



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1443号
学位記番号	第304号
氏名	鬼頭 宏彰
授与年月日	平成26年4月15日
学位論文の題名	脳血管内皮細胞におけるイオンチャネルを介した細胞増殖及び細胞死機構の解明
論文審査担当者	主査： 糸 和彦 副査： 今泉 祐治, 林 秀敏, 田中 正彦

名古屋市立大学学位論文

脳血管内皮細胞におけるイオンチャネルを介した
細胞増殖及び細胞死機構の解明

2014 年

名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野

鬼頭 宏彰

学位論文内容要旨

脳血管内皮細胞におけるイオンチャネルを介した細胞増殖及び細胞死機構の解明

鬼頭 宏彰

血液脳関門の主要な構成成分である脳血管内皮細胞は細胞増殖及び細胞死のバランスを取ることにより血液脳関門の機能維持に寄与する。細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の変動は、細胞増殖や細胞死を含む様々な細胞生理機能の制御に関連すると考えられる。本研究において脳血管内皮細胞 t-BBEC117 に機能発現する Ca^{2+} 遊離活性化 Ca^{2+} (CRAC) チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入が脳血管内皮細胞の細胞増殖を制御する重要な因子であることを明らかとした。CRAC チャネルの分子実体と考えられる Orai1 は細胞周期のいずれのステージにおいても恒常的に機能する一方で、G2/M 期において Orai2 発現が増加し Orai1 に対して抑制的に作用することで細胞内 Ca^{2+} 動態を制御し細胞増殖に寄与することが明らかとなった。また、t-BBEC117 は細胞傷害性のストレスに晒されると内向き整流性 K^+ チャネル (Kir2.1) の発現が増大することが明らかとなった。Kir2.1 発現増加による深い静止膜電位の形成により細胞外から過剰な Ca^{2+} を流入させストレス誘導性細胞死を制御することが示された。本研究により、脳血管内皮細胞における Ca^{2+} 流入は強度依存的に細胞増殖及び細胞死という相反する細胞現象を制御することを明らかとした。また Ca^{2+} 流入制御には K^+ チャネルによる膜電位制御が大きく寄与しており、ストレス環境下において Kir2.1 発現が増加することでストレス傷害を受けた細胞を速やかに取り除き血液脳関門の機能維持に寄与するという新たな恒常性機構を提示した。

名古屋市立大学学位論文

2014年

脳血管内皮細胞におけるイオンチャネルを介した
細胞増殖及び細胞死機構の解明

鬼頭 宏彰

名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野
(指導: 今泉 祐治 教授)

2014

**Regulation of cell proliferation and death via ion channels
in brain capillary endothelial cells**

Hiroaki Kito

**Department of Molecular and Cellular Pharmacology,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University
(Thesis Adviser: Professor Yuji Imaizumi)**

一、本論文は、2014年3月に名古屋市立大学大学院 薬学研究科において審査されたものである。

主査	条 和彦	教授
副査	今泉 祐治	教授
副査	林 秀敏	教授
副査	田中 正彦	准教授

二、本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

基礎となる報文

1. Hiroaki Kito, Daiju Yamazaki, Susumu Ohya, Hisao Yamamura, Kiyofumi Asai, Yuji Imaizumi
Up-regulation of $K_{ir}2.1$ by ER stress facilitates cell death of brain capillary endothelial cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 411(2):293-8, 2011
2. Hiroaki Kito, Hisao Yamamura, Yoshiaki Suzuki, Susumu Ohya, Kiyofumi Asai, Yuji Imaizumi
Membrane hyperpolarization induced by endoplasmic reticulum stress facilitates Ca^{2+} influx to regulate cell cycle progression in brain capillary endothelial cells.
Journal of Pharmacological Sciences, 125(2):227-32, 2014
3. Hiroaki Kito, Hisao Yamamura, Yoshiaki Suzuki, Susumu Ohya, Kiyofumi Asai, Yuji Imaizumi
Regulation of store-operated Ca^{2+} entry activity by cell cycle dependent up-regulation of Orai2 in brain capillary endothelial cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 459(3):457-62, 2015

参考論文

1. Daiju Yamazaki, Hiroaki Kito, Seiji Yamamoto, Susumu Ohya, Hisao Yamamura, Kiyofumi Asai, Yuji Imaizumi
Contribution of $K_{ir}2$ potassium channels to ATP-induced cell death in brain capillary endothelial cells and reconstructed HEK293 cell model
American Journal of Physiology Cell Physiology 300: C75-C86, 2011
2. Susumu Ohya, Erina Nakamura, Sayuri Horiba, Hiroaki Kito, Miki Matsui, Hisao Yamamura, Yuji Imaizumi
Role of the $KCa3.1$ K^+ channel in auricular lymph node $CD4^+$ T-lymphocyte function of the delayed-type hypersensitivity model
British Journal of Pharmacology 169(5):1011-1023, 2013

三、本論文の基礎となる研究は、今泉 祐治 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

I. 序論	1
II. 実験方法	8
1. 細胞標本の調整.....	8
2. RNA 抽出及び RT-PCR 法.....	8
3. リアルタイム PCR 法.....	8
4. ウェスタンブロッティング法.....	9
5. 電気生理学的実験.....	10
6. 膜電位感受性色素 DiBAC ₄ (3)を用いた膜電位測定.....	10
7. 細胞内 Ca ²⁺ 濃度 ([Ca ²⁺] _i)測定法.....	10
8. プラスミドコンストラクトの作成と遺伝子導入.....	11
9. siRNA による遺伝子発現抑制.....	11
10. フローサイトメーターによる細胞分離実験.....	12
11. 細胞周期同調培養法.....	12
12. MTT 法.....	13
13. アポトーシス・細胞死の測定.....	13
14. 溶液.....	13
15. 使用薬物.....	14
16. 統計処理.....	14
III. 結果及び考察	15
1. 脳血管内皮細胞における CRAC チャネルを介した細胞増殖機構の解明	15
1-1. t-BBEC 117 における CRAC チャネルの機能発現.....	15
1-2. t-BBEC117 における Orai/STIM サブタイプの同定.....	17
1-3. t-BBEC117 における siRNA による Orai/STIM のノックダウンの効果.....	17
1-4. t-BBEC117 における Orai1/STIM1 ノックダウンによる細胞増殖への影響.....	21
1-5. 細胞周期依存的なストア作動性 Ca ²⁺ 流入の変動.....	22
1-6. 細胞周期依存的なイオンチャネル発現変化とストア作動性 Ca ²⁺ 流入活性への影響.....	24

1-7. t-BBEC117 の細胞増殖に対する Orai2 の寄与.....	26
1-8. 要約と考察.....	27
2. ストレス負荷による脳血管内皮細胞死とイオンチャネルによるその制御機構.....	30
2-1. t-BBEC117 における小胞体ストレス負荷.....	30
2-2. ストレス負荷による内向き整流性 K ⁺ チャネル発現変化.....	31
2-3. 内向き整流性 K ⁺ チャネル発現増加による膜電位への影響.....	33
2-4. t-BBEC117 における細胞膜電位と細胞内 Ca ²⁺ 濃度の関係.....	35
2-5. ストレス負荷による細胞内 Ca ²⁺ 動態の変化.....	37
2-6. t-BBEC117 におけるストレス負荷誘導性細胞死に対する Kir2.1 の寄与.....	42
2-7. 要約と考察.....	43
IV. 総括.....	46
V. 謝辞.....	48
VI. 引用文献.....	49

本文では以下の略語を用いた(順不同)。

SK; Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel

Kir2.x; Inwardly rectifier K^+ channel

TRP; Transient receptor potential

TRPC; Transient receptor potential canonical

CRAC; Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel

SOCE; Store-operated Ca^{2+} entry

ATP; Adenosine 5'-triphosphate

TG; Thapsigargin

TM; Tunicamycin

UCL1684; 6,10-diazo-(3-thio-triphosphate)3(1,3),8(1,4)-dibenzena-1,5(1,4)-diquinolincyclodecaphane,

DiBAC₄(3); bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol

MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

EGTA; *O,O'*-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid,

2-APB; 2-Aminoethyl diphenylborinate

SK&F96365; 1-[2-(4-Methoxyphenyl)-2-[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]ethyl]imidazole,

UPR; unfolded protein response

IRE1; inositol requiring protein-1

PERK; protein kinase R-like ER kinase

ATF6; activating transcription factor 6

GRP78; glucose-regulated protein 78kDa

CHOP; CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein

PM; Plasma membrane

ER; Endoplasmic reticulum

DMEM; Dulbecco's modified eagle's medium

FBS; Fetal bovine serum

RNA; Ribonucleic acid

mRNA; messenger RNA

DNA; Deoxyribonucleic acid

cDNA; complementary DNA

siRNA; short interference RNA

RT-PCR; Reverse transcription-polymerase chain reaction

GAPDH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

SDS; Sodium dodecyl sulfate

PAGE; Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS; Phosphate buffered saline

HEPES; 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

[Ca²⁺]_i; Intracellular Ca²⁺ concentration

I. 序論

血液脳関門(Blood Brain Barrier: BBB)

歴史的には、血液脳関門は、毛細血管壁を構成する血管内皮細胞の層構造によって構成されると考えられていた。しかし、近年になり **neurovascular unit** の概念が広く認識され、脳高次機能や中枢神経系機能制御には神経細胞に加えて、血管系細胞(血管内皮細胞とペリサイト)やグリア細胞(アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト)等の非神経細胞の機能連関が大きく寄与すると考えられている(1)。**neurovascular unit** において非神経系細胞は中枢神経系への物理的、生化学的、免疫学的なバリアとして機能し、シグナル伝達、血管新生、神経発生において極めて重要な脳微小環境の調節を行っている。

脳血管内皮細胞は血管系と脳実質の境界部に位置しており、周囲をアストロサイトやペリサイトに覆われることで血液脳関門を構成している。脳微小血管における細胞間結合は細胞間輸送あるいは脳微小環境維持において重要であり、脳血管内皮細胞はタイトジャンクションと呼ばれる極めて強固な結合様式をとっている。タイトジャンクションは、他の分子として **occludin** が報告されているものの(2)、主には **claudin** によって構成される(3)。これらのタイトジャンクション構成分子は、結合分子 **zona occludin (ZO-1, -2)** を介してアクチン骨格と結合している(4)。**claudin family** は 20 種類のサブタイプが存在するが、血液脳関門におけるタイトジャンクションには **claudin-5** が重要である(5)。

アストロサイトの脳内における機能は多岐にわたり、脳内イオン濃度や水量調節、神経伝達物質の除去、シナプス形成、そして血液脳関門の調節などが挙げられる(6)。また、アストロサイトは神経細胞シナプスと微小血管を橋渡ししており、局所における血流制御により、神経興奮に合わせた酸素やグルコース供給を制御することも報告されている(7)。アストロサイト由来の **glial-derived neurotrophic factor (GDNF)**、**basic fibroblast growth factor (BFGF)** などは脳血管内皮細胞のタイトジャンクション形成促進、トランスポーターの発現調整を介して血液脳関門の形成に機能している(5,8)。

ペリサイトは脳内において微小毛細血管の周囲を取り囲んで存在し、内皮細胞やアストロサイト、神経細胞とともに **neurovascular unit** を構成している(9)。内皮細胞に対してペリサイトは約 3:1 の割合で存在し、内皮細胞とはギャップ結合を形成することでシグナル伝達を行う。一例として、内皮細胞で産生された **platelet-derived growth factor B (PDGF-B)** はペリサイトに作用し、ペリサイトの増殖を促進することが報告されている(10)。また、ペリサイトはアクチンストレスファイバーを有し収縮を引き起こすことが報告されており、微小血管の血管径を制御し血流のコントロールに寄与している(11)。マウスを使用した検討では発生期の脳微小血管においてペリサイトがリクルートされ、血液脳関門の発達や血液脳関門を介した輸送に寄与することが報告されており(12)、実際にペリサイトの欠損は局所的な血流を減少させ、血液脳

関門を破壊することが明らかとなっている(13,14)。

血液脳関門のバリア機能は脳への物質輸送を制御する非常に重要な機構であるが、同時に脳内へ薬物を送達する際の代表的な障害となる。鬱病、統合失調症、てんかんなどの中枢神経疾患の一部は低分子医薬品による治療が最近では行われているものの、血液脳関門は未だに神経変性疾患、炎症性疾患、癌、感染症などの治療法開発における大きな障害となっている(15)。また、血液脳関門は脳の恒常性維持に寄与していることから、その破綻は脳の透過性、免疫細胞輸送、病原微生物の脳への移行などに大きな影響を与える(16)。血液脳関門の破綻は、神経変性疾患(アルツハイマー病、パーキンソン病)、脳血管疾患(脳卒中)、てんかん発作、感染症(ウイルス性脳炎)、髄膜炎、炎症性疾患(多発性硬化症)等、様々な疾患において関連が報告されている(17-24)。血液脳関門の破綻と中枢神経系疾患との関連から、血液脳関門の機能回復が脳の疾患、感染、傷害に対する効果的な治療法になりうるのではないかと期待されている(1)。

小胞体ストレス

小胞体は細胞内の主要な Ca^{2+} 貯蔵器官であると同時に、タンパク質の成熟において重要な役割を担う細胞内小器官である。小胞体において、分泌タンパク質が正常に折りたたまれ、また異常な折りたたみ構造となってしまった変性タンパク質が除去、分解される。個々の細胞の生存において、小胞体におけるタンパク質の正常な成熟は不可欠なものである。異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体に蓄積することを小胞体ストレスと呼び、小胞体ストレスが過剰あるいは長時間持続する場合にはアポトーシスが誘導される。一方で、小胞体ストレスを解消する細胞内シグナルが存在し、小胞体ストレス応答(unfolded protein response: UPR) (図 1)と呼ばれる。小胞体膜上には小胞体ストレスにおけるシグナル伝達に関与する小胞体ストレスセンサー(inositol requiring protein-1 (IRE1), protein kinase R-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6))が存在し、これらの下流のシグナルによりUPRが活性化される。小胞体ストレスが無い状態では、いずれも小胞体膜上でシャペロン分子である glucose-regulated protein 78kDa (GRP78)と結合しており不活性状態で存在するが、小胞体ストレスが負荷されると GRP78 がそれぞれから乖離することで活性化される。小胞体ストレスセンサーの下流シグナルにおいては、小胞体シャペロン分子などの誘導によるタンパク質の折りたたみや変性タンパク質の分解を促進することで細胞保護に機能するシグナルが存在する。一方で、過剰な小胞体ストレスに晒されるとアポトーシス促進性の転写因子である CHOP の誘導や caspase12 の活性化、IRE1 を介した JNK 経路の活性化などによりアポトーシスが誘導される(25,26)。

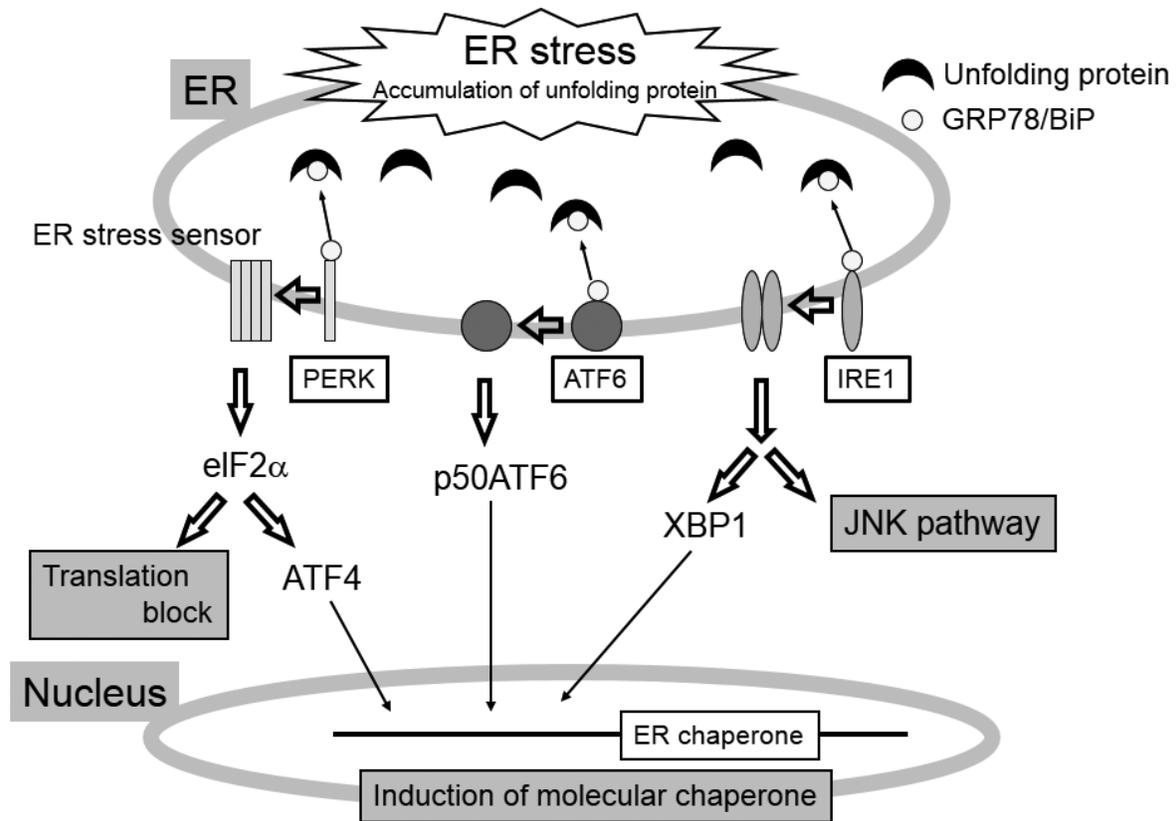


図1 小胞体ストレス応答

IRE1: inositol requiring protein-1, PERK: protein kinase R-like ER kinase, ATF6: activating transcription factor 6, GRP78: glucose-regulated protein 78kDa

Ca²⁺遊離活性化 Ca²⁺チャネル(CRAC チャネル)

ストア作動性 Ca²⁺流入 (SOCE) は多くの非興奮性細胞及び興奮性細胞における重要な Ca²⁺流入経路である。小胞体内 Ca²⁺濃度の減少は細胞膜上に存在するストア作動性 Ca²⁺チャネルを活性化し、様々な細胞機能調節に必要な持続的な細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こす。Ca²⁺遊離活性化 Ca²⁺チャネル(CRAC チャネル)はストア作動性 Ca²⁺チャネルと非常に類似した電気生理学的性質を有しており、最近になり CRAC チャネルを構成する分子として Orai1 (CRACM1) が同定された。Orai1 は細胞膜上において CRAC チャネルのチャネル孔を形成しており、対となる STIM1 は小胞体膜上において小胞体内 Ca²⁺濃度を感知しストア枯渇により Orai1 と結合することで CRAC チャネルを活性化させる(図2)。

Orai は細胞膜上に発現する Ca²⁺チャネルであり、Orai1, Orai2, Orai3 サブタイプが存在する。Orai は4回膜貫通構造をとり、N末端、C末端は細胞質内に存在する。それぞれN末端、C末端に STIM1 との結合領域を持ち、4量体を形成することで活性化すると考えられている(27)。Orai1 は遺伝性重症複合

免疫疾患 (SCID) の患者より遺伝子変異が発見されたことで、CRAC チャンネルの分子実体として同定された(28)。Orai1 は T 細胞や B 細胞などの免疫系細胞において SOCE を担う分子実体として報告されているが(29)、心臓や骨格筋、平滑筋においても多数発現が報告されている。Orai2, Orai3 も過剰発現系を用いた検討より、Orai1 と同様に CRAC チャンネルとして機能することが報告されているが、活性化及び不活性化のキネティクスや一価イオンの透過性などが異なることが報告されている(30,31)。

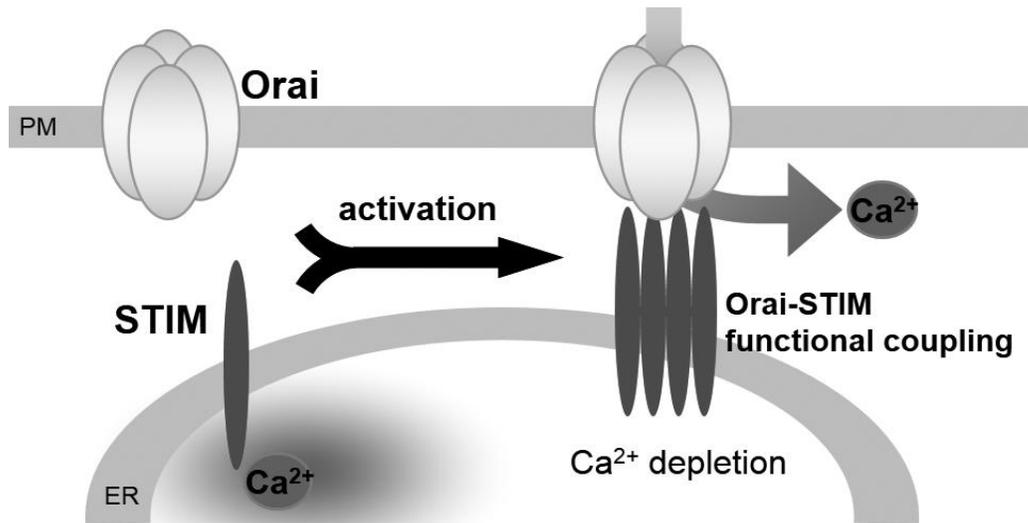


図 2 Ca²⁺遊離活性化 Ca²⁺チャンネル (CRAC チャンネル) 活性化機構

STIM は小胞体の枯渇などの刺激により活性化して凝集し Orai と機能的な複合体を形成することで CRAC チャンネルとして機能する。

STIM は主に小胞体膜上に存在する 1 回膜貫通構造の分子であり、小胞体 Ca²⁺センサーとして機能することで SOCE の活性化に関与している。STIM は小胞体内領域に Ca²⁺結合ドメイン (EF-hand) を持ち、小胞体内 Ca²⁺濃度の低下により Ca²⁺が解離することで多量体を形成し Orai と結合する(32)。STIM は STIM1, STIM2 の 2 つのサブタイプからなり、SOCE と CRAC チャンネルに関する研究の多くは STIM1 に着目して行われている。一方で、STIM2 も STIM1 と同様にホモマーを形成し、Orai1 を活性化させることが報告されている。STIM2 は STIM1 と比較して小胞体 Ca²⁺濃度の感受性が高く、より微小な Ca²⁺濃度変化により活性化することから、恒常的な Ca²⁺流入に寄与することで定常状態の細胞内 Ca²⁺濃度の制御に寄与する可能性を示している(33)。

Kir2.x チャンネル

内向き整流性 K⁺ (Kir) チャンネルは、心室筋細胞等の深い静止膜電位と長いプラトー層の形成を行う古典的的内向き整流性 K⁺チャンネル (IK1/Kir2.0 サブファミリー)、受容体依存性に G 蛋白質により直接活

性化される G 蛋白質制御 Kir チャンネル (GIRK/Kir3.0 サブファミリー)、スルホニルウレア受容体と会合し細胞内 ATP 等により活性を制御される ATP 感受性 Kir チャンネル (K_{ATP} /Kir6.0 サブファミリー)、上皮・グリア細胞などで K^+ 輸送を担う Kir サブユニット (ROMK/Kir1.1、Kir4.0 サブファミリー) の 4 つに大きく分類される。各サブファミリーに共通する構造として細胞膜を 2 回貫通するセグメント (M1, M2) とポアを形成する H5 領域を持ち、このサブユニットがホモあるいはヘテロ 4 量体を形成することで、機能的なチャンネルを形成している (図 3)。

