

学位論文（博士）

Endoplasmic reticulum stress promotes nuclear
translocation of calmodulin,
which activates phenotypic switching of
vascular smooth muscle cells

（小胞体ストレスがカルモジュリンの核内移行を促進することにより、血管平滑筋細胞の形質転換を引き起こす）

氏名 内田 智之

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 器官病態内科学講座

令和4年12月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	3
4. 方法	4
5. 結果	5
6. 考察	6
7. 結語	7
8. 謝辞	8
9. 参考文献	9

1. 要旨

小胞体ストレスの増加は、動脈硬化において血管平滑筋培養細胞 (VSMCs) の形質転換 (分化→脱分化) と強く関連している。小胞体の Ca^{2+} 貯蔵量減少は、VSMCs における小胞体ストレスの増加の主要な原因の一つである。リアノジン受容体 (RyR) は筋小胞体膜上に存在する主要な Ca^{2+} 放出チャネルである。正常細胞の安静状態ではカルモジュリン (CaM) は RyR と結合し、RyR を閉鎖した状態で安定化させている。CaM と RyR の結合が減弱すると、RyR から異常な Ca^{2+} 漏出が起これ、 Ca^{2+} 貯蔵量が減少し、小胞体ストレスが増加する原因となり得る。そこで我々は、マウスの VSMCs を用いて RyR に結合している CaM (CaM-RyR) が小胞体ストレスにより引き起こされる VSMCs の形質転換に重要な役割を果たしているか否か、また、CaM-RyR の結合親和性を高める作用を有するダントロレン (DAN) が VSMCs の形質転換に影響を与えるか否かを評価した。

小胞体ストレスにより CaM が RyR から解離し、核内へ移行することにより、MEF2 と KLF5 の核内での発現量が増加し、この MEF2-KLF5 のシグナル伝達経路が活性化することで VSMCs が形質転換 (分化→脱分化) し、増殖能や遊走能を有するようになり動脈硬化巣の形成や不安定化につながるという新たな知見を得ることができた。さらに CaM-RyR の結合親和性を高める DAN は、RyR チャネルを安定化させ、異常な Ca^{2+} 漏出を抑制し、小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量を保持することで小胞体ストレスの増加を抑制し、さらに CaM の核内への移行を制御することで、MEF2-KLF5 経路の活性化を抑制し、その結果として VSMCs の形質転換を抑制することが示され、動脈硬化巣の進展化、不安定化に対する全く新しい治療戦略となり得る可能性があることが示唆された。

2. 研究の背景

動脈硬化は虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症、大動脈瘤、脳卒中など心血管疾患の主要な原因であり、世界的に人類の健康にとって大きな脅威の内の一つとなっている [1]。

血管平滑筋細胞 (VSMCs) は動脈硬化の進展に重要な役割を果たしている。VSMCs は動脈の中膜に存在し、正常では収縮型と呼ばれる分化した形質を示し、血管の弾力を維持している。細胞に傷害やストレスが加わると、VSMCs は収縮型から再び合成型と呼ばれる未分化な形質へ変化し、より高い増殖能や中膜から内膜への遊走能を持つようになり (形質転換と呼ばれる)、動脈硬化巣の形成や不安定化に関与している [2]。したがって、VSMCs の形質転換 (分化→脱分化) を抑制することが心血管疾患の治療において重要なステップとなり得る。

VSMCs における小胞体ストレスは脆弱なプラーク形成に関与するアポトーシ

スや形質転換（分化→脱分化）に影響を与えている。VSMCsにおける小胞体ストレスの主要な原因の一つとして、小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量の減少が言われている[3]。小胞体膜上に存在する Ca^{2+} 放出チャネルの一つであるリアノジン受容体 (RyR) は、VSMCs の Ca^{2+} 動態において中心的な役割を果たしている[4]。また、RyR 修飾蛋白の一つであるカルモジュリン (CaM) は正常な状態では、RyR に結合し、RyR の開閉を安定化させ、小胞体の Ca^{2+} 貯蔵量の維持に関与している[5]。一方、RyR から CaM が解離（結合親和性が低下）することによって、RyR から異常な Ca^{2+} 漏出が起これ、それに伴い小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量が減少し、小胞体ストレスが惹起される可能性があり、小胞体ストレスの発生と CaM の RyR に対する結合親和性低下との間に関連性があると推測される。心筋細胞では、心肥大のシグナル活性を刺激するアンギオテンシン II 負荷や圧負荷心肥大モデルにおいて、RyR から CaM が解離し、RyR から解離した CaM が核内へ移行することにより HDACs (ヒストン脱アセチル化酵素) の核外移行を促し、心肥大のシグナル (MEF2、NFAT など) が活性化されることを証明した[6]。VSMCs においては、MEF2 の活性化は VSMCs の形質転換を引き起こすとされる転写因子 KLF5 の核内発現を誘導する[7、8]。しかし、VSMCs において CaM の核内移行が VSMCs の形質転換に関与しているとの報告はまだない。

そこで CaM-RyR の結合親和性が小胞体ストレスにより引き起こされる VSMCs の形質転換における重要な役割を果たしているか否かを検討した。小胞体ストレスを惹起する薬剤としてツニカマイシン (TM)、また CaM-RyR の結合親和性を高め、RyR チャネルを安定化させる作用を有するダントロレン (DAN) を使用し[9、10、11]、血管平滑筋培養細胞を用いて CaM-RyR 結合能における役割を評価した。スラミンは直接的に CaM を RyR から解離させ[12]、CaM の核内移行を促進するため[6]、スラミンが VSMCs の形質転換を促進するか否かも検証した。動脈硬化モデルである ApoE ノックアウトマウスを用いて、大動脈の動脈硬化性プラーク面積に対する DAN の効果も評価した。

3. 目的

本研究では血管平滑筋細胞 (VSMCs) を用いて CaM-RyR の細胞内動態が小胞体ストレスにより引き起こされる VSMCs の形質転換（分化→脱分化）に重要な役割を果たすか否か、また CaM-RyR の結合親和性を高める作用を有する DAN が VSMCs の形質転換に影響を与えるか否かを評価した。

4. 方法

全ての手順は山口大学医学部の動物倫理委員会のガイドラインによって承認された動物の管理と使用に関する指針に従って遂行された。

2.1 細胞培養

マウスの大動脈血管平滑筋培養 (MOVAS) 細胞は ATCC (Rockville, MD, USA) から購入し、DMEM (Invitrogen) に 0.1% のウシ胎児血清 (FBS)、100IU/mL のペニシリン、100mg/mL のストレプトマイシンを加えて 37°C、5% CO₂ で加湿された培養器内で培養した。高濃度の FBS では VSMCs が形質転換 (分化→脱分化) するため [13]、培養細胞が生存できる最低限の FBS 濃度を用いた。

