

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09730

研究課題名(和文) 動脈管酸素感受性と収縮弛緩制御におけるヒートショックタンパク質の役割

研究課題名(英文) A study of heat shock proteins in constriction and relaxation response to oxygen stimuli in the ductus arteriosus

研究代表者

羽山 恵美子 (Hayama, Emiko)

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00349698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウサギ成熟胎仔及び新生仔の動脈管に発現するHSP70は、Hsp72 (HspA1B)であり、種を超えて出生前後のラット動脈管中膜に発現することを確認した。新生仔動脈管中膜の外膜近傍にHsp72は局在し、元の内腔に近いアポトーシス領域とは異なっていた。HspA1Bとc-FosのmRNAの発現パターンがよく一致することを発見した。c-FOSは、c-JUN等とヘテロ複合体を形成する転写因子であり、細胞増殖、分化、アポトーシス等に関与する。しかし、c-JUNの発現は動脈管で肺動脈や大動脈よりむしろ低かった。c-FOS関連のストレスレスポンス遺伝子群が動脈管の酸素刺激により発現することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Specific expression of Hsp72 (HspA1B) in the near term ductus arteriosus (DA) was confirmed in both rabbit and rat. Expression of Hsp72 and apoptotic cells in newborn rabbit DA media was separated near adventitia and near lumen respectively. Identical expression pattern of HspA1B and c-Fos mRNA in fetal and newborn DA, the adjacent aorta (Ao) and pulmonary artery (PA) was detected. c-FOS plays a regulatory role in growth, differentiation and apoptosis. c-FOS proteins do not dimerize with each other and only bind to DNA as AP-1 transcription factor when bound with c-JUN. However, c-Jun was expressed relatively lower in the DA than the Ao and PA, suggesting existence of different binding partners. Expression of several stress response gene mRNAs related c-Fos was determined in the mature fetal DA with oxygen stimuli.

研究分野：分子生物学

キーワード：動脈管 ヒートショックタンパク質 酸素感受性

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈管は胎性期の低酸素状態で開き、生後酸素に反応して収縮する。一方、肺動脈は胎生期低酸素状態で収縮しており、生後血中酸素分圧が上昇すると拡張する。また、臍帯動脈は胎盤や胎児の酸素供給需要に合わせて収縮弛緩する。血管平滑筋の収縮弛緩は血管抵抗を制御し、胎児の発育や心機能に大きな影響を与える。しかし、動脈管と肺動脈の酸素に対する反応の違いや臍帯動脈の収縮弛緩の機序には不明な点が多い。

(2) 血管平滑筋の収縮弛緩は主に Ca^{2+} によって媒介される。膜が脱分極すると細胞外から細胞内へ流入する Ca^{2+} が増加する。交感神経や副交感神経受容体の刺激により小胞体から Ca^{2+} 放出が増加する。成熟平滑筋では細胞膜から流入する Ca^{2+} やイノシトール3リン酸が小胞体を刺激して Ca^{2+} を放出する。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、 Ca^{2+} -カルモジュリン複合体が形成され、ミオシン軽鎖キナーゼを活性化しミオシン調節軽鎖 (LC20) をリン酸化して、平滑筋が収縮する。

(3) ヒートショックタンパク質 (HSP) は、熱や化学物質などのストレスにより誘導される一群のタンパク質で、分子量 70~110 kDa などの高分子量 HSP と分子量 10~30 kDa の低分子量 HSP に分類される。低分子量 HSP である HSP27 は、骨格筋や平滑筋に高発現し、筋収縮制御タンパク質であるアクチンに結合、リン酸化により収縮を調節する (Somara et al, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010)。HSP27 は動脈管に高発現する。酸化ストレスで生じる活性酸素種による刺激は、p38 MAPK などによるリン酸化を経て HSP27 に伝わり (Stokoe et al, FEBS, 1992, Landry et al, JBC, 1992)、リン酸化 HSP27 は筋収縮を促進する。リン酸化 HSP27 は、カルデスモンとトロポミオシンのアクチン結合の構造を変化させ、ミオシンとの結合を促進し (Somara & Bitar, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005) 筋収縮をもたらす。

