

平成22年6月6日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790205
 研究課題名(和文) 血管新生過程におけるカルシウム動態の時空間パターンの意義の解明
 研究課題名(英文) Mechanism of spatiotemporal pattern of calcium mobilization in vascular endothelial cells
 研究代表者
 並木繁行(NAMIKI SHIGEYUKI)
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：90452193

研究成果の概要(和文)：

血管新生プロセスでは血管内皮細胞内のカルシウム動態が重要な意義を有していると考えられているが、血管内皮細胞へのカルシウム動員機構については不明な点が多い。本研究では、免疫細胞等でストア作動性カルシウム流入(SCOCE)に重要であると提唱されている Stim1 と Orail が、血管内皮細胞においても SCOC の制御に重要であることを明らかにした。また、VEGF 刺激時に血管内皮細胞からの von willebrand factor の放出が SOCE 活性依存的に制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We showed that Stim1 and Orail contribute to store operated calcium entry (SOC) activity in vascular endothelial cells. We also found that von willebrand factor release from vascular endothelial cells is regulated by continuous calcium influx by SOC mechanism after VEGF stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：血管内皮細胞、カルシウム、ストア作動性カルシウム流入、von willebrand factor (vWF)、血管新生

1. 研究開始当初の背景

血管新生は正常な生体で生理的に、あるいは特定の疾患の際に見られるプロセスであり、既に存在している血管からの新しいキャピラリーの発達として定義される。血管内には血管内皮増殖因子 (VEGF) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 等の可溶性の栄養が循環しており、それぞれからさまざまな要因によって生じるシグナルが血管新生のプロセスの誘因となることが知られている。

生体内の白血球や神経細胞などいくつかの細胞では細胞の遊走には細胞内のカルシウム上昇が必要とされている。特に神経細胞のように極性や方向性を持った遊走を行う際には細胞内のカルシウムの空間的な分布がその運命を決定するのに重要な役割を担っていることが明らかになっている。内皮細胞が遊走しチューブを形成する際にも方向性を持った遊走が必要であるので、VEGF 等の栄養因子によって惹起される血管新生の一連のプロセスにも細胞内外から動員されるカルシウムシグナリングが重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、この過程での血管内皮細胞内でのカルシウム動員機構、特に細胞外からのカルシウム流入機構については、分子的基盤を含め、不明な点が多い。

2. 研究の目的

血管新生のプロセスで重要な役割を担うと考えられる血管内皮細胞内のカルシウム動態の時空間パターンを作り出す分子機構を明らかにする。血管内皮細胞のカルシウム動態を制御するのに寄与していると考えられる分子群について詳細に検証する。特に細胞外からのカルシウム流入機構を司る Stim1 と Orai1 に着目して解析を行う。また、血管新生の際にシグナル分子として機能すると考えられる VEGF が血管内皮細胞に生じさせる機能変化について検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 血管内皮細胞での細胞外からのカルシウム流入の分子基盤の解明

血管内皮細胞での細胞外からのカルシウ

ム流入の重要な様式であるストア作動性カルシウム流入 (SOC) 機構における分子基盤の解明を行った。免疫細胞等で SOC 機構への関与が示されている Stim 1 と Orai 1 について、血管内皮細胞での SOC 機構への寄与を検証した。臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の Stim 1 遺伝子と Orai 1 遺伝子の発現を shRNA によって抑制を行った。遺伝子発現の抑制効果はリアルタイム PCR によって評価した。Stim 1 遺伝子と Orai 1 遺伝子の発現をノックダウンさせた HUVEC の SOC 活性はカルシウムイメージングによって評価した。

2) VEGF によって惹起される SOC の活性評価

HUVEC で VEGF 刺激によって惹起されるカルシウム動態変化をカルシウムイメージングによって解析した。コントロール条件、Stim1、Orai1 いずれかのノックダウン条件でタブシガルジン処理によってカルシウムストア内のカルシウムを枯渇させた後に、calcium add-back プロトコールによって SOC 活性を評価した。

3) 血管内皮細胞からの VEGF 依存的な von willebrand factor (vWF) 放出における容量性カルシウム流入機構の寄与

VEGF 刺激時に HUVEC から放出される vWF 量を ELISA 法にて測定した。Stim 1 遺伝子もしくは Orai 1 遺伝子を shRNA で抑制した HUVEC で vWF 量を定量し、コントロール条件での vWF 放出量と比較した。

4. 研究成果

1) 血管内皮細胞での細胞外からのカルシウム流入の分子基盤の解明

shRNA をレンチウイルスを用いて HUVEC 導入し、Stim1 遺伝子と Orai1 遺伝子の発現の抑制を試みた。これらの細胞での遺伝子抑制効果をリアルタイム PCR で定量したところ、Stim1 遺伝子については、78%、Orai1 については 97% と非常に高い遺伝子抑制効果が確認された。これらの細胞について、SOC 活性の評価を行った。タブシガルジン処理によって細胞内カルシウムストアを枯渇させて、その際に惹起される SOC の活性を評価した。Stim1、Orai1 をいずれの遺伝子をノックダウンした HUVEC では、顕著な SOC 活性の低下が確認された (図 1)。

