

A study on thapsigargin-induced calcium ion and cation influx pathways in vascular endothelial cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 直樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1586

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 309号	学位授与年月日	平成11年 9月 3日
氏 名	山 本 直 樹		
論文題目	A study on thapsigargin-induced calcium ion and cation influx pathways in vascular endothelial cells (Thapsigargin による血管内皮細胞内カルシウムイオン及び陽イオン流入経路の検討)		

博士(医学) 山本直樹

論文題目

A study on thapsigargin-induced calcium ion and cation influx pathways in vascular endothelial cells
(Thapsigarginによる血管内皮細胞内カルシウムイオン及び陽イオン流入経路の検討)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血管内皮細胞は多機能細胞とみなされ、その機能発現に細胞内 Ca^{2+} が重要な働きをすることが知られているが、血管内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)を調節する機構は十分には解明されていない。Bradykinin等の細胞膜表面アゴニストは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させるが、この上昇はendoplasmic reticulum(ER)からの Ca^{2+} 放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入からなると報告されている。ERからの Ca^{2+} 放出はinositol-1, 4, 5-trisphosphate(IP_3)を介し誘発され、さらにER内の貯蔵 Ca^{2+} の低下により、細胞外からの Ca^{2+} 流入が刺激されるというcapacitative theoryが支持されているが、そのメカニズム及び流入経路については未だ明らかにされていない。ERの Ca^{2+} -ATPase活性を選択的に阻害するthapsigarginは Ca^{2+} のERへの取り込みを阻害することにより、 IP_3 を介さずERの Ca^{2+} 含量を低下させ、細胞外からの Ca^{2+} 流入をきたすと考えられている。本研究ではthapsigarginを用い、血管内皮細胞における Ca^{2+} 濃度調節機構、特に細胞外からの Ca^{2+} 流入経路について検討した。

[材料ならびに方法]

- 1) 細胞培養：ブタ胸部下行大動脈を機械的に擦過することにより内皮細胞を分離し、M199培養液中に懸濁し、実験槽(カバーガラス上に固着したポリビフェニル製のフレキシバーム皿)にて2日間培養したものを用いた。
- 2) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定：カバーガラス上の内皮細胞に、蛍光 Ca^{2+} 濃度指示薬であるfura-2/AM $2 \mu\text{M}$ を45分間loading後、励起波長340nmと380nmでの蛍光比を画像解析した。細胞内でのキャリブレーションによりその蛍光比から Ca^{2+} 濃度を算出した。
- 3) 細胞内への Mn^{2+} 流入の測定： Mn^{2+} は Ca^{2+} より高い結合性でfura-2と結合し、その蛍光を捕色する。また360nm励起光によるfura-2の蛍光は Ca^{2+} 濃度に影響を受けないので、360nm励起光によるfura-2の蛍光強度の減少を測定することにより、 Mn^{2+} の細胞内への流入を検討した。

[結果]

- 1) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に及ぼすthapsigarginの影響。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はthapsigargin(10^{-6}M)投与により $42 \pm 6 \text{ nM}$ から $1665 \pm 151 \text{ nM}$ (mean $\pm$ S.E., $n=10$)に上昇した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の最高値はthapsigargin濃度 $10^{-7}\text{M} \sim 10^{-5}\text{M}$ で濃度依存性であった。
- 2) Thapsigarginによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇における細胞外 Ca^{2+} の影響。Thapsigargin(10^{-6}M)による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、 Ca^{2+} -free EGTA溶液下で有意に抑制された(basal: $24 \pm 4 \text{ nM} \rightarrow$ peak: $689 \pm 168 \text{ nM}$, mean $\pm$ S.E., $n=10$)。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は主に細胞外からの Ca^{2+} 流入によることが明らかになった。
- 3) Thapsigargin(10^{-6}M)による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇における電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の影響。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルブロッカーであるverapamil(10^{-5}M)投与では影響を受けず、

Na⁺free溶液下においても影響を受けなかった。

4) Thapsigargin (10⁻⁶M) による [Ca²⁺]_i 上昇における Ni²⁺ と高 K⁺ の影響。[Ca²⁺]_i 上昇は非特異的陽イオンチャンネル阻害剤である Ni²⁺ (NiCl₂ 10⁻³M) 溶液下で有意に抑制され (basal: 27 ± 4 nM → peak: 229 ± 19 nM, mean ± S.E., n = 10)、細胞膜の脱分極をきたす高 K⁺ (KCl 150 mM) 溶液下においても有意に制御された (basal: 34 ± 19 nM → peak: 567 ± 73 nM, mean ± S.E., n = 10)。

