

骨髄間質細胞の細胞周期進行における STIM/Orai 及び TRPC チャネルの役割

市川 純, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学教室)

骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell, BMSC) は骨髄内に存在し骨芽細胞や脂肪細胞, 軟骨細胞のみならず神経や血管及び心筋へと分化可能な体性幹細胞を含む。採取の容易さや成人骨髄にも存在し自家移植可能であることから, 再生医療の安全な幹細胞ソースとして既に臨床治療にも応用されている。方法としては骨髄穿刺により採取した BMSC を培養して増やし分化誘導してから移植することが多い。そのため, 培養効率の向上は重要な課題の一つであり, 増殖及び分化, あるいは細胞周期の制御機構を知ることは不可欠であるが依然不明な点が多い。そこで BMSC の細胞周期制御における Ca^{2+} の役割に着目し, 近年非興奮性細胞の重要な Ca^{2+} 動員経路として注目されている STIM/Orai 及び TRPC 分子の関与について検討した。ラットより単離し一次培養した BMSC を各細胞周期に同調させて mRNA 及びタンパク発現量を調べると, S 期において顕著な STIM/Orai 及び TRPC1 の発現増加と TRPC6 の発現減少が観察された。これとは反対に G_1 期において TRPC6 の発現量は増加していた。 Ca^{2+} イメージング法で細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を測定すると, ストア依存性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) が S 期で増大し G_1 期で減少していることがわかった。またフローサイトメトリーによる解析の結果, RNAi 法により STIM/Orai あるいは TRPC1/C6 の発現を抑制すると, 細胞周期分布に対して各々異なる影響を及ぼすことが明らかとなった。更に膜電位について検討した結果, TRPC6 の発現が最も少ない S 期では BMSC の静止電位が最も深く, 逆に発現が最も多い G_1 期では最も浅いことがわかり, 静止電位と TRPC6 発現量の相関性が示唆された。また RNAi 法により TRPC6 の発現抑制を行うと静止電位が過分極側へ傾き, 且つ SOCE が増大することが明らかとなった。静止電位と SOCE の直接的な関連を調べるため細胞外を Na^+ -free の状態にして膜を過分極させたところ, SOCE が大きくなり且つ異なる各細胞周期間の差異が消失した。反対に細胞外を過剰 K^+ で灌流し膜を脱分極させると SOCE が小さくなり, 過分極時と同様に異なる各細胞周期間の差異が消失した。これらの結果より, S 期においては STIM/Orai 及び TRPC1 の発現量増加のみならず, TRPC6 の発現量減少による静止電位の過分極側へのシフトとそれに伴う Ca^{2+} の駆動電圧増加によって SOCE が増大し (G_1 期では

その逆の現象が起こる), 細胞周期進行に影響を及ぼす可能性が示唆された。

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

ストア作動性カルシウムによる免疫制御

大洞将嗣^{1,2} (¹九州大学生体防御医学研究所感染ネットワーク研究センター分子免疫学分野, ²科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業「さきがけ」)

胸腺内 T 細胞の分化では, T 細胞受容体 (TCR) シグナルによって, T 細胞の運命が決定する。TCR 刺激によって活性化されるシグナル伝達経路のうち, カルシウムシグナルは, カルシウム流入後に活性化されるカルシニューリンを欠損するマウスの解析によって, T 細胞の分化に重要な役割を果たすことがよく知られている。T 細胞では, ストア作動性カルシウム流入が主なカルシウム流入機構であるため, ストア作動性カルシウム流入は, T 細胞の分化に決定的な役割を果たしていると考えられてきた。しかし, 個体レベル, 分子レベルでの証明はなされていない。そこで我々は, ストア作動性カルシウム流入の重要な制御分子である Stim1 と Stim2 を欠損するマウス (Stim 欠損マウス) を用いて, T 細胞の分化におけるストア作動性カルシウム流入の役割の解析を行った。