2.2 カルセイン-アセトキシメチルエステル (Calcein-AM) 法

細胞の生存率を Calcein-AM 染色で確認した。ある濃度の TM を加えた後に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、2 μmol/L の Calcein-AM で 30 分間、37°C で培養した。カルセイン陽性細胞を蛍光マイクロプレートリーダーで検出した。

2.3 TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) と cleaved caspase-3 法

アポトーシスした細胞を TUNEL assay kit (DeadEnd Fluorometric System Kit) を製造仕様書通りに使用し、計測した。cleaved caspase-3 (ab13847, 1:200; Abcam) の免疫細胞染色で、アポトーシスし、死亡した細胞の計測を行った。

2.4 細胞内 Ca²⁺レベルのモニタリング

MOVAS 細胞を 20 μmol/L の Fluo-4-AM を加えて 30 分間、37°C の培養器で Ca²⁺ を含まないタイロード液 (140mM NaCl, 6mM KCl, 1mM MgCl₂, 10mM glucose) で培養した。小胞体の Ca²⁺貯蔵量は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss, Germany) を用いて計測した [14]。Fluo-4 は 488 nm で励起され、500/530 nm バンドパスフィルターを用いて発光を記録した。小胞体の Ca²⁺貯蔵量を評価するために 10 μmol/L のイオノマイシンを急速投与した。

2.5 免疫細胞染色

MOVAS 細胞をスライドガラスにのせ、4%パラホルムアルデヒドで 5 分間、固定した [15]。0.1% Triton X を 20 分間使用し細胞膜の透過処理を行った。細胞を洗浄し、1% ウシ血清アルブミンと 3% protein block buffer でブロッキングした。一次抗体は CaM (1:250; EP799Y, Abcam)、RyR (1:500; C3-33, Sigma-Aldrich)、KLF5 (1:200; ab137676, Abcam)、MEF2 (1:250; ab197070, Abcam)、CHOP (1:50; 9C8, Santa Cruz biotechnology)、GRP78 (1:100; PA5-19503, Thermo Fisher

Scientific)、SM22 alpha (1:100;ab14106, Abcam)、calponin1 (1:100;ab46794, Abcam)、SMemb (1:100;MYH10, Abcam)を細胞に加え、一晚反応させた。二次抗体は Alexa Fluor 488 あるいは Alexa Fluor 633 (Invitrogen) を使用した。

2.6 動物

C57BL/6J の ApoE ノックアウトマウスは Charles River 社より購入した。マウスに超高脂肪食 (Research Diets 社の 60 kcal%脂肪含有の D12492) を 4 週齢から実験終了時点まで投与した。

2.7 Oil Red O 染色

新しい Oil Red O 溶液を準備した。大動脈を切り出し、外膜の脂肪や結合組織を除去し、4%パラホルムアルデヒドに一晩漬け、Oil Red O で染色した。画像を撮影し、動脈硬化プラークの面積を Image J を使用して計測した。

2.8 統計解析

データは標準偏差で表現され、Student の t 検定 (図 S1B、図 4A) あるいは Tukey 検定 (図 S1C-F、図 1、図 2、図 3) の後に一元配置分散分析で有意差を評価した。統計学的な有意差は $P < 0.05$ とした。

5. 結果

3.1. DAN は TM による細胞死を抑制する

小胞体ストレスを惹起する TM が細胞死を引き起こすか否かを検証した。MOVAS 細胞を異なる TM の濃度で 24 時間培養した。TM は濃度依存性に細胞死を引き起こした (図 S1A)。50%阻害濃度 (IC_{50}) は 70 ng/mL であった (図 S1A)。50%の生存率であれば、TM による細胞死の増減を正確に評価できると考え、 IC_{50} に近い、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ の TM を本研究では使用した。TM による細胞死は $10 \mu\text{mol/L}$ の DAN の投与によって抑制された。このことより、DAN によって CaM-RyR の結合親和性が高まったことが TM による細胞死の抑制に重要である可能性が示唆された (図 S1B)。次に、TM に暴露されると増加するアポトーシスのマーカーである TUNEL あるいは caspase3 陽性細胞数を DAN が減少させるか否かを評価した。図 S1C-E はコントロール群、TM 群、TM+DAN 群の TUNEL あるいは caspase3 陽性細胞の共焦点顕微鏡画像を示す。DAN は TM により増加した TUNEL あるいは caspase3 陽性細胞数を有意に抑制し、この結果より DAN は TM による細胞のアポトーシスを抑制したことが示唆された (図 S1D-F)。