(4) HSP は、熱や化学物質などのストレスにより誘導される一群のタンパク質で、分子量 70~110 kDa などの高分子量 HSP と分子量 10~30 kDa の低分子量 HSP に分類される。高分子量 HSP は変性したタンパク質の修復を行うが、低分子量 HSP の機能は未解明の部分が多い。低分子量 HSP は、非刺激時には重合体として存在し、ストレスによりリン酸化され二量体に変化する (Lavoie et al, J Biochem Mol Biol, 1993)。低分子量 HSP である HSP20 と HSP27 は、骨格筋や平滑筋に高発現し、筋収縮制御タンパク質であるアクチンに結合、リン酸化により収縮を調節する (Somara et al, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010)。HSP27 は動脈管に高発現し近隣の血管にも発現する。酸化ストレスで生じる活性酸素種などの刺激は、p38 MAPK などによるリン酸化を経て HSP27 に伝わり (Stokoe et al,

FEBS, 1992, Landry et al, JBC, 1992) リン酸化 HSP27 は筋収縮を促進する。また HSP20 は、環状ヌクレオチド依存キナーゼ (PKA/PKG) によってリン酸化を受け (Beall et al, JBC, 1999)、筋を弛緩する (Jerius et al, J Vasc Surg, 1999)。HSP20 のリン酸化は、HSP27 のリン酸化を調節する (McLemore et al, J Am Coll Surg, 2005)。リン酸化 HSP27 は、リン酸化カルデスモンとトロポミオシンのアクチン結合の構造を変化させ、ミオシンとの結合を促進し (Somara & Bitar, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005) 筋収縮をもたらす。

(5) 高分子量 HSP である HSP70 は、タンパク質の正しいフォールディングを保つシャペロン機能が知られる。臍帯動脈は、動脈管と同じく、生後の酸素濃度の上昇とプロスタグランジンの減少により攣縮する。HSP70 は、満期牛胎仔臍帯動脈に発現し、未熟胎仔や通常血管には発現しない (Brophy 他, J Reproduction and Fertility, 1998)。HSP70 は、プロスタグランジン J2 (Hamel 他, Cell Stress & Chaperones, 2000)、プロスタグランジン A などにより誘導され、抗酸化作用をもつ (Elia 他, Eur J Biochem, 1999)。HSP70 は、I κ B と結合し NF- κ B パスウェイを抑制することにより抗炎症作用を示し、アポトーシスを抑制する (Heck 他, 2012)。活性酸素種 (ROS, 過酸化水素など) は、STATs (JAK/STAT パスウェイ) の HSP70 のプロモーターへの結合を促し、HSP70 の発現を活性化させる。JAK2 活性は血管平滑筋細胞の増殖を促すことから、細胞の成長促進と酸化ストレス抑制作用が推定される。(Nageswara, Arterioscler Throm Vasc Biol, 2001)。HSP70 の抗酸化作用は、HSP70 が SOD-2 と結合し、SOD-2 をミトコンドリアへ輸送することで説明される。肺高血圧の場合、この機能が低下しミトコンドリアの酸化ストレスが増加する (Afolayan 他, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014)。

近年、HSP70 とミトコンドリア電子伝達系の成熟及び酸素刺激に関する報告が続いた。HSP70 は、タンパク質の細胞内輸送に関わる Mge1 ダイマーと ATP 依存で結合する。酸化ストレスは、Mge1 ダイマーをモノマーとし、Mge1-HSP70 複合体を減らすことから、Mge1 は、酸化ストレスセンサーである (Marada 他, Molecular Biology of the Cell, 2013)。核由来のタンパク質のミトコンドリアへの輸送には、輸送複合体が必要であり、HSP70 はその構成成分の一つである。ミトコンドリアの電子伝達系複合体 IV に Cox4 が入ると成熟型チトクローム C オキシダーゼが完成するが、その輸送には、Cox4-Hsp70-Mge1 複合体が用いられる。COX4 のサブユニットの COX4-1 は、ユビキタスに発現するが、COX4-2 は、肺、気管、胎盤に多く、HIF-1 の活性を通して、低酸素で発現が誘導される (Bottinger 他, Molecular

