

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860547

研究課題名(和文)動脈硬化進展における血管内皮カルシウムセンサーSTIM1の役割の解明

研究課題名(英文)The role of STIM1 in vascular endothelial cells in the progression of atherosclerosis

研究代表者

西本 光宏(Nishimoto, Mitsuhiro)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：90646572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内のカルシウムストアセンサーであるSTIM1の血管内皮細胞における血管内皮機能制御ならびに動脈硬化進展への影響を検討した。血管内皮特異的STIM1欠損マウス(KO)を作成し、解析を行った。KOマウス由来の血管内皮細胞においてストア依存性カルシウム流入は顕著に抑制され、内皮型NO合成酵素の活性化およびNO産生が抑制された。大動脈を用いた拡張機能実験ではKO由来の大動脈では内皮依存性血管拡張機能が抑制され、KOマウスは活動期優位の血圧上昇を呈した。一方KO由来内皮細胞ではTNFによる酸化LDL受容体発現誘導が抑制されていた。

研究成果の概要(英文)：We explored the function of STIM1, the sensor of the store of the intracellular calcium in the vascular endothelial cells (EC) and the role for the progression of atherosclerosis. We generated EC-specific STIM1 knockout mice (KO). In the endothelial cells from KO, store-operated calcium entry, the activity of endothelial nitric oxide synthase, and nitric oxide production were significantly suppressed. Endothelial function examined by aortic ring was also significantly suppressed by EC-specific STIM1 depletion. Moreover, KO mice exhibited the active time-dominant increase in blood pressure. In addition, we explored the induction of oxidized LDL receptors by TNF as a marker of pro-atherosclerotic reaction. Contrary to expectations, the reaction was suppressed in ECs from KO.

研究分野：高血圧

キーワード：血管内皮 カルシウム 高血圧 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管内皮機能制御と動脈硬化進展

血管内皮はさまざまな生理活性物質を物理的・化学的刺激に応じて分泌することで血管全体の環境を制御する重要な内分泌臓器として働いている。これらの作用は総体として血管内皮機能とよばれており、血管内皮機能障害は動脈硬化進展における最初のステップとされる。臨床的にも高血圧、糖尿病、脂質異常症のごく病初期から障害が観察され、しかも将来の高血圧や冠動脈イベント発症との相関が知られている。内皮障害を修復することで動脈硬化の進展抑制が可能と考えられるが、その機序は十分に分かっているわけではない。

正常血管内皮機能維持は特に一酸化窒素 (NO) に大きく依存しており、機能障害時には NO 産生能の低下がおきることが知られている。血管内皮細胞における NO 産生は主に内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) に依存しているが、eNOS の活性化の重要な制御因子として細胞内カルシウム濃度上昇による eNOS のリン酸化が知られている。

(2) ストア依存性カルシウム流入と STIM1

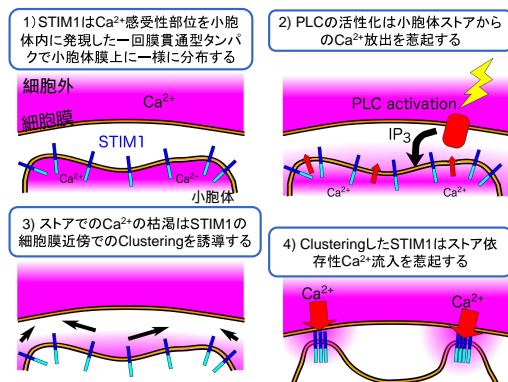
一般に G タンパク共役型受容体のリガンドとなる物質は細胞内カルシウム濃度増加

を惹起する。この際、リガンド刺激はまず小胞体をはじめとする細胞内のカルシウムストアからのカルシウム放出を起こすが、この刺激が引き金となって細胞外からのカルシウム流入が起きることが知られており、ストア依存性カルシウム流入 (store-operated calcium entry, SOCE) と呼ばれている。このシグナルの伝達経路は長年不明であったが、2005 年に STromal Internal Molecule1 (STIM1) がこのシグナルに必須のタンパクとして同定された。その後の検討で STIM1 は種々の細胞の小胞体膜上に主に分布し、小胞体内のカルシウム濃度のセンサーとして働いていることがわかってきた (図 1A, B)。(3)