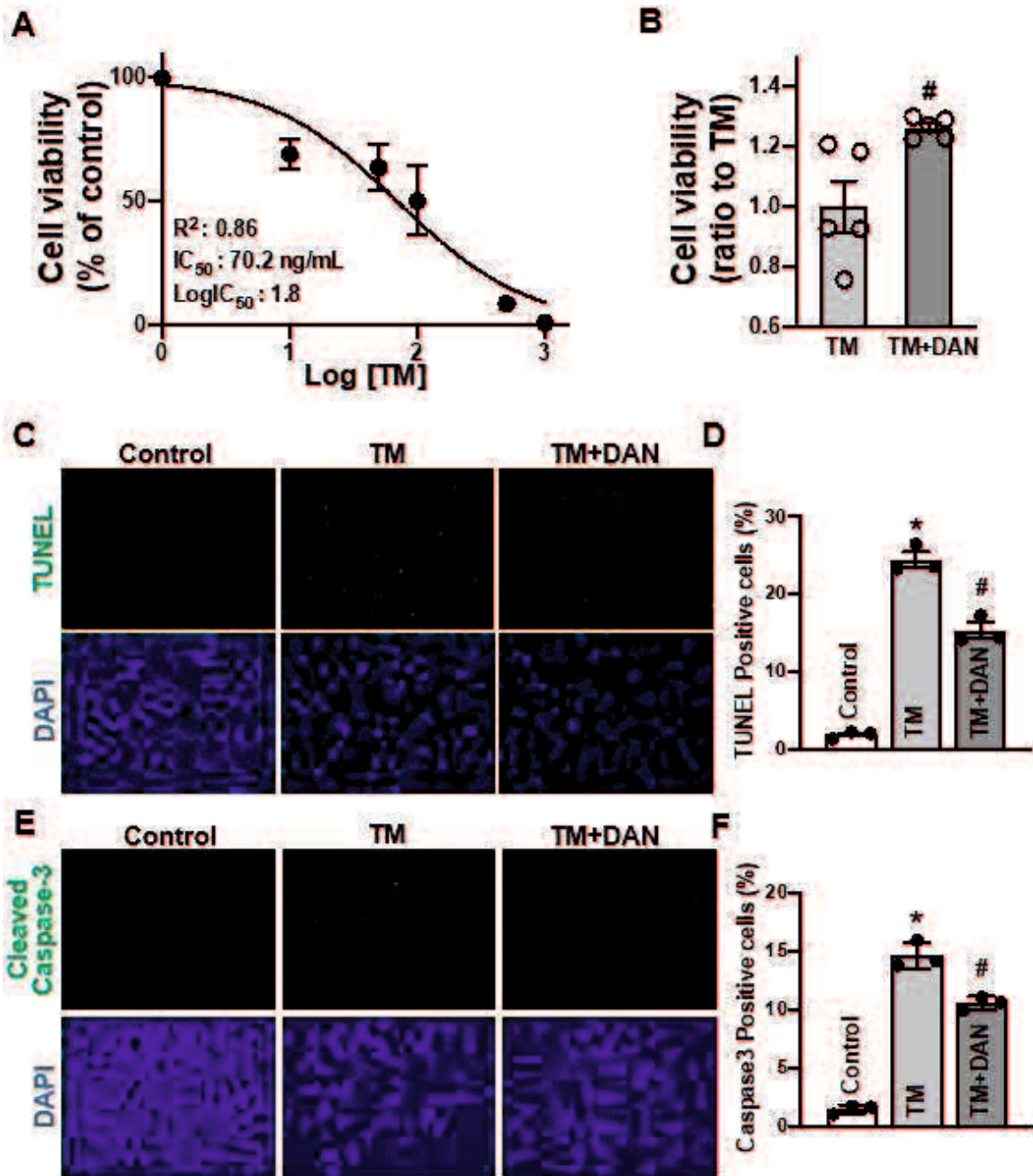


図 S1 DAN は MOVAS 細胞のアポトーシスを抑制することによって、TM による細胞死を抑制する。

A : TM の濃度依存性に細胞の生存率は低下した。B : DAN (10 $\mu\text{mol/L}$) は TM を投与した細胞の生存率を増加させた。

A、B のデータは 5 回の独立した実験結果である。C : コントロール群、TM (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 群、TM (0.1 $\mu\text{g/mL}$) + DAN (10 $\mu\text{mol/L}$) を 24 時間投与した群における TUNEL 陽性細胞の代表的な画像を示す。D : TUNEL 陽性細胞の割合を示す。E : コントロール群、TM (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 群、TM (0.1 $\mu\text{g/mL}$) + DAN (10 $\mu\text{mol/L}$) を 24 時間投与した群における caspase3 陽性細胞の画像を示す。caspase3 陽性は緑色、DAPI は青色で示す。F : caspase3 陽性細胞の割合を示す。D、F のデータは 3 回の独立した実験結果である。* $P < 0.05$ vs. Control、# $P < 0.05$ vs. TM。

3.2 DAN は TM による小胞体ストレスを小胞体の Ca^{2+} 貯蔵量を保持することによって抑制する

TM による小胞体ストレスに対する DAN の効果を小胞体ストレスマーカーである CHOP や GRP78 を用いて評価した。図 1A はコントロール群、TM 群、TM+DAN 群における CHOP と GRP78 の共焦点顕微鏡での免疫蛍光染色画像を示す。DAN は TM による小胞体ストレスを有意に抑制した (図 1A-B)。小胞体ストレスの増加と小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量減少は密接に関連しているため、小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量を $10 \mu\text{mol/L}$ のイオノマイシンを用いて評価した。図 1C にコントロール群、TM 群、TM+DAN 群における細胞内 Ca^{2+} の代表的な画像を示す。TM を 24 時間投与するとピークの細胞質 Ca^{2+} 濃度は減少しており、このことは小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量が減少していることが示唆されるが、DAN はこの小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量の減少を抑制した (図 1D)。

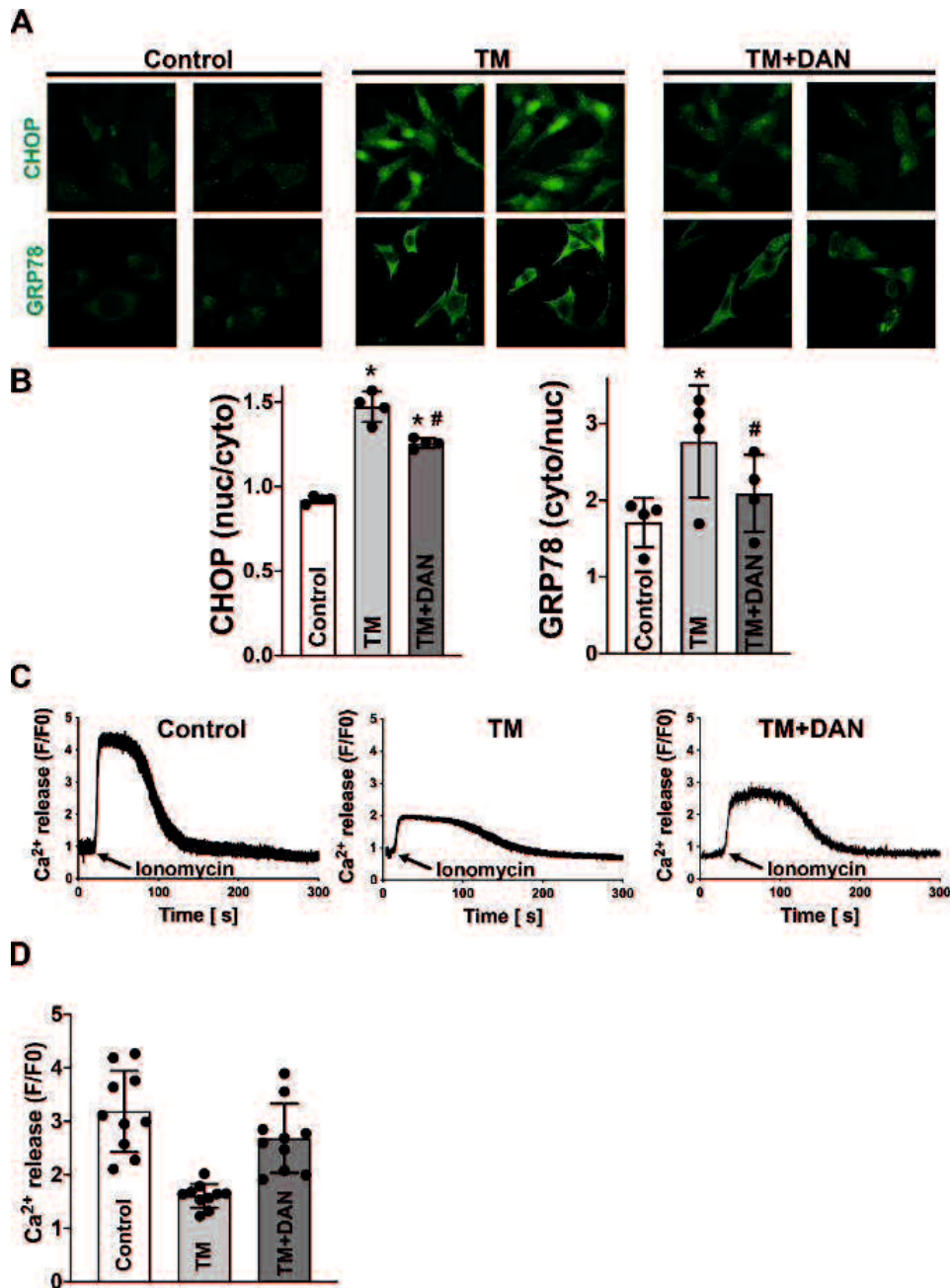


図1 MOVAS細胞においてDANはTMによる小胞体ストレス（GRP78、CHOP）の影響を抑制した。TM、TM+DANがイオノマイシンによるCa²⁺放出に与えた影響を示す。

