HamaMed-Repository

浜松医科大学学術機関リポジトリ

浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

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関与する）

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 μM）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（F340/380）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 産生に関与する 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（F340/F380）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（F340/F380）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 μM）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 mM）の前投与により抑制された（BK: $F/F_0=1.58\pm0.05$; Trolox: $F/F_0=1.07\pm0.003$, $p<0.05$）

（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±0.04; VAS2880: F/F_0=1.11±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±0.04; 1 mM Ca^{2+}: F/F_0=1.77±0.04, p=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±0.05; BAPTA: F/F_0=1.05±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±0.04; Thapsigargin: F/F_0=1.09±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±0.03; W-7: F/F_0=1.10±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±0.03; KN-93: F/F_0=1.55±0.03, p=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と報告されているが、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。