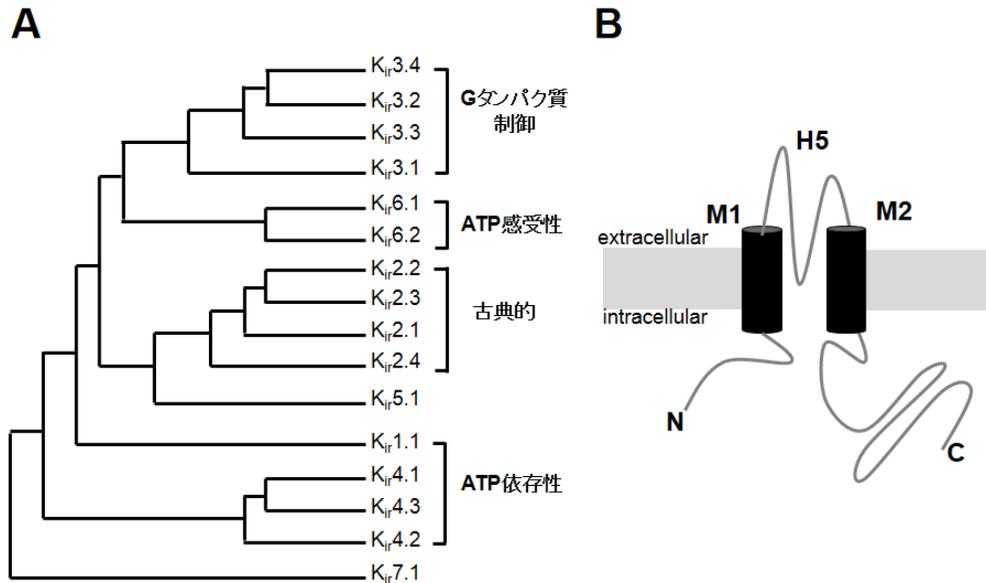


図 3 内向き整流性 K^+ チャンネルの分子構造とサブファミリー

A. 内向き整流性 K^+ チャンネルファミリーの系統樹。**B.** 内向き整流性 K^+ チャンネルの分子構造

Kir チャンネルは K^+ の平衡電位よりも過分極電位で内向き電流を流し、脱分極電位では外向き電流が流れにくい特徴を示す。この性質を内向き整流性と呼んでおり、強い内向き整流性を示す Kir2 サブファミリーは、心筋細胞等において細胞の静止膜電位を K^+ の平衡電位付近に安定させることで静止膜電位の形成に寄与することが知られている。また、末梢血管内皮細胞における静止膜電位の制御や脳血管収縮、胃酸分泌への関与が示されており、さらに初代培養ラット脳血管内皮細胞において Kir2.1 及び Kir2.2 の機能的な発現が報告されていることから、脳血管内皮細胞における静止膜電位の形成においても内向き整流性 K^+ チャンネルの寄与が示唆される。

本研究について

本邦において、脳血管疾患は三大死因の一つに数えられる主要な疾病の一つである。血液脳関門は脳微小毛細血管により構成され有害物質の脳への移行を妨げることで中枢機能維持に寄与しているが、多くの脳疾患時において血液脳関門の機能変性が報告されている。脳卒中、脳梗塞、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病や脳腫瘍などの脳疾患時においては、タイトジャンクションの形成抑制に加え、脳血管内皮細胞の脱落により血液脳関門の崩壊が引き起こされる。血液脳関門の機能維持には主要な構成要素である脳血管内皮細胞の細胞増殖と細胞死の恒常的なバランスが不可欠であると考えられ、脳血管内皮細胞の細胞増殖、細胞死について検討することは中枢神経系機能維持あるいは脳血管疾患における病態解明において重要な意義を持つと考えられる。

細胞内における遊離 Ca^{2+} 濃度の変動は細胞内情報伝達を制御するセカンドメッセンジャーとして細胞分裂・収縮・分泌・遺伝子発現・細胞死など様々な細胞機能調節において重要な役割を担っている。神経細胞や筋細胞のような興奮性細胞においては細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は主に細胞膜の脱分極を介した電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化により制御される。一方、血管内皮細胞のような非興奮性細胞では電位依存性 Ca^{2+} チャネルの機能発現は低く、細胞外からの Ca^{2+} 流入は電位非依存的 Ca^{2+} チャネルが担っている。

興奮性細胞とは対照的に非興奮性細胞では細胞膜の過分極が Ca^{2+} 流入における電気化学的駆動力を増大させることから、細胞の膜電位の形成に対して大きな役割を占める K^{+} チャネルは、細胞内 Ca^{2+} シグナルの調節において極めて重要な機能を果たしている。これまでに細胞増殖や細胞死の制御に関与するイオンチャネルは数多く報告されており、その中でも K^{+} チャネルに関するものが多い。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は様々な細胞種で細胞増殖を促進することが知られているが、一方で細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の過度な上昇はミトコンドリア過負荷を生じ細胞死を誘導することも報告されている。また、 K^{+} チャネルの活性化による過分極は Ca^{2+} 流入の調節因子として機能するだけでなく、 Cl^{-} の流出を促進する。 K^{+} チャネルと Cl^{-} チャネルの活性化による KCl の流出に伴う浸透圧変化は細胞外への水の流出を促進し、アポトーシスの前段階である細胞収縮を引き起こす。

そこで本研究では、脳血管内皮細胞株に機能発現する K^{+} チャネル、 Ca^{2+} チャネルに注目しイオンチャネルを介した膜電位及び細胞内 Ca^{2+} 動態の制御による細胞増殖・細胞死の制御機構を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。

- ① 脳血管内皮細胞における主要な Ca^{2+} シグナルを形成する Ca^{2+} 遊離活性化 Ca^{2+} チャネル (CRACチャネル) を介した細胞増殖制御機構の解明。
- ② ストレス負荷脳血管内皮細胞において誘導される細胞死に対する内向き整流性 K^{+} チャネル (Kir2.1チャネル) の寄与の解明。

ヒトにおける脳微小血管は全長が 600 km、表面積が 12-25 m² と脳全体に広く分布しているが (34,35)、脳血管内皮細胞は脳全体の約 0.1%を占めるにとどまる。そのため、単離あるいは初代培養により細胞標本を得るのは非常に困難である。そこで、本研究を行うにあたり、細胞標本として名古屋市立大学大学院 医学研究科 分子神経生物学において作製されたウシ脳血管内皮細胞 (t-BBEC117) を用

参考 脳血管内皮細胞に特異的な特徴

1. 紡錘状構造
 2. ALP活性高値
 3. 酸化型LDL受容体であるLOX-1の存在を示す
Dil-acetylated-LDLの取り込み
 4. Multidrug resistance (mdr) 遺伝子の発現
 5. グルコーストランスポーター (GLUT-1) 遺伝子の発現
 6. アストロサイトとの共培養によるタイトジャンクションの
形成とそれに伴うグルコース透過性の低下
-

いた(36)。t-BBEC117は単離ウシ脳血管内皮細胞に対して T 抗原 (simian virus 40 large tumor, SV 40 large T) 遺伝子を発現する pSV3-neo を遺伝子導入し、G418 耐性細胞をサブクローニングすることにより作製した。t-BBEC117は左表に示したような6つの脳血管内皮細胞の特徴を有しており、脳血管内皮細胞のモデル細胞として有用である。

II. 実験方法

1. 細胞標本の調製

名古屋市立大学大学院 医学研究科 分子神経生物学分野の浅井教授らによって作製されたウシ脳血管内皮細胞 (t-BBEC117) (36) は、100 U/ml penicillin (Wako, Osaka, Japan)、10 mg/ml streptomycin (Meiji Seika Kaisha, Tokyo, Japan)、0.1% G418 (Wako) 及び 10% FBS (Gibco, Milan, Italy) 添加 DMEM 培地 (DMEM-10% FBS, 0.1% G418) で培養した。実験に用いる際には使用する 1~2 日前にガラス片に蒔いた。細胞へのストレス負荷は小胞体ストレス誘導剤として広く使用されている tunicamycin (5 ng/ml) を培養培地に添加し 72 時間培養することで行った。

2. RNA 抽出及び RT-PCR 法

t-BBEC 117 をシャーレ培養し、コンプレントに達した後 Tripure Isolation Reagent (Roche, Basel, Switzerland) を用いて AGPC (Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol Chloroform) 法により総 RNA を細胞から抽出し、OD₂₆₀ 値から total RNA 濃度を計算した。1 µg の total RNA を用いて SUPERSCRIPT II /RNase (-) 逆転写酵素 (Invitrogen, CA, USA) と Oligo(dT) (Invitrogen) により cDNA を合成した。RT-PCR には PCR 増幅装置として GeneAmp2400 (Perkin Elmer ABI, Wellesley, Massachusetts) を用い、DNA ポリメラーゼとして Ampli taq Glod (TaKaRa) を用いた。基本プログラムは以下の通りである。1) 前熱変性反応 (94°C, 10 分間)、2) 熱変性反応 (94°C, 30 秒間)、3) アニール反応 (58°C, 30 秒間)、4) 伸長反応 (72°C, 1 分間)。2) ~4) はサイクル反応であり、35 サイクルで行った。PCR 終了後、1~2% アガロースゲルで電気泳動を行い、PCR 産物を分離した。これを 0.5 µg/ml 臭化エチジウムで 15 分間染色した後、FAS-III (Toyobo, Osaka, Japan) にて染色像を取得した。使用したプライマーは「3. リアルタイム PCR 法」にまとめて示した。

3. リアルタイム PCR 法

「2. mRNA 抽出及び RT-PCR 法」の記述にあるように cDNA を合成し、リアルタイム-PCR に用いた。リアルタイム PCR は PCR 検出定量システム ABI7000 (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて行った。SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用い、サイバーグリーンアッセイ法よりサイクル毎の蛍光を測定し、その蛍光強度から、あらかじめ作成した検量線を元にして、GAPDH mRNA 発現量を内在性標準物質として相対的な対象イオンチャンネル mRNA の発現量を GAPDH に対する比として表した。本研究で用いたプライマー配列は以下に示した。

Clones (Genebank Accession No., Primar site, Product length)			
(+)	Sense primar sequence		
(-)	Antisense primar sequence		
bCHOP	(NM_001078163, 83-397, 315 bp)	bSTIM1	(NM_001035409, 895-1038, 144 bp)
(+)	5'-TGCTGTCCTCAGATGAAAATCG-3'	(+)	5'-CTGGTGGTGTCTATCGTTATTGGT-3'
(-)	5'-GCTGTGCCACTTTCCTTTCATT-3'	(-)	5'-TTCCTGAAGGTCATGCAGACTCT-3'
bKir2.1	(NM_174373, 1181-1281, 101 bp)	bSTIM2	(XM_002688161, 2236-2375, 140 bp)
(+)	5'-CATATTTCTGGTGTCTCCCATCAC-3'	(+)	5'-CCTCCTCAAGCCTTGAGATATACC-3'
(-)	5'-TCTCAAAGTCTGCGTTGTTCGAT-3'	(-)	5'-AGACCCATGCAATCAGGAGAAC-3'
bKir2.2	(NM_001024690, 691-791, 101 bp)	bTRPC1	(NM_174476, 1649-1770, 122 bp)
(+)	5'-TGCACAGACGCTGCTATTCA-3'	(+)	5'-TTGTTTTCTTTCACAATTGGG-3'
(-)	5'-CAATATGGCTCTTGCGTAGGTT-3'	(-)	5'-ATGAACGAATGGAAGGTGT-3'
bOrai1	(NM_001099002, 1037-1187, 151 bp)	bTRPC3	(AB179743, 403-523, 121 bp)
(+)	5'-ACAGACCGACAGTTCAGGAA-3'	(+)	5'-ACCCAGGGAGTACATTTTGCA-3'
(-)	5'-GCGTAAGGCCAAAGCTCTGA-3'	(-)	5'-CCTGAAGGAAAGCCAGGAATC-3'
bOrai2	(NM_001191348, 1489-1594, 106 bp)	bTRPC5	(XM_599990, 532-632, 101 bp)
(+)	5'-GACGGTTCGAGACCAAAGTCT-3'	(+)	5'-TGTGTGGAGTGTGTGTCCAGTTC-3'
(-)	5'-TTAGCCATCAGTCTCCCCTTAAAC-3'	(-)	5'-AAGGCGATGAGTGAGGGACTT-3'
bOrai3	(NM_001193202, 457-592, 136 bp)	bGAPDH	(BC102589, 138-249, 112 bp)
(+)	5'-GCTGGAGAGCAAACATGAATACC-3'	(+)	5'-TTCTGGCAAAGTGGACATCGT-3'
(-)	5'-GTTGCTAACGGCTTCAATGTGA-3'	(-)	5'-CTTGACTGTGCCGTTGAACTTG-3'

4. ウェスタンブロットリング法

回収した細胞を遠心後、上清を吸い取り protease inhibitor の入った 1 ml lysis buffer で懸濁した。懸濁液をホモジナイズ処理後、遠心により全細胞タンパク質溶液を取得した。タンパク質溶液をタンパク定量キット(Bio-Rad, CA, USA)によりタンパク質含量を測定した。タンパク質試料(30~50 µg/lane)を 12% SDS-PAGE により分画化し、PVDF 膜(GE Healthcare UK Ltd.)に転写した。PVDF 膜は PBS/0.1% Tween20(Tween-PBS)に 2% アルブミンを加えた溶液でブロッキング(12時間)した後、それぞれ特異的な一次抗体を加えた Tween-PBS に浸して 24 時間インキュベートした(4°C)。それぞれの PVDF 膜を Tween-PBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、各一次抗体に対応した二次抗体で 1 時間インキュベートした(4°C)。その後、さらに Tween-PBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、ECL 検出システム(GE Healthcare UK Ltd.)、Image Reader (Las1000, FUJIFILM, Tokyo, Japan)を用いて可視化した。

一次抗体は次のような希釈倍率で使用した。

抗 Orai2 抗体 (Alomone Lab) : 1:200

抗 Kir2.1 抗体 (Alomone Lab) : 1:200

二次抗体として下記のものを用いた。

抗ウサギ IgG-HRP 標識ロバ抗体 (GE Healthcare UK Ltd.) : 1:4000

5. 電気生理学的実験

t-BBEC117の膜電流測定にはHamillらにより確立されたホールセルパッチクランプ法(37)を用いた。記録電極は外径1.04-1.08 mmの芯入ガラス管から2段式電極製作機(PB-7; Narishige, Tokyo, Japan)を用いて作製し、顕微鏡下で先端を熱加工により滑らかに整え使用した。実験には先端の直径が約1 μ m、細胞内液充填時の電気抵抗が2-5 M Ω の記録電極を使用した。倒立顕微鏡 (TMD; Nikon, Tokyo, Japan)のステージ上に固定したチャンバーに細胞を定着させたガラス片を固定し、Normal HEPES溶液で灌流した。細胞に対し、水圧式微動マニピレーター (M0-203; Narishige)を用いて記録電極を押し当て、電位固定法により膜電流を測定した。測定した電流は微小電流用増幅器(EPC-7; HEKA ElektronikあるいはCEZ-2400; Nihonkoden, Tokyo, Japan)を用いて増幅し、AD変換機 (Digidata 1440A; Axon Instruments)、Clampex10.2 (Axon Instruments)を用いて記録した。データ解析はClampfit10.2 (Axon Instruments)を用いて行った。

6. 膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)を用いた膜電位測定法

オキソノール系膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)は細胞膜が脱分極すると蛍光強度が増加し、膜が過分極すると蛍光強度が減少する色素であることが知られている。-20~-70 mV の範囲においては1%の蛍光強度の減少は0.5 mV の過分極に相当する(38)。チャンバーに細胞を蒔いたガラス片を固定し、100 nM DiBAC₄(3) (DOJINDO, Kumamoto, Japan)を約30分間室温で負荷し、その後灌流しながら細胞に約30分間負荷した。画像測定・解析装置として、高速 CCD カメラ蛍光画像解析システム ARGUS/HiSCA (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を用いた。DiBAC₄(3)は488 nmの波長で励起させ、520 nm以上の蛍光波長を取得した。各実験の最後に140mM High K⁺ HEPES溶液を灌流させ、細胞を近似的に0mVに脱分極させ、得られた蛍光強度により規格化し ratio(F/F_{140K})を算出した。

7. 細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)測定法

[Ca²⁺]_i 変化の測定には高速 CCD カメラ蛍光画像解析システム ARGUS/HiSCA (Hamamatsu Photonics)を用い、[Ca²⁺]_i変化を画像解析した。本実験ではCa²⁺蛍光指示薬としてfura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM, Invitrogen)を使用した。測定用チャンバーに細胞を付着させたガラス片を固定し、

10 μM fura-2 AM を添加し、約 30 分間室温で放置して細胞に負荷した。その後、HEPES 溶液で過剰の fura-2 AM を 10 分間、洗浄した後、測定を開始した。一度の測定によりガラス片上の約 10 細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を計測した。測定条件は細胞内の色素をキセノンランプにより励起波長 340 nm 及び 380 nm の光で励起させ、放出された 520 nm 以上の各々の蛍光を高感度カメラで取得し(それぞれ F_{340} 及び F_{380})、その蛍光強度比 (F_{340}/F_{380}) を 1 枚の画像として取得した。

また、得られた蛍光強度比 (F_{340}/F_{380}) を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のキャリブレーションを行うことにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ へ換算した。 Ca^{2+} イオノフォアである 10 μM イオノマイシンを含む Ca^{2+} free HEPES 溶液を灌流した時の蛍光強度比 (F_{340}/F_{380} , R_{\min}) と 380 nm で励起した際の蛍光強度 (F_f) を得た。次に 10 μM イオノマイシンを含む normal HEPES 溶液を灌流させた時の蛍光強度比 (F_{340}/F_{380} , R_{\max}) と 380 nm で励起した際の蛍光強度 (F_b) を得た。Fura2 の Ca^{2+} 錯体解離定数 (K_d) は 224 nmol/l とした。得られた値を以下の式に導入し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に換算した。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times (F_f / F_b)$$

8. プラスミドコンストラクト作成と遺伝子導入

「2. 細胞からの RNA 抽出及び RT-PCR」に従い t-BBEC117 由来 cDNA を合成した。PCR 産物をアガロース電気泳動により分画し、目的産物のバンドから DNA を精製した。精製した DNA 断片を制限酵素処理した後、pcDNA3.1(+)/neo へサブクローニングし、コンピテント細胞に形質導入した。得られたポジティブクローンからプラスミド DNA を精製し、DNA 配列を BigDye terminator v3 kit (Applied Biosystems)、シークエンサー (ABI PRIZM 3100 genetic analyzer) を用いて配列を確認した。上記の方法により Orai2 遺伝子 (NM_001191348) をクローニングした。また t-BBEC117 への遺伝子導入には lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて行った。

9. siRNA による遺伝子発現抑制

RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) は、二本鎖 RNA と相補的な塩基配列を持つ mRNA が分解される現象を指す。RNAi 法とは、RNA 干渉を利用して人工的に二本鎖 RNA (siRNA) を細胞内へ導入することにより、任意の遺伝子発現を抑制する手法である。siRNA の導入には Amaxa Basic Nucleofector kit V (Lonza, Basel, Switzerland) を用いエレクトロポレーションにより行った。siRNA 導入後、48 時間から 72 時間に実験を行った。本研究で用いた siRNA 配列は以下に示した。

Clones (Genebank Accession No., siRNA site)

- (+) Sense siRNA sequence
- (-) Antisense siRNA sequence

siRNA	scramble siRNA
bOrai1 (NM_001099002, 975-999)	bOrai1 (NM_001099002, 975-999)
(+) 5'-CCUUCGGCCUGAUCUUUCUCGUCUU-3'	(+) 5'-CCUGGCCGUUAUCUUUAGCUCUCUU-3'
(-) 5'-AAGACGAUAAAGAUCAGGCCGAAGG-3'	(-) 5'-AAGAGAGCUAAAGAUACGGCCAGG-3'
bOrai2 (NM_001191348, 1231-1255)	bOrai2 (NM_001191348, 1231-1255)
(+) 5'-UCGUGGUCGGCACCAUCCACUUCUA-3'	(+) 5'-UCGUGUCCUCAACCUACUCUGUCUA-3'
(-) 5'-UAGAAGUGGAUGGUGAAGACCACGA-3'	(-) 5'-UAGACAGAGUAGGUUGAGGACACGA-3'
bSTIM1 (NM_001035409, 1251-1275)	bSTIM1 (NM_001035409, 1251-1275)
(+) 5'-GCUGGAAUCGCAUAGCUCUAGGGUAU-3'	(+) 5'-GCUCUAAUACGUCGAGUACGGGUAU-3'
(-) 5'-AUACCAUGAGCUAUGCGAUUCCAGC-3'	(-) 5'-AUACCCGUACUCGACGUUUAGAGC-3'
bSTIM2 (XM_002688161, 2108-2132)	bSTIM2 (XM_002688161, 2108-2132)
(+) 5'-GCCCUGCUCUGUAUCGGAAUGAAGA-3'	(+) 5'-GCCUCGGUCUAUGGCUAAAAGCUAGA-3'
(-) 5'-UCUUCAUCCGAUACAGAGCAGGGC-3'	(-) 5'-UCUAGCUUUAGCCAUAGACCGAGGC-3'

10. フローサイトメーターによる細胞分離実験

培養した t-BBEC 117 をトリプシン処理により剥離し、PBS(-)溶液で洗浄し遠心した。遠心後、上清を除き、100 nM DiBAC₄(3) HEPES 溶液で室温にて30分間インキュベートした。30分後、細胞懸濁液に薬物を加え、フローサイトメーター (BD LSR; Becton-Dickinson, Nj, USA) を用いて DiBAC₄(3) の蛍光強度により、10,000 細胞に対するヒストグラムを作成した。細胞周期の測定に使用した細胞は、上清を遠心除去後、4°C 70%エタノールで懸濁し、氷上で30分間放置することにより固定した。DNA 染色には、細胞固定に用いたエタノールを除去後、PBS(-)に再懸濁し 100 µg/ml RNase を加え、37°C で20分間放置した。その後、25 µg/ml propidium iodide (Sigma) を加え氷上で20分間放置した。フローサイトメーターを用いて PI の蛍光強度により、10,000 細胞に対するヒストグラムを作成した。

11. 細胞周期同調培養法

細胞周期の同調培養には、過剰チミジン法を用いた(39)。細胞周期を G1/S 期の境界及び S 期に同調させるためチミジン/PBS(-)溶液を最終濃度が 2.5 mM となるように培養液に加え、20~24 時間培養した。次に、チミジン含有培養液を取り除き通常の培養液で 15 時間培養を行うことで細胞周期を G2/M 期へ進行させた。そして、細胞周期を G1/S 期の境界に同調させるために、再度チミジン含有培養液で 20 時間培養を行った。実験には G1/S 期の境界から細胞周期を進行させるため、同調培養後、再び通常培培養液で培養を行った。

12. MTT 法

細胞増殖及び細胞死の測定には MTT 法を用いた。テトラゾリウム塩である MTT (3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) (Sigma)を用いた MTT 法は細胞内酵素活性を指標としているためほとんどの細胞に適用でき、得られる結果も比較的安定しているため、種々の簡易試験法として用いられている。MTT は 5 mg/ml の濃度になるように PBS(-)溶液に溶解した。細胞溶解用溶液として 20% SDS/50% DMF 溶液を用いた。t-BBEC 117 を $4\sim 5 \times 10^3$ cells/well になるように 96 well プレートに蒔き、37°C、5% CO₂ でインキュベートした。細胞接着後(約 12 時間後)に薬物を培地に懸濁した薬物溶液に置換した。その時間を 0 時間とし、24 時間毎に 72 時間まで測定を続けた。測定は各時間経過したプレートに 10 µl/well の MTT 溶液を加え、4 時間後に 20% SDS/50% DMF 溶液を 100 µl/well 加え細胞を溶解し、ホルマザン塩を溶解させた。さらに 6 時間後にマルチスキャン JX (Ver1.1; Thermo Labsystems, USA)を用いて測定波長: 595 nm、参照波長: 650 nm において吸光度を測定し、生細胞数の間接的な指標とした。

13. アポトーシス・細胞死の測定

細胞の形態的变化を観察するために 100 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma)により 10 分間室温で核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡(AIR; Nikon)を用い解析した。DNA 断片化にはアガロースゲル電気泳動法を用いた。細胞サンプルを細胞溶解バッファーにより細胞溶解させ DNA 断片を抽出した。遠心処理後、DNA を含む上清に RNase を加え 37°C、1 時間温置した。続けて proteinase K を加え 50°C、30 分間温置した。イソプロパノールにより DNA を沈殿させた後、TE バッファーへ再懸濁し電気泳動の試料とした。2%アガロースゲルで電気泳動を行い、0.5 µg/ml 臭化エチジウムで 15 分間染色した後、FAS-III (Toyobo)にて染色像を取得した。カスパーゼ 3,7 活性の測定には Caspase-Glo® 3/7 Assay Kit (Promega, Madison, USA)を用い、1420 Multilabel Counter ARVO® MX (PerkinElmer)にて発光を測定した。

14. 溶液

細胞外液(mM)

① Normal HEPES 溶液

137 NaCl, 5.9 KCl, 2.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 14 glucose, 10 HEPES (pH 7.4 with 10 N NaOH)

② Ca²⁺-free HEPES 溶液

137 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 MgCl₂, 5 EGTA, 14 glucose, 10 HEPES (pH 7.4 with 10 N NaOH)

③High K⁺ HEPES 溶液

5.9 NaCl, 140 KCl, 2.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 14 glucose, 10 HEPES (pH 7.4 with 10 N NaOH)

細胞内液 (mM)

