

毛様体上皮細胞の cyclic AMP 系に対するカルシウムイオンの影響

二井 宏 紀

広島大学医学部眼科学教室

要 約

カルシウムイオノフォアで培養毛様体上皮細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、上皮細胞の cAMP 系作動薬に対する反応性の変化を検討した。受容体を介して cAMP 系を活性化する vasoactive intestinal peptide やイソプロテレノールでは、カルシウムイオノフォア前処置で cAMP の産生量は増大した。受容体を介さず cAMP 系を活性化するフッ化ナトリウムやフォルスコリンでは、カルシウムイオノフォアで前処置しても cAMP の産生量は変化しなかった。Vasoactive intestinal peptide とイソプロテレノールで認めたカルシウムイオノフォア前処置による cAMP 産生量の増大は、カルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素阻害

剤で抑制された。今回の結果から、カルシウムイオンの作用は、受容体を介する系と受容体を介さない系ではその影響が異なっており、カルシウムイオンはカルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素を介して、その作用を発現している可能性が示唆された。(日眼会誌 99:392-396, 1995)

キーワード：毛様体上皮、細胞内情報伝達系、カルシウムイオン、カルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素、アデニル酸シクラーゼ

Calcium Ion Effects on cAMP System in Cultured Chick Ciliary Epithelial Cells

Hiroyuki Nii

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

Abstract

I investigated stimulation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate (cAMP) production by vasoactive intestinal peptide (VIP), isoproterenol (ISO), sodium fluoride (NaF), and forskolin (FSK) in cultured chick embryo ciliary epithelium (CE). In order to clarify the influence of intracellular calcium ions on cAMP production when CE was activated by cAMP activating agents, I also studied the effects of calcium ionophore (A23187) on VIP, ISO, NaF, and FSK stimulated cAMP production. After stimulation with VIP, ISO, NaF, and FSK, a concentration dependent increase in cAMP level was observed. Addition of A23187 activated VIP and ISO stimulated cAMP production. However, A23187 had no effect on the cAMP level when CE was stimulated by

NaF and FSK. The activating effect of A23187 was inhibited by calcium/calmodulin-dependent protein kinase inhibitor (W-7). I speculate that calcium ions have different effects on receptor-mediated cAMP pathway and non-receptor-mediated cAMP pathway, and that calcium ions modulate the cAMP pathway through the calcium/calmodulin-dependent protein kinase. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:392-396, 1995)

Key words: Ciliary epithelia, Intracellular signal transduction system, Calcium ions, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase, Adenylate cyclase

I 緒 言

毛様体上皮細胞は眼圧調整機能の主たる役割を担って

おり、その房水産生能は細胞外からの神経刺激ホルモン、およびプロスタグランジンに代表されるオータコイドなどの刺激により調節されるといわれているが、その詳

別刷請求先：734 広島県広島市南区霞 1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 二井 宏紀

(平成 6 年 9 月 22 日受付, 平成 6 年 11 月 14 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroyuki Nii, M.D. Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima-ken 734, Japan

(Received September 22, 1994 and accepted in revised form November 14, 1994)

細は明らかではない¹⁾。細胞外からの様々な刺激は細胞内情報伝達系を介して細胞機能を調節する。毛様体上皮細胞の細胞内情報伝達系には、アデニル酸シクラーゼ cyclicAMP 系 (cAMP 系)²⁾³⁾とイノシトールリン脂質代謝回転系⁴⁾⁵⁾が存在することが明らかとなっている。cAMP 系では cAMP⁶⁾が細胞内情報伝達物質として働き、イノシトールリン脂質代謝回転系が刺激されると、ジアシルグリセロールとイノシトール 1,4,5-三リン酸が産生され、ジアシルグリセロールを介しプロテインキナーゼ C (PKC) が活性化され⁵⁾、イノシトール 1,4,5-三リン酸を介し細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し⁷⁾、房水産生機能を調節していると考えられる。β 遮断薬点眼で房水産生が減少することが明らかとなっているが⁸⁾、一方フォルスコリン⁹⁾やグリセオール酸¹⁰⁾などの細胞内 cAMP を上昇させる薬剤でも房水産生が減少することが報告されており、少なくとも細胞内 cAMP は房水産生に密接に関与している¹⁾。眼科臨床の場では、緑内障に対しコリン作動薬、交感神経刺激薬や交感神経遮断薬が使用され併用例も多く、毛様体上皮細胞は細胞外から様々な情報刺激を受けている¹¹⁾。

