

ヒト滑膜肉腫細胞におけるOrai1による細胞内Ca²⁺制御

鈴木翔太、鈴木裕可、波多野紀行、村木由起子、村木克彦

愛知学院大学 薬学部

【目的】

Ca²⁺は細胞内の刺激応答反応において重要なメッセンジャーとして働き、多彩な細胞機能の制御に深く関わっている。細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる経路として、細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺遊離と細胞外からのCa²⁺流入が存在する。また、これら2つの経路が密接に関連した現象として、細胞内Ca²⁺貯蔵部位のCa²⁺枯渇により活性化される細胞外からのCa²⁺流入 (Store Operated Ca²⁺ Entry: SOCE) が挙げられる。SOCE は様々な細胞において古くから観察されていたが、その分子機構は長い間未知であった。2005年Roosらは細胞内Ca²⁺貯蔵部位に存在するStim (Stromal interaction molecule) を、2006年Feskeらは細胞膜のOraiチャネルをSOCE 構成分子であると同定した。これらの報告以降、SOCEの分子機構は急速に解明されつつあり、現在SOCE は細胞内Ca²⁺貯蔵部位のStimがCa²⁺枯渇を感知し、Stim自身が細胞膜に存在するCa²⁺透過性イオンチャネルOraiを活性化することにより引き起こされると考えられている。

滑膜細胞は関節滑膜を構成する細胞であり、健常人の関節腔内では滑らかな関節可動に寄与するコラーゲンやヒアルロン酸を分泌している。しかし、関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) 患者の関節腔内では、滑膜細胞が炎症反応により増殖・活性化し、炎症性サイトカインを分泌し続ける。その結果、活性化した破骨細胞が軟骨・骨を破壊し、関節そのものを変形させ、ついには強直を引き起こす。滑膜細胞はRA病態形成において中心となる細胞であるが、SOCEを含めた細胞内Ca²⁺動態については不明な点が多い。また、histamine (His) やbradykinin (BK) は滑膜細胞の細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、RA病態増悪を誘発させるにも関わらず、そのCa²⁺流入経路の関与については未解明である。

本研究では滑膜肉腫細胞株SW982を用いて、滑膜細胞における細胞内Ca²⁺動態、特に免疫系細胞の分化に深く関わるとされているSOCEの分子制御について検討を行った。また、His及びBKによる細胞内Ca²⁺濃度上昇におけるOraiの機能についても解析を行った。

【方法】

RT-PCRはSW982由来cDNAを用いて行った。細胞内Ca²⁺濃度はfura2-AMをロードし、340 nmと380 nmの蛍光強度比を取得することにより測定した。Orai1及びOrai3の機能を解析するため、Orai1あるいはOrai3を標的としたsiRNA (siOrai1, siOrai3) をSW982に導入し、導入後96時間後に細胞内Ca²⁺濃度を測定した。

【結果】

SW982におけるSOCE構成分子を明らかにする目的で、Orai及びStim familyのmRNA発現を RT-PCR法により検討した。その結果、SW982ではOrai1~3、Stim1、2が発現していた。Orai familyはすべてのサブタイプのmRNAが発現していたが、生体内で機能しているという報告が多いOrai1、3に着目した。siOrai1及びsiOrai3をSW982に導入し、SOCEにおけるそれぞれのサブタイプの寄与について検討した結果、siOrai1導入SW982では遺伝子発現抑制効果のないスクランブルsiRNA導入SW982に比べてCa²⁺ストア枯渇薬であるThapsigargin (TG) 誘発SOCEが大きく減少した。しかし、siOrai3導入SW982ではSOCEの減少はみられなかった。よって、TG誘発SOCEではOrai1の寄与が大きいことが明らかになった。

次にTG誘発SOCEに比べて、より生理条件に近いagonist誘発SOCEにおけるOrai1、3の寄与について検討した。SW982におけるHis及びBKによる細胞内Ca²⁺濃度上昇にはH₁受容体及びB₂受容体が関与することが明らかになった。またagonist刺激により一過性細胞内Ca²⁺濃度上昇の後にSOCEが誘発されることが明らかになった。siOrai1導入SW982では、His及びBKによる一過性細胞内Ca²⁺濃度上昇に大きな変化はなかったが、SOCEは大きく減少した。つまり、His及びBK誘発SOCEでは、Orai1を介した細胞外からのCa²⁺流入が大きく関与することが明らかになった。一方、siOrai3導入SW982では、agonist刺激による一過性細胞内Ca²⁺濃度上昇に大きな変化はなく、またBK刺激後のSOCEにも変化はなかったが、His刺激後のSOCEは有意に増加した。この結果はOrai3がHis刺激後のSOCEを負に制御している可能性を示唆している。

最後にagonist誘発細胞内Ca²⁺動態におけるOrai1、3の機能について検討した。His及びBKを5分間SW982に添加し、その間の細胞内Ca²⁺濃度上昇に対するOrai1、3の寄与について解析した。その結果、siOrai1導入SW982では5分間のHis及びBK誘発細胞内Ca²⁺濃度上昇が大きく減少した。一方、siOrai3導入SW982では5分間のBK誘発細胞内Ca²⁺濃度上昇に変化はなかったが、His誘発細胞内Ca²⁺濃度上昇はHis刺激後のSOCEと同じく有意に増加した。

【考察】

ヒト滑膜細胞やSW982において、agonist刺激による細胞内Ca²⁺濃度上昇がPKCの活性化を介して炎症性サイト

カインの分泌を促進することが報告されており、滑膜細胞における細胞内Ca²⁺濃度はRA病態形成を制御する重要な因子であると考えられている。

本研究結果により、SW982におけるTG及びagonist誘発SOCEにOrai1を介した細胞外からのCa²⁺流入が大きく寄与することが明らかになった。またHis刺激によるSOCEでは、Orai3がSOCEを負に制御するという新たな分子機構の存在を示唆した。Orai1及びOrai3による細胞内Ca²⁺濃度制御機構はHisやBKを介したRA病態形成に関与する可能性があり、RA療法の新たな標的となるかもしれない。



「自分らしさ」が、ウォルナットスタイル。

変化の速い時代に合った、新しい地域医療のカタチを
書き続けていくために必要なもの。
それは、いつの時代においても、患者さんの気持ちを理解
することができ、柔軟に対応していける「センス」をもっ
た人材——愛知にこだわる調剤薬局グループウォルナット
はそう考え、「センス」ある薬剤師の皆さんとの出会
いを大切にしています。

<http://www.walnut-net.co.jp/>

モバイル→<http://www.walnut-net.co.jp/m/>



愛知名古屋の調剤薬局グループ
WALNUT Co., Ltd.
株式会社ウォルナット

〒460-0008 名古屋市中区栄3-11-31 グラスシティ栄6F TEL 052-252-0963 E-mail info@walnut-net.co.jp