Stim 欠損マウスはカルシニューリン欠損マウスと異なり, $\alpha\beta$ TCR 陽性 T 細胞の細胞数, CD4/CD8 の比率だけでなく, 胸腺におけるポジティブセレクションも正常であった。大きなカルシウム流入が必要とされるネガティブセレクションにおいても, 部分的な障害のみを観察した。この結果から, 自己反応性の T 細胞の選択にストア作動性カルシウム流入が関与している可能性が示唆された。そこで, 自己反応性 TCR を持ち機能的な成熟 T 細胞を選択するアゴニスト選択性 T 細胞 (制御性 T 細胞など) の分化の解析を行った。その結果, ポジティブセレクションなどとは対照的に, ストア作動性カルシウム流入はアゴニスト選択性 T 細胞の分化を選択的に制御していることが判明した (図)。Stim1 と Stim2 の欠損によって, アゴニスト選択性 T 細胞のもっとも未熟な前駆細胞の発生には影響せずアゴニスト選択そのものへの影響は軽微である一方, アゴニスト選択後のマスター転写因子の発現上昇, 前駆細胞の増殖, さらに機能的な成熟が著明に障害されていた。選択後の成熟が阻害されているメカニズムは, カルシウム依存性の転写因子 NFAT の標的分子 (サイトカイン受容体やエフェクター分子) の発現が減少し

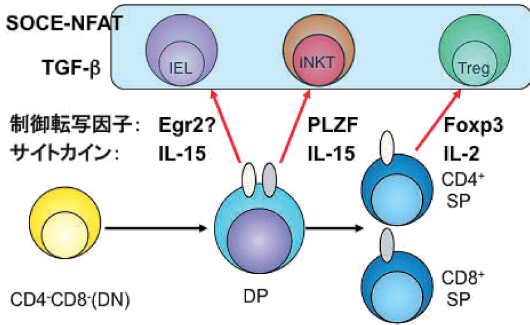


図 ストア作動性カルシウム流入 (SOCE) による持続的かつある一定レベル以上のカルシウム流入は、抑制機能を持つ T 細胞群のアゴニスト選択後分化を制御している。

ているためであった。さらに、転写因子 NFAT1 と NFAT2 を欠損した場合、やはり選択的にアゴニスト選択性 T 細胞の分化が阻害された。

以上、STIM 依存性ストア作動性カルシウム流入を介したカルシウムシグナルは、効率的な NFAT の活性化を介して、アゴニスト選択性 T 細胞の選択後成熟を制御していることが明らかとなった (図)。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

皮膚表皮角化細胞における STIM1-Orai1 を介したカルシウム流入の生理的意義

富田一沼賀拓郎^{1,2} (1九州大学高等研究院, 2アメリカ国立環境衛生科学研究所・アメリカ国立衛生研究所)

生体を体外の危険から保護する最前線組織が表皮組織である。表皮の完全性はそれを構成するケラチノサイトの分化により制御され、その分化機構の破綻は、多くの皮膚疾患の原因あるいは増悪因子として知られている。表皮におけるケラチノサイトの分化を制御する主要因子が、細胞内および細胞外に存在する Ca 濃度勾配を特徴とする Ca ホメオスタシスである。細胞内外の Ca 濃度は未分化な細胞がある基底層において低く、上層の顆粒層において高くなる。細胞外 Ca 濃度上昇は、細胞表面に発現する Ca 感受性受容体 (CaSR) により感受され、細胞内シグナル伝達系を活性化しケラチノサイトの分化を推進する。この細胞内シグナル伝達系のひとつが細胞内の Ca シグナルである。

我々は、これまでにこの細胞内 Ca シグナルに

着目し、細胞外からの Ca 流入経路の探索から、ストア作動性 Ca 流入 (SOCE) がその主要な Ca 流入経路であろうと予測し研究を行った。SOCE は、非興奮性細胞における主要な細胞外から細胞内へのカルシウム流入経路であり、特に T 細胞の増殖・分化の破綻に起因する重症複合免疫不全症の原因変異因子として有名である。しかしながら、T 細胞以外における SOCE の生理的重要性はまだあまり報告されていない。SOCE は二つの主要タンパク質 STIM1 と Orai1 により構成される。細胞内 Ca ストアである小胞体内の Ca 濃度の低下を Ca 結合タンパク質 STIM1 が感知し、形質膜上のチャンネルサブユニットである Orai1 を物理的相互作用により活性化し SOCE が惹起される。