近年、細胞内情報伝達系レベルで、ある情報伝達系が他の情報伝達系を活性化したり抑制すること (クロストーク) が証明されてきた¹²⁾¹³⁾。すなわち、1つの情報伝達系は他の情報伝達系の影響を受けており、1つ1つの情報伝達系が独立して細胞機能を調節しているのではない。毛様体上皮細胞でも PKC と cAMP 系の間にクロストークが存在することが報告²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾されているが、細胞機能の調節に重要な役割を担っている細胞内カルシウムイオンと cAMP 系のクロストークは明らかとなっていない。今回、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が cAMP 系へどのような影響を与えるか明らかにする目的で、カルシウムイオノフォアで細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させたときに、培養家鶏胚毛様体上皮細胞の cAMP 系作動薬に対する cAMP 産生能がどのように変化するか検討したので報告する。

II 実験方法

1. 培養細胞

培養細胞は、形質転換や腫瘍化を起こさず増殖する細胞系である家鶏胚毛様体上皮細胞を用いた。Mishima ら¹⁶⁾の方法に従い、家鶏胚 11 日目の毛様体突起部から分離した毛様体上皮細胞を牛胎児血清 10% 加ダルベッコ変法イーグル培地で 3~4 週間初代培養し、コンフルエントになったものを使用した。実験に使用する前に、牛胎児血清を含まないイーグル培地で培養細胞を洗浄し実験を行った。毛様体上皮細胞を 3-isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX)、カルシウムイオノフォア (A 23187)、カルシウムイオノフォアとカルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素阻害剤 (W-7) で 30 分間前処置

し、これら 3 群を各種 cAMP 系作動薬で 15 分間刺激し、カルシウム作動薬を用いない状態で cAMP 系を刺激したときの cAMP 産生量と、A 23187 で細胞内カルシウム濃度を上昇させた状態で cAMP 系を刺激したときの cAMP 産生量を比較した。また、W-7 を A 23187 に加えカルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素の活性化を阻害することで A 23187 の cAMP 産生への影響がどう変化するか調べた。

2. 使用薬剤

すべての実験には、産生された cAMP 分解抑制のため、1 mM の IBMX を含むイーグル培地を薬剤の溶液として用いた。培養に使用したダルベッコ変法イーグル培地は日水製薬 (東京) から、牛胎児血清は GIBCO (USA) から入手した。カルシウムイオノフォア (A 23187) は Sigma (USA) から、カルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素阻害剤 (W-7) は生化学工業 (東京) から入手した。cAMP 系作動薬として、vasoactive intestinal peptide (VIP) は Bachem (USA) から、イソプロテレノール (ISO)、フッ化ナトリウム (NaF) は Sigma (USA) から入手し、フッ化ナトリウムは 20 μM の AlCl₃ に溶解して使用した。フォルスコリン (FSK) は Calbiochem (USA) から入手した。

3. cAMP の定量

検体の調整は、培養細胞を 1 mM の IBMX を含む各薬剤で刺激した後、氷冷した 10% 過塩素酸で反応を停止した。次いで細胞を破碎し、2,000×g で 10 分間遠心分離した。上清を 2 規定の水酸化カリウムで中和し、cAMP 測定用検体とした。cAMP 量は、ヤマサ社製 cAMP 測定キット「ヤマサ」を用いラジオイムノアッセイ法で測定した。沈渣は、Lowry 法で蛋白定量を行い、蛋白 1 mg あたりの cAMP 量を比較した。測定値の統計処理は、分散分析を行い、有意差を検定した。図には平均値と標準誤差を表示した。

III 結果

1. ベースラインの cAMP 量

1 μM の A 23187、100 μM の W-7 を 30 分間反応させたときのベースラインの cAMP 量の変化を調べた。全く薬剤を使用しなかった群 (Pre) に比べ、IBMX を単独反応させた群、IBMX と A 23187 を反応させた群、IBMX と W-7 を反応させた群、および IBMX と A 23187 と W-7 を反応させた群は有意に cAMP 量が増大した (p<0.05)。4 群の間には cAMP 量に有意差はなかった (図 1)。

2. A 23187、W-7 前処置後 cAMP 系作動薬刺激による cAMP 量の変動

IBMX を 30 分間単独反応させた群 (A 23187 (-) 群)、A 23187 を反応させた群 (A 23187 (+) 群)、A 23187 と W-7 を併用した群 (A 23187+W-7 群) の 3 群に cAMP

