



Akt and Ca²⁺ signaling in endothelial cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 尾関, 真理子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/259

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 439号	学位授与年月日	平成17年 3月15日
氏名	尾関 真理子		
論文題目	Akt and Ca ²⁺ signaling in endothelial cells (血管内皮細胞における Akt とカルシウムシグナリング)		

博士(医学) 尾 関 真理子

論文題目

Akt and Ca²⁺ signaling in endothelial cells

(血管内皮細胞におけるAktとカルシウムシグナリング)

論文の内容の要旨

[はじめに]

タンパク質リン酸化酵素であるAktは、様々な細胞において成長因子、ホルモンなどの刺激下にフォスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3 kinase)依存性に活性化され、おもにアポトーシス調節を行うことが知られている。このAktは、血管内皮細胞においても一酸化窒素(NO)産生や血管新生の調節など重要な機能を担っている。またこれらの血管内皮機能が内皮細胞カルシウム応答の変化にも依存しているということが知られているが、Aktがカルシウム(Ca²⁺)応答を介し内皮機能調節に関与するかは明らかではない。そこで、本研究では血管内皮細胞のCa²⁺応答に及ぼすAktの役割について検討した。

[材料ならびに方法]

対象は培養ブタ大動脈血管内皮細胞とし、内皮細胞におけるアゴニスト刺激時の細胞内Ca²⁺濃度変化はCa²⁺蛍光指示薬であるfura-2/AMを用いて画像解析した。これによって得られた蛍光強度比(F340/F380)は相対的な細胞内Ca²⁺濃度を示している。Ca²⁺応答のアゴニストとしてbradykinin(BK; 10nM)、thapsigargin(TG; 1μM)を用いた。AktをPI3 kinase/Akt阻害剤であるLY294002とwortmanninの投与、もしくはAktドミナントネガティブ変異体(dnAkt)発現によって抑制し、アゴニスト刺激時のカルシウム応答の変化を観察した。Aktと内皮由来NO合成酵素(eNOS)のタンパク発現、リン酸化状態の変化はウエスタンブロット法により確認した。

[結果]

- (1) アゴニスト非刺激時の血管内皮細胞で、活性型Akt(リン酸化Akt)が発現し、またAktの基質のひとつであるeNOSのリン酸化も確認された。このAktとeNOSのリン酸化はPI3 kinase/Akt阻害剤であるLY294002とwortmanninの前投与により抑制された。
- (2) LY294002はアゴニスト刺激時のCa²⁺応答を濃度依存的に抑制した(TG刺激時のpeak F340/F380: 4.66 ± 0.15(平均±SD); LY294002 1μM投与時: 3.65 ± 0.14; LY294002 5μM投与時: 3.27 ± 0.15、LY294002 10μM投与時: 1.93 ± 0.14、LY294002 50μM投与時: 1.13 ± 0.04)。BK、TGによって生じる細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺動員と、細胞内Ca²⁺貯蔵部位のCa²⁺含量低下によって刺激される細胞外からのCa²⁺流入、即ち容量性Ca²⁺流入から構成されるが、LY294002(50μM)は容量性Ca²⁺流入を選択的に抑制した(TG刺激時のpeak F340/F380; コントロール群 3.97 ± 1.35 vs LY294002群 0.78 ± 0.16, p < 0.01, n = 28、BK刺激時のpeak F340/F380; コントロール群 4.33 ± 1.40 vs LY294002群 0.65 ± 0.10, p < 0.01, n = 28)。
- (3) wortmannin(100nM)はアゴニスト刺激時のCa²⁺応答に影響を与えなかった(TG刺激時のpeak F340/F380; コントロール群 5.18 ± 1.43 vs wortmannin群 4.89 ± 0.64, n = 28、BK刺激時のpeak F340/F380; コ

ントロール群 4.40 ± 0.14 vs wortmannin群 4.47 ± 0.12 , $n=28$)。

- (4) dnAkt発現内皮細胞において、アゴニスト刺激時の Ca^{2+} 応答はコントロールベクター (*s-galactosidase*) 導入細胞と同等であった (TG刺激時のpeak F340/F380; コントロール群 4.39 ± 0.16 vs dnAkt群 4.25 ± 0.11 , $n=25$, BK刺激時のpeak F340/F380; コントロール群 4.50 ± 0.13 vs dnAkt群 4.64 ± 0.14 , $n=25$)。

[考察]

血管内皮細胞においては、アゴニスト非刺激時にAktは活性型を呈し、さらにその下流メディエーターであるeNOSがリン酸化されていることから、Aktは非刺激時に既に活性化しており、またこの活性化はPI3 kinase依存性であると考えられた。