Biology of the Cell, 2013), COX4 サブユニットの交換により低酸素環境においても、呼吸効率を最大にしていると考えられる (Fukuda 他, Cell, 2007)。Cox4-2 のプロモーター領域には、酸素濃度を感じて反応するエレメントがあり、酸素濃度により発現量の制御を受ける (Aras 他, Nucleic Acids Research, 2013)。すなわち、HSP70/Mge1/Cox4 を介して、ミトコンドリア電子伝達系の ATP 産生能や活性酸素生産量は、酸素濃度による制御を受ける。(7) 我々は、これまでに動脈管の収縮弛緩に関する遺伝子について検討し、筋小胞体の Ca²⁺ の貯蔵や放出する能力が成熟するに従い変動するという結果を得た。酸素刺激に対して、動脈管はどのようなパスウェイにより収縮を行うのかについて考察を進めてきたが、HSP27 や HSP70 と筋収縮・酸素感受性に関する論文に注目し、予備検討を行ったところ、HSP27 は満期胎仔動脈管に高発現した。HSP70 は、胎仔動脈管の成熟に伴い発現が増加し、生後、中膜の中央部から消失が始まった。HSP27 のアクチン結合筋収縮制御タンパク質とその調節を行う酸素刺激により HSP27 がリン酸化し、強い収縮力を与え、そのシグナル伝達経路は p38 MAPK が関与するのではないかと。プロスタグランジンに誘導される HSP70 の増加は、成熟胎児の動脈管の機能に重要であり、動脈管の管腔の閉鎖には、HSP70 によるアポトーシスの誘導が作用するのではないかと。本研究の中で、これらの仮説を立証し、又は新たな知見を得たい。

2. 研究の目的

動脈管は酸素で収縮する。動脈管における酸素シグナル伝達機構を明らかにすることが本研究の最終目的である。低分子量ヒートショックプロテイン (HSP) の一つである HSP27 は、活性酸素などの刺激によりリン酸化され、アクチン結合タンパク質に結合し、アクチン収縮能を強め、平滑筋の収縮を促す。高分子量 HSP である HSP70 は、抗酸化作用、抗アポトーシス作用、ミトコンドリアの電子伝達系の成熟を支える。HSP70 は、ミトコンドリアへの輸送複合体に含まれ、複合体には酸素センサー機能が備わる。動脈管の酸素感受性には、HSP27 のリン酸化による収縮力の増加、管腔の閉鎖に関わる HSP70 量制御によるアポトーシスの誘導が作用していると推定される。本研究の最終目的は、動脈管の酸素感受性収縮機構における HSP27 や HSP70 の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 組織試料の採取

日本白色家兎並びにウィスターラットの妊娠動物を過剰量のペントバルビタール投与により安楽死させ、胎仔を採取し、速やかに氷冷し、組織試料を冷生理的食塩液中で顕微鏡下可及的速やかに採取した。ラットからは、

妊娠 19 日 (未熟)、21 日 (成熟) 胎仔を、家兎からは、21 日 (未熟)、27 日、30 日 (成熟) 胎仔から試料を得た。また新生仔の組織試料を採取する場合は、腹腔内注射によるペントバルビタールの過剰量投与により安楽死させてから、採取を行った。

(2) qPCR 試料の調製と検出

全 RNA を調製する場合、採取した組織試料を RNA later 中で -20℃ 保存した。解凍し、RNA later 液中で、顕微鏡下、動脈管、肺動脈、大動脈を切り分け、血液などできる限り除き、それぞれプール血管試料とした。このプール試料から全 RNA を抽出、RNA 濃度を測定し、逆転写酵素 (PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time), Takara) により cDNA を調製し、適宜希釈して、定量 PCR 用のテンプレートとした。

目的遺伝子 mRNA の発現を測定するための定量 PCR には、SYBR 蛍光色素を含む PCR 酵素ミックス (Thunderbird SYBR qPCR mix, Toyobo 等) を用いた。各遺伝子 mRNA の発現は GAPDH mRNA の発現量に対して補正し、DA30 (妊娠 30 日家兎胎仔動脈管) を 1 とした相対値 (PA 肺動脈, Ao 大動脈, NB 新生仔) として表示した。

(3) タンパク質試料の調製

ウサギ又はラットの胎仔及び新生仔から動脈管及び周辺の大血管を冷生理的食塩液中で顕微鏡下速やかに採取し、血液などを除去し、液体窒素で急速凍結し -80℃ で保存した。又、RNA later 中に保存した組織試料から、全 RNA 抽出後、冷アセトン沈殿によりタンパク質を回収した。これらの組織試料から、7M 尿素、4% CHAPS を含む HEPES 緩衝液、pH8.6 (+ 脱リン酸化阻害剤ならびにプロテアーゼ阻害剤) によりタンパク質を可溶化した。ブラッドフォードウルトラ (Expedeon) を用い、ウシ血清アルブミンを標準としてタンパク質濃度を測定し、SDS-PAGE やフォスタグ電気泳動用試料とした。