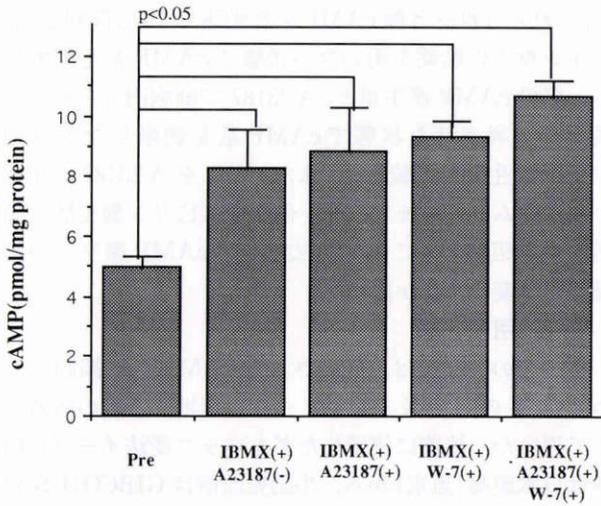


図1 培養毛様体上皮細胞でカルシウムイオノフォア (A 23187), カルシウム-カルモジュリン依存性蛋白質リン酸化酵素阻害剤 (W-7) 処理がベースラインの cyclic adenosine 3': 5-monophosphate (cAMP) 量に与える影響 (n=4). IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthin. バーは標準誤差を示す

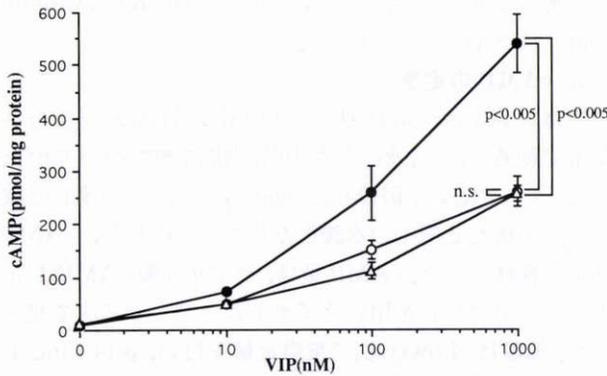


図2 培養毛様体上皮細胞で A 23187, W-7 前処置が vasoactive intestinal peptide (VIP) の cAMP 産生量に与える影響 (n=6). 白丸: A 23187 (-) 黒丸: A 23187 (+) 三角: A 23187+W 7. バーは標準誤差を示す

系作動薬で 15 分間細胞刺激を行い, A 23187, W-7 前処置が cAMP 産生能を変化させるか否かを調べた.

1) VIP 刺激: $10^{-8} \sim 10^{-6}$ M の VIP で毛様体上皮細胞を刺激した場合, cAMP 産生量は濃度依存性に増大した (図 2). A 23187 で前処置すると, VIP による cAMP 産生は統計学的に有意に活性化された ($p < 0.005$). A 23187 前処置による cAMP 産生能の活性化は, W-7 を加えることで消失した.

2) イソプロテレノール刺激: $10^{-6} \sim 10^{-5}$ M のイソプロテレノールで刺激した場合, cAMP 産生量は濃度依存性に増大した (図 3). A 23187 で前処置すると, イソプロテレノールによる cAMP 産生は活性化され, 統計学的に有意差があった ($p < 0.005$). この活性化は, W-7 を加

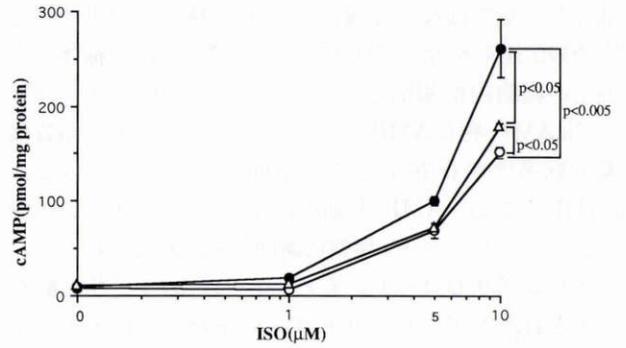


図3 培養毛様体上皮細胞で A 23187, W-7 前処置がイソプロテレノール (ISO) の cAMP 産生量に与える影響 (n=6). 白丸: A 23187 (-) 黒丸: A 23187 (+) 三角: A 23187+W 7. バーは標準誤差を示す