血管内皮細胞における STIM1

細胞内へのカルシウム流入は他にもリガンド依存性カルシウムチャネルや、電位依存性カルシウムチャネルを介して起こりうる。しかし、リガンド依存性カルシウムチャネルの開始に SOCE が必要である可能性が高く、また電位依存性カルシウムチャネルは血管内皮においてはほとんど発現がないと考えられている。さらに SOCE は eNOS が存在する膜直下で局所的に大きなカルシウム濃度上昇を惹起するため、eNOS を活性化させるシグナルとして SOCE の役割は非常に大きいと考えられている (図 2)。したがって STIM1 の障害は血管内皮機能を傷害し、血管拡張能を阻害すると考えられる。

A



B

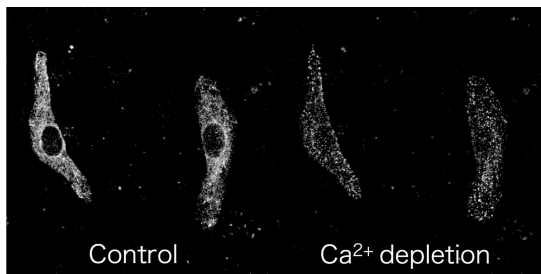


図 1. ストア依存性カルシウム流入における STIM1 の分布と機能

A. STIM1 はストア依存性カルシウム流入においてストア内のカルシウム枯渇を感知し、細胞膜上のカルシウムチャネルへシグナルを伝達する。

B. ストア枯渇刺激に対する STIM1 の分布変化: ウシ血管内皮細胞に YFP 融合 STIM1 を発現させて Thapsigargin で刺激前 (左) 刺激 5 分後 (右) で観察した。

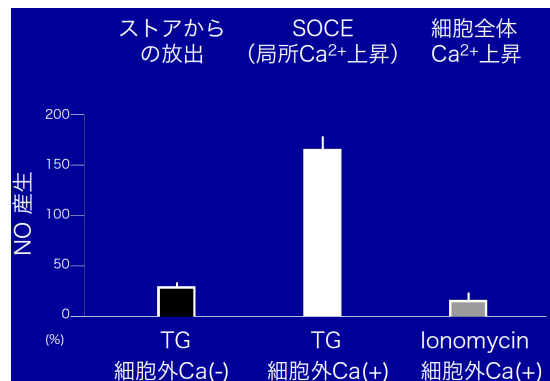


図 2. カルシウム刺激による NO 産生能 (文献 1 より)

ストアからのカルシウム放出、細胞全体でのカルシウム濃度上昇に対してストア依存性カルシウム流入は eNOS 近傍で局所的に大きな濃度上昇を惹起するため NO 産生への寄与が大きい

(4) 血管傷害性刺激における血管内皮 STIM1 の役割

高血圧自然発症ラットでは主に平滑筋と思われる大動脈での発現増加が報告され、また内膜剝離に対する修復において平滑筋での STIM1 発現が必要であることが報告されており、血管平滑筋における STIM1 の機能は明らかにされつつある。一方、動脈硬化において上述のとおり血管内皮細胞が非常に重要であるにも関わらず、血管内皮 STIM1 の役割は明らかにされていない。血管内皮機能の傷害

は動脈硬化進展性変化の開始と考えられ、血管内皮 STIM1 は NO 産生を介して傷害刺激に対して保護的に作用すると考えられた。しかし、我々の予備検討ではむしろ STIM1 の欠損によって傷害に対して保護的な反応が認められた。過剰な NO はラジカルとの結合による ONOO⁻ 産生によって炎症を惹起することが知られており、STIM1 がこのスイッチのような働きをしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

内皮機能障害は動脈硬化進展の最初期のステップであり、その機序を明らかにすることは新たな治療標的の探索に有効である。本研究では STIM1 の血管内皮機能に対する影響を生理的条件、および傷害刺激に対する反応を生体レベルを含めて検討する。細胞レベルに留まらない生体レベルでの動脈硬化への寄与の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮特異的 STIM1 欠損マウス作出

図 3 のように STIM1 遺伝子の exon6 を loxP 配列で挟んだ Flox マウス(Flox)を作出し、血管内皮特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Tie2-Cre マウスと交配して血管内皮特異的 STIM1 欠損マウス(ECKO)を作出した(図 3)。