①内向き整流性電流測定用内液

140 KCl, 4 MgCl₂, 5 Na₂ATP, 0.05 EGTA, 10 HEPES (adjusted to pH 7.2 with KOH)

②細胞内 Ca²⁺濃度同時測定用内液

140 KCl, 4 MgCl₂, 5 Na₂ATP, 0.05 fura2, 10 HEPES (adjusted to pH 7.2 with KOH)

15. 使用薬物

BaCl₂·2H₂O: Wako

LaCl₃·7H₂O: Wako

GdCl₃·6H₂O: Wako

SK&F96365: Sigma

2-APB: TOCRIS

UCL1684: TOCRIS

Tunicamycin: Calbiochem

Thapsigargin: Wako

16. 統計処理

実験結果は全て平均値±標準誤差として表示した。2 群間の平均値の差の検定には Student's t-test を用いた。また、多重比較には Tukey's の多重比較法を用いた。図中の*、** (または#、##) はそれぞれ危険率 5% 及び 1% で有意な差があることを示している。

III. 結果及び考察

1. 脳血管内皮細胞における CRAC チャネルを介した細胞増殖機構の解明

血液脳関門は循環血液中からの物質の移行を制限し脳への有害物質の移行を妨げることで中枢神経系の恒常性に寄与している。血液脳関門は一層からなる脳血管内皮細胞により構成され、周囲をアストロサイトやペリサイトにより被覆されることで様々に機能制御を受けている(5,12)。

種々の細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動は細胞増殖の制御に大きく寄与することが知られている(40-42)。脳血管内皮細胞のような非興奮性細胞において、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの機能発現は比較的 low、細胞外からの Ca^{2+} 流入は主に電位非依存的な Ca^{2+} 透過チャネルが担っている(43-47)。そのような電位非依存的 Ca^{2+} 透過チャネルにおいては、細胞膜の過分極は Ca^{2+} 透過の電気化学的駆動力を増大させるため、興奮性細胞とは対照的に過分極により細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が生じる。これまでに、末梢の血管内皮細胞では、 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル (K_{Ca}) (48,49) や内向き整流性 K^+ チャネル (Kir) (50,51)、TRP チャネル(43,52)の発現が示され、機能解析も進んでいる。対照的に、脳血管内皮細胞においては P-glycoprotein などのトランスポーターについての研究が進んでいる(53)が、一部の電位依存性 K^+ チャネル及び内向き整流性 K^+ チャネルの報告はあるものの(54)、イオンチャネルの発現とそれらの機能を含めた電気生理学的特徴については成果が少ないのが現状である。

そこで、本研究では血管内皮細胞のような非興奮性細胞において主要な Ca^{2+} シグナルを構成すると考えられる Ca^{2+} 遊離活性化 Ca^{2+} チャネル (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel; CRAC channel) に注目し細胞内 Ca^{2+} 動態へ与える影響を検討した。CRAC チャネルを介した Ca^{2+} 流入は免疫細胞をはじめとして多くの非興奮性細胞や平滑筋細胞などの興奮性細胞においても、細胞増殖、遊走などの生理機能を持つことが報告されているため、脳血管内皮細胞における CRAC チャネルを介した Ca^{2+} シグナル及び細胞増殖に対する CRAC チャネルの寄与を解明することを目的とした。

1-1. t-BBEC 117 における CRAC チャネルの機能発現

t-BBEC 117 におけるストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) について検討した。小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬である $1 \mu\text{M}$ タプシガルギン (TG) 前処置 (30 分間) により完全に細胞内の Ca^{2+} を除去した後、 Ca^{2+} 除去細胞外液から 2.2 mM Ca^{2+} 含有溶液に置換すると大きな細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇が観察された。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を SOCE による Ca^{2+} 流入として評価した。SOCE は 2 回続けて誘発し、1 回目のピーク値を 1.0 として、2 回目のピークを規格化することで各薬物の評価を行った (図 3A)。t-BBEC117 において誘導される SOCE に対して、各 SOCE 阻害薬を用いることで薬理的な検討を行った。

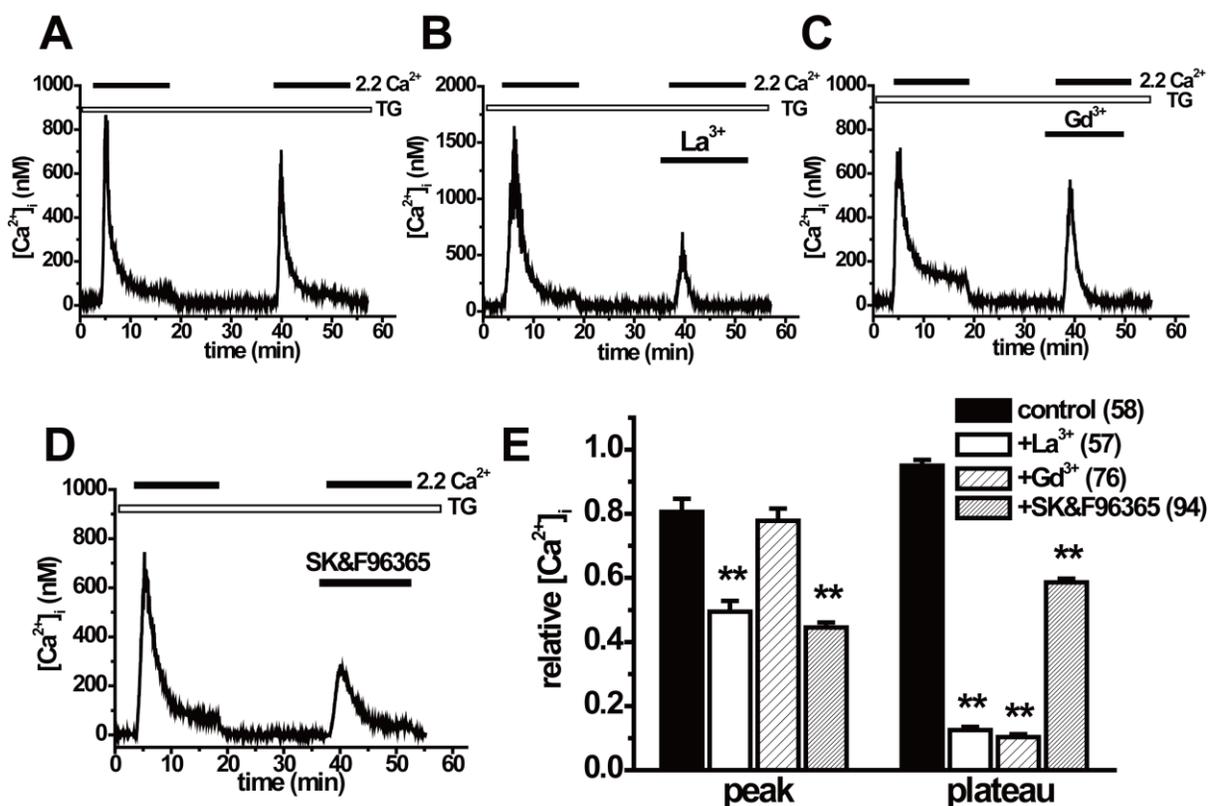


図4 t-BBEC117におけるストア作動性 Ca^{2+} チャネルの機能発現の確認

t-BBEC117において、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura2/AM を用い、ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) の測定を行った。SOCE 誘発は、 Ca^{2+} 除去外液中、小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害薬である 1 μ M タブシガルギン (TG) の前処置により完全に小胞体を枯渇させた後、2.2 mM Ca^{2+} 含有溶液に置換することで行った。A. t-BBEC117 における典型的な SOCE を介した $[Ca^{2+}]_i$ 変化。B, C, D. SOCE を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する、10 μ M La^{3+} , 10 μ M Gd^{3+} , 10 μ M SK&F96365 の効果。E. コントロール及び阻害薬適用による SOCE 活性の変化をまとめた。一回目に誘発した SOCE における Δ ratio 値を 1.0 とし、二回目の SOCE を規格化した。一過性、持続性の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を、それぞれ peak 相、plateau 相として評価した。例数は図中の括弧内に示した。

図 4A はコントロールにおける結果、図 4B,C,D は SOCE の 2 回目の誘発時にそれぞれ非選択陽イオンチャネル阻害薬である 10 μ M La^{3+} , 10 μ M Gd^{3+} , 10 μ M SK&F96365 を適用した際の典型的な Ca^{2+} 変化のトレースを示している。SOCE は Ca^{2+} 除去細胞外液から 2.2 mM Ca^{2+} 含有溶液に置換後、一過性に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を示す Peak 相と持続的に続く Plateau 相を示したため、薬物評価は Peak 相、及び Plateau 相に対して行った。図 3E は、これらの結果をまとめたものである。コントロールと比較して、 La^{3+} , Gd^{3+} , SK&F96365 はいずれも SOCE を介した Ca^{2+} 流入を抑制した (Peak: control; 0.81 ± 0.041 , La^{3+} ; 0.49 ± 0.033 , Gd^{3+} ; 0.78 ± 0.038 , SK&F96365; 0.44 ± 0.016 , Plateau: control; 0.95 ± 0.018 , La^{3+} ; 0.13 ± 0.010 , Gd^{3+} ; 0.10 ± 0.0088 , SK&F96365; 0.59 ± 0.012) (** p < 0.01 vs. control)。以上の結果より、t-BBEC117 において CRAC チャネルが機能発現することが明らかとなった。

1-2. t-BBEC117 における Orai/STIM サブタイプの同定

CRAC チャンネルは、遺伝性重症複合免疫疾患 (severe combined immune deficiency; SCID) の患者由来 T 細胞から Orai1 が同定されて以来(28)、T 細胞や B 細胞等の免疫系細胞をはじめとした非興奮性細胞から、平滑筋細胞などの興奮性細胞に至るまで多くの細胞種においてその生理機能が報告されている(29,55-58)。哺乳類における Orai は Orai1, Orai2, Orai3 の 3 つのサブタイプにより構成されるが、現在サブタイプ特異的に作用する薬物は存在しない。一方で特徴的な作用を示す薬物に 2-APB が挙げられる。10 μM 以下の低濃度の 2-APB は Orai1, Orai2, Orai3 いずれのサブタイプに対しても活性化薬として作用するが、30 μM 以上の高濃度の 2-APB は Orai1, Orai2 に対しては抑制的に作用し、Orai3 に対しては活性化薬として作用する(30,59)。この濃度による作用の違いを用いて、t-BBEC117 に機能発現する Orai の機能解析を行った。

図 4 と同様に SOCE を二度続けて誘発させ、二度目の SOCE 誘発時にそれぞれ 5 μM , 50 μM 2-APB を適用することで SOCE に対する作用を検討した。図 5A は 5 μM 2-APB 適用時における典型的な Ca^{2+} 濃度変化のトレース、図 5B は 50 μM 2-APB 適用時における典型的な Ca^{2+} 濃度変化のトレースを示した。図 5C では図 4E と同様に、Peak 相及び Plateau 相に対して、一度目の反応を 1.0 として 2 度目の反応を規格化することで、2-APB 適用による SOCE を介した Ca^{2+} 流入への影響を評価した。その結果、図 5C にまとめたように、5 μM 2-APB 適用は Peak 相における Ca^{2+} 流入を促進するが、Plateau 相への影響は観察されなかった (Peak: 1.39 ± 0.20 , Plateau: 0.95 ± 0.019 , $n=70$, ** $p < 0.01$ vs. control)。一方で、50 μM 2-APB 適用は Peak 相、Plateau 相どちらにおいても Ca^{2+} 流入を抑制した (Peak: 0.065 ± 0.007 , Plateau: 0.36 ± 0.033 , $n=34$, ** $p < 0.01$ vs. control)。以上のように、t-BBEC117 における SOCE は低濃度 2-APB により活性化し、高濃度 2-APB で抑制される性質を持つことが明らかとなった。このことから、t-BBEC117 に機能発現する CRAC チャンネルは Orai1 もしくは Orai2 によって構成される可能性が示された。

CRAC チャンネルは、細胞膜上に存在しイオン孔を形成する Orai と小胞体膜状に存在し小胞体 Ca^{2+} 濃度の変動を感知する STIM の分子複合体で構成される。Orai は上述のように Orai1, Orai2, Orai3 の 3 種類が存在し、STIM は STIM1, STIM2 の 2 種類のサブタイプが存在する。そこで、t-BBEC117 に発現する Orai, STIM の mRNA 発現をリアルタイム PCR により検討したところ、Orai1 及び Orai2 のいずれも高発現していることが示唆された (Orai1: 0.10 ± 0.010 , Orai2: 0.10 ± 0.007 , Orai3: 0.020 ± 0.0016 , STIM1: 0.021 ± 0.002 , STIM2: 0.12 ± 0.0069) (図 5D)。

1-3. t-BBEC117 における siRNA による Orai/STIM のノックダウンの効果

t-BBEC 117 に機能発現する Orai/STIM の分子基盤の同定を行うために、Orai1, Orai2, STIM1, STIM2 に対する siRNA (si-Orai1, si-Orai2, si-STIM1, si-STIM2) を t-BBEC117 へ導入し SOCE を介し

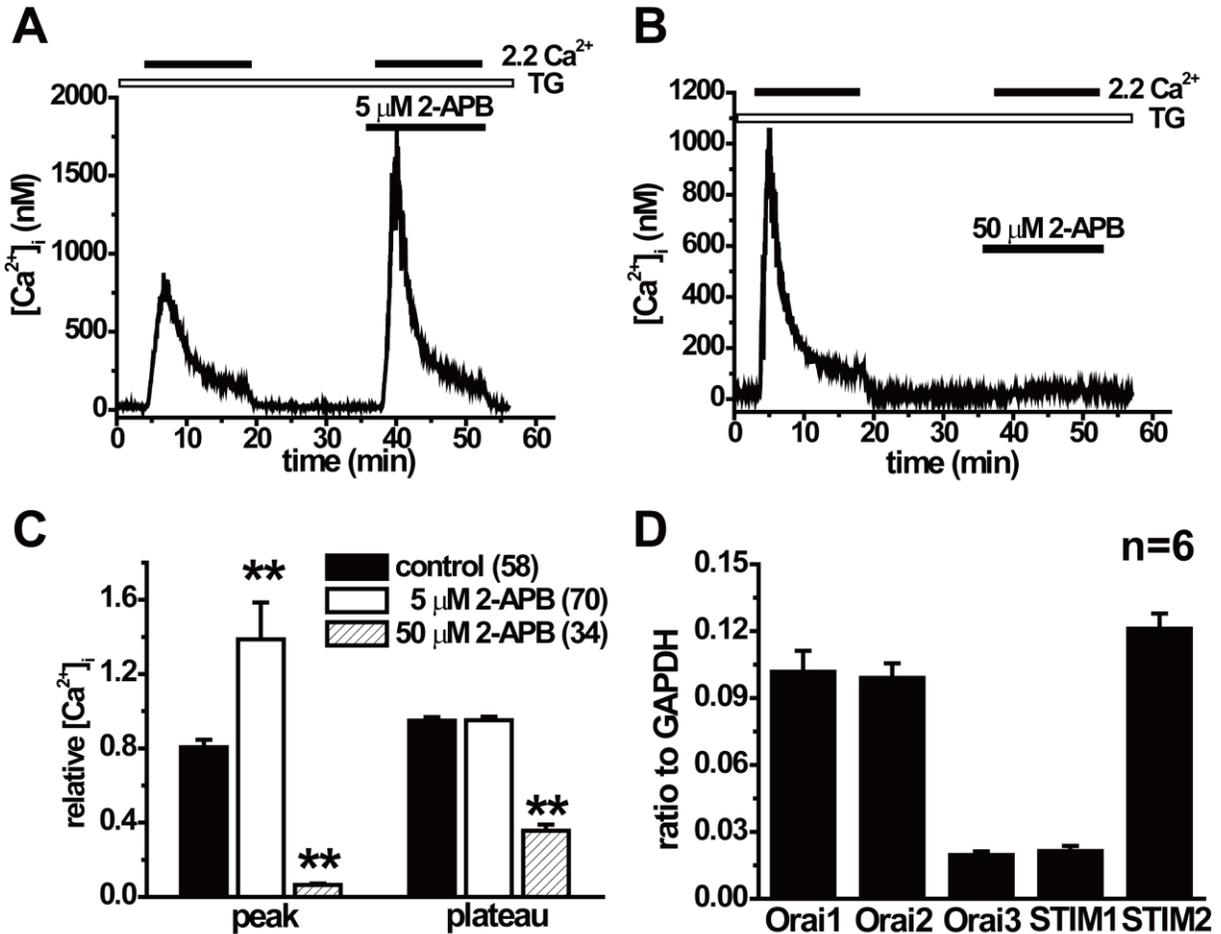


図5 t-BBEC117におけるストア作動性 Ca^{2+} チャネルに対する Orai の寄与の検討

t-BBEC117において、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura2/AM を用い、ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) の測定を行った。2-APB は Orai チャネルに対して特徴的な作用を持つことが報告されている。2-APB 低濃度 (~10 μ M 以下) では Orai1,2,3 を活性化させ、高濃度 (30 μ M 以上) では Orai1,2 を抑制し、Orai3 を活性化させる。A, B. それぞれ 5 μ M, 50 μ M 2-APB を適用させた結果を示した。C. A, B における二度目に誘発させた SOCE による Ca^{2+} 濃度変化をまとめた (**; $p < 0.01$ vs control)。例数は図中の括弧内に示した。D. Orai/STIM の mRNA 発現解析を行った。各発現量は GAPDH の発現量で規格化し評価した。

た Ca^{2+} 流入に与える影響を検討した。それぞれのコントロール実験には、各 siRNA に対するスクランブル siRNA を使用した (sc-Orai1, sc-Orai2, sc-STIM1, sc-STIM2)。図 6A, B, C は Orai1 ノックダウンにおける結果を示した。リアルタイム PCR を用いて si-Orai1 の特異性に関して検討し、Orai2, Orai3 の mRNA 発現には影響がないことを確認した (sc-Orai1; Orai1: 0.076 ± 0.011 , Orai2: 0.056 ± 0.009 , Orai3: 0.015 ± 0.002 , si-Orai1; Orai1: 0.016 ± 0.001 , Orai2: 0.063 ± 0.004 , Orai3: 0.020 ± 0.0009 , ** $p < 0.01$ vs. sc-Orai1) (図 6A)。si-Orai1 導入細胞における SOCE を介した Ca^{2+} 流入を検討した。1 μ M TG 前処置に

より完全に細胞内の Ca^{2+} を除去した後、 Ca^{2+} 除去細胞外液から 2.2 mM Ca^{2+} 含有溶液に置換することで SOCE を誘発させ、Orai1 ノックダウンによる影響を検討した(図 6B)。図 6C において、sc-/si-Orai1 を導入した t-BBEC117 において誘発された SOCE をピークにおける Ca^{2+} 濃度変化としてまとめた(sc-Orai1: 228.39 ± 11.23 , si-Orai1: 112.95 ± 10.86 , $n=77, 90$, ** $p < 0.01$ vs. sc-Orai1)。図 6D, E, F は STIM1 ノックダウンにおける結果を示した。リアルタイム PCR を用いて si-STIM1 の特異性に関して検討し、STIM2 の mRNA 発現には影響がないことを確認した(sc-STIM1; STIM1: 0.043 ± 0.0012 , STIM2: 0.153 ± 0.0024 , si-STIM1; STIM1: 0.0235 ± 0.0005 , STIM2: 0.165 ± 0.0079 , ** $p < 0.01$ vs. sc-STIM1) (図 6D)。si-STIM1 導入細胞における SOCE を介した Ca^{2+} 流入を検討した。図 5B と同様に SOCE を誘発させ、STIM1 ノックダウンによる影響を検討した(図 6E)。図 6F において、sc-/si-STIM1 を導入した t-BBEC117 において誘発された SOCE をピークにおける蛍光強度比の変化量としてまとめた(sc-STIM1: 702.28 ± 73.32 , si-STIM1: 355.07 ± 29.62 , $n=64, 88$, ** $p < 0.01$ vs. sc-STIM1)。

図 6G, H は Orai2 ノックダウンにおける結果を示した。リアルタイム PCR を用いて si-Orai2 の特異性に関して検討し、Orai1, Orai3 の mRNA 発現には影響がないことを確認した(sc-Orai2; Orai1: 0.081 ± 0.0033 , Orai2: 0.078 ± 0.0037 , Orai3: 0.015 ± 0.0017 , si-Orai2; Orai1: 0.072 ± 0.0052 , Orai2: 0.026 ± 0.0009 , Orai3: 0.023 ± 0.002 , ** $p < 0.01$ vs. sc-Orai2) (図 6G)。図 6H において、sc-/si-Orai2 を導入した t-BBEC117 において誘発された SOCE をピークにおける Ca^{2+} 濃度変化としてまとめた(sc-Orai2: 564.25 ± 37.43 , si-Orai2: 539.77 ± 29.24 , $n=112, 91$)。図 6I, J は STIM1 ノックダウンにおける結果を示した。リアルタイム PCR を用いて si-STIM2 の特異性に関して検討し、STIM1 の mRNA 発現には影響がないことを確認した(sc-STIM2; STIM1: 0.0460 ± 0.0062 , STIM2: 0.164 ± 0.0011 , si-STIM2; STIM1: 0.0465 ± 0.0013 , STIM2: 0.100 ± 0.0029 , ** $p < 0.01$ vs. sc-STIM2) (図 6I)。図 6J において、sc-/si-STIM2 を導入した t-BBEC117 において誘発された SOCE をピークにおける Ca^{2+} 濃度変化としてまとめた(sc-STIM2: 531.45 ± 60.56 , si-STIM2: 520.39 ± 46.79 , $n=51, 85$)。

以上の結果から、Orai1, STIM1 のノックダウンは SOCE 活性を減弱させるが、Orai2, STIM2 のノックダウンは SOCE 活性には影響を与えないことが示された。よって、対数増殖期の t-BBEC117 において、主に機能発現している CRAC チャネルは Orai1 と STIM1 からなる分子複合体で構成されることが明らかとなった。

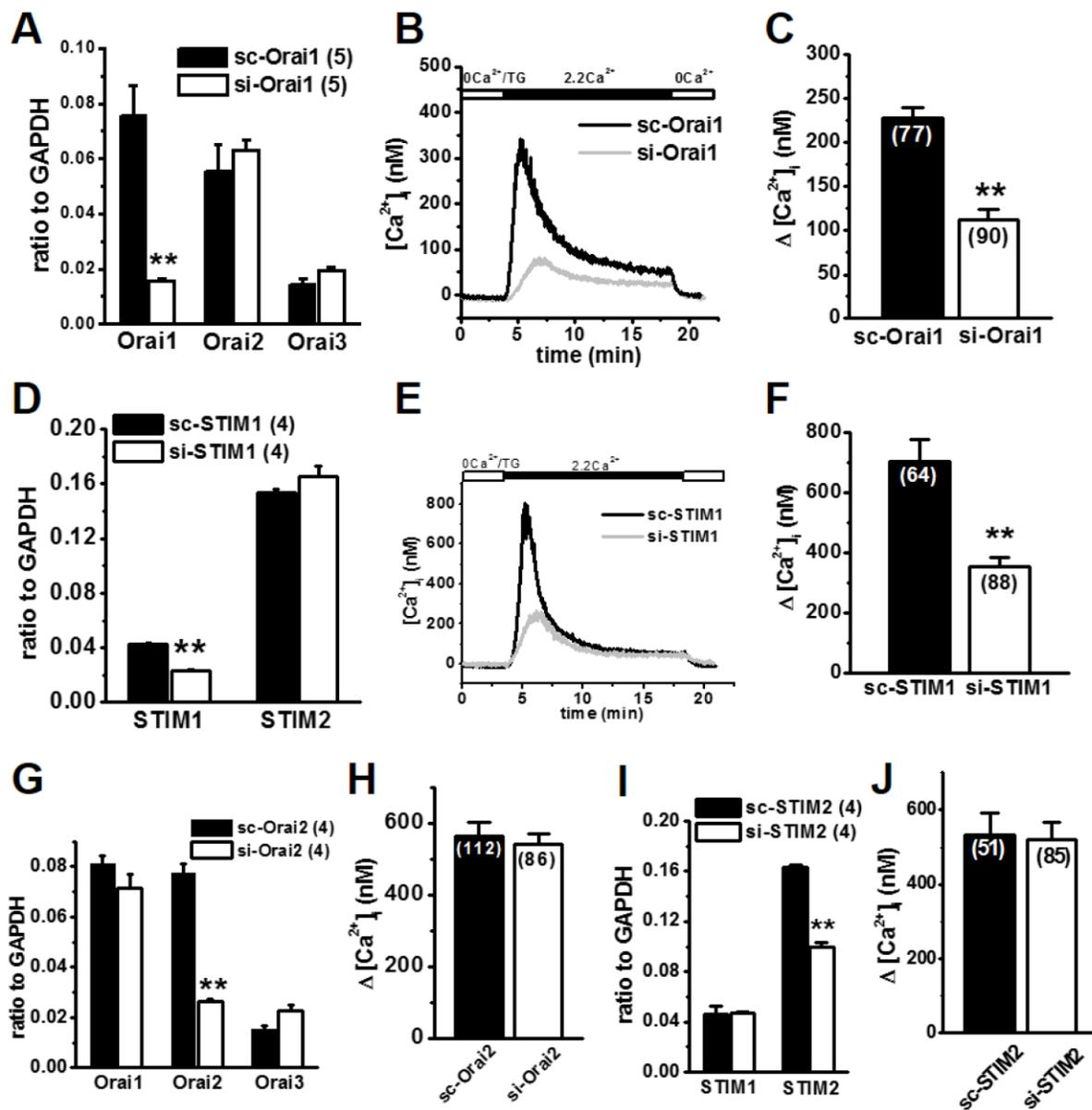


図6 t-BBEC117におけるsiRNAを用いたOrai/STIMの分子同定

tBBEC117においてOrai1, Orai2, STIM1, STIM2に対するsiRNA (si-Orai1, si-Orai2, si-STIM1, si-STIM2)を導入しSOCEへの影響を検討した。対照群には各siRNAに対するスクランブル配列を持つsiRNA (sc-Orai1, sc-Orai2, sc-STIM1, sc-STIM2)を導入した。siRNA導入後、48-72時間培養し各実験を行った。例数は図中の括弧内に示した。A, D, G, I.リアルタイムPCRによりsiRNAの特異性に関してmRNAレベルで検討を行った(**; $p < 0.01$ vs scramble)。B, E. siRNA導入細胞においてSOCEを誘発させた際の典型的なCa²⁺濃度変化のトレースを示した。C, F, H, J. 各種siRNA導入細胞においてSOCEを誘発させ、Ca²⁺濃度変化を評価した(**; $p < 0.01$ vs scramble)。

