

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790186  
 研究課題名（和文）血管内皮細胞のカルシウムチャネルを活性化する因子の探索とチャネル活性化機序の解明  
 研究課題名（英文）A search for a calcium channel activator of endothelial cells and studies on calcium channels of endothelial cells  
 研究代表者  
 辻野 なつ子 （TSUJINO NATSUKO）  
 金沢大学・医学系・助教  
 研究者番号：40432166

## 研究成果の概要：

血管内皮細胞のカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) チャネル活性化因子の探索と  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活性化機序の検討を行なった。 $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活性化因子としてトロンビンに注目し、トロンビンによる内皮細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路について解析した。トロンビンは内皮細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こすことを明らかにし、 $\text{Ca}^{2+}$  流入の細胞内情報伝達系と  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関わるチャネルを明らかにした。トロンビンによる  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路は炎症時の内皮細胞収縮に重要である可能性が考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

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：循環 生理活性物質

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞内のカルシウム上昇には細胞内のカルシウムストアからカルシウムの遊離と細胞外からのカルシウム流入があるが、内皮細胞の持続的収縮には細胞外からのカルシウム流入が重要であることが知られている。血管内皮細胞における細胞外からのカルシウム流入は、血管張力調節と炎症反応に深く関与していると考えられており、内皮細胞の収縮機序の解明は炎症

の治療にも重要であると考えられる。このため新規の血管収縮因子を探すことは炎症の治療にも大きく貢献できると考えられる。また、内皮細胞への細胞外からのカルシウム流入が血管内皮細胞の収縮、ひいては炎症に重要であることが明らかである一方、血管内皮細胞へのカルシウム流入の詳細な機序は不明であった。そこで、本

研究は、以下を目的とした。

## 2. 研究の目的

(1) 炎症や血管張力の調節に関与する因子に注目し、内皮細胞のカルシウム流入を引き起こす新たな因子の探索を行なう。

(2) 内皮細胞での細胞外からのカルシウム流入経路について詳細な解析を行い、その経路を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞にカルシウム流入を引き起こす生理活性物質の探索

### ①内皮細胞の収縮を指標とした一次スクリーニング

ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) を用いて、HUVECの収縮およびストレスファイバーの形成を指標に、これらを引き起こす生理活性物質をスクリーニングした。細胞内カルシウム上昇に関わるフォスホオリパーゼCを活性化する炎症性メディエータのサイトカイン (腫瘍壊死因子 $\alpha$ )、ケモカイン (インターロイキン8)、アラキドン酸代謝物 (プロスタグランジンE2) や、循環調節にも関与することが示唆されている神経伝達物質で、細胞内カルシウム上昇に関わるGq共役型受容体を持つもの (カルシトニン遺伝子関連ペプチド) などについて検討した。HUVECを2万cells/cm<sup>2</sup>で一週間培養し、血清除去を行った後、生理活性物質を投与した。1時間後、細胞を固定し、ストレスファイバーを蛍光標識したphalloidinで染色し、蛍光顕微鏡で観察することで、細胞収縮とストレスファイバー形成を評価し、それらを引き起こす物質を選択した。

### ②電気生理学的方法を用いた二次スクリーニング

HUVECを用い、ホールセルパッチクランプ法を行い、電位固定下でカルシウム電流を計

測し、カルシウムの流入を測定した。

### (2) カルシウム流入機序の解明

ホールセルパッチクランプ法を用い、トロンビンによるカルシウムイオン流入情報伝達系を明らかにした。情報伝達を担う分子の阻害薬存在下、もしくはRNA干渉法により情報伝達に関わる遺伝子発現を抑制した状態で、カルシウム電流変化を観察し、電流に与える影響を解析した。

カルシウム流入に関与するチャネルの性質を、イオン選択性の解析や、阻害薬等を用いて同定した。また、RT-PCRを用いて、HUVECに発現しており、カルシウム流入に関与すると考えられたチャネルの発現を確認した。

## 4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞にカルシウム流入を引き起こす生理活性物質の探索

HUVEC、ラット大動脈からの急性単離内皮細胞およびイヌ大動脈からの急性単離内皮細胞を用いたスクリーニングでは新たに収縮を引き起こす因子は確認されなかった。そこで、既知の血管収縮因子であるトロンビンが内皮細胞にカルシウム流入を引き起こすかどうか検討した。はじめに、HUVECをFITCファロイジンで染色することで、トロンビンによる細胞の形態変化を観察した。トロンビンは濃度依存的にHUVECのストレスファイバーを増加させ、それに伴いEC<sub>50</sub>0.05 U/mlで収縮を引き起こした。この収縮反応は、細胞内のカルシウムイオンを除去するBAPTA-AM(10  $\mu$ M)の前処置で約半分に抑制された。また、HUVECをモノレイヤーの層になるように培養し、細胞層の抵抗を経時的に測定した。トロンビン投与により、抵抗はトロンビン濃度依存的、時間依存的に減少を示した。以上からトロンビンによりHUVECの細胞間の接着は解離し、細胞収縮が起こっていることを確認した。次に、細胞内のカルシウム上昇に細胞外