(2) 単離大動脈血管内皮細胞のストア依存性カルシウム流入および NO 産生

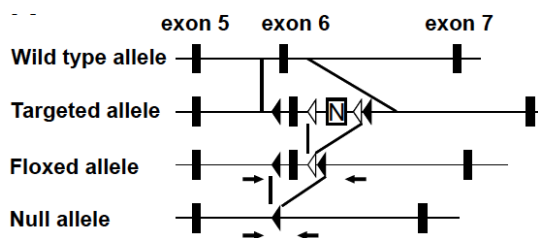
Flox, ECKO の大動脈から血管内皮細胞を単離し、STIM1 の発現、ストア依存性カルシウム流入および NO 産生能を蛍光指示物質を用いて評価した。

(3) 大動脈血管内皮機能の評価

Flox, ECKO から大動脈を取り出してリング標本を作成した。アイソメトリック測定装置にセットして KCl、フェニレフリン(Phe)による収縮反応、アセチルコリン(ACh)による内皮依存性血管弛緩反応、NO 供与体であるニトロプルシドナトリウム(SNP)による内皮非依存性血管弛緩反応を評価した。

(4) 血圧の評価

テイルカフ法および radio-telemetry 法によって血圧を評価した。さらに血管機能傷害を



■: exon ◀: loxP ◀: FRT □: Neo

図 3. STIM1 Flox マウスの作出

C57/BL6 マウス ES 胚を用いて図の通りノックインマウスを作出し、更に Flp 発現マウスと交配して Neo 配列を除去し、Flox allele をもつ Flox マウスを作出した。矢印: ジェノタイピングのためのプライマーの位置

惹起する可能性のある刺激として高食塩食負荷を行った。

(5) 内皮細胞に対する傷害刺激

培養の容易なウシ培養内皮細胞に対して RNA 干渉法によって STIM1 の発現抑制を行った細胞を用いて解析した。TNF 処置を行い、炎症マーカーとして酸化 LDL 受容体 LOX-1 発現を評価した。さらに上流の評価のため NF- κ B の活性化をルシフェラーゼアッセイおよびゲルシフトアッセイによって行った。

4. 研究成果

(1) ECKO マウスの血管では血管平滑筋での STIM1 の発現は保たれる一方で内皮細胞での STIM1 のシグナルは完全に欠損していることが確認できた(図 4)

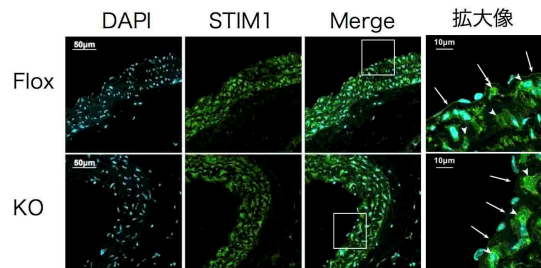


図 4. 内皮特異的 STIM1 欠損マウスでの STIM1 発現

拡大像は Merge 画像の四角部分を表す。平滑筋での STIM1 発現(矢頭)については Flox, ECKO で同等であった。矢印で示す一層のシグナルで認められる内皮細胞での STIM1 は ECKO では完全に消失していた。

(2) 単離培養大動脈内皮細胞ではストア依存性カルシウム流入およびそれに伴う eNOS の活性化、NO 産生が著明に抑制されていた(図 5)。

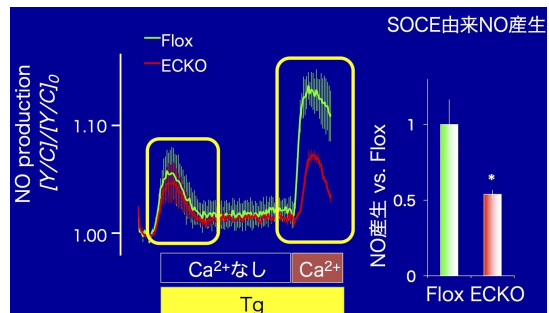


図 5. STIM1 欠損内皮細胞の NO 産生

ストアからのカルシウム放出によっておきる NO 産生を示す最初のピークは Flox と ECKO で同等であるのに対して、SOCE による NO 産生は ECKO で有意に抑制されていた。

(3) ECKO 由来の大動脈リング標本では KCl による脱分極性の収縮、Phe による刺激による収縮はいずれも有意に亢進していた。さらに SNP による内皮非依存性拡張反応は Flox と同等であったのに対して ACh による内皮依存性弛緩反応は有意に抑制されていた。この反応は NO 合成酵素阻害薬である L-NAME によって完全に阻害され、NO 依存性であることが

確かめられた。またプロスタグランジンの合成阻害薬であるインドメタシン処置下では Flox, ECKO ともに弛緩反応の亢進を認めしたが、やはり ECKO で有意に抑制を認めた。

