



# Rapid $\text{Ca}^{2+}$ refilling system of intracellular store(s) in human vascular endothelial cells

高田, 祥一郎

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-04-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1425

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001425>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



|         |  |
|---------|--|
| 氏名・（本籍） | 高 田 祥 一 郎 （兵庫県）  |
| 学位の種類   | 医学博士   |
| 学位記番号   | 医博ろ第1164号  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当   |
| 学位授与の日付 | 平成2年4月25日  |
| 学位論文題目  | RAPID $\text{Ca}^{2+}$ REFILLING SYSTEM OF INTRACELLULAR<br>STORE (S) IN HUMAN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS<br>(ヒト血管内皮細胞内カルシウム貯蔵部の急速なカルシウム<br>再充填機構) |
| 審査委員    | 主査 教授 藤 田 拓 男<br>教授 田 中 千賀子 教授 高 井 義 美   |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### I. はじめに

高血圧の発症維持機耗に末梢血管平滑筋の収縮が重要であるが、それを制御する物質として血管内皮細胞由来の血管拡張物質である prostacyclin ( $\text{PG-I}_2$ ) 及び endothelium-derived relaxing-factor (EDRF) が最近特に注目されている。また、これらの物質の産気に内皮細胞 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇が不可欠であることが種々のほ乳類由来血管内皮細胞を用いた実験結果から推測されている。しかしながら、ヒト血管内皮細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  制御機構は不明な点が多い。そこで、ヒト臍帯静脈内皮細胞を分離培養し、 $\text{PG-I}_2$  および EDRF 産生刺激作用を有する bradykinin および  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore 等に対する内皮細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の反応を fura-2 で測定することにより、ヒト血管内皮細胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  制御機構を検討した。

### II. 実験方法

#### 細胞培養

ヒト臍帯静脈内腔をPBSで洗浄し、0.1%コラゲナーゼを含む培養液を内腔に注入、 $37^\circ\text{C}$ 10分間インキュベートすることにより、内皮細胞を選択的に分離し、FCS, NU-SERUM, ECGSおよびヘパリンを含むRPMI培養液で培養し、継代2-3代を以下の実験に供した。

#### $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定

1%ゼラチンで表面をコートした円形カバーガラス ( $\phi 13\text{mm}$ ) 上に内皮細胞を培養, confluent になったものを  $4\ \mu\text{M}$  fura-2 AMを含む培養液中で $37^\circ\text{C}$ , 40分間インキュベートし、洗浄後、 $1.5\text{mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ を含む緩衝液中で蛍光測定 (excitation:  $340\text{nm}$ 及び $380\text{nm}$ , emission:  $500\text{nm}$ ) を実施した。

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の calibration は Tsien の方法に準じて行なった。

### Ⅲ. 結 果

#### 細胞同定

本培養操作によって得た細胞は、単層の敷石状配列をとる増殖形態を示し、組織化学的検討の結果は、抗第8因子関連抗原抗体陽性であった。以上のことから、本実験で用いた細胞が、血管内皮細胞由来であることが確認された。

#### [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 反応

1.5mM Ca<sup>2+</sup> 存在下で bradykinin は濃度依存性 (10<sup>-8</sup>-10<sup>-6</sup>M) かつ急速 (15秒以内で頂値をとる) な [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応を示した。bradykinin による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は急峻なピーク (初期相) とそれに続く基礎値よりやや高いなだらかな持続的上昇 (持続相) から成った。3 mM EGTA 前処置により、初期相は減弱するが明らかに存在するのに対し、持続相は完全に抑制された。3 mM EGTA 存在下、10<sup>-6</sup>M ionomycin 添加により、bradykinin の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応は完全に抑制された。しかしながら、ionomycin 処理後、1.5mM Ca<sup>2+</sup> を含む新しい Hepes 緩衝液に置換することにより、時間依存性に bradykinin に対する [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応は回復し、2分以内に完全に回復した。この bradykinin に対する [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の反応性の回復は 10<sup>-5</sup>M verapamil (Ca<sup>2+</sup> チャンネルブロッカー) の同時添加によっても有意の影響を受けなかった。

