

Calcium release from endoplasmic reticulum
involves calmodulin-mediated NADPH
oxidase-derived reactive oxygen species
production in endothelial cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2020-04-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 櫻田, 隆悟 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003708

博士 (医学) 櫻田 隆悟

論文題目

Calcium release from endoplasmic reticulum involves calmodulin-mediated NADPH oxidase-derived reactive oxygen species production in endothelial cells

(血管内皮細胞において小胞体からのカルシウム放出は、カルモジュリンを介した NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素種の生成に参与する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血管内皮細胞における活性酸素種 (ROS) の生成源である NADPH オキシダーゼ (NOX) の活性化には、細胞内 Ca^{2+} と、カルモジュリン (CaM) 及びカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) の関与が報告されている。血管内皮細胞における Ca^{2+} 応答は、ストア調節性カルシウムイオン流入 (SOCE) により調節されている。SOCE は小胞体における Ca^{2+} 放出と引き続き生じるストア作動性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入の 2 つのコンポーネントにより構成されるが、いずれのコンポーネントが Ca^{2+} /CaM による NOX の活性化に寄与するかは明らかではない。そこで我々は血管内皮細胞における細胞 Ca^{2+} の調整機構と NOX 由来の ROS の生成メカニズムを明らかにすることとした。

[材料ならびに方法]

実験対象として初代培養ブタ下行大動脈血管内皮細胞を用い、ブラジキニン (BK: $1 \mu\text{M}$) 刺激による細胞内 Ca^{2+} 動態と ROS 産生の関連について検討した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は、Fura-2 AM 蛍光試薬を用いて、励起波長 340 nm および 380 nm にて惹起された蛍光波長 510 nm を測定し、強度比 (F_{340}/F_{380}) を求めた。細胞内 ROS の濃度変化は、C-DCDHF-DA を用いて、励起波長 490 nm にて惹起された蛍光波長 510 nm を測定した。ROS 産生に参与する NOX のホモログのリン酸化の同定には Phostag を用い検討した。

[結果]

- (1) 細胞外 Ca^{2+} 濃度 1 mM の条件下で、BK は Fura-2 の蛍光強度 (F_{340}/F_{380}) を前値の 0.87 ± 0.01 から投与後 90 秒で 3.89 ± 0.07 に増加させ、投与後 360 秒まで遷延した。細胞外 Ca^{2+} 濃度 0 mM の条件下では BK は Fura-2 AM の蛍光強度 (F_{340}/F_{380}) は 90 秒後に一過性の小さな上昇を認めるのみであった (0.59 ± 0.004 から 1.21 ± 0.06)。また、この上昇は Ca^{2+} キレート剤 BAPTA/AM ($100 \mu\text{M}$) の前投与により消失した。
- (2) BK による C-DCDHF-DA の蛍光強度 (F/F_0) の変化は、180 秒時点で 1.58 ± 0.05 に上昇した ($p < 0.05$)。またこの効果は ROS のスカベンジャーである Trolox ($100 \mu\text{M}$) の前投与により抑制された (BK: $F/F_0 = 1.58 \pm 0.05$; Trolox: $F/F_0 = 1.07 \pm 0.003$, $p < 0.05$)

- (3) BK 投与による C-DCDHF-DA の蛍光強度 (F/F_0) は、NOX 阻害薬である VAS2870 (50 μM) の前投与により抑制された (BK: $F/F_0=1.45\pm 0.04$; VAS2880: $F/F_0=1.11\pm 0.002$, $p<0.05$)。
- (4) 細胞外 Ca^{2+} 濃度を 0 mM (EGTA: 1 mM) あるいは 1 mM の条件下で BK による ROS 生成反応を比較した時、両群間で差を認めなかった (0 mM Ca^{2+} : $F/F_0=1.79\pm 0.04$; 1 mM Ca^{2+} : $F/F_0=1.77\pm 0.04$, $p=\text{NS}$)。
- (5) 細胞外 Ca^{2+} 濃度 0 mM の条件下において、細胞内 Ca^{2+} を BAPTA/AM (100 μM) でキレートすると、BK による ROS 産生は減弱した (BK: $F/F_0=2.02\pm 0.05$; BAPTA: $F/F_0=1.05\pm 0.002$, $p<0.05$)。また Ca^{2+} -ATPase inhibitor である Thapsigargin (1 μM) により小胞体カルシウム含有量減少させると、BK による ROS 産生は減弱した (BK: $F/F_0=1.79\pm 0.04$; Thapsigargin: $F/F_0=1.09\pm 0.01$, $p<0.05$)。
- (6) BK による ROS の産生は、CaM 阻害薬である W-7 (100 μM) の前投与によって抑制されたが (BK: $F/F_0=1.58\pm 0.03$; W-7: $F/F_0=1.10\pm 0.01$, $p<0.05$)、CaMKII 阻害薬である KN-93 の前投与による抑制は認めなかった (BK: $F/F_0=1.55\pm 0.03$; KN-93: $F/F_0=1.55\pm 0.03$, $p=\text{NS}$)。
- (7) BK は NOX2、NOX4、NOX5 のリン酸化を生じさせなかった。

[考察]

ROS 生成源は、一酸化窒素生成酵素や、キサンチンオキシダーゼ、ミトコンドリア呼吸鎖、NOX などの関与が知られているが、結果 (2) より BK 投与による ROS 生成には NOX が関与することが明らかとなった。血管内皮細胞における Ca^{2+} の調整には、SOCE が重要な役割を果たしていることが報告されているが、結果 (1) から (5) より、BK 投与による ROS 生成は、小胞体からの Ca^{2+} 放出により調整されていることが明らかとなった。NOX の活性化には Ca^{2+} /CaM、CaMKII の関与が報告されているが、結果 (6)、(7) より BK 投与による ROS 生成には、リン酸化酵素である CaMKII は関与せず、 Ca^{2+} /CaM によって直接調整されていることが明らかとなった。

[結論]

ブタ下行大動脈血管内皮細胞において BK 投与による ROS 生成は、SOCE による Ca^{2+} 流入ではなく、小胞体からのカルシウム放出によって調整される。NOX は小胞体から放出された Ca^{2+} によって活性化した Ca^{2+} /CaM により直接的に調整されることが示された。