1-4. t-BBEC117 における Orai1/STIM1 ノックダウンによる細胞増殖への影響

細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動は、多くの細胞において細胞増殖、分化、遊走、遺伝子発現、細胞死など様々な細胞生理機能の制御に関与することが報告されている。特に CRAC チャネルを介した Ca^{2+} シグナルは免疫細胞をはじめとして、臍帯静脈内皮細胞、網膜色素上皮細胞などの非興奮細胞(60-62)や血管平滑筋細胞や気道平滑筋細胞などの興奮性細胞(58,63)、また神経膠芽細胞腫、子宮頸部癌などの腫瘍細胞(55,64)における細胞増殖に関与することが多数報告されている。そこで本研究では、脳血管内皮細胞の細胞増殖に対する CRAC チャネルの寄与を検討した。

t-BBEC117 において、主に CRAC チャネルを構成すると考えられる Orai1 と STIM1 に着目して実験を行った。細胞増殖アッセイには、MTT 法を用いた。CRAC チャネルの阻害薬として 50 μM 2-APB を使用し細胞生存度を評価した。図 7A において、2-APB 非存在下、存在下で 96 時間まで細胞を培養し、0 時間における細胞生存度を 1.0 として相対的な細胞増殖を 0 から 96 時間まで 24 時間毎に示した。その結果、48 時間、72 時間、96 時間において 2-APB の適用により細胞増殖が有意に減少していた(24 時間: control; 2.182 ± 0.015 , 2-APB; 2.004 ± 0.038 , 48 時間: control; 2.378 ± 0.033 , 2-APB; 2.112 ± 0.029 , 72 時間: control; 3.283 ± 0.042 , 2-APB; 2.694 ± 0.0078 , 96 時間: control; 4.310 ± 0.052 , 2-APB; 3.294 ± 0.055 , ** $p < 0.01$ vs. control)。

2-APB を用いた検討より、CRAC チャネルの抑制は t-BBEC117 においても、他の細胞種と同様に細胞増殖の抑制を引き起こした。2-APB は CRAC チャネル阻害薬として使用される一方で IP_3 受容体の阻害薬としても使用される薬物である。そこで細胞増殖に対する CRAC チャネルの寄与に関して、より特異的に検討を行うために、Orai1 及び STIM1 に対する siRNA を使用することで細胞増殖に対する影響を検討した。siRNA 導入は電ポレーション法により行い、約 12 時間培養後、細胞を 96 ウェルプレートへ播種した。96 ウェルプレートへの播種 6 時間後を 0 時間として MTT 法を適用した。siRNA 導入細胞に対して、96 時間まで細胞を培養し、0 時間における細胞生存度を 1.0 として相対的な細胞増殖を 0 から 96 時間まで 24 時間毎に示した。Orai1 をノックダウンしたところ、図 7B に示すようにいずれの時間においても有意に細胞増殖が抑制された(24 時間: sc-Orai1; 1.815 ± 0.033 , si-Orai1; 1.612 ± 0.033 , 48 時間: sc-Orai1; 2.658 ± 0.060 , si-Orai1; 2.207 ± 0.16 , 72 時間: sc-Orai1; 3.516 ± 0.093 , si-Orai1; 2.727 ± 0.045 , 96 時間: sc-Orai1; 4.358 ± 0.057 , si-Orai1; 3.364 ± 0.073 , ** $p < 0.01$ vs. sc-Orai1)。同様に STIM1 のノックダウンによる細胞増殖への影響を検討したところ、96 時間において有意に細胞増殖が抑制された(24 時間: sc-STIM1; 1.537 ± 0.054 , si-STIM1; 1.542 ± 0.075 , 48 時間: sc-STIM1; 1.985 ± 0.039 , si-STIM1; 1.928 ± 0.056 , 72 時間: sc-STIM1; 2.502 ± 0.059 , si-STIM1; 2.277 ± 0.094 , 96 時間: sc-STIM1; 2.996 ± 0.069 , si-STIM1; 2.651 ± 0.055 , ** $p < 0.01$ vs. sc-STIM1) (図 7C)。

以上の結果から t-BBEC117 において Orai1/STIM1 から構成される CRAC チャネルは、細胞内 Ca^{2+} シグナルに関与し細胞増殖の制御に寄与することが明らかとなった。

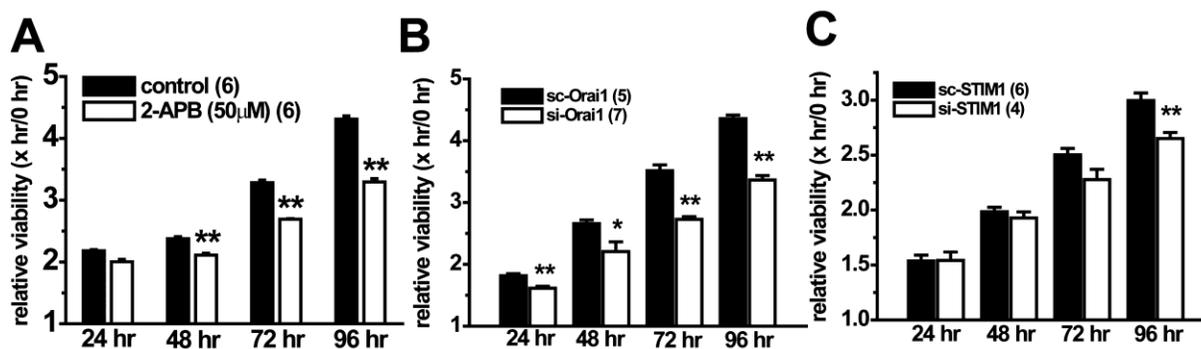


図7 t-BBEC117の細胞増殖に対するOrai1及びSTIM1の寄与

MTT法による細胞増殖の検討。0時間における細胞生存度を1.0として規格化し、各時間における細胞増殖を評価した。例数は図中の括弧内に示した。A. 50 μM 2-APBによる細胞増殖の抑制(**; p<0.01 vs. control)。B. Orai1ノックダウン細胞における細胞増殖の抑制(**; p<0.01 vs. control)。C. STIM1ノックダウン細胞における細胞増殖の抑制(**; p<0.01 vs. control)。

1-5. 細胞周期依存的なストア作動性Ca²⁺流入の変動

細胞増殖とは細胞がDNAの複製と分裂を行うことにより細胞数が増加することを指し、その一連の過程を細胞周期という。細胞はその増殖過程において、DNA複製を行うS期と細胞分裂を行うM期を交互に繰り返しており、M期とS期の間をG1期、S期とM期の間をG2期といいG1期-S期-G2期-M期の周期を形成している。また、細胞周期から外れ増殖を行っておらず、静止状態にある細胞はG0期にあると呼ばれる。細胞内Ca²⁺シグナルは細胞増殖の制御に深く関与することはよく知られている。一般的に、G1期からS期にかけては細胞外からのCa²⁺流入や細胞内Ca²⁺濃度の周期的な振動を示すCa²⁺オシレーションが大きく寄与する一方で、M期においてはIP₃受容体を介した一過性のCa²⁺シグナルが重要な役割を果たすと考えられている(65,66)。そこで、t-BBEC117において細胞周期依存的なCRACチャネル活性を検討することで、細胞周期進行におけるCRACチャネルの寄与を解明することを目指した。

細胞周期依存的なストア作動性Ca²⁺流入を測定するために、過剰チミジン法による細胞周期同調培養を行った。過剰チミジン法によりt-BBEC117の細胞周期をG1/S期の境界に同調させた後に、正常培地に置換することで経時的に細胞周期を進行させ、各時間に細胞を回収することで各細胞周期の細胞群を取得した。顕著に細胞周期を分けることができたものとして、正常培地へ置換後、0時間のものをG0/G1期の細胞群、6時間のものをG2/M期の細胞群とした。また、対数増殖期と類似した細胞周期

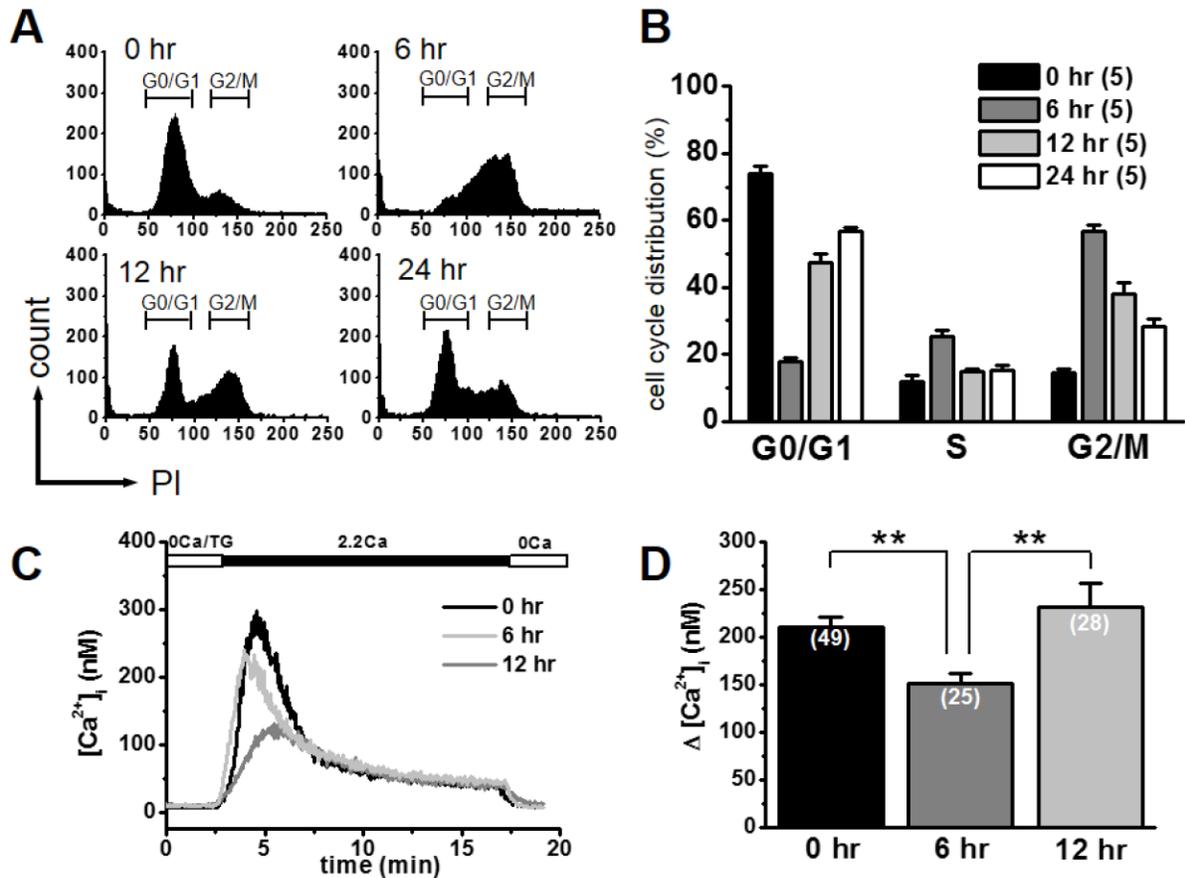


図 8 t-BBEC117 における細胞周期依存的なストア作動性 Ca²⁺流入の変動

過剰チミジン法を用いて G1/S 期境界に同調した t-BBEC117 に対して、培養培地を正常培地に置換することで経時的に細胞周期を進行させ、3 時間毎に細胞を回収した。Propidium iodide (PI) により蛍光標識し、フローサイトメーターにより細胞周期を測定した。例数は図中の括弧内に示した。A, B. 正常培地置換後、0, 6, 12, 24 時間における細胞周期解析の結果を示した。C. 細胞周期を顕著に分けることができたものとして、0 時間を G0/G1 期、6 時間を G2/M 期の細胞群として、また 12 時間を対数増殖期の細胞群として取得し、それぞれ SOCE 活性の測定を行った。D. 各時間における細胞に対して SOCE による Ca²⁺濃度変化を評価した (**; p<0.01 vs. 0, 12 時間)。

分布を示すものとして 12 時間における細胞群を回収し実験に使用した。図 8A, B では各時間において回収した細胞群の細胞周期をフローサイトメーターにより測定した結果を示した (0 時間: G0/G1; 74.1±2.2%, S; 11.6±1.9%, G2/M; 14.3±1.3%, 6 時間: G0/G1; 17.9±1.0%, S; 25.4±1.9%, G2/M; 56.7±2.1%, 12 時間: G0/G1; 47.4±2.8%, S; 14.7±0.9%, G2/M; 37.9±3.5%, 24 時間: G0/G1; 56.7±1.2%, S; 15.1±1.6%, G2/M; 28.2±2.2%)。0 時間、6 時間、12 時間において取得した細胞群に対してストア作動

性 Ca^{2+} 流入の測定を行った(図 8C)。その結果、0 時間及び 12 時間における細胞と比較して、6 時間における細胞ではストア作動性 Ca^{2+} 流入を介した Ca^{2+} 濃度上昇が有意に抑制された(0 時間: 211.02 ± 10.59 , 6 時間: 151.90 ± 10.38 , 12 時間: 232.10 ± 24.12 , $n=49, 25, 28$, **, $p < 0.01$ vs 0, 12 時間)(図 8D)。以上の検討より、正常培地へ置換後 6 時間の細胞群、すなわち G2/M 期の細胞群において SOCE 活性が有意に減弱していることが明らかとなった。

1-6. 細胞周期依存的なイオンチャネル発現変化とストア作動性 Ca^{2+} 流入活性への影響

細胞周期とイオンチャネルの関係はこれまでに癌細胞を中心に検討されてきた。細胞周期依存的なイオンチャネル機能に関しては様々な報告があるものの、主として K^{+} チャネルの阻害は G1 期から S 期への移行の阻害、 Ca^{2+} チャネルの阻害は G2/M 期における細胞周期進行を抑制する(67)。そこで、t-BBEC117 における細胞周期依存的なイオンチャネル発現を検討することで、G2/M 期において生じたストア作動性 Ca^{2+} 流入活性の低下の原因を明らかにすることを旨とした。

図 8 と同様に各細胞周期の細胞群を取得し実験に使用した。0 時間、6 時間、12 時間における細胞群に対して、リアルタイム PCR 法により Orai2 発現を検討したところ、0 時間及び 12 時間と比較して 6 時間において有意に Orai2 mRNA 発現が増大していた(0 時間: 0.084 ± 0.0059 , 6 時間: 0.116 ± 0.0051 , 12 時間: 0.089 ± 0.0054 , *, $p < 0.05$ vs 0, 12 時間)(図 9A)。また、ウェスタンブロット法によりタンパク発現を比較したところ、mRNA と同様に、0 時間と比較して 6 時間において有意に Orai2 タンパク発現が増大していた(6 時間: 1.66 ± 0.20 , *, $p < 0.05$ vs 0 時間)(図 9B)。また、t-BBEC117 における Ca^{2+} 流入経路として、当研究室ではこれまでに TRPC1, TRPC3, TRPC5 の mRNA 発現を確認している(68)。これら TRPC1, 3, 5 に加え、Orai1, Orai3, STIM1, STIM2 に対して、リアルタイム PCR 法により細胞周期依存的な mRNA 発現変化の検討を行ったところ、0 時間、6 時間、12 時間のいずれにおいても変化は観られなかった(data not shown)。以上の結果から、6 時間の細胞すなわち G2/M 期の細胞において Orai2 発現が増大していることが明らかとなった。

G2/M 期の細胞群において生じた SOCE 活性低下が、Orai2 発現上昇に起因するものであるかを検討するために Orai2 ノックダウン細胞に対して、図 8A と同様に細胞周期同調培養を行い、G0/G1 期及び G2/M 期の細胞を取得した。また、それぞれ G0/G1 期、G2/M 期の細胞群において Orai2 mRNA 発現が抑制されていることをリアルタイム PCR により確認した(data not shown)。図 8C と同様に 0 時間、6 時間における SOCE 活性を検討した。sc-Orai2 導入細胞では図 8C で示した結果と同様に、0 時間と比較して 6 時間の細胞で SOCE 活性の低下が観られたが、si-Orai2 導入細胞において、この SOCE 活性の低下が有意に回復していた(sc-Orai2: 0 時間; 302.71 ± 12.11 , 6 時間; 236.49 ± 14.50 , $n=25, 41$, si-Orai2: 0 時間; 270.66 ± 9.72 , 6 時間; 327.72 ± 20.30 , $n=36, 31$, **, $p < 0.01$ vs. sc-Orai2)(図 9C)。

また、Orai2 の SOCE 活性に対する影響を検討するために、bovine Orai2 を遺伝子クローニングし t-BBEC117 に対してリポフェクションにより Orai2 を一過性に強制発現させ SOCE 活性への影響を検討した。Mock と比較し、Orai2 発現細胞では有意に SOCE 活性が低下していた (mock: 253.31 ± 27.02 , Orai2: 200.24 ± 17.02 , $n=32, 27$, *, $p < 0.05$ vs. mock) (図 9D)。以上の結果から、t-BBEC117 において G2/M 期に発現増大した Orai2 は SOCE に対して抑制的に作用することで細胞内 Ca^{2+} シグナルの制御に寄与していることが明らかとなった。

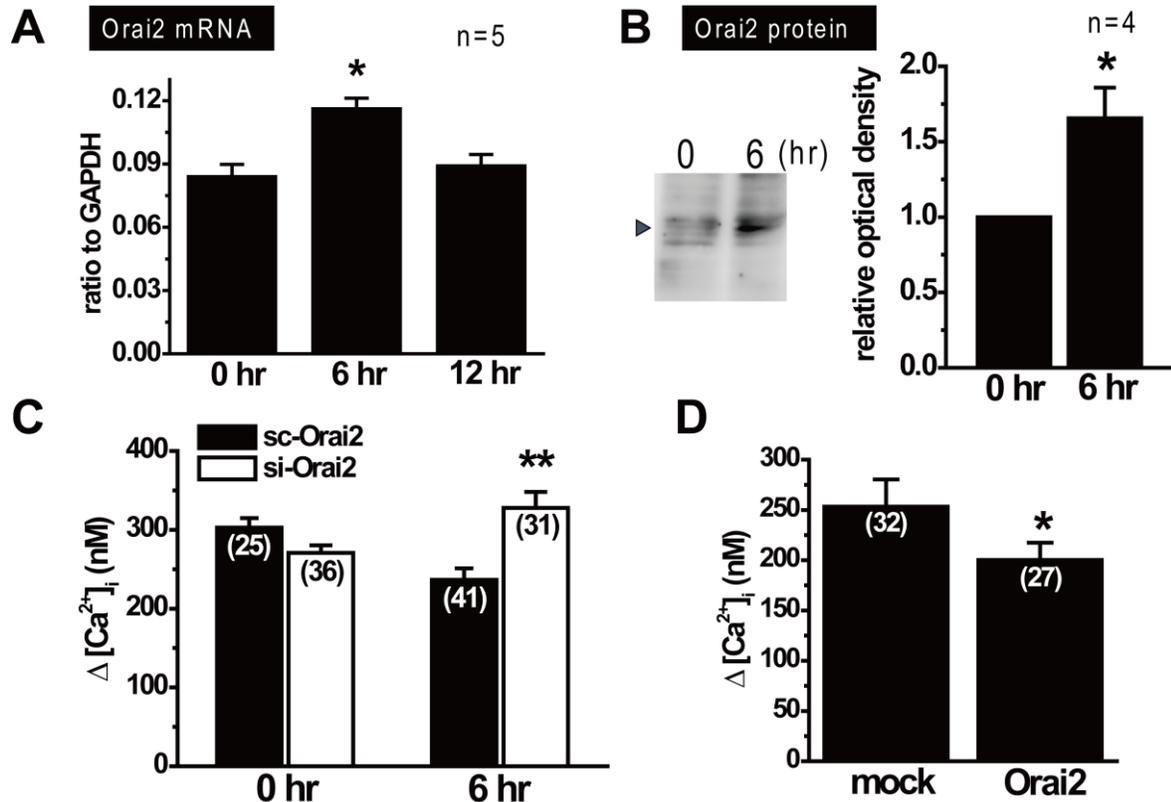


図 9 t-BBEC117 における細胞周期依存的な Orai2 発現変動とストア作動性 Ca^{2+} 流入への影響

過剰チミジン法を用いて G1/S 期境界に同調した t-BBEC117 に対して、培養培地を正常培地に置換することで経時的に細胞周期を進行させた。正常培地へ置換後 0 時間、6 時間の細胞群をそれぞれ G0/G1 期、G2/M 期の細胞群として実験に用いた。例数は図中の括弧内に示した。A. 細胞周期依存的な Orai2 mRNA 発現に関して、リアルタイム PCR 法により検討した (*; $p < 0.05$ vs. 0, 12 時間)。B. 細胞周期依存的な Orai2 タンパク発現に関して、ウェスタンブロット法により検討した (*; $p < 0.05$ vs. 0 時間)。C. Orai2 ノックダウン細胞における細胞周期依存的な SOCE 活性の変動を検討した (**; $p < 0.01$ vs. sc-Orai2)。sc-/si-Orai2 導入細胞に対して同調培養を行い、正常培地へ置換後 0 時間、6 時間の細胞群をそれぞれ G0/G1 期、G2/M 期の細胞群として実験に用いた。D. Orai2 の一過性強制発現による SOCE への影響を検討した。各細胞において SOCE を誘発させ、 Ca^{2+} 濃度変化を評価した (*; $p < 0.05$ vs mock)。

1-7. t-BBEC117 の細胞増殖に対する Orai2 の寄与

t-BBEC117 において、Orai2 は細胞周期依存的に発現が変動し SOCE 活性の制御に関与することが明らかとなった。SOCE を介した Ca^{2+} シグナルは多くの細胞種において細胞増殖に寄与することが示されていることから、Orai2 の細胞増殖へ与える影響について検討を行った。

細胞増殖に対する Orai2 の寄与を検討するために、Orai2 に対する siRNA を使用することで細胞増殖に対する影響を検討した。siRNA 導入は電ポレーション法により行い、約 12 時間培養後、細胞を 96 ウェルプレートへ播種した。96 ウェルプレートへの播種 6 時間後を 0 時間として MTT 法を適用した。siRNA 導入細胞に対して、96 時間まで細胞を培養し、0 時間における細胞生存度を 1.0 として相対的な細胞増殖を 0 から 96 時間まで 24 時間毎に示した。Orai2 をノックダウンしたところ、図 10A に示すように 48 時間、72 時間において有意に細胞増殖が抑制された (24 時間: sc-Orai2; 1.596 ± 0.017 , si-Orai2; 1.494 ± 0.082 , 48 時間: sc-Orai2; 2.131 ± 0.043 , si-Orai2; 1.874 ± 0.013 , 72 時間: sc-Orai2; 2.744 ± 0.065 , si-Orai2; 2.396 ± 0.087 , 96 時間: sc-Orai2; 3.379 ± 0.12 , si-Orai2; 3.069 ± 0.13 , ** $p < 0.01$ vs. sc-Orai2)。