(4) 抗体の調製

本研究ではフォスタグ親和性電気泳動などにより分離転写したウェスタンブロットを多く検出するため、感度のよい抗体を必要とした。始め市販の抗体を使用した。微量のリン酸化タンパク質の検出には感度が低く、かつ高価すぎた。そこで自ら抗体を調製した。採取したウサギ組織試料から全 RNA を抽出、オリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応により cDNA を調製し、ターゲット遺伝子 (Hsp27, HspA1b, HspA2, HspA8) のタンパク質コード領域をクローニングした。10x ヒスチジンタグを N 末端につけた融合タンパク質となるように大腸菌発現ベクターに挿入し、抗原タンパク質を発現・精製した。これをマウス又は家兎に免疫しポリクローナル抗体 (抗血清) を調製した。抗原タンパク質に対する反応を ELISA により検討し、高タイトルを得て、全採血し、抗血清を得た。

(5) フォスタグ電気泳動と免疫的検出

フォスタグ電気泳動では、リン酸化のレベルに応じてリン酸化/非リン酸化フォームを分離することができる。HSP27 のリン酸化の検出のためのフォスタグ電気泳動ゲルは、10%アクリルアミドゲル(29:1)、50 μmol/L フォスタグ、100 μmol/L MnCl₂とした。泳動後のゲルを、10 mmol/L EDTA を含むプロッティング緩衝液で 10 分間インキュベートして Mn²⁺イオンを除き、プロッティングを 1 時間行った。3% スキムミルクを含む TBST 緩衝液でブロッキングし、調製した抗 HSP27 マウス抗血清と反応させた。二次抗体として抗マウス IgG-HRP を用い、ケミルミネッセンス反応により検出した。

(6) 組織試料の免疫染色

採取した組織は、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液(Wako)で固定した。この試料をパラフィン包埋し、薄切切片(4 μm)を作製した。脱パラフィン後、98 45 分間賦活化(イムノセイバー)し、内在性のペルオキシダーゼ活性を阻害するために 0.3%過酸化水素液処理を 30 分間行った。馬血清を含むリン酸緩衝生理的食塩水(PBS)を用いてブロッキング後、抗 HSP70 マウスモノクローナル抗体を一次抗体として、VECTASTAIN Elite ABC Mouse IgG Kit を用いてペルオキシダーゼ(DAB)染色を行った。その後、ヘマトキシリンカウンター染色し、脱水・透徹、封入した。

(7) 組織試料のアポトーシスの検出

アポトーシスを起こした細胞の特徴の一つ、クロマチン DNA のヌクレオソーム単位(185 bp)での断片化を、標識核酸の取り込みを利用した TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法で、組織学的な局在を検出するキット(In situ Apoptosis Detection kit, Takara)を用いてその方法に従って行った。

4. 研究成果

(1) 動脈管に発現する HSP70 種の特定

本研究を始めるきっかけの一つとなった、ウサギ動脈管における HSP70 の特異的発現を検出した抗体は、HSP70 の複数のファミリーメンバーも検出するモノクローナル抗体(Santa Cruz, sc-24, W27)であった。そこで、本研究では、動脈管に特異的に発現する HSP70 種を確定する実験から開始した。定量 PCR による検討

ウサギ胎仔

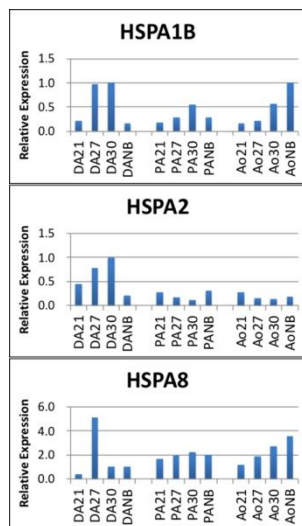


図1 HSP70 mRNA の発現

(妊娠 21, 27, 30 日目)と新生仔(生後 1 日)の動脈管(DA)、肺動脈(PA)、大動脈(Ao)における HSP70 種をコードする 3 遺伝子 *Hsp1Ab*, *HspA2*, *HspA8* の定量 PCR を実施した(図 1)。免疫染色の結果(図 4)と勘案すると、周産期の動脈管に特異的に発現する HSP70 種は、*Hsp1Ab*, *HspA2* と推定された。