我々は、ヒトケラチノサイト株である HaCaT 細胞を低 Ca から高 Ca 含有培地にスイッチすることによる分化モデル (Ca スイッチ) を用いて、STIM1 と Orai1 を RNA 干渉により発現抑制し、その細胞内 Ca 動態と分化過程に与える影響を解析した。その結果、人工的にストアを枯渇させ得る小胞体 Ca ポンプ阻害剤 Thapsigargin (TG) に惹起される Ca 応答が STIM1 および Orai1 のノックダウンによりほぼ完全に抑制された。このことから、STIM1 と Orai1 がケラチノサイトにおける主要な SOCE の構成因子であることを明らかにした。ここで興味深いことに、ケラチノサイトを低 Ca 培地において培養した場合、ストア内 Ca 量の減弱が STIM1 および Orai1 ノックアウトにおいて観察された。一方、高 Ca 培地で培養した細胞においては観察されなかった。これらから未分化な細胞においては、ストアの構造的な枯渇が誘発されており、SOCE はストアを再充填するために常に活性化していることが示唆された。これら SOCE の欠損は、細胞外 Ca 濃度上昇に伴う細胞内 Ca 上昇を強く抑制した。これに伴い、Ca スイッチに誘導されるケラチノサイト分化マーカーの発現が抑制された。また分化に付随する細胞増殖の抑制についても STIM1 と Orai1 において減弱されることを明らかにした。一方で、STIM1 と Orai1 の抑制は未分化細胞の増殖も抑制し、SOCE がケラチノサイトにおいて細胞増殖と分化のバランスを制御する重要な因子であることが示唆された。

我々は、in vivo における STIM1 の意義を解析するため、皮膚表皮特異的な STIM1 ノックアウトマウスを作製した。残念ながら、通常の皮膚組織においては、顕著な表現型は観察されなかった。しかしながら、創傷治癒について検討したところ、STIM1 ノックアウトマウスにおいて有意な治癒

の促進が観察された。以上から、STIM1が創傷治癒のような急激な皮膚組織の再構成が必要な場合に、活性化する因子であることが示唆された。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

ストレス性高血圧原因遺伝子としての *Stim1* の同定：高血圧モデルラット SHRSP を用いた研究

大原浩貴, 磯村 実, 並河 徹 (島根大学医学部病態病理学講座)

【はじめに】

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) は、その祖先系統である高血圧自然発症ラット (SHR) の中から、脳卒中により死亡した親からの仔を選抜・交配することで1974年に確立された。SHRSPはSHRよりも重症の高血圧を示し、何の人為的措置なしにほぼ100%の個体が脳血管障害を発症する。

SHRSPの遺伝性循環器病態において、その「過剰な」ストレス感受性の関与が示唆されている。その分子機序として、交感神経活性と血圧調節の中核とされる吻側延髄腹外側野 (rostral ventrolateral medulla; RVLM) における酸化ストレスレベルの亢進が指摘されているが、これを引き起こす遺伝的素因については未知の点が多い [1]。以前我々は、WKYとSHRSPの間で特定の染色体領域を入れ替えたコンジュニック系統を用いた遺伝学的・生理学的解析により、第1染色体の約1.8-Mbpの領域に、交感神経活性の亢進を介して血圧上昇を引き起こす遺伝子が存在することを突き止めた [2]。さらに最近、新たに作成したコンジュニック系統を用いた解析から候補領域を約1.2-Mbpに絞り込み、この領域に存在する *Stim1* 遺伝子を有力な候補遺伝子として同定した [3]。以下にその方法論と結果を簡潔に紹介する。