細胞周期進行に対する Orai2 の寄与を検討するためにフローサイトメーターを用いて、細胞周期の解析を行った。siRNA 導入後、72 時間の細胞を回収し、Propidium iodide (PI) により蛍光標識し細胞周期を測定した。sc-Orai2 導入細胞と比較して、si-Orai2 導入細胞では G0/G1 期の細胞周期を示す細胞が有意に減少していた (sc-Orai2: G0/G1; $61.5 \pm 0.6\%$, S; $11.6 \pm 0.6\%$, G2/M; $27.0 \pm 0.4\%$, si-Orai2: G0/G1; $56.8 \pm 0.4\%$ S; $13.9 \pm 0.6\%$, G2/M; $29.3 \pm 0.6\%$, ** $p < 0.01$ vs. sc-Orai2) (図 10B)。

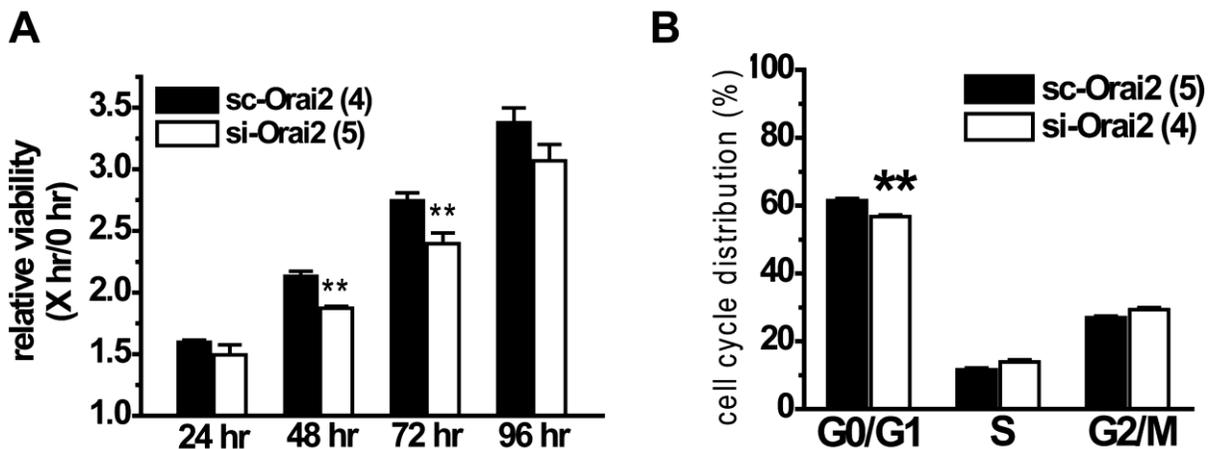


図 10 t-BBEC117 の細胞増殖に対する Orai2 の寄与

A. MTT 法による細胞増殖の検討。0 時間における細胞生存度を 1.0 として規格化し、各時間における細胞増殖を評価した。Orai2 ノックダウン細胞における細胞増殖の抑制 (**; $p < 0.01$ vs. control)。B. 細胞周期進行に対する Orai2 の寄与の検討。sc-/si-Orai2 導入後、72 時間の細胞に対して Propidium iodide (PI) により蛍光標識し、フローサイトメーターにより細胞周期を測定した (**; $p < 0.01$ vs. sc-Orai2)。例数は図中の括弧内に示した。

1-8. 要約と考察

本研究において以下のことを明らかにした。

1. t-BBEC 117 において、主に Orai1 と STIM1 により構成される CRAC チャネルが機能発現している。
2. t-BBEC 117 において、Orai1/STIM1 を介した Ca^{2+} シグナルは細胞増殖に関与する。
3. t-BBEC 117 において、他の細胞周期と比較し G2/M 期において Orai2 発現上昇に起因する SOCE 活性の低下が生じる。
4. t-BBEC117 の正常な細胞増殖には、Orai1 の定常的な発現に加え、Orai2 発現変化による SOCE 制御が関与している。

脳血管内皮細胞は血液脳関門の実体であり、末梢の血管内皮細胞とは異なる性質を有する。その一つが、周囲のアストロサイトからの分泌因子によるタイトジャンクションの形成であり、物質の移動が極端に制限されている(5)。この血液脳関門による物質移行の制限は脳の発達、成熟あるいは恒常性維持において極めて重要な役割を担っており、血液脳関門の機能維持には脳血管内皮細胞の細胞増殖が深く関与している。細胞内遊離 Ca^{2+} は最も重要なセカンドメッセンジャーのうちの 1 つであり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は様々な細胞生理機能の制御に関与している。細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇により活性化するストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) は、興奮性細胞、非興奮性細胞を問わず、広く Ca^{2+} シグナルを形成している(69)。SOCE を構成する Orai や STIM の機能欠損により、表現型への様々な影響が報告されていることから、生理機能制御に対し SOCE が大きく寄与していることが示されている(70-74)。特に、Orai1/STIM1 で構成される SOCE がヒト臍帯静脈内皮細胞において細胞増殖の制御に関与することが報告される(60)なか、最近になり、SOCE シグナルは様々な種類の癌細胞及び平滑筋細胞において細胞遊走や細胞周期進行への関与が報告されている(55-58)。多くの細胞種において Orai と STIM が SOCE の分子実体として考えられているが、癌細胞や平滑筋細胞をはじめとした細胞種による SOCE 分子実体の差異に関しても今後更なる検討が必要である。

本研究において、t-BBEC117 において生じた SOCE は、これまでの報告同様に典型的な薬理学的特徴を有していた。すなわち、SOCE を介した Ca^{2+} 流入はランタノイドや SKF96365、高濃度 2-APB により抑制され、低濃度 2-APB により活性化された。また、siRNA を使用した検討では Orai1/STIM1 ノックダウンは SOCE 活性を顕著に減少させるのに対して、Orai2/STIM2 は mRNA 発現が多いにもかかわらずノックダウンによる影響は生じなかった。STIM2 は STIM1 と比較して、Orai の活性化への寄与が小さいといった報告や STIM1 と異なり STIM2 の過剰発現は SOCE 活性を低下させるといった報告も行われている(75,76)。これらの報告を踏まえて、本研究で得られた結果は t-BBEC117 の SOCE を担う分子実体が主に Orai1 と STIM1 であることを支持するものである。また、t-BBEC117 の SOCE に対するランタノイドの抑制作用は、Orai 単独で構成される SOCE を介した Ca^{2+} 流入への作用と比較して、弱いものであった(77)。

これまでの血管内皮細胞を用いた研究において TRPC チャンネルが血管内皮細胞の SOCE に関与することが報告(78,79) されており、当研究室においても t-BBEC117 における TRPC1, TRPC3, TRPC5 の mRNA 発現を明らかにしている(68)。TRPC1, 3, 5 いずれも SOCE の分子候補として考えられている(47,69,80)。TRPC4 や TRPC5 を介した Ca^{2+} 流入は Gd^{3+} の適用により活性化するため(81,82)、t-BBEC117 において機能発現する SOC チャンネルは Gd^{3+} に対する反応性を考慮すると Orai1 と TRPC チャンネルにより構成されている可能性も示唆される。

細胞分裂は、細胞周期進行を通して正常な細胞増殖を保つうえで非常に重要な過程である。細胞周期進行には、一過性の Ca^{2+} スパイクから Ca^{2+} オシレーションまで様々な種類の Ca^{2+} シグナルが関与しており、正常な細胞増殖の制御に寄与している(65)。また、細胞周期依存的な Ca^{2+} シグナルの変化として、HeLa 細胞をヒスタミン刺激した際の Ca^{2+} 流入が細胞分裂期に減弱することが報告されている(83)。また、脂肪細胞株 RBL-2H3 の細胞周期進行過程において、CRAC 電流が M 期に減少し、G1/S 期に増加することも報告されている(84)。本研究において、t-BBEC117 の細胞周期依存的な SOCE 活性変化を検討したところ、G0/G1 期と比較して G2/M 期において SOCE 活性が低下することが明らかとなった。この結果は他の細胞種における報告と類似するものであった。この G2/M 期における SOCE 活性低下の原因を検討したところ、G2/M 期に Orai2 の発現が増大することに起因するものであった。Orai の発現制御機構に関して、Orai1 はユビキチンリガーゼ Nedd4-2 の基質となりユビキチン化されることでプロテアソームにより分解を受ける(85,86)、あるいは Orai1 と STIM1 の発現制御には転写制御因子 NF- κ B が関与するといった報告が行われている(87)ものの、Orai/STIM の他のサブタイプにおける制御機構は未だ充分には検討されておらず今後の検討課題である。

細胞周期依存的な Orai/STIM の機能変化に関しては、*Xenopus* 卵母細胞の減数分裂時における SOCE 活性の検討を行った研究において、減数分裂時に STIM1 の凝集阻害及び、Orai1 の細胞質内への移行が生じることで SOCE 活性が抑制されることが示されている(88,89)。さらには、HEK293 及び HeLa 細胞を使用した検討において、有糸分裂時に STIM1 がリン酸化を受けることで SOCE 活性を低下させることが報告されている(90)。本研究で明らかとした G2/M 期における Orai2 発現上昇による SOCE 活性の抑制は、これらの SOCE 活性制御機構に加え、新たな細胞周期進行制御機構である。我々は Orai2 による SOCE 活性の抑制機構に関して詳細な検討を行っていないが、SOCE の機能及び活性制御機構に関して以下のような報告が行われている。HEK293 に Orai1 を単独で発現させた時と比較して Orai1+Orai2 を発現させた場合 CRAC 電流が有意に抑制される(91)。機能的な Orai チャンネルは、一般的にはホモ 4 量体を形成すると考えられている(27,92)が、ヘテロ他量体の形成も報告されている(93)。Orai1 と Orai3 で構成されるヘテロ Orai チャンネルは、arachidonate-regulated Ca^{2+} -sensitive (ARC) channel を形成する(94,95)。ARC チャンネルの活性制御においても STIM1 は重要な役割を担うものの、小胞体膜と細胞膜の近接部(ER-PM junction)への凝集は STIM1 非依存的に起こることから、一般的な SOCE と

は異なる性質を有すると考えられる(96)。また、X線結晶構造解析により Orai1 チャンネルの構造が示された(97)。結晶が得られた Orai チャンネルは 6 量体を構成していたことから、従来の 4 量体に加えて 6 量体で機能している可能性を示すものである。しかしながら、4 量体と比較し 6 量体の Orai チャンネルは透過するイオンの選択性が大きく異なっており、4 量体では比較的 Ca^{2+} 選択性が高いのに対して 6 量体では Ca^{2+} 選択性が低く Na^{+} の透過性が上昇していた。また、TRPC1-STIM1-Orai1 の 3 者からなる複合体が、ストア枯渇下における SOCE の活性化に寄与することが報告されている(98)。このように Orai チャンネルは、多量体形成、ヘテロマー形成、他のイオンチャンネルとの機能連関など様々な要因により制御を受けていると考えられ、本研究において明らかとした Orai2 発現増加がどのような機構を介して SOCE 活性を抑制しているかは今後の更なる検討が必要である。

結論として、Orai2 は細胞周期に依存して発現が変動することで細胞周期進行に関与する。G0/G1 期には Orai2 発現は抑制されており、主に Orai1 で構成される SOCE への影響は比較的弱い。一方で、G2/M 期においては Orai2 発現が上昇し、SOCE に対して抑制的に作用することで細胞内 Ca^{2+} シグナルの制御に寄与していると考えられる(図 11)。

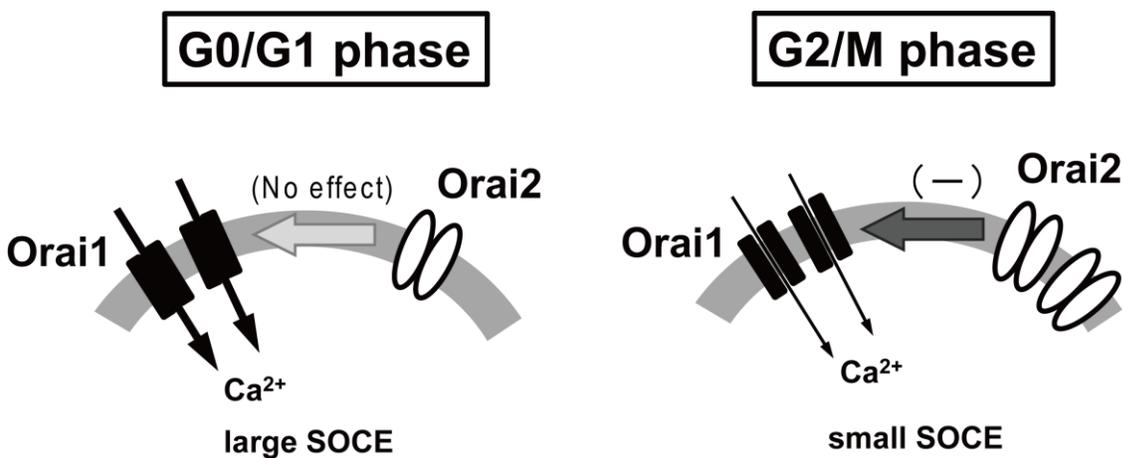


図 11 t-BBEC117 の細胞周期進行に伴う Orai2 機能の概略図

G0/G1 期において、Orai2 発現は低く、Orai1 を介した SOCE への影響は比較的小さい。一方、G2/M 期において Orai2 発現は増大し、作用機構は不明であるが Orai1 を介した SOCE に対して抑制的に作用する。また、G0/G1 期及び G2/M 期の間では Orai1 の発現量に変化は見られなかった。

2. ストレス負荷による脳血管内皮細胞死とイオンチャネルによるその制御機構

血液脳関門は脳への物質輸送において中心的な役割を果たすことで、中枢神経系の恒常性維持機構に深く関与している。脳血管内皮細胞同士はタイトジャンクションと呼ばれる特殊な細胞間結合をとっており、末梢血管内皮細胞と比較してはるかに強固なバリア機能を有している。一方で、多くの疾患時において血液脳関門の機能変性が報告されている。脳卒中、脳梗塞、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病などの脳疾患時においてはタイトジャンクションの変性により血液脳関門の透過性が亢進する(17,19,20,22,99)。また、脳卒中、くも膜下出血、アルツハイマー病などの中枢神経系疾患において脳血管内皮細胞の障害や細胞死が病態の増悪に関与する(18,21,100)。脳血管内皮細胞に対する炎症性サイトカイン、感染症、放射線治療、虚血、変性疾患、細胞の脱落などの急性あるいは慢性的な傷害は細胞障害を引き起こし、細胞死を誘導する(101)。

これまでに K^+ チャネルの活性化が細胞死誘導に寄与するという報告が多数なされている(102,103)。 K^+ チャネル活性化による K^+ 流出は Cl^- 及び Ca^{2+} 透過の電気化学的駆動力を増大させ、 Cl^- を細胞外へ、 Ca^{2+} を細胞内へ移動させる。これにより K^+ チャネルと Cl^- チャネルの活性化による KCl の流出は、水の細胞外への放出を促進させアポトーシスの前段階である細胞収縮を引き起こす。また、過剰な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はミトコンドリア Ca^{2+} 過負荷を生じ細胞死が誘導される(41,69,103,104)。当研究室においても、t-BBEC 117 を用いた検討により ATP 刺激により多くの細胞で細胞増殖が促進するのに対して、内向き整流性 K^+ チャネル (Kir2.1) が高発現している 10~15%程度の細胞群においては、過剰な過分極に起因する細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により細胞死が誘導されることを明らかにしている(105)。

小胞体ストレスは、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患あるいは脳虚血といった疾患時に誘導され、脳血管内皮障害を介して病態の増悪に関与する(23,106-109)。そこで本研究では脳血管内皮細胞株 t-BBEC117 を用いて病態時を想定したストレス条件下において誘導される細胞死における Kir2.1 の関与について検討した。

2-1. t-BBEC 117 における小胞体ストレス負荷

本研究では、t-BBEC117 に対してストレスを負荷し実験を行っている。本研究で使用したツニカマイシンは小胞体ストレス誘導剤として広く使用されている。小胞体ストレスでは様々な因子が活性化することが知られているが、小胞体ストレスにより誘導される細胞死には CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP)やカスパーゼ 12 の活性化が関与することが示されている。そこで、t-BBEC117 におけるノーマル群及

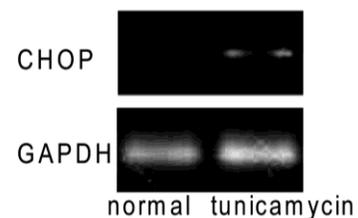


図 12 ストレス負荷による小胞体ストレスマーカーの発現変化

びストレス負荷群において RT-PCR 法により、小胞体ストレス負荷の指標である CHOP mRNA 発現を比較した。ツニカマイシン処理により CHOP の発現レベルが顕著に上昇していることから、小胞体ストレスが負荷されていると考えられた(図 12)。

2-2. ストレス負荷による内向き整流性 K⁺チャネル発現変化

t-BBEC 117 において内向き整流性 K⁺チャネル(Kir2.1)が細胞死の誘導に関与していることから、ノーマル細胞及びストレス負荷細胞において Kir2.1 活性の比較を行った。t-BBEC117 における内向き整流性 K⁺電流をホールセルパッチクランプ法により測定した。保持電位-40 mV に固定し、-120 mV から +40 mV までランプパルス(0.32 V/s)を 15 秒間隔で与えたところ、ストレスを負荷していないノーマル細胞において電流密度-電圧曲線は顕著な内向き電流は示さなかった(図 13A)。

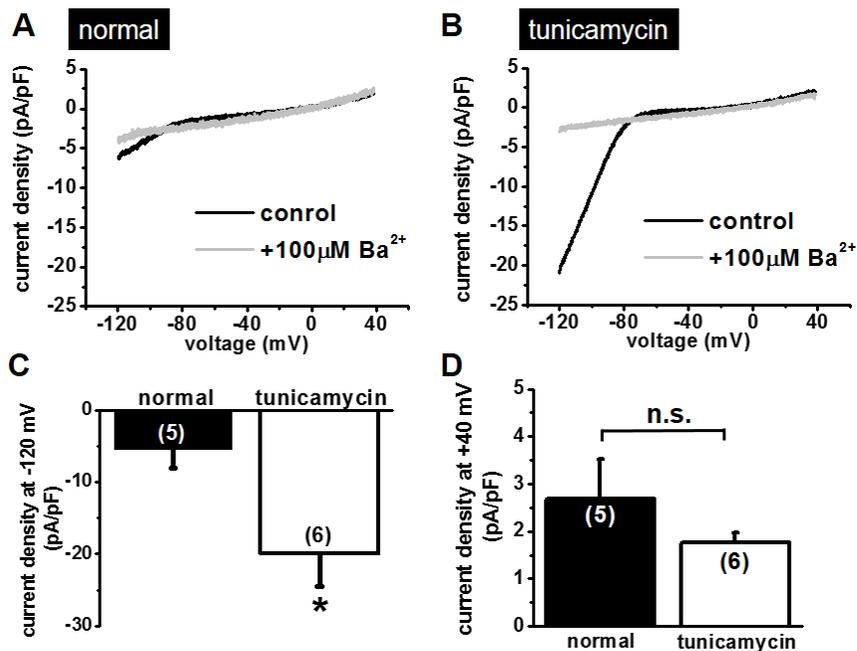


図 13 t-BBEC117 における内向き整流性 K⁺チャネル電流解析

t-BBEC117 における膜電流をホールセルパッチクランプ法により測定した。保持電位-40mV に固定し、-120mV から+40mV までランプパルス(0.32 V/s)を 15 秒間隔で与えた。A. ノーマル群における典型的な電流密度-電圧関係を示した(黒線: コントロール、灰線: 100 μM Ba²⁺適用)。B. ツニカマイシン処理群における典型的な電流密度-電圧関係を示した(黒線: コントロール、灰線: 100 μM Ba²⁺適用)。C. ノーマル群及びツニカマイシン処理群の-120 mV における Ba²⁺感受性電流を比較した(ノーマル群 n=6、ツニカマイシン添加群 n=5、*; p<0.05 vs normal)。D. ノーマル群及びツニカマイシン処理群の+40 mV における Ba²⁺感受性電流を比較した(ノーマル群 n=6、ツニカマイシン処理群 n=5)。

一方、ツニカマイシン処理群における多くの細胞では約-70mV よりも過分極側において大きな内向き電流が観測され、顕著な内向き整流性を示した(図 13B)。内向き整流性とは、脱分極側で外向き電流が流れにくい性質のことを指す。さらに内向き整流性 K⁺チャンネル阻害薬である 100 μM Ba²⁺の適用により内向き電流は抑制された。またこの時の各群での Ba²⁺感受性電流成分を示した(図 13C, D)。-120mV における電流をノーマル群、ツニカマイシン処理群で比較すると、それぞれ、-5.37±2.72 pA/pF、-19.9±4.64 pA/pF でありツニカマイシン添加群において Ba²⁺感受性電流の有意な増加が観察された(ノーマル群 n=6, ツニカマイシン処理群 n=5, *, p<0.05)(図 13C)。+40mV における電流をノーマル群、ツニカマイシン処理群で比較すると、それぞれ、2.68±0.851 pA/pF, 1.75±0.227 pA/pF でありノーマル群とツニカマイシン処理群において Ba²⁺感受性電流に差は観られなかった(ノーマル群 n=6, ツニカマイシン処理群 n=5)(図 13D)。ツニカマイシン処理細胞において測定された Ba²⁺感受性電流の逆転電位は -74.8±1.9(n=6)であり、K⁺チャンネルの寄与を示唆している。以上の結果から、t-BBEC117 においてツニカマイシン処理により Ba²⁺感受性内向き整流性 K⁺電流が増加することが明らかとなった。

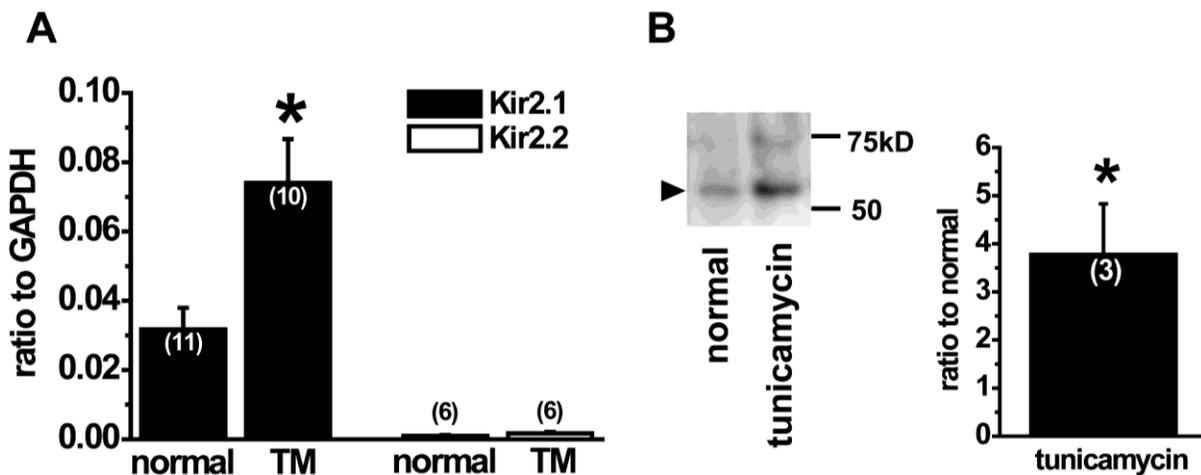


図 14 ストレス負荷による内向き整流性 K⁺チャンネル発現変化解析

A. t-BBEC117における内向き整流性 K⁺チャンネルの mRNA 発現解析をリアルタイム PCR 法を用いて行った。ノーマル群及びツニカマイシン処理群における Kir2.1 mRNA 発現変化を示した(ノーマル群 n=11, ツニカマイシン添加群 n=10, *, p<0.05)。ノーマル群及びツニカマイシン処理群における Kir2.2 mRNA 発現変化を示した(ノーマル群 n=11, ツニカマイシン添加群 n=10)。 **B.** t-BBEC117 における Kir2.1 のタンパク発現解析をウェスタンブロット法を用いて行った(ツニカマイシン処理群: n=3, *, p<0.05)。

t-BBEC117 に対するツニカマイシン処理により、内向き整流性 K⁺チャネルの活性が上昇することが明らかとなったため、Kir2 チャネルのストレス負荷による mRNA 及びタンパク発現変化を検討した。リアルタイム PCR の結果、Kir2.1 mRNA 発現はノーマル群と比較しツニカマイシン処理群において有意に上昇していた(ノーマル群: 0.032±0.006, n=11, ツニカマイシン処理群: 0.074±0.013, n=10, *, p<0.05)。当研究室では RT-PCR を用いた検討により、t-BBEC117 において Kir2.1 に加えて内向き整流性 K⁺チャネルの他のサブタイプである Kir2.2 の mRNA 発現を明らかにしている(105)。そのため Kir2.2 に関して同様の検討を行ったところ、ストレス負荷による mRNA 発現変化は生じなかった(ノーマル群: 0.00097±0.00021, n=11, ツニカマイシン処理群: 0.00167±0.0004, n=10) (図 14A)。また、ウェスタンブロット法により Kir2.1 タンパク発現変化を検討したところ、mRNA と同様に発現が有意に増大していた(ツニカマイシン処理群: 3.78±1.04, n=3, *, p<0.05) (図 14B)。