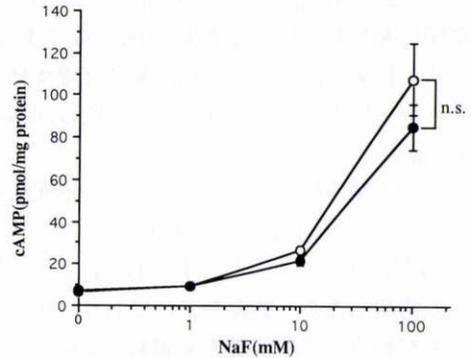


図4 培養毛様体上皮細胞で A 23187 前処置がフッ化ナトリウム (NaF) の cAMP 産生量に与える影響 (n=6). 白丸: A 23187 (-) 黒丸: A 23187 (+). バーは標準誤差を示す

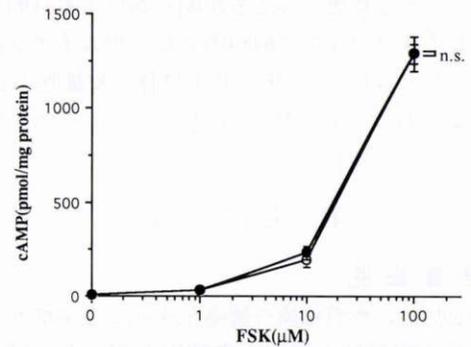


図5 培養毛様体上皮細胞で A 23187 前処置がフォススコリン (FSK) の cAMP 産生量に与える影響 (n=6). 白丸: A 23187 (-) 黒丸: A 23187 (+). バーは標準誤差を示す

えることで有意に抑制された ($p < 0.05$).

3) フッ化ナトリウム刺激: $10^{-3} \sim 10^{-1}$ M のフッ化ナトリウムで刺激した場合, cAMP 産生量は濃度依存性に増大した (図 4). A 23187 前処置の有無で cAMP の産生

量に差はなかった。

4) フォルスコリン刺激： 10^{-6} ～ 10^{-4} Mのフォルスコリンで刺激した場合、cAMP産生量は濃度依存性に増大した(図5)。A 23187前処置の有無でcAMPの産生量に差はなかった。

IV 考 按

眼圧調整をつかさどる毛様体上皮細胞では、cAMP系²⁾³⁾⁶⁾とイノシトールリン脂質代謝回転系⁴⁾⁵⁾⁷⁾¹⁷⁾の少なくとも2種類の細胞内情報伝達系の存在が明らかとなっている。以前、我々の教室から家鶏胚毛様体上皮細胞においてPKCのcAMP系に及ぼす影響を報告²⁾した。今回、毛様体上皮細胞の情報伝達系のクロストークの中で、カルシウムイオノフォアで細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させたとき、培養家鶏胚毛様体上皮細胞のcAMP系作動薬に対するcAMP産生能がどう変化するか検討した。その結果、培養家鶏胚毛様体上皮細胞では、カルシウムイオノフォア前処置を行い、膜受容体を介するVIPとイソプロテレノールでcAMP系を刺激すると、PKCと異なりcAMP産生能は増大し、GTP結合蛋白やアデニル酸シクラーゼを直接刺激するフッ化ナトリウムとフォルスコリンではカルシウムイオノフォアはcAMP産生能に全く影響しないことが明らかとなった。

従来、カルシウムイオンのcAMP系へ与える影響については、毛様体上皮以外の様々な組織で報告^{18)~23)}されている。ヒト神経芽細胞腫細胞やラット松果体細胞でカルシウムイオンを増大させると、プロスタグランジンE₁(PGE₁)受容体刺激によるcAMP産生が活性化される¹⁸⁾¹⁹⁾。同じくヒトやブタの好中球でも、イオノフォア処理によりイソプロテレノール、PGE₁刺激時のcAMP産生が増大し、この効果はカルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素阻害剤で抑制される²⁰⁾²¹⁾。これらの組織では、2つの情報伝達系が協調的に働いているように思われる。一方、牛角膜内皮細胞では、イオノフォア処置でイソプロテレノールやフォルスコリンによるcAMP産生が著明に抑制された²²⁾。また、ヒト血小板でも、PGE₁受容体刺激によるcAMP産生がカルシウムイオノフォア処理で抑制される²³⁾。これらの細胞では、逆にカルシウムイオンはcAMP系に抑制的に働いていると考えられる。

PKCのcAMP系への影響に関しては、多くの報告がなされている。ラットの網状赤血球細胞でPKCをホルボールエステルで活性化すると、 β -アドレナリン受容体刺激でのcAMP産生能は抑制される²⁴⁾。白色家兎毛様体ではPKCを活性化すると、イソプロテレノール、VIP、フッ素イオンのcAMP産生能が増大するが¹⁵⁾、カルバコールで細胞内カルシウムイオンを上昇させると同時にPKCを活性化すると、イソプロテレノール、VIP、PGE₂、フォルスコリンのcAMP産生が抑制される²⁵⁾。つまり、

動物種、組織により、イノシトールリン脂質代謝回転系とcAMP系の相互作用は多彩で、これらの相互作用について現時点で一様に議論はできない。今回の培養家鶏胚毛様体上皮細胞での結果は、ヒト神経芽細胞腫細胞¹⁸⁾やラット松果体細胞¹⁹⁾、ヒト好中球²⁰⁾、ブタ好中球²¹⁾の反応ときわめて類似しており、牛角膜内皮細胞²²⁾やヒト血小板²³⁾とは異なり、カルシウムイオンは培養家鶏胚毛様体上皮細胞では、膜受容体を介してcAMP系が刺激されたとき協調的に働くことが示唆された。我々の教室で家鶏胚毛様体上皮細胞をフォルボールエステルで処理しPKCを活性化すると、イソプロテレノールで β -アドレナリン受容体を刺激したときのcAMP産生能は抑制され、フッ化ナトリウム、フォルスコリンで受容体を介さずにcAMP系を刺激したときのcAMP産生能には影響しなかった²⁾。同一組織でカルシウムイオンとPKCのcAMP系に与える影響が異なっていることから、カルシウムイオンとPKCはそのバランスでcAMP系を修飾している可能性がある¹⁷⁾。

カルシウムイオンのcAMP系への作用点であるが、今回カルシウムイオン濃度を上昇させたとき膜受容体を介する刺激ではcAMP産生が活性化され、膜受容体を介さない刺激ではカルシウムイオン濃度上昇はcAMP産生に全く影響しなかった。したがって、細胞内カルシウムイオンの濃度上昇で膜受容体が何らかの修飾を受け、VIP、イソプロテレノールで膜受容体を刺激したときのcAMP産生が活性化された可能性がある。つまり、培養家鶏胚毛様体上皮細胞では、PKCと同じくカルシウムイオンの作用点も膜受容体であると思われる。

また、培養家鶏胚毛様体上皮細胞でのカルシウムイオノフォアによるcAMP産生能の活性化は、カルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素阻害剤のW-7を加えることで抑制された。細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇するとカルモジュリンが活性型となり、カルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素が活性化される¹⁷⁾。カルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素は基質特異性が広く、多くの蛋白質のリン酸化を触媒することが知られている²⁶⁾。これらから、カルシウムイオノフォアは細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、カルモジュリンを介しカルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素を活性化しcAMP系の膜受容体をリン酸化することで、その活性を修飾した可能性が示唆される。今回の結果から、cAMP系はその活性化の程度がPKCのみならず、カルシウムイオンによっても修飾を受けることが明らかとなった。今後、毛様体上皮細胞の房水産生機能の検討を行う際、1つ1つの情報伝達系の検討に伴い、クロストークの存在を念頭におくことが必要と考えられる。

稿を終えるにあたり、ご校閲頂きました調枝寛治教授に感謝申し上げます。また、終始ご指導頂きました三嶋 弘助教授

ならびにご助言を頂きました薬学科の石橋貞彦教授，黒川知則講師に御礼申し上げます。なお，本論文の要旨は，第98回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) 三嶋 弘, 木内良明: 機能(毛様体). 猪俣 孟, 他(編): 眼科学大系, 3A, 緑内障. 中山書店, 東京, 53-62, 1993.
- 2) 永田淳士: 培養毛様体上皮細胞におけるプロテインキナーゼCのcyclic AMP産生系に対する影響. 広大医誌 40: 15-21, 1992.
- 3) Neufeld AH, Sears ML: Cyclic AMP in ocular tissues of the rabbit, monkey, and human. Invest Ophthalmol Vis Sci 13: 475-477, 1974.
- 4) Wax MB, Coca-Prados M: Receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis in human ocular ciliary epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 1675-1679, 1989.
- 5) Nagata A, Mishima HK, Okamura N, Ishibashi S, Choshi K: Inositol phosphate-diacylglycerol signaling pathway in regulation of intraocular pressure. Jpn J Ophthalmol 37: 339-343, 1993.
- 6) Sears ML: Regulation of aqueous flow by the adenylate cyclase receptor complex in the ciliary epithelium. Am J Ophthalmol 100: 194-198, 1985.
- 7) Ohuchi T, Yoshimura N, Tanihara H, Kuriyama S, Ito S, Honda Y: Ca^{2+} mobilization in non-transformed ciliary nonpigmented epithelial cells. Invest Ophthalmol Vsi Sci 33: 1696-1705, 1992.
- 8) Yablonski ME, Zimmerman TJ, Waltman SR, Becker B: A fluorophotometric study of the effect of timolol on aqueous humor dynamics. Exp Eye Res 27: 135-142, 1978.
- 9) Shibata T, Mishima H, Kurokawa T: Ocular pigmentation and intraocular pressure response to forskolin. Curr Eye Res 7: 667-673, 1988.
- 10) Mishima HK, Kiuchi Y, Yokoyama T, Yasumoto T, Yamazaki M: A cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, 8'-pivaloyloxymethyl ester (POM-ester) or griseolic acid, lowers rabbit intraocular pressure. Curr Eye Res 10: 817-822, 1991.
- 11) Shields MB: Textbook of Glaucoma. Williams & Wilkins, Baltimore, 431-445, 1992.
- 12) Houslay MD: 'Crosstalk': A pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. Eur J Biochem 195: 9-27, 1991.
- 13) 広田 篤: 家鶏胚の培養網膜色素上皮におけるプロテインキナーゼCのアデニレートシクラーゼ-cAMP系への影響. 日眼会誌 96: 1412-1417, 1992.
- 14) Wax MB, Barrett DA: Regulation of adenylate cyclase in rabbit iris ciliary body. Curr Eye Res 12: 507-520, 1993.
- 15) Mittag TW, Yoshimura N, Podos SM: Phorbol ester: Effect on intraocular pressure, adenylate cyclase, and protein kinase in the rabbit eye. Invest Ophthalmol Vsi Sci 28: 2057-2066, 1987.
- 16) Mishima HK, Ono H, Sakuma O, Choshi K: The ciliary epithelia in culture. In: Blodi F (Ed): Acta XXV Councilium Ophthalmol, Kugler & Ghedini, Milano, 675-687, 1986.
- 17) Nishizuka Y: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature 308: 693-698, 1984.
- 18) Baumgold J, Paek R, Yasumoto T: Agents that stimulate phosphoinositide turnover also elevate cAMP in SK-N-SH human neuroblastoma cells. Life Sci 50: 1755-1759, 1992.
- 19) Sugden AL, Sugden D, Klein DC: Essential role of calcium influx the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. J Biol Chem: 11608-11612, 1986.
- 20) Iannone MA, Wolberg G, Zimmerman TP: Ca^{2+} ionophore-induced cyclic adenosine-3',5'-monophosphate elevation in human neutrophils. Biochem Pharmacol 42: 105-111, 1991.
- 21) Ishitoya J, Takenawa T: Potentiation of PGE₁-induced increase in cyclic AMP by chemotactic peptide and Ca^{2+} ionophore through calmodulin-dependent processes. J Immunol 138: 1201-1207, 1987.
- 22) Reinach P, Holmberg N: Inhibition by calcium of beta adrenoceptor mediated cAMP responses in isolated bovine corneal epithelial cells. Curr Eye Res 8: 85-90, 1989.
- 23) Rodan GA, Feinstein MB: Interrelationships between Ca^{2+} and adenylate and guanylate cyclases in the control of platelet secretion and aggregation. Proc Natl Acad Sci USA 73: 1829-1833, 1976.
- 24) Yamashita A, Kurokawa T, Danura T, Higashi K, Ishibashi S: Induction of desensitization by phorbol ester to β -adrenergic agonist stimulation in adenylate cyclase system of rat reticulocytes. Biochem Biophys Res Commun 138: 125-130, 1986.
- 25) Jumblatt JE, North GT, Hackmiller RC: Muscarinic cholinergic inhibition of adenylate cyclase in the rabbit iris-ciliary body and ciliary epithelium. Invest Ophthalmol Vsi Sci 31: 1103-1108, 1990.
- 26) 山内 卓: Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの形態と細胞における発現. 蛋核酵 37: 1590-1599, 1992.