5) Mn²⁺ の細胞内への流入に及ぼす thapsigargin の影響。1 mM Mn²⁺ (MnCl₂ 1 mM) 溶液下において、thapsigargin 投与により細胞内への Mn²⁺ 流入が促進された。Thapsigargin による Mn²⁺ 流入は、細胞外液 Mn²⁺ 濃度を 1 mM に一定にした溶液下では、細胞外液 Ca²⁺ 濃度が高いほど、Mn²⁺ 流入量は減少した。

〔結論〕

Thapsigargin による [Ca²⁺]_i の上昇は、細胞内貯蔵部位からの Ca²⁺ 放出と、細胞外からの Ca²⁺ 流入によって生じることが示された。Thapsigargin によって刺激される Ca²⁺ 流入経路として、電位依存性 Ca²⁺ チャンネル及び Na⁺/Ca²⁺ 交換系の関与は否定的であり、非選択的陽イオンチャンネルを介することが示唆された。さらにこの流入経路において、Mn²⁺ 流入と Ca²⁺ 流入は競合的に作用することが認められた。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞でもカルシウムイオンが重要な生理調節機能をしているが、その血管内皮細胞内のカルシウムイオン濃度 ([Ca²⁺]_i) を調節する機構は十分には解明されていない。血管作動性薬剤の血管内皮細胞内のカルシウムイオン濃度上昇作用は endoplasmic reticulum (ER) からの Ca²⁺ 放出と細胞外からの Ca²⁺ 流入からなると報告されている。

その ER からの Ca²⁺ 放出は inositol-1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) を介して誘発され、さらに ER 内の貯蔵 Ca²⁺ の低下により、細胞外からの Ca²⁺ 流入が刺激されるという capacitative theory が支持されているが、そのメカニズム及び流入経路については未だ明らかにされていない。

申請者は ER の Ca²⁺-ATPase 活性を選択的に阻害する thapsigargin の薬理作用に注目して、この薬剤を用いて、血管内皮細胞における Ca²⁺ 濃度調節機構、特に細胞外からの Ca²⁺ 流入経路について研究したものである。

材料は、ブタの胸部下行大動脈からの内皮細胞を分離し、2日間培養したものを用いた。細胞内カルシウムイオン濃度の測定はこの研究グループが従来用いている方法で、蛍光 Ca²⁺ 濃度指示薬である fura-2 の蛍光測定による方法を使用している。

検討項目 1) Thapsigargin による [Ca²⁺]_i 上昇における細胞外 Ca²⁺ の影響

2) Thapsigargin による [Ca²⁺]_i 上昇における電位依存性 Ca²⁺ チャンネルと Na⁺/Ca²⁺ 交換系の影響

3) Thapsigargin による [Ca²⁺]_i 上昇における Ni²⁺ と高 K⁺ の影響

4) Mn²⁺ の細胞内への流入に及ぼす thapsigargin の影響

結果として、1) Thapsigargin による [Ca²⁺]_i の上昇は、細胞内貯蔵部位からの Ca²⁺ 放出と、細胞外からの Ca²⁺ 流入によって生じることが明らかになった。2) Thapsigargin によって刺激される Ca²⁺ 流入経路として、電位依存性 Ca²⁺ チャンネル及び Na⁺/Ca²⁺ 交換系の関与は無く、非選択的陽イオンチャンネルを介することが考えられた。Ca²⁺ の流入経路において、Mn²⁺ 流入と Ca²⁺ 流入は競合的に作用することが分かった。

この研究により、血管内細胞でのカルシウムイオン濃度の上昇及び流入の機構が明らかにされ、血管系での薬理学、生理学分野で貢献したことが審査会で評価された。

この発表に際して申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 使用した2日間培養のブタ血管内皮細胞のconfluenceの程度は
- 2) G-actinがF-actinになる機序は
- 3) 電位依存性カルシウムイオンチャンネル以外のチャンネルはあるか
- 4) 細胞内カルシウムイオン濃度に影響を与える細胞外液の最小のカルシウムイオン濃度は
- 5) 血管内皮細胞カルシウムイオン濃度増加はどのような意味をもつか
- 6) 血管内皮細胞のカルシウムイオン濃度はエンドセリンの放出に関与するか
- 7) Thapsigarginの血管内皮細胞のpermeabilityに対する回復実験の意味は
- 8) Thapsigarginの薬学的応用は
- 9) この研究の臨床的意義は
- 10) Mn^{2+} の生理的役割は

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 平 光 忠 久

副査 大 橋 京 一 副査 小 林 隆 夫