### Ⅳ. 考 察

bradykinin を含む内皮細胞依存性の血管拡張物質は、種々のほ乳類の血管内皮細胞上のそれぞれの特異的受容体に働き、PI代謝回転、Ca<sup>2+</sup>動員 (IP<sub>3</sub>を介すると考えられている) 等の一連の生化学的反応により PG-I<sub>2</sub> 及び EDRF 産生を促すと考えられている。さらに bradykinin はヒト臍帯静脈内皮細胞からも PG-I<sub>2</sub> 及び EDRF 産生を促すことが報告されている。本実験では、bradykinin は明らかにヒト臍帯静脈内皮細胞内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応を惹起した。この Ca<sup>2+</sup>動員は、細胞外及び細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部の両者からであることが示唆され、PG-I<sub>2</sub> 及び EDRF 産生機構に密接に関与するものと考えられる。EGTA 存在下、ionomycin 添加により、bradykinin の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応が完全に抑制されたことは、ionomycin 処理が bradykinin 感受性の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部を完全に枯渇させることを示唆した。ところが、ionomycin 処理後、1.5mM Ca<sup>2+</sup> を含む新しい Hepes 緩衝液に置換すると、bradykinin に対する反応性が急速に (2分以内) に回復した実験結果は、ヒト臍帯静脈内皮細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部に急速な Ca<sup>2+</sup> 再充填機構が存在することを示唆した。また、verapamil 同時添加によってもこの急速な Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部の再充填機構が影響を受けなかった本実験は、細胞外 Ca<sup>2+</sup> が voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel 以外を経由して細胞質に流入した後、急速に細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部に取り込まれる可能性を示唆した。この再充填機構の生理的意義は不明であるが、ヒト臍帯静脈内皮細胞内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の急速な変化に対し緩衝作用を有すると推測され、この効果が [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 依存性の PG-I<sub>2</sub> 及び EDRF 産生を制御することにより、血管収縮を調節していると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

高血圧の原因は遺伝的因子, 神経性因子, 代謝性因子等多様であるが栄養的因子としてナトリウムの過剰の他にカルシウム欠乏が最近注目されている。ナトリウムの過剰摂取は循環血液量の増加レニン活性の増加とともにNa-K-ATPase を抑制するウアイン様物質の増加をおこし細胞内ナトリウムの増加をきたしナトリウム カルシウムの交換機序によって細胞内カルシウムを増加させる他, 尿中へのカルシウム排出を増加させ, カルシウム摂取の不足ともひ続発性副甲状腺機能亢進をおこさせ, これによる細胞内カルシウムを増加させ平滑筋の収縮によって血圧を上昇させる。血管平滑筋とともに血管の動態と情報伝達に重要な役割を果している血管内皮細胞の細胞内カルシウムについてはまだ不明な点が多いがプロスタサイクリンや内皮由来弛緩因子 (EDRF) は血管内皮細胞の細胞内カルシウムを上昇させることが知られており, これらの作用物質はブラディキニンその他の血管作動物質によって放出され, 血管の弛緩をおこすことが報告されており, 血管内皮細胞の細胞内カルシウムの上昇は平滑筋細胞とま逆に血管の弛緩をおこすことが注目されている。しかし乍らブラジキニンの血管内皮細胞における情報伝達の機序については殆ど知られていない。

そこで研究者はヒト臍帯血管から内皮細胞をとり出しHUVE細胞系をつくってブラジキニンの定用機序について特に情報伝達に対する作用を中心に検討した。

Jaffe 等の方法によりヒト臍静脈から血管内皮細胞を摂取した。0.1% コラゲネースで細胞を分離し, 15% FCSを含むRPM±1640培地に15% NU血清 $10\mu\text{g}/\text{ml}$  ECGS,  $90\mu\text{g}/\text{ml}$ のヘパリンと抗生物質を加えて培養した。細胞内カルシウムの測定はFura II 蛍光法によって行ない, 340と380nmの蛍光に10msec 毎に測定して算出した。ブラジキニン $10^{-6}$ によって細胞内遊離カルシウムは急激に上昇し, 15秒で最大に達し, その後持続高値が4-5分継続した。EGTAで前処置すると最初のピークは有意に減少し, 又持続高値は消失した。このことは最初のピークは細胞内カルシウムプールからの動員にもとづき持続高値は細胞内カルシウムに依存することが示唆された。又ブラジキニンによって急速な $\text{IP}_3$ 産生が観察され, 細胞内カルシウムプールからの動員における $\text{IGP}_3$ の関与が示唆された。この結果 $\text{PGI}_2$ やEDRFの産生が起こる事が考えられた。又血管内皮細胞における急速なカルシウム再充填機構の存在が示唆された。

以上本研究者は, 従来殆ど研究されなかったブラジキニンの血管内皮細胞における作用機序について検討し新しい知見を得たもので, 価値ある集積とみとめられる。よって, 本研究者は, 医学博士の学位を得る資格があると考えられる。