A：コントロール群、TM(0.1 μg/mL)群、TM(0.1 μg/mL)+DAN(10 μmol/L)群、24時間投与におけるCHOPとGRP78（緑色）の代表的な画像を示す。B：コントロール群、TM群、TM+DAN群における核でのCHOP、細胞質でのGRP78の発現量のまとめ。C：コントロール群、TM(0.1 μg/mL)群、TM(0.1 μg/mL)+DAN(10 μmol/L)群、24時間投与におけるイオノマイシンによるCa²⁺放出の代表的な画像を示す。D：コントロール群、TM群、TM+DAN群でのイオノマイシンによるCa²⁺放出のまとめ。B、DのデータはGRP78とCHOPは4回の独立した実験で合計60個の細胞、Ca²⁺放出は10回の独立した実験結果である。*P < 0.05 vs. Control、#P < 0.05 vs. TM。

3.3 DANは核内のMEF2-KLF5シグナルを不活性化させることでTMによるMOVASの形質転換を抑制する

TMによる小胞体ストレスが形質転換を促進し、DANがこれを抑制するか否かを検討した。図2Aは分化した正常のVSMCsにおいて発現するSM22 α とカルポニン、脱分化状態で発現するSMembの免疫染色画像を示す。

TMに暴露されるとSM22 α とカルポニンの発現量は有意に減少したが、DANを追加すると発現量の減少は抑制された。逆に、TMはSMembの発現量を有意に増加させたが、DANはこの発現量の増加を抑制した(図2B)。VSMCsの形質転換を調節する転写因子として有名なKLF5の発現量はMEF2によってコントロールされており[16]、両者は冠動脈硬化病変に共発現していると報告されている[7]。そこで、MOVAS細胞において、KLF5とMEF2の発現量がTMによって増加するか否か、また仮にTMによりKLF5とMEF2の発現量が増加していれば、DANの投与によりこれらの発現量増加が抑制されるか否かを検討した。図2Cはコントロール群、TM群、TM+DAN群におけるMEF2とKLF5の免疫蛍光染色画像を示す。TM群では、MEF2とKLF5の核内での発現量が劇的に増加したが、DANはこれらの発現を有意に抑制した(図2D)。

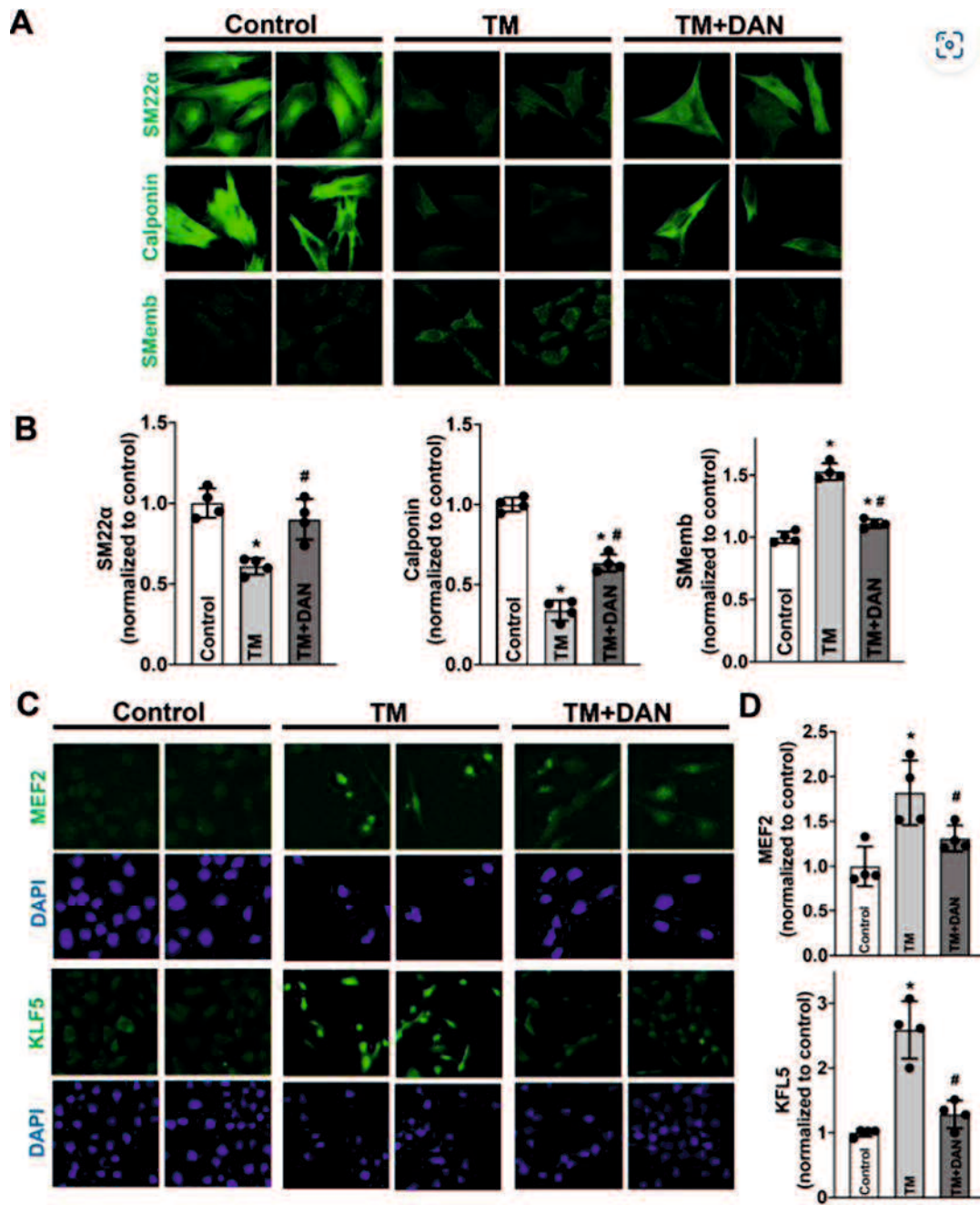


図2 DANはTM投与によるMOVAS細胞の形質転換を促進するMEF2とKLF5の核内発現量増加を抑制した。

A: コントロール群、TM(0.1 μ g/mL)群、TM(0.1 μ g/mL)+DAN(10 μ mol/L)群におけるMOVAS細胞のSM22 α 、カルポニン、SMembの免疫蛍光染色画像を示す。B: コントロール群、TM群、TM+DAN群におけるMOVAS細胞のSM22 α 、カルポニン、SMembの発現量のまとめ。C: コントロール群、TM(0.1 μ g/mL)群、TM(0.1 μ g/mL)+DAN(10 μ mol/L)群におけるMOVAS細胞のMEF2とKLF5の免疫蛍光染色画像を示す。D: コントロール群、TM群、TM+DAN群でのMOVAS細胞のMEF2とKLF5の発現量のまとめを示す。BとDのデータは4回の独立した実験において、合計60細胞を解析した。* $P < 0.05$ vs. Control、# $P < 0.05$ vs. TM。