2-3. 内向き整流性 K⁺チャネル発現増加による膜電位への影響

古典的内向き整流性 K⁺チャネル(Kir2.0)は特に心筋細胞において静止膜電位の形成と安定化、維持に寄与しており、I_{K1} 電流として機能している。また心筋細胞に加え末梢血管内皮細胞における静止膜電位の制御に寄与することも報告されている(47)。そのため、t-BBEC117 において Kir2.1 の発現増加により静止膜電位に影響を与えるかどうか検討を行った。膜電位の測定は膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)により行った。DiBAC₄(3)は細胞膜が脱分極すると蛍光強度が増加し、膜が過分極すると蛍光強度が減少する色素である。各実験の最後に 140mM High K⁺ HEPES 溶液を灌流させ、細胞を近似的に 0 mV に脱分極させ、得られた蛍光強度により規格化し ratio(F/F_{140K})を算出した。ノーマル群(図 15A)及びツニカマイシン処理群(図 15B)における 100 μM Ba²⁺適用による典型的な DiBAC₄(3)蛍光強度比変化のトレースを示した。ノーマル群に比較しツニカマイシン処理によるストレス負荷群においては、定常状態において DiBAC₄(3)の蛍光強度比が有意に低いことから、静止膜電位が過分極側にシフトしていることが明らかとなった。また 100 μM Ba²⁺の適用により蛍光強度比の上昇すなわち脱分極が生じた(ノーマル群: control; 0.468±0.012, Ba²⁺; 0.480±0.009, n=123, ツニカマイシン処理群: control; 0.330±0.021, Ba²⁺; 0.404±0.017, n=50, **, p<0.01 vs. tunicamycin-control, #, p<0.01 vs. normal-control) (図 15C)。このようにツニカマイシン処理群においては、内向き整流性 K⁺チャネルの活性が上昇しており深い静止膜電位の形成に寄与していることが示唆された。

ストレス負荷における静止膜電位の変化をより明確に示すために、フローサイトメトリー法により DiBAC₄(3)蛍光強度(FL1-H)の約 10,000 細胞に対するヒストグラムを作成した。ノーマル群及びツニカマイシン処理群、それぞれにおけるコントロール及び 100 μM Ba²⁺適用における典型的なヒストグラムを示した(左上: ノーマル群コントロール、左下: ノーマル群 Ba²⁺、右上: ツニカマイシン処理群コントロール、右下: ツニカマイシン処理群 Ba²⁺) (図 16A)。

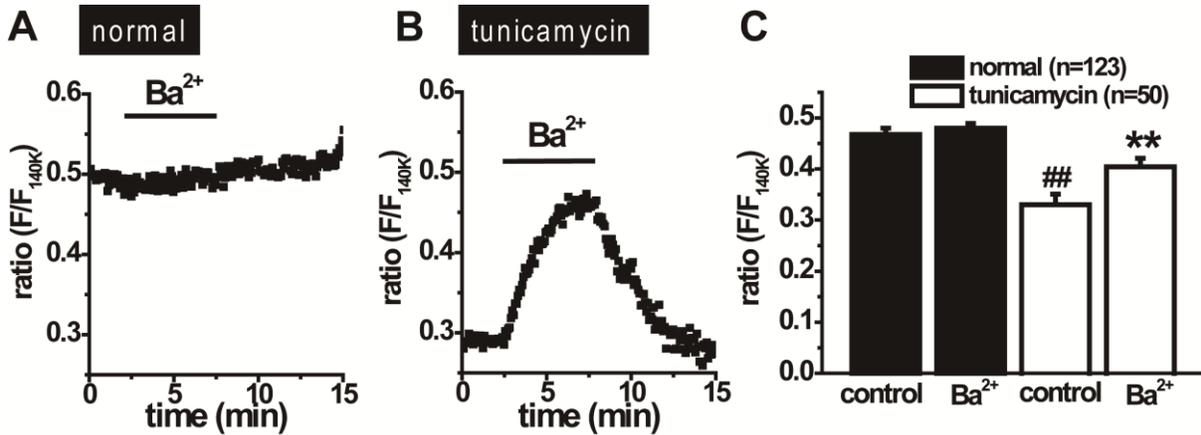


図 15 t-BBEC117 におけるストレス負荷による静止膜電位への影響

t-BBEC117 において膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)を用いて膜電位測定を行った。各実験の最後に 140mM High K⁺ HEPES 溶液を灌流させ、細胞を近似的に 0mV に脱分極させ、得られた蛍光強度により規格化し ratio(F/F_{140K})を算出した。A. ノーマル群における内向き整流性 K⁺チャンネル阻害薬 100 μM Ba²⁺適用による典型的な DiBAC₄(3)蛍光強度比の変化を示した。B. ツニカマイシン処理群における 100 μM Ba²⁺適用による典型的な DiBAC₄(3)蛍光強度比の変化を示した。C. 100 μM Ba²⁺適用前後における DiBAC₄(3)蛍光強度比の変化を各細胞群についてまとめた(ノーマル群: n=123, ツニカマイシン処理群: n=50, **, p<0.01 vs tunicamycin-control, ###; p<0.01 vs. normal-control)。

ノーマル群、ツニカマイシン処理群いずれにおいても DiBAC₄(3)蛍光強度により 2 群に分かれた。蛍光強度の小さいものは膜電位が深く、大きいものは膜電位が浅いと考えられる。さらに 100 μM Ba²⁺適用により蛍光強度の小さいものは蛍光強度の大きい方向へシフトした。このことから蛍光強度の小さく、深い膜電位を持つと考えられる細胞には Kir2.1 が機能的に発現していることが示唆された。また、蛍光強度の小さいものを H1、大きいものを H2 としてそれぞれ算出し、細胞全体に対する深い膜電位を持つ細胞割合として H1/H1+H2 を求めた。ノーマル群に比較しツニカマイシン処理群において細胞割合 (H1/H1+H2) が有意に大きいことから、ツニカマイシン処理群において深い静止膜電位を持つ細胞が有意に増加していることが示唆された(ノーマル群: 0.318±0.009, n=3, ツニカマイシン処理群: 0.423±0.008, n=3, **, p<0.01) (図 16B)。

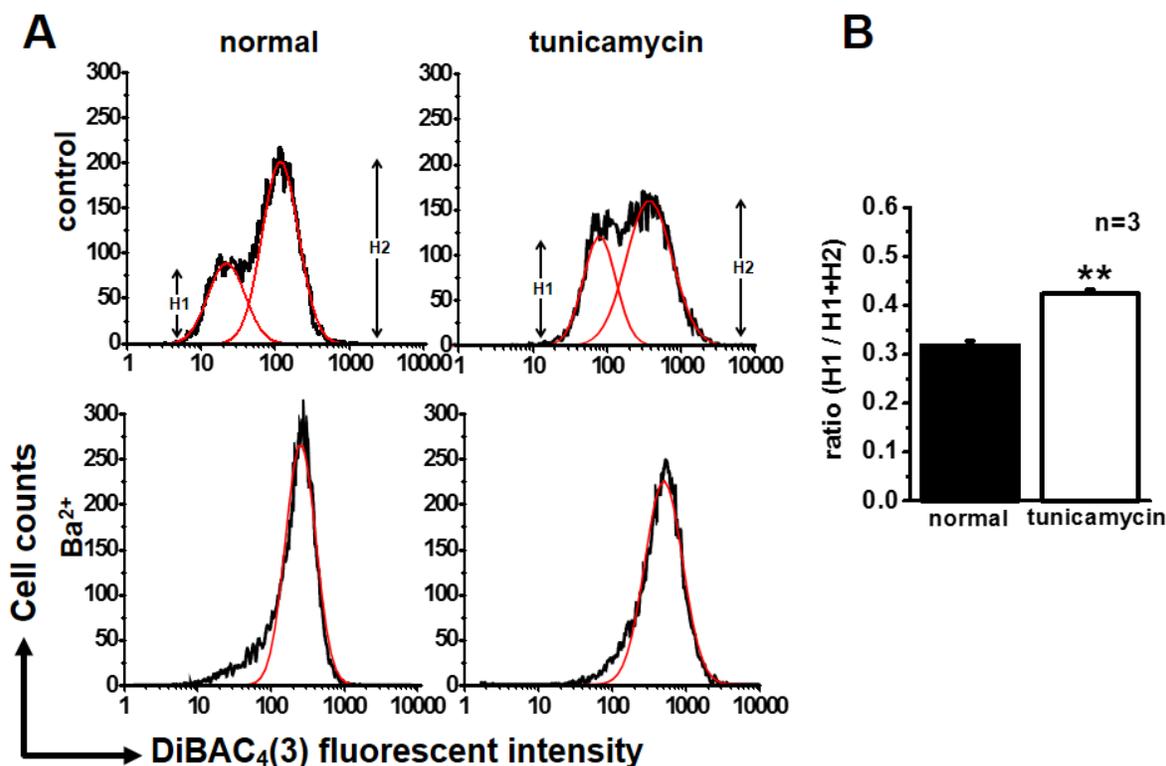


図 16 t-BBEC117 における静止膜電位による細胞分布変化の解析

t-BBEC117において、ノーマル群及びツニカマイシン処理群に対しフローサイトメトリーによりDiBAC₄(3)蛍光強度(FL1-H)によるヒストグラムを作成した。A. 各細胞群に対してコントロール及び内向き整流性 K⁺チャンネル阻害薬 100 μM Ba²⁺を適用した際の典型的なヒストグラムを示した(左上: ノーマル-コントロール、左下: ノーマル-Ba²⁺、右上: ツニカマイシン-コントロール、右下: ツニカマイシン-Ba²⁺)。B. ノーマル群及びツニカマイシン処理群においてAに示したH1, H2を算出しH1/H1+H2を求めた(n=3, **, p<0.01)。

2-4. t-BBEC117 における細胞膜電位と細胞内 Ca²⁺濃度の関係

脳血管内皮細胞のような非興奮性細胞において、電位依存性 Ca²⁺チャンネルの機能発現は比較的 low、細胞内への主な Ca²⁺流入経路は電位非依存的な Ca²⁺透過チャンネルが担っている(46,47,110)。そのような電位非依存的なイオンチャンネルは細胞膜の過分極により Ca²⁺透過の電気化学的駆動力が増大し、細胞内への Ca²⁺流入を促進すると考えられる。そこで、t-BBEC117 において細胞膜電位が細胞外からの Ca²⁺流入に与える影響を明らかにするために膜電位と細胞内 Ca²⁺濃度の検討を行った。

ストレスを負荷していない t-BBEC117 に対して、ホールセルパッチクランプ法と Ca²⁺蛍光指示薬

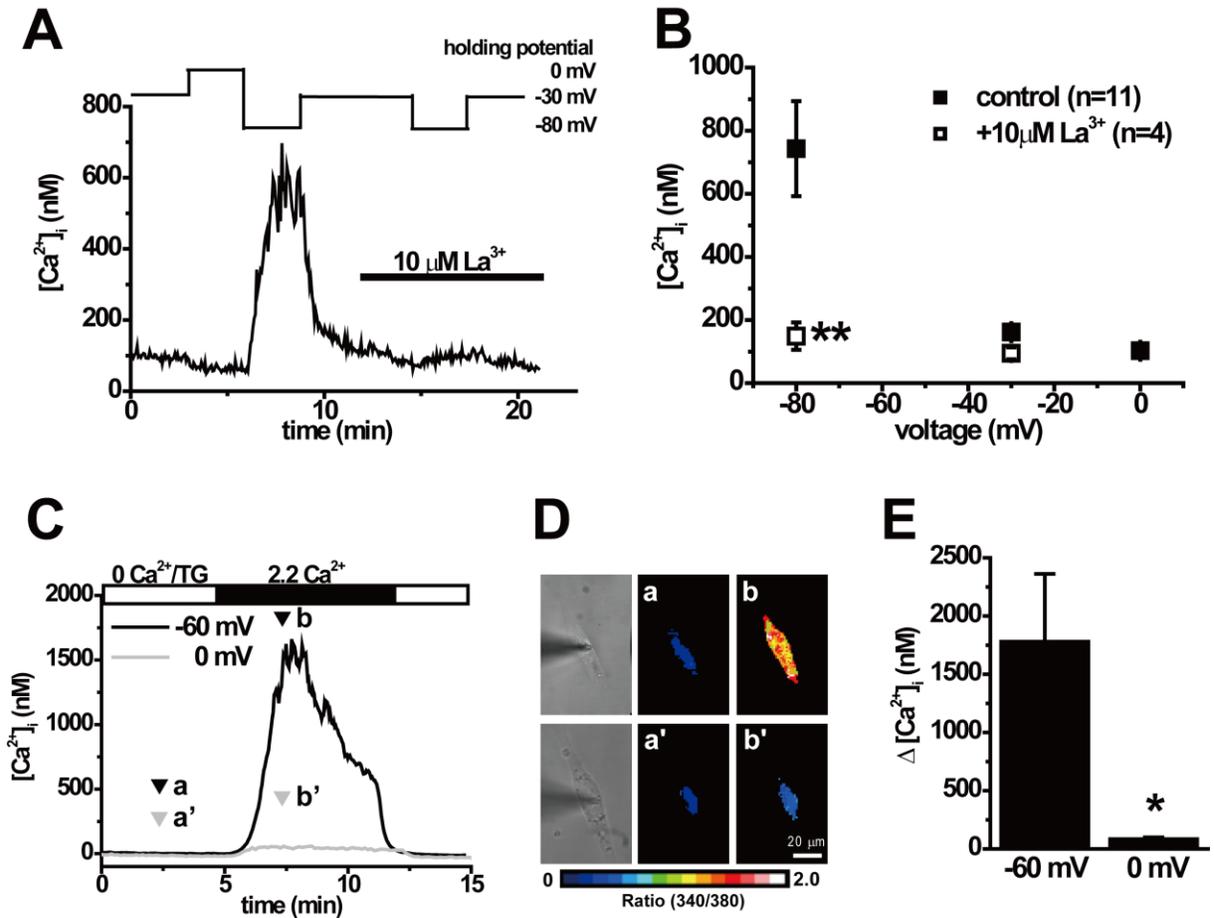


図 17 t-BBEC117 における膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係

t-BBEC117 において、膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係を検討した。ホールセルパッチクランプ法による膜電位固定下においてパッチ電極から fura2 を細胞へ負荷し、膜電位を変化させた際の Ca^{2+} 流入を検討した。

A. 保持電位を上段に示すようなプロトコールで変化させた時の、 Ca^{2+} 濃度変化のトレースを示した。保持電位-80 mV における結果は 2 度目の値を使用し、非選択的陽イオンチャネル阻害薬 10 μM La^{3+} 適用時のものと比較した。

B. A における保持電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係を示した (**; $p < 0.01$ vs. control (V_H : -80 mV))。

C. 保持電位-60 mV, 0 mV において、ストア作動性 Ca^{2+} 流入を誘発させ膜電位と SOCE 活性との関係を検討した。

D. C 中の矢頭 (a, b, a', b') における fura2 蛍光画像を示した。

E. 保持電位-60 mV, 0 mV における SOCE による Ca^{2+} 濃度変化を評価した (-60 mV: $n=5$, 0 mV: $n=4$, **; $p < 0.01$ vs. -60 mV)。

fura2 を用い膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度の同時測定を行った。fura2 は細胞内液に添加し、パッチ電極から細胞へ負荷した。膜電位固定下、保持電位を図 17A の上段に示したプロトコールのように 0 mV, -30 mV, -80 mV へ変化させ、その際の Ca^{2+} 濃度変化のトレースを示した。また、-80 mV における Ca^{2+} 濃度は 2 度測定し、解析には 2 度目の値を使用した。薬物は 10 μM La^{3+} を 2 度目の測定時に適用すること

で評価した。保持電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度をプロットしたところ、保持電位-30 mV と比較し-80 mV では顕著に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇していた。また、保持電位-80 mV における細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は非選択的陽イオンチャネル阻害薬 10 μM La^{3+} を適用することで有意に減少した(コントロール: 0 mV; 102.65 ± 5.89 , -30 mV; 161.41 ± 14.61 , -80 mV; 743.01 ± 150.79 , $n=11$, La^{3+} : -30 mV; 94.26 ± 19.03 , -80 mV; 148.91 ± 43.51 , $n=4$, **, $p < 0.01$ vs. control (V_H : -80 mV)) (図 17B)。

t-BBEC117 において、ストア作動性 Ca^{2+} 流入(SOCE)の膜電位依存性に関して、同様にホールセルパッチクランプ法と Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura2 を組み合わせることで行った。1 μM タプシガルギンにより小胞体を完全に枯渇させた後、細胞外液に Ca^{2+} を加えることで SOCE を誘発させた。保持電位を 0 mV, -60 mV に固定した細胞においてそれぞれ SOCE を誘発させた際の典型的な Ca^{2+} 濃度変化のトレースを示した(図 17C)。図 17C 中に示した矢頭(a, b, a', b')における fura2 の蛍光画像をそれぞれ示した。上段は保持電位-60 mV、下段は保持電位 0 mV における画像である(図 17D)。各保持電位において、SOCE による Ca^{2+} 濃度変化をまとめたところ、保持電位 0 mV と比較して-60 mV では有意に SOCE を介した Ca^{2+} 流入が増加した(-60 mV: 1778.13 ± 583.79 , $n=5$, 0 mV: 83.58 ± 14.95 , $n=4$, **, $p < 0.01$ vs. -60 mV) (図 17E)。

以上の結果から、t-BBEC117 においても他の非興奮性細胞と同様に細胞膜の過分極が細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進させることが明らかとなった。

2-5. ストレス負荷による細胞内 Ca^{2+} 動態の変化

ストレス負荷細胞では Kir2.1 に起因する深い静止膜電位が形成されていることから、細胞内 Ca^{2+} シグナルへの影響が予想された。そこで、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定を行うことで、ストレス負荷による t-BBEC117 の Ca^{2+} 動態への寄与を検討した。

ストレス負荷 t-BBEC 117 細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態を検討するために、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2AM を用いた。図 18A ではノーマル群及びツニカマイシン処理群における典型的な Ca^{2+} 濃度変化のトレースを示した。ノーマル群とツニカマイシン処理群において静止状態における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を検討したところ、ノーマル群と比較してツニカマイシン処理群において有意に定常状態における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇していた(ノーマル群: 87.51 ± 3.61 , $n=113$, ツニカマイシン処理群: 101.44 ± 4.42 , $n=90$, *, $p < 0.05$) (図 18B)。また、 Ca^{2+} -free HEPES 溶液灌流により細胞外から Ca^{2+} を除去したところ、両群において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の低下が観察された。 Ca^{2+} -free HEPES 溶液による、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化をまとめたところ、ノーマル群に比較してツニカマイシン処理群でこの減少幅が有意に大きかった(ノーマル群: -61.86 ± 2.67 , $n=113$, ツニカマイシン処理群: -79.60 ± 4.420 , $n=90$, **, $p < 0.01$) (図 18C)。以上の結果から、t-BBEC117 に対するストレス負荷は細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進することが明らかとなった。

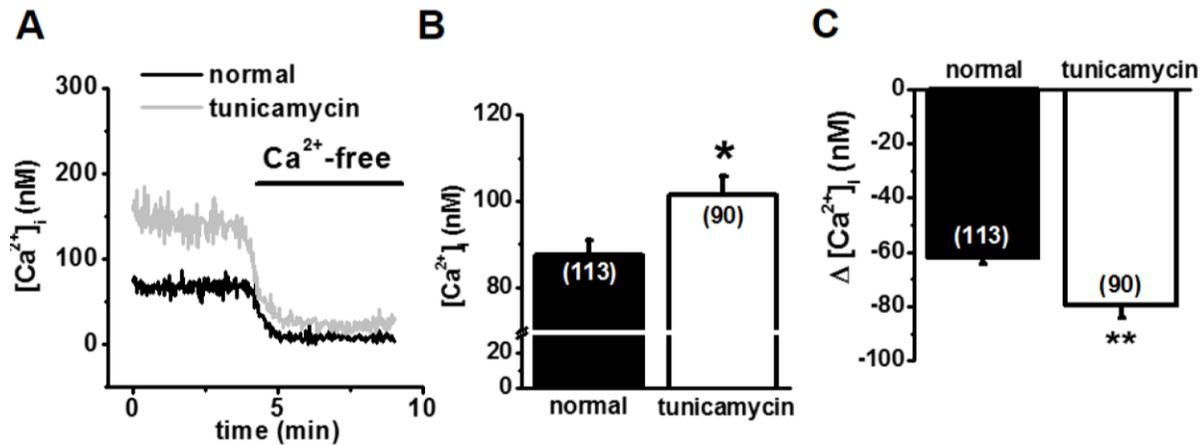


図 18 ストレス負荷による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇

t-BBEC117 における細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)を fura-2/AM を用いて測定した。A. 細胞外溶液から Ca^{2+} を除去した場合における、典型的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を示した(黒線: ノーマル群、灰線: ツニカマイシン処理群)。B. 各細胞群における静止状態での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を示した(ノーマル群: n=113, ツニカマイシン処理群: n=90, *, $p<0.05$)。C. Aにおける各細胞群における細胞外 Ca^{2+} 除去による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を示した(ノーマル群: n=113, ツニカマイシン処理群: n=90, **, $p<0.01$)。

SOCE は脳血管内皮細胞のような非興奮性細胞において主要な Ca^{2+} シグナルを形成すると考えられている。図 17 において t-BBEC117 における SOCE を介した Ca^{2+} 流入も細胞膜の過分極により促進することが示されたことから、膜電位の変化は SOCE 活性にも大きな影響を与えると考えられる。そこで、t-BBEC117 においてストレス負荷による SOCE 活性への影響を検討した。1 μM TG により小胞体を完全に枯渇させた後、細胞外液に 2.2 mM Ca^{2+} を加えることで SOCE を誘発させた。SOCE は 2 回続けて誘発させ、2 回目の SOCE 誘発時には Kir チャンネル阻害薬 100 μM Ba^{2+} を適用させた。 Ba^{2+} 存在下の 2 回目のピーク値を 1.0 として、1 回目のピークを規格化することで SOCE 活性の評価を行った。図 19A, B はそれぞれノーマル群、ツニカマイシン群における典型的な Ca^{2+} 濃度変化のトレースを示した。これらの結果をまとめたところ、ノーマル細胞と比較してツニカマイシン処理群において有意に SOCE 活性が増大していることが明らかとなった(ノーマル群: 1.20 ± 0.026 , n=44, ツニカマイシン処理群: 1.31 ± 0.028 , n=37, *, $p<0.05$) (図 19C)。

当研究室では、t-BBEC117 において膜電位感受性色素である DiBAC₄(3)により膜電位を測定したところ、ATP により小コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル(SK2)の活性化による過分極を生じる一方で、一部の Kir2.1 が豊富に発現した細胞では Ba^{2+} 感受性の過分極を生じることを明らかとしている(68,105)。

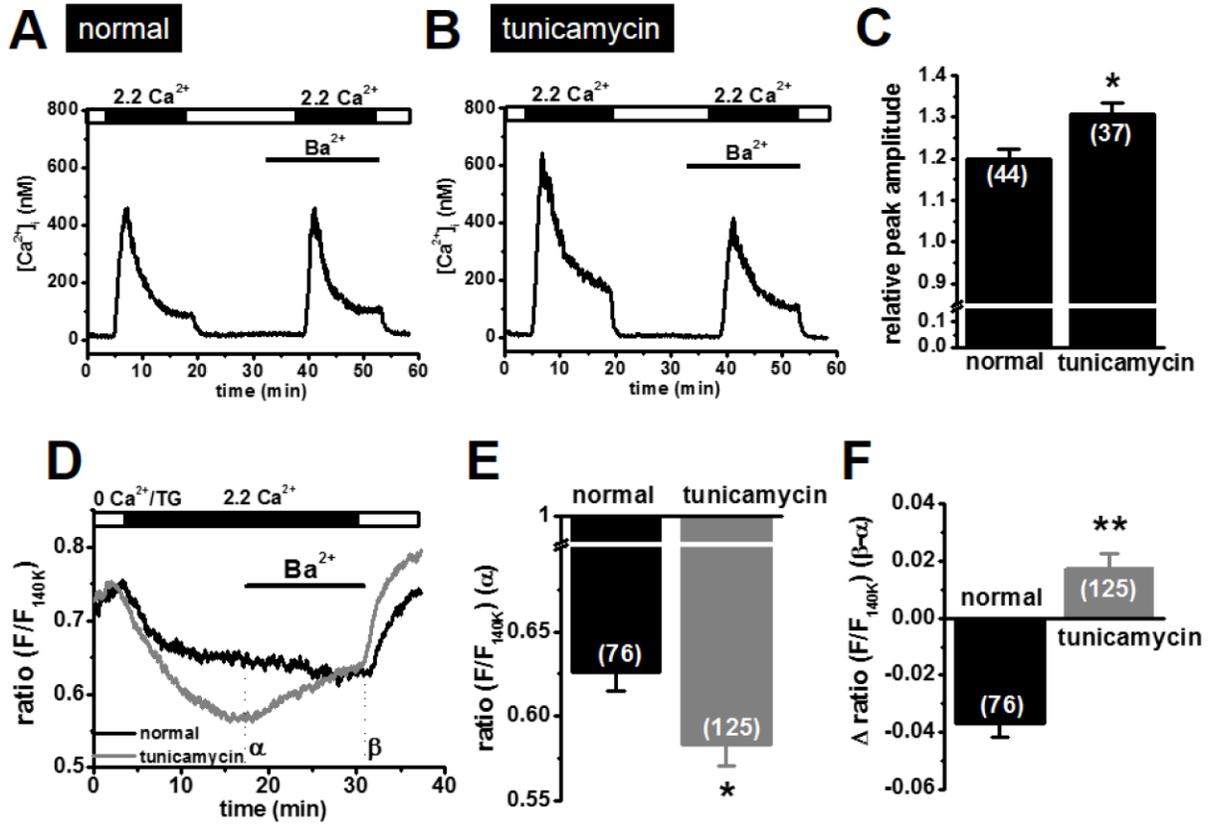


図 19 t-BBEC117 における SOCE 誘導性過分極

t-BBEC117 において、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura2AM により SOCE の測定を行った。SOCE 誘発は、 Ca^{2+} 除去外液中、小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害薬である $1 \mu M$ TG の前処置により完全に小胞体を枯渇させた後、 $2.2 mM$ Ca^{2+} 含有溶液に置換することで行った。SOCE は 2 回続けて誘発し、2 回目の SOCE 誘発時に Kir 阻害薬 $100 \mu M$ Ba^{2+} を適用した。A, B. それぞれノーマル群、ツニカマイシン処理群における SOCE のトレースを示した。C. Ba^{2+} 存在下における SOCE のピーク値を 1.0 として、1 回目のピークを規格化することで SOCE 活性を評価した (ノーマル群 $n=44$, ツニカマイシン処理群 $n=37$, *, $p<0.05$)。t-BBEC117 において、SOCE 誘発時の膜電位変化を膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) により検討した。D. ノーマル群、ツニカマイシン処理群における SOCE 誘導性過分極を示した。D において Ba^{2+} 適用前後をそれぞれ α , β とした。E. 各細胞群において SOCE 誘導性過分極 (α) を比較した (ノーマル群 $n=76$, ツニカマイシン処理群 $n=125$, *, $p<0.05$)。F. 各細胞群において SOCE 誘導性過分極に対する Ba^{2+} の作用 ($\beta-\alpha$) をまとめた (ノーマル群 $n=76$, ツニカマイシン処理群 $n=125$, **, $p<0.01$)。

このように t-BBEC117 における $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は SK2 や Kir2.1 の活性化を介した膜電位制御により Ca^{2+} 流入における正帰還機構を形成している。このことから、SOCE を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇によっても同様の正帰還機構により Ca^{2+} 流入に対して寄与している可能性が考えられる。そこで t-BBEC117 における SOCE 誘発時に生じる膜電位変化の検討を行った。

膜電位の測定は膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)により行った。1 μ M TG により小胞体を完全に枯渇させた後、細胞外液に 2.2 mM Ca^{2+} を加えることで SOCE を誘発させた。t-BBEC117 に対する SOCE の誘発は、DiBAC₄(3)蛍光強度比の低下、すなわち過分極を示した。ノーマル群及びツニカマイシン処理群における、典型的な DiBAC₄(3)蛍光強度比の変化を示した(図 19D)。また、図 19D において Ba^{2+} 適用前後をそれぞれ α , β とした。SOCE により誘発された過分極(α)を比較したところ、ノーマル群に比べツニカマイシン処理群で生じた過分極が有意に大きかった(ノーマル群: 0.626 ± 0.010 , $n=76$, ツニカマイシン処理群: 0.584 ± 0.013 , $n=125$, *, $p < 0.05$) (図 19E)。SOCE 誘発後続けて、 Ba^{2+} を適用するとノーマル群では影響が少ないのに対して、ツニカマイシン処理群では多くの細胞において脱分極が生じた。この SOCE 誘導性過分極に対する Ba^{2+} の反応性の違いから、ノーマル群及びツニカマイシン処理群を 2 種類の細胞集団に分類した。その結果、ノーマル群における主な細胞集団は Ba^{2+} 非感受性過分極を示したが、ツニカマイシン処理群における主な細胞集団は Ba^{2+} 感受性の SOCE 誘発性過分極を示した。両細胞群における Ba^{2+} 感受性過分極を生じた細胞の割合をまとめると、ノーマル群において 14% (76 細胞中 11 細胞)、ツニカマイシン処理群において 54% (125 細胞中 68 細胞)であった。この時の DiBAC₄(3) 蛍光強度比変化($\beta - \alpha$)をまとめたところ、ノーマル群と比較してツニカマイシン群において有意に脱分極が生じていた(ノーマル群: -0.037 ± 0.005 , $n=76$, ツニカマイシン処理群: 0.017 ± 0.006 , $n=125$, **, $p < 0.01$) (図 19F)。

t-BBEC117 における Ba^{2+} 非感受性の SOCE 誘導性過分極が、以前の報告と同様に SK2 活性化に起因するものであることの確認を行った。 Ba^{2+} 非感受性過分極に対して SK2 阻害薬 100 nM UCL1684 を適用したところ、ノーマル群とツニカマイシン処理群において同程度の脱分極が生じた(ノーマル群: 0.66 ± 0.014 , $n=23$, ツニカマイシン処理群: 0.70 ± 0.019 , $n=33$, $p=0.17$) (data not shown)。

t-BBEC117 において、膜電位と $[Ca^{2+}]_i$ の関係に対するツニカマイシン処理の影響を検討した。図 17と同様に、パッチ電極から fura2 を負荷し膜電位と $[Ca^{2+}]_i$ の同時測定を行った。保持電位を図 20A の上段に示したプロトコールのように 0 mV, -30 mV, -80 mV へ変化させ、その際のノーマル群及びツニカマイシン群における Ca^{2+} 濃度変化のトレースを示した。結果をまとめると、ツニカマイシン処理を行った細胞においてもノーマル群と同様に、保持電位-30 mV よりも-80 mV において顕著に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こった。また、保持電位-80 mV において、ノーマル群とツニカマイシン処理群において $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に有意な差は生じなかった(ノーマル群の結果は図 15 と同様のものを使用した)(ツニカマイシン処理群: 0

mV; 102.65 ± 5.89 , -30 mV; 161.41 ± 14.61 , -80 mV; 743.01 ± 150.79 , n=5) (図 20B)。

これまでに、当研究室では t-BBEC117 に TRPC1, TRPC3, TRPC5 の mRNA 発現を報告している (68)。そこで t-BBEC117 に対して、ツニカマイシン処理により細胞外からの Ca^{2+} 流入経路に変化が生じるかどうかを検討するために、TRPC1, TRPC3, TRPC5 に加えて CRAC チャンネルの分子実体である Orai1

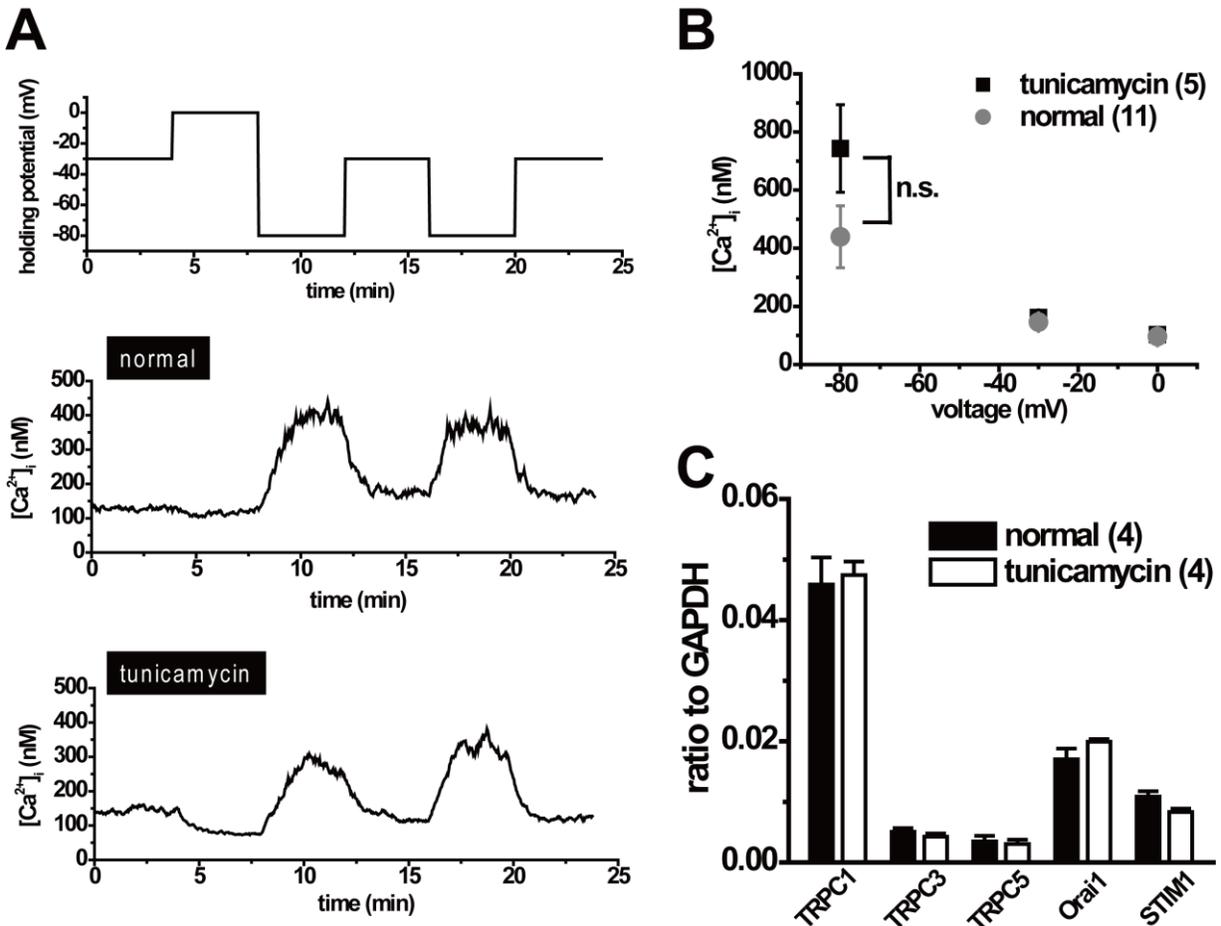


図 20 t-BBEC117 におけるストレス負荷による Ca^{2+} 流入経路の発現変化

t-BBEC117 において、膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係を検討した。ホールセルパッチクランプ法による膜電位固定下においてパッチ電極から fura2 を細胞へ負荷し、膜電位を変化させた際の Ca^{2+} 流入を検討した。A. 保持電位を上段に示すようなプロトコールで変化させた時の、ノーマル群及びツニカマイシン処理群における Ca^{2+} 濃度変化のトレースを示した。B. A のツニカマイシン処理群における保持電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係を示した (n=5)。ノーマル群における結果は図 14 と同様のものを使用した。C. ツニカマイシン処理による Ca^{2+} 透過チャネルの mRNA 変化をリアルタイム PCR 法により検討した (n=4)。

と STIM1 に対してリアルタイム PCR 法により mRNA 発現変化の検討を行った。ノーマル群及びツニカマイシン処理群において、各 mRNA 発現を比較したところ、TRPC1, TRPC3, TRPC5, Orai1, STIM1 いずれにおいても発現変化は生じなかった(ノーマル群: TRPC1; 0.046±0.004, TRPC3; 0.0051±0.001, TRPC5; 0.0035±0.001, Orai1; 0.017±0.002, STIM1; 0.011±0.001, n=4, ツニカマイシン処理群: TRPC1; 0.047±0.002, TRPC3; 0.0043±0.001, TRPC5; 0.0030±0.001, Orai1; 0.020±0.0004, STIM1; 0.0083±0.001, n=4) (図 20C)。

2-6. t-BBEC117 におけるストレス負荷誘導性細胞死に対する Kir2.1 の寄与

ストレス負荷による内向き整流性 K⁺チャネル発現増加の機能的役割を明らかにするために、細胞生存に対する 100 μM Ba²⁺の効果を検討した。ノーマル群及びツニカマイシン処理群における細胞生存度を 72 時間まで 24 時間ごとに、ノーマル群、ツニカマイシン処理群に対してそれぞれコントロール及び 100 μM Ba²⁺添加群の計 4 群において MTT 法により検討した。0 時間における細胞生存度を 1.0 と規格化して 72 時間における細胞生存度を棒グラフにまとめた。t-BBEC117 に対するツニカマイシン処理は細胞死を誘導するが、このストレス誘導性細胞死は 100 μM Ba²⁺を添加し、Kir2.1 活性を阻害することで部分的ではあるが有意に細胞死が抑制された(ノーマル群:control; 1.44±0.18, Ba²⁺;1.26±0.13, n=8, ツニカマイシン処理群: control; 0.41±0.06, Ba²⁺;0.71±0.04, n=6, ^{##} : p<0.01 vs normal, * : p<0.05 vs control) (図 21)。以上の結果より、ツニカマイシン処理により発現が増加した Kir2.1 はツニカマイシン誘導性の細胞死の制御に寄与することが明らかとなった。

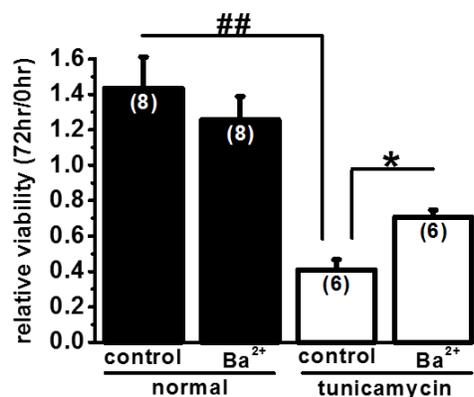


図 21 t-BBEC117 におけるストレス誘導性細胞死に対する Kir2.1 の寄与

t-BBEC117 におけるストレス負荷により誘導される細胞死に対し Kir2.1 の寄与を MTT 法により検討した。0 時間における細胞生存度を 1.0 と規格化して 72 時間における細胞生存度を測定した。ノーマル群、ツニカマイシン処理群に対して、コントロール及び 100 μM Ba²⁺適用による 72 時間における細胞生存度をまとめた(ノーマル群: n=8, ツニカマイシン処理群: n=6, ^{##} : p<0.01 vs normal, * : p<0.05 vs control)。

2-7. 要約と考察

本研究において以下のことを明らかにした。

1. t-BBEC 117 において、ツニカマイシン処理による小胞体ストレス負荷は内向き整流性 K^+ チャンネル Kir2.1 の発現を増加させる。
2. t-BBEC 117 において、ツニカマイシン処理による Kir2.1 発現増加は深い静止膜電位の形成に寄与する。
3. t-BBEC 117 において、ツニカマイシン処理による細胞膜の過分極は細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進させ定常状態における $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる。
4. t-BBEC117 におけるツニカマイシン処理により生じる細胞死の誘導は Kir2.1 活性の上昇が一部寄与する。

血液脳関門によるバリア機能は脳の発達、成熟及び中枢神経系における恒常性に大きく寄与しており、脳血管内皮細胞障害は中枢神経系疾患の増悪を引き起こす。当研究室において正常培養条件化 t-BBEC117 の約 15%の細胞群において Kir2.1 が機能発現しており、ATP 刺激が SK2 と Kir2.1 の連続的な活性化を生じさせ過剰な過分極を誘発することを明らかにしている。この過分極は TRP チャンネル等からの Ca^{2+} 流入を促進させ、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす(105)。このことから脳血管内皮細胞における SK2 と Kir2.1 は血液脳関門の正常なバリア機能維持及び生理条件下における脳のホメオスタシスにおいて重要な役割を果たすと考えられる。

古典的内向き整流性 K^+ チャンネル(Kir2)は、骨格筋や心筋において細胞の静止膜電位を K^+ の平衡電位へ近づけることで深い静止膜電位の形成に寄与している(111)。これまでに初代培養ラット脳血管内皮細胞において Kir2.1 と Kir2.2 の発現が報告されているものの、その生理機能は未だ充分には解明されていない(54)。そのような中、本研究において t-BBEC117 に対するツニカマイシン処理による小胞体ストレス負荷は Kir2.1 発現を増大させ静止膜電位の形成に寄与する一方で、細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進させることを示した。この持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は部分的ではあるものの、ツニカマイシン誘導性細胞死に寄与することを明らかにした。以上の結果は、生理条件下だけではなく病態時においても脳血管内皮細胞における Kir2.1 生理機能の重要性を裏付けるものである。

Kirチャンネルの活性制御機構としてタンパクリン酸化、脱リン酸化が知られている。その中でも Kir2.1 は、PKA、PKC、受容体共役型チロシンキナーゼにより制御を受ける(112-114)。また、細胞膜への安定化を担う足場タンパクである AKAP79 や SAP97 などが Kir2 と相互作用することも報告されている(115,116)。Kir2.1 の生理及び病態生理における機能として、ヒト筋芽細胞においてチロシン脱リン酸化による Kir2.1 の活性化が細胞分化の引き金となること(117)、また Kir2.1 活性化を介したアストロサイトの K^+ 取り込み障害がてんかんなどの病態時における神経過興奮の原因となること(118)などが報告されて

いる。本研究において、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン処理により Kir2.1 の発現が増加した。小胞体ストレスは UPR (unfolded protein response) と呼ばれるシグナル伝達を誘導し、転写制御などの広範にわたる小胞体ストレス応答を引き起こすことで細胞の保護に作用するが(119)、過剰あるいは長期に及ぶ UPR はアポトーシスを誘導する(120,121)。Kir2.1 の発現制御機構は未だ十分には研究が進んでおらず詳細は明らかではないが、Sp-1、Sp-3、NF-Y などの転写因子の活性化により Kir2.1 の転写が制御されることが示されている(122)。UPR により活性化されるシグナルの 1 つである ATF6 は小胞体膜上に存在する小胞体ストレスセンサーの 1 つであり、転写因子 NF-Y と複合体を形成することが報告されている(123,124)。NF-Y と ATF6 の機能的な複合体形成により Kir2.1 の転写制御が生じている可能性はあるものの、ツニカマイシン処理による Kir2.1 発現制御に関しては今後更なる検討が必要である。

[Ca²⁺]_i の上昇は細胞増殖に必要な機構であるだけではなく、アポトーシス誘導に関与することはよく知られている(41,42,103)。また心筋細胞や神経細胞への Ca²⁺過負荷はネクロシスを引き起こすことから(125,126)、細胞死誘導における[Ca²⁺]_i の変動は非常に重要な制御因子である。本研究により明らかとなった Kir2.1 発現上昇による深い静止膜電位の形成は、TRP チャネルや CRAC チャネルを介した Ca²⁺流入を促進すると考えられる。TRP チャネル等の非選択的陽イオンチャネルを介した持続的な Ca²⁺流入は細胞死を誘導することが報告されている(127)。本研究では、ツニカマイシン処理細胞において核の形態変化及び DNA 断片化が生じており、ツニカマイシン誘導性細胞死がアポトーシスである可能性が高いと考えられる(図 22)。しかしながら、Kir2.1 発現上昇がアポトーシスの原因となりうるかは本研究で明らかにすることはできなかった。ノーマル群と比較してツニカマイシン処理群において、カスパーゼ

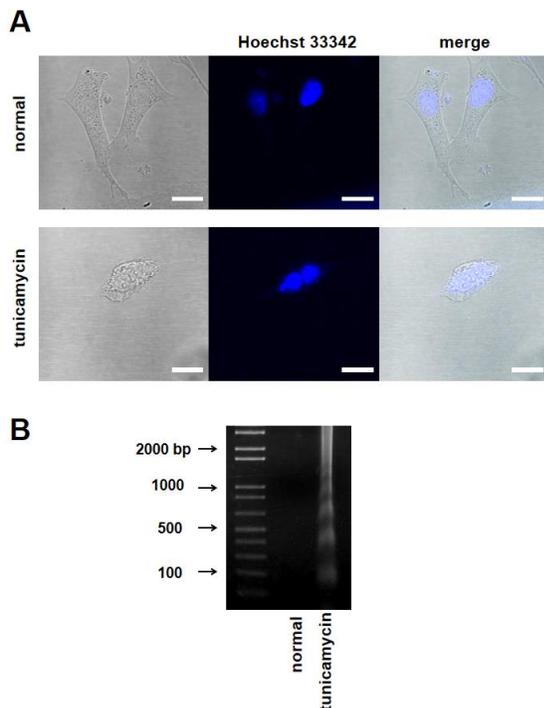


図 22 ツニカマイシン誘導性細胞死の形態的特徴

A. Hoechst 33342 による核染色。上段がノーマル群、下段がツニカマイシン処理群における結果を示した。ノーマル群では、核の凝集、断片化は生じなかった(0/50cells)。一方、ツニカマイシン処理群では、11/41 cells で生じていた。 **B.** DNA 断片化をアガロースゲル電気泳動により検出した。

3, 7 の活性が有意に上昇していたものの、 Ba^{2+} 適用ではカスパーゼ活性に変化は生じなかった (data not shown)。この結果は、Kir2.1 活性化がカスパーゼシグナルの下流に位置する可能性を示唆するものである。しかしながら、Kir2.1 活性化による細胞死が小胞体ストレス誘導性細胞死と異なる機構で生じており、両者が並行して細胞死を引き起こしている可能性も考えられることから、ツニカマイシン誘導性細胞死に対する Kir2.1 の寄与する詳細なメカニズムに関しては更なる検討が必要である。

結論として、t-BBEC117 に対するツニカマイシンによる小胞体ストレス負荷はストレスシグナルを介してアポトーシスを引き起こす。また、ストレスシグナルの一部は Kir2.1 の発現を増大させ深い静止膜電位の形成に寄与する。この深い膜電位は細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進させることにより、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こすことで細胞死の制御に関与することが明らかとなった (図 23)。

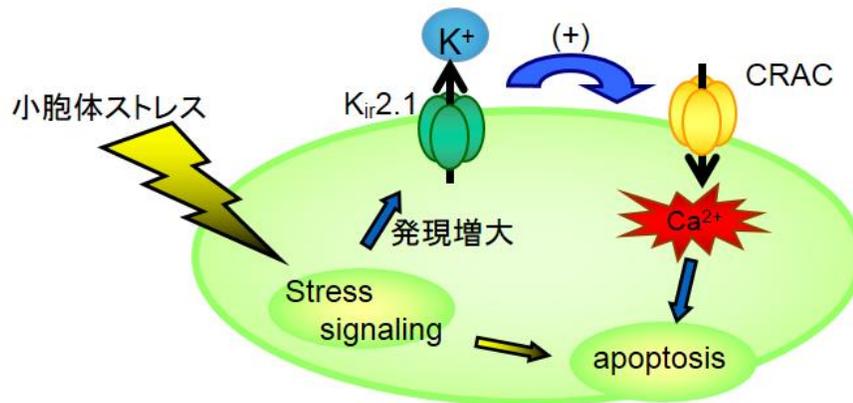


図 23 t-BBEC117 におけるツニカマイシン誘導性細胞死の制御機構

IV. 総括

本研究では脳血管内皮細胞のモデルとして有用である、ウシ脳血管内皮細胞 (t-BBEC117) を用いて脳血管内皮細胞における細胞増殖機構及び細胞死メカニズムについての検討を行い、以下の知見を得た。

1. t-BBEC 117 において主に機能発現する Orai, STIM の各サブタイプは Orai1 及び STIM1 であり、CRAC チャネルを構成しストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) を担うことを明らかにした。また、ランタノイドを用いた検討から SOCE は CRAC チャネルが主体的に機能するものの、他の TRP チャネル等も関与すると考えられる。
2. Orai1 及び STIM1 に対して siRNA によりノックダウンを行ったところ、いずれにおいても有意に細胞増殖が抑制された。このことから t-BBEC117 における細胞増殖には Orai1 及び STIM1 から構成される CRAC チャネルを介した Ca^{2+} シグナルが寄与することが明らかとなった。
3. 過剰チミジン法を適用し t-BBEC117 に対して細胞周期同調培養を行ったところ、他の細胞周期と比較して G2/M 期における細胞群において有意に SOCE 活性が低下することが明らかとなった。この細胞周期依存的な SOCE 活性低下の原因を検討するために、細胞周期依存的なイオンチャネル発現変化を解析したところ、G2/M 期において Orai2 の発現が mRNA 及びタンパクレベルで上昇していた。また、細胞周期依存的な SOCE 活性低下は、Orai2 をノックダウンすることで消失した。このことから、細胞周期の G2/M 期において Orai2 発現が増加し SOCE に対して抑制的に作用していることが明らかとなった。
4. 細胞周期依存的な SOCE 活性の低下が、細胞周期進行にどのような影響を与えるかを検討するために、siRNA を使用し Orai2 をノックダウンした細胞における細胞周期分布を解析した。その結果、コントロールと比較して、ノックダウン細胞において G0/G1 期の細胞群の割合が減少していることが明らかとなった。また MTT 法により Orai2 ノックダウン細胞における細胞増殖を検討したところ、コントロールと比較して有意に細胞増殖が減少した。以上の結果より、Orai2 は細胞周期依存的に SOCE 活性を変化させ細胞周期進行を制御することで、正常な細胞増殖に寄与することが明らかとなった。

5. ツニカマイシン処理により小胞体ストレスを負荷した t-BBEC117 に対してホールセルパッチクランプ法を適用した結果、 Ba^{2+} 感受性内向き整流性 K^+ 電流の増加が示された。リアルタイム PCR 及びウェスタンブロットの結果、内向き整流性 K^+ チャンネル Kir2.1 の発現が上昇していることが明らかとなった。
6. Kir2.1 の発現上昇は深い静止膜電位の形成に関与することが予想されたため、膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)により膜電位への影響を検討した。その結果、ストレス負荷細胞において有意に深い静止膜電位を持つことが示された。また、フローサイトメーターを用い同様に膜電位の検討を行ったところ、ストレス負荷群において深い膜電位を持つ細胞割合が有意に高いことが明らかとなった。
7. 脳血管内皮細胞において、細胞膜の過分極は細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進すると考えられる。そこで、定常状態における $[Ca^{2+}]_i$ を測定したところ、ストレス負荷細胞において有意に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇していた。また膜電位固定下、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところノーマル群とストレス負荷群に有意な差がなく、さらに Ca^{2+} 流入経路と考えられる Ca^{2+} 透過チャンネルに発現変化が生じなかったことからストレス負荷細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞の過分極が原因となり生じていることが明らかとなった。
8. ツニカマイシン処理による小胞体ストレス負荷は、t-BBEC117 に対して細胞死を誘導した。一方でこのストレス誘導性細胞死は Kir 阻害薬 Ba^{2+} を添加しておくことで部分的ではあるが有意に抑制された。

脳血管内皮細胞は血液脳関門を構成することから細胞増殖及び細胞死機構について、その制御機構を明らかにすることは中枢神経系の恒常性機構解明においても重要な知見になると考えられる。CRAC チャンネルを介した Ca^{2+} シグナルは脳血管内皮細胞の細胞増殖を制御する重要な因子であるが、一方で脳疾患時等において脳血管内皮細胞にストレス負荷されると Kir2.1 発現が増加し、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし細胞死が誘導される。このように Kir2.1 は細胞死を引き起こすスイッチとして機能することで傷害を受けた細胞を取り除く機構として機能していると推測される。

本研究で得られた結果は、脳血管内皮細胞における細胞増殖と細胞死のメカニズムに関して重要な情報を提供するものであり、脳疾患時における中枢神経系の恒常性維持機構を解明する上で非常に有益な情報となり得る。

V. 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤な御指導を賜った名古屋市立大学大学院 薬学研究科、今泉 祐治 教授に深甚な謝意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御助言および御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院 薬学研究科、桑 和彦 教授、林 秀敏 教授ならびに田中 正彦 准教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、ウシ脳血管内皮細胞 (t-BBEC117) を提供していただき、また終始有益な御指導、御助言を賜りました名古屋市立大学大学院 医学研究科、浅井 清文 教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始有益な御指導、御助言を賜りました京都薬科大学 薬学部 大矢 進 教授、名古屋市立大学 薬学研究科、山村 寿男 准教授ならびに鈴木 良明 助教に深謝致します。

本研究にあたり、御協力を頂いた名古屋市立大学大学院 薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野の卒業生及び教室員諸氏ならびに名古屋市立大学大学院 医学研究科 分子神経生物学分野の教室員諸氏に心より感謝致します。

VI. 引用文献

1. Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., and Begley, D. J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* **37**, 13-25
2. Furuse, M., and Tsukita, S. (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in cell biology* **16**, 181-188
3. Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* **161**, 653-660
4. Hawkins, B. T., and Davis, T. P. (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews* **57**, 173-185
5. Abbott, N. J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 41-53
6. Halassa, M. M., and Haydon, P. G. (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annual review of physiology* **72**, 335-355
7. Iadecola, C., and Nedergaard, M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature neuroscience* **10**, 1369-1376
8. Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H. C., and Bauer, H. (2005) In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cellular and molecular neurobiology* **25**, 25-39
9. Bonkowski, D., Katyshev, V., Balabanov, R. D., Borisov, A., and Dore-Duffy, P. (2011) The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids and barriers of the CNS* **8**, 8-19
10. Winkler, E. A., Bell, R. D., and Zlokovic, B. V. (2011) Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature neuroscience* **14**, 1398-1405
11. Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P., and Attwell, D. (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* **443**, 700-704

12. Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., and Barres, B. A. (2010) Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* **468**, 562-566
13. Armulik, A., Genove, G., Mae, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., and Betsholtz, C. (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **468**, 557-561
14. Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., and Zlokovic, B. V. (2010) Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* **68**, 409-427
15. Pardridge, W. M. (2010) Biopharmaceutical drug targeting to the brain. *Journal of drug targeting* **18**, 157-167
16. Neuwelt, E. A., Bauer, B., Fahlke, C., Fricker, G., Iadecola, C., Janigro, D., Leybaert, L., Molnar, Z., O'Donnell, M. E., Povlishock, J. T., Saunders, N. R., Sharp, F., Stanimirovic, D., Watts, R. J., and Drewes, L. R. (2011) Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature reviews. Neuroscience* **12**, 169-182
17. Bartels, A. L. (2011) Blood-brain barrier P-glycoprotein function in neurodegenerative disease. *Current pharmaceutical design* **17**, 2771-2777
18. Cheng, Y. D., Al-Khoury, L., and Zivin, J. A. (2004) Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **1**, 36-45
19. Correale, J., and Villa, A. (2007) The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* **40**, 148-160
20. Erickson, M. A., and Banks, W. A. (2013) Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *The Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **33**, 1500-1513
21. Gules, I., Satoh, M., Nanda, A., and Zhang, J. H. (2003) Apoptosis, blood-brain barrier, and subarachnoid hemorrhage. *Acta neurochirurgica. Supplement* **86**, 483-487
22. Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E. H., Risau, W., and Engelhardt, B. (2003) Localization of claudin-3 in

- tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* **105**, 586-592
23. Xu, J., Chen, S., Ku, G., Ahmed, S. H., Xu, J., Chen, H., and Hsu, C. Y. (2001) Amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation. *The Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **21**, 702-710
 24. Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., and Searson, P. C. (2013) The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in neuroengineering* **6**, 1-22
 25. Kim, I., Xu, W., and Reed, J. C. (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 1013-1030
 26. Ron, D., and Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 519-529
 27. Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2008) The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**, 116-120
 28. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179-185
 29. Hogan, P. G., Lewis, R. S., and Rao, A. (2010) Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual review of immunology* **28**, 491-533
 30. DeHaven, W. I., Smyth, J. T., Boyles, R. R., Bird, G. S., and Putney, J. W., Jr. (2008) Complex actions of 2-aminoethyl-diphenyl borate on store-operated calcium entry. *The Journal of biological chemistry* **283**, 19265-19273
 31. Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., and Penner, R. (2007) CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Current Biology* **17**, 794-800
 32. Deng, X., Wang, Y., Zhou, Y., Soboloff, J., and Gill, D. L. (2009) STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *The Journal of biological chemistry* **284**, 22501-22505

33. Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., and Meyer, T. (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell* **131**, 1327-1339
34. Gross, P. M., Sposito, N. M., Pettersen, S. E., and Fenstermacher, J. D. (1986) Differences in function and structure of the capillary endothelium in gray matter, white matter and a circumventricular organ of rat brain. *Blood vessels* **23**, 261-270
35. Zlokovic, B. V. (2005) Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in neurosciences* **28**, 202-208
36. Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M. E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., and Kato, T. (1999) Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neuroscience Research* **35**, 155-164
37. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **391**, 85-100
38. Yamada, A., Gaja, N., Ohya, S., Muraki, K., Narita, H., Ohwada, T., and Imaizumi, Y. (2001) Usefulness and limitation of DiBAC₄(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in HEK293 cells. *The Japanese Journal of Pharmacology* **86**, 342-350
39. Bostock, C. J., Prescott, D. M., and Kirkpatrick, J. B. (1971) An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Experimental cell research* **68**, 163-168
40. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-648
41. Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 11-21
42. Parekh, A. B., and Penner, R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiological reviews* **77**, 901-930

43. Antoniotti, S., Lovisolò, D., Fiorio Pla, A., and Munaron, L. (2002) Expression and functional role of bTRPC1 channels in native endothelial cells. *FEBS Letters* **510**, 189-195
44. Beech, D. J. (2005) TRPC1: store-operated channel and more. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **451**, 53-60
45. Funabashi, K., Ohya, S., Yamamura, H., Hatano, N., Muraki, K., Giles, W., and Imaizumi, Y. (2010) Accelerated Ca²⁺ entry by membrane hyperpolarization due to Ca²⁺-activated K⁺ channel activation in response to histamine in chondrocytes. *American journal of physiology. Cell physiology* **298**, C786-797
46. Kamouchi, M., Philipp, S., Flockerzi, V., Wissenbach, U., Mamin, A., Raeymaekers, L., Eggermont, J., Droogmans, G., and Nilius, B. (1999) Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *The Journal of physiology* **518 Pt 2**, 345-358
47. Nilius, B., and Droogmans, G. (2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiological reviews* **81**, 1415-1459
48. Muraki, K., Imaizumi, Y., Ohya, S., Sato, K., Takii, T., Onozaki, K., and Watanabe, M. (1997) Apamin-sensitive Ca²⁺-dependent K⁺ current and hyperpolarization in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 340-343
49. Sollini, M., Frieden, M., and Beny, J. L. (2002) Charybdotoxin-sensitive small conductance K_{Ca} channel activated by bradykinin and substance P in endothelial cells. *British journal of pharmacology* **136**, 1201-1209
50. Forsyth, S. E., Høger, A., and Høger, J. H. (1997) Molecular cloning and expression of a bovine endothelial inward rectifier potassium channel. *FEBS Letters* **409**, 277-282
51. Yang, D., MacCallum, D. K., Ernst, S. A., and Hughes, B. A. (2003) Expression of the inwardly rectifying K⁺ channel Kir2.1 in native bovine corneal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **44**, 3511-3519
52. Muraki, K., and Imaizumi, Y. (2001) A novel function of sphingosine-1-phosphate to activate a non-selective cation channel in human endothelial cells. *The Journal of physiology* **537**, 431-441

53. Hosoya, K., Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2002) Recent advances in the brain-to-blood efflux transport across the blood-brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics* **248**, 15-29
54. Millar, I. D., Wang, S., Brown, P. D., Barrand, M. A., and Hladky, S. B. (2008) Kv1 and Kir2 potassium channels are expressed in rat brain endothelial cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **456**, 379-391
55. Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, Y. T., Lin, P. Y., Huang, H. J., Chou, C. Y., Chang, H. C., Tang, M. J., and Shen, M. R. (2011) Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 15225-15230
56. Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H. (2011) Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Journal of cellular physiology* **226**, 542-551
57. Feng, M., Grice, D. M., Faddy, H. M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., Muend, S., Kenny, P. A., Sukumar, S., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R., and Rao, R. (2010) Store-independent activation of Orai1 by SPCA2 in mammary tumors. *Cell* **143**, 84-98
58. Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R. K., Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Singer, H. A., and Trebak, M. (2009) Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through I_{CRAC} in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *The FASEB Journal* **23**, 2425-2437
59. Prakriya, M., and Lewis, R. S. (2001) Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors. *The Journal of physiology* **536**, 3-19
60. Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R. K., and Trebak, M. (2008) Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circulation research* **103**, 1289-1299
61. Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P. G., and Rao, A. (2007) Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell calcium* **42**,

62. Yang, I. H., Tsai, Y. T., Chiu, S. J., Liu, L. T., Lee, H. H., Hou, M. F., Hsu, W. L., Chen, B. K., and Chang, W. C. (2013) Involvement of STIM1 and Orai1 in EGF-mediated cell growth in retinal pigment epithelial cells. *Journal of biomedical science* **20**, 41-51
63. Spinelli, A. M., Gonzalez-Cobos, J. C., Zhang, X., Motiani, R. K., Rowan, S., Zhang, W., Garrett, J., Vincent, P. A., Matrougui, K., Singer, H. A., and Trebak, M. (2012) Airway smooth muscle STIM1 and Orai1 are upregulated in asthmatic mice and mediate PDGF-activated SOCE, CRAC currents, proliferation, and migration. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **464**, 481-492
64. Motiani, R. K., Hyzinski-Garcia, M. C., Zhang, X., Henkel, M. M., Abdullaev, I. F., Kuo, Y. H., Matrougui, K., Mongin, A. A., and Trebak, M. (2013) STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **465**, 1249-1260
65. Schreiber, R. (2005) Ca²⁺ signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation. *The Journal of membrane biology* **205**, 129-137
66. Whitaker, M., and Patel, R. (1990) Calcium and cell cycle control. *Development* **108**, 525-542
67. Becchetti, A. (2011) Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. *American journal of physiology. Cell physiology* **301**, C255-265
68. Yamazaki, D., Aoyama, M., Ohya, S., Muraki, K., Asai, K., and Imaizumi, Y. (2006) Novel functions of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in enhanced cell proliferation by ATP in brain endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **281**, 38430-38439
69. Parekh, A. B., and Putney, J. W., Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiological reviews* **85**, 757-810
70. Braun, A., Varga-Szabo, D., Kleinschnitz, C., Pleines, I., Bender, M., Austinat, M., Bosl, M., Stoll, G., and Nieswandt, B. (2009) Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood* **113**, 2056-2063
71. Feske, S., Picard, C., and Fischer, A. (2010) Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1. *Clinical immunology* **135**, 169-182

72. Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., and Rao, A. (2008) Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature immunology* **9**, 432-443
73. Robinson, L. J., Mancarella, S., Songsawad, D., Tourkova, I. L., Barnett, J. B., Gill, D. L., Soboloff, J., and Blair, H. C. (2012) Gene disruption of the calcium channel Orai1 results in inhibition of osteoclast and osteoblast differentiation and impairs skeletal development. *Laboratory Investigation* **92**, 1071-1083
74. Vig, M., DeHaven, W. I., Bird, G. S., Billingsley, J. M., Wang, H., Rao, P. E., Hutchings, A. B., Jouvin, M. H., Putney, J. W., and Kinet, J. P. (2008) Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nature immunology* **9**, 89-96
75. Bird, G. S., Hwang, S. Y., Smyth, J. T., Fukushima, M., Boyles, R. R., and Putney, J. W., Jr. (2009) STIM1 is a calcium sensor specialized for digital signaling. *Current Biology* **19**, 1724-1729
76. Soboloff, J., Spassova, M. A., Hewavitharana, T., He, L. P., Xu, W., Johnstone, L. S., Dziadek, M. A., and Gill, D. L. (2006) STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry. *Current Biology* **16**, 1465-1470
77. Mercer, J. C., Dehaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S., and Putney, J. W., Jr. (2006) Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 24979-24990
78. Brough, G. H., Wu, S., Cioffi, D., Moore, T. M., Li, M., Dean, N., and Stevens, T. (2001) Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca²⁺-selective, store-operated Ca²⁺ entry pathway. *The FASEB Journal* **15**, 1727-1738
79. Tiruppathi, C., Freichel, M., Vogel, S. M., Paria, B. C., Mehta, D., Flockerzi, V., and Malik, A. B. (2002) Impairment of store-operated Ca²⁺ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circulation research* **91**, 70-76
80. Beech, D. J., Muraki, K., and Flemming, R. (2004) Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *The Journal of physiology* **559**,

81. Schaefer, M., Plant, T. D., Obukhov, A. G., Hofmann, T., Gudermann, T., and Schultz, G. (2000) Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *The Journal of biological chemistry* **275**, 17517-17526
82. Xu, S. Z., Zeng, F., Boulay, G., Grimm, C., Harteneck, C., and Beech, D. J. (2005) Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *British journal of pharmacology* **145**, 405-414
83. Volpi, M., and Berlin, R. D. (1988) Intracellular elevations of free calcium induced by activation of histamine H1 receptors in interphase and mitotic HeLa cells: hormone signal transduction is altered during mitosis. *The Journal of cell biology* **107**, 2533-2539
84. Tani, D., Monteilh-Zoller, M. K., Fleig, A., and Penner, R. (2007) Cell cycle-dependent regulation of store-operated I_{CRAC} and Mg^{2+} -nucleotide-regulated MagNum (TRPM7) currents. *Cell calcium* **41**, 249-260
85. Lang, F., Elyenstein, A., and Shumilina, E. (2012) Regulation of Orai1/STIM1 by the kinases SGK1 and AMPK. *Cell calcium* **52**, 347-354
86. Elyenstein, A., Gehring, E. M., Heise, N., Shumilina, E., Schmidt, S., Szteyn, K., Munzer, P., Nurbaeva, M. K., Eichenmuller, M., Tyan, L., Regel, I., Foller, M., Kuhl, D., Soboloff, J., Penner, R., and Lang, F. (2011) Stimulation of Ca^{2+} -channel Orai1/STIM1 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1). *The FASEB Journal* **25**, 2012-2021
87. Elyenstein, A., Schmidt, S., Gu, S., Yang, W., Schmid, E., Schmidt, E. M., Alesutan, I., Szteyn, K., Regel, I., Shumilina, E., and Lang, F. (2012) Transcription factor NF-kappaB regulates expression of pore-forming Ca^{2+} channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca^{2+} entry and affect cellular functions. *The Journal of biological chemistry* **287**, 2719-2730
88. Yu, F., Sun, L., and Machaca, K. (2009) Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17401-17406
89. Yu, F., Sun, L., and Machaca, K. (2010) Constitutive recycling of the store-operated Ca^{2+} channel Orai1 and its internalization during meiosis. *The Journal of cell biology* **191**, 523-535

90. Smyth, J. T., Petranka, J. G., Boyles, R. R., DeHaven, W. I., Fukushima, M., Johnson, K. L., Williams, J. G., and Putney, J. W., Jr. (2009) Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nature cell biology* **11**, 1465-1472
91. Gross, S. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Freichel, M., Cavalie, A., and Flockerzi, V. (2007) Murine ORAI2 splice variants form functional Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *The Journal of biological chemistry* **282**, 19375-19384
92. Ji, W., Xu, P., Li, Z., Lu, J., Liu, L., Zhan, Y., Chen, Y., Hille, B., Xu, T., and Chen, L. (2008) Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13668-13673
93. Schindl, R., Frischauf, I., Bergsmann, J., Muik, M., Derler, I., Lackner, B., Groschner, K., and Romanin, C. (2009) Plasticity in Ca²⁺ selectivity of Orai1/Orai3 heteromeric channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19623-19628
94. Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2009) The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *The Journal of physiology* **587**, 4181-4197
95. Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2008) Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels. *The Journal of physiology* **586**, 185-195
96. Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2007) STIM1 regulates Ca²⁺ entry via arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *The Journal of physiology* **579**, 703-715
97. Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., and Long, S. B. (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* **338**, 1308-1313
98. Ong, H. L., Cheng, K. T., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B. B., Gill, D. L., and Ambudkar, I. S. (2007) Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium

- channel components. *The Journal of biological chemistry* **282**, 9105-9116
99. de Vries, H. E., Kooij, G., Frenkel, D., Georgopoulos, S., Monsonego, A., and Janigro, D. (2012) Inflammatory events at blood-brain barrier in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders: implications for clinical disease. *Epilepsia* **53 Suppl 6**, 45-52
100. Zipfel, G. J., Han, H., Ford, A. L., and Lee, J. M. (2009) Cerebral amyloid angiopathy: progressive disruption of the neurovascular unit. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **40**, S16-19
101. Rizzo, M. T., and Leaver, H. A. (2010) Brain endothelial cell death: modes, signaling pathways, and relevance to neural development, homeostasis, and disease. *Molecular Neurobiology* **42**, 52-63
102. Burg, E. D., Remillard, C. V., and Yuan, J. X. (2006) K⁺ channels in apoptosis. *The Journal of membrane biology* **209**, 3-20
103. Pigozzi, D., Tombal, B., Ducret, T., Vacher, P., and Gailly, P. (2004) Role of store-dependent influx of Ca²⁺ and efflux of K⁺ in apoptosis of CHO cells. *Cell calcium* **36**, 421-430
104. Remillard, C. V., and Yuan, J. X. (2004) Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L49-67
105. Yamazaki, D., Kito, H., Yamamoto, S., Ohya, S., Yamamura, H., Asai, K., and Imaizumi, Y. (2011) Contribution of K_{ir}2 potassium channels to ATP-induced cell death in brain capillary endothelial cells and reconstructed HEK293 cell model. *American journal of physiology. Cell physiology* **300**, C75-86
106. Suo, Z., Fang, C., Crawford, F., and Mullan, M. (1997) Superoxide free radical and intracellular calcium mediate A beta(1-42) induced endothelial toxicity. *Brain research* **762**, 144-152
107. Quiniou, C., Sennlaub, F., Beauchamp, M. H., Checchin, D., Lahaie, I., Brault, S., Gobeil, F., Jr., Sirinyan, M., Kooli, A., Hardy, P., Pshezhetsky, A., and Chemtob, S. (2006) Dominant role for calpain in thromboxane-induced neuromicrovascular endothelial cytotoxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **316**, 618-627
108. Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T.,

- Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., and Tohyama, M. (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *The Journal of cell biology* **165**, 347-356
109. Fonseca, A. C., Ferreiro, E., Oliveira, C. R., Cardoso, S. M., and Pereira, C. F. (2013) Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1-40 peptide in brain endothelial cells. *Biochimica et biophysica acta* **1832**, 2191-2203
110. Nilius, B., Viana, F., and Droogmans, G. (1997) Ion channels in vascular endothelium. *Annual review of physiology* **59**, 145-170
111. Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological reviews* **90**, 291-366
112. Wischmeyer, E., Doring, F., and Karschin, A. (1998) Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1 channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **273**, 34063-34068
113. Rossignol, T. M., and Jones, S. V. (2006) Regulation of a family of inwardly rectifying potassium channels (Kir2) by the m1 muscarinic receptor and the small GTPase Rho. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **452**, 164-174
114. Wischmeyer, E., and Karschin, A. (1996) Receptor stimulation causes slow inhibition of IRK1 inwardly rectifying K⁺ channels by direct protein kinase A-mediated phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5819-5823
115. Dart, C., and Leyland, M. L. (2001) Targeting of an A kinase-anchoring protein, AKAP79, to an inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *The Journal of biological chemistry* **276**, 20499-20505
116. Leonoudakis, D., Mailliard, W., Wingerd, K., Clegg, D., and Vandenberg, C. (2001) Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *The Journal of Cell Science* **114**, 987-998
117. Hinard, V., Belin, D., Konig, S., Bader, C. R., and Bernheim, L. (2008) Initiation of human myoblast differentiation via dephosphorylation of Kir2.1 K⁺ channels at tyrosine 242.

118. Kang, S. J., Cho, S. H., Park, K., Yi, J., Yoo, S. J., and Shin, K. S. (2008) Expression of Kir2.1 channels in astrocytes under pathophysiological conditions. *Molecules and Cells* **25**, 124-130
119. Bernales, S., Papa, F. R., and Walter, P. (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 487-508
120. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103
121. Ron, D. (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *The Journal of Clinical Investigation* **110**, 1383-1388
122. Redell, J. B., and Tempel, B. L. (1998) Multiple promoter elements interact to control the transcription of the potassium channel gene, KCNJ2. *The Journal of biological chemistry* **273**, 22807-22818
123. Li, M., Baumeister, P., Roy, B., Phan, T., Foti, D., Luo, S., and Lee, A. S. (2000) ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 5096-5106
124. Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 6755-6767
125. Kristian, T., and Siesjo, B. K. (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **29**, 705-718
126. Artal-Sanz, M., and Tavernarakis, N. (2005) Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Letters* **579**, 3287-3296
127. Miller, B. A. (2006) The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *The Journal of membrane biology* **209**, 31-41