STIM1 のノックダウンによる NFκB 活性化の抑制が、Ca²⁺シグナルの抑制を介していることを直接示すことができておらず、今後の課題である。

本研究においてストア依存性 Ca²⁺流入制御タンパクである STIM1 は血管内皮に保護的な NO の産生に不可欠である一方で、障害刺激時における反応にも促進的に寄与していることが示された。したがって STIM1 は血管内皮の病態生理において単純に保護的か、障害的かという点については本研究の結果からは結論できない。しかし、STIM1 が血管内皮機能調節に何らかの関与をしている可能性が強く示唆され、各病態を複雑に修飾している可能性が考えられる。今後さらなる検討によって STIM1 の内皮における機能解析が進み、心血管病の病態生理のより深い理解と将来の治療への応用が期待される。