3.4 TMあるいはスラミンによる VSMCs の形質転換によって引き起こされる CaM の核内移行を DAN は抑制する

心臓では、DAN は病的な心肥大で観察される CaM の RyR からの解離、及び CaM-RyR の核内への移行を抑制し、それに伴い MEF2 活性(病的な心肥大を惹起するシグナル)をも抑制することを報告してきた[6]。VSMCs では、TM を投与することで MEF2 の発現量が増加していたが、この増加が心臓と同様に CaM の細胞内動態と連動しているか否かについては報告がない。よって、VSMCs において、TM 投与により CaM が核内へ移行するか否か、また DAN がこの現象を抑制するか否かを検証した。

図 3A は MOVAS 細胞における CaM と RyR の共局在を示す。MOVAS 細胞に TM を投与した後に、CaM は RyR では減少していたが、核内では増加していた。逆に、DAN の投与によって、TM による RyR での CaM の減少と CaM の核内移行は抑制された(図 3B-C)。スラミンは CaM-RyR 結合部位に直接的に結合し、CaM を RyR から解離させる作用があるため、 $100 \mu\text{mol/L}$ のスラミンを用いて CaM の核内移行が VSMCs の形質転換に重要なステップであるか否かを検討した[12、17]。図 3D はスラミンや DAN の有無で分けた CaM、KLF5、SM22 α 、SMemb の免疫蛍光染色画像であり、核は DAPI で染色した。スラミンによって直接的に CaM を RyR から解離させると、CaM の核内への移行を促進し、さらに KLF5 の核内での発現量が増加し、その結果、形質転換を促進させたが(SM22 α は減少、SMemb は増加)、DAN を投与することで、CaM の核内への移行、及び KLF5 の発現を抑制し、形質転換をも抑制した(図 3E)。

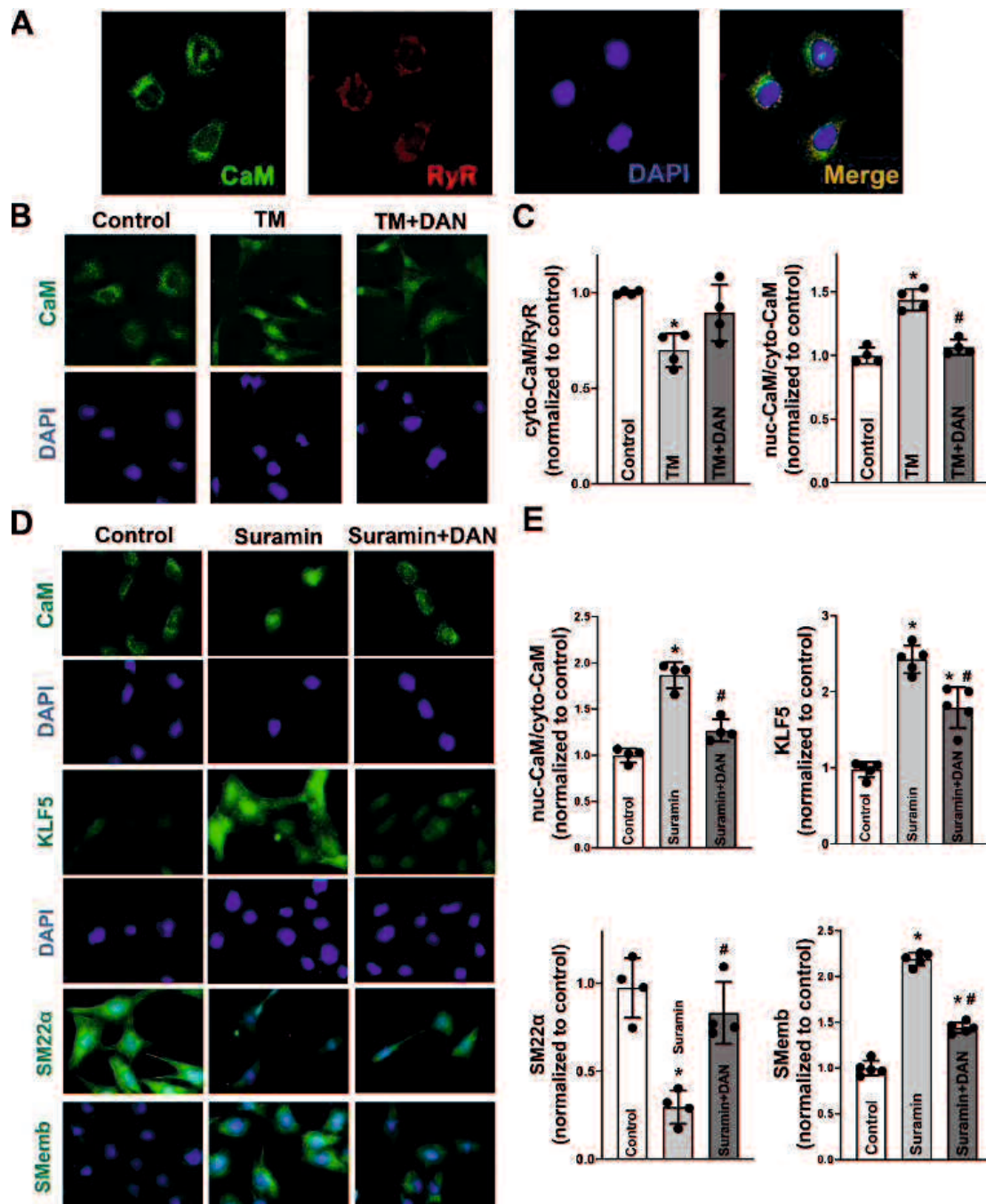


図3 DANはTMによるCaMの核内移行を抑制した。逆にスラミンはCaMの核内移行を促進し、KLF5を活性化させ、MOVAS細胞の形質転換を促進した。

A: MOVAS細胞でのRyRとCaMが共局在した免疫蛍光染色画像を示す。RyR(赤色)、CaM(緑色)、DAPI(青色)、3者を合わせた画像を黄色で示す。B, D: コントロール群、TM(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)群、TM(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)+DAN(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)群、スラミン群、スラミン+DAN(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)群のMOVAS細胞の免疫蛍光染色画像を示す。C, E: BとDのまとめ。データは4回あるいは5回の独立した実験から60個の細胞を用いて解析した。* $P < 0.05$ vs. Control、# $P < 0.05$ vs.

3.5 DAN は ApoE ノックアウトマウスにおける動脈硬化病変形成を抑制する

DAN が動脈硬化を軽減するか否かを検討するために、超高脂肪食を投与した ApoE ノックアウトマウスで Oil Red O 染色を行い、大動脈弓部における動脈硬化プラーク面積を評価した。DAN を投与すると ApoE ノックアウトマウスと比較して大動脈弓における動脈硬化プラーク面積が有意に減少した (図 4)。このことより、CaM-RyR の結合親和性を高めて、RyR 機能を安定化させることにより動脈硬化の進展を抑制できる可能性があることが示唆された。

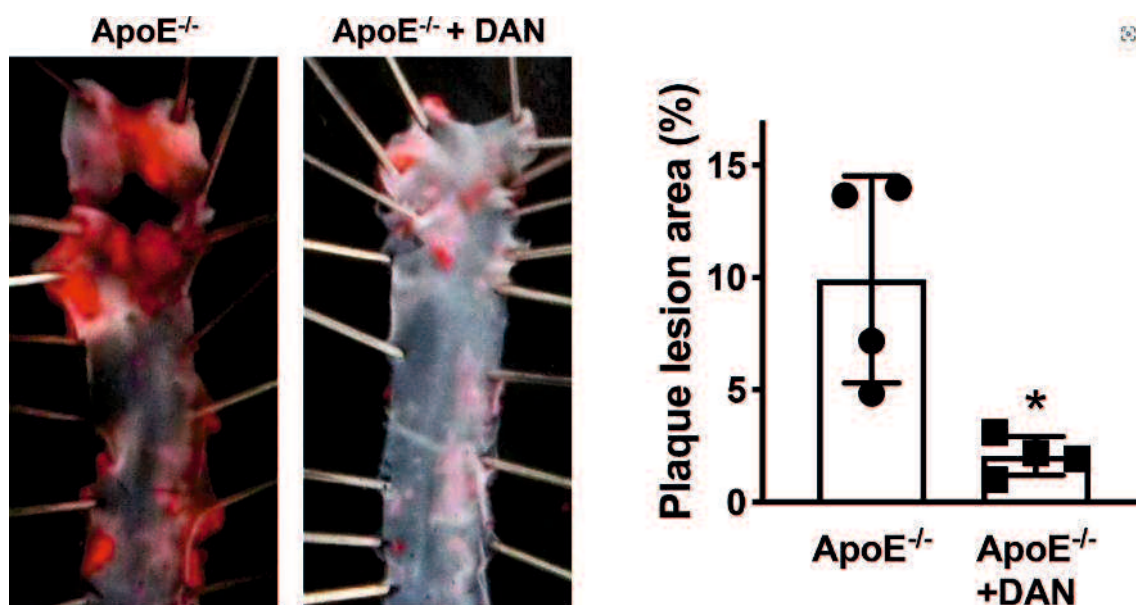


図 4 DAN は ApoE ノックアウトマウスの動脈硬化プラーク形成を抑制する。左は大動脈の代表的な画像、右は大動脈のプラーク病変面積の解析結果を示す。データは 4 回の独立した実験から取得した。*P < 0.05 vs. ApoE^{-/-}。

6. 考察

小胞体ストレスは、VSMCs において形質転換、アポトーシスを促進し、動脈硬化を進展させる [18]。RyR からの異常な Ca²⁺漏出により、小胞体の Ca²⁺貯蔵量が慢性的に減少すると、小胞体ストレスがさらに増加する [19]。心筋細胞では CaM と RyR の強固な結合が RyR チャンネルの安定化につながっているが、様々な刺激により CaM が RyR から解離すると、RyR チャンネルが不安定となり異常な Ca²⁺漏出が起こるだけでなく、RyR から解離した CaM が核内へ移行することで心肥大のシグナルが活性化される [6]。しかしながら、VSMCs では、CaM の核内移行と小胞体ストレスにより引き起こされるアポトーシスや形質転換との関連性は未だ不

明である。

本研究での新しい知見は、

(1) TMによる小胞体ストレスは、アポトーシスを引き起こすことで細胞死を促進したが、CaMとRyRの結合親和性を高める作用を有するDANによってこのアポトーシスは抑制された。

(2) TMによる小胞体ストレスは小胞体内のCa²⁺貯蔵量を減少させたが、DANを投与することで、小胞体内のCa²⁺貯蔵量は保持され、小胞体ストレス応答に関与するGRP78やアポトーシスのマーカーであるCHOPの発現を抑制した。この結果より、CaMとRyRの結合親和性を高め、RyR機能を安定化させることが、動脈硬化巣でみられるVSMCsのアポトーシスと過剰な小胞体ストレスを抑制するために重要であることが証明された。

(3) TMによる小胞体ストレスはVSMCsの分化マーカーであるSM22 α とカルポニンの発現を抑制し、脱分化マーカーであるSMembの発現を増加させた。このことより、TMによる小胞体ストレスはVSMCsの形質転換を促進することが証明された。

(4) さらに、このVSMCsの形質転換を促進させる経路としてMEF2-KLF5のシグナル伝達経路が関与していることが証明された[7、16]。DANはMEF2-KLF5のシグナル伝達経路の活性を抑制し、VSMCsの形質転換を抑制することがわかった。

(5) また、TMによる小胞体ストレスは、CaMとRyRの結合親和性を弱め、CaMの核内移行を促進し、核内でのCaMの発現量増加がMEF2-KLF5のシグナル経路の活性化に関与しており、DAN投与によってCaMの核内移行が制限されることで、MEF2-KLF5のシグナル経路の活性を抑制していることが証明された。

(6) さらに、CaMの核内移行→MEF2-KLF5の活性化→形質転換の促進という経路を裏付けるために、VSMCsにスラミンを添加することとした。スラミンによりCaMはRyRから解離し、そのRyRから解離したCaMは核内移行し、KLF5の発現量を増加させ、その結果VSMCsの形質転換が引き起こされることを証明した。

(7) *In vivo*の実験としてApoEノックアウトマウスを用いたが、ApoEノックアウトマウスにおける動脈硬化プラークの形成は、DANを投与することで抑制された。

小胞体ストレスによりCaMがRyRから解離し、核内へ移行すると、MEF2-KLF5のシグナル経路が活性化することで、VSMCsが形質転換し、動脈硬化の形成につながる。CaMとRyRの結合親和性を高めるDANはCaMの核内移行を抑制し、RyRチャンネルを安定化させ、小胞体内のCa²⁺貯蔵量を増加させることで小胞体ストレスを抑制し、さらにCaMの核内移行により活性化されるMEF2-KLF5シグナル経

路を抑制することで形質転換を抑制する（図5）。

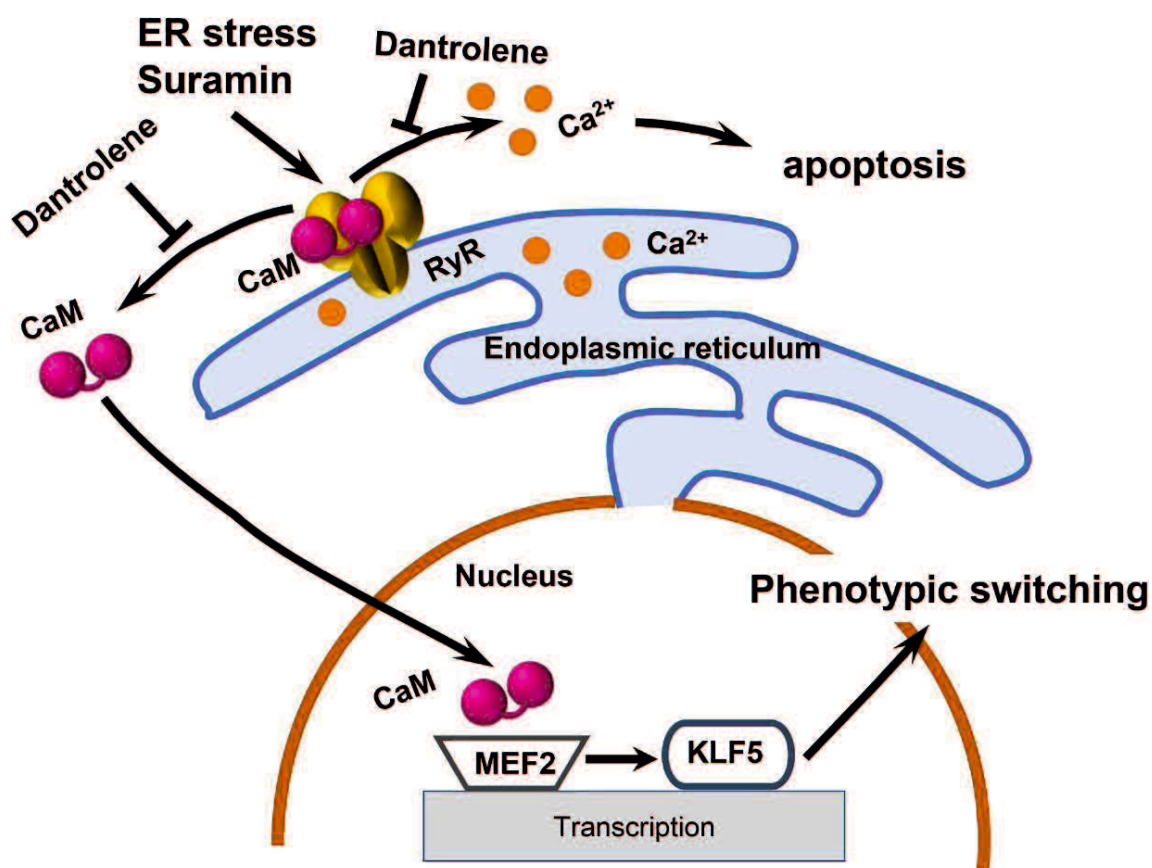


図5 VSMCsの形質転換を促進するCaM、MEF2、KLF5の動態を示す。小胞体ストレスあるいはスラミンによりCaMがRyRから解離し、核内移行する。核内でのMEF2-KLF5シグナル経路はVSMCsの形質転換を促進するが、DANはこのシグナル経路を抑制する。

4.1 TMにより惹起される小胞体ストレスと細胞死に対するDANの効果

磯村らの報告では、人間の神経芽細胞腫であるSH-SY5Y培養細胞ではDANは塩化トリブチルスズ(TBT)により誘導される小胞体マーカーであるGRP78の発現とeIF2 α のリン酸化を減少させることで、TBTによる小胞体からのCa²⁺漏出を抑制し、TBTによるCa²⁺貯蔵量の減少を抑制することで部分的に小胞体ストレスを軽減した。さらに、DANはTBTにより惹起される細胞死を抑制した[20]。中村らは神経細胞において、DANはTMによって誘導されるGRP78の発現と小胞体のCa²⁺貯蔵量の減少を抑制したと報告している[14]。今回の研究で、VSMCsでもDANがTMにより誘導されるGRP78とCHOPの発現を抑制することで、TMによる小胞体ストレスやVSMCsの細胞死を抑制したことが新たに分かった。

4.2 CaM は MEF2-KLF5 シグナル経路を活性化することで VSMCs の形質転換に関与している

心筋細胞では CaM は RyR と直接的に結合し、RyR チャンネルを安定化させている。CaM と RyR の結合親和性はいくつかの心不全モデルにおいて減弱し、RyR から解離した CaM が核内移行することで HDACs の核外輸送や MEF2 シグナル経路の活性化による心肥大へとつながる[6]。VSMCs においては、大石らの報告によると、MEF2 の活性化は KLF5 の発現を誘導し、KLF5 と MEF2 は冠動脈の動脈硬化プラークに共発現しており、MEF2 と KLF5 は動脈硬化の形成において重要な役割を果たしている、と提唱している[7]。KLF5 の活性化はまた、VSMCs の形質転換と関連している[16]。したがって、本研究では、TM により惹起される小胞体ストレスが CaM の核内移行を引き起こし、それに伴い MEF2-KLF5 経路の活性化を促進するか否かを評価した。VSMCs において DAN が CaM と RyR の結合親和性を高めることで CaM の核内移行を抑制し、MEF2-KLF5 経路の活性化を抑制するか否かを確認した。その結果、TM により惹起される小胞体ストレスは CaM の核内移行を促し、MEF2-KLF5 経路の活性化を促進することで、VSMCs の形質転換を起こすが、DAN を投与するとこれらは抑制されることを示した。TM による小胞体ストレスがなくとも、スラミンによって CaM が RyR から解離することで、CaM は核内移行し、KLF5 を活性化し、VSMCs の形質転換が引き起こされた。以上より、CaM の核内移行が MEF2-KLF5 シグナル経路を介する VSMCs の形質転換において重要なステップではないかと結論した。

4.3 ApoE ノックアウトマウスでの動脈硬化プラークに対する DAN の効果

DAN の投与により ApoE ノックアウトマウスを用いて動脈硬化プラークの形成が抑制できるか否かを検証した。動脈硬化プラークの面積は DAN 投与で有意に抑制された。今回の研究ではプラーク面積のみしか評価していないため、細胞内の CaM 動態、KLF5 や MEF2 の発現などより詳細なメカニズムや生体内での形質転換の程度などを ApoE ノックアウトマウスを用いて今後評価する必要がある。

小胞体ストレスにより CaM は核内へ移行することで、MEF2-KLF5 シグナル経路が活性し VSMCs の形質転換が促進される。したがって、CaM と RyR の結合親和性を高め、この経路を抑制することが動脈硬化に対する全く新しい治療戦略となる可能性がある。