(4) テイルカフ法において有意な血圧上昇を認めたためテレメトリ法によって自由行動下での血圧測定を行ったところ、ECKO では拡張期優位でマウスの活動期である夜間優位な血圧上昇が認められた(図 6)。NO 産生低下によって食塩感受性高血圧の発症が予想されたが、期待に反して食塩負荷によるさらなる血圧上昇は認められなかった。

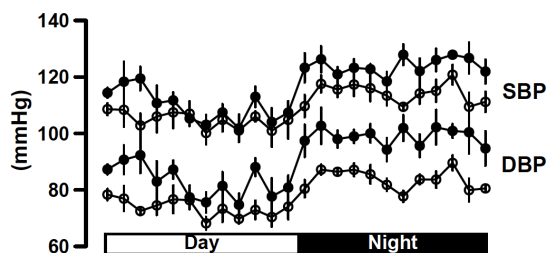


図 6 . 血管内皮特異的 STIM1 欠損マウスの血圧日内変動

ラジオテレメトリ法による自由行動下血圧測定において ECKO は夜間活動期優位の血圧上昇を認めた。 : Flox, : ECKO

(5) ウシ初代培養大動脈血管内皮細胞において STIM1 発現抑制によって TNF による LOX-1 発現誘導は有意に抑制された。NF B ルシフェラーゼアッセイでは STIM1 発現抑制によるシグナル抑制を認めしたが、NF B ゲルシフトアッセイにおいては有意な差を認めず、どのように傷害形成に関わっているかを明らかにすることはできなかった。

本研究によって STIM1 が血管内皮細胞において生理的条件下では血管内皮機能調節に大きく寄与しており、血圧制御にも関わっていることが明らかになった。ストア依存性カルシウム流入は ATP やトロンピン、アンジオテンシン II など血管機能に関わる様々な内分泌物質が、パラクライン、オートクライン的に作用することで開始すると考えられる。これらはより限定された局所のさらに一過性の血管機能調節を行っていると考えられるが、このような細かな調節が総体としての血圧制御にまで関わることを本研究は初めて示した。さらにそのような調節は生体が活発に活動している時に重要であることを示唆する結果であった。一方で動脈硬化進展につながる血管内皮傷害時には STIM1 はむしろ反応を増強する方向に作用する可能性が示唆されたが、その詳細なメカニズムについては不明であり、今後の課題と考える。

<参考文献>

1. Lin S, Fagan KA, Li KX, Shaul PW, Cooper DM, Rodman DM. Sustained endothelial nitric-oxide synthase

activation requires capacitative Ca^{2+} entry. *J Biol Chem* 2000; 275:17979-17985.

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)

〔学会発表〕(計 5 件)

西本光宏、水野理介、丸茂丈史、河原崎和歌子、鮎澤信宏、広浜大五郎、上田浩平、一色政志、藤田敏郎 カルシウムセンサー-STIM1 は内皮機能調節を介して血圧を制御する 第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (YIA 候補講演) 東京コンベンションホール (東京) 2016 年 12 月 16 日

西本光宏 STIM1 は血管内皮細胞において NO 産生を介して血圧調節に関与する 第 65 回 東京大学 Blood Vessel Club (招請講演) 東京大学 (東京) 2016 年 10 月 31 日

西本光宏、水野理介、丸茂丈史、河原崎和歌子、鮎澤信宏、広浜大五郎、上田浩平、一色政志、藤田敏郎 血管内皮機能調節におけるカルシウムセンサー-STIM1 の役割の解析 第 11 回 Vascular Biology Innovation に関する研究助成 研究発表会 ホテル椿山荘東京 (東京) 2016 年 8 月 20 日

西本光宏、水野理介、丸茂丈史、河原崎和歌子、鮎澤信宏、広浜大五郎、上田浩平、一色政志、藤田敏郎 STIM1 は血管内皮細胞において NO 産生を介して血圧調節に関与する 第十回高血圧と冠動脈疾患研究会 (奨励賞) 大手町サンケイプラザ (東京) 2015 年 12 月 19 日

Mitsuhiro Nishimoto, Risuke Mizuno, Masashi Isshiki, Toshiro Fujita. STIM1 regulates blood pressure via NO production in vascular endothelial cells. The 18th International Vascular Biology Meeting, Exceptional Abstract Award みやこメッセ (京都) 2014 年 4 月 8 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西本 光宏 (Mitsuhiro Nishimoto) 東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号 : 90646572