以上結果より、血管内皮細胞での SOC 活性の発現には Stim1 と Orai1 のいずれも必須であることが明らかになった。

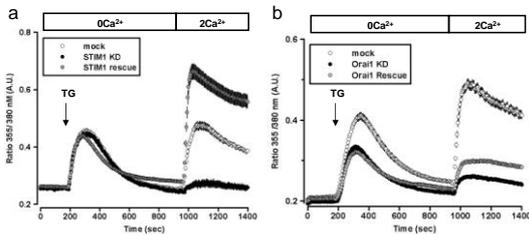


図1. HUVECでの Stim1, Orai1の細胞外からのストア作動性カルシウム流入への寄与の評価
a. Stim1をノックダウンした HUVECでの SOC 活性の評価。 b. Orai1をノックダウンした HUVECでの SOC 活性の評価。

2) VEGF によって惹起される SOC の活性評価

HUVECで VEGFによって惹起されるカルシウム動態変化を解析した。コントロール条件では、持続したカルシウム上昇が見られたのに対し、Stim1, Orai1いずれのノックダウン細胞では一過性のカルシウム上昇が見られた。この結果は、VEGF2 依存的な持続したカルシウム上昇は Stim1, Orai1 を介したものであることを示している。また、VEGF 刺激後には、細胞内のカルシウムストアが枯渇し、SOC が誘導されることが Ca^{2+} add-back プロトコルとカルシウムイメージングによって明らかになった (図2)。

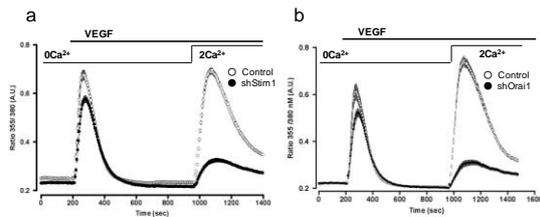


図2. Ca^{2+} add-back プロトコルによる VEGF 刺激依存的な SOC 活性の評価
a. Stim1をノックダウンした HUVECでの結果。 b. Orai1をノックダウンした HUVECでの結果。

3) 血管内皮細胞からの VEGF 依存的な von willebrand factor (vWF) 放出における容量性カルシウム流入機構の寄与

血管新生に重要なシグナル分子である VEGF によって惹起される vWF 放出が Stim1, Orai1 を介した SOC 機構によるものなのかど

うかをそれぞれの遺伝子をノックダウンした HUVEC を用いて評価を行った。ELISA 法を用いて、VEGF 刺激後に培地中に HUVEC から放出された vWF 量を定量した結果、stim1 をノックダウンした場合は、13%にまで SOC 活性が低下した。また、Orai1 をノックダウンした場合でも16%にまで SOC 活性が低下した(図2)。これらの結果は、Stim1, Orai1 を介した SOC 機構によって惹起される持続的なカルシウム濃度上昇が VEGF 依存的な vWF 放出に寄与していることを示すものである。

以上の結果をまとめた論文を投稿準備中である。

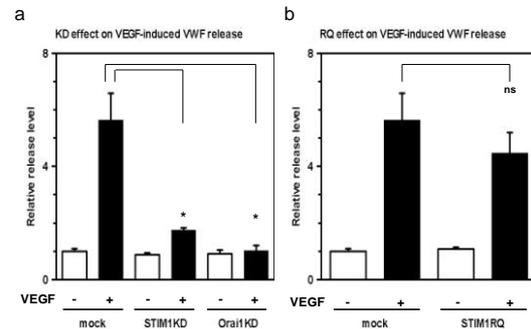


図3. Stim1, Orai1 の VEGF 依存的な vWF 放出活性への寄与の評価。
a. Stim1をノックダウンした HUVECでの VEGF 依存的な vWF 放出活性の評価。 b. Orai1をノックダウンした HUVECでの VEGF 依存的な vWF 放出活性の評価。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ①Isa M, Ohta Y, Namiki S, Hirose K. Artificial control of subtype-specific platelet-derived growth factor receptor signaling. *Journal of Pharmacological Sciences*, 111, 312-316 (2009) (査読有)
- ②Matsuo R, Kobayashi S, Watanabe S, Namiki S, Inuma S, Sakamoto H, Hirose K, Ito E. Glutamatergic neurotransmission in the procerobrum (Olfactory center) of a terrestrial mollusk. *Journal of Neuroscience Research*, 87, 3011-3023 (2009) (査読有)

[その他]
ホームページ等
<http://www.neurobiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

並木 繁行 (NAMIKI SHIGEYUKI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90452193

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし