



Myosin light-chain kinase regulates capacitative Ca²⁺ entry in human monocytes/macrophages

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: TRAN, QUANG KIM メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1195

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	医博第 342号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	TRAN QUANG KIM		
論文題目	Myosin light-chain kinase regulates capacitative Ca^{2+} entry in human monocytes/macrophages (ヒト単球/マクロファージにおいてミオシン軽鎖キナーゼにより調節される容量性カルシウム流入機構の検討)		

博士(医学) TRAN QUANG KIM

論文題目

Myosin light-chain kinase regulates capacitative Ca^{2+} entry in human monocytes/macrophages

(ヒト単球/マクロファージにおいてミオシン軽鎖キナーゼにより調節される容量性カルシウム流入機構の検討)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

動脈硬化病変初期像の完成に、単球/マクロファージと血管内皮細胞の接着、その内皮下への侵入と泡沫細胞化が重要であることが報告されている。さらに、これらの過程が細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})濃度の変化により修飾されることが注目されている。我々はこれまで血管内皮細胞を対象とし細胞骨格調節系であるミオシン軽鎖キナーゼが内皮細胞への Ca^{2+} 流入調節に中心的な役割を演じることを認め報告した。本研究では、アンチセンス法を用い単球/マクロファージにおける Ca^{2+} シグナル調節機構を解析し、ミオシン軽鎖キナーゼにより調節される Ca^{2+} シグナル機構について検討を加えた。

〔方法〕

対象としてFicoll Paqueにより分離したヒト単球細胞を用いた。ミオシン軽鎖キナーゼの開始コドン領域に対する相補的アンチセンスオリゴマーを合成し、ミオシン軽鎖キナーゼが特異的に抑制された細胞系を作成した。細胞内 Ca^{2+} 動態は蛍光色素法を用い、イオン特異性蛍光プローブであるfura-2を細胞に負荷し、 Ca^{2+} 濃度変化を画像解析装置により解析した。ミオシン軽鎖リン酸化は、Stullの方法に準じUrea Gel Electrophoresisによりミオシン軽鎖の非リン酸化、リン酸化体をウエスタンブロットしデンシトメトリーにより定量化した。

- (1) 小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害薬であるthapsigargin(TG, $1\mu\text{M}$), cyclopiazonic acid(CPA $100\mu\text{M}$)投与時の細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を検討した。
- (2) 蛋白キナーゼの細胞内 Ca^{2+} 調節における関与をミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬であるML-9($1\text{--}100\mu\text{M}$), wortmannin($100\mu\text{M}$)およびチロシンキナーゼ阻害薬、Cキナーゼ阻害薬を用い検討し、ミオシン軽鎖リン酸化反応と Ca^{2+} 流入反応との相関を解析した。
- (3) 正常細胞とミオシン軽鎖キナーゼアンチセンスオリゴマー導入培養細胞においてTGとCPA投与時の細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を比較検討した。

〔結果〕

- (1) 1mM の細胞外 Ca^{2+} 存在下で、TGおよびCPAは単球/マクロファージ内 Ca^{2+} 濃度(F340/380)をそれぞれ 0.87 ± 0.17 より 4.28 ± 0.39 、 4.10 ± 0.41 へ上昇した。細胞外 Ca^{2+} 非存在下では、TGおよびCPAにより 1.07 ± 0.06 、 1.10 ± 0.11 への軽度な一過性の上昇を認めた。
- (2) 細胞外 Ca^{2+} 非存在下でCPAを投与し、一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を観察した後にCPAを除去し、細胞外液を Ca^{2+} 含有溶液に置換すると再び細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇した。
- (3) ミオシン軽鎖キナーゼの阻害薬であるML-9($100\mu\text{M}$)、wortmannin($100\mu\text{M}$)を投与すると、TGおよびCPAによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はほぼ完全に抑制された。ML-9の抑制作用は濃度依存的であった。

しかし、チロシンキナーゼ阻害薬であるgenistein (100 μ M)、herbimycin A (100 μ M) やCキナーゼ阻害薬であるbisindolylmaleimide I (10 μ M)、staurosporine (0.3 μ M) の投与時には、TGおよびCPAによる細胞内Ca²⁺濃度上昇は軽度の抑制を認めるのみであった。

(4) TG投与により、ミオシン軽鎖リン酸化量は0%より77%に増加し、ML-9 (100 μ M), wortmannin (100 μ M) により、このリン酸化はほぼ完全に抑制された。ML-9 (1-100 μ M) によるリン酸化抑制作用は濃度依存的であり、Ca²⁺流入抑制作用と有意に相関した ($r=0.95197$, $P<0.05$)。

(5) ミオシン軽鎖キナーゼアンチセンス細胞では、定常状態の細胞内Ca²⁺濃度に変化を認めなかったが、TGおよびCPA投与時の細胞外からのCa²⁺入流は完全に抑制された。

〔考察〕

ヒト単球/マクロファージにおいても細胞内Ca²⁺ストアのCa²⁺含量の低下により刺激される細胞外からのCa²⁺流入、すなわち容量性Ca²⁺流入機構が存在することが示された。この容量性Ca²⁺流入は、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬投与時およびミオシン軽鎖キナーゼアンチセンス細胞ではほぼ完全に抑制され、ミオシン軽鎖リン酸化の程度とも有意に相関した。以上より、ヒト単球/マクロファージにおける容量性Ca²⁺流入がミオシン連鎖キナーゼにより調節されることが明らかとなった。