大腸菌発現ウサギ HSP70 タンパク質 3 種と免疫染色に用いた抗体(W27)との反応

抗 HSP70 マウスモノクローナル抗体(W27)を 10xHis 融合ウサギ *HspA1B*, *A2*, *A8* タンパク質と反応さ

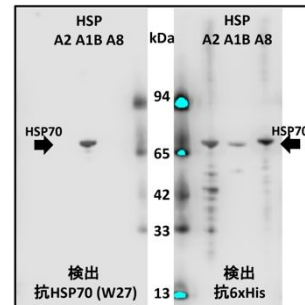


図2 大腸菌発現 3 種 HSP70 タンパク質と HSP70 抗体(W27)との反応

せたところ、*HspA1B* タンパク質のみに反応した(図 2)。同等のプロットを 10xHis 抗体で検出したところ His 融合タンパク質の発現も確認された。この結果から、家兎周産期動脈管で発現する HSP70 は *HspA1B* 遺伝子由来と考えられた(以下、*Hsp72* と記載する)。

(2) ラット及びウサギ動脈管における *Hsp72* の発現

ラット胎仔(19 日未熟, 21 日満期成熟)と新生仔(生後 1 日)の動脈管を含む大血管における *Hsp72* の発現を検討した。*Hsp72* は、満期胎仔及び新生仔の動脈管中膜に発現していることが判明した(図 3)。本研究の初頭に判明していた周産期のウサギ胎仔・新生仔の動脈管における *Hsp72* も中膜に発現しており(図 4)、この現象は種を超えて存在するこ

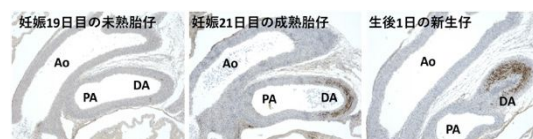


図3 ラット胎仔・新生仔における *Hsp72* の発現 成熟胎仔及び新生仔動脈管中膜に *Hsp72* が発現する。動脈管(DA)、肺動脈(PA)、大動脈(Ao)

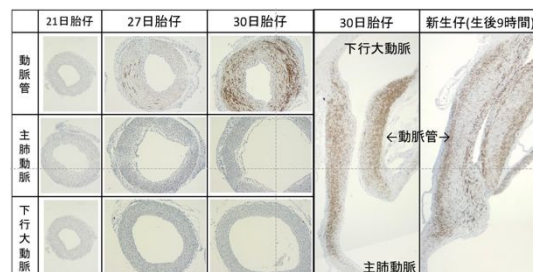


図4 家兎胎仔新生仔における HSP70 の発現 HSP70 は、満期妊娠 30 日胎仔の動脈管中膜において高発現し、新生仔の動脈管の中膜の中央部分から発現が低下する。

とが示された。

(3) 新生仔動脈管のアポトーシスと HSP70 の発現

動脈管の形質的閉鎖に伴うアポトーシスは、ウサギ新生仔では生後 1-2 日目に検出される。HSP70 種は、抗アポトーシス作用を示すとされることから、ウサギ新生仔動脈管の隣り合う薄切切片を用いてアポトーシスと Hsp72 の検出を行った (図 5)。結果は、閉鎖した動脈管の元の管腔に沿って中膜のほぼ半ばまでの領域にアポトーシスが検出 (薄茶色部分) された。Hsp72 はそのすぐ外側から外膜に到る中膜に発現 (茶色部分) していた。確定するには二重染色が必要ではあるが、Hsp72 発現細胞ではアポトーシスを生じていないように思われる。Hsp72 の抗アポトーシス作用が *in vivo* 動脈管においても、