7. 結語

小胞体ストレスが CaM の核内移行を促進することにより、VSMCs の形質転換 (分化→脱分化) を引き起こす。したがって、CaM と RyR の結合親和性を高めることが動脈硬化に対する全く新しい治療戦略となる可能性がある。

8. 謝辞

本研究の遂行および論文作成に際し、ご指導、ご鞭撻を賜りました山口大学大学院医学系研究科 器官病態内科学 矢野雅文教授に感謝申し上げます。また、指導教官として終始ご指導いただいた山口大学大学院医学系研究科 器官病態内科学 小田哲郎講師に感謝の意を表します。本研究では多くの先生方や実験助手の方々にデータ収集にご協力いただきました。ここに改めて感謝致します。

9. 参考文献

- [1] E. Braunwald, Shattuck lecture- cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities, *N. Engl. J. Med.* 337 (19) (1997) 1360–1369.
- [2] N. Kaplan-Albuquerque, Y.E. Bogaert, V.V. Putten, M.C. Weiser-Evans, R.A. Nemenoff, Patterns of gene expression differentially regulated by platelet-derived growth factor and hypertrophic stimuli in vascular smooth muscle cells: markers for phenotypic modulation and response to injury, *J. Biol. Chem.* 280 (20) (2005) 19966–19976.
- [3] D. Mekahli, G. Bultynck, J.B. Parys, H.D. Smedt, L. Missiaen, Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3 (6) (2011), a004317.
- [4] M. Kabmann, I.A. Szijártó, C.F. García-Prieto, G. Fan, J. Schleifenbaum, Y.M. Anistan, C. Tabeling, Y. Shi, F. le Noble, M. Witzentrath, Y. Huang, L. Marko, M.T. Nelson, M. Gollasch, Role of ryanodine type 2 receptors in elementary Ca²⁺ signaling in arteries and vascular adaptive responses, *J. Am. Heart Assoc.* 8 (9) (2019), e010090.
- [5] D.M. Balshaw, N. Yamaguchi, G. Meissner, Modulation of intracellular calcium release channels by calmodulin, *Am. J. Phys.* 185 (1) (2002) 1–8.
- [6] T. Oda, T. Yamamoto, T. Kato, H. Uchinomi, G. Fukui, Y. Hamada, T. Nanno, H. Ishiguchi, Y. Nakamura, Y. Okamoto, M. Kono, S. Okuda, S.

Kobayashi, D.M. Bers, M. Yano, Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 125 (2018) 87–97.

[7] Y. Oishi, I. Manabe, Y. Imai, K. Hara, M. Horikoshi, K. Fujiu, T. Tanaka, T. Aizawa, T. Kadowaki, R. Nagai, Regulatory polymorphism in transcription factor KLF5 at the MEF2 element alters the response to angiotensin II and is associated with human hypertension, *Faseb. J.* 24 (6) (2010) 1780–1788.

[8] Y. Cheng, X. Liu, J. Yang, Y. Lin, D.Z. Xu, Q. Lu, E.A. Deitch, Y. Huo, E.S. Delphin, C. Zhang, MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation, *Circ. Res.* 105 (2) (2009) 158–166.

[9] H. Uchinoumi, Y. Yang, T. Oda, N. Li, K.M. Alsina, J.L. Puglisi, Y. Chen-Izu, R.L. Cornea, X.H.T. Wehrens, D.M. Bers, CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 98 (2016) 62–72.

[10] X. Xu, M. Yano, H. Uchinoumi, A. Hino, T. Suetomi, M. Ono, H. Tateishi, T. Oda, S. Okuda, M. Doi, S. Kobayashi, T. Yamamoto, Y. Ikeda, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (3) (2010) 660–666

[11] T. Oda, Y. Yang, H. Uchinoumi, D.D. Thomas, Y. Chen-Izu, T. Kato, T. Yamamoto, M. Yano, R.L. Cornea, D.M. Bers, Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and calmodulin affinity, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 85 (2015) 240–248.

[12] Y. Yang, T. Guo, T. Oda, A. Chakraborty, I. Chen, H. Uchinoumi, A.A. Knowlton, B.R. Fruen, R.L. Cornea, G. Meissner, D.M. Bers, Cardiac myocyte Z-line calmodulin is mainly RyR2-bound, and reduction is arrhythmogenic and occurs in heart failure, *Circ. Res.* 114 (2) (2014) 295–306.

[13] K. Hayashi, H. Saga, Y. Chimori, K. Kimura, Y. Yamanaka, K. Sobue, Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (44) (1998) 28860–28867.

[14] Y. Nakamura, T. Yamamoto, X. Xu, S. Kobayashi, S. Tanaka, M.

Tamitani, T. Saito, T.C. Saido, M. Yano, Enhancing calmodulin binding to ryanodine receptor is crucial to limit neuronal cell loss in Alzheimer disease, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 7289.

[15] J.S. Martini, P. Raake, L.E. Vinge, B.R. DeGeorge Jr., J.K. Chuprun, D.M. Harris, E. Gao, A.D. Eckhart, J.A. Pitcher, W.J. Koch, Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (34) (2008) 12457–12462.

[16] T. Suzuki, D. Sawaki, K. Aizawa, Y. Munemasa, T. Matsumura, J. Ishida, R. Nagai, Kruppel-like factor 5 shows proliferation-specific roles in vascular remodeling, direct stimulation of cell growth, and inhibition of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 284 (14) (2009) 9549–9557.

[17] T. Guo, B.R. Fruen, F.R. Nitu, T.D. Nguyen, Y. Yang, R.L. Cornea, D.M. Bers, FRET detection of calmodulin binding to the cardiac RyR2 calcium release channel, *Biophys. J.* 101 (9) (2011) 2170–2177.

[18] M. Furmanik, C.M. Shanahan, Endoplasmic reticulum stress in arterial smooth muscle cells: a novel regulator of vascular disease, *Curr. Cardiol. Rev.* 13 (2) (2017) 94–105.

[19] W.R. Yamamoto, R.N. Bone, P. Sohn, F. Syed, C.A. Reissaus, A.L. Mosley, A.B. Wijeratne, J.D. True, X. Tong, T. Kono, C. Evans-Molina, Endoplasmic reticulum stress alters ryanodine receptor function in the murine pancreatic β cell, *J. Biol. Chem.* 294 (1) (2019) 168–181.

[20] M. Isomura, Y. Kotake, K. Masuda, M. Miyara, K. Okuda, S. Samizo, S. Sanoh, T. Hosoi, K. Ozawa, S. Ohta, Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its Ca^{2+} -mediated mechanism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272 (1) (2013) 137–146.

この学位論文は

Tomoyuki Uchida, Tetsuro Oda, et al.

Endoplasmic reticulum stress promotes nuclear translocation of calmodulin, which activates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022 Aug;628(2022)155–162. doi:10.1016/j.bbrc.2022.08.069.

に原著論文として発表したものからデータを引用して作成いたしました。