二つの異なるPI3 kinase阻害剤はともにAkt活性化を抑制するにもかかわらず、LY294002はアゴニスト刺激時の Ca^{2+} 応答を抑制し、一方でwortmanninは抑制しないという矛盾した結果が得られた。しかし、dnAktの発現は Ca^{2+} 応答に影響を与えず、Akt活性は内皮細胞におけるアゴニスト刺激時の Ca^{2+} 応答に関与しないことが示唆された。また、LY294002の Ca^{2+} 応答抑制機序については現時点では明らかでないが、容量性 Ca^{2+} 流入調節因子としてチロシンキナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼなどリン酸化酵素の関与が報告されており、LY294002がPI3 kinase/Aktシグナル経路には非依存的に、これら Ca^{2+} 応答調節因子に影響を及ぼす可能性も否定できない。

[結論]

Aktは、血管内皮細胞においてアゴニスト刺激時の Ca^{2+} 応答に関与しないことが示唆された。またLY294002は内皮細胞においてPI3 kinase/Aktシグナル経路非依存的に容量性 Ca^{2+} 流入を抑制すると考えられた。

Aktは、血管内皮細胞においてアゴニスト刺激時の Ca^{2+} 応答に関与しないことが示唆された。またLY294002は内皮細胞においてPI3 kinase/Aktシグナル経路非依存的に容量性 Ca^{2+} 流入を抑制すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞は血管拡張、血栓抑制、血管透過性調節、血管新生など様々な機能をもつが、なかでも血管拡張は主要な作用である。血管拡張機序として血管内皮の細胞内のカルシウム濃度(Ca^{2+})が上昇しNOを産生しこれが血管平滑筋に作用し血管を拡張することが明らかになっている。血管内皮細胞では蛋白リン酸化酵素のひとつのAktはフォスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3 kinase)依存性に活性化され、その結果一酸化窒素(NO)を産生する。しかし細胞内 Ca^{2+} の上昇とAktの活性化がどのように関連しているかについての直接的な研究はいままで存在しなかった。申請者らはAktが Ca^{2+} 応答を介し内皮機能調節に関与するかについて検討した。

ブタ大動脈血管内皮細胞を培養し、内皮細胞におけるアゴニスト刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。アゴニストはbradykinin, thapsigarginを用い、細胞内 Ca^{2+} はfura-2/AMを用いて解析した。Aktを抑制するためにインヒビターとしてLY294002とwortmanninを用いた。またAkt活性をもたないAktドミナントネガティブ変異体(dnAkt)も作成し、bradykinin, thapsigargin刺激による細胞内 Ca^{2+} の変化を測定した。上記Akt活性を変化させた時のAktおよび内皮型NO合成酵素(eNOS)のタンパク発現、リン酸化についてはウエ

スタンプロット法により確認した。

申請者らは以下のような結果を得た。

- (1) 恒常状態の血管内皮細胞では活性型Akt(リン酸化Akt)とeNOSのリン酸化が観察されたが、Akt阻害剤であるLY294002とwortmanninの前投与により抑制された。
- (2) LY294002はアゴニスト刺激時のCa²⁺応答を濃度依存的に抑制した。
- (3) wortmanninはアゴニスト刺激時のCa²⁺応答に影響を与えなかった。
- (4) dnAkt発現内皮細胞ではアゴニスト刺激時、Ca²⁺応答が見られなかった。

以上の結果から注目すべき点として3つが挙げられる。第1に血管内皮細胞においては恒常的にAktが発現しており、この発現はPI3 kinase依存性であること、第2にAkt阻害剤wortmanninやdnAktはCa²⁺応答を抑制しないことよりAktの活性化が必ずしも細胞内Ca²⁺濃度の上昇につながらないことを示した点、第3にLY294002はAktを介さない系でCa²⁺応答を調節していることが示唆された点である。現在Aktを調節する薬剤が開発されているが、申請者らの知見はAktを抑制する物質が必ずしも同じ生理活性もたないことを示唆した点で重要な発見といえる。

審査委員会は本論文について次のような試問を行った。

- 1) 豚大動脈の血管内皮を使用した根拠について
- 2) アゴニストとしてbradykinin、thapsigarginを用いた理由
- 3) bradykininの活性化機構について
- 4) インヒビターLY294002、wortmanninのAktへの選択性について
- 5) LY294002がAktを介さずにCa²⁺応答を抑制する機序について
- 6) LY294002とミオシン軽鎖リン酸化酵素との関連について
- 7) エンドセリン、カテコラミン産生時のAkt、eNOSの変化について
- 8) Shear stressとAktの活性化の関連について
- 9) 静脈系血管内皮におけるAktおよびCa²⁺応答について
- 10) 大動脈と小動脈の血管内皮におけるAktおよびCa²⁺応答の違いについて
- 11) 血管内皮のvoltage dependent calcium channelについて
- 12) 本実験結果と実際の生体内での変化との差異について

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、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 金山 尚 裕
副査 数井 暉 久 副査 近藤 一 直