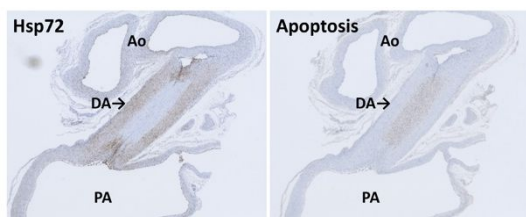


図 5 ウサギ新生仔 (生後 1 日) における Hsp72 発現とアポトーシス細胞の局在

示されたことになる。

(4) HSP70 関連遺伝子の発現を検討

HSP70 と相互作用するとされるタンパク質をコードする遺伝子の発現を、ウサギ胎仔・新生仔試料を対象として定量 PCR 法を用いて検討した。その中で、HSP72 と c-FOS 遺伝子との同期発現を発見した (図 6)。最初期転写因子の一つである c-FOS は、細胞増殖やアポトーシス制御に関わる。細胞外からの刺激に対して最初に応答して発現誘導される内因性の遺伝子の一つである。c-FOS は、c-JUN や ATF などとヘテロ複合体を形成する AP-1 転写因子であり、細胞増殖、細胞の移動、分化などに関与する。そこで、c-JUN の発現についても検討したところ、図 6 に示したように、c-FOS とは異なり、動脈管における発現は肺動脈や大動脈よりむしろ低かった。酸素刺激などを受けていない自然な状態においては、

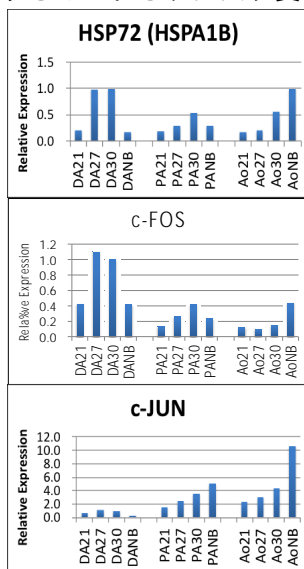


図 6 HSPA1B, c-Fos, c-JUN mRNA の発現

動脈管における c-FOS のヘテロ複合体の相手は、c-JUN ではないらしい。

c-FOS 遺伝子の発現を基点として、探索を継続したところ、多くのストレスレスポンス遺伝子が動脈管の酸素刺激により速やかに発現することを突きとめた。酸素刺激に対する動脈管特異的なシグナル伝達パスウェイをさらに明らかにしていきたい。

(5) HSP27 のリン酸化の検出

リン酸化 HSP27 は筋収縮を促進するとされる。ラット未熟、成熟胎仔、新生仔の動脈管と主肺動脈の HSP27 のリン酸化を、フォスタグ電気泳動法を用いて検討した (図 7)。成熟胎仔の動脈管と肺動脈を 95%酸素-5%炭酸ガス刺激 (O2)、95%窒素-5%炭酸ガス刺激 (N2) した試料も同時に検出した。動脈管、肺動脈のいずれも O2 及び N2 刺激により高リン酸化を示す、泳動が遅延したバンドが見られた。残念ながらリン酸化 HSP27 の検出が不良であるが、O2 動脈管に比べて N2 動脈管において、泳動が最も遅延したリン酸化バンドが明瞭である点に差が見られた。肺動脈ではこのような違いは見られなかった。

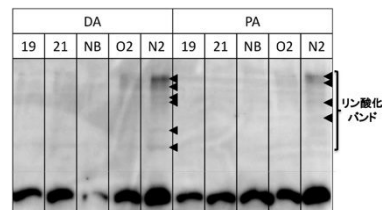


図 7 ラット未熟 (19D)、成熟 (21D) 胎仔、新生仔 (NB、生後 1 日)、動脈管 (DA)、肺動脈 (PA) におけるリン酸化 HSP27 の検出

脈を 95%酸素-5%炭酸ガス刺激 (O2)、95%窒素-5%炭酸ガス刺激 (N2) した試料も同時に検出した。動脈管、肺動脈のいずれも O2 及び N2 刺激により高リン酸化を示す、泳動が遅延したバンドが見られた。残念ながらリン酸化 HSP27 の検出が不良であるが、O2 動脈管に比べて N2 動脈管において、泳動が最も遅延したリン酸化バンドが明瞭である点に差が見られた。肺動脈ではこのような違いは見られなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)
[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽山 恵美子 (HAYAMA, Emiko)
東京女子医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 00349698

(2) 連携研究者

中西 敏雄 (NAKANISHI, Toshio)
東京女子医科大学・医学部・特任教授
研究者番号: 90120013