〔総括〕

細胞内で重要なセカンドメッセンジャーとして働く細胞内Ca²⁺濃度の調節機構を明らかにすることは細胞機能の発現・調節メカニズムを解明するうえでも極めて意義深いものと考えられる。本研究の知見は単球/マクロファージにおいて容量性Ca²⁺流入機構が存在し、ミオシン軽鎖キナーゼがその調節系として作用し細胞機能を修飾するとともに、動脈硬化の発症にも関わる重要なシグナルとなることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

単球やマクロファージは動脈硬化症における粥状硬化巣形成に大きな役割を果たしていることが知られており、それらの細胞の活性化と細胞内Ca²⁺反応の間に強い関係があることも報告されている。しかし、その細胞内Ca²⁺反応の全貌については、重要な点が未だ明らかになっていない。そこで申請者は、これらの細胞におけるCa²⁺反応の制御機構を明らかにする目的で、Ca²⁺反応を蛍光法により観察しながら、細胞内Ca²⁺ストアを枯渇させる実験を行った。この中で、Ca²⁺反応に対するアンチセンスを初めとする各種のミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の阻害剤の効果を調べ、この酵素の関与について検討した。

申請者は、ヒト血液からFicoll-Paque法を用いて単球を単離した。ミオシン軽鎖キナーゼのコードに対応する相補的アンチセンスオリゴマーを合成し、これを用いてミオシン軽鎖キナーゼの発現量の低下した単球を作製した。細胞内Ca²⁺反応を蛍光指示薬であるfura-2を用いて画像解析的に測定した。また、ミオシン軽鎖のリン酸化の程度を電気泳動法とウェスタンブロット法にデンシトメトリーを組み合わせで定量化した。対照細胞とアンチセンス処理細胞とにおけるCa²⁺反応とリン酸化量とを、小胞体のCa²⁺ポンプ阻害薬とミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬などの有無の下で調べた。

細胞外に生理的なレベルのCa²⁺があるときには、小胞体Ca²⁺ポンプ阻害薬であるthapsigargin (TG) と cyclopiazonic acid (CPA) は大きな細胞内Ca²⁺反応を引き起こした。細胞外Ca²⁺が無いと、同反応は非常に

小さく現れたが、この反応を見た後に細胞外に Ca^{2+} を戻すと、それによって非常に大きな反応が誘発された。ミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬であるML-9、worthmanninの存在下では、この大きな Ca^{2+} 反応が抑制された。また、アンチセンス導入細胞ではTGとCPA投与による Ca^{2+} 流入は完全に抑制された。チロシンキナーゼ阻害薬のgenisteinやherbimycin A、Cキナーゼ阻害薬であるbisindolylmaleimide Iやstaurosporineによっては大きな抑制効果は得られなかった。TG投与によって細胞内のミオシン軽鎖は高度に(77%)リン酸化され、この反応はML-9とworthmanninによって完全に抑制された。

以上の観察から、単球マクロファージ系の細胞においても、細胞内 Ca^{2+} ストアー内の Ca^{2+} 量の低下によって活性化される容量性 Ca^{2+} 流入の経路があることが証明された。さらに、その経路がミオシン軽鎖キナーゼの活性化によって制御されていることが明らかになった。これによって、動脈硬化巣の形成などにミオシン軽鎖キナーゼが実際に関与している可能性が高まった。

審査委員会は明解な薬理学的手法により炎症、動脈硬化に関係する単球ないしマクロファージの細胞内 Ca^{2+} 濃度の制御に、新しい概念の Ca^{2+} チャネルが深く関与していることを示し、そのチャネル制御機構の上流に特定のリン酸化酵素があることを明らかにした点を高く評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 単球とマクロファージとをどのように定義し区別したか
- 2) 使用した培養細胞は単球とマクロファージのどちらにより近いのか
- 3) トランスフェクションの手法はどのようなものを使ったのか
- 4) 電気泳動パターンのにじみはどのようなときに起こるのか
- 5) *Chlamydia pneumoniae* の抗体タイターは測ったか
- 6) 単球を活性化するケモカインの効果は調べたか
- 7) ブラジキニンのような IP_3 系に働くアゴニストの効果は調べたか
- 8) Ca^{2+} 反応の大きさを Ca^{2+} 濃度の絶対値で校正したか
- 9) 細胞外に Ca^{2+} が無いとなぜthapsigargin誘起の Ca^{2+} 反応は極端に小さくなるのか
- 10) チャネルのリン酸化の有無は調べたか
- 11) MLCKは容量性 Ca^{2+} チャネルを直接リン酸化するのかMLCを介して働くのか
- 12) 細胞内ストアーからの Ca^{2+} 消失はどのようにMLCKの活性化に繋がるのか
- 13) チロシンキナーゼ阻害薬が Ca^{2+} 反応を一部抑制する効果を持つことの説明
- 14) 容量性 Ca^{2+} チャネルはどのような実態を持つものか

これらの質問に対し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	寺川進	
	副査	福田敦夫	副査 千田金吾