【方法と結果】

①新規コンジュニック系統の作成

SHRSPゲノムを背景に、WKYの第1染色体断片を移し替えたコンジュニック系統 (SHRSP.WKY-(D1Smu13-D1Wox33)/Izm, 以下SPwch1.72と略) をSHRSPに戻し交配し、そのF1世代を相互交配してF2世代を得た。このF2世代から組換え体を選抜し、SHRSPに戻し交配することで雌雄のヘテロ個体を得た。これらを兄妹交配することで、SPwch1.72より狭いWKY由来の染色体領域を保持するコンジュニック系統 (SHRSP.WKY-(D1Smu13)/Izm, 以下SPwch1.71と略) を確立した。

②ストレス感受性の評価と候補領域の絞り込み

SHRSP, WKY, SPwch1.71 および1.72 いずれも12週齢雄性ラットを用いた。テレメトリー法による血圧測定、ならびに交感神経活性の評価として尿中ノルエピネフリン量の測定および心拍変動のパワースペクトル解析 (高周波成分 (HF) に対する低周波成分 (LF) の比率 (LF/HF) を相対的な交感神経活性として算出) を行い、拘束ストレスもしくは低温ストレスに伴うこれらの生理学的パラメーターの変化値をストレス感受性の指標とした。

SPwch1.71, SPwch1.72ともにベースラインの血圧はSHRSPと同等であった。拘束もしくは低温ストレスを与えた際の血圧変化は、SPwch1.72はSHRSPよりも有意に低く、一方SPwch1.71はSHRSPと同等であった。同様に、交感神経活性についてもSPwch1.72のそれはSHRSPより有意に低いが、SPwch1.71はSHRSPと同等であった。これらの結果から、SPwch1.71がカバーする染色体領域を候補から除し、ストレス感受性遺伝子の存在領域を約1.2-Mbp、候補遺伝子を12個に絞り込んだ。

③候補遺伝子の解析

SHRSPとWKYをコントロール群と低温ストレス負荷群 (各N=5) に分け、RVLMを含む脳幹領域から全RNAおよびタンパク質を抽出した。定量的RT-PCR解析により、低温ストレス負荷によりSHRSPで有意に発現量が高くなる遺伝子を二つ (*Nup98*, *Pgap2*) 同定した。一方、WKY/Izm, SHR/Izm, SHRSP/Izmの全ゲノム配列から各候補遺伝子における非同義置換の有無を調べたところ、SHRSPの *Stim1* 遺伝子にナンセンス変異 (p.Arg640X) が存在することがわかった。ウェスタンブロット解析によりSHRSPで不完全長の変異型STIM1の発現が確認され、WKYと比してタンパク質レベルでの発現低下も見られた。さらに、WKY, SHR, SHRSPの重系と、一般に利用される複数の実験用ラットについて個別にシーケンシングを行い、このナンセンス変異はSHRSP系統に特徴的であることがわかった。

【まとめ】

2009年にGiachiniらによりSHRSPの動脈におけるSTIM1の過剰発現とその高血圧病態との関連が指摘された [4]。彼らと我々の報告の間にはいくつかの相違点があるが、SHRSPの循環器病態の背景に、STIM1が関与する何らかの増悪シグナルが存在する可能性を提示している点に着目すべきであろう [3, 4]。変異による欠失とタンパクレベルでの発現低下、どちらが重要かは不明だが、カルシウム恒常性の制御というSTIM1の生理的

機能を考慮すると、この遺伝子は現時点における最有力候補だと言える。

利益相反：なし

1. Kishi T et al: Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. *Front Physiol* **3**: 335, 2012
 2. Xiao B et al: A 1.8-Mbp fragment on chromosome 1 affects sympathetic response to stress: evaluation in reciprocal congenic strains between stroke-prone spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *J Hypertens* **29**: 257–265, 2011
 3. Ferdaus MZ et al: Identification of *Stim1* as a candidate gene for exaggerated sympathetic response to stress in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *PLoS ONE* **9**: e95091, 2014
 4. Giachini FR et al: Increased activation of stromal interaction molecule-1/Orai-1 in aorta from hypertensive rats: A novel insight into vascular dysfunction. *Hypertension* **53**: 409–416, 2009
-