カルシウムが関与しているか検討した。パッチクランプ法のホールセルモードを用いたところ、トロンビンは、 $-60$  mV の膜電位固定下で濃度依存的に  $EC_{50}$  0.13 U/ml で内向き電流を引き起こした。得られた電流の逆転電は  $56 \pm 10$  mV であり、この電流はカルシウム電流であると考えられた。

そこで細胞外カルシウム流入機序について検討した。

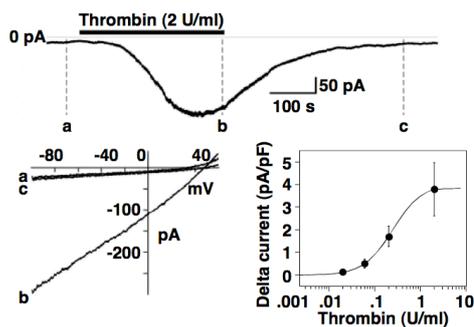


図1 トロンビンによるカルシウム電流  
上図： $-60$  mV の膜電位固定下でのトロンビンによる内向き電流（ホールセルモード）。下図左：トロンビンによる内向き電流の逆転電位は  $56 \pm 10$  mV であった。下図右：内向き電流は濃度依存的に引き起こされた。

### (2) カルシウム流入機序の解明

トロンビンによって引き起こされた電流は細胞外のカルシウムの除去で完全に抑制された。またカルシウム流入はプロテインキナーゼ C の阻害薬 ( $1 \mu$ M Bisindolmaleimide) で約半分に抑えられ、ホスホリパーゼ C の阻害薬 ( $1 \mu$ M U73122) で完全に抑制されたことから、カルシウム流入にはプロテインキナーゼ C、ホスホリパーゼ C が関与することが分かった。

また、カルシウム流入は非選択的陽イオンチャネルの阻害薬である、 $La^{3+}$  や SKF96365 で抑制されたことから、非選択的陽イオンチャネルがカルシウム流入に関与していることが明らかになった。非選択的陽イオンチャネル候補として transient receptor potential (TRP) が

考えられたため、HUVEC に発現している TRP を RT-PCR を用いて検討した。HUVEC に発現している TRP は TRPC1, 4, TRPV1, 2, 4, TRPM4, 7 であった。そこでカルシウム流入に関わるチャネルを薬理的に解析したところ、TRPV, TRPM の関与はないことが分かった。さらに TRPC1 のドミナントネガティブ変異体を HUVEC に発現させたが、カルシウム流入は抑制された。一方、TRPC4 のドミナントネガティブ変異体の発現でカルシウム流入は抑制された。以上よりトロンビンによるカルシウム流入には TRPC4 が関与しており、このカルシウム流入は炎症時の内皮細胞収縮に重要である可能性が考えられた。これらの結果は抗炎症薬の開発に貢献できる可能性がある。



図2 HUVEC に発現していた TRP

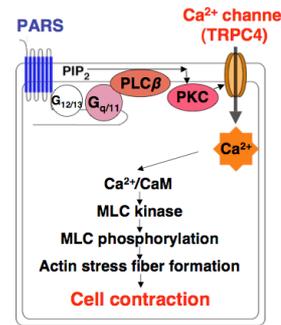


図3 まとめ

トロンビンはホスホリパーゼ C およびプロテインキナーゼ C を介して TRP (TRPC4) を活性化し、細胞外からカルシウムイオンを流入させ、内皮細胞収縮を引き起こしていると考えられた。

### 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)

- (1) Yamada M, Ohta K, Niwa A, Tsujino N, Nakada T, Hirose M. Contribution of L-Type  $Ca^{2+}$  Channels to Early Afterdepolarizations Induced by I (Kr) and I (Ks) Channel

Suppression in Guinea Pig  
Ventricular Myocytes  
**J Membr Biol.** 2008  
Apr;222(3):151-66. 査読有

- (2) Hirose M, Tsujino N, Nakada T,  
Tano S, Imamura H, Yamada M.  
Mechanisms of preventive effect of  
nicorandil on ischemia-induced  
ventricular tachyarrhythmia in  
isolated arterially perfused canine  
ventricular wedges.  
**Basic Clin Pharmacol Toxicol.**  
2008 Jun;102(6):504-14. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 辻野なつ子, 中田勉, 河合佳子, 弘瀬  
雅教, 山田充彦  
トロンピンはヒト血管内皮細胞で非特  
異的カチオン電流を誘発する  
第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月  
17 日 (横浜)
- (2) 辻野なつ子, 坪内清貴、百瀬崇展、弘  
瀬雅教、山田充彦  
トロンピンは非選択的陽イオンチャネ  
ルを介して内皮細胞活動を調節する。  
第 48 回日本脈管学会総会 2007 年 10  
月 (長野)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻野 なつ子 (TSUJINO NATSUKO)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：40432166

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし