



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

氏名	きとう ひろあき 鬼頭 宏彰
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 304 号
学位授与の日付	平成 26 年 4 月 15 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	(主査) 教授 糸 和彦 (副査) 教授 今泉 祐治・教授 林 秀敏・准教授 田中 正彦

論文内容の要旨

血液脳関門は、循環血液中からの物質の移行を制限し、脳への有害物質の侵入を妨げ、中枢神経系の環境を恒常的に維持する機能を有している。血液脳関門の実体である脳血管内皮細胞はその周囲をアストロサイトやペリサイトによって覆われることで機能修飾を受け強固なバリア機能を維持している。アストロサイト同士はギャップジャンクションを形成しているのに対して、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様式によって結合している。その結合は末梢毛細血管の 50~100 倍強固であり、これにより脳への物質の移動が厳密に制限されている。

本邦において、脳血管疾患は三大死因の一つに数えられ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 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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、Ca²⁺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 Ca²⁺動態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 Ca²⁺シグナルを形成する Ca²⁺遊離活性化 Ca²⁺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。

脳血管内皮細胞は脳全体の約 0.1%を占めるにとどまるため、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 分子神経生物学分野・浅井教授の下において作製されたウシ脳血管内皮細胞 (t-BBEC117) を用いた。

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

多くの細胞種において、CRAC チャネルの活性化を介したストア作動性 Ca²⁺流入 (SOCE) が細胞内 Ca²⁺動態の調節に寄与し、細胞増殖を含む様々な細胞機能制御に対して重要な役割を担うと報告されている。CRAC チャネルは、細胞膜上に存在しチャネル孔を形成する Orai と小胞体膜状に存在し Ca²⁺を感知する STIM の分子複合体で構成される。CRAC チャネルの主要な構成分子である Orai1 はこれまでにヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を含む多くの細胞種において細胞増殖への関与が示されているため、Orai/STIM を介した Ca²⁺流入が細胞増殖に与える影響について検討し、脳血管内皮細胞におけるイオンチャネル活性変化を介した細胞増殖制御機構を解明することを目的とした。

薬理的及び分子生物学的手法から t-BBEC117 に発現する Orai は Orai1 及び Orai2 であることが示唆された。また、Orai、STIM の各サブタイプに対する siRNA を使用した結果、Orai1 及び STIM1 ノックダウン細胞において有意に SOCE の抑制が生じ、MTT 法を用いた細胞増殖アッセイでは両細胞群で有意に細胞増殖が抑制された。以上の結果から、他の細胞種で報告されるように t-BBEC117 においても Orai1 を介した Ca²⁺シグナルが細胞増殖の制御に大きく寄与することが明らかとなった。

細胞増殖に対する CRAC チャネルの寄与をより詳細に解明するために各細胞周期における細胞内 Ca²⁺動態の検討を行った。細胞周期進行過程において、多様な [Ca²⁺]_i 変動が正常な細胞増殖に関与することが報告されているため、細胞周期進行における [Ca²⁺]_i 変化に対して、CRAC チャネルの寄与を検討するために t-BBEC117 に対しダブルチミジン法による細胞周期の同調培養を行った。G1/S 期に同調後、通常の成長培地に置換することで細胞周期を経時的に進行させ各細胞周期の細胞群を回収し検討を行った。その結果、G0/G1 期と比較し G2/M 期において CRAC チャネルの構成分子の一つである Orai2 発現の上昇及び SOCE 活性の有意な低下が認められた。

細胞周期進行に対し、G2/M 期における Orai2 の発現上昇が SOCE 活性に与える影響を検討するために、siRNA を適用した Orai2 ノックダウン細胞に対して同調培養を行った。その結果、G2/M 期の SOCE 活性の低下が、コントロール細胞と比較してノックダウン細胞において有意に抑制されることを見出した。また、Orai2 ノックダウンは細胞増殖を有意に抑制した。これらの結果から、Orai2 は G2/M 期において SOCE に対して抑制的に作用することにより細胞内 Ca²⁺動態を制御し、細胞周期の適切な進行に寄与する可能性が高いと考えられる。

以上の結果から、CRAC チャネルは脳血管内皮細胞において細胞内 Ca²⁺動態を制御する主要な Ca²⁺チャネルであり、CRAC チャネルを介して形成される Ca²⁺シグナルは脳血管内皮細胞の細胞増殖に大きく寄与することが明らかとなった。脳血管内皮細胞株である t-BBEC117 に機能発現する CRAC チャネルは主に Orai1/STIM1 の分子複合体で構成され細胞周期全般にわたる Ca²⁺シグナルを形成するが、分裂期においては Orai2 の発現が増大し SOCE 活性を低下させることが、適切な細胞周期の進行に必要であることが示された。

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

当研究室ではこれまでに 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⁺ (Kir2.1)チャネルが高発現している 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としている。そこで本研究では、t-BBEC 117 に対し、病態時に誘導されると考えられる細胞ストレスを負荷することで細胞死を誘導し、その誘導性細胞死における Kir2.1 の寄与を検討した。

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、分泌された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。小胞体ストレスは主にアルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患の原因として注目されているが、血管内皮細胞で生じた場合には高血圧や動脈硬化などを誘導することが示唆されているため、小胞体ストレス負荷における脳血管内皮細胞での影響を検討した。細胞ストレス負荷には、小胞体ストレス誘導剤として広く用いられるツニカマイシンを用いた。

ストレス負荷細胞において、ホールセルパッチクランプ法及び発現解析法(Q-PCR、western blot)により、Kir2.1 の発現が増加し活性が上昇していることが明らかとなった。さらに、Kir チャネル阻害薬である Ba^{2+} 投与によりストレス負荷細胞においてのみ、有意に大きな脱分極が生じた。このことからストレス負荷細胞における Kir2.1 の発現上昇は深い静止膜電位の形成に寄与していることが示された。

ストレス負荷細胞では静止状態における細胞内 Ca^{2+} 濃度が有意に上昇しており、外液 Ca^{2+} を除去することで速やかに低下した。このことから細胞外からの定常的な Ca^{2+} 流入増加が推測されたため、非興奮性細胞において重要と考えられる SOCE について検討を行った。ストレスを負荷していない細胞と比較し、ストレス負荷細胞において、 Ba^{2+} の適用により SOCE を介する Ca^{2+} 流入が有意に抑制された。また、ストレス負荷により生じた細胞死は Ba^{2+} により部分的ではあるが抑制されたことから、Kir2.1 の活性化が細胞死誘発に関与することが示唆された。

以上の結果から、t-BBEC117 における小胞体ストレス負荷は Kir2.1 の発現あるいは活性を増大させ細胞膜を過分極させることを見出した。この過分極が細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進させ、静止状態での細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで細胞死を誘発する可能性が示唆された。

(総括)

t-BBEC117 を用いた本研究において、以下のことが明らかとなった。

①脳血管内皮細胞の細胞増殖には Orai1 及び STIM1 の分子複合体から構成される CRAC チャネルを介した Ca^{2+} シグナルが重要な役割を持つ。

②脳血管内皮細胞の適切な細胞周期の進行には CRAC チャネルの活性低下が一部寄与する。また、それは発現の増加した Orai2 が Orai1 との複合体を形成することによりその機能を抑制することで生じることが示唆される。

③小胞体ストレス条件下において Kir2.1 発現量が mRNA 及び、タンパクのレベルで増加し、小胞体ストレスにより誘導される細胞死に一部寄与する。

脳血管内皮細胞は血液脳関門を構成する主要な構成成分であり、細胞のバランスの取れた細胞増殖及び細胞死により血液脳関門の機能が維持されている。血管内皮細胞は血管の一番内側に存在し常に血流に晒されているため、血圧やシエアストレスを含めた様々な急性あるいは慢性的なストレスに暴露されており、高い確率で傷害が引き起こされる。CRAC チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入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、一方で脳損傷時や脳虚血時において脳血管内皮細胞にストレスが負荷されると Kir2.1 発現量が増加し、細胞外から過剰な Ca^{2+} が流入し細胞死が誘導される。このように Kir2.1 チャネルは細胞死を引き起こすスイッチとして機能し、傷害を受けた細胞を速やかに取り除くことで血液脳関門の恒常性維持に機能すると推測される。

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、中枢神経系の恒常性を保つ上での薬物治療に対して非常に有益な情報となり得る。

論文審査の結果の要旨

公開発表会および個別面接時の質疑や審査委員のコメントを反映させ、博士論文に関し十分な改訂を行った。最終試験において博士論文内容について口頭発表させたところ、論文全体及び改訂部分について十分な説明を行った。また口頭発表後に数々の質問を行ったところ、それぞれの質問に関して的確に返答をした。以上のことから、論文に関連した分野について十分な知識を持ち、研究の背景や展望についても十分に理解していることが明らかとなった。知識・見識・能力において博士号を授与するに十分な程度に達していると判断された。よって論文審査委員会では最終試験を合格と判定し、教授・准教授で構成される論文審査会において